

## Article original

# Recherche de substances à activité immunorégulatrice sur le lymphocyte T humain: nouveaux composés thiadiazabicycliques et étude comparative avec le tétramisole

Bernard REFOUVELET<sup>1</sup>, Pierre TRONCHE<sup>1\*</sup>, Jacques COUQUELET<sup>1</sup>, Jean-François ROBERT<sup>2</sup>, Ghislaine BONNEFOY-CLAUDET<sup>3</sup> et Jacqueline PANOUSE-PERRIN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Chimie Thérapeutique, Faculté de Pharmacie, 28, place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand Cedex,

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Thérapeutique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, place Saint-Jacques, 25030 Besançon Cedex, et

<sup>3</sup>Laboratoire de Microbiologie Pharmaceutique, place Saint-Jacques, 25030 Besançon Cedex, France

(Reçu le 26-2-1986, accepté le 1-10-1986)

**Résumé** — La préparation de vingt-cinq composés nouveaux de structure thiadiazabicyclique appartenant à quatre séries différentes a été réalisée à partir de l'ester méthylique de la L-thiaproline. Leur structure est étayée par les données spectroscopiques en particulier de RMN protonique. Des propriétés immunomodulatrices ont été mises en évidence chez plusieurs composés à l'aide d'une méthode cinétique fiable, reproductible, fondée sur la mobilisation des récepteurs E des lymphocytes T humains.

**Summary** — **New thiadiazabicyclic compounds with immunoregulatory actions on human T lymphocytes: comparison with tetramisole.** *Twenty five new compounds with a thiadiazabicyclic structure were obtained in four chemical series from L-thiaproline methyl ester. Spectroscopic data, especially <sup>1</sup>H NMR, were in agreement with the proposed structures. Immunomodulatory properties were detected in several compounds with a reliable, reproducible kinetic method based upon the mobility of the human E receptors on T lymphocytes.*

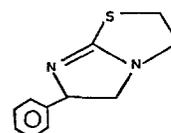
thiadiazabicyclic compounds / tetramisole / T lymphocytes / immunomodulators

## Introduction

Au cours de l'agression par des éléments étrangers, l'organisme humain réagit en mettant en jeu des éléments actifs du système immunitaire, en particulier les lymphocytes T (LT), qui interviennent non seulement au niveau de l'immunité à médiation cellulaire mais aussi par le biais de la coopération cellulaire sur le niveau de la sécrétion des anticorps circulants. Les réactions d'immunité à médiation cellulaire jouent un rôle important au cours de certaines infections, dans la réponse immune tumorale, dans les rejets de greffe et comme composantes de certaines maladies auto-immunes [1], tandis que les anticorps spécifiques circulants se comportent comme des médiateurs de reconnaissance des antigènes au service des cellules phagocytaires, mais aussi d'autres cellules effectrices du système immunitaire [2].

Il existe dans l'organisme une immunomodulation

intrinsèque permanente qu'on souhaite renforcer ou atténuer par les modulateurs. Ceux-ci sont soit des produits du système immunitaire lui-même, soit des produits naturels ou de synthèse d'origine bactérienne, soit des composés synthétiques pour lesquels il existe déjà quelques modèles auxquels il faudra ajouter ceux qui seront découverts à la faveur de criblages systématiques. Le premier composé chimique simple à effet immunostimulant a été révélé par Renoux et Renoux [3]: il s'agit du lévamisole, isomère lévogyre du tétramisole. Celui-ci connu et utilisé pour ses propriétés anthelmintiques a fait l'objet de nombreuses études expérimentales [4] et même cliniques pour ses activités dans le domaine immunologique [5—8].



\* Auteur à qui la correspondance doit être adressée.

Il exerce une stimulation des lymphocytes T et potentialise les fonctions des polynucléaires neutrophiles et des macrophages. L'effet immunomodulateur dépendrait plus du noyau soufré que de l'action cholinergique du noyau imidazole [5, 7—10].

## Chimie

Les analogues structuraux du lévamisole décrits dans la littérature conservent pour la plupart le cycle imidazole, les trois hétéroatomes présents dans la structure se retrouvant dans les mêmes positions [11, 12]. Nous décrivons ici la préparation de quelques représentants de quatre séries de composés thiadiazabicycliques obtenus en peu d'étapes et avec de bons rendements à partir de l'ester méthylique de la L-thiaproline **1** décrit dans un précédent mémoire [13] (Schéma 1).

Les oxo-4 thia-7 diaza-1,3 bicyclo[3.3.0]octanes **3** (Tableau I) sont préparés par une réaction de *N*-aminoalkylation de l'ester méthylique **1** avec isolement intermédiaire de l'aminométhylol **2**.

La première partie de la réaction s'effectue à la température du laboratoire en solution hydrométhanolique avec

un excès de formaldéhyde en milieu neutre. L'aminométhylol **2** est condensé avec les amines primaires par chauffage de plusieurs heures dans le cellosolve (éther monoéthylrique de l'éthylène glycol). Les composés bicycliques **3** sont purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice. Ils sont obtenus à l'état huileux ou cristallisé avec des rendements de 40—70%. Les températures élevées atteintes dans cette seconde étape entraînent une racémisation partielle ou totale ainsi qu'il ressort de l'examen des pouvoirs rotatoires des composés thiadiazabicycliques **3**. Tous les spectres infrarouges de ces composés présentent entre 1680 et 1695  $\text{cm}^{-1}$  une bande d'intensité forte correspondant à la vibration du groupement lactamique. En RMN protonique il apparaît dans cette série trois massifs distincts: un massif centré à 3,3 ppm qui correspond à la partie AB (Ha, Ha') d'un système ABX; un massif centré à 4,0 ppm qui correspond à la superposition de 2 systèmes AB: (Hc, Hc') et (Hd, Hd'); un massif centré à 4,5 ppm qui correspond à la superposition de la partie X du système ABX (Hb), et du spectre AB des protons vicinaux du substituant porté par l'azote. Du fait de la superposition des raies, il n'est pas possible d'analyser la partie X du système ABX.

La réduction des composés **3** en thia-7 diaza-1,3 bicyclo[3.3.0]octanes *N*-substitués **4** (Tableau II) est réalisée par l'hydruure de lithium et aluminium au sein du tétrahydrofurane [14, 15], en opérant à la température du laboratoire pour éviter la formation de produits secondaires. Les composés réduits **4** sont des huiles à point d'ébullition élevé et sont obtenus avec des rendements de 30—40% à partir des lactames correspondants **3**. En spectrométrie infrarouge, on observe la disparition complète de toute bande correspondant à la vibration d'un carbonyle.

En RMN protonique, on devrait retrouver au minimum 3 systèmes de spins: un système complexe fortement couplé pour (Ha, Ha', Hb, He et He'), deux systèmes AB pour (Hc, Hc') et (Hd, Hd'). Pratiquement, du fait du nombre et de la superposition des raies entre 2,5 et 4,0 ppm, ce type de spectre n'est pas exploitable.

Les dioxo-2,6 thia-9 diaza-1,5 bicyclo[5.3.0]décane **6** (Tableau III) comportant un cycle hepta-atomique sont préparés en 2 étapes. L'ester méthylique de la L-thiaproline **1** est acylé à l'azote par le chlorure de chloro-3 propionyle au sein du benzène anhydre à reflux selon Saxena [15]. Le dérivé *N*-chloroacylé **5** est distillé sous vide; il cristallise par refroidissement. Dans une étape ultérieure il est condensé avec des amines primaires aliphatiques ou aromatiques dans le cellosolve en présence de triéthylamine. Les composés bicycliques **6** sont isolés par chromatographie sur colonne de gel de silice puis recristallisés dans l'isopropanol. On observe en spectroscopie infrarouge deux bandes d'intensité forte situées entre 1620 et 1640  $\text{cm}^{-1}$  et correspondant aux deux groupements lactamiques. En spectrométrie de RMN protonique, on observe quatre massifs distincts correspondant à trois systèmes de spins; un massif centré à 2,7 ppm pour la partie XY d'un système ABXY correspondant aux protons Hd et Hd'; un massif centré à 3,3 ppm qui correspond à la partie AB d'un système ABX pour (Ha, Ha'); un massif centré à 3,85 ppm pour la partie AB du système ABXY précédent, correspondant

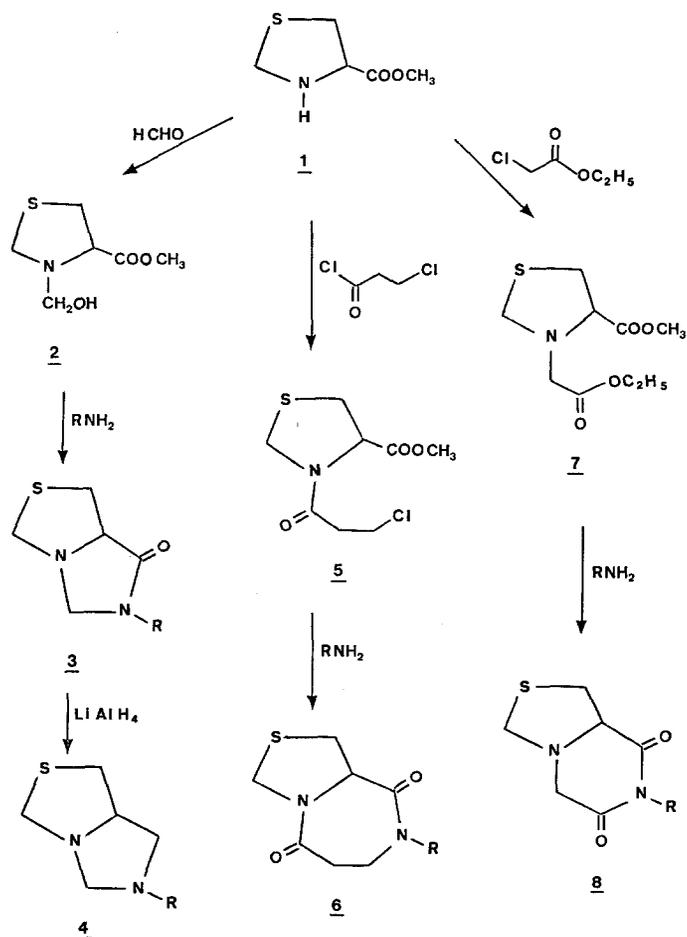
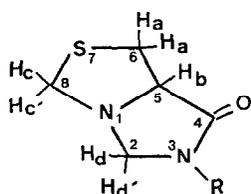


Schéma 1. Voies d'accès aux composés thiadiazabicycliques.

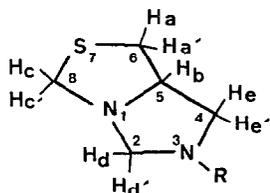
Tableau I. Oxo-4 thia-7 diaza-1,3 bicyclo[3,3,0]octanes 3.



N°	R	Formule	M	Rdt %	F <sup>o</sup> C ou E <sup>o</sup> C (mm Hg)	Rf (a)	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>
3a		C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> OS	234	64	74	0,28	+ 9°,0
3b		C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> OSF	252	66	119	0,27	+ 5°,9
3c		C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> OSCl	268,5	63	77	0,26	+ 25°,5
3d		C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	294	48	78	0,26	+ 30°,7
3e		C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> OS	248	69	80	0,25	- 22°,3
3f		C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	308	49	103	0,25	- 8°,1
3g		C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> OS	226	40	63	0,29	- 26°,8
3h		C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> OS	200	35	210 (0,01)	0,26	- 45°,6
3i		C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	230	26	170 (0,01)	0,30	- 18°,5

<sup>a</sup>Solvant de migration: acétate d'éthyle — hexane (7/3)

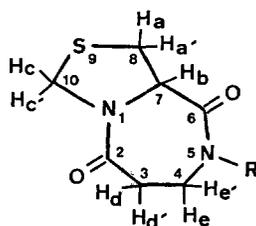
Tableau II. Thia-7 diaza-1,3 bicyclo[3,3,0]octanes 4.



N°	R	Formule	M	Rdt %	E <sup>o</sup> C (mm Hg)	Rf (a)	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>
4a		C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> S	220	38	145 (0,01)	0,22	+ 71°,5
4b		C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> SCl	254,5	37,5	165 (0,01)	0,21	+ 74°,5
4c		C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> S	234	39	160 (0,01)	0,24	+ 76°,7

<sup>a</sup>Solvant de migration: acétate d'éthyle — hexane (7/3)

Tableau III. Dioxo-2,6 thia-9 diaza-1,5 bicyclo[5,3,0]decane 6.



N°	R	Formule	M	Rdt %	F°C	Rf(a)	$[\alpha]_D^{20}$
6a		$C_{14}H_{16}N_2O_2S$	276	30	144	0,17	+ 3°,5
6b		$C_{14}H_{15}N_2O_2SF$	294	27	164	0,18	- 9°,9
6c		$C_{14}H_{15}N_2O_2SCl$	310,5	23	116	0,18	0°
6d		$C_{16}H_{20}N_2O_4S$	336	24	127	0,18	0°
6e		$C_{15}H_{18}N_2O_2S$	290	22	140	0,16	0°
6f		$C_{13}H_{20}N_2O_2S$	268	26	124	0,25	- 16°,6
6g		$C_{11}H_{18}N_2O_2S$	242	25	95	0,21	0°

<sup>a</sup>Solvant de migration: acétate d'éthyle — hexane (7/3)

aux protons He et He'; enfin un massif centré à 4,8 ppm qui correspond à la superposition d'un système AB pour Hc, Hc' et de la partie X du système ABX précédent pour Hb.

Les dioxo-3,5 thia-8 diaza-1,4 bicyclo[4.3.0]nonanes **8** (Tableau IV) représentent une autre famille de composés bicycliques dicarboxylés obtenus eux aussi en 2 étapes à partir de l'ester méthylique de la L-thiaproline **1**. Celui-ci est alkylé à l'azote par le monochloracétate d'éthyle en présence de carbonate de sodium; le diester **7** distillé sous vide est condensé avec une amine primaire dans le cello-solve en présence de triéthylamine. Les composés bicycliques **8** sont séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice puis recristallisés dans l'isopropanol.

On retrouve en spectroscopie infrarouge dans tous les composés une bande d'intensité forte ou deux bandes entre 1690 et 1710  $cm^{-1}$ , correspondant aux deux carbonyles de la fonction imide. Le spectre de RMN protonique est assez complexe, comme dans les séries précédentes, et présente quatre massifs distincts: un massif centré à 3,3 ppm qui correspond à la partie AB d'un système ABX pour (Ha, Ha'); un singulet élargi centré à 3,95 ppm qui correspond aux protons Hc et Hc'; un massif centré à 4,5 ppm qui correspond au système AB (Hd et Hd'); un

massif centré à 4,9 ppm qui correspond à la partie X (Hb) du système ABX.

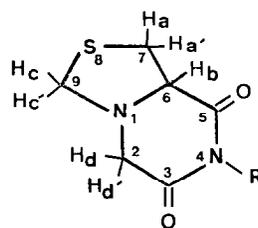
*N.B.* — Les signaux des protons portés par les substituants R reliés à l'atome d'azote, conformes aux données théoriques, ne sont pas mentionnés ici. Il convient cependant de signaler que les protons méthyléniques voisins de l'atome sont généralement inclus dans un massif correspondant aux protons du squelette.

## Pharmacologie

### Principe

La propriété des globules rouges de mouton de se fixer à la surface des LT par l'intermédiaire des récepteurs E est utilisée couramment pour mettre en évidence et dénombrer les LT dans le sang périphérique, ainsi que dans les organes lymphoïdes humains. La signification physiologique de ces récepteurs E commence à être comprise. Il existe une voie alterne d'activation des LT humains qui implique le récepteur E: le blocage de ce dernier par des anticorps monoclonaux OKT<sub>11</sub> dirigés contre les épitopes

Tableau IV. Dioxo-3,5 thia-8 diaza-1,4 bicyclo[4,3,0]nonanes 8.



N°	R	Formule	M	Rdt %	$\bar{F}^{\circ}\text{C}$	Rf(a)	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$
8a		$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$	262	22	102	0,31	0°
8b		$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{SCl}$	296,5	19	92	0,32	+ 19°,7
8c		$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$	276	20	119	0,27	0°
8d		$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$	338	20	138	0,45	+ 24°
8e		$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$	254	24	121	0,36	+ 2°,2
8f		$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$	214	23	79	0,34	+ 8°,7

<sup>a</sup>Solvant de migration: acétate d'éthyle — hexane (7/3)

du récepteur E entraîne non seulement une activation des LT mais aussi une augmentation de la production d'interleukine 2 ( $\text{IL}_2$ ) par le lymphocyte concerné ainsi qu'un accroissement du nombre de ses récepteurs à  $\text{IL}_2$  [16, 17] comme le fait l'antigène qui se fixe sur le récepteur spécifique  $\text{T}_3\text{Ti}$ .

De plus Herbert et Watson [18] postulent que la voie alterne d'activation interviendrait au niveau de la régulation de la réponse immunitaire (immunosuppression/immunoactivation). En effet, la fixation de l'antigène aux récepteurs  $\text{T}_3\text{Ti}$  entraîne la disparition d'une partie des récepteurs E de la surface des LT évitant l'activation de la cellule par l'intermédiaire de la voie alterne. On peut dire, d'une autre façon, que la fixation des anticorps monoclonaux  $\text{OKT}_{11}$  sur les épitopes du récepteur E, au cours de l'activation des LT par les mitogènes entraîne l'inhibition de la réponse proliférative. C'est d'ailleurs ce que nous avons observé fortuitement lorsque nous avons utilisé dans le milieu de culture au cours d'essais de transformation lymphoblastique par la PHA (phytohémagglutinine), un sérum AB humain absorbé sur globules rouges de mouton. Il y a blocage du récepteur E par les résidus de globules rouges de mouton, ce qui inhibe à 100% la transformation lymphocytaire induite par la PHA. Pour Herbert et Watson [18] l'expression des récepteurs à  $\text{IL}_2$  sur la surface lymphocytaire T, c'est-à-dire l'activation des LT n'aurait lieu que si l'un des 2 récepteurs (E ou  $\text{T}_3\text{Ti}$ ) était bloqué, mais pas les 2 à la fois.

Ces découvertes récentes redonnent un regain d'intérêt à l'étude des récepteurs E qui persistent tout au long de la maturation des LT, ce qui est bien en faveur de l'hypothèse d'un rôle privilégié de ce récepteur E au cours de la réponse immunitaire, mais ce rôle reste encore à approfondir. Ces découvertes confirment aussi que le récepteur E est mobile dans la membrane lymphocytaire T. Ces micro-déplacements avaient déjà été entrevus par Bernard *et al.* [20] à l'aide d'anticorps monoclonaux et par Donahoe *et al.* [21] qui étudiant le mécanisme de formation des rosettes E ont révélé l'existence d'un phénomène de transition de phases correspondant à un gain et une perte de rosettes au cours d'un temps d'incubation de quelques minutes.

Traités *in vitro* par la trypsine, les LT au repos perdent une partie de leur capacité à faire des rosettes E. Pour Gattringer et Wick [19] le pourcentage des LT formant rosettes s'abaisse de 68 à 3% puis une partie d'entre eux réapparaît en 13—17 h de sub-culture. C'est cette dernière propriété, qui a été retenue par Lomnitzer et Rabson [22] pour essayer de mettre en évidence l'activité immunostimulante du chlorhydrate de lévamisole en espérant montrer une éventuelle capacité, à accélérer la régénération des récepteurs E trypsinés.

Si effectivement Lomnitzer et Rabson trouvent une certaine activité du chlorhydrate de lévamisole, ils reconnaissent qu'elle n'est pas dose dépendante.

Après avoir obtenu les mêmes résultats, nous avons

remarqué que pour des durées d'incubation voisines les unes des autres (2 h, 2 h 30 min, 3 h, 3 h 30 min, 4 h), nous observons qu'en présence de concentrations variables de lévamisole, les pourcentages de LT trypsinés formant rosettes étaient très différents alors que ce phénomène n'était pas mis en évidence avec les lymphocytes non trypsinés incubés avec ou sans chlorhydrate de lévamisole.

Ainsi dans l'exemple de la Fig. 1, sous l'action de la trypsine à 0,25%, le nombre de LT formant rosettes est abaissé à 6%. Au cours des sub-cultures effectuées en présence de chlorhydrate de lévamisole, il se développe successivement un double phénomène: après 2 h d'incubation à +37°C, le nombre des lymphocytes formant rosettes s'élève à 26% et au cours des 2 h suivantes, on observe des pertes et gains de rosettes successifs qui vont de 15–26%.

Ce phénomène oscillatoire ne se développe qu'à partir d'une certaine concentration de chlorhydrate de lévamisole ( $4,16 \times 10^{-8}$  mmol/ml) qui sert de seuil de comparaison pour les autres produits étudiés: l'amplitude des oscillations semble indépendante de la concentration en produit actif.

Dans la Fig. 1 sont regroupées pour un même donneur, les courbes expérimentales obtenues avec les lymphocytes T trypsinés ou non mis en présence ou non d'une concentration de chlorhydrate de lévamisole de  $8,3 \times 10^{-4}$  mmol/ml (moyenne de 3 essais).

A la vue de ces résultats nous pensons que le phénomène de gains et de pertes de rosettes que nous avons observé avec le chlorhydrate de lévamisole et que nous avons, entre autres, obtenu avec le chlorhydrate de tétramisole n'est pas la conséquence d'une synthèse protéique accrue mais qu'il est plutôt dû à des modifications membranaires

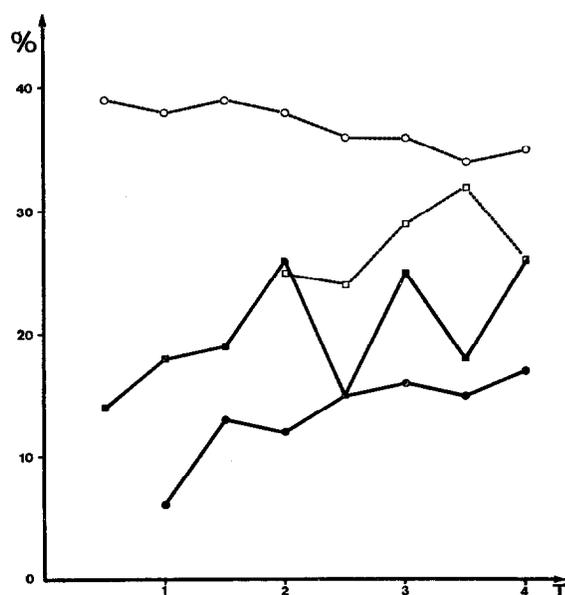


Fig. 1. Pourcentage de lymphocytes formant des rosettes E après différentes durées d'incubation (h). ■—■: lymphocytes trypsinés + lévamisole,  $8,3 \times 10^{-4}$  mmol/ml; ●—●: lymphocytes trypsinés; □—□: lymphocytes non trypsinés + lévamisole,  $8,3 \times 10^{-4}$  mmol/ml; ○—○: lymphocytes non trypsinés.

sous l'action conjuguée de la trypsine, libérant les récepteurs E du cytosquelette, et de l'immunomodulateur accélérateur les microdéplacements naturels des récepteurs E dans une membrane rendue plus fluide.

La détermination des concentrations seuils telle qu'elle sera décrite dans la partie expérimentale permet donc des études comparatives et cette méthode cinétique autorise des évaluations reproductibles de l'activité immunomodulatrice [23, 24].

## Résultats et Discussion

Neuf thiadiazabicycloalcanes appartenant aux différentes séries préparées, ont été soumis à cette étude. Nous y avons ajouté deux composés de structure voisine, décrits dans un mémoire antérieur [12]:

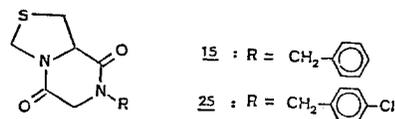


Tableau V. Concentration minimale active dans la régénération des sites de fixation des rosettes E des lymphocytes T humains.

Composé	Concentration (mmol/ml)
Tétramisole (Chte)	$4,16 \times 10^{-7}$
3b	$4,16 \times 10^{-9}$
3c	$4,16 \times 10^{-6}$ — $4,16 \times 10^{-7}$
3e	$4,16 \times 10^{-7}$
3g	$4,16 \times 10^{-6}$ — $4,16 \times 10^{-7}$
4a	$4,16 \times 10^{-7}$
6a	$4,16 \times 10^{-6}$ — $4,16 \times 10^{-7}$
6c	$4,16 \times 10^{-8}$
6f	$4,16 \times 10^{-8}$
8a	$4,16 \times 10^{-6}$ — $4,16 \times 10^{-7}$
15*	$4,16 \times 10^{-6}$ — $4,16 \times 10^{-7}$
25*	$4,16 \times 10^{-7}$

\*Composés repris dans [12].

Dans le Tableau V sont mentionnées les concentrations minimales permettant la régénération et la mobilisation des récepteurs E des lymphocytes T humains; le chlorhydrate de tétramisole est pris comme substance de référence.

Trois composés ont une activité voisine de celle du tétramisole, ce sont les composés 3e, 4a et 25.

Cinq composés ont une activité inférieure à celle du chlorhydrate de tétramisole: 3c, 3g, 6a, 8a et 15. Nous n'avons pas évalué précisément les concentrations minimales actives.

Enfin trois composés, 3b, 6c et 6f, sont plus actifs que le chlorhydrate de tétramisole et avoisinent ou dépassent l'activité du chlorhydrate de lévamisole, 10 fois plus actif que le racémique dans notre essai.

## Conclusion

A l'aide d'une méthode fiable, reproductible, d'évaluation comparative de substances provoquant la régénération des récepteurs des rosettes E disparus au cours de la trypsination des lymphocytes T humains, puis leur mobilisation, nous avons mis en évidence des propriétés immunomodulatrices chez plusieurs composés thiazolidiniques. Six composés utilisés à des concentrations égales ou inférieures à celles du tétramisole ont répondu comme celui-ci. Ce nombre est cependant trop réduit pour ébaucher la moindre relation structure—activité, mais il est suffisant pour attirer l'attention sur des structures dont l'étude mérite d'être poursuivie.

## Protocoles expérimentaux

Les points de fusion ont été déterminés au banc de Köfler et ne sont pas corrigés. Les points d'ébullition ont été déterminés sous pression réduite.

Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un appareil Beckman 4240 en pastilles de bromure de potassium. Les spectres de RMN protonique ont été enregistrés sur un appareil Varian 360 A, le tétraméthylsilane constituant la référence interne.

Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  ont été enregistrés sur un appareil Jeol FX 60. Les analyses élémentaires ont été effectuées par le Service d'Analyses du CNRS de Vernaison; conformes aux normes habituellement admises, elles ne sont pas publiées.

Le pouvoir rotatoire a été déterminé à l'aide d'un polarimètre électronique Perkin—Elmer 241 en solution dans le chloroforme.

La séparation des produits réactionnels est effectuée par chromatographie moyenne pression sur colonne de gel de silice Kieselgel 60 Merck (70—230 mesh) à l'aide d'une pompe Duramat Merck.

### *N*-Hydroxyméthyl thiazolidine carboxylate-4 de méthyle 2

A une solution de 20 g (0,136 mol) de L(-)thiazolidine carboxylate-4 de méthyle dans 50 ml de méthanol, on ajoute lentement 15 ml d'une solution aqueuse à 35% de formaldéhyde et on maintient l'agitation pendant 10 h à température ambiante. La solution est évaporée sous vide, le résidu est repris par l'éther; la solution est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée. On recueille un liquide jaune clair qui, après distillation sous pression réduite, devient incolore. On obtient 19 g de *N*-hydroxyméthyl thiazolidine carboxylate-4 de méthyle pur (Rdt = 72%).

$E_D = 150\text{—}152^\circ\text{C}$ ;  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}$ ; PM = 177.  $R_f$ (acétate d'éthyle—hexane, 7:3) = 0,61;  $[\alpha]_D^{20} = -143^\circ$ ; IR (KBr),  $\nu_{\text{cm}^{-1}}$ : 3500 (OH); 2950 (CH); 1750 (C=C ester), 1040 (C—O).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  ppm: 3,2 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  en 5); 3,3 (s, 2H, N— $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3,8 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ); 4,3 (m, 4H,  $\text{CH}_2$  en 2, CH en 4 et OH).

### *Oxo-4 thia-7 diaza-1,3 bicyclo[3.3.0]octanes 3a à 3i*

Une solution de 5,31 g (0,03 mol) de *N*-hydroxyméthyl thiazolidine carboxylate-4 de méthyle et de 0,04 mol d'amine primaire dans 50 ml de cellosolve est maintenue à reflux pendant 12 h. Le solvant est chassé sous vide; le résidu est repris par 100 ml de chlorure de méthylène. La phase organique est lavée à l'eau et séchée sur sulfate de sodium. Après évaporation du solvant, le nouveau résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, l'éluant étant constitué par le mélange acétate d'éthyle—hexane, 6:4. Le produit isolé est recristallisé dans l'isopropanol ou distillé sous vide.

### *Thia-7 diaza-1,3 bicyclo[3.3.0]octanes 4a à 4c*

Dans un ballon à trois cols refroidi par un bain de glace, on met en suspension 4 g (0,105 mol) d'hydruure de lithium et aluminium dans 100 ml de tétrahydrofurane anhydre. On introduit alors goutte à

goutte une solution de 0,025 mol d'oxo-4 thia-7 diaza-1,3 bicyclo[3.3.0]octane dans 25 ml de tétrahydrofurane. Le mélange est agité pendant 12 h en maintenant la température au-dessous de  $5^\circ\text{C}$ .

Le complexe est alors décomposé par addition lente de 20 ml d'eau en maintenant le bain de glace. Après 2 h d'agitation, le précipité est repris par 100 ml d'isopropanol puis la solution est filtrée. Le filtrat est évaporé sous pression réduite; le résidu est repris par 100 ml de chlorure de méthylène et la solution séchée sur sulfate de sodium, puis évaporée. L'huile obtenue est ensuite distillée sous pression réduite.

### *N*-(chloro-3' propionyl) thiazolidine carboxylate-4 de méthyle 5

On met en suspension 18,35 g (0,10 mol) de chlorhydrate de thiazolidine carboxylate-4 de méthyle et 25,4 g (0,20 mol) de chlorure de chloro-3 propionyle dans 250 ml de benzène anhydre et on porte 2 h à reflux. Le solvant est chassé par évaporation et le résidu repris par 100 ml de chlorure de méthylène. Après 3 lavages à l'eau, la solution est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée.

Le produit visqueux obtenu est distillé sous pression réduite. Le distillat, traité par l'éther se solidifie. Le produit solide est recristallisé dans un mélange chloroforme—acétate d'éthyle; on retire 15 g de cristaux blancs (Rdt = 63%).

$F = 95^\circ\text{C}$ ;  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{NClO}_3$ ; PM = 237,5;  $R_f$ (acétate d'éthyle—hexane, 7:3) = 0,50;  $[\alpha]_D^{20} = -149^\circ$ ; IR (KBr),  $\nu_{\text{cm}^{-1}}$ : 2900 (C—H); 1750 (C=O ester); 1660 (C=O lactame).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  ppm: 2,9 (t, 2H, CO— $\text{CH}_2$ — $\text{CH}_2\text{Cl}$ ); 3,3 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  en 5); 3,9 (m, 5H,  $\text{CH}_2$ — $\text{CH}_2\text{Cl}$  et  $\text{CH}_3$ ); 4,6 (m, 3H,  $\text{CH}_2$  en 2 et CH en 4).

### *Dioxo-2,6 thia-9 diaza-1,5 bicyclo[5.3.0]décanes 6a à 6g*

Une solution de 5,94 g (0,025 mol) de *N*-(chloro-3' propionyl)thiazolidine carboxylate-4 de méthyle, de 2,83 g (0,028 mol) de triéthylamine et de 0,0375 mol d'amine primaire dans 100 ml de cellosolve est portée à reflux pendant 16 h. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu repris par un mélange chlorure de méthylène—benzène, 8:2. La phase organique est lavée à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique à 5%, puis filtrée et séchée sur sulfate de sodium. Les solvants sont évaporés; le résidu est repris par du chlorure de méthylène puis chromatographié sur colonne de gel de silice, l'éluant étant un mélange cyclohexane—acétate d'éthyle, 5:5. Le composé isolé est recristallisé dans l'isopropanol.

### *N*-Éthoxycarbonylméthyl thiazolidine carboxylate-4 de méthyle 7

On met en suspension 10,6 g (0,10 mol) de carbonate de sodium dans un mélange de 14,7 g (0,10 mol) de thiazolidine carboxylate-4 de méthyle et de 18,4 g (0,10 mol) de monochloracétate d'éthyle et on agite à température ambiante pendant 14 jours. Le mélange réactionnel est repris par 100 ml de chlorure de méthylène; on sépare par filtration le résidu minéral. Le filtrat chlorométhylénique est agité à 5 reprises avec 5 ml d'acide chlorhydrique 2 N, séché sur sulfate de sodium puis évaporé sous vide. Le liquide huileux obtenu est distillé sous vide; on recueille 16 g de *N*-éthoxycarbonylméthyl thiazolidine carboxylate-4 de méthyle (Rdt = 68%).

$E_{0,2} = 133\text{—}135^\circ\text{C}$ ;  $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_5$ ; PM = 235;  $R_f$ (acétate d'éthyle—hexane, 7:3) = 0,66  $[\alpha]_D^{20} = -138^\circ$ ; IR (film),  $\nu_{\text{cm}^{-1}}$ : 2950 (C—H); 1730 et 1750 (C=O ester).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  ppm: 1,3 (t, 3H,  $\text{COOCH}_2$ — $\text{CH}_3$ ); 3,3 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  en 5); 3,45 (s, 2H, N— $\text{CH}_2$ — $\text{COOCH}_2$ ); 3,80 (t, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ); 4,20 (m, 5H,  $\text{COOCH}_2$ — $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  en 2 et CH en 4).

### *Dioxo-3,5 thia-8 diaza-1,4 bicyclo[4.3.0]nonanes 8a à 8f*

Une solution de 5,88 g (0,025 mol) de *N*-éthoxycarbonylméthyl thiazolidine carboxylate-4 de méthyle, de 2,53 g (0,025 mol) de triéthylamine et de 0,0375 mol d'amine primaire dans 100 ml de cellosolve est portée à reflux pendant 20 h. Le solvant est évaporé sous vide, le résidu est repris par du chlorure de méthylène. La phase organique est lavée par une solution d'acide chlorhydrique à 5% puis à l'eau; elle est ensuite séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous pression réduite. Elle est chromatographiée sur colonne de gel de silice, l'éluant étant un mélange acétate d'éthyle—hexane, 5:5. Le composé isolé est recristallisé dans l'isopropanol.

*Méthode cinétique d'évaluation quantitative de l'activité de substances immunomodulatrices*

Elle consiste à déterminer le pourcentage de LT trypsinés, formant rosettes, incubés avec le produit étudié pendant 3 durées de temps imposées 120 min, 150 min, 180 min: si le produit est immunomodulateur les valeurs obtenues sont statistiquement différentes; parallèlement, plusieurs témoins sont réalisés qui permettent d'interpréter les résultats (voir plus loin) en comparaison, soit avec le chlorhydrate de lévamisole  $4,16 \times 10^{-8}$  mmol/ml, soit avec le chlorhydrate de tétramisole (10 fois moins actif)  $4,16 \times 10^{-7}$  mmol/ml. Dans l'essai que nous présentons, nous étudions les produits à une concentration molaire, soit égale, soit multiple, ou sous multiple, dans un rapport de 10.

Les lymphocytes T humains sont obtenus par centrifugation en gradient de ficoll de sang hépariné de donneurs du Centre de Transfusion de Besançon. En vue de la trypsinisation, ils sont répartis en 5 tubes (a, b, c, d et e) dont seulement le contenu des 3 premiers subira l'action de la trypsine à 0,25% pendant 40 min à + 37°C; 2 lavages successifs en milieu de survie RPMI et en milieu de survie RPMI additionné de 5% de sérum humain AB (décomplémenté, absorbé sur hématies de mouton). Les lymphocytes sont alors remis en suspension à la concentration de  $10^4$  cellules/mm<sup>3</sup> dans le milieu de survie RPMI additionné de 5% de sérum humain AB.

Les tubes (a) et (e) reçoivent le produit à la concentration étudiée. Les tubes (b) et (d) servent de témoins des lymphocytes trypsinés (b) et non trypsinés (d).

Le tube (c) reçoit du chlorhydrate de tétramisole à une concentration sûrement immunomodulatrice.

L'ensemble des tubes est incubé à l'étuve à + 37°C pendant 180 min.

Au cours de l'incubation des prélèvements successifs sont effectués dans chacun des tubes après 120 min, 150 min, le reste étant maintenu encore 30 min à l'étuve. Ces prélèvements de 250 µl sont déposés dans des tubes qui sont centrifugés. On remplace le surnageant par 120 µl d'une suspension de GR de mouton à  $5 \times 10^4$ /mm<sup>3</sup>. Après 10 min d'incubation à + 37°C, au bain-marie, suivie d'une centrifugation à  $1000 \times g$  pendant 2 min, les tubes sont abandonnés à + 4°C pendant 18 h.

Pour chaque tube on évalue les LT formant rosettes sur 200 LT dénombrés ce qui permet d'obtenir les valeurs:

$X'_{120}$ ,  $X'_{150}$ ,  $X'_{180}$  pour les prélèvements effectués dans le tube (a) après incubation respective de 120, 150 et 180 min.

$Tryp_{120}$ ,  $Tryp_{150}$ ,  $Tryp_{180}$  pour les prélèvements effectués dans le tube (b) après incubation respective de 120, 150 et 180 min.

$C'_{120}$ ,  $C'_{150}$ ,  $C'_{180}$  pour les prélèvements effectués dans le tube (d) après incubation respective de 120, 150 et 180 min.

Puis on calcule, pour chaque temps de contact: — le % de rosettes régénérées en: 120 min:  $X'_{120} - Tryp_{120}$ ; 150 min:  $X'_{150} - Tryp_{150}$ ; 180 min:  $X'_{180} - Tryp_{180}$ . — Le % de rosettes régénérables en: 120 min:  $C'_{120} - Tryp_{120}$ ; 150 min:  $C'_{150} - Tryp_{150}$ ; 180 min:  $C'_{180} - Tryp_{180}$ .

Pour un temps de contact donné, l'index  $I'$  est le rapport des % de rosettes régénérées aux % de rosettes régénérables  $\times 100$ . Exemple: pour un temps de contact de 120 min :

$$I'_{120} = \frac{X'_{120} - Tryp_{120}}{C'_{120} - Tryp_{120}} \times 100$$

Au cours de chaque essai effectué avec une concentration de produit, on obtient une valeur d'index  $I'$  pour chacun des 3 temps de contact. La concentration est jugée inactive si ces 3 valeurs sont voisines. La

concentration minimale active correspond à celle qui entraîne un début de disparité significative entre ces 3 valeurs.

Un calcul similaire effectué à partir des résultats obtenus avec le chlorhydrate de tétramisole permet de contrôler pour chaque donneur la bonne sensibilité de ses lymphocytes à cette substance immunomodulatrice.

## Remerciements

Les auteurs remercient M. le Professeur J. C. Gramain, U.E.R. Sciences, Université de Clermont II et M. le Professeur J. J. Panouse, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Franche-Comté - Besançon pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce mémoire.

## Références

- 1 Pouletty R. (1985) *Concours Méd.* 107, 2111—2114
- 2 Roitt I., Brostoff J. & Male D. (1985) *Immunologie fondamentale et appliquée* (MEDSI, Ed.) Paris
- 3 Renoux G. & Renoux M. (1971) *C. R. Acad. Sci.* 272 D, 349—350
- 4 Renoux G. & Renoux M. (1974) *J. Immunol.* 113, 779—790
- 5 Renoux G. (1978) *Pharm. Therap. A.* 2, 397—423
- 6 Symoens J. & Rosenthal M. (1977) *J. Reticuloendothel. Soc.* 21, 175—196
- 7 Renoux G. & Renoux M. (1976) *Nouv. Presse Méd.* 5, 67—70
- 8 Renoux G. (1985) in: *The Modulation of Immunity* (Mitchell M. S., ed.), Pergamon Press, Oxford, pp. 393—410
- 9 Renoux G. & Renoux M. (1978) *Nouv. Presse Méd.* 7, 197—201
- 10 Rentchnick P. (1978) *Nouv. Presse Méd.* 7, 1873—1874
- 11 Robert J. F., Xicluna A. & Panouse J. J. (1975) *Eur. J. Med. Chem.* 10, 59—64
- 12 Andreani A., Bonazzi D., Rambaldi M. & Fabri G. (1982) *Eur. J. Med. Chem.* 17, 271—274
- 13 Margoum N., Tronche P., Bastide P., Bastide J. & Rubat C. (1984) *Eur. J. Med. Chem.* 19, 415—419
- 14 Freed M. & Day A. R. (1960) *J. Org. Chem.* 25, 2108—2113
- 15 Saxena K., Jain C. & Anand N. (1973) *J. Med. Chem.* 16, 560—564
- 16 Meur S. C., Hussey R. E., Fabby M., Fox D., Acuto O., Fitzgerald K. A., Hodgdon J. C., Protentis J. P., Schlossman S. F. & Reinherz F. I. (1984) *Cell* 36, 897—906
- 17 Reinherz E. L. (1985) *Immunol. Today* 6, 75—79
- 18 Herbert A. G. & Watson J. D. (1986) *Immunol. Today* 7, 72—76
- 19 Gattringer C. & Wick G. (1977) *Immunol.* 32, 199—205
- 20 Bernard A., Gelin G., Raynald B., Pham D., Gosse C. & Boumsell L. (1982) *J. Exp. Med.* 155, 1317—1333
- 21 Donahoe R. M., Madden J. J., Hollingsworth F., Shafer D. & Falek A. (1985) *Fed. Proc.* 44, 95—99
- 22 Lomnitzer R. & Rabson A. R. (1978) *Clin. Exp. Immunol.* 33, 499—502
- 23 Bonnefoy-Claudet G. & Panouse-Perrin J. XXXIVth Colloquium: *Protides of the Biological Fluids* Brussels, May 1—3 1986, Abstract p. B312
- 24 Bonnefoy-Claudet G. & Panouse-Perrin J. (1986) in: *Proceedings of the 34th Colloquium: Protides of the Biological Fluids*, Pergamon Press, Oxford, 645—648