

Fonctionnalisation du méthyl-1 formyl-2 nitro-5 imidazole et recherche de propriétés antiparasitaires

P Vanelle¹, J Maldonado^{1*}, O Jentzer², MP Crozet², B Savornin³, F Delmas³,
M Gasquet³, P Timon-David³

¹Laboratoire de Chimie Organique, Faculté de Pharmacie de Marseille;

²Laboratoire de Chimie Organique B, CNRS UA 109, Faculté St Jérôme, 13397 Marseille Cedex 13;

³Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, 27, bd Jean Moulin, 13385 Marseille, Cedex 5, France

(Reçu le 24 janvier 1989; accepté le 26 septembre 1989)

Résumé — La recherche de nouveaux imidazoles pharmacologiquement actifs nous a conduits à fonctionnaliser le méthyl-1 formyl-2 nitro-5 imidazole dans des réactions classiques de synthèse organique: formation d'aldimines, réaction de Knoevenagel, formation d'ylidène-4 buténolide. Les composés ainsi préparés présentent d'intéressantes activités amoebicide, trichomonacide ou leishmanicide.

Summary — **Functional derivatives of 1-methyl 2-formyl 5-nitroimidazole. Evaluation of their antiparasitic activities.** New imidazole compounds with pharmacological activity were obtained after subjecting 1-methyl-2-formyl-5-nitroimidazole to classical organic reactions: aldimine production, Knoevenagel reaction, and 4-ylidenebutenolide production. Some of these compounds exhibit significant antiparasitic activities against amoebae, trichomonas and leishmania.

5-nitroimidazoles / antiparasitic agents / amoebicide activity / trichomonacide activity / leishmanicide activity

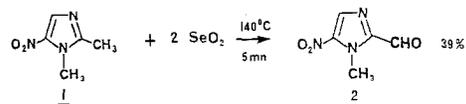
Introduction

Le méthyl-1 formyl-2 nitro-5 imidazole par sa fonction aldéhydique est un intermédiaire réactionnel très utilisé dans la synthèse de divers imidazoles pharmacologiquement actifs [1–4]. L'optimisation de l'oxydation du diméthyl-1,2 nitro-5 imidazole ou dimétridazole par le dioxyde de sélénium nous a conduits à envisager la préparation d'aldimines aromatiques, d'ylidène-4 buténolide et d'alkylidène malonate d'éthyle dérivés de nitro-5 imidazoles. L'activité protozoocide de ces composés a été testée sur *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* et deux espèces de leishmanies: *Leishmania infantum* et *Leishmania tropica*, comparativement à celle du métronidazole et de la pentamidine.

Chimie

L'oxydation du dimétridazole **1** en méthyl-1 formyl-2 nitro-5 imidazole **2** par le dioxyde de sélénium est

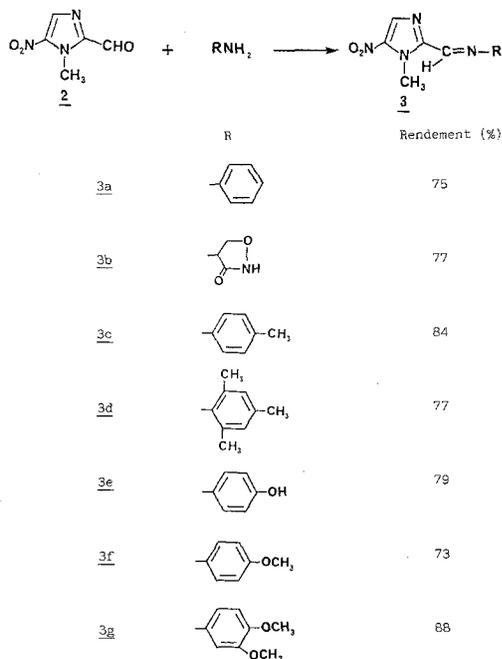
décrite [5]. Cependant, le rendement n'est pas mentionné et les conditions opératoires sont imprécises: la réaction est effectuée sans solvant à 140°C, température de fusion de **1** avec une quantité stoechiométrique d'oxydant. L'obtention de **2** est réalisée selon cette méthode qui présente l'avantage d'être rapidement exécutée, en utilisant 2 équivalents de dioxyde de sélénium et en maintenant la température à 140°C pendant 5 min, une température plus élevée et une durée de réaction plus longue facilitant la décarbonylation de l'aldéhyde.



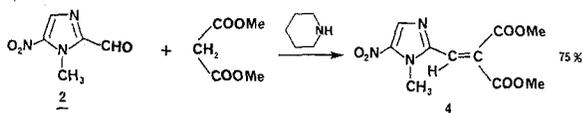
En faisant réagir **2** avec l'aniline à 0°C pendant une heure suivant la méthode de Tiollais [6], on obtient le méthyl-1 phényliminométhyl-2 nitro-5 imidazole **3a**. Cette réaction a été étendue à d'autres amines primaires en modifiant le mode opératoire: quantité

*Correspondance et tirés à part

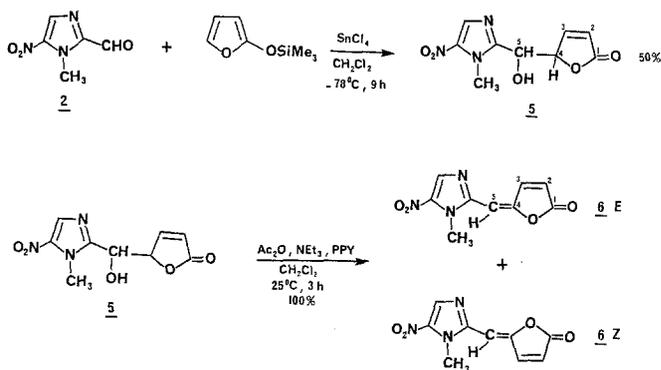
stoechiométrique de **2** et d'amine, dans le minimum d'éthanol absolu sous argon, pendant 24 h et à température ambiante.



Par la réaction classique de Knoevenagel [7], **2** se condense avec le malonate de méthyle en présence d'une quantité catalytique de pipéridine au reflux du benzène pendant 15 h pour fournir le (méthyl-1 nitro-5 imidazol-2 yl)-1 méthoxycarbonyl-2 acrylate de méthyle **4** avec un rendement de 75%:



Les relations structure-activité établies avec différents méthyl-1 alkylidène-méthyl-2 nitro-5 imidazoles ont permis de constater que les molécules les plus actives biologiquement ont leur plus haute orbitale moléculaire occupée (HOMO) très délocalisée [8, 9]. Dans le but de confirmer cette relation structure-activité, nous avons réalisé la synthèse d'ylidène-4 buténolide pour lequel la délocalisation du système π serait très importante. En utilisant la méthode d'Asaoka [10-13], le triméthylsiloxy-2 furanne en présence d'une quantité catalytique de chlorure d'étain IV, réagit avec **2** pour donner l'alcool **5**. Cet adduit traité par 2 à 3 équivalents d'anhydride acétique et de triéthylamine en présence d'une quantité catalytique de pyrrolidino-4 pyridine (PPY) conduit au méthyl-1 (butène-2 olide-4 ylidène-4 méthyl)-2 nitro-5 imidazole **6** quantitativement:



L'alcool **5** possédant deux carbones asymétriques, les deux couples de diastéréoisomères présents en proportions égales sont séparables par chromatographie sur colonne de gel de silice. La déshydratation a cependant été effectuée sur le mélange: la RMN du mélange brut indique deux isomères géométriques dans les proportions approximatives E/Z (en raison de leur faible solubilité) égales à 9/1, qui n'ont pu être isolés purs par chromatographie sur colonne.

Activité protozoicide

Nous avons évalué l'activité protozoicide des différents composés synthétisés sur *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* et deux espèces de leishmanies: *Leishmania infantum* et *Leishmania tropica*. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau I.

L'activité amoebicide est intéressante: le produit **3b** est le moins efficace avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) égale à 50 mg/l. Tous les autres dérivés ont une CMI comprise entre 5 et 25 mg/l et deux d'entre eux, le **3c** et le **3f** ont une activité amoebicide égale à celle de notre témoin métronidazole (CMI = 5 mg/l).

Les essais effectués sur *Trichomonas vaginalis* montrent une activité trichomonacide remarquable pour 2 produits: **4** et **6**. Avec une CMI = 0,05 mg/l, ils sont 10 fois plus actifs que le métronidazole (Flagyl).

Quant à l'activité leishmanicide, elle se retrouve uniquement pour le composé **6**, la CMI variant entre 15 et 25 mg/l selon l'espèce. Le témoin pentamidine présente également une CMI sur *Leishmania infantum* et *Leishmania tropica* égale à 15 mg/l.

Ces résultats confirment les relations structure-activité qui sont à la base de la synthèse du composé **6**: les produits les plus efficaces sont ceux dont la délocalisation du système π est la plus grande. Parmi les aldimines synthétisées, ce sont celles dont le noyau aromatique est le moins substitué qui présentent l'activité amoebicide la plus développée.

Tableau I. Évaluation *in vitro* d'activité protozoocide sur *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania infantum* et *Leishmania tropica*. CMI en mg/l.

Produits	<i>Trichomonas vaginalis</i>		<i>Leishmania</i>		
	<i>histolytica</i>	<i>vaginalis</i>	<i>L. infantum</i> ₁	<i>L. infantum</i> ₂	<i>L. tropica</i>
3a	25	50	>100	>100	>100
3b	50	100	>100	>100	>100
3c	5	100	>100	>100	>100
3d	25	100	>100	100	100
3e	10	100	100	100	100
3f	5	100	100	100	100
3g	10	100	>100	>100	>100
4	25	0,05	>100	>100	>100
5	10	100	>100	>100	>100
6	10	0,05	15	25	15
métroni- dazole	5	0,5			
penta- midine			15	15	15

Conclusion

Les dérivés synthétisés présentent une activité amoebicide, au moins égale à celle du métronidazole pour deux d'entre eux (3c et 3f).

Les produits 4 et 6 sont particulièrement actifs sur *Trichomonas vaginalis* (10 fois plus efficaces que le métronidazole pris comme référence).

Quant à l'activité leishmanicide, elle ne se retrouve que chez ce composé 6 avec une CMI égale à celle du témoin pentamidine (Lomidine).

Ce produit 6 paraît le plus intéressant de la série synthétisée, puisqu'il présente à la fois une activité amoebicide, trichomonacide et leishmanicide.

Protocoles expérimentaux

Chimie

Les points de fusion (F) sont déterminés en tubes capillaires sur un appareil de Büchi et ne sont pas corrigés. Les spectres de ¹H RMN sont enregistrés sur spectromètre Varian EM 360 (60 MHz) ou Varian XL 200 (200 MHz) et les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne. Les constantes de couplage J sont exprimées en Hertz. La multiplicité des signaux de résonance est indiquée par les abréviations: (s) singulet, (d) doublet,

(t) triplet, (q) quadruplet et (m) multiplet. Les spectres infra-rouge sont enregistrés sur spectrophotomètre Perkin-Elmer modèle 297 et sont réalisés à l'état solide (pastille de KBr). Les analyses élémentaires (C, H, N) sont effectuées au laboratoire d'analyses de l'École Supérieure de Chimie de Marseille et ont donné des résultats conformes aux normes habituelles ($\pm 0,4\%$ de la théorie). Les solvants sont séchés et purifiés par les méthodes usuelles. Les séparations par chromatographie liquide (CPL) sont réalisées sur colonne de silice Merck Kieselgel 60 (70–230 mesh ASTM). Les chromatographies sur couche mince (CCM) sont effectuées sur gel de silice 60 F 254, d'épaisseur 0,2 mm, déposé sur feuille d'aluminium (Merck).

Oxydation du diméthyl-1,2 nitro-5 imidazole

Méthyl-1 formyl-2 nitro-5 imidazole 2

Dans un ballon bicol de 100 ml équipé d'un thermomètre et d'un réfrigérant surmonté d'un tube desséchant à chlorure de calcium, on place 0,03 mol (4,23 g) de diméthyl-1,2 nitro-5 imidazole et 0,06 mol (6,66 g) de dioxyde de sélénium. Les deux solides sont mélangés et le ballon est plongé dans un bain d'huile à 140°C. Après 5 min d'agitation à 140°C, le mélange réactionnel est refroidi par un bain de glace, puis solubilisé dans 100 ml de chlorure de méthylène. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous vide. Après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec le mélange chloroforme-acétone (7/3), on isole 1,82 g de méthyl-1 formyl-2 nitro-5 imidazole 2 sous forme de cristaux jaunes, soit un rendement de 39%. Le dimétridazole n'ayant pas réagi, puis le méthyl-1 nitro-5 imidazole sont élués ensuite.

Solide jaune – F (hexane) = 91°C (litt F = 90–94°C [14]); RMN ¹H (CDCl₃) δ 4,34 (s, 3H, NCH₃); 8,06 (s, 1H, H imidazole); 9,90 (s, 1H, CHO).

Aldimines aromatiques

Méthyl-1 phényliminométhyl-2 nitro-5 imidazole 3a

À 0,02 mol (1,9 ml) d'aniline refroidie à 0°C, on ajoute lentement 0,004 mol (0,62 g) de méthyl-1 formyl-2 nitro-5 imidazole 2. Après 1 h d'agitation à cette température, sous atmosphère d'argon, le mélange réactionnel est repris au chlorure de méthylène puis lavé à l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et évaporée sous vide. Le méthyl-1 phényliminométhyl-2 nitro-5 imidazole 3a cristallise par addition d'éthanol. 0,70 g de cristaux blancs sont recueillis par filtration soit un rendement de 75%.

Solide blanc – F (éthanol absolu) = 128°C. IR (KBr) ν cm⁻¹: 1631 (C=N). RMN ¹H (CDCl₃) δ 4,53 (s, 3H, NCH₃); 7,33 (s, 5H, H aromatique); 8,06 (s, 1H, H imidazole); 8,53 (s, 1H, CH=N).

Les autres aldimines aromatiques sont préparées suivant le mode opératoire général suivant: un mélange de 0,01 mol (1,55 g) de méthyl-1 formyl-2 nitro-5 imidazole 2 et de 0,01 mol d'amine primaire est solubilisé dans le minimum d'éthanol absolu. Après agitation à température ambiante, sous atmosphère d'argon, pendant 24 h, l'éthanol est évaporé sous vide et l'aldimine purifiée par recristallisation à chaud dans l'éthanol absolu.

Méthyl-1 (isoxazolidinone-3 imino-4 méthyl)-2 nitro-5 imidazole 3b

Rendement: 77% (1,85 g). Solide orange – F (éthanol absolu) = 141°C. IR (KBr) ν cm⁻¹: 1649 (C=N). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 3,90 (s, 3H, NCH₃); 4,03–4,33 (m, 2H, CH₂); 4,66–5,33 (m, 2H, CH et NH); 7,87 (s, 1H, H imidazole); 8,07 (s, 1H, CH=N).

Méthyl-1 méthyl-4' phényliminométhyl-2 nitro-5 imidazole 3c
Rendement: 84% (2,05 g). Solide jaune – F (éthanol absolu) = 135–136°C. IR (KBr) ν cm⁻¹: 1623 (C=N). RMN ¹H (CDCl₃) δ 2,40 (s, 3H, CH₃); 4,53 (s, 3H, NCH₃); 7,23 (s, 4H, H aromatique); 8,10 (s, 1H, H imidazole); 8,57 (s, 1H, CH=N).

Méthyl-1 triméthyl 2', 4', 6' phényliminométhyl-2 nitro-5 imidazole 3d
Rendement: 77% (2,09 g). Solide jaune-orangé – F (éthanol absolu) = 53°C. IR (KBr) ν cm⁻¹: 1634 (C=N). RMN ¹H (CDCl₃) δ 2,20 (s, 6H, *o*-CH₃); 2,33 (s, 3H, *p*-CH₃); 4,60 (s, 3H, NCH₃); 6,97 (s large, 2H, H aromatique); 8,15 (s, 1H, H imidazole); 8,36 (s, 1H, CH=N).

Méthyl-1 hydroxy-4' phényliminométhyl-2 nitro-5 imidazole 3e
Rendement: 79% (1,94 g). Solide jaune – F (éthanol absolu) = 247–248°C. IR (KBr) ν cm⁻¹: 1614 (C=N). RMN ¹H DMSO-d₆ δ 4,38 (s, 3H, NCH₃); 6,87 (d, 2H, H aromatique CH=C-OH); 7,45 (d, 2H, H aromatique CH=C-N); 8,28 (s, 1H, H imidazole); 8,68 (s, 1H, CH=N); 9,73–10,06 (m, 1H, OH).

Méthyl-1 méthoxy-4' phényliminométhyl-2 nitro-5 imidazole 3f
Rendement: 73% (1,90 g). Solide jaune – F (éthanol absolu) = 131°C. IR (KBr) ν cm⁻¹: 1627 (C=N). RMN ¹H (CDCl₃) δ 3,87 (s, 3H, OCH₃); 4,57 (s, 3H, NCH₃); 7,02 (d, 2H, H aromatique CH=C-OCH₃); 7,41 (d, 2H, H aromatique CH=C-N); 8,17 (s, 1H, H imidazole); 8,65 (s, 1H, CH=N).

Méthyl-1 diméthoxy-3',4' phényliminométhyl-2 nitro-5 imidazole 3g
Rendement: 88% (2,55 g). Solide jaune-orangé – F (éthanol absolu) = 146°C. IR (KBr) ν cm⁻¹: 1628 (C=N). RMN ¹H (CDCl₃) δ 3,95 (s, 6H, OCH₃); 4,57 (s, 3H, NCH₃); 6,98 (s, 3H, H aromatique); 8,13 (s, 1H, H imidazole); 8,64 (s, 1H, CH=N).

(Méthyl-1 nitro-5 imidazol-2 yl)-1 méthoxycarbonyl-2 acrylate de méthyle 4
0,018 mol (2,38 g) de malonate de méthyle, 0,02 mol (3,10 g) de méthyl-1 formyl-2 nitro-5 imidazole 2, 1 ml de pipéridine et 10 ml de benzène sont introduits dans un ballon équipé d'une colonne de distillation azeotropique. Le mélange réactionnel est porté au reflux du benzène pendant 15 h. Après refroidissement, le benzène est évaporé sous vide et le résidu organique chromatographié sur colonne de gel de silice en éluant avec le mélange chloroforme-acétone (7/3). On obtient ainsi 4,03 g de (méthyl-1 nitro-5 imidazol-2 yl)-1 méthoxycarbonyl-2 acrylate de méthyle 4, soit un rendement de 75%.
Solide rose – F (éthanol absolu) = 138°C. IR (KBr) ν cm⁻¹: 1738, 1720 (C=O), 1636 (C=C). RMN ¹H (CDCl₃) δ 3,90 (s, 6H, OCH₃); 4,12 (s, 3H, NCH₃); 7,56 (s, 1H, H éthylénique); 8,10 (s, 1H, H imidazole).

Méthyl-1 [(butène-2 olide-4 yl-4)-1 hydroxy-1 méthyl]-2 nitro-5 imidazole 5
Dans un ballon tricol de 100 ml muni d'un thermomètre, d'un robinet surmonté d'un ballon d'argon et d'un septum, on dissout 0,015 mol (2,40 g) de méthyl-1 formyl-2 nitro-5 imidazole 2 dans 22 ml de chlorure de méthylène préalablement séché par élution sur une colonne de gel de silice. On ajoute à la seringue sous atmosphère d'argon, 0,018 mol (3 ml) de triméthylsiloxy-2 furanne à -50°C, puis 0,002 mol de chlorure d'étain IV (2 ml SnCl₄ 1 M dans CH₂Cl₂) à -78°C et le mélange réactionnel est agité à cette température pendant 9 h. Après addition de 20 ml d'une solution d'HCl 1 M, on laisse revenir à température ambiante. L'agitation est maintenue pendant une nuit. On récupère alors la phase organique et

on extrait 3 fois la phase aqueuse au chlorure de méthylène (10 ml). Après réunion des 2 phases organiques et séchage sur sulfate de magnésium, on évapore sous vide. On recueille 1,57 g d'une huile orange. La phase aqueuse est alcalinisée par une solution de carbonate de potassium et extraite 3 fois au chlorure de méthylène (10 ml). Après séchage et évaporation sous vide, on récupère 0,84 g de produits dont la CCM est identique à celle du résidu obtenu précédemment. Les deux fractions sont donc rassemblées et chromatographiées sur colonne de gel de silice en éluant avec le mélange chloroforme-acétone (7/3).

On isole ainsi, 0,35 g de chacun des 2 diastéréoisomères et 1,10 g du mélange des 2 isomères, soit un rendement global en alcool de 50,3% (1,80 g).

1^{er} diastéréoisomère: huile jaune orangée. R_f = 0,7 (chloroforme-acétone, 7/3). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 3,90 (s, 3H, NCH₃); 5,07 (m, 1H, H₅); 5,56 (m, 1H, H₄); 6,26 (dd, *J* = 6 Hz et *J* = 2 Hz, 1H, H₂); 6,40 (m, 1H, OH); 7,90 (dd, *J* = 6 Hz et *J* = 1,5 Hz, 1H, H₃); 8,03 (s, 1H, H imidazole).

2^e diastéréoisomère: solide blanc – F (toluène) = 141°C. R_f = 0,3 (chloroforme-acétone, 7/3). IR (KBr) ν cm⁻¹: 3289 (OH), 1825, 1792, 1754 (C=O), 1599 (C=C). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 3,90 (s, 3H, NCH₃); 5,00 (m, 1H, H₅); 5,56 (m, 1H, H₄); 6,26 (dd, *J* = 6 Hz et *J* = 2 Hz, 1H, H₂); 6,46 (m, 1H, OH); 7,66 (dd, *J* = 6 Hz et *J* = 1 Hz, 1H, H₃); 8,03 (s, 1H, H imidazole).

Méthyl-1 (butène-2 olide-4 ylidène-4 méthyl)-2 nitro-5 imidazole 6

Dans un ballon de 100 ml, on place 0,0041 mol (1 g) de méthyl-1 [(butène-2 olide-4 yl-4)-1 hydroxy-1 méthyl]-2 nitro-5 imidazole (mélange des 2 isomères), 0,0114 mol (1,156 g) de triéthylamine, 0,0084 mol (0,864 g) d'anhydride acétique, 20 ml de chlorure de méthylène et 0,0005 mol (0,075 g) de pyrrolidino-4 pyridine. On agite pendant 3 h à température ambiante. Il se forme un précipité. On récupère par filtration 0,45 g de cristaux verts qui sont lavés à l'eau. Le filtrat est évaporé. La triéthylamine, l'anhydride acétique mis en excès et l'acide acétique formé sont éliminés par lavage à l'eau. L'insoluble est filtré, relavé à l'eau. On recueille encore 0,43 g de cristaux verts soit un rendement de 100% (0,88 g).

Solide vert – F (éthanol absolu) = 195°C. IR (KBr) ν cm⁻¹: 1778, 1756 (C=O), 1641 (C=C).

Deux isomères sont visibles en CCM (éluant: chloroforme-acétone 7/3), et en RMN ¹H (200 MHz, acétone-d₆) en proportions approximatives E/Z = 9/1, mais n'ont pu être séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice.
RMN ¹H (200 MHz, acétone-d₆).

Isomère E: δ 3,99 (s, 3H, NCH₃); 6,51 (dd, *J* = 5,6 Hz et *J* = 1,7 Hz, 1H, H₂); 6,67 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₃); 7,99 (s, 1H, H imidazole); 8,57 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H, H₅).

Isomère Z: δ 3,96 (s, 3H, NCH₃); 6,38 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, H₃); 6,43 (dd, *J* = 5,5 Hz et *J* = 1,5 Hz, 1H, H₂); 7,83 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, H₃); 7,99 (s, 1H, H imidazole).

L'attribution de la structure E ou Z est fondée sur le glissement chimique du proton H₅ qui est plus déblindé lorsqu'il est *cis* avec l'oxygène de la fonction lactone que sous la forme *trans*, l'effet de la double liaison conjuguée étant faible.

Évaluation antiparasitaire

Les composés à étudier sont dissous dans le diméthylformamide (DMF) à raison de 10 mg/ml et distribués pour une concentration finale de 100, 50, 25, 15, 10, 5 mg/l. Une dilution au 1/10^e de la solution mère dans du DMF permet d'obtenir des concentrations plus faibles (1 mg/l, 0,05 mg/l).

Nous avons vérifié que le DMF, à la concentration utilisée, n'exerce aucune activité vis-à-vis des parasites.

L'activité amoebicide est évaluée sur *Entamoeba histolytica* (souche Rahman) *in vitro* en milieu liquide de Jones [15] selon le protocole habituel [16]. Les tubes sontensemencés par 0,3 ml d'un inoculum renfermant 20 000 amibes/ml. On détermine la CMI après 48 h. Une réculture est effectuée à partir de la première concentration active.

L'activité trichomonacide est déterminée sur *Trichomonas vaginalis* (souche sauvage B) *in vitro* en milieu liquide oxoid (*Trichomonas medium* - code CM 161) [17]. On détermine la CMI de la même façon que pour *Entamoeba histolytica* après une réculture à 48 h.

L'activité leishmanicide est évaluée sur deux souches de *Leishmania infantum* isolées chez le chien (souche 1: LP MA 57 et souche 2: LP MA 56) et une souche de *Leishmania tropica* isolée chez l'homme (LP MA 59).

La culture *in vitro* est réalisée en milieu NB (Nutrient Broth) additionné de sang frais de lapin [18]. Les tubes sontensemencés par 10⁶ formes promastigotes de leishmanies. La CMI est déterminée après 7 jours de culture.

Références

- 1 Winkelmann E, Raether W, Gebert U, Sinharay A (1977) *Arzneim Forsch Drug Res* 27, 2251-2263
- 2 Cavalleri B (1982) *In: Nitroimidazoles: Chemistry, Pharmacology and Clinical Application* (Breccia A, Cavalleri B, Adams GE, eds) Plenum Press, NY 9-33
- 3 Ouattara L, Debaert M, Cavier R (1987) *Il Farmaco Ed Sci* 42, 449-456
- 4 Ouattara L, Debaert M, Cavier R (1988) *Il Farmaco Ed Sci* 43, 389-393
- 5 Henry DW, Hoff DR (1965) Merck and Co Inc, 661262
- 6 Tiollais R (1947) *Bull Soc Chim Fr*, 708-724
- 7 Allen CFH, Spangler FW (1962) *Org Synthesis* III, 377-379
- 8 Crozet MP, Vanelle P, Bouscasse L, Avignon T (1986) *Spectroscopy Lett* 19, 1049-1057
- 9 Vanelle P (1987) Thèse Doctorat ès Sciences Physiques, Aix-Marseille III
- 10 Asaoka M, Sugimura N, Takei H (1979) *Bull Chem Soc Jpn* 52, 1953-1956
- 11 Asaoka M, Yanagida N, Sugimura N, Takei H (1980) *Bull Chem Soc Jpn* 53, 1061-1064
- 12 Asaoka M, Yanagida N, Takei H (1980) *Tetrahedron Lett* 21, 4611-4614
- 13 Asaoka M, Yanagida N, Ishibashi K, Takei H (1981) *Tetrahedron Lett* 22, 4269-4270
- 14 Kulsa P, Rooney LS (1977) US Patent Office 4,010,176
- 15 Taylor ERA, Baker RJ (1968) *The Cultivation of Parasites In Vitro*. Blackwell Sci Publ 128-130
- 16 Cavier R, Cenac J (1972) *Bull Soc Path Exot* 65, 399-404
- 17 Audibert P, Placidi M, Giovannangeli G, Cristau B, Gasquet M, Delmas F, Andrac A, Timon-David P (1979) *Ann Pharm Fr* 37, 483-490
- 18 Ranque P (1966) Thèse Doctorat Médecine, Aix-Marseille II