

Synthèse de dérivés de la 2-thio hydantoïne à potentialité immunorégulatrice et anticancéreuse

M Blanc¹, M Cussac^{2*}, A Boucherle¹, G Leclerc¹

¹Laboratoire de Chimie Organique, Groupe de Pharmacochimie Moléculaire, Faculté de Pharmacie, 38240 Meylan;

²Laboratoire de Chimie Thérapeutique, Groupe de Pharmacochimie Moléculaire, Faculté de Pharmacie, 38700 La Tronche, France

(Reçu le 2 juillet 1990; accepté le 19 septembre 1990)

Summary — Synthesis of 2-thiohydantoin derivatives with potential immunomodulating and anticancer activities. Functionalized 2-thiohydantoins were synthesized. Their immunomodulating and anticancer actions were evaluated. It is shown that for these potentially active products on chronic inflammatory diseases involving cellular-mediated immunity the development of immunomodulating activity is related to the cyclised thiourea structure. Anticancer activity is weak. These biological activities are however insufficient to promote an industrial development.

2- thiohydantoins / immunomodulators / anticancer agents

Introduction

Le lévamisole [1], agent immunomodulateur de structure imidazo-thiazolique [2, 3] a servi de modèle à nos recherches [4]. En associant deux sous-structures de médicaments actifs sur les phénomènes inflammatoires chroniques invalidants et sur le système immunitaire (lévamisole, méthimazole...), nos travaux ont été orientés vers la synthèse de dérivés de la thio-2 hydantoïne à activité immunomodulatrice potentielle.

Le lévamisole a été utilisé dans le traitement d'inflammations chroniques telle que la polyarthrite rhumatoïde mettant en jeu un processus immunitaire de type cellulaire proche de l'hypersensibilité retardée [5]. Le méthimazole, médicament antithyroïdien, développe une activité secondaire immunodépressive qui a été utilisée en thérapeutique [6]. Nous utilisons d'ailleurs dans notre travail ce produit comme référence pour l'évaluation de l'activité immunosuppressive de nos composés. Un composé de structure hydantoïne, la phénytoïne, améliore le score clinique des rhumatisants atteints de polyarthrite rhumatoïde [7].

L'activité anticancéreuse potentielle des 2-thio hydantoïnes est suggérée par la spiromustine, moutarde à l'azote de structure spirohydantoïne possédant une activité intéressante sur les tumeurs cérébrales [8], et également par un analogue de struc-

ture 2-thio barbiturique: la merbarone, dont l'activité cytotoxique se traduit par un arrêt de la croissance cellulaire observé dans la leucémie et dans différentes tumeurs malignes chez les mammifères [9].

Enfin, le métabolite principal du lévamisole, l'OMPI: 2-oxo-3-(2-mercaptoéthyl)-5phényl imidazole, qui est un composé imidazolé substitué par un groupement porteur d'une liaison-SH libre, développe *in vitro* et sur l'animal un bon pouvoir de phagocytose [10, 11] et interfère avec les microtubules dont il favorise la polymérisation [12].

Chimie

Les 2-thio hydantoïnes 5-substituées recherchées ont été synthétisées à partir d'acides-amino ou d'amino-esters et d'isothiocyanates. L'hétérocyclisation en 2-thio hydantoïnes fait appel à des processus variés.

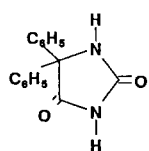
Méthode A

La réaction se déroule en deux étapes, mais sans isolement de la thiourée intermédiaire (schéma 1).

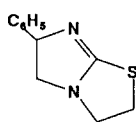
Méthode B

Les thiourées intermédiaires sont isolées (schéma 2). Leur structure et leur activité cytotoxique anticancéreuse seront étudiées.

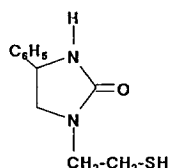
*Correspondance et tirés à part



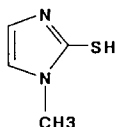
phénytoïne



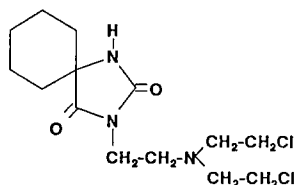
lévamisole



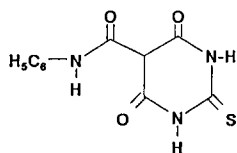
OMPI



méthimazole



spiromustine



merbarone

Méthode C

Notre intérêt s'est porté sur le groupement substituant CN en raison de sa réactivité chimique et également pour son rôle dans l'activité immunorégulatrice observée dans le cas de plusieurs agents anti-inflammatoires lors du traitement de la polyarthrite rhumatoïde [13].

L'hétérocyclisation est conduite en 2 étapes (schéma 3), mais quelles que soient les conditions, le groupe CN est toujours transformé.

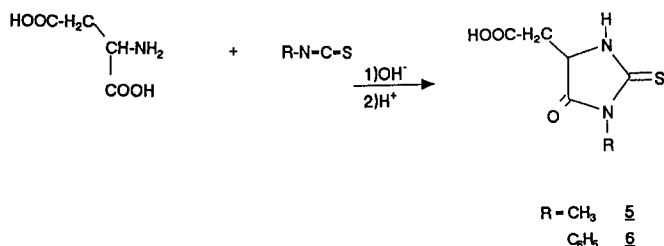


Schéma 1.

Méthode D

La fonctionnalisation en 5 peut être réalisée à partir de composés de structure hydantoin mais l'azote N₁ doit être protégé. L'acylation, par exemple, a lieu préférentiellement sur ce site plus réactif que le carbone 5 (schéma 4).

Résultats et discussion

Les constantes physico-chimiques et les analyses spectrales des composés synthétisés sont rassemblées dans les tableaux I et III pour les thiourées intermédiaires et dans les tableaux II et IV pour les 2-thiohydantoïnes.

La préparation d'hydantoïnes et de 2-thiohydantoïnes est réalisée classiquement par cyclisation d'urées ou thiourées intermédiaires dérivées d'acides aminés ou de leurs esters. Cette cyclisation est obtenue le plus souvent à chaud en milieu acide [14, 15] et les hydantoïnes et 2-thiohydantoïnes sont stables en milieu acide.

L'hétérocyclisation des urées intermédiaires est parfois conduite à chaud sans solvant et plus rarement en milieu alcalin [14, 15] en raison de l'instabilité usuelle des hydantoïnes en ce milieu. Cette instabilité en milieu alcalin est mise à profit dans la dégradation séquentielle de peptides d'Edman où l'hydrolyse est réalisée après formation intermédiaire de la 2-thiohydantoïne. Nous avons utilisé l'un et l'autre des processus d'hétérocyclisation des thiourées intermédiaires qui ne sont pas toujours isolées.

Dans le cas des dérivés cyanés, les thiourées intermédiaires ont été isolées. Leur hétérocyclisation en 2-thiohydantoïnes en milieu acide entraîne l'hydrolyse totale et la perte du groupe nitrile, ce qui élimine toute substitution en position 5. Leur hétérocyclisation en milieu alcalin conduit aux 2-thiohydantoïnes-5-carbamoylées témoignant de l'hydrolyse partielle du groupe nitrile. Dans tous les cas, le substituant nitrile est transformé.

Le composé 10, à la différence des autres produits, est substitué sur l'azote N₁. Ce groupe acétyle a été introduit comme groupe protecteur avant l'acylation du carbone 5.

L'hydrolyse ménagée sélective a été tentée par des méthodes diverses (NaOH aq, HF, HCl à reflux). Dans tous les cas, les 2 substituants en 1 et en 5 ont été hydrolysés pour former le composé 11. La monoacylation en 5 s'est avérée impossible, directement ou indirectement.

Pharmacologie

Une activité immunologique et une activité anticancéreuse ont été recherchées sur plusieurs des composés préparés.

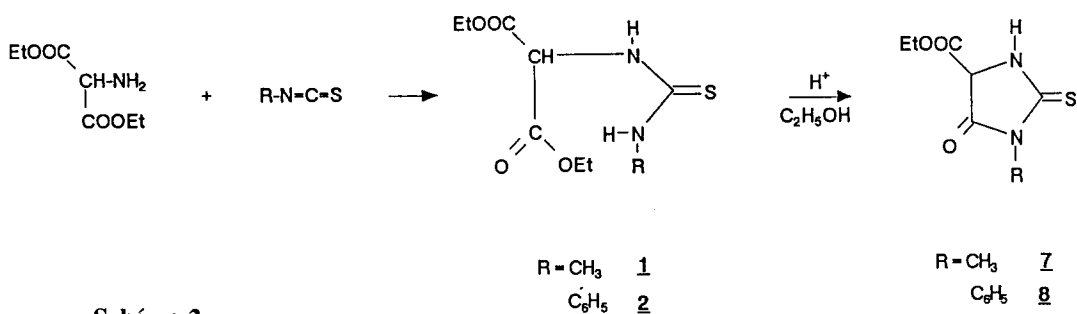


Schéma 2.

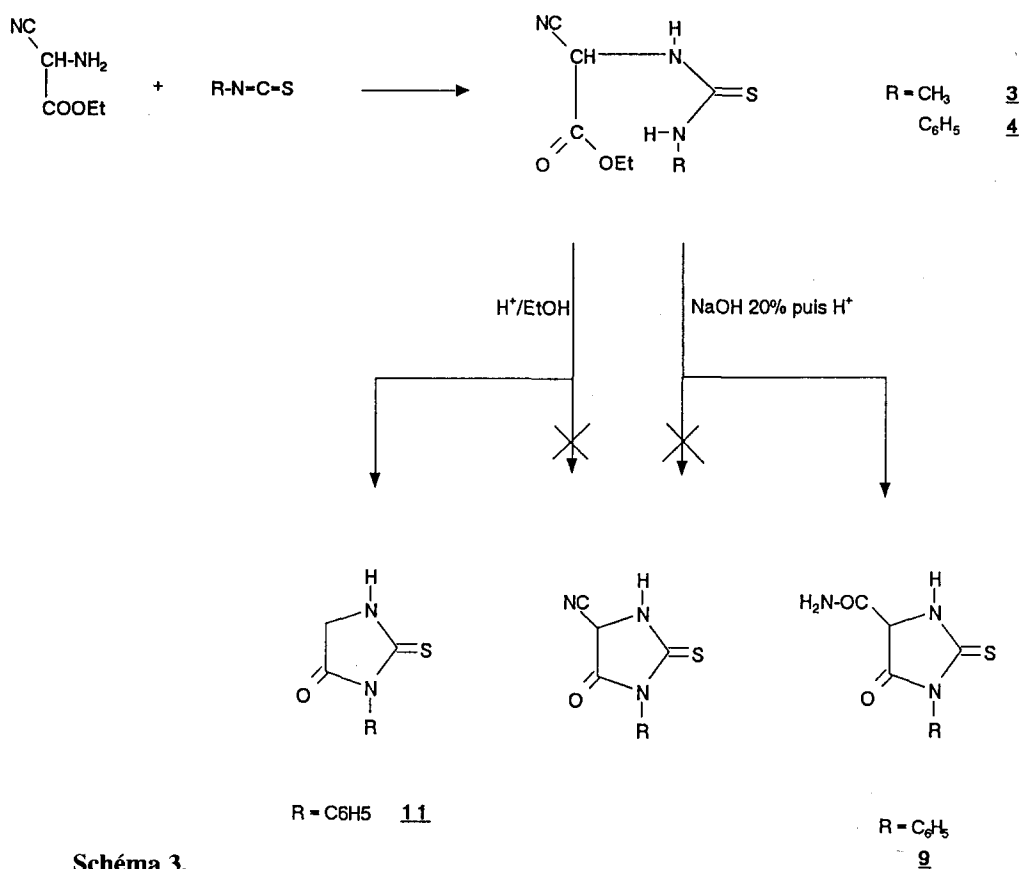


Schéma 3.

Activité immunosuppressive

Plusieurs tests ont été mis en œuvre pour évaluer l'activité immunosuppressive. Certains sont pratiqués *in vivo* (test à l'albumine bovine méthylée chez la souris) et d'autres *in vitro* (mesure de la stimulation lymphoblastique et mesure de l'activité *Natural Killer* (NK) de splénocytes de souris).

Test d'hypersensibilité retardée à l'albumine bovine méthylée chez la souris

La réaction d'hypersensibilité retardée est appréciée par l'augmentation du poids de la patte 24 h après injection plantaire de l'agent déclenchant, l'albumine

bovine méthylée, 7 jours après sensibilisation par le même agent. L'influence des produits à essayer, administrés *per os* 24 h et 2 h avant le challenge, se manifeste par un accroissement du poids de la patte par rapport aux témoins dans le cas d'un produit immunostimulant et par une diminution de poids dans le cas d'un produit immunosuppresseur.

La substance témoin est la ciclosporine (tableau V).

Mesure de la stimulation lymphoblastique de splénocytes de souris

Ce test *in vitro* permet d'apprécier la stimulation ou l'inhibition de cellules lymphoblastiques par les

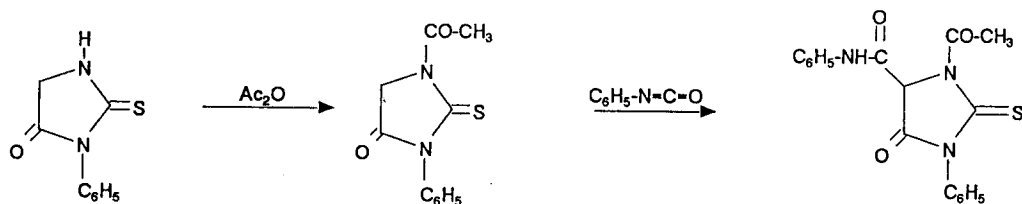
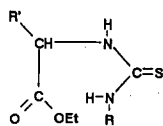


Schéma 4.

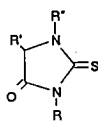
10

Tableau I. Thiourées intermédiaires.

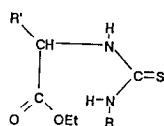


N°	R	R'	F°C	Solvant de recristallisation	Rdt (%)	Formule moléculaire
1	CH ₃	COOEt	110	Alcool 60°	40	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₄ S
2	C ₆ H ₅	COOEt	96	Alcool 60°	76	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄ S
3	CH ₃	CN	173	Alcool 60°	50	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂ S
4	C ₆ H ₅	CN	214	Alcool 60°	70	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂ S

Tableau II. 2-thio hydantoïnes.

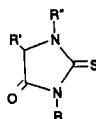


N°	R	R'	R''	F°C	Solvant de recristallisation	Rdt (%)	Formule moléculaire	Litt
5	CH ₃	CH ₂ COOH	H	175	Alcool 95°	48	C ₆ H ₈ N ₂ O ₃ S	[16]
6	C ₆ H ₅	CH ₂ COOH	H	256	Éthanol-DMF	50	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	
7	CH ₃	COOEt	H	216	Alcool 95°	87	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	
8	C ₆ H ₅	COOEt	H	156	Alcool 60°	90	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	
9	C ₆ H ₅	CONH ₂	H	270	Alcool 95°	58	C ₁₀ H ₉ N ₃ O ₂ S	
10	C ₆ H ₅	CONHC ₆ H ₅	COCH ₃	260	Alcool 60°	7	C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₃ S	
11	C ₆ H ₅	H	H	256	Alcool 95°	90	C ₉ H ₈ N ₂ OS	[22]

Tableau III. Thiourées intermédiaires: spectrométrie IR.

<i>N</i> ^o	<i>Fréquences d'absorption en cm⁻¹</i>
1	3180, 2980–2950, 1745, 1725
2	3375–3200, 2980–2950, 1750, 1720, 1590
3	3470, 2980–2950, 1640
4	3410, 2980–2950, 1660, 1590

substances étudiées. Le test consiste à mesurer la radioactivité des cultures cellulaires due à l'incorporation de ³H thymidine dans l'ADN des splénocytes mis préalablement en contact avec les produits à étudier et avec des lectines stimulantes (PHA = phytohémmagglutinine qui stimule les lymphocytes T et LPS = lipopolysaccharides qui stimulent les lymphocytes B). Une augmentation de la radioactivité incorporée, mesurée par rapport à la radioactivité des cultures cellulaires témoins non soumises à l'action du produit étudié, traduit un effet immunostimulant; une diminution de la radioactivité incorporée traduit un effet immunodépresseur. L'utilisation de l'une ou l'autre des lectines stimulantes permet de différencier l'effet des produits sur les populations lymphocytaires T ou B. Les substances témoins sont la ciclosporine et le méthimazole (tableau VI).

Tableau IV. 2-thio hydantoïnes: spectrométrie IR et RMN.

<i>N</i> ^o	<i>IR ν cm⁻¹</i>	<i>RMN (DMSO-d₆) δ ppm</i>
5	3170, 2980–2930, 1740, 1710	2,78 (m, 2H, CH ₂), 3,09 (s, 3H, CH ₃), 4,46 (t, 1H, CH), 10,25 (s, 1H, NH), 12,66 (s, 1H, OH)
6	3200, 3030, 2920, 1760, 1690, 1600	2,79–3,07 (m, 2H, CH ₂), 4,65 (t, 1H, CH), 7,18–7,65 (m, 5H, 1Ar), 10,47 (s, 1H, NH), 12,66 (s, 1H, 10H)
7	3190, 2970–2930, 1740, 1730	1,19 (t, 3H, CH ₃), 3,10 (s, 3H, N-CH ₃), 4,20 (q, 2H, CH ₂), 5,20 (s, 1H, CH), 11,09 (s, 1H, NH)
8	3190, 3030, 2970–2900, 1760, 1730, 1600	1,29 (t, 3H, CH ₃), 4,30 (q, 2H, CH ₂), 5,39 (s, 1H, CH), 7,30–7,55 (m, 5H, 1Ar), 10,95 (s, 1H, NH)
9	3200, 3030, 1750, 1690, 1620	5,03 (s, 1H, CH), 7,27–7,54 (m, 5H, 1Ar), 7,74–8,06 (d, 2H, NH ₂), 10,71 (s, 1H, NH)
10	3250, 3020, 2950, 1760, 1660, 1600	2,81 (s, 3H, CH ₃), 5,65 (s, 1H, CH), 7,13–7,64 (m, 10H, 2Ar), 10,98 (s, 1H, NH)
11	3200, 3010, 2900–2950, 1760, 1600	4,35 (s, 2H, CH ₂), 7,35 (m, 5H, 1Ar), 10,39 (s, 1H, NH)

Mesure de l'activité NK des splénocytes de souris sur le lymphome murin in vitro

Des cellules de lymphome murin (cellules cibles) préalablement marquées au ^{51}Cr sont mises en présence de splénocytes de souris (cellules effectrices) préalablement incubées avec les solutions de substances à étudier. L'activité NK cytotoxique des splénocytes provoque la lyse des cellules cibles dont l'importance est appréciée par la mesure de la radioactivité γ relarguée. Les variations d'activité cytotoxique, mesurées par rapport à celle de splénocytes témoins non traités, permettent d'estimer l'effet immunologique des substances à étudier sur l'activité cytotoxique des splénocytes de souris (tableau VII).

Activité anticancéreuse

Détermination de cytotoxicité directe in vitro sur mélanome B16 murin

L'activité cytotoxique directe des produits à essayer est appréciée par mesure de l'inhibition de croissance de la lignée tumorale *in vitro*, à leur contact. Cette évaluation est réalisée par comptage des cellules vivantes. Cette activité est comparée à celle de médicaments connus utilisés dans les mêmes conditions à des concentrations variables (tableau VIII).

Résultats et discussion

Les essais pharmacologiques ont été conduits dans le but de détecter une éventuelle activité sur le système

Tableau V. Activité immunosuppressive: test à l'albumine bovine méthylée. $\uparrow$ augmentation, $\downarrow$ diminution par rapport à la patte témoin.

N°	Dose per os mg/kg	Variation pondérale (en %)
Ciclosporine	2 x 100	49 $\downarrow$
6	2 x 100	11 $\uparrow$
8	2 x 100	5 $\uparrow$
9	2 x 100	21 $\downarrow$

immunitaire de nos produits de structure 2-thiohydantoïne. Ce sont de simples essais d'orientation pour guider la synthèse de produits diversifiés structurellement proches.

L'activité des 2-thio hydantoïnes sur le système immunitaire se révèle plutôt immunodépressive pour l'ensemble des produits essayés comme l'attestent de façon manifeste les résultats du test de stimulation lymphoblastique, mais à des concentrations déjà élevées (40–400 μM). Cette atténuation de l'activité immunitaire, qui n'est dose dépendante que pour les produits 6, 8, 9, concerne à la fois les activités des lymphocytes T et des lymphocytes B; le produit 6 paraît un peu plus dépresseur des lymphocytes T tandis que les produits 9 et 11 seraient un peu plus dépresseurs des lymphocytes B.

Les réponses dans le test *in vivo* d'hypersensibilité retardée à l'albumine bovine méthylée témoignent de

Tableau VI. Activité immunosuppressive: mesure de la stimulation lymphoblastique. "Pour tous les résultats analysés, seuls les plus significatifs par rapport à la ciclosporine et au méthimazole sont inscrits. $\uparrow$ stimulation, $\downarrow$ inhibition.

N°	+ PHA		+ LPS	
	Concentration (μM)	Variation de radioactivité (en %)	Concentration (μM)	Variation de radioactivité (en %)
Méthimazole	876	40 $\downarrow$		
Ciclosporine	1,6	80 $\downarrow$	1,6	50 $\downarrow$
5	53	25 $\downarrow$		
	530	25 $\downarrow$	530	0
6	40	55 $\downarrow$		
	400	80 $\downarrow$	400	70 $\downarrow$
8	38	25 $\downarrow$		
	380	70 $\downarrow$	380	65 $\downarrow$
9			4,2	18 $\downarrow$
	42	0	42	23 $\downarrow$
	420	80 $\downarrow$	420	57 $\downarrow$
11	520	40 $\downarrow$	260	60 $\downarrow$

la complexité de la réponse immunitaire puisque si l'effet immunodépresseur du produit **9** est nettement confirmé, les produits **6** et **8** se révèlent légèrement stimulants.

L'activité Natural Killer induite sur les lymphocytes spléniques est faible ou nulle et se manifeste tantôt par une activation (pour le composé **8** mais elle n'est pas dose-dépendante ainsi que pour le composé **5**) ou par une inhibition (**11**).

Les produits essayés ne développent pas une activité homogène sur le système immunitaire, traduisant des mécanismes d'intervention non univoques; leur niveaux d'activité est modeste.

La détection d'un effet cytotoxique direct sur mélanome B16 révèle une activité inexistante pour l'ensemble des produits étudiés (thiohydantoïnes et thiourées **1** et **2**) et faible pour les produits **6** et **8** puisqu'elle se manifeste pour des concentrations à peine inférieures à la concentration limite de 30 μM (valeur considérée comme seuil de détection) pour une inhibition de croissance tumorale de 50% alors que les agents anticancéreux connus développent dans ces conditions une activité antiproliférative CI 50 sur ce test à des concentrations de 1,1 μM pour le 5-fluoro uracile mais aussi 0,045 μM pour l'adriamycine, 0,009 μM pour la navelbine et 0,004 μM pour la vincristine.

Ces résultats préliminaires, conduits avec un nombre restreint de composés, plaident en faveur d'une activité plutôt immunodépressive d'importance modeste et laissent à penser que cet effet sur le système immunitaire semble lié à la structure 2-thio hydantoïne puisque les variations structurales, de caractère acide, introduites en position 5 ne développent pas d'influence particulière. L'activité anticancéreuse est négligeable.

Tableau VII. Mesure de l'activité NK (splénocytes de souris). $\uparrow$ stimulation, $\downarrow$ inhibition.

Produit	Concentration	Résultat en %
Ciclosporine	2 $\mu\text{g/ml}$	66 ^a $\downarrow$
Muramyl dipeptide	10 $\mu\text{g/ml}$	19 ^a $\uparrow$
	100 $\mu\text{g/ml}$	24 ^a $\uparrow$
5	530 μM	12 ^b $\uparrow$
6	400 μM	0 ^b
8	38 μM	11 ^b $\uparrow$
	380 μM	7 ^b $\uparrow$
11	52 μM	11 ^b $\downarrow$

^aSignificatif $P < 0,05$ pour le test de Dunett; ^bmoyenne de deux essais.

Partie expérimentale

Les points de fusion sont déterminés au banc de Köfler. Les spectres infra-rouge sont réalisés sur spectrophotomètre Philips PYE-Unicam SP3-100. Les spectres RMN du proton sont effectués sur un appareil Bruker AC 200 de 200 MHz en solution dans le DMSO- d_6 . Les chromatographies sur couche mince sont réalisées sur plaque de silice GF 254 sur aluminium, dans deux types de mélange de solvants: benzène/acétate d'éthyle; 1/9 et méthanol/chloroforme; 1/9.

Chimie

Acide 3-phényl 2-thio -5-hydantoïne acétique **6**

Mode opératoire selon [16]. À une solution de 0,05 mol d'acide aspartique (6,65 g) dans 100 ml de KOH 1 N est ajoutée une solution de 0,05 mole d'isothiocyanate de phényle

Tableau VIII. Activité anticancéreuse: étude de l'activité cytotoxique sur mélanome B16 *in vitro*.

N°	Dose μM	Résultats en % stimulation inhibition	Témoin	Dose μM	Résultats en % stimulation inhibition
1	> 30	50	Adriamycine	0,045	50
2	> 30	50	Adriamycine	0,045	50
4	> 30	50	Adriamycine	0,045	50
6	10	22	Méthimazole	10	28
8	6,9	50	5 FU	1,1	50
	8,2	50	Méthimazole	10	50

(6,75 g) dans 100 ml d'éthanol. L'agitation est maintenue à 40°C pendant 2 h. Le mélange est alors acidifié (qsp pH 1), puis porté à ébullition 10 à 15 min. Le précipité obtenu est filtré, lavé à l'eau et recristallisé. F = 256°C (Éthanol-DMF); rdt = 50%; analyse: $C_{11}H_{10}N_2O_3S$.

N-dicarbéthoxy-méthyl N'-phényl thiourée 2

Une solution de 0,025 mol d'acétyl malonate de diéthyle (4,4 g) préparé selon Cerchez [17, 18] et de 0,025 mol d'isothiocyanate de phényle (3,4 g) dans 100 ml d'éthanol est agitée 24 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide, l'huile résiduelle cristallise. F = 96°C (alcool 60°); rdt = 76%; analyse: $C_{14}H_{18}N_2O_4S$ (C, H, N, S).

5-carbéthoxy 3-phényl-2-thio hydantoïne 8

Une solution de 0,025 mol d'acétyl malonate de diéthyle (4,4 g) préparé selon Cerchez [17, 18] et de 0,025 mol d'isothiocyanate de phényle (3,4 g) dans 100 ml d'éthanol est agitée 24 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide, l'huile résiduelle cristallise. F = 96°C (alcool 60°); rdt = 76%; analyse: $C_{14}H_{18}N_2O_4S$ (C, H, N, S).

N-(cyano, carbéthoxy-méthyl) N'-phényl thiourée 4

Une solution de 0,025 mol d'acétyl malonate de diéthyle (4,4 g) préparé selon Logeman [19–21] et de 0,025 mol d'isothiocyanate de phényle est agitée 24 h à température ambiante. Le précipité obtenu est filtré, lavé à l'alcool 60° et recristallisé. F = 214°C (alcool 60°); rdt = 70%; analyse: $C_{12}H_{13}N_3O_2S$ (C, H, N, S).

5-carboxamido 3-phényl-2-thio hydantoïne 9

Une suspension de 0,01 mol de thiourée 4 (3 g) dans 90 ml de soude aqueuse à 20% est portée à ébullition 10 min. Après dilution et acidification par HCl concentré (qsp pH 1), le précipité obtenu est filtré, lavé à l'eau et recristallisé dans l'alcool 95°. F = 270°C (alcool 95°); rdt = 58%; analyse: $C_{10}H_9N_3O_2S$.

5-anilido 1-acétyl 3-phényl-2-thio hydantoïne 10

Le mélange composé de 0,02 mol de 1-acétyl-3-phényl-2-thio hydantoïne (4,68 g) (obtenu par acylation de la 3-phényl-2-thio hydantoïne par l'anhydride acétique, 30 min à reflux [22]), de 0,02 mol d'isocyanate de phényle (2,38 g) et de 0,002 mol de DMAP dans 50 ml de pyridine est chauffé à reflux 30 min. Le solvant est évaporé sous vide, le résidu est repris par l'eau, le précipité formé est filtré et recristallisé. F = 260°C (alcool 60°); rdt = 7%; analyse: $C_{18}H_{15}N_3O_3S$ (C, H, N, S).

3-phényl 2-thio hydantoïne II

0,0019 mol de thiourée 4 (0,5 g) est mise dans 20 ml d'HCl 6 N. La suspension est portée à reflux. Le produit se dissout rapidement et il se forme aussitôt un précipité blanc. Le reflux est maintenu 15 min. Après refroidissement, le précipité est filtré, lavé à l'eau et recristallisé. F = 256°C (alcool 95°), Rdt = 90%. F (litt) = 242–244°C [22].

Pharmacologie

Activité immunosuppressive

Test à l'albumine bovine méthylée. Ce test est pratiqué sur des souris Swiss (selon Crowle *et al* [23]) mâles de 25 g en moyenne. Les souris sont sensibilisées par injection intradermique en trois endroits de 0,1 ml/souris d'un mélange à 50% d'adjuvant complet de Freund et à 50% d'une solution d'albumine bovine méthylée à 5 mg/ml dans du NaCl à 0,9%. Sept jours plus tard, 0,025 ml d'une solution d'albumine bovine méthylée à 1% dans du NaCl à 0,9% est injecté dans le coussinet plantaire de la patte arrière droite. 24 h plus tard, les pattes arrières sont prélevées et pesées et la réaction d'hyper-sensibilité retardée quantifiée par la différence de poids entre les deux pattes. Cette différence varie de 75 à 110 mg chez les

animaux témoins selon les expériences. Chaque produit à étudier est administré *per os* à raison de 100 mg/kg, 24 h et 2 h avant le challenge, en suspension dans 25 ml/kg d'un mélange de Tween 80 + eau distillée (1 goutte de Tween pour 10 ml d'eau). La différence de poids des pattes arrières des souris traitées est comparée (en %) à celle des animaux témoins de l'expérience. Huit souris sont utilisées par lot. Les calculs statistiques sont effectués selon le test de Bonferroni. Les pourcentages de variations sont rapportés dans le tableau V.

Mesure de la stimulation lymphoblastique selon Dziarski [24]. Les splénocytes de 4 souris femelles B6D2F1 de 7 à 12 semaines sont prélevés, isolés (Potter et filtration sur gaze) et placés dans du milieu RPMI [25] sans sérum. Après comptage des cellules vivantes, on place en culture 5×10^5 cellules dans 200 µl de RPMI additionné de sérum de cheval (10%). Les produits à étudier dissous dans l'eau ou dans le mélange eau + DMSO (0,1 à 0,5% de DMSO) et la lectine stimulante: 10 µl de solution aqueuse à 0,2 mg/ml de PHA ou 10 µl de solution aqueuse à 1 mg/ml de LPS sont ensuite ajoutés aux cultures cellulaires durant 48 h. Six heures avant la fin de la stimulation, on marque les splénocytes avec 1 µCi de 3H thymidine (10 µl). Les cellules sont récoltées (cell harvester) sur des filtres GFA et lavées 20 fois à l'eau distillée. Les filtres séchés sont placés dans 6 ml de liquide de scintillation et leur radioactivité est évaluée à l'aide d'un compteur β (cpm).

La variation de radioactivité de l'essai, rapportée à la radio-activité de cultures témoins, est exprimée en pourcentage: $[\text{cpm}(\text{essai}) - \text{cpm}(\text{témoin})/\text{cpm}(\text{témoin})] \times 100$. Huit mesures de radioactivité sont effectuées pour chaque concentration de produit essayé.

La dispersion des comptages de radioactivité pour les essais et pour les témoins dans une même manipulation (mêmes splénocytes) est de + ou – 5% par rapport à la moyenne. Elle est naturellement plus élevée quand il s'agit de splénocytes de lots différents: l'écart standard de la moyenne est alors de 12% pour les essais conduits en présence de PHA et de 16% pour les essais conduits en présence de LPS. Pour les témoins et pour des splénocytes différents, l'écart standard de la moyenne est réduit à 5 et 8%. Une variation de + 25% (stimulation) ou de – 25% (inhibition) par rapport à la radioactivité des cultures témoins correspond, aux yeux des expérimentateurs à un effet biologiquement significatif.

Activité anticancéreuse

Mesure de l'activité NK des splénocytes de souris selon Phillips *et al* [26]. Les animaux utilisés sont des souris femelles B₆D₂F₁ de 7 à 12 semaines, par lot de 4. Les cellules cibles (C) sont des cellules YAC 1 (lymphome murin) marquées au ^{51}Cr comme suit: 5×10^6 cellules + 200 µCi ^{51}Cr ($Na_2Cr_2O_7$ (200 µl, 400 à 600 mCi/mg)) pendant 45 min à 37°C. Lavage par RPMI pendant 1 h à 0°C, puis ajuster la suspension à 10^5 cellules C/ml.

Les cellules effectrices (E) sont des splénocytes isolés après attachement sur des boîtes de culture (2 h à 37°C, incubateur à CO₂) et placés dans du milieu RPMI. Les cellules E sont incubées 60 min en présence de solutions du produit pour les essais *in vitro*.

Puis les cellules C et les cellules E sont incubées ensemble dans le rapport E/C = 200 durant 4 h à 37°C.

Le surnageant est prélevé et la radioactivité relarguée est comptée (compteur γ). L'activité cytotoxique induite est rapportée à celle de splénocytes témoins, et exprimée en pourcentage de variation d'activité NK par rapport aux témoins. Les produits de référence utilisés sont la ciclosporine A (2 µg/ml) et le muramylidipeptide (à 10 et à 100 µg/ml).

Détermination de la cytotoxicité sur mélanome B16 (murin) *in vitro* selon Bradner et Claridge [27]. Le traitement se déroule sur 3 jours (5 cycles cellulaires).

J0: sur une plaque à 24 puits, ensemencement de 1 ml de suspension de 10^4 cellules/ml dans le milieu de culture (RPMI + 10% de sérum de veau fœtal).

J1: Le milieu est retiré, les cellules sont mises en présence de 1 ml de milieu de culture auquel on ajoute une solution de produit à étudier: 10 μ l pour un produit soluble dans l'eau et 0,5 μ l pour un produit soluble dans le DMSO. Trois cultures sont réalisées pour chaque concentration du produit à essayer.

J4: Évaluation de la toxicité: le milieu est retiré, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS. Les cellules sont décrochées du support plastique avec 200 μ l d'une solution de trypsine à 0,05% et d'EDTA à 0,01% dans le PBS, et reprises dans du PBS pour être comptées au compteur Coulter.

L'activité inhibitrice cytotoxique sur la prolifération cellulaire est mesurée par rapport à la prolifération de cultures cellulaires non traitées. La dispersion des comptages cellulaires (écart standard de la moyenne) est < 5% tant pour les cultures témoins que pour les cultures traitées. Quatre concentrations du produit testé sont utilisées. On calcule la concentration inhibitrice à 50% (CI 50) du produit testé par régression linéaire par rapport à la prolifération contrôlée correspondante en tenant compte des valeurs comprises entre 20 et 80% d'inhibition. Une inhibition de 50% de la prolifération cellulaire pour des concentrations 'seuil' de produit < 30 μ M atteste d'un début d'activité cytotoxique.

Remerciements

Nous remercions les laboratoires Pierre Fabre Médicament pour l'aide matérielle offerte par un contrat de collaboration Université-Industrie et pour la réalisation des essais pharmacologiques sous la direction de Jean-Pierre Tarayre et Chantal Etiévant. Nos remerciements s'adressent également à Messieurs JP Couzinier, P Lenoble, J Tisne Versailles et D Bigg ainsi qu'aux techniciennes C Cathala et M Barbara.

Références

- Renoux G (1980) *Drugs* 20, 89–99
- Hopkins SJ (1979) *Drugs Future* 4, 421–426
- Janssen PAJ (1976) *Progr Drug Res* 20, 347
- Blanc M (1989) Contribution à l'étude de dérivés de la 2-thio-hydantoïne. Thèse Doctorat de l'Université Joseph Fourier, Grenoble I
- Smith HR, Steinberg AD (1983) *Annu Rev Immunol* 1, 175
- Tottertman TH (1987) *N Eng J Med* 1 331, 15–22
- Stecher VJ, Carlson JA (1983) *Ann Rep Med Chem* 18, 177
- Easland G Jr (1986) *Drugs Future* 9, 773–776
- Cheng BKY, Cheng CC (1987) *Drugs Future* 12, 217–219
- Van Ginckel R, De Brabander M (1979) *J Reticuloendoth Soc* 25
- Hadden JW, Hadden EM, Spira T, Settineri R, Simon L, Giner-Sorolla A (1982) *Int J Immunopharmacol* 4, 235–242
- De Brabander M (1978) *Chem Biol Interact* 23, 45–63
- Venuti MC (1986) *Ann Rep Med Chem* 21, 203
- Lespagnol A (1953) In: *Traité de Chimie organique* (Grignard V). Masson, Paris, XX, 909–956
- Lopez CA, Trigo GG (1985) *Adv Heterocyclic Chem* 38, 177–288
- Krivtsov VF, Stepanov VM (1965) *J General Chemistry USSR*, 554–556
- Cerchez V (1930) *Bull Soc Chim Fr* 47, 1279–1282
- Locquin R, Cerchez V (1930) *Bull Soc Chim Fr* 47, 1274–1279
- Logeman FI, Shaw G (1980) *Chemistry and Industry* 13, 541–542
- Conrad M, Schuze A (1909) *Ber* 42, 735–742
- Fields M, Walz DE, Rothchild S (1951) *J Am Chem Soc* 73, 1000–1003
- Johnson B, Hill AJ, Kelsey EB (1920) *J Am Chem Soc* 42, 1711–1720
- Crowle AJ, Hu CC, Patrucco A (1968) *J Allergy* 42, 140–156
- Dziarski R (1985) *J Clin Lab Immunol* 16, 93–109
- Moore GE, Gerner RE, Franklin HA (1967) *JAMA* 199, 519–524
- Philipps JH, Nishioka K, Babcock GF (1983) *Ann NY Acad Sc* 419, 193–204.
- Bradner WT, Claridge CA (1984) Screening systems In: *Antineoplastic agents* (Remers WA, ed) Wiley Interscience Publ, 41–82