Eur. J. Med. Chem. **22** (1987) 403—409
© Elsevier, Paris

Article original

Synthèse et étude parasitologique de triazino-1,2,4[4,3-a] benzimidazoles

Ibrahima N'DIAYE[1], Joëlle MAYRARGUE[1], Claude COMBET FARNOUX[1], Marcel MIOCQUE[1]* et Philippe GAYRAL[2]**

[1]*Laboratoire de Chimie Organique, CNRS UA496, et*
[2]*Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, 5, rue J.-B.-Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France*

(Reçu le 8 janvier 1987, accepté le 26 mars 1987)

Résumé — Une méthode de synthèse originale est développée pour accéder à des triazino-1,2,4[4,3-a]benzimidazoles par action d'hydrazines diversement substituées sur des chloro-2 benzimidazoles substitués en 1 par une chaîne fonctionnalisée. Des homologues nitrés sont également préparés et leur isomérie est précisée par l'étude de spectrographie RMN. L'activité anti-parasitaire a été évaluée *(Trichomonas vaginalis, Entamoeba histolytica, Hymenolepis nana, Nippostrongylus brasiliensis)*.

Summary — **Synthesis and parasitological study of 1,2,4-triazino[4,3-a]benzimidazoles.** *An original synthetic pathway to obtain 1,2,4-triazino[4,3-a]benzimidazoles is described. It involves the condensation of hydrazines with 2-chloro benzimidazoles N-substituted with a propargyl or acetonyl chain. Aromatic nitroderivatives have also been prepared, whose isomeric structure is elucidated by ^1H and ^{13}C NMR. The evaluation of anti-parasitic activities has been performed* (Trichomonas vaginalis, Entamoeba histolytica, Hymenolepis nana, Nippostrongylus brasiliensis).

1,2,4-triazino[4,3-a]benzimidazoles / nitrotriazinobenzimidazoles / anti-parasitic activity

Introduction

L'étude de la relation structure—activité anthelminthique dans la série du benzimidazole nous a amenés à rechercher l'influence de la création d'un troisième cycle, de type triazinique, par annélation du benzimidazole. En effet, il avait déjà été constaté que la formation d'un troisième cycle pyrazinique ou pyridinique [1] entraînait le maintien ou un léger accroissement de l'activité anti-parasitaire manifestée par les précurseurs bicycliques. Nous avons, par ailleurs, introduit un pharmacophore nitré sur le cycle benzénique, la bibliographie nous ayant montré [2] que la plupart des dérivés du benzimidazole utilisés en thérapeutique anti-parasitaire possèdent un substituant en position 5.

Pour accéder aux triazino-1,2,4[4,3-a]benzimidazoles nous avons retenu une voie d'accès originale partant de chloro-2 benzimidazoles substitués en 1 par un reste propargyle ou cyanométhyle.

Les homologues nitrés, non encore décrits, ont été obtenus à partir des nitro-5 et nitro-6 chloro-2 benzimidazoles substitués en 1 par un reste oxo-2 propyle ou éthoxycarbonylméthyle [3, 4].

Douze des produits préparés au cours de ce travail ont été évalués sur quatre espèces de parasites: deux protozoaires, *Entamoeba histolytica* et *Trichomonas vaginalis in vitro*, et deux helminthes, *Hymenolepis nana* chez la souris et les larves infectantes de *Nippostrongylus brasiliensis in vitro*.

Chimie

Synthèses à partir du propargyl-1 chloro-2 benzimidazole

L'hydrazine, la méthylhydrazine et l'acétylhydrazine ont été opposées au propargyl-1 chloro-2 benzimidazole **1** [5] selon des protocoles adaptés à chaque cas pour conduire aux triazino-1,2,4[4,3-a]benzimidazoles **2** et **3**. Les conditions requises par la réaction avec l'acétylhydrazine sont cause d'une désacétylation et mènent au composé **2** (Schéma 1).

Synthèse à partir du cyanométhyl-1 chloro-2 benzimidazole

Seule des hydrazines essayées, la *N*-méthylhydrazine a donné lieu à la réaction attendue: substitution au niveau du

**Auteur à qui la correspondance doit être adressée.*
***Avec la collaboration technique de Marie-Noëlle Kerhir.*

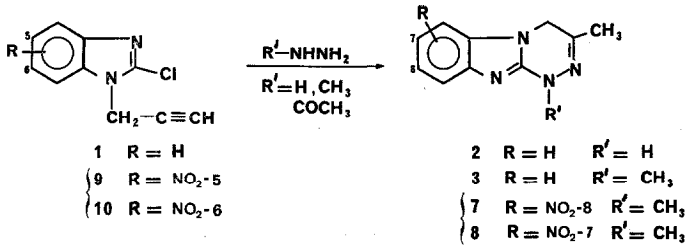


Schéma 1.

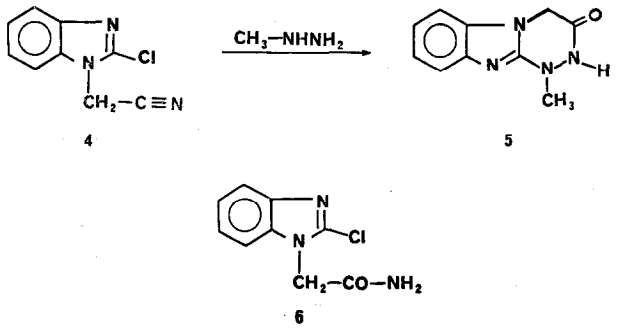


Schéma 2.

carbone 2 suivie de cyclisation (Schéma 2).

L'obtention de **5** au lieu de la structure amidinique attendue et correspondant à **5** s'explique par l'hydrolyse de l'imine intermédiaire; en effet nous avons vérifié que l'amide **6** ne réagit pas avec la méthylhydrazine pour former **5**.

Synthèses à partir des nitro-5 et nitro-6 chloro-2 (oxo-2 propyl)-1 benzimidazoles

Les nitro-7 et nitro-8 dihydro-1,4 diméthyl-1,3 triazino-1,2,4-[4,3-a]benzimidazoles (**7** et **8**) sont obtenus par action de la méthylhydrazine sur les nitro-5 et nitro-6 chloro-2 propargyl-1 benzimidazoles (**9** et **10**) mais cette voie d'accès ne permet pas de séparer les isomères nitrés.

En raison de l'activité anti-parasitaire manifestée par le mélange des isomères **7** et **8**, nous avons alors cherché à en séparer les constituants en utilisant une autre méthode de synthèse. Pour cela nous avons préparé et isolé les nitro-5 et nitro-6 chloro-2 (oxo-2 propyl)-1 benzimidazoles selon le Schéma 3 et les avons fait réagir avec les hydrazines.

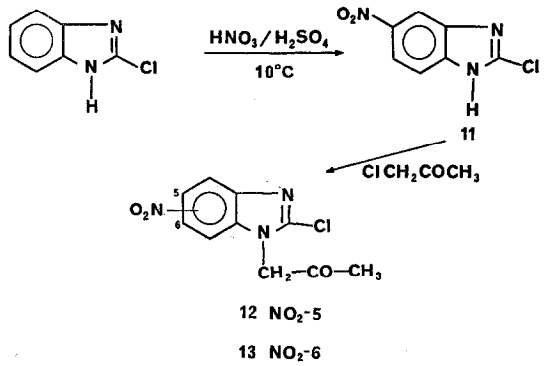


Schéma 3.

Réactions avec l'hydrazine et la méthylhydrazine

Les isomères **12** et **13** traités séparément par l'hydrazine et la méthylhydrazine conduisent respectivement aux composés **7**, **14** et **8**, **15** (Schéma 4).

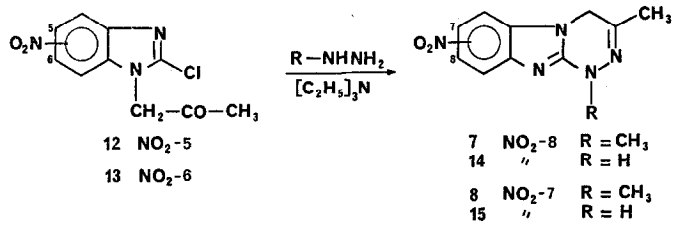


Schéma 4.

Réactions avec l'acétylhydrazine

La réaction de l'acétylhydrazine sur les dérivés propargylés **1**, **9** et **10** ne nous ayant pas permis d'obtenir le triazino-benzimidazole *N*-acétylé attendu, nous avons repris la réaction avec les cétones **12** et **13**.

A chaud, dans le diméthylformamide (DMF) et en l'absence de base, on obtient dans les deux cas, un mélange de produits dont l'isolement n'a pu être réalisé (Schéma 5).

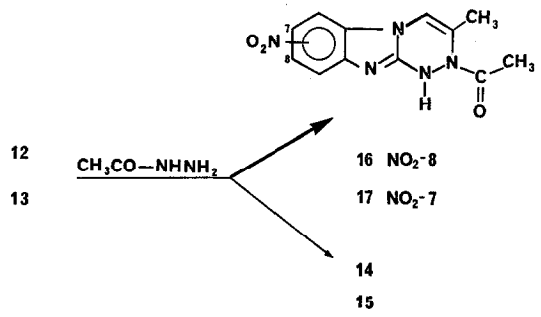


Schéma 5.

Les produits ont été identifiés grâce à l'étude détaillée de leurs spectres de RMN ^1H (250 MHz) et RMN ^{13}C (20 MHz). Dans les deux réactions, le dihydro-1,2 triazino-benzimidazole dont le squelette n'a pas encore été décrit à notre connaissance est obtenu de façon très majoritaire (> 80%). Les isomères **14** et **15** doivent se former au prix d'un processus de désacétylation thermique décrit plus haut.

Synthèses à partir des nitro-5 et nitro-6 chloro-2 éthoxy-carbonylméthyl-1 benzimidazoles

Nous avons cherché à préparer les homologues nitrés de **5** en faisant réagir la méthylhydrazine sur les nitro-5 et nitro-6 chloro-2 éthoxycarbonylméthyl-1 benzimidazoles.

La réaction mène aux dérivés cycliques attendus (Schéma 6) mais l'isolement des deux isomères n'a pu être réalisé.

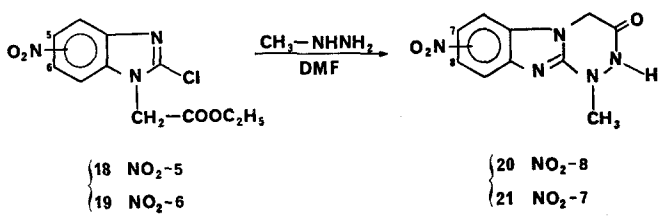


Schéma 6.

Discussion

Les triazinobenzimidazoles nitrés

Nous avons préparé ces composés pour deux raisons: 1) le but de notre étude étant l'accès à des molécules antiparasitaires, l'introduction d'un pharmacophore NO_2 était de grand intérêt; 2) dans un travail conduit précédemment dans le laboratoire sur la cyclisation des aminométhyl-2 propargyl-1 benzimidazoles [6], il avait été constaté que leurs dérivés nitrés ne se cyclisaient pas. Nous avons recherché si cette impossibilité se retrouvait ici.

La structure des dérivés nitrés a été établie grâce à une étude détaillée de leurs spectres de RMN ^1H et ^{13}C

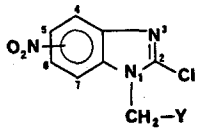
En effet, la bibliographie montre que la position d'un substituant nitré en 5 ou 6 sur le noyau benzénique des dérivés du benzimidazole peut être déterminée à l'aide des déplacements chimiques en RMN des hydrogènes et des carbones des sommets 4 et 7.

L. Pappalardo, J. Elguero et A. Fruchier ont montré [7] que le proton benzénique le plus déblindé des alkyl-1 benzimidazoles est généralement le proton situé sur le carbone 4.

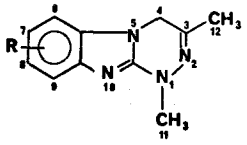
De plus, du fait du déblindage provoqué par un groupement NO_2 sur le proton situé en *ortho*, on constate que la différence de déplacement H_4—H_7 dans le cas d'un isomère nitré en position 5 est deux fois plus importante que celle H_7—H_4 observée pour l'isomère nitré en position 6.

Une constatation analogue peut être faite dans le cas des produits **9** et **10**, **18** et **19**, et **7** et **8**, dont les spectres ont été enregistrés dans le même solvant ($CDCl_3$) que celui utilisé par des auteurs cités ci-dessus (voir Tableau I): **9** ΔH_4—H_7 = 1,07 ppm; **10** ΔH_7—H_4 = 0,7 ppm; **18** ΔH_4—H_7 = 1,15 ppm; **19** ΔH_7—H_4 = 0,43 ppm; **7** ΔH_9—H_6 = 1,3 ppm; **8** ΔH_6—H_9 = 0,5 ppm.

Tableau I.



N°		Y	RMN ^1H δppm				RMN ^{13}C δppm			
			H_4	H_5	H_6	H_7	C_4	C_5	C_6	C_7
9	NO_2-5	—C≡CH	8,57		8,25	7,5				
10	NO_2-6	—C≡CH	7,7	8,20		8,40				
12*	NO_2-5	—$COCH_3$	8,55		8,3	7,82	114,8	143,4	118,6	111,4
13*	NO_2-6	—$COCH_3$	7,85	8,23		8,7	119,1	118,2	143,5	107,9
18	NO_2-5	—$COOC_2H_5$	8,6		8,27	7,45				
19	NO_2-6	—$COOC_2H_5$	7,82	8,30		8,25				



N°	R	RMN ^1H δppm				RMN ^{13}C δppm			
		H_6	H_7	H_8	H_9	C_6	C_7	C_8	C_9
3	H					107,8	122,4	120,2	117,0
7	NO_2-8	7,1	8,1		8,4	106,6	116,5		112,6
7*	NO_2-8	7,45	8,1		8,2				
8	NO_2-7	7,95		8,15	7,45	103,7		115,8	119,2
8*	NO_2-7	8,20		8,15	7,5				

Spectres enregistrés dans $CDCl_3$.
*Spectres enregistrés dans DMSO d_6.

L'application de ces règles permet ainsi d'identifier par RMN les dérivés nitro-5 et nitro-6 en série benzimidazole ou les dérivés nitro-7 et nitro-8 en série triazinobenzimidazole.

Les spectres des dérivés **12** et **13**, insolubles dans le chloroforme ont été réalisés dans le DMSO d_6, on observe alors un effet de solvant qui, ainsi que cela a été décrit [8] à propos du chloro-2 méthyl-1 benzimidazole, déblinde plus fortement le proton H_7 que le proton H_4.

Cette observation a été vérifiée au niveau des triazinobenzimidazoles **7** et **8** dont les spectres de RMN ^1H ont été réalisés dans les deux solvants.

L'étude des spectres de RMN ^{13}C du méthyl-1 benzimidazole et de ses homologues nitrés en position 5 et 6 [9] montre également que le carbone 4 résonne à champ plus faible que le carbone 7. La différence de déplacement est, par ailleurs, beaucoup plus grande (12 ppm) dans le cas du méthyl-1 nitro-6 benzimidazole que dans le cas du méthyl-1 nitro-5 benzimidazole (4,6 ppm), ce qui s'explique par les positions *ortho* ou *méta* des deux carbones par rapport au substituant nitré (blindage $\simeq$ 5 ppm du carbone en *ortho* et déblindage $\simeq$ 0,5 ppm du carbone en *méta*).

On observe effectivement: pour **12** $\Delta C_4—C_7$ = 3,4 ppm; **13** $\Delta C_4—C_7$ = 11,2 ppm; et pour **7** $\Delta C_9—C_6$ = 6 ppm; **8** $\Delta C_9—C_6$ = 15,5 ppm.

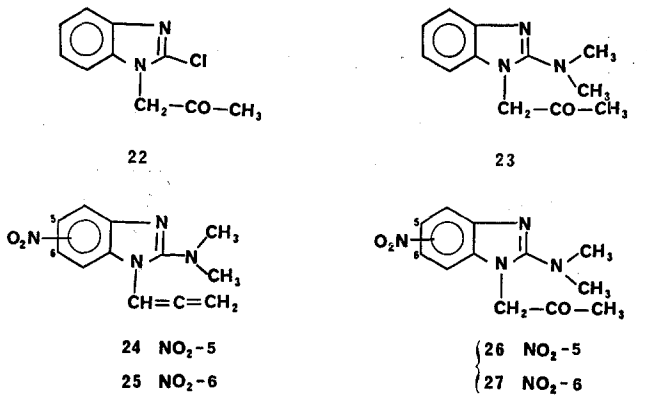


Schéma 7.

Pharmacologie anti-parasitaire

Un échantillon de 17 composés dont 12 décrits dans ce travail et 5 autres [10] (Schéma 7) ont été soumis aux essais d'activité anti-parasitaire.

Il s'agit de dérivés linéaires du benzimidazole ou de triazino-1,2,4[4,3-a]benzimidazoles, porteurs ou non du pharmacophore nitré au niveau du noyau benzénique.

Les produits ont été évalués sur les quatre parasites: *Entamoeba histolytica* et *Trichomonas vaginalis in vitro*, *Hymenolepis nana* chez la souris, et sur les larves infectantes de *Nippostrongylus brasiliensis in vitro*.

Les modes opératoires sont donnés dans les protocoles expérimentaux.

Résultats

L'ensemble des résultats obtenus est porté dans le Tableau II. Alors qu'aucune activité sur larves infectantes de *N. brasiliensis* n'est enregistrée à 24 h, au bout de 4 jours, 8 composés présentent une activité supérieure à 90% à la dose de 200 mg/l; 6 d'entre eux sont nitrés. A 50 mg/l, seuls 3 composés nitrés entraînent une mortalité des larves supérieure à 80% et les autres sont inactifs. L'activité sur *H. nana*

Tableau II. Activité anti-parasitaire des produits étudiés.

Produit	*E. histolytica* *CMI* (mg/l)	*T. vaginalis* *CMI* (mg/l)	*T. vaginalis* *CL*	*H. nana* % de souris déparasitées	*N. brasiliensis* % de mortalité des larves infectantes mg/l — 24 h			*N. brasiliensis* mg/l — 4 jours		
					200	50	10	200	50	10
Métronidazole	1,25— 2,5	1,25— 2,5								
18/19	> 100	> 100		0	0	0	0	100	13	0
22	10—100	8— 10	10—20	0	0	0	0	100	10	2
23	100	> 100		0	0	0	0	91	9	8
24	10—100	10—100		0	39	0	0	100	86	6
25	10—100	10—100		0	0	0	0	100	86	9
26/27	10—100	10—100		0	0	—	—	26	—	—
2	> 100	> 100		0	0	—	—	—	—	—
3	> 100	> 100		0	0	0	—	55	10	—
7/8	10—100	4	10—20	20	17	0	0	100	60	6
7	10—100	10—100		0	0	0	—	32	15	—
8	10—100	10—100		0	0	0	0	94	82	22
5	10—100	10—100		0	0	—	—	1	—	—
12	> 100	> 100		0	0	0	0	96	32	0
13	> 100	> 100		0	31	0	0	96	43	6
14	> 100	10—100		0	3	—	—	25	—	—
15	> 100	> 100		0	0	—	—	4	—	—
20/21	> 100	10—100		0	45	0	—	44	9	—

est inexistante à l'exception d'une légère activité décelable pour le mélange **7/8**. Par contre ces produits ont une activité assez générale sur *E. histolytica* et *T. vaginalis*. En particulier, sur ce dernier parasite, les *CMI* et les *CL* de deux produits, le **22** et le mélange **7/8** les situent à un très bon niveau, voisin du métronidazole pris ici comme référence.

Discussion

L'exploitation de ces résultats suggère quelques commentaires: les activités sur les helminthes sont faibles ou nulles. Si l'on compare l'activité d'autres benzimidazoles comme le flubendazole, le mébendazole ou l'albendazole qui sont efficaces sur ce modèle avec les larves infectantes de *N. brasiliensis* au bout de 4 jours à des concentrations inférieures à 0,01 mg/l (C. Bories et P. Gayral, communication personnelle), on constate que cette série chimique est de 5000—10 000 fois moins active. En outre, la nitration a un effet favorable sur l'activité puisqu'à 50 mg/l, les 3 composés encore actifs à plus de 80% possèdent un groupement NO_2.

Les activités observées sur *T. vaginalis* et *E. histolytica* permettent de remarquer que les structures tricycliques ne se signalent pas par une activité plus élevée. On constate néanmoins que les composés **5** et **7/8** présentent une activité non négligeable. En outre, l'introduction de substituants NO_2 dans les molécules essayées n'entraîne que dans un cas, un accroissement significatif d'activité et en effet le **7/8** est nettement plus actif que le **3**.

Encore est-il surprenant de remarquer que les isomères **7** et **8**, essayés séparément montrent une activité bien inférieure à celle du mélange initial.

Conclusion

Cette nouvelle série dans les benzimidazoles n'a répondu que partiellement à l'espoir qu'on lui portait, à savoir obtenir des produits polyvalents à large spectre d'action. Partant de l'activité anthelminthique du noyau benzimidazole, il aurait été intéressant d'obtenir une activité protozoocide par fixation de groupements nitrés ou de triazines.

Seul, un composé possède cette polyvalence sans être nitré, il s'agit du **22**. Toutefois, son activité comparée à celle des benzimidazoles de référence n'est pas suffisante mais sa structure est un point de départ pour une pharmacomodulation visant à obtenir de meilleures activités.

Protocoles expérimentaux

Chimie

Les analyses pondérales élémentaires effectuées sur appareil Perkin—Elmer 240* ont donné des résultats conformes aux normes habituelles. Les points de fusion, non corrigés, ont été déterminés au banc de Köfler ou sur Mettler FP 51. Les spectres IR ont été enregistrés sur Perkin—Elmer 117. Les spectres de RMN ^1H ont été enregistrés sur des spectromètres Varian T 60, Varian EM 90 ou Bruker AM 250 et les spectres de RMN ^{13}C sur Varian CFT 20 à partir de solutions dans le DMSO d_6, $CDCl_3$ ou CD_3COOD. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au tétraméthylsilane pris comme référence interne*.

*Chloro-2 propargyl-1 benzimidazoles **1**, **9** et **10***

Dans un flacon tricol de 250 ml muni d'un réfrigérant, d'une agitation magnétique et d'une ampoule à brome, on dissout 0,05 mol de chloro-2 benzimidazole ou de chloro-2 nitro-5 benzimidazole dans 130 ml de tétrahydrofuranne (THF) anhydre. Au mélange refroidi vers 10°C, on ajoute avec précaution 0,05 mol d'hydrure de sodium. Après 10 min d'agitation, on ajoute goutte à goutte 0,055 mol de bromure de propargyle. Le mélange est ensuite agité sous reflux pendant 2 h. Après refroidissement, on ajoute 30 ml de méthanol, puis on évapore les solvants sous pression réduite. Le résidu repris dans 800 ml d'eau abandonne le produit brut qui est filtré et lavé à l'eau avant d'être purifié par recristallisation dans l'hexane [5].

La purification du mélange des isomères **9** et **10** se fait par chromatographie sur colonne de silice avec le mélange chloroforme—éther (8,5/1,5) comme solvant d'élution.

1 (80%, F = 96,5°C). RMN ^1H ($CDCl_3$): 2,35 (t, J = 3 Hz, ≡ C—H); 4,9 (d, J = 3 Hz, CH_2); 7,3 (m, H_5, H_6 et H_7); 7,65 (m, H_4).

9 et **10** (66%). **9** RMN ^1H ($CDCl_3$): 2,45 (t, J = 2 Hz, C≡H); 5,03 (d, J = 2 Hz, CH_2); 7,5 (d, J_1 = 6 Hz, H_7); 8,25 (dd, J_1 = 6 Hz, J_2 = 1,5 Hz, H_6); 8,57 (d, J_2 = 1,5 Hz, H_4).

10 RMN ^1H ($CDCl_3$): 2,45 (t, J = 2 Hz, ≡C—H); 5,03 (d, J = 2 Hz, CH_2); 7,7 (d, J_1 = 6 Hz, H_4); 8,2 (dd, J_1 = 6 Hz, J_2 = 1,5 Hz, H_5); 8,4 (d, J_2 = 1,5 Hz, H_7).

*Dihydro-1,4 méthyl-3 triazino-1,2,4[4,3-a]benzimidazole **2**, dihydro-1,4 diméthyl-1,3 triazino-1,2,4[4,3-a]benzimidazole **3***

Dans un flacon de 100 ml muni d'un réfrigérant et d'une agitation magnétique, on dissout 0,01 mol de propargyl-1 chloro-2 benzimidazole dans 20 ml de DMF.

Après avoir versé goutte à goutte 0,02 mol d'hydrate d'hydrazine ou de méthylhydrazine sur la solution, on ajoute quelques gouttes de soude concentrée (12 N), puis le mélange est agité vers 140°C pendant 6 h.

Après refroidissement, dans la réaction avec l'hydrazine, un précipité blanc se dépose. La précipitation est complétée en ajoutant de l'eau au mélange. Le produit solide est filtré, lavé au méthanol puis recristallisé dans un mélange DMF—H_2O (50/50).

2 (48%, F = 295°C). RMN ^1H (CD_3COOD): 2,2 (s, CH_3); 4,8 (s, CH_2); 7,35—7,7 (m, 4 protons aromatiques); 11,25 (s, NH). RMN ^{13}C (CD_3COOD): 20,9 (C_{11}); 43,5 (C_4); 110,5 (C_6); 114,2 (C_9); 124,4 et 125,8 (C_7 et C_8); 130,0 (C_{5a}); 131,2 (C_{9a}); 145,4 (C_3); 160,2 (C_{10a}).

Dans la réaction avec la méthylhydrazine, après évaporation du DMF presque à sec, le produit précipité par addition d'eau est filtré, lavé à l'eau et recristallisé dans un mélange DMF—H_2O (25/75).

3 (71%, F = 135°C). RMN ^1H ($CDCl_3$): 2,1 (s, CH_3); 3,7 (s, CH_3); 4,65 (s, CH_2); 7,1—7,8 (m, 4 protons aromatiques). RMN ^{13}C ($CDCl_3$): 20,8 (C_{12}); 38,8 (C_{11}); 43,5 (C_4); 107,8 (C_6); 117,0 (C_9); 120,2 et 122,8 (C_7 et C_8); 132,3 (C_{5a}); 137,5 (C_{9a}); 142,1 (C_3); 161,8 (C_{10a}).

*Chloro-2 cyanométhyl-1 benzimidazole **4***

Dans un flacon à trois tubulures, on introduit 0,06 mol (9,15 g) de chloro-2 benzimidazole et 80 ml de triéthylamine. Le chloroacétonitrile (0,065 mol) est ajouté goutte à goutte à la suspension agitée à 90°C. Après 10 min de réaction, il y a apparition d'une phase limpide de triéthylamine, et d'une phase huileuse un peu trouble qui contient le produit alkylé. On maintient l'agitation pendant 15 min à 80°C. Après refroidissement, la phase huileuse cristallise, l'excès de triéthylamine est récupéré par décantation et le produit cristallisé est repris par l'eau et filtré après 1 h, puis lavé à l'eau, séché et recristallisé dans l'eau. Il est important de bien laver lors de la filtration pour enlever toutes les traces de triéthylamine susceptibles de favoriser l'hydrolyse de la fonction nitrile au moment de la recristallisation. Rdt = 71%;

*Nous remercions M^lle S. Mairesse-Lebrun qui en a assumé la charge.

*Nous remercions M^me J. Mahuteau qui les a établis et qui nous a aidés par de fréquentes discussions concernant leur interprétation.

F = 162°C. RMN ^{1}H (DMSO d_6): 5,75 (s, CH_2); 7,45 (m, H_5 et H_6); 7,75 (m, H_4 et H_7).

Dihydro-1,4 méthyl-1 triazino-1,2,4[4,3-a]benzimidazol-3 one **5**

On place dans un autoclave une suspension de 0,015 mol de cyanométhyl-1 chloro-2 benzimidazole dans 50 ml de méthanol puis 0,03 mol de méthylhydrazine.

Le mélange est chauffé à 170°C pendant 1 h. Après refroidissement, le produit est filtré, lavé et recristallisé avec du méthanol. Rdt = 36%; F = 243°C. RMN ^{1}H (CD_3COOD): 3,32 (s, CH_3); 4,65 (s, CH_2); 7,1—7,3 (m, 4 protons aromatiques); 11,20 (s, NH). RMN ^{13}C (CD_3-COOD): 37,2 (C_{11}); 74,0 (C_4); 111,0 et 111,2 (C_6 et C_9); 122,4 et 124,9 (C_7 et C_8); 129,8 (C_{5a}); 132,2 (C_{9a}); 157,0 (C_{10a}); 178,2 (C_3). IR (KBr): 3620, 3400, 1640 cm^{-1}.

Chloro-2 nitro-5 benzimidazole **11**

Dans un flacon à trois tubulures muni d'un réfrigérant, d'un dispositif d'agitation, d'un thermomètre et d'une ampoule à brome, on introduit 5 g (0,033 mol) de chloro-2 benzimidazole [11] et 20 ml d'acide nitrique (d = 1,38). On verse goutte à goutte 20 ml d'acide sulfurique (d = 1,83) dans le mélange refroidi par un bain de glace. Après l'addition de l'acide sulfurique, le chloro-2 benzimidazole se dissout et on maintient l'agitation autour de 10°C pendant 1 h. Le milieu est ensuite versé dans un mélange eau—glace. Le précipité est filtré, lavé à l'eau, puis recristallisé dans un mélange éthanol—eau (3/1). Rdt = 70%; F = 223°C. RMN ^{1}H (DMSO d_6): 7,7 (d, J_1 = 4,5 Hz, H_7); 8,15 (dd, J_1 = 4,5 Hz, J_2 = 1,5 Hz, H_6); 8,4 (d, J_2 = 1,5 Hz, H_4); 9,55 (s élargi, NH).

Nitro-5 et nitro-6 chloro-2 (oxo-2 propyl)-1 benzimidazoles **12** *et* **13**

Dans un bicol de 250 ml muni d'un refrigérant, d'une agitation magnétique et d'une ampoule à brome, on dissout 0,019 mol de chloro-2 nitro-5 benzimidazole dans 100 ml d'éthanol. On ajoute 0,019 mol de carbonate acide de sodium dissous dans 10 ml d'eau. Après quelques min d'agitation à froid, on ajoute 0,021 mol de chloracétone puis le mélange est agité sous reflux pendant 2 h. Après refroidissement, on évapore l'excès d'éthanol puis le résidu est traité par un mélange eau—glace. Le précipité est filtré, lavé à l'eau.

La purification et la séparation des isomères se font par chromatographie sur colonne de silice avec l'acétate d'éthyle comme solvant d'élution.

12 (30%; F = 178°C). RMN ^{1}H (DMSO d_6): 2,37 (s, CH_3); 5,52 (s, CH_2); 7,82 (d, J_1 = 8,5 Hz, H_7); 8,3 (dd, J_1 = 8,5 Hz, J_2 = 2 Hz, H_6); 8,55 (d, J_2 = 2 Hz, H_4). RMN ^{13}C (DMSO d_6): 27,0 ($C_{3'}$); 53,5 ($C_{1'}$); 111,4 (C_7); 114,8 (C_4); 118,7 (C_6); 139,8 et 140,1 (C_{3a} et C_{7a}); 143,4 (C_5); 144,6 (C_2); 200,8 ($C_{2'}$).

13 (24%; F = 205°C). RMN ^{1}H (DMSO d_6): 2,4 (s, CH_3); 5,6 (s, CH_2); 7,85 (d, J_1 = 9 Hz, H_4); 8,23 (dd, J_1 = 9 Hz, J_2 = 2 Hz, H_5); 8,7 (d, J_2 = 2 Hz, H_7). RMN ^{13}C (DMSO d_6): 27,1 ($C_{3'}$); 53,6 ($C_{1'}$); 107,9 (C_7); 118,2 (C_5); 119,1 (C_4); 135,1 (C_{7a}); 143,5 (C_6); 145,4 et 145,8 (C_2 et C_{3a}); 200,8 ($C_{2'}$).

Dihydro-1,4 diméthyl-1,3 nitro-8 et nitro-7 triazino-1,2,4[4,3-a]benzimidazoles **7** *et* **8**

Dans un flacon de 100 ml muni d'un réfrigérant et d'une agitation magnétique, on dissout 0,0025 mol de nitro-5 ou nitro-6 chloro-2 (oxo-2 propyl)-1 benzimidazole dans 20 ml de DMF. Après avoir versé goutte à goutte 0,005 mol de méthylhydrazine, on ajoute quelques gouttes de triéthylamine puis le mélange est agité vers 140°C pendant 2 h.

Après refroidissement, le mélange est versé sur la glace ce qui donne un précipité qui est filtré et lavé à l'eau. La purification des isomères se fait par chromatographie sur colonne de silice avec l'acétate d'éthyle comme solvant d'élution.

7 (41%; F = 194°C). RMN ^{1}H ($CDCl_3$): 2,13 (s, CH_3); 4,62 (s, CH_2); 3,60 (s, CH_3); 7,1 (d, J_1 = 8 Hz, H_6); 8,1 (dd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 2 Hz, H_7); 8,4 (d, J_2 = 2 Hz, H_9). RMN ^{13}C ($CDCl_3$): 20,7 (C_{12}); 38,6 (C_{11}); 43,7 (C_4); 106,6 (C_6); 112,6 (C_9); 116,5 (C_7).

8 (48%; F = 233°C). RMN ^{1}H ($CDCl_3$): 2,13 (s, CH_3); 4,66 (s, CH_2); 3,62 (s, CH_3); 7,45 (d, J_1 = 8 Hz, H_9); 7,95 (d, J_2 = 2 Hz, H_6); 8,15 (dd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 2 Hz, H_8). RMN ^{13}C ($CDCl_3$): 20,8 (C_{12}); 38,6 (C_{11}); 43,6 (C_4); 103,7 (C_6); 115,8 (C_8); 119,2 (C_9).

En raison de la faible solubilité des produits **7** et **8** nous n'avons pu déterminer avec certitude sur les spectres de RMN ^{13}C, les singulets correspondant aux carbones quaternaires.

Dihydro-1,4 méthyl-3 nitro-8 et nitro-7 triazino-1,2,4[4,3-a]benzimidazoles ***14*** *et* ***15***

Dans un flacon de 100 ml muni d'un réfrigérant et d'une agitation magnétique, on dissout 0,0025 mol de nitro-5 ou nitro-6 chloro-2 (oxo-2 propyl)-1 benzimidazole dans 20 ml de DMF. Après avoir versé goutte à goutte 0,005 mol d'hydrazine, on ajoute quelques gouttes de triéthylamine puis le mélange est agité vers 140°C pendant 2 h 30.

Après refroidissement le mélange est versé dans la glace, ce qui donne un précipité qui est filtré, lavé à l'eau puis recristallisé.

14: DMF—H_2O (50/50); **15**: DMF—H_2O (75/25).

14 (60%; F > 300°C). RMN ^{1}H (DMSO d_6): 2,15 (s, CH_3); 4,9 (s, CH_2); 7,5 (d, J_1 = 8 Hz, H_6); 8,1 (dd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 2 Hz, H_7); 8,17 (d, J_2 = 2 Hz, H_9); 11,4 (s, NH).

15 (68%; F > 300°C). Insoluble dans tous les solvants usuels.

Dihydro-1,2 acétyl-2 méthyl-3 nitro-8 et nitro-7 triazino-1,2,4[4,3-a]-benzimidazoles ***16*** *et* ***17***

Dans un flacon de 100 ml muni d'un réfrigérant et d'une agitation magnétique, on dissout 0,0025 mol de nitro-5 ou nitro-6 chloro-2 (oxo-2 propyl)-1 benzimidazole dans 20 ml de DMF. On ajoute 0,005 mol d'acétylhydrazine puis le mélange est agité vers 140°C pendant 3 h.

Après refroidissement le mélange est versé sur la glace ce qui donne un précipité qui est filtré, lavé à l'eau et au méthanol puis recristallisé: **16**: DMF—H_2O (50/50); **17**: DMF—H_2O (80/20).

Dans chacun des cas, toutes les tentatives de séparation pour éliminer le produit minoritaire ont échoué du fait de la très faible solubilité des mélanges dans les solvants usuels. Cependant, les intégrations des spectres de RMN du proton (250 MHz) nous permettent de déterminer les proportions approximatives de chacun des produits.

A partir du nitro-5 chloro-2 (oxo-2 propyl)-1 benzimidazole on obtient 80% de **16** (Rdt = 37%) et pour le nitro-6 on obtient 95% de **17** (Rdt = 51%).

16 RMN ^{1}H (DMSO d_6): 2,13 (s, CH_3); 2,17 (s, CH_3); 7,71 (s, H_4); 7,96 (d, J_1 = 8,5 Hz, H_6); 8,1 (dd, J_1 = 8,5 Hz, J_2 = 2 Hz, H_7); 8,35 (d, J_2 = 2 Hz, H_9); 11,29 (s, NH). RMN ^{13}C (DMSO d_6): 9,1 (CH_3—C=); 20,3 (CH_3—C=O); 102,2 (C_6); 110,7 (C_9); 113,4 et 114,1 (C_4 et C_7); 131,5 (C_3); 140,5 (C_{5a}); 142,9 (C_8); 145,6 (C_{9a}); 152,3 (C_{10a}); 169,7 (>C=O).

17 RMN ^{1}H (DMSO d_6): 2,13 (s, CH_3); 2,18 (s, CH_3); 7,6 (d, J_1 = 9 Hz, H_9); 7,82 (s, H_4); 8,13 (dd, J_1 = 9 Hz, J_2 = 2,5 Hz, H_8); 8,9 (d, J_2 = 2,5 Hz, H_6); 11,33 (s, NH). RMN ^{13}C (DMSO d_6): 9,0 (CH_3—C=); 20,3 (CH_3—C=O); 103,1 (C_6); 108,0 (C_4); 117,0 (C_8); 118,3 (C_9); 126,5 (C_3); 130,5 (C_{5a}); 138,8 (C_7); 151,5 (C_{9a}); 152,8 (C_{10a}); 169,5 (>C=O).

Chloro-2 éthoxycarbonylméthyl-1 nitro-5 et nitro-6 benzimidazoles ***18*** *et* ***19***

Dans un bicol de 250 ml muni d'un réfrigérant, d'une agitation magnétique et d'une ampoule à brome, on dissout 0,017 mol de chloro-2 nitro-5 benzimidazole dans 100 ml d'éthanol. On ajoute 0,017 mol de carbonate acide de sodium dissous dans 10 ml d'eau. Après quelques min d'agitation à froid, on ajoute 0,0255 mol de bromoacétate d'éthyle puis le mélange est agité sous reflux pendant 1 h 30. Après refroidissement, on évapore l'excès d'éthanol puis le résidu est traité par un mélange eau—glace. Le pH de la solution est ramené vers 8 avec une solution d'ammoniaque diluée. Le précipité qui se dépose lentement est filtré puis lavé à l'eau.

La purification du mélange des isomères se fait par chromatographie sur colonne de silice avec l'acétate d'éthyle comme solvant d'élution. Rdt = 77%. Les deux isomères sont représentés en pourcentage voisin de 50% dans le mélange.

18 RMN ^{1}H ($CDCl_3$): 1,3 (t, CH_3); 4,35 (q, CH_2); 5,05 (s, CH_2); 7,45 (d, J_1 = 9 Hz, H_7); 8,27 (dd, J_1 = 9 Hz, J_2 = 2 Hz, H_6); 8,6 (d, J_2 = 2 Hz, H_4).

19 RMN ^{1}H ($CDCl_3$): 1,3 (t, CH_3); 4,35 (q, CH_2); 5,05 (s, CH_2); 7,82 (d, J_1 = 9 Hz, H_4); 8,30 (dd, J_1 = 9 Hz, J_2 = 2 Hz, H_5); 8,25 (d, J_2 = 2 Hz, H_7).

Dihydro-1,4 méthyl-1 nitro-8 et nitro-7 triazino-1,2,4[4,3-a]benzimidazol-3 (2H) ones ***20*** *et* ***21***

Dans un flacon de 100 ml muni d'un réfrigérant et d'une agitation magnétique, on dissout 0,0065 mol de chloro-2 éthoxycarbonylméthyl-1

nitro-5 et nitro-6 benzimidazole dans 25 ml de DMF. Après avoir versé goutte à goutte 0,013 mol de méthylhydrazine, on ajoute quelques gouttes de triéthylamine puis le mélange est agité vers 140°C pendant 2 h.

Après refroidissement, on évapore l'excès de DMF et le produit précipité par l'eau est filtré, lavé à l'eau puis recristallisé dans le minimum de DMF (Rdt = 61%).

Toutes les tentatives de séparation des isomères ont échoué.

20 RMN ^{1}H (DMSO d_6): 3,42 (s, CH_3); 4,85 (s, CH_2); 7,55 (d, J_1 = 8 Hz, H_6); 8,1 (dd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 1,5 Hz, H_7); 8,15 (d, J_2 = 1,5 Hz, H_9).

21 RMN ^{1}H (DMSO d_6): 3,4 (s, CH_3); 4,85 (s, CH_2); 7,40 (d, J_1 = 8 Hz, H_9); 8,15 (dd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 1,5 Hz, H_8); 8,30 (d, J_2 = 1,5 Hz, H_6).

Parasitologie

Essais protozoocides [*12, 13*]

Essai in vitro *sur* E. histolytica *souche Rahman.* L'activité anti-amibienne est évaluée *in vitro* en milieu de Pavlova—Jones, ensemencé par 10 000 amibes/ml. Les composés sont dissous dans l'eau distillée ou dans le 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).*

Essai in vitro *sur* T. vaginalis, *souche V.* Le milieu liquide utilisé est celui au thioglycolate enrichi de 5% de sérum de cheval, ensemencé par 30 000 parasites/ml. On détermine la *CMI* de la même façon que pour *E. histolytica* après subculture à 48 h. La concentration létale *(CL)* est déterminée dans les mêmes conditions sur une culture de 48 h.

Essais anthelminthiques [*12—14*]

Essai sur H. nana *chez la souris.* L'activité sur Cestodes est déterminée *in vivo* chez la souris femelle parasitée depuis 19 jours. Le traitement est fait par administration d'une suspension par voie orale à 200 mg/kg en une seule fois. On détermine le pourcentage de souris déparasitées le lendemain du traitement, après purgation.

Essai in vitro *sur larves infectantes L3 de* N. brasiliensis. Celles-ci sont obtenues par coproculture parasitaire pendant 14 jours à 27°C. Elles sont décontaminées par lavages successifs et mises en survie dans un milieu de culture pour cellules de mammifères, constitué de RPMI 1640, de sérum fœtal de veau à 10% et d'antibiotiques usuels. L'incubation se fait à l'obscurité, à 37°C, sous une atmosphère air + CO_2 pendant 4 jours. Dans un puits d'un volume de 2,8 ml d'une plaque Falcon de 24 puits, sont introduits 1,5 ml de milieu, 20 larves infectantes et la solution dans l'eau ou le DMSO, du produit à tester sous un volume de 10 μl.

La vitalité des larves est notée au bout de 24 h (J2) et de 4 jours (J5). Pour chaque plaque, deux puits sont utilisés par concentration et 4 puits témoins 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 des témoins.

Références

1 Bergerat I., Galons H., Combet Farnoux C., Miocque M. & Gayral P. (1984) *Eur. J. Med. Chem.* 19, 475—476

2 McFarland J. W. (1972) *Prog. Drug Res.* Birkhaüser Verlag, Basel, 16, pp. 157

3 Povstyanoi M. V., Kochergin P. M., Logachev E. V., Yakubovskii E. A., Akimov A. V. & Kruglenko V. P. (1976) *Chem. Heterocycl. Compds.* (Angl. Transl.) p. 1180

4 Beilis Y. I., Povstyanoi M. V., Logachev E. V. & Shikarev A. V. (1976) *J. Chem. USSR* 46, 420

5 Klynev N. A., Krasovskii A. N., Sheinkman A. K., Krasovskii I. A. & Zhil'nikov V. G. (1981) *J. Org. Chem. USSR* 17, 1555

6 Bergerat I. (1983) Thèse de Doctorat de 3e cycle, Université de Paris XI

7 Pappalardo L., Elguero J. & Fruchier A. (1975) *Ann. Quim.* 71, 598

8 Dembech P., Seconi G. & Vivarelli P. (1971) *J. Chem. Soc. (B)* 1670

9 Fruchier A., Pappalardo L. & Elguero J. (1980) *Ann. Quim.* 76, 79

10 N'Diaye I. (1986) Thèse de 3e Cycle, Faculté des Sciences, Orsay, France

11 Harrison D., Ralph J. T. & Smith A. C. B. (1963) *J. Chem. Soc.* 2930

12 Gayral P., Bourdais J., Lorre A. & Abenhaim D. (1978) *Eur. J. Med. Chem.* 13, 171—175

13 Karmouta M. G., Lafont O., Combet Farnoux C., Miocque M., Rigothier M. C., Louchon B. & Gayral P. (1980) *Eur. J. Med. Chem.* 15, 341—349

14 Brienne M. J., Jacques J. & Gayral P. (1981) *Eur. J. Med. Chem.* 16, 363—366