

ETUDE DES PROPRIETES RADIOPROTECTRICES DE COMPOSES HETERO-CYCLIQUES AZOTES

Sommaire. - Les propriétés radioprotectrices de l'imidazole ayant été mises en évidence dans un précédent travail, les auteurs poursuivent leur expérimentation sur certains dérivés de ce noyau ainsi que des composés de structure voisine.

Leurs résultats montrent :

1° que les composés obtenus par substitution d'un groupement mercapto, méthyle, carbonyle ou benzyle, à un hydrogène du noyau imidazole sont inactifs,

2° que le benzimidazole présente par contre des propriétés intéressantes.

Pour ce dernier composé le pourcentage de survie pouvant atteindre 90 pour cent les auteurs ont déterminé les conditions optimales de son activité radioprotectrice ; de plus, dans le but d'obtenir des renseignements susceptibles de préciser le mécanisme d'action de la radioprotection, ils ont étudié pour chacun des produits expérimentés d'une part leur action sur la température interne de la souris et d'autre part leur activité radioprotectrice .../

ON THE RADIOPROTECTIVE PROPERTIES OF HETEROCYCLIC NITROGENOUS COMPOUNDS

Summary. - Continuing their study of the possible radioprotective properties of heterocyclic nitrogenous compounds, the authors study certain derivatives of imidazole and other compounds of similar structure.

The results obtained showed :

1° that the derivatives resulting from the presence in the imidazole ring of the mercapto, methyle, carbonyle, or benzyle groups are inactive : these substitutions appear to destroy the significant radioprotective activity of the imidazole,

2° that benzimidazole, on the contrary, seems to possess highly interesting properties. The pourcentage of survivals obtained with mice treated with benzimidazole and exposed to lethal irradiation has encouraged the authors to undertake careful study of this substance, with a view to define optimum activity conditions, and to determine the mechanism responsible for its radioprotective action.

Further on and so as to of clarify certain points that might give useful data concerning the mechanisms of action of radioprotective chemicals, .../

in vitro vis-à-vis d'une solution d'hémine.

1964

p. 16

Commissariat à l'Energie Atomique - France

---

in respect of each of the products the authors have studied :

- a - the action of these bodies on the internal temperature of mice,
- b - their radioprotective activity in vitro, in a solution of irradiated hemin.

1964

P. 16

**ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS RADIOPROTECTRICES  
DE COMPOSÉS HÉTÉROCYCLIQUES AZOTÉS**

par

Renaud RINALDI et Yvette BERNARD

**Rapport CEA - R 2582**

CENTRE D'ÉTUDES  
NUCLÉAIRES DE GRENOBLE



*Les rapports du COMMISSARIAT A L'ÉNERGIE ATOMIQUE sont, à partir du n° 2200, en vente à la Documentation Française, Secrétariat Général du Gouvernement, Direction de la Documentation, 16, rue Lord Byron, PARIS-8<sup>e</sup>.*

*The C.E.A. reports starting with n° 2200 are available at the Documentation Française, Secrétariat Général du Gouvernement, Direction de la Documentation, 16, rue Lord Byron, PARIS-8<sup>e</sup>.*

ETUDE DES PROPRIETES RADIOPROTECTRICES DE  
COMPOSES HETEROCYCLIQUES AZOTES

par

Renaud RINALDI et Yvette BERNARD



## ETUDE DES PROPRIETES RADIOPROTECTRICES

### DE COMPOSES HETEROCYCLIQUES AZOTES

Le présent travail prend place dans le cadre des recherches que nous avons entreprises depuis quelques années, sur les propriétés radioprotectrices des composés de la famille de l'imidazole. Les résultats intéressants précédemment obtenus avec l'imidazole lui-même (9), alors que de nombreux dérivés de ce noyau sont inactifs, nous ont incité à poursuivre notre expérimentation avec des composés de structures voisines dans le but de rechercher les corrélations pouvant exister, pour cet ensemble de substances, entre la structure et l'activité radioprotectrice.

Cette étude systématique ayant permis de mettre en évidence un nouveau composé radioprotecteur : le benzimidazole, nous avons essayé de déterminer les conditions optimales de son activité en faisant varier successivement la dose de ce composé, le temps séparant son injection de l'irradiation et les doses d'irradiation.

De plus, afin de préciser certains points pouvant apporter des renseignements utiles quant au mécanisme d'action des radioprotecteurs, nous avons étudié pour chacun des produits expérimentés, d'une part leur action sur la température interne de la souris, d'autre part leur activité radioprotectrice in vitro vis à vis d'une solution d'hémine.

#### I. - ACTION RADIOPROTECTRICE IN VIVO.

Dans la nouvelle série d'expériences que nous présentons nous avons testé 15 produits (tableau I) parmi lesquels on trouve des dérivés de l'imidazole et des noyaux hétérocycliques azotés.



Ces composés, provenant de différentes firmes (LIGHT, SERLABO, PROLABO, et CIBA), sont utilisés sous forme de solutions dans du soluté physiologique isotonique ou dans du 1-2-propanediol à 10%, ramenées à pH 7 au moment de leur administration par voie intrapéritonéale.

Préalablement à l'étude des propriétés radioprotectrices de ces corps, leur toxicité chez la souris a été déterminée en utilisant la méthode décrite par DIXON et MOOD (3) et reprise par KIMBALL, BURNETT et DOHERTY (4), ce qui permet d'obtenir, avec un nombre relativement restreint d'animaux, la DL 50/30 jours.

Comme dans nos études précédentes (9), le test retenu pour la mise en évidence rapide de l'activité protectrice des composés étudiés est la réduction de la mortalité chez des souris traitées par ces produits et soumises à une dose de rayons X létale pour les témoins.

Les animaux, des souris C3H/Jax âgées de 12 à 18 semaines, sont enfermés pendant l'irradiation dans une boîte circulaire de plexiglass comportant 10 cases utilisables. Cinq de ces cases sont destinées à des souris sur lesquelles on a pratiqué une injection intrapéritonéale du produit à tester, et les 5 autres à des souris témoins ayant reçu par la même voie une injection du solvant utilisé. Les quantités voulues de solutions, fraîchement préparées, sont injectées cinq minutes avant le début de l'irradiation, les doses utilisées étant, pour les premières expériences, égales à la moitié de la DL 50 précédemment déterminée. Ces doses seront éventuellement augmentées ou diminuées selon que la toxicité paraîtra exagérée ou non par l'irradiation.

Le générateur de rayons X utilisé fonctionne sous une tension continue de 180 kV, avec une intensité de 18 mA. Pour l'exposition, la boîte renfermant les souris est placée sur un plateau tournant afin que l'énergie radiante soit distribuée de façon plus homogène. Les animaux, ainsi disposés à une distance de 50 cm de la source filtrée par une plaque de cuivre de 0,5 mm d'épaisseur, reçoivent une dose de 700 R délivrés en 10 minutes environ.

Après irradiation les animaux, toujours groupés par 5, sont mis en cage, maintenus à un régime normal et dénombrés chaque jour. Cette exposition de 700 R permet d'obtenir une mortalité de 100% chez les témoins 2 semaines après irradiation, tandis que la survie à 30 jours des souris traitées sert à chiffrer l'activité protectrice des produits étudiés.

Les résultats obtenus concernant la radioprotection in vivo sont rassemblés dans le tableau I duquel il ressort nettement :

a) que ces dérivés de l'imidazole ne sont pas radioprotecteurs ; les différentes doses utilisées pour chacun des produits n'ont pas permis d'obtenir de survie à 30 jours, et la courbe de mortalité des animaux traités est semblable à celle des témoins.

b) qu'en ce qui concerne les noyaux hétérocycliques azotés, seul le benzimidazole donne des résultats intéressants. En effet, tandis que pour les autres composés la mortalité

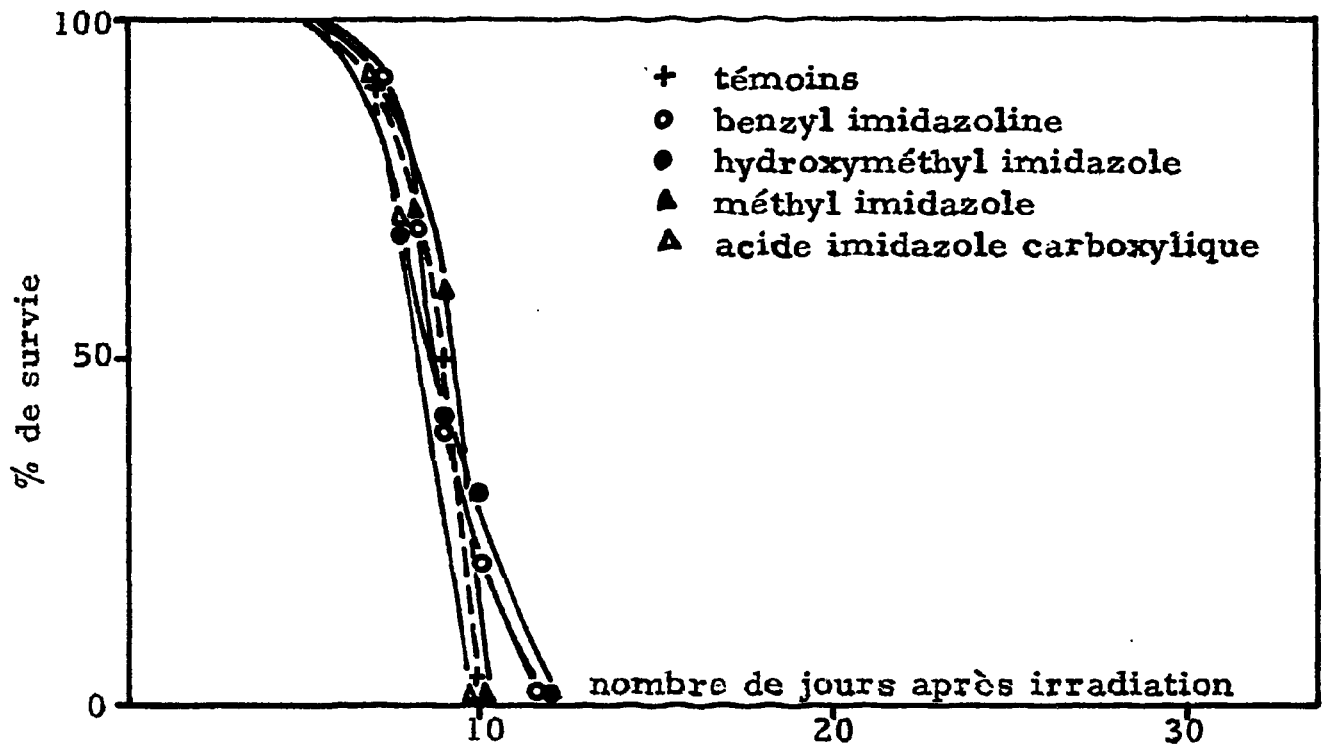


Fig. 1 - Courbes de survie de souris traitées par les dérivés de l'imidazole 5 minutes avant une irradiation de 700 R.

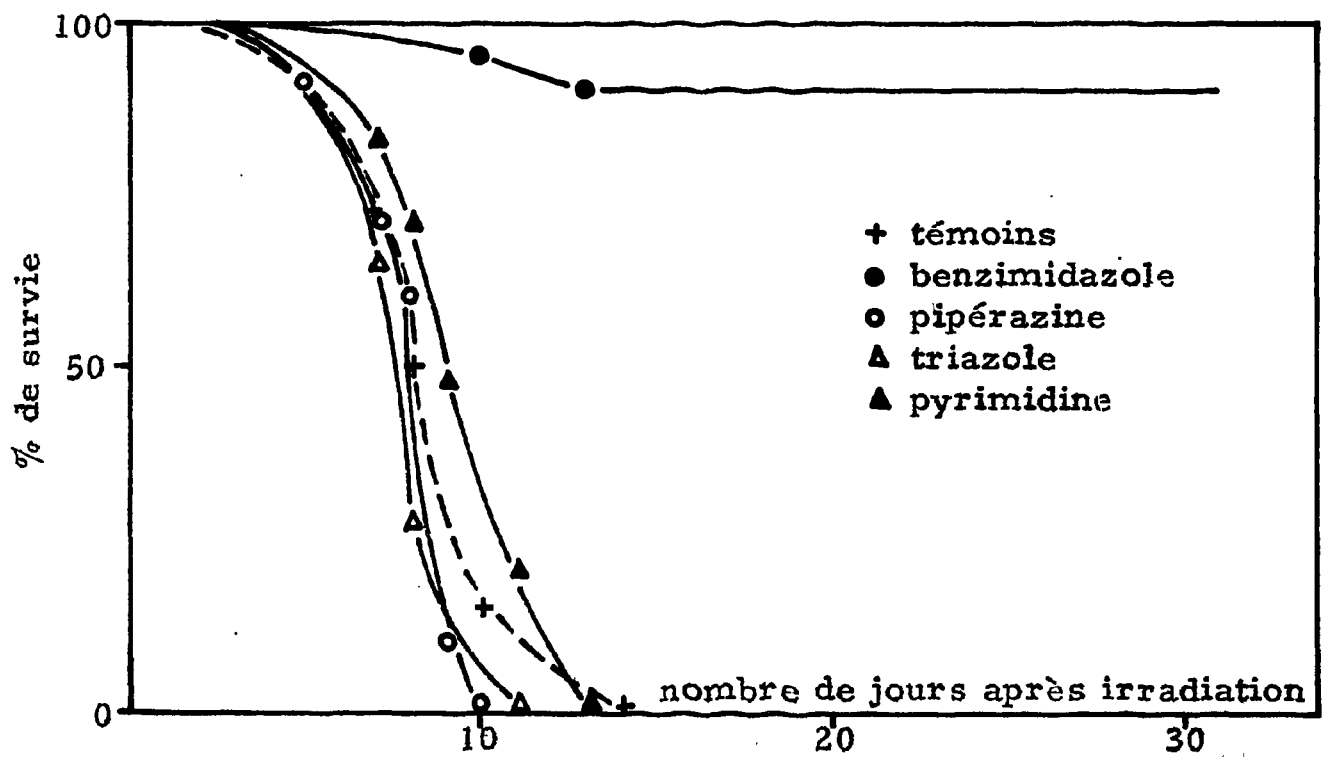


Fig. 2 - Courbes de survie de souris traitées par certains hétérocycles azotés 5 minutes avant une irradiation de 700 R.

TABLEAU I

Produit étudié	Solution utilisée		Toxicité DL 50 en mg/g	Protection in vivo	
	Solvant	mg/ml		dose en mg /g	survie %
2-mercapto-imidazole	SPI *	20	1,87	0,80 1,0 1,20	0 0 0
2-méthyl-imidazole	SPI	20	0,70	0,35	0
Acide imidazole 4- carboxylique	SPI	15	1,65	0,35 0,50 0,80	0 0 0
4-hydroxy-méthyl-imidazole	SPI	100	2,02	0,50 1,0	0 0
2-benzyl-imidazoline	SPI	10	0,16	0,08 0,10	0 0
Pyrrole	Tampon phosphate	2,5	0,098	0,03 0,05	0 0
Pyrazole	SPI	50 25	1,40	0,75 0,30	0 0
Triazole	SPI	50	1,42	0,75	0
Pyrimidine	SPI	50	3,31	1,50	0
Pyridine	SPI	25	0,95	0,45	15 à préciser
Pyrazine	SPI	50	2,73	1,40	0
Pyridazine	SPI	25	2,65	1,30 0,80	0 0
Pipérazine	SPI	50	1,90	0,80	0
Purine	SPI	15	1,10	0,50	0
Benzimidazole	Propane diol à 10 %	7,5	0,52	0,35	90

\* SPI = soluté physiologique isotonique

observée est identique à celle des animaux témoins, dans le cas du benzimidazole on obtient 90% de survie 30 jours après une irradiation mortelle.

La figure 1 donne les courbes de survie des dérivés de l'imidazole en fonction du nombre de jours après l'irradiation, et la figure 2 ces mêmes courbes pour quelques uns des hétérocycles azotés.

## II.- ETUDE DES PROPRIETES RADIOPROTECTRICES DU BENZIMIDAZOLE

L'examen des résultats obtenus montrant que seul le benzimidazole présente des propriétés radioprotectrices intéressantes, il apparaissait nécessaire de préciser les conditions optimales de l'activité de ce composé.

### 1.- ETUDE DE LA RADIOPROTECTION EN FONCTION DE LA DOSE DE PROTECTEUR

Connaissant la toxicité du benzimidazole (DL 50= 0,52 mg/g), on injecte aux animaux des doses de 0,15 - 0,25 - 0,35 mg/g immédiatement avant une irradiation de 660 R et on détermine comme précédemment le pourcentage de survie après 30 jours. Les résultats obtenus donnent respectivement :

- 70% de survie pour une dose de 0,15 mg/g

- 95% de survie pour une dose de 0,25 mg/g.

En ce qui concerne la dose de 0,35 mg/g, des phénomènes toxiques se produisent et peuvent entraîner la mort de 5% environ des animaux dans les heures qui suivent l'injection. Les souris ayant résisté à cette toxicité survivent à 100% au syndrome d'irradiation qui, ne se manifestant qu'au bout de 5 à 6 jours, ne peut, de ce fait, être confondu avec la mortalité due à la toxicité, laquelle apparaît dans les 24 heures.

La figure 3, qui donne le pourcentage de survie obtenue en fonction du temps après une irradiation de 660 R pour des souris traitées par ces différentes doses de benzimidazole, met en évidence l'augmentation de la protection avec la dose de produit administré.

## 2.- ETUDE DE LA RADIOPROTECTION EN FONCTION DU TEMPS SEPARANT L'INJECTION DU DEBUT DE L'IRRADIATION

Pour cette étude on injecte 0,25 mg/g de benzimidazole 1 heure, 30 minutes, 5 minutes avant l'irradiation létale et immédiatement après celle-ci. Dans ces conditions, les courbes de survie (figure 4) montrent que les animaux traités immédiatement après l'irradiation meurent exactement comme les témoins, tandis que pour les souris ayant reçu le composé avant irradiation on obtient, 30 jours après, les pourcentages de survie suivants :

- 45% si l'irradiation est faite 1 heure après l'injection
- 75%           "           "           30 minutes           "
- 90%           "           "           5 minutes           "

Alors que l'injection après l'irradiation se révèle totalement inefficace, il apparaît nettement que l'activité protectrice du benzimidazole est maximum lorsque le produit est injecté quelques minutes avant le début de l'irradiation et que la protection diminue au fur et à mesure que cet intervalle de temps augmente.

## 3.- ETUDE DE LA RADIOPROTECTION EN FONCTION DE LA DOSE D'IRRADIATION

Des témoins et des souris ayant reçu 0,25 mg/g de benzimidazole 5 minutes avant le début de l'irradiation sont soumises à des expositions de 550, 580, 600, 625, 660, 700, 800 et 900 R. Ici encore les pourcentages de survie à 30 jours permettent d'apprécier les propriétés radioprotectrices du benzimidazole en fonction de la dose de rayons X.

Comme le montre la figure 5, alors que le pourcentage de survie des témoins diminue rapidement avec l'augmentation de la dose (90% pour 550 R et 0% pour 700 R), pour les animaux protégés la survie est de 100% jusqu'à 625 R, puis de 90% pour 700 R et ne tombe à 10% qu'après une exposition de 900 R.

Pour ces 2 séries d'expériences (témoins et protégés) nous avons tracé (figure 6) les droites de régression des probits de mortalité à 30 jours en fonction du logarithme de la dose d'irradiation. Les courbes obtenues montrent que :

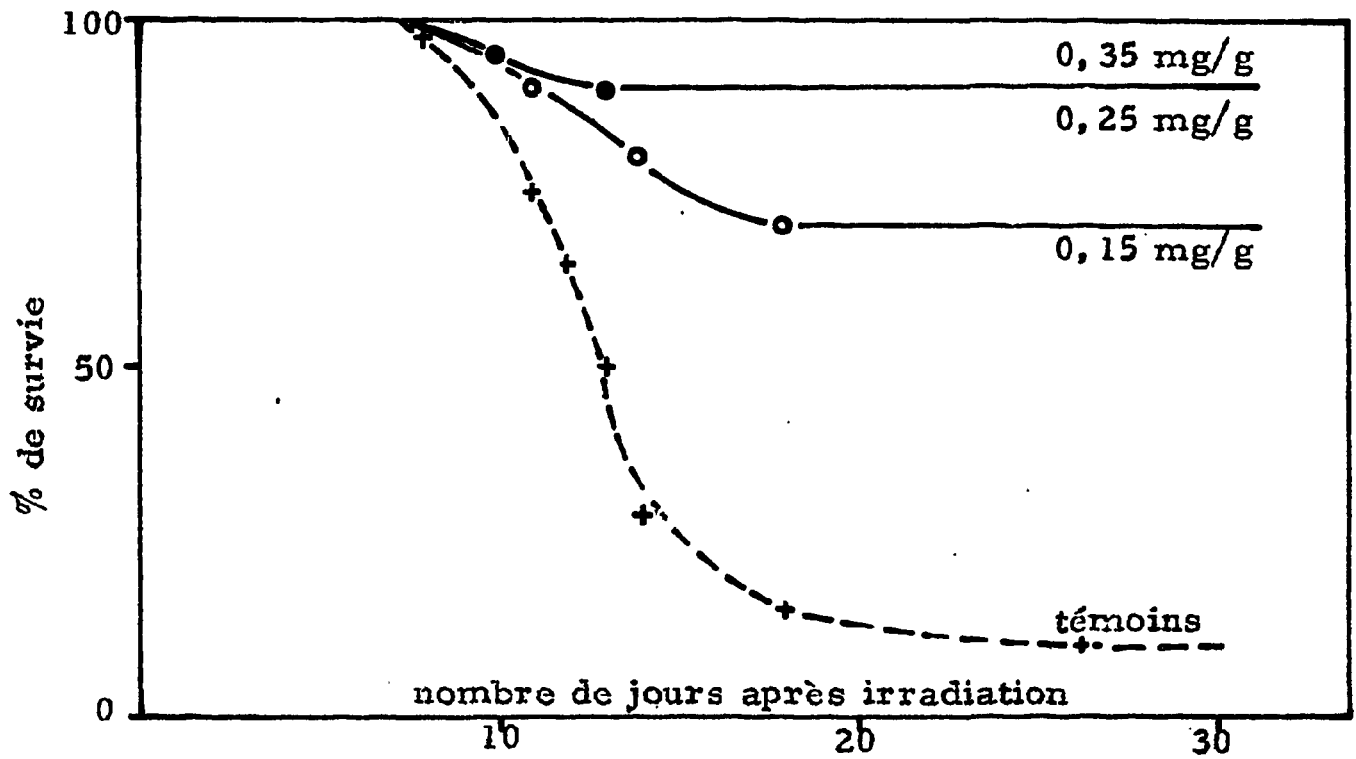


Fig. 3 - Courbes de survie de souris traitées par différentes doses de benzimidazole et irradiées à 660 R.

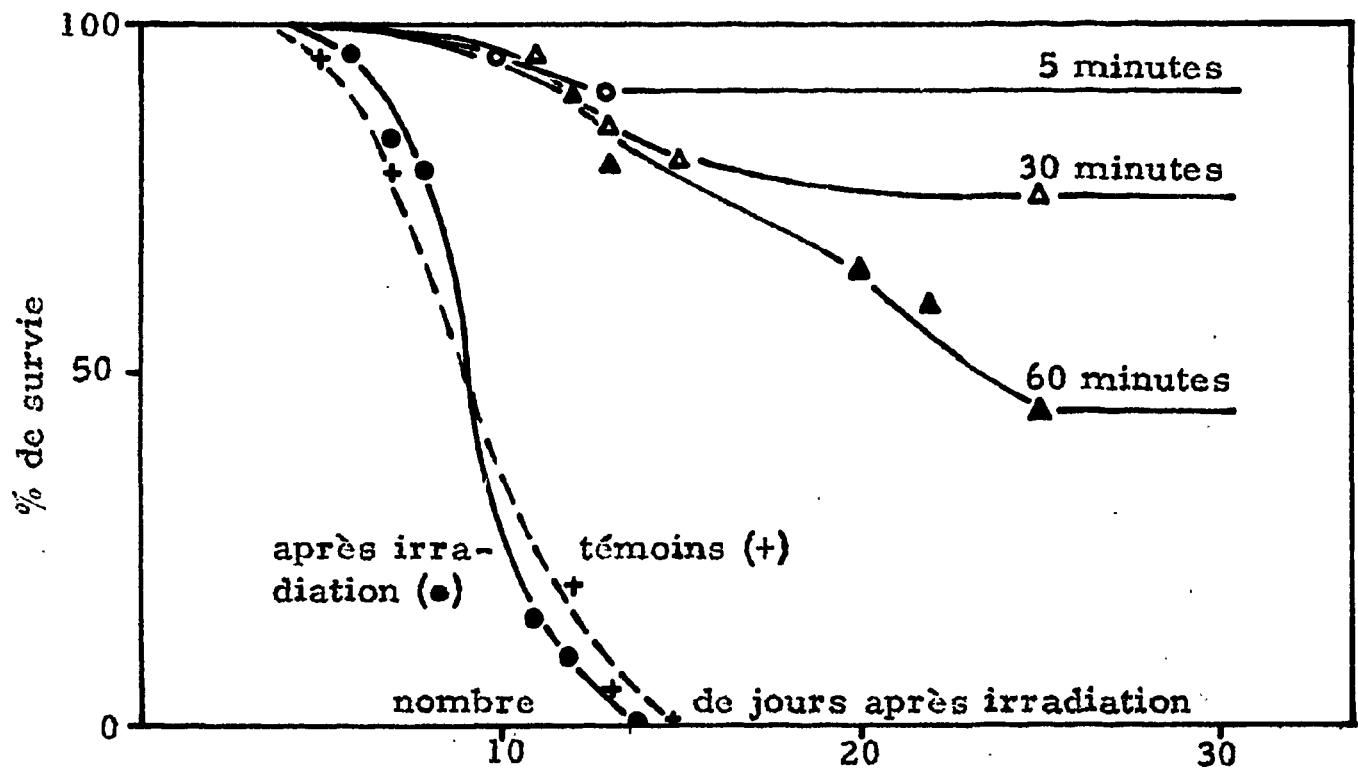


Fig. 4 - Courbes de survie de souris irradiées à 700 R à des temps variables après injection de 0,25 mg/g de benzimidazole.

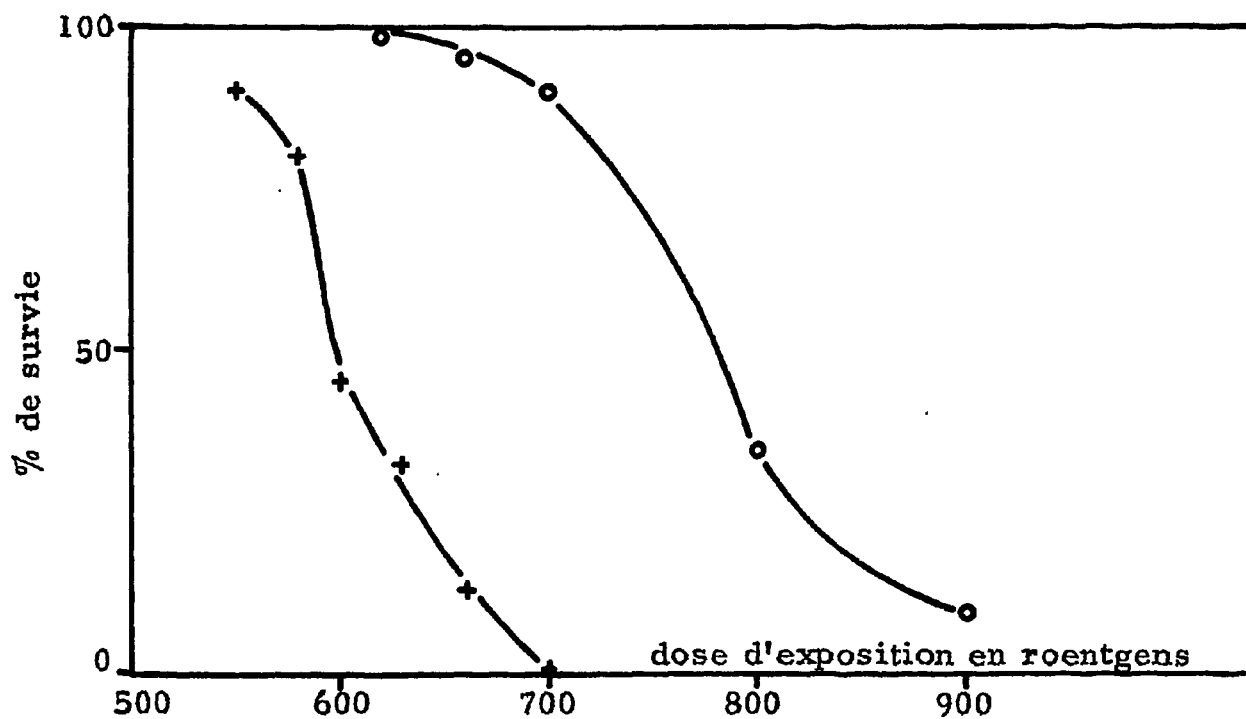


Fig. 5 - Courbes de survie de souris témoins (+) et protégées (o) par 0,25 mg/g de benzimidazole en fonction de l'exposition aux rayons X.

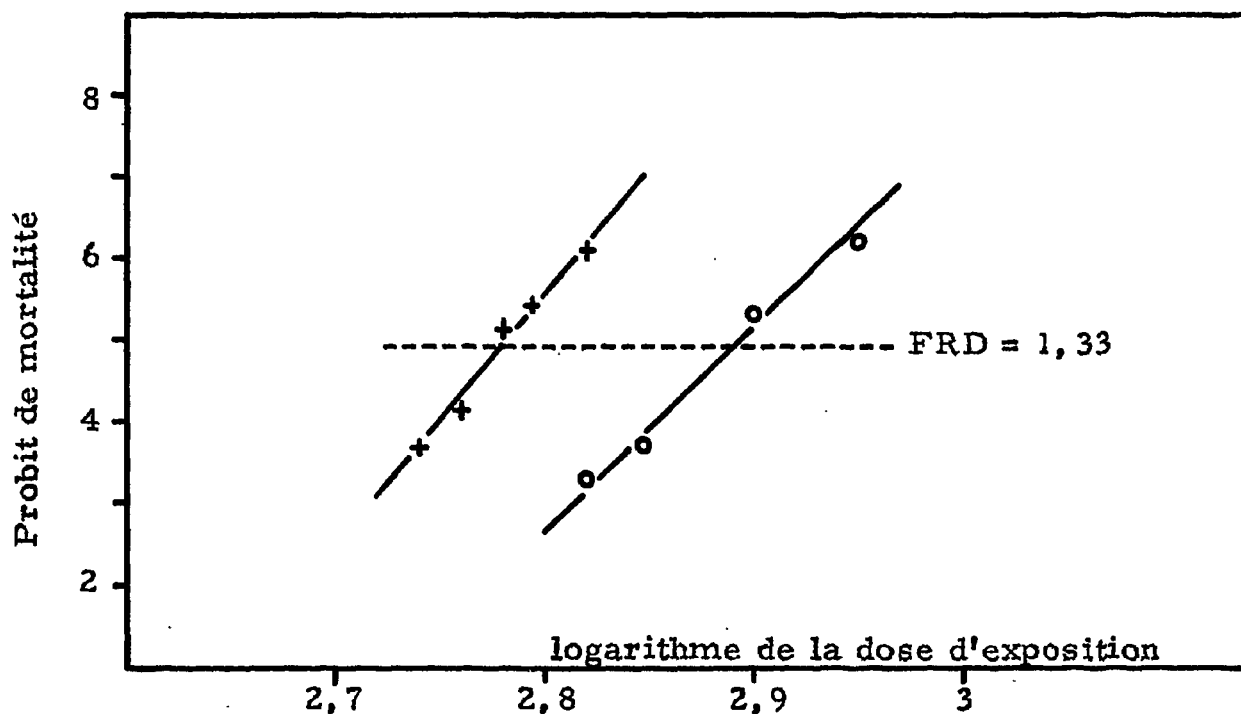


Fig. 6 - Droites de regression des probits de mortalité à 30 jours pour les souris témoins (+) et les souris protégées (o) par le benzimidazole.

a) pour les expositions de rayons X utilisées, le pourcentage de survie des animaux protégés est bien supérieur à celui des animaux non traités.

b) le facteur de réduction de dose (FRD) pour la dose létale moyenne (DL 50) est de 1,33.

c) ces 2 droites n'étant pas parallèles, le facteur de réduction de dose n'a pas une valeur unique mais semble croître avec la dose d'irradiation, ce qui est classique pour ce genre de courbe (2-8).

### III.- ACTION DES COMPOSES ETUDIES SUR LA TEMPERATURE RECTALE DES SOURIS

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'hypothermie considérée comme moyen de protection contre les radiations (6-10) ou encore dans le but d'expliquer l'action des substances radioprotectrices.(7).

TABEAU II

Produit étudié	Variation maximum de la température rectale	Temps nécessaire en mn pour obtenir l'hypothermie maximum
2- mercapto imidazole	- 4° C	180
2- méthyl-imidazole	- 2° C	20
Acide imidazole 4 carboxylique	- 2° C	10
Hydroxy-méthyl-imidazole	- 4,5° C	30
2-benzyl-imidazoline	- 3° C	30
Pyrrole	+ 1° C	10
Pyrazole	- 2° C	20
Triazole	- 3° C	20
Pyridine	- 7,5° C	40
Pyrazine	- 1° C	10
Pyridazine	- 3° C	25
Pipérazine	- 4° C	20
Purine	- 2,2° C	30
Benzimidazole	- 8° C	60



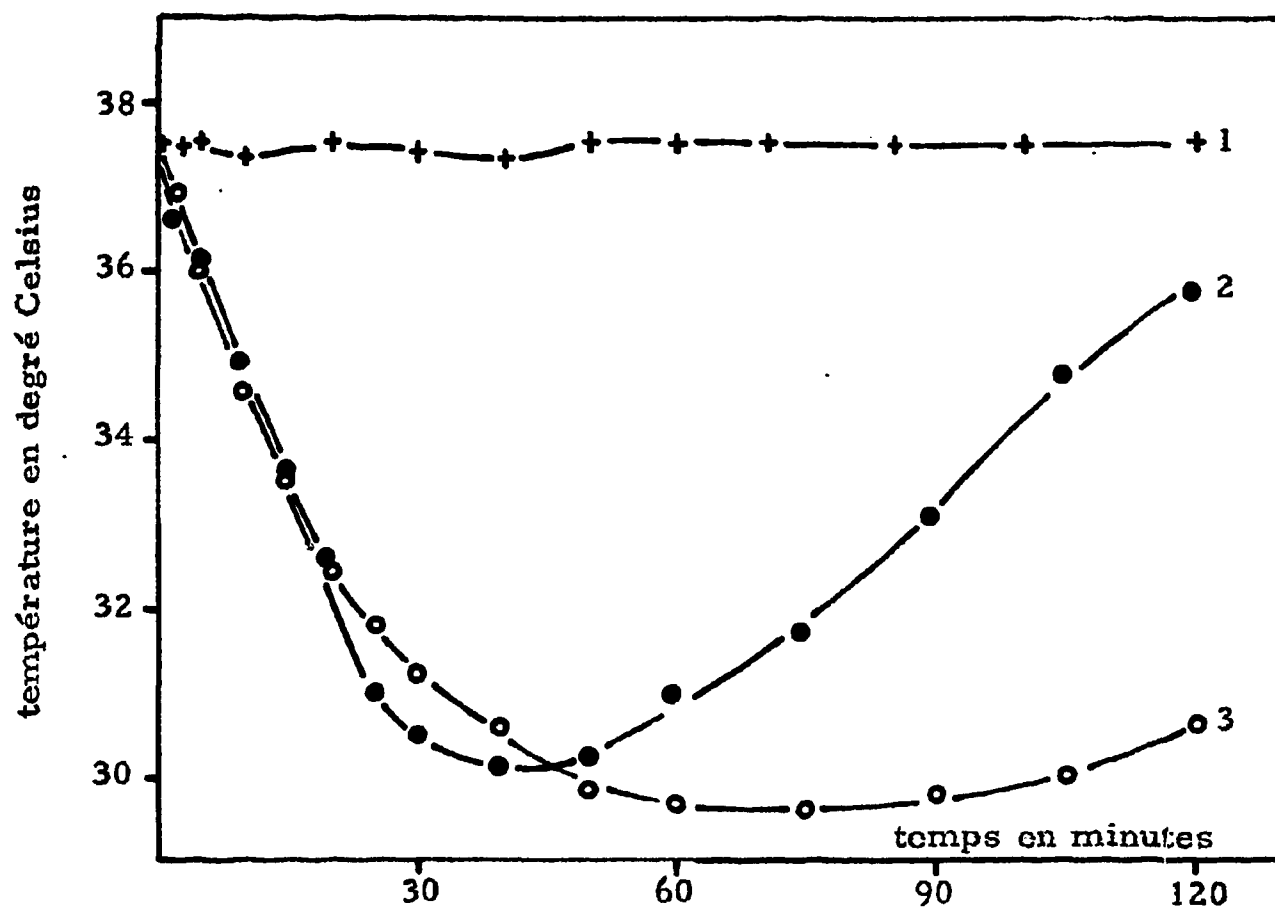


Fig. 7 - Variation de la température rectale de la souris après injection de soluté physiologique (1), de pyridine (2) et de benzimidazole (3).

Bien que le plus souvent leurs résultats aient montré qu'on ne pouvait établir de parallélisme entre la radioprotection et l'hypothermie provoquée par les composés protecteurs, nous avons tenu à préciser ce point, dans le cas des hétérocycles azotés, en déterminant systématiquement l'action des composés étudiés sur la température rectale de la souris.

Pour ce faire, nous avons utilisé un thermomètre électrique (thermomètre universel électrique type TE 3, ELEKTRO-LABORATORIET-COPENHAGUE) équipé d'une sonde RM4 et expérimenté avec les doses de produits déjà employées "in vivo".

Après avoir préalablement déterminé la température rectale de chaque souris (valeur moyenne 37,5° C), on a suivi l'évolution de cette température après l'injection en notant cette donnée toutes les 5 minutes pendant la première demi-heure, puis toutes les 10 minutes pendant les deux heures et demi suivantes.

Sur le tableau II, qui donne les résultats obtenus pour cette série de mesures, on constate que dans la plupart des cas, l'action de ces composés se traduit par un abaissement de la température de l'ordre de 2 à 3° C qui se produit dans les 30 minutes suivant l'injection. On notera cependant l'hypothermie plus importante provoquée par la pyridine (-7,5° C) et le benzimidazole (-8° C après 60 minutes). Ce dernier produit, qui est le seul composé radioprotecteur intéressant de la série, est aussi le plus hypothermisant. Toutefois, il ne semble pas y avoir de corrélation entre la valeur de cette hypothermie et le degré de radioprotection. En effet non seulement l'activité du benzimidazole est maximum quand il est injecté 5 minutes avant l'irradiation, c'est-à-dire au moment où la température rectale de la souris n'a chuté que de 2° C environ, mais lorsque l'hypothermie devient maximum, soit 60 minutes après l'injection, la protection a déjà diminué de moitié. De plus la pyridine, très hypothermisante, ne paraît pas être un bon radioprotecteur (à préciser).

La figure 7 donne les courbes de température en fonction du temps pour des souris traitées par le sérum physiologique, le benzimidazole et la pyridine.

#### IV. - EXPERIMENTATION IN VITRO

Les travaux de BARAC, BEAUMARIAGE et coll. (1-5) sur la dégradation de l'hémine par irradiation et sa protection par certains composés radioprotecteurs nous ont incité à utiliser cette méthode pour tester l'activité radioprotectrice in vitro de nos composés.

L'émetteur de rayons X nous employé pour cette expérimentation est un baltographe 5-50 kV/35 mA équipé d'un tube OEG 60 à fenêtre axiale de béryllium. L'appareil fonctionne sous une tension de 43 kV et une intensité de 30 mA. Une coupelle à fond plat de 4 cm de diamètre contient 2 ml de solution à irradier et se trouve à 6,75 cm du foyer du faisceau. Dans ces conditions, le débit est de 90.000 R par minute.

L'hémine est dosée par spectrophotométrie. L'étude des spectres de cette substance (en solution à 10 mg par litre dans NaOH N/1000) avant et après irradiation à des doses de  $9 \cdot 10^4$ ,  $18 \cdot 10^4$ ,  $27 \cdot 10^4$  et  $45 \cdot 10^4$  R (fig. 8) nous a amené à conserver la longueur d'onde de 3900 Å pour toutes nos mesures. La dégradation de l'hémine en fonction de l'irradiation est suivie par la variation des densités optiques (fig. 9). Importante dès une irradiation de  $9 \cdot 10^4$  R, cette dégradation se poursuit jusqu'à  $45 \cdot 10^4$  R, irradiation pour laquelle la valeur de la densité optique ne représente plus que 20% de la valeur de départ (hémine non irradiée).

Des mesures identiques sont également pratiquées avec les substances étudiées utilisées à la dose de 0,5 g/l. Pour 8 d'entre elles on ne relève aucune absorption notable quelle que soit la dose d'irradiation pour la longueur d'onde adoptée.

Nous avons analysé ensuite l'influence de l'irradiation sur des solutions d'hémine en présence de radioprotecteurs, les concentrations en hémine et en composés protecteurs étant les mêmes que dans les solutions employées ci-dessus. Dans tous les cas la dégradation est moins importante que pour l'hémine seule (fig. 9). Toutefois, la protection obtenue est généralement peu élevée : la densité optique retrouvée se situe entre 30 et 40% de sa valeur initiale alors que pour l'hémine seule elle était de 20% après irradiation.

Deux produits cependant, le pyrazole et la pipérazine, semblent donner des résultats plus intéressants : on retrouve en effet respectivement pour ces derniers 70 et 60% de la densité optique initiale après irradiation de  $45 \cdot 10^4$  R.

Ces premiers résultats d'une expérimentation en cours devront être confirmés et complétés, mais il apparait dès maintenant qu'on ne peut établir de relation entre la protection obtenue in vivo et in vitro par les composés étudiés.

## V.- CONCLUSION

L'étude des propriétés radioprotectrices de 15 composés dérivés de l'imidazole ou appartenant à la série des hétérocycles azotés nous a permis de mettre en évidence une substance

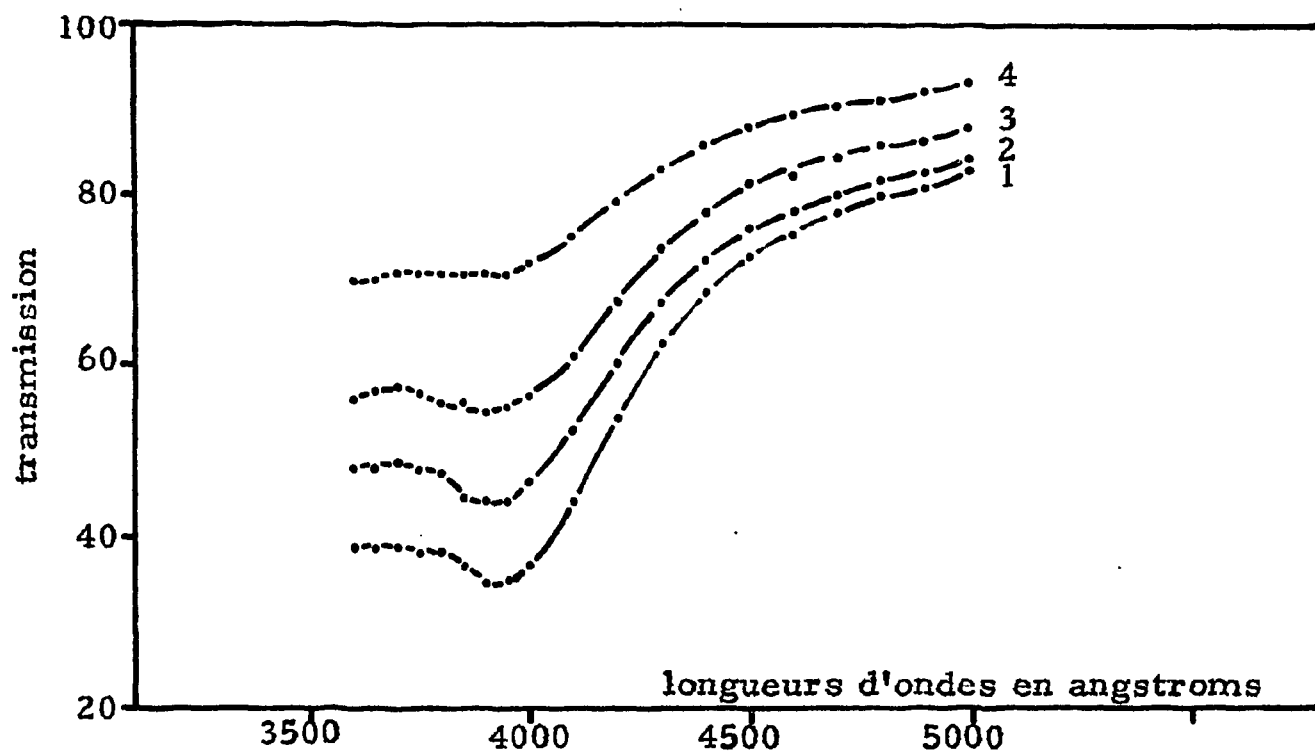


Fig. 8 - Spectre de transmission de solutions d'hémine irradiées à  $9 \cdot 10^4$ (1),  $18 \cdot 10^4$  (2),  $27 \cdot 10^4$  (3) et  $45 \cdot 10^4$  R (4).

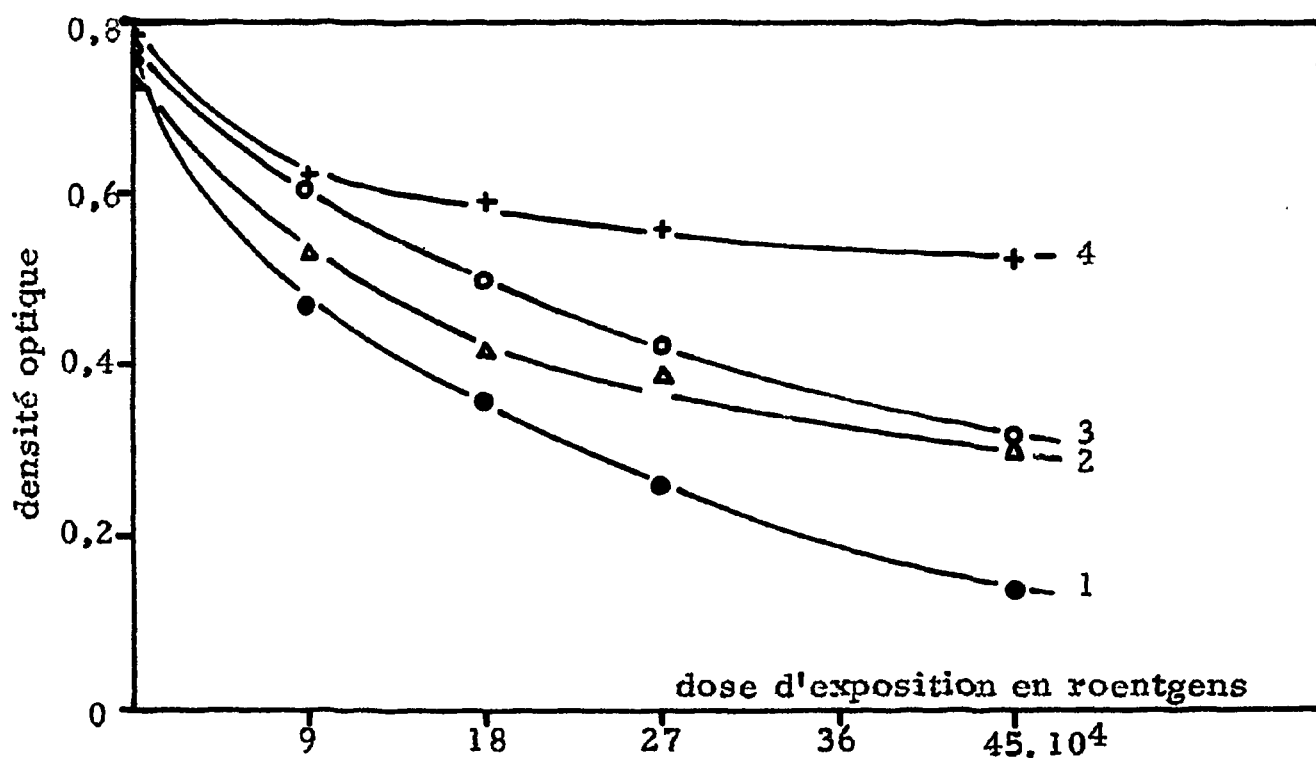


Fig. 9 - Variation en fonction de l'irradiation des densités optiques de solutions d'hémine (1) et d'hémine en présence de protecteurs : triazole (2), acide imidazole carboxylique (3), pyrazole (4).

dotée d'un pouvoir protecteur intéressant : le benzimidazole, qui, injecté par voie intrapéritonéale chez la souris avant une irradiation mortelle pour les témoins, permet la survie de 90% des animaux traités.

De plus, bien que son action soit maximum si l'injection est faite 5 minutes avant l'irradiation, il faut remarquer qu'administré une heure avant l'exposition le benzimidazole protège encore 45% des animaux.

Le facteur de réduction de dose est de 1,33 si l'on considère l'irradiation provoquant la mortalité de 50% des animaux témoins et protégés.

Bien que l'hypothermie provoquée par le benzimidazole soit importante, il ne semble pas en ce qui concerne nos composés, que l'on puisse établir de corrélation entre ce facteur et l'activité radioprotectrice. Dans le cas de la radioprotection in vitro, le pyrazole et la pipérazine semblent les plus intéressants mais ils se sont par contre révélés inactifs in vivo.

Manuscrit reçu le 6.7.64

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - BARAC G., BEAUMARIAGE M.L., CUVELIER C. et NOTAY W. Action des rayons X sur la bilirubine et la biliverdine en milieu protéique. Arch. int. Pharmacodyn. 1961, C XXX I, n°1-2 p.239
- 2 - CATSCH A. in "Advances in Radiobiology" Ed. Oliver and Boyd. 1957
- 3 - DIXON W.J., MOOD A.M.  
A method for obtaining an analysing sensitivity data. J.Am. Stat. Assoc. 1948, 43, p. 109
- 4 - KIMBALL A.W., BURNETT W.T., DOHERTY D.G.  
Chemical protection against ionizing radiation. I Sampling methods for screening compounds in radiation protection studies in mice. Rad. Res. 1957, 7, p. 1.
- 5 - GOMES OLIVEIRA H., BEAUMARIAGE M.L., CUVELIER C., NOTAY W., BARAC G.  
Action des rayons X sur l'hémine. Arch. Int. Pharmacodyn. 1961, C XXX I, n° 1-2, p. 236
- 6 - HORNSEY S.  
The protective effect of the reduction of the body temperature on adult and young mice after whole body irradiation. Advances in Radiobiology - Oliver and Boyd, 1957
- 7 - LIEBECQ - HUTTER S. et BACQ Z.M.  
Température interne de la souris après injection de radioprotecteurs.  
Arch. Int. Physiol. Bioch. 1958, 66, 3, p. 469.
- 8 - MEWISSEN D.J.  
Radiolesions, radiocancers, et radio protection chimique. Ed. Maloine - Paris, 1961.
- 9 - RINALDI R. et BERNARD Y.  
Etude de l'activité radioprotectrice du noyau imidazole et de quelques uns de ses dérivés  
Troisième congrès International d'Hygiène et de Médecine Préventive. Vienne 27-30 Mai  
1962 - Rapport C.E.A. n° 2207.
- 10 - Van den BRENK H.A.S. et JAMIESON D.  
Metabolic factors in radioprotective action. In "Biological effects of ionizing radiation at the molecular level " BRNO 1962, AEIA.



**FIN**