

ETUDE DE LA REPARTITION
DU BENZIMIDAZOLE ¹⁴C CHEZ LA SOURIS
APRES INJECTION INTRAPERITONEALE

par

Carlos TYORTYALIAN

Rapport CEA - R 2899

1965

Aa

CEA-R 2899 - TYORTYALIAN Carlos

ETUDE DE LA REPARTITION DU BENZIMIDAZOLE ¹⁴C
CHEZ LA SOURIS APRES INJECTION INTRAPERITONEALE

Sommaire. - Dans le cadre de l'étude du mécanisme de l'action radioprotectrice du benzimidazole, ce travail a pour objet l'étude de la répartition tissulaire chez la souris de ce composé marqué au carbone 14.

L'expérimentation a montré que le benzimidazole se répartit très rapidement et de façon pratiquement homogène dans tous les tissus, avec toutefois une affinité paraissant se manifester au niveau de l'estomac et du contenu gastrique. L'élimination, qui se fait par voie urinaire, est très rapide.

1965

12 p.

Commissariat à l'Energie Atomique - France

CEA-R 2899 - TYORTYALIAN Carlos

STUDY OF THE ¹⁴C BENZIMIDAZOLE DISTRIBUTION IN MICE
AFTER INTRAPERITONAL INJECTION

Summary. - In order to provide further information on the mechanism of benzimidazole radioprotective activity, this work studies the tissular repartition in mice of this compound labelled with carbone 14.

Experiments have showed that benzimidazole distribution is fast and homogeneous in all the tissues, but however affinity appears at the level of stomach and gastric content. Elimination is made through the urinary system and is very fast.

1965

12 p.

Commissariat à l'Energie Atomique - France

Les rapports du COMMISSARIAT A L'ENERGIE 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 VIIIème.

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 VIIIème.

- Rapport CEA-R 2899 -

Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble

ETUDE DE LA REPARTITION DU BENZIMIDAZOLE ^{14}C
CHEZ LA SOURIS APRES INJECTION INTRAPERITONEALE

par

Carlos TYORTYALIAN

- Novembre 1965 -

ETUDE DE LA REPARTITION DU BENZIMIDAZOLE ^{14}C CHEZ LA SOURIS APRES INJECTION INTRAPERITONEALE

Les travaux entrepris depuis quelques années aux laboratoires de Radiobiologie du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble et de l'Institut des Isotopes Radio-Actifs sur les propriétés radioprotectrices des dérivés hétérocycliques azotés ont permis la mise en évidence de quelques composés actifs in vivo (6 - 7 - 8). Parmi eux le benzimidazole injecté à la souris quelques minutes avant une irradiation mortelle pour tous les témoins, permet la survie de 90 % des animaux irradiés.

Dans le cadre de l'étude du mécanisme d'action responsable de la radioprotection, il convenait de déterminer la répartition de ce composé après injection à la souris ; le présent travail a pour objet l'étude de la distribution de la radioactivité dans les organes de l'animal après injection de benzimidazole marqué au ^{14}C .

Dans ce but, nous avons suivi le produit marqué pendant les 24 heures suivant l'injection, en utilisant deux méthodes : prélèvement d'organes pour détermination quantitative du Carbone 14 et méthode autoradiographique (1) (3) (4). La période pendant laquelle la protection contre les effets de l'irradiation est maximum c'est-à-dire dans les 15 minutes après l'injection, a plus particulièrement retenu notre attention.

- Expérimentation

Le benzimidazole $2\text{-}^{14}\text{C}$, préparé par la Société MERCK SHARP et DOHME, est utilisé en solution dans le propane diol à 10 %. Le produit marqué, injecté à la dose de $0,5 \mu\text{Ci}$ par souris, est au préalable additionné de benzimidazole non radioactif de façon à obtenir une solution dont la concentration est égale à celle que l'on utilise en radioprotection (7,5 mg/ml).

L'expérimentation est faite avec des souris $\text{C}_3\text{H}/\text{Jax}$, provenant du centre d'élevage du C.N.R.S. de Gif-sur-Yvette ; ces animaux reçoivent le benzimidazole par voie intrapéritonéale et sont sacrifiés 5, 15, 30 minutes, 1, 3, 6 et 24 heures après l'injection.

1 - Technique par prélèvements d'organes

Dans cette technique, les souris sont anesthésiées à l'éther et le prélèvement de sang est effectué par ponction cardiaque, ce qui entraîne la mort de l'animal. On prélève ensuite des fragments de divers organes : foie, rate, rein, coeur, poumons, intestin, muscle, cerveau, estomac et du contenu gastrique. Ces échantillons, lavés au sérum physiologique, sont lacérés puis lyophilisés pendant 4 heures ; le résidu sec est finement broyé et homogénéisé. On pèse ensuite une fraction de chacune de ces poudres d'organes, environ 10 mg, que l'on introduit dans un flacon spécial destiné au comptage par scintillation liquide, cette méthode s'étant révélée la plus efficace et la plus rapide pour la mesure des radioéléments émetteurs de rayonnement β de faible énergie émis par le ^{14}C .

L'appareil qui nous a servi à effectuer ces mesures * (TRICARB - PACKARD modèle 3224) est muni d'un passeur automatique de 200 échantillons maintenus à une température de 4° C. Au moment du comptage, chaque flacon est introduit dans une chambre noire où les excitations lumineuses produites par le passage du rayonnement nucléaire à travers le mélange scintillant sont recueillies par des photomultiplicateurs et transmis à un ensemble électronique aboutissant à une échelle de comptage. Le mélange scintillant se compose d'un solvant, le toluène contenant 4 g/litre de 2-5 diphenyloxazole ou P.P.O. (scintillateur organique) et 0,3 g/litre de 1-4 bis-2,5 phényloxazolyte-benzène ou POPOP qui améliore le rendement du scintillateur en jouant le rôle de "changeur de longueur d'onde" en adaptant la longueur d'onde des scintillations à celle pour laquelle la photocathode du photomultiplicateur est le plus sensible (2).

Les échantillons réduits sous forme de poudres sont dissous dans de l'hydroxyde d'hyamine après un passage de 12 heures à 60° C (un millilitre d'hyamine (p.diisobutyl-cresoxyetoxyethyl-dimethyl-benzylammonium) pouvant dissoudre jusqu'à 90 mg de protéines). On ajoute alors le mélange scintillant et on observe différentes colorations : une altération du scintillateur se traduit par un phénomène de "quenching" qui amène une diminution du taux de comptage. Une seconde mesure permet d'évaluer un facteur de correction par la méthode du "standard interne". Cette technique consiste à introduire dans chaque flacon une quantité donnée d'un étalon dont on connaît le taux de comptage sans quenching ; la deuxième mesure de l'échantillon auquel on a ajouté l'étalon donne la valeur de cet étalon avec ce phénomène. Du rapport des taux de comptage des étalons avec et sans quenching on déduit le facteur de correction.

Le rendement de comptage sans quenching est de 77 % ; les comptages sont effectués pendant des temps tels que l'erreur statistique soit toujours ≤ 2 %, c'est-à-dire au moins égaux à 10 minutes.

* Ces mesures ont été effectuées par le Laboratoire de Mesures de la Section de Protection contre les Radiations du C.E.N. Grenoble.

Les résultats exprimés en désintégration par minute et par gramme de tissu sec pour les organes ou en désintégration par minute et par millilitre pour la solution injectée, permettent de calculer le pourcentage de radioactivité retrouvé par gramme de tissu par rapport à l'activité totale injectée à l'animal.

2 - Technique autoradiographique

La technique utilisée, mise au point par F. PÉDRELLI (5), permet de matérialiser la répartition globale du produit marqué à un moment donné ; en multipliant les expériences à des temps différents, après injection du benzimidazole ^{14}C , on peut suivre le métabolisme de ce composé.

Les animaux après administration du composé radioactif, sont congelés par immersion dans l'azote liquide (-195°C) ; inclus dans la paraffine, ils sont ensuite fraisés selon un plan à niveau anatomique choisi. Un film radiographique est plaqué contre cette préparation constamment maintenus à basse température, puis développé dans les conditions habituelles ; le repérage anatomique est précisé par une photographie directe, en couleur, de la surface fraisée.

Pour le tirage sur papier photographique nous avons utilisé la méthode dite "de contact" ; les zones radioactives apparaissent ainsi comme des plages d'autant plus claires sur fond noir, que la concentration en produit marqué est plus forte.

- Résultats

1 - Etude de la répartition par comptage des organes

Le tableau I donne pour chaque organe le pourcentage de radioactivité retrouvé par gramme de tissu sec en fonction de la radioactivité injectée à l'animal. On peut noter que très rapidement, soit 5 minutes après l'injection de benzimidazole ^{14}C , on retrouve du produit marqué dans tous les prélèvements et, de plus, que cette répartition semble assez homogène. Ce résultat est identique chez les animaux sacrifiés 15 minutes après l'injection, c'est-à-dire au moment où, lors des expériences de radioprotection in vivo, les animaux sont en fin d'irradiation. Notre expérimentation a porté dans ce cas sur 30 souris et l'activité retrouvée par gramme de tissu sec est d'environ 20 % pour tous les échantillons, sauf pour le muscle, moins actif (14%), et pour le rein, plus actif (25 %).

Au bout de 30 minutes, la répartition reste assez homogène, mais tandis que la plupart des tissus commencent à perdre leur activité, le rein et l'estomac montrent une augmentation (respectivement 36 et 25 %) que l'on retrouve également dans les prélèvements de 1 heure.

Après 3 heures, la radioactivité de la plupart des tissus n'est plus que de 5 % environ, tandis que celle du rein commence à décroître (23 %) et que celle de l'estomac augmente encore (41 %).

TABLÉAU I

Temps après Tissu injection étudié	5 mn	15 mn	30 mn	1 heure	3 heures	6 heures	24 heures
Sang	17,78 ±3,40	19,80 ±3,41	20,14 ±3,04	21,08 ±2,10	6,20 ±2,02	-	-
Foie	24,87 ±2,37	20,89 ±2,78	18,08 ±1,61	18,02 ±3,09	5,46 ±2,17	0,55 ±0,06	
Rate	21,92 ±3,96	22,12 ±4,68	18,32 ±0,87	17,03 ±2,52	4,12 ±1,84	-	-
Rein	25,75 ±6,55	25,07 ±3,46	30,69 ±8,90	36,61 ±9,25	23,24 ±11,82	1,38 ±0,64	
Coeur	19,27 ±2,77	19,75 ±1,99	18,41 ±1,52	18,21 ±2,88	4,74 ±2,16		
Poumon	20,27 ±2,06	20,04 ±2,05	17,52 ±2,38	18,20 ±1,44	5,12 ±1,51	-	-
Muscle	10,43 ±2,01	14,40 ±1,35	13,03 ±1,89	14,16 ±1,61	3,75 ±0,87	-	-
Intestin	29,27 ±10,86	18,07 ±2,69	16,67 ±1,34	18,08 ±3,2	5,04 ±1,12	1,42 ±0,79	
Cerveau	18,71 ±2,40	18,63 ±3,08	17,53 ±1,55	16,24 ±4,47	3,83 ±1,81		-
Estomac	13,41 ±1,81	17,33 ±3,87	21,30 ±2,4	25,67 ±7,55	41 ±12,88	16,10 ±11,48	-

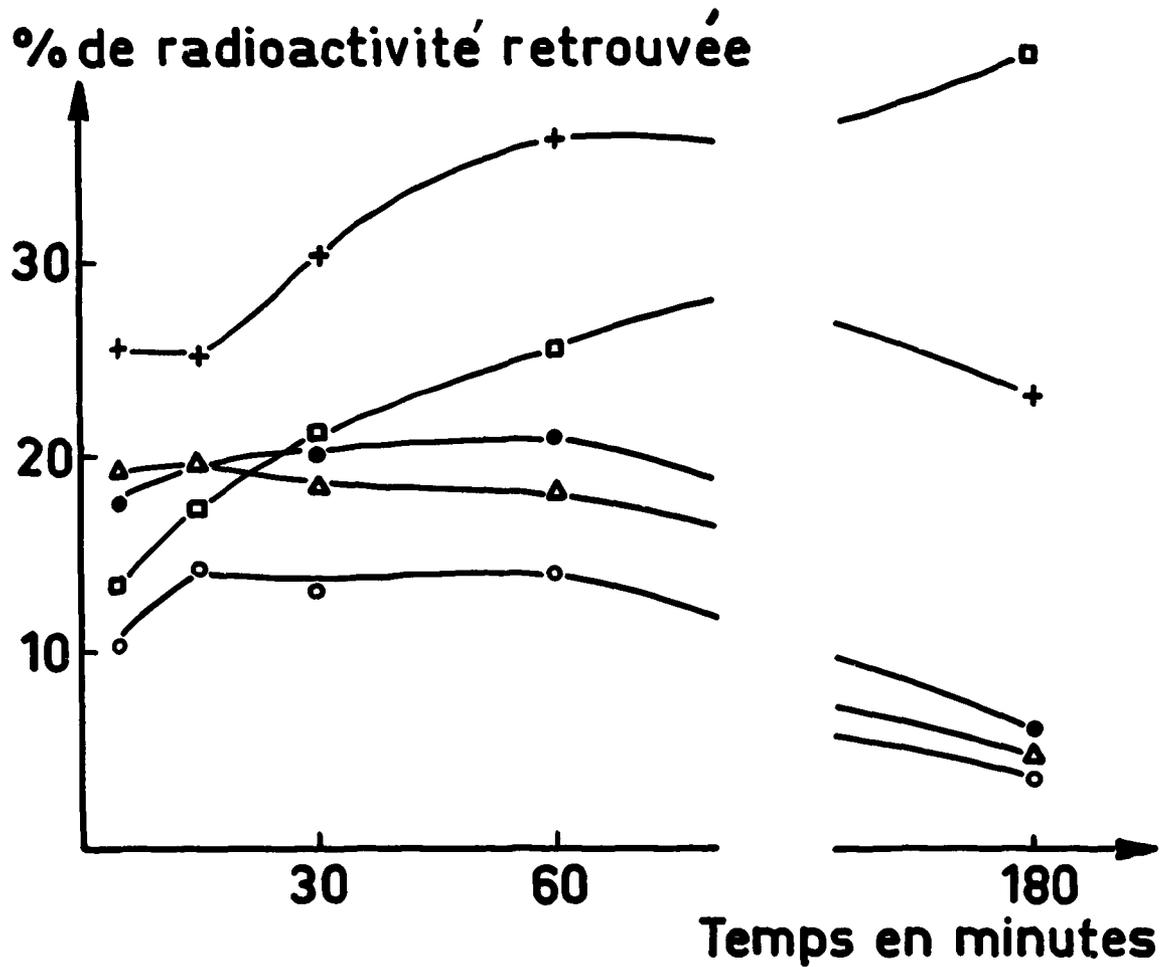


Figure 1 - Radioactivité retrouvée dans différents tissus en fonction du temps après injection de benzimidazole ^{14}C : muscle o, coeur Δ, sang ●, rein +, estomac □.

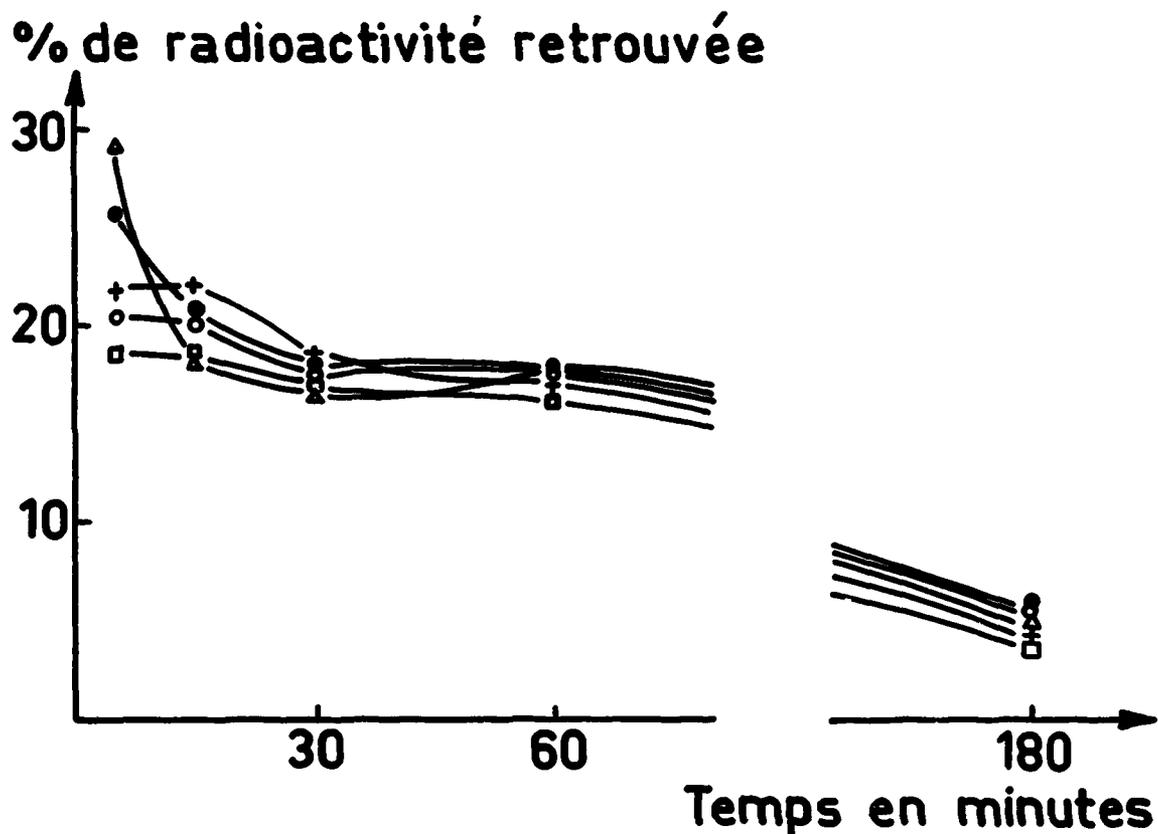


Figure 2 - Radioactivité retrouvée dans les différents tissus en fonction du temps après l'injection de benzimidazole ^{14}C : foie ●, poumons o, rate +, intestin Δ, cerveau □.

6 heures après l'injection, il ne reste presque plus rien dans les tissus sauf dans l'estomac qui garde encore 16 % de l'activité.

Après 24 heures, le comptage de tous les prélèvements ne diffère pas du mouvement propre de l'ensemble de comptage. Les figures 1 et 2 montrent les variations de l'activité de ces différents organes en fonction du temps.

Les prélèvements d'urine faits entre 1 et 24 heures après l'injection montrent que la radioactivité augmente dans l'urine pendant les trois premières heures, puis diminue et devient nulle au bout de 24 heures.

2 - Etude autoradiographique

Les résultats obtenus par cette méthode recourent exactement ceux qui ont été donnés par la méthode de comptage des organes prélevés.

En effet, la figure 3 montre que la répartition du benzimidazole ^{14}C , cinq minutes après l'injection, est totale et l'on retrouve de la radioactivité dans tous les tissus de la souris y compris le cerveau.

Les figures 4 (coupe médiane), 5 et 6 (coupe au niveau du rein) montrent qu'après 13, 30 et 60 minutes on note une concentration du carbone 14 dans l'estomac, le contenu gastrique et dans le rein qui commence l'élimination.

Au bout de 6 heures, seul l'estomac renferme encore du produit marqué et après 24 heures nous n'obtenons plus rien sur les films radiographiques.

3 - Interprétation des résultats

De l'ensemble des résultats que nous venons d'exposer et qui nous ont été fournis par deux méthodes différentes, il ressort qu'après l'injection par voie intrapéritonéale de benzimidazole marqué au carbone 14 en position 2, ce produit se répartit très rapidement et d'une façon homogène dans tout le corps de la souris ; 5 minutes après l'injection, tous les tissus mesurés renferment du produit marqué.

En ce qui concerne le foie, le poumon, la rate, l'intestin et le cerveau, il semble que le maximum soit atteint à ce moment là, puisque tous comptages effectués après des temps plus longs montrent une légère diminution de l'activité. Il reste environ 90 % de l'activité après 60 minutes mais la disparition devient ensuite beaucoup plus rapide et au bout de 180 minutes il ne reste plus que 20 % environ de l'activité maximale. Après 6 heures cette activité a pratiquement disparue.

Pour le coeur et le muscle, la concentration augmente jusqu'à 15 minutes, demeure stationnaire jusqu'à 1 heure, décroît ensuite jusqu'à 20 % environ de la

Fig. 3



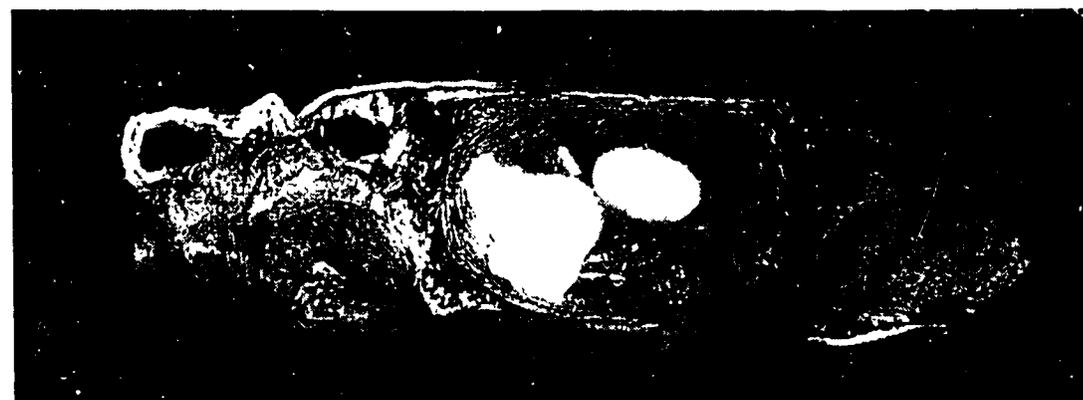
Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6



Répartition du benzimidazole marqué au ^{14}C chez la souris 5 minutes (fig. 3), 15 minutes (fig. 4), 30 minutes (fig. 5) et une heure (fig. 6) après injection intrapéritonéale.

valeur maximale à 3 heures, et devient nulle pour 6 heures. Il faut noter toutefois que le muscle est le tissu qui fixe le moins le benzimidazole.

La concentration dans le sang augmente régulièrement, mais d'une façon peu importante jusqu'à 60 minutes, et diminue ensuite. Il ne reste après 3 heures qu'environ 30 % du pourcentage obtenu à 1 heure. A 6 heures on ne retrouve plus aucune activité.

Le rein qui fixait une quantité de benzimidazole voisine de celle des autres tissus à 5 et 15 minutes voit sa radioactivité augmenter progressivement avec le temps, ce que l'on peut attribuer à l'élimination urinaire de la substance.

En effet, des mesures faites sur des prélèvements d'urine montrent que des quantités très importantes sont éliminées par cette voie, avec une excrétion maximale se situant entre 2 et 3 heures après l'injection.

En ce qui concerne l'estomac, la fixation qui était faible au départ, augmente d'une façon très importante pour atteindre au bout de 3 heures environ trois fois la valeur initiale.

Le même phénomène se retrouve pour le contenu gastrique. Ce fait, qui a été mis en évidence tout d'abord par la technique autoradiographique, a été ensuite retrouvé par la méthode de comptage. Les figures 3, 4, 5 et 6 illustrent parfaitement ce résultat.

- Conclusion

L'étude de la répartition du benzimidazole ^{14}C chez la souris montre que :

a) Cette distribution est rapide puisque 5 minutes après l'injection tous les tissus de la souris sont radioactifs.

b) Au moment où le benzimidazole est le plus actif en tant que radioprotecteur in vivo (entre 5 et 15 minutes), nous remarquons que cette répartition est homogène, sauf en ce qui concerne l'estomac et le contenu gastrique pour lesquels son affinité commence à se manifester.

c) L'élimination du benzimidazole semble se faire surtout par voie urinaire. Elle est rapide, maximale au bout de 2 heures et pratiquement totale en 6 heures.

d) La seule affinité importante du benzimidazole que l'on ait pu mettre en évidence dans ce travail est celle pour l'estomac et le contenu gastrique.

- BIBLIOGRAPHIE -

- 1 - BORST W.R., CHRISTIAN J.E., MIYA T.S.
Determination of the excretion and the tissue distribution of Carboxyl Carbon in the rat after administration of C¹⁴ Carboxyl Acetylsalicylic Acid
Journal of the American Pharmaceutical Association, 1956, Vol. XIV. n° 8, p. 511-513
- 2 - DULCINO J., BOSCO R., VERLY W.G., MAISIN J.R.
Assay of Tritium and Carbon 14 in animal tissues by liquid Scintillation
Clin. Chim. Acta. 1963, n° 8, p. 58-65
- 3 - FIRKET H., LELIEVRE P., SMOLIAR V.
Distribution précoce de la radioactivité dans les organes du rat après injection de cystamine ³⁵S et de cystéamine ³⁵S.I - Introduction et résultats autoradiographiques
C.R. Soc. Biol. 1963, n° 3, p. 677
- 4 - LELIEVRE P., FIRKET H., SMOLIAR V.
Distribution précoce de la radioactivité dans les organes du rat après injection de cystamine ³⁵S et de cystéamine ³⁵S.II - Dosage de la radioactivité et conclusion
C.R. Soc. Biol. 1963, n° 3, p. 690
- 5 - PELLERIN P.
La technique d'autoradiographie anatomique à la température de l'azote liquide
Path. Biol. 1961, 2, 3-4, p. 233
- 6 - RINALDI R., BERNARD Y.
On the radioprotective properties of heterocyclic nitrogenous compounds (First international Symposium on Radiozensitizers and Radioprotective Drugs-Milano, Italy), 1964 ; Progress in Biochemical Pharmacology, Vol. 1, 3 pages
Rapport C.E.A. n° 2.582, C.R. Acad. Sc. 1964, 258, p. 6251

- 7 - RINALDI R., 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° 2.207, et C.R. Ac. Sc. 254, 1962, p. 4.217
- 8 - RINALDI R., BERNARD Y. et GUILHERMET M.
Activité radioprotectrice de composés hétérocycliques azotés dérivés de l'imidazole et du benzimidazole
C.R. Ac. Sc. 261, 1965, p. 570

FIN