

SYNTHESE DU CHLORURE DE 2-(DIMETHYLAMINOPHENYL)-3,6-DIMETHYL BENZO [2-¹⁴C]-THIAZOLIUM OU THIOFLAVINE T

M.VERNY, C. NICOLAS, A.VEYRE

INSERM U 71 - B.P. 184 - Rue Montalembert
63005 CLERMONT-FERRAND CEDEX

SUMMARY

¹⁴C-Thioflavine T hydrochloride, labelled at the 2-position of the thiazole ring, is synthesized from 4-dimethylamino [¹⁴CO₂H]benzoic acid, obtained from Ba ¹⁴CO₃. The radiochemical yield is 76 %.

Key words : ¹⁴C-Thioflavine T
 4-dimethylamino [¹⁴CO₂H]benzoic acid
 2-methylamino 5-methyl benzene thiol

INTRODUCTION

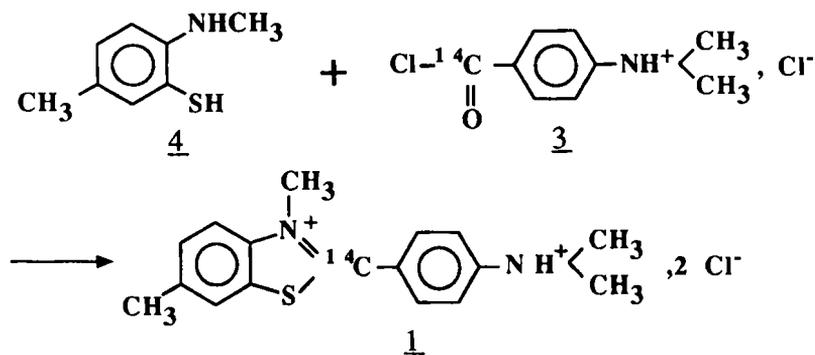
La Thioflavine T, utilisée comme colorant spécifique du tissu amyloïde (1,2,3) met en évidence, in vitro, les trois types de lésions amyloïdes de la maladie d'Alzheimer (4,5,6).

L'absence de marqueur biologique in vivo, ne permet pas le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

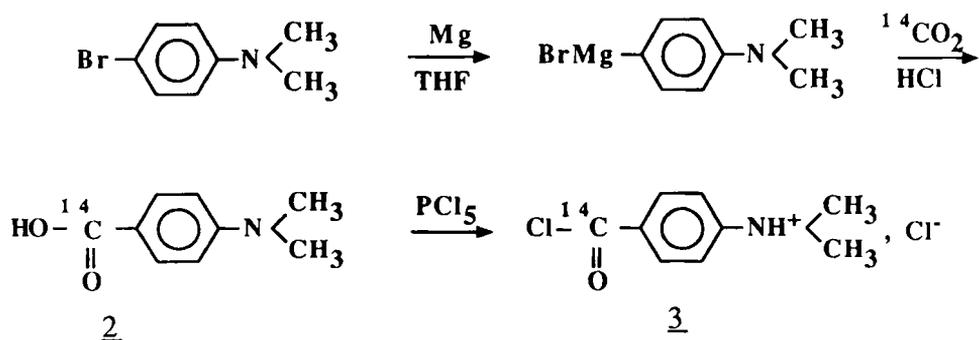
Les résultats obtenus sur le tissu cérébral "in vitro" nous permettent d'envisager son utilisation possible comme marqueur biologique.

Aussi, il apparait nécessaire d'étudier la biodisposition et la pharmacocinétique de cette molécule à l'aide d'un marquage par ¹⁴C.

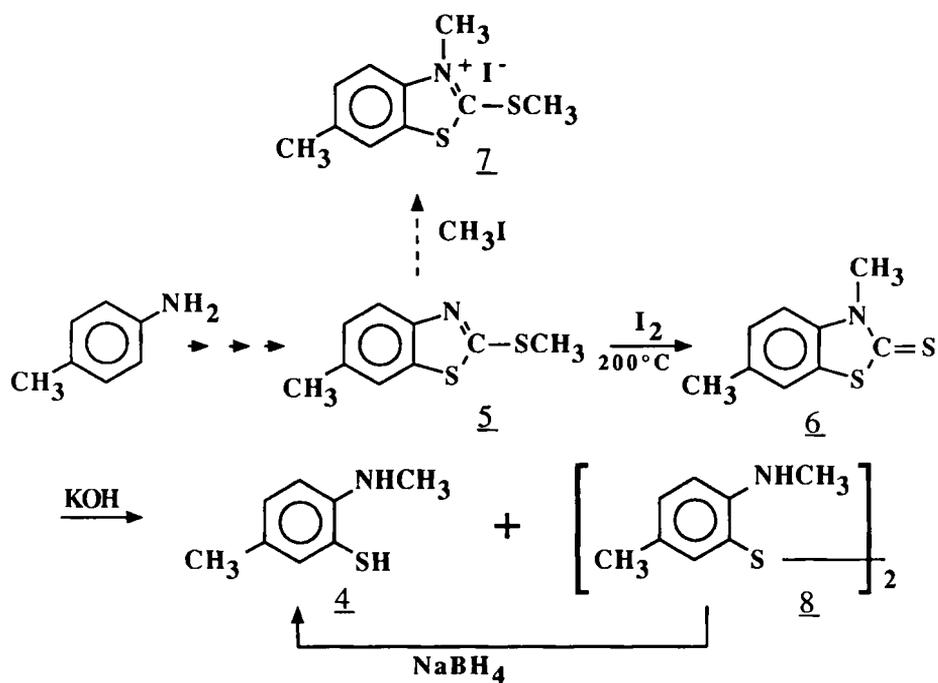
La Thioflavine T a été préparée sous forme de chlorhydrate 1 selon le schéma 1, avec un rendement de 84 % :



Le marquage au carbone 14 est effectué au niveau du groupe carbonyle de l'acide 4-diméthylamino benzoïque 2 suivant le schéma 2 :



Par ailleurs le 2-méthylamino 5-méthyl benzène-thiol 4 est obtenu à partir de la p.toluidine, avec un rendement global de 30 %, selon un mode opératoire décrit par GARMAISE et coll. (7) auquel quelques modifications ont cependant dû être apportées (cf. Partie expérimentale) (schéma 3).



Le chlorhydrate de ¹⁴C-Thioflavine T a été préparé avec une activité spécifique de 11 mCi/mmol (407 MBq/mmol), le rendement radioactif à partir de Ba¹⁴CO₃ étant de 76 %.

PARTIE EXPERIMENTALE

1. 2-Méthylamino 5-méthyl benzèthiol 4 (schéma 3)

1.1. Le passage de la p.toluidine au composé 5 reprend la suite d'étapes décrites par GARMAISE et coll. (7). Le réarrangement de ce composé en 6 est ensuite effectué par chauffage pendant 3 h en tube scellé, à 200-220°C, en présence d'un cristal d'iode, mais non d'iodure de méthyle comme indiqué en (7), le principal produit obtenu étant alors l'iodure d'ammonium quaternaire 7.

Le solide noir obtenu est extrait par plusieurs portions d'éthanol bouillant. Le composé 6 précipite par refroidissement (Rdt 70 %).

1.2. La saponification du composé précédent par la potasse éthanolique à 250 g/l à reflux pendant 24 h conduit essentiellement, après neutralisation par HCl puis extraction au chloroforme, au disulfure 8.

Celui-ci est purifié sur colonne de silice merck 60 (230-400 mesh) (éluant : CHCl₃).

1.3. Le composé 8 (910 mg, 3 mmol) mis en solution dans EtOH absolu, est traité par de petites portions de NaBH₄ en excès pendant 30 minutes. On évapore à sec, reprend par 10 ml de HCl N/10 et extrait par le benzène. Cette solution benzénique, après séchage sur MgSO₄ et filtration, est concentrée jusqu'à 5 ml environ, et utilisée immédiatement dans l'étape suivante 3.

Spectres RMN (solvant CDCl₃), δ (ppm)

	Φ (2 d + s)	SCH ₃ (s)	N CH ₃ (s)	Φ CH ₃ (s)
<u>5</u>	7,0 - 7,7	2,73	-	2,40
<u>6</u>	7,2 - 7,5	-	3,76	2,37
<u>7</u>	7,0 - 7,5	3,10	4,07	2,50
<u>8</u>	6,4 - 7,15	-	2,73	2,13
<u>4</u>	6,4 - 7,15	-	2,83	2,17

2. Acide 4-diméthylamino [¹⁴C O₂H]benzoïque 2 (schéma 2)

Dans un ballon rodé à long col, on place 170 mg (7 mmol) de magnésium, 5 ml de THF et un cristal d'iode. Par une ampoule à robinet on ajoute progressivement 1,4 g (7 mmol) de p.bromo diméthylaniline, en solution dans 10 ml de THF, en chauffant au début jusqu'à décoloration de l'iode. Après la fin de l'addition, on chauffe encore à reflux 45 minutes.

Le contenu du ballon est ensuite congelé dans l'azote liquide, après avoir été relié à une rampe à vide, par laquelle on introduit le gaz CO₂ produit à partir de 0,2 g (1 mmol) de Ba ¹⁴CO₃ à 55 mCi/mmol., additionné de 0,8 g (4 mmol) de BaCO₃, mélangés à un excès d'acide sulfurique (environ 50 ml). Après la fin de l'absorption, la température est remontée à - 20°C pendant 30 minutes. Finalement on reprend par HCl 1N, extrait à l'éther et précipite l'acide 2 par addition de soude jusqu'à pH 3.

Rdt : 0,754 g (4,54 mmol), 91 % par rapport à BaCO₃

Activité spécifique : 11 mCi/mmol (407 MBq/mmol) , (Rdt radioactif 92 %)

Pureté radiochimique : 100 %

Rf = 0,74 (éluant : Toluène/Dioxanne/Acide acétique 10/6/1)

= 0,90 (éluant : n-Butanol/Acide acétique/Eau 4/1/1)

RMN (DMSO D₆) - δ ppm = 2,97 (s, 2 NCH₃) - 6,65 et 7,75 (2d, Φ)

3. Chlorhydrate de [¹⁴C]-Thioflavine T L (schéma 1)

L'acide 2 précédemment obtenu (4,54 mmol) est agité 45 minutes à température ambiante avec 1,05 g (5 mmol) de PCl₅ dans 10 ml de CH₂Cl₂. On évapore à sec, et lave rapidement à l'éther le solide résiduel.

RMN (CDCl₃) - δ ppm = 3,13 (s, 2 N CH₃) - 7,22 et 8,02 (2d, Φ)

Le chlorure d'acide 3, redissous dans 5 ml de CH₂Cl₂, est alors ajouté au thiol 4 en solution benzénique (~ 6 mmol) obtenu en 1.3. On agite 2 h 30 à température ambiante. Le précipité jaune est filtré, lavé abondamment au benzène, puis recristallisé dans EtOH absolu additionné de quelques gouttes de HCl concentré.

Rdt : 1,35 g (3,8 mmol), 84 % par rapport à l'acide 2

Activité spécifique : 11 mCi/mmol (407 MBq/mmol)

(Rdt radioactif 76 % par rapport à Ba¹⁴CO₃)

Pureté radiochimique : 98 %

Rf = 0,20 (éluant : n-Butanol/Acide acétique/Eau 4/1/1)

RMN (DMSO D₆) - δ ppm = 2,50 (Φ CH₃) - 3,12 (2NCH₃)-4,22 (+NCH₃)

6,9 et 8,0 (2d, Φ) 7,5-8,2 (m, Φ)

Le produit obtenu après séjour de 24 h dans un dessiccateur à vide comporte environ 3 moles d'eau par mole : l'analyse de KARL-FISCHER (% H₂O = 13,9) est confirmée par les données de la RMN (environ 6 H excédentaires) et celles de l'analyse élémentaire (% Cl = 17,23 - Théorie pour C₁₇H₂₀Cl₂N₂S, 3 H₂O = 17,32).

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier J. Lefrançois pour la réalisation de ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - COOPER J.H. - J.Clin Pathol., 22, 410-413 (1969)
- 2 - FRANCIS R.J. - Amyloid : theory and pratic of histological techniques - Edited by J.D. Buncroft, A. Stevens 155-179 (1982)
- 3 - SCHWARTZ P. - Gérontologies 18, 321-362 (1971)
- 4 - BEHROUZ N., DEFOSSEZ A., DELACOURTE A., HUBLAU P., MAZUCCA M. - C.R. Acad. Sci. III, 308 (16), 437-44 (1989)
- 5 - DELACOURTE A., DEFOSSEZ A., PERSUY P., PEERS M.C. -Virchows Arch. 411 (3), 139-204 (1987)
- 6 - TOWNSEND L.E., GILROY J., LEWITT P., WOLFE D.E., POMARA N., WEINTRAUB J., REITZ D. - Neuroch. Pathol. 6, 213-29, (1987)
- 7 - GARMAISE D.L., PARIS G.Y., KOMLOSSY J., CHAMBERS C.H., Mc CRAE R.C. J. Med. Chem. 12, 30-36 (1989).