

SYNTHESE DE LA [¹⁵N]-CYSTEAMINE

Catherine Lagoueyte ¹, Subra G.¹, Bonnet P.A.^{1*}, Fernandez J.P.¹, Roman V.²,
Fatome M.², Chapat J.P.¹

¹ URA-CNRS 1111, Laboratoire de Chimie Organique Pharmaceutique
15, Av. Charles Flahault, 34060 Montpellier Cedex, France

² Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, Départ. Radiopathologie,
38700 La Tronche, France

RESUME

La synthèse d'un radioprotecteur, la [¹⁵N]-cystéamine, est réalisée à partir de la [¹⁵N]-glycine, afin d'effectuer des études physico-chimiques en milieu membranaire par RMN ¹⁵N.

SUMMARY

The synthesis of the radioprotector [¹⁵N]-cysteamine from [¹⁵N]-glycine is described. Cysteamine is labelled by ¹⁵N in order to study its interaction with phospholipidic membranes by ¹⁵N NMR.

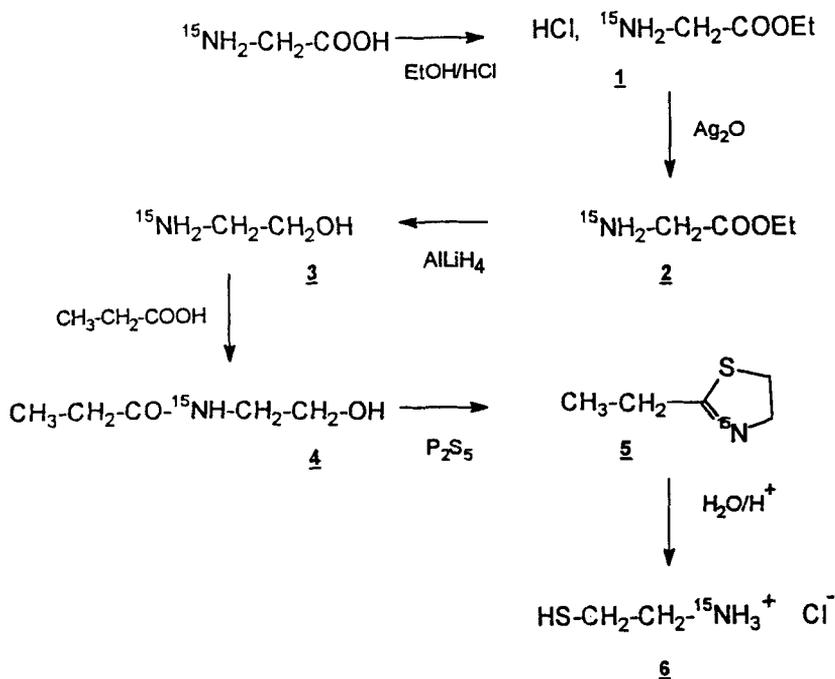
Key Words: [¹⁵N]-Cysteamine , [¹⁵N]-NMR , Radioprotector.

INTRODUCTION

La cystéamine ou mercaptoéthylamine est, parmi les aminothiols, le radioprotecteur de base (1) ; en effet, sa structure se retrouve dans la plupart des principaux radioprotecteurs et représenterait le principe actif. Sa dégradation digestive et sa toxicité non négligeable imposent la recherche de nouvelles formes galéniques d'administration tel le liposome (2). L'étude des interactions entre radioprotecteurs et membranes lipidiques, semble intéressante, sachant que ces interactions peuvent être impliquées dans un mécanisme possible de la radioprotection (2,3). La détermination du pK aqueux et du pK membranaire de la fonction amine de la cystéamine peut être un moyen judicieux pour la compréhension des interactions entre cette molécule et la membrane phospholipidique (4), l'évaluation du pK étant réalisée par mesure du déplacement chimique du signal de l'atome d'azote en fonction du pH par la technique originale de

RMN ^{15}N (5). Etant donné la très faible abondance naturelle de l'isotope ^{15}N , la synthèse de la ^{15}N -cystéamine s'avère nécessaire pour permettre d'utiliser ce moyen d'investigation.

Le processus de synthèse de la ^{15}N -cystéamine est illustré dans le schéma 1.



SCHEMA 1

La préparation du chlorhydrate de glycinate d'éthyle est réalisée par estérification de la glycine dans l'alcool absolu, selon la méthode de Weissbach et Sprinson (6). Le glycinate d'éthyle est obtenu par action de l'oxyde d'argent en solution étherée, suivant le mode opératoire proposé par Curtius et Goebel (7). La réduction du glycinate d'éthyle par l'hydrure de lithium aluminium donne l'éthanolamine (8) qui est ensuite traitée par un excès d'acide carboxylique. L'acylaminoalcool ainsi obtenu réagit à chaud avec le pentasulfure de phosphore pour donner le dérivé cyclisé dihydrothiazole correspondant. Après hydrolyse acide, le produit final obtenu est le chlorhydrate de mercaptoéthylamine (9, 10). Ce procédé de synthèse, souvent décrit pour des quantités extrêmement importantes de produit de départ a été appliqué à la synthèse de la cystéamine marquée à l'azote ^{15}N . De nombreuses adaptations ont du être effectuées. Une optimisation des différentes techniques mises en oeuvre a été réalisée lors de synthèses préalables mettant en jeu de faibles quantités de produit non marqué.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel

La [¹⁵N]-glycine provient de Eurisotop (Saint-Aubin, France). Les autres produits proviennent de Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Les solvants utilisés sont fraîchement distillés et conservés sur tamis moléculaire. Les spectres RMN sont réalisés sur spectromètre RMN Varian 60 MHz et Bruker 250 MHz. Les positions des différents pics sont données en ppm par rapport au TMS.

Synthèse de la [¹⁵N]-cystéamine

Chlorhydrate de [¹⁵N]-glycinate d'éthyle (1)

17 g (0,226 mole) de [¹⁵N]-glycine sont mis en solution dans 100 ml d'éthanol anhydre sous courant d'HCl gazeux pendant une heure. Ensuite, le mélange est chauffé au bain-marie environ dix heures jusqu'à l'obtention d'une solution limpide. Après refroidissement, les cristaux obtenus sont filtrés sur verre fritté. Le filtrat est concentré par évaporation. De nouveaux cristaux apparaissent et sont rassemblés avec les précédents. Après séchage sous vide, le point de fusion des cristaux de chlorhydrate de [¹⁵N]-glycinate d'éthyle est de 144°C et correspond aux données du produit commercial ¹⁴N. Cette réaction permet d'obtenir 26,6 g de chlorhydrate de [¹⁵N]-glycinate d'éthyle, soit un rendement de 84 %. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 60 MHz), δ: 1,05 (3H,t,CH₃), 3,60 (2H,s,CH₂), 4,05 (2H,q,CH₂), 8,55 (2H,s large,NH₂).

[¹⁵N]-Glycinate d'éthyle (2)

26,6 g (0,19 mole) de chlorhydrate de [¹⁵N]-glycinate d'éthyle et 22 g (0,095 mole) d'oxyde d'argent sont mis en suspension, sous forte agitation dans 170 ml d'éther anhydre (7). L'agitation est maintenue 30 minutes après apparition d'un précipité blanc-grisâtre de chlorure d'argent. La solution est alors filtrée et la phase étherée concentrée. 17 g de [¹⁵N]-glycinate d'éthyle sont obtenus, soit un rendement de 86 %.

[¹⁵N]-Ethanolamine (3)

9,65 g (0,250 mole) d'hydruure de lithium aluminium sont mis en suspension dans 82 ml d'éther anhydre. 17 g (0,165 mole) de [¹⁵N]-glycinate d'éthyle en solution étherée sont introduits goutte à goutte. L'agitation est maintenue 25 minutes en chauffant à reflux. Le mélange réactionnel est refroidi avec un bain de glace et 20 ml d'eau sont ensuite ajoutés. Après filtration sur verre fritté, la phase étherée contenant très peu d'aminoéthanol, le résidu est extrait en continu par de l'alcool éthylique à chaud, pendant 6 heures (appareil de type Soxhlet). Après évaporation de l'alcool, l'huile résiduelle obtenue est distillée sous pression réduite pour donner 2,25 g de [¹⁵N]-éthanolamine, soit un rendement de 42 %, Eb₂₅ = 90°C. RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz), δ: 2,7 (3H,s,NH₂,OH), 2,8 (2H,t,CH₂).

N-propionyl [¹⁵N]-éthanolamine (4)

2,1 g (0,034 mole) de [¹⁵N]-éthanolamine sont portés à reflux avec 2,5 g (0,024 mole) d'acide propionique pendant 1/2 heure. La distillation sous vide donne 2,3 g de N-propionyl [¹⁵N]-éthanolamine, soit un rendement de 58 %, $E_{b_{0,8}} = 151^{\circ}\text{C}$. RMN ¹H (CDCl₃, 60MHz), δ: 1,15 (3H,t,CH₃), 2,2 (2H,q,CH₂), 3,4 (2H,t,CH₂), 6,2 (2H,s,NH,OH).

2-éthyl-4,5-dihydro [¹⁵N]-thiazole (5)

2,65 g (0,012 mole) de P₂S₅ sont mis en suspension dans 14 ml d'huile minérale. On ajoute 2,3 g (0,019 mole) de N-propionyl [¹⁵N]-éthanolamine sous forte agitation. Le mélange réactionnel est chauffé progressivement jusqu'à 110°C. La réaction est exothermique, élevant la température à 140°C. Cette température est maintenue pendant 1/2 heure. Puis, la température est ramenée à 80°C. On ajoute lentement 6 ml d'eau puis quelques ml d'une solution aqueuse de NaOH 30 % jusqu'à l'obtention d'un pH basique. La réaction est laissée sous agitation 1/2 heure. Après entraînement à la vapeur d'eau du mélange, la solution aqueuse est extraite à l'éther, la phase étherée est séchée sur Na₂SO₄ anhydre et évaporée à la pression atmosphérique. L'huile résiduelle est distillée sous pression réduite (30 mm Hg) pour donner 1,16 g de 2-éthyl-4,5-dihydro [¹⁵N]-thiazole ; $E_{b_{30}} : 73^{\circ}\text{C}$, Rdt = 51 %. RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz) δ: 1,2 (3H,t,CH₃), 2,5 (2H,q,CH₂), 3,25 (2H,t,CH₂), 4,25 (2H,t,CH₂).

Chlorhydrate de [¹⁵N]-cystéamine (6)

1,16 g (0,011 mole) de 2-éthyl-4,5-dihydro [¹⁵N]-thiazole sont portés à reflux 24 heures dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 20 %. Le mélange est ensuite évaporé sous vide. Le produit obtenu est recristallisé par dissolution dans du méthanol et précipitation à l'éther. 500 mg de chlorhydrate de [¹⁵N]-cystéamine sont obtenus, (Rdt = 40 %). Plusieurs recristallisations sont nécessaires pour purifier le chlorhydrate. $F = 70-71^{\circ}\text{C}$. RMN ¹H (D₂O, 250 MHz) δ: 2,83 (2H,t,CH₂), 3,2 (2H,t,CH₂).

DISCUSSION

L'oxyde d'argent est préparé selon la technique habituelle (11) et deshydraté par stockage (12 h) dans un dessiccateur avant d'être mis en solution. La nature basique du pH indique que la quantité d'oxyde d'argent ajoutée est suffisante.

La principale difficulté rencontrée lors de la préparation de l'éthanolamine provient de son extraction du résidu obtenu après destruction de l'excès de AlLiH_4 par H_2O , la phase étherée renfermant une quantité minime de produit attendu. L'utilisation d'un appareil de type Soxhlet permet de réaliser l'extraction solide-liquide en continu.

La neutralisation et la réduction simultanée du chlorhydrate de glycinate d'éthyle par traitement par un excès de AlLiH_4 permet d'accéder à l'éthanolamine en une seule opération mais avec un rendement bien plus faible comparé à celui obtenu en deux étapes.

L'acide propionique a été préféré à l'acide acétique pour la préparation de l'aminoolcool N-substitué car la synthèse du 2-éthyl-4,5-dihydrothiazole s'effectue avec un rendement très supérieur à celle du 2-méthyl-4,5-dihydrothiazole particulièrement volatil. En effet, la réaction de cyclisation fortement exothermique et l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau conduisent à une perte de produit d'autant plus importante que celui-ci est volatil. De plus, concernant cette réaction de cyclisation, une quantité minimale d'amide de départ (4) a pu être déterminée. En effet, la mise en réaction de quantités inférieures à 0,019 mole de N-propionyl-éthanolamine induit des rendements extrêmement faibles, voir nuls, en dérivé cyclisé.

Les purifications par cristallisation éliminent la cystamine qui se forme par oxydation du chlorhydrate de cystéamine (12). Les cristaux blancs sont très hygroscopiques et doivent être manipulés avec des instruments en téflon pour éviter une oxydation catalytique en présence d'ions métalliques.

REFERENCES

- (1) FATOME M., Radioprotection, 22, 209, (1987).
- (2) ROMAN V., BACQUIER F., LETERRIER F., FATOME M., C. R. Acad. Sci. Paris, 295, 191, (1982).
- (3) JOCELYN P.C., dans Biochemistry of the SH group, Academic Press, London, (1972).
- (4) BONNET P.A., ROMAN V., FATOME M., BERLEUR F., Chem.Phys.Lipids, 55, 133,(1990).
- (5) BLOMBERG F., RUTERJANS H., dans Biological Magnetic Resonance, (Berliner L.J., Reuben J. Eds), Plenum Press, New York, 5, 21, (1983).
- (6) WEISSBACH A., SPRINSON D. B., J. Biol. Chem., , 203, 1023, (1953).
- (7) CURTIUS T., GOEBEL F., Ann. Chem., 37, 159, (1888),.
- (8) KARRER P., PORTAMM P., SUTER M., Helv. Chem. Acta, 31, 1617, (1948).
- (9) ROGGERO J., Thèse de Doctorat d'Etat, Marseille, (1964).
- (10) WENKER H., J. Amer. Chem. Soc., 37, 1079, (1935).

(11) MADSEN, Z. Anorg. Allgem. Chem., 79, 197, (1913).

(12) MAISIN J.R., BACQ Z.M., dans Sulfur-containing Radioprotective Agents, IEPT, (Bacq Z.M., Ed.), Pergamon Press, Oxford, 1975.

Remerciements

Ce travail a été financé par la Direction des Recherches Etudes et Techniques. Contrat n°901073.