

Synthèse et activité antithyroïdienne de dérivés du triazole

JF Lagorce, F Comby, J Buxeraud, C Raby

Laboratoire de Chimie Organique et Chimie Thérapeutique, Faculté de Pharmacie,
Université de Limoges, 2, rue du Docteur-Marcland, 87025 Limoges Cedex, France

(Reçu le 7 juin 1990; accepté le 19 décembre 1991)

Summary — Synthesis and antithyroid activity of triazole derivatives. The synthesis of nitrogen heterocycle derivatives (pyridine, pyrimidine, pyrazine) of 3-mercapto-1,2,4-triazole and 3-mercapto-1-methyl-1,2,4-triazole is described. The antithyroid activity of compounds is evaluated by action on molecular iodine, by action on peroxidase and *in vivo* on the rat (hormones levels, histology). Pyridyl and pyrimidyl derivatives of mercaptotriazole and mercaptomethyltriazole, as well as (6-methoxy-pyridyl) mercaptomethyltriazole, are the most active. Study over one month does not reveal agranulocytosis.

antithyroid drugs / charge transfer complex / peroxidase / mercaptotriazole

Introduction

Plusieurs médicaments ont été utilisés comme antithyroïdiens et pourtant seul le carbimazole (Néo-mercazole) dérivé du méthimazole ou 1-méthyl-2-mercaptoimidazole (MMI) et le benzylthiouracile (Basdène) sont encore commercialisés, le carbimazole étant de beaucoup le plus prescrit; les autres dérivés du thiouracile (méthyle, propyle), la 2-mercaptothiazoline ont été abandonnés, la thiourée et ses dérivés sont beaucoup trop toxiques. Le carbimazole présente lui-même des inconvénients. Son activité, très forte, peut conduire à une inactivation irréversible de la peroxydase thyroïdienne [1], enzyme responsable de l'oxydation des iodures et du couplage des iodotyrosines en iodothyronines [2] d'où un effet goitrigène qui limite son utilisation. Il peut également provoquer une leucopénie, une agranulocytose.

Il apparaît nécessaire de compléter l'arsenal thérapeutique dans cette série médicamenteuse par la recherche d'une nouvelle molécule dont l'action antithyroïdienne serait moins forte que celle du méthimazole et dénuée d'effets secondaires.

Puisque les dérivés de l'imidazole, en particulier le méthimazole, sont actifs sur l'hormonogénèse thyroïdienne [3], nous avons voulu remplacer un diazole par un triazole et contrôler l'apport de nouveaux produits avec comme noyau de base le 3-mercapto-1,2,4-triazole. On y retrouve la structure thioamide commune aux substances habituellement utilisées en thérapeutique antithyroïdienne [3, 4].

À partir de ces observations, un plan de recherche d'un nouvel antithyroïdien a été élaboré, avec pour objectif la découverte d'une substance dénuée d'effets goitrigènes et agranulocytosiques [3–6].

Ce travail rapporte la préparation de nouveaux dérivés, les résultats de leur action sur l'iode moléculaire et la peroxydase, sites d'action possibles. En effet, nous avons montré que les antithyroïdiens de synthèse (ATS) pouvaient agir non seulement sur la peroxydase thyroïdienne, mais aussi sur l'iode moléculaire et nous avons proposé un mécanisme d'action possible des ATS [7]. L'action sur l'iode, sous forme I_2 , résulte d'une complexation par transfert de charge entre un donneur (le médicament) et un accepteur (l'iode). Nous avons pu montrer qu'un composé ayant une constante de formation de complexe (K_c) supérieure à 100 l/mol^{-1} pouvait avoir une activité antithyroïdienne [8]. Cependant, pour certains dérivés, il n'a pas été possible de calculer la K_c , pour d'autres il peut y avoir action sur l'iode moléculaire et absence d'inhibition sur la peroxydase, voir activation de l'enzyme, c'est pourquoi nous réalisons, comme test de référence, une expérimentation *in vivo* sur le rat.

Chimie

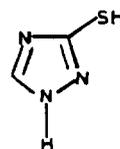
C'est à partir de 3-mercapto-1,2,4-triazole, et de son dérivé méthylé sur l'azote en 1, que nous avons préparé deux classes de produits. Nous partons à chaque fois d'un thiol pour conserver la structure

thioamide. Dans le tableau I, nous avons donné les résultats globaux (K_c , inhibition de la LPO, expérimentation animale) des noyaux de base, mercapto-triazole et mercapto-méthyltriazole.

Le mercapto-triazole montre une activité assez faible tant sur l'iode que sur la peroxydase et l'action *in vivo* est faible. Par contre, le mercapto-méthyltriazole, qui agit assez fortement sur l'iode et sur la peroxydase, révèle une activité moyenne. Cependant ils possèdent un SH libre, comme dans le méthimazole, la 2-mercaptothiazoline, les thiourées, il pourrait donc présenter les mêmes inconvénients que ces molécules. C'est pourquoi l'objet de cette étude porte essentiellement sur les dérivés de substitution sur le soufre de ces deux noyaux de base.

Type I

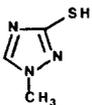
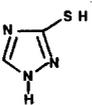
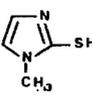
Il s'agit des dérivés du 3-mercapto-1,2,4-triazole (MT).



Si nous comparons le pouvoir électrodonneur de N-méthylimidazole ($K_c = 426 \text{ l}\cdot\text{M}^{-1}$) et celui de méthimazole ($K_c = 23\,194 \text{ l}\cdot\text{M}^{-1}$) [9], nous pensons que le groupement SH est indispensable à une activité suffisante, mais cette activité se révèle parfois trop forte *in vivo*, ainsi elle conférerait au méthimazole des propriétés secondaires indésirables.

Il nous a semblé intéressant de remplacer le noyau de l'imidazole par celui du triazole, dans le but de diminuer les risques hématologiques, et de fixer sur le soufre des noyaux de la pyridine, de la pyrazine et de la pyrimidine pour atténuer, sans plus, le pouvoir électrodonneur du soufre.

Tableau I. Activité antithyroïdienne des noyaux de base. Activité: + faible; ++ moyenne; ++++ très forte. Poids des glandes: en mg pour 100 g de poids corporel.

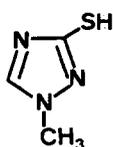
	K_c $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}$	Activité inhibitrice sur la LPO CI_{50} en M	Expérimentation animale			Histologie	
			T4 ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	T3 (ng/ml)	Poids des glandes mg/100 g	Épithélium	Activité de la glande
 3-mercapto-1,2,4-triazole	203,46	$9,3 \cdot 10^{-6}$	3,23	1,92	8,7	Cylindro-cubique	+
 3-mercapto-1-méthyl-1,2,4-triazole	1777,80	$9,2 \cdot 10^{-6}$	3,37	0,98	27,5	Cylindrique	++
 2-mercapto-1-méthyl imidazole (Méthimazole)	23194	$2,46 \cdot 10^{-5}$	0,31	0,62	24,75	Cylindrique	++++
Rats témoins			3,35	2,12	6,2	Cubique	±

Ces dérivés ont été obtenus par action d'une solution d'une chloropyridine ou d'une chlorodiazine (pyrazine, pyrimidine) sur une solution de thiolate alcalin. Le produit de la réaction précipite, il est isolé sous forme de base ou de chlorhydrate.

Au tableau II figurent les différentes molécules de cette série.

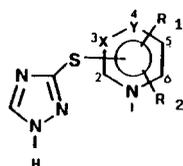
Type II

Les produits de cette série présentent comme noyau de base le 3-mercapto-1-méthyl-1,2,4-triazole (MMT).



Le cycle du MMT présente un méthyle sur l'azote en 1, ce qui renforce la densité électronique du noyau triazole. Nous avons voulu vérifier la différence d'activité apportée par ce radical par rapport à la première série où l'azote n'est pas méthylé. En effet en ce qui concerne le méthimazole, cet azote est méthylé.

Tableau II. Dérivés du 3-mercapto-1,2,4-triazole. -S-T position du radical thiotriazole sur le noyau pyridinique ou son homologue.



N° Mol	X	Y	R ₁	R ₂	-S-T	P F°C	Procédé	Rendement (%)	Formule	PM
1	C	C	H	H	2	214	A	58	C ₇ H ₆ N ₄ S	178,21
2	C	C	H	H	3	214	A	49	C ₇ H ₆ N ₄ S	178,21
3	C	C	NO ₂ (3)	H	2	217	B	51	C ₇ H ₅ N ₅ SO ₂	223,21
4	C	C	NO ₂ (5)	H	2	104	B	47	C ₇ H ₅ N ₅ SO ₂	223,21
5	C	C	NO ₂ (3)	NO ₂ (5)	2	204	C	56	C ₇ H ₄ N ₆ SO ₄	268,21
6	C	C	COOH(3)	H	2	210	D	10	C ₈ H ₆ N ₄ SO ₂	222,22
7	N	C	H	H	2	145	E	30	C ₆ H ₅ N ₅ S	179,20
8	C	C	OCH ₃ (3)	H	2	164	F	30	C ₈ H ₈ N ₄ SO	208,24
9	C	C	OH(3)	H	2	128	G	25	C ₇ H ₆ N ₄ SO	194,21
10	C	N	H	H	2	238	E	15	C ₆ H ₅ N ₅ S	179,20

La présence de ce radical méthyle ne facilite pas l'isolement du produit de condensation du MMT avec la pyridine halogénée. C'est ainsi que les composés **11** et **12** ont été isolés sous forme de chlorhydrates, les bases correspondantes étant des substances huileuses non cristallisables.

Résultats et discussion

Nous avons montré [7-9] qu'il y avait une relation entre l'activité antithyroïdienne d'une molécule et son pouvoir électrodonneur. Ce pouvoir est quantifié grâce à la détermination de la constante de formation de complexe (K_c).

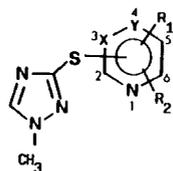
Il a été établi un tableau montrant la relation entre la K_c et l'activité antithyroïdienne de nombreux composés. Le tableau IV reprend cette corrélation pour les composés qui nous semblent les plus intéressants.

En reprenant les K_c obtenues avec les produits que nous avons synthétisés, mais aussi en reprenant l'interaction de certains composés formant des complexes d'ordre supérieur, nous avons une idée sur leur possible activité antithyroïdienne (tableau V).

Pour chacun des produits synthétisés, l'expérimentation conduit à: la recherche du ou des sites d'action de ces molécules; une étude sur le rat, ce qui constitue un test global.

Recherche du ou des sites d'action

Les molécules ayant un pouvoir électrodonneur peuvent agir à deux niveaux: sur l'iode moléculaire ou sur la peroxydase thyroïdienne.

Tableau III. Dérivés du 3-mercapto-1-méthyl-1,2,4-triazole. -S-T position du radical thiotriazole sur le noyau pyridinique ou son homologue.

N° Mol	X	Y	R ₁	R ₂	-S-T	P F°C	Procédé	Rendement (%)	Formule	PM
11	C	C	H	H	2	162	H	54	C ₈ H ₈ N ₄ S, HCl	228,90
12	C	C	H	H	3	167	H	49	C ₈ H ₈ N ₄ S, HCl	228,90
13	C	C	NO ₂ (3)	H	2	101	B	62	C ₈ H ₇ N ₅ SO ₂	237,41
14	C	C	NO ₂ (5)	H	2	191	B	55	C ₈ H ₇ N ₅ SO ₂	237,41
15	C	C	NO ₂ (3)	NO ₂ (5)	2	195	C	45	C ₈ H ₄ N ₆ SO ₄	280,22
16	N	C	H	H	2	160	E	36	C ₇ H ₇ N ₅ S	193,23
17	C	C	OCH ₃ (6)	H	2	144	F	20	C ₉ H ₁₀ N ₄ SO	222,27
18	C	C	OH(6)	H	2	142	G	22	C ₈ H ₈ N ₄ SO	208,24

Tableau IV. Corrélation K_c/activité antithyroïdienne des composés étudiés précédemment. Activité de la glande (examen histologique): faible: +; moyenne: ++; forte: +++; très forte: ++++.

	K _c (1·mol ⁻¹)	Activité de la glande
Thiocyanate de K	96	+
Disulfirame	296	++
N-CH ₃ imidazole	426	++
2-mercapto thiazoline	2527	+++
Thiourée	8825	+++
Tétraméthylthiourée	13215	+++
1-méthyl-2-mercapto-imidazole	23194	++++

Action sur l'iode moléculaire

Certains auteurs [10] ont montré qu'en l'absence de tyrosine, de protéines réceptrices (BSA, thyroglobuline), l'iode moléculaire peut se former dans des proportions importantes. Physiologiquement, c'est la thyroglobuline qui est la protéine réceptrice de la forme oxydée de l'iode. Or Ericson [11, 12] et Eklhom [13] ont montré par autoradiographie et microscopie électronique que la thyroglobuline se situait à quelques distances des autres constituants nécessaires à la formation des hormones thyroïdiennes. Ces auteurs ont étudié la localisation des composants nécessaires à l'iodation. Ces localisations montrent que les composants, iodures/H₂O₂/TPO, sont

situés dans la membrane apicale et que la thyroglobuline est accumulée dans la lumière folliculaire, donc en un lieu différent, ce qui veut dire que l'iode moléculaire peut se former en quantité importante avant d'être transformé en I⁺. Par conséquent, il est normal de penser que les molécules ayant un pouvoir électrodonneur important peuvent complexer cet iode et le détourner de son métabolisme habituel.

Les molécules originales étudiées peuvent, pour la plupart, réagir avec l'iode, pour former un complexe de type transfert de charge.

Ces complexes par transfert de charge sont souvent des complexes de stoechiométrie 1:1 (figs 1 et 2), que nous sommes capables d'interpréter grâce au calcul de la constante de formation du complexe [14].

Cette constante nous permet de quantifier le pouvoir électrodonneur des molécules et donc leur capacité d'interférer sur le métabolisme thyroïdien.

Mais quelquefois, l'aspect des spectres semblent correspondre à des complexes de stoechiométrie 1:1, alors que le calcul de la constante de formation K_c, aussi bien par la méthode de Lang [15] que par une autre méthode (Nash [16], Benesi-Hildebrand-Scott [17, 18]) s'est révélé impossible.

Nous nous sommes alors orienté vers des complexes de stoechiométrie supérieure, pour lesquels nous n'avons pas encore déterminé une méthode de calcul de constante de formation du complexe, mais le pouvoir électrodonneur de ces produits paraît important.

L'examen des valeurs de K_c (tableau V) et donc de l'effet électrodonneur, nous permet de dire que:

Tableau V. Corrélation K_c /activité enzymatique/activité antithyroïdienne des composés synthétisés. Activité de la glande: \pm : très faible; +: faible; ++: moyenne; +++: forte; ++++: très forte.

Composés	Effet électrodonneur K_c l·mol ⁻¹	Inhibition de la LPO CI_{50} en M	Activité de la glande
1	Stoechiométrie 2:1 ^a ou ordre >	1,2 10 ⁻⁴	+
2	1040,981	6,4 10 ⁻⁵	+++
3	Insoluble	Active	+
4	Insoluble	9,7 10 ⁻⁵	\pm
5	Stoechiométrie 2:1 ^a ou ordre >	4,6 10 ⁻⁵	+
6	Stoechiométrie 2:1 ^a ou ordre >	Sans action	++
7	1422,58	4,74 10 ⁻⁵	++ à +++
8	Stoechiométrie 2:1 ^a ou ordre >	9,20 10 ⁻⁵	++
9	Stoechiométrie 2:1 ^a ou ordre >	Active	+
10	Stoechiométrie 2:1 ^a ou ordre >	9,50 10 ⁻³	+
11	995,68	1,19 10 ⁻⁵	++
12	941,57	3,10 10 ⁻⁵	++
13	42,71	7,3 10 ⁻⁵	+ à ++
14	279,12	7,6 10 ⁻⁵	+ à ++
15	Insoluble	2,1 10 ⁻³	+
16	Stoechiométrie 2:1 ^a ou ordre >	2,55 10 ⁻⁵	+++
17	Stoechiométrie 2:1 ^a ou ordre >	5,66 10 ⁻⁴	+++
18	Stoechiométrie 2:1 ^a ou ordre >	2,95 10 ⁻⁴	++
KSCN	96	3,9 10 ⁻²	+
MMI	23194	2,46 10 ⁻⁵	++++

^aProduits pour lesquels la constante de formation de complexe de charge avec l'iode n'a pu être calculée car la stoechiométrie n'est pas 1:1, mais d'ordre supérieur.

– la détermination de la constante de formation du complexe (K_c) n'a pas été toujours possible, soit par insolubilité des produits dans les solvants habituellement utilisés pour cette détermination (CCl_4 , $CHCl_3$, CH_2Cl_2), soit par formation de complexe de stoechiométrie 2:1;

– les valeurs trouvées sont intéressantes quand on les compare au thiocyanate de potassium, antithyroïdien connu, dont la K_c est égale à 96 l·M⁻¹ [7];

– les plus fortes valeurs sont trouvées avec le mercaptotriazole sur lequel est fixée une pyridine non substituée (composé 2) ou une pyrimidine non substituée (composé 7);

– un groupement NO_2 abaisse le pouvoir électrodonneur (composés 13 et 14).

Nous savons que la détermination du pouvoir électrodonneur peut être une bonne indication pour suspecter une molécule d'avoir une action antithyroïdienne [8], mais nous rencontrons, avec un certain nombre de molécules deux obstacles, soit qu'elles ne nous permettent pas de savoir s'il y a complexation en raison de leur insolubilité, soit qu'il n'est pas encore possible de calculer la constante K_c lorsqu'il y a formation d'un complexe 2:1. Mais dans ce dernier cas, nous savons qu'il y a une complexation.

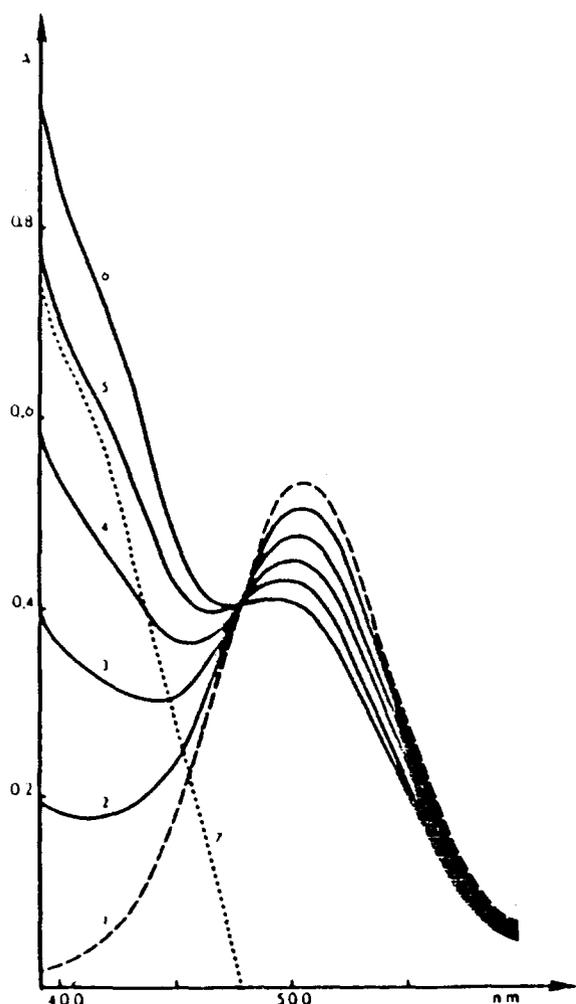


Fig 1. Spectres d'absorption visible du composé 2 et de $I_2 = 5,53 \cdot 10^{-4}$ dans $CHCl_3$. Les concentrations M de 2 sont (1) 0, (2) $4,49 \cdot 10^{-5}$, (3) $8,99 \cdot 10^{-5}$, (4) $1,34 \cdot 10^{-4}$, (5) $1,79 \cdot 10^{-4}$, (6) $2,24 \cdot 10^{-4}$, (7) bande visible calculée du complexe à partir de la solution.

Même si nous ne pouvons pas déterminer la K_c , le fait de savoir qu'une molécule a un pouvoir électrodonneur est intéressant car ce pouvoir peut s'exercer au niveau moléculaire vis-à-vis de l'iode moléculaire et/ou au niveau cellulaire par action sur la peroxydase thyroïdienne. C'est grâce à ce test que nous avons pu suspecter de nombreuses molécules d'avoir une activité antithyroïdienne [19], confirmée ensuite par le test sur le rat.

Action sur la peroxydase thyroïdienne

La peroxydase thyroïdienne (TPO) intervient comme nous l'avons vu dans la synthèse des hormones thyroïdiennes à plusieurs niveaux (fig 3). Le mécanisme le plus souvent retenu pour l'action des antithyroïdiens

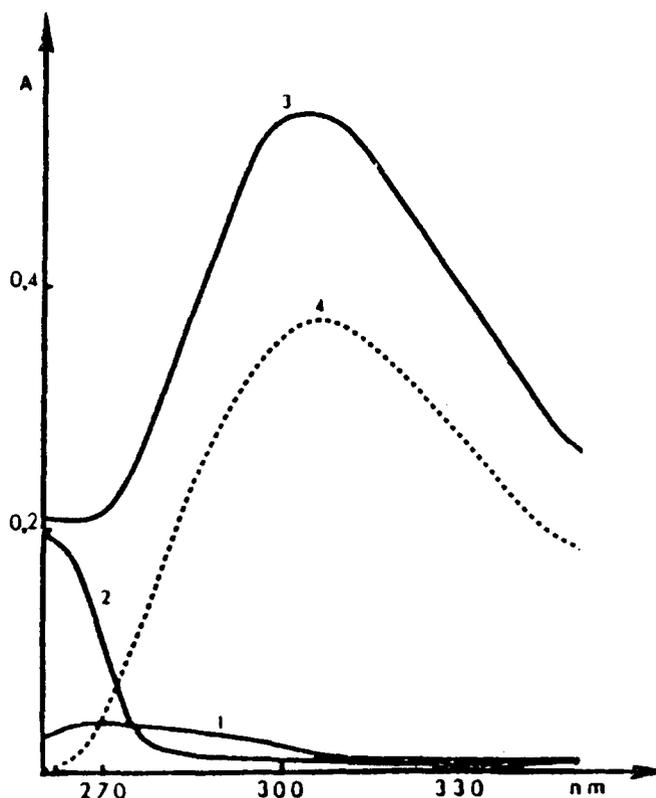


Fig 2. Spectres ultraviolets de complexe (produit 2- I_2) dans CCl_4 à $20^\circ C$. Les concentrations M sont: (1) $[I_2] 5,53 \cdot 10^{-4}$, (2) $2 1,89 \cdot 10^{-4}$, (3) $[I_2] 5,53 \cdot 10^{-4}$ et $2 1,89 \cdot 10^{-4}$, (4) courbe d'absorption calculée du complexe.

(ATS) est leur activité sur la peroxydase thyroïdienne [2, 20-22]; il est par conséquent nécessaire d'étudier l'action des dérivés synthétisés sur cette enzyme. Cependant, l'extraction, la purification de la TPO est longue, difficile et conduit à de petites quantités dont l'activité enzymatique peut se révéler très faible. Pour avoir des résultats comparatifs, nous utilisons la lactoperoxydase (LPO) qui peut être obtenue commercialement sous forme de lot homogène. Il a été montré que la LPO constitue un bon modèle, ayant des propriétés similaires à celles de la TPO [23, 24].

Pour chaque composé nous avons tracé la courbe représentant l'activité inhibitrice sur la lactoperoxydase en fonction du logarithme de la concentration de substance induite dans le milieu réactionnel: $H_2O_2/LPO/ABTS$ (acide 2,2'-bis-azino-3-éthyl-benzothiazoline sulfonique).

Le point de la courbe, pour lequel on observe 50% d'inhibition de l'activité enzymatique, permet de calculer la concentration inhibitrice 50 (CI_{50}) (fig 4). Tous les résultats sont exprimés en concentrations molaires (tableau V).

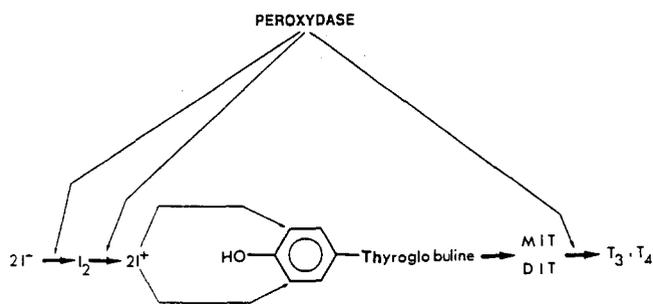


Fig 3. Niveaux d'action de la peroxydase dans la synthèse des hormones thyroïdiennes.

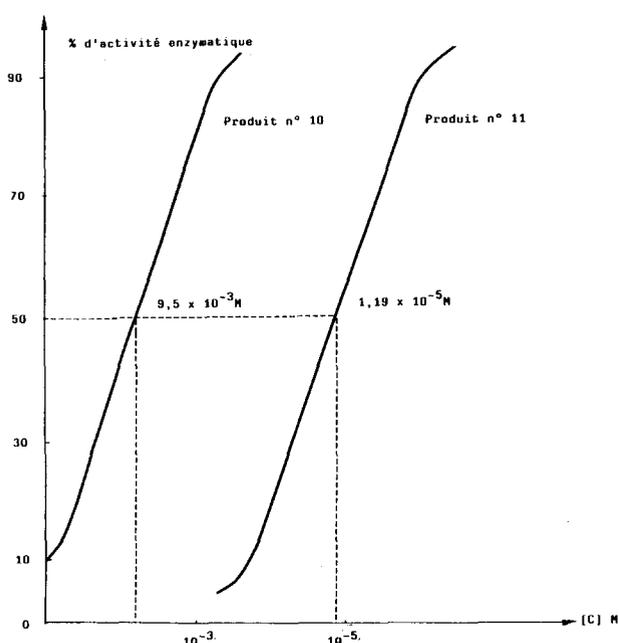


Fig 4. Activité inhibitrice de certains composés sur la lactoperoxydase. Détermination de CI_{50} [ABTS] = 1,4 mM; Lactoperoxydase = 1,33 $\mu g \cdot ml^{-1}$; H_2O_2 = 1,15 mM; tampon phosphate = 66,6 mM.

La plupart des composés synthétisés pourraient intervenir sur la fonction thyroïdienne en inhibant la peroxydase. Nous pouvons comparer la valeur de cette inhibition par rapport à celle du méthimazole dont la CI_{50} est égale à $2,46 \cdot 10^{-5} M$ [8]. Le composé **3** interfère sur le métabolisme thyroïdien bien qu'il active la peroxydase. Enfin pour le produit **6**, il n'a pas été possible d'obtenir un résultat en raison de son insolubilité dans le tampon utilisé.

Donc, en ce qui concerne les dérivés du triazole et du méthyltriazole, l'inhibition, lorsqu'elle existe, est assez forte de 10^{-4} à $10^{-5} M$, sauf pour les dérivés **10**

et **15** (composés pyrazinique et dinitré de la pyridine) où l'inhibition est de $10^{-3} M$. La présence d'une NO_2 sur le noyau pyridinique substitué sur le MT (composé **3**) fait que cette molécule active la LPO, par contre le MMT substitué par une pyridine nitrée en position 3 (composé **13**) inhibe la LPO ($CI_{50} = 7,3 \cdot 10^{-5} M$).

Étude sur le rat

Par administration gastrique des drogues à des rats, il est possible de contrôler l'activité antithyroïdienne *in vivo*, après avoir envisagé leur action sur les deux cibles, iode et TPO.

Nous avons pu contrôler cette action par plusieurs paramètres: poids de l'animal, poids de la thyroïde, dosage des hormones thyroïdiennes et histologie des glandes thyroïdes (tableau VI). Ces résultats sont importants pour deux raisons: ils permettent de confirmer l'éventuelle activité indiquée par l'un des tests sur l'iode et/ou sur la peroxydase, et ils montrent l'activité du produit *in vivo* qui peut être différente de l'activité *in vitro*.

Ce sont les dérivés **2**, **16**, **17** qui provoquent la plus forte baisse des T_4 et le degré d'activité de la glande le plus grand (+++). Il y a donc ici correspondance. Par contre, avec le dérivé **7**, on a une activité forte et un abaissement moyen de la T_4 .

Notons que le composé **3** qui active l'enzyme a néanmoins une activité antithyroïdienne.

Par cette étude sur le rat, nous avons pu contrôler par examen de la formule sanguine de chacun des rats traités qu'il n'y avait pas de modification, par conséquent pas d'agranulocytose, or le méthimazole peut quelquefois provoquer cette anomalie hématologique. Cependant l'étude ayant été menée sur trois semaines seulement, nous ne pouvons pas en déduire de conclusions définitives.

En ce qui concerne ces tests, d'une façon générale, nous pouvons dire que la détermination du pouvoir électrodonneur constitue une bonne présomption d'activité, mais que l'inhibition enzymatique ne coïncide pas forcément avec ce pouvoir. En effet l'inactivation enzymatique peut se faire par action sur le fer du hème mais aussi sur la globine [25]. Lorsqu'un composé agit sur l'iode et est inactif sur l'enzyme, la complexation étant une réaction réversible [7], l'activité *in vivo* sera de moyenne ou de faible intensité. C'est pourquoi pour les produits dont le pouvoir électrodonneur et/ou la CI_{50} semble intéressants, il est indispensable de réaliser une étude *in vivo*.

En ce qui concerne l'étude sur le rat, nous pouvons dire que les résultats les plus fiables sont donnés par l'étude histologique. En effet le taux des hormones peut être modifié par les produits qui interviennent sur la 5-désiodase empêchant ainsi la transformation de la

Tableau VI. Résultats de l'expérimentation animale. Les doses sont de 50 mg/kg par jour. L'expérimentation dure 4 semaines. Les dosages de T₄ sont déterminés par immunoenzymologie. Type d'activité: — pas d'activité, repos fonctionnel de la glande; ±: très faible; +: faible; ++: moyenne; +++: forte; ++++: très forte.

Composés	Dosages hormonaux		Poids des glandes mg/100 g de poids corporel	Histologie	
	T3 (ng/ml)	T4 (µg/dl)		Épithélium	Activité de la glande
Témoin	2,12 ± 0,32	3,35 ± 0,58	6,2 ± 0,09	Cubique	- à +
1	1,94 ± 0,21 ^a	3,29 ± 0,82 ^b	8,03 ± 1,58	Cylindrocubique	+
2	0,86 ± 0,24 ^b	1,58 ± 0,39 ^a	25,44 ± 4,12	Cylindrique	+++
3	2,08 ± 0,18 ^a	3,33 ± 0,32 ^a	6,3 ± 0,13	Cylindrocubique	+
4	2,36 ± 0,22 ^a	3,60 ± 0,42 ^b	6,3 ± 0,28	Cubique	±
5	2,02 ± 0,20 ^a	2,96 ± 0,22 ^a	8,65 ± 2,05	Cubique	+
6	1,54 ± 0,16 ^a	2,28 ± 0,40 ^a	5,95 ± 0,93	Cylindrique	++
7	1,38 ± 0,18 ^a	2,34 ± 0,49 ^b	15,05 ± 4,03	Cylindrique	++ à +++
8	1,58 ± 0,20 ^a	2,42 ± 0,36 ^a	13,18 ± 4,62	Cylindrique	++
9	1,88 ± 0,21 ^a	3,02 ± 0,30 ^b	8,64 ± 2,76	Cylindrocubique	+
10	1,94 ± 0,18 ^a	2,91 ± 0,28 ^a	8,48 ± 3,02	Cylindrocubique	+
11	1,42 ± 0,24 ^a	2,62 ± 0,38 ^a	13,80 ± 3,21	Cylindrique	++
12	1,21 ± 0,22 ^a	2,34 ± 0,44 ^a	13,34 ± 5,05	Cylindrique	++
13	1,74 ± 0,26 ^a	3,32 ± 0,50 ^b	6,26 ± 1,96	Cylindrocubique	+ à ++
14	1,68 ± 0,24 ^a	2,72 ± 0,38 ^a	10,18 ± 2,14	Cylindrocubique	+ à ++
15	2,04 ± 0,20 ^a	3,60 ± 0,10 ^a	6,60 ± 1,07	Cylindrocubique	+
16	0,98 ± 0,09 ^a	1,46 ± 0,40 ^a	32,15 ± 5,88	Cylindrique	+++
17	0,96 ± 0,10 ^a	1,02 ± 0,49 ^b	21,6 ± 2,12	Cylindrique	+++
18	1,42 ± 0,16 ^a	2,18 ± 0,28 ^a	15,86 ± 3,44	Cylindrique	++
KSCN	1,96 ± 0,34 ^a	3,16 ± 0,18 ^a	9,28 ± 1,14	Cylindrocubique	+
MMI	0,62 ± 0,11 ^a	0,31 ± 0,04 ^a	24,75 ± 1,63	Cylindrique	++++

Calcul des différences entre les valeurs trouvées des témoins et de chacun des produits testés (Student's test). ^aP < 0,001; ^bP < 0,01.

T₄ en T₃. La T₄ peut être normale ou élevée sans que cela corresponde à l'activité glandulaire. De même le poids de l'animal et le poids de la glande ne constituent pas des tests fidèles, en effet s'il y a une hypothyroïdie sévère, l'animal maigrit, s'il y a une hyperactivité avec excréation, la glande aura un volume diminué.

Conclusion

Après avoir considéré les résultats sur l'iode, sur la peroxydase, sur le rat (hormones et histologie) nous pouvons dire que le noyau triazole peut être retenu comme noyau de base pour un nouveau composé anti-thyroïdien et qu'il peut remplacer l'imidazole surtout s'il se confirme qu'il n'engendre pas des anomalies hématologiques. Le mercaptotriazole et le mercapto-méthyltriazole conduisent l'un et l'autre à des produits antithyroïdiens. Le blocage du groupement SH, qui

peut être la cause d'effets secondaires, par une pyridine ou une diazine semble intéressant. Par contre, les substitutions envisagées sur la pyridine et les diazines ne semblent pas apporter d'avantages puisque les dérivés les plus actifs (**2**, **7**, **11**, **12**, **16**) sont ceux où ces noyaux ne sont pas substitués. Seul le dérivé méthoxylé (**17**) de la pyridine du MMT est lui aussi très actif.

Protocoles expérimentaux

Chimie

Les points de fusion sont mesurés sur un banc de Kofler. Les spectres IR sont réalisés en pastilles de KBr et sont enregistrés sur un appareil Beckman IR 4500. Les spectres RMN sont effectués sur un appareil Bruker 200 MHz à la Faculté de pharmacie de Marseille; les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane utilisé comme référence interne.

Les procédés de synthèse sont communs à plusieurs composés lorsque les substituants sont identiques, seul le composé de base est différent.

Méthode A: (2-pyridyl)-3-thio-1,2,4-triazole (1)

On mélange intimement des quantités équimoléculaires de 2-chloropyridine et de 3-mercapto-1,2,4-triazole. On porte à la température de fusion 220°C, puis on laisse augmenter spontanément la température. Le mélange se solidifie. Après refroidissement, le résidu est repris par de l'éthanol dilué (éthanol/eau 70/30, v/v), la solution est filtrée puis neutralisée par addition d'une solution aqueuse de NaHCO₃ à 5%. Le produit précipité est recristallisé dans un mélange eau/éthanol (3:1). F = 214°C, Rdt = 58%, IR (cm⁻¹) = 3080 (vCH arom), 3133–2513 (vNH), 1558–1584 (v noyau pyridine), 1525–1470 (v C=C), 1500 (v C=N). RMN ¹H (DMSO-d₆): 8,4 (m, 1H, H₃ pyridine); 7,2 (m, 1H, H₄ pyridine); 7,1 (m, 1H, H₅ pyridine); 7 (m, 1H, H₆ pyridine); 6,8 (d, 1H, H₅ triazole); 6 (d, 1H, proton NH). Méthode utilisée pour les composés 1 et 2.

Méthode B: (3-nitro-2-pyridyl)-3-thio-1,2,4-triazole (3)

On chauffe à reflux, pendant 2 h, 0,01 mol de 2-chloro-3-nitropyridine avec 0,01 mol de sel sodique de 3-mercapto-1,2,4-triazole dissous dans 30 ml d'éthanol. On dilue par un excès d'eau. Le produit précipite. Il est recristallisé dans un mélange eau/éthanol (3:1). F = 217°C, Rdt = 51%; IR (cm⁻¹) = 3139–3070 (v CH arom), 2836–2629 (v NH), 1558 (v s noyau pyridine), 1507 (v aNO₂), 1340 (v sNO₂), 1480 (v C=N). RMN ¹H (DMSO-d₆): 8,4 (m, 1H, H₄ pyridine); 7,6 (m, 1H, H₆ pyridine); 8 (m, 1H, H₅ pyridine); 6 (d, 1H, proton NH); 6,8 (d, 1H, H₅ triazole). Méthode utilisée pour les composés 3, 4, 13, 14.

Méthode C: (3,5-dinitro-2-pyridyl)-3-thio-1,2,4-triazole (5)

On mélange une solution chloroformique à 10% de 2-chloro-3,5-dinitropyridine avec une quantité équimoléculaire de MT en solution à 10% dans le chloroforme, la réaction démarre spontanément. Après 1/4 d'heure de contact CHCl₃ est évaporé et le résidu est repris par l'éthanol dilué (éthanol/eau, 70/30, v/v). On neutralise par NaHCO₃. Le produit précipite. F = 204°C, Rdt = 56,71%, IR (cm⁻¹): 3102 (v CH arom), 1512 (v NO₂), 1585–1516 (v CH pyridine), 1500 (v C=N), 1339 (v sNO₂). RMN ¹H (DMSO-d₆): 9 (d, 1H, H₄ pyridine); 8 (d, 1H, H₆ pyridine); 6 (d, 1H, proton NH); 6,8 (d, 1H, H₅ triazole). Méthode utilisée pour les composés 5 et 15.

Méthode D: (3-carboxy-2-pyridyl)-3-thio-1,2,4-triazole (6)

Dans un bécher maintenu dans un bain de glace, on prépare une solution éthanolique de 0,02 mol d'éthylate de sodium. Dans cette solution on introduit 0,01 mol d'acide 2-chloro pyridino-carboxylique et 0,01 mol de MT. Après une agitation douce pendant 10 min, on évapore à sec. Le résidu de couleur blanche est repris par 5 ml de propylène glycol, qui est ensuite chauffé à la température de reflux pendant 10 h sous agitation vigoureuse. Après dilution par 40 ml de solution de soude normale chaude, on filtre. Le filtrat est amené à pH 4 par addition HCl concentré. Le produit cristallise. F = 210°C, Rdt = 10%, IR (cm⁻¹): 3137 (v CH arom), 2500–3000 (γ OH), 1671 (v C=N), 1680–1250 (v C=O), 1584–1558 (v noyau pyridine) RMN ¹H (DMSO-d₆): 9,2 (s, 1H, H de l'acide); 8,4 (m, 1H, H₄ pyridine); 7,8 (m, 1H, H₅ pyridine); 7,6 (m, 1H, H₆ pyridine); 6 (d, 1H, proton NH); 6,8 (d, 1H, H₅ triazole).

Méthode E: 2-pyrimidyl-3-thio-1,2,4-triazole (7)

On prépare le sel sodique de mercapto-triazole en mélangeant 0,02 mol de thiol avec 0,022 mol de soude (soit 22 ml de soude

1 N). On agite pendant 10 min, on évapore puis on ajoute 0,02 mol de sel sodique du thiol dans 30 ml d'octanol. Cette suspension est placée dans un ballon où on ajoute alors 0,02 mol de 2-chloropyrimidine. Le ballon est muni d'une colonne réfrigérante, le tout est placé sous agitation constante et chauffé 2 h à température de reflux. Après refroidissement rapide, on ajoute un excès d'eau ce qui provoque la précipitation du produit.

Après filtration et lavage à l'eau distillée, le produit est recristallisé dans le mélange eau:méthanol (3:1). F = 145°C, Rdt = 30%, IR (cm⁻¹): 3138 (v CH arom), 3073 (v NH), 1500 (v C=N). RMN ¹H (DMSO-d₆): 8,4 (d, 2H, H₃ et H₄ pyrimidine); 7,4 (s, 1H, H₆ pyrimidine); 6,8 (d, 1H, H₅ triazole); 6 (d, 1H, proton NH). Méthode utilisée aussi pour les composés 10 et 16.

Méthode F: (6-methoxy-2-pyridyl)-3-thio-1,2,4-triazole (8)

Même procédé que E, mais on laisse le mélange sous agitation pendant 12 h avant de chauffer 3 h à la température de reflux. F = 164°C, Rdt = 30%, IR (cm⁻¹): 3137 (v CH arom), 1670 (v C=N), 1480 (v CH₃). RMN ¹H (DMSO-d₆): 4 (s, 3H, H OCH₃); 8,1 (d, 1H, H₃ pyridine); 8 (d, 1H, H₄ pyridine); 7,4 (s, 1H, H₅ pyridine); 6 (d, 1H, proton NH); 6,8 (d, 1H, H₅ triazole). Méthode utilisée également pour le composé 17.

Méthode G: (6-hydroxy-2-pyridyl)-3-thio-1,2,4-triazole (9)

Même procédé que E mais, après filtration, le résidu recueilli sur le filtre est mis en suspension dans 300 ml de chloroforme. On filtre de nouveau. Le filtrat chloroformique est évaporé à sec sous vide, et le résidu est recristallisé dans le mélange méthanol/eau (1:4). F = 128°C, Rdt = 25%. IR (cm⁻¹): 3135 (v CH arom), 1670 (v C=N), 3800–3200 (v OH), 1500 (v C=N), 1400 (v OH). RMN ¹H (DMSO-d₆): 7,2 (d, 1H, H₃ pyridine); 7,4 (d, 1H, H₄ pyridine); 7 (s, 1H, H₆ pyridine); 8 (s, 1H, proton de OH); 6,8 (d, 1H, H₅ triazole); 6 (d, 1H, proton NH). Méthode utilisée aussi pour le composé 18.

Méthode H: 2-pyridyl-3-thio-1 méthyl-1,2,4-triazole (11)

On reprend le même protocole opératoire que celui décrit en A. Après refroidissement et neutralisation de la solution filtrée par NaHCO₃, le produit se sépare sous forme de gouttelettes huileuses qui ne cristallisent pas. On extrait alors par le chloroforme, puis on deshydrate par du sulfate de sodium anhydre et on évapore à sec. Le résidu est repris par le mélange éther éthylique/éthanol absolu (1:1) et par barbotage de HCl gazeux dans la solution, on provoque la précipitation du chlorhydrate correspondant. F = 162°C, Rdt = 54%, IR (cm⁻¹): 3047 (v CH arom), 2956–2919, 2858 (v CH₃), 1500 (v C=N). RMN ¹H (DMSO-d₆): 8,4 (m, 1H, H₃ pyridine); 8 (m, 1H, H₄ pyridine); 7,8 (m, 1H, H₅ pyridine); 7,4 (m, 1H, H₆ triazole); 6,8 (d, 1H, H₅ triazole); 3,6 (s, 3H, H de CH₃ en 1). Même procédé de synthèse pour le produit 12.

Pharmacologie

Détermination du pouvoir électrodonneur

Le protocole d'expérimentation est celui habituellement utilisé [15].

L'iode est un produit suprapur bisublimé Merck 4743. Il est utilisé sans aucune purification et conservé à l'obscurité dans un dessiccateur contenant de l'anhydride phosphorique.

Les donneurs sont les produits de synthèse, leur pureté a été contrôlée par HPLC (appareil Waters France, modèle 510 colonne Nucléosil C18 diamètre 5, phase mobile 50% CH₃CN, 50% NaH₂PO₄, 0,01 M, pH 3).

Les solvants sont des produits Merck pour spectroscopie UV: chloroforme (réf 2447) et tétrachlorure de carbone (réf 2209). On utilise l'un ou l'autre des solvants suivant la solubilité des produits testés.

Les composés de base, mercaptotriazole et mercaptométhyl triazole sont des produits Lancaster (Strasbourg, France).

Inhibition de la lactoperoxydase

L'activité de la peroxydase est déterminée à pH 7 et à une température de 20°C, en mesurant la vitesse de l'oxydation de l'acide 2,2'-bis-azino-3-éthyl-benzothiazoline sulfonique (ABTS) par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Pour la mesure des activités enzymatiques, nous avons utilisé la lactoperoxydase (Sigma Rd L 2005).

Le spectre d'absorption de l'ABTS oxydé présente une bande caractéristique à 411 nm, longueur d'onde à laquelle nous mesurons les activités enzymatiques.

L'action du médicament sur l'enzyme est étudiée en mesurant la vitesse initiale de la réaction catalysée, pour différentes concentrations de médicaments.

Pour chaque concentration de produit, nous réalisons un essai cinétique avec la molécule étudiée, et un essai de référence sans cette molécule. Chacun de ces essais nous fournit une vitesse initiale qui nous permet de calculer le pourcentage d'inhibition ou d'activation de la peroxydase par le produit, selon la formule suivante :

$$\frac{VO_x - VO}{VO} = \text{pourcentage d'inhibition ou d'activation}$$

où VO_x = vitesse initiale avec le médicament étudié et

VO = vitesse initiale sans médicament.

Expérimentation animale

L'expérimentation est réalisée sur des groupes de 10 rats mâles de souche Wistar pesant environ 200 g. Après 21 jours de régime normoiodé (10,75 µg d'iode par jour et par rat), les animaux reçoivent pendant 30 jours 50 mg/kg par jour de produit à tester par intubation gastrique sous forme de suspensions à 5% dans la gomme arabique. À la fin du traitement, les rats sont sacrifiés et après prélèvement, les thyroïdes soigneusement débarrassées de tous les tissus annexes, sont pesées avec précision. Le poids relatif de la thyroïde est alors évalué par rapport au poids corporel initial. De même, le sang est prélevé en vue de la détermination du taux d'hormones thyroïdiennes par polarisation de fluorescence (Abbott, Rungis, France) [26]. Les résultats rendent compte de la variation de ces paramètres par rapport au groupe témoin qui n'a reçu, pendant la même période, aucune médication mais un placebo constitué par le véhicule mucilagineux.

L'examen histologique de la glande porte sur l'évaluation de la colloïde intracellulaire et sur l'aspect de l'épithélium glandulaire (cubique ou cylindrique) et un score de + à ++++ est attribué en fonction du degré d'activité de la glande [7].

Un groupe d'animaux reçoit dans les mêmes conditions 50 mg/kg par jour de méthimazole et permet de comparer l'activité des nouveaux dérivés à celle d'un antithyroïdien de référence.

Examen hématologique

La numération des leucocytes, la formule sanguine sont déterminées avec un appareil H₁ (Technicon, France).

Références

- Engler H, Taurog A, Luthy C, Dorris ML (1983) *Endocrinology* 112, 86-95
- Taurog A (1976) *Endocrinology* 98, 1031-1046
- Marchant B, Lees FH, Alexander WD (1978) *Pharmac Ther* 3, 305-348
- Sitar DS, Thornhill DP (1972) *J Pharmacol Exp Ther* 183, 440-448
- Delarge J, Thunus L, Beckers C, Ghys A, Deneff J, Jamouille JC (1984) *Eur J Med Chem* 19, 559-586
- Dupont L, Didiberg O (1981) *Bull Soc Chim Belg* 90, 905-913
- Raby C, Lagorce JF, Jambut-Absil AC, Buxeraud J, Catanzano G (1990) *Endocrinology* 126, 1683-1691
- Buxeraud J, Absil AC, Claude J, Raby C, Catanzano G, Beck C (1985) *Eur J Med Chem* 20, 43-51
- Buxeraud J, Absil AC, Raby C (1984) *J Am Pharm Sci* 70, 1687-1690
- Magnusson RP, Taurog A, Dorris ML (1984) *J Biol Chem* 259, 13783-13790
- Ericson LE (1983) *J Endocrinol Invest* 6, 311-324
- Ofverholm T, Ericson LE (1984) *Endocrinology* 114, 827-835
- Eklom R (1981) *Mol Cel Endocrinol* 24, 141-163
- Raby C, Buxeraud J (1980) *Eur J Med Chem* 15, 425-430
- Lang RP (1962) *J Am Chem Soc* 84, 1185-1192
- Nash CP (1960) *J Phys Chem* 64, 950-953
- Benesi HA, Hildebrand JH (1949) *J Am Chem Soc* 71, 2703-2707
- Scott RL (1956) *Rec Trav Chim* 75, 787-789
- Jambut-Absil AC, Buxeraud J, Lagorce JF, Raby C (1987) *Int J Pharm* 35, 129-137
- Maloof F, Smith S, Soodak M (1962) *Mech React Sulfur Compounds* 4, 61-68
- Morris DR, Hager P (1966) *J Biol Chem* 241, 3582-3589
- Nagashima T, Taurog A, Riesco G (1983) *Endocrinology* 113, 362-370
- Taurog A, Dorris ML, Lamas J (1974) *Endocrinology* 94, 1286-1294
- Oktaki S, Nakagawa H, Nakamura S, Nakamura M, Yamazaki J (1985) *J Biol Chem* 260, 441-448
- Nunez J, Pommier J, Deme D, Virion A, Michot JL, Courtin F (1981) *Ann Endocrinol* 42, 439-445
- Symons RG, Vining RF (1985) *Clin Chem* 31, 1342-1348