

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 573 080**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)  
②1 N° d'enregistrement national : **85 15676**  
⑤1 Int Cl\* : C 07 F 9/117; A 61 K 31/66; C 12 P 7/02.

①2

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 22 octobre 1985.

③0 Priorité : SE, 23 octobre 1984, n° 8405295-0.

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 20 du 16 mai 1986.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *SIREN Matti* — CH.

⑦2 Inventeur(s) : *Matti Sirén*.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Bureau D. A. Casalonga, Office Josse et  
Petit.

⑤4 Inositol-triphosphate.

⑤7 Inositol-triphosphate (IP<sub>3</sub>) choisi parmi le groupe formé  
par le D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate, le D-myo-inositol-  
1,2,5-triphosphate, le L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate et le  
myo-inositol-1,2,3-triphosphate, procédé pour le produire, et  
composition en comprenant.

FR 2 573 080 - A1

INOSITOL-TRIPHOSPHATE

La présente invention concerne un inositol-triphosphate spécial (IP<sub>3</sub>), un procédé de sa production, et une composition le contenant.

Déjà en 1900, différents chercheurs avaient décrit la découverte de l'acide phytinique, composé organique phosphaté, c'est-à-dire le 1,2,3,4,5,6-hexakis (dihydrogénéophosphate) myo-inositol (qu'on appelle encore parfois l'acide inositohexaphosphorique) dans les plantes. La teneur des différentes plantes en acide phytinique varie considérablement. La teneur des grains est habituellement d'environ 0,5-2 %, avec quelques exceptions. Le riz glacé a une teneur de seulement 0,1 %, tandis que le riz sauvage contient 2,2 % d'acide phytinique. Les haricots en contiennent environ 0,4-2 %, les plantes oléagineuses environ de 2-5 %, et le pollen, de 0,3-2 %. La teneur en acide phytinique de la plante varie durant le temps de croissance. La teneur est aussi influencée par le climat, entre autres.

Il y a dans la littérature des rapports sur la présence de l'inositol-pentaphosphate (IP<sub>5</sub>) et de l'inositol-tétraphosphate (IP<sub>4</sub>) dans quelques plantes. On sait de plus que les dérivés phosphatés inférieurs à IP<sub>6</sub> se forment à la germination des graines. Par exemple, les produits finaux à la germination sont l'inositol et le phosphate. L'emploi de IP<sub>6</sub> a été décrit dans plusieurs publications scientifiques. La majorité des auteurs de ces articles ont observé plusieurs effets négatifs chez les humains et les animaux, liés à la consommation de IP<sub>6</sub> ou de substances contenant IP<sub>6</sub>. Alimenter des chiens avec une nourriture contenant trop de IP<sub>6</sub> cause par exemple du rachitisme. Chez les humains, on a observé un manque de zinc, et en conséquence une croissance plus lente des enfants. On a observé une anémie, principalement chez les femmes. A cause des effets négatifs mentionnés ci-dessus sur le bilan minéral chez les humains et les ani-

maux, on a tenté jusqu'à présent de réduire au minimum la prise de  $IP_6$  et de ses dérivés.

En outre, on sait, par exemple par Bull. Sté. Chim. Biol. 36,9 (1956) p. 85, hydrolyser l'acide phytinique avec de l'acide chlorhydrique dilué à une température élevée pour obtenir un mélange d'inositol-phosphates inférieurs, c'est-à-dire de  $IP_5$ ,  $IP_4$ ,  $IP_3$ ,  $IP_2$  (inositol-diphosphate) et de  $IP_1$  (inositol-monophosphate). Chacun de ces inositol-phosphates peut exister sous la forme de nombreux isomères.

5  
10 On peut attendre jusqu'à 20 isomères pour  $IP_3$ .

Un isomère spécifique de  $IP_3$ , le D-myo-inositol-1,4,5-triphosphate, a été décrit dans Biochem. Biophys. Res. Commun. 120,2 (1984), page 481. Ce composé est connu comme agent de mobilisation intracellulaire du calcium dans le corps humain, et on peut facilement l'isoler à partir des membranes cellulaires.

15

On ne sait rien des propriétés de n'importe quel autre des isomères spécifiques des différents inositol-triphosphates sous forme pure. Ainsi, il est assez difficile de séparer le grand nombre d'isomères de  $IP_3$  les uns des autres, et par suite d'identifier et de définir la formule structurale de chaque isomère et ses propriétés. Jusqu'à présent, on ne connaît aucun procédé de production ou d'obtention d'un quelconque isomère isolé de  $IP_3$  autre que le susdit D-myo-inositol-1,4,5-triphosphate. De plus, dans un procédé de production de  $IP_3$  qui implique un système d'hydrolyse, un ré-arrangement des isomères et/ou une déphosphorylation plus poussée en  $IP_2$ ,  $IP_1$  ou l'inositol doivent être considérés comme des problèmes particuliers.

20  
25

A cause des difficultés mentionnées ci-dessus, il n'y a pas de données sur les isomères spécifiques de  $IP_3$  sous forme pratiquement pure autre que le susdit D-myo-inositol-1,4,5-triphosphate.

30

Selon la présente invention, et de façon tout à fait inattendue, on a pu résoudre le problème mentionné ci-

35

dessus de la séparation de certains isomères différents de  $IP_3$  les uns des autres, et de les produire sous forme pratiquement pure. Les isomères de  $IP_3$  peuvent être obtenus sous la forme d'un sel ou d'un acide. La forme de sel est préférée, puisqu'elle est plus facile à produire sous forme  
5 concentrée et pure que celle d'acide.

Selon la présente invention, un inositol-triphosphate ( $IP_3$ ), choisi parmi le groupe constitué par le D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate, le D-myo-inositol-1,2,5-  
10 triphosphate, le L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate et le myo-inositol-1,2,3-triphosphate, sous forme d'acide ou de sel, est produit et isolé sous forme pratiquement pure.

Comme mentionné ci-dessus, les isomères  $IP_3$  individualisés peuvent être obtenus sous forme de sel ou d'acide.  
15 Sous ces deux formes, ils peuvent, pour la première fois, être obtenus sous forme pratiquement pure.

Le  $IP_3$  sous forme acide est généralement fourni sous la forme d'une solution aqueuse. Dans un tel cas, la concentration de l'acide peut être de 10 à 45, de préférence  
20 de 15 à 45, et encore mieux de 20 à 45 % en poids du poids total de la solution.

On peut facilement obtenir la forme du sel de l'isomère  $IP_3$  à partir de la forme acide en utilisant des modes opératoires standard. Ainsi, on peut préparer des sels  
25 tels que les sels de métaux alcalins et les sels de métaux alcalino-terreux, par exemple de lithium, de sodium, de potassium, de calcium ou de magnésium. Cependant, les sels d'aluminium, de zinc et de fer, sont eux aussi très utiles, ainsi que les sels d'ammonium et d'amine organique. De plus,  
30 des sels mixtes contenant différents cations peuvent être utilisés.

Des exemples d'amines sont la triéthanolamine, la diéthanolamine, la triisopropanolamine, le N,N-diméthyl-2-amino-2-méthyl-1-propanol, la N,N-diméthyl-éthanolamine,  
35 la tétrabutylamine et la cyclohexylamine. D'autres sels

peuvent aussi être utiles. Sont spécialement préférés les sels qui sont physiologiquement acceptables.

Pour produire le ou les isomères de IP<sub>3</sub> selon l'invention, on peut utiliser comme  
5 matériaux de départ un ou plus des composés IP<sub>6</sub>, IP<sub>5</sub> ou IP<sub>4</sub>, ou bien un produit naturel contenant au moins l'un de ces composés. Dans les cas où le matériau de départ est un produit naturel, on en choisit de préférence un qui contient au moins 0,3 %, de préférence au moins 1 %, d'inositol-  
10 phosphate (IP<sub>6</sub> + IP<sub>5</sub> + IP<sub>4</sub>).

Des produits particulièrement convenables sont les graines, en particulier le son, les pollens, les haricots et les plantes oléagineuses. Ces produits contiennent tous du IP<sub>6</sub>.

15 On croit théoriquement que les isomères de IP<sub>3</sub> peuvent être produits par les techniques suivantes, par exemple :

- 1) dégradation enzymatique à partir de IP<sub>4</sub>, IP<sub>5</sub> et/ou IP<sub>6</sub>.
- 2) hydrolyse chimique à partir de IP<sub>4</sub>, IP<sub>5</sub> et/ou IP<sub>6</sub>.
- 20 3) synthèse chimique à partir de, par exemple, l'inositol, IP<sub>1</sub>, IP<sub>2</sub> et de phosphate.
- 4) synthèse enzymatique à partir de, par exemple, l'inositol, IP<sub>1</sub>, IP<sub>2</sub> et un phosphate.
- 5) production microbiologique (comprenant également les  
25 techniques de ADN hybride).
- 6) migration chimique ou enzymatique de l'inositol-phosphate ou hydrolyse chimique ou enzymatique d'inositol-phosphate substitué.

Une combinaison de deux ou plus des procédés  
30 mentionnés ci-dessus peut aussi être possible. Cependant, beaucoup de ces procédés ne produisent que des mélanges d'un certain nombre d'isomères qui sont au mieux extrêmement difficiles à séparer en isomères individualisés, si toutefois on peut les séparer.

Selon l'invention, on préfère un procédé dans lequel on utilise un matériau contenant  $IP_6$ , comme on l'a mentionné auparavant. Puis  $IP_6$  est dégradé par voie enzymatique en  $IP_3$ , à l'aide de l'enzyme phytase. L'enzyme phytase est normalement présente dans toutes les plantes et graines contenant de l'inositol-phosphate. C'est pourquoi, selon l'invention, il n'est habituellement pas nécessaire d'ajouter d'enzyme si on utilise un produit naturel comme matériau de départ. Dans les cas où le produit naturel a une activité enzymatique trop basse ou bien quand on utilise comme matériau de départ  $IP_6$ ,  $IP_5$ , ou  $IP_4$ , ou bien un mélange de ceux-ci, on ajoute une enzyme phytase provenant du son, par exemple.

L'enzyme phytase provenant de plantes, de graines, et de micro-organismes, a l'effet surprenant de rendre possible, selon l'invention, la production des isomères  $IP_3$  spécifiques mentionnés ci-dessus en forte concentration et sous forme pratiquement pure.

Le  $IP_6$  peut être fourni soit sous forme de matériau pur, soit sous forme d'un produit source contenant du  $IP_6$ . Une manière convenable de traiter un matériau de départ naturel contenant  $IP_6$ , par exemple le son, est de le pré-traiter, par exemple par dégradation ou élimination de la membrane extérieure, et élimination des constituants non désirés. Ensuite, on trempe le matériau dans l'eau afin de rendre l'inositol-phosphate disponible pour la dégradation et d'activer l'enzyme. Quand de l'enzyme supplémentaire est nécessaire, elle peut être ajoutée à cette étape ou à une étape ultérieure. On laisse ensuite agir l'enzyme pendant aussi longtemps que nécessaire pour que soit atteint le degré désiré d'hydrolyse.

L'hydrolyse a lieu à une température convenable, habituellement de 20-70°C, de préférence de 30-60°C, et à un pH de 4 à 8. Afin d'arrêter l'hydrolyse au niveau désiré, l'enzyme peut être détruite ou inactivée, par exemple par un

rapide chauffage du matériau de départ hydrolysé. Afin de donner au matériau une forme stable au stockage, on peut convenablement le lyophiliser.

L'invention concerne spécialement un procédé de production d'un inositol-triphosphate (IP<sub>3</sub>) choisi parmi le groupe constitué par le D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate, le D-myo-inositol-1,2,5-triphosphate, le L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate et le myo-inositol-1,2,3-triphosphate, sous forme d'acide ou de sel, dans lequel un matériau contenant IP<sub>6</sub> est mis à l'incubateur à une température comprise entre 20 et 70°C, de préférence comprise entre 30 et 50°C, et à un pH de 4 à 8, avec de la phytase jusqu'à ce que soit accomplie la libération d'environ 30-60 %, habituellement environ 50 %, du phosphore total de l'ester. Audit stade, une forte proportion de l'isomère IP<sub>3</sub> ou des isomères IP<sub>3</sub> désirés s'est formée par hydrolyse du matériau contenant IP<sub>6</sub>.

On peut ensuite séparer le mélange d'inositol-phosphates obtenu par chromatographie sur colonne afin d'isoler la fraction contenant IP<sub>3</sub>. En cas de séparation chromatographique, ladite fraction est ensuite éventuellement soumise à une autre séparation chromatographique, de préférence dans une colonne. Une telle séparation peut présenter des avantages si la fraction contient plus d'un isomère IP<sub>3</sub>. Le ou les isomères IP<sub>3</sub> sont ensuite de préférence isolés sous forme acide. En ajoutant une base à l'acide, on peut obtenir, si on le désire, IP<sub>3</sub> sous forme de sel.

Parmi les nombreuses sources de phytase utile selon l'invention, on préfère la levure, et encore plus la levure de boulanger. La levure de boulanger suédoise, produite par Jästbolaget, en Suède, ainsi que la levure de boulanger produite par Rajamäki, en Finlande, et par Hefefabriken AG, en Suisse, ont par exemple été utilisées selon la présente invention. On a établi que, de façon très surprenante, quand on utilise une telle levure, on n'obtient pratiquement qu'un seul isomère, le D-myo-inositol-

1,2,6-triphosphate. Bien sûr, l'utilisation de levure est un procédé très intéressant quand seul ledit isomère est désiré.

5 Dans l'état actuel des connaissances, aucune autre méthode ne fournit un produit constitué d'un seul isomère. On obtient habituellement un mélange d'un grand nombre d'isomères.

10 Le procédé mentionné ci-dessus, avec les modifications appropriées, peut aussi être utilisé quand on utilise comme matériau de départ un ou plusieurs des composés  $IP_6$ ,  $IP_5$  ou  $IP_4$  eux-mêmes.

15 Selon un autre mode de réalisation, l'invention concerne également une composition d'inositol-phosphate, constituée de D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate, et d'au moins l'un des D-myo-inositol-1,2,5-triphosphate, L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate et myo-inositol-1,2,3-triphosphate, sous forme d'acide ou de sel. La composition contient habituellement 20-99,5, de préférence 30-99,5 % en poids dudit  $IP_3$ . La teneur en D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate se trouve dans le domaine allant de 50-100 % en poids, sur la base de la teneur totale en lesdits inositol-triphosphates, le reste comprenant les inositol-phosphates autres que  $IP_3$ .

25 Quelquefois, il peut être préférable que dans la composition, le  $IP_3$  consiste essentiellement en du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate seul.

En plus de  $IP_3$ , le reste de la composition d'inositol-phosphate peut contenir également des inositol-tétraphosphates ( $IP_4$ ) et des inositol-diphosphates ( $IP_2$ ).

30 La composition peut comprendre 20-99,5 %, de préférence plus de 60 %, en poids de  $IP_3$ , et 80-0,5 %, de préférence moins de 40 %, en poids d'autres inositol-phosphates. 40-85 %, de préférence 50-85 %, en poids desdits autres inositol-phosphates doivent ensuite être  
35 constitués de  $IP_2$  et de  $IP_4$ . Il peut être préférable que

IP<sub>3</sub> soit constitué essentiellement par du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate.

La composition contient quelquefois des quantités mineures, par exemple moins de 10 %, de préférence 1-8 %, en poids de un ou plusieurs IP<sub>1</sub> et IP<sub>6</sub>, calculés sur la base de la teneur totale en inositol-phosphates de la composition.

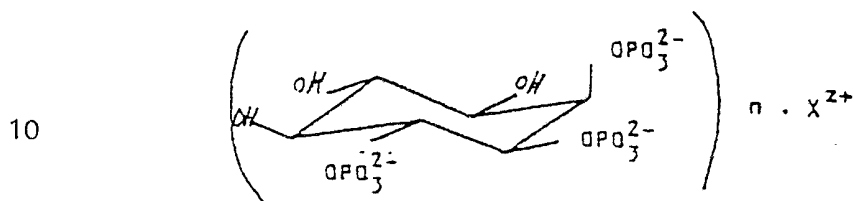
On peut préparer de tels types de compositions en enrichissant le produit d'inositol-phosphate de fermentation initiale par addition du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate jusqu'à obtenir la concentration finale désirée dudit isomère dans la composition. De telles méthodes sont bien connues dans le domaine et consistent par exemple en un simple mélange mécanique. D'une autre façon, cette composition peut être produite directement par fermentation en utilisant de la levure, spécialement de la levure de boulanger, comme source de phytase. Comme on l'a précédemment indiqué, l'emploi de levure de boulanger a pour résultat la production presque exclusive de D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate, c'est-à-dire que presque toute la fraction de IP<sub>3</sub> est constituée de D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate.

L'inositol-triphosphate sous forme d'acide ou de sel selon l'invention peut être employé comme médicament ou comme produit alimentaire, éventuellement sous forme d'adjuvant ou comme stabilisant pour divers produits. En outre, IP<sub>3</sub> peut exercer un effet protecteur sur les semences. On peut aussi l'employer comme adjuvant pour une pâte dentifrice, comme agent inhibiteur de corrosion dans les peintures, les laques, les huiles lubrifiantes, et en traitement de surface des métaux, comme composant dans un agent d'assainissement, comme agent ignifuge, pour des applications lithographiques, pour l'inhibition de la production par exemple d'aflatoxine dans les micro-organismes, et pour une modification ou une augmentation de l'activité enzymatique de l'amylase, par exemple.

La composition d'inositol-phosphate, produite soit directement par fermentation, soit par enrichissement, comme décrit précédemment, est utile dans toutes les applications mentionnées ci-dessus.

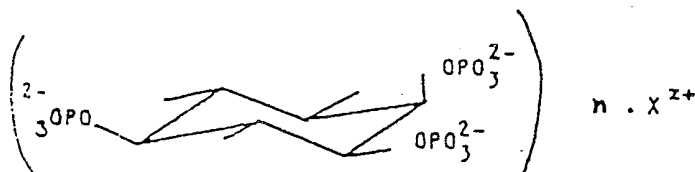
5 Les isomères de  $IP_3$  mentionnés ci-dessus ont les formules suivantes :

le D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate de formule



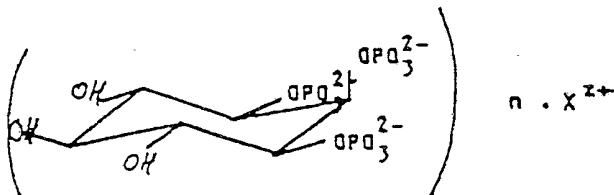
où X est l'hydrogène, au moins un cation univalent, divalent ou multivalent, ou un mélange de ceux-ci, n est le nombre d'ions, et z est la charge des ions respectifs ;

15 le D-myo-inositol-1,2,5-triphosphate de formule.



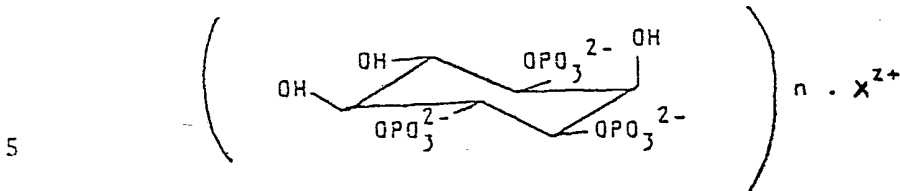
20 où X, n et z ont les significations mentionnées ci-dessus ;

le myo-inositol-1,2,3-triphosphate de formule



où X, n et z ont les significations mentionnées ci-dessus ; et

le L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate de formule



où X, n et z ont les significations mentionnées ci-dessus ;

Dans chacune des formules ci-dessus, n est compris entre 6 et 1 inclusivement, et z est compris entre 1 et 6 inclusivement. De préférence, n est compris entre 3 et 6 inclusivement et z est 3, 2 ou 1.

Les nouveaux isomères de  $IP_3$  de la présente invention sont particulièrement efficaces dans l'utilisation thérapeutique citée ci-dessus, et ils sont pratiquement dénués de tous effets secondaires indésirables dans cet emploi. En particulier, le D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate est particulièrement efficace, et il présente un degré d'activité supérieur par comparaison avec les autres isomères, spécialement le D-myo-inositol-1,4,5-triphosphate.

20 Les complexes formés par le D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate avec le cadmium sont considérablement plus stables que les complexes du cadmium formés par, par exemple, le D-myo-

inositol-1,4,5-triphosphate. Dans une moindre mesure, le D-myo-inositol-1,2,5-triphosphate, le L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate et le myo-inositol-1,2,3-triphosphate, sont aussi plus souhaitables pour l'emploi thérapeutique que le D-myo-inositol-1,4,5-triphosphate pour un grand nombre des mêmes raisons.

L'invention sera expliquée de façon plus approfondie en liaison avec les exemples de réalisation ci-dessous et les figures et tableaux joints. Les exemples 1 et 2 montrent une hydrolyse du phytate de sodium avec la phytase de blé et le fractionnement d'un mélange d'inositol-phosphates. Les exemples 3 et 4 concernent la détermination de la structure des isomères de  $IP_3$ . L'exemple 5 illustre la détermination des valeurs de pKa de  $IP_3$ . L'exemple 6 montre la détermination des constantes relatives de liaison pour  $IP_3$  avec Ca, Zn, et Cd, respectivement. Les exemples 7-10 concernent des modes opératoires de traitement des sels de calcium des isomères de  $IP_3$  de l'invention. L'exemple 11 illustre le spectre infrarouge du sel de calcium du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphates. Les exemples 12 et 13 montrent une hydrolyse du phytate de sodium avec du son de blé, et le fractionnement d'un mélange des inositol-phosphates obtenus. L'exemple 14 concerne un mode opératoire de traitement du sel de zinc du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate. Les exemples 15-17 montrent l'hydrolyse du phytate de sodium avec de la levure de boulanger, le fractionnement du mélange d'inositol-phosphates obtenu, et la détermination de l'isomère isolé de  $IP_3$  obtenu.

L'exemple 18 illustre un mode opératoire de traitement du sel de sodium du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate. L'exemple 19 montre une hydrolyse chimique du phytate de sodium avec l'acide chlorhydrique, et le fractionnement du mélange d'inositol-phosphates obtenu. L'exemple 21 concerne la synthèse chimique d'inositol-phosphates, à partir d'acide polyphosphorique et de myo-inositol, et la détermination

structurale de  $IP_3$  par RMN-H. L'exemple 21 montre l'hydrolyse de l'acide phytique dans le son de riz, l'extraction et l'analyse des inositol-phosphates obtenus. L'exemple 22 concerne la caractérisation de différents sels de D-myoinositol-1,2,6-triphosphate. L'exemple 23 montre que  $IP_3$  prévient l'augmentation de l'agrégation des plaquettes dans les humains provoquée par le fait de fumer. Dans l'exemple 24, on montre qu'une glycémie accrue chez les souris, provoquée par des radicaux libres, peut être contrecarrée par l'injection de  $IP_3$ .

#### Exemple 1

Hydrolyse du phytate de sodium avec la phytase de blé, et fractionnement d'un mélange d'inositol-phosphates.

Une quantité de 1,6 g de phytate de sodium (provenant de maïs, Sigma Chemical Co) est dissoute dans 650 ml de tampon d'acétate de sodium, à pH 5,2. On y ajoute 2,7 g de phytase de blé (EC 3.1.3.26, 0,015 U/mg, Sigma Chemical Co), et le mélange est mis à l'incubateur à 38°C.

La déphosphorylation est suivie de la détermination du phosphore inorganique libéré. Après 3 heures, quand 50 % du phosphore inorganique est libéré, on arrête l'hydrolyse en ajoutant 30 ml d'ammoniac à pH 12. On obtient un mélange liquide contenant les inositol-phosphates.

On fait passer 350 ml du mélange sur une colonne échangeuse d'ions (Dowex 1, forme chlorure, 25 mm x 250 mm), et on élue avec un gradient linéaire d'acide chlorhydrique (0-0,7 N HCl). On hydrolyse complètement des parties aliquotes des fractions éluées afin de déterminer les teneurs en phosphore et en inositol. La figure 1 montre les variations de la quantité de phosphore en fonction du volume élué. Les pics correspondent à différents inositol-phosphates, c'est-à-dire qu'un pic présentant un rapport du phosphore à l'inositol de trois à un correspond à l'inositol-triphosphate, etc. On obtient deux fractions présentant un rapport du phosphore à l'inositol de trois à un.

Exemple\_2

Fractionnement des inositol-triphosphates.

On neutralise 100 ml de la première fraction obtenue dans l'exemple 18 présentant un rapport phosphore/inositol de trois/un et on précipite à l'état de sel de baryum, après addition, en excès de 10 %, d'une solution d'acétate de baryum 0,1 M. On dissout 600 mg du sel précipité dans 50 ml d'acide chlorhydrique dilué. On sépare la solution sur une colonne échangeuse d'ions (Dowex 1, forme chlorure, 25 mm x 2500 mm) avec de l'acide chlorhydrique dilué comme éluant. On analyse des parties aliquotes des fractions éluées pour en déterminer la teneur en phosphore. La figure 2 indique les variations de la quantité de phosphore, en fonction du volume élué. On peut voir sur la figure trois pics constitués par les inositol-triphosphates isomères.

Exemple\_3

Détermination de la structure des inositol-triphosphates isomères par RMN-H.

Les trois pics obtenus dans l'exemple 2 sont analysés par RMN-H. Les spectres sont représentés sur la figure 3 a, b et c. Les données montrent que les pics sont constitués par le myo-inositol-1,2,6-triphosphate, le myo-inositol-1,2,3-triphosphate et le myo-inositol-1,3,4-triphosphate, respectivement.

La seconde fraction obtenue dans l'exemple 1 et présentant un rapport phosphore/inositol de trois/un est analysée par RMN-H. Le spectre est représenté sur la figure 4. Les données montrent que cette fraction est constituée par du myo-inositol-1,2,5-triphosphate. Dans cet exemple de réalisation, ainsi que dans tous les exemples suivants où l'on utilise la RMN-H, l'appareil de RMN-H est un spectromètre Nicolet 360 WB. Le standard interne est du tétraméthylsilane.

Exemple 4

Détermination des isomères optiques des inositol-triphosphates.

20 mg des composés déterminés par RMN-H selon  
5 l'exemple 3 comme étant le myo-inositol-1,2,6-triphosphate  
et le myo-inositol-1,3,4-triphosphate sont encore chromato-  
graphiés sur une colonne chirale à base de cellulose acétylée  
(20 mm x 300 mm, Merck), avec un mélange d'éthanol et d'eau  
comme éluant. On analyse les fractions avec un polarimètre.  
10 Comme on peut le voir sur la figure 5, chaque composé con-  
siste en un isomère optique, le D-myo-inositol-1,2,6-tri-  
phosphate et le L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate, respec-  
tivement.

Exemple 5

15 Détermination des valeurs de pKa pour des inositol-  
triphosphates.

Une quantité de 10 ml de la première fraction  
obtenue dans l'exemple 1 présentant un rapport phosphore/  
inositol de trois/un est dosée avec NaOH 0,01 M. On mesure  
20 avec une électrode le pH au cours du dosage. La figure 6  
représente les variations de pH en fonction du volume de  
NaOH.

On obtient les valeurs suivantes de pKa :

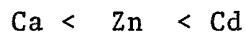
25 pKa1 = 4,7  
pKa2 = 7,5.

Exemple 6

Détermination des constantes relatives de forma-  
tion de complexes entre les inositol-triphosphates et le  
calcium, le zinc et le cadmium, respectivement.

30 Une quantité de 10 ml de la première fraction  
obtenue dans l'exemple 1 présentant un rapport phosphore/  
inositol de trois/un, est dosée avec NaOH 0,01 M en présence

de 0,2 mM d'ions calcium, d'ions zinc et d'ions cadmium, respectivement. Une tendance plus grande à la formation d'un complexe entre le métal et l'inositol-triphosphate a pour résultat l'abaissement de la valeur de pH pour un certain volume de NaOH ajouté. Comme on peut le voir sur la figure 7, les constantes de formation de complexes entre un métal et  $IP_3$  augmentent dans l'ordre suivant :



#### Exemple 7

10 Procédé de préparation du sel de calcium du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate.

100 ml de la fraction contenant le D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate obtenu dans l'exemple 2 sont neutralisés à un pH d'environ 7 avec une solution aqueuse de  $Ca(OH)_2$ .  
15 Le sel de calcium est précipité par addition de 100 ml d'éthanol. Le précipité est centrifugé, recristallisé, et séché sous vide.

La structure du sel de calcium purifié du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate obtenu est confirmée par analyse par RMN-H.  
20

Le sel de calcium du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate recristallisé ci-dessus est aussi analysé chimiquement pour déterminer la teneur en carbone, en phosphore, en oxygène, et en calcium. Le tableau 1 indique les résultats. La formule du sel est  $Ca_3IP_3$ .  
25

#### Exemple 8

Procédé de préparation du sel de calcium du L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate.

100 ml de la fraction contenant le L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate obtenu dans l'exemple 2 sont neutralisés à un pH d'environ 7 avec une solution aqueuse de  $Ca(OH)_2$ .  
30 Le sel de calcium est précipité par addition de 100 ml

d'éthanol. Le précipité est centrifugé, recristallisé, et séché sous vide.

5 La structure du sel de calcium purifié du L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate obtenu est confirmée par analyse par RMN-H.

10 Le sel de calcium du L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate recristallisé ci-dessus est aussi analysé chimiquement pour déterminer la teneur en carbone, en phosphore, en oxygène, et en calcium. Le tableau 1 indique les résultats. La formule du sel est  $\text{Ca}_3\text{IP}_3$ .

#### Exemple 9

Procédé de préparation du sel de calcium du myo-inositol-1,2,3-triphosphate.

15 100 ml de la fraction contenant le myo-inositol-1,2,3-triphosphate obtenu dans l'exemple 2 sont neutralisés à un pH d'environ 7 avec une solution aqueuse de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Le sel de calcium est précipité par addition de 100 ml d'éthanol. Le précipité est centrifugé, recristallisé, et séché sous vide.

20 La structure du sel de calcium purifié du myo-inositol-1,2,3-triphosphate obtenu est confirmée par analyse par RMN-H.

25 Le sel de calcium du myo-inositol-1,2,3-triphosphate recristallisé ci-dessus est aussi analysé chimiquement pour déterminer la teneur en carbone, en phosphore, en oxygène, et en calcium. Le tableau 1 indique les résultats. La formule du sel est  $\text{Ca}_3\text{IP}_3$ .

#### Exemple 10

30 Procédé de préparation du sel de calcium du D-myo-inositol-1,2,5-triphosphate.

100 ml de la fraction contenant le D-myo-inositol-1,2,5-triphosphate obtenu dans l'exemple 2 sont neutralisés à un pH d'environ 7 avec une solution aqueuse de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Le sel de calcium est précipité par addition de 100 ml d'éthanol. Le précipité est centrifugé, recristallisé, et séché sous vide.

La structure de sel de calcium purifié du D-myo-  
5 inositol-1,2,5-triphosphate obtenu est confirmée par analyse par RMN-H.

Le sel de calcium du D-myo-inositol-1,2,5-tri-  
phosphate recristallisé ci-dessus est aussi analysé chimi-  
quement pour déterminer la teneur en carbone, en phosphore,  
10 en oxygène, et en calcium. Le tableau 1 indique les résultats. La formule du sel est  $\text{Ca}_3\text{IP}_3$ .

#### Exemple 11

Spectre infrarouge (IR) du sel de calcium du  
D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate.

15 Le sel de calcium purifié du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate obtenu dans l'exemple 7 est analysé par IR.

Les bandes caractéristiques sont :

20 3500  $\text{cm}^{-1}$  - OH  
2900  $\text{cm}^{-1}$  - CH  
1600  $\text{cm}^{-1}$  - OH  
1100  $\text{cm}^{-1}$  - C-O et -P  
1000  $\text{cm}^{-1}$  - C-O et -P  
800  $\text{cm}^{-1}$  - C-C

#### Exemple 12

25 Hydrolyse du phytate de sodium avec du son de blé, et fractionnement d'un mélange d'inositol-phosphates.

Une quantité de 10 g de phytate de sodium (provenant de maïs, Sigma Chemical Co) est dissoute dans 500 ml d'une solution tampon d'acétate de sodium à pH 5,0. Tout  
30 en augmentant la température à 37°C, on ajoute du son de blé (10 g) sous agitation. L'incubation commence et continue à 37°C. La déphosphorylation est suivie du dosage du phosphore inorganique libéré. L'hydrolyse est arrêtée par

addition de 100 ml d'ammoniac après 2 heures, quand 50 % du phosphore inorganique a été libéré. La suspension obtenue est centrifugée, et le surnageant est recueilli.

On fait passer 300 ml du surnageant à travers une  
5 colonne échangeuse d'ions (Dowex 1, forme chlorure, 25 mm x 250 mm) et on élue avec un gradient linéaire d'acide chlorhydrique (0-0,7 N HCl). On hydrolyse complètement des parties aliquotes des fractions éluées afin de déterminer les teneurs en phosphore et en inositol. On recueille deux  
10 fractions présentant un rapport phosphore/inositol de trois/un ( $IP_3$ ).

#### Exemple 13

Fractionnement des inositol-triphosphates.

On utilise la même méthode que celle décrite  
15 dans l'exemple 2, excepté que la première fraction recueillie dans l'exemple 12 est chromatographiée. On obtient trois pics, et on analyse les produits correspondants par RMN-H. Les produits sont le myo-inositol-1,2,6-triphosphate, le myo-inositol-1,2,3-triphosphate et le myo-inositol-1,3,4-  
20 triphosphate, respectivement.

#### Exemple 14

Procédé de préparation du sel de zinc du D-myo-  
inositol-1,2,6-triphosphate.

100 ml de la fraction contenant le D-myo-inositol-  
25 1,2,6-triphosphate obtenu dans l'exemple 13 sont neutralisés, à une valeur de pH d'environ 7, avec une solution aqueuse de ZnO. Le sel de zinc est précipité par addition de 100 ml d'éthanol. Le précipité est centrifugé, recristallisé, et séché sous vide. Le sel de zinc recristallisé ci-dessus du  
30 D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate est aussi chimiquement analysé afin d'en déterminer la teneur en carbone, en phosphore, en oxygène, et en zinc. Le tableau 1 reproduit les résultats. La formule du sel est  $Zn_3IP_3$ .

Exemple 15

Hydrolyse de phytate de sodium avec de la levure de boulanger et fractionnement d'un mélange d'inositol-phosphates.

5 On dissout une quantité de 0,7 g de phytate de sodium (provenant de maïs, Sigma Chemical Co) dans 600 ml d'un tampon d'acétate de sodium à pH 4,6. On ajoute, tout en agitant, 50 g de levure de boulanger provenant de Jästbolaget, Suède (substances sèches : 28 %, teneur en azote : 2 % ;  
10 teneur en phosphore:0,4%). On commence et on continue l'incubation à 45°C. La déphosphorylation est suivie du dosage du phosphore inorganique libéré. Après 7 heures, quand 50 % du phosphore organique est libéré, on arrête l'hydrolyse en ajoutant 30 ml d'ammoniac à pH 12. On centrifuge la suspension, et on  
15 recueille le surnageant.

On fait passer 400 ml du surnageant sur une colonne échangeuse d'ions (Dowex 1, forme chlorure, 25 mm x 250 mm) et on élue avec un gradient linéaire d'acide chlorhydrique (0-0,7 N HCl).

20 On hydrolyse complètement des parties aliquotes des fractions éluées afin de déterminer leur teneur en phosphore et en inositol. La figure 8 représente la variation de la quantité de phosphore en fonction du volume élué. Les pics correspondent à différents inositol-phosphates; c'est-  
25 à-dire qu'un pic avec un rapport du phosphore à l'inositol de trois à un correspond aux inositol-triphosphates, etc.

Exemple 16

Détermination de la structure des inositol-triphosphates isomères.

30 La fraction obtenue dans l'exemple 15 présentant un rapport phosphore/inositol de trois/un est neutralisée et évaporée avant une analyse par RMN-H. Le spectre s'avère identique à celui indiqué dans la figure 3a. Les données montrent que le pic consiste en du myo-inositol-1,2,6-tri-  
35 phosphate.

Exemple 17

Détermination des isomères optiques du myo-  
inositol-triphosphate.

On a utilisé la même méthode que celle décrite  
5. dans l'exemple 4, à la différence que 10 mg du composé  
déterminé par RMN selon l'exemple 16 sont analysés. Comme on  
peut le voir sur la figure 9, le composé est constitué d'un  
seul isomère optique, le D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate.  
Ledit isomère peut se ré-arranger en L-myo-inositol-1,3,4-  
10 triphosphate, par traitement avec un acide tel que l'acide  
chlorhydrique.

Exemple 18

Procédé de préparation du sel de sodium du D-myo-  
inositol-1,2,6-triphosphate.

15 100 ml de la fraction contenant le D-myo-inositol-  
1,2,6-triphosphate obtenu dans l'exemple 15 sont neutralisés  
à un pH d'environ 7, avec une solution aqueuse de NaOH.  
Après addition de 100 ml d'éthanol, le volume de la solution  
est réduit par évaporation, et le sel de sodium est préci-  
20 pité, centrifugé, recristallisé, et séché sous vide. La  
structure du sel de sodium purifié du D-myo-inositol-1,2,6-  
triphosphate obtenu est confirmée par analyse en RMN-H.

On a aussi analysé chimiquement le sel de sodium  
recristallisé du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate, afin  
25 d'en déterminer les teneurs en carbone, phosphore, oxygène,  
et sodium. Le tableau 1 reproduit les résultats. La formule  
du sel est  $\text{Na}_6\text{IP}_3$ .

Exemple 19

30 Hydrolyse chimique du phytate de sodium, et  
fractionnement d'un mélange d'inositol-phosphates.

Une quantité de 1,0 g de phytate de sodium (pro-  
venant de maïs, Sigma Chemical Co) est dissoute dans 15 ml  
de HCl 6 N. L'échantillon est chauffé sous vide dans un tube

scellé, dans un four (105°C) pendant 5 heures. Après ce laps de temps, 34 % du phosphore inorganique a été libéré.

On neutralise 5 ml du mélange liquide à pH 7 avec une solution aqueuse de NaOH, et on le fait passer sur une  
5 colonne échangeuse d'ions (Dowex 1, forme chlorure 10 mm x 150 mm) et on élue avec un gradient linéaire d'acide chlorhydrique (HCl 0-0,7 N). Des parties aliquotes des fractions éluées sont complètement hydrolysées afin d'en déterminer les teneurs en phosphore et en inositol. La figure 10  
10 représente la variation de la quantité de phosphore en fonction du volume élué. La fraction présentant un rapport phosphore/inositol de trois/un est recueillie. Le spectre de RMN-H indique un nombre substantiel de produits isomères.

#### Exemple 20

15 Synthèse chimique d'inositol-phosphates.

On introduit de l'acide polyphosphorique (80 %  $P_2O_5$ , 3,5 g) dans un flacon à bouchon de verre, et on chauffe à 150°C. On ajoute 0,2 g de myo-inositol, et on maintient le mélange à ladite température pendant 2 heures, jusqu'à ce  
20 qu'on le neutralise à pH 7 avec une solution aqueuse de NaOH. On précipite la composition obtenue sous forme d'un sel de baryum après addition d'un excès de 10 % d'une solution d'acétate de baryum 0,1 M.

On transforme 20 mg du sel de baryum en la forme  
25 acide par addition d'acide chlorhydrique dilué, et on analyse par HPLC. L'appareil d'analyse est étalonné avec des inositol-phosphates connus. La figure 11 représente les chromatogrammes. On recueille la fraction déterminée comme étant l'inositol-triphosphate.

30 Le spectre RMN-H indique un nombre substantiel de produits isomères.

Exemple\_21

On met en suspension 1,0 kg de son de riz, contenant environ 1 % d'inositol-hexaphosphate ( $IP_6$ ) dans 10 l d'une solution tampon d'acétate de sodium à pH 5 à 25°C. Après 4 heures, après libération de 50 % du phosphore inorganique, on enlève la boue et on ajoute un litre de HCl 2 M. On secoue la suspension pendant 1 heure, et on la centrifuge ensuite. On neutralise le surnageant à pH 7 avec une solution aqueuse de  $Ca(OH)_2$ . On obtient un précipité en ajoutant 5 l d'éthanol. Le sel de calcium, constitué par un mélange de différents inositol-phosphates, est centrifugé, séché, et recristallisé. 20 mg du sel de calcium recristallisé sont transformés en la forme acide, par addition d'acide chlorhydrique dilué, et sont analysés par HPLC. Le mélange est constitué de 40 % d'inositol-triphosphate, dont 70 % de D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate. Le reste est constitué d'autres inositol-phosphates.

Exemple\_22

Caractérisation des différents sels de D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate.

On partage en 7 portions 70 ml de la fraction présentant un rapport phosphore/inositol de trois/un obtenu dans l'exemple 15. Après avoir ajusté le pH avec NaOH 0,1 M, on ajoute différents cations sous forme de chlorure, un ion à chaque portion. Les sels utilisés sont  $FeCl_3$ ,  $MgCl_2$ ,  $AlCl_3$ , KCl,  $NH_4Cl$ ,  $(CH_3CH_2CH_2CH_2)_4N^+ Cl^-$  et  $C_6H_{13}NH_3Cl$ , respectivement.

Après addition de 10 ml d'éthanol, des précipités se forment. On recristallise les sels, et on les analyse pour en déterminer les teneurs en phosphore, carbone, oxygène, et métal, après recristallisation. Le tableau 1 ci-dessous indique la composition des sels purifiés.

Exemple\_23

On étudie l'effet de  $IP_3$  sur l'agrégation des plaquettes après inhalation de fumée de tabac chez les humains.

On administre en deux occasions, à quatre jeunes mâles non-fumeurs en bonne santé, une capsule contenant 50 mg de  $IP_3$  ou 50 mg d'un placebo. Le  $IP_3$  utilisé est le sel de calcium du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate. Ni le sujet ni l'expérimentateur ne connaissent quels sujets reçoivent  $IP_3$  ou le placebo.

Deux heures après l'ingestion de la capsule, on prélève un échantillon de sang. Les sujets fument ensuite deux cigarettes d'affilée. On prélève un second échantillon de sang après qu'ils aient fumé. On détermine les réponses d'agrégation des plaquettes à ADP et au collagène dans les deux échantillons, en utilisant pratiquement la même procédure que dans l'exemple 1. Les résultats sont exprimés sous la forme des variations dans l'agrégation de l'échantillon avant à l'échantillon après l'inhalation de fumée. Un signe plus indique que l'agrégation est plus importante après inhalation de fumée.

	Agent d'agrégation	Concentration de l'agent d'agrégation	$IP_3$	Placebo	Différence entre $IP_3$ et placebo
20	ADP	0,5 mmol	+ 1,5	+ 7,25	5,85
	"	1 mmol	- 1,5	+ 0,25	1,75
	"	2,5 mmol	- 1,5	0	1,5
	"	5 mmol	- 2,5	- 0,75	1,75
25	Collagène	0,5 mg	+ 5,15	+12,25	6,5
	"	1 mg	- 8,25	+ 1,75	10,0
	"	2,5 mg	- 3,75	0	3,75
	"	5 mg	- 1,5	- 0,25	1,25

Dans le groupe ayant reçu le placebo, l'inhalation de fumée cause une augmentation de l'agrégation, qui est la plus marquée pour des concentrations faibles des agents

d'agrégation. Dans tous les cas, cet effet est contrecarré par  $IP_3$ . Ainsi,  $IP_3$  prévient l'augmentation de l'agrégation des plaquettes causée par l'inhalation de fumée.

Exemple 24

5 On injecte par voie intrapéritonéale à des souris (10 dans chaque groupe) du  $IP_3$  (sel de sodium du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate) à trois doses différentes, ou bien de l'eau physiologique. 30 minutes après cette injection, toutes les souris excepté un groupe de contrôle reçoivent une  
10 injection intraveineuse d'alloxane, 50 mg/kg, dans de l'eau physiologique.

Les animaux sont mis à la diète pendant 12 heures avant l'injection d'alloxane, et pendant une heure après. 72 heures après l'injection d'alloxane, on analyse un échantillon de sang des souris pour déterminer leur glycémie.  
15 résultats sont les suivants :

	Dose de $IP_3$ mg/kg	Dose d'alloxane mg/kg	Glycémie
	-----	-----	-----
	0	0	216
20	0	50	864
	800	50	857
	1600	50	677

L'alloxane provoque un diabète et augmente la glycémie en favorisant les réactions de radicaux libres dans  
25 les cellules produisant l'insuline. Avec  $IP_3$ , la glycémie décroît en fonction de la dose, et la dose la plus élevée protège quelque peu l'alloxane.

Tableau 1 : Formules chimiques des différents sels de IP<sub>3</sub>

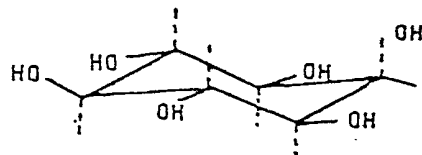
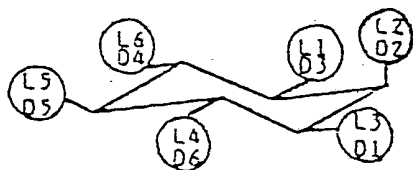
Composé	Analyse élémentaire					Formule
	Me %	C %	O %	P %	N %	
5 Sel de calcium de 1,2,6-IP <sub>3</sub>	Ca: 22,0	14,1	44,2	17,1	--	Ca <sub>3</sub> IP <sub>3</sub>
Sel de calcium de 1,3,4-IP <sub>3</sub>	Ca: 21,4	13,8	42,9	16,3	--	Ca <sub>3</sub> IP <sub>3</sub>
Sel de calcium de 1,2,3-IP <sub>3</sub>	Ca: 22,7	12,9	45,6	18,2	--	Ca <sub>3</sub> IP <sub>3</sub>
10 Sel de calcium de 1,2,5-IP <sub>3</sub>	Ca: 23,2	13,3	44,7	16,9	--	Ca <sub>3</sub> IP <sub>3</sub>
Sel de zinc de 1,2,6-IP <sub>3</sub>	Zn: 31,5	12,1	38,2	14,7	--	Zn <sub>3</sub> IP <sub>3</sub>
15 Sel de sodium 1,2,6-IP <sub>3</sub>	Na: 23,1	12,8	44,6	15,8	--	Na <sub>6</sub> IP <sub>3</sub>
Sel de fer de 1,2,6-IP <sub>3</sub>	Fe: 21,5	13,1	43,4	18,2	--	Fe <sub>2</sub> IP <sub>3</sub>
20 Sel de potassium et de magnésium de 1,2,6-IP <sub>3</sub>	K: 27,5 Mg: 3,8	11,3	38,7	14,1	--	K <sub>4</sub> MgIP <sub>3</sub>
Sel de magnésium de 1,2,6-IP <sub>3</sub>	Mg: 15,8	16,0	50,8	18,9	--	Mg <sub>3</sub> IP <sub>3</sub>
Sel d'aluminium de 1,2,6-IP <sub>3</sub>	Al: 12,6	15,8	53,3	21,2	--	Al <sub>2</sub> IP <sub>3</sub>
25 Sel d'ammonium de 1,2,6-IP <sub>3</sub>	--	13,1	47,8	16,9	15,6	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> IP <sub>3</sub>
x Sel de tétrabutylammonium de 1,2,6-IP <sub>3</sub>	--	57,0	20,1	7,8	3,5	[CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ] <sub>4</sub> N] <sub>3</sub> H <sub>3</sub> IP <sub>3</sub>
30 * Sel de cyclohexylammonium de 1,2,6-IP <sub>3</sub>	--	39,5	35,1	12,6	6,2	[C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> H <sub>3</sub> IP <sub>3</sub>

Pour une meilleure compréhension de l'invention, les formules sont données ci-dessous, représentant les isomères de  $IP_3$  de l'invention. Les formules sont aussi données pour  $IP_6$ ,  $IP_5$ ,  $IP_4$  et  $IP_2$ .

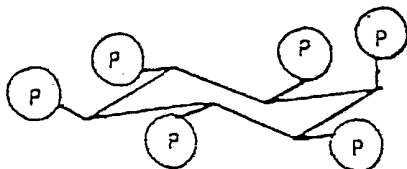
5 Les esters-phosphates inférieurs du myo-inositol sont nommés en fonction de l'endroit où sont situés les restes d'acide phosphorique sur le noyau d'inositol, la numérotation donnant des numéros de position aussi peu élevés que possible. L et D représentent une numérotation dans le sens des aiguilles d'une montre et dans le sens contraire, respectivement, et sont utilisés suivant le sens qui donne les numéros de position les plus faibles. L'atome de carbone axiale possède toujours le numéro de position 2. Les formules structurales ci-dessous sont simplifiées en la forme acide.

10

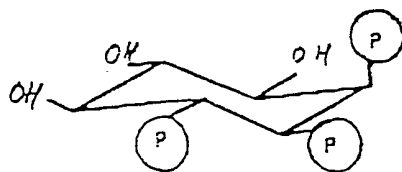
15

myo-inositol;  $C_6H_6(OH)_6$ 

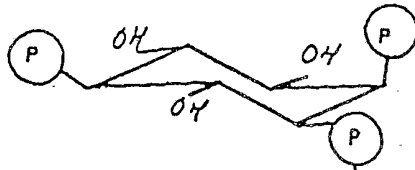
20

1,2,3,4,5,6-hexakis-(dihydrogénophosphate)-myo-inositol, autrement dit myo-inositol hexakis (phosphate) ou  $IP_6$ 

25

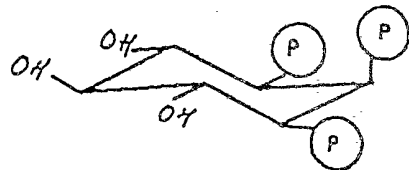
D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate, autrement dit D-1,2,6- $IP_3$

5

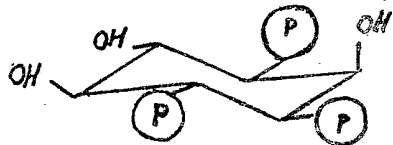
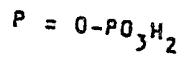


D-myoinositol-1,2,5-tri-  
phosphate, autrement dit  
D-1,2,5-IP<sub>3</sub>

10

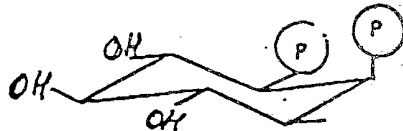


myoinositol-1,2,3-tri-  
phosphate, autrement dit  
1,2,3-IP<sub>3</sub>

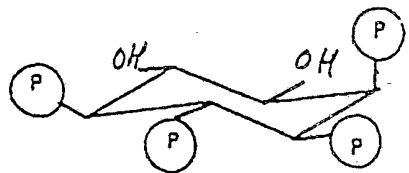


L-myoinositol-1,3,4-tri-  
phosphate, autrement dit  
L-1,3,4-IP<sub>3</sub>

15

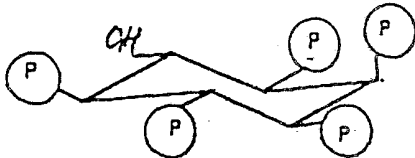


L-myoinositol-1,2-diphos-  
phate autrement dit  
L-1,2-IP<sub>2</sub>

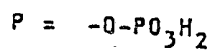


C-myoinositol-1,2,5,6-  
tetra-phosphate ou D-1,2,5,  
6-IP<sub>4</sub>

20



L-myoinositol-1,2,3,4,5-  
penta-phosphate ou  
L-1,2,3,4,5-IP<sub>5</sub>



REVENDICATIONS

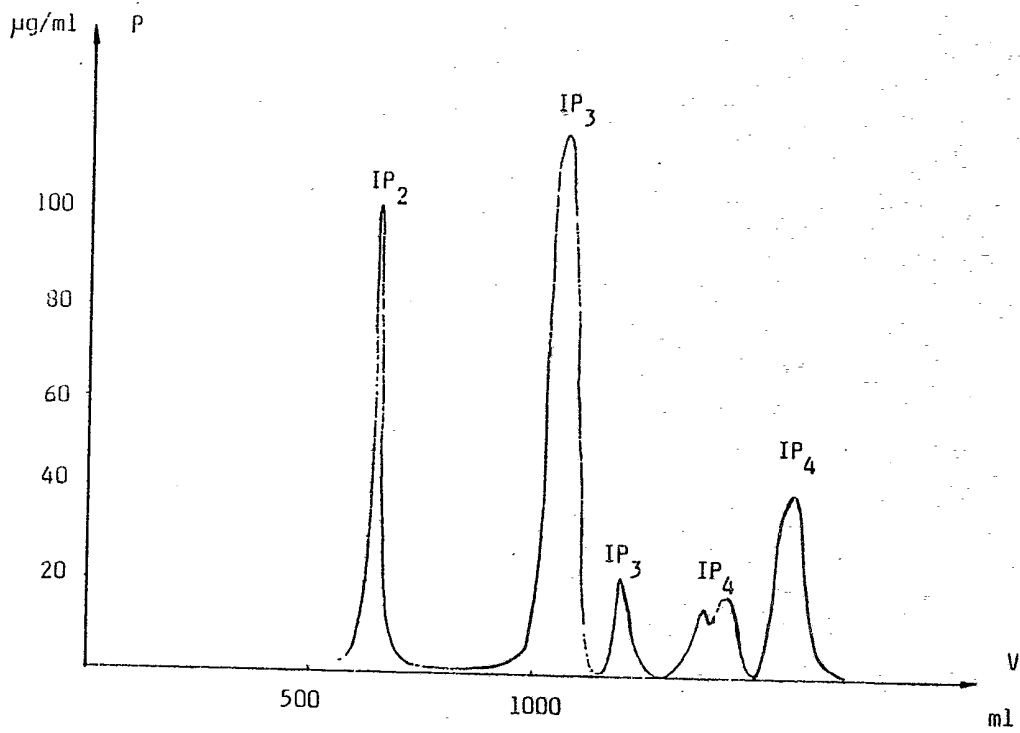
1. Inositol-triphosphate ( $IP_3$ ), caractérisé en ce qu'il est choisi parmi le groupe constitué par le D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate, le D-myo-inositol-1,2,5-triphosphate, le L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate et le myo-inositol-1,2,3-triphosphate, sous forme d'acide ou de sel.  
5
2.  $IP_3$  selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste en du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate.
3.  $IP_3$  selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste en du myo-inositol-1,2,3-triphosphate.
- 10 4.  $IP_3$  selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il se trouve sous forme pratiquement pure.
5.  $IP_3$  sous forme acide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il se trouve sous la forme d'une solution aqueuse.
- 15 6.  $IP_3$  sous forme acide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il se trouve sous forme d'une solution aqueuse dans laquelle la concentration de l'acide est comprise entre 10-45 % en poids, sur la base du poids total de la solution.
- 20 7.  $IP_3$  sous forme de sel selon la revendication 1, caractérisé en ce que ses cations sont choisis parmi le groupe constitué par les métaux alcalins et les métaux alcalino-terreux.
8. Sel selon la revendication 7, caractérisé en ce  
25 que les cations sont choisis parmi le groupe constitué par le lithium, le sodium, le potassium, le calcium, et le magnésium.
9.  $IP_3$  sous forme de sel selon la revendication 1,  
30 caractérisé en ce que les cations sont choisis parmi le groupe constitué de l'aluminium, du zinc, et du fer.

10.  $IP_3$  sous forme de sel selon la revendication 1, caractérisé en ce que le sel est un sel d'ammonium ou un sel d'amine organique.
11. Procédé de production d'un inositol-triphosphate ( $IP_3$ ), choisi parmi le groupe constitué par le D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate, le D-myo-inositol-1,2,5-triphosphate, le L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate et le myo-inositol-1,2,3-triphosphate, sous forme d'acide ou de sel, caractérisé en ce que un matériau contenant de l'inositol-hexaphosphate est mis à l'incubateur à une température comprise entre 20 et 70°C, à un pH de 4 à 8, avec de la phytase, jusqu'à ce que soit accomplie la libération d'environ 30-60 % du phosphore total de l'ester, on sépare ensuite par chromatographie le mélange obtenu pour isoler la fraction contenant  $IP_3$ , on soumet éventuellement ladite fraction à une séparation chromatographique ultérieure, et on isole des formes spécifiques isomères de  $IP_3$  sous forme d'acide ou de sel en solution.
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la phytase est une phytase de levure.
13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la levure est une levure de boulanger.
14. Procédé de production du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate sous forme d'acide ou de sel, caractérisé en ce que l'on met à l'incubateur un matériau contenant de l'inositol-hexaphosphate, à une température comprise entre 20 et 70°C, avec de la phytase de levure jusqu'à ce que soit accomplie la libération d'environ 30-60 % du phosphore total de l'ester, on sépare ensuite par chromatographie le mélange obtenu pour isoler la fraction contenant  $IP_3$ , et on isole le D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate sous forme d'acide ou de sel en solution.
15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la levure est une levure de boulanger.

16. Composition d'inositol phosphate, comprenant du D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate, et au moins l'un des composés D-myo-inositol-1,2,5-triphosphate, L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate, et myo-inositol-1,2,3-triphosphate, sous  
5 forme d'acide ou de sel, caractérisée en ce qu'elle contient 20-99,5 % en poids dudit  $IP_3$ , et que la teneur en D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate se trouve comprise entre 50-100% en poids, sur la base de la teneur totale desdits inositol-triphosphates, le reste comprenant les inositol-phosphates  
10 autres que  $IP_3$ .
17. Composition selon la revendication 16, caractérisée en ce que la fraction de  $IP_3$  est présente à raison de 30-99,5 % en poids.
18. Composition selon la revendication 16, caractérisée  
15 en ce que le  $IP_3$  est essentiellement le D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate.

1/13

Figure 1 : Hydrolyse du phytate de sodium avec la phytase de blé



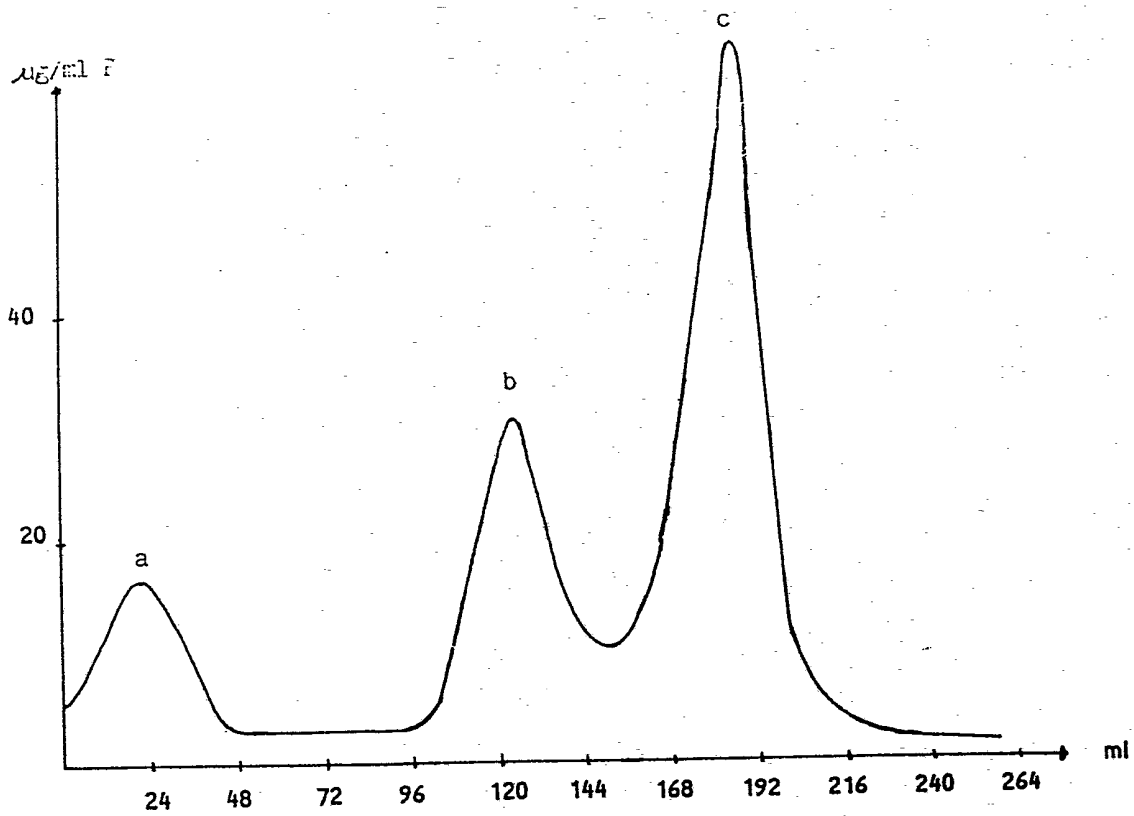
2/13

Figure 2 : Séparation d'inositol-triphosphates isomères

a = myo-inositol-1,3,4-triphosphate

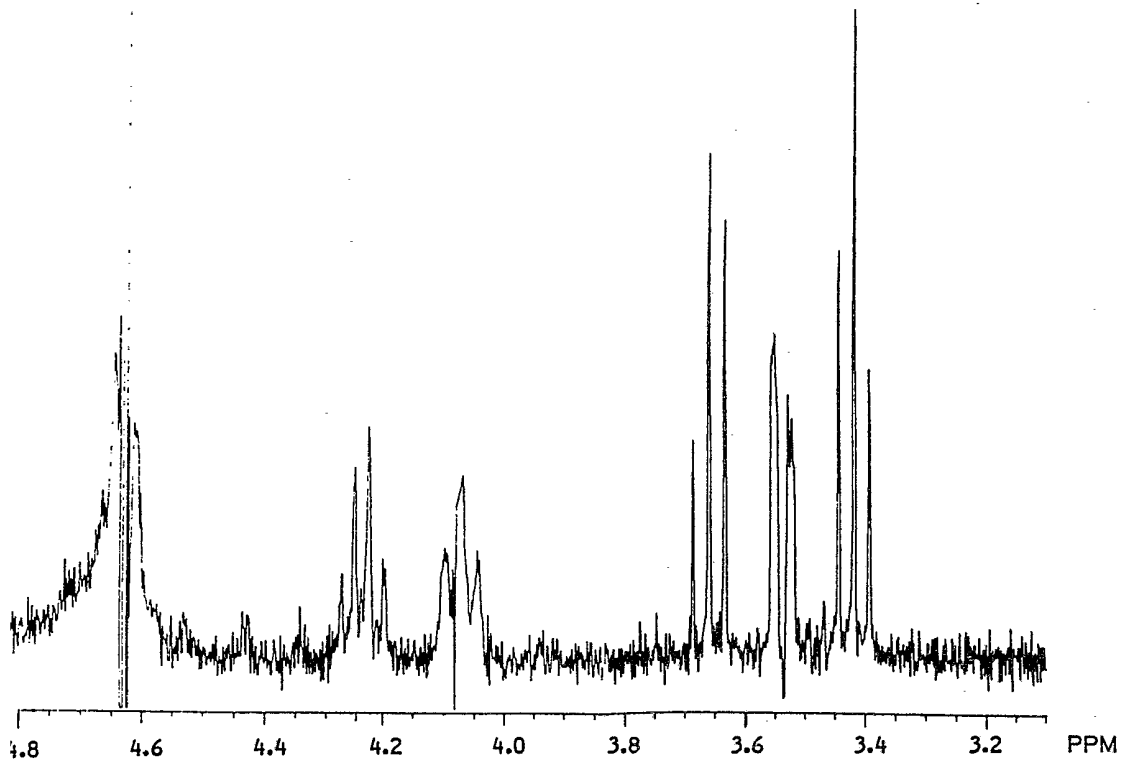
b = myo-inositol-1,2,3-triphosphate

c = myo-inositol-1,2,6-triphosphate



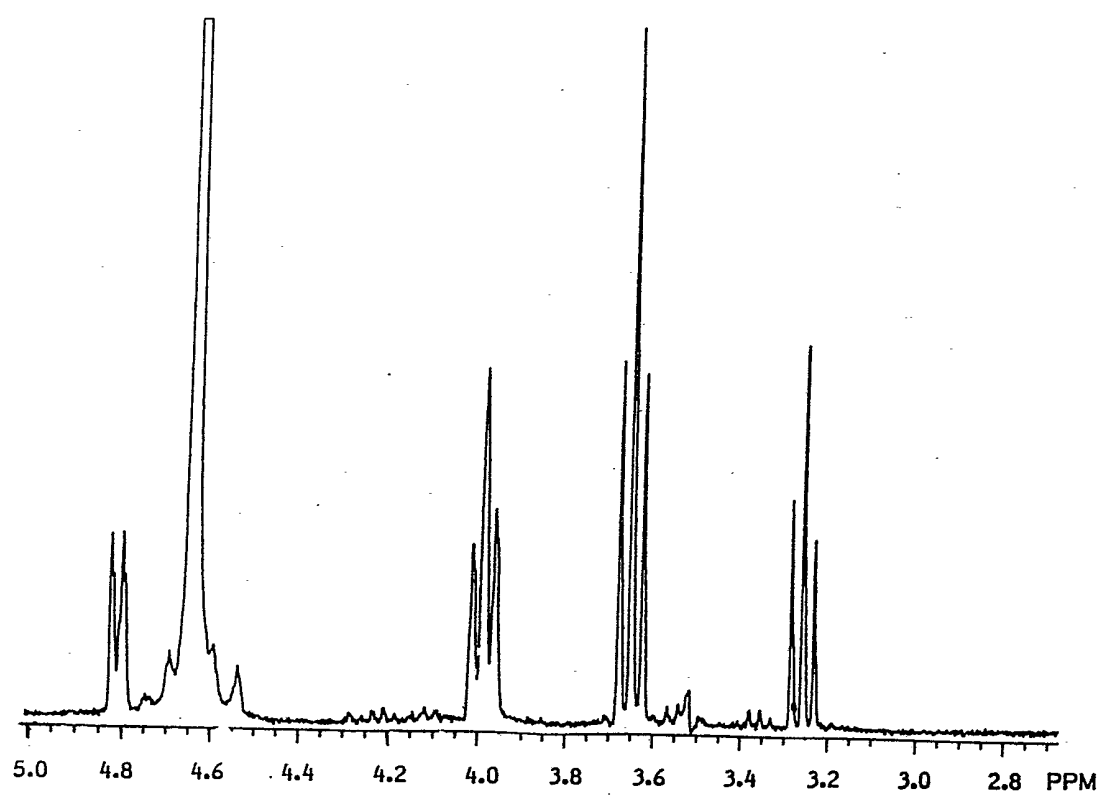
3/13

Figure 3a : Spectre RMN-H du myo-inositol-1,2,6-triphosphate



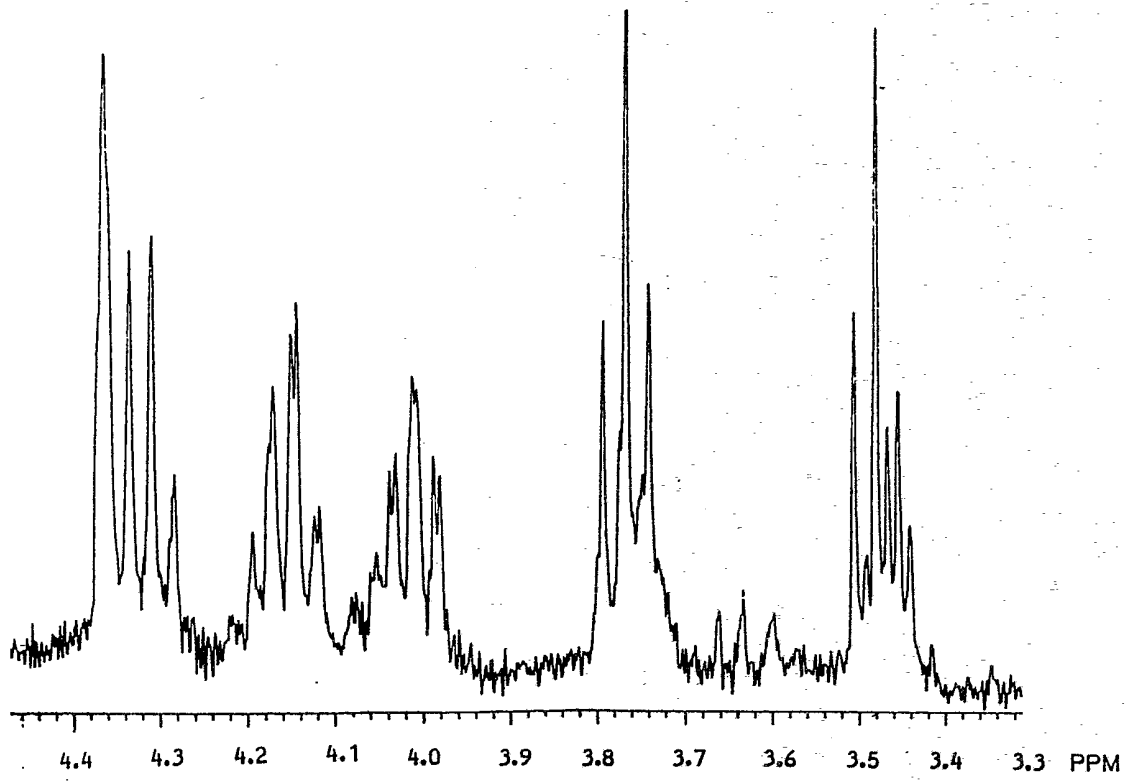
4/13

Figure 3b : Spectre RMN-II du myo-inositol-1,2,3-triphosphate



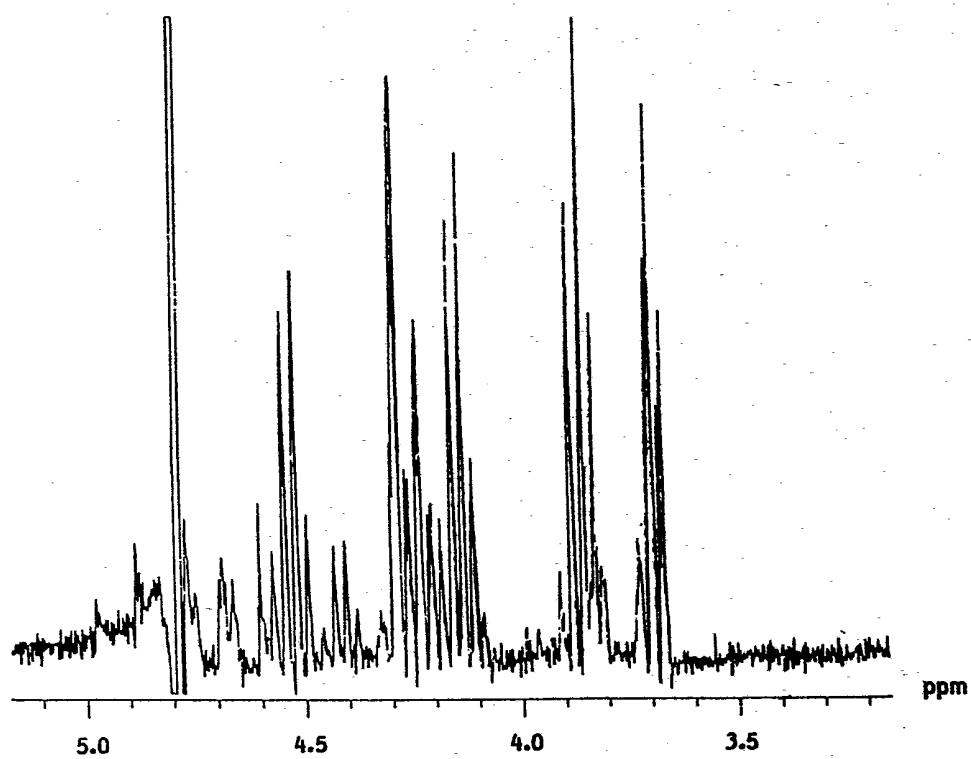
5/13

Figure 3 c : Spectre RMN-H du myo-inositol-1,3,4-triphosphate



6/13

Figure 4: Spectre RMN-II du myo-inositol-1,2,5-triphosphate.

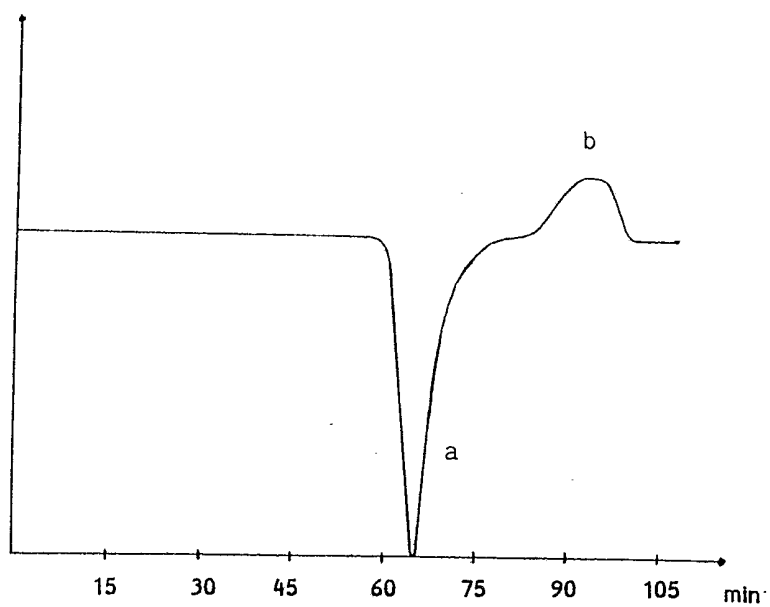


7/13

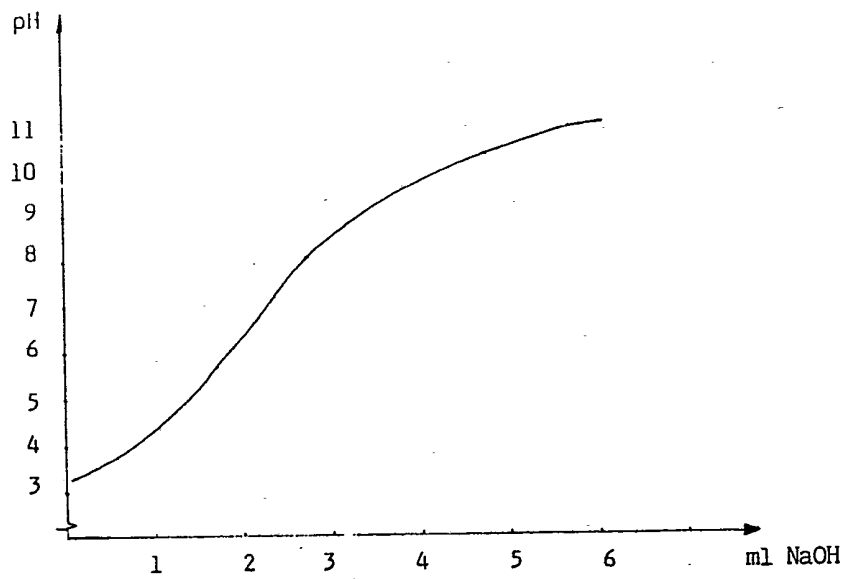
Figure 5 : Résolution optique du myo-inositol-1,2,6-triphosphate  
et du myo-inositol-1,3,4-triphosphate

a = D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate

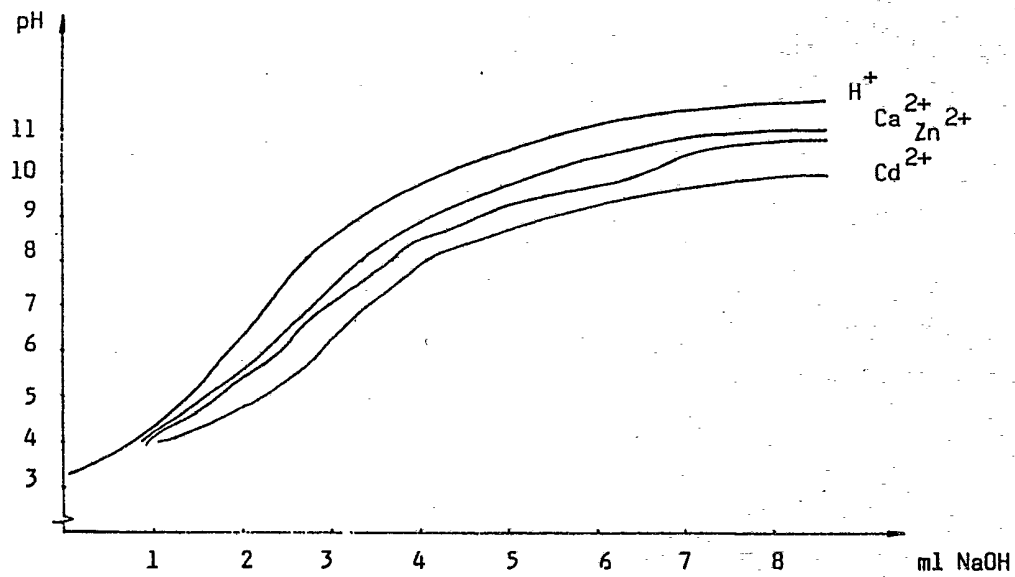
b = L-myo-inositol-1,3,4-triphosphate



8/13

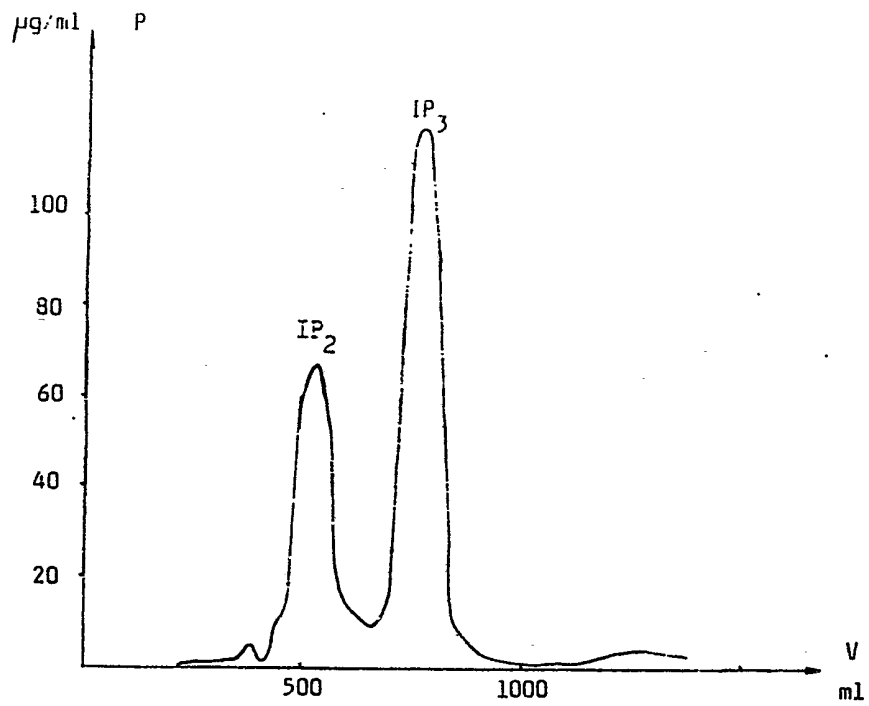
Figure 6 : Dosage de  $IP_3$  par NaOH

9/13

Figure 7: Dosage de  $IP_3$  par NaOH en présence d'ions métalliques

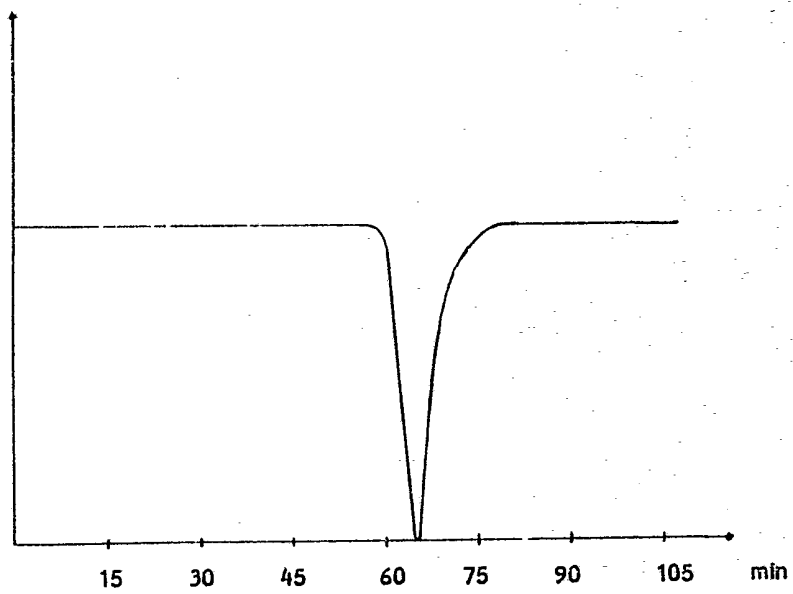
10/13

Figure 8 : Hydrolyse du phytate de sodium avec de la levure de boulanger



11/13

Figure 9 : Résolution optique du myo-inositol-1,2,6-triphosphate



12/13

Figure 10 : Hydrolyse chimique du phytate de sodium

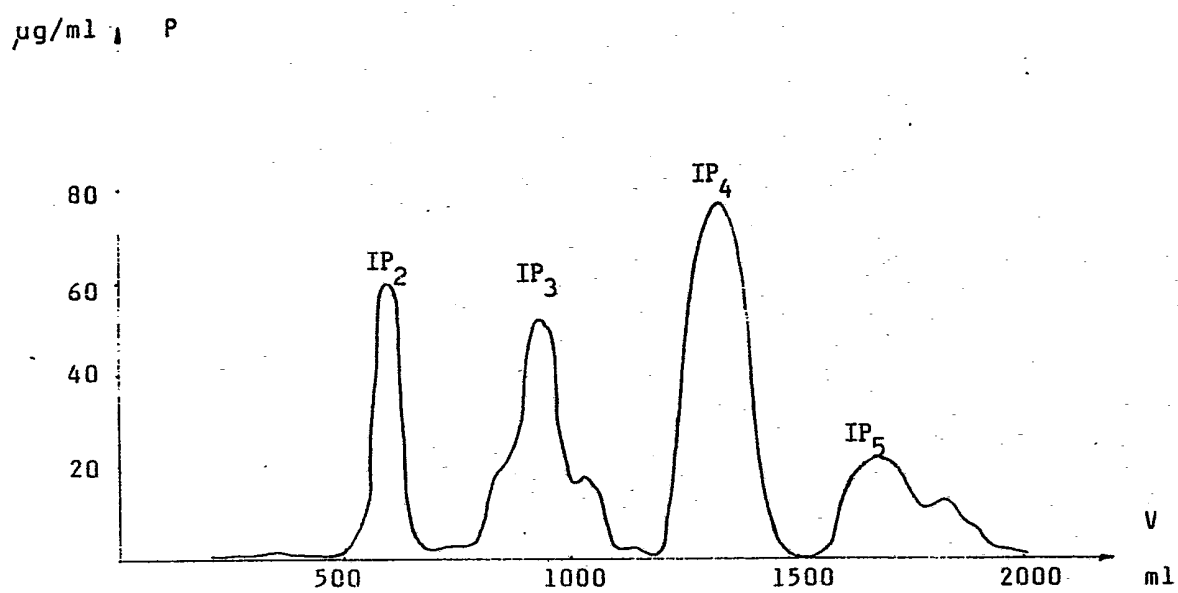


Figure 11 : Chromatogramme HPLC d'inositol-phosphates synthétisés par voie chimique

