

Article original

Nouveaux anti-parasitaires dans la série du benzimidazole: synthèse d'hétéroarylamino-2 benzimidazoles et évaluation de leur activité biologique

Moubachirou GBADAMASSI¹, Jean-Louis BARASCUT¹, Jean-Louis IMBACH^{1*} et Philippe GAYRAL²

¹Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Laboratoire de Chimie Bio-Organique, UA488 du CNRS, pl. Eugène-Bataillon, 34060 Montpellier Cedex, et

²Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Parasitologie, rue Jean-Baptiste-Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

(Reçu le 15 juillet 1987, accepté le 24 novembre 1987)

Résumé — Un certain nombre de dérivés de l'amino-2 benzimidazole, dans lesquels les substituants sur la fonction amine sont des hétérocycles pentagonaux nitrés, ont été synthétisés. L'activité de l'ensemble de ces composés a été évaluée sur un certain nombre de parasites. Quelques-uns de ces dérivés ont une activité non-négligeable sur les Protozoaires et les Helminthes.

Summary — New anti-parasitic agents in the benzimidazole series: synthesis of 2-aminoheteroarylbenzimidazoles and evaluation of their biological activities. Some 2-aminobenzimidazole derivatives with nitro pentagonal heterocycle substitutions on their amino group were synthesized. All these compounds have been tested on some parasite models. Some benzimidazole derivatives showed protozoicide and anthelmintic activities.

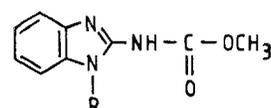
2-aminobenzimidazoles / nitrothiophene / 1-methyl-2-chloroimidazole / anti-parasitic compounds / protozoicide activity / anthelmintic activity

Introduction

Un nombre important de dérivés du benzimidazole sont actuellement utilisés comme médicaments [1] et plus particulièrement comme anthelminthiques [2].

Malgré leur structure souvent différente, il a été montré récemment que le mode d'action des benzimidazoles anthelminthiques pouvait être basé sur leur affinité de liaison *in vitro* et *in vivo* avec les tubulines [3, 4] et conduire ainsi à l'inhibition de la polymérisation des tubulines en microtubules [5, 6]. Différentes études structure—activité [4, 7—11] ont de plus montré que les benzimidazoles qui possèdent une fonction carbamate en 2 et/ou une substitution en 5 (6) sur le cycle ont une activité anthelminthique non-négligeable qui peut varier soit avec la nature de la substitution en position 5 (6) soit avec la nature de la substitution sur l'atome d'azote en position 1 (Fig. 1).

D'autre part, il est bien connu que les composés nitro-hétérocycliques pentagonaux présentent aussi des activités anti-parasitaires [12—22] plus spécialement dans le domaine des affections à protozoaires. Ainsi, l'acétamido-2 nitro-5



1 R = H Carbendazime

2 R = $\begin{array}{c} \text{—C—NH—(CH}_2\text{)}_3\text{—CH}_3 \\ || \\ \text{O} \end{array}$ Benomyl

Fig. 1.

thiazole 3 est faiblement actif vis-à-vis de *Trichomonas vaginalis* alors que le niridazole 4 est un amoebicide efficace et possède aussi des propriétés schistosomicides [13—15].

Une activité protozoicide a aussi été détectée en série nitrothiophène [16], nitropyrazole [17] et nitroimidazole [18, 19] dont le chef de file est l'(hydroxy-2 éthyl)-1 méthyl-2 nitro-5 imidazole 5 (métronidazole) (Fig. 2).

*Auteur à qui la correspondance doit être adressée.

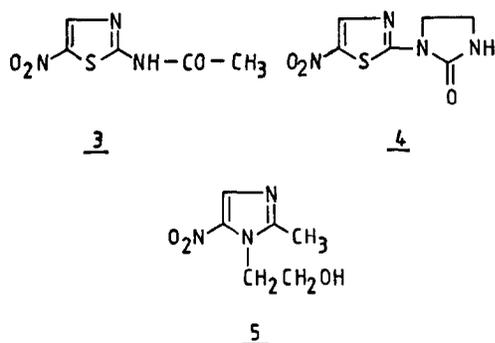


Fig. 2.

L'ensemble de ces données nous a conduits à envisager la synthèse de composés associant ces deux entités liées par un pont amide: l'une, dérivée du benzimidazole, réputée principalement pour son activité anthelminthique, l'autre, nitrohétérocyclique possédant une activité protozoocide (Fig. 3). Parmi les nitrohétérocycles pentagonaux nous avons choisi dans un premier temps les nitrothiophènes et le méthyl-1 nitro-2 imidazole.

Pour l'évaluation pharmacologique des activités anti-parasitaires, il est facile de trouver des modèles de Vers et en particulier de Nématodes qui répondent bien aux benzimidazoles. Nous avons retenu un essai *in vitro* sur les larves infectantes de *Nippostrongylus brasiliensis*. Par contre pour les Protozoaires, il vaut mieux multiplier les essais sur des groupes de parasites différents pour obtenir un large éventail de résultats et diminuer le risque de faux-négatifs. C'est pourquoi nous avons utilisé les modèles d'Amibe *Entamoeba histolytica* et *Trichomonas vaginalis in vitro* pour déterminer les CMI des produits préparés, et deux modèles *in vivo* chez la Souris *Plasmodium berghei* et *Trypanosoma brucei brucei* [23—25].

Chimie

Les synthèses d'amino-2 benzimidazoles substitués en position 2 sont généralement effectuées par alkylation, acylation ou arylation d'amino-2 benzimidazoles [26—32]. Nous avons choisi d'effectuer les réactions d'acylation en milieu pyridinique en faisant réagir le chlorure d'acide adéquat sur l'amino-2 benzimidazole (Fig. 3).

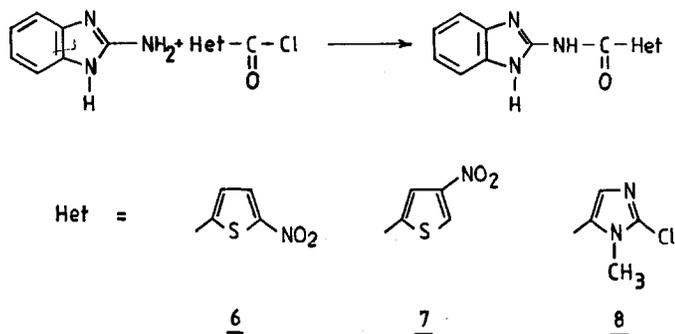


Fig. 3.

Les chlorures d'acides dans les séries nitro-4 et nitro-5 thiophène ont été obtenus à partir de l'acide correspondant [33]. L'acide méthyl-1 nitro-2 imidazole carboxylique-5 peut être obtenu par de nombreuses méthodes [30—40]. En ce qui nous concerne, nous avons effectué la synthèse de l'ester éthylique du méthyl-1 amino-2 imidazole carboxylique-5 à partir de l'énolate de la sarcosine éthyl ester C-formylée avec un rendement de 38%. La synthèse de l'acide méthyl-1 nitro-2 imidazole carboxylique-5 a ensuite été effectuée selon les méthodes déjà décrites [38, 40]. Le chlorure d'acide correspondant obtenu par réaction de l'acide méthyl-1 nitro-2 imidazole carboxylique-5 et du chlorure de thionyle n'a pas été isolé et est mis directement en réaction avec l'amino-2 benzimidazole dans la pyridine. Les caractéristiques physico-chimiques du produit obtenu ne correspondent pas à celles du produit attendu mais à celles du dérivé chloro-2 imidazole correspondant **8**. Le remplacement du groupement NO₂ par le chlore semble avoir eu lieu lors de l'action de SOCl₂ sur l'acide correspondant. Des exemples de déplacement de ce groupement NO₂ ont été décrits antérieurement [41—44].

A partir de ces hétéroarylamino-2 benzimidazoles, nous avons ensuite synthétisé les dérivés alkylés en position 1, soit en faisant agir les halogénures d'alkyles correspondants soit par ouverture d'époxydes (Tableau I). Ainsi d'une part, le mélange équimoléculaire de **6** et d'iodure de méthyle dans l'acétone en présence d'une quantité stoechiométrique de carbonate de potassium conduit à 69% de **9**. D'autre part, lorsque **6** est mis à reflux dans un large excès de méthoxy-3 epoxy-1,2 propane, un seul dérivé **12** est obtenu avec 85% de rendement après purification.

Nous devons cependant signaler que dans deux cas, nous avons obtenu en mélange avec le dérivé monosubstitué en position 1, une certaine quantité de composé disubstitué-1,3. Ainsi, lors de la réaction de **6** et de l'iodure de méthyle, 7% du diméthyl-1,3 *N*-(carboxamido-2' nitro-5' thiophène)-2 benzimidazole **22** sont isolés. Quand le *N*-(carboxamido-2' nitro-4' thiophène)-2 benzimidazole **7** et le bromo-2 acétate d'éthyle sont mis en réaction dans l'acétone, 31% du dérivé disubstitué-1,3 **23** sont synthétisés ainsi que 22% de **17** (Fig. 4).

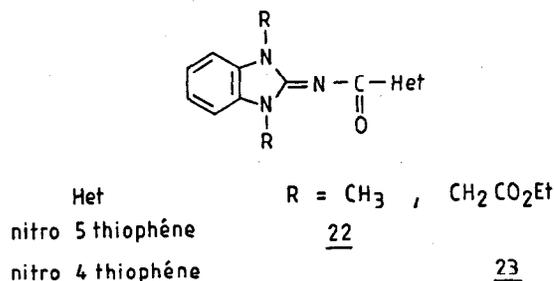


Fig. 4.

Activité anti-parasitaire

Nous avons ensuite évalué les activités protozoocides, trypanocides, anti-malariques et anthelminthiques des composés que nous venons de synthétiser.

Tableau I.

Het \ R	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₂ CO ₂ Et	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OCH ₃	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	CH ₂ CH(OH)CH ₂ Oφ
	<u>6</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>
	<u>7</u>	<u>15</u>	<u>16</u>	<u>17</u>		<u>18</u>	<u>19</u>
	<u>8</u>	<u>20</u>	<u>21</u>				

En ce qui concerne l'activité protozoocide, les résultats sont rassemblés dans le Tableau II. Sur *E. histolytica*, la CMI est dans le meilleur des cas comprise entre 10 et 100 mg/l ce qui correspond à une activité moyenne. Par contre les essais effectués sur *T. vaginalis* montrent qu'un certain nombre de produits ont une CMI inférieure à 1 mg/l, ils sont plus actifs que le métronidazole pris comme référence. La plupart des composés les plus efficaces appar-

Tableau II. Evaluation *in vitro* d'activité protozoocide sur *E. histolytica* Rahman et sur *T. vaginalis* souche G.

Produits	<i>Entamoeba histolytica</i> CMI mg/l	<i>Trichomonas vaginalis</i> CMI mg/l
Metronidazole		
4	1,25— 2,5	1,25— 2,5
6	10 —100	0,8 — 1
7	10 —100	1 — 10
8	10 —100	10 —100
9	10 —100	0,6 — 0,8
10	>100	0,8 — 1
11	>100	6 — 8
12	10 —100	0,2 — 0,4
13	>100	10 —100
14	>100	10 —100
15	>100	1 — 10
16	>100	>100
17	>100	4 — 6
18	10 —100	8 — 10
19	10 —100	8 — 10
20	>100	>100
21	10 —100	4 — 6
22	10 —100	1 — 10
23	>100	10 —100

tiennent à la série *N*-(carboxamido-2' nitro-5' thiophène)-2 benzimidazole dont le composé parent 6 a une CMI comprise entre 0,8 et 1 mg/l. Les dérivés appartenant à la série *N*-(carboxamido-2' nitro-4' thiophène)-2 benzimidazole ont une activité moins marquée avec une CMI comprise entre 1 et 10 mg/l. Par contre, la série *N*-(méthyl-1' chloro-2' imidazole)-2 benzimidazole est inactive. Ceci peut être dû à l'absence du groupement nitro.

L'activité trypanocide a été évaluée *in vivo* sur *T. b. brucei* et l'activité anti-malarique *in vivo* sur *P. berghei*. Aucun des produits essayés ne présente ce type d'activité.

L'activité anthelminthique a donc été évaluée en crible préliminaire sur des larves infectantes de *Nippostrongylus brasiliensis in vitro*. Les résultats obtenus sur les Nématodes sont rassemblés dans le Tableau III. On remarque qu'un certain nombre de dérivés du benzimidazole ont une activité notable puisque pour une concentration de 200 mg/l au bout de 4 jours, 100% de larves sont immobiles donc considérées comme mortes pour les composés 8, 13, 19, 20 et 21. Il est à noter que trois de ces produits ne portent pas de groupement NO₂ (8, 20 et 21), mais une substitution chlore en position 2 du cycle imidazole. Toutefois aucune activité n'est relevée au bout de 24 h.

Conclusion

En conclusion, nous avons synthétisé un certain nombre de dérivés de l'amino-2 benzimidazole dans lesquels les substituants sur la fonction amine en 2 sont des hétérocycles pentagonaux nitrés réputés pour leur activité protozoocide.

Tableau III. Essai anthelminthique *in vitro* sur larves infectantes de *Nippostrongylus brasiliensis*.

Produits	mg · l ⁻¹ pendant 4 jours		
	200	50	10
6	30%	12%	—
7	59%	17%	—
8	100%	14%	0%
9	27%	—	—
10	6%	—	—
11	14%	—	—
12	18%	—	—
13	100%	38%	0%
14	91%	18%	0%
15	8%	—	—
16	55%	12%	—
17	0%	—	—
18	64%	5%	—
19	100%	9%	4%
20	100%	15%	0%
21	99%	18%	10%
22	39%	6%	—
23	20%	—	—

Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité comparé aux témoins.

Le *N*-(carboxamido-2' nitro-5' thiophène)-2 benzimidazole **6**, le *N*-(carboxamido-5' méthyl-1' chloro-2' imidazole)-2 benzimidazole **8** ont été obtenus par réaction d'acylation entre l'amino-2 benzimidazole et les chlorures d'acides correspondants. Les dérivés *N*-1 substitués ont ensuite été préparés par action des halogénures d'alkyles ou des époxydes correspondants sur les composés parents. Les structures de ces différents dérivés ont été déterminées sans ambiguïté par RMN du proton et par spectrométrie de masse par la méthode FAB.

L'ensemble de ces composés ne présente pas d'activité sur les modèles de Trypanosomoses et paludisme chez la Souris bien que des nitrohétérocycles de structure assez proche soient connus pour posséder ces activités. Par contre, un certain nombre de ces dérivés ont une activité non-négligeable sur les Protozoaires et les Helminthes. De plus, trois dérivés du benzimidazole sont particulièrement actifs vis-à-vis de *T. vaginalis*. Ces produits sont porteurs du motif nitro-5 thiophène.

Parmi les benzimidazoles ayant une activité anthelminthique, les plus actifs portent le motif méthyl-1 chloro-2 imidazole lié à la position 2 du benzimidazole par une liaison amide. Ces derniers, nous semblent particulièrement prometteurs dans la mesure où ils ne présentent pas de substitution nitro-azole, entité qui est souvent la cause de toxicité secondaire.

Protocoles expérimentaux

Chimie

Indications générales

Les chromatographies sur couche mince (CCM) sont faites sur plaques de silice «Merck Kieselgel 60 F₂₅₄» avec indicateur fluorescent. Les

taches sont révélées à la lampe UV ou à l'iode. Les chromatographies sur colonne ont été réalisées avec de la silice «Sds Kieselgel 60, 0,040—0,063 mm (230—400 mesh ASTM)». Les dépôts secs ont été réalisés avec de la silice 70—230 mesh. Les points de fusion non-correctés ont été pris en capillaire sur un appareil Büchi 510. Les analyses élémentaires ont été effectuées par le Centre National de la Recherche Scientifique - Service Central d'Analyse à Vernaison. Les spectres UV et visibles ont été enregistrés sur un spectrophotomètre carry 1 de 220—350 nm ou de 220—450 nm (Tableau IV). Les spectres de RMN ont été effectués soit sur un appareil Varian EM360 ou un Varian EM390. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane. La multiplicité des signaux observés est indiquée par une lettre minuscule: multiplet (m); quadruplet (q); triplet (t); doublet (d); singulet (s) (Tableau V). Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre de masse JEOL DX300. Les spectres Infra-Rouge ont été effectués sur un appareil Beckmann acculab 4. Les fréquences de vibrations sont exprimées en cm⁻¹.

L'acide nitro-4 thiophène carboxylique-2 et l'acide nitro-5 thiophène carboxylique ont été synthétisés selon les méthodes déjà décrites [33]. L'énolate de sodium de la *N*-formyl sarcosine éthyl ester a été obtenu selon la méthode décrite [38].

Chlorhydrate de l'amino-2 carboxylate d'éthyle-5 imidazole

27,69 g (0,142 mol) de l'énolate de sodium de la *N*-formyl C-formyl sarcosine éthyl ester sont ajoutés à 159 ml de solution méthanolique d'acide chlorhydrique (2 N). Le mélange est mis ½ h à reflux, puis évaporé à sec. Au résidu huileux, repris par l'acide acétique 10% aqueux sont ajoutés 26,24 g (0,32 mol) d'acétate de sodium, puis 13,44 g (0,32 mol) de cyanamide. L'ensemble est mis à reflux ½ h. En fin de réaction, le mélange réactionnel est filtré. Le filtrat est ramené à pH = 1 par addition d'acide chlorhydrique concentré, puis évaporé à sec. Le résidu ainsi obtenu donne après recristallisation dans un mélange acétone méthanol, 38% du chlorhydrate de l'amino-2 carboxylate d'éthyle-5 imidazole. F = 200—201°C (F = 200—205°C [38]).

A partir du chlorhydrate ainsi obtenu, le nitro-2 carboxylate d'éthyle-5 imidazole est préparé [38], la saponification de l'ester conduit à 90% d'acide.

Les différents chlorures d'acides sont obtenus par réaction de SOCl₂ sur les acides. L'excès de chlorure de thionyle est évaporé sous vide. Le résidu coévaporé trois fois avec du toluène est directement utilisé.

Acylation de l'amino-2 benzimidazole

Méthode générale. A une solution d'amino-2 benzimidazole (0,01 mol) dans la pyridine anhydre est additionné 0,011 mol du chlorure d'acide correspondant. Le mélange ainsi obtenu est mis 5 h à reflux. En fin de réaction, le mélange réactionnel est traité par 300 ml d'eau et de glace. Le précipité ainsi obtenu est séparé et purifié par recristallisation dans l'éthanol. On obtient:

6 Rdt.: 69%; F > 300°C; CCM: R_f = 0,33 (silice, éther); M/z = 288; Anal.: C₁₂H₈N₄O₃S (C, H, N).

7 Rdt.: 74%; F > 300°C; CCM: R_f = 0,64 (silice, CH₂Cl₂/MeOH, v/v, 96/4); M/z = 288; Anal. C₁₂H₈N₄O₃S (C, H, N).

8 Rdt.: 86%; F > 300°C; CCM: R_f = 0,4 (silice, ACOEt); M/z = 275; Anal.: C₁₂H₁₀N₅OCl (C, H, N).

Synthèse des dérivés *N*₁-substitués des hétéroarylamino-2 benzimidazoles (Tableau VI)

a. Alkylation: méthode générale. Un mélange équimoléculaire de l'hétéroarylamino-2 benzimidazole (**6**, **7** ou **8**), d'halogénure d'alkyle correspondant et de K₂CO₃ dans de l'acétone anhydre est mis à reflux. L'avancement de la réaction est contrôlé par CCM. En fin de réaction, la solution, diluée avec de l'acétone est filtrée puis évaporée à sec. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant CH₂Cl₂).

b. Par ouverture d'époxydes: méthode générale. Un mélange équimoléculaire de l'hétéroarylamino-2 benzimidazole (**6**, **7** ou **8**) et d'époxyde correspondant sont mis à reflux dans l'acétone anhydre ou le tétrahydrofurane (THF) anhydre avec une quantité catalytique de K₂CO₃. L'avancement de la réaction est contrôlé par CCM. En fin de réaction le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant CH₂Cl₂).

Lors de la synthèse de **13** l'époxy-1,2 hydroxy-3 propane a été ajouté par portions égales aux temps t = 0, 5, 20 et 48 h.

Tableau IV. Spectres UV des dérivés du benzimidazole pris dans MeOH.

<u>6</u>	λ_{\max} = 245 258 292 326 ϵ = 14900 ep. 20241 19952	<u>15</u>	λ_{\max} = 245 335 ϵ = 12335 18280
<u>7</u>	λ_{\max} = 245 323 ϵ = 25770 34864	<u>16</u>	λ_{\max} = 244 325 ϵ = 39950 54767
<u>8</u>	λ_{\max} = 248 256 266 313 ϵ = 9588 9814 7445 25607	<u>17</u>	λ_{\max} = 247 327 ϵ = 12445 18223
<u>9</u>	λ_{\max} = 249 258 290 368 ϵ = 8799 7219 14061 13140	<u>18</u>	λ_{\max} = 245 324 ϵ = 16318 18280
<u>10</u>	λ_{\max} = 249 257 290 369 ϵ = 7343 6458 14061 11041	<u>19</u>	λ_{\max} = 243 256 323 ϵ = 10091 6195 14689
<u>11</u>	λ_{\max} = 249 257 289 365 ϵ = 9693 8609 16500 14539	<u>20</u>	λ_{\max} = 250 255 267 319 ϵ = 10871 11360 8422 37803
<u>12</u>	λ_{\max} = 244 258 290 370 ϵ = 4441 3736 8459 6344	<u>21</u>	λ_{\max} = 249 257 267 320 ϵ = 7630 8199 6332 6344
<u>13</u>	λ_{\max} = 247 256 288 366 ϵ = 7533 6108 13844 11401	<u>22</u>	λ_{\max} = 244 287 339 ϵ = 12204 16478 13000
<u>14</u>	λ_{\max} = 249 256 289 368 ϵ = 11381 10346 20951 16468	<u>23</u>	λ_{\max} = 246 311 ϵ = 9339 9238

Evaluation anti-parasitaire*Plasmodium berghei souche NK 65*

Les souris sont infectées par injection intrapéritonéale de 15 millions d'hématies parasitées à J1. Les souris sont des femelles SPF de 20 g maximum. Le traitement est administré à dose unique, sous cutanée, à la posologie de 200 mg/kg chez 5 souris 3 jours après l'inoculation (J4). La substance a été préalablement dissoute ou mise en suspension dans un excipient aqueux contenant 1% de carboxyméthylcellulose (CMC). La survie des souris témoins infectées non-traitées est de 7 à 9 jours. Les critères d'activité sont: l'allongement de la survie par rapport aux témoins, et la réduction de la parasitémie à J8 et J21, si les souris ont survécu, par comparaison du pourcentage d'hématies parasitées chez les souris témoins et les traitées.

Entamoeba histolytica souche Rahman

L'activité anti-ambienne est évaluée *in vitro* en milieu de Pavlova—Jones,ensemencé par 10 000 amibes au ml. Les composés sont dissous dans le diméthylformamide (DMF) (10 mg/ml) et distribués pour une concentration finale de 100, 10 et éventuellement 1 mg/l. Une

subculture est effectuée à 48 h à partir de la première concentration active. On détermine la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Trichomonas vaginalis souche V

Le milieu liquide utilisé est celui au thioglycolate enrichi de 5% de sérum de cheval, ensemencé par 30 000 parasites au ml. On détermine la CMI de la même façon que pour *E. histolytica* après subculture à 48 h.

Trypanosoma brucei brucei

Cette souche est entretenue sur souris femelles de 20 g. On injecte 10 000 trypanosomes par voie intrapéritonéale et le traitement est effectué dans l'heure qui suit. Le composé solubilisé dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) est administré par voie sous-cutanée à la dose de 200 mg/kg. On compare la survie de 3 souris parasitées non-traitées à celle des lots de 3 souris traitées.

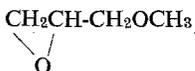
Nippostrongylus brasiliensis (larves infectantes in vitro)

Le parasite est entretenu chez le rat blanc. Les larves infectantes sont obtenues des selles après une coproculture de 14 jours à 27°C. Elles

Tableau V. Spectres de RMN des dérivés du benzimidazole pris dans le DMSO-d₆.

	NH	H ₅	H ₄	H ₃	H _{arom.}	OH	N-CH ₂	N-CH ₃	-CH-	O-CH ₃	-CH ₂ -O	CH ₂ -CH ₃
6	13,4	8,1 (d) J=4,8Hz	7,66 (d) J=4,8Hz	7,2 (m)								
7	12,6	8,2	8,9	7,82 (m)								
8	12,4		7,76		7,43 (m) 7,13 (m)			3,96				
9			8,1 (d) J=4,5Hz	7,73 (d) J=4,5Hz	7,38 (m) 7,33 (m)							
10	12,6		8,1 (d) J=4,5Hz	7,7 (d) J=4,5Hz	7,6 (m) 7,32 (m)	4,90 (t) J=4,5Hz	4,3 (t) J=6Hz				3,63 (m)	
11	12,77		8,03 (d) J=4,8Hz	7,63 (d) J=4,8Hz	7,53 (m)		5,08 (s)					4,2(q), 1,23 (t) J=8Hz
12	12,8		8,1 (d) J=4,5Hz	7,67 (d) J=4,5Hz	7,5 (m) 7,23 (m)	5,16 (m)	4,17 (m)		4,17 (m)	3,33 (m)	3,33 (m)	
13	12,63		8,06 (d) J=4,8Hz	7,68 (d) J=4,8Hz	7,5 (m) 7,23 (m)	4,96 (m)	4,18 (m)		3,98 (m)		3,43 (m)	
14	12,63		8,05 (d) J=4,8Hz	7,63 (d) J=4,8Hz	7,5-6,9 (m)	5,5 (m)	4,1 (m)		4,30 (m)		4,30 (m)	
15	12,72	8,1 (d) J=1,6Hz		8,9 (d) J=1,6Hz	7,53 (m) 7,28 (m)							
16	12,8	8,05 (d) J=1,6Hz		8,9 (d) J=1,6Hz	7,5 (m) 7,2 (m)	4,8 (t) J=6Hz	3,62 (t) J=6Hz				4,15 (m)	
17	13,1	8,28 (d) J=1,8Hz		9,07 (d) J=1,8Hz	7,72 7,43 (m)		5,22 (s)					4,3(q), 1,25 (t) J=8Hz
18	12,73	8,1 (d) J=1,6Hz		8,82 (d) J=1,6Hz	7,63 (m) 6,87 (m)	5,48	4,08 (m)		4,37 (m)		4,37 (m)	
19	12,7	8,07 (d) J=1,6Hz		8,83 (d) J=1,6Hz	7,5 (m) 7,2 (m)	4,87 (m)	4,1 (m)		3,83 (m)		3,4 (m)	
20			7,77 (s)		7,23 (m)			4,0 (s)				
21			7,6 (s)		7,47 (m)	4,85 (m)	4,08 (m)	4,0 (s)			3,28 (m)	
22			7,9 (d) J=4,2Hz		7,18 (m) 7,36 (m)							3,73 (s)
23		8,17 (d) J=1,8Hz		9,03 (d) J=1,8Hz	7,62 (m) 7,57 (m)		5,32 (s)					3,35(q) 1,22 (t) J=8Hz

Tableau VI. Préparation et propriétés physico-chimiques (des dérivés N-1 substitués de 6, 7 et 8).

Produit de départ	Halogénures d'alkyle ou époxyde	Temps de réaction (h)	Produit de la réaction	Rdt. (%)	F °C	R _f silice	M/z	Analyse
6	ICH ₃	12	9	69	> 250	0,42 (éter)	302	C ₁₃ H ₁₀ N ₄ O ₃ S
			22	6,9	214—215	0,16 (éter)	316	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₃ S
	BrCH ₂ CH ₂ OH	24	10	70	246—247 (acétone)	0,63 (ACOEt)	332	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₄ S
	BrCH ₂ CO ₂ Et	12	11	49	228—230	0,40 (éter)	374	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₅ S
		3	12	85	195—197	0,44 (éter)	376	C ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₅ S
7	ICH ₃	12	13	72	237—240	0,21 (éter)	362	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₅ S
			14	85	224—227	0,50 CH ₂ Cl ₂ /MeOH v/v, 96/4		C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₅ S
	BrCH ₂ CH ₂ OH	2	16	83	244—246 (ACOEt)	0,33 (éter)	332	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₄ S
	BrCH ₂ CO ₂ Et	9	17	22	215—217	0,24	374	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₅ S
			23	31	127—129	0,10 (CH ₂ Cl ₂)	460	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₇ S
	26	18	75	212—215	0,44 (ACOEt)		C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₅ S	
8	ICH ₃	21	19	88	205—208	0,68 CH ₂ Cl ₂ /MeOH v/v, 96/4		C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₅ S
			20	40	256—258	0,48 CH ₂ Cl ₂ /MeOH v/v, 98/2	289	C ₁₃ H ₁₂ N ₅ OCl
	BrCH ₂ CH ₂ OH	19	21	72	212—215 (ACOEt)	0,22 (ACOEt)	319	C ₁₄ H ₁₄ N ₅ O ₂ Cl

sont rincées et mises en survie dans un milieu pour culture de tissu de vertébré contenant du milieu RPMI 1640, du sérum fœtal de veau (10%) et des antibiotiques usuels. La culture est effectuée à 37°C. Les solutions des produits à essayer sont faites avec de l'eau stérile pour les produits solubles dans l'eau, dans le DMSO pour les autres.

Dans un puits d'un volume de 2 ml sont introduits 1 ml de milieu, environ 20 larves exactement comptées, et la solution du produit sous un volume de 10 µl. La vitalité des larves est notée au bout de 24 h (J2) et de 4 jours (J5). On fait deux puits par concentration et 4 puits témoins qui ne reçoivent que l'excipient utilisé (80 larves). La répartition et la lecture des résultats sont effectuées au hasard. Les résultats sont rendus en pourcentage de larves immobiles et considérées comme mortes, en tenant compte de la mortalité de témoins (en moyenne 10% à J5).

Références

- Ireland C. R., Gull K., Gutteridge W. E. & Pogson C. I. (1979) *Biochem. Pharmacol.* 28, 2680
- Sharma S. & Abuzar S. (1983) *Prog. Drug Res.* 27, 85
- Wang C. C. (1984) *J. Med. Chem.* 27, 1
- Lacey E. & Watson T. R. (1985) *Biochem. Pharmacol.* 34, 1073
- Dustin P. (1978) dans: *Microtubules* Springer, Berlin, pp. 452
- Roberts K. & Hyams J. S. (1979) dans: *Microtubules* Academic Press, New York, pp. 595
- Wilson L. & Friedkin M. (1967) *Biochemistry* 6, 3126
- Laclette J. P., Guena G. & Zetina C. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 417
- Borgers L., De Nollin S., Verheyen A., Debrabander M. & Thienpont D. (1976) dans: *Microtubules and Microtubular Inhibitors* (Borgers M. & Debradander M., eds.), North Holland, Amsterdam, p. 497
- Friedman P. A. & Platzer E. G. (1980) *Biochem. Biophys. Acta* 630, 271
- Friedman P. A. & Platzer E. G. (1980) dans: *The Host Invaders* (Van den Bossche H., ed.), North Holland, Biomedical Press, Amsterdam, p. 595
- Cukler A. C., Kupferberg A. B. & Millman N. (1955) *Antibiot. Chem.* 5, 540
- Lambert C. R., Wilhelm M., Striebel H., Kradolfer F. & Schmidt P. (1964) *Experientia* 20, 452
- Schmidt P. & Wilhem M. (1966) *Angew. Chem. Int. Ed.* 5, 857
- Wilhem M., Marquandt F. H., Meier K. & Schmidt P. (1966) *Helv. Chim. Acta* 49, 2443
- Dunn G. L., Actor P. & Dipasquo V. J. (1966) *J. Med. Chem.* 9, 751
- Wright D. E. (1961) US Pat. 2,979,512; (1961) *Chem. Abstr.* 55, 19952g
- Cosar C., Crisan C., Horclois R., Jacob R. M., Robert J., Tchelitcheff S. & Vaupre R. (1966) *Arzneim. Forsch.* 16, 23
- Elslager E. F. & Thompson P. E. (1962) *Annu. Rev. Pharmacol.* 2, 1931

- 20 Meyer I. S., Greene L. F. & Hesseltine H. C. (1966) *J. Am. Med. Assoc.* 195, 1161
- 21 Erickson D. G., Bourgeois J. G., Sadun E. H. & Bueding E. (1971) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 178, 411
- 22 Stohler H. R. & Szente A. (1974) *Third International Congress of Parasitology Munich, 1974* Abstr. E3 (11), p. 1330
- 23 Gayral Ph., Bourdais J., Lorre A., Abenhaim D., Dusset F., Pommies M. & Fouret G. (1978) *Eur. J. Med. Chem.* 13, 171
- 24 Karmouta M. G. J., Lafont O., Combet Farnoux C., Miocque M., Rigotherier M. C., Louchon B. & Gayral Ph. (1980) *Eur. J. Med. Chem.* 15, 341
- 25 Brienne M. J., Jacques J., Gayral Ph. & Dusset F. (1981) *Eur. J. Med. Chem.* 16, 363
- 26 Watts J. C. (1973) German Pat. (DOS) 2202279; (1973) *Chem. Abstr.* 79, 115592
- 27 Stedman R. J. (1969) U.S. Pat. 3480642; (1971) *Chem. Abstr.* 75, 11831h
- 28 Mayer K. H., Grewe F. & Frohberger P. E. (1974) German Pat. (DOS) 2253324; (1974) *Chem. Abstr.* 81, 25673
- 29 Burmakin N. M., Kukalenko S. S., Savinova A. M., Voldkovich S. D., Berman M. Yu., Amosov G. Ya. & Fichman L. S. (1974) *Khim. Prom. Moscow* 13
- 30 Van Gelder J. L. H., Raeymackers A. H. M. & Raevens L. F. C. (1971) German Pat. (DOS) 2029637; (1971) *Chem. Abstr.* 74, 100047
- 31 Smith Kline and French Laboratories (1968) Brit. Pat. 1,122,957; (1969) *Chem. Abstr.* 70, 87805h
- 32 Donn G. L. (1972) U.S. Pat. 3694455; (1973) *Chem. Abstr.* 78, 16183h
- 33 Reynaud P. & Delaby R. (1955) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1614
- 34 Lancini G. C., Lazzari E., Arioli V. & Bellani P. (1969) *J. Med. Chem.* 12, 775
- 35 Jones R. G. (1949) *J. Am. Chem. Soc.* 71, 644
- 36 Schmidt U. & Geiger F. (1963) *Ann. Chem.* 664, 168
- 37 Krentzberger A. (1962) *J. Med. Chem.* 27, 886
- 38 Cavalleri B., Ballotta R. & Lancini G. C. (1972) *J. Heterocyclic Chem.* 9, 979
- 39 Gupta R. P., Larroquette C. A. & Agrawal K. C. (1982) *J. Med. Chem.* 25, 1342
- 40 Asato G. & Berkelhammer G. (1972) *J. Med. Chem.* 15, 1086
- 41 Beck J. R. (1978) *Tetrahedron* 34, 2057
- 42 Eiter L. F. (1972) *Liebigs Ann. Chem.* 761, 130
- 43 Dell'Erba C., Spinnelli D. & Leandri G. (1969) *Gazz. Chim. Ital.* 99, 535
- 44 Goldman P. & West J. D. (1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6224
- 45 MacKay D. (1966) *Can. J. Chem.* 44, 2881