

MARQUAGE PAR ^{125}I et ^{14}C D'INDOMONOCARBOCYANINES A TROPISME HEPATIQUE

Marie-France Moreau et Françoise Lapalus
INSERM. Unité de Recherche U 71, Etude métabolique des
molécules marquées. 63005 Clermont-Ferrand Cedex - B.P. 184,
France.

Received on February 17, 1975.

SUMMARY

The ^{125}I and ^{14}C labelling of new dyes for the functional hepatic exploration, are described.

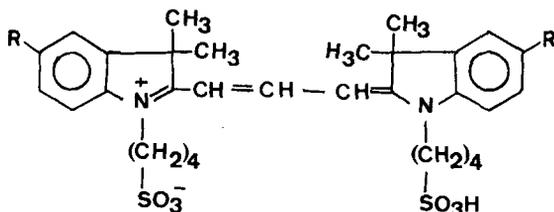
RESUME

Les marquages par l'iode radioactif et le carbone 14 de nouveaux colorants adaptés à l'exploration fonctionnelle hépatique, sont décrits.

I Introduction

L'exploration de la fonction hépatique a bénéficié depuis plusieurs années de l'apport des techniques isotopiques. L'utilisation de certaines molécules marquées par un émetteur γ (Rose Bengale, Bromosulfoptaléine) permet d'obtenir des renseignements sur l'activité fonctionnelle des cellules polygonales et accessoirement sur la morphologie du parenchyme hépatique. Par ailleurs, la possibilité d'obtenir des composés marqués au ^{14}C permet d'envisager sur l'animal une étude plus précise des mécanismes cellulaires d'épuration hépatobiliaire. Dans une note préliminaire à l'Académie des Sciences (1), nous avons indiqué que les difficultés de synthèse et de marquage du Vert d'Indocyanine nous ont amenés à préparer une série de colorants voisins mais de structure plus simple, ayant un tropisme hépatique marqué :

ces composés appartiennent à la famille des indomonocarbocyanines, leur structure est représentée par la formule ci-dessous :



Le processus de synthèse, ainsi que les premiers résultats de l'étude expérimentale chez l'animal, ont été publiés (2, 3). Parmi cette série de cyanines, certaines offraient la possibilité d'être marquées par l'iode radioactif ou par le carbone 14. Nous nous proposons ici de décrire le marquage de ces colorants par ^{125}I d'une part et par ^{14}C d'autre part.

II Marquage d'Indomonocarbocyanines à l'Iode 125

En premier lieu, nous avons essayé d'halogéner les molécules dans lesquelles $\text{R} = \text{H}, \text{HO}, \text{CH}_3\text{O}$, par action de l'iode moléculaire ou du monochlorure d'iode dans différents milieux : $\text{NH}_4\text{OH}, \text{HCl}, \text{CH}_3\text{COOH}$, mais dans aucun des cas, nous n'avons obtenu un produit iodé.

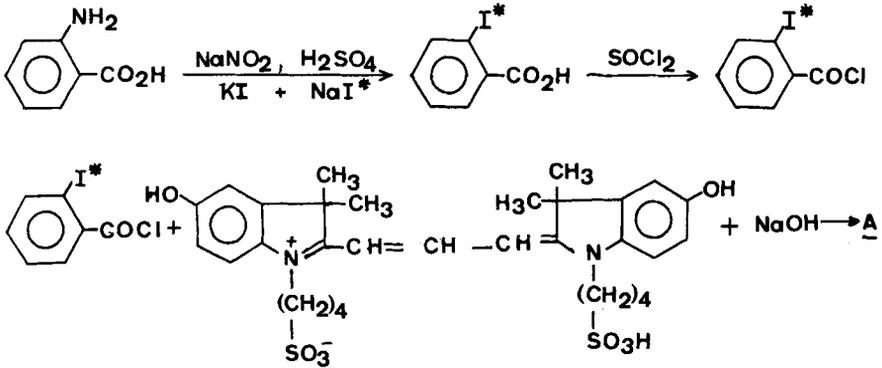
Nous avons préparé ensuite la cyanine 5, 5' di-iodée ($\text{R} = \text{I}$), selon le processus déjà décrit (3). Cependant la méthode utilisée n'est pas envisageable dans le cas d'un marquage, étant donné la longueur des opérations et le très faible rendement final. Nous avons par ailleurs essayé d'effectuer sur cette cyanine un échange isotopique, en la laissant en contact avec 1 mc de $^{125}\text{I}\text{Na}$, dans le diméthylformamide, pendant 8 jours à 110° , l'échange ne se fait que suivant un très faible pourcentage.

Devant les difficultés rencontrées pour obtenir un colorant iodé marqué, nous avons pensé introduire un vecteur d'iode, et nous avons ainsi préparé les composés suivants :

- cyanine di (iodo - 2 benzoate) - 5, 5' ($\text{R} = \text{C}_6\text{H}_4\text{COO}^{\text{I}^*}$) (cyanine A)
- cyanine di (iodo - 4 benzyloxy) - 5, 5' ($\text{R} = \text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{O}^{\text{I}^*}$) (cyanine B)
- cyanine di (iodo - 2 benzyloxy) - 5, 5' ($\text{R} = \text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{O}$) (cyanine C)

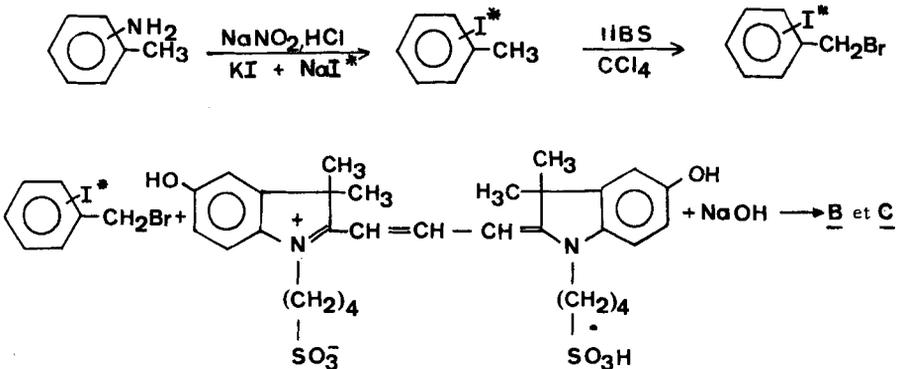
Le colorant A est obtenu en condensant le chlorure d'acide iodo-2 benzoïque ^{125}I sur la cyanine dihydroxy-5, 5' ($\text{R} = \text{OH}$), dans la pyridine. La

préparation et le marquage de ce vecteur s'effectuent à partir de l'acide anthranilique (4). Le processus de synthèse est représenté par le schéma ci-dessous :



Nous avons ainsi préparé la cyanine A marquée avec une activité spécifique de $8,4 \mu\text{C}/\text{mg}$.

Les dérivés B et C sont préparés en condensant sur la cyanine dihydroxy respectivement les bromures de paraiodobenzyle et d'orthoiodobenzyle. Ces derniers sont obtenus par bromation des toluènes correspondants (5), eux-mêmes préparés par diazotation des toluidines (6) :



B et C sont obtenues avec des activités spécifiques respectives de $9 \mu\text{C}/\text{mg}$ et $5 \mu\text{C}/\text{mg}$.

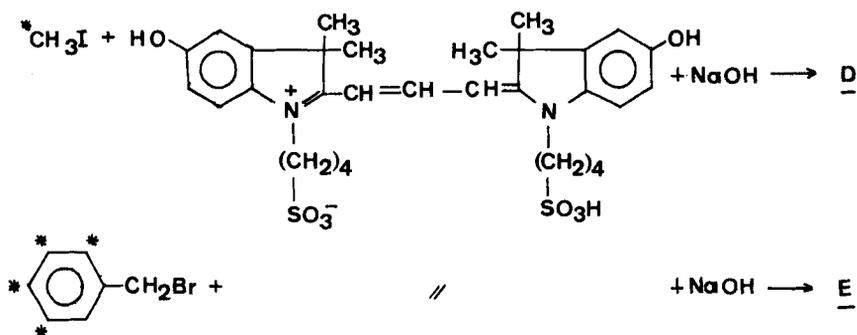
III Marquage d'Indomonocarbocyanines par ^{14}C

Afin d'obtenir des renseignements sur le métabolisme de ces colorants, nous avons envisagé le marquage de certains d'entre eux par le carbone 14.

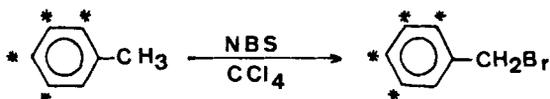
Nous avons choisi pour l'instant les cyanines pour lesquelles l'introduction du carbone radioactif soit la plus aisée d'une part, et d'autre part qui s'éliminent bien par la bile. C'est pourquoi nous avons préparé les deux composés suivants :

- cyanine diméthoxy-5, 5' (R = *CH_3O) : cyanine D
- cyanine dibenzyloxy-5, 5' (R = *C_6H_4CH_2O) : cyanine E

Ces dérivés sont obtenus comme les précédents à partir de la cyanine dihydroxy-5, 5', sur laquelle nous avons condensé l'iodure de méthyle pour D et le bromure de benzyle pour E.



L'iodure de méthyle marqué au ^{14}C est fourni par le C. E. A. Le Bromure de benzyle ^{14}C est préparé en traitant le toluène 2, 3, 4, 5, - ^{14}C par le N - Bromosuccinimide :



D et E sont obtenus respectivement avec une activité spécifique de 1,5 $\mu C/mg$ et de 1,1 $\mu C/mg$.

Nous avons préparé des colorants de structure voisine de celle du Vert d'Indocyanine, marqués par l'Iode radioactif et par le carbone 14. En ce qui concerne les produits iodés (cyanines A, B et C), l'étude biologique chez l'animal, actuellement en cours, a mis en évidence une hydrolyse rapide de la fonction ester dans l'organisme. Par contre la liaison éther oxyde est stable ; on note une différence de comportement nette entre B et C : le composé B a une élimination biliaire relativement faible alors que le composé C a un taux d'élimination comparable à celui du Vert d'Indocyanine, et indépendant de la

dose de colorant injectée. Ces résultats amènent à poursuivre notre étude en vue de l'utilisation possible de cette molécule marquée dans l'exploration de la fonction hépatobiliaire.

PARTIE EXPERIMENTALE

Généralités :

Les spectres infrarouges ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer 257.

Les spectres dans le visible ont été réalisés sur un appareil Leres S 28. Les spectres de R. M. N. ont été effectués sur un appareil Jeol C 60 HL en utilisant le T. M. S. en référence interne.

Les chromatographies en phase vapeur (cpv) sont effectuées au moyen d'un appareil Techmation MT 220 Tracor, en utilisant une colonne de 1 m carbowax 20 M à 10 %.

Les points de fusion sont pris sur un banc KOFLER.

La pureté des cyanines est contrôlée par chromatographie sur couche mince, en utilisant du gel de silice Merck G type 60, en éluant successivement avec les deux mélanges suivants :

- Butanol-Acide Acétique-Eau (50/15/35)
- ter Butanol-Ammoniaque 3 % (75/25)

Ces chromatographies ont été analysées sur un dérouleur de chromatogramme PANAX équipé, pour les produits iodés, d'une sonde à cristal plat INa (T1) (27 mm) et pour les produits marqués au ^{14}C , d'un détecteur type Geiger Muller sans fenêtre.

Les mesures de radioactivité sont effectuées :

- pour les cyanines iodées, avec un compteur à cristal puits INa (T1) relié à un sélecteur d'amplitude et à une échelle de comptage. La largeur de la bande utilisée est de 10 volts. Elle est centrée sur le pic d'absorption totale de ^{125}I (27 keV).

- pour les produits marqués au ^{14}C , avec un scintillateur liquide modèle 6860 Nuclear Chicago muni d'un standard externe de Baryum 133 pour les corrections de Quenching.

Les échantillons d'iodure de sodium marqué, ainsi que l'iodure de méthyle ^{14}C et le toluène ^{14}C , sont fournis par le C. E. A.

I Préparation de la cyanine A

1) Préparation de l'acide iodo-2 benzoïque ^{125}I :

A une solution bien agitée de 5 mmoles d'acide amino-2 benzoïque dans 4 ml d'acide sulfurique et 4 ml d'eau, on additionne à 0° 5,4 mmoles de NaNO_2 dans 1 ml d'eau. On ajoute ensuite une solution contenant $^{125}\text{I}^-\text{Na}$ (sans entraîneur et sans réducteur) et 6 mmoles de KI, dans l'acide sulfurique dilué. On chauffe jusqu'à l'ébullition pendant quelques minutes, puis on refroidit et filtre l'acide benzoïque iodé précipité. Après purification par deux passages successifs acide-base, le rendement est de 70 %.

$F = 162^\circ$ Litt⁽⁴⁾ $F = 162^\circ$

IR : 3300 à 2500 cm^{-1} : OH (COOH)

1680 cm^{-1} : C = O (COOH)

A partir d'un échantillon de 30 mC de $^{125}\text{I}^-\text{Na}$, nous avons obtenu, dans ces conditions, une activité spécifique de 19 $\mu\text{C}/\text{mg}$.

2) Préparation du chlorure de l'acide iodo-2 benzoïque ^{125}I :

3,5 mmoles d'acide et 40 mmoles de SOCl_2 fraîchement distillé, sont maintenus à reflux pendant deux heures. Puis on laisse refroidir et évapore sous vide l'excès de chlorure de thionyle.

Le chlorure d'acide iodo-2 benzoïque ainsi obtenu est utilisé directement pour la suite de la préparation.

3) Préparation de la cyanine A :

A 1,5 mmole de cyanine dihydroxy-5,5' dans 20 ml de pyridine fraîchement distillée, on ajoute 3,5 mmoles de chlorure d'acide et on agite pendant 16 heures à température ambiante. On additionne ensuite une grande quantité d'éther anhydre, ce qui entraîne la précipitation de la cyanine A, on filtre, lave à l'éther et l'acétone, puis sèche sous vide sur chlorure de calcium.

Le rendement est de 30 %, l'activité spécifique de 8,4 $\mu\text{C}/\text{mg}$.

IR : 1100 - 1300 cm^{-1} (SO_3H)

1030 cm^{-1} (SO_3H)

1560 cm^{-1} (double liaison fortement conjuguée)

1740 cm^{-1} (C = O)

Visible : λ max (H_2O) : 525 et 560 nm.

La chromatographie ascendante sur papier Wathman n°2, en éluant avec HCl 0,5 N, ne décèle pas la présence d'iode.

II Préparation de la cyanine B1) Préparation du para iodo-toluène ^{125}I

A une solution fortement agitée de 10 mmoles d' amino-4 toluène dans 4 ml d'HCl concentré et 4 ml d'eau, on additionne à 0° 10,5 mmoles de NaNO_2 dans 2 ml d'eau. Puis, on ajoute une solution contenant $^{125}\text{I}\text{Na}$ (sans entraîneur et sans réducteur) et 10,5 mmoles de KI dans l'eau. On laisse à température ambiante pendant environ 1 heure, puis on chauffe au bain-marie jusqu'à ce que le dégagement d'azote cesse. On refroidit, additionne une solution de NaOH 5% jusqu'à l'obtention d'un pH basique. On extrait à l'éther et sèche sur chlorure de calcium. Après avoir évaporé le solvant sous vide, on purifie le para iodo toluène par chromatographie sur colonne de silice (solvant = benzène, éluant = éther de pétrole).

Le rendement est de 70 % après purification.

F = 34° Litt₍₆₎ : F = 35°

La pureté du produit est contrôlée par cpv sur colonne carbowax à 110°.

Les spectres IR et RMN sont superposables à ceux d'un échantillon de para iodo toluène authentique.

A partir de 51 mC de $^{125}\text{I}\text{Na}$, nous avons obtenu dans ces conditions, une activité spécifique de 22,1 $\mu\text{C}/\text{mg}$.

2) Préparation du bromure de para iodo benzyle ^{125}I

A 7 mmoles de para iodo toluène en solution dans 2 ml de CCl_4 , on ajoute 7,8 mmoles de N B S et une pointe de spatule de peroxyde de benzoyle. On laisse à reflux pendant 15 heures. Après avoir refroidi, on filtre, évapore CCl_4 sous vide, et purifie le dérivé bromé par chromatographie sur colonne de silice (solvant = benzène, éluant = éther de pétrole).

Le rendement est de 33 %.

F = 78° Litt₍₇₎ F = 78,5° - 79,5°

La cpv sur colonne carbowax à 110° indique que le produit est pur.

RMN (CCl_4) : 4,40 (singulet) (CH_2)

7 à 7,8 (multiplet) (aromatique)

Activité spécifique : 16,1 $\mu\text{C}/\text{mg}$.

3) Préparation de la cyanine B :

A 0,5 mmole de cyanine dihydroxy-5,5' dans 10 ml d'eau, on ajoute 2mmoles de soude et on laisse environ 1 heure à 50°. Puis on ajoute 2mmoles

de bromure de paraiodobenzyle dans 20 ml d'acétone, et laisse 24 heures à reflux. On refroidit, additionne HCl 5 N jusqu'à obtention d'un pH acide, extrait au chloroforme, sèche sur sulfate de magnésium, et évapore le solvant sous vide. La cyanine est lavée à l'éther et séchée sous vide sur chlorure de calcium.

Nous avons ainsi obtenu la cyanine B avec un rendement de 45 % et une activité spécifique de 9 $\mu\text{C}/\text{mg}$

$$\begin{aligned} \text{IR} : & 1100 - 1300 \text{ cm}^{-1} \quad (\text{SO}_3\text{H}) \\ & 1040 \text{ cm}^{-1} \quad (\text{SO}_3\text{H}) \\ & 1560 \text{ cm}^{-1} \quad (\text{double liaison}) \\ \text{Visible} : & \lambda \text{ max } (\text{H}_2\text{O}) : 532 \text{ et } 565 \text{ nm.} \end{aligned}$$

La chromatographie ascendante sur papier Whatman n°2 en éluant avec HCl 0,5 N, ne décèle pas la présence d'iodure.

III Préparation de la cyanine C.

Elle est réalisée selon le même processus que la cyanine B :

1) préparation de l'orthoiodotoluène ^{125}I :

Le rendement est de 35 %.

La cpv sur colonne carbowax à 110° montre que le produit est pur.

Les spectres IR et RMN sont superposables à ceux d'un échantillon d'orthoiodotoluène authentique.

A partir de 30 mC de $^{125}\text{I}\text{Na}$, nous avons obtenu dans ces conditions une activité spécifique de 13 $\mu\text{C}/\text{mg}$.

2) préparation du bromure d'orthoiodobenzyle ^{125}I .

Le rendement est de 52 %.

$$F = 55^\circ \quad \text{Litt}_{(8)} F = 53,5^\circ$$

La pureté du produit est contrôlée par cpv sur colonne de carbowax à 135°.

RMN (CCl_4) : 4,40 (singulet) (CH_2)
6,9 à 7,5 (multiplet) (aromatiques)

Activité spécifique : 9,3 $\mu\text{C}/\text{mg}$.

3) préparation de la cyanine C.

Elle est obtenue avec un rendement de 60 % et une activité spécifique de 5 $\mu\text{C}/\text{mg}$.

IR : 1100 - 1300 cm^{-1} (SO_3H)
 1040 cm^{-1} (SO_3H)
 1560 cm^{-1} (double liaison conjuguée)
 Visible : λ max (H_2O) : 532 et 565 nm.

La chromatographie ascendante sur papier Whatman, en éluant avec HCl 0,5N, ne décèle pas la présence d'iodure.

IV Préparation de la cyanine D :

A l'aide d'une rampe à vide, on transvase 2 mMoles d'iodure de méthyle $^{14}\text{CH}_3\text{I}$ (2 mC) sur une solution de 0,5 mMole de cyanine dihydroxy dans 10 ml d'eau et 2 mMoles de soude. On laisse 24 heures à reflux, puis additionne HCl 5 N jusqu'à obtention d'un pH acide. On évapore à sec sous vide poussé, lave la cyanine D récupérée à l'éther et à l'acétone, puis sèche sous vide sur chlorure de calcium.

Le colorant est purifié par chromatographie sur colonne de silice, en éluant avec le mélange ter Butanol - Ammoniaque (75/25).

Le rendement, après purification est de 45 %.

Activité spécifique : 1,5 $\mu\text{C}/\text{mg}$.

IR : 1100 - 1300 cm^{-1} (SO_3H)
 1040 cm^{-1} (SO_3H)
 1560 cm^{-1} (double liaison)
 Visible : λ max (H_2O) : 532, 565 nm

V Préparation de la cyanine E.

1) préparation du bromure de benzyle ^{14}C .

A l'aide d'une rampe à vide, on transvase dans un ballon 5 mMoles de toluène 2,3,4,5 - ^{14}C (2, 3 mC), que l'on dissout dans 2 ml de CCl_4 . On ajoute 5,75 mMoles de N-Bromosuccinimide et une pointe de spatule de peroxyde de benzoyle, puis on laisse à reflux pendant 15 heures. On filtre, évapore CCl_4 sous vide, et purifie le bromure de benzyle par chromatographie sur colonne de silice (solvant = benzène, éluant = éther de pétrole).

Rendement : 55 %

Activité spécifique : 2,7 $\mu\text{C}/\text{mg}$.

La cpv sur colonne carbowax à 90° indique que le produit est pur.

Les spectres IR et RMN sont superposables à ceux d'un échantillon de bromure de benzyle authentique.

2) préparation de la cyanine, selon le même processus que pour les composés B et C.

Rendement:60 %

Activité spécifique : 1, 1 μ C/mg

IR : 1100 - 1300 cm⁻¹ (SO₃H)

1040 cm⁻¹ (SO₃H)

1560 cm⁻¹ (double liaison)

Visible : λ (H₂O) : 532 et 565 nm.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) MOREAU M. F., LAPALUS F., MEYNIEL G., C.R. Acad. Sc. Paris, 276, série D, 2473 (1973)
- 2) LAPALUS F., MOREAU M. F., GAILLARD G., MEYNIEL G., Biomédecine, 20, 231 (1974)
- 3) MOREAU M. F., LAPALUS F., MEYNIEL G., Chim. Thér. 9, 274 (1974).
- 4) VOGEL A. I., Practical Organic Chemistry, III^e édition Longman, London, 760 (1956).
- 5) SCHMID H., KARRER P., Helv. Chim. Acta., 29, 573 (1946)
- 6) VOGEL A. I., Practical Organic Chemistry, III^e édition Longman, London, 599 (1956).
- 7) SLOVITER H. A., J. Amer. Chem. Soc., 71, 3360 (1949)
- 8) BACON R. G. R., LINDSAY W. S., J. Chem. Soc., 1375 (1958).