

Synthèse et étude de l'activité cytotoxique *in vitro* et antitumorale *in vivo* de nouvelles pyrrolo[2,1-*c*] [1,4] benzodiazépines: partie I

MP Foloppe¹, E Caballero², S Rault¹, M Robba¹

¹Laboratoire de chimie thérapeutique, UFR des Sciences pharmaceutiques,
Université de Caen, 1, rue Vaubénard, 14032 Caen Cedex, France;

²Laboratorio de Química farmacéutica, Facultad de Farmacia, Salamanca, Espagne

(Reçu le 16 mai 1991; accepté le 19 septembre 1991)

pyrrolo [2,1-*c*] [1,4] benzodiazepines / cytotoxicity assay / antineoplastic assay

Introduction

Depuis la découverte des propriétés antitumorales de l'anthracycline **1** [1] et de ses analogues comme les néothramycines A **2** et B **3** [2] et la chicamycine B **4** [3], les pyrrolo [2,1-*c*] [1,4] benzodiazépines ont fait l'objet de nombreuses études chimiques et pharmacologiques [4, 5] (schéma 1). Il est aujourd'hui bien établi que ces substances se fixent dans le petit sillon de l'ADN en formant des liaisons covalentes par réaction de leur groupement carbinolamine N10-C11 avec l'azote N2 de la guanine [6–8]. Le groupement hydroxyle porté par le pyrrole en position 2 ou 3 dans les néothramycines et les chicamycines par exemple est également susceptible de réagir avec d'autres sites de l'ADN. Les relations structure-activité qui ont démontré le rôle crucial joué par la structure carbinolamine N10-C11 ont également laissé apparaître que des variations structurales pouvaient être apportées sur le cycle benzénique à condition qu'elles ne soient pas trop stériquement encombrantes. Ceci nous a

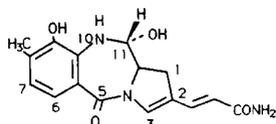
conduit à mener une étude de la synthèse de nouveaux dérivés de cette famille en remplaçant les groupements hydroxy et méthoxy des néothramycines et chicamycines par un substituant méthylènedioxy et le groupement carbinolamine par des groupements thioxo et iminothioéthers.

Chimie

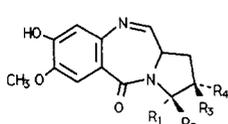
Synthèses

Synthèse de la 1,2,3,10,11,11*a*-hexahydro-2-hydroxy-7,8-méthylènedioxy-5*H*-pyrrolo[2,1-*c*] [1,4] benzodiazépine-5,11-dione **10** (schéma 2)

L'acide pipéronylique **5** subit une nitration en position 2 au moyen de l'acide nitrique fumant (le dérivé secondaire **7**: 4,5-méthylènedioxy-1,2-dinitrobenzène, qui se forme également lors de la réaction est facilement séparé en milieu alcalin) est ensuite opposé à la *trans*-4-hydroxyproline pour donner l'acide 4-hydroxy-1-(4,5-méthylènedioxy-2-nitrobenzoyl) pyrrolidine-2-carboxylique **9**. Le traitement de **9** par le chlorure stanneux dans un mélange d'HCl et

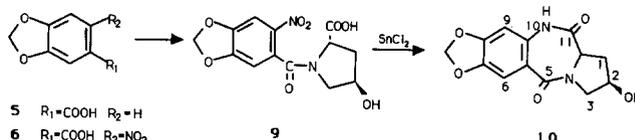


1 Anthramycine



2 R₁ = OH, R₂ = R₃ = R₄ = H Néothramycine A
3 R₂ = OH, R₁ = R₃ = R₄ = H Néothramycine B
4 R₁ = R₂ = R₃ = H, R₄ = OH Chicamycine B

Schéma 1.



5 R₁ = COOH R₂ = H
6 R₁ = COOH R₂ = NO₂
7 R₁ = R₂ = NO₂
8 R₁ = COCl R₂ = NO₂

Schéma 2.

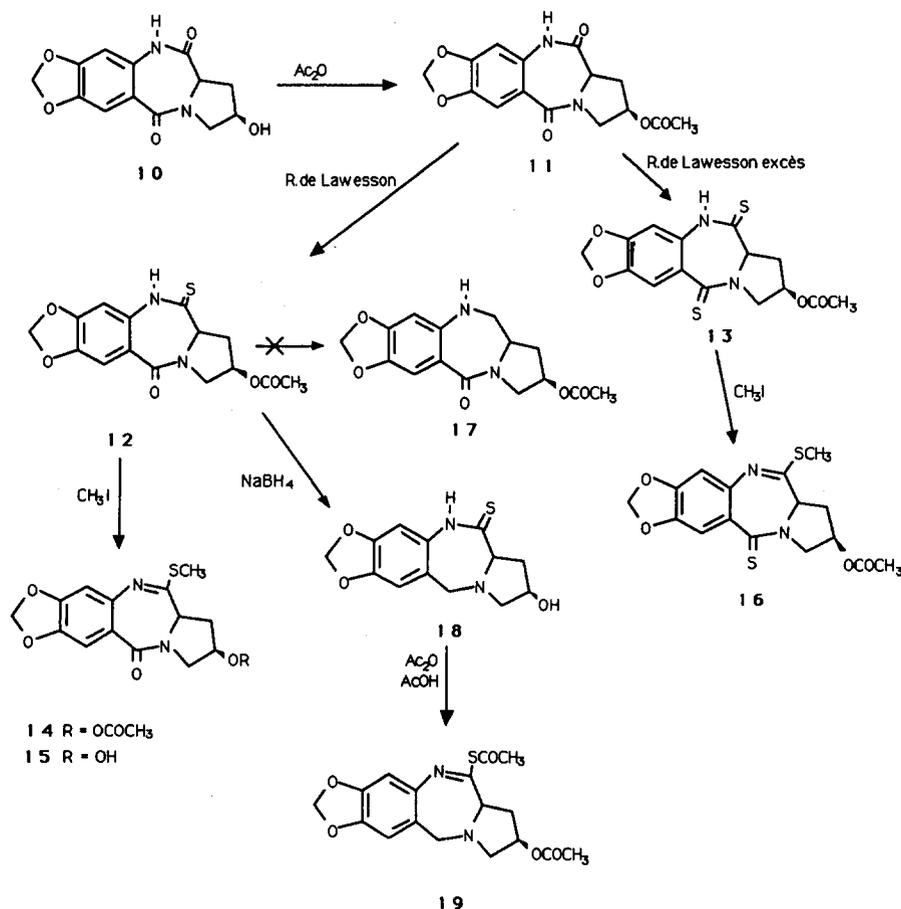


Schéma 3.

d'acide acétique fournit en une seule étape la 2-hydroxypyrrrolobenzodiazépinedione **10**.

Synthèse des thiodérivés **12–19** à partir du dilactame **10** (schéma 3)

L'alcool secondaire du dilactame **10** est estérifié en acétate **11** au moyen d'un mélange d'acide acétique et d'anhydride acétique. Lorsque **11** est traité par 0,8 équivalent de réactif de Lawesson au reflux du benzène pendant 6 h la réaction conduit au thiolactame **12**. En revanche lorsque la réaction est menée dans le dioxane en présence d'un excès de ce même réactif, le dilactame **11** subit une double thionation pour former la pyrrolobenzodiazépinedithione **13**. Nous avons mis au point les conditions de ces réactions dont les résultats sont sélectifs. L'alkylation au moyen d'iodure de méthyle dans le tétrahydrofurane en présence de carbonate de potassium du thiolactame **12** ainsi que du dithiolactame **13** conduit respective-

ment aux dérivés iminothioéthers **14** et **16**. Le dérivé **15** est isolé après hydrolyse douce du groupement acyle de l'iminothioéther **14**. La méthode de désulfuration des thiolactames en amines décrites par Mandal *et al* [9, 10], utilisant le borohydrure de sodium dans un mélange de tertio-butanol et de méthanol a été menée sur le thiolactame **12**. Cette méthode a conduit non pas au dérivé **17** attendu, mais à la 2-hydroxypyrrrolobenzodiazépinedithione **18** après réduction du lactame et hydrolyse du groupement acyle en position 2. Par traitement dans un mélange d'acide acétique et d'anhydride acétique ce dérivé **18** conduit au diacétyliminothioéther **19** dont la structure confirme les résultats de la réaction précédente.

Essais d'obtention de la fonction imine N10-C11 à partir de l'iminothioéther **14** (schéma 4)

Lorsque l'iminothioéther **14** est traité au moyen d'hydrazine au reflux de l'éthanol, il subit une substi-

tution nucléophile accompagnée de l'hydrolyse du groupement acyle pour conduire à la **11**-hydrazino pyrrolobenzodiazépine-5-one **20**. Les essais de deshydrazination selon Albert [11] au moyen d'éthylate de sodium en présence d'oxygène ne nous ont permis d'obtenir jusqu'ici que des produits de dégradation du système tricyclique. Le traitement de l'iminothioéther **14** par l'amalgame d'aluminium préparé selon la méthode de Meyers [12] suivi de l'action du chlorure mercurique ne fournit pas la diazépine attendue **21** mais ne permet de récupérer que le dilactame **10** mais ne permet de récupérer que le dilactame **10** quelles que soient les variations apportées à ce protocole. La désulfuration par l'acide thiolacétique est sans effet à température ambiante dans le méthanol, tandis qu'au reflux la réaction forme l'acétyldilactame **11**. Enfin le dérivé **14** en présence de nickel de Raney au reflux de l'éthanol en l'absence d'hydrogène permet d'accéder à la dihydrobenzodiazépine **22**. Les données de RMN concernant les protons H_2 et H_{11a} confirment par comparaison avec les données bibliographiques [2, 13] que la structure 2R et 11aS est conservée pour l'ensemble des produits décrits.

Pharmacologie

Activité cytotoxique *in vitro*

L'effet des dérivés (**10**, **11**, **12**, **13**, **14**, **18**) sur la prolifération des cellules L1210 en culture a été étudiée par le Microculture Tetrazolium Assay (MTA) [14]. Ils sont dépourvus de toute cytotoxicité *in vitro* même à une concentration de 50 μ M.

Activité antitumorale *in vivo*

Protocole du National Cancer Institute (Leukemia screen 3PS31)

Les composés **12**, **14**, **15**, **20** ne possèdent pas d'activité antitumorale sur la leucémie P388 à la dose de 200 mg/kg (T/C = 100).

Activité antitumorale *in vivo* du composé **12**

Le protocole standard de Geran a été utilisé [15], le BCNU a été pris comme référence. Ce composé n'a manifesté ni toxicité ni activité antitumorale à 150 mg/kg.

Protocoles expérimentaux

Chimie

Les points de fusion ont été déterminés au banc Köfler. Les analyses élémentaires sont conformes aux formules élémentaires à $\pm 0,3\%$. Les spectres infrarouges (IR) (KBr) sont enregistrés sur Perkin-Elmer 257G. Les spectres de RMN ^1H (DMSO- d_6) ou (CDCl_3) ont été enregistrés soit à 90 MHz sur un spectromètre Varian EM390 soit à 200 MHz sur un spectromètre Jeol JNM-FX 200. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane utilisé comme référence interne.

Acide 4,5-méthylènedioxy-2-nitro-benzoïque **6**

30 g (0,18 mol) d'acide pipéronylique **5** sont ajoutés par petites fractions en 30 min avec précaution à 200 ml d'acide nitrique ($d = 1,42$), la réaction est amorcée en chauffant le mélange réactionnel à 50°C puis la température est maintenue entre 50 et 70°C pendant l'addition. Le mélange réactionnel est ensuite

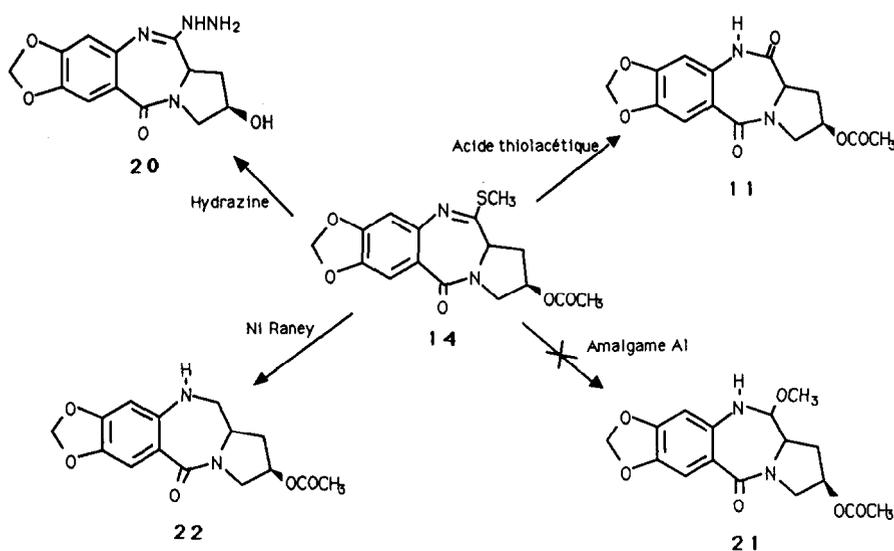


Schéma 4.

laissé sous agitation pendant 2 h. Le précipité jaune formé est essoré et lavé au moyen de 100 ml d'eau. Afin d'éliminer le composé dinitré **7** formé lors de réaction, le gâteau est dissous dans une solution aqueuse saturée d'hydrogencarbonate de sodium. Le dérivé dinitré est essoré, et après acidification du filtrat à 0°C avec une solution d'HCl 12 N, on recueille un précipité jaune qui est essoré, lavé à l'eau et séché. (Rdt = 70%; F = 172°C) IR (KBr) 1710 (C = O); 1515, 1335 (NO₂). RMN ¹H (DMSO-d₆): (1H, s, H3) 7,55; (1H, s, H6) 7,25; (2H, s, CH₂) 6,25; (1H, s, OH) 6,20.

Chlorure de 4,5-méthylènedioxy-2-nitrobenzoyle 8

5 g (0,23 mol) d'acide 4,5-méthylènedioxy-2-nitrobenzoïque **6** sont mis en suspension dans 50 ml de chlorure de thionyle et chauffés au reflux pendant 2 h. La solution brune obtenue est concentrée sous pression réduite. L'huile résiduelle cristallise dès l'addition de 50 ml d'éther de pétrole. Les cristaux sont essorés et recristallisés dans l'éther éthylique. (Rdt = 90%; F = 70°C). IR (KBr) 1775 (C = O); 1500, 1335 (NO₂). RMN ¹H (DMSO-d₆): (1H, s, H3) 7,50; (1H, s, H6) 7,05; (2H, s, CH₂) 6,25.

Acide 4-hydroxy-1-(4,5-méthylènedioxy-2-nitrobenzoyl) pyrrolidine-2-carboxylique 9

Dans un tricol de 2 l muni de 2 ampoules à brome et d'un thermomètre, refroidi par un bain de glace, 13,1 g (0,1 mol) de *trans*-4-hydroxyproline en solution dans 200 ml d'eau sont agités. Par une ampoule à brome, on ajoute goutte à goutte 22,8 g (0,1 mol) de chlorure d'acide **8** en solution dans 150 ml d'acétone, de façon à ce que la température reste comprise entre 15 et 20°C. Simultanément, une solution d'hydroxyde de sodium à 40% est également ajoutée goutte à goutte de façon à ce que le pH du mélange réactionnel demeure alcalin. L'agitation est poursuivie 30 min à température ambiante. L'acétone est éliminée sous vide. La solution aqueuse est acidifiée au moyen d'HCl 12 N, puis abandonnée 24 h. Les cristaux formés sont essorés, lavés à l'eau et recristallisés dans l'isopropanol. (Rdt = 75%; F = 230°C). Anal C₁₃H₁₂N₂O₈ (C, H, N). IR (KBr) 3380 (OH); 1730, 1620 (C = O); 1520, 1335 (NO₂). RMN ¹H (DMSO-d₆): (1H, s, H3) 7,65; (1H, s, H6) 6,80; (2H, s, CH₂) 6,25; (1H, s, OH) 4,30; (1H, t, H2) 4,40; (1H, s, H4) 3,45; (2H, m, H5), 3,00; (2H, m, H3) 2,10.

(2R, 11aS)-1,2,3,10,11,11a-hexahydro-2-hydroxy-7,8-méthylènedioxy-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazépine-5,11-dione 10

On dissout 10 g de chlorure stanneux dans un mélange de 10 ml d'acide acétique et 25 ml d'HCl 12 N. 5 g (0,015 mol) de l'acide **9** sont mis en solution dans 10 ml de diméthylformamide. Ces deux solutions sont réunies et agitées pendant 1 h à température ambiante puis 30 min dans un bain-marie bouillant. La solution obtenue est refroidie puis alcalinisée au moyen d'une solution d'hydroxyde de sodium. La suspension blanche obtenue est filtrée, le gâteau est séché puis repris dans de l'isopropanol bouillant, l'hydroxyde d'étain est séparé et l'isopropanol est éliminé sous vide. Le résidu blanc est recristallisé dans l'isopropanol. (Rdt = 85%; F = 244°C). Anal C₁₃H₁₂N₂O₅ (C, H, N). IR (KBr) 3480 (OH); 3250 (NH); 1680, 1620 (C = O). RMN ¹H (DMSO-d₆): (1H, s, NH) 10,20; (1H, s, H6) 7,10; (1H, s, H9) 6,55; (2H, s, CH₂) 6,00; (1H, s, OH) 5,05; (1H, t, H2) 4,25; (1H, H11a) 4,10; (2H, m, H3) 3,45; (2H, m, H1) 2,60 et 1,95.

(2R, 11aS)-2-acétoxy-1,2,3,10,11,11a-hexahydro-7,8-méthylènedioxy-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazépine-5,11-dione 11
5 g (0,018 mol) du dérivé **10** en solution dans un mélange de 50 ml d'acide acétique et 10 ml d'anhydride acétique sont

chauffés au reflux pendant 1 h. À la solution brune obtenue, on additionne 70 ml d'eau, ce mélange réactionnel est abandonné 12 h à température ambiante. Les cristaux blancs formés sont essorés, lavés à l'eau, séchés et recristallisés dans l'isopropanol. (Rdt = 95%; F > 260°C). Anal C₁₅H₁₄N₂O₆ (C, H, N). IR (KBr) 3240 (NH); 1730, 1690, 1620 (C = O). RMN ¹H (DMSO-d₆): (1H, s, NH) 10,35; (1H, s, H6) 7,15; (1H, s, H9) 6,65; (2H, s, CH₂) 6,10; (1H, m, H2) 5,25; (1H, H11a) 4,20; (2H, dd, H3) 3,60 et 3,85; (2H, m, H1) 2,20 et 2,75; (3H, s, CH₃) 2,00.

(2R, 11aS)-2-acétoxy-1,2,3,10,11,11a-hexahydro-7,8-méthylènedioxy-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazépine-5-one-11-thione 12

8 g (0,025 mol) de l'acétate **11** et 8 g du réactif de Lawesson dans 500 ml de benzène sont chauffés au reflux pendant 6 h. L'insoluble jaune est essoré, lavé à l'éther éthylique et recristallisé dans l'isopropanol. (Rdt = 93%; F = 252°C). Anal C₁₅H₁₄N₂O₅S (C, H, N, S). IR (KBr) 3200 (NH); 1720, 1640 (C = O). RMN ¹H (DMSO-d₆): (1H, s, NH) 15,45; (1H, s, H6) 7,25; (1H, s, H9) 6,80; (2H, s, CH₂) 6,10; (1H, m, H2) 5,30; (1H, H11a) 4,40; (2H, dd, H3) 3,50 et 3,75; (2H, m, H1) 2,20 et 3,40; (3H, s, CH₃) 2,00.

(2R, 11aS)-2-acétoxy-1,2,3,10,11,11a-hexahydro-7,8-méthylènedioxy-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazépine-5-11-dithione 13

À 3 g de l'acétate **11** en solution dans 100 ml de 1,4-dioxane, on additionne un excès de réactif de Lawesson. Le mélange réactionnel est chauffé au reflux pendant 5 h. Le dioxane est ensuite éliminé sous vide, le résidu est repris par de l'isopropanol. L'insoluble est recristallisé dans l'isopropanol. (Rdt = 72%; F > 260°C). Anal C₁₅H₁₄N₂O₄S₂ (C, H, N, S). IR (KBr) 3240 (NH); 1720 (C = O). RMN ¹H (DMSO-d₆): (1H, s, NH) 12,55; (1H, s, H6) 7,50; (1H, s, H9) 6,70; (2H, s, CH₂) 6,15; (1H, m, H2) 5,45; (1H, H11a) 4,75; (2H, m, H3) 4,00; (2H, m, H1) 2,40 et 2,10; (3H, s, CH₃) 2,10.

(2R, 11aS)-2-acétoxy-1,2,3,11a-tétrahydro-7,8-méthylènedioxy-11-méthylthio-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazépine-5-one 14

À une solution de 6,8 g (0,021 mol) d'acétate **12** dans 60 ml de tétrahydrofurane, on ajoute 2 équivalents d'iodure de méthyle et 12 g de carbonate de potassium. Le mélange réactionnel est agité pendant 17 h à température ambiante. L'insoluble est filtré et le filtrat est évaporé sous vide. Le résidu est repris par de l'éther éthylique et recristallisé dans l'éther éthylique. (Rdt = 87%; F = 138°C). Anal C₁₆H₁₆N₂O₅S (C, H, N, S). IR (KBr) 1740 (C = O). RMN ¹H (DMSO-d₆): (H1, s, H6) 7,20; (1H, s, H9) 6,70; (2H, s, CH₂) 6,10; (1H, m, H2) 5,30; (1H, H11a) 4,30; (2H, dd, H3) 3,65 et 2,75; (2H, m, H1) 2,10 et 2,70; (3H, s, CH₃) 2,45; (3H, s, CH₃) 2,00.

(2R, 11aS)-1,2,3,11a-tétrahydro-2-hydroxy-7,8-méthylènedioxy-11-méthylthio-5H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazépine-5-one 15

À 1 g (0,002 mol) du thioéther **14** dans 30 ml de méthanol, on ajoute 60 mg de borohydrure de sodium. Le mélange réactionnel est agité 2 h à température ambiante. Le méthanol est éliminé sous vide. Le résidu est repris par de l'eau, le précipité blanc qui se forme est séparé et recristallisé dans l'éther éthylique. (Rdt = 60%; F = 208°C). Anal C₁₄H₁₄N₂O₄S (C, H, N, S). IR (KBr) 3340 (OH); 1660 (C = O). RMN ¹H (DMSO-d₆): (1H, s, H6) 7,310; (1H, s, H9) 6,55; (2H, s, CH₂) 5,90; (1H, m, H2) 4,55; (1H, H11a) 4,15; (2H, dd, H3) 3,55 et 3,85; (2H, m, H1) 2,10 et 2,70; (3H, s, CH₃) 2,35.

(2R, 11aS)-2-acétoxy-1,2,3,11a-tétrahydro-2-hydroxy-7,8-méthylènedioxy-11-méthylthio-5H-pyrrolo[2,1-c] [1,4]benzodiazépine-5-thione 16

À une solution de 0,8 g (0,002 mol) d'acétate **13** dans 25 ml de tétrahydrofurane, on ajoute 2 équivalents d'iodure de méthyle et 1,2 g de carbonate de potassium. Le mélange réactionnel est agité pendant 17 h à température ambiante. L'insoluble est essoré et le filtrat est évaporé sous vide. Le résidu est repris par de l'éther éthylique et recristallisé dans l'acétone. (Rdt = 67% ; F = 198°C). Anal C₁₆H₁₆N₂O₄S₂ (C, H, N, S). IR (KBr) 1730 (C = O). RMN ¹H (DMSO-d₆) : (1H, s, H6) 7,60 ; (1H, s, H9) 6,70 ; (2H, s, CH₂) 6,10 ; (1H, m, H2) 5,45 ; (1H, H11a) 4,60 ; (2H, dd, H3) 4,00 et 4,15 ; (2H, m, H1) 2,90 et 2,60 ; (3H, s, CH₃) 2,45 ; (3H, s, CH₃) 2,05.

(2R, 11aS)-1,2,3,10,11,11a-hexahydro-2-hydroxy-7,8-méthylènedioxy-5H-pyrrolo[2,1-c] [1,4]-benzodiazépine-11-thione 18

À 2,2 g (0,006 mol) de la thione **12** en solution dans 18 ml de tertiobutanol, on ajoute par petites fractions 5 g de borohydrure de sodium. Le mélange réactionnel est chauffé au reflux pendant 4 h. Pendant ce reflux sont additionnés toutes les heures 2 ml de méthanol. Le mélange verdâtre obtenu est repris par 10 ml d'eau. L'insoluble est filtré, séché et recristallisé dans l'isopropanol. (Rdt = 76% ; F = 226°C). Anal C₁₃H₁₄N₂O₃S (C, H, N, S). IR (KBr) 3320 (OH et NH). RMN ¹H (DMSO-d₆) : (1H, s, H6) 7,50 ; (1H, s, H9) 6,30 ; (2H, s, CH₂) 5,90 ; (1H, s, OH) 5,15 (1H, m, H3) 3,80 et 3,40 ; (2H, m, H1) 2,15 et 1,95.

(2R, 11aS)-2-acétoxy-11-acétylthio-1,2,3,11a-tétrahydro-7,8-méthylènedioxy-5H-pyrrolo[2,1-c] [1,4] benzodiazépine 19

1,1 g (0,004 mol) de la thione **18** en solution dans 10 ml d'acide acétique et 3 ml d'anhydride acétique sont chauffés au reflux pendant 1 h. L'acide et l'anhydride acétique sont éliminés sous vide, l'huile résiduelle est reprise par de l'éther éthylique. L'insoluble est essoré, séché et recristallisé dans l'isopropanol. (Rdt = 75% ; F = 144°C). Anal C₁₇H₁₈N₂O₅S (C, H, N, S). IR (KBr) 1740, 1665 (C = O). RMN ¹H (DMSO-d₆) : (1H, s, H6) 7,25 ; (1H, s, H9) 7,05 ; (2H, s, CH₂) 6,15 ; (1H, m, H2) 5,30 ; (1H, H11a) 4,50 ; (2H, H5) 4,00 ; (2H, m, H3) 4,30 et 3,40 ; (2H, m, H1) 2,30 ; (3H, s, CH₃) 2,00 ; (3H, s, CH₃) 1,68.

(2R, 11aS)-11-hydrasino-1,2,3,11a-tétrahydro-2-hydroxy-7,8-méthylènedioxy-5H-pyrrolo[2,1-c] [1,4] benzodiazépine-5-one 20

Une solution de 0,5 g (1,43 mol) d'acétate **14** dans 35 ml d'éthanol et 2 ml d'hydrazine est chauffée au reflux pendant 4 h. Le mélange réactionnel est évaporé sous vide, on additionne de l'eau, l'insoluble est essoré, séché et recristallisé dans l'éthanol. (Rdt = 48% ; F = 176°C). Anal C₁₃H₁₃N₄O₄ (C, H, N). IR (KBr) 3340 (OH) ; 2940, 2880 (NH) ; (1640 (C = O)). RMN ¹H (DMSO-d₆) : (1H, s, H6) 7,00 ; (1H, s, H9) 6,65 ; (2H, s, CH₂) 5,95 ; (3H, m, NH) 5,95 ; (1H, d, H2) 4,95 ; (1H, t, H11a) 4,25 ; (2H, dd, H3) 3,50 et 3,35 ; (2H, m, H1) 2,75 et 1,90.

(2R, 11aS)-2-acétoxy-1,2,3,10,11,11a-hexahydro-7,8-méthylènedioxy-5H-pyrrolo[2,1-c] [1,4] benzodiazépine-5-one 22

À 2 g (0,006 mol) du thioéther **14** dans 300 ml d'éthanol, on additionne un excès de nickel de Raney. Le mélange réaction-

nel est chauffé au reflux pendant 4 h. Ce mélange est filtré et le filtrat est éliminé sous vide. Le résidu jaune subit une purification par chromatographie sur silice, on obtient alors un solide blanc. (Tdt = 50% ; F = 208°C). Anal C₁₅H₁₆N₂O₅ (C, H, N). IR (KBr) 1720, 1620 (C = O). RMN ¹H (CDCl₃) : (1H, s, H6) 7,55 ; (1H, s, H9) 6,20 ; (2H, s, CH₂) 5,90 ; (1H, H2) 5,30 ; (1H, NH) 4,35 ; (1H, H11a) 3,95 ; (2H, H11) 3,95 ; (2H, H3) 3,60 et 3,25 ; (2H, m, H1) 2,35 et 1,95.

Étude pharmacologique in vitro

Les produits étudiés ont été dissous à 10⁻² M dans du diméthylsulfoxyde puis dilués en milieu aqueux. La méthode utilisant le Microculture Tetrazolium Assay (MTA) a été employée.

Le paramètre mesuré est la réduction d'un sel de tétrazolium, le MTT, qui est jaune et soluble, en cristaux de formazane, pourpres et insolubles, par les enzymes mitochondriales de la chaîne respiratoire. La densité optique mesurée est directement proportionnelle au nombre de cellules viables.

Les cellules L1210, à 10⁴ cellules/ml, sont incubées pendant 48 h avec les produits à tester (3 fois 9 concentrations) puis le MTT est ajouté à 0,5 mg/ml pendant 4 h. Le surnageant est éliminé et la densité optique est mesurée. Les résultats sont exprimés en CI50, concentration du produit qui inhibe à 50% la densité optique des cellules traitées par rapport aux témoins.

Références

- 1 Leimgruber W, Stefanovic V, Schenker F, Karr A, Berger J (1965) *J Am chem Soc* 87, 5791-5793
- 2 Takeuchi T, Miyamoto M, Ishizuka M, Naganawa H, Kondo S, Hamada M, Umezawa H (1976) *J Antibiotics* 29, 93-96
- 3 Konishi M, Hatori M, Tomita K, Sugawara W, Ikeda C, Nishiyama Y, Imanishi H, Miyaki T, Kawaguchi H (1984) *J Antibiotics* 37, 191-199
- 4 Thurston DE, Hurley LH (1983) *Drugs Future* 8, 957-971
- 5 Hurley LH, Thurston DE (1984) *Pharm Res* 2, 52
- 6 Remers WA (1988) In: *The Chemistry of the Antitumor Antibiotics*. Vol 2, 28. John Wiley & sons, Chichester
- 7 Hertzberg RP, Hecht SM, Reynolds VL, Molineux IJ, Hurley LH (1986) *Biochemistry* 25, 1249-1258
- 8 Hurley LH, Reck T, Thurston DE (1988) *Chem Res Toxicol* 1, 258
- 9 Mandal SB, Giri VS, Pakrashi SC (1988) *Heterocycles* 27, 11-12
- 10 Mandal SB, Giri VS, Sabeena MS, Pakrashi SC (1988) *J Org Chem* 53, 4236-4241
- 11 Albert A, Catteral G (1967) *J Chem Soc (C)* 1533
- 12 Meyers AI, Durandetta JL (1975) *J Org Chem* 40, 2021-2025
- 13 Konishi M, Ohkuma H, Naruse N, Kawaguchi H (1984) *J Antibiotics* 37, 200-206
- 14 Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd M (1988) *Cancer Res* 48, 589-601
- 15 Geran RI, Greenberg NH, MacDonald MD, Schumacher AM, Abbott BJ (1972) *Cancer Chemother Rep* 3, 1-101