

# SYNTHESE DE NOUVELLES QUINONES HETEROCYCLIQUES PAR APPLICATION DES REACTIONS DE CYCLOADDITIONS DE DIELS-ALDER ET 1,3-DIPOLAIRE. EVALUATION IN VITRO DE LEUR ACTIVITE SUR TOXOPLASMA GONDII

Muriel Compain-Batissou Cudel

#### ► To cite this version:

Muriel Compain-Batissou Cudel. SYNTHESE DE NOUVELLES QUINONES HETEROCY-CLIQUES PAR APPLICATION DES REACTIONS DE CYCLOADDITIONS DE DIELS-ALDER ET 1,3-DIPOLAIRE. EVALUATION IN VITRO DE LEUR ACTIVITE SUR TOXOPLASMA GONDII. Chimie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT: . tel-00281991

### HAL Id: tel-00281991 https://theses.hal.science/tel-00281991

Submitted on 28 May 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

#### UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I FACULTE DE PHARMACIE INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

 $N^{\circ}$  d'ordre 346-2007

Année 2007

#### THESE

présentée

#### devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

#### du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

# présentée et soutenue publiquement le 20 décembre 2007

par

#### Mme COMPAIN-BATISSOU Muriel Epouse CUDEL

#### SYNTHESE DE NOUVELLES QUINONES HETEROCYCLIQUES PAR APPLICATION DES REACTIONS DE CYCLOADDITIONS DE DIELS-ALDER ET 1,3-DIPOLAIRE. EVALUATION IN VITRO DE LEUR ACTIVITE SUR TOXOPLASMA GONDII

#### Directeurs de thèse : N. Walchshofer et M.E. Sarciron

JURY : M R. ESCALE M P. RATHELOT Mme C. PINEL Mme N. WALCHSHOFER Melle M.E. SARCIRON M Z. BOUAZIZ Professeur Université de Montpellier, Président Professeur Université de Marseille. MCU Université de Grenoble. Professeur Université de Lyon1 Professeur Université Lyon1 MCU Université de Lyon1

### **UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I**

**Président de l'Université** Vice-Président du Conseil Scientifique Vice-Président du Conseil d'Administration Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire Secrétaire Général

#### M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX M. le Professeur J. LIETO M. le Professeur D. SIMON M. G. GAY

### SECTEUR SANTE

### **Composantes**

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche UFR de Médecine Lyon-Nord UFR de Médecine Lyon-Sud UFR d'Odontologie Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine Directeur : M. le Professeur P. COCHAT Directeur : M. le Professeur X. MARTIN Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY Directeur : M. O. ROBIN Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

### SECTEUR SCIENCES

### **Composantes**

UFR de Physique UFR de Biologie UFR de Mécanique UFR de Génie Electrique et des Procédés UFR Sciences de la Terre UFR de Mathématiques UFR d'Informatique UFR de Chimie Biochimie UFR STAPS Observatoire de Lyon Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon IUT A IUT B Institut de Science Financière et d'Assurances Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK Directeur : M. le Professeur H. PINON Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID Directeur : M. le Professeur G. CLERC Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE Directeur : M. le Professeur H. PARROT Directeur : M. C. COLLIGNON Directeur : M. le Professeur R. BACON Directeur : M. le Professeur J. LIETO Directeur : M. le Professeur M. C. COULET Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE Directeur : M. le Professeur J. C. AUGROS

Je dédie cette thèse à mon cher mari, ainsi qu'à ma chère mère

A tous ceux qui nourris de sciences,

sont morts de faim

#### REMERCIEMENTS

Ce travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein des laboratoires de Chimie Organique et de Parasitologie de la faculté de pharmacie de l'Université Lyon 1, à l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologique

Nous souhaitons remercier les Professeurs N. Walchshofer et M.E. Sarciron pour avoir acceptée d'être mes directrices de thèses. Nous vous remercions pour m'avoir accompagnée durant ces quelques années. Nous remercions les Professeurs H. Fillion, et A.F. Pétavy qui m'ont accueillie dans leur laboratoire respectif.

Nous souhaitons exprimer notre plus vive gratitude à M. Z. Bouaziz, qui m'accompagné, prodigué des conseils, encadré pour la partie chimique. Ces qualités de pédagogue transparaissaient dans ces enseignements, nous avons été ravie d'avoir pu travailler sous sa direction, pour sa gentillesse et son efficace contribution pour la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions le Professeur M.E. Sarciron, qui m'a encadré pour ce travail d'évaluation

A Messieurs les Professeurs R. Escale, P. Rathelot et à Mme C. Pinel, MCU. Nous avons été très sensible à l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger cette thèse. Nous tenons à leur exprimer notre respectueuse gratitude et considération.

Nous sommes également reconnaissant à Mme M. Domard d'avoir eu l'amabilité de réaliser les calculs théoriques des orbitales moléculaires pour certains de nos composés.

Nous ne pouvons oublier de remercier Jacques Gentili, pour son efficace contribution, pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

Nous exprimons notre gratitude à Philippe Lawton, qui a accepté de partager son bureau pour m'accueillir, qui m'a évité quelques difficultés et errements sur ce travail d'évaluation.

J'exprime ma gratitude à mon mari, Frédéric, qui n'y croyait plus, et à ma mère, Rose-Marie, qui m'a toujours encouragée à aller le plus loin possible.

Je souhaite remercier ceux ont partagé ma vie de laboratoire pendant ces années, en particulier Abbass Taleb et Samar Issa, deux rayons de soleil, à Eric Le Roux, pour sa gentillesse.

# LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique		
ARN	Acide ribonucléique		
ATP	Adénosine triphosphate nucléoside		
9-BBN	9-borabicyclo[3.3.1]nonane		
BBr <sub>3</sub>	Tribromure de bore		
BSA	bovine serum albumine		
$C_2H_5I$ ,	Iodure d'éthyle		
CI 50	Concentration inhibitrice 50 %		
$Cu(NO_3)_2$	Nitrate de cuivre		
Cu <sub>2</sub> O	Oxyde cuivreux		
CuBr	Bromure cuivreux		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	dichlorométhane		
DMF	diméthylformamide		
DMSO	Diméthylsulfoxide		
éq	équivalent		
$H_2SO_4$	Acide sulfurique		
HCl	Acide chlorhydrique		
HDQ	1-Hydroxy-2-Docécyl-4(1H) Quinolone		
HFF	human foreskin fibloblast : fibroblaste humain de prépuce		
НМРТ	Hexaméthylphosphorus triamide		
Ki	constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur		
КОН,	Potasse		
LDA	Lithium diisopropylamide		
Μ	Mole		
MOMCl	chlorométhyl méthyl éther		
NADH	Nicotinamide-adénine-dinucléotide		
NaI	Iodure de sodium		
NaOH	Soude		
NBS	N-bromosuccinimide		
NOE	Nuclear Overhauser effect : effet Overhauser nucléaire		
PBS	Phosphate buffered saline : tampon phosphate		
PCA	passive cutaneous anaphylaxis		
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Triphénylphosphine de palladium		
PdCl <sub>2</sub>	Chlorure de palladium		
Ppm	Partie par million		
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship		
RMN	Résonnance magnétique nucléaire		
t BuOH	<i>Tert</i> -butanol		
t BuOK	Tert-butanolate		
t.a.	Température ambiante		
t-BuOOH	tert-butyl hydroperoxyde		
THF	Tétrahydrofurane		
TMSCl	Chlorure de triméthylsilyle		
UTP	Uridine triphosphate		

# SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE I : SYNTHESE	4
CHAPITRE 1 : LES ORTHO-CARBAZOLEQUINONES ET DERIVES	5
I-DONNEES BIBLIOGRAPHIOUES	6
1) Alcaloïdes de structure ortho-carbazoleauinone	6
2) Activités biologiques décrites pour ces alcaloïdes :	
3) Les différentes voies de sonthèse des ortho-carbazolequinones	7
4) Synthèse des henzocarhazole-5 6-diones	
5) Réactions de Diels-Alder mettant en jeu des ortho-aujnones	
II TRAVALLY PERSONNELS	
1) Synthèse de garbazola 12 dionas :	
2) Pégations de publicadditions [4, 2] de la carbazole 1,2 dione	
2) Reactions de cyclodaditions [4+2] de la carbazole-1,2-alone	
5) Synthese de la carbazole-5,4-alone :	
4) Oxydation de l'aminocarbazole avec le sel de Frèmy	
5) Réactions de cycloadditions [4+2] de la carbazole-3,4-dione	
5.1) Réaction avec l'acétoxybutadiène	
5.2) Reaction avec le cyclobutadiene	
5.5) Reaction avec un azadiene	
CHAPITRE 2 : CYCLOADDITIONS DIPOLAIRES-1,5 SUR DES PARA-CARBAZOLEQUINC	JNES 28
I-DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	
1) Alcaloïdes de structures para-carbazolequinones	
2) Activités biologiques décrites pour ces alcaloïdes	
3) Carbazolequinones ayant montré des propriétés biologiques intéressantes : antiparasitaires, a antibactériennes.	ntitumorales, 32
4) Cycloaddition de para-quinones avec les oxydes de nitriles	
5) Cycloaddition de para-quinones avec les azotures	
II-TRAVAUX PERSONNELS	
1) Synthèse des para-carbazolequinones	
2) Synthèse des oxydes de nitriles	
3) Cycloaddition dipolaire-1,3 entre les para-carbazolequinones et les oxydes de nitriles	
3.1) Réaction avec la <i>para</i> -carbazolequinone non bromée	
3.2) Réaction avec les bromocarbazolequinones	
3.2.1) Réaction avec la 2-bromocarbazolequinone	55
3.2.2) Réaction avec la 3-bromocarbazolequinone	56
3.3) Détermination structurale	57
3.4) Etude de l'orientation de la cycloaddition par la théorie des orbitales frontières	58
3.5) Conclusion	61
4) Synthèse des azotures	61
5) Cycloaddition dipolaire-1,3 entre les para-carbazolequinones et les azotures	
5.1) Réaction avec la <i>para</i> -carbazolequinone non bromée	62
5.2) Réaction avec les bromocarbazolequinones	63
5.2.1) Réaction avec la 2-bromocarbazolequinone	64
5.2.2) Réaction avec la 3-bromocarbazolequinone	65
5.3) Détermination structurale	65
5.4) Etude de l'orientation de la cycloaddition par la théorie des orbitales frontières	
5.5) Conclusion	
CHAPIIKE 5 : PARTIE EXPERIMENTALE	
MATERIELS ET METHODES	71

PARTIE II : ACTIVITES BIOLOGIQUES	
CHAPITRE 1 : TOXOPLASMA GONDII ET LA TOXOPLASMOSE	
I TOXOPLASMA GONDII	
1) Découverte du parasite	
2) Classification et taxonomie	
3) Morphologie	
3.1) Tachyzoïte ou trophozoïte	
3.2) Kyste	
3.3) Oocyste	
4) Cvcle	
4.1) Félidé : hôte définitif	
4.2) Animaux homéothermes : hôtes intermédiaires	
4.3) La sporulation	
II LA TOXOPLASMOSE	
1) Epidémiologie	
2) Physiopathologie	
2.1) Rôle de l'immunité	
2.2) Facteurs de pathogénicité	114
2.3) Physiopathologie des lésions	115
3) Tableau clinique	
3.1) Toxoplasmose chez le sujet immunocompétent	116
3.1.1. La toxoplasmose ganglionnaire	116
3.1.2. Les atteintes oculaires	116
3.1.3. Formes sévères de toxoplasmose	116
3.1.4. Evolution	117
3.2) Toxoplasmose chez l'immunodéprimé	117
3.2.1. Toxoplasmose cérébrale	
3 2.2. Toxoplasmose extra-cérébrale	
3.2.2.1. Localisation oculaire	118
3.2.2.2. Localisation pulmonaire	119
3 2.2.3. Autres localisations et formes disséminées	119
3.3) Toxoplasmose congénitale	119
4) Diagnostic	
5) Principaux schémas thérapeutiques	
5 1 Toxoplasmose en dehors de la grossesse, chez l'immunocompétent	
5 2 Traitement de la toxoplasmose congénitale	
5 2 1 Traitement ante - natal : prévention de la transmission materno-foetale	
5 2 2 Traitement congénital de l'enfant	
5 3 Toxoplasmose chez l'immunodéprimé	
5 3 1 Traitement curatif	
5 3 2 Traitement prophylactique secondaire	
CHAPITRE 2 : TEST D'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE TOXOPLASMA GONDII	
I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	
1) Principaux médicaments	
1.1) Les macrolides et apparentés	
1 2) Inhibiteurs de la déshydrofolate réductase (DHFR)	
1.3) Les sulfamides	
1 4) Autres médicaments	
2) Autres molécules actives contre Toxoplasma gondii	
II TRAVAUX PERSONNELS	161
1) Introduction	161
2) Matériels et méthodes	

2.1) Culture cellulaire	161
2 1 1 Milieux	161
2 1 1 1Milieu incomplet :	161
2 1 1 2 Milieu complet	161
2 1 2 Cellules	162
2 1 2 1 THP 1	162
2 1 2 2 Toxoplasma gondii souche RH	162
2 2) Test de cytotoxicité	162
2 3) Test d'inhibition de la croissance de <i>T. gondii</i>	164
3) Résultats et Discussion	167
4) Conclusion :	171
CHAPITRE 3 : TEST D'INHIBITION DE LA PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE DE TOXOPLASMA GONDII	172
CHAPITRE 3 : TEST D'INHIBITION DE LA PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	<b> 172</b>
CHAPITRE 3 : TEST D'INHIBITION DE LA PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE DE TOXOPLASMA GONDII I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES II TRAVAUX PERSONNELS	<b> 172</b> 173 178
CHAPITRE 3 : TEST D'INHIBITION DE LA PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE DE TOXOPLASMA GONDII I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES II TRAVAUX PERSONNELS 1) Introduction	<b> 172</b> 173 178 <i>17</i> 8
CHAPITRE 3 : TEST D'INHIBITION DE LA PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE DE TOXOPLASMA GONDII I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES II TRAVAUX PERSONNELS 1) Introduction 2) Matériels et méthodes	<b> 172</b> 173 178 <i>178</i> <i>178</i>
CHAPITRE 3 : TEST D'INHIBITION DE LA PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE DE TOXOPLASMA GONDII I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES II TRAVAUX PERSONNELS 1) Introduction 2) Matériels et méthodes 3) Résultats	<b> 172</b> 173 178 <i>178</i> <i>178</i> <i>179</i>
CHAPITRE 3 : TEST D'INHIBITION DE LA PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE DE TOXOPLASMA GONDII I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES II TRAVAUX PERSONNELS 1) Introduction 2) Matériels et méthodes 3) Résultats 4) Conclusion	<b> 172</b> 173 178 178 178 179 181
CHAPITRE 3 : TEST D'INHIBITION DE LA PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE DE TOXOPLASMA GONDII I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES II TRAVAUX PERSONNELS 1) Introduction 2) Matériels et méthodes 3) Résultats 4) Conclusion CONCLUSION GENERALE	172 173 178 178 178 179 181 182
CHAPITRE 3 : TEST D'INHIBITION DE LA PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE DE TOXOPLASMA GONDII	172 173 178 178 178 179 181 182 185

# INTRODUCTION GENERALE

La toxoplasmose due au parasite *Toxoplasma gondii* est une maladie infectieuse qui touche les animaux et les hommes. Il s'agit d'une anthropozoonose ubiquitaire, habituellement bénigne et asymptomatique chez l'immunocompétent. La toxoplasmose se révèle redoutable chez l'immunodéprimé ou le foetus. La première complication est la survenue d'une toxoplasmose aiguë létale chez l'immunodéprimé, la deuxième complication est la réactivation du parasite à l'occasion d'une immunodéprission, comme par exemple dans les toxoplasmoses cérébrales. L'atteinte oculaire (choriorétinite) est possible chez l'immunodéprimé comme chez l'immunocompétent. La troisième complication est la transmission transplacentaire du parasite au fœtus, ce qui donne la toxoplasmose congénitale. Les conséquences sont variables en fonction de l'âge de la grossesse au moment de l'infection. Les conséquences vont de l'avortement spontané à la mort fœtale *in utero*, des choriorétinites jusqu'à des formes asymptomatiques. Malgré de nombreuses recherches, concernant à la fois le développement de nouveaux médicaments et celui de vaccin, l'arsenal thérapeutique reste très restreint.

L'objectif des travaux présentés dans ce mémoire est de synthétiser des molécules et d'évaluer leur efficacité sur *T. gondii*. Ce mémoire est consacré dans un premier volet à la synthèse de carbazolequinones, comprenant des *ortho*-carbazolequinones et des *para*-carbazolequinones, et dans un deuxième volet à l'évaluation biologique des composés sur *Toxoplasma gondii*.

Les carbazolequinones sont des molécules qui ont montré des propriétés biologiques intéressantes. Un produit naturel comme la Calothrixine A extraite d'une cyanobactérie a montré une activité antimalarique à des concentrations nanomolaires.



Calothrixine A (*Calothrix cyanobacteria*)

Concernant les *ortho*-carbazolequinones, nous nous intéressons à la réaction de Diels-Alder mettant en jeu ces quinones avec des carbodiènes, comme l'acétoxybutadiène ou le cyclopentadiène. Nous obtenons ainsi des benzocarbazole-5,6-diones. Concernant les *para*carbazolequinones, nous nous intéressons aux réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire mettant en jeu ces quinones en tant que dipolarophiles et des dipôles comme les oxydes de nitriles et les azotures. Nous nous intéressons en particulier à la régiosélectivité de ces cycloadditions. Nous obtenons ainsi des isoxazolocarbazole-4,10-diones et triazolocarbazole-4,10-diones. Structure ortho-carbazolequinone





Concernant l'évaluation biologique *in vitro* des composés synthétisés, nous examinons la cytotoxicité, l'inhibition de la croissance des tachyzoïtes ainsi que l'inhibition potentielle de la purine nucléoside phosphorylase (PNP) enzyme clé de la voie de sauvetage des purines, seule voie d'accès pour le parasite aux bases puriques. Le blocage de ce métabolisme entraîne la mort du parasite.

### **PARTIE I : SYNTHESE**

**CHAPITRE 1 : LES ORTHO-CARBAZOLEQUINONES ET DERIVES** 

#### **I-DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

Dans un premier volet de cette partie bibliographique, nous nous sommes intéressés aux alcaloïdes de structure *ortho*-carbazolequinones : leurs propriétés biologiques et les différentes voies de leur synthèse. Dans un deuxième volet, nous nous sommes intéressés à la réaction de Diels-Alder mettant en jeu des *ortho*-quinones, en nous limitant toutefois aux *ortho*-carbazolequinones et à des structures assez proches qui sont les *ortho*-indoloquinones.

Structure ortho-carbazolequinone



carbazole-3,4-dione

carbazole-1,2-dione

Structure ortho-indoloquinone



#### 1) Alcaloïdes de structure ortho-carbazolequinone

Des produits naturels de structure ortho-carbazolequinone (Schéma 1) ont été isolés' à partir de divers *Streptomyces* : *Streptomyces exfoliatus* 2419-SVT2 <sup>1 2 3</sup>, *Streptomyces viridochromogenes* 2942-SVS3 <sup>4</sup>, et *Streptomyces violaceus* 2448-SVT2 <sup>5</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> K. Shin-Ya, M. Tanaka, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto. *Tetrahedron Letters*, **1993**, <u>34</u> (31), 4943 - 4944.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> N. Orihara, K. Furihata, H. Seto. *The Journal of Antibiotics*, **1997**, <u>50</u> (11), 979 - 981.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> K. Shin-Ya, T. Kunigami, J. S. Kim, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto. *Biosc. Biotech. Biochem.*, **1997**, <u>61</u> (10), 1768 - 1769.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> K. Shin-Ya, S. Shimizu, T. Kunigami, K. Furihata, H. Seto. *The Journal of Antibiotics*, **1995**, <u>48</u> (7), 574 - 578.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> M. Tanaka, K. Shin-ya, K. Furihata, H. Seto. *The Journal of Antibiotics*, **1995**, <u>48</u> (4), 326 - 328.



#### 2) Activités biologiques décrites pour ces alcaloïdes :

Ces alcaloïdes ont montré des propriétés biologiques intéressantes et ont fait l'objet de nombreuses études. Nous pouvons citer :

- L'inhibition de la toxicité du L-glutamate et les propriétés antioxydantes pour la lavanduquinocine et les carquinostatines.

- L'inhibition de la peroxydation lipidique pour les carbazoquinocines A et B.

#### 3) Les différentes voies de synthèse des ortho-carbazolequinones

Une des voies de synthèses des carbazole-3,4-diones a pour étape clé une substitution électrophile effectuée sur une diméthoxyaniline par un cation complexe tricarbonyl fer du cyclohexadiène. Cette méthode <sup>6 7 8 9</sup> a permis la synthèse de molécules naturelles telles que la carbazoquinocine-C **3**, la carquinostatine-A **7** et la lavanduquinocine **9**.

La synthèse <sup>6</sup> de la carbazoquinocine-C **3** (Schéma 2) est ainsi réalisée à partir du 2,3diméthoxytoluène **10** commercial. Une bromation avec du *N*-bromosuccinimide NBS suivie d'une métallation en utilisant du *n*-butyllithium et une alkylation avec le 1-bromoheptane permettent d'obtenir le composé **12** avec un bon rendement. Ce dernier est ensuite nitré et réduit par hydrogénation catalytique pour donner l'aniline substituée **14**. La réaction avec le cation

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> H.J. Knölker, W. Frohner. *Tetrahedron Letters*, **1997**, <u>38</u> (9), 1535 - 1538

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> H.J. Knölker, W. Frohner. *Synlett*, **1997**, <u>9</u>, 1108 - 1110

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup>H.J. Knölker, E. Baum, K.R. Reddy. *Tetrahedron Letters*, **2000**, <u>41</u> (8), 1171 - 1174

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> H.J. Knölker, K.R. Reddy. Synlett, **1999**, <u>5</u>, 596 - 598

complexe **15** conduit au complexe **16** qui, par démétallation avec l'oxyde de triméthylamine dans l'acétone et déshydrogénation catalytique donne le composé **17**. Les deux dernières étapes correspondent à une déméthylation avec  $BBr_3$  puis une oxydation à l'air pour obtenir la carbazoquinocine-C.



Knölker et *al* 1999 <sup>9</sup> ont développé une cyclisation oxydative initiée par le palladium II d'un intermédiaire de type anilino-3,4-benzoquinone. Par cette stratégie, ils ont pu accéder à la carbazoquinocine-C **3** et à la carquinostatine-A **7** déjà synthétisées par la voie précédente. Nous décrivons, dans le schéma 3, la synthèse du composé **3**. Ce dernier est obtenu à partir du composé **12** en trois étapes avec un rendement global de 29%. Une déméthylation avec BBr<sub>3</sub> conduit au dérivé dihydroxylé **18** qui donne, après oxydation et addition nucléophile de l'aniline, l'anilinobenzoquinone **19** qui sera cyclisée dans l'acide acétique en présence de diacétate de palladium (Schéma 3).



La carbazoquinocine-C **3** a été également préparée  $^{10}$   $^{11}$  en quatre étapes à partir de la *para*-benzoquinone **20** avec un rendement global de 39% (Schéma 4).



La réaction du magnésien  $C_7H_{15}MgCl à -78^{\circ}C$  sur la quinone **22** conduit majoritairement à l'intermédiaire **23** qui, par oxydation en milieu acide donne le composé **3** avec un bon rendement.

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> H.J. Knölker, K.R. Reddy, A. Wagner . *Tetrahedron Letters*, **1998**, <u>39</u> (45), 8267 - 8270

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> H.J. Knölker, W. Frohner, K.R. Reddy. Synthesis 2002, <u>4</u>, 557 - 564

Les Carbazoquinocines 2, 3, 4, 5 et 6, ainsi que d'autres alcaloïdes naturels de structure carbazole ont été obtenus par une troisième voie de synthèse  $^{12}$   $^{13}$  utilisant comme produit de départ le 3-iodoindole-2-carboxaldéhyde 26. Nous illustrons cette voie par la synthèse de la carbazoquinocine-B 2 qui est obtenu en 9 étapes avec un rendement global de 15% (Schéma 5).



La protection de l'azote indolique avec un groupement benzène sulfonyle suivie d'une réaction de couplage avec un alcénylstannane conduit au composé **28**. Une réaction avec un magnésien puis un traitement par le chlorométhyl méthyl éther (MOMCl) permettent d'obtenir le composé **29**. Ce dernier chauffé dans *tert*-butanol en présence de *tert*-butanolate de potassium conduit au mélange des carbazoles **30** et **31**. La déprotection de **30** est complétée par un traitement avec de la soude 3M.

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> T. Choshi, H. Fujimoto, E. Sugino, S. Hibino. *Heterocycles*, **1996**, <u>43</u> (9), 1847 - 1854

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> T. Choshi, H. Fujimoto, C. Nagayama, E. Sugino, S. Hibino. J. Org. Chem., **1997**, <u>62</u> (8), 2535 - 2543

La réaction de **31** avec chlorure de triméthylsilyle (TMSCl) et d'iodure de sodium suivie d'un traitement par l'anhydride de trifluorométhanesulfonyle conduit au triflate 32. Ce dernier est alkylé par une réaction de couplage avec le 9-heptyl-9-BBN (9-heptyl-9-borabicyclo[3.3.1] nonane) en présence de PdCl<sub>2</sub>. L'heptylcarbazole 33 est traité par BBr<sub>3</sub> pour donner l'hydroxycarbazole 34 qui est ensuite oxydé par (PhSeO)<sub>2</sub>O conduisant à la carbazoquinocine-B 2.

Plus récemment, Aygün et Pindur 2000 et 2003<sup>14 15</sup> ont développé une voie de synthèse efficace permettant d'accéder à la carbazoquinocine-C 3 et à de nombreux analogues. L'étape clé est une réaction de cyclisation entre un 2-vinylindole et le chlorure d'oxalyle. Nous décrivons cette nouvelle méthode pour la synthèse du composé 3 à partir du 1-phénylsulfonylindole 35 (Schéma 6).



La première étape correspond à une alkylation du noyau indolique par addition nucléophile du carbanion formé en position 2, sur la 3-décanone conduisant à la formation de l'alcool 36. Ce dernier est déshydraté puis déprotégé pour donner un mélange des deux vinylindoles régioisomères 37 et 38 qui réagissent avec le chlorure d'oxalyle en formant la carbazoquinocine-C 3 et l'analogue 39.

Rawat et Wulff 2004<sup>16</sup> ont préparé la carbazoquinocine-C **3** via une réaction de cyclisation photochimique d'un complexe 3-indolylcarbène (Schéma 7).

 <sup>&</sup>lt;sup>14</sup> A. Aygun, U. Pindur. Synlett, **2000**, <u>12</u>, 1757 - 1760
<sup>15</sup> A. Aygun, U. Pindur. J. Heterocyclic Chem., **2003**, <u>40</u> (3), 411 - 417

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> M. Rawat, W.D. Wulff. Organic Letters, **2004**, <u>6</u> (3), 329 - 332.



#### Schéma 7

L'irradiation photochimique du complexe **40**, dans une atmosphère de monoxyde de carbone, engendre une insertion d'un CO puis cyclisation conduisant au carbazole substitué **41**. La carbazoquinocine-C **3** est obtenue à partir de ce dernier après les étapes de méthylation du groupement OH, déprotection de l'azote, déméthylation des fonctions méthyléther par BBr<sub>3</sub> et enfin oxydation par NaIO<sub>4</sub>.

#### 4) Synthèse des benzocarbazole-5,6-diones

Les benzocarbazolequinones qui intéressent notre étude bibliographique sont des molécules tétracycliques possédant un cycle benzénique accolé en C1-C2 ou en C3-C4, au noyau *ortho*-carbazolequinone (Schéma 8).



#### Schéma 8

Trois synthèses de benzocarbazole-5,6-diones sont décrites dans la littérature. Leur point commun est l'hétéro cyclisation d'une aminophénylhydroxynaphtoquinone en milieu acide selon une réaction d'addition nucléophile intramoléculaire de la fonction amine sur la quinone. Ces trois synthèses diffèrent par les méthodologies mises en œuvre pour accéder à ce précurseur.

La première méthode <sup>17</sup> consiste en un couplage de la *para*-bromoquinone **43** avec l'organostannane **44**, catalysé par Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> et CuBr, suivi d'une hydroxylation en position 3 de la quinone **45** à l'aide du tert-butyl hydroperoxyde (t-BuOOH) et du Triton B. l'étape de cyclisation est réalisée au reflux du méthanol en présence de d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> avec un rendement de 80% et donne un mélange de l'*ortho*-quinone **47** et de la *para*-quinone **48** dans des proportions égales (Schéma 9). Des analogues *N*-substitués ont été obtenus par *N*-alkylation de ces deux derniers dérivés.



La deuxième méthode <sup>18</sup> consiste en une nitroarylation de 2-hydroxy-1,4-naphtoquinones **49**, suivie d'une réduction du groupement NO<sub>2</sub> par hydrogénation catalytique à température ambiante puis une hétéro cyclisation au reflux de l'acétate d'éthyle conduisant à un mélange des quinones **53** et **54** dans des proportions qui varient selon la nature des substituants  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$  (Schéma 10) et (Tableau 1).

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> A.M. Echavarren, N. Tamayo, O. De Frutos, A. Garcia. *Tetrahedron Letters*, **1997**, <u>53</u> (49), 16835 - 16846

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> K. Kobayashi, T. Taki, M. Kawakita, M. Uchida, O. Morikawa, H. Konishi. *Heterocycles*, **1999**, <u>51</u> (2), 349 - 354



Schéma 10

Tableau 1: Influence de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> sur le rendement de 53 et 54.

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	$R_3$	% 53	% 54
Me	Me	Н	24	75
Me	Me	Me	18	74
MeO	Me	Н	22	48
MeO	Me	Me	26	51
MeO	MeO	Н	41	45

Plus récemment, Cruces et al 2002<sup>19</sup> ont obtenu la quinone 56 à partir du cétoester 55 par une réaction de condensation de Claisen qui conduit dans un premier temps à un intermédiaire biphénol qui, dans les conditions réactionnelles, sera oxydé en quinone. La seconde étape est une réduction du groupement NO2 conduisant à l'intermédiaire 57 qui n'a pas été isolé mais chauffé au reflux de l'acétate d'éthyle pour donner le mélange des deux quinones 58 et 59. L'ortho-quinone 58 est obtenue majoritairement avec un rendement de 71% (Schéma 11).

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> J. Cruces, E. Martinez, M. Treus, L.A. Martinez, J.C. Estevez, R.J. Estevez, L. Castedo. Tetrahedron, 2002, <u>58</u> (15), 3015 - 3019



Schéma 11

#### 5) Réactions de Diels-Alder mettant en jeu des ortho-quinones

Etant donné le quasi absence, dans la littérature, de travaux sur la réaction de Diels-Alder des *ortho*-carbazolequinones, nous évoquerons, pour illustrer ce type de réaction, les travaux réalisés sur les *ortho*-indoloquinones qui sont des structures assez proches de notre modèle.

Des cycloadditions [4+2] mettant en jeu l'*ortho*-indoloquinone **60** et le 1-azadiène **61** ou le 2-azadiène **62** ont été menées dans notre laboratoire <sup>20</sup>. Dans les mêmes conditions opératoires, deux types de réactivité ont été observés selon la structure de l'azadiène (Schéma 12). Le 1-azadiène **61** réagit sur la double liaison C=C de la quinone pour conduire au cycloadduit de type pyridoindoloquinone **63** tandis que le 2-azadiène **62** réagit sur une double liaison C=O pour donner la structure spiranique **64**, instable dans les conditions réactionnelles. Elle s'ouvre pour donner finalement le composé **65**.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> V. Bernardes Genisson, P. Nebois, M. Domard, H. Fillion. Chem. Pharm. Bull, 2000, <u>48</u> (6), 893 - 894



#### Schéma 12

Cai et *al* 1990<sup>21</sup> ont effectué également la cycloaddition entre la quinone **66** et le cyclopentadiène dans le benzène à 0°C. Ils ont obtenu exclusivement le cycloadduit primaire **67** (Schéma 13). La stéréochimie *endo* de ce dérivé a été confirmée par spectroscopie de RMN-<sup>1</sup>H NOE différentielle.



Somei et *al* 1995 <sup>22</sup> ont effectué la réaction de Diels-Alder entre la quinone **68** et divers carbodiènes tels que le cyclopentadiène, le 2,3-diméthylbutadiène, le 1-acétoxybutadiène, le 1,3-pentadiène, le 1-méthoxy-1,3-cyclohexadiène et le 1-(1-acétoxyvinyl)cyclohéxène (Schéma 14). Dans ces réactions les adduits primaires n'ont pas été isolés et les régioisomères de **72**, **73** et **74** 

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> P. Cai, J.K. Snyder, J-C. Chen, R. Fine, L. Volicer. *Tetrahedron Letters*, **1990**, <u>31</u> (7), 969 - 972

<sup>&</sup>lt;sup>22</sup> M. Somei, Y. Fukui, M. Hasegawa. *Heterocycles*, **1995**, <u>41</u> (10), 2157-2160

n'ont pas été observés. La structure de ces composés est déterminée par une étude cristallographique réalisée sur les dérivés acétoxylés correspondants.



Schéma 14

S. V. Chernov et *al* 2000<sup>23</sup> ont réalisé des cycloadditions de Diels-Alder sur les *ortho*indoloquinones **76a** et **76b** qui ont été obtenues à partir des 5-hydroxyindoles **75a** et **75b** par oxydation au moyen du sel de Frémy. La réaction de **75a** avec le cyclopentadiène dans le méthanol à température ambiante conduit au cycloadduit *endo* **77a**. Ils ont ensuite réalisé, dans

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> S.V. Chernov, E.E. Shults, M.M. Shakirov, Y.V. Gatilov, I.Y. Bagryanskaya, G.A. Tolstikov. *Russ. J. Org. Chem*, **2000**, <u>36</u> (11), 1623 - 1633

les mêmes conditions, la cycloaddition de **75a** et **75b** avec l'acide levopimarique **78** et ils ont obtenu les structures **79a** et **79b** de configuration *endo* (Schéma 15).



Schéma 15

#### **II-TRAVAUX PERSONNELS**

Le but de notre travail consiste à réaliser des cycloadditions [4+2] entre une carbazole-1,2 ou 3,4-dione et des carbodiènes ou des azadiènes afin d'accéder aux structures benzo- ou pyridocarbazolequinones. Récemment, une étude préliminaire a été menée au sein de notre laboratoire concernant les cycloadditions d'*ortho*-carbazolequinones. Les travaux de DEA de Mlle Djamila Latrèche 2004<sup>24</sup> ont porté sur l'utilisation de la carbazole-1,2-dione **81**.

#### 1) Synthèse de carbazole-1,2-diones :

La première étape consiste à obtenir les 2-hydroxycarbazoles. Le 2-hydroxycarbazole **80a** est un composé commercial. Le 2-hydroxy-9-méthyl-(*9H*)-carbazole **80b** est obtenu par *N*-méthylation sélective du composé **80a** avec un rendement de 80% (Schéma 16).



#### Schéma 16

Nous avons choisi d'effectuer cette alkylation chimiosélective selon la méthode mise au point par Albanese et *al*  $^{25}$ . Cette méthode permet une *N*-alkylation directe sans *O*-protection, et ceci en générant le dianion par un excès de base forte (hydrure de sodium NaH 60%, 2,5 éq.) et en *N*-alkylant dans des conditions rigoureusement anhydres (Schéma 17).



<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> M. Compain-Batissou, D. Latrèche, J. Gentili, N. Walchshofer, Z. Bouaziz. *Chem. Pharm. Bull.*, **2004**, <u>52</u> (9), 1114 - 1116

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> D.Albanese, D.Landini, M.Penso, G.Spano, A.Trebicka. *Tetrahedron*, **1995**, <u>51</u> (19), 5681 - 5688

En choisissant les bonnes conditions réactionnelles, on peut obtenir de très bons rendements en composé **80b** et diminuer les proportions des produits de *O*-alkylation **80c** et de dialkylation **80d**.

La chimiosélectivité et les rendements sont meilleurs en utilisant le mélange de solvants THF/DMF. En effet, dans un solvant polaire aprotique tel que le THF, le dianion existe sous la forme d'agrégats de paires d'ions très peu réactifs. L'addition d'une quantité limitée d'un solvant plus polaire et qui solvate bien les cations tel que le DMF, converti les agrégats en paires d'ions libres et donc plus réactives.

La deuxième étape consiste à oxyder les 2-hydroxycarbazoles **80a** et **80b** au moyen du sel de Frémy, en excès, préparé selon la méthode de Zimmer <sup>26</sup> (Schéma 18).



#### Schéma 18

Les auteurs ont proposé un mécanisme général, en se basant sur la stoechiométrie observée, concernant l'oxydation radicalaire des phénols (Schéma 19).





<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> H. Zimmer, D.C. Lankin, S.W. Horgan. Chem. Rev., 1971, <u>71</u> (2), 229 - 246

La carbazole-1,2-dione **81a** obtenue n'est pas très stable en solution dans les solvants usuels. De plus, elle se dégrade lentement lorsqu'on essaye de la purifier par chromatographie sur gel de silice. Des travaux antérieurs sur les *para*-carbazolequinones, <sup>27</sup> ont montré que la N-alkylation de ces dérivés améliore leur solubilité, leur stabilité et de ce fait leur réactivité comme diènophile dans la réaction d'hétéro Diels-Alder avec les 1- et les 2-azadiènes. Dans ce but, nous nous sommes proposés de préparer la quinone **81b**. La synthèse de cette *ortho*-carbazolequinone a été effectuée selon la méthode précédente.

Nous avons constaté que la N-méthylation n'a pas amélioré la stabilité et nous pensons que le faible rendement de la réaction d'oxydation est en partie dû à l'instabilité de la quinone.

#### 2) Réactions de cycloadditions [4+2] de la carbazole-1,2-dione

Deux essais de cycloaddition ont été réalisés, l'un avec l'acétoxybutadiène, l'autre avec le cyclopentadiène (Schéma 20).

La réaction avec l'acétoxybutadiène a été réalisée au reflux du THF et conduit au dérivé aromatique **82** avec un rendement de 56%. Le cycloadduit primaire n'a pas été observé.





La réaction avec le cyclopentadiène a été effectuée dans dichlorométhane  $CH_2Cl_2$  à – 10°C. Seul le cycloadduit *endo* **83** a été obtenu avec un rendement de 49%.





Nous avons confirmé la stéréochimie *endo* de **83** par spectroscopie de RMN-<sup>1</sup>H NOE différentielle. Les interactions observées sont indiquées ci-dessous.

<sup>&</sup>lt;sup>27</sup> A. Poumaroux, Z. Bouaziz, M. Domard, H. Fillion. *Heterocycles*, **1997**, <u>45</u> (3), 585 - 596



-l'irradiation du signal de H-4a à 3,42 ppm, donne une réponse au niveau de H-11c à 4,12 ppm (10,8%) et au niveau des H-12 à 1,71 ppm (3,1%).

-l'irradiation du signal de H-11c à 4,12 ppm donne une réponse au niveau de :

H-4a à 3,42 ppm (11,8%)

H-1 et H-4 à 3,59 ppm (4,1%)

H-12 à 1,71 ppm (3,8%)

H-11 à 7,87 ppm (3%)

-l'irradiation du signal des protons H-12 à 1,71 ppm donne une réponse au niveau de H-1 et H-4 à 3,6 ppm (11%)

H-11c à 4,12 ppm (6,7%)

H-4a à 3,41 ppm (3,6%).

Les interactions observées par l'irradiation de l'isomère **83** selon la technique RMN-<sup>1</sup>H NOE différentielle confirment sans ambiguïté la stéréochimie attribuée

La tentative d'obtenir des dérivés de type pyridocarbazolequinones par cycloaddition de la quinone **81** avec divers azadiènes n'a pas abouti. Ces réactions conduisent à des mélanges de nombreux produits qui ne semblent pas correspondre aux dérivés attendus. Il est en effet rapporté dans la littérature <sup>28 29 30</sup> que dans les conditions des réactions de Diels-Alder, les *ortho*-quinones présentent des réactivités assez variées. Elles peuvent réagir comme carbodiènophiles, hétérodiènophiles, carbodiènes ou hétérodiènes.

#### 3) Synthèse de la carbazole-3,4-dione :

Nous avons envisagé de synthétiser la carbazolequinone **87** en trois étapes à partir du 3aminocarbazole commercial **84.** Nous avons préparé dans un premier temps le sel de diazonium **85**, que nous avons hydrolysé par la suite pour obtenir le 3-hydroxycarbazole **86** (Schéma 23).

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup> L. Horner, H. Merz. Justus Liebigs Ann. Chem., **1950**, <u>570</u> (1), 89-120

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> V. Nair, S. Kumar. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, **1996**, 443 - 447

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup> A. M. Echavarren, J. K. Stille. J. Am. Chem. Soc., **1988**, <u>110</u> (12), 4051 - 4053



Schéma 23

Un test au  $\beta$ -naphtol permet de vérifier la formation du sel de diazonium. Il consiste en un couplage azoïque donnant un précipité rouge (Schéma 24).



#### Schéma 24

L'hydrolyse du sel de diazonium **85** en milieu acide à chaud donne l'hydroxycarbazole **86** avec un rendement de 31%. Pour tenter d'améliorer le rendement de cette étape, nous avons appliqué d'autres méthodes décrites pour les sels de diazonium aromatiques.

L'une de ces méthodes est décrite par Horning et *al* 1973 <sup>31</sup> et consistait à préparer des phénols par décomposition des tétrafluoroborates de sel de diazonium aromatique par reflux dans l'acide trifluoroacétique contenant du trifluoroacétate de potassium. Malheureusement cette méthode ne nous a pas permis d'améliorer les résultats de cette étape. Une autre méthode décrite par Cohen et *al* 1977 <sup>32</sup> basée sur l'oxydation des radicaux aryles en phénols par les ions cuivres et qui consiste en l'addition de Cu<sub>2</sub>O à une solution diluée du sel de diazonium dissous dans une solution contenant un large excès de nitrate de cuivre Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. La réaction s'effectuait à température ambiante ou même à 0°C donc avec une dégradation à priori beaucoup moins importante que lors de l'hydrolyse acide. Le rendement maximal que nous avons pu obtenir était de 32%, mais il diminuait lorsque la quantité de sel de diazonium augmentait. Nous avons donc retenu la méthode standard c'est-à-dire l'hydrolyse du sel de diazonium en milieu acide à chaud.

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> D.E. Horning, D.A. Ross, J.M. Muchowski. Can. J. Chem. / Rev. Can. Chim., 1973, <u>51</u> (14), 2347 - 2348

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> T. Cohen, A.G. Dietz Jr., J.R. Miser. J. Org. Chem., **1977**, <u>42</u> (12), 2053 - 2058

Nous avons synthétisé la quinone **87** (Schéma 25), en oxydant l'hydroxycarbazole **86** par le sel de Frémy en excès que nous avons préparé selon la méthode de Zimmer 1971 <sup>26</sup>. Le rendement global pour l'obtention du produit **87** à partir de l'amine **84** est de 16 %.



#### 4) Oxydation de l'aminocarbazole avec le sel de Frémy

Au vu du faible rendement en carbazole-3,4-dione **87**, une oxydation directe de l'aminocarbazole **84** par le sel de Frémy a été tentée (Schéma 26). Nous avons obtenu les deux dimères **92** et **93**. La réaction procèderait par la formation dans un premier temps d'un mélange de l'aminophénol **88** et de l'*ortho*-quinone imine **89**. Une addition nucléophile de l'amine **84** ou de l'aminophénol **88** sur la quinone imine **89** conduirait aux intermédiaires **90** et **91** qui seraient oxydés par la suite.

Des réactions similaires ont été observées dans la littérature lors de l'oxydation, par le sel de Frémy, d'amines aromatiques substituées en position *para* par un groupement alkyle ou alkyloxy <sup>33 34</sup>.



Schéma 26

<sup>&</sup>lt;sup>33</sup> H.J. Teuber, G. Jellinek. Chem. Ber., 1954, <u>87</u> (12), 1841 - 1848

<sup>&</sup>lt;sup>34</sup> L. Horner, K. Sturm. *Chem. Ber.*, **1955**, <u>88</u> (3), 329 - 338

Le mécanisme d'oxydation d'amines aromatiques par le sel de Frémy a été décrit par Zimmer et  $al^{26}$ . Le radical stabilisé par l'effet mésomère donneur de l'atome d'azote se forme en *ortho* de l'amine primaire aromatique, la position en *para* étant substituée (Schéma 27).



Schéma 27

#### 5) Réactions de cycloadditions [4+2] de la carbazole-3,4-dione

#### 5.1) Réaction avec l'acétoxybutadiène

La réaction de cycloaddition [4+2] entre la carbazole-3,4-dione **87** et l'acétoxybutadiène a été réalisée au reflux du toluène pendant 12h en présence d'alumine basique et en utilisant un excès du diène (3,9 équivalents) (Schéma 28). Le dérivé aromatique **94** est obtenu avec un rendement de 35%. Le cycloadduit primaire n'a pas été observé.



Schéma 28

#### 5.2) Réaction avec le cyclobutadiène

La réaction a été effectuée dans le dichlorométhane pendant 6h à 0°C en utilisant 9 équivalents de cyclopentadiène fraîchement distillé puis en chauffant à 40°C pendant 48h en présence de silice. Le composé **95** est obtenu avec 26% de rendement (Schéma 29).



Schéma 29

#### 5.3) Réaction avec un azadiène

Nous avons essayé de synthétiser les *ortho*-pyridocarbazolequinones **97** ou **98** en réalisant une cycloaddition entre l'azadiène **96a** et la carbazoledione **87** (Schéma 30). Nous avons obtenu un mélange complexe de plusieurs produits très difficiles à isoler. Le seul composé que nous avons pu isoler par chromatographie sur colonne de gel de silice est une aminoquinone **99** obtenu avec un rendement de 18%. Vu le faible rendement de ce dérivé, nous n'avons pas cherché à déterminer sa régiochimie.



Avec la carbazolequinone **81a**, nous avons effectué des cycloadditions uniquement avec l'azadiène **96b**.



Schéma 31
Nous avons essayé diverses conditions de réaction, inspirées pour la plupart d'exemples du laboratoire, afin d'améliorer la réaction et d'obtenir les produits de cycloaddition [4+2]. Ainsi, nous avons fait varier la température, le solvant, la nature du réactif d'aromatisation. Tous les essais sont résumés dans le tableau 2.

Solvant	Température	Temps	Réactif	Autres
			d'aromatisation	
EtOH absolu	reflux	1 nuit	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> basique	
EtOH absolu	reflux	1 nuit	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> basique	$N_2$
EtOH absolu	reflux	6 H	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> basique	N <sub>2</sub> /ultra-sons
EtOH absolu	t.a	48 H	silice	
THF anhydre	reflux	1 nuit	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> basique	
THF anhydre	t.a	1 nuit	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> basique	
Toluène	reflux	1 nuit	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> basique	

<u>**Tableau 2**</u> : essais de cycloaddition entre **81a** et **96b**.

Aucun produit n'a pu être isolé. Faute de résultats encourageants et concluants, nous avons renoncé à la synthèse d'*ortho*-pyridocarbazolequinones. Les rendements des réactions de cycloadditions [4+2] avec les *ortho*-carbazolequinones sont plus faibles que ceux obtenus avec les *para*-carbazolequinones, ce qui nous a amené à utiliser ces dernières afin d'étudier leur réactivité vis-à-vis de dipôle dans les réactions de cycloadditions 1,3 dipolaires.

# CHAPITRE 2 : CYCLOADDITIONS DIPOLAIRES-1,3 SUR DES PARA-CARBAZOLEQUINONES

#### **I-DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

Depuis la découverte des premières *para*-carbazolequinones, isolées de *Murraya euchrestifolia Hayata*, plante médicinale poussant en Asie du Sud, ces alcaloïdes ont suscité l'intérêt des chercheurs chimistes et biologistes, d'une part pour développer des stratégies de synthèse conduisant aussi bien à ces molécules naturelles qu'à de nouveaux analogues et d'autre part pour étudier leurs activités biologiques. Nous nous sommes intéressés, dans cette partie bibliographique, aux différentes structures et aux activités biologiques décrites pour les alcaloïdes possédant un noyau *para*-carbazolequinone.

De point de vue synthèse, nous avons choisi d'appliquer la réaction de cycloaddition 1,3dipolaire entre une *para*-carbazolequinone et un oxyde de nitrile ou un azoture pour accéder à des molécules tétracycliques, répondant respectivement aux structures isoxazolocarbazolequinone et triazolocarbazolequinone. Pour illustrer cette stratégie de synthèse, nous nous sommes intéressés à la bibliographie des cycloadditions 1,3-dipolaires des *para*-quinones avec les oxydes de nitriles et avec les azotures.

# 1) Alcaloïdes de structures para-carbazolequinones

Des produits naturels ayant la structure *para*-carbazolequinone ont été isolés à partir de différentes plantes ou bactéries. Le genre Murraya, de la famille des Rutacées, en particulier les espèces *M. euchrestifolia* <sup>35 36 37 38 39</sup> et *M. koenigii* <sup>40 41</sup> est une source d'alcaloïdes particulièrement importante.

Ce sont des plantes médicinales, poussant en Asie du Sud, qui sont utilisées comme analgésique ou anesthésique local et pour soigner l'eczéma, le rhumatisme et les oedèmes <sup>36</sup>. *Clausena excavata* est utilisée pour soigner les douleurs abdominales, les morsures de serpents et comme agent de désintoxication <sup>42 43</sup>. Le schéma 32 illustre les principaux alcaloïdes qui on été isolés.

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup> H. Furukawa, T.S. Wu, T. Ohta, C.S. Kuoh. *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, <u>33</u> (10), 4132 - 4138

<sup>&</sup>lt;sup>36</sup> T.S. Wu, T. Ohta, H. Furukawa, C.S. Kuoh. *Heterocycles*, **1983**, <u>20</u> (7), 1267 - 1269

<sup>&</sup>lt;sup>37</sup> C. Ito, M. Nakagawa, T.S. Wu, H. Furukawa. *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, <u>39</u> (10), 2525 - 2528

<sup>&</sup>lt;sup>38</sup> H. Furukawa, M. Yogo, C. Ito, T.S. Wu, C.S. Kuoh, *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, <u>33</u> (3), 1320 - 1322

<sup>&</sup>lt;sup>39</sup> C. Ito, T.S. Wu, H. Furukawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, <u>36</u> (7), 2377 - 2380

<sup>&</sup>lt;sup>40</sup> C. Ito, Y. Thoyama, M. Omura, I. Kajiura, H. Furukawa. Chem. Pharm. Bull., **1993**, <u>41</u> (12), 2096 - 2100

<sup>&</sup>lt;sup>41</sup> C. Saha, B.K. Chowdhury. *Phytochemistry*, **1998**, <u>48</u> (2), 363 - 366

<sup>&</sup>lt;sup>42</sup> T.S. Wu, S.C. Huang, P.L. Wu, K.H. Lee. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, <u>4</u> (20), 2395 - 2398

<sup>&</sup>lt;sup>43</sup> R.W. Rickards, J.M. Rothschild, A.C. Willis, N.M. de Chazal, J. Kirk, K. Kirk, K.J. Saliba, G.D. Smith. *Tetrahedron*, **1999**, <u>55</u> (47), 13513 - 13520



Me

HO

$$\begin{split} & R_1 = R_2 = R_3 = H : \text{Murrayaquinone A } (M. \ euchristifolia)^{35} \\ & R_1 = H, R_2 = \text{OMe}, \ R_3 = \text{prényle} : \text{Murrayaquinone B } (M. \ euchristifolia)^{35, 36} \\ & R_1 = H, R_2 = \text{OMe}, \ R_3 = \text{géranyle} : \text{Murrayaquinone C } (M. \ euchristifolia)^{35} \\ & R_1 = H, R_2 = \text{OH}, \ R_3 = \text{géranyle} : \text{Murrayaquinone D } (M. \ euchristifolia)^{35} \\ & R_1 = H, R_2 = \text{OH}, \ R_3 = \text{géranyle} : \text{Murrayaquinone D } (M. \ euchristifolia)^{35} \\ & R_1 = H, R_2 = \text{OH}, \ R_3 = \text{prényle} : \text{Murrayaquinone E } (M. \ euchristifolia)^{37} \\ & R_1 = H, R_2 = \text{OH}, \ R_3 = \text{prényle} : \text{Murrayaquinone E } (M. \ euchristifolia)^{37} \\ & R_1 = H, R_2 = \text{OMe}, R_3 = H : \text{Koeniginequinone A } (M. \ koenigii)^{41} \\ & R_1 = \text{OMe}, \ R_2 = \text{OMe}, \ R_3 = H : \text{Koeniginequinone B } (M. \ koenigii)^{41} \end{split}$$

Clausenaquinone A (Clausena excavata)<sup>42</sup>



OMe

Bismurrayaquinone A (*M. koenigii*)<sup>40</sup>



Bikoeniquinone A (*M. koenigii*)<sup>40</sup>







R = H: Pyrayaquinone B (*M. euchrestifolia*)<sup>38</sup> R = prényle: Pyrayaquinone C (*M. euchrestifolia*)<sup>39</sup>



Calothrixine A (Calothrix cyanobacteria)<sup>43</sup>



Calothrixine B (Calothrix cyanobacteria)<sup>43</sup>

Schéma 32

# 2) Activités biologiques décrites pour ces alcaloïdes

La murrayaquinone A a montré une action inotrope positive triphasique sur le ventricule myocardique du cochon de Guinée <sup>44</sup>. Elle s'est également révélée être cytotoxique contre des cellules de lignées tumorales de type SK-MEL-5 impliquées dans le mélanome et Colo-205 que l'on retrouve dans le carcinome du colon avec des concentrations inhibitrices 50 % CI <sub>50</sub> respectivement à 2,58 et 3,85  $\mu$ g/mL <sup>45</sup>. *Murraya koenigii* pousse au Sri Lanka et au Nigéria. De façon empirique, *Murraya koenigii* est utilisé comme stimulant, anti-dysentérique, et dans la pathologie diabétique. Les extraits au méthanol des tiges de *M. koenigii* du Nigéria contiennent plusieurs alcaloïdes du carbazole parmi lesquels on trouve la murrayaquinone A. Ces extraits n'ont pas révélé d'activité hypoglycémique. Ils causent une dépression chez la souris albinos à des doses de 25 à 400 mg/ kg. Ils se sont montrés toxiques vis-à-vis du protozoaire *Trichomonas gallinae* avec des CI <sub>50</sub> de 34 et 35  $\mu$ g/ml à 24h. Ces tests ont permis de confirmer le rôle dans la dysenterie, mais ils réfutent le rôle de stimulant ou d'antidiabétique <sup>46</sup>.

La clausenaquinone A a montré une forte activité inhibitrice de l'agrégation plaquettaire chez le lapin : 100 % d'inhibition à 10  $\mu$ g/mL. Elle a également montré une importante activité cytotoxique vis-à-vis de cellules tumorales HCT-8, RPMI-7951 et TE671 à des doses respectives de 0,92, 0,22 et 3,82  $\mu$ g/mL<sup>39</sup>.

La bismurrayaquinone A a montré une activité contre le protozoaire *Leishmania donovani* et une modeste activité fongicide avec une certaine cytotoxicité, mais elle n'a pas révélé d'activité antimalarique sur le protozoaire *Plasmodium falciparum in vitro*<sup>47</sup>.

Les calothrixines A et B inhibent la croissance d'une lignée chloroquinorésistante de *Plasmodium falciparum* avec une valeur de CI <sub>50</sub> de 58 ±8 nM et 180 ± 44 nM respectivement. Elles ont aussi montré une activité inhibitrice de la croissance des cellules de cancer du col HeLA avec une CI <sub>50</sub> de 40 ± 9 nM et 350 ± 82 nM respectivement <sup>43</sup>.

La calothrixine A a montré également une activité inhibitrice de l'ARN polymérase d'*Escherichia coli* <sup>48</sup>. Cette inhibition est compétitive avec l'ATP (adénosine triphosphate) comme substrat, avec une constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur  $K_i$  de 0,23 ± 0,11 mM et non compétitive avec l'UTP (uracile triphosphate). L'inhibition de l'activité enzymatique de 50% a été calculée à 100µM.

<sup>&</sup>lt;sup>44</sup> K. Takeya, M. Itoigawa, H. Furukawa. *Eur. J. Pharmacol.*, **1989**, <u>169</u> (1), 137 - 145

<sup>&</sup>lt;sup>45</sup> M. Itoigawa, Y. Kashiwada, C. Ito, H. Furukawa, Y. Tachibana, K.F. Bastow, K.-H. Lee. *J. Nat. Prod.*, **2000**, <u>63</u> 7), 893 - 897

<sup>&</sup>lt;sup>46</sup> A.C. Abebajo, G. Olayiwola, E. Verspohl, E.O. Iwalewa, N.O.A. Omisore, D. Bergenthal, V. Kumar, S.K. Adesina *Pharmaceutical Biology* **2004** 42 (8) 610 - 620

Adesina, *Pharmaceutical Biology*, **2004**, <u>42</u> (8), 610 - 620 <sup>47</sup> S. Tasler, G. Bringmann. *The Chemical Record*, **2002**, <u>2</u> (2), 114 - 127

<sup>&</sup>lt;sup>48</sup> N.T. Doan, P.R. Stewart, G.D. Smith. FEMS Microbiology Letters, 2001, <u>196</u> (2), 135 - 139

Elle a montré une activité pro-apoptotique sur les cellules cancéreuses humaines Jurkat<sup>49</sup> qui sont des cellules lymphocytaires T. Cette activité est temps et concentration dépendante. La CI 50 pour la calothrixine A a été mesuré à 1,6µM après 24h d'incubation. Pour une concentration de 1 µM, le pourcentage de cellules en apoptose est de 9, 14 et 49 % à respectivement 12 h, 24h et 48h. Pour le contrôle, le pourcentage d'apoptose est de moins de 6%. Une concentration en calothrixine A inférieure à 0,1µM n'affecte pas la survie des cellules. La morphologie des cellules observées au microscope électronique montre des cellules condensées, une condensation de la chromatine et un « blebbing » des membranes plasmatiques (ampoules membranaires), ce qui caractérise l'apoptose. Les cellules traitées par la calothrixine A à 1µM sont stoppées au stade G2/M du cycle cellulaire. La fragmentation de l'ADN est à la fois temps et concentration dépendante par rapport à l'exposition à la calothrixine. La ménadione a été comparée à la calothrixine A. La CI 50 est sensiblement plus élevée, l'arrêt du cycle cellulaire a lieu à des concentrations plus élevées. La calothrixine A a une structure d'intercalant de l'ADN, ce qui pourrait expliquer sa cytotoxicité grâce à son effet quinone-dépendant. Les quinones sont des composés très réactifs, qui peuvent endommager les cellules en générant des radicaux oxygénés, en oxydant les lipides cellulaires et certains ions métalliques comme le fer et le cuivre ou en modifiant de façon covalente les protéines ou les acides nucléiques.

Une étude de la relation structure –activité a été réalisée sur les calothrixines A et B et une série d'autres quinones. C'est une étude électrochimique en vue de rechercher une éventuelle relation entre leur potentiel de réduction et leur activité d'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses HeLA. Elle a montré l'absence de corrélation directe entre ces deux facteurs. Néanmoins, toutes les quinones ayant une CI  $_{50} < 1,6 \mu$ M sont facilement réduites en semiquinones correspondantes <sup>50</sup>.

# 3) Carbazolequinones ayant montré des propriétés biologiques intéressantes : antiparasitaires, antitumorales, antibactériennes.

Parmi les molécules ayant montré une activité anti-toxoplasmique, les hydroxyquinones comme l'atovaquone **100** se sont révélés d'excellents inhibiteurs de la croissance de *Toxoplasma gondii* et sont utilisés en thérapeutique (Schéma 33). Ces structures sont proches des carbazoles et carbazoles quinones. Ces derniers ont montré des activités biologiques très intéressantes, particulièrement comme des antitumoraux et comme antiparasitaires, en particulier sur *Plasmodium falciparum*. Elles ont aussi montré une activité antibactérienne.

L'intégralité des propriétés des molécules naturelles a été décrite au chapitre précédent.

<sup>&</sup>lt;sup>49</sup> X. Chen, G.D. Smith, P. Waring, J. Appl. *Phycol.*, **2003**, <u>15</u> (4), 269 - 277

<sup>&</sup>lt;sup>50</sup> P.H. Bernardo, C.L.L. Chai, G.A. Heath, P.J. Mahon, G.D. Smith, P. Waring, B.A. Wilkes. *J. Med. Chem.*, **2004**, <u>47</u> (20), 4958 - 4963



Schéma 33

Des séries de carbazoles dimériques ou monomériques, naturelles ou synthétiquement modifiées ont montré une activité anti-malarique. Les composés actifs sont les composés **103**, **104**, **106**, **108**, **109**, **115**, **117**<sup>51</sup> (Schéma 34).





<sup>&</sup>lt;sup>51</sup> G. Bringmann, A. Ledermann, J. Holenz, M.T. Kao, U. Busse, H.G. Wu, G. Francois, Guido. *Planta Medica*, **1998**, <u>64</u> (1), 54-57.

Parmi les structures proches des carbazoles, l'elliptinium **118** (Schéma 35) est utilisé comme cytotoxique, c'est un intercalant inhibiteur de la topoisomérase II ( topo2 ) qui altère le super enroulement de l'ADN en créant une cassure double-brin permettant à une portion du brin d'ADN de passer à travers l'autre. <sup>52</sup>. L'inhibiteur agit en stabilisant le complexe de clivage, ce qui est ressenti par la cellule comme une agression létale. L'elliptinium **118** a été utilisée comme modèle pour trouver de nouveaux anti-tumoraux.



L'équipe de Asche 2005 <sup>53</sup> a développé des benzocarbazoles (Schéma 36), de structure voisine de l'ellipticine, et évalué leur activité cytotoxique sur une soixantaine de lignée cellulaire cancéreuse humaine. Les molécules **119** et **120** se sont révélées sélectivement actives sur les cellules de leucémies et la molécule **121** s'est révélée active sélectivement sur les cellules de mélanomes. L'activité la plus importante sur toutes les lignés a été obtenue avec un dérivé un peu particulier, le composé **122** qui est une méthylène-*p*-quinone



<sup>&</sup>lt;sup>52</sup> Dossier du CNHIM 2004, XXV, 4-5, Anticancéreux : utilisation pratique (5<sup>ème</sup> édition)

<sup>&</sup>lt;sup>53</sup> C. Asche, W. Frank, A. Albert, U. Kucklaender. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, <u>13</u> (3), 819-837.

La daunomycine **123** est un produit antibiotique cytotoxique, de la famille des anthracyclines. L'équipe de Tamura 1987 <sup>54</sup> a synthétisé des analogues de la daunomycine **123** en introduisant un cycle carbazolequinone : c'est le composé **124**.



Schéma 37

Concernant l'activité anti-bactérienne, plusieurs équipes ont synthétisé des dérivés carbazoles quinones actifs. L'équipe de Hammam 1978 <sup>55</sup> a synthétisé une carbazolequinone **125** (Schéma 38) qui a été testée sur 18 microorganismes, et elle s'est avérée être plus active que le sulfaméthoxazole. . La même équipe 1978 <sup>56</sup> a synthétisé des thiazolocarbazolequinones **126** à **133** qui se sont révélés être bactéricides contre les bactéries gram + et gram -.



# Schéma 38

L'équipe de Doan <sup>48</sup> <sup>57</sup> a découvert un alcaloïde extrait d'une cyanobactérie du genre *Fischerella*, le 12-epi-hapalindole E isonitrile, et le indolophenanthridine calothrixine A du genre *Calothrix*. Ces alcaloïdes sont capables de tuer plusieurs organismes et types cellulaires. Ils inhibent la synthèse d'ARN, et par conséquence la synthèse des protéines de *Bacillus subtilis*. La calothrixine A inhibent la réplication de l'ADN. Les mesures *in vitro* de la synthèse de l'ARN confirment les résultats *in vivo* et suggèrent que les deux composés inhibent l'ARN polymérase directement. Le degré d'inhibition est indépendant de la concentration d'ADN mais est fortement

<sup>&</sup>lt;sup>54</sup> Y. Tamura, M. Kirihara, M. Sasho, S. Akai, J. Sekihachi, R. Okunaka, Y. Kita. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1987**, <u>19</u>, 1474-1476.

<sup>&</sup>lt;sup>55</sup> A.S. Hammam, M.A. Eldawy. Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences, **1978**, <u>17</u> (2), 145-152

<sup>&</sup>lt;sup>56</sup> A.S. Hammam, H.S. El-Kashef *Fac Revue Roumaine de Chimie*, **1978**, <u>23</u> (4), 587-593

<sup>&</sup>lt;sup>57</sup> N.T. Doan, R.W. Rickards, J.M. Rothschild, G.D. Smith. Journal of Applied Phycology, **2000**, <u>12</u> (3-5), 409-416

dépendant de la concentration en polymérase. Ces deux alcaloïdes inhibent l'ARN polymérase d'*Escherichia coli*, compétitivement avec l'ATP (adénosine triphosphate) et non compétitivement avec l'UTP (uridine triphosphate). Les valeurs de Ki avec l'ATP comme substrat sont de 1,3 mM et 0,23 mM, respectivement.

La pyridocarbazolequinone **134** a montré une activité bactéricide modérée <sup>58</sup>.



Schéma 39

#### 4) Cycloaddition de para-quinones avec les oxydes de nitriles

Les réactions de cycloaddition dipolaire-1,3 entre une *para*-quinone et un oxyde de nitrile conduisent généralement à des structures oxazoloquinones. Les quinones réagissent dans ce cas par leurs doubles liaisons C=C. Il a été rapporté dans certains cas, la formation de dérivés spiraniques, résultat d'une réaction entre le dipôle et une double liaison C=O de la quinone.

S. Shiraishi et *al* 1977 1978 1984 <sup>59 60 61 62</sup> ont réalisé des cycloadditions entre l'oxyde de 2,4,6-triméthylbenzonitrile **139** et une série de *para*-benzoquinones polysubstituées, dans le chloroforme ou le benzène à température ambiante.

La plupart des benzoquinones utilisées dans cette étude donnent des cycloadditions sur une double liaison C=O, conduisant à la formation de dérivés spiraniques (Schéma 40).



 <sup>&</sup>lt;sup>58</sup> A.S. Yanni, Z.H. Khalil, A.A. Timmawy A Collection of Czechoslovak Chemical Communications, **1991**, <u>56</u>
 (7), 1489-1494

<sup>&</sup>lt;sup>59</sup> S. Shiraishi, S. Ikeuchi, M. Seno, T. Asahara. Bull. Chem. Soc. Jpn., **1977**, <u>50</u> (4), 910 - 913

<sup>&</sup>lt;sup>60</sup> S. Shiraishi, S. Ikeuchi, M. Seno, T. Asahara. Bull. Chem. Soc. Jpn., 1978, <u>51</u> (3), 921 - 925

<sup>&</sup>lt;sup>61</sup> T. Hayakawa, K. Araki, S. Shiraishi. Bull. Chem. Soc. Jpn., **1984**, <u>57</u> (6), 1643 - 1649

<sup>&</sup>lt;sup>62</sup> T. Hayakawa, K. Araki, S. Shiraishi. Bull. Chem. Soc. Jpn., 1984, <u>57</u> (8), 2216 - 2218



#### Schéma 40

L'utilisation d'un excès d'oxyde de nitrile, conduit à une double addition sur les deux carbonyles de la quinone.

Parmi toutes les quinones utilisées dans cette étude, seules les quinones 162 et 164 et 166 ont donné lieu à des cycloadditions sur une double liaison C=C conduisant aux dérivés isoxazolines 163 et 165 et isoxazole 167 dont la régiochimie n'a pas été déterminée par les auteurs (Schéma 41).



Schéma 41

Ces mêmes auteurs ont également effectué des réactions de cycloaddition entre certaines de ces *p*-benzoquinones et l'oxyde de 2,6-dichlorobenzonitrile **168**. Ils ont obtenu des résultats assez différents que ceux obtenus avec l'oxyde de nitrile **139**.

Avec les quinones disubstituées 135 et 136, le site réactionnel est une double liaison
C=C alors qu'avec l'oxyde de nitrile 139 la réaction se fait sur un C=O.

- Les quinones tétrasubstituées 140 et 141 réagissent avec 168 au niveau des deux sites C=C et C=O pour conduire à un mélange de produits, tandis qu'elles réagissent avec 139 uniquement au niveau d'une double liaison C=O.

- Avec la quinone monosubstituée **166**, bien que le site réactionnel reste le même, ils obtiennent un mélange de deux régioisomères avec **168**, alors qu'avec **139**, ils n'obtiennent que le régioisomère **175**. Les conditions réactionnelles et les résultats expérimentaux sont résumés dans le schéma 42.





Des prévisions théoriques de l'orientation de la réaction ont été réalisées par la théorie des orbitales frontières et certaines ont été confirmées par les résultats expérimentaux, notamment celle concernant le site de réactivité dans les quinones. Les valeurs des niveaux d'énergie des orbitales frontières calculées pour les oxydes de nitriles et les quinones, ont permis de classer les *p*-quinones en deux groupes : un groupe qui donne des additions sur la double liaison C=O et pour lequel la réaction est gouvernée par l'interaction entre la HOMO de l'oxyde de nitrile et la LUMO de la quinone. L'autre groupe donne des additions sur la double liaison C=C et pour lequel la réaction est gouvernée par l'interaction entre la LUMO de l'oxyde de nitrile et la HOMO de la quinone.

G. A. Conway et *al*<sup>63</sup> ont synthétisé la 5,6-dichloro-3-méthylbenzo[d]isoxazole-4,7 dione **177** qui s'est avéré être un bon agent antitumoral, actif aussi bien sur le carcinome ascitique d'Ehrlich que sur la leucémie lymphocytaire P-188. La cycloaddition dipolaire -1,3 est réalisée entre la 2,3-dichloro-*p*-benzoquinone **176** et l'oxyde d'acétonitrile. Ce dernier est généré in situ à partir de l'acétaldoxime par une réaction avec  $Cl_2$  en milieu basique (Schéma 43).

<sup>63</sup> G.A. Conway, L.J. Loeffler, I.H. Hall. J Med Chem. 1983, 26 (6), 876 - 884



Schéma 43

G. Brahmeshwari et *al* 1991<sup>64</sup> ont synthétisé les isoxazoloquinones **180a-e**, à partir de l'embeline **178** et ont testé leur activité fongicide sur *Fusarium oxysporum* et *Curvularia lunata*. Pour cela, ils ont réalisé des cycloadditions dipolaires-1,3 avec des oxydes de nitrile aromatiques obtenus *in situ* à partir des chloroximes **179a-e**. Les auteurs obtiennent un seul régioisomère, mais ils ne fournissent aucune preuve concernant la structure du régioisomère obtenu (Schéma 44).



#### Schéma 44

Cette même équipe 1995<sup>65</sup> a par la suite synthétisé des isoxazolonaphtoquinones **182 a**e, à partir de l'hydroxynaphtoquinone **181** et les mêmes oxydes de nitrile que précédemment (Schéma 45).



# Schéma 45

<sup>&</sup>lt;sup>64</sup> G. Brahmeshwari, S. Ramadevi, M.S. Rao, T.V. Padmanabha Rao. Indian Journal of Chemistry, 1991, <u>30B</u>, 369 - 370

<sup>&</sup>lt;sup>65</sup> G. Brahmeshwari, V.R. Rajeswar Rao, T.V. Padmanabha Rao. Indian Journal of Chemistry, 1995, <u>34B</u>, 139 - 140

F. Farina et *al* 1995<sup>66</sup> ont réalisé des cycloadditions entre les oxydes de nitrile **184** et **186** et des naphtoquinones disubstituées. L'addition se fait exclusivement sur la double liaison C=C de la quinone. Les réactions avec l'oxyde de nitrile **184** conduisent généralement aux cycloadduits primaires de type naphtoisoxazolines qui seront aromatisés lors de la purification sur une colonne de gel de silice pour conduire finalement aux structures naphtoisoxazoles. Avec l'oxyde de nitrile **186**, les cycloadduits primaires ne seront pas isolés, l'aromatisation se fait facilement dans les conditions réactionnelles.

Dans le cas des naphtoquinones symétriques **183a-c**, les produits de cycloaddition sont obtenus avec de bons rendements (Schéma 46).



# Schéma 46

Dans le cas des naphtoquinones dissymétriques **188a-d**, la réaction est souvent régiosélective, elle conduit au mélange des deux régioisomères attendus dans des proportions variables (Schéma 47). L'attribution de ces régioisomères est basée sur la comparaison de leurs spectres RMN H<sup>1</sup>, notamment sur le déplacement du proton de la fonction OH en position R<sub>1</sub> qui serait plus déblindé dans les régioisomères de type **192** que dans les régioisomères de type **191**. La jonction *cis* dans les composés de type **189** et **190** est confirmée par la présence, dans leurs spectres RMN H<sup>1</sup>, d'un système AB entre 4,9 ppm et 5,5 ppm avec une constante de couplage de 10 Hz.

<sup>&</sup>lt;sup>66</sup> F.Farina, M.V. Marin, M.Munoz, M.C. Paredes, R. Rodriguez. Heterocycles, **1995**, <u>40</u> (1), 413 - 424



B. Venugopalan et *al*<sup>67</sup> se sont intéressés à la synthèse de nouvelles quinones hétérocycliques analogues des anthraquinones afin de tester leur activité anti-protozoaire, en particulier contre *Entamoeba histolytica*. Ils ont préparé des composés de structure pyrazolo-, triazolo- et isoxazoloquinoxalinequinone, par des réactions de cycloaddition dipolaire en utilisant respectivement le diazométhane, un azoture ou un oxyde de nitrile comme dipôles et une quinoxaline-5,8-dione comme dipolarophile.

Nous décrivons dans cette partie la synthèse des isoxazoloquinoxalinequinones **195a-d** réalisée à partir des quinones **193a,b** et les oxydes de nitrile générés *in situ* à partir des chloroximes **194a-c** (Schéma 48). L'oxyde d'argent joue d'une part le rôle de base pour une élimination-1,3 basocatalysée de HCl à partir de la chloroxime entraînant la formation de l'oxyde de nitrile correspondant. D'autre part, il oxyde le cycloadduit primaire de type isoxazolinequinone en dérivé de type isoxazoloquinone.

<sup>&</sup>lt;sup>67</sup> B. Venugopalan, S.Suresh Iyer, P.Jayant Karnik, N.J de Souza. *Heterocycles*, **1987**, <u>26</u> (12), 3173 - 3180



J.L. Stevens et *al* 2003<sup>68</sup> ont effectué la cycloaddition-1,3 dipolaire régio-orientée sur des naphtoquinones dissymétriques. L'utilisation d'une quinone bromée oriente la réaction vers la formation du seul régioisomère dans lequel l'atome d'oxygène de l'oxyde de nitrile est lié au carbone bromé de la quinone. L'attribution de la structure a été réalisée par analyse aux rayons X (Schéma 49).



<sup>&</sup>lt;sup>68</sup> J.L. Stevens, T.D. Welton, J.P. Deville, V. Behar. *Tetrahedron Letters*, **2003**, <u>44</u> (49), 8901 - 8903

# 5) Cycloaddition de para-quinones avec les azotures

G. Alonso et *al* 1978<sup>69</sup> ont synthétisé des dérivés quinoniques *N*-glycosylés du benzotriazole et naphtotriazole par cycloaddition dipolaire-1,3 des azotures de glycosyles **202a** et **202b** avec la 2-méthyl-1,4-benzoquinone **201** ou la 1,4-naphtoquinone **204**.

La réaction entre l'azoture **202a** et la benzoquinone **201**, au reflux de l'acétate d'éthyle ou du toluène, conduit au seul régioisomère **203** avec un rendement de 20%. Les résultats de RMN <sup>1</sup>H ou de spectroscopie UV n'ont pas permis aux auteurs de déterminer la structure exacte de ce régioisomère (Schéma 50).





Dans le cas de la réaction entre les azotures **202a** et **202b**, et la naphtoquinone **204**, la structure des composés obtenus dépend du solvant utilisé et de la température du milieu. Lorsqu'elle est effectuée dans l'acétate d'éthyle à température ambiante pendant 5 jours, la réaction conduit aux dérivés naphtotriazolediones **205**. Au reflux de l'acétate d'éthyle pendant 17 heures, elle donne un mélange de produits de structures différentes : les naphtotriazolediones **205**, les aminoquinones **206** et les aminométhylène-indanediones **207**. En fin, lorsque la réaction est réalisée au reflux du toluène pendant 17 heures, elle conduit au seul composé **207a** en utilisant l'azoture **202a**, et au mélange des deux produits **205b** et **207b** en utilisant l'azoture **202b** (Schéma 51).

Les structures **205**, **206** et **207** sont obtenues à partir du cycloadduit primaire de type triazoline qui donne **205** par oxydation et **206** ou **207** par élimination de  $N_2$ . Cette élimination étant favorisée par de hautes températures.

<sup>&</sup>lt;sup>69</sup> G. Alonso, M. Fuertes, M.T. Garcia-Lopez, F.G. de las Heras, J.M. Infante, M. Stud. *Eur. J. Med. Chem.-Chimica therapeutica*, **1978**, <u>13</u> (2), 155 - 160



# Schéma 51

D. R. Buckle et *al* 1983 <sup>70</sup> ont préparé des naphtotriazolediones afin d'étudier leur activité antiallergique, évaluée par leur capacité d'inhiber une réaction anaphylactique cutanée passive (rat passive cutaneous anaphylaxis : PCA).

L'une des méthodes développées par les auteurs est la cycloaddition 1,3-dipolaire des naphtoquinones **204** et **208** avec l'azoture **209**. Les dérivés **210a** et **210b** initialement formés sont ensuite débenzylés par l'acide trifluoroacétique pour donner les naphtotriazolediones recherchées **211a** et **211b** (Schéma 52).

<sup>&</sup>lt;sup>70</sup> R. Buckle, H. Smith, B.A. Spicer, J.M. Tedder. J. Med. Chem., **1983**, <u>26</u> (5), 714 - 719



#### Schéma 52

Des dérivés fonctionnalisés en C5 ou en C6 sont ensuite obtenus à partir de **211a**<sup>71</sup>. La première étape est une nitration qui conduit au mélange des régioisomères **212** et **213** avec un rendement de 74% et dans les proportions 9:1. Les conversions fonctionnelles sont ensuite réalisées sur les dérivés nitrés au moyen d'une substitution nucléophile d'anion aldoxime, alcoolate ou thiolate pour conduire respectivement aux composés hydroxylés, méthoxylés et thioalkylés (Schéma 53).



Schéma 53

<sup>&</sup>lt;sup>71</sup> J.M. Tedder, D.R. Buckle. J. Chem. Research (S), **1983**, 12-13

La réaction de la naphtoquinone **204** avec l'azoture de triméthylsilyle **220**<sup>72</sup>, conduit à la 2-aminonaphtoquinone **221**. Le rendement de la réaction dépend du solvant utilisé. Le meilleur rendement est obtenu dans le DMF ou le DMSO (Schéma 54).



L. Benati et *al* 1991 <sup>73</sup> ont étudié l'effet du solvant et de la température sur la réaction de cycloaddition des azotures de *p*-méthoxyphényle **222** et de *p*-nitrophényle avec les naphtoquinones **204** et son dérivé méthylé en C2. Effectuée dans le benzène, le nitrométhane ou le DMSO, la réaction conduit à un mélange de produits issus de la décomposition de l'intermédiaire triazoline initialement formé. L'élévation de la température favorise la formation des composés énamine **224**, benzazépine **225** et aziridine **226** au dépend du dérivé triazole **223**. Ce dernier est favorisé par l'utilisation de l'hexaméthylphosphotriamide (HMPT) comme solvant à une température de 60°C. Afin d'illustrer les structures obtenues, nous décrivons dans le schéma 55, l'exemple de la réaction de la naphtoquinone **204** avec l'azoture **222** dans le benzène et dans HMPT à la même température, 60°C.



i) C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, 60°C, 5 jours : **223**(1%) + **224**(46%) + **225**(20%) + **226**(31%) ii) HMPT, 60°C, 15h : **223**(62%) + **224**(3%)

# Schéma 55

<sup>&</sup>lt;sup>72</sup> B.Husu, S. Kafka, Z. Kadunc, M. Tisler. *Monatshefte für Chemie*, **1988**, <u>119</u>, 215 - 222

<sup>&</sup>lt;sup>73</sup> L. Benati, P. Carlo Montevecchi, P. Spagnolo. J.Chem.Soc.Perkin Trans 1, 1991, (1) 71 - 77

I. T. Barnish et *al* 1992 <sup>74</sup> ont également observé la formation de ces différentes structures dans des cycloadditions mettant en jeu divers azotures, comme l'azoture de 2-méthylphényle, de 4-chlorophényle ou de 4-nitrophényle avec de *p*-quinones comme la naphtoquinone, la benzoquinone et la méthylbenzoquinone. Les réactions ont été effectuées dans le benzène à différentes températures.

F. Palacios et *al* 1995<sup>75</sup> ont réalisé des cycloadditions 1,3-dipolaire entre la naphtoquinone **204** et les azotures d'alkylphosphonate **227** et d'alkylcarboxylate **228**. Le résultat des cycloadditions dépend des conditions opératoires (Schéma 56). Lorsque la réaction est effectuée dans le THF à température ambiante pendant 2 semaines, seules les naphtotriazolediones **229** sont obtenues avec de faibles rendements. Ces composés **229** sont également obtenus seuls mais avec des rendements nettement plus importants (75%), lorsque la réaction est réalisée au reflux du THF pendant 20 heures. Enfin, lorsque la réaction est effectuée au reflux du toluène pendant 36 heures, en plus des composés majoritaires **229** (60%), ils obtiennent minoritairement les énamines **230** (15%).



Schéma 56

<sup>&</sup>lt;sup>74</sup> I.T. Barnish, M.S. Gibson. J. Chem. Research (S), **1992**, 208, J. Chem. Resaerch (M), **1992**, 1740 - 1757

<sup>&</sup>lt;sup>75</sup> F. Palacios, A.M. Ochoa de Retana, J. Pagalday. *Organic preparations and procedures int*, **1995**, <u>27</u> (6), 625 - 635,

#### **II-TRAVAUX PERSONNELS**

Dans cette partie, nous décrivons la synthèse des *para*-carbazolequinones des oxydes de nitriles et des azotures et nous présentons les résultats des réactions de cycloaddition dipolaire-1,3 réalisées entre ces différents dipôles et dipolarophiles.

Nous présentons également une étude de l'orientation de la cycloaddition par la théorie des orbitales frontières. Une comparaison avec les résultats expérimentaux, met en évidence le rôle de l'atome de brome dans la régiosélectivité de la cycloaddition.

# 1) Synthèse des para-carbazolequinones

La première partie de ce travail consiste à préparer les *para*-carbazolequinones. La première est une *p*-carbazolequinone non bromée, préparée dans le but d'étudier sa réactivité dans la réaction de cycloaddition dipolaire-1,3 vis-à-vis des oxydes de nitrile et des azotures. Les 2- et 3-bromocarbazolequinones correspondantes sont également synthétisées. Elles nous permettront d'étudier l'incidence de cette substitution sur l'orientation de la cycloaddition et éventuellement d'obtenir les différents cycloadduits d'une manière totalement régiosélective.

La méthodologie que nous avons choisie a été déjà appliquée dans notre laboratoire et a conduit aux composés attendus avec d'assez bons rendements <sup>27</sup>. La première étape est une réaction entre la phénylhydrazine **231** et la cyclohexan-1,3-dione **232**, elle conduit à la phénylhydrazinocyclohexénone **233** avec un bon rendement. La synthèse indolique de Fischer à partir de **233** conduit à la tétrahydrocarbazolone **234** (Schéma 57).



En ce qui concerne le mécanisme de la synthèse indolique de Fischer, il débute par un réarrangement sigmatropique [3+3] de la phénylhydrazinocyclohexénone **233** et qui aboutit à la cyclisation et à l'élimination d'une molécule d'ammoniac (Schéma 58).



La *N*-éthylation de **234** (Schéma 59) est ensuite réalisée dans le but d'améliorer la solubilité de la carbazolequinone correspondante. Nous avons en effet remarqué que les carbazolequinones non substituées sur l'azote sont très peu solubles dans les solvants organiques usuels.





La déshydrogénation de la tétrahydrocarbazolone **235** est effectuée au moyen de Pd-C à 10% au reflux du diphényléther, un solvant à haut point d'ébullition (259°C). L'hydroxycarbazole **236** est obtenu avec un rendement de 71% (Schéma 60).



Schéma 60

Cette dernière étape est très longue car le diphényléther est éliminé par chromatographie sur colonne de silice, or plus la quantité de produit de départ est importante, plus on est obligé d'utiliser de grande quantité de solvant, plus l'élimination de ce dernier est difficile. Le solvant est élué en premier mais il est susceptible d'entraîner l'hydroxycarbazole. On est donc obligé de fractionner la solution contenant l'hydroxycarbazole, ou bien de passer sur plusieurs colonnes de façon séquentielle pour éliminer ce solvant.

Par la suite, un composé a été commercialisé le 4-hydroxy-(9*H*)-carbazole **237**. L'utilisation de ce composé a permis d'améliorer les rendements et de réduire le temps de synthèse de **236**. Nous avons donc réalisé une *N*-éthylation sélective de l'hydroxycarbazole **237** selon la méthode décrite par D. Albanese et *al* 1995  $^{25}$  et appliquée au 2-hydroxycarbazole. Cette méthode permet une *N*-alkylation directe sans protection de la fonction phénol, et ceci en générant le dianion par un excès de base forte (NaH 60%, 2,5 éq.) dans le THF en présence d'une faible quantité de DMF (2 éq.) et en alkylant dans des conditions rigoureusement anhydres sous courant d'azote et à température ambiante (Schéma 61).



Le 4-hydroxycarbazole **236** est ensuite oxydé par le sel de Frémy dans un mélange acétone-eau à température ambiante pour conduire à la carbazolequinone **238** (Schéma 62).





Nous avons synthétisé la 2-bromocarbazolequinone **240** par bromation de la carbazolequinone **238** au moyen de dibrome  $Br_2$  (Schéma 63). Cette réaction procède par une addition de  $Br_2$  sur la double liaison C=C de la quinone conduisant à l'intermédiaire dibromé **239**, suivie d'une élimination de HBr. L'orientation de l'élimination de HBr s'explique par le fait

que le carbonyle en C-1, moins riche en électrons que le carbonyle en C-4 (enrichi en électrons par effet mésomère donneur de l'atome d'azote), entraîne une augmentation de l'acidité de H-2 par rapport à H-3. H-2 peut donc s'éliminer plus facilement initiant la déshydrobromation qui conduit à la 2-bromocarbazolequinone **240**. Cette étape nécessite l'utilisation d'acide acétique rigoureusement anhydre sous peine d'échec. Le solvant est donc séché sur anhydride acétique.



# Schéma 63

La 3-bromocarbazolequinone **243** a été obtenue en deux étapes, à partir du 4hydroxycarbazole **236**. La bromation à l'aide du *N*-bromosuccinimide conduit au mélange des deux hydroxycarbazoles monobromé **241** et dibromé **242** avec un rendement de 90% et dans les proportions 9/1 en faveur du monobromé. L'oxydation de ce mélange par le sel de Frémy conduit à la seule 3-bromocarbazolequinone **243** avec un rendement de 72% (Schéma 64).



Schéma 64

#### 2) Synthèse des oxydes de nitriles

Les oxydes de nitriles sont généralement préparés à partir d'aldoximes par une réaction d'halogénation suivie d'une déshydrohalogénation en milieu basique <sup>76</sup> (Schéma 65).

$$R-CH=N-OH \xrightarrow{NaOH} \left[ \begin{array}{ccc} R-CH=N-O & \leftrightarrow & R-CH-N=O \\ Aldoxime & Anion oxime \end{array} \right] Na + H_2O \xrightarrow{Cl_2}{-NaCl} Aldoxime & Anion oxime \\ R-CH=N-O & \bigoplus & R-CH=N-O \\ \hline Cl & OH & Na \\ \hline Cl & OH & OH \\ \hline Cl & OH & Na \\ \hline Cl & OH & OH \\ \hline Cl & OH \\ \hline Cl$$

basocatalysée

#### Schéma 65

Il a été également décrit que la déshydrogénation d'une aldoxime au moyen de l'hypochlorite ou l'hypobromite de sodium conduit à l'oxyde de nitrile correspondant avec de bons rendements <sup>77</sup> (Schéma 66).

> $\xrightarrow{\text{NaOCl ou NaOBr}} \xrightarrow{\text{(f)} \bigcirc} R - C = N - O$ R−CH=N−OH Schéma 66

Pour notre part, nous avons appliqué cette dernière stratégie. Les oxydes de nitrile 246 et 247 ont été préparés respectivement à partir de l'oxime du benzaldéhyde 244 et de l'oxime du 6méthylpyridine-2-carboxaldéhyde 245 par une réaction de déshydrogénation au moyen d'hypochlorite de sodium dans le THF à 0°C (Schéma 67).





<sup>&</sup>lt;sup>76</sup> C. Grundmann, J.M. Dean. J. Org. Chem., **1965**, <u>30</u> (8), 2809 - 2812

<sup>&</sup>lt;sup>77</sup> C. Ticozzi, A. Zanarotti, *Tetrahedron Letters*, **1994**, <u>35</u> (40), 7421 - 7424

Il est connu que les oxydes de nitriles se dimérisent spontanément pour donner des oxydes d'oxadiazoles <sup>76</sup> (Schéma 68). Afin d'éviter cette dimérisation conduisant aux composés **248** et **249**, nous avons utilisé nos oxydes de nitriles fraîchement préparés et sans purification. La phase organique, qui contient l'oxyde de nitrile, est séparée par décantation puis séchée sur sulfate de sodium et utilisée directement dans les réactions de cycloaddition.



Schéma 68

#### 3) Cycloaddition dipolaire-1,3 entre les para-carbazolequinones et les oxydes de nitriles

# 3.1) Réaction avec la para-carbazolequinone non bromée

La réaction de cycloaddition entre la quinone non bromée **238** et l'oxyde de nitrile **246** est réalisée dans le THF, à température ambiante. Au bout de 3 jours d'agitation pendant lesquels un excès d'oxyde de nitrile est régulièrement ajouté par petites fractions, la réaction conduit à un mélange des deux régioisomères **250** et **251** dans des proportions équivalentes et avec un rendement global de 48% (Schéma 69). Les proportions sont déterminées en se basant sur la RMN <sup>1</sup>H réalisée sur le mélange.

Les cycloadduits primaires de type isoxazoline ont été observés sur CCM mais ils finissent par disparaître au profit des composés aromatiques **250** et **251**, certainement grâce à une oxydation rapide par la quinone **238**.



La cycloaddition de la quinone 238 avec l'oxyde de nitrile 247, réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, nécessite la présence d'alumine basique pour aboutir aux composés aromatiques 252 et 253. En absence d'alumine basique, la réaction conduit au mélange de ces derniers composés avec leurs cycloadduits primaires respectifs.

Les régioisomères **252** et **253** sont obtenus quasiment dans les mêmes proportions, déterminées par RMN <sup>1</sup>H, avec un rendement global de 50% (Schéma 70).



#### 3.2) Réaction avec les bromocarbazolequinones

Dans une étude menée, dans notre laboratoire 2778 sur la réactivité des *p*-carbazolequinones dans la réaction de Diels-Alder avec des azadiènes, on a montré que la présence d'un brome en position C2 ou C3 de la quinone permet d'améliorer leur réactivité et d'orienter la cycloaddition d'une manière totalement régiosélective.

Nous présenterons dans cette partie les résultats des cycloadditions 1,3-dipolaires réalisées entre les carbazolequinones bromées 240 et 243 et les oxydes de nitriles 246 et 247.

#### 3.2.1) Réaction avec la 2-bromocarbazolequinone

Les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire de la 2-bromoquinone **240** avec les oxydes de nitriles **246** et **247** ont été effectuées dans le THF à température ambiante pendant 3 jours. Un large excès d'oxyde de nitrile est utilisé et ajouté goutte à goutte dans le milieu réactionnel. Un seul régioisomère est obtenu, c'est celui dans lequel l'atome d'oxygène de l'oxyde de nitrile est lié au carbone C2 de la quinone. Ainsi, les régioisomères **250** et **252** sont obtenus avec des rendements respectifs de 48% et 58% (Schéma 71).

 <sup>&</sup>lt;sup>78</sup> A. Poumaroux, Z. Bouaziz, H. Fillion, M. Domard, J. Giraud, A. F. Pétavy. *Chem. Pharm. Bull.*, **1999**, <u>47</u> (5), 643
 - 646

Dans ce cas, les cycloadduits primaires de type isoxazoline n'ont pas été observés. Une élimination spontanée de HBr conduit aux composés aromatiques.



Schéma 71

# 3.2.2) Réaction avec la 3-bromocarbazolequinone

Les cycloadditions entre la 3-bromoquinone **243** et les oxydes de nitriles **246** et **247** ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment. Elles conduisent respectivement aux régioisomères **251** et **253** pour lesquels l'atome d'oxygène de l'oxyde de nitrile est lié au carbone C3 de la quinone (Schéma 72).



Schéma 72

#### 3.3) Détermination structurale

Une séquence COSY (Correlated Spectroscopy) a été préalablement réalisée sur le régioisomère **252**. Cette séquence permet de mettre en évidence les couplages scalaires entre noyaux magnétiquement non équivalents. Elle nous a permis l'attribution précise des protons aromatiques et par conséquent l'utilisation de la RMN <sup>1</sup>H NOE, afin de prouver la régiochimie de nos molécules. La mesure de l'effet Overhauser nucléaire est réalisée sur le couple **252** / **253** (Figure 1).

Dans le cas de l'isomère **252**, l'irradiation à 8,12 ppm (H-3') donne des réponses au niveau de H-4' à 7,81 ppm et de H-5 à 8,36 ppm. De plus, l'irradiation du signal du CH<sub>3</sub> du groupe éthyle à 1,52 ppm donne des réponses au niveau du CH<sub>2</sub> du groupe éthyle à 4,53 ppm et du H-8 à 7,48 ppm.

Dans le cas de l'isomère **253**, l'irradiation du signal du CH<sub>3</sub> du groupe éthyle à 1,47 ppm donne quatre réponses : à 7,88 ppm (H-3'), à 7,47 ppm (H-6), à 4,70 ppm (CH<sub>2</sub> du groupe éthyle) et à 2,71 ppm (CH<sub>3</sub>-6'). L'irradiation du signal de H-3' à 7,88 ppm donne, en plus de la réponse au niveau de H-4', une réponse au niveau du CH<sub>3</sub> du groupe éthyle à 1,47 ppm.





Nous n'avons pas réalisé d'expériences RMN <sup>1</sup>H NOE sur les régioisomères **250** et **251**, mais la comparaison de leurs spectres IR avec ceux des régioisomères **252** et **253** montre une certaine analogie, d'une part entre **250** et **252** obtenus à partir de la 2-bromocarbazolequinone et d'autre part entre **251** et **253** obtenus à partir de la 3-bromocarbazolequinone.

Les régioisomères **250** et **252** présentent deux bandes d'absorption à 1673 et 1658 cm<sup>-1</sup> relatives aux deux carbonyles, tandis que les régioisomères **251** et **253** présentent une seule bande C=O à 1673 cm<sup>-1</sup> pour le premier et à 1667 cm<sup>-1</sup> pour le second. Cette caractéristique IR a déjà été observée pour des régioisomères de type pyridocarbazolequinones synthétisés au laboratoire dans de précédents travaux 2778.

# 3.4) Etude de l'orientation de la cycloaddition par la théorie des orbitales frontières

Les calculs des valeurs des énergies des orbitales frontières ont été réalisés grâce à la collaboration avec le Pr. Monique Domard, responsable du laboratoire de chimie physique et modélisation moléculaire de l'ISPB.

La théorie des orbitales frontières permet d'une part d'étudier la réactivité du dipôle et du dipolarophile par le calcul des énergies des orbitales frontières HOMO et LUMO, et d'autre part de rendre compte de la régiosélectivité des cycloadditions avec l'utilisation des coefficients de ces orbitales frontières.

En général, si le dipolarophile est substitué par un groupe électroattracteur, alors on a réaction entre la HOMO du dipôle et la LUMO du dipolarophile. En revanche, si le dipolarophile est substitué par un groupe électrodonneur, alors on a réaction entre la HOMO du dipolarophile et la LUMO du dipôle.

Les carbazolequinones **238**, **240** et **243** sont des dipolarophiles appauvris en électrons par l'effet mésomère attracteur des deux carbonyles en C-1 et C-4, la réaction de cycloaddition dipolaire-1,3 avec les oxydes de nitrile devrait se faire par l'interaction entre les orbitales HOMO du dipôle et LUMO du dipolarophile. Ces conditions caractérisent ce que l'on appelle addition de Sustmann de type I. Ceci est confirmé par les valeurs des énergies des orbitales frontières qui ont été calculées au niveau *ab initio* en utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) avec la fonctionnelle hybride B3LYP <sup>79 80</sup> fournie dans le package gaussian 98 <sup>81</sup>. La fonctionnelle hybride B3LYP est devenue une des fonctionnelles les plus utilisées dans les travaux théoriques récents (Figures 2, 3 et 4).



Figure 2

<sup>&</sup>lt;sup>79</sup> C. Lee, W. Yang, R.G. Pan, *Phys. Rev. B.* **1988**, <u>37</u> (2), 785 - 789

<sup>&</sup>lt;sup>80</sup> A.D. Becke, J. Chem. Phys., **1993**, <u>98</u>, 5648 - 5652

<sup>&</sup>lt;sup>81</sup> M.J. Frisch, M.G.W. Trucks, G.H.B. Schlegel, J.A. Pople, *Gaussian* 98 (Revision A.10), Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **2001** 



Figure 3



Les interactions des orbitales frontières dans les états de transition d'une réaction, sont d'autant plus favorables que la différence d'énergie entre ces orbitales est plus faible. Par exemple, dans le cas de la réaction entre la carbazolequinone **238** et l'oxyde de nitrile **247**, l'état de transition est stabilisé par l'interaction HOMO **247** / LUMO **238** ( $\Delta E = 3,463 \text{ eV}$ ). L'état de transition de la réaction entre **238** et **246** est également stabilisé par l'interaction HOMO **246** / LUMO **238** ( $\Delta E = 3,251 \text{ eV}$ ).

Ces calculs montrent aussi une diminution de l'énergie de la LUMO des quinones bromées 240 et 243 par rapport à celle de la non bromée 238. La différence d'énergie entre les orbitales frontières HOMO des oxydes de nitriles et LUMO des quinones est plus faible dans le cas des quinones bromées 240 et 243. On devrait normalement s'attendre à une meilleure

réactivité des quinones bromées, mais malgré cette différence, nous n'avons pas observé une amélioration appréciable.

Afin d'étudier la régiosélectivité de la réaction de cycloaddition, nous avons calculé, par la même méthode, les coefficients des orbitales LUMO des quinones **238**, **240** et **243** au niveau des carbones C2 et C3 et des orbitales HOMO des oxydes de nitrile **246** et **247** au niveau des atomes d'oxygène et de carbone (Figure 5).



Pour les trois quinones **238**, **240** et **243** le coefficient le plus élevé se trouve en C-3. La présence d'un atome de brome en C-2 ou en C-3 entraîne une augmentation de ces coefficients mais celui de C-3 reste toujours le plus élevé.

Pour les oxydes de nitriles 246 et 247, le coefficient le plus élevé apparaît sur l'atome d'oxygène.

En se basant sur le principe du recouvrement maximum des orbitales frontières, on en déduit que les réactions de cycloaddition dipolaire [3+2] entre **238** et les oxydes de nitrile **246** et **247** conduisent préférentiellement aux régioisomères respectifs **251** et **253**. Or, les résultats expérimentaux, décrits dans les schémas 67 et 68, montrent que nous avons obtenu, pour chaque oxyde de nitrile, les deux régioisomères dans des proportions sensiblement identiques. Les prévisions théoriques de l'orientation de la cycloaddition n'ont pas été vérifiées dans ce cas.

Pour les bromocarbazolequinones 240 et 243, deux hypothèses sont envisageables : - En tenant compte des coefficients orbitalaires, on devrait obtenir majoritairement 251 et 253. - En considérant que l'orientation de la cycloaddition est sous le contrôle de l'atome de brome conformément à ce qui a été décrit dans la littérature (l'oxygène de l'oxyde de nitrile attaque le carbone bromé de la quinone), on devrait obtenir majoritairement ou exclusivement les régioisomères **250** et **252** à partir de la 2-bromoquinone **240** et les régioisomères **251** et **253** à partir de la 3-bromoquinone **243**.

Les résultats que nous avons obtenus et qui sont décrits dans les schémas 69 et 70, confirment clairement cette deuxième hypothèse. En effet, nous avons obtenu d'une manière totalement régiosélective les régioisomères dans lesquels l'atome d'oxygène de l'oxyde de nitrile est lié au carbone bromé de la quinone.

# 3.5) Conclusion

La réaction de cycloaddition avec la carbazolequinone non bromée, conduit au mélange des deux régioisomères dans des proportions équivalentes.

L'utilisation des quinones bromées nous a permis d'obtenir les isoxazoloquinones régioisomères séparément et d'une manière totalement régiosélective. La sélectivité est gouvernée par la position de l'atome de brome, avec une attaque préférentielle de l'oxygène de l'oxyde de nitrile sur le carbone bromé de la quinone. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par J.L. Stevens et *al* 2003<sup>68</sup>.

Concernant le site de réactivité, les carbazolequinones réagissent par leur double liaison C=C conduisant aux structures isoxazoloquinones. Nous n'avons en aucun cas observé de dérivés spiraniques résultant de cycloadditions au niveau des doubles liaisons C=O.

# 4) Synthèse des azotures

La synthèse des azotures de benzyle **255** et de 4-méthoxybenzyle **209** est réalisée par substitution nucléophile sur les halogénures correspondants **254** et **256**, au moyen de l'azoture de sodium, selon la méthode décrite par D. R. Buckle et *al* 1982 <sup>82</sup>. La réaction est réalisée à l'abri de la lumière, dans l'éthanol pendant 24 heures (Schéma 73). La solution est ensuite reprise dans l'éther éthylique, lavée à l'eau pour éliminer l'azoture de sodium en excès, séchée et évaporée sous vide à une température inférieure à +20°C. Les azotures sont alors isolés sous forme d'une huile claire et utilisés sans purification.

<sup>&</sup>lt;sup>82</sup> D.R. Buckle, C.J.M. Rockell. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1982, 627 - 630





Schéma 73

# 5) Cycloaddition dipolaire-1,3 entre les para-carbazolequinones et les azotures

#### 5.1) Réaction avec la para-carbazolequinone non bromée

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, les réactions de cycloaddition avec les azotures sont des réactions généralement très lentes et pouvant donner différentes structures issues de la décomposition de l'adduit primaire de type triazoline. La nature des produits de la réaction dépend aussi de la nature du solvant et de la température du milieu réactionnel. La formation de la structure triazole semble être défavorisée par le chauffage à température élevée.

Nous avons testé différents solvants, comme le toluène, l'acétate d'éthyle ou le THF sans obtenir la formation du moindre produit après deux semaines à température ambiante. Dans l'éthanol, par contre nous avons obtenu un produit. Nous avons donc choisi de réaliser la cycloaddition 1,3 dipolaire de l'azoture de benzyle **255** avec la carbazolequinone **238** dans l'éthanol à température ambiante. Après 2 semaines de réaction, nous avons filtré pour isoler un précipité orange insoluble dans l'éthanol. Il contient les deux régioisomères **218** et **219** que nous avons séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice. Le rendement global est de 68% avec les proportions **218/219** = 4/1 (Schéma 74).


#### Schéma 74

La réaction avec l'azoture **209** est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Après 2 semaines de réaction à température ambiante, le solvant est évaporé à sec et le produit brut est repris dans l'éther éthylique pour donner un précipité orange constitué par les deux régioisomères **259** et **260** que nous avons séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice. Ils sont obtenus avec un rendement global de 27% et dans les proportions **259/260** = 3/1(Schéma 75).





#### 5.2) Réaction avec les bromocarbazolequinones

La réaction de la quinone non bromée avec les azotures conduit à un mélange de régioisomères avec des rendements assez moyens. Nous voulons étudier, comme nous l'avons

fait avec les oxydes de nitriles, l'incidence d'un atome de Brome en position C-2 ou C-3 de la quinone sur les cycloaddition avec les azotures.

#### 5.2.1) Réaction avec la 2-bromocarbazolequinone

La cycloaddition de l'azoture de benzyle **255** avec la 2-bromocarbazolequinone **240** a été réalisée dans l'acétonitrile à température ambiante pendant 4 jours. Le précipité orange qui apparaît dans le milieu est constitué du seul régioisomère **257**. Après recristallisation dans l'éthanol, **257** est obtenu avec un rendement de 50%.

La cycloaddition de **240** avec l'azoture **209** dans les mêmes conditions opératoires, conduit après 3 jours de réaction, au seul régioisomère **259** qui est obtenu après purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, avec un rendement de 43%.

Les résultats des cycloadditions de la 2-bromocarbazolequinone **240** avec les azotures **209** et **255** sont en accord avec ce que nous avons obtenu dans les cycloadditions de cette quinone avec les oxydes de nitriles. Elles sont totalement régiosélectives.

Dans le cas des azotures, la sélectivité est en faveur de l'isomère dans lequel l'atome N-1 de l'azoture est lié au carbone-3 de la quinone (Schéma 76).



Schéma 76

#### 5.2.2) Réaction avec la 3-bromocarbazolequinone

La cycloaddition de la 3-bromocarbazolequinone **243** avec les azotures, effectuée dans l'éthanol à température ambiante, conduit au mélange des deux régioisomères. La régiosélectivité, dans ce cas, est en faveur des isomères **258** et **260**, dans lesquels l'atome N-1 de l'azoture est lié au carbone-2 de la quinone (Schéma 77).

Les proportions des régioisomères avoisinent, dans les deux réactions, le rapport 1/2, alors que les proportions des régioisomères avec la quinone non bromée avoisine le rapport 4/1 ou 3/1.



#### 5.3) Détermination structurale

L'attribution structurale est basée sur une étude des corrélations  ${}^{1}\text{H}{-}^{13}\text{C}$  HMBC, réalisée sur le couple de régioisomères **259** / **260** (Figure 6).

Elle a révélé pour l'isomère **259**, la présence d'un couplage  $J^4$  entre les protons  $CH_2$  du groupement éthyle (4,76 ppm) et C-4 (172,86 ppm) tandis que les protons  $CH_2$  du groupement *p*-méthoxybenzyle (5,93 ppm) donne un couplage  $J^4$  avec C-10 (172,74 ppm).

Pour le régioisomère **260**, les protons  $CH_2$  de l'éthyle (4,69 ppm) et  $CH_2$  du groupement *p*-méthoxybenzyle (5,88 ppm) donnent un couplage  $J^4$  avec C-4 (170,26 ppm), tandis que C-10 (175,24 ppm) n'est pas corrélé.





Nous n'avons pas réalisé d'étude des corrélations <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC sur les régioisomères **257** et **258**, mais la comparaison de leurs spectres RMN <sup>13</sup>C et IR respectivement avec ceux des régioisomères **259** et **260** permet d'attribuer la structure sans équivoque.

Concernant la RMN <sup>13</sup>C, il existe une analogie, d'une part entre les régioisomères **257** et **259** obtenus à partir de la 2-bromocarbazolequinone et d'autre part entre les régioisomères **258** et **260** obtenus majoritairement à partir de la 3-bromocarbazolequinone. Cette analogie concerne essentiellement les déplacements chimiques des carbones carbonyliques C-4 et C-10. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

	δ C-4 (ppm)	δ C-10 (ppm)
257	172,90	172,68
259	172,86	172,74
258	170,42	175,44
260	170,26	175,24

Tableau 3

Dans le cas des isomères **257** et **259**, on note une différence de l'ordre de 0,2 ppm entre les déplacements de C-4 et C-10 alors qu'elle est de l'ordre de 5 ppm pour les isomères **258** et **260**.

Pour les spectres IR, les régioisomères **257** et **259** présentent deux bandes d'absorption relatives aux deux carbonyles : 1678 et 1652 cm<sup>-1</sup> pour **257** et 1679 et 1655 cm<sup>-1</sup> pour **259**.

Quant aux régioisomères **258** et **260**, ils ne présentent qu'une seule bande C=O à 1667  $\text{cm}^{-1}$  pour le premier et à 1670 cm<sup>-1</sup> pour le second.

#### 5.4) Etude de l'orientation de la cycloaddition par la théorie des orbitales frontières

Comme les carbazolequinones 238, 240 et 243 sont des dipolarophiles appauvris en électrons par l'effet mésomère attracteur des deux carbonyles en C-1 et C-4, la réaction de

cycloaddition dipolaire-1,3 avec les azotures devrait se faire par l'interaction entre les orbitales HOMO du dipôle et LUMO du dipolarophile. Ceci est confirmé par les valeurs des énergies des orbitales frontières calculées par la même méthode que précédemment (Figures 7, 8 et 9). En effet, la différence d'énergie entre HOMO azoture / LUMO quinone est plus faible que celle entre HOMO quinone / LUMO azoture.







Comme dans le cas des oxydes de nitriles, la différence d'énergie entre les orbitales frontières HOMO des azotures et LUMO des quinones est plus faible dans le cas des quinones bromées **240** et **243** par rapport à la quinone non bromée **238**, mais malgré cette différence, nous n'avons pas observé une amélioration appréciable de la réactivité des azotures sur les quinones bromées.

Afin d'étudier la régiosélectivité de la réaction de cycloaddition, les coefficients des orbitales HOMO des azotures **209** et **255** au niveau des atomes d'azote N-1 et N-3 ont été calculés par la même méthode que précédemment. Nous rappelons également les coefficients des orbitales LUMO des quinones **238**, **240** et **243** qui ont été calculés au niveau des carbones C-2 et C-3 (Figure 10).





Pour les quinones 238, 240 et 243 le coefficient le plus élevé se trouve en C-3. Pour les azotures 209 et 255, le coefficient le plus élevé est sur N-1. En se basant uniquement sur le principe du recouvrement maximum des orbitales frontières, les cycloadditions devraient conduire préférentiellement aux régioisomères 257 et 259.

Les résultats expérimentaux obtenus à partir de la quinone non bromée **238** et de la 2bromoquinone **240** sont en accord avec ces prédictions théoriques. L'atome N-1 de l'azoture attaque le carbone C-3 de la quinone pour conduire majoritairement ou exclusivement aux régioisomères **257** et **259**.

Par contre, avec la 3-bromoquinone **243**, nous avons obtenu des résultats inverses. L'azote N-1 de l'azoture attaque préférentiellement le carbone C-2 non bromé de la quinone pour conduire majoritairement aux régioisomères **258** et **260**.

Ces résultats montrent clairement que l'atome de brome en C-2 ou en C-3 de la quinone joue un rôle déterminant dans l'orientation de la cycloaddition. La quinone bromée en C-2 nous a permis d'accéder d'une manière totalement régiosélective aux régioisomères **257** et **259**. Alors que la quinone bromée en C-3 nous a permis d'obtenir majoritairement les régioisomères **258** et **260**.

#### 5.5) Conclusion

La réaction de cycloaddition des azotures avec la carbazolequinone non bromée, conduit au mélange des deux régioisomères dans des proportions différentes.

La 2-bromoquinone nous a permis d'obtenir un des régioisomères d'une manière totalement régiosélective et la 3-bromoquinone nous a permis d'obtenir l'autre régioisomère majoritairement. La sélectivité est gouvernée par la position de l'atome de brome, avec une attaque préférentielle de l'azote N-1 de l'azoture sur le carbone non bromé de la quinone.

Les conditions opératoires que nous avons appliquées dans nos réactions ont été plutôt favorables à la formation des composés triazoloquinones et nous n'avons en aucun cas isolé d'autres structures comme cela était observé dans certains travaux décrits dans la littérature.

**CHAPITRE 3 : PARTIE EXPERIMENTALE** 

### MATERIELS ET METHODES

#### **Purification des solvants**

Les solvants ont été purifiés selon les méthodes décrites dans l'ouvrage intitulé : « Purification of laboratory chemicals » <sup>83</sup>

## Chromatographies

Les chromatographies sur couche mince de gel de silice ont été réalisées avec les plaques Kieselgel 60 SIL G/UV 254 de Macherey-Nagel. Les plaques ont été révélées sous lumière UV (254 ou 365 nm). La séparation des produits par chromatographie sur colonne a été effectuée sur gel de silice Matrex (60 A, 35-70 µm).

#### Points de fusion

Les points de fusion ont été déterminés en tube capillaire à l'aide de l'appareil Büchi 510.

### Spectroscopie Infrarouge

Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un appareil de Perkin-Elmer 1310 infrared et Perkin-Elmer FT spectrum one.

#### Spectroscopie de Résonance magnétique Nucléaire

Les spectres de RMN ont été effectués à 300 MHz sur un appareil BRUKER AM 300 (<sup>1</sup>H-NMR: 300 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 75 MHz). Les produits ont été étudiés en solution dans CDCl<sub>3</sub> ou DMSO avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne.

#### Analyses centésimales :

Les analyses centésimales ont été réalisées au Service Central de Microanalyse du CNRS à Solaize. Les masses moléculaires et les pourcentages en C, H, N, O ont été calculés avec les valeurs suivantes : C : 12,011, H : 1,008, N : 14,007, O : 16,000

<sup>&</sup>lt;sup>83</sup> D.D. Perrin, W.L.F. Armarego, D.R. Perrin, Purification of Laboratory Chemicals, Pergamon Press Oxford, 2<sup>nd</sup> Ed. **1980** 



#### Mode opératoire:

Dans un tricol sec, on pèse 250 mg (6,25 mmol, 2,5 éq.) de NaH 60%.Sous atmosphère d'azote, on ajoute goutte à goutte pendant 10 min, une solution contenant 457,5 mg (2,5 mmol,1 éq.) de 2-hydroxycarbazole **80a**, 0,37 ml de DMF et 5 ml de THF anhydre.

Au bout de 10 min, on ajoute l'agent alkylant  $CH_3I$ : 0,17 ml (390,5 mg, 2,75 mmol, 1,1 éq.).On laisse agiter à température ambiante et sous atmosphère d'azote pendant 2 h. On refroidit le ballon dans un bain de glace, on ajoute 2 ml d'eau et on évapore à sec. Le résidu d'évaporation est reprit dans l'eau et neutralisé avec HCl 1N. On filtre le précipité qui est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant: $CH_2Cl_2/MeOH$  2%).On obtient une poudre jaune ocre.

## **Infrarouge** (**KBr**, v **cm**<sup>-1</sup>): 3360(O-H).

**RMN<sup>1</sup>H(DMSO**, δ, **ppm**): 9,53 (1H, s, O-H); 7,96 (1H, d, J=7,72 Hz, H-5); 7,89 (1H, d, J=8,29 Hz, H-4); 7,48(1H, d, J=8,1 Hz, H-8); 7,34 (1H, td, J=8,20 Hz et J=1,13 Hz, H-6 ou H-7); 7,13 (1H, td, J=7,73 Hz et J=0,95 Hz, H-6 ou H-7); 6,86 (1H, d, J=1,88 Hz, H-1); 6,68 (1H, dd, J=8,29 Hz et J=2,07 Hz, H-3); 3,37 (3H, s, CH<sub>3</sub>).



#### Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL, on dissout 2 g (9,52 mmol) d'aminocarbazole **84** dans 6 mL d'eau. On obtient une pâte marron clair. On ajoute goutte à goutte 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré sous agitation magnétique et en refroidissant dans un bain de glace. On obtient une solution vert foncé. On ajoute ensuite, goutte à goutte pendant 10 min, une solution froide de 0,8 g (11,60 mmol) de NaNO<sub>2</sub> dans 4 mL de H<sub>2</sub>O. On maintient la température entre 5 et 7°C et on continue d'agiter pendant 5 à 10 min après lesquelles on verse le mélange réactionnel sur une solution aqueuse d'acide sulfurique (6 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré dans 5 mL d'eau). On laisse agiter à 90°C pendant une nuit. Le test au β-naphtol étant négatif (disparition du sel de diazonium), on verse la solution dans 30 mL d'un mélange eau/glace. Après extraction par l'éther éthylique, la phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. Le résidu obtenu après évaporation est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). On obtient 0,614 g (2,91 mmol) d'hydroxycarbazole **86** de couleur beige.

## **IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 3300 (OH)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J** Hz, **\delta ppm**) : 8,03 (dd, 1H, *J* = 7,7 et 1,1 Hz, H-5); 7,54 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, H-4); 7,47 (td, 1H, *J* = 8,3 et 1,1 Hz, H-7); 7,38 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, H-8); 7,27 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz, H-1); 7,19 (td, 1H, *J* = 7,7 et 1,1 Hz, H-6); 7,04 (dd, 1H, *J* = 8,7 et 2,3 Hz, H-2); 4,85 (s, 1H, OH); 4,33 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,42 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

**Analyse élémentaire** : C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO, 0,4 H<sub>2</sub>O % calculé : C 76,97, H 6,37, N 6,41 % trouvé : C 77,16, H 6,40, N 6,23



# 1,2-Dihydrocarbazole-1,2(9H)-dione (81a)

#### Mode opératoire :

Dans un monocol de 500 ml, on dissout 1 g (5,45 mmol, 1 eq.) de 2-hydroxycarbazole 80a dans 200 ml d'acétone. On ajoute goutte à goutte une solution contenant 3,66 g (13,5 mmol, 2,5 eq.) de sel de Frémy, 181 mg (1,32 mmol, 0,24 eq.) de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 200 ml d'eau permutée.

Une fois l'addition terminée, on agite pendant 30 min à température ambiante. Après extraction par le dichlorométhane, la phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. Le résidu obtenu après évaporation est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 5 %). On obtient une poudre vert foncé.

Infrarouge (KBr,  $v \text{ cm}^{-1}$ ) : 3260 (N-H) ; 1665 et 1640 (C = O).

**RMN** <sup>1</sup>H (**DMSO**, δ **ppm**) : 12,61 (1H, s, N-H) ; 7,87 (2H, m, J=9.9 Hz, H-5 et H-3 ou H-4) ; 7,37 (2H, m, H-8 et H-6 ou H-7); 7,19 (1H, m, H-6 ou H-7); 5,97 (1H, d, H-3 ou H-4, J=9,9 Hz).



### Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 ml , on dissout 120 mg (0,61mmol,1eq.) de 2-hydroxy-9-méthyl-(9H)carbazole dans 25 ml d'acétone. On ajoute goutte à goutte , une solution contenant 408,5 (1,52mmol,2,5eq.) de sel de Frémy, 19,9 mg(0,15mmol,0,25eq) de  $KH_2PO_4$  dans 25 ml d'eau permutée.

Une fois l'addition terminée, on laisse agiter pendant 30min à température ambiante. Après extraction par le dichlorométhane, la phase organique est séchée sur  $Na_2SO_4$  anhydre.Le résidu obtenu après évaporation est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice(éluant:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

# Infrarouge(KBr, ,v cm<sup>-1</sup>): 1670 et 1640 (C=O)

**RMN<sup>1</sup>H(DMSO**, δ, **ppm**): 7,9 (2H, m, H-5 et H-3 ou H-4) ; 7,59 (1H, d, J=8,67 Hz, H-8) ; 7,45 (1H, m, H-6 ou H-7) ; 7,26 (1H, m, H-6 ou H-7) ; 6,01 (1H, d, J=9,8 Hz, H-3 ou H-4); 4 (3H, s, CH<sub>3</sub>).



## Mode opératoire :

Dans un ballon de 25 ml, on dissout 300 mg (1,52 mmol, 1 eq.) de carbazole-1,2-(9H)-dione dans 14 ml de THF anhydre. On ajoute goutte à goutte une solution contenant 503 mg (4,5 mmol, 3 eq.) de 1-acétoxy-1,3-butadiène dans 1 ml de THF.

On chauffe au reflux pendant 15h. Le résidu d'évaporation est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant :  $CH_2Cl_2/MeOH 5 \%$ ). On obtient une poudre noire.

# **Infrarouge (KBr, ν cm<sup>-1</sup>)** : 3320 (N-H) ; 1710 et 1680 (C = O).

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl3**, δ **ppm**) : 12,4 (1H, s, N-H) ; 8,29 (1H, d, J=8,29 Hz) ; 8,18 (1H, d, J=7,73 Hz) ; 7,89 (1H, dd, J=7,72 Hz et J=1,32 Hz) 7,68 (1H, td, J=7,64 Hz et J=1,32 Hz) ; 7,44 (2H, m) ; 7,34 (1H, td, J=7,54 Hz et J=0,94 Hz) ; 7,25 (1H, td, J=6,6 Hz et J=1,51 Hz).

**Microanalyse** : C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>, 0,3H<sub>2</sub>O % calculé : C 76,13, H 4,04, N 5,12 % trouvé : C 76,03, H 3,83, N 5,54

## 1,4,4a,11c-Tétrahydro-1,4-méthano-7H-benzo[c]carbazole-5,6-dione (83)



### Mode opératoire :

On dissout 1 g (5,3 mmol, eq.) de 1,2-dihydrocarbozole-1,2-(9H)-dione dans 40 ml de dichlorométhane. On agite magnétiquement, tout en refroidissant dans un bain de glace avec du sel (-10°C). on ajoute alors goutte à goutte 1,05 g (15,9 mmol, 3 eq., 1,13 ml) de cytopentadiène fraîchement distillé. On laisse agiter pendant 5h à -10°C, puis une nuit à température ambiante. Le résidu obtenu après évaporation est lavé avec de l'éther éthylique et filtré. Le précipité obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 3 %), puis reprit à froid dans le dichlorométhane. On obtient un produit jaune vif.

Infrarouge (KBr,  $v \text{ cm}^{-1}$ ) : 3260 (N-H) ; 1700 et 1640 (C = O).

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl3**, **δ ppm**) : 8,9 (1H, s, N-H) ; 7,87 (1H, d, J=7,91Hz, H-11) ; entre 7,55 et 7,20 (3H aromatiques, m) ; 6,1 (1H, t, J=5,65 Hz et J=2,45 Hz, H-2 ou H-3) ; 5,58 (1H, t, J=5,28 Hz et J=3,02 Hz, H-2 ou H-3) ; 4,1 (1H, dd, J=7,16 Hz et J=3,77 Hz, H-11c) ; 3,59 (2H, s, H-1 et H-4) ; 3,42 (1H, dd, J=7,16 Hz et J=3,96 Hz, H-4a) ; 1,71 (2H, s, H-12).

**Microanalyse** : C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>, 0,7H<sub>2</sub>O % calculé : C 74, H 5,26, N 5,07 % trouvé : C 73,98, H 4,89, N 5,23



### Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL, on dissout 2 g (9,52 mmol) d'aminocarbazole **84** dans 6 mL d'eau. On obtient une pâte marron clair. On ajoute goutte à goutte 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré sous agitation magnétique et en refroidissant dans un bain de glace. On obtient une solution vert foncé. On ajoute ensuite, goutte à goutte pendant 10 min, une solution froide de 0,8 g (11,60 mmol) de NaNO<sub>2</sub> dans 4 mL de H<sub>2</sub>O. On maintient la température entre 5 et 7°C et on continue d'agiter pendant 5 à 10 min après lesquelles on verse le mélange réactionnel sur une solution aqueuse d'acide sulfurique (6 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré dans 5 mL d'eau). On laisse agiter à 90°C pendant une nuit. Le test au β-naphtol étant négatif (disparition du sel de diazonium), on verse la solution dans 30 mL d'un mélange eau/glace. Après extraction par l'éther éthylique, la phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre. Le résidu obtenu après évaporation est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). On obtient 0,614 g (2,91 mmol) d'hydroxycarbazole **86** de couleur beige.

# **IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 3300 (OH)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J** Hz,  $\delta$  **ppm**) : 8,03 (dd, 1H, *J* = 7,7 et 1,1 Hz, H-5); 7,54 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz, H-4); 7,47 (td, 1H, *J* = 8,3 et 1,1 Hz, H-7); 7,38 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, H-8); 7,27 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz, H-1); 7,19 (td, 1H, *J* = 7,7 et 1,1 Hz, H-6); 7,04 (dd, 1H, *J* = 8,7 et 2,3 Hz, H-2); 4,85 (s, 1H, OH); 4,33 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,42 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

**Analyse élémentaire** : C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO, 0,4 H<sub>2</sub>O % calculé : C 76,97, H 6,37, N 6,41 % trouvé : C 77,16, H 6,40, N 6,23



# 9-Ethyl-3,4-dihydrocarbazole-3,4-(9H)-dione (87)

## Mode opératoire :

Dans un ballon de 500 mL, on dissout 0,614 g (2,91 mmol) de **86** dans 115 mL d'acétone. On ajoute goutte à goutte, une solution contenant 1,957 g (7,28 mmol) de sel de Frémy, 0,103 g (0,76 mmol) de  $KH_2PO_4$  dans 115 mL d'eau permutée.

Une fois l'addition terminée, on laisse agiter pendant 45 min à température ambiante. Après extraction par le dichlorométhane, la phase organique est séchée sur  $Na_2SO_4$  anhydre. Le résidu obtenu après évaporation est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant :  $CH_2Cl_2 / MeOH$ , 99,5/0,5). On obtient 0,327 g (1,45 mmol) de quinone **87** de couleur rouge.

## **IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1670, 1640 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **\delta ppm**) : 8,09 (m, 1H, H-5); 7,31 à 7,15 (m, 4H, H-1, H-6, H-7, H-8); 6,16 (d, 1H, J = 10,2 Hz, H-2); 4,14 (q, 2H, J = 7,4 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,43 (t, 3H, J = 7,4 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH</u><sub>3</sub>)

**RMN** <sup>13</sup>**C** (**DMSO-d**<sub>6</sub> δ **ppm**) : 16,74 (CH<sub>3</sub>), 39,28 (CH<sub>2</sub>), 113,12, 113,51, 121,60, 125,51, 125,54, 126,34, 129,45, 131,88, 138,41, 143,97, 173,15 (CO), 184,67 (CO)

**Analyse élémentaire** : C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>, 0,3 H<sub>2</sub>O % calculé : C 72,90, H 5,07, N 6,07 % trouvé : C 72,81, H 4,90, N 6,07

# 3-Amino-9-éthyl-1-[(9-éthyl-9*H*-carbazol-3-yl) imino]-1,9-dihydro-4*H*carbazol-4-one (92)



#### Mode opératoire :

Dans un ballon de 500 mL, on pèse 1 g (4,76 mmol) d'aminocarbazole **84**. On ajoute 200 mL d'acétone et on agite magnétiquement à température ambiante. On prépare une solution de 3,2 g (11,90 mmol) de sel de Frémy et 0,16 g (1,19 mmol) de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 200 mL d'eau permutée. Cette solution est versée dans une ampoule de coulée et elle est ajoutée goutte à goutte pendant trois quart d'heure à la solution d'aminocarbazole. Le mélange est agité à température ambiante pendant une heure. On extrait par du dichlorométhane, on sèche sur sulfate de magnésium et on évapore le solvant à la trompe à eau. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice avec pour éluant le mélange AcOEt / Ether de pétrole (20/80). On obtient deux composés: **92** (10%) de couleur rouge sombre et **93** (30%) de couleur violet.

### **IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>): 3460, 3360, 1635, 1595

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **\delta ppm**) : 8,19 (d, 2H, *J* = 7,4 Hz); 7,77 (d, 1H, *J* = 7,4 Hz); 7,76 (s, 1H, H-4'); 7,68 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz); 7,62 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz); 7,49-7,33 (m, 3H); 7,21-7,13 (m, 2H); 6,34 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 5,93 (s, 1H, H-2); 4,96 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 4,48 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,45 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,36 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)</u></u>

**Analyse élémentaire** : C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O, 0,4 H<sub>2</sub>O % calculé : C 76,48, H 5,68, N 12,74 % trouvé : C 76,51, H 5,73, N 12,59

# 3-Amino-9-éthyl-1-[(9-éthyl-4-hydroxy-9*H*-carbazol-3-yl) imino]-1,9-dihydro-4*H*-carbazol-4-one (93)



## Mode opératoire :

Voir le composé précédent.

**IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 3500, 3380, 1625, 1585, 1550

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**DMSO-d<sub>6</sub>, \delta ppm) : 9,00 (s, 1H, OH**); 8,26 (d, 1H, *J* = 7,4 Hz); 8,19 (d, 1H, *J* = 7,4 Hz), 7,75 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz); 7,57 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz); 7,44–7,32 (m, 3H); 7,19 (m, 1H); 7,14 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz); 7,01 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz); 6,32 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 6,04 (s, 1H, H-2); 5,03 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 4,42 (q, 2H, *J* = 7,4 Hz, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,41 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH<sub>3</sub>); 1,35 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH<sub>3</sub>)</u></u></u></u>

**FAB-MS** *m*/*z* 449 (M+H)<sup>+</sup>

**Analyse élémentaire** : C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 0,4 H<sub>2</sub>O % calculé : C 73,79, H 5,49, N 12,29 % trouvé : C 73,87, H 5,41, N 12,36

# 11-Ethylbenzo[a]carbazole-5,6(11H)-dione (94)



#### Mode opératoire :

Dans un ballon de 10 mL, on dissout 0,050 g (0,22 mmol) de quinone **87** dans 2,5 mL de toluène fraîchement distillé. On ajoute goutte à goutte une solution contenant 0,097 g (0,87 mmol) de 1-acétoxy-1,3-butadiène dans 1 mL de toluène.

On chauffe au reflux pendant 4h30, puis on ajoute 0,5 g d'alumine basique et on laisse au reflux la nuit. Le résidu d'évaporation est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant :  $CH_2Cl_2$  / MeOH, 98/2). On obtient 0,021 g (0,08 mmol) de benzocarbazolequinone **94** de couleur orange.

**IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1690, 1630 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **\delta ppm**) : 8,30 (dd, 1H, *J* = 6,6 et 1,8 Hz); 8,16 (dd, 1H, *J* = 7,6 et 1,0 Hz); 7,80 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz); 7,68 (td, 1H, *J* = 7,6 et 1,3 Hz); 7,46 (t, 1H, *J* = 7,4 Hz); 7,40 - 7,28 (m, 3H); 4,59 (q, 2H, *J* = 7,3 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,69 (t, 3H, *J* = 7,3 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

**RMN** <sup>13</sup>**C** (**DMSO-d<sub>6</sub>**, **δ ppm**) : 15,59 (CH<sub>3</sub>), 41,50 (CH<sub>2</sub>), 112,42, 115,12, 121,95, 125,24, 125,82, 125,88, 125,93, 129,97, 130,83, 131,16, 132,10, 136,28, 139,69, 143,62, 174,50 (CO), 182,42 (CO)

**Analyse élémentaire** : C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>, 0,25 H<sub>2</sub>O % calculé : C 77,26, H 4,86, N 5,00 % trouvé : C 77,31, H 4,80, N 4,78

# 11-Ethyl-1,4-dihydro-1,4-méthanobenzo[a]carbazole-5,6(11H)-dione (95)



#### Mode opératoire :

On dissout 0,150 g (0,67 mmol) de quinone **87** dans 6 mL de  $CH_2Cl_2$ . On agite magnétiquement, tout en refroidissant dans un bain de glace. On ajoute alors goutte à goutte 0,5 mL (0,4 g, 2,42 mmol) de cyclopentadiène fraîchement distillé. On laisse agiter pendant 6h à 0°C, puis on ajoute 1,5 g de silice et on laisse 48h sous agitation magnétique en chauffant légèrement (~ 40°C).

Le mélange réactionnel est filtré et la silice est lavée plusieur fois avec  $CH_2Cl_2$ . Le filtrat est concentré sous vide de la trompe à eau et le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant :  $CH_2Cl_2$  / MeOH, 98/2). Le composé **95** obtenu est de couleur vert foncé.

# **IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1625 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J** Hz,  $\delta$  **ppm**) : 8,15 (m, 1H, *J* = 7,9 et 1,1 Hz, H-7); 7,34 - 7,25 (m, 3H, H-8, H-9, H-10); 6,96 (dd, 1H, *J* = 4,9 et 3,2 Hz, H-2 ou H-3); 6,82 (dd, 1H, *J* = 4,9 et 3,2 Hz, H-2 ou H-3); 4,45 (q, 2H, *J* = 7,4 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 4,33 (s, 1H, H-1 ou H-4); 4,16 (s, 1H, H-1 ou H-4); 2,36 (m, 2H, H-12); 1,58 (t, 3H, *J* = 7,4 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm**) : 17,11 (CH<sub>3</sub>), 47,78 (CH<sub>2</sub>), 52,28, 70,97, 111,34, 112,73, 121,17, 125,31, 125,57, 126,82, 127,03 138,81, 141,16, 144,37, 151,16, 151,36, 160,90,176,15 (CO), 178,58 (CO)

**Analyse élémentaire** : C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>, 0,5 H<sub>2</sub>O % calculé : C 76,49, H 5,41, N 4,69 % trouvé : C 76,56, H 5,29, N 4,67

3-(N'-phénylhydrazino)-cyclohex-2-èn-1-one (233)



#### Mode opératoire :

A une solution de 5,6g (50 mmol) de cyclohexane-1,3-dione dans 80 ml d'eau, sous agitation et à température ambiante, on ajoute goutte à gutte une solution de 5,4g (50 mmol) de phénylhydrazine dans 20 ml d'acide acétique à 20%. Il se forme un précipité qui est récupéré par filatration puis séché et recristallisé dans un mélange éthanol / eau. On obtient une pourdre blanche (9,7g). La réaction est suivie en CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9 :1)

# **IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 3250 (NH) , 1605 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**DMSO**-*d6*, **J Hz**, **δ ppm**) : 8,71 (s, 1H, N-H); 7,83 (s, 1H, N-H); 7,18-7,13 (m, 2H, H arom.); 6,74-6,66 (m, 3H, H arom.); 4,98 (s, 1H, H-2); 2,10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1,85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>)

#### Litt. :

Point de fusion : 177-187°C, Rdt = 94% <sup>84</sup> 188-190°C, Rdt = 80% <sup>85</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>84</sup> J.K. Rodriguez, F. Temprano, C. Esteban-Calderon, M. Martinez-Ripoll. J. Chem. Soc. Perkin Trans I, **1989**, 2117-2122

<sup>&</sup>lt;sup>85</sup> D. Joseph, L. Martarello, G. Kirsch J. Chem. Research (S), **1995**, 448-449 ; J. Chem. Research (M), **1995**, 2557-2568



# 1,23,9-Tétrahydro-(4H)-carbazol-4-one (234)

## Mode opératoire :

On dissout 4g (19,8 mmol) de phénylhydrazinocyclohexènone **233** dans 150 ml d'acide sulfurique 15%. On chauffe à reflux sous agitation pendant 4h30. Le milieu est ensuite transvasé dans un erlen refroidi dans un bain eau-glace. On ajoute goutte à goutte 300 ml d'eau. Un précipité jaune se forme, qui est récupéré par filtration, séché et recristallisé dans de l'acétone. On obtient une poudre jaunâtre (1,6 g, 8,64 mmol). La réaction est suivie en CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ Acétate d'éthyle : 1 :1)

# **IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 3110 (NH), 1610 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**DMSO-***d6*, **J Hz**, **δ ppm**) : 8,81 (signal large, 1H, N-H); 8,22 (m, 1H, H-5); 7,36-7,20 (m, 3H, H arom.); 2,98 (t, 2H, *J* = 6,2 Hz, CH<sub>2</sub>); 2,60 (t, 2H, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>2</sub>); 2,24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>)

# 9-Ethyl-1,2,3,9-tétrahydro-(4H)-carbazol-4-one (235)



### Mode opératoire :

On chauffe à reflux et sous agitation une suspension constituée de 2g (10,8 mmol) de tétrahydrocarbazolone **234**, 2,53 g (16,25 mmol) d'iodoéthane, 1,2g (21,38 mmol) de potasse en pastille et 0,246 g (1,08 mmol) de chlorure de benzyltriéthylammonium dans 150 ml d'acétone. Au bout d'une demi-heure, le milieu est refroidi puis filtré. Le filtrat est évaporé sous vide, et le résidu est dissous dans 150 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée à l'eau et séchée sur sulfate de magnésium. Après fiultration et évaporation du solvant, le produit brut est lavé à l'éther et recristallisé dans un mélange éther/ hexane. On obtient une poudre blanche (1,8g, 8,42 mmol). La réaction est suivie en CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pur).

**IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1630 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **δ ppm**) : 8,25 (m, 1H, H-5); 7,31-7,23 (m, 3H, H arom.); 4,13 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,91 (t, 2H, J = 6,2 Hz, CH2); 2,56 (t, 2H, J = 6,4 Hz, CH2); 2,22 (m, 2H, CH2); 1,39 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH</u><sub>3</sub>)

## Litt. :

Point de fusion 107-109°C<sup>86</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>86</sup> H. Iida, Y. Yuasa, C. Kibayashi J. Org. Chem., 1980, <u>45</u>, 2938-2942



## 9-Ethyl-4-hydroxy-(9H)-carbazole (236)

### Mode opératoire :

Dans un tricol sec de 100 mL, on pèse 4,70 g (117,50 mmol) de NaH 60%. Tout en agitant à température ambiante et sous atmosphère d'azote, on ajoute goutte à goutte pendant 10 min, une solution contenant 5 g (27,30 mmol) de l'hydroxycarbazole **237**, 4 mL de DMF et 50 mL de THF anhydre.

L'agitation est poursuivie pendant 1 h avant d'ajouter 2,4 mL (0,468 g, 30 mmol) de l'agent alkylant  $CH_3CH_2I$ . Il y a production de mousse. Au bout de 15 min, on refroidit le tricol à l'aide d'un bain de glace puis on ajoute 3 mL d'eau glacée. On transvase dans un monocol et on évapore le THF sous vide de la trompe à eau. On acidifie avec de l'acide chlorhydrique concentré (pH 4) puis on extrait par  $CH_2Cl_2$ . La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium puis évaporée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant: $CH_2Cl_2$  / Ether de pétrole, 3/1). On obtient 3,8 g (18 mmol) de poudre blanche de l'hydroxycarbazole **236**.

## **IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 3490 (OH)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **δ ppm**) : 8,32 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-5); 7,50-7,24 (m, 4H, H arom.); 7,00 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, H arom.); 6,58 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz, H arom.); 5,38 (s, 1H, OH); 4,35 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,43 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH</u><sub>3</sub>)

**Analyse élémentaire** : C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO % calculé : C 79,59, H 6,20, N 6,63 % trouvé : C 79,36, H 6,30, N 6,59

# 9-Ethyl-1,4-dihydrocarbazole-1,4(9H)-dione (238)



#### Mode opératoire :

Une solution de 0,86 g (3,20 mmol) de sel de Frémy et de 0,05 g (0,37 mmol) de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 50 mL d'eau permutée est ajoutée goutte à goutte à une solution de 0,320 g (1,52 mmol) de l'hydroxycarbazole **236** dans 50 mL d'acétone. Le mélange est agité à température ambiante pendant 1h. Après extraction avec du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>. Le résidu obtenu après évaporation du solvant est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / Ether de pétrole, 1/1). On obtient 0,286 g de quinone **238** sous la forme d'une poudre rouge.

**IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1660, 1640 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **\delta ppm**) : 8,22 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-5); 7,40-7,26 (m, 3H, H arom.); 6,56 (système AB, 2H, *J* = 10,2 Hz, H-2 et H-3); 4,58 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,38 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH</u><sub>3</sub>)

**Analyse élémentaire** : C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>, 0,4 H<sub>2</sub>O % calculé : C 72,34, H 5,11, N 6,02 % trouvé : C 72,47, H 4,98, N 5,86

### 2-Bromo-9-éthyl-1,4-dihydrocarbazole-1,4(9H)-dione (240)



#### Mode opératoire :

On dissout 0,338 g (1,50 mmol) de carbazolequinone **238** dans 36 mL d'acide acétique glacial. On ajoute, goutte à goutte 0,240 g (1,50 mmol) de brome dans 2 mL du même solvant sous agitation et à température ambiante. Au bout de 20 minutes, la solution est versée sur 80 mL d'un mélange eau-glace. Le précipité jaune formé est récupéré par filtration puis repris par 15 mL d'éthanol absolu. La solution obtenue est chauffée à reflux sous agitation pendant 45 minutes. Après refroidissement, **240** précipite sous la forme d'une poudre rouge qu'on récupère par filtration (0,370 g).

**IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1665, 1640 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **δ ppm**) : 8,25 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H-5); 7,46-7,30 (m, 3H, H arom.); 7,19 (s, 1H, H-3); 4,65 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,45 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH<sub>3</sub></u>)

**Analyse élémentaire** : C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrNO<sub>2</sub> % calculé : C 55,29, H 3,31, N 4,60, Br 26,27 % trouvé : C 55,53, H 3,32, N 4,59, Br 26,27

# 3-Bromo-9-éthyl-4-hydroxy-(9H)-carbazole (241)



#### Mode opératoire :

Une solution de 0,126 g (0,71 mmol) de NBS dans 5 mL d'acétonitrile est ajoutée goutte à goutte à une solution de 0,3 g (1,42 mmol) de **236** dans 10 mL du même solvant sous agitation et à température ambiante. Après 15 minutes, le solvant est évaporé sous vide et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt / Ether de pétrole, 1/9). Le composé monobromé **241** est obtenu sous forme d'huile (0,205 g). Le produit de départ **236** en excès est également récupéré (0,135 g).

# **IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 3520 (OH)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **δ ppm**) : 8,35 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-5); 7,51-7,46 (m, 2H, H arom.); 7,39 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz, H-8); 7,31-7,28 (m, 1H, H arom.); 6,90 (d, 1H, J = 8,6 Hz, H-1); 6,1 (s, 1H, OH); 4,32 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,41 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH</u><sub>3</sub>)

**Analyse élémentaire** : C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>BrNO % calculé : C 57,95, H 4,17, N 4,82 % trouvé : C 57,69, H 4,10, N 4,42

## 3-Bromo-9-éthyl-1,4-dihydrocarbazole-1,4(9H)-dione (243)



#### Mode opératoire :

Une solution de 0,43 g (1,60 mmol) de sel de Frémy et 0,025 g (0,18 mmol) de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dans 25 mL d'eau permutée est ajoutée goutte à goutte et à température ambiante à une solution de 0,16 g (0,76 mmol) du composé **241** dans 25 mL d'acétone. Le mélange est agité pendant 1h. Après extraction avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> puis concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / Ether de pétrole, 1/1). La bromoquinone **243** est obtenue sous la forme d'une poudre rouge (0,13 g).

**IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1655 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **δ ppm**) : 8,28 (m, 1H, H-5); 7,47-7,35 (m, 3H, H arom.); 7,13 (s, 1H, H-2); 4,63 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,44 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

**Analyse élémentaire** : C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>BrNO<sub>2</sub>, 0,15H<sub>2</sub>O % calculé : C 54,80, H 3,35, N 4,56, Br 26,04 % trouvé : C 54,60, H 3,35, N 4,55, Br 26,09

## 9-Ethyl-3-phénylisoxazolo[5,4-b]carbazole-4,10(9H)-dione (250)



## Mode opératoire :

## Préparation de l'oxyde de nitrile 246 :

Dans un erlen de 25 mL, on pèse 0,539 g (4,45 mmol) de benzaldoxime **244**, on ajoute 6 mL de THF et 6 mL (10,98 mmol) d'une solution d'hypochlorite de sodium à 13%. La solution est agitée pendant 15 minutes à température ambiante. La phase organique, contenant l'oxyde de nitrile **246**, est séparée par décantation, séchée sur sulfate de sodium et filtrée.

## Réaction de cycloaddition

La solution d'oxyde de nitrile est ensuite ajoutée progressivement à une solution de 0,152 g (0,50 mmol) de la 2-bromoquinone **240** dans 10 mL de THF. L'agitation à température ambiante est maintenue pendant 3 jours au cours desquels on rajoute un excès de l'oxyde de nitrile **246** fraîchement préparé. Après évaporation sous vide, le résidu obtenu est repris avec de l'éther éthylique pour donner un précipité rouge foncé qui est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant :  $CH_2Cl_2$  / Ether de pétrole, 1/1). On obtient 0,110 g (64%) de **250**. **250** est également purifié par recristallisation dans l'éthanol.

**IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1673, 1658 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **δ ppm**) : 8,38 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz, H-5); 8,18 (m, 2H, H arom.); 7,55 (m, 3H, H arom.); 7,48 (m, 2H, H-7 et H-8); 7,39 (m, 1H, H-6); 4,74 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,52 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH</u><sub>3</sub>)

**RMN** <sup>13</sup>**C** (**CDCl**<sub>3</sub>, δ ppm) : 15,61 (CH<sub>3</sub>), 40,92 (CH<sub>2</sub>), 111,47 (CH), 119,42 (Cq), 120,44 (Cq), 124,19 (CH), 124,70 (Cq), 125,72 (CH), 126,97 (Cq), 128,41 (CH), 129,01 (2 CH), 129,98 (2 CH), 131,47 (CH), 132,92 (Cq), 140,26 (Cq), 161,15 (Cq), 167,43 (Cq), 168,20 (Cq), 177,24 (Cq)

**Analyse élémentaire :** C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,5 H<sub>2</sub>O % calculé : C 71,79, H 4,30, N 7,97 % trouvé : C 71,64, H 4,20, N 7,86

# 5-Ethyl-3-phénylisoxazolo[4,5-b]carbazole-4,10(5H)-dione (251)



## Mode opératoire :

Préparation de l'oxyde de nitrile 246 : voir synthèse précédente

Réaction de cycloaddition

Dans un ballon de 50 mL, on pèse 0,1 g (0,33 mmol) de la 3-bromoquinone **243** et on ajoute 10 mL de THF. La solution d'oxyde de nitrile préparée avec 0,337 g (2,78 mmol) de benzaldoxime **244** est ensuite ajoutée progressivement à la solution de **243** préalablement préparée. On laisse agiter à température ambiante pendant 3 jours au cours desquels on rajoute un excès de l'oxyde de nitrile **246** fraîchement préparé. Après évaporation sous vide, le résidu obtenu est repris avec de l'éther éthylique pour donner un précipité rouge. Il est récupéré par filtration puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt / Ether de pétrole, 1/3). On obtient 0,078 g (69%) de **251**. **251** est également purifié par recristallisation dans l'éthanol.

**IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1667 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **δ ppm**) : 8,37 (d, 1H, *J* = 7,1 Hz, H-9); 8,09 (m, 2H, H arom.); 7,56 (m, 3H, H arom.); 7,48 (m, 2H, H-6 et H-7); 7,42 (m, 1H, H-8); 4,73 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,47 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

**RMN** <sup>13</sup>**C** (**CDCl**<sub>3</sub>, **δ ppm**) : 15,50 (CH<sub>3</sub>), 40,98 (CH<sub>2</sub>), 111,66 (CH), 117,72 (Cq), 118 (Cq), 123,79 (CH), 124,10 (Cq), 126,01 (CH), 126,90 (Cq), 127,81 (CH), 129,02 (2 CH), 129,75 (2 CH), 131,50 (CH), 135,73 (Cq), 139,57 (Cq), 161,01 (Cq), 168,72 (Cq), 170,50 (Cq), 175,01 (Cq)

**Analyse élémentaire :** C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,1 H<sub>2</sub>O % calculé : C 73,29, H 4,16, N 8,14 % trouvé : C 73,35, H 4,19, N 8,19

## 9-Ethyl-3-(6-méthylpyridin-2-yl)isoxazolo[5,4-b]carbazole-4,10(9H)-dione

(252)



### Mode opératoire :

### Préparation de l'oxyde de nitrile 247 :

Dans un erlen, on pèse 0,2 g (1,47 mmol) de 6-méthylpyridine aldoxime **245**, on ajoute 5 mL (9,15 mmol) d'une solution d'hypochlorite de sodium à 13% et 2 mL de THF, en refroidissant le bécher dans un bain de glace et en agitant. La solution initialement jaune, verdit. On vérifie par CCM ( $CH_2Cl_2$ ) la disparition de l'aldoxime. La phase organique, contenant l'oxyde de nitrile **247**, est séparée par décantation, séchée sur sulfate de sodium et filtrée.

#### Réaction de cycloaddition

Dans un ballon de 50 mL, on dissout 0,155 g (0,51 mmol) de 2-bromoquinone **240** dans 10 mL de THF et on agite à température ambiante. La solution d'oxyde de nitrile est ensuite ajoutée progressivement à la solution de **240** préalablement préparée. L'agitation à température ambiante est maintenue pendant 3 jours au cours desquels on rajoute un excès de l'oxyde de nitrile **247** fraîchement préparé. Après évaporation sous vide, le résidu obtenu est repris avec de l'éther éthylique pour donner un précipité rouge qui est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant :  $CH_2Cl_2$  pur puis  $CH_2Cl_2 / AcOEt$ , 1/1). On obtient 0,105 g (58%) de **252**. **252** est également purifié par recristallisation dans l'éthanol.

# **IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1673 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J** Hz,  $\delta$  **ppm**) : 8,36 (d, 1H, J = 8,2 Hz, H-5); 8,12 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-3'); 7,81 (t, 1H, J = 7,8 Hz, H-4'); 7,48 (m, 2H, H-7 et H-8); 7,38 (m, 1H, H-6); 7,34 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-5'); 4,73 (q, 2H, J=7,2 Hz, C<u>H</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-6'); 1,52 (t, 3H, J = 7,2 Hz, C<u>H</u><sub>3</sub>CH<sub>2</sub>) **RMN**<sup>13</sup>**C** (**CDCl**<sub>3</sub>, **δ ppm**) : 15,61 (CH<sub>3</sub>), 25,09 (CH<sub>2</sub>), 40,96 (CH<sub>3</sub>), 111,51 (CH), 119,64 (Cq), 120,436 (Cq), 123,19 (CH), 124,18 (CH), 124,68 (Cq), 125,56 (CH), 125,75 (CH), 128,45 (CH), 132,99 (Cq), 137,35 (CH), 140,28 (Cq), 146,05 (Cq), 159,73 (Cq), 160,56 (Cq), 167,33 (Cq), 168,07 (Cq), 176,91 (Cq)

Analyse élémentaire : C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, 0,1 H<sub>2</sub>O

% calculé : C 70,23, H 4,27, N 11,70

% trouvél : C 70,24, H 4,30, N 11,66

# 5-Ethyl-3-(6-méthylpyridin-2-yl)isoxazolo[4,5-b]carbazole-4,10(5H)-dione

(253)



## Mode opératoire :

### Préparation de l'oxyde de nitrile 247 :

On prépare une solution de 0,605 g (4,45 mmol) de 6-méthylpyridine aldoxime **245** dans 6 mL de THF, on refroidit dans un bain de glace et on ajoute 6 mL (10,98 mmol) d'une solution d'hypochlorite de sodium à 13% et on laisse agiter pendant 15 minutes. La phase organique, contenant l'oxyde de nitrile **247**, est séparée par décantation, séchée sur sulfate de sodium et filtrée.

#### Réaction de cycloaddition

La solution d'oxyde de nitrile est ensuite ajoutée progressivement à une solution de 0,05 g (0,16 mmol) de la 3-bromoquinone **243** dans 5 mL de THF. On laisse agiter à température ambiante pendant 3 jours au cours desquels on rajoute un excès de l'oxyde de nitrile **247** fraîchement préparé. Après évaporation sous vide, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt / Ether de pétrole, 1/3). On obtient 0,021 mg (35%) de **253**. **253** est également purifié par recristallisation dans l'éthanol.

**IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1673 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J** Hz, **\delta ppm**) : 8,34 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-9); 7,88 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-3'); 7,80 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-4'); 7,47 (m, 2H, H-6 et H-7); 7,42 (m, 1H, H-8); 7,35 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-5'); 4,70 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-6'); 1,47 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

**RMN** <sup>13</sup>**C** (**CDCl**<sub>3</sub>, **δ ppm**) : 15,44 (CH<sub>3</sub>), 25,05 (CH<sub>2</sub>), 40,96 (CH<sub>3</sub>), 111,68 (CH), 117,68 (Cq), 118,35 (Cq), 122,68 (CH), 123,74 (CH), 124,09 (Cq), 125,52 (CH), 126,00 (CH), 127,79 (CH),

135,72 (Cq), 137,35 (CH), 139,51 (Cq), 146,07 (Cq), 159,71 (Cq), 160,47 (Cq), 168,48 (Cq), 170,30 (Cq), 174,43 (Cq)

## Analyse élémentaire : C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, 0,3 H<sub>2</sub>O

% calculé : C 69,53, H 4,33, N 11,58

% trouvé : C 69,68, H 4,37, N 11,49

# 1-Benzyl-5-éthyl[1,2,3]triazolo[4,5-b]carbazole-4,10(1*H*,5*H*)-dione (257)



## Mode opératoire :

## Préparation de l'azoture 255 :

Dans un ballon de 100 mL on prépare une solution de 0,48 g (7,38 mmol) de NaN<sub>3</sub> et 1,13 g (6,61 mmol) de bromure de benzyle **254** dans 50 mL d'éthanol. La solution est ensuite chauffée au reflux pendant 24h. On laisse refroidir puis on ajoute 40 mL d'eau et on extrait l'azoture **255** par 3 x 30 mL d'éther éthylique. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium puis évaporée sous vide de la trompe à eau à une température  $< 20^{\circ}$ C. On obtient un produit liquide incolore huileux à l'odeur un peu anisée.

### Réaction de cycloaddition

On prépare une solution de 0,152 g (0,5 mmol) de la 2-bromoquinone **240** dans 10 mL d'acétonitrile. On agite à température ambiante et on ajoute goutte à goutte l'azoture **255** préparé précédemment. Au bout de quatre jours, on observe un précipité orange. La suspension est alors concentrée sous vide puis filtrée pour donner **257** sous la forme d'un solide orange qui sera purifié par recristallisation dans l'éthanol

**IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1678, 1667, 1652

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **δ ppm**) : 8,33 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz, H-9); 7,53 (m, 2H, H arom.); 7,46 (m, 3H, H arom.); 7,35 (m, 3H, H arom.); 5,98 (s, 2H, <u>CH</u><sub>2</sub>Ph); 4,76 (q, 2H, *J* = 7,0 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,48 (t, 3H, *J* = 7,0 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH</u><sub>3</sub>)

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**CDCl**<sub>3</sub>, **δ ppm**) : 15,51 (CH<sub>3</sub>), 40,95 (CH<sub>2</sub>), 53,72 (CH<sub>2</sub>), 111,66 (CH), 118,00 (Cq), 123,64 (CH), 124,37 (Cq), 125,81 (CH), 127,72 (CH), 129,08 (2 CH), 129,27 (CH), 129,35 (2 CH), 134,65 (2 Cq), 135,48 (Cq), 139,47 (Cq), 145,95 (Cq), 172,67 (CO), 172,90 (CO)

Analyse élémentaire : C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 0,4 H<sub>2</sub>O

% calculé : C 69,37, H 4,66, N 15,41

% trouvé : C 69,41, H 4,44, N 15,48
# 3-Benzyl-5-éthyl[1,2,3]triazolo[4,5-b]carbazole-4,10(3*H*,5*H*)-dione (258)



# Mode opératoire :

Préparation de l'azoture 255 : Voir synthèse précédente

#### Réaction de cycloaddition :

On prépare une solution de 0,152 mg (0,5 mmol) de la 3-bromoquinone **243** dans 5 mL d'éthanol, on ajoute goutte à goutte l'azoture **255** préparé précédemment. On laisse agiter à température ambiante pendant 15 jours au cours desquels un excès d'azoture, fraîchement préparé, est rajouté régulièrement. On observe la formation d'un précipité orange. La suspension est cocentrée sous vide puis filtrée pour conduire à solide orange constitué par le mélange des deux régioisomères **257** et **258** qui seront séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice. Pour l'éluant, on commence par un mélange  $CH_2Cl_2$  / Ether de pétrole (1/1) en augmentant, au fur et à mesure, les proportions de  $CH_2Cl_2$ . Le premier régioisomère sorti, on termine par le mélange  $CH_2Cl_2$  / AcOEt (8/1) pour sortir le deuxième régioisomère.

On obtient 0,040 g (23%) de **257** et 0,090 g (51%) de **258**.

**IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1666 (C=O)

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J** Hz, δ ppm) : 8,40 (dd, 1H, *J* = 7,9 et 1,1 Hz, H-9); 7,51 (m, 2H, H arom.); 7,6 (m, 6H, H arom.); 5,94 (s, 2H, <u>CH</u><sub>2</sub>Ph); 4,67 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, <u>CH</u><sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,48 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH</u><sub>3</sub>)

**RMN** <sup>13</sup>**C** (**CDCl**<sub>3</sub>, **δ ppm**) : 15,56 (CH<sub>3</sub>), 40,84 (CH<sub>2</sub>), 53,93 (CH<sub>2</sub>), 111,25 (CH), 119,97 (Cq), 124,42 (CH et Cq), 125,57 (CH), 128,24 (CH), 128,96 (2 CH), 129,33 (CH), 129,38 (2 CH), 133,56 (Cq), 133,95 (Cq), 134,48 (Cq), 139,96 (Cq), 147,12 (Cq), 170,41 (CO), 175,44 (CO)

**Analyse élémentaire :** C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 0,2 H<sub>2</sub>O % calculé : C 70,07, %H 4,59, %N 15,56 % trouvé : C 70,10, %H 4,42, %N 15,55

# 5-Ethyl-1-(4-méthoxybenzyl)[1,2,3]triazolo[4,5-b]carbazole-4,10(1H,5H)-dione

(259)



#### Mode opératoire :

#### Préparation de l'azoture 209 :

Dans un ballon de 100 mL, on pèse 0,48 g (7,38 mmol) de NaN<sub>3</sub>, on ajoute 1,034 g (6,61 mmol) de chlorure de 4-méthoxybenzyle **256** et 50 mL d'éthanol. On laisse agiter à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24h. On ajoute 40 mL d'eau et on extrait l'azoture **209** par 3 x 30 mL d'éther éthylique. On sèche sur sulfate de sodium et on évapore le solvant sous vide à température <  $20^{\circ}$ C. On obtient un liquide incolore huileux à l'odeur anisée. Réaction de cycloaddition :

On prépare une solution de 0,152 g (0,5 mmol) de la 2-bromoquinone **240** dans 10 mL d'acétonitrile puis on ajoute goutte à goutte l'azoture **209** préparé précédemment. La solution obtenue est agitée à température ambiante pendant trois jours. Un précipité orange apparaît. L'acétonitrile est évaporé sous vide et le résidu obtenu est repris par l'éther éthylique et filtré pour donner un précipité orange constitué d'un seul régioisomère qui sera purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice Pour l'éluant, on commence par un mélange  $CH_2Cl_2$  / Ether de pétrole (1/1) en augmentant, au fur et à mesure, les proportions de  $CH_2Cl_2$  pour terminer avec du  $CH_2Cl_2$  pur. On obtient 0,082 g (43%) de **259**.

**259** est également purifié par recristallisation dans l'éthanol.

# **IR** (**KBr**, ν cm<sup>-1</sup>) : 1679, 1668, 1655

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **\delta ppm**) : 8,38 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, H-9); 7,52 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz, Harom.); 7,49 (m, 2H, H-6 et H-7); 7,45 (m, 1H, H-8); 6,90 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H arom.); 5,93 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 4,76 (q, 2H, *J* = 6,9 Hz, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></u>); 3,80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 1,48 (t, 3H, *J* = 6,9 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH<sub>3</sub></u>) **RMN**<sup>13</sup>**C** (**CDCl**<sub>3</sub>, **δ ppm**) : 15,37 (CH<sub>3</sub>), 40,86 (CH<sub>2</sub>), 53,26 (CH<sub>2</sub>), 55,65 (CH<sub>3</sub>), 111,55 (CH), 114,74 (2 CH), 118,85 (Cq), 123,67 (CH), 124,45 (CH), 125,67 (CH), 126,96 (Cq), 127,60 (Cq), 130,58 (2 CH), 134,56 (Cq), 135,60 (Cq), 139,52 (Cq), 146,01 (Cq), 160,51 (Cq), 172,73 (CO-10), 172,86 (CO-4)

# Analyse élémentaire : C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, 0,6 H<sub>2</sub>O

% calculé : C 66,52, H 4,87, N 14,10

% trouvé : C 66,57, H 4,64, N 13,96

# 5-Ethyl-3-(4-méthoxybenzyl)[1,2,3]triazolo[4,5-b]carbazole-4,10(*3H*,5*H*)-dione (260)



# Mode opératoire :

Préparation de l'azoture 209 : Voir synthèse précédente

Réaction de cycloaddition :

On prépare une solution de 0,152 g (0,5 mmol) de la 3-bromoquinone **243** dans 5 mL d'éthanol. On ajoute goutte à goutte l'azoture **209** préparé précédemmentet et on agite à température ambiante pendant 10 jours. Après évaporation de l'éthanol, le résidu obtenu est repris par l'éther éthylique puis filtré. Il conduit à un précipité orange contenant un mélange des deux régioisomères **259** et **260** qui seront séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant :  $CH_2Cl_2$  / Ether de pétrole 3/1 puis  $CH_2Cl_2$  pur puis  $CH_2Cl_2$  / AcOEt, 10/1). On obtient 0,033 g (17%) du régioisomère **259** et 0,058 g (30%) du régioisomère **260**. **260** est également purifié par recristallisation dans l'éthanol.

# **IR** (**KBr**, **v** cm<sup>-1</sup>) : 1666

**RMN** <sup>1</sup>**H** (**CDCl**<sub>3</sub>, **J Hz**, **\delta ppm**) : 8,43 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-9); 7,46 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H arom.); 7,42 (m, 2H, H arom.); 7,35 (m, 1H, H arom.); 6,88 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H arom.), 5,88 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ar); 4,69 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></u>); 3,78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 1,49 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH<sub>3</sub></u>)

**RMN**<sup>13</sup>**C** (**CDCl**<sub>3</sub>, δ ppm) : 15,33 (CH<sub>3</sub>), 40,58 (CH<sub>2</sub>), 53,25 (CH<sub>2</sub>), 55,46 (CH<sub>3</sub>), 110,98 (CH), 114,42 (2 CH), 119,75 (Cq), 124,21 (CH et Cq), 125,32 (CH), 126,40 (Cq), 127,98 (CH), 130,31 (2 CH), 133,16 (Cq), 133,75 (Cq), 139,72 (Cq), 146,92 (Cq), 160,20 (Cq), 170,26 (CO-4), 175,24 (CO-10)

**HRMS** calculé pour  $C_{22}H_{18}N_4O_3$ : 386,13790, trouvé : 386,13736

**PARTIE II : ACTIVITES BIOLOGIQUES** 

**CHAPITRE 1 : TOXOPLASMA GONDII ET LA TOXOPLASMOSE** 

Les carbazolequinones naturelles ou synthétiques, ont montré des activités antiparasitaires intéressantes, en particulier des activités anti-plasmodiales <sup>41 51</sup>. Des travaux précédents ont montré que des dérivés de para-carbazolequinones avaient une activité anti-toxoplasmique, et une activité inhibitrice de la Purine Nucléoside Phosphorylase (PNP) de *T. gondii* <sup>87</sup>. Cette enzyme est une enzyme importante de la voie de sauvetage des purines, seule voie d'accès pour le parasite aux bases puriques car il dépend totalement de son hôte, et ne peut les synthétiser *de novo*.

Après avoir synthétisé des molécules de type *ortho*-carbazolequinone, isoxazolocarbazolequinone et triazolocarbazolequinone, l'objectif était dans un premier temps de tester leur activité antiparasitaire *in vitro* sur une culture de *Toxoplasma gondii*, et dans un deuxième temps de tester leur action inhibitrice sur la PNP (purine nucléoside phosphorylase), de *T. gondii*, enzyme clé de la voie de sauvetage des purines.

#### I TOXOPLASMA GONDII

#### 1) Découverte du parasite

*Toxoplasma gondii*, parasite responsable de la toxoplasmose a été découvert en 1908 à Tunis et à Sao Paulo. Suite à une épidémie de laboratoire chez un rongeur, *Ctenodactylus gundi*, Charles Nicolle et Louis Hubert Manceaux à l'institut Pasteur de Tunis isolèrent un protozoaire de forme arquée. Ils le nommèrent *Toxoplasma gondii* du grec toxon (arc) et plasma (forme). Cette découverte fut présentée le 26 octobre 1908 par Laveran, à l'Académie des Sciences de Paris. Au même moment, A. Splendore trouva ce parasite à la suite de la mort de lapins de laboratoire à Sao Paulo. Ces résultats furent publiés le 16 juillet 1908.

Dans les années 1920-1930, apparaissent les premières descriptions de cas de toxoplasmose humaine (toxoplasmose congénitale avec manifestations oculaires en 1923, un cas d'encéphalite chez un enfant en 1939) et les transmissions possibles entre hôtes intermédiaires par inoculation de tachyzoïtes <sup>88</sup>. La mise au point des premiers tests sérologiques dans les années 1940 a permis de révéler l'importance de la prévalence de la toxoplasmose humaine. Le rôle dans la transmission de la consommation de viande insuffisamment cuite (et notamment de viande de mouton) n'a été clairement identifié que dans les années 1960 <sup>89</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>87</sup> Z. Bouaziz, A. Ghérardi, F. Régnier, M.E. Sarciron, X. Bertheau, B. Fenet, N. Walchshofer, H. Fillion. *Eur. J.* Org. Chem. **2002**, <u>11</u>, 1834-1838

<sup>&</sup>lt;sup>88</sup> A. Wolf, D. Cowen, B. Paige. *Science*, **1939**;<u>89</u> :226-227.

<sup>&</sup>lt;sup>89</sup> G. Desmonts, J. Couvreur, F. Alison, J. Baudelot, J. Gerbeaux, M. Lelong. *Rev Fr Etudes Clin Biol.*, **1965**;<u>10</u>: 952-958.



Figure 11 : Structure d'un tachyzoïte (gauche) et d'un bradyzoïte (droite) de *T. gondii* en microscopie électronique à transmission d'après Dubey et *al.* 1998 <sup>94</sup>

Ce n'est enfin qu'en 1969 que le rôle du chat comme hôte définitif et l'existence des oocystes ont été démontrés, permettant alors de comprendre les circonstances de contamination des herbivores et de décrire le cycle de ce parasite <sup>90 91</sup>.

#### 2) Classification et taxonomie

T. gondii est un protozoaire, de l'embranchement des Apicomplexa, de la classe des Coccidea, de l'ordre des Eimariida, de la famille des Sarcocystidae. Il est l'unique représentant du genre Toxoplasma.

#### 3) Morphologie

T. gondii est une coccidie à développement intracellulaire obligatoire. Il existe sous trois formes : tachyzoïte, bradyzoïte, oocyste. 92 93

#### 3.1) Tachyzoïte ou trophozoïte

Cette forme existe chez tous les animaux homéothermes (qui maintiennent leur température constante), dont les mammifères ou les oiseaux, qui sont des hôtes intermédiaires. Son aspect <sup>94</sup> est piriforme, arqué, avec une extrémité effilée, 5-10 µm x 3-4 µm.. Comme tous les Apicomplexa, Toxoplasma gondii dispose d'un complexe apical situé dans la partie antérieure du tachyzoïte, constitué par un conoïde (bande spiralées de microtubules formant un cône troqué), des rhoptries, d'un micronème, de granulations denses (figure 11).

Il n'existe pas de structure motrice particulière, les déplacements se font par des mouvements circulaires, ondulatoires ou par rotation. Il se divise très rapidement dans les cellules qui l'hébergent. Il se multiplie donc de facon endocellaire dans les macrophages, par endodyogénie. Cette forme est très fragile, elle est détruite par l'acidité gastrique, ou l'eau de Javel, mais elle est infectante pour le fœtus par voie sanguine de la mère à l'enfant via le placenta.

#### **3.2) Kyste**

Cette forme sphérique ou ovoïde de 15 à 200 µm existe chez l'hôte intermédiaire. Le kyste est constitué de 2000 à 3000 éléments semblables appelé bradyzoïte. Le bradyzoïte a une

<sup>&</sup>lt;sup>90</sup> W.M. Hutchison. *Nature*, **1965**, 206: 961-962.

<sup>&</sup>lt;sup>91</sup> J.K. Frenkel, J.P. Dubey, M.L. Miller. Science, **1969**, <u>164</u>, 432-33.

<sup>&</sup>lt;sup>92</sup> Site de l'université de Lille : cours de parasitologie sur la toxoplasmaose <u>http://arachosia.univ-</u> <u>lille2.fr/labos/parasito/Internat/courspar/toxopl.html</u> (consulté en 2007) <sup>93</sup> Site de Wikipedia : <u>http://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma\_gondii</u> (consulté en 2007)

<sup>&</sup>lt;sup>94</sup> J.P. Dubey, D.S. Lindsay, C.A. Speer. *Clin Microbiol Rev.*, **1998**, <u>11</u> (2), 267-299.



Figure 12 : Structure d'un sporozoïte de *T. gondii* en microscopie électronique d'après Dubey et *al.* 1998 <sup>94</sup>

structure voisine du tachyzoïte, mais il contient en plus des granules de glycogène (figure 11). Les bradyzoïtes se développent à l'intérieur de la vacuole parasitophore par division endodyogénie plus lente que pour le tachyzoïte. La paroi des kystes se forme à partir de la vacuole parasitophore. Les kystes sont présents au niveau du cerveau, de la rétine, ou des muscles, ils produisent un antigène, la toxoplasmine, ce qui confère à l'hôte une immunité protectrice. Les kystes résistent à l'acidité gastrique et aux températures inférieures à  $45^{\circ}C^{95}$ . Il sont détruits après une congélation à  $-20^{\circ}C$  pendant plusieurs jours, ou une cuisson à  $70^{\circ}C$  ou à  $56^{\circ}C$  pendant 30 min ou par salaison  $^{95}$ . La contamination se fait par ingestion. Lorsque les conditions sont favorables, les bradyzoïtes se transforment en tachyzoïtes qui vont se déplacer et coloniser les cellules de l'hôte.

#### 3.3) Oocyste

L'oocyste est de forme ovoïde, mesure environ 9 x 14  $\mu$ m. il est très résistant dans le milieu extérieur. Il est le résultat de la reproduction sexuée chez le félidé qui est l'hôte définitif. Il est éliminé dans les excréments, il effectue sa maturation en quelques jours à température ambiante, en présence d'oxygène. Deux sporocystes se différencient en quatre sporozoïtes chacun. Chaque sporozoïte mesure 7 x 1,5 $\mu$ m et possède une organisation identique au tachyzoïte (figure 12). Les oocystes sont détruits par la chaleur (30 secondes à 90°C), la dessiccation ou la congélation prolongée <sup>92</sup>. Ils résistent à l'acide gastrique, aux détergents, aux alcalis, aux acides. Il faut 1h avec de l'ammoniaque à 6% pour les détruire <sup>95</sup>. Ils sont infestants par ingestion.

#### 4) Cycle

Le cycle peut être direct, court, sans hôte intermédiaire (cycle monoxène) ou indirect en passant par des hôtes intermédiaires (cycle hétéroxène). L'hôte définitif est le chat ou les félidés sauvages, l'hôte intermédiaire n'est pas spécifique, il s'agit d'animaux à sang chaud, c'est-à-dire les mammifères ou les oiseaux <sup>96</sup>.

#### 4.1) Félidé : hôte définitif

Le cycle sexué débute dans l'épithélium intestinal des félins, provoquant une coccidiose. Après ingestion, les membranes du kyste ou de l'oocyste sont lysées dans l'estomac. Les bradyzoïtes ou sporozoïtes ainsi libérés dans la lumière intestinale se transforment en tachyzoïtes, qui pénètrent dans les entérocytes. Plusieurs schizogonies (multiplications asexuées)

<sup>&</sup>lt;sup>95</sup> Rapport du groupe de travail « Toxoplasma gondii » de l'AFSSA déc **2005** : « Toxoplasmose : état des

connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation »

<sup>&</sup>lt;sup>96</sup> J.P. Dubey., Int J Parasitol., **1998**, <u>28</u>, 1019-24.

dans la vacuole parasitophore située entre les villosités et le noyau de la cellule intestinale ont lieu donnant des schizozoïtes. L'éclatement des cellules libèrent des mérozoïtes qui soit infestent d'autres cellules, soit se transforment en gamétocyte mâle ou femelle. Le macrogamétocyte femelle est de forme ovoïde, d'une taille 5 à 7  $\mu$ m, ne possède aucune division nucléaire, et son noyau est globuleux. Le microgamétocyte mâle est de forme sphérique (10  $\mu$ m de diamètre). Les noyaux se divisent, libérant des microgamètes. Cette gamétogonie aboutit à la formation d'oocystes immatures qui sont émis en grande quantité avec les fèces. Après sporulation, les oocystes sont rapidement disséminés et conservent leur pouvoir infectant dans le sol et l'eau pendant plusieurs mois. Le cycle est complet quand l'hôte définitif s'infecte en ingérant une proie contenant des kystes ou bien des végétaux souillés d'oocystes. Après ingestion de kystes, les oocystes sont émis au bout de 5 à 6 jours dans les selles. Si l'hôte définitif s'est infecté par ingestion d'oocystes (sol,...), alors l'émission n'intervient que 20 à 40 jours après ingestion.



Figure 13 : Cycle parasitaire de *T. gondii*. d'après Ferguson 2004 <sup>97</sup>

#### 4.2) Animaux homéothermes : hôtes intermédiaires

Le *cycle asexué* a lieu entre hôtes intermédiaires. Après l'ingestion de kystes tissulaires ou d'oocystes matures, les bradyzoïtes ou les sporozoïtes se transforment en tachyzoïtes. Ceux-ci

<sup>&</sup>lt;sup>97</sup> D.J.P. Ferguson Int. J. Parasitol., 2004, <u>34</u>, 347-360

seront disséminés rapidement dans tout l'organisme par voie lymphatique ou sanguine. Cette phase de dissémination et de multiplication correspond à la phase aigüe de la toxoplasmose et ne dure que quelques jours, avant l'enkystement des parasites au niveau des tissus cérébraux, musculaires parfois oculaires, établissant la phase chronique.

#### 4.3) La sporulation

Le succès de la sporulation qui se déroule dans le milieu extérieur, dépend de la température, des conditions d'aérobiose et d'hygrométrie. Expérimentalement, la sporulation est d'autant plus longue que la température est faible : 21 jours à 11°C contre 48 h à 25°C <sup>98</sup>. D'une façon générale, les oocystes perdent leur capacité à sporuler après congélation 1 jours à -21°C ou 7 jours à -6°C <sup>99</sup> ou après exposition à la chaleur 24 h à 37°C ou 10 minutes (min) à 50°C <sup>96</sup>. La sporulation est encore possible après conservation des oocystes non sporulés à 4°C pendant 11 semaines <sup>100</sup>. En conditions anaérobies, la sporulation peut être incomplète (arrêt au stade sporocyste) et produire des oocystes non infectants <sup>98</sup> <sup>101</sup>. La sporulation peut reprendre partiellement (4%) en conditions aérobies après 30 j d'anaérobiose <sup>98</sup>.



Figure 14 : Oocyste non sporulé Centers for Disease Control and Prevention (CDC)



Figure 15 : Oocyste sporulés d'après Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

<sup>&</sup>lt;sup>98</sup> J.P. Dubey, N.L. Miller, J.K. Frenkel. J. Exp. Med., **1970**, <u>132</u>, 636-662

<sup>&</sup>lt;sup>99</sup> J.K. Frenkel., J.P. Dubey. *J.Parasitol.*, **1973**, <u>59</u>, 587-588

<sup>&</sup>lt;sup>100</sup> D.S. Lindsay, B.L. Blagburn, J.P. Dubey. Vet. Parasitol., **2002**, <u>103</u>, 309-313.

<sup>&</sup>lt;sup>101</sup> J.P. Dubey, N.L. Miller, J.K. Frenkel. J. Parasitol., **1970**, <u>56</u>, 447-456



Figure 16 : Sources et modes de l'infection humaine à toxoplasmes  $^{94 \ 102}$ 

#### **II LA TOXOPLASMOSE**

#### 1) Epidémiologie

La toxoplasmose est une parasitose cosmopolite, avec une séroprévalence variable d'un pays à l'autre (de 7 à 80 %) et parfois à l'intérieur d'un même pays. Les prévalences inférieures à 30 % s'observent principalement en Amérique du Nord, en Grande-Bretagne, en Scandinavie et en Asie du Sud-Est. Elle va de 20 à 50 % en Europe du sud ainsi que dans les régions humides de l'Afrique Les prévalences supérieures à 60 % s'observent principalement en Afrique et en Amérique Latine. L'Europe de l'Ouest continentale a des prévalences de 50 à 70 % <sup>94 101</sup>.

En France la séroprévalence a longtemps été élevée (82% en 1960, 66% en 1982), mais elle a diminué régulièrement depuis 40 ans pour atteindre 54% en 1995 et 44% en 2003, avec des variations régionales encore mal expliquées. Les conditions climatiques, mais aussi d'autres facteurs de risques, liés aux modes de vie et à l'alimentation ont été évoqués pour expliquer ces différences de prévalence entre les pays<sup>101</sup>.

La toxoplasmose est une parasitose avec trois réservoirs<sup>102</sup>:

1<sup>er</sup>: sol, eau, litière du chat: oocyste infestant.

 $2^{\text{ème}}$ : viande crue, ou mal cuite: kyste.

 $3^{eme}$ : femme enceinte, réservoir pour le fœtus.

L'incidence de la toxoplasmose dans la population générale est difficile à évaluer car l'infection est le plus souvent asymptomatique. En France, le nombre annuel de nouvelles infections, estimé par modélisation en se basant sur des données de prévalence de l'enquête Périnatalité 1995, est compris entre 200 000 et 300 000 cas avec environ 30 000 à 45 000 cas symptomatiques <sup>103</sup> <sup>104</sup>. Cette étude a été renouvelée lors de l'Enquête Nationale Périnatale 2003 avec la même méthodologie. La séroprévalence globale en 2003 est de 44% <sup>105</sup>.

Des données plus précises ont pu être obtenues chez les patients immunodéprimés (SIDA) qui présentent des formes cliniques sévères, faisant l'objet d'une notification. Le nombre de cas déclarés de toxoplasmose inaugurale chez les patients SIDA est environ de 200 par an, après avoir sensiblement diminué entre 1992 (800 cas) et 1997 (250 cas)<sup>106 107 108</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>102</sup> R. Evans. Ho-Yen DO, Joss AWL, eds. Oxford. Oxford University. **1992**: 26-55.

<sup>&</sup>lt;sup>103</sup> T. Ancelle, V. Goulet, V. Tirard-Fleury, L. Baril, C. Du Mazaubrun, P. Thulliez, M. Wcislo, B. Carme., BEH. 1996, 51, 227-229.

<sup>&</sup>lt;sup>104</sup> T. Ancelle, V. Goulet, V. Tirard-Fleury, L. Baril, C. Du Mazaubrun, P. Thulliez, M. Wcislo, B. Carme., France, Saint-Maurice. Octobre 1996 : p27 Rapport du Réseau National de Santé Publique.

<sup>&</sup>lt;sup>105</sup> F. Berger. Mémoire de Master M2 "Epidémiologie et recherche clinique". Université Paris XI. 2005.

<sup>&</sup>lt;sup>106</sup> F. Derouin, P. Thulliez, Y.J. Garin. *Pathol Biol.* **1991**, <u>39</u>, 255-259.

<sup>&</sup>lt;sup>107</sup> E. Candolfi, M.L. Partisani, E. De Mautort, S. Bethencourt, M. Frantz, T. Kien, J.M. Lang. Presse Med., 1992, <u>21</u>, 394-395. <sup>108</sup> F. Bourdillon, F. Raffi, C. Pradier. BEH. **1996**, 17:96.

Les données d'incidence de la toxoplasmose au cours de la grossesse proviennent toutes des données de surveillances sérologiques systématiques. L'incidence de la toxoplasmose chez la femme enceinte séronégative a fortement baissé entre 1960 (environ 40 cas/1000 femmes séronégatives) et 1995 (entre 5,4 et 13,2 cas/1000 femmes séronégatives). La séroprévalence ayant diminué notablement pendant la même période, le nombre de femmes séronégatives a augmenté et le nombre d'infections rapporté à l'ensemble des grossesses reste situé entre 2,4 et 5,8 cas/1000 grossesses en 1995. Par une approche complémentaire (relevé du nombre des amniocentèses réalisées pour une infection maternelle en cours de grossesse) le nombre de séroconversions chez les femmes enceintes a été estimé à 2700 pour l'année 2000. En tenant compte, d'une part des résultats des amniocentèses, et d'autre part du risque de transmission materno-fœtale (29%), le nombre d'enfants nés vivants avec une toxoplasmose congénitale a été estimé à 600 cas environ. En se référant aux données d'études de cohortes d'enfants infectés, il a été estimé que sur ces 600 cas, 174 enfants auraient des séquelles dont 11 une hydrocéphalie et 145 une rétinochoroïdite. <sup>94</sup>

#### 2) Physiopathologie

#### 2.1) Rôle de l'immunité

Le contrôle de l'infection toxoplasmique est à la fois dépendant de l'immunité et du terrain génétique de l'hôte. L'immunité cellulaire T joue un rôle prédominant. L'interféron jouant un rôle essentiel dans l'activation des macrophages et l'induction des mécanismes effecteurs sur le parasite ou les cellules parasitées. Les macrophages, les NK, cellule T et cytokine (IL2, TNF alpha, INF gamma) des ions superoxydes, des dérivés nitrés et du produit du métabolisme de l'acide arachidonique interviennent. Tout déficit profond de l'immunité cellulaire (iatrogène ou lié à une pathologie associée) peut favoriser la survenue d'une toxoplasmose grave par réactivation de kystes acquis lors d'une infection antérieurement acquise. L'immunité humorale n'a pas de rôle essentiel dans la résistance à l'infection.

#### 2.2) Facteurs de pathogénicité

Les rôles respectifs du stade infectant, de la taille de l'inoculum et de la voie de contamination, sont bien évalués chez la souris mais très mal connus chez l'homme <sup>94</sup>. Chez l'homme, le génotype II de la souche infectante est le plus fréquemment retrouvé, aussi bien dans les toxoplasmoses congénitales que chez l'hôte immunodéprimé.

#### 2.3) Physiopathologie des lésions

Elle est directement liée à la prolifération des tachyzoïtes et à la lyse des cellules qu'ils infectent. Les kystes (contenant des bradyzoïtes) n'entraînent pas directement de lésions tissulaires mais sont susceptibles de se réactiver.

Après ingestion (mode de contamination de l'adulte le plus fréquent), le parasite dissémine par voie hématogène et lymphatique. A ce stade, on observe des adénopathies dans 10 à 20% des cas <sup>109</sup>, caractérisées par une forte hyperplasie folliculaire, mais sans nécrose. Ces adénopathies cervivales le plus souvent, s'accompagnent d'une fièvre prolongée à 38 °C, d'une asthénie. Le taux des monocytes augmente, et la maladie est très comparable dans ses manifestations cliniques à une mononucléose infectieuse. La guérison est relativement lente. <sup>94</sup>

Les toxoplasmes pénètrent les cellules du système histiomonocytaire, s'y multiplient, sont libérés, contaminent d'autres cellules. Le foie est le premier organe atteint, le parasite se multiplie dans les hépatocytes, puis les tissus lymphoïdes, le poumon, le cerveau, les tissus musculaires, la rétine, le placenta (puis le fœtus) sont atteints. L'infection des tissus, consécutive à la parasitémie est le plus souvent asymptomatique chez les sujets immunocompétents. La réaction immunitaire intervient dans un deuxième temps avec lyse des tachyzoïtes libres par les anticorps, mais dans les organes pauvres en anticorps, le passage de cellule en cellule se poursuit (rétine, cerveau). Les lésions d'encéphalite et de rétinochoroïdite sont essentiellement observées en cas d'infection congénitale ou chez des patients immunodéprimés: elles sont constituées de zones de nécrose, associées à une forte réaction inflammatoire. Des atteintes multiviscérales sont également possibles (poumon, cœur, foie) chez ces patients. L'atteinte cérébrale peut associer vascularites, thromboses et calcifications. Ces lésions peuvent être secondairement responsables d'hydrocéphalie. L'atteinte oculaire, au niveau de la rétine est fréquente.<sup>94</sup>

Dans un troisième temps, les kystes pourraient se former dans n'importe quel organe, mais ne persisteraient que dans les organes possédant des cellules à longue durée de vie, ou moins exposées à la réponse immune (cerveau, œil). Les bradyzoïtes demeurent dans le kyste, s'y multiplient puis entrent dans un état de quiescence.

<sup>&</sup>lt;sup>109</sup> R.E. Mc Cabe, R.G. Brooks, R.J.S. Dorfman. *Rev Infect Dis.* **1987**, <u>9</u>, 754-774.

<sup>&</sup>lt;sup>110</sup> Moniteur de l'internat 4<sup>ème</sup> tome, collectif, groupe LIAISONS, edition 2002

#### 3) Tableau clinique

#### 3.1) Toxoplasmose chez le sujet immunocompétent

La survenue d'une toxoplasmose est cliniquement inapparente dans environ 80% des cas, y compris chez la femme enceinte non immunisée vis-à-vis de *T. gondii*. Lorsqu'elle est apparente, elle peut présenter plusieurs formes, dont certaines sévères.

#### 3.1.1. La toxoplasmose ganglionnaire

C'est la forme clinique la plus fréquente (15 à 20% des cas), caractérisée par la présence d'adénopathies, le plus souvent localisées dans la région cervicale ou occipitale. Les ganglions peuvent être volumineux, mais restent indolores, élastiques, et n'évoluent jamais vers la suppuration. S'y associent une asthénie, souvent intense et prolongée, une fièvre modérée et parfois des myalgies. Ces symptômes peuvent persister plusieurs mois avant de régresser spontanément sans traitement <sup>109 111</sup>.

#### 3.1.2. Les atteintes oculaires

Longtemps considérés comme exceptionnelles chez l'immunocompétent, les atteintes oculaires peuvent être contemporaines ou retardées de plusieurs années par rapport à la date de contamination. Lorsqu'elles sont retardées, elles correspondent à une réactivation locale de kystes résiduels de la primo-infection. En France, Couvreur et Thulliez en rapportent 45 cas sur une période d'observation de 13 ans <sup>112</sup>, associées dans 2 cas à des manifestations neurologiques. L'investigation de plusieurs épidémies de toxoplasmose a permis de montrer une incidence nettement plus élevée de rétinochoroïdites consécutives à une toxoplasmose récente, atteignant 14% des cas au cours de l'épidémie de Greater Victoria au Canada <sup>113</sup>.

En dehors des situations épidémiques, cette fréquence reste probablement sous-estimée dans la population générale, en raison des difficultés du diagnostic de la toxoplasmose oculaire. Dans une série de 62 cas de toxoplasmoses oculaires, Brézin estime que 35% des cas sont d'origine acquise <sup>114</sup>.

#### 3.1.3. Formes sévères de toxoplasmose

Associées à la toxoplasmose ganglionnaire, des atteintes cutanées à type d'exanthème, de dermatomyosite et des atteintes viscérales, hépatiques, myocardiques, péricardiques,

<sup>&</sup>lt;sup>111</sup> J. Diebold, J. Audouin, A. Letourneau, S. Caulet. Revue Française des Laboratoires. 1988, <u>178</u>, 83-89.

<sup>&</sup>lt;sup>112</sup> J. Couvreur, P. Thulliez. *Presse Med.*, **1996**, <u>25</u>, 438-42.

<sup>&</sup>lt;sup>113</sup> W.R. Bowie, A.S. King, D.H. Werker, J.L. Isaac-Renton, A. Bell, S.B. Eng, S.A. Marion. *Lancet.* **1997**, <u>350</u>, 173-177.

<sup>&</sup>lt;sup>114</sup> A.P. Brézin, E. Delair-Briffod. *Encycl Méd Chir, Ophtalmologie*. **2003**, 21-230-B-15,14pp.

pulmonaires ou neurologiques peuvent être observées  $^{115 \ 116 \ 117 \ 118}$ . Des atteintes multiviscérales ont été observées en Guyane française chez des patients ayant consommé de la viande de gibier, soulevant l'hypothèse d'une contamination par des souches de *T. gondii* d'une virulence particulière  $^{118}$ .

#### **3.1.4. Evolution**

Généralement, la toxoplasmose reste totalement latente, malgré la persistance des kystes dans les tissus.

#### 3.2) Toxoplasmose chez l'immunodéprimé

Chez les patients immunodéprimés, l'infection faisant suite à une contamination par voie orale est le plus souvent asymptomatique. Chez des patients présentant un déficit très profond de l'immunité, l'hypothèse d'une dissémination hématogène faisant directement suite à l'infection a été évoquée dans quelques cas de toxoplasmose cérébrale ou de toxoplasmose pulmonaire <sup>119 120</sup> <sup>121</sup>. Chez les transplantés d'organes contaminés par un greffon contenant des kystes de *T. gondii*, on observe un rejet fébrile, se compliquant rapidement d'une dissémination avec atteinte hépatique, une péricardite, une myocardite, une pneumopathie ou d'une focalisation cérébrale <sup>122</sup> <sup>123 124 125</sup>. Les transplantés sont exposés aux risques de réactivation de leurs kystes cérébraux s'ils sont séropositifs pour la toxoplasmose, ou bien ils peuvent recevoir les kystes du donneur présents dans le greffon. Le problème se pose alors si le receveur n'est pas immunisé. Les receveurs comme les donneurs sont dépistés systématiquement.

Dans la grande majorité des cas, les formes graves de toxoplasmose sont consécutives à la réactivation d'une infection acquise antérieurement. Les formes cliniques sont comparables, quelque soit le type d'immunodépression sous-jacente, et l'atteinte cérébrale est de loin la plus fréquente. Mais il existe une plus grande fréquence des formes pulmonaires et disséminées chez les greffés de moelle allogénique <sup>126</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>115</sup> S.K. Magid, L.J. Kagen. Am J Med., **1983**, <u>75</u>, 313-320

<sup>&</sup>lt;sup>116</sup> S.D. Mawhorter, D. Effron, R. Blinkhorn, P.J. Spagnuolo. Clin Infect Dis., **1992**, <u>1</u>, 1084-1088.

<sup>&</sup>lt;sup>117</sup> J. Chandenier, G. Jarry, D. Nassif, Y. Douadi, L. Paris, P. Thulliez, E. Bourges-Petit, C. Raccurt. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, **2000**, <u>19</u>, 375-379.

<sup>&</sup>lt;sup>118</sup> B. Carme, F. Bissuel, D. Ajzenberg, R. Bouyne, C. Aznar, M. Demar, S. Bichat, D. Louvel, A.M. Bourbigot, C. Peneau, P. Neron, M.L. Darde. *J Clin Microbiol.*, **2002**, <u>40</u>, 4037-4044.

<sup>&</sup>lt;sup>119</sup> C. Pomeroy, G.A. Filice. *Clin Infect Dis.*, **1992**, <u>14</u>, 863-870.

<sup>&</sup>lt;sup>120</sup> F. Raffi, M. Tiab, O. Morin, F. Derouin. Presse Med., **1992**, <u>28</u>, 584-585.

<sup>&</sup>lt;sup>121</sup> C. Rabaud, T. May, J.C. Lucet, C. Leport, P. Ambroise-Thomas, P. Clin Infect Dis., 1996, 23, 1249-1254

<sup>&</sup>lt;sup>122</sup> B.J. Luft, Y. Naot, F.G. Araujo, E.B. Stinson, J.S. Remington. Ann Intern Med., **1983**, <u>99</u>, 27-31.

<sup>&</sup>lt;sup>123</sup> G. E. Speirs, M. Hakim, R.Y. Calne, T.G. Wreghitt. Clin Transplantation, 1988, 2, 257-260

<sup>&</sup>lt;sup>124</sup> T.G. Wreghitt, M. Hakim, A.H. Balfour, P.G. Stovin, S. Stewart, J. Scott, T.A.H. English, J. Wallwork. *J Clin Pathol.*, **1989**, <u>42</u>, 194-199.

<sup>&</sup>lt;sup>125</sup> D.M. Israelski, J.S. Remington . Curr Clin Top Infect Dis., **1993**, <u>13</u>, 322-356.

<sup>&</sup>lt;sup>126</sup> A. Mele, P. J. Paterson, H.G. Prentice, P. Leoni, C.C. Kibbler. Bone Marrow Transplant., 2002, 29, 691-698.

#### 3.2.1. Toxoplasmose cérébrale

L'encéphalite toxoplasmique focalisée est la manifestation clinique la plus fréquente chez les malades immunodéprimés <sup>127 128</sup>. Elle associe de la fièvre et une symptomatologie neurologique très diverse : céphalées, déficits moteurs ou sensitifs, comitialité, troubles psychiatriques <sup>128 129</sup>. L'imagerie par scanner ou IRM montre habituellement un ou plusieurs abcès dont la périphérie prend fortement le produit de contraste : aspect en cocarde (figure 17). On peut également observer des encéphalites diffuses, sans image radiologique <sup>130</sup>.



Figure 17 : aspect en cocarde d'une encéphalite toxoplasmique

#### 3 2.2. Toxoplasmose extra-cérébrale

#### 3.2.2.1. Localisation oculaire

Chez les patients immunodéprimés (SIDA principalement), la localisation oculaire est la deuxième, par sa fréquence, après la toxoplasmose cérébrale, à laquelle elle est associée dans 10 à 20% des cas <sup>131</sup> <sup>132</sup> <sup>133</sup>. On observe une grande variété de lésions cliniques, de type rétinochoroïdite, uni- ou multifocales ou diffuses, parfois bilatérales. Elles sont souvent plus étendues et hémorragiques que chez les patients immunocompétents mais avec une réaction inflammatoire moins intense. Une uvéite antérieure est fréquemment associée <sup>134</sup> .(figure 18)

<sup>&</sup>lt;sup>127</sup> C. Leport, J.S. Remington. Presse Med., 1992, <u>21</u>, 1165-1171

<sup>&</sup>lt;sup>128</sup> B.J. Luft, R. Hafner, A.H. Korzun, C. Leport, D. Antoniskis, E.M. Bosler, D.D. 3rd Bourland, R. Uttamchandani, J. Fuhrer, J. Jacobson, et coll. *N Engl J Med.*, **1993**, <u>329</u>, 995-1000.

<sup>&</sup>lt;sup>129</sup> F. Raffi, J.P. Aboulker, C. Michelet, V. Reliquet, H. Pelloux, A. Huart, I. Poizot-Martin, P. Morlat, B. Dupas, J.M. Mussini, C. Leport. *AIDS.*, **1997**, <u>11</u>, 177-184.

<sup>&</sup>lt;sup>130</sup> F. Gray, R. Gherardi, E. Wingate, J. Wingate, G. Fenelon, A. Gaston, A. Sobel, J. Poirier. *J Neurol.*, **1989**, <u>236</u>, 273-277.

<sup>&</sup>lt;sup>131</sup> I. Cochereau-Massin, P. LeHoang, M. Lautier-Frau, E. Zerdoun, L. Zazoun, M. Robinet, P. Marcel, B. Girard, C. Katlama, C. Leport, et coll. *Am J Ophthalmol.*, **1992**, <u>114</u>, 130-135.

<sup>&</sup>lt;sup>132</sup> G.N. Holland. Am J Ophtholmalogy, **2003**, <u>136</u>, 973-988.

<sup>&</sup>lt;sup>133</sup> G.N. Holland. Am J Ophthalmology, **2004**, <u>137</u>, 1-17.

<sup>&</sup>lt;sup>134</sup> I. Kuo, N.A. Rao. Springer Sem Immunopathol., **1999**, <u>21</u>, 161-177



Figure 18 : rétinochoroïdite, active , centrale ou périphérique d'après Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

#### 3.2.2.2. Localisation pulmonaire

Moins fréquente, mais d'une extrême gravité, elle est observée chez des patients profondément immunodéprimés et se caractérise par une pneumopathie hypoxémiante, avec un aspect radiologique de pneumopathie interstitielle <sup>119 121 135</sup>. Dans la plupart des cas, l'évolution est fatale en quelques jours avec l'aggravation rapide des symptômes pulmonaires et la survenue fréquente d'un état de choc <sup>136</sup>.

#### 3 2.2.3. Autres localisations et formes disséminées

De nombreuses autres localisations ont été décrites : médullaires, musculaires, cutanées, hépatiques, digestives, cardiaques, testiculaires <sup>135 137</sup>.

#### 3.3) Toxoplasmose congénitale

Suite à la contamination de la mère, le parasite diffuse par voie hématogène dans son organisme et passe le placenta. La parasitémie est brève chez la mère mais le parasite présent dans le placenta y reste jusqu'au terme de la grossesse. Le traitement par la spiramycine, diminue le taux d'infection.

Il existe un polymorphisme clinique, les conséquences de l'infection étant variables, allant de la perte fœtale à une atteinte cérébrale sévère ou, au contraire, à une forme infraclinique. Le risque de transmission du parasite augmente avec l'âge de la grossesse au moment de la contamination maternelle. A l'inverse, la gravité de l'infection fœtale évolue de façon opposée. Au cours du ler trimestre de grossesse, l'infection fœtale se produit dans moins de 6 % des cas mais conduit dans la majorité des cas à une forme sévère ou à une perte fœtale. A l'inverse, au 3ème trimestre de grossesse, le passage trans-placentaire survient dans 80 % des cas

<sup>&</sup>lt;sup>135</sup> C. Rabaud, T. May, C. Amiel, C. Katlama, C. Leport, P. Ambroise-Thomas, P. Canton. *Medicine (Baltimore)*. **1994**, <u>73</u>, 306-314.

<sup>&</sup>lt;sup>136</sup> J.C. Lucet, M.P. Bailly, J.P. Bedos, M. Wolff, B. Gachot, F. Vachon. *Chest.*, **1993**, <u>104</u>, 1054-1058

<sup>&</sup>lt;sup>137</sup> M. Ganji, A. Tan, M.I. Maitar, C.M. Weldon-Linne, E. Weisenberg, D.P. Rhone. Arch Pathol Lab Med., 2003, 127, 732-734

et donne généralement une infection infra-clinique. Au cours du second semestre, l'infection fœtale se produirait dans 25 à 30 % des cas.  $^{138 \ 139}$ .

La maladie peut se présenter de façon extrêmement diverse avec des atteintes de pratiquement tous les organes. En plus de sa diversité, la deuxième caractéristique de l'affection est son potentiel évolutif imprévisible; des lésions oculaires pouvant survenir ou récidiver de façon inopinée <sup>140</sup>. Il s'agit essentiellement de rétinochoroïdites uni ou bilatérales évoluant vers une cicatrisation pigmentée et/ou atrophique <sup>114</sup>.

Les cas rapportés dans la littérature sont très hétérogènes. La fréquence et la gravité des lésions varient selon les études car les modalités d'inclusion des patients sont différentes. Ainsi le recrutement peut être basé soit sur l'observation de cas cliniques, soit sur un dépistage systématique des séroconversions au cours de la grossesse, ce qui permet d'investiguer et de suivre tous les enfants y compris ceux porteurs de formes infra-cliniques. Parmi les cas étudiés, certains ont pu bénéficier d'un traitement anténatal. Enfin la durée du suivi des patients est un facteur important pour l'évaluation des séquelles de la maladie.

Pour Desmonts et al 1974, la présentation de la maladie se divise en quatre tableaux : <sup>141</sup>

1. Atteinte neurologique avec hydrocéphalie (obstruction de l'aqueduc de Sylvius), microcéphalie, microphtalmie avec ou sans rétinochoroïdite. Ces signes peuvent être observés à la naissance ou être diagnostiqués plus tard. L'auteur rappelle qu'une hydrocéphalie peut être observée dans les premiers mois de vie en dépit d'un développement psychomoteur normal. L'imagerie médicale permet le diagnostic anténatal des atteintes cérébrales qui sont détectées soit en échographie de morphologie fœtale soit en imagerie par résonance magnétique. L'échographie fœtale permet d'identifier principalement deux types de lésions : des dilations ventriculaires, habituellement bilatérales et symétriques et des hyperdensités intracrâniennes correspondant aux calcifications observées après la naissance <sup>142</sup>.

2. Atteinte généralisée sévère avec exanthème maculo-papulaire, purpura, pneumonie, ictère, hépato-splénomégalie. Ce tableau peut se présenter avec ou sans atteinte oculaire ou neurologique.

3. Atteinte modérée avec hépato-splénomégalie et ictère, avec ou sans thrombocytopénie. La relation de ce signe avec l'infection toxoplasmique est souvent établie plus tard, parfois devant l'apparition d'un foyer de rétinochoroïdite.

<sup>&</sup>lt;sup>138</sup> D. Dunn, M. Wallon., F. Peyron., E. Pertersen., C. Peckham, R. Gilbert. *Lancet*, **1999**, <u>353</u>, 1829-1833

<sup>&</sup>lt;sup>139</sup> G. Desmonts, J. Couvreur. Sem Hôp Paris, **1986**, <u>62</u>, 1418-1422

<sup>&</sup>lt;sup>140</sup> F. Peyron, M. Wallon, C. Bernardoux. *N Engl J Med.*, **1996**, <u>334</u>, 993-994.

<sup>&</sup>lt;sup>141</sup> G. Desmonts, J. Couvreur . *In* Conn RB (éditeur) "Current diagnosis" 7. WB Saunders Company, Philadelphia, **1974**, 274-297.

<sup>&</sup>lt;sup>142</sup> F. Jacquemard. *In* "Congenital toxoplasmosis" P. Ambroise-Thomas and E. Pedersen Ed.; Springer-Verlag, Paris, **2000**.111-120.

4. Atteinte infra-clinique : le patient peut rester asymptomatique tout au long de sa vie ou au contraire présenter des atteintes oculaires dont la gravité dépend de la localisation par rapport à la macula. Cette classification rend bien compte du polymorphisme clinique de l'affection et du retard d'apparition de certaines manifestations.

La toxoplasmose congénitale en France :

Depuis 1992 la France a rendu obligatoire le suivi sérologique mensuel des femmes enceintes non immunisées contre la toxoplasmose. Cette disposition permet la détection des séroconversions maternelles. De plus les enfants contaminés bénéficient d'un traitement et d'un suivi permettant le dépistage des séquelles tardives de la maladie.

Une étude récente réalisée en France <sup>143</sup> rapporte le diagnostic et le suivi sur une période médiane de six ans de 1506 femmes enceintes ayant présenté une séroconversion toxoplasmique en cours de grossesse. Toutes les séroconversions ont été prises en charge selon un même protocole et dans un même centre. A la naissance, les enfants ont été investigués et traités de façon homogène. Le suivi sur une période médiane de 6 ans après la naissance permet d'avoir une estimation relativement précise des séquelles de l'affection chez des enfants ayant bénéficié d'un traitement anté et post-natal.

Cinquante trois grossesses se sont terminées soit par un avortement spontané (22 cas dont 6 infections toxoplasmiques prouvées), soit par une interruption médicale de grossesse (27 cas dont 16 infections prouvées) soit par un enfant mort-né (4 dont 3 infections prouvées). Il s'agissait dans la majorité des cas de contaminations de début de grossesse.

Sur les 1384 enfants vivants et correctement suivis, 74 % n'étaient pas infectés. Ce chiffre confirme bien que les indications d'interruption de grossesse doivent être posées avec discernement, d'autant que les manifestations cliniques sont le plus souvent modérées. En effet, sur 327 enfants contaminés, seuls 24% présentaient des lésions oculaires. Tous avaient un développement et une scolarité normale. Dans cette étude, les séquelles visuelles et neurologiques étaient modérées ce qui contraste avec les tableaux rapportés dans la littérature. Enfin, le fait que la moitié des lésions soit diagnostiquée après l'âge de 2 ans et que 29 % des enfants aient présenté un nouvel évènement oculaire durant les 12 premières années de vie est en faveur de la nécessité d'un suivi ophtalmologique régulier.

<sup>&</sup>lt;sup>143</sup> M. Wallon, L. Kodjikian, C. Binquet, J. Garweg, J. Fleury, C. Quantin, F. Peyron. *Pediatrics.*, **2004**, <u>113</u>, 1567-1572.

#### 4) Diagnostic

Suivant le contexte clinique, le diagnostic biologique de la toxoplasmose repose sur la mise en évidence des anticorps spécifiques et sur l'isolement du parasite ou de l'ADN parasitaire. Le diagnostic ne faisant pas l'objet de notre travail, nous ne développerons pas.

#### 5) Principaux schémas thérapeutiques

Les schémas thérapeutiques sont peu nombreux, et ils reposent sur un nombre limité de molécules. Ces molécules sont groupées en deux familles, les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique et les macrolides. Ces médicaments ne sont actifs que sur les tachyzoïtes, mais à l'exception de l'atovaquone, ils sont inactifs sur les kystes.

#### 5 1 Toxoplasmose en dehors de la grossesse, chez l'immunocompétent

L'abstention est la règle sauf dans les formes symptomatiques. Dans les formes bénignes, l'administration de spiramycine ou de cotrimoxazole est proposée. Dans les formes graves, notamment en cas d'atteinte oculaire ou viscérale, le traitement par l'association pyriméthamine + sulfadiazine est efficace <sup>94 144 145 146</sup>.

#### 5 2 Traitement de la toxoplasmose congénitale

#### 521 Traitement ante - natal : prévention de la transmission materno-foetale

Tant que l'infection fœtale n'est pas prouvée, le traitement de la mère par la spiramycine est proposé jusqu'à l'accouchement ou jusqu'au résultat du diagnostic anténatal. Ce choix thérapeutique reste recommandé de par la concentration du médicament dans le tissu placentaire et son absence d'effet tératogène. En revanche, il semble bien établi que la spiramycine n'a aucune efficacité sur les lésions fœtales <sup>144</sup>. En conséquence, dès que l'infection fœtale est démontrée, le traitement par la spiramycine est remplacé par l'association pyriméthamine + sulfadiazine ou pyriméthamine + sulfadoxine (+ folinate de calcium) dont l'efficacité sur les lésions fœtales <sup>147 148 149 150</sup>, mais contestée par certains en l'absence d'étude prospective contrôlée <sup>151 152 153</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>144</sup> J. Couvreur, C. Leport. Yu V.L., Merignac T.C., Barriere S.L.(ed) Williams & Wilkins. 1998;600-612.

<sup>&</sup>lt;sup>145</sup> F. Derouin. Curr Opin Investig Drugs., 2001,2, 1368-1374.

<sup>&</sup>lt;sup>146</sup> L.H. Bosch-Driessen, F.D. Verbraak, M.S. Suttorp-Schulten, R.L. van Ruyven, A.M. Klok, C.B. Hoyng, A. Rothova. *Am J Ophthalmol.*, **2002**, <u>134</u>, 34-40.

<sup>&</sup>lt;sup>147</sup> F. Daffos, F. Forestier, M. Capella-Pavlovsky, P. Thulliez, C. Aufrant, D. Valenti, W.L. Cox. *N Engl J Med.*, **1988**, <u>318</u>, 271-275.

<sup>&</sup>lt;sup>148</sup> P. Hohlfeld, F. Daffos, P. Thulliez, C. Aufrant, J. Couvreur, J. MacAleese, D. Descombey, F. Forestier. *J Pediatr.*, **1989**, <u>5</u>, 765-769.

Lorsque la contamination materno-fœtale est considérée comme très probable (contamination maternelle au cours des derniers mois de la grossesse), le traitement par l'association pyriméthamine + sulfadiazine ou sulfadoxine est entrepris d'emblée par certaines équipes, sans pratique d'un diagnostic anténatal.

# 522 Traitement congénital de l'enfant

Dès la naissance, il repose sur l'administration prolongée de pyriméthamine+sulfadiazine ou sulfadoxine pendant au moins douze mois. L'administration concomitante d'acide folinique est indispensable. La mise en place d'un traitement précoce et sa poursuite sur une période prolongée permettent de réduire sensiblement la fréquence et la gravité des séquelles neurologiques et ophtalmologiques <sup>154 155 156 157</sup>. Le traitement des rechutes et en particulier des rétinochoroïdites toxoplasmiques aiguës associe préférentiellement pyriméthamine + sulfamide, éventuellement associés à une corticothérapie lorsque la composante inflammatoire est importante <sup>144 148 158</sup>. D'autres alternatives thérapeutiques ont été proposées dans la toxoplasmose oculaire mais il manque des études cliniques comparatives <sup>159 160</sup>.

#### 5 3 Toxoplasmose chez l'immunodéprimé

#### 531 Traitement curatif

Le traitement curatif des formes graves (toxoplasmose cérébrale, extracérébrale, oculaire) chez l'immunodéprimé repose, en première intention, sur l'association pyriméthamine + sulfadiazine ou pyriméthamine + clindamycine en administrant systématiquement de l'acide folinique pour prévenir la myélotoxicité de la pyriméthamine. Un traitement par dose de charge pendant 48 heures est suivi par un traitement à pleine dose pendant 4 à 6 semaines. Lorsqu'il est toléré, ce traitement est rapidement efficace <sup>128 144</sup>.

Chez les patients dont le déficit immunitaire persiste, le traitement d'attaque doit être suivi par un traitement d'entretien <sup>131 144</sup>. En effet, le traitement curatif n'élimine pas les formes

<sup>158</sup> G.N. Holland, K.G. Lewis. *Am J Ophthalmol.*, **2002**, <u>134</u>, 102-114.

<sup>&</sup>lt;sup>149</sup> I. Villena, D. Aubert, B. Leroux, D. Dupouy, M. Talmud, C. Chemla, T. Trenque, G. Schmit, C. Quereux, M. Guenounou, M. Pluot, A. Bonhomme, J.M. Pinon. *Scand J Infect Dis.*, **1998**, <u>30</u>, 295-300.

<sup>&</sup>lt;sup>150</sup> W. Foulon, I. Villena, B. Stray-Pedersen, A. Decoster, M. Lappalainen, J.M. Pinon, P.A. Jenum, K. Hedman, A. Naessens. *Am J Obstet Gynecol.*, **1999**, <u>180</u>, 410-415.

<sup>&</sup>lt;sup>151</sup> L. Gras, R.E. Gilbert, A.E. Ades, D. Dunn. Int J Epidemiol., 2001, <u>30</u>, 1309-1313

<sup>&</sup>lt;sup>152</sup> R.E. Gilbert, L. Gras, M. Wallon, F. Peyron, A.E. Ades, D.T. Dunn. *Int J Epidemiol.*, **2001**, <u>30</u>, 1303-1308.

<sup>&</sup>lt;sup>153</sup> R. Gilbert, L. Gras. *BJOG.*, **2003**, <u>110</u>, 112-20.

<sup>&</sup>lt;sup>154</sup> J. Couvreur, Ph. Thulliez. J Pédiatrie et de Puériculture. ,1989, 2, 80-88

<sup>&</sup>lt;sup>155</sup> J. McAuley, K.M. Boyer, D. Patel, M. Mets, C. Swisher, N. Roizen, C. Wolters, L. Stein, M. Stein, W. Schey, et al. *Clin Infect Dis.*, **1994**, <u>18</u>, 38-72.

<sup>&</sup>lt;sup>156</sup> N. Roizen, C.N. Swisher, M.A. Stein, J. Hopkins, K.M. Boyer, E. Holfels, M.B. Mets, L. Stein, D. Patel, P. Meier, et coll. *Pediatrics.*, **1995**, <u>95</u>, 11-20

<sup>&</sup>lt;sup>157</sup> A.P. Brezin, P. Thulliez, J. Couvreur, R. Nobre, R. Mcleod, M.B. Mets. Am J Ophthalmol., 2003, <u>135</u>, 779-84.

<sup>&</sup>lt;sup>159</sup> P.A. Pearson, A.R. Piracha, H.A. Sen, G.J. Jaffe. *Ophthalmology*, **1999**, <u>106</u>, 148-153

<sup>&</sup>lt;sup>160</sup> M.R. Stanford, S.E. See, L.V. Jones, R.E. Gilbert. *Ophthalmology.*, **2003**, <u>110</u>, 926-931

kystiques et le risque de réactivation d'un kyste latent persiste tant que dure l'immunodépression. Les médicaments utilisés sont ceux du traitement curatif mais à demi-dose.

En cas d'intolérance à la pyriméthamine et/ou aux sulfamides, les alternatives thérapeutiques sont peu nombreuses : cotrimoxazole par voie intraveineuse et à forte dose  $^{161 \ 162}$ , pyriméthamine + macrolide  $^{146}$ , ou atovaquone  $^{163 \ 164}$ . Ces médicaments ou associations sont cependant moins efficaces ou moins bien tolérées que les traitements de référence, aussi bien en traitement d'attaque que d'entretien.

#### **5 3 2 Traitement prophylactique secondaire**

Chez les patients infectés par le VIH ayant une sérologie de toxoplasmose positive et un taux de CD4<100/mm3<sup>165</sup>, le cotrimoxazole est habituellement utilisé, en administration quotidienne ou bihebdomadaire. Cette prophylaxie spécifique doit s'associer à la mise en place d'un traitement antirétroviral efficace.

Chez les greffes de moelle allogénique ayant une sérologie positive avant greffe, le cotrimoxazole ou l'association sulfadoxine + pyriméthamine peuvent être utilisés, mais ne sont habituellement administrés qu'à partir de la fin du premier mois après la greffe pour éviter de retarder la reconstitution hématologique des patients. Cette prophylaxie est maintenue pendant 6 mois, voire plus longtemps en cas de réaction de greffon contre hôte (GVH)<sup>166</sup>.

Chez les transplantés d'organe (cœur principalement), une chimioprophylaxie n'est recommandée que lorsque le donneur est positif pour la toxoplasmose et que le receveur est séronégatif (risque de transmission). Les schémas prophylactiques ne sont pas bien standardisés (pyriméthamine seule, cotrimoxazole, sulfadoxine + pyriméthamine); une étude récente montre l'excellente efficacité du cotrimoxazole sur la toxoplasmose et d'autres infections opportunistes chez 417 transplantés cardiaques <sup>167</sup>.

Chez les patients immunodéprimés, la chimioprophylaxie est maintenue tant que persiste le risque de réactivation d'une toxoplasmose latente, de quelques mois pour les transplantés et greffés de moelle à plusieurs années chez les patients infectés par le VIH et dont le taux de CD4

<sup>&</sup>lt;sup>161</sup> D. Torre, S. Casari, F. Speranza, A. Donisi, G. Gregis, A. Poggio, S. Ranieri, A. Orani, G. Angarano, F. Chiodo, G. Fiori. *Antimicrob Agents Chemother.*, **1998**, 42, 1346-1349

<sup>&</sup>lt;sup>162</sup> D. Torre, F. Speranza, R. Martegani, C. Zeroli, M. Banfi, M. Airoldi. J Infect., 1998, <u>37</u>, 15-18.

<sup>&</sup>lt;sup>163</sup> C. Katlama, B. Mouthon, D. Gourdon, D. Lapierre, F. Rousseau. *AIDS.*, **1996**, <u>10</u>, 1107-1112

<sup>&</sup>lt;sup>164</sup> R.A. Torres, W. Weinberg, J. Stansell, G. Leoung, J. Kovacs, M. Rogers, J. Scott, and the Atovaquone/Toxoplasmic encephalitis study group. *Clin Infect Dis.*, **1997**, <u>24</u>, 422-429

<sup>&</sup>lt;sup>165</sup> J.F. Delfraissy (coordinateur). Rapport 2004 Ed. Médecine Flamarion, Paris., 164 pp.

<sup>&</sup>lt;sup>166</sup> A.B. Foot, Y.J. Garin, P. Ribaud, A. Devergie, F. Derouin, E. Gluckman. *Bone Marrow Transplant.*, **1994**, <u>14</u>, 241-245

<sup>&</sup>lt;sup>167</sup> L.R. Baden, J.T. Katz, L. Franck, S. Tsang, M. Hall, R.H. Rubin, J. Jarcho. Transplantation., 2003, 75, 339-343

reste <100/mm3. Si le taux de CD4 devient supérieur à 200/mm3 pendant trois au minimum, il est possible d'interrompre la chimioprophylaxie.  $^{165\ 168\ 169\ 170}$ .

<sup>&</sup>lt;sup>168</sup> C. Mussini, P. Pezzotti, A. Govoni, V. Borghi, A. Antinori, A. d'Arminio Monforte, A. De Luca, N. Mongiardo, M.C. Cerri, F. Chiodo, E. Concia, L. Bonazzi, M. Moroni, L. Ortona, R. Esposito, A. Cossarizza, B. De Rienzo. J *Infect Dis.*, **2000**, <u>181</u>, 1635-42. <sup>169</sup> H. Furrer, M. Opravil, E. Bernasconi, A. Telenti, M. Egger *Lancet.*, **2000**, <u>355</u>, 2217-2218.

<sup>&</sup>lt;sup>170</sup> V. Soriano, C. Dona, R. Rodriguez-Rosado, P. Barreiro, J. Gonzalez-Lahoz. *AIDS.*, **2000**, <u>14</u>, 383-386

# CHAPITRE 2 : TEST D'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE TOXOPLASMA GONDII

#### I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Les médicaments reconnus actifs contre la toxoplasmose sont en nombre limité, alors que de nombreuses molécules ont été testées *in vitro* et / ou *in vivo*. Dans un premier volet de cette partie bibliographique, nous nous sommes intéressés aux médicaments de la toxoplasmose. Dans un deuxième volet, nous nous sommes intéressés aux molécules testées contre *T. gondii*, à l'exclusion des molécules décrites dans le premier volet.

#### 1) Principaux médicaments

Ces molécules sont groupées en deux familles, les macrolides et les inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique qui regroupe les inhibiteurs de la déshydrofolate réductase et les sulfamides.

#### 1.1) Les macrolides et apparentés

Les macrolides sont des antibiotiques avec un effet parasitostatique mais uniquement à des concentrations élevées, qui ne sont atteintes que dans certains tissus, comme le foie et le poumon, mais pas l'œil ni le cerveau, ce qui limite leur intérêt dans les formes graves de la toxoplasmose. Les macrolides s'accumulent dans les phagocytes (polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages péritonéaux et alvéolaires). Ils se concentrent dans le placenta, et réduiraient la transmission materno-foetale du parasite <sup>94</sup>. La spiramycine **261** est le principal macrolide utilisé dans le traitement de la toxoplasmose acquise et en cours de grossesse. C'est un macrolide à 16 C, sa demi vie est de 8 h, la diffusion tissulaire est bonne mais il ne passe pas le LCR, il passe dans le lait maternel, il a une élimination biliaire <sup>171</sup>.

Les autres macrolides <sup>172</sup> comme l'azithromycine **262** <sup>173</sup>, la roxithromycine <sup>174</sup> ou la clarithromycine ont de meilleures concentrations tissulaires mais sont encore contre-indiqués chez la femme enceinte.

Les kétolides, apparentés aux macrolides, ne sont pas utilisés pour la toxoplasmose humaine, mais ils sont efficaces chez l'animal  $^{94}$   $^{175}$ .

La clindamycine 263, famille des lincosamides, proches des macrolides, est habituellement utilisée en association avec la pyriméthamine dans le traitement des

<sup>&</sup>lt;sup>171</sup> VIDAL 2007

<sup>&</sup>lt;sup>172</sup> H.R. Chang, J.C.F. Pechere, Antimicrob. Agents Chemother.., **1988**, <u>32</u>, 524-529

<sup>&</sup>lt;sup>173</sup> J. Blais, V. Garneau, S. Chamberland. Antimicrob. Agents Chemother., 1993, <u>37</u>, 1701-1703

<sup>&</sup>lt;sup>174</sup> B. Luft. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **1987**, <u>6</u>, 479-481.

<sup>&</sup>lt;sup>175</sup> F.G. Araujo, A.A. Khan, T.L. Slifer, A. Bryskier, J.S. Remington. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, <u>41</u>, 2137–2140

toxoplasmoses cérébrales (traitement de deuxième intention) ou oculaires <sup>94</sup> <sup>176</sup> <sup>177</sup> <sup>178</sup>. Les macrolides et médicaments apparentés sont généralement bien tolérés ; des intolérances digestives, parfois graves, sont observées avec la clindamycine <sup>171</sup>.





#### 1 2) Inhibiteurs de la déshydrofolate réductase (DHFR)

La pyriméthamine **264** a un effet antiparasitaire puissant mais elle n'est pas dénuée d'effets indésirables car les inhibiteurs de la déshydrofolate réductase agissent également sur la synthèse de l'acide folique de l'hôte. La pyriméthamine a un effet parasiticide sur les tachyzoïtes de *T. gondii* à de très faibles concentrations, la concentration inhibitrice 50% est de 0,04  $\mu$ g/ml<sup>179</sup>. Elle a une action synergique avec les sulfamides. Son absorption digestive est lente et incomplète, sa demi-vie est de 4 jours, la liaison protéique est de l'ordre de 80%, elle s'accumule dans les tissus comme le rein, le cerveau, le foie, la rate, elle passe le placenta et le lait. Elle peut

<sup>&</sup>lt;sup>176</sup> J. Blais, C. Tardif, S. Chamberland Antimicrob. Agents Chemother., 1993, <u>37</u>, 2571 - 2577

<sup>&</sup>lt;sup>177</sup> B.R. Dannemann, D.M. Israelski, J.S. Remington. Arch. Intern. Med., **1988**, <u>148</u>, 2477 - 2482.

<sup>&</sup>lt;sup>178</sup> J.M. Hofflin, J. S. Remington. Antimicrob. Agents Chemother., **1987**, <u>31</u>, 492 - 496

<sup>&</sup>lt;sup>179</sup> F. Derouin, C. Chastang Antimicrob. Agents Chemother., **1989**, <u>33</u>, 1753 - 1759

donner des réactions allergiques, des agranulocytoses, des leucopénies transitoires, des carences en acide folique pouvant entraîner une anémie mégaloblastique. Il convient de laisser un intervalle de huit jours entre deux prises. La pyriméthamine est contre indiquée chez la femme enceinte en fin de grossesse, car il y a un risque d'ictère néo-natal <sup>171</sup>. La pyriméthamine est utilisée en traitement curatif et prophylactique, mais pas chez la femme enceinte.

Le triméthoprime **265**, composant du cotrimoxazole, est également actif sur *T. gondii*, mais à des concentrations 100 fois plus élevées que la pyriméthamine <sup>179</sup>. L'absorption digestive du triméthoprime est bonne, sa demi-vie est de 9h, la fixation protéique est de 50%, son élimination est urinaire (60% en 24h). Les effets indésirables sont des troubles digestifs, des réactions cutanées allergiques <sup>171</sup>. Il ne peut pas être utilisé chez la femme enceinte.

Ces deux médicaments diffusent bien dans l'organisme, avec cependant un temps de latence pour la pyriméthamine (ce qui impose l'utilisation d'une dose de charge) et franchissent le placenta. Chez l'animal, un effet tératogène a été rapporté lors de l'administration de fortes doses en début de gestation, contre-indiquant leur utilisation chez la femme au cours du premier trimestre de la grossesse <sup>94</sup>.



Schéma 79

#### 1.3) Les sulfamides

De nombreux sulfamides sont actifs sur *T. gondii* et leur choix est surtout orienté par leur pharmacocinétique. La sulfadiazine **267** et le sulfaméthoxazole **266** ont des demi-vies courtes (10-12 heures) et leur administration doit être quotidienne <sup>171</sup>. La sulfadoxine est un sulfamide retard, moins actif que la sulfadiazine **267** mais dont l'administration peut être hebdomadaire. Les sulfamides diffusent bien dans l'organisme et franchissent la barrière placentaire. L'association d'un inhibiteur de la DHFR et d'un sulfamide est remarquablement synergique sur *T. gondii* par un effet "en cascade" sur deux enzymes essentiels au métabolisme de l'acide folique du parasite <sup>94</sup>. Parmi les associations les plus actives, figurent pyriméthamine + sulfadiazine, pyriméthamine + sulfadoxine (effet retard), et triméthoprime + sulfaméthoxazole <sup>179</sup>. Ces associations sont utilisées en priorité pour le traitement et la prophylaxie secondaire des formes graves de toxoplasmose. Elles sont efficaces, mais fréquemment responsables d'effets indésirables hématologiques tels que les neutropénies, thrombopénies justifiant l'administration

systématique d'acide folinique et/ou de signes d'intolérance cutanées, parfois graves tels que l'épidermolyse, syndrome de Lyell<sup>171</sup>.



#### 14) Autres médicaments

L'atovaquone **269** est la seule molécule active sur les tachyzoïtes et les kystes de *T*. *gondii*. Malgré cette caractéristique, l'utilisation de ce médicament reste très limitée par sa mauvaise biodisponibilité. Elle est augmentée lors d'un repas riche en graisse, sa demi-vie est de 2 à 3 jours, la fixation aux protéines plasmatiques est totale, l'élimination est fécale à 90%. Les effets secondaires sont des éruptions cutanées, des nausées, des diarrhées, des céphalées <sup>171</sup>. L'atovaquone est une hydroxynaphtoquinone. La découverte de son effet anti-toxoplasmique a fait l'objet de nombreuses publications <sup>180</sup> <sup>181</sup> <sup>182</sup> <sup>183</sup>. Sa faible biodisponibilité par voie orale limite l'utilisation de ce médicament. Des nanosuspensions d'atovaquone pour voie IV ont été préparées et testées chez la souris <sup>184</sup>. A des concentrations supérieures à 1 µg/ml, il n'y a pas d'effets cytotoxiques, et l'effet est aussi efficace qu'avec l'atovaquone libre. Les nanosuspensions diffusent dans les poumons, le foie, le cerveau, le sérum. Les nanosuspensions pourraient être un traitement des encéphalites toxoplasmiques.

<sup>&</sup>lt;sup>180</sup> F.G. Araujo, J. Huskinson, J.S. Remington. Antimicrob. Agents Chemother., 1991, <u>35</u>, 293–299

<sup>&</sup>lt;sup>181</sup> F.G. Araujo, J. Huskinson-Mark, W.E. Gutteridge, J.S. Remington Antimicrob. Agents Chemother., **1992**, <u>36</u>, 326–330

<sup>&</sup>lt;sup>182</sup> S. Romand, M. Pudney, F. Derouin. Antimicrob. Agents Chemother., **1993**, <u>37</u>, 2371–2378

<sup>&</sup>lt;sup>183</sup> A.L. Baggish, D.R. Hill. Antimicrob. Agents Chemother., 2002, <u>46</u>, 1163–1673, Minireview

<sup>&</sup>lt;sup>184</sup> N. Scholer, K. Krause, O. Kayser, R.H. Muller, K. Borner, H. Hahn, O. Liesenfeld Antimicrob. Agents Chemother., **2001**, <u>45</u>, 1771–1779



Schéma 81

#### 2) Autres molécules actives contre Toxoplasma gondii

Parmi les molécules développées et actives, certaines sont des inhibiteurs de la déshydrofolate réductase, enzyme clé du métabolisme des purines et du thymidylate du parasite. Plusieurs médicaments inhibent cette enzyme.

Le piritrexime, un antifolate lipidique soluble a été évalué pour son activité anti *Pneumocystis* et anti *Toxoplasma*<sup>185</sup>. La concentration permettant d'inhiber 50% de la DHFR de *T. gondii* est de 17 nM. Cet antifolate nécessite des doses entre 40 et 1000 fois plus faibles que celles utilisées pour le triméthoprime ou la pyriméthamine, antifolates utilisés conventionnellement sur ces parasites. Le piritrexime est aussi capable d'inhiber la réplication de *T. gondii in vivo*<sup>186</sup>.

Le trimétrexate, un analogue soluble et lipidique du méthotrexate a aussi été évalué et a montré une activité inhibitrice de la DHFR de *Pneumocystis carinii* et *T. gondii* 100 à 10 000 fois plus puissante que le triméthoprime et la pyriméthamine *in vitro* <sup>187</sup>. *P. carinii* est un champignon responsable de pneumonie chez les patients infectés par le VIH ou qui sont immunodéprimés, *in vitro* et *in vivo* 

La pyriméthamine, le triméthoprime, le trimétrexate-glycuronate et le piritrexime sont de très bons inhibiteurs de la DHFR de *T. gondii*. Ils inhibent la croissance de *T. gondii* avec des CI 50 sont de 0,04  $\mu$ g/ml pour la pyriméthamine, 2,3  $\mu$ g/ml pour le triméthoprime, 0,16 ng/ml pour le trimétrexate et 6,9ng/ml pour le piritrexime <sup>179</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>185</sup> J.A. Kovacs, C.J. Allegra, J.C. Swan, J.C. Drake, J.E. Parrillo, B.A. Chabner, H. Masur *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1988**, <u>32</u>, 430–433

<sup>&</sup>lt;sup>186</sup> F.G. Araujo, D.R. Guptill, J.S. Remington. J. Infect. Dis., **1987**, <u>156</u>, 828-830.

<sup>&</sup>lt;sup>187</sup> C.J. Allegra, J.A. Kovacs, J.C. Drake, J.C. Swan, B.A. Chabner, H. Masur. J. Clin. Invest., 1987, 79, 478-482



L'épiroprime **273** seul ou combiné avec la dapsone a été testé sur la DHFR de *T. gondii*, *in vitro*. L'effet anti-toxoplasmique de l'épiroprime a été observé avec des concentrations de l'ordre du nanogramme / ml. Les effets sont synergiques avec la dapsone. Les effets *in vivo* sont synergiques avec la dapsone, la pyriméthamine et la sulfadiazine <sup>188</sup>. La combinaison d'inhibiteurs de la DHFR (PS 15, l'épiroprime ou la pyriméthamine) et de dapsone a été testée sur un modèle de rat, dans la prophylaxie d'une double infection par *T. gondii* et *P. carinii* <sup>189</sup>. Aucun des composés seuls ne prévient la toxoplasmose, mais la combinaison avec la dapsone permet d'obtenir une prévention à la fois contre la pneumocystose et la toxoplasmose chez le rat. L'épiroprime est aussi actif et sélectif contre la déshydrofolate réductase des staphylococci, des enterococci, pneumococci et streptococci. L'épiroprime est un meilleur inhibiteur de la DHFR bactérienne que le triméthoprime, et il est inactif sur les DHFR humaines. La combinaison de l'épiroprime avec la dapsone est synergique et montre une activité *in vitro* supérieure à la combinaison triméthoprime - sulfaméthoxazole sur la DHFR bactérienne <sup>190</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>188</sup> H.R. Chang, D. Arsenijevic, R. Comte, A.M. Polak, R.L. Then, J.C. Pechere. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, <u>38</u>, 1803–1807

<sup>&</sup>lt;sup>189</sup> M. Brun-Pascaud, F. Oise Chau, L. Garry, D. Jacobus, F. Derouin, P.M. Girard. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, <u>40</u>, 2067–2070

<sup>&</sup>lt;sup>190</sup> H.H. Locher, H. Schlunegger, P.G. Hartman, P. Angehrn, R.L. Then *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, <u>40</u>, 1376–1381



Schéma 83

D'autres molécules inhibitrices de la DHFR ont été synthétisées et évaluées. Il s'agit de di-amino-quinazolines 274, de di-amino-ptéridines 275, de di-amino-tétrahydropyrimidoisoquinoline 276, de di-amino-dihydrotriazines 277 et 278<sup>191</sup> (Schéma 84). Au total, cinquante et un composés ont été testés comme inhibiteurs de la DHFR de *P. carinii*, de *T. gondii* ou de foie de rat. La substitution en positions 6 et 7 par des groupements alkyles ou aryles sur les 2,4diaminoptéridines 275 permet une inhibition sélective de l'enzyme de *T. gondii*. Le 2,4-diamino-6,7-bis(cyclohexylméthyl)ptéridine s'est révélé être un bon inhibiteur de la DHFR de *T. gondii* ou de *P. carinii* avec un ratio sélectif par rapport à l'enzyme du mammifère bien meilleur que ceux décrits pour le trimétrexate 271 ou le piritrexime 272.



**274** 2,4-diaminoquinazolines avec des substituants en position 5, 6, ou 7





**275** 2,4-diamino-ptéridines disubstituées en 6,7

**276** 1,3-diamino-7,8,9,10-tétrahydro pyrimido[4,5-*c*] isoquinolines



1-aryl-4,6-diamino-1,2-dihydro-s-triazines

#### Schéma 84

Quatre nouveaux inhibiteurs de la DHFR, de la famille des di-amino-ptéridines disubstituées **275**, ont été identifiés. En fait, trois des ces structures 6,7-Dibutyl 2,4-Diaminopteridines **280**, 6,7-Dipropyl 2,4-Diaminopteridines **279** et 6-o-methoxyphenyl, 7-ethyl 2,4-Diaminopteridines **281**, inhibent la réplication de *T. gondii*, et sont même plus actifs que la

<sup>&</sup>lt;sup>191</sup> A. Rosowsky, J.B. Hynes, S.F. Queener Antimicrob. Agents Chemother., 1995, <u>39</u>, 79-86

pyriméthamine **264**. Les concentrations inhibitrices 50 sont de l'ordre de 0,018 à 0,033  $\mu$ M, comme inhibiteurs de la DHFR. Un de ces composés, le 6,7-dibutyl 2,4-diaminopteridine **280**, est aussi un inhibiteur puissant et sélectif de la DHFR de *P. carinii*. Aucun des trois composés testés **279**, **280**, **281** n'est toxique sur les cellules mammifères aux concentrations testées <sup>192</sup>.



275 2,4-diamino-ptéridines disubstituées en 6,7

**279**  $R_1 = R_2 = i$ -propyl **280**  $R_1 = R_2 = i$ -butyl **281**  $R_1 = o$ -méthoxyphényl et  $R_2 =$  éthyl

#### Schéma 85

L'équipe de Lau 2001<sup>193</sup> a évalué 84 composés 2,4-diaminopyrimidine dicycliques et tricycliques comme inhibiteurs potentiels de la déshydrofolate réductase (DHFR) de plusieurs parasites incluant *Plasmodium falciparum*, et *Toxoplasma gondii*. Parmi ces composés, neuf composés (**282** à **290**) se sont révélés actifs à la fois contre la DHFR de *P. falciparum* et *T. gondii*. (Schéma 86).



<sup>&</sup>lt;sup>192</sup> H.C. Jackson, K. Biggadike, E. Mckilligin, O.S. Kinsman, S.F. Queener, A. Lane, J.E. Smith Antimicrob. Agents Chemother., **1996**, <u>40</u>, 1371–1375

<sup>&</sup>lt;sup>193</sup> H. Lau, J.T. Ferlan, V. Hertle Brophy, A. Rosowsky, C. Hopkins Sibley Antimicrob. Agents Chemother., 2001, <u>45</u>, 187–195
Les sulfamides agissent sur le métabolisme des folates du parasite en bloquant la dihydroptéroate synthase et sont largement utilisés en clinique comme la sulfadiazine **267** et le sulfaméthoxazole **266**. Le sulfisoxazole a été testé comme inhibiteur de *T gondii* avec un CI <sub>50</sub> de 6,4  $\mu$ g/ ml <sup>179</sup>. D'autres sulfonamides que ceux habituellement utilisés en clinique, les sulfanilides dihalogénés en 3' et 5' **291** (Schéma 87) se sont révélés être des inhibiteurs de la croissance de *T gondii*, en culture, après 48 h d'incubation. Les CI <sub>50</sub> sont de l'ordre de 8,9 à 42,7  $\mu$ M. Ces composés agissent comme des inhibiteurs compétitifs sur la dihydroptéroate synthase. Les Ki qui représentent les constantes de dissociation du complexe Enzyme – inhibiteurs sont 6 à 57 fois plus bas que le Ki du sulfaméthoxazole <sup>194</sup>.





## Schéma 87

Cliniquement, l'atovaquone **269** est une hydroxyquinone active à la fois contre les kystes et les formes végétatives de *T. gondii*. D'autres hydroxyquinones analogues de l'atovaquone ont été synthétisées et évaluées contre *Toxoplasma*. Parmi ces molécules, deux 3-alkyl-2-hydroxy-1,4-naphtoquinones substituées **292** et **293** ont été évaluées (Schéma 88). Ces composés inhibent la croissance cellulaire du parasite. Les concentrations inhibitrices 50% après 48 h d'incubation sont de 0,13  $\mu$ M pour l'atovaquone **269**, 0,11  $\mu$ M et 0,10  $\mu$ M pour les deux composés testés <sup>195</sup>.



Schéma 88

Plus récemment, l'équipe de Ferreira 2002 <sup>196</sup> a testé quatorze naphtoquinones naturelles ou synthétiques. *In vitro*, sept naphtoquinones ont montré une inhibition significative de la croissance de *T. gondii*, à des concentrations de 1 à 5  $\mu$ g/ml. Seulement trois composés protègent les souris infectées par les tachyzoïtes d'une souche RH de *T. gondii*: 2-hydroxy-3-(3'-pentenyl)-1,4-naphthoquinone, 2-hydroxy-3-(1'-vinylphenyl)-1,4-naphthoquinone, 2-hydroxy-3-(1'-propen-

<sup>&</sup>lt;sup>194</sup> L.C. Chio, L.A. Bolyard, M. Nasr, S.F. Queener Antimicrob. Agents Chemother., 1996, <u>40</u>, 727–733

<sup>&</sup>lt;sup>195</sup> A.A. Khan, M. Nasr, F.G. Araujo Antimicrob. Agents Chemother., **1998**, <u>42</u>, 2284–2289

<sup>&</sup>lt;sup>196</sup> R.A. Ferreira, A.B Oliveira, S.A. Gualberto, R.W. Vitor *Parasite*, **2002**, <u>9</u> (3), 261-269

3'-phenyl)-1,4-naphthoquinone. Chez les souris infectées et traitées oralement par 50 mg/kg/ jour par de l' 2-hydroxy-3'-(3'-pentenyl)-1,4-naphthoquinone, la mort est retardée de 7 jours. Le traitement par des doses de 100 mg/kg/ jour oralement ou 50 mg/ kg/ jour par voie intra péritonéale par le 2-hydroxy-3-(1'-vinylphenyl)-1,4-naphthoquinone prolonge de 5 à 16 jours la vie de l'animal. Le traitement avec 50 mg/ kg/ par jour par voie orale ou intra-péritonéale par le - hydroxy-3-(1'-propen-3'-phenyl)-1,4-naphthoquinone prolonge de 4 jours la vie de l'animal et 30 jours respectivement. La même équipe en 2006 <sup>197</sup> a testé *in vitro* et *in vivo* l'effet seul ou combiné avec la sulfadiazine de la 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone et a montré un effet synergique.

Plusieurs autres molécules, dont certains antibiotiques (quinolones de quatrième génération, cyclines), sont actives *in vitro* ou *in vivo* sur *T. gondii*, mais ne sont pas utilisées dans le traitement de la toxoplasmose humaine  $^{92}$ .

La doxycycline s'est révélée être un bon inhibiteur *in vivo* et *in vitro* de *T. gondii* <sup>198</sup>. Des macrophages péritonéaux ont été infectés par une souche virulente RH de *T. gondii* et ils sont exposés à différentes concentrations de doxycycline. L'activité anti-toxoplasmique a été estimée avec le [3H] uracile, lequel est incorporé par le parasite mais pas par les cellules hôtes. La concentration inhibitrice 50 % (CI <sub>50</sub>) de doxycycline a été mesurée à 6,4  $\mu$ g/ml. La tétracycline n'a montré aucune activité anti-toxoplasmique. *In vivo*, une dose de 300 mg/kg *per os* de doxycycline protège de la mort une souris infectée par 5 000 tachyzoïtes injectée par voie intrapéritonéale.

Les quinolones et fluoroquinolones ont fait l'objet de nombreuses investigations, de la part de nombreuses équipes. Les fluoroquinolones de quatrième génération sont des composés actifs contre *T. gondii*, mais ne sont pas encore utilisées en thérapeutique dans cette affection. Elles ont été testées seules ou en association, *in vivo* ou *in vitro*. Certaines de ces fluoroquinolones sont commercialisées en France comme la moxifloxacine, d'autres sont commercialisées au Canada comme la gatifloxacine, et la trovafloxacine a été retirée du marché en 1997 suite à la survenue d'hépatites fulminantes.

Avant d'être retiré du marché, la fluoroquinolone trovafloxacine **294** faisait l'objet d'investigation, en particulier par l'équipe de Khan. Elle s'est révélée être une molécule active contre *T. gondii*. D'autres fluoroquinolones ont été testées par l'équipe de Khan 1996<sup>199</sup> *in vitro* à des concentrations de 0,625 à 10  $\mu$ g/ ml, telles que la ciprofloxacine, la fléroxacine, l'ofloxacine, la témafloxacine, tosufloxacine mais seule la trovafloxacine **294** inhibe la

<sup>&</sup>lt;sup>197</sup> R.A. Ferreira, A.B Oliveira, M.F. Ribeiro, W.L. Tafuri, R.W. Vitor *Exp Parasitol.*, **2006**, <u>113</u> (2), 125-129

<sup>&</sup>lt;sup>198</sup> H.R. Chang, R. Comte, J.C. Pechere Antimicrob. Agents Chemother., **1990**, <u>34</u>, 775–780

<sup>&</sup>lt;sup>199</sup> A.A. Khan, T. Slifer, F.G. Araujo, J.S. Remington Antimicrob. Agents Chemother., 1996, <u>40</u>, 1855–1859

réplication de *T. gondii* sans toxicité significative sur les cellules hôtes. La concentration inhibitrice 50% à 24 et 72 h est de 0,77 à 0,98  $\mu$ g/ml respectivement. La trovafloxacine **294** a été évaluée *in vivo* chez la souris. Un traitement des souris infectées par 100 à 200 mg/kg de trovafloxacine pendant 10 jours permet d'obtenir 100 % de souris survivantes. Une dose de 50 mg/kg protège 90% des souris infectées tandis qu'une dose de 25 mg/kg prolonge la survie de l'animal. Les autres fluoroquinolones n'ont pas montré de telles activités *in vivo*. La trovafloxacine (25 mg/ kg/ jour) a été évaluée par cette même équipe en 1997 <sup>200</sup> *in vivo* en combinaison avec la clarithromycine (200 mg/kg/jour), le pyriméthamine (10 mg/kg/jour) ou la sulfadiazine (150 mg/l) chez la souris. Les souris sont infectées par voie intra-péritonéale et traitées par voie orale pendant 10 jours. Il s'avère que l'adjonction de la trovafloxacine à un autre anti-toxoplasmique comme la clarithromycine, la pyriméthamine ou la sulfadiazine est synergique.



Schéma 89

Cette même équipe en 1999 <sup>201</sup> a évalué l'activité anti-toxoplasmique de plusieurs fluoroquinolones **295** dérivées de la trovafloxacine **294** (Schéma 90). L'inhibition de la réplication a été mesurée par la technique d'incorporation de [3H] uracile. La CI <sub>50</sub> est de 2,93  $\mu$ M pour la trovafloxacine, et pour les 11 autres composés, elle varie de 0,53 à 14,09  $\mu$ M. Six composés ont des CI <sub>50</sub> inférieures à celle de la trovafloxacine. Les relations structure-activité ont été étudiées. L'addition d'un méthyle en C5 du cycle 1,8 naphthyridone, ou bien d'un méthyle en C2 d'un cycle azabicyclohexane, ou d'un groupement amine en 6 de l'azabicyclohexane augmente l'activité. Plus encore, le remplacement du 2,4-difluorophényle par un cyclopropyle en N1 du 1,8-naphthyridone augmente l'activité. Le fait de d'éloigner le groupement amine d'un atome de carbone diminue cette activité.

 <sup>&</sup>lt;sup>200</sup> A.A. Khan, T. Slifer, F.G. Araujo, R.J. Polzer, J.S. Remington Antimicrob. Agents Chemother., 1997, <u>41</u>, 893–897

<sup>&</sup>lt;sup>201</sup> A.A. Khan, F.G. Araujo, K.E. Brighty, T.D. Gootz, J.S. Remington Antimicrob. Agents Chemother., **1999**, <u>43</u>, 1783–1787





CH

**298** grepafloxacine Cy = 3'-méthylpiperazine

COOH

295 Fluoroquinolones

#### Schéma 90

La gatifloxacine 296 (Schéma 91) a été évalué in vitro sur T. gondii 202, elle inhibe la réplication intracellulaire des tachyzoïtes, avec une CI 50 de 0.21 mg/ml après 48h d'incubation. Elle a une action synergique avec la pyriméthamine. En effet après un traitement des cultures par de la gatifloxacine et de la pyriméthamine (ratio 1 :1), et 48h d'incubation, l'effet synergique est démontré. Des doses de gatifloxacine 296 de 100 et 200 mg/kg/jour ont été administrées par oral à des souris pendant 10 jours. Ces doses prolongent significativement (p = 0.056 et p < 0.0001 respectivement) la survie des animaux infectés par une dose létale de tachyzoïtes. Une dose de 400 mg/kg donne 20 % de survivants. La mortalité intervient chez 100% des souris non traitées ou insuffisamment traitées (dose de 25 ou 50 mg/kg/jour). Le traitement des souris infectées par une combinaison de gatifloxacine **296** (200 mg/kg/jour) et de pyriméthamine (12,5 mg/kg/jour) donne 85% de survivants. Le traitement par la gatifloxacine 296 seule donne 0% de survivant, et le traitement par la pyriméthamine seule donne 20% de survivants.





Cy = 3'-méthylpiperazine **297** moxifloxacine Cy = piperidinopyrrolidine







piperidinopyrrolidine





D'autres fluoroquinolones ont été testés par l'équipe de Gozalbes en 2000 <sup>203</sup> (Schéma 91). Sur les 24 composés évalués, 20 se sont révélées actives in vitro contre *T. gondii* avec des CI <sub>50</sub> de l'ordre de 10 mg/ L. Les fluoroquinolones les plus actives sont la trovafloxacine **296**, la grépafloxacine **298**, la gatifloxacine **296** et la moxifloxacine **297**. Les CI <sub>50</sub> sont de 0,4, 2,4, 4,1 et 5,1 mg/L, respectivement. Les relations structure activité ont été étudiées. L'acide carboxylique en C3 n'a aucun rôle dans l'activité antiparasitaire, par contre l'activité est liée à la présence du fluor en C6. Cette activité est accrue par la présence du groupe méthyle en C5 ou d'un azabicyclohexane en C7. Un nucléophile en C8 est essentiel pour l'activité de la gatifloxacine et la moxifloxacine (Schéma 91).

Les fluoroquinolones continuent de faire l'objet d'investigations. Les fluoroquinolones de références avec une activité importante anti-toxoplasmique restent la trovofloxacine **294**, la gatifloxacine **296** et la moxifloxacine **297**. L'équipe d'Anquetin en 2004 <sup>204</sup>, 2005 <sup>205</sup>. et 2006 <sup>206</sup>. a conçu de nouvelles fluoroquinolones par une analyse QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship). Les molécules synthétisées par l'équipe de Gozalbes en 2000 <sup>203</sup> ont été étudiées par analyse informatique, et les CI <sub>50</sub> prédites et expérimentales ont été confrontées pour valider le modèle informatique. Parmi les douze composés, les 8-éthyl (ou méthoxy) et 5 –éthyl-8 méthoxy-6-fluoroquinolones ont été prédits actifs contre *T. gondii*. Quatre 6-fluoro-8-methoxy-quinolones **299**, **300**, **301**, **302** ont été synthétisées (Schéma 92) mais une seule quinolone **301** s'est révélée aussi active que prévue. Seul ce composé **301** apparaît comme un inhibiteur comparable ou meilleur que la trovafloxacine, la gatifloxacine et la moxifloxacine.



# Schéma 92

D'autres antibiotiques ont été testés sur *Toxoplasma gondii*, comme agent inhibiteurs. La rifabutine, un dérivé semi synthétique de la rifamycine S, inhibe la croissance de *T. gondii in* 

<sup>&</sup>lt;sup>203</sup> R. Gozalbes, M. Brun-Pascaud, R. Garcia-Domenech, J. Galvez, P.M. Girard, J.P. Doucet, F. Derouin *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, <u>44</u>, 2771–2776

<sup>&</sup>lt;sup>204</sup> G. Anquetin, M. Rouquayrol, N. Mahmoudi, M. Santillana-Hayat, R. Gozalbes, J. Greiner, K. Farhati, F. Derouin, R. Guedj, P. Vierling *Bioorg Med Chem Lett.*, **2004**, <u>14</u> (11), 2773-2776

<sup>&</sup>lt;sup>205</sup> G. Anquetin, J. Greiner, P. Vierling Curr Drug Targets Infect Disord., 2005, 5 (3):227-245

<sup>&</sup>lt;sup>206</sup> G. Anquetin, J. Greiner, N. Mahmoudi, M. Santillana-Hayat, R. Gozalbes, K. Farhati, F. Derouin, A. Aubry, E. Cambau, P. Vierling. *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, <u>41</u> (12), 1478-1493

vitro à des concentrations allant de 0,5 à 20 mg/ml. La CI 50 est estimée à 1,68 mg/ml. L'action de l'atovaquone est synergique avec la rifabutine. L'inhibition est observée pour des doses de 20  $\mu$ g /ml de rifabutine combinées avec des doses d'atovaquone de 0,01 à 0,02  $\mu$ g/ ml, ainsi que pour des doses de rifabutine de 1, 2, 5 µg /ml combinées avec des doses d'atovaquone de 0,02 µg /ml. In vivo, des souris infectées par 10000 tachyzoïtes de la souche virulent RH sont traitées oralement pendant 10 jours soit de J1 à J10 soit de J4 à J14, par de la rifabutine à des doses de 200 mg/kg/ jour. 100% des souris traitées de J1 à J10 survivent pendant la période de traitement. Mais à la fin de l'expérience à J30, la mortalité est de 46%. Pour les souris traitées de J4 à J14, 100% des souris survivent pendant la période de traitement, mais la mortalité à la fin de l'expérience à J30 est 90%. L'administration de rifabutine à 200 mg/kg/ jour combinée à des doses d'atovaquone à 100 mg/kg/jour prolonge la survie des souris comparativement à l'administration de chaque médicament seul <sup>207</sup>. 75% des souris infectées survivent lorsqu'elles sont traitées par 100 mg/kg/jour de rifabutine combinée avec une dose inefficace de pyriméthamine (10mg / kg). Une dose administrée chez les souris de 50 mg/ kg de rifabutine combinée avec des doses inefficaces de clindamycine (25 mg/ kg/ jour), ou d'atovaquone (5 mg/kg/ jour) ou de sulfadiazine (80 mg /L d'eau de boisson/ jour) protègent de la mort respectivement 80%, 60% et 60 % des souris traitées. L'action de la rifabutine est synergique avec l'atovaquone, la clindamycine, le pyriméthamine ou la sulfadiazine <sup>208</sup>.

La rifapentine, un dérivé de la rifamycine, inhibe *in vitro* la croissance de *T. gondii* et n'est pas toxique sur les cellules hôtes L929 (cellules du tissu connectif de souris) aux concentrations employées à 5  $\mu$ g/ ml et 10  $\mu$ g/ ml<sup>209</sup>. La technique pour mesurer l'inhibition de la croissance de *T. gondii* est la technique d'incorporation du [3H] uracile. La cytotoxicité a été déterminée par le Cell Titer 96 kit (Promega Corp. Madison, Wis). Cette technique est décrite dans la partie expérimentale.

D'autres composés ont montré un intéressant potentiel anti-toxoplasmique : le synercid, un composé constitué de quinupristine et de dalfopristine. *In vitro*, les 50% d'inhibition de la réplication intracellulaire des tachyzoïtes est atteinte pour le synercid, la quinupristine et la dalfopristine à 1,6 2,7 et 6,3 mg/ml respectivement. L'association des deux composés est clairement plus active que chaque composé séparément. *In vivo*, le traitement de souris infectées par 100 ou 200 mg/kg/ jour de synercid administré par voie intra-péritonéale pendant 10 jours permet d'obtenir 50 % ou 100 % respectivement de souris survivantes alors que les souris du groupe contrôle meurent à J18. Le traitement avec 200 mg /kg/ jour de quinupristine ou de dalfopristine seule donne 20% de souris survivantes. Le traitement avec 50 mg /kg/ jour de

<sup>&</sup>lt;sup>207</sup> S. Romand, C. Della Bruna, R. Farinotti, F. Derouin Antimicrob. Agents Chemother., 1996, <u>40</u>, 2015–2020

<sup>&</sup>lt;sup>208</sup> F.G. Araujo, T. Slifer, J. S. Remington Antimicrob. Agents Chemother., **1994**, <u>38</u>, 570–575

<sup>&</sup>lt;sup>209</sup> F.G. Araujo, A.A. Khan, J.S. Remington Antimicrob. Agents Chemother., 1996, <u>40</u>, 1335–1337

quinupristine ou de dalfopristine retarde le moment de la mort des souris <sup>210</sup>. Ce composé est actif aussi contre *P. carinii* <sup>211</sup>.

En dehors des antibiotiques, d'autres molécules ont été testées sur T. gondii.

L'équipe de Chang 1989 <sup>212</sup> a étudié les effets *in vitro* de trois composés bicycliques, avec une jonction en cis 1,2,4-trioxanes (pentatroxane **303**, thiahexatroxane **304**, et hexatroxanone **305**) (Schéma 93) contre *T. gondii*. Des macrophages péritonéaux et inactivés sont infectés par une souche virulente RH de *T. gondii* et sont exposés aux 1,2,4-trioxanes à différentes concentrations. L'activité anti-toxoplasmique des médicaments a été mesurée avec le [3H] uracile qui est incorporé par le parasite mais pas par les cellules hôtes. Le pentatroxane **303** et le thiahexatroxane **304** sont les plus actifs sur les toxoplasmes intracellulaires, mais ils sont inactifs sur les toxoplasmes extracellulaires. La CI 90% est respectivement de 6,8 et 5,3 µg/ml respectivement. Un examen microscopique des macrophages infectés confirme l'inhibition de la réplication. Ces activités sont comparables à celle du pyriméthamine (1µg /ml) seul ou du pyriméthamine combinée avec la sulfadiazine (25 µg/ml). Le pentatroxane **303** et le thiahexatroxane **304** sont aussi capables d'inhiber la croissance intracellulaire de *T. gondii*, en présence de cellules HeLA qui sont des cellules humaines cancéreuses, ce qui suggère que l'activité anti-toxoplasmique n'est pas due à un mécanisme spécifique macrophagique, telle que l'activation macrophagique.



#### Schéma 93

L'artémisinine **306** est un composé dérivé du qing hao (*Artemisia annua* L.), une plante chinoise, comportant un cycle trioxane. Sa capacité à inhiber la formation de plaque de *T. gondii* sur les fibroblastes a été testée *in vitro* <sup>213</sup>. Il n'y a pas de toxicité apparente sur les fibroblastes. Des fibroblastes sont mis en culture dans des plaques à 12 puits, puis après 3 jours, les tachyzoïtes sont ajoutés (1 tachyzoïte pour 1000 fibroblastes). L'incubation dure 3 h avant l'ajout du médicament. Les cultures sont examinées au microscope à contraste de phase.

<sup>&</sup>lt;sup>210</sup> A.A. Khan, T.R. Slifer, F.G. Araujo, J.S. Remington Antimicrob. Agents Chemother., **1999**, <u>43</u>, 2043–2045

<sup>&</sup>lt;sup>211</sup> P.D. Walzer, A. Ashbaugh, M. Collins, M.T. Cushion Antimicrob. Agents Chemother., 2001, 45, 3234–3237

<sup>&</sup>lt;sup>212</sup> H.R. Chang, W. Jefford, J. Pechere Antimicrob. Agents Chemother., **1989**, <u>33</u>, 1748–1752

<sup>&</sup>lt;sup>213</sup> K. Ou-Yang, E. C. Krug, J. J. Marr, R. L. Berens. Antimicrob. Agents Chemother., 1990, <u>34</u>, 1961–1965

L'artémisinine à 0,4  $\mu$ g/ml pendant 5 jours élimine les plaques de *T. gondii*. A des doses de 1,3  $\mu$ g /ml pendant 14 jours, tous les toxoplasmes sont éliminés. Six dérivés de l'artémisinine ont été testés : le dihydroqinghaosu **307**, le 1-propyl-ether-qinghaosu **310**, et le 1-butyl-ether-qinghaosu **311** sont comparables à l'artémisinine **306**. L'éthyl-éther-qinghaosu (artééther) **309** et le secbutyl-éther-qinghaosu **312** sont plus actifs. Le méthyl-éther-qinghaosu (artéméther) **308** est le plus actif.



### Schéma 94

L'équipe de Holfels en 1994 <sup>214</sup> a testé plusieurs molécules, l'artémisinine éther (artééther) **309**, le cycloguanil, la méfloquine, le primaquine, le sulfate de quinine, le vérapamil, le trifluopérazine. L'artééther **309** à des doses supérieures ou égales à 0,5  $\mu$ g/ml et le cycloguanil à des doses supérieures ou égales 1  $\mu$ g/ml inhibent *T. gondii in vitro*. Le cycloguanil à 2,5  $\mu$ g/ml combiné avec une concentration non inhibitrice de la sulfadiazine (25  $\mu$ g/ml) inhibent la croissance de *T. gondii* de façon plus importante que le cycloguanil à 2,5  $\mu$ g/ml seul. Ni la primaquine, ni la méfloquine, ni le sulfate de quinine n'ont d'effet inhibiteur sur *T. gondii* intracellulaire. Le vérapamil à 5 et 10  $\mu$ g/ml et le trifluopérazine à 0,5  $\mu$ g/ml ne sont pas des inhibiteurs à ces concentrations basses, mais des concentrations plus importantes sont toxiques pour les cellules hôtes.

<sup>&</sup>lt;sup>214</sup> E. Holfels, J. McAuley, D. Mack, W. K. Milhous, R. McLeod. Antimicrob. Agents Chemother., **1994**, <u>38</u>, 1392–1396

L'équipe de Sarciron en 2000 <sup>215</sup> a évalué l'effet de l'artésumate et son métabolite le dihydroartémisinine, *in vitro* sur *Toxoplasma gondii*. La croissance du parasite mis en culture avec des cellules THP1 est inhibée à 70% à des concentrations de 0,1 à 0,5  $\mu$ g/ ml au bout de 96 h. In vivo, des souris sont infectées par gavage avec des kystes obtenus à partir du cerveau de souris infectées. Trois mois plus tard, le nombre de kystes dans le tissu cérébral est 40% fois moins important dans le groupe traité par l'association artésumate - dihydroartémisinine (50 : 50) à 100 mg/ jour pendant cinq jours par rapport au groupe contrôle.

L'artémisinine **306** est un composé actif contre *T gondii*. Six dérivés **308**, **313 a à d**, **314** ont été synthétisés <sup>216</sup> (Schéma 95). Ces composés ont des CI <sub>50</sub> de l'ordre de 8 à 0,7  $\mu$ M. Ils sont plus actifs que le triméthoprime. La cytotoxicité de ces composés est moins importante qu'avec le triméthoprime. La concentration toxique pour 50% des cellules hôtes avec le triméthoprime est de 210  $\mu$ M alors qu'elle est de l'ordre de 340  $\mu$ M à 1,560  $\mu$ M pour les dérivés de l'artémisinine.



La pentamidine **315** est une diamine active sur *Trypanosoma gambiense* et *rhodiense* qui sont des protozoaires responsables de la maladie du sommeil transmise par la glossine mais elle est inactive sur *T. cruzi*, qui est un protozoaire responsable de la maladie de Chagas transmise par une punaise, la réduve, et qui donne des affections cardiaques essentiellement. Elle est active sur *P. carinii, Blastomyces dermatitidis* qui est un champignon responsable de lésions cutanées granulomateuses et ulcérées, ainsi que sur *Leishmania* qui sont des protozoaires endocellulaires parasites des cellules endothéliales, des macrophages et des monocytes. Les *Leishmania* sont responsables de plusieurs maladies à localisation cutanée ou viscérale <sup>171</sup>. Certains analogues de la pentamidine **316** à **320** sont des molécules actives sur *T. gondii*. Les tachyzoïtes sont mis en culture, puis après 2h l'inoculation, les médicaments à 100 µg/ml sont ajoutés à la flasque. Après

<sup>&</sup>lt;sup>215</sup> M.E. Sarciron, C. Saccharin, A.F. Petavy, F. Peyron Am J Trop Med Hyg. 2000, 62 (1), 73-76

<sup>&</sup>lt;sup>216</sup> L. Jones-Brando, J. D'Angelo, G.H. Posner, R. Yolken Antimicrob. Agents Chemother., 2006, <u>50</u>, 4206–4208

quatre jours d'incubation, les tachyzoïtes sont comptés et le pourcentage d'inhibition est déterminé par rapport aux contrôles. L'inhibition de la réplication des tachyzoïtes est importante (de 52 à 98%) pour la pentamidine et cinq de ces analogues **316** à **320** (Schéma 96)<sup>217</sup>.



#### Schéma 96

Le paclitaxel est un composé cytotoxique utilisé en cancérologie. Des tachyzoïtes de souche RH de *T. gondii* sont mis en culture avec des cellules HFF (human foreskin fibloblasts) de fibroblastes humains de prépuce. Des tests de cytotoxicité sont entrepris afin de vérifier que le paclitaxel n'est pas toxique pour les fibroblastes aux concentrations employées. L'addition de paclitaxel à la concentration de 1 µM empêche la multiplication du parasite mis en culture avec les cellules HFF. L'inhibition de la réplication a été mesurée par la technique d'incorporation de [3H] uracile. La densité relative, le pourcentage de cellules infectées, l'aspect de l'organisme et des vacuoles parasitophores sont observés au microscope et comparés à des cultures contrôles non traitées par le paclitaxel. La division du noyau du tachyzoïte est arrêtée. Quatre jours après l'infection et en présence de la molécule, l'inhibition de la division du noyau est irréversible, avec les tachyzoïtes incapables de quitter les cellules infestées, donc incapables d'infester de nouvelles cellules, et d'avoir une croissance cellulaire normale. Si les fibroblastes sont prétraités par le paclitaxel avant l'addition des tachyzoïtes, les parasites pénètrent les cellules, mais sont incapables de se répliquer. Les microtubules du parasite sont affectés, mais pas les microtubules des cellules HFF, aux concentrations employées<sup>218</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>217</sup> D.S. Lindsay, B.L. Blagburn, J.E. Hall, R.R. Tidwell Antimicrob. Agents Chemother., 1991, <u>35</u>, 1914–1916

<sup>&</sup>lt;sup>218</sup> R. Estes, N. Vogel, D. Mack, R. Mcleod Antimicrob. Agents Chemother., 1998, <u>42</u>, 2036–2040

L'équipe de Mack en 1984<sup>219</sup> a testé plusieurs molécules contre T. gondii, dont la ciclosporine A. Cette molécule a été décrite précédemment comme ayant une action sur P. *falciparum*<sup>220</sup>. Des cellules macrophagiques sont mises en culture dans des cellules 24 puits, se sont des cellules adhérentes. Les tachyzoïtes de souche RH de T. gondii sont ajoutés. 1h après la ciclosporine est ajoutée, à des concentrations variant de 0,1 à 10 µg/ml. Après 20h d'incubation, l'inhibition de la réplication a été mesurée par la technique d'incorporation de [3H] uracile. La ciclosporine inhibe la réplication de T gondii à des concentrations supérieures ou égales à 2 µg / ml<sup>219</sup>. Le métronidazole a aussi été testé dans les mêmes conditions, mais il s'est révélé inactif sur T. gondii<sup>216</sup>. L'équipe de Silverman 1997<sup>221</sup> a testé des analogues de la ciclosporine. Des cellules Vero qui sont des cellules de rein de singe vert d'Afrique monocouche sont mis en culture puis elles sont infectées par des tachyzoïtes de souches RH. Les analogues de ciclosporine sont introduits et incubés 24h. Parmi ces 26 analogues testés, le composé SDZ 215-918 a montré une activité anti-toxoplasmique particulièrement importante. La CI 50 est de 0,45µg/ml. L'inhibition de la réplication a été mesurée par la technique d'incorporation de [3H] uracile. Une étude cinétique a montré que l'activité anti-toxoplasmique était rapidement atteinte (t  $\frac{1}{2}$  < 20 min), mais il existe une réversibilité, et c'est seulement au bout d'un temps de contact long (> 24h), que la dose de 5 mg/ml est létale pour le parasite. A cette concentration, ce dérivé n'a pas d'action sur la synthèse des protéines des cellules Vero ou bien sur leur réplication cellulaire. Cette activité antiparasitaire pourrait être due à l'inhibition de la P glycoprotéine, une enzyme impliquée dans le transport. Le composé SDZ 215 918 bloque à la fois l'invasion et la réplication de T. gondii.

Des copolymères appelés aussi poloxamères ont été testés in vivo sur des souris infectées et atteintes de toxoplasmose aiguë. Le traitement d'une toxoplasmose aiguë chez la souris avec des copolymères CRL 8131 et CRL 8142 seuls retarde la mort, mais la survie est significativement prolongée lorsque l'on traite les souris par les copolymères combinés avec la sulfadiazine, le pyriméthamine, la clindamycine ou l'atovaquone. Sans les copolymères, et traités par ces mêmes molécules, la mort intervient. Les souris sont infectées par la souche RH ou par des kystes. Elles sont traitées 24 h ou 48 h respectivement après inoculation. Le traitement de l'encéphalite toxoplasmique avec une dose non efficace d'atovaquone combinée avec le copolymère CRL 8131 montre une réduction de l'inflammation et le nombre de kystes de *T. gondii* dans le cerveau <sup>222</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>219</sup> D.G. Mack, R. Mcleod Antimicrob. Agents Chemother., **1984**, <u>28</u>, 26–30

<sup>&</sup>lt;sup>220</sup> K. Thommen-Skott Agents Action, **1981**, <u>11</u>, 770-773

<sup>&</sup>lt;sup>221</sup> J.A. Silverman, M.L. Hayes, B.J. Luft, K.A. Joiner Antimicrob. Agents Chemother., 1997, <u>41</u>, 1859–1866

<sup>&</sup>lt;sup>222</sup> F.G. Araujo, T. Slifer Antimicrob. Agents Chemother., 1995, <u>39</u>, 2696–2701

L'équipe de Conseil 1999<sup>223</sup> étudie les effets des inhibiteurs de protéases sur le développement asexuel de T. gondii. La souche RH de T. gondii utilisé est une souche avec un gène lacZ transfecté, qui exprime une activité bêta-galactosidase cytoplasmique. Les cellules Vero sont prétraitées par les inhibiteurs pendant 1h, avant l'invasion par les tachyzoïtes, dans ces conditions, il n'y a pas d'inhibition de la croissance du parasite. Si les parasites sont traités par les inhibiteurs pendant 1h avant l'invasion des cellules Vero, la mesure de l'activité bêtagalactosidase par lyse des cellules infectées suivie d'une réaction avec le rouge  $\beta$ -Dgalactopyranoside et mesure de l'absorbance à  $\lambda$  540 nm montre une réduction très importante de cette activité par rapport aux contrôles non traités. Les tachyzoïtes prétraités sont ajoutés aux cellules Vero en monocouche, disposées dans des puits. Les parasites sont laissés 1h en contact avec les cellules à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les puits sont lavés par un tampon phosphate, les cellules sont fixées dans le méthanol, colorées par du bleu de méthylène et de l'éosine. Le nombre de parasites intracellulaires est compté. Parmi les inhibiteurs testés, seulement deux inhibiteurs irréversibles, la 3,4-dichloroisocoumarine et le fluorure de 4-(2aminoéthyl)-benzène sulfonyle préviennent l'invasion des cellules hôtes en affectant spécifiquement les cibles des parasites, de façon dose-dépendante avec des CI 50 comprises entre 1 et 5 et 50 et 100 mM respectivement.

L'activité de la 2',3' didésoxyinosine ddI a été testée contre *T. gondii in vivo* et *in vitro*. Ce composé est utilisé dans le traitement du VIH. Des cellules THP1 et une suspension de tachyzoïtes sont mis en culture. Les molécules sont ajoutées, il s'agit de la ddI, de la spiramycine, de la sulfadiazine, de la pyriméthamine ou de la clindamycine. Lorsqu'une dose de ddI de 4 mg/ml est utilisé, aucune cellule THP1 n'est infestée, et aucun parasite n'est retrouvé après 60h d'incubation. A 1µg/ml, et après 60 h d'incubation, ddI induisent une inhibition de 87 à 89%, soit une inhibition comparable à celle obtenue avec des doses de 4µg/ml de sulfadiazine ou de spiramycine. Une observation au microscope électronique confirme que après 12 h d'exposition, les quelques parasites observés sont altérés. *In vivo*, quarante souris âgées de 8 semaines ont été infectées par voie orale avec des kystes. Le traitement des souris par le ddI montre une réduction du nombre de kystes dans le tissu cérébral par rapport au groupe contrôle  $^{224}$ .

L'équipe de Derouin 2000<sup>225</sup> a testé plusieurs médicaments comme inhibiteurs potentiels de *T. gondii*. Il s'agit d'analogues des nucléosides comme l'AZT, de la lamivudine, de la ddI, de la stavudine, de la zalcitabine et d'inhibiteurs de protéases comme le ritonavir, l'indinavir, le nelfinavir et le saquinavir. Les tachyzoïtes de la souche virulente RH de *T. gondii* sont mis en

<sup>&</sup>lt;sup>223</sup> V. Conseil, M. Soete, J.F. Dubremetz Antimicrob. Agents Chemother., 1999, <u>43</u>, 1358–1361

<sup>&</sup>lt;sup>224</sup> M.E. Sarciron, P. Lawton, C. Saccharin, A.F. Petavy, F. Peyron *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, <u>41</u>, 1531–1536

<sup>&</sup>lt;sup>225</sup> F. Derouin, M. Santillana-Hayat Antimicrob. Agents Chemother., 2000, <u>44</u>, 2575–2577

culture avec des fibroblastes, auxquels on ajoute les molécules à tester à des concentrations de 0,0005 à 100  $\mu$ g/ml. L'effet de chaque médicament est déterminé par la mesure de la densité optique en fonction du logarithme de la concentration. Certains analogues des nucléosides n'ont aucun effet sur la croissance du parasite, alors que le ritonavir et le nelfinavir peuvent inhiber la croissance de *T. gondii* avec des CI <sub>50</sub> de 5,4 et 4,0  $\mu$ g/ml. Les effets toxiques pour 50% des cellules hôtes sont de 20  $\mu$ g/ml pour la nelfinavir et de 40  $\mu$ g/ml pour le ritonavir. Aucun anti-rétroviral n'affecte l'activité anti-toxoplasmique du pyriméthamine et de la sulfadiazine. Il n'y a aucun effet synergique entre le pyriméthamine ou la sulfadiazine et chaque antirétroviral testé.

Des biphosphonates ont été décrits actifs contre *T. gondii* <sup>226</sup>. L'activité *in vivo* antiparasitaire, dirigée contre *Leishmania donovanii* et *Toxoplasma gondii*, de trois biphosphonates a été déterminée. Des souris ont été infectées oralement par 10 kystes. Le traitement a été débuté 3 jours après l'infection et s'est poursuivi pendant 10 jours, par voie intra péritonéale. L'alendronate s'est révélée inactif, le pamidronate est actif contre *L. donovanii*, le risédronate est actif contre *L. donovanii*, il est un peu moins actif sur les souris infectées par *T. gondii*. Les doses utilisées pour le traitement de l'infection à *T. gondii* sont de 10 et 20 mg/kg <sup>227</sup>

Le pyrrole trisubstitué 4-[2-(4-fluorophenyl)-5-(1-methylpiperidine-4-yl)-1H-pyrrol-3-yl] pyridine **321** (Schéma 97) est un inhibiteur potentiel de la protéine kinase dépendant du GMP cyclique des apicomplexes. Ce composé a été évalué sur des souris infectées par *T. gondii*, par voie intra-péritonéale <sup>229</sup>. Les souris ayant reçu ce composé à 50 mg/kg deux fois par jour pendant 10 jours sont protégés de l'infection. A l'arrêt du traitement, les parasites sont retrouvés au niveau du poumon, de la rate et du cerveau, ce qui indique une recrudescence asymptomatique de l'infection. L'interféron gamma semble être indispensable aux souris pour combattre l'infection, même si elles ont été traitées par le composé pyrrolé. En effet l'infection a été réalisée sur des souris survivent mais dès l'arrêt, elles meurent. Si des souris immunocompétentes sont à nouveau infectées par une dose létale de tachyzoïtes, elles survivent. Le composé pyrrolé semble immuniser les souris traitées. L'interféron gamma et le composé pyrrolé ont un rôle synergique.

<sup>&</sup>lt;sup>226</sup> M.B. Martin, et al. J. Med. Chem., 2001, <u>44</u>, 909–916

<sup>&</sup>lt;sup>227</sup> V. Yardley, A.A. Khan, M.B. Martin, T.R. Slifer, F.G. Araujo, S.N.J. Moreno, R. Docampo, S.L. Croft, E. Oldfield *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2002**, <u>46</u>, 929–931

<sup>&</sup>lt;sup>228</sup> Y. Ling, G. Sahota, S. Odeh, J.M. Chan, F.G. Araujo, S.N. Moreno, E. Oldfield *J Med Chem.*, **2005**, <u>48</u> (9):3130-3140

<sup>&</sup>lt;sup>229</sup> B. Nare, J.J. Allocco, P.A. Liberator, R.G.K. Donald Antimicrob. Agents Chemother., 2002, <u>46</u>, 300–307



Le flurazépam **322** s'est révélé être un inhibiteur de la croissance de *T. gondii in vitro* <sup>230</sup>. Les tachyzoïtes sont mis en culture avec des fibroblastes. Après 4 à 6 h d'incubation, les médicaments sont ajoutés. Après 48h d'incubation, on mesure l'incorporation de [3H] uracile. Le composé PK 11195 **323** n'a pas semblé être actif sur *T. gondii*. Les deux composés **322** et **323** sont actifs sur *P. falciparum* <sup>230</sup>.



# Schéma 98

L'équipe d'Asai en 2002 <sup>231</sup> a testé approximativement 150 000 petites molécules comme inhibiteurs potentiels de l'hydrolase nucléoside triphosphate (NTPase), une enzyme des tachyzoïtes de *T. gondii*, par un screening robotisé. Cinq composés, de structures différentes (Schéma 99) se sont révélés être de bons inhibiteurs des deux isoformes des NTPases avec des CI <sub>50</sub> de l'ordre de 0,1 à 20  $\mu$ M. Les CI <sub>50</sub> sont similaires pour les deux isoformes. Les cinq composés sont l'acide 2-[2-[2-(2,4,5-trichlorophénoxy)éthoxy]éthoxy]acétique **324**, l'acide ursolique **325**, le 1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide, 5-amino-1-(3,5-dichloro-4-[tricyclo(3.3.1.13,7)dec-1-ylcarbony]phényl) méthyle **326**, le 2-phénylthio-indole **327** et l'acide 9-hydroxy-10-(pentachlorophénoxy) stéarique **328**. Des cellules HFF en monocouche sont mis en culture, ils sont inoculés avec 1000 tachyzoïtes de la souche clone 2F qui exprime une bêta-

<sup>&</sup>lt;sup>230</sup> F. Dzierszinski, A. Coppin, M. Mortuaire, E. Dewailly, C. Slomianny, J.C. Ameisen, F. DeBels, S. Tomavo *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2002**, <u>46</u>, 3197–3207

<sup>&</sup>lt;sup>231</sup> T. Asai, T. Takeuchi, J. Diffenderfer, L.D. Sibley Antimicrob. Agents Chemother., 2002, <u>46</u>, 2393–2399

galactosidase. Les composés inhibiteurs potentiels sont ajoutés et le tout est incubé 48h à 37°C. Après une lyse des cellules et des parasites, l'activité galactosidase est quantifiée avec le rouge de chlorophénol D-galactopyranoside. Le nombre de tachyzoïtes est estimé à l'aide d'une courbe étalon. Ces composés inhibent aussi la réplication des tachyzoïtes in vitro, avec des CI <sub>50</sub> de l'ordre de 7 à 50  $\mu$ M. Le composé le plus actif est le 2-phénylthio-indole **327**.



Sept nouveaux composés **329** à **335** analogues du 2-phénylthio-indole **327** (Schéma 100) ont été synthétisés et testés à la fois comme des inhibiteurs potentiels des NTPases et comme des inhibiteurs de la croissance de *T. gondii in vitro*, par la même méthode que précédemment. . Ces composés **329** à **335** sont des inhibiteurs des NTPases, et inhibent aussi la croissance de *T gondii* avec des CI <sub>50</sub> de l'ordre 3,2 à 44  $\mu$ M .



# Schéma 100

L'équipe d'Atreya 2003 <sup>232</sup> a identifié un composé, l'éosine B **336**, agissant comme un inhibiteur pour une nouvelle cible thérapeutique concernant *T. gondii*. L'éosine B, appelé 4',5'-dibromo-2'7'-dinitrofluorescéine **336** (Schéma 101), cible l'enzyme bifonctionnelle déshydrofolate réductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) du parasite au niveau d'un unique site non actif. Cette enzyme n'est pas présente chez les mammifères, elle constitue donc une cible pouvant bloquer la voie métabolique des folates du parasite. L'usage de l'éosine B **336** a été approuvé par la FDA (Food and drug administration) comme médicament et comme produit cosmétique, car elle n'a pas montré de génotoxicité, ni de carcinogénicité. Le composé **336** inhibe la DHFR-TS de *T. gondii* avec une CI <sub>50</sub> de 180  $\mu$ M. Ce composé fait l'objet de recherche concernant une potentielle action antimalarique <sup>233</sup>.



<sup>&</sup>lt;sup>232</sup> C.E Atreya, E.F. Johnson, J.J. Irwin, A. Dow, K.M. Massimine, I. Coppens, V. Stempliuk, S. Beverley, K.A. Joiner, B.K. Shoichet, K. S.Anderson. J. Biol. Chem., 2003, <u>278</u>, 14092–14100.

<sup>&</sup>lt;sup>233</sup> K.M. Massimine, M.T. McIntosh, L.T. Doan, C.E. Atreya, S. Gromer, W. Sirawaraporn, D.A. Elliott, K.A. Joiner, R.H. Schirmer, K.S. Anderson. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2006**, <u>50</u>, 3132–3141

Parmi les cibles potentielles permettant d'inhiber la croissance du parasite, le blocage de la voie des purines a été exploré. L'équipe d'El Kouni 1995<sup>234</sup> 1999<sup>235</sup> et 2003<sup>236</sup> s'est particulièrement intéressée aux composés de type benzylthioinosine, comme agent antitoxoplasmique. L'analogue de purine nucléoside NBMPR (nitrobenzylthioinosine ou 6-[(4nitrobenzyl)thio]-9-β-D-ribofuranosylpurine) est phosphorylé sélectivement par le nucléoside-5'-monophosphate de T. gondii, mais pas par la kinase adénosine des mammifères. NBMPR est clivé à l'intérieur du toxoplasme en nucléobase nitrobenzylmercaptopurine. Le nitrobenzylmercaptopurine n'est un substrat ni pour l'adénosine kinase, ni pour l'hypoxanthineguanine-xanthine-phosphoribosyltransférase. Le métabolisme de NBMPR est inconnu chez le parasite, il a été testé comme agent anti-toxoplasmique. NBMPR tue les T. gondii intracellulaires, à l'intérieur des fibroblastes humains, de facon dose-dépendante, avec une CI  $_{50}$ de 10 mM et sans toxicité apparente vis-à-vis des cellules hôtes. Les CI 50 ont été déterminées par la technique d'incorporation de [3H] uracile. Des doses de 100 mM n'ont pas d'effet toxique significatif sur les cellules hôtes non infectées. Les tests de cytotoxicité ont été effectués par la technique du formozan (Cell Titer 96 Kit, du laboratoire Promega Corp. Madison, Wis cf. partie expérimentale) : les cellules HFF (human foreskin fibroblast) sont incubées avec les composés à des concentrations allant de 2 à 100 $\mu$ M. La mesure de l'absorbance se fait à  $\lambda$  540 nm. D'autres composés 9-B-D-ribofuranosylpurines substitués en 6, qui sont de bons ligands de l'adénosine kinase du parasite <sup>234</sup> ont aussi été testés. Parmi les produits testés, le 6-benzylthioinosine, le pnitrobenzyl-6-selenopurine riboside, le N6-(p-azidobenzyl) adénosine, le N6-(p-nitrobenzyl) adénosine, comme le NBMPR sont toxiques sélectivement sur les cellules infectées par le parasite. Certains composés 9-β-D-ribofuranosylpurines substitués en 6 sont donc des agents potentiels pouvant bloquer le métabolisme des purines chez T. gondii<sup>235</sup>.

Les transporteurs des purines nucléoside / adénosine diffèrent selon qu'il s'agit de cellules de mammifères ou de protozoaires. Les transporteurs des parasites sont moins sélectifs, il transporte à la fois les  $\beta$ -D adénosine et  $\beta$ -L adénosine. Ces transporteurs peuvent être inhibés par le nitrobenzylthioinosine ou les purines  $\beta$ -L nucléosides <sup>236</sup>.

L'adénosine kinase de *T. gondii* est une enzyme clé du métabolisme du *T. gondii*. Cette enzyme est significativement plus active que les autres enzymes de la voie de sauvetage des purines de *T. gondii*. Certains nucléosides des purines substitués en 6, sont des substrats de l'enzyme du parasite mais pas de l'enzyme humaine. Le *p*-Cyano-6-benzylthioinosine et le 2,4-dichloro-6-benzylthioinosine sont les meilleurs ligands de l'enzyme. De façon générale, la

<sup>&</sup>lt;sup>234</sup> M.H. Iltzsch, S.S. Uber, K.O. Tankersly, M.H. el Kouni. *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, <u>49</u>, 1501–1512

<sup>&</sup>lt;sup>235</sup> M.H. El Kouni, V. Guarcello, O.N. Al Safarjalani, F.N.M. Naguib Antimicrob. Agents Chemother., **1999**, <u>43</u>, 2437–2443

<sup>&</sup>lt;sup>236</sup> O.N. Al Safarjalani, F.N.M. Naguib, M.H. el Kouni Antimicrob. Agents Chemother., 2003, <u>47</u>, 3247–3251

substitution en position para du cycle phényle sont de meilleurs ligands que ceux substitués en *méta* ou *ortho* <sup>237</sup>. L'équipe d'El Kouni en 2004 <sup>238</sup>, en 2005 <sup>239</sup>, a synthétisé de nombreux analogues du 6-benzylthioinosine **337**, comme substrats potentiels de l'adénosine kinase (Schéma 102) <sup>240 241</sup>.



#### Schéma 102

Parmi les autres enzymes clé du métabolisme des purines, l'IMP déshydrogénase (inosine monophosphate déshydrogénase) constitue une cible thérapeutique. Elle catalyse la conversion de l'IMP (inosine monophosphate) en XMP (xanthine monophosphate). L'IMP déshydrogénase est inhibée par des analogues de l'adénine dinucléotide, comme le composé TAD **338** et les dérivés méthylèniques non hydrolysables de TAD **339** et SAD **340** (Schéma 103). Les Ki sont de 1,77 ±0,73  $\mu$ M pour **338**, 0,98 ±0,48  $\mu$ M pour **339** et 0,38 ± 0,5 pour **340** <sup>242</sup>



### Schéma 103

<sup>&</sup>lt;sup>237</sup> R.H. Rais, O.N. Al Safarjalani, V. Yadav, V. Guarcello, M. Kirk, C.K. Chu, F.N.M. Naguib, M.H. el Kouni *Biochemical Pharmacology*, **2005**, <u>69</u> (10), 1409-1419

<sup>&</sup>lt;sup>238</sup> V. Yadav , C.K. Chu, R.H. Rais, O.N. Al Safarjalani, V. Guarcello, F.N. Naguib, M.H. el Kouni *J Med Chem.*, **2004**, <u>47</u> (8), 1987-96

 <sup>&</sup>lt;sup>239</sup> A. Gupte, J.K. Buolamwini, V. Yadav, C.K. Chu, F.N. Naguib, M.H. el Kouni *Biochemical Pharmacology*, 2005, <u>71</u> (1-2), 69-73

<sup>&</sup>lt;sup>240</sup> M.H. el Kouni Curr Pharm Des., **2007**, <u>13</u> (6), 581-597

<sup>&</sup>lt;sup>241</sup> Y.A. Kim, A. Sharon, C.K. Chu, R.H. Rais, O.N. Al Safarjalani, F.N. Naguib, M.H. el Kouni *Biochemical Pharmacology*, **2007**, <u>73</u> (10), 1558-1572

<sup>&</sup>lt;sup>242</sup> W.J. Sullivan Jr, S.E. Dixon, C. Li, B. Striepen, S.F. Queener Antimicrob. Agents Chemother., **2005**, <u>49</u>, 2172–2179

L'auréobasidine A, un inhibiteur d'une enzyme, l'IPC synthase (inositol phosphocéramide synthase) synthétisant une sphingolipide l'inositol phosphorylcéramide, est présente dans les plantes, les champignons et quelques protozoaires, mais absente chez les mammifères. La souche RH de *T. gondii* exprimant la  $\beta$ -galactosidase est mise en culture avec des cellules de fibroblastes HFF pendant 2h. La culture est lavée pour enlever les parasites extracellulaires. L'auréobasidine A est ajouté à différentes concentrations de 0,1 à 10 µg/ml. Après 48h, cette molécule inhibe la réplication de *T. gondii* avec des CI <sub>50</sub> de 0,3µg/ml mais elle n'affecte pas les cellules HFF. Le mécanisme d'action résulte d'une perte des structures intracellulaires et de la vacuolisation. En plus, l'auréobasidine inhibe la synthèse des sphingolipides du parasite <sup>243</sup>.

La triazine 4,6-diamino-1,2-dihydro-2,2-dimethyl-1-(2,4,5-trichlorophenoxypropyloxy)-1,3,5 triazine nommé WR99210 342 (Schéma 104) inhibe T. gondii in vitro à des concentrations nanomolaires <sup>244</sup>. La souche RH de *T. gondii* est mise en culture avec des cellules HFF pendant une heure avant addition de l'agent inhibiteur potentiel. Le [5,6-3H] uracile est ajouté est incubée pendant 20h. Les cellules sont comptées à l'aide d'un spectrophotomètre à scintillations. La CI 50 est approximativement de 50 nM. Ce composé est actif in vivo. Des souris sont infectées par des souches RH, elles reçoivent 10 000 tachyzoïtes par voie intra-péritonéale. Le traitement est initié 15 min après l'infection. Les doses de composé 342 utilisées sont de 1,25 mg/ kg/ jour administrées par voie intra-péritonéale pour le traitement des souris pendant 3 jours. Le nombre de tachyzoïtes est quantifié 4 jours après l'infection. Le groupe des souris traitées apparaît en bonne santé alors que le groupe contrôle apparaît comme malade. Les parasites sont quantifiés dans le groupe traité comme dans le groupe contrôle. Dans le groupe traité, le nombre est abaissé de 2 log. Le composé nommé PS-15 341 est utilisé par gavage, il est administré une fois par jour une heure après l'infection par voie intra-péritonéale. La concentration utilisée est de 26 mM ce qui donne une dose de 387 mg/kg/ jour. Les résultats sont similaires à ceux obtenus avec le composé 342. Le composé 341 est métabolisé in vivo en composé 342 (Schéma 104).





 <sup>&</sup>lt;sup>243</sup> S. Sonda, G. Sala, R. Ghidoni, A. Hemphill, J. Pieters Antimicrob. Agents Chemother., 2005, <u>49</u>, 1794–1801
<sup>244</sup> E.J. Mui, D. Jacobus, W.K. Milhous, G. Schiehser, H. Hsu, C.W. Roberts, M.J. Kirisits, R. McLeod. Antimicrob. Agents Chemother., 2005, <u>49</u>, 3463–3467

Plus récemment, d'autres substances ont été testées. L'analogue de quinone, l'1-Hydroxy-2-Docecyl-4(1H) Quinolone appelé aussi HDQ 343 (Schéma 105) inhibe la croissance de T. gondii, par inhibition des NADH déshydrogénase<sup>245</sup>. Des cellules de fibroblastes HFF ont mis en culture pendant deux heures avec T. gondii, puis la solution est lavée pour enlever les parasites extracellulaires et les molécules inhibitrices potentielles sont ajoutées. L'incubation dure 24h, les cultures sont ensuite traitées de la façon suivante : fixation par un tampon phosphate (PBS) et du paraformaldéhyde 4% pendant 10 min, perméabilisation par du Triton X 100 (0,25%) pendant 15 min. Mis en contact avec du BSA (bovine serum albumine) pendant une heure, les solutions sont incubées pendant 1h avec de l'antisérum anti-T. gondii polyclonal de lapin dans un tampon PBS contenant 1% de BSA, suivi par une incubation pendant une heure avec une immunoglobuline G de Cy3-conjugué anti-lapin. Le nombre de parasite par vacuole a été déterminé par microscopie immunofluorescence. L'activité bêta galactosidase des parasites de T. gondii a été transférée dans le gène lacZ d'E. coli qui est utilisé de façon courante pour quantifier le taux de réplication par méthode colorimétrique. Des tachyzoïtes de la souche RH, exprimant la bêta galactoside, et fraîchement lysés, sont utilisés pour infecter les cellules HFF monocouche, qui sont incubées dans des plaques de 24 puits pendant 4h à 37°C. Les cellules HFF sont lavées, et incubées avec différentes concentrations du composé 343 (1, 0,1, 0,01, 0,001 μM) et avec du rouge de chlorophénol β-D-galactopyranoside à 100 μM. L'absorbance est mesurée à 570 nm et à 630 nm. L'inhibition de la croissance du parasite est obtenue avec une concentration du composé 304 de l'ordre de quelques nanomoles par litre. La CI  $_{50}$  est de 2,4 ± 0,3 nM, valeur mesurée basée sur des essais mesurant la taille des vacuoles et la CI 50 est de 3,7 ± 1,4 nM basée sur des tests d'activité de bêta-galactosidase. Le composé 343 inhibe de façon synergique avec l'atovaquone la croissance de T. gondii. La taille du groupe alkyle est importante car un dérivé avec une chaîne de 5 carbones n'inhibe pas la réplication de parasite alors que les composés avec des chaînes de 6, 8 ou 14 carbones inhibent la réplication. L'hypothèse retenue par les auteurs est que ce synergisme pourrait être lié au blocage du cycle ubiquinol / ubiquinone sur deux sites différents.



<sup>&</sup>lt;sup>245</sup> A. Saleh, J. Friesen, S. Baumeister, U. Gross, W. Bohne Antimicrob. Agents Chemother., 2007, <u>51</u>, 1217–1222

Des composés inhibiteurs sélectifs des protéases cystéine ont été évalués. L'invasion des cellules est régie par une série de protéines secrétées par trois organelles spécialisées, incluant les micronèmes, qui contribuent à l'adhésion du parasite et à sa pénétration dans la cellule hôte. Des études concernant les espèces Trypanosoma et Plasmodium ont montré que des inhibiteurs des protéases cystéine pouvaient être des agents antiparasitaires potentiels et qu'ils pouvaient traiter les infections in vivo. L'équipe de Fen Teo en 2007<sup>246</sup> a conçu une série d'inhibiteurs sélectifs des protéases-cystéines afin d'évaluer leur effet sur l'invasion des cellules hôtes par T. gondii. Deux de ces composés, le morpholinourée-leucyl-homophénolalaninyl-phényl-vinylsulfone appelé LHVS 344 et N-benzoxycarbonyl-(leucyl)3-phényl-vinyl-sulfone appelé ZL3VS 345 (Schéma 106) empêche l'invasion des cellules par T. gondii à des concentrations micromolaires. Le composé 344 inhibe l'invasion par T. gondii avec une CI 50 de 10 µM alors que pour le composé **345**, la CI 50 est de 12,5 µM. Les parasites sont incubés 15 min avec les inhibiteurs de protéases à des concentrations de 1 à 50 µM, puis les cellules HFF sont ajoutées. Après une incubation de 15 min, les cellules sont rincées pour enlever les parasites extracellulaires et elles sont fixées avec du formaldéhyde et du glutaraldéhyde dans un tampon PBS pendant 20 min. Après un nouveau rinçage avec du PBS, on ajoute du sérum bovin fœtal dans du tampon PBS. Les cellules sont lavées avec un tampon de dilution d'antigène. Les parasites attachés sont marqués par un anticorps polyclonal de lapin, le  $\alpha$  SAG1 (P30) tandis que les parasites intracellulaires sont marqués avec un anticorps monoclonal (Mab 9E11 α SAG1) de lapin après perméabilisation par du Triton X-100. Des anticorps secondaires sont utilisés : Ac Alexa Fluoro 594 anti-lapin, Ac Alexa Fluoro 488 anti-souris, le 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI). Ils sont ajoutés à la solution successivement avec un lavage entre chaque étape pour marquer les noyaux. La lecture est faite par contraste de phase et par épifluororescence. L'activité des protéases cystéine est nécessaire pour la sécrétion des micronèmes et l'invasion des cellules par T. gondii.



<sup>&</sup>lt;sup>246</sup> C. Fen Teo, X. Wang Zhou, M. Bogyo, and V.B. Carruthers Antimicrob. Agents Chemother., 2007, 51, 679–688



### Schéma 106

L'équipe de Smith 2007 <sup>247</sup> a évalué le composé MC1626 (2-methylcarbethoxyquinoline) comme inhibiteur de la croissance de *T gondii*. La CI <sub>50</sub> était de l'ordre de 100 $\mu$ M. Les tachyzoïtes ont été mis en culture avec des cellules de fibroblastes HFF. La technique d'incorporation de [3H] uracile a été utilisée pour déterminer la CI <sub>50</sub>. A des concentrations supérieures à 300  $\mu$ M, aucune cellule hôte n'a semblé présenter des signes de dégradations.

L'équipe de Walchshofer<sup>241</sup> a synthétisé de nombreux composés qui ont été testés comme antiparasitaires, contre *T. gondii*, certains ont été aussi testés contre *Leishmania*.

Des dérivés quinoniques **346** à **367** (Schéma 107) ont été synthétisés puis testés sur une souche virulente RH de *T. gondii*, maintenu en culture dans des cellules THP1. Ces dérivés ont été testés à des doses variables de 0,5 à 4  $\mu$ g/ ml et comparés à des molécules de référence comme la clindamycine, sulfadiazine, pyriméthamine et l'atovaquone. Le pourcentage d'inhibition de la croissance de *T. gondii* est observé après 72h. Plusieurs molécules inhibent 70% de la croissance des parasites, mais seule la molécule tétracyclique est aussi active que la sulfadiazine, avec une CI <sub>50</sub> respectivement à 1,63 et 1,62  $\mu$ M<sup>248</sup>.



<sup>&</sup>lt;sup>247</sup> A.T. Smith, M.R. Livingston, A. Mai, P. Filetici, S.F. Queener, W.J. Sullivan, Jr. Antimicrob. Agents Chemother., **2007**, <u>51</u>, 1109–1111

<sup>&</sup>lt;sup>248</sup> M.E. Sarciron, P. Nebois, F. Pautet, A.F. Pétavy, H. F., N. Walchshofer *Parasitology Research*, **2002**, <u>88</u> (11), 969-971



CI  $_{50} = 2,30 \ \mu g/ml$ 



351  $CI_{50} = 1,25 \; \mu g/ml - 4,194 \mu M$ 

0

0

QН



0

349

 $CI_{50} = 1,28 \; \mu g/ml \quad 5,423 \mu M$ 



13,068µM

HN ő

352 CI  $_{50} = 2,18 \ \mu g/ml$  7,569 $\mu M$ 

353  $CI_{50} = 1,20 \ \mu g/ml \quad 5,854 \mu M$ 

354 CI  $_{50} = 2,00 \ \mu g/ml = 8,23 \mu M$ 





356

CI  $_{50} = 1,00 \ \mu g/ml \quad 3,534 \mu M$ 





357





358 CI  $_{50} = 1,86 \ \mu g/ml = 8,122 \mu M$ 



CI  $_{50} = 0.94 \ \mu g/ml \ 4.069 \mu M$ 

O || 0

360 CI  $_{50} = 1,80 \ \mu g/ml \quad 7,469 \mu M$ 





 $CI_{50} = 1,76 \ \mu g/ml \quad 7,242 \mu M$ 

Br ∥ 0









#### Schéma 107

D'autres composés de type indoloquinone **374** à **377** et quinoneimine **378** et **379** ont été synthétisés et évalués par l'équipe de Tapia en 2003<sup>249</sup> (Schéma 108). La souche RH de *T. gondii* est mise en culture avec des cellules THP1 de lignée myélomonocytique humaine. *In vitro*, des essais ont montré une activité anti-*Leishmania* et anti-toxoplasmique, sans cytotoxicité sur les cellules THP1. Les CI <sub>50</sub> pour l'ensemble des composés **368** à **375** pour *T. gondii* sont comprises entre 0,0007 et 0,0051  $\mu$ M. Les CI <sub>50</sub> sont égales à 0,0034  $\mu$ M à la fois pour la pyriméthamine et la sulfadiazine. Concernant les tests de cytotoxicité, les CI <sub>50</sub> pour l'ensemble des composés **368** à **375** sont comprises entre 0,817 et 0,011  $\mu$ M. Pour la pyriméthamine la CI <sub>50</sub> est de 0,010  $\mu$ M et pour la sulfadiazine, la CI <sub>50</sub> est de 0,012  $\mu$ M.



<sup>&</sup>lt;sup>249</sup> R.A. Tapia, Y. Prieto, F. Pautet, N. Walchshofer, H. Fillion, B. Fenet, M.E. Sarciron. *Bioorg Med Chem.*, 2003, <u>11</u> (16), 3407-3412



Schéma 108

Des napthtofuranquinones **385** et **386** et des naphtothiophenquinones **389** à **392** contenant un cycle thiazole fusionné ont été synthétisés par l'équipe de Tapia en 2003 <sup>250</sup> puis évalués concernant leur activité anti-*Leishmania* et anti-toxoplasmique (Schéma 109). Les quinones de départ **380** à **384** ont aussi été évaluées. Malheureusement, les naphtothiophenquinones **389** à **392** ont montré une très faible solubilité dans les solvants usuels, ne permettant pas leur évaluation biologique. Deux quinones **381** et **385** ont montré des activités bien supérieures aux molécules de références avec des toxicités moindres. Les CI <sub>50</sub> sont de 0,0007 µM pour les deux molécules **381** et **385**, contre 0,0034 µM pour la sulfadiazine et 0,0034 µM pour la pyriméthamine.

<sup>&</sup>lt;sup>250</sup> R.A. Tapia, L. Alegria, C.D. Pessoa, C. Salas, M.J. Cortes, J.A. Valderrama, M.E. Sarciron, F. Pautet, N. Walchshofer, H. Fillion *Bioorg Med Chem.*, **2003**, <u>11</u> (10), 2175-2182



#### Schéma 109

Les dérivés benzimidazole-4,7-diones **393** à **422** (Schéma 110) ont été testés comme inhibiteurs de la PNP (purine nucléoside phosphorylase) de *T. gondii*<sup>251</sup>. Les Ki sont de l'ordre de 2,96 à 0,10 mM. Les composés ont été testés à 1 et 4 mM concernant l'inhibition de la croissance de *T. gondii*. A 1 mM, ils inhibent la réplication des souches RH de 45 à 80 % selon les composés. La 8 aminoguanosine utilisé comme contrôle positif inhibe 85% de la réplication à 1mM. Le Ki pour la 8 aminoguanosine est de 0,20 mM.



#### Schéma 110

A travers ces exemples de la littérature, nous pouvons constater que les molécules actives contre *T. gondii* ont des structures chimiques très variées. Le mécanisme d'action de ces molécules n'est pas toujours élucidé. La structure la plus intéressante semble être l'hydroxynaphtoquinone atovaquone.

<sup>&</sup>lt;sup>251</sup> F. Alvarez, A. Gherardi, P. Nebois, M.E. Sarciron, A.F. Petavy, N. Walchshofer. *Bioorg Med Chem Lett.*, **2002**, <u>12</u> (6), 977-979

# **II TRAVAUX PERSONNELS**

## 1) Introduction

Notre objectif est d'évaluer l'activité anti-toxoplasmique des molécules synthétisées (cf. partie I). Pour cela, nous avons maintenu en culture *Toxoplasma gondii* avec des cellules de lignées monocytaires THP1. Nous avons donc mené dans un premier temps un test de cytotoxicité sur les cellules THP1 afin de démontrer que l'activité inhibitrice de la croissance du parasite n'est pas liée à la toxicité sur les cellules THP1, et dans un deuxième temps un test d'inhibition de la croissance de *T. gondii*.

#### 2) Matériels et méthodes

### 2.1) Culture cellulaire

## 211 Milieux

### 2 1 1 1Milieu incomplet :

Il est utilisé pour la préparation du milieu complet. Il s'agit de RPMI 1640 (Sigma Aldrich, France) préparé selon la méthode suivante :

Un flacon de poudre de 10,4g est dilué dans un litre d'eau distillée à laquelle est ajoutée 2 g de bicarbonate de sodium, sous agitation magnétique. Le pH est ajusté à 7,2. Une filtration stérilisante est ensuite effectuée sur un filtre Stérivex  $(0,22 \ \mu m)$ . Ce milieu peut être conservé au réfrigérateur, dans un flacon de volume adapté de façon à ce qu'il soit rempli jusqu'à la limite supérieure pour limiter les contacts avec l'air. En effet le CO<sub>2</sub> alcalinise le milieu.

#### 2112 Milieu complet

Il est préparé avec 85 ml de milieu incomplet stérile. Dans un tube conique de 15 ml, on prépare 10 ml de sérum de veau fœtal (DAP, Vogelgrun, France), 2 ml d'une solution de pénicilline et de streptomycine, 3 ml de tampon HEPES à 500 mmol / 1 (Sigma Aldrich, France). Ce mélange est filtré sur un filtre Stérivex ® de porosité 0,22 µm avant d'être ajouté au milieu incomplet. Le milieu contient donc du sérum de veau à 10%, de la pénicilline à 200 UI /ml et de la streptomycine à 200 µg / ml. Ce milieu est conservé à  $+4^{\circ}$ C.

#### 212 Cellules

# 2121THP1

Les cellules de la lignée myélomonocytique humaine THP 1 (ECACC 88081201; Sophia-Antipolis, France) ont été utilisées. Les cellules sont cultivées dans du milieu complet à +  $37^{\circ}$ C dans des flasques plastiques (Corning), placées en incubateur sous atmosphère de 5% en CO<sub>2</sub>, en milieu humide. Une fois par semaine, le milieu de culture est renouvelé, et les cellules sont diluées.

### 2 1 2 2 Toxoplasma gondii souche RH

Les tachyzoïtes sont issus de la souche RH cultivées in vitro dans notre laboratoire. Les parasites sont mis en culture avec les cellules THP 1 avec le milieu complet dans des flasques plastiques, placées dans l'incubateur à 37 °C, sous atmosphère de 5% en CO2, en milieu humide. Les tachyzoïtes infestent les cellules THP 1, ils s'y multiplient et finissent par lyser les cellules. Une fois par semaine, le milieu est renouvelé, et de nouvelles cellules THP 1 sont ajoutées.

# 2 2) Test de cytotoxicité

Le nombre de cellules est compté en cellule de Malassez et ajusté à 100 000 cellules/ ml pour les THP1.

Les références utilisées ont été la pyriméthamine et la sulfadiazine (Sigma, L'Isle d'Abeau, France). Les molécules testées sont celles décrites dans le tableau 4.

Les solutions mères (SM1) sont préparées à la concentration de 2,5 mM dans le DMSO stérile. Pour cela, les quantités pesées sont indiquées dans le tableau 4. 1 ml de DMSO stérile est ajouté, et la solution est homogénéisée. SM1 est obtenue en prélevant 250  $\mu$ l de la solution précédente à 10 mM et en complétant à 750  $\mu$ l.

Les solutions diluées (SD1) à 25  $\mu$ M sont préparées de la façon suivante : 10 $\mu$ l de SM1 sont prélevés, auxquels 990  $\mu$ l de RPMI sont ajoutés. Pour le composé **253**, sa faible capacité de dissolution oblige à préparer une solution diluée différente : 50  $\mu$ l de DMSO stérile sont ajoutés à 50  $\mu$ l de SM1. Une deuxième solution mère (SM2) à 1,25 mM est ainsi obtenue. 20  $\mu$ l de SM2 sont prélevés auxquels 980  $\mu$ l de RPMI sont ajoutés. La solution diluée SD2 est ainsi obtenue à une concentration de 25  $\mu$ M, mais elle contient deux fois plus de DMSO que les autres. Elle est spécifique au composé **253**.

Les tests sont réalisés en plaque de 96 puits de capacité 100  $\mu$ l. Les composés sont testés à des concentrations de 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M et 0,1  $\mu$ M. Pour obtenir une concentration finale de 5 ou 1  $\mu$ M, 20  $\mu$ l ou 4  $\mu$ l de SD1 (ou SD2) sont prélevés et la solution est complétée à 100  $\mu$ l. Pour obtenir, les concentrations à 0,5 et 0,1  $\mu$ M, les solutions SD1 ou SD2 sont diluées au dixième, ainsi les solutions SD3 et SD4 sont obtenues. 20  $\mu$ l et 4  $\mu$ l de SD3 et SD4 sont prélevés et complétés à 100  $\mu$ l. SD1, SD2, SD3 et SD4 sont préparées avant chaque expérience. Certains composés ont été testés à la concentration de 0,2 $\mu$ M, dans le cas où la gamme précédente n'est pas suffisamment précise pour déterminer la CI <sub>50</sub>.

Les puits de contrôle contiennent du DMSO à la même concentration que les puits contenant les produits à tester.

Les produits testés étant colorés et l'absorbance étant mesurée à  $\lambda$  490 nm, un puits « blanc » est réalisé pour chaque produit et pour chaque concentration : le puits contient le produit testé, le milieu de culture, mais pas de cellule. L'absorbance mesurée pour ces puits « blancs » sera retranchée de l'absorbance mesurée pour les puits contenant les produits et les cellules. La plaque est incubée 72h à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> en milieu humide. Au bout des 72 h d'incubation, la viabilité a été évaluée avec un réactif du laboratoire Promega : Cell Titer 96 Aqueous Non radioactive Cell proliferation assay ®. Il met en œuvre une réaction colorimétrique à base d'un composé de tétrazolium (MTS) et d'un réactif de couplage des électrons le phénazine méthosulfate (PMS). Le MTS est réduit par les cellules en formozan qui est soluble dans le milieu de culture. Après 1h30 de réaction à 37°C, l'absorbance du formozan est mesurée à 490 nm, par un spectromètre, sans traitement additionnel. La transformation de MTS en formozan se fait par l'intermédiaire d'enzymes déshydrogénases, présentes dans les cellules métaboliquement actives. La quantité de formozan formée mesurée par l'absorbance à 490 nm est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans les puits.

Une analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Graphpadprism ® version 4 de la Société Graphpad software. Pour chaque composé, le test a été réalisé trois fois, au moins dans trois expériences différentes. Les moyennes de chaque expérience sont ainsi obtenues.

Détails des calculs

Moyenne des absorbances mesurées du produit seul dans le RPMI : A p seul Moyenne des absorbances du produit avec les cellules dans le RPMI : A p cell Moyenne des absorbances du contrôle (cellule sans produit) : A cell Le pourcentage de cellules vivantes est calculé de la manière suivante : 100 x (A p cell – A p seul )/ A cell.

Le pourcentage d'inhibition est 100 - 100 x (A p cell – A p seul )/ A cell.

On détermine la moyenne et l'écart type à la moyenne du pourcentage d'inhibition pour chaque produit testé. On trace à l'aide du logiciel Graphpadprism ® la courbe pourcentage d'inhibition en fonction du log des concentrations en produit et on détermine la CI <sub>50</sub> pour chaque produit.

# 2 3) Test d'inhibition de la croissance de T. gondii

Le nombre de cellules est compté en cellule de Malassez et ajusté à 100 000 cellules/ ml pour les THP1 et 30 000 / ml pour les tachyzoïtes.

Les molécules synthétisées sont diluées comme précédemment. Les références utilisées ont été la pyriméthamine et la sulfadiazine (Sigma, L'isle d'Abeau, France). SD1, SD2, SD3 et SD4 sont préparées avant chaque expérience. Les tests sont réalisés en plaque de 96 puits de capacité 100  $\mu$ l. Les composés sont testés à des concentrations de 0,2  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M.

Les puits de contrôle contiennent du DMSO à la même concentration que les puits contenant les produits à tester.

La plaque est incubée 72h à  $37^{\circ}$ C sous 5% de CO<sub>2</sub> en milieu humide. Le bleu trypan est ajouté aux solutions. Les cellules et tachyzoïtes vivants ne sont pas perméables et ils restent non colorés, tandis les cellules et tachyzoïtes altérés sont colorés en bleu. Les tachyzoïtes vivants sont comptés en cellule de Malassez, et les résultats sont analysés par rapport aux puits de contrôle.

Une analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Graphpadprism ® version 4 de la Société Graphpad software. Pour chaque composé, le test a été réalisé en triplicats, au moins dans trois expériences différentes.

Molécules testées	Masse molaire (g/mol)	Quantité pesée (mg)	Concentration (mM)
	197	1,97	10
81a			
	247	2,47	10
82			
	263	2,63	10

Tableau 4 : structure de molécules évaluées in vitro sur T. gondii















225	2,25	10
275	2,75	
		10

2,89 

3,42

342	3,42	10

3,57 



357 3,57 10

3,56

10

10

10

10





356 3,56 10

3,86

356

386

272,3

258





260



248,7 2,49

2,72

Pyriméthamine 264



Sulfadiazine 268

166

# 3) Résultats et Discussion

Malgré la solubilisation dans le DMSO, certaines molécules se sont révélées peu solubles en milieu aqueux. Il s'agit des molécules **250**, **251**, **257**, **258**, **259**, **260**. Les tests de cytotoxicité aux concentrations de 5 et 1  $\mu$ M n'ont pas pu être menés à bien sur ces molécules. Le tableau 5 indique le pourcentage d'inhibition de la croissance des cellules THP1 pour des concentrations en produits de 5, 1, 0,5 et 0,1  $\mu$ M. La concentration de 5  $\mu$ M est toxique pour les cellules THP1. A cette concentration, la croissance des cellules est inhibée à 95% quelques soient les produits testés. Seule la pyriméthamine se montre moins toxique avec une inhibition de la croissance de 45 %. Les produits **82**, **94** montrant une toxicité importante même à 0,5 $\mu$ M, il a été testé à 0,2 $\mu$ M. Les produits **259** et **260** étant particulièrement peu solubles, ils ont été testés à 0,2 $\mu$ M. Quant au composé **253**, la différence de pourcentage d'inhibition entre 0,5 et 0,1 $\mu$ M nous a amené à tester à la concentration intermédiaire de 0,2 $\mu$ M. Grâce à ces données, la CI <sub>50</sub> a été déterminée à l'aide du logiciel Graphprism ®. Les résultats concernant la CI <sub>50</sub> sont présentés dans le tableau 6.

	5μΜ	1 µM	0,5 μM	0,1 μM	0,2 μM
81	$99,04 \pm 0,87$	$56,02 \pm 3,42$	$36,31 \pm 2,32$	5,78 ± 5,73	
82	$101,03 \pm 3,40$	$100,24 \pm 6,42$	$101,15 \pm 0,69$	$18,03 \pm 6,67$	29,33 ± 3,38
83	97,68 ± 1,57	$53,40 \pm 8,55$	$38,20 \pm 9,93$	$-4,51 \pm 3,36$	
87	$95,25 \pm 4,45$	31,71 ± 6,58	$14,35 \pm 4,03$	$7,85 \pm 5,26$	
94	$100,71 \pm 3,49$	85,01 ± 3,33	$91,59 \pm 4,10$	$10,24 \pm 6,75$	$32,\!62 \pm 2,\!80$
95	93,36 ± 4,74	$45,99 \pm 2,70$	$28,38 \pm 4,47$	$12,91 \pm 9,78$	
250			$81,06 \pm 2,08$	9,85 ± 5,57	
251			$86,72 \pm 0,51$	$10,95 \pm 5,89$	
252	98,04 ± 7,56	98,07 ± 1,68	$26,61 \pm 3,57$	$0,97 \pm 5,67$	
253	$92,89 \pm 2,55$	85,96 ± 3,16	65,13 ± 10,43	-1,88 ± 8,97	$11,47 \pm 3,17$
257			81,67 ± 5,72	6,75 ± 6,77	
258			87,19 ± 6,58	8,96 ± 7,24	
259			$86,85 \pm 2,24$	$3,59 \pm 7,02$	$37,56 \pm 7,72$
260			$93,08 \pm 2,57$	7,97 ± 6,30	$33,\!98 \pm 5,\!74$
Pyriméthamine	44,56 ± 8,03	$31,23 \pm 3,58$	$28,46 \pm 2,36$	13,57± 9,81	
sulfadiazine	$72,15 \pm 4,92$		$38,14 \pm 4,45$	9,78 ± 5,61	

Tableau 5 : pourcentage d'inhibition de la croissance des cellules THP1

Les résultats concernant l'inhibition de la croissance de *T gondii* souche RH sont référencés dans le tableau 7. Compte tenu de la cytotoxicité des produits, ils ont été testés à des concentrations plus faibles que la concentration toxique pour les cellules THP1, soient à 0,2 et 0,1  $\mu$ M. Cette cytotoxicité est une contrainte très importante, car elle limite la gamme de concentration pouvant être testées. Tous les produits testés inhibent la croissance du parasite à

0,2 et à  $0,1 \mu$ M. Certains ont une action comparable aux molécules de références que sont la sulfadiazine et la pyriméthamine. A 0,2 et  $0,1 \mu$ M, aucun cristal de produit n'a été observé au microscope.

	0,2µM	0,1 μM
81	$45,17 \pm 8,93$	$31,94 \pm 5,80$
82	$30,16 \pm 3,52$	$21,19 \pm 4,98$
83	$39,71 \pm 2,52$	$15,75 \pm 6,35$
87	$31,93 \pm 6,94$	$22,17 \pm 6,20$
94	$25,81 \pm 7,65$	5,93 ± 11,85
95	$33,15 \pm 4,52$	$1,90 \pm 3,80$
250	$45,27 \pm 2,05$	$30,14 \pm 9,34$
251	$54,20 \pm 5,34$	$35,45 \pm 2,44$
252	$38,72 \pm 8,72$	$19,16 \pm 2,60$
253	$52,32 \pm 7,22$	$24,88 \pm 8,94$
257	$40,43 \pm 6,32$	$32,14 \pm 6,65$
258	$37,59 \pm 7,31$	$27,69 \pm 5,05$
259	$47,74 \pm 8,16$	$38,86 \pm 6,09$
260	$40,40 \pm 6,41$	$31,58 \pm 8,11$
Pyriméthamine	$49,03 \pm 6,32$	$35,69 \pm 7,67$
sulfadiazine	$49,35 \pm 5,14$	$36,80 \pm 7,61$

Tableau 6 : pourcentage d'inhibition de la croissance de T. gondii RH

Le tableau 7 regroupe les CI <sub>50</sub> calculées par le logiciel Graphprism ® pour les cellules THP1 et le parasite *Toxoplasma*.

# Tableau 7 : CI 50 de THP1 et de T. gondii RH

	CI 50 (µM) THP1	CI 50 (µM) T. gondii
81	$0,769 \pm 0,042$	$0,247 \pm 0,040$
82	$0,232 \pm 0,018$	$0,499 \pm 0,068$
83	$0,794 \pm 0,064$	$0,252 \pm 0,015$
87	$1,419 \pm 0,086$	$0,478 \pm 0,141$
94	$0,216 \pm 0,019$	$0,307 \pm 0,057$
95	$1,054 \pm 0,055$	$0,232 \pm 0,008$
250	$0,236 \pm 0,012$	$0,242 \pm 0,020$
251	$0,239 \pm 0,014$	$0,172 \pm 0,007$
252	$0,592 \pm 0,025$	$0,280 \pm 0,026$
253	$0,398 \pm 0,034$	$0,190 \pm 0,009$
257	$0,286 \pm 0,021$	$0,314 \pm 0,048$
258	$0,247 \pm 0,014$	$0,361 \pm 0,054$
259	$0,296 \pm 0,044$	$0,197 \pm 0,019$
260	$0,221 \pm 0,014$	$0,313 \pm 0,046$
Pyriméthamine	$1,213 \pm 0,173$	$0,201 \pm 0,014$
sulfadiazine	$5,821 \pm 1,022$	$0,205 \pm 0,018$

Concernant *Toxoplasma*, les molécules de référence sulfadiazine et pyriméthamine ont une CI <sub>50</sub> égale respectivement à 0,201 et 0,205  $\mu$ M. Les molécules **251** et **253** ont une CI <sub>50</sub> légèrement inférieure, ainsi que la molécule **259**. Ces molécules sont plus actives contre *Toxoplasma gondii* que les molécules de référence. Cependant elles ont une cytotoxicité plus importante que la sulfadiazine ou la pyriméthamine. La molécule **95** présente un intérêt car sa CI <sub>50</sub> est proche des molécules de référence à 0,233  $\mu$ M, mais elle est peu cytotoxique (CI <sub>50</sub> à 1,054  $\mu$ M sur les THP1). Les molécules **81** et **83** présentent des caractéristiques similaires avec une CI <sub>50</sub> à respectivement 0,247 et 0,252  $\mu$ M, et une cytotoxicité moindre avec cette fois une CI <sub>50</sub> à 0,769 et 0,794  $\mu$ M. Les molécules **94**, **82**, **250**, **251**, **253**, **257**, **258**, **259**, **260** sont très cytotoxiques.

Les molécules **87**, **94** et **95** sont des ortho carbazoles 3,4 diones. La molécule **87** tricyclique est peu toxique pour les molécules THP1, ainsi que la molécule **95**, résultant de la cycloaddition de **87** et du cyclopentadiène. Il semble que ce cycle supplémentaire confère une activité anti-toxoplasmique plus importante. Par contre la molécule tétracyclique **94** résultant de l'addition de l'acétoxybutadiène sur **87** présente une activité radicalement différente avec une cytotoxicité très importante vis-à-vis des THP1, ainsi qu'une activité anti-toxoplasmique plus importante que la molécule tricyclique **87**. L'adjonction d'un cycle supplémentaire au carbazole 3,4 dione augmente l'activité anti-toxoplasmique, et selon le cycle ajouté, elle augmente aussi la cytotoxicité.

Les molécules **81**, **82** et **83** sont des ortho carbazoles 1,2 diones. Comme précédemment la molécule tricyclique **81** est peu cytotoxique vis-à-vis des THP1, et elle est active contre *T. gondii*. La molécule **83** résultant de l'addition de **81** et du cyclopentadiène présente une activité cytotoxique et antiparasitaire similaire à **81**. Par contre **82**, issu de la cycloaddition de **82** et l'acétoxybutadiène, offre un profil d'activité radicalement différent avec une cytoxicité très importante et une diminution de l'activité antiparasitaire. L'adjonction d'un cycle plan aromatique aux ortho carbazole 1,2 ou 3,4 dione confère une activité cytotoxique, et diminue l'activité antiparasitaire. Par contre l'adjonction d'un bicycle ponté confère aux carbazole diones (en particulier les 3,4 diones) une activité anti-toxoplasmique.

Si on compare l'activité des deux molécules tricycliques **87** (3,4 dione) et **81** (1,2 dione), **81** est plus active que **87** à la fois contre les cellules THP1 et le parasite. L'orientation des carbonyles en 1,2 ainsi que la non substitution de l'azote pourrait expliquer cette différence. Si on compare les molécules tétracycliques et planes **94** (3,4 dione) et **82** (1,2 dione), leur activité cytotoxique et anti-toxoplasmique sont très proches, L'orientation des carbonyles ou la non substitution ne semble pas jouer un rôle prépondérant quant à leur activité biologique. Si on compare les molécules pentacycliques avec un cycle ponté **95** (3,4 dione) et **83** (1,2 dione), elles ont une activité anti-toxoplasmique très intéressante, ainsi qu'une cytotoxicité moindre. Comme précédemment, l'orientation des carbonyles ou la non substitution de l'azote ne semblent pas intervenir quant à leur activité biologique.



Schéma 111

Les molécules **251** et **253** ont des structures chimiques très proches, elles présentent une inhibition de la croissance de *T. gondii*, avec des valeurs de CI <sub>50</sub> très voisines. Les isoxazoline-carbazolequinones sont des molécules capables d'inhiber la croissance in vitro de *T. gondii*. Parmi les triazolo-carbazolequinones, seule la molécule **259** inhibe la croissance de *T. gondii*. Les isoxazolo ou les triazolo-carbazolequinones présentent une cytotoxicité très importante vis-à-vis des THP1, ce qui limite leur intérêt thérapeutique comme antiparasitaire.



Schéma 112
#### 4) Conclusion :

Ces nouvelles molécules inhibent la croissance de *T. gondii in vitro* mais leur faible solubilité en milieu aqueux, rend leur évaluation biologique difficile et limite considérablement leur éventuel potentiel thérapeutique. La galénique pourrait améliorer cette faible solubilité en milieu aqueux, et ainsi améliorer la biodisponibilité de ces produits. D'autre part, ces molécules sont toxiques pour les cellules THP1, elles pourraient présenter un intérêt thérapeutique comme anticancéreux, mais seuls des tests sur plusieurs lignées cellulaires pourraient confirmer leur effet cytotoxique et surtout de connaître leur sélectivité. Ces molécules présentent une parenté structurelle avec les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase II, comme les anthracyclines, mais surtout un autre intercalant inhibiteur de la topoisomérase II comme l'elliptinium.

# CHAPITRE 3 : TEST D'INHIBITION DE LA PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE DE *TOXOPLASMA GONDII*

#### I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Les molécules synthétisées inhibent la croissance du parasite. Plusieurs molécules de type carbazolequinones ont déjà été testées au sein du laboratoire de parasitologie sur une enzyme du métabolisme des purines <sup>87</sup>: la purine nucléoside phosphorylase (PNP). Cette enzyme est une enzyme clé de la voie de sauvetage des purines, seule voie d'accès pour le parasite aux bases puriques.

Nous avons donc évalué l'activité inhibitrice potentielle de nos molécules sur la PNP de *T. gondii*, .afin de savoir si l'inhibition de la croissance du parasite observée est liée à ce mécanisme d'action.

Les mammifères utilisent deux voies d'accès aux purines<sup>252</sup>:

La synthèse *de novo* à partir de ribose 5-phosphate et de molécules telles que les acides aminés.

La voie de sauvetage des purines où l'organisme « recycle » les bases puriques provenant principalement du catabolisme des acides nucléiques, et les transforme en fonction de ses besoins.

Les protozoaires ne possèdent pas de voie d'accès de *novo* aux bases puriques. La voie de sauvetage des purines est donc leur seule possibilité afin de disposer des ces bases. Les nucléosides sont importés de leur hôte. L'équipe de Krug <sup>253</sup> a étudié le métabolisme des purines de *T. gondii*, et a trouvé des activités de type phosphorylase pour la guanine et l'inosine. Aucune activité de clivage n'a été mise en évidence, ni aucune activité nucléoside kinase ou phosphotransférase. Les désaminases ont été trouvées pour l'adénine et la guanine. Les activités phosphoribosyltransférase ont été mises en évidence pour les quatre nucléobases puriques. L'interconversion est possible seulement en direction de l'adénine vers la guanine. L'équipe de Chaudhary <sup>254</sup> a démontré que *T. gondii* utilise deux enzymes pour la voie des purines, l'hypoxanthine xanthine guanine phosphoribosyltransférase et l'adénosine kinase. Il semblerait que la voie de sauvetage de l'adénosine est plus importante que la voie de sauvetage de l'hypoxanthine ou des autres bases. La figure ci-dessous illustre la voie de sauvetage des purines de *T. gondii* d'après Chaudhary <sup>254</sup>.

<sup>253</sup> E.C. Krug, J.J. Marr, R.L. Berens *The journal of biological chemistry*, **1989**, <u>264</u> (8), 10601 - 10607

<sup>&</sup>lt;sup>252</sup> R.B. Gilbertsen, J.C. Sircair C.Hansch et al, ed Oxford et New York, Pergamon Press, **1990**, *2*, 443-480

<sup>&</sup>lt;sup>254</sup> K. Chaudhary, J.A. Darling, L.M. Fohl, W.J. Sullivan Jr, R.G.K. Donald, E.R. Pfefferkorn, B. Ullman, D.S. Roos *The journal of biological chemistry*, **2004**, <u>279</u> (30), 31221 – 31227



Figure 19

L'équipe de Sarciron en 1999<sup>255</sup> a déterminé les activités de plusieurs enzymes de la voie de sauvetage des purines, dans des tachyzoïtes provenant de kystes, par HPLC. Six enzymes ont été testés *in vivo* et *in vitro*, l'adénosine désaminase, la guanine désaminase, la purine nucléoside phosphorylase, la xanthine oxydase, l'hypoxanthine xanthine guanine phosphoribosyltransférase (HXG PRT) et l'adénine phosphoribosyltransférase (A PRT). *In vitro*, ni la guanine désaminase ni l'HXG PRT n'ont été détectées. *In vivo*, la PNP et l'adénosine désaminase ont montré une activité importante. La PNP est une enzyme ubiquitaire, mais il existe des différences de structures entre l'enzyme des mammifères et de ce parasite. Cette enzyme est une enzyme clé du métabolisme des purines car elle intervient dans la transformation de l'inosine en hypoxanthine et de la guanine en guanosine. Elle a donc été sélectionnée comme une cible potentielle pour des produits à visée anti-toxoplasmique.

La PNP est une enzyme ubiquitaire, elle coupe la liaison entre la base et le sucre, la réaction étant induite par l'ion phosphate. Cette réaction est réversible mais fonctionne surtout dans le sens nucléoside nucléotide.

Base – ribose + HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (phosphate inorganique)  $\leq >$  base – H + ribose-1-phosphate. (base = inosine ou guanosine).

Associée à l'HXGPRT, elle est une enzyme de la voie de sauvetage des purines alors que associée à la xanthine oxydase, elle est une enzyme du catabolisme.

<sup>&</sup>lt;sup>255</sup> A. Ghérardi, M. E. Sarciron, A.F. Pétavy, F. Peyron *Life sciences*, 1999, 65 (17), 1733-1738

D'après Chaudahary <sup>256</sup>, la PNP de *T. gondii* est très proche de la PNP de *Plasmodium falciparum* et d'*E. Coli*, concernant la séquence des acides aminés. La PNP de *Toxoplasma* a un poids moléculaire de 33025 Da. (toxoDB <u>www.toxoDB.org</u>). Elle est donc plutôt classée comme une molécule de bas poids moléculaire. A cause de leurs applications cliniques potentielles, de nombreux analogues de nucléotides et nucléosides ont été synthétisés et testés comme inhibiteurs de PNP. D'après Bzowska <sup>257</sup>, les inhibiteurs potentiels des PNP de bas poids moléculaire sont généralement des analogues des substrats nucléosides, comprenant des modifications de la base et / ou du pentose. Les modifications portent sur le remplacement de cycle ou d'une partie du cycle, souvent avec l'attachement du phosphate ou d'un groupe phosphonate, pour la compétitivité avec le second substrat de la phosphorylation, le phosphate inorganique Pi. D'autres inhibiteurs ont été développés, les analogues de l'état de transition. Il s'agit des immucillines H et G les inhibiteurs des PNP de haut poids moléculaires (*E. coli*), peuvent aussi être des analogues nucléosidiques, les formycines A et B, ainsi que des analogues 7-déaza. Un substituant chlorure sur des analogues de nucléoside 7-déaza sont aussi des inhibiteurs.

L'équipe de Chaudhary <sup>256</sup> a testé la sensibilité de la PNP de *T. gondii* aux immucillines, analogues de l'état de transition qui s'avèrent de puissants inhibiteurs de la PNP de P. falciparum. La croissance de la souche sauvage de T. gondii n'est pas affectée par 10 µM d'immucillines H, mais la souche mutante, pour laquelle l'adénosine kinase de la voie de sauvetage des purines est absente, est sensible à l'immucilline H avec une CI 50 de 23 nM. En présence du substrat hypoxanthine, la souche mutante a une croissance normale, mais la croissance est inhibée en présence du substrat inosine, ce qui indique que l'immucilline agit par inhibition de la PNP de T. gondii. La séquence primaire des acides aminés de la PNP de T. gondii est identique à 40% à celle de la PNP de P. falciparum. Des enzymes recombinants montrent des paramètres cinétiques similaires pour plusieurs substrats. Cependant contrairement à l'enzyme du *Plasmodium*, TgPNP est insensible à la méthylthio-immucilline H, qui inhibent la PNP de Plasmodium avec un Ki de 2,7 nM. De plus, la PNP de T. gondii (TgPNP) ne peut pas utiliser le 5'-méthylthio-inosine. Ce produit est obtenu chez Plasmodium par désamination de la méthylthio-adénosine, un produit de la voie biosynthétique des polyamines, et son autre mécanisme d'obtention de l'hypoxanthine en plus de la voie de sauvetage des purines. Une analyse du génome a montré l'absence totale de cette voie biosynthétique chez T. gondii, d'où le fait que l'enzyme TgPNP n'utilise pas 5'-méthylthio-inosine. La différence concernant les voies métaboliques des purines ou des polyamines parmi les membres du phylum Apicomplexa avec les cellules hôtes humaines oriente la stratégie de développement de médicament ciblé.

<sup>&</sup>lt;sup>256</sup> K. Chaudhary, L.M. Ting, K. Kim, D.S. Roos The journal of biological chemistry, **2006**, <u>281</u> (35), 25652 – 25658

<sup>&</sup>lt;sup>257</sup> A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar Pharmacoly & therapeutics, **2000**, <u>88</u>, 349-425

Des dérivés carbazolequinones ont synthétisés et testés comme inhibiteurs potentiels de l'activité de la PNP de deux souches de *T. gondii* (souche RH et ME 49)<sup>87</sup>. Les dérivés testés étaient les suivants (Schéma 113) :



Schéma 113

Les références utilisées étaient la 8 aminoguanosine qui est un inhibiteur de la PNP humaine et de *P. falciparum*, la formycine A qui est un inhibiteur de la PNP d' *E. coli* et l'allopurinol ribose qui est un substrat de la PNP humaine. La 8 aminoguanosine inhibe la PNP des deux souches avec une valeur de Ki de l'ordre de 0,2 mM. La formycine a une valeur de Ki de l'ordre de 1,70 mM pour les deux souches et l'allopurinol ribose a une valeur de Ki de 2 et 1,8 mM pour la souche RH et ME 49 respectivement. Parmi les quinones tricycliques **403**, **404**, **238**, **240** et **411**, les quinones non substituées sur la double liaison C2-C3 (X = H) soient **403**,

**404**, **238**, et **411**, présentent une valeur de Ki de même ordre de grandeur voire légèrement plus basse que notre meilleure référence, la 8 aminoguanosine, sur les deux souches. Parmi ces composés, le dérivé *N*-éthyl **238** est le plus actif avec des valeurs de Ki à 0,7 et 0,14 mM sur les deux souches. Parmi les composés tétracycliques **405**, **406**, **407**, **408**, **409**, **410**, **412**, **413**, **414**, la présence du groupement hydroxy soient **412**, **413** et **414** n'augmente pas l'activité inhibitrice par rapport aux composés non hydroxylés **405** et **406**. Par contre la position de l'azote du cycle pyridinique détermine l'activité inhibitrice. La meilleure activité a été observée avec les régioisomères 1,10 **405** et **413** puis avec les régioisomères 1,6 **406** et **414**. Les quinones **409** et **410** se sont montré plus actifs que les dérivés lactames correspondants **407**, **408**. Les dérivés pentacycliques ont présentés une valeur de Ki supérieure aux autres dérivés. Les composés **403**, **238**, **404**, **409** et **410** ont montré une activité inhibitrice de la PNP supérieure à la référence 8 aminoguanosine, les composés **405**, **407**, **408**, ont montré une activité inhibitrice de la PNP inférieure à la référence 8 aminoguanosine.

#### **II TRAVAUX PERSONNELS**

#### 1) Introduction

Suite à ces résultats, nous avons synthétisé d'autres carbazolequinones, structurellement proches des précédentes. Notre travail a consisté à tester l'activité inhibitrice des composés que nous avons synthétisés (cf. partie chimique) sur la PNP de la souche RH de *T. gondii*. Dans un premier temps, il nous a fallu isoler la PNP de *T. gondii*, puis procéder au test d'inhibition en utilisant une méthode chromatographique.

#### 2) Matériels et méthodes

La souche RH de *T. gondii* est maintenue en culture avec des cellules myélomonocytiques humaines THP1 comme décrit plus haut. Pour obtenir le matériel enzymatique en quantité suffisante, il a fallu collecter les protozoaires pendant plus d'une année. La PNP est obtenue par différentes étapes qui ont été décrites dans la thèse d'Arnauld Ghérardi <sup>258</sup>. La première étape consiste à séparer les toxoplasmes des cellules THP1. Pour cela, les cultures sont prélevées dans un tube conique et centrifugées à 1000 g min <sup>-1</sup>. Le culot est remis en suspension et mis en flasques de cultures tandis que le surnageant contenant les tachyzoïtes est centrifugé à 2000 g. min<sup>-1</sup>. Après élimination du surnageant, le culot est remis en suspension et filtré sur filtre Millipore de 5 $\mu$ . Après une centrifugation à 2000 g. min<sup>-1</sup>, et élimination du surnageant, le culot est conservé à -80°C.

La deuxième étape est la purification de *T. gondii*. Il s'agit d'abord de précipiter les protéines de membranes, la PNP étant une enzyme du cytoplasme. Les culots sont décongelés, réunis, mis en suspension dans un tampon phosphate 0,05M en présence de saccharose et d'inhibiteurs de protéases (Sigma), centrifugés à 18000g à 4°C pendant une demi-heure. Le surnageant est récupéré, le culot est remis en suspension dans le tampon phosphate, centrifugé 1 heure à 4°C. Les surnageants sont réunis. Ils sont précipités dans du sulfate d'ammonium 4M, dialysés une nuit à 4°C dans du tampon phosphate. Après centrifugation à 20000 g pendant 1h à 4°C, le surnageant est déposé sur une colonne de DEAE Sephacel, puis sur une colonne d'hydroxyapatite. La mesure de l'absorbance à 280 nm permet de détecter les fractions actives. Une aliquote est gardée à chaque étape.

Une électrophorèse en minigel en SDS page est ensuite réalisée, la révélation est faite par coloration argentique. Enfin le dosage des protéines est effectué par méthode spectrophotométrique. La gamme étalon est réalisée avec des concentrations croissantes

<sup>&</sup>lt;sup>258</sup> Arnauld Ghérardi, Th D, Lyon1, 2001-208.

d'albumine bovine (Merck) de 0,2 à 1 mg/ml. La mesure de l'absorbance est faite à 595 et à 450 nm. Le réactif est le bleu brillant de Coumassie (Roti ® nanoquant de Roth), qui se lie proportionnellement aux protéines passant ainsi du stade cationique (absorption à 470 nm) au stade anionique (absorption à 595 nm) d'après Bradford <sup>259</sup>. Le ratio de la mesure de l'absorbance à 590 et à 450 nm en fonction de la concentration, permet d'établir la droite étalon. L'échantillon, dilué au 20<sup>ème</sup>, au 10<sup>ème</sup> et <sup>1</sup>/<sub>4</sub> est ensuite confronté à cette droite étalon permettant de déterminer la concentration en protéine de cet échantillon après purification.

L'activité enzymatique est déterminée par HPLC. La phase mobile est constituée de phosphate d'ammonium NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 25mM et de méthanol, la proportion est de 95/5. La PNP contenue dans l'échantillon est incubée en présence d'inosine et de phosphate inorganique. Le détecteur mesure l'absorbance à 254 nm, l'inosine et l'hypoxanthine absorbent à cette longueur d'onde. L'hypoxanthine est formée à partir d'inosine. Les produits synthétisés sont testés comme inhibiteurs potentiels de la PNP. Les produits à tester sont préparés en solution dans le DMSO à 8µM. Ils sont incubés en présence d'inosine 8µM, de tampon phosphate 0,05M et de PNP. Le pourcentage de l'inhibition de la PNP est défini par le ratio de l'activité en présence des produits synthétisés et sans ces produits. Chaque produit à tester est chromatographié à 254 nm, afin de vérifier qu'il n'absorbe pas à cette longueur d'onde. Les incubations durent 30 min à 37 °C dans un bain thermostaté. Les contrôles sont incubés de la façon suivante : 4 µl d'inosine, 4µl de DMSO, 20µl d'eau et 4 µl de tampon phosphate. Chaque produit à tester est chromatographié de la façon suivante : 4µl de produit à tester solubilisé dans le DMSO, 4µl d'inosine, 4µl de tampon phosphate et 20 µl de PNP. Les produits à tester sont faiblement solubles en milieu aqueux, la concentration choisie correspondant à la concentration maximale pour avoir une solubilité totale, soit une concentration de 0,5µM au final (8 µM dans DMSO, dilué au 16 ème soit 1/ 6,25 de DMSO). La molécule de référence choisie est la 8 aminoguanosine, chaque expérience est réalisée en triplicats.

#### 3) Résultats

Les tests préalables ont été réalisés sur un échantillon contenant la PNP après la réunion des surnageants et avant la précipitation dans le sulfate d'ammonium. Cet échantillon avait une activité de type PNP, en présence d'inosine et de phosphate inorganique, l'hypoxanthine était formée. Cet échantillon contenait 80  $\mu$ g/ml de protéine. En effet, la purification de la PNP est extrêmement délicate, avec comme principal risque la perte d'activité au cours des différentes étapes de la purification. Une aliquote à chaque étape étant conservée, l'activité est mesurée pour chaque aliquote. Il est possible d'avoir une activité enzymatique dans l'échantillon de départ, et

<sup>&</sup>lt;sup>259</sup> Bradford anal Biochem, **1976**, <u>72</u>, 248-254

de ne plus en avoir après le passage sur colonne. Or pour avoir une activité enzymatique détectable en HPLC, il faut collecter les protozoaires sur plusieurs mois. Donc les tests préalables sont effectués, sur un échantillon contenant encore de nombreuses protéines, afin d'éliminer les produits sans activité, et de ne tester sur l'enzyme purifiée que des produits ayant une activité inhibitrice.



Figure 22 Droite d'étalonnage de la gamme Roti Nanoquant (Biorad).

#### Tableau 10

Ratio DO 590 / DO	Concentration (µg/	Dilution préalable de	Concentration réelle
450	ml)	l'échantillon	de l'échantillon (µg/
			ml)
0,795	3,932	1/20	78,64
1,066	7,800	1/10	78,00
2	21,143	1/4	84,57

Nous avons testés 14 produits (composés **81**, **82**, **83**, **87**, **94**, **95**, **250**, **251**, **252**, **253**, **257**, **258**, **259**, **260**), ainsi que la 8 aminoguanosine, comme référence. Les tests ont été répétés trois fois. Aucun produit testé n'a montré une absorbance à 254 nm, même après une incubation de 30 min à 37°C, aucun produit n'était un substrat de la PNP. Aucun produit n'a montré d'inhibition supérieure à la 8 aminoguanosine. Tous les produits avaient un pourcentage d'inhibition inférieur à 30%. La 8 aminoguanosine avait un pourcentage d'inhibition de 46%.

Compte tenu des résultats des tests préalables ne montrant apparemment aucune activité inhibitrice, aucun test n'a été mené sur la PNP purifiée.

## 4) Conclusion

Aucune des molécules testées n'est inhibitrice de la PNP, aux concentrations utilisées, alors qu'elles ont des propriétés inhibitrices de la croissance de *T. gondii*. Le mécanisme d'action ne passe pas par l'inhibition de cette enzyme, le mécanisme reste non élucidé.

## CONCLUSION GENERALE

L'objectif des travaux présentés dans ce mémoire est la synthèse de carbazolequinones et l'évaluation de leur efficacité sur *T. gondii*. Ce mémoire est consacré dans un premier volet à la synthèse d'*ortho*-carbazolequinones et de *para*-carbazolequinones, et dans un deuxième volet à l'évaluation biologique des composés sur *Toxoplasma gondii*.

Concernant les *ortho*-carbazolequinones, nous avons entrepris de synthétiser différents dérivés en mettant en jeu ces quinones avec des carbodiènes, par une réaction de Diels-Alder. La méthode pour accéder aux carbazoles 1,2 et 3,4 diones est une oxydation du 2 ou 3 hydroxycarbazole par le sel de Frémy. La réaction de Diels-Alder utilisant comme diène l'acétoxybutadiène ou cyclopentadiène nous a permis d'accéder aux benzocarbazole-5,6-diones. Nous avons ainsi synthétisé quatre benzocarbazole-5,6-diones originales.

Concernant les *para*-carbazolequinones, nous avons entrepris la synthèse de dérivés isoxazolocarbazole-4,10-dione et triazolocarbazole-4,10-dione. La méthode pour accéder à ces composés est une cycloaddition 1,3-dipolaire mettant en jeu ces quinones en tant que dipolarophiles et des dipôles comme les oxydes de nitriles et les azotures. Nous nous intéressons en particulier à la régiosélectivité de ces cycloadditions.

La réaction de cycloaddition des azotures avec la carbazolequinone non bromée, conduit au mélange des deux régioisomères dans des proportions différentes.

La 2-bromoquinone nous a permis d'obtenir un des régioisomères d'une manière totalement régiosélective et la 3-bromoquinone nous a permis d'obtenir l'autre régioisomère majoritairement. La sélectivité est gouvernée par la position de l'atome de brome, avec une attaque préférentielle de l'azote N-1 de l'azoture sur le carbone non bromé de la quinone.

Les conditions opératoires que nous avons appliquées dans nos réactions ont été plutôt favorables à la formation des composés triazoloquinones et nous n'avons en aucun cas isolé d'autres structures comme cela était observé dans certains travaux décrits dans la littérature.

Nous avons confirmé les attributions de structure des différents régioisomères par une séquence RMN <sup>1</sup>H NOE pour les isoxazoloquinones et par une étude des corrélations <sup>1</sup>H - <sup>13</sup> C HMBC.

La bromation de la quinone est une méthode originale permettant de réaliser des cycloadditions 1,3-dipolaires régiosélectives. Nous avons ainsi réalisé huit produits originaux.

Concernant l'évaluation biologique des composés synthétisés, leurs structures planes proches des anthracyclines, laissent présager une certaine cytotoxicité. Nous avons donc examiné la cytotoxicité des composés sur les cellules THP1, qui sont des cellules myélomonocytiques humaines. La souche RH de *T. gondii* est maintenue en culture avec des cellules THP1 dans le

milieu RPMI sous 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C. Les composés testés se sont révélés être cytotoxiques sur les cellules THP1 à 5 et 1  $\mu$ M et peu cytotoxique à 0,1  $\mu$ M.

L'inhibition de la croissance des tachyzoïtes a été évaluée à des concentrations peu toxiques pour les cellules THP1, c'est-à-dire à 0,2 et  $0,1 \mu$ M. Les composés se sont révélés actifs sur *T. gondii*, certains ont même une activité similaire à celle des références comme la sulfadiazine et la pyriméthamine. Cependant la toxicité des composés risque d'être un frein à une éventuelle utilisation clinique en parasitologie. Par contre, ces molécules pourraient avoir un potentiel comme anticancéreux, il conviendrait de les tester sur plusieurs lignées cellulaires. L'évaluation *in vivo* n'a pas été menée, car les produits sont trop toxiques.

Plusieurs carbazolequinones synthétisés par notre laboratoire ont été évaluées comme inhibiteurs potentiels de la purine nucléoside phosphorylase (PNP) enzyme clé de la voie de sauvetage des purines, seule voie d'accès pour le parasite aux bases puriques. Ces molécules avaient montré une activité d'inhibition de la PNP, à des concentrations millimolaires. Les carbazolequinones nouvellement synthétisées ont donc été évaluées. Compte tenu de leur faible solubilité en milieu aqueux, les nouvelles carbazolequinones ont été testées à des concentrations micromolaires. Malheureusement, aucun composé n'a été capable d'inhiber l'enzyme.

L'inhibition de la croissance de *T.gondii* par nos composés n'est pas liée à l'inhibition de la PNP.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** 

### **BIBLIOGRAPHIE**

- K. Shin-Ya, M. Tanaka, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto.
   Structure of carquinostatin A, a new neuronal cell protecting substance produced by *Streptomyces exfoliatus Tetrahedron Letters*, **1993**, <u>34</u> (31), 4943 - 4944.
- [2] N. Orihara, K. Furihata, H. Seto.
   Studies on the biosynthesis of terpenoidal compounds produced by actinomycetes 2.
   Biosynthesis of carquinostatin B via the non-mevalonate pathway in *Streptomyces exfoliates*.
   *The Journal of Antibiotics*, **1997**, <u>50</u> (11), 979 981.
- K. Shin-Ya, T. Kunigami, J. S. Kim, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto.
   Carquinostatin B, a new neuronal cell-protecting substance produced by *Streptomyces exfoliatus*.
   *Biosc. Biotech. Biochem.*, 1997, <u>61</u> (10), 1768 1769.
- [4] K. Shin-Ya, S. Shimizu, T. Kunigami, K .Furihata, H. Seto.
   A new neuronal cell protecting substance, lavanduquinocin, produced by *Streptomyces viridochromogenes The Journal of Antibiotics*, 1995, <u>48</u>(7), 574 - 578.
- [5] M. Tanaka, K. Shin-ya, K. Furihata, H. Seto.
   Isolation and structural elucidation of antioxidative substances, carbazoquinocins A to F
   *The Journal of Antibiotics*, 1995, <u>48</u> (4), 326 328.
- [6] H.J. Knölker, W. Frohner.
   Transition metal complexes in organic synthesis. Part 37. Convergent iron-mediated total synthesis of the potent lipid peroxidation inhibitor carbazoquinocin C.
   *Tetrahedron Letters*, 1997, <u>38</u> (9), 1535 1538
- [7] H.J. Knölker, W. Frohner.
   Transition metal complexes in organic synthesis. Part 39. First total synthesis of the potent neuronal cell protecting substance (±)-carquinostatin A via iron- and nickel-mediated coupling reactions.
   Synlett, 1997, 9, 1108 1110
- [8] H.J. Knölker, E. Baum, K.R. Reddy.
   Transition metal complexes in organic synthesis. Part 58. First enantioselective total synthesis of the potent neuronal cell protecting substance carquinostatin A from (R)-propene oxide.
   *Tetrahedron Letters*, 2000, <u>41</u> (8), 1171 1174
- [9] H.J. Knölker, K.R. Reddy.
   Indoloquinones. Part 6. First palladium-mediated oxidative cyclization of arylamino-1,2-benzoquinones to carbazole-3,4-quinones. Application to the total synthesis of carbazoquinocin C and (±)-carquinostatin A.
   Synlett, 1999, <u>5</u>, 596 - 598

- [10] H.J. Knölker, K.R. Reddy, A. Wagner.
   Indoloquinones. Part 5. Palladium-catalyzed total synthesis of the potent lipid peroxidation inhibitor carbazoquinocin C.
   *Tetrahedron Letters*, 1998, <u>39</u> (45), 8267 8270
- [11] H.J. Knölker, W. Frohner, K.R. Reddy.
   Indoloquinones, part 7. Total synthesis of the potent lipid peroxidation inhibitor carbazoquinocin C by an intramolecular palladium-catalyzed oxidative coupling of an anilino-1,4-benzoquinone.
   Synthesis 2002, <u>4</u>, 557 564
- T. Choshi, H. Fujimoto, E. Sugino, S. Hibino.
   Synthesis of new tetracyclic oxazolocarbazoles as functionalized precursors to antioxidative agents, antiostatins and carbazoquinocins.
   *Heterocycles*, 1996, <u>43</u> (9), 1847 1854
- T. Choshi, H. Fujimoto, C. Nagayama, E. Sugino, S. Hibino.
   Total Syntheses of Carazostatin, Hyellazole, and Carbazoquinocins B-F.
   J. Org. Chem., 1997, <u>62</u> (8), 2535 2543
- [14] A. Aygun, U. Pindur.
   A new and effective method to carbazoquinocin C and related carbazole-3,4quinones as biological antioxidants: key reactions of 2-vinylindoles with oxalyl chloride.
   Synlett, 2000, 12, 1757 - 1760
- [15] A. Aygun, U. Pindur.
   Synthesis and biological evaluation of structural variants of carbazoquinocin C.
   *J. Heterocyclic Chem.*, 2003, <u>40</u> (3), 411 417
- M. Rawat, W.D. Wulff.
   Total Synthesis of Carbazoquinocin C: Application of the o-Benzannulation of Fischer Carbene Complexes to Carbazole-3,4-quinone Alkaloids.
   Organic Letters, 2004, 6 (3), 329 332.
- [17] A.M. Echavarren, N. Tamayo, O. De Frutos, A. Garcia. Synthesis of benzo[b]carbazoloquinones by coupling of organostannanes with bromoquinones *Tetrahedron Letters*, 1997, <u>53</u> (49), 16835 - 16846
- K. Kobayashi, T. Taki, M. Kawakita, M. Uchida, O. Morikawa, H. Konishi.
   A simple synthesis of benzocarbazolequinones via o-nitroarylation of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones. *Heterocycles*, 1999, <u>51</u> (2), 349 - 354
- J. Cruces, E. Martinez, M. Treus, L.A. Martinez, J.C. Estevez, R.J. Estevez, L. Castedo.
   From phenylacetylphenylacetic acids to indoles: a simple new divergent synthesis of 6,11-dihydro-5H-benzo[a]carbazole-5,6-diones and 6,11-dihydro-5H-benzo[b]carbazole-6,11-diones.
   *Tetrahedron*, 2002, <u>58</u> (15), 3015 3019

- [20] V. Bernardes Genisson, P. Nebois, M. Domard, H. Fillion. Reactivity of an o-indoloquinone to 1- and 2-azadienes. *Chem. Pharm. Bull*, 2000, <u>48</u> (6), 893 - 894
- P. Cai, J.K. Snyder, J-C. Chen, R. Fine, L. Volicer.
   Preparation, reactivity, and neurotoxicity of tryptamine-4,5-dione *Tetrahedron Letters*, **1990**, <u>31</u> (7), 969 - 972
- M. Somei, Y. Fukui, M. Hasegawa.
   Preparations of tryptamine-4,5-diones, and their diels-alder and nucleophilic addition reactions *Heterocycles*, 1995, <u>41</u> (10), 2157-2160
- [23] S.V. Chernov, E.E. Shults, M.M. Shakirov, Y.V. Gatilov, I.Y. Bagryanskaya, G.A. Tolstikov.
   Synthetic transformations of higher terpenoids: V. 2-methyl-4,5-dioxo-3ethoxycarbonyl-4,5-dihydroindole, A new dienophile. Synthesis of indoloterpenes from levopimaric acid.
   *Russ. J. Org. Chem*, 2000, <u>36</u> (11), 1623 1633
- [24] M. Compain-Batissou, D. Latrèche, J. Gentili, N. Walchshofer, Z. Bouaziz. Synthesis and diels-alder reactivity of *ortho*-carbazolequinones. *Chem. Pharm. Bull.*, 2004, <u>52</u> (9), 1114 - 1116
- [25] D.Albanese, D.Landini, M.Penso, G.Spano, A.Trebicka.
   Chemoselective N-alkylation of 2-hydroxycarbazole as a model fort he synthesis of N-substituted pyrrole derivatives containing acidic functions. *Tetrahedron*, 1995, <u>51</u> (19), 5681 - 5688
- [26] H. Zimmer, D.C. Lankin, S.W. Horgan.
   Oxidations with potassium nitrodisulfonate (Fremy's radical). Teuber reaction. *Chem. Rev.*, **1971**, <u>71</u> (2), 229 - 246
- [27] A. Poumaroux, Z. Bouaziz, M. Domard, H. Fillion.
   Regiospecific hetero Diels-Alder synthesis of pyrido[2,3-b]- and pyrido[3,2-b]carbazole-5,11-diones
   *Heterocycles*, 1997, 45 (3), 585 596
- [28] L. Horner, H. Merz.
   Über die Einwirkung von Olefinen auf Substituierte o-Chinone Justus Liebigs Ann. Chem., 1950, 570 (1), 89-120
- [29] V. Nair, S. Kumar.Diels-alder reactions of o-benzoquinones with acyclic dienes *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1996**, 443 447
- [30] A. M. Echavarren, J. K. Stille. Total synthesis of amphimedine *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, <u>110</u> (12), 4051 - 4053
- [31] D.E. Horning, D.A. Ross, J.M. Muchowski.

Synthesis of phenols from diazonium tetrafluoborates; a useful modification *Can. J. Chem. / Rev. Can. Chim.*, **1973**, <u>51</u> (14), 2347 - 2348

- [32] T. Cohen, A.G. Dietz Jr., J.R. Miser.
   A simple preparation of phenols from diazonium ions via generation and oxidation of aryl radicals by copper salts
   J. Org. Chem., 1977, <u>42</u> (12), 2053 2058
- [33] H.J. Teuber, G. Jellinek.
   Reaktionen mit Nitrosodisulfonat, VII. Mitteil.: Oxydation von primären aromatischen Aminen
   *Chem. Ber.*, 1954, <u>87</u> (12), 1841 1848
- [34] L. Horner, K. Sturm.
   Zur Kenntnis der o-Chinone VII: Chinon-imide als Zwischenprodukte bei der Einwirkung des Fremyschen Salzes auf aromatische Amine.
   *Chem. Ber.*, 1955, <u>88</u> (3), 329 - 338
- [35] H. Furukawa, T.S. Wu, T. Ohta, C.S. Kuoh.
   Chemical constituents of Murraya euchrestifolia Hayata. Structures of novel carbazolequinones and other new carbazole alkaloids.
   *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, <u>33</u> (10), 4132 4138
- [36] T.S. Wu, T. Ohta, H. Furukawa, C.S. Kuoh. Structure of Murrayaquinone-B, a novel carbazole alkaloid from *Murraya* euchrestifolia Hayata *Heterocycles*, **1983**, <u>20</u> (7), 1267 - 1269
- [37] C. Ito, M. Nakagawa, T.S. Wu, H. Furukawa. New carbazole alkaloids from *Murraya euchrestifolia*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, <u>39</u> (10), 2525 - 2528
- [38] H. Furukawa, M. Yogo, C. Ito, T.S. Wu, C.S. Kuoh, New carbazolequinones having dimethylpyran ring system, from *Murraya euchrestifolia*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, <u>33</u> (3), 1320 - 1322
- [39] C. Ito, T.S. Wu, H. Furukawa, New carbazole alkaloids from *Murraya euchrestifolia*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, <u>36</u> (7), 2377 - 2380
- [40] C. Ito, Y. Thoyama, M. Omura, I. Kajiura, H. Furukawa. Alkaloidal constituents of Murraya koenigii. Isolation and structural elucidation of novel binary carbazolequinones and carbazole alkaloids *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, <u>41</u> (12), 2096 - 2100
- [41] C. Saha, B.K. Chowdhury.
   Carbazoloquinones from *Murraya koenigii*.
   *Phytochemistry*, **1998**, <u>48</u> (2), 363 366

- [42] T.S. Wu, S.C. Huang, P.L. Wu, K.H. Lee.
   Structure and synthesis of clausenaquinone-A. A novel carbazolequinone alkaloid and bioactive principle from *Clausena excavata*.
   *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, <u>4</u> (20), 2395 2398
- [43] R.W. Rickards, J.M. Rothschild, A.C. Willis, N.M. de Chazal, J. Kirk, K. Kirk, K.J. Saliba, G.D. Smith.
   Calothrixins A and B, Novel pentacyclic metabolites from *Calothrix* Cyanobacteria with potent activity against Malaria parasites and human cancer cells. *Tetrahedron*, **1999**, <u>55</u> (47), 13513 13520
- [44] K. Takeya, M. Itoigawa, H. Furukawa.
   Triphasic inotropic response of guinea pig papillary muscle to murrayaquinone-A isolated from Rutaceae
   *Eur. J. Pharmacol.*, 1989, <u>169</u> (1), 137 145
- [45] M. Itoigawa, Y. Kashiwada, C. Ito, H. Furukawa, Y. Tachibana, K.F. Bastow, K.-H. Lee.
   Antitumor Agents 203. Carbazole alkaloid murrayaquinone A and related synthetic carbazolequinones as cytotoxic agents.
   J. Nat. Prod., 2000, 63(7), 893 897
- [46] A.C. Abebajo, G. Olayiwola, E. Verspohl, E.O. Iwalewa, N.O.A. Omisore, D. Bergenthal, V. Kumar, S.K. Adesina,
   Evaluation of the ethnomedical claims of *Murraya koenigii Pharmaceutical Biology*, 2004, <u>42</u> (8), 610 - 620
- [47] S. Tasler, G. Bringmann.
   Biarylic biscarbazole alkaloids: occurrence, stereochemistry, synthesis, and bioactivity.
   *The Chemical Record*, 2002, <u>2</u> (2), 114 127
- [48] N.T. Doan, P.R. Stewart, G.D. Smith.
   Inhibition of bacterial RNA polymerase by cyanobacterial metabolites 12-epihapalindone E isonitrile and calothrixin A.
   *FEMS Microbiology Letters*, 2001, <u>196</u> (2), 135 - 139
- [49] X. Chen, G.D. Smith, P. Waring, Human cancer cell (Jurkat) killing by the cyanobacterial metabolite calothrixin A. J. Appl. Phycol., 2003, <u>15</u> (4), 269 - 277
- [50] P.H. Bernardo, C.L.L. Chai, G.A. Heath, P.J. Mahon, G.D. Smith, P. Waring, B.A. Wilkes.
  Synthesis, electrochemistry, and bioactivity of the cyanobacterial Calothrixins and related quinones.
  J. Med. Chem., 2004, <u>47</u> (20), 4958 4963
- [51] G. Bringmann, A. Ledermann, J. Holenz, M.T. Kao, U. Busse, H.G. Wu, G. Francois.
   Antiplasmodial activity of mono- and dimeric carbazoles *Planta Medica*, 1998, <u>64</u> (1), 54-57.

- [52] Dossier du CNHIM 2004, XXV, 4-5, Anticancéreux : utilisation pratique (5<sup>ème</sup> édition)
- [53] C. Asche, W. Frank, A. Albert, U. Kucklaender.
   Synthesis, antitumor activity and structure-activity relationships of 5Hbenzo[b]carbazoles.
   *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, <u>13</u> (3), 819 - 837.
- [54] Y. Tamura, M. Kirihara, M. Sasho, S. Akai, J. Sekihachi, R. Okunaka, Y. Kita. Total synthesis of a D-ring indole analog of daunomycin. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1987**, <u>19</u>, 1474 - 1476.
- [55] A.S. Hammam, M.A. Eldawy.
   Heterocyclic quinones. Part VIII. Synthesis and antibacterial screening of certain new carbazoloquinone derivatives of sulfonamides.
   *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1978, <u>17</u> (2), 145 152.
- [56] A.S. Hammam, H.S. El-Kashef
   Heterocyclic quinones. X. Synthesis and antibacterial screening of new thiazolocarbazoloquinones
   *Fac Revue Roumaine de Chimie*, 1978, <u>23</u> (4), 587 593.
- [57] N.T. Doan, R.W. Rickards, J.M. Rothschild, G.D. Smith.
   Allelopathic actions of the alkaloid 12-epi-hapalindole E isonitrile and calothrixin A from cyanobacteria of the genera *Fischerella* and *Calothrix Journal of Applied Phycology*, 2000, <u>12</u> (3-5), 409 416.
- [58] A.S. Yanni, Z.H. Khalil, A.A. Timmawy
   Synthesis of some new sulfonamide derivatives of 7-chloroquinoline-5,8-dione and pyridocarbazolediones
   *A Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 1991, <u>56</u> (7), 1489 1494
- [59] S. Shiraishi, S. Ikeuchi, M. Seno, T. Asahara.
   The reaction of aromatic nitrile N-Oxides with tetrahalo-*p*-benzoquinones.
   *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1977**, <u>50</u> (4), 910 913
- [60] S. Shiraishi, S. Ikeuchi, M. Seno, T. Asahara. The reaction of 2,4,6-trimethylbenzonitrile N-Oxide with polysubstituted *p*-benzoquinones. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1978**, <u>51</u> (3), 921 - 925
- [61] T. Hayakawa, K. Araki, S. Shiraishi.
   An account of the Site and Regio-selectivity in the reaction of Nitrile oxides with substituted *p*-benzoquinones by Frontier Molecular Theory.
   *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1984**, <u>57</u> (6), 1643 1649
- [62] T. Hayakawa, K. Araki, S. Shiraishi.
   The reaction of nitrile oxides with methoxy *p*-benzoquinones.
   *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1984**, <u>57</u> (8), 2216 2218

- [63] G.A. Conway, L.J. Loeffler, I.H. Hall.
   Synthesis and antitumor evaluation of selected 5,6-disubsituted 1(2)H-indazole-4,7-diones
   *J Med Chem.* 1983, <u>26</u> (6), 876 884
- [64] G. Brahmeshwari, S. Ramadevi, M.S. Rao, T.V. Padmanabha Rao.
   Synthesis and biological activity of fused heterocycles derived from embelin *Indian Journal of Chemistry*, **1991**, <u>30B</u>, 369 - 370
- [65] G. Brahmeshwari, V.R. Rajeswar Rao, T.V. Padmanabha Rao. Synthesis of 3-arylnaphth[2,3-*d*]-isoxazole-4,9-diones from Lawsone *Indian Journal of Chemistry*, **1995**, <u>34B</u>, 139 - 140
- [66] F.Farina, M.V. Marin, M.Munoz, M.C. Paredes, R. Rodriguez.
   1,3-dipolar cycloaddition of nitrile oxides to 1,4-naphtoquinone derivatives. Heterocycles, 1995, <u>40</u> (1), 413 - 424
- [67] B. Venugopalan, S.Suresh Iyer, P.Jayant Karnik, N.J de Souza.
   Cycloaddition reactions of 2,3-diphenylquinoxaline-5,6-dione. Synthesis of novel pyrazolo [3,4-g] quinoxalinequinone, isoxazolo[4,5-g] quinoxalinequinone and pyrrolo(3,4-g] quinoxalinequinone.
   *Heterocycles*, **1987**, <u>26</u> (12), 3173 3180
- [68] J.L. Stevens, T.D. Welton, J.P. Deville, V. Behar.
   Regiocontrolled [3,2] quinine nitrile oxide entry to type II polyketide building blocks
   *Tetrahedron Letters*, 2003, <u>44</u> (49), 8901 8903
- [69] G. Alonso, M. Fuertes, M.T. Garcia-Lopez, F.G. de las Heras, J.M. Infante, M. Stud. Cytostatic quinones. II. Synthesis of N-glycosyl heterocyclic quinones
   *Eur. J. Med. Chem.- Chimica therapeutica*, 1978, <u>13</u> (2), 155 160
- [70] R. Buckle, H. Smith, B.A. Spicer, J.M. Tedder.
   Study on *v*-triazoles. 9. antiallergic 4,9-dihydro-4,9-dioxo-1*H*-naphtho[2,3-*d*]-*v*-triazoles
   *J. Med. Chem.*, **1983**, <u>26</u> (5), 714 719
- [71] J.M. Tedder, D.R. Buckle.
   Study on *v*-triazoles. Part 8. nucleophilic aromatic substitution (SNAr) reactions of nitro-4,9-dihydro-4,9-dioxo-1*H*-naphtho[2,3-*d*]-*v*-triazoles
   *J. Chem. Research (S)*, **1983**, 12 13
- [72] B. Husu, S. Kafka, Z. Kadunc, M. Tisler. Amination of naphthoquinones with azidotrimethylsilane *Monatshefte für Chemie*, **1988**, <u>119</u>, 215 - 222
- [73] L. Benati, P. Carlo Montevecchi, P. Spagnolo.
   Thermal reactivity of tricyclic 4,5-diacyltriazolines resulting from addition of aryl azides to 1,4-naphthoquinone and 2-methyl-1,4-naphthoquinone
   *J.Chem.Soc.Perkin Trans 1*, **1991**, (1) 71 77

- [74] I.T. Barnish, M.S. Gibson.
   The reaction of aryl azides with 1,4-quinones
   *J. Chem. Research (S)*, **1992**, 208, *J. Chem. Resaerch (M)*, **1992**, 1740 1757
- [75] F. Palacios, A.M. Ochoa de Retana, J. Pagalday.,
   1,3 dipolar cycloaddition of azidoalkylphosphoantes and carboxylates to maleimide and naphthoquinone
   Organic preparations and procedures int, 1995, <u>27</u> (6), 625 - 635
- [76] C. Grundmann, J.M. Dean.
   Nitriles oxides . V. stable aromatic nitrile oxides
   J. Org. Chem., 1965, <u>30</u> (8), 2809 2812
- [77] C. Ticozzi, A. Zanarotti, Synthesis of a bifunctional 2,4-dihydroxy five carbon synthon. Enantiomerically pure  $\Delta 2$ -isoxazolines by chromatographic resolution *Tetrahedron Letters*, **1994**, <u>35</u> (40), 7421 - 7424
- [78] A. Poumaroux, Z. Bouaziz, H. Fillion, M. Domard, J. Giraud, A. F. Pétavy. Regiospecific synthesis of pyrido[3,4-b]- and pyrido[4,3-b]carbazole-5,11-dione derivatives. Evaluation of their in vitro antifungal or antiprotozoological activities *Chem. Pharm. Bull.*, **1999**, <u>47</u> (5), 643 - 646
- [79] C. Lee, W. Yang, R.G. Pan, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density *Phys. Rev. B.* 1988, <u>37</u> (2), 785 - 789
- [80] A.D. Becke,Density-functional thermochemistry . III. The role of exact exchange *J. Chem. Phys.*, **1993**, <u>98</u> (7), 5648 5652
- [81] M.J. Frisch, M.G.W. Trucks, G.H.B. Schlegel, J.A. Pople, Gaussian 98 (Revision A.10), Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 2001
- [82] D.R. Buckle, C.J.M. Rockell.
   Studies on v-triazoles. Part 4. the methoxybenzylgroup, a versatile N-protecting group fort he synthesis of N-unsubstituted v-triazoles
   J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1982, 627 630
- [83] D.D. Perrin, W.L.F. Armarego, D.R. Perrin, Purification of Laboratory Chemicals, Pergamon Press Oxford, 2<sup>nd</sup> Ed. **1980**
- [84] J.K. Rodriguez, F. Temprano, C. Esteban-Calderon, M. Martinez-Ripoll. Synthesis of 4-(N,N-dimethylaminoethyl)-1,2,3,4-tetrahydrocarbazole: molecular structure and reactivity of the 1,2-dihydrocarbazol-4(3H)-one and derivatives *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1989**, 2117-2122
- [85] D. Joseph, L. Martarello, G. Kirsch Tetracyclic compounds from tetrahydrocarbazolones. II: synthesis from 1,2,3,9-

tetrahydrocarbazol-4-ones J. Chem. Research (S), **1995**, 448-449 J. Chem. Research (M), **1995**, 2557-2568

- [86] H. Iida, Y. Yuasa, C. Kibayashi.
   Intramolecular cyclization of enaminones involving arylpalladium complexes. Synthesis of Carbazoles
   J. Org. Chem., 1980, 45, 2938-2942
- [87] Z. Bouaziz, A. Ghérardi, F. Régnier, M.E. Sarciron, X. Bertheau, B. Fenet, N. Walchshofer, H. Fillion.
   Synthesis of carbazolequinone derivatives as inhibitors of *Toxoplasma gondii* Purine Nucloside Phosphorylase.
   *Eur. J. Org. Chem.* 2002, <u>11</u>, 1834-1838
- [88] A. Wolf, D. Cowen, B. Paige.
   Human toxoplasmosis : occurrence in infants as en encephalomyelitis. Verification by transmission to animals.
   *Science*, 1939;89, 226-227.
- [89] G. Desmonts, J. Couvreur, F. Alison, J. Baudelot, J. Gerbeaux, M. Lelong.
   Etude épidémiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine.
   *Rev Fr Etudes Clin Biol.*, 1965, <u>10</u>, 952-958.
- [90] W.M. Hutchison.Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, **1965**, <u>206</u>: 961-962.
- [91] J.K. Frenkel, J.P. Dubey, M.L. Miller. *Toxoplasma gondii* : fecal forms separated from eggs of nematodes *Toxocara cati*. *Science*, 1969,164,432-33.
- [92] Site de l'université de Lille : cours de parasitologie sur la toxoplasmaose <u>http://arachosia.univ-lille2.fr/labos/parasito/Internat/courspar/toxopl.html</u> (consulté en **2007**)
- [93] Site de Wikipedia : <u>http://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma\_gondii</u> (consulté en **2007**)
- [94] J.P. Dubey, D.S. Lindsay, C.A. Speer.
   Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.
   *Clin Microbiol Rev.*, 1998, <u>11</u> (2), 267-299.
- [95] Rapport du groupe de travail « *Toxoplasma gondii* » de l'AFSSA déc 2005 : « Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation »
- [96] J.P. Dubey.Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*.*Int J Parasitol.*, **1998**, <u>28</u>, 1019-24.
- [97] D.J.P. Ferguson

Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host *International journal of parasitology*, **2004**, <u>34</u>, 347-360

- [98] J.P. Dubey, N.L. Miller, J.K. Frenkel. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.*, **1970**, <u>132</u>, 636-662
- [99] J.K. Frenkel., J.P. Dubey.Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts.*J.Parasitol.*, **1973**, <u>59</u>, 587-588
- [100] D.S. Lindsay, B.L. Blagburn, J.P. Dubey. Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. *Vet. Parasitol.*, 2002, <u>103</u>, 309-313.
- [101] J.P. Dubey, N.L. Miller, J.K. Frenkel.Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*.*J. Parasitol.*, **1970**, <u>56</u>, 447-456
- [102] R. Evans.
   Life cycle and animal infection. in human toxoplasmosis.
   Ho-Yen DO, Joss AWL, eds. Oxford. Oxford University. 1992: 26-55.
- [103] T. Ancelle, V. Goulet, V. Tirard-Fleury, L. Baril, C. Du Mazaubrun, P. Thulliez, M. Wcislo, B. Carme.
  La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. Résultats d'une Enquête Nationale Périnatale.
  BEH. 1996, <u>51</u>, 227-229.
- [104] T. Ancelle, V. Goulet, V. Tirard-Fleury, L. Baril, C. Du Mazaubrun, P. Thulliez, M. Wcislo, B. Carme.
  La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. Résultats d'une Enquête Nationale Périnatale.
  France, Saint-Maurice. Oct. 1996 : p27 Rapport du Réseau National de Santé Publique.
- [105] F. Berger.
   La toxoplasmose en France chez la femme enceinte: séroprévalence et estimation de l'incidence à partir d'enquêtes nationales.
   Mémoire de Master M2 "Epidémiologie et recherche clinique". Université Paris XI.
   2005.
- [106] F. Derouin, P. Thulliez, Y.J. Garin.
   Interêt et limites de la sérologie de toxoplasmose chez les sujets VIH+.
   *Pathol Biol.* 1991, <u>39</u>, 255-259.
- [107] E. Candolfi, M.L. Partisani, E. De Mautort, S. Bethencourt, M. Frantz, T. Kien, J.M. Lang.
   Séroprévalence de la toxoplasmose chez 346 sujets infectés par le VIH dans l'est de la France. Suivi sérologique des sujets non contaminés par *Toxoplasma gondii*. *Presse Med.*, **1992**, <u>21</u>, 394-395.

- [108] F. Bourdillon, F. Raffi, C. Pradier.
   Les principales circonstances de survenue de la toxoplasmose cérébrale chez les patients atteints par le V.I.H. en France. Situation de Corynebacterium diphteriae en France (1987-1995).
   BEH. 1996, 17:96.
- [109] R.E. Mc Cabe, R.G. Brooks, R.J.S. Dorfman.
   Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev Infect Dis.* 1987, <u>9</u>, 754-774.
- [110] Moniteur de l'internat 4<sup>ème</sup> tome, collectif, groupe LIAISONS, éd 2002.
- [111] J. Diebold, J. Audouin, A. Letourneau, S. Caulet.
   La lymphadénite toxoplasmique. Différents aspects histopathologiques.
   *Revue Française des Laboratoires*. 1988, <u>178</u>, 83-89.
- [112] J. Couvreur, P. Thulliez. Toxoplasmose acquise à localisation oculaire ou neurologique. *Presse Med.*, **1996**, <u>25</u>, 438-42.
- [113] W.R. Bowie, A.S. King, D.H. Werker, J.L. Isaac-Renton, A. Bell, S.B. Eng, S.A. Marion.
   Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC *Toxoplasma* Investigation Team.
   *Lancet.* 1997, <u>350</u>, 173-177.
- [114] A.P. Brézin, E. Delair-Briffod. Toxoplasmose oculaire. Encycl Méd Chir, Ophtalmologie. 2003, 21-230-B-15,14pp.
- [115] S.K. Magid, L.J. Kagen.
   Serologic evidence for acute toxoplasmosis in polymyositis-dermatomyositis.
   Increased frequency of specific anti-*Toxoplasma* IgM antibodies.
   *Am J Med.*, **1983**, <u>75</u>, 313-320.
- [116] S.D. Mawhorter, D. Effron, R. Blinkhorn, P.J. Spagnuolo. Cutaneous manifestations of toxoplasmosis. *Clin Infect Dis.*, **1992**, <u>1</u>, 1084-1088.
- [117] J. Chandenier, G. Jarry, D. Nassif, Y. Douadi, L. Paris, P. Thulliez, E. Bourges-Petit, C. Raccurt.
   Congestive heart failure and myocarditis after seroconversion for toxoplasmosis in two immunocompetent patients.
   *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 2000, <u>19</u>, 375-379.
- B. Carme, F. Bissuel, D. Ajzenberg, R. Bouyne, C. Aznar, M. Demar, S. Bichat, D. Louvel, A.M. Bourbigot, C. Peneau, P. Neron, M.L. Darde.
   Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana.
   J Clin Microbiol., 2002, <u>40</u>, 4037-4044.

- [119] C. Pomeroy, G.A. Filice.Pulmonary toxoplasmosis.*Clin Infect Dis.*, **1992**, <u>14</u>, 863-870.
- F. Raffi, M. Tiab, O. Morin, F. Derouin. Toxoplasmose cérébrale au cours d'une prio-infection toxoplasmique. *Presse Med.*, **1992**, <u>28</u>, 584-585.
- [121] C. Rabaud, T. May, J.C. Lucet, C. Leport, P. Ambroise-Thomas, P. Canton.
   Pulmonary toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus: a French National Survey.
   *Clin Infect Dis.*, **1996**, <u>23</u>, 1249-1254.
- B.J. Luft, Y. Naot, F.G. Araujo, E.B. Stinson, J.S. Remington.
   Primary and reactivated *Toxoplasma* infection in patients with cardiac transplants.
   Clinical spectrum and problems in diagnosis in a defined population.
   *Ann Intern Med.*, **1983**, <u>99</u>, 27-31.
- G. E. Speirs, M. Hakim, R.Y. Calne, T.G. Wreghitt.
   Relative risk of donor-transmitted *Toxoplasma gondii* infection in heart, liver and kidney transplant recipients.
   *Clin Transplantation*, 1988, <u>2</u>, 257-260.
- T.G. Wreghitt, M. Hakim, A.H. Balfour, P.G. Stovin, S. Stewart, J. Scott, T.A.H. English, J. Wallwork.
   Toxoplasmosis in heart and heart and lung transplant recipients. *J Clin Pathol.*, **1989**, <u>42</u>, 194-199.
- [125] D.M. Israelski, J.S. Remington . Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. *Curr Clin Top Infect Dis.*, **1993**, <u>13</u>, 322-356.
- [126] A. Mele, P. J. Paterson, H.G. Prentice, P. Leoni, C.C. Kibbler. Toxoplasmosis in bone marrow transplantation: a report of two cases and systematic review of the literature. *Bone Marrow Transplant.*, 2002, <u>29</u>, 691-698.
- [127] C. Leport, J.S. Remington. Toxoplasmose au cours du SIDA. *Presse Med.*, **1992**, <u>21</u>, 1165-1171.
- B.J. Luft, R. Hafner, A.H. Korzun, C. Leport, D. Antoniskis, E.M. Bosler, D.D. 3rd Bourland, R. Uttamchandani, J. Fuhrer, J. Jacobson, et *al.* Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team. *N Engl J Med.*, **1993**, <u>329</u>, 995-1000.
- [129] F. Raffi, J.P. Aboulker, C. Michelet, V. Reliquet, H. Pelloux, A. Huart, I. Poizot-Martin, P. Morlat, B. Dupas, J.M. Mussini, C. Leport.
  A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. The BIOTOXO Study Group. *AIDS.*, 1997, <u>11</u>, 177-184.

- [130] F. Gray, R. Gherardi, E. Wingate, J. Wingate, G. Fenelon, A. Gaston, A. Sobel, J. Poirier.
   Diffuse "encephalitic" cerebral toxoplasmosis in AIDS. Report of four cases. *J Neurol.*, **1989**, 236, 273-277.
- [131] I. Cochereau-Massin, P. LeHoang, M. Lautier-Frau, E. Zerdoun, L. Zazoun, M. Robinet, P. Marcel, B. Girard, C. Katlama, C. Leport, et *al*. Ocular toxoplasmosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Am J Ophthalmol.*, **1992**, <u>114</u>, 130-135.
- [132] G.N. Holland.
   Ocular toxoplasmosis : A global reassessment. Part I : epidemiology and course of the disease.
   *Am J Ophtholmalogy*, 2003, <u>136</u>, 973-988.
- [133] G.N. Holland.
   Ocular toxoplasmosis : A global reassessment. Part II : Disease manifestations and management.
   *Am J Ophthalmology*, 2004, <u>137</u>, 1-17.
- [134] I. Kuo, N.A. Rao. Ocular disease in AIDS. Springer Sem Immunopathol., 1999, <u>21</u>, 161-177.
- [135] C. Rabaud, T. May, C. Amiel, C. Katlama, C. Leport, P. Ambroise-Thomas, P. Canton.
   Extracerebral toxoplasmosis in patients infected with HIV. A French National Survey.
   *Medicine (Baltimore)*. 1994, <u>73</u>, 306-314.
- [136] J.C. Lucet, M.P. Bailly, J.P. Bedos, M. Wolff, B. Gachot, F. Vachon. Septic shock due to toxoplasmosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Chest.*, **1993**, <u>104</u>, 1054-1058.
- [137] M. Ganji, A. Tan, M.I. Maitar, C.M. Weldon-Linne, E. Weisenberg, D.P. Rhone. Gastric toxoplasmosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. A case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.*, 2003, <u>127</u>, 732-734.
- [138] D. Dunn, M. Wallon., F. Peyron., E. Pertersen., C. Peckham, R. Gilbert. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*, **1999**, 353, 1829-1833.
- [139] G. Desmonts, J. Couvreur. Toxoplasmose congénitale. Etude prospective de l'issue de la grossesse chez 542 femmes atteintes de toxoplasmose acquise en cours de gestation. *Sem Hôp Paris*, **1986**, <u>62</u>, 1418-1422.
- [140] F. Peyron, M. Wallon, C. Bernardoux.Long-term follow-up of patients with congenital ocular toxoplasmosis.

N Engl J Med., 1996, <u>334</u>, 993-994.

- [141] G. Desmonts, J. Couvreur. Toxoplasmosis. *In* Conn RB (éditeur) "Current diagnosis" 7. WB Saunders Company, Philadelphia, 1974, 274-297.
- [142] F. Jacquemard.
   Clinical aspects of infection during pregnancy.
   *In* "Congenital toxoplasmosis" P. Ambroise-Thomas and E. Pedersen Ed.; Springer-Verlag, Paris, 2000.111-120.
- [143] M. Wallon, L. Kodjikian, C. Binquet, J. Garweg, J. Fleury, C. Quantin, F. Peyron. Long-term ocular prognosis in 327 children with congenital toxoplasmosis. *Pediatrics.*, 2004, <u>113</u>, 1567-1572.
- [144] J. Couvreur, C. Leport.
   *Toxoplasma gondii* in : Antimicrobial Therapy and vaccines,
   Yu V.L., Merignac T.C., Barriere S.L.(ed) Williams & Wilkins. 1998;600-612.
- [145] F. Derouin.
   Anti-toxoplasmosis drugs.
   *Curr Opin Investig Drugs.*, 2001,2, 1368-1374.
- [146] L.H. Bosch-Driessen, F.D. Verbraak, M.S. Suttorp-Schulten, R.L. van Ruyven, A.M. Klok, C.B. Hoyng, A. Rothova.
   A prospective, randomized trial of pyrimethamine and azithromycin vs pyrimethamine and sulfadiazine for the treatment of ocular toxoplasmosis.
   *Am J Ophthalmol.*, 2002, <u>134</u>, 34-40.
- [147] F. Daffos, F. Forestier, M. Capella-Pavlovsky, P. Thulliez, C. Aufrant, D. Valenti, W.L. Cox.
   Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N Engl J Med.*, **1988**, <u>318</u>, 271-275.
- [148] P. Hohlfeld, F. Daffos, P. Thulliez, C. Aufrant, J. Couvreur, J. MacAleese, D. Descombey, F. Forestier.
  Fetal toxoplasmosis: outcome of pregnancy and infant follow-up after in utero treatment. *J Pediatr.*, **1989**, <u>5</u>, 765-769.
- [149] I. Villena, D. Aubert, B. Leroux, D. Dupouy, M. Talmud, C. Chemla, T. Trenque, G. Schmit, C. Quereux, M. Guenounou, M. Pluot, A. Bonhomme, J.M. Pinon. Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of congenital toxoplasmosis: follow-up of 78 cases between 1980 and 1997. Reims Toxoplasmosis Group. *Scand J Infect Dis.*, **1998**, <u>30</u>, 295-300.
- [150] W. Foulon, I. Villena, B. Stray-Pedersen, A. Decoster, M. Lappalainen, J.M. Pinon, P.A. Jenum, K. Hedman, A. Naessens.
  Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol.*, **1999**, <u>180</u>, 410-415.

- [151] L. Gras, R.E. Gilbert, A.E. Ades, D. Dunn.
   Effect of prenatal treatment on the risk of intracranial and ocular lesions in children with congenital toxoplasmosis.
   *Int J Epidemiol.*, 2001, <u>30</u>, 1309-1313.
- [152] R.E. Gilbert, L. Gras, M. Wallon, F. Peyron, A.E. Ades, D.T. Dunn. Effect of prenatal treatment on mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*: retrospective cohort study of 554 mother-child pairs in Lyon, France. *Int J Epidemiol.*, 2001, <u>30</u>, 1303-1308.
- [153] R. Gilbert, L. Gras.
   European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis. Effect of timing and type of treatment on the risk of mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*. *BJOG.*, 2003, <u>110</u>, 112-20.
- [154] J. Couvreur, Ph. Thulliez.
   Devenir des toxoplasmoses congénitales.
   *J Pédiatrie et de Puériculture*. ,1989, <u>2</u>, 80-88.

[155] J. McAuley, K.M. Boyer, D. Patel, M. Mets, C. Swisher, N. Roizen, C. Wolters, L. Stein, M. Stein, W. Schey, et al.
Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago Collaborative Treatment Trial. *Clin Infect Dis.*, **1994**, <u>18</u>, 38-72.

- [156] N. Roizen, C.N. Swisher, M.A. Stein, J. Hopkins, K.M. Boyer, E. Holfels, M.B. Mets, L. Stein, D. Patel, P. Meier, et *al*. Neurologic and developmental outcome in treated congenital toxoplasmosis. *Pediatrics.*, 1995, <u>95</u>, 11-20.
- [157] A.P. Brezin, P. Thulliez, J. Couvreur, R. Nobre, R. Mcleod, M.B. Mets.
   Ophthalmic outcomes after prenatal and postnatal treatment of congenital toxoplasmosis.
   *Am J Ophthalmol.*, 2003, <u>135</u>, 779-84.
- [158] G.N. Holland, K.G. Lewis.An update on current practices in the management of ocular toxoplasmosis.*Am J Ophthalmol.*, 2002, 134, 102-114.
- P.A. Pearson, A.R. Piracha, H.A. Sen, G.J. Jaffe.
   Atovaquone for the treatment of *Toxoplasma* retinochoroiditis in immunocompetent patients.
   *Ophthalmology*, 1999, 106, 148-153.
- [160] M.R. Stanford, S.E. See, L.V. Jones, R.E. Gilbert.
   Antibiotics for toxoplasmic retinochoroiditis: an evidence-based systematic review. *Ophthalmology.*, 2003, <u>110</u>, 926-931
- [161] D. Torre, S. Casari, F. Speranza, A. Donisi, G. Gregis, A. Poggio, S. Ranieri, A. Orani, G. Angarano, F. Chiodo, G. Fiori.

Randomized trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus pyrimethaminesulfadiazine for therapy of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Antimicrob Agents Chemother.*, **1998**, <u>42</u>, 1346 - 1349.

- [162] D. Torre, F. Speranza, R. Martegani, C. Zeroli, M. Banfi, M. Airoldi.
   A retrospective study of treatment of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients with trimethoprim-sulphamethoxazole.
   J Infect., 1998, <u>37</u>, 15 18.
- [163] C. Katlama, B. Mouthon, D. Gourdon, D. Lapierre, F. Rousseau.
   Atovaquone as long-term suppressive therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS and multiple drug intolerance. Atovaquone Expanded Access Group.
   *AIDS.*, **1996**, 10, 1107 1112
- [164] R.A. Torres, W. Weinberg, J. Stansell, G. Leoung, J. Kovacs, M. Rogers, J. Scott, and the Atovaquone/Toxoplasmic encephalitis study group. Atovaquone for salvage treatment and suppression of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis.*, **1997**, <u>24</u>, 422 - 429
- [165] J.F. Delfraissy (coordinateur).
   Prise en charge des personnes infectées par le VIH.
   Rapport 2004 Ed. Médecine Flamarion, Paris., 164 pp.
- [166] A.B. Foot, Y.J. Garin, P. Ribaud, A. Devergie, F. Derouin, E. Gluckman.
   Prophylaxis of toxoplasmosis infection with pyrimethamine/sulfadoxine (Fansidar) in bone marrow transplant recipients.
   *Bone Marrow Transplant.*, 1994, <u>14</u>, 241 245.
- [167] L.R. Baden, J.T. Katz, L. Franck, S. Tsang, M. Hall, R.H. Rubin, J. Jarcho.
   Successful toxoplasmosis prophylaxis after orthotopic cardiac transplantation with trimethoprim-sulfamethoxazole.
   *Transplantation.*, 2003, <u>75</u>, 339 343.
- [168] C. Mussini, P. Pezzotti, A. Govoni, V. Borghi, A. Antinori, A. d'Arminio Monforte, A. De Luca, N. Mongiardo, M.C. Cerri, F. Chiodo, E. Concia, L. Bonazzi, M. Moroni, L. Ortona, R. Esposito, A. Cossarizza, B. De Rienzo. Discontinuation of primary prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia and toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus type I-infected patients: the changes in opportunistic prophylaxis study. *J Infect Dis.*, 2000, <u>181</u>, 1635 1642.
- [169] H. Furrer, M. Opravil, E. Bernasconi, A. Telenti, M. Egger Stopping primary prophylaxis in HIV-1-infected patients at high risk of *Toxoplasma* encephalitis. Swiss HIV Cohort Study. *Lancet.*, 2000, <u>355</u>, 2217 - 2218.
- [170] V. Soriano, C. Dona, R. Rodriguez-Rosado, P. Barreiro, J. Gonzalez-Lahoz. Discontinuation of secondary prophylaxis for opportunistic infections in HIVinfected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS.*, 2000, <u>14</u>, 383 - 386

- [171] VIDAL 2007
- [172] H.R. Chang, J.C.F. Pechere
   In vitro effects of four macrolides (roxithromycin, spiramycin, azithromycin [cp-62,993], and (a-56268) on *Toxoplasma gondii* Antimicrob Agents Chemother., 1988, <u>32</u>, 524 529
- [173] J. Blais, V. Garneau, S. Chamberland.
   Inhibition of *Toxoplasma gondii* protein synthesis by azithromycin *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, <u>37</u>, 1701 - 1703
- [174] B. Luft.
   In vivo and in vitro activity of roxithromycin against *Toxoplasma gondii* in mice.
   *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **1987**, <u>6</u>, 479 481.
- [175] F.G. Araujo, A.A. Khan, T.L. Slifer, A. Bryskier, J.S. Remington The ketolide antibiotics HMR 3647 and HMR 3004 are active against *Toxoplasma gondiii* in vitro and in murine models of infection *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, <u>41</u>, 2137 - 2140
- [176] J. Blais, C. Tardif, S. Chamberland
   Effect of Clindamycin on Intracellular Replication, Protein Synthesis, and Infectivity of *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993, <u>37</u>, 2571 2577
- [177] B.R. Dannemann, D.M. Israelski, J.S. Remington..
   Treatment of toxoplasmic encephalitis with intravenous clindamycin. *Arch. Intern. Med.*, **1988**, <u>148</u>, 2477 - 2482.
- [178] J.M. Hofflin, J. S. Remington.
   Clindamycin in a murine model of toxoplasmic encephalitis.
   Antimicrob. Agents Chemother., 1987, <u>31</u>, 492 496
- [179] F. Derouin, C. Chastang
   In vitro effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, **1989**, <u>33</u>, 1753 1759
- [180] F.G. Araujo, J. Huskinson, J.S. Remington.
   Remarkable in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against tachyzoites and tissue cysts of *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, **1991**, <u>35</u>, 293–299
- [181] F.G. Araujo, J. Huskinson-Mark, W.E. Gutteridge, J.S. Remington In vitro and in vivo Activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against the cyst form of *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, <u>36</u>, 326–330
- S. Romand, M. Pudney, F. Derouin.
   In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone atovaquone alone or combined with pyrimethamine, sulfadiazine, clarithromycin, or minocycline against *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, <u>37</u>, 2371–2378

- [183] A.L. Baggish, D.R. Hill
   Antiparasitic Agent Atovaquone
   Antimicrob. Agents Chemother., 2002, <u>46</u>, 1163–1673, Minireview
- [184] N. Scholer, K. Krause, O. Kayser, R.H. Muller, K. Borner, H. Hahn, O. Liesenfeld Atovaquone nanosuspensions show excellent therapeutic effect in a new murine model of reactivated toxoplasmosis *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, <u>45</u>, 1771–1779
- [185] J.A. Kovacs, C.J. Allegra, J.C. Swan, J.C. Drake, J.E. Parrillo, B.A. Chabner, H. Masur
   Potent antipneumocystis and antitoxoplasma activities of Piritrexim, a lipid-soluble antifolate
   Antimicrob. Agents Chemother., 1988, <u>32</u>, 430–433
- [186] F.G. Araujo, D.R. Guptill, J.S. Remington.
   In vivo activity of piritrexim against *Toxoplasma gondii* J. Infect. Dis., 1987, <u>156</u>, 828-830.
- [187] C.J. Allegra, J.A. Kovacs, J.C. Drake, J.C. Swan, B.A. Chabner, H. Masur. Potent in vitro and in vivo antitoxoplasma activity of the lipid-soluble antifolate trimetrexate. *J. Clin. Invest.*, **1987**, <u>79</u>, 478-482.
- [188] H.R. Chang, D. Arsenijevic, R. Comte, A.M. Polak, R.L. Then, J.C. Pechere Activity of Epiroprim (Ro 11-8958), a Dihydrofolate Reductase Inhibitor, alone and in combination with Dapsone against *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, <u>38</u>, 1803–1807
- [189] M. Brun-Pascaud, F. Oise Chau, L. Garry, D. Jacobus, F. Derouin, P.M. Girard Combination of PS-15, Epiroprim, or Pyrimethamine with Dapsone in Prophylaxis of *Toxoplasma gondii* and *Pneumocystis carinii* Dual Infection in a Rat Model *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, <u>40</u>, 2067–2070
- [190] H.H. Locher, H. Schlunegger, P.G. Hartman, P. Angehrn, R.L. Then Antibacterial activities of Epiroprim, a new Dihydrofolate Reductase Inhibitor, alone and in combination with Dapsone *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, 40, 1376–1381
- [191] A. Rosowsky, J.B. Hynes, S.F. Queener Structure-activity and structure-selectivity studies on Diaminoquinazolines and other inhibitors of *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* Dihydrofolate Reductase *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1995**, <u>39</u>, 79–86
- [192] H.C. Jackson, K. Biggadike, E. Mckilligin, O.S. Kinsman, S.F. Queener, A. Lane, J.E. Smith
   6,7-disubstituted 2,4-diaminopteridines: novel inhibitors of *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* Dihydrofolate Reductase
   Antimicrob. Agents Chemother., **1996**, <u>40</u>, 1371–1375
- [193] H. Lau, J.T. Ferlan, V. Hertle Brophy, A. Rosowsky, C. Hopkins Sibley Efficacies of lipophilic inhibitors of Dihydrofolate Reductase against parasitic

protozoa Antimicrob. Agents Chemother., 2001, 45, 187–195

- [194] L.C. Chio, L.A. Bolyard, M. Nasr, S.F. Queener Identification of a class of sulfonamides highly active against Dihydropteroate Synthase from *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, and *Mycobacterium avium Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, <u>40</u>, 727–733
- [195] A.A. Khan, M. Nasr, F.G. Araujo Two 2-Hydroxy-3-Alkyl-1,4-Naphthoquinones with in vitro and in vivo activities against *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, <u>42</u>, 2284–2289
- [196] R.A. Ferreira, A.B Oliveira, S.A. Gualberto, R.W. Vitor Activity of natural and synthetic naphthoquinones against *Toxoplasma gondii*, in vitro and in murine models of infection *Parasite*, 2002, <u>9</u> (3), 261-269
- [197] R.A. Ferreira, A.B Oliveira, M.F. Ribeiro, W.L. Tafuri, R.W. Vitor *Toxoplasma gondii*: in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. *Exp Parasitol.*, 2006, <u>113</u> (2), 125-129
- [198] H.R. Chang, R. Comte, J.C. Pechere
   In vitro and in vivo effects of doxycycline on *Toxoplasma gondii* Antimicrob. Agents Chemother., **1990**, <u>34</u>, 775–780
- [199] A.A. Khan, T. Slifer, F.G. Araujo, J.S. Remington Trovafloxacin Is Active against *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, <u>40</u>, 1855–1859
- [200] A.A. Khan, T. Slifer, F.G. Araujo, R.J. Polzer, J.S. Remington Activity of Trovafloxacin in combination with other drugs for treatment of acute murine toxoplasmosis *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, <u>41</u>, 893–897
- [201] A.A. Khan, F.G. Araujo, K.E. Brighty, T.D. Gootz, J.S. Remington Anti-*Toxoplasma gondii* activities and Structure-Activity Relationships of novel fluoroquinolones related to Trovafloxacin *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, <u>43</u>, 1783–1787
- [202] A.A. Khan, T.R. Slifer, F.G. Araujo, J.S. Remington Activity of Gatifloxacin alone or in combination with Pyrimethamine or Gamma Interferon against *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, <u>45</u>, 48–51
- [203] R. Gozalbes, M. Brun-Pascaud, R. Garcia-Domenech, J. Galvez, P.M. Girard, J.P. Doucet, F. Derouin Anti-*Toxoplasma* activities of 24 Quinolones and Fluoroquinolones in vitro: Prediction of activity by molecular topology and virtual computational techniques *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, <u>44</u>, 2771–2776

- [204] G. Anquetin, M. Rouquayrol, N. Mahmoudi, M. Santillana-Hayat, R. Gozalbes, J. Greiner, K. Farhati, F. Derouin, R. Guedj, P. Vierling Synthesis of new fluoroquinolones and evaluation of their in vitro activity on *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. *Bioorg Med Chem Lett.*, 2004, <u>14</u> (11), 2773-2776.
- [205] G. Anquetin, J. Greiner, P. Vierling Quinolone-based drugs against *Toxoplasma gondii* and Plasmodium spp. *Curr Drug Targets Infect Disord.*, 2005, <u>5</u> (3):227-245
- [206] G. Anquetin, J. Greiner, N. Mahmoudi, M. Santillana-Hayat, R. Gozalbes, K. Farhati, F. Derouin, A. Aubry, E. Cambau, P. Vierling. Design, synthesis and activity against *Toxoplasma gondii*, Plasmodium spp., and Mycobacterium tuberculosis of new 6-fluoroquinolones. *Eur. J. Med. Chem.*, 2006, 41 (12), 1478-1493
- [207] S. Romand, C. Della Bruna, R. Farinotti, F. Derouin In vitro and in vivo effects of Rifabutin alone or combined with Atovaquone against *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, <u>40</u>, 2015–2020
- [208] F.G. Araujo, T. Slifer, J. S. Remington Rifabutin is active in murine models of toxoplasmosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, <u>38</u>, 570–575
- [209] F.G. Araujo, A.A. Khan, J.S. Remington Rifapentine is active in vitro and in vivo against *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, <u>40</u>, 1335–1337
- [210] A.A. Khan, T.R. Slifer, F.G. Araujo, J.S. Remington Quinupristin-Dalfopristin Is Active against *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, <u>43</u>, 2043–2045
- [211] P.D. Walzer, A. Ashbaugh, M. Collins, M.T. Cushion In vitro and in vivo effects of Quinupristin-Dalfopristin against *Pneumocystis carinii Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, <u>45</u>, 3234–3237
- [212] H.R. Chang, W. Jefford, J. Pechere.
   In vitro effects of three new 1,2,4-trioxanes (pentatroxane, thiahexatroxane, and hexatroxanone) on *Toxoplasma gondii*.
   *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1989**, <u>33</u>, 1748–1752
- [213] K. Ou-Yang, E. C. Krug, J. J. Marr, R. L. Berens.
   Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* by qinghaosu and derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1990**, <u>34</u>, 1961–1965
- [214] E. Holfels, J. McAuley, D. Mack, W. K. Milhous, R. McLeod. In vitro effects of artemisinin ether, cycloguanil hydrochloride (alone and in combination with sulfadiazine), quinine sulfate, mefloquine, primaquine phosphate, trifluoperazine hydrochloride, and verapamil on *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, <u>38</u>, 1392–1396.

- [215] M.E. Sarciron, C. Saccharin, A.F. Petavy, F. Peyron Effects of artesunate, dihydroartemisinin, and an artesunate-dihydroartemisinin combination against *Toxoplasma gondii*. *Am J Trop Med Hyg.* 2000, <u>62</u> (1), 73-76
- [216] L. Jones-Brando, J. D'Angelo, G.H. Posner, R. Yolken In Vitro Inhibition of *Toxoplasma gondii* by Four New Derivatives of Artemisinin *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, <u>50</u>, 4206–4208
- [217] D.S. Lindsay, B.L. Blagburn, J.E. Hall, R.R. Tidwell Activity of pentamidine and pentamidine analogs against *Toxoplasma gondii* in cell cultures *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1991**, 35, 1914–1916
- [218] R. Estes, N. Vogel, D. Mack, R. Mcleod Paclitaxel arrests growth of intracellular *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, <u>42</u>, 2036–2040
- [219] D.G. Mack, R. Mcleod

New micromethod to study the effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii*: comparison of Sulfadoxine and Sulfadiazine individually and in combination with Pyrimethamine and study of Clindamycin, Metronidazole, and Cyclosporin A *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1984**, <u>28</u>, 26–30

- [220] K. Thommen-Skott Antimalarial activity of cyclosporin Agents Action, **1981**, <u>11</u>, 770-773
- [221] J.A. Silverman, M.L. Hayes, B.J. Luft, K.A. Joiner Characterization of anti-*Toxoplasma* Activity of SDZ 215-918, a Cyclosporin derivative lacking immunosuppressive and peptidyl-prolyl-isomerase-inhibiting activity: possible role of a P Glycoprotein in *Toxoplasma* physiology *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, <u>41</u>, 1859–1866
- [222] F.G. Araujo, T. Slifer
   Nonionic block copolymers potentiate activities of drugs for treatment of infections with *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, <u>39</u>, 2696–2701
- [223] V. Conseil, M. Soete, J.F. Dubremetz
   Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii* Antimicrob. Agents Chemother., 1999, 43, 1358–1361
- [224] M.E. Sarciron, P. Lawton, C. Saccharin, A.F. Petavy, F. Peyron Effects of 2,'3'-Dideoxyinosine on *Toxoplasma gondii* cysts in mice *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, <u>41</u>, 1531–1536
- [225] F. Derouin, M. Santillana-Hayat Anti-*Toxoplasma* activities of antiretroviral drugs and interactions with Pyrimethamine and Sulfadiazine in vitro *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, <u>44</u>, 2575–2577
[226] M.B. Martin, et *al*.

Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. *J. Med.Chem.*, **2001**, <u>44</u>, 909–916

- [227] V. Yardley, A.A. Khan, M.B. Martin, T.R. Slifer, F.G. Araujo, S.N.J. Moreno, R. Docampo, S.L. Croft, E. Oldfield
   In vivo activities of Farnesyl Pyrophosphate Synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii* Antimicrob. Agents Chemother., 2002, <u>46</u>, 929–931
- [228] Y. Ling, G. Sahota, S. Odeh, J.M. Chan, F.G. Araujo, S.N. Moreno, E. Oldfield Bisphosphonate inhibitors of Toxoplasma gondi growth: in vitro, QSAR, and in vivo investigations. *J Med Chem.*, 2005, 48 (9):3130-3140
- [229] B. Nare, J.J. Allocco, P.A. Liberator, R.G.K. Donald Evaluation of a cyclic GMP-Dependent Protein Kinase Inhibitor in treatment of murine Toxoplasmosis: Gamma Interferon is required for efficacy *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, <u>46</u>, 300–307
- [230] F. Dzierszinski, A. Coppin, M. Mortuaire, E. Dewailly, C. Slomianny, J.C. Ameisen, F. DeBels, S. Tomavo Ligands of the peripheral benzodiazepine receptor are potent inhibitors of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* in vitro *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, <u>46</u>, 3197–3207
- [231] T. Asai, T. Takeuchi, J. Diffenderfer, L.D. Sibley Identification of small-molecule inhibitors of Nucleoside Triphosphate Hydrolase in *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, <u>46</u>, 2393–2399
- [232] C.E Atreya, E.F. Johnson, J.J. Irwin, A. Dow, K.M. Massimine, I. Coppens, V. Stempliuk, S. Beverley, K.A. Joiner, B.K. Shoichet, K. S.Anderson.
   A molecular docking strategy identifies Eosin B as a nonactive site inhibitor of protozoal bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase.
   J. Biol. Chem., 2003, 278, 14092–14100.
- [233] K.M. Massimine, M.T. McIntosh, L.T. Doan, C.E. Atreya, S. Gromer, W. Sirawaraporn, D.A. Elliott, K.A. Joiner, R.H. Schirmer, K.S. Anderson. Eosin B as a novel antimalarial agent for drug-resistant *Plasmodium falciparum Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, <u>50</u>, 3132–3141
- [234] M.H. Iltzsch, S.S. Uber, K.O. Tankersly, M.H. el Kouni. Structure-activity relationship of the binding of nucleoside ligands to adenosine kinase from *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Pharmacol.*, 1995, <u>49</u>, 1501–1512.
- [235] M.H. El Kouni, V. Guarcello, O.N. Al Safarjalani, F.N.M. Naguib Metabolism and selective toxicity of 6-Nitrobenzylthioinosine in *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, <u>43</u>, 2437–2443

- [236] O.N. Al Safarjalani, F.N.M. Naguib, M.H. el Kouni
   Uptake of nitrobenzylthioinosine and purine β-L-Nucleosides by intracellular *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, <u>47</u>, 3247–3251
- [237] R.H. Rais, O.N. Al Safarjalani, V. Yadav, V. Guarcello, M. Kirk, C.K. Chu, F.N.M. Naguib, M.H. el Kouni
   6-Benzylthioinosine analogues as subversive substrate of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase: Activities and selective toxicities
   *Biochemical Pharmacology*, 2005, <u>69</u> (10), 1409-1419
- [238] V. Yadav, C.K. Chu, R.H. Rais, O.N. Al Safarjalani, V. Guarcello, F.N. Naguib, M.H. el Kouni Synthesis, biological activity and molecular modeling of 6-benzylthioinosine analogues as subversive substrates of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase. *J Med Chem.*, 2004, <u>47</u> (8), 1987-96.
- [239] A. Gupte, J.K. Buolamwini, V. Yadav, C.K. Chu, F.N. Naguib, M.H. el Kouni
   6-Benzylthioinosine analogues: promising anti-toxoplasmic agents as inhibitors of the mammalian nucleoside transporter ENT1.
   *Biochemical Pharmacology*, 2005, <u>71</u> (1-2), 69-73.
- [240] M.H. el Kouni
   Adenosine metabolism in *Toxoplasma gondii*: potential targets for chemotherapy. *Curr Pharm Des.*, 2007, <u>13</u> (6), 581-597
- [241] Y.A. Kim, A. Sharon, C.K. Chu, R.H. Rais, O.N. Al Safarjalani, F.N. Naguib, M.H. el Kouni Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of N6benzyladenosine analogues as potential anti-toxoplasma agents. *Biochemical Pharmacology*, 2007, <u>73</u> (10), 1558-1572
- [242] W.J. Sullivan Jr, S.E. Dixon, C. Li, B. Striepen, S.F. Queener IMP Dehydrogenase from the protozoan parasite *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, <u>49</u>, 2172–2179
- [243] S. Sonda, G. Sala, R. Ghidoni, A. Hemphill, J. Pieters Inhibitory effect of aureobasidin A on *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, <u>49</u>, 1794–1801
- [244] E.J. Mui, D. Jacobus, W.K. Milhous, G. Schiehser, H. Hsu, C.W. Roberts, M.J. Kirisits, R. McLeod Triazine inhibits *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro and in vivo *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, <u>49</u>, 3463–3467
- [245] A. Saleh, J. Friesen, S. Baumeister, U. Gross, W. Bohne Growth inhibition of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* by nanomolar concentrations of HDQ (1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone): a high affinity inhibitor of alternative (type II) NADH Dehydrogenases *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, <u>51</u>, 1217–1222

- [246] C. Fen Teo, X. Wang Zhou, M. Bogyo, and V.B. Carruthers Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51, 679–688
- [247] A.T. Smith, M.R. Livingston, A. Mai, P. Filetici, S.F. Queener, W.J. Sullivan, Jr. Quinoline derivative MC1626, a putative GCN5 histone acetyltransferase (HAT) inhibitor, exhibits HAT-Independent activity against *Toxoplasma gondii Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, <u>51</u>, 1109–1111
- [248] M.E. Sarciron, P. Nebois, F. Pautet, A.F. Pétavy, H. F., N. Walchshofer Quinonic derivatives active against *Toxoplasma gondii Parasitology Research*, 2002, <u>88</u> (11), 969-971
- [249] R.A. Tapia, Y. Prieto, F. Pautet, N. Walchshofer, H. Fillion, B. Fenet, M.E. Sarciron.
   Synthesis and antiprotozoal evaluation of benzothiazolopyrroloquinoxalinones, analogues of kuanoniamine A.
   *Bioorg Med Chem.*, 2003, <u>11</u> (16), 3407-3412
- [250] R.A. Tapia, L. Alegria, C.D. Pessoa, C. Salas, M.J. Cortes, J.A. Valderrama, M.E. Sarciron, F. Pautet, N. Walchshofer, H. Fillion Synthesis and antiprotozoal activity of naphthofuranquinones and naphthothiophenequinones containing a fused thiazole ring. *Bioorg Med Chem.*, 2003, <u>11</u> (10), 2175-2182
- [251] F. Alvarez, A. Gherardi, P. Nebois, M.E. Sarciron, A.F. Petavy, N. Walchshofer. Benzimidazole-4,7-diones as inhibitors of protozoal (Toxoplasma gondii) purine nucleoside phosphorylase. *Bioorg Med Chem Lett.*, 2002, <u>12</u> (6), 977-979
- [252] R.B. Gilbertsen, J.C. Sircair
   Comprehensive medicinal chemistry, CH 8.3 Enzyme cascades, purine metabolism and immunosuppression.
   C.Hansch et *al*, ed Oxford et New York, Pergamon Press, **1990**, *2*, 443-480
- [253] E.C. Krug, J.J. Marr, R.L. Berens
   Purine metabolism in *Toxoplasma gondii The journal of biological chemistry*, **1989**, <u>264</u> (8), 10601 - 10607
- [254] K. Chaudhary, J.A. Darling, L.M. Fohl, W.J. Sullivan Jr, R.G.K. Donald, E.R. Pfefferkorn, B. Ullman, D.S. Roos
   Purine salvage pathway in the apicomplexa parasite *Toxoplasma gondii*. *The journal of biological chemistry*, **2004**, <u>279</u> (30), 31221 – 31227
- [255] A. Ghérardi, M. E. Sarciron, A.F. Pétavy, F. Peyron Purine pathway enzymes in a cyst forming strain of *Toxoplasma gondii Life sciences*, **1999**, <u>65</u> (17), 1733-1738
- [256] K. Chaudhary, L.M. Ting, K. Kim, D.S. Roos *Toxoplasma gondii* purine nucleoside phosphorylase biochemical characterization, inhibitor profiles, and comparison with the *Plasmodium falciparum* ortholog

*The journal of biological chemistry*, **2006**, <u>281</u> (35), 25652 – 25658

- [257] A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar
   Purine nucleoside phosphorylases : properties, functions and clinical aspects.
   *Pharmacoly & therapeutics*, 2000, <u>88</u>, 349-425
- [258] Arnauld Ghérardi : *Toxoplasma gondii* : étude de la purine nucléoside phosphorylase, Thèse de Doctorat, Lyon1, 2001, numéro 2001-208
- [259] Bradford *anal Biochem*, **1976**, <u>72</u>, 248-254

**PUBLICATIONS** 

# Synthesis and Diels-Alder Reactivity of ortho-Carbazolequinones

Muriel Compain-Batissou, Djamila Latreche, Jacques Gentili, Nadia Walchshofer, and Zouhair Bouaziz\*

Laboratoire de Chimie Organique, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Claude Bernard Lyon1; 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France. Received February 2, 2004; accepted June 9, 2004

Oxidation of 2- and 3-hydroxycarbazoles with Frémy's salt gave the corresponding *ortho*-carbazolequinones. These molecules react as carbodienophiles in Diels–Alder reaction with 1-acetoxy-1,3-butadiene and 1,3-cy-clopentadiene to provide the novel benzocarbazolequinone structures 15, 16, 18 and 19.

Key words ortho-carbazolequinone; Diels-Alder reaction; benzocarbazolequinone

The carbazole-3,4-quinones represent an important family of carbazole alkaloids. Carquinostatins A and B, lavanduquinocin and carbazoquinocins A—F represent the first carbazole alkaloids containing an *ortho*-quinone system<sup>1)</sup> and possess various biologic activities (Chart 1).

The carquinostatins A and B were isolated from *Strepto-myces exfoliatus 2419-SVT2* and were shown to be potent neuronal protecting substances.<sup>2,3)</sup> Lavanduquinocin was isolated from *Streptomyces viridochromogenes 2942-SVS3* and exhibit a strong neuronal cell protecting activity.<sup>4)</sup> The carbazoquinocins A—F were isolated from *Streptomyces violaceus 2448-SVT2* and they showed strong inhibitory activity against lipid peroxydation.<sup>5)</sup>

As part of our continuing search for biologically active compounds with a quinone moiety, we were particularly interested in the synthesis and in the Diels–Alder chemistry of carbazolequinones.<sup>6)</sup> In a previous work we reported the synthesis,<sup>7,8)</sup> the induction of caspase-dependent cell death<sup>9)</sup> and the *Toxoplasma gondii* purine nucleoside phosphorylase inhibitory activity<sup>10)</sup> of some carbazole-1,4-quinones.

The purpose of this work is to obtain carbazole-1,2 and -3,4-dione derivatives and to report their behaviour as dienophiles in [4+2] cycloaddition reactions.

#### **Results and Discussion**

Carbazole-1,2-quinone  $3^{11}$  was obtained by oxidation of the commercially available hydroxycarbazole 1 with Frémy's salt. Treatment of 1 with sodium hydride in the presence of methyl iodide in the solvent system THF–DMF, gave



Chart 1

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: bouaziz@univ-lyon1.fr

chemoselectively the *N*-methylated compound  $2^{(12)}$ . Then, oxidation of 2 with Frémy's salt afforded carbazole-1,2-quinone 4.

On the other hand, carbazole-3,4-quinone 7 was obtained in two steps from the commercially available 3-aminocarbazole 5. The formation of the corresponding diazonium salt at 0 °C followed by heating the latter in highly acidic aqueous solution gave the 3-hydroxycarbazole 6, which was oxidized as above to yield quinone 7 (Chart 2).

Our attempts to obtain 7 through a direct oxidation of 5 with Frémy's salt provided the dimeric carbazole compounds 12 and 13 only. The reaction may proceed first by formation of a mixture of amino phenol 8 and *ortho*-quinone imine 9. Then, a nucleophilic addition of primary amine 5 or 8 to quinone imine 9 led to intermediates 10 and 11 which were subsequently oxidized to the dimeric carbazoles 12 and 13 (Chart 3). Aromatic amines which have a position *para* to the amino group substituted by an alkyl or alkoxy group have been reported to undergo a similar reaction.<sup>13,14</sup>



© 2004 Pharmaceutical Society of Japan





The Diels–Alder reactions of *ortho*-quinones previously reported have been essentially performed with carbodienes. Recently, our group reported the first examples of [4+2] cy-cloaddition of *ortho*-benzofurandione<sup>15)</sup> and *ortho*-indolo-quinone<sup>16)</sup> towards 1-azadienes. Thus the *ortho*-benzofurandione reacts as a carbodienophile and *ortho*-indoloquinone can react either as a carbodienophile or as heterodienophile.

In continuation of this work focused on heterocyclic *ortho*-quinones we planned to investigate the chemical behaviour of *ortho*-carbazolequinones **3** and **7** towards carbodienes and 1-azadienes.

The [4+2] cycloaddition between carbazolequinone 3 or 7 and 1-acetoxy-1,3-butadiene 14 was performed at reflux in dry THF and provided directly the benzocarbazolequinones 15 and 16, respectively. The reaction between 1,3-cyclopentadiene 17 and carbazolequinone 3, carried out in dichloromethane at -10 °C for 5 h then at room temperature for 12 h led to the stable cycloadduct endo 18. In contrast, reaction of 7 with 1,3-cyclopentadiene 17 as above gave an unstable tetrahydro cycloadduct which was converted into the dihydro derivative 19 after its treatment with silicagel at 40 °C (Chart 4).

The stereochemistry endo of **18** was confirmed by <sup>1</sup>H-NMR NOE DIFF experiment (Chart 5). Irradiation at 3.42 ppm (H-4a) gives responses on H-11c at 4.12 ppm and H-12 at 1.71 ppm. Irradiation at 4.12 ppm (H-11c) gives responses on H-4a and H-12. Finally, an irradiation at 1.71 ppm (H-12) gives two responses on H-4a and H-11c.

Attempted cycloadditions of *ortho*-carbazolequinones **3** and **7**, as dienophiles, with different 1-azadienes gave a complex mixture of products and failed to yield the expected pyridocarbazolequinones, probably due to the versatile reactivity profile of *ortho*-quinones in Diels–Alder reactions. Potentially they can react as carbodienes, heterodienes or dienophiles.

#### Experimental

Melting points were taken in a capillary tube using a Büchi 510 apparatus. The IR spectra were obtained on a Perkin–Elmer 1310 spectrophotometer. The NMR spectra were recorded with a Bruker AM 300 spectrometer (<sup>1</sup>H-NMR: 300 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 75 MHz). Chemical shifts are reported in ppm using tetramethylsilane (TMS) as an internal reference. Coupling constant values are given in Hz. Elemental analyses were performed at the Centre de Microanalyse du CNRS at Solaize, France.

**2-Hydroxy-9-methyl-9***H***-carbazole (2)** A solution of 2-hydroxycarbazole **1** (0.457 g, 2.5 mmol) and DMF (0.37 ml, 4.76 mmol) in dry THF (5 ml) was added dropwise to 60% NaH (0.25 g, 6.25 mmol) under a nitrogen atmosphere and stirring at room temperature. After 10 min,  $CH_3I$  (0.17 ml, 2.75 mmol) was added and the stirring was continued for 2 h. The resulting mixture was cooled to 0 °C and quenched with water (2 ml). After removing the solvent under vacuum, the crude product was washed with acidic aqueous solution and purified by column chromatography on silica gel with  $CH_2CI_2/MeOH$  (98 : 2) as the eluent. Compound **2** was obtained as a yellow solid in 80% yield (ref. 12, 89%), mp 162 °C (ref. 12, 166–167 °C). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3360. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.53 (1H, s, OH), 7.96 (1H, d, *J*=7.7 Hz, H-5), 7.89 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-4), 7.48 (1H, d, *J*=8.2, L1.Hz, H-7), 7.13 (1H, td, *J*=7.7, 1.0 Hz, H-6), 6.86 (d, 1H, *J*=2.0 Hz, H-1), 6.68 (1H, dd, *J*=8.3, 2.0 Hz, H-3), 3.76 (3H, s, CH<sub>3</sub>-9).

General Method for the Oxidation of Hydroxycarbazoles with Frémy's Salt An aqueous solution (20 ml) of Frémy's salt (0.37 g, 1.37 mmol) and potassium dihydrogen orthophosphate (0.02 g, 0.15 mmol) was added to a solution of hydroxycarbazole 1, 2 or 6 (0.55 mmol) in acetone (20 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, extracted with  $CH_2Cl_2$ , dried over  $Na_2SO_4$  and concentrated under vacuum.

**1,2-Dihydrocarbazole-1,2(9***H***)-dione (3)** The quinone **3** was obtained from hydroxycarbazole **1**. The crude mixture was purified by column chromatography on silica gel using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95:5) as the eluent. Compound **3** was obtained as a dark green solid in 64% yield (ref. 11, 83%), mp 181 °C (ref. 11, 178 °C). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3260, 1665, 1640. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 12.61 (1H, s, NH), 7.87 (2H, m, H-4, H-5), 7.43—7.18 (3H, m, H-6, H-7, H-8), 5.97 (1H, d, J=9.9 Hz, H-3).

**9-Methyl-1,2-dihydrocarbazole-1,2(9***H***)-dione (4)** The quinone **4** was obtained from hydroxycarbazole **2**. The crude mixture was purified by column chromatography on silica gel using  $CH_2Cl_2$  as the eluent. Compound **4** was obtained as a dark green solid in 42% yield, mp 177 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1670, 1640. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.90 (2H, m, H-4, H-5), 7.59 (1H, d, J=8.7 Hz, H-8), 7.45 (1H, m, H-6 or H-7), 7.26 (1H, m, H-6 or H-7), 6.01 (1H, d, J=9.8 Hz, H-3), 4.01 (3H, s,  $CH_3$ -9). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 182.7, 172.4, 141.2, 138.2, 131.2, 128.6, 123.9, 123.8, 123.3, 121.9, 112.7, 32.6. HR-MS *m/z*: 211.0630 (Calcd for C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>: 211.0633).

3-Hydroxy-9-ethyl-9H-carbazole (6) A solution of 3-amino-9-ethylcarbazole 5 (1 g, 4.76 mmol), ice (3 g) and concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 ml) in water (1.5 ml) was stirred at 0 °C. Then, a cooled solution of NaNO<sub>2</sub> (0.391 g, 5.11 mmol) in water (1 ml) was added dropwise and the stirring was continued for 10 min. The resulting mixture was added to acidic aqueous solution (3 ml of concentrated H2SO4 in 2.5 ml of water) heated at reflux. After 5 min the reaction mixture was poured into ice water (30 ml), extracted with CH2Cl2 and dried with Na2SO4. After removing the solvent under vacuum, the crude product was purified by column chromatography on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> as the eluent. Compound 6 was obtained as a beige solid in 15% yield, mp 106 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3300. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.03 (1H, d, J=7.7, 1.1 Hz, H-5), 7.54 (1H, d, J=2.3 Hz, H-4), 7.47 (1H, td, J=8.3, 1.1 Hz, H-7), 7.38 (1H, d, J=8.3 Hz, H-8), 7.27 (1H, d, J=8.7 Hz, H-1), 7.19 (1H, td, J=7.7, 1.1 Hz, H-6), 7.04 (1H, dd, J=8.7, 2.3 Hz, H-2), 4.85 (1H, s, OH), 4.33 (2H, q, J=7.3 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.42 (3H, t, J=7.3 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Anal. Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NO · 0.4 H<sub>2</sub>O: C, 76.97; H, 6.37; N, 6.41. Found: C, 77.16; H, 6.40; N, 6.23.

**9-Ethyl-3,4-dihydrocarbazole-3,4(9***H***)-dione (7)** The quinone 7 was obtained from hydroxycarbazole **6** by oxidation with Frémy's salt according to the general method described above. The crude mixture was purified by column chromatography on silica gel using  $CH_2Cl_2/MeOH$  (99.5 : 0.5) as the eluent. Compound 7 was obtained as a red solid in 50% yield, mp 195 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1670, 1640. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.09 (1H, m, H-5), 7.31–7.15 (4H, m, H-1, H-6, H-7, H-8), 6.16 (1H, d, J=10.2 Hz, H-2), 4.14 (2H, q, J=7.4 Hz,  $CH_2CH_3$ ), 1.43 (3H, t, J=7.4 Hz,  $CH_2CH_3$ ). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 184.7, 173.2, 143.9, 138.4, 131.9, 129.5, 126.3, 125.6, 125.5, 121.6, 113.5, 113.1, 39.3, 16.7. *Anal.* Calcd for  $C_{14}H_{11}NO_2 \cdot 0.3 H_2O$ : C, 72.90; H, 5.07; N, 6.07. Found: C, 72.81; H, 4.90; N, 6.07.

**Oxidation of 3-Amino-9-ethylcarbazole 5 with Frémy's Salt** An aqueous solution (200 ml) of Frémy's salt (3.2 g, 11.9 mmol) and potassium dihydrogen orthophosphate (0.16 g, 1.19 mmol) was added to a solution of aminocarbazole **5** (1 g, 4.76 mmol) in acetone (200 ml). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h, extracted with  $CH_2Cl_2$ , dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography on silica gel using  $CH_3COOEt/Petroleum$  ether (20:80) as the eluent to give compounds **12** and **13**.

**3-Amino-9-ethyl-1-[(9-ethyl-9***H***-carbazol-3-yl)imino]-1,9-dihydro-4***H***-carbazol-4-one (12) Compound 12 was obtained as a dark red solid in 10% yield, mp 236 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3460, 3360, 1635, 1595. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d\_6) \delta: 8.19 (2H, d, J=7.4 Hz, H), 7.77 (1H, d, J=7.4 Hz), 7.76 (1H, s, H-4'), 7.68 (1H, d, J=8.5 Hz), 7.62 (1H, d, J=8.5 Hz), 7.49—7.33 (3H, m), 7.21—7.13 (2H, m), 6.34 (2H, br s, NH<sub>2</sub>), 5.93 (1H, s, H-2), 4.96 (2H, q, J=7.0 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.48 (2H, q, J=7.0 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.45 (3H, t, J=7.0 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.36 (3H, t, J=7.0 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.36 (3H, t, J=7.0 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). Anal. Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O · 0.4 H<sub>2</sub>O: C, 76.48; H, 5.68; N, 12.74. Found: C, 76.51; H, 5.73; N, 12.59.** 

**3-Amino-9-ethyl-1-[(9-ethyl-4-hydroxy-9***H***-carbazol-3-yl)imino]-1,9dihydro-4***H***-carbazol-4-one (13) Compound 13 was obtained as a dark blue solid in 30% yield, mp 248 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3500, 3380, 1625, 1585, 1550. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d\_6) \delta: 9 (1H, s, OH), 8.26 (1H, d,** *J***=7.4 Hz), 8.19 (1H, d,** *J***=7.4 Hz), 7.75 (1H, d,** *J***=8.1 Hz), 7.57 (1H, d,** *J***=8.1 Hz), 7.44— 7.32 (3H, m), 7.19 (1H, m), 7.14 (1H, d,** *J***=8.5 Hz), 7.01 (1H, d,** *J***=8.5 Hz), 6.32 (2H, br s, NH<sub>2</sub>), 6.04 (1H, s, H-2), 5.03 (2H, q,** *J***=7.0 Hz, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.42</u> (2H, q,** *J***=7.4 Hz, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.41 (3H, t,** *J***=7.4 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, t,** *J***=7.0 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH<sub>3</sub>). FAB-MS** *m/z* **449 (M+H)<sup>+</sup>.** *Anal.* **Calcd for C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 0.4 H<sub>2</sub>O: C, 73.79; H, 5.49; N, 12.29. Found: C, 73.87; H, 5.41; N, 12.36.**</u></u>

**Benzo[c]carbazole-5,6(7***H***)-dione (15) 1-Acetoxy-1,3-butadiene 14 (0.503 g, 4.5 mmol) in dry THF (1 ml) was added dropwise to a solution of carbazoledione 3 (0.3 g, 1.52 mmol) in 14 ml of the same solvent. The reaction mixture was stirred at reflux for 15 h. The solvent was evaporated off to afford a residue which was purified by column chromatography on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95:5) as the eluent to give compound <b>15** as a black solid in 56% yield, mp >300 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3320, 1710, 1680. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) &: 12.4 (1H, s, NH), 8.29 (1H, d, *J*=8.3 Hz), 8.18 (1H, d, *J*=7.6 Hz), 7.89 (1H, dd, *J*=7.5, 1.3 Hz), 7.68 (1H, td, *J*=7.6, 1.3 Hz), 7.44 (2H, m), 7.34 (1H, td, *J*=7.5, 1.0 Hz), 7.25 (1H, td, *J*=6.6, 1.5 Hz). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) &: 181.5, 172.3, 141.0, 136.4, 135.7, 132.9, 130.6, 130.5, 128.5, 127.9, 125.6, 123.9, 123.8, 123.3, 122.2, 114.7. *Anal.* Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>·0.3 H<sub>2</sub>O: C, 76.06; H, 3.83; N, 5.54. Found: C, 76.38; H, 4.05; N, 5.55.

**11-Ethylbenzo[a]carbazole-5,6(11***H***)-dione (16)** Synthesis of compound **16** was performed starting from 7 following the procedure used for **15**. Compound **16** was purified by column chromatography on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2) as the eluent and obtained as an orange solid in 35% yield, mp 255 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1690, 1630. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) & 8.30 (1H, dd, J=6.6, 1.8 Hz), 8.16 (1H, dd, J=7.6, 1.0 Hz), 7.80 (1H, d, J=7.9 Hz), 7.68 (1H, td, J=7.6, 1.3 Hz), 7.46 (1H, t, J=7.4 Hz), 7.40—7.28 (3H, m), 4.59 (2H, q, J=7.3 Hz, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></u>), 1.69 (3H, t, J=7.3 Hz, CH<sub>2</sub><u>CH<sub>3</sub></u>). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) & 182.4, 174.5, 151.3, 143.6, 139.7, 136.3, 132.1, 131.2, 130.8, 129.9, 125.9, 125.82, 125.2, 121.9, 115.1, 112.4, 41.5, 15.6. *Anal.* Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>·0.25 H<sub>2</sub>O: C, 77.26; H, 4.86; N, 5.00. Found: C, 77.31; H, 4.80; N, 4.78.

**1,4,4a,11c-Tetrahydro-1,4-methanobenzo[c]carbazole-5,6(7H)-dione** (18) Freshly distilled cyclopentadiene 17 (1.05 g, 15.9 mmol) was added dropwise to a solution of the carbazoledione 3 (1 g, 5.3 mmol) in  $CH_2Cl_2$ (40 ml) stirred and cooled at -10 °C. The stirring was continued for 5 h at -10 °C then for 12 h at room temperature. The solution was concentrated under vacuum and the resulting residue was chromatographed on silica gel using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (97:3) as the eluent. Compound 18 was obtained as a yellow solid in 49% yield, mp 182 °C. IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3260 1700, 1640. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.9 (1H, s, NH), 7.87 (1H, d, *J*=7.9 Hz, H-11), 7.55—7.20 (3H, m, H-8, H-9, H-10), 6.1 (1H, t, *J*=5.3, 3.0 Hz, H-2 or H-3), 5.58 (1H, t, *J*=5.3, 3.0 Hz, H-2 or H-3), 4.1 (1H, dd, *J*=7.2, 3.8 Hz, H-11c), 3.59 (2H, s, H-1, H-4), 3.42 (1H, dd, *J*=7.2, 3.8 Hz, H-4a), 1.71 (2H, s, H-12). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 199.1, 172.2, 140.8, 136.3, 135.2, 134.9, 129.4, 126.1, 124.6, 123.4, 121.4, 113.9, 51.5, 49.8, 49.1, 48.2, 37.4. *Anal.* Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>·0.7 H<sub>2</sub>O: C, 74.00; H, 5.26; N, 5.07. Found: C, 73.98; H, 4.89; N, 5.23.

11-Ethyl-1,4-dihydro-1,4-methanobenzo[a]carbazole-5,6(11H)-dione (19) Freshly distilled cyclopentadiene 17 (0.4 g, 6.06 mmol) was added dropwise to a solution of the carbazoledione 7 (0.15 g, 0.67 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 ml) stirred and cooled at 0 °C. The stirring was continued for 6 h at 0 °C. Then, 1.5 g of SiO<sub>2</sub> was added and the reaction mixture was stirred for 48 h at 40 °C. The mixture was filtered and SiO<sub>2</sub> washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined filtrates were concentrated under vacuum. Column chromatography of the residue, eluting with a mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2) gave compound 19 as a dark green solid in 26% yield, mp 191 °C (decomp.). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1625. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.15 (1H, m, J=7.9, 1.1 Hz, H-7), 7.34-7.25 (3H, m, H-8, H-9, H-10), 6.96 (1H, dd, J=4.9, 3.2 Hz, H-2 or H-3), 6.82 (1H, dd, J=4.9, 3.2 Hz, H-2 or H-3), 4.45 (2H, q, J=7.4 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.33 (1H, s, H-1 or H-4), 4.16 (1H, s, H-1 or H-4), 2.36 (2H, m,  $\overline{\text{H-12}}$ ), 1.58 (3H, t, J=7.4 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 178.6, 176.4, 160.9, 151.4, 151.2, 144.4, 141.2, 138.8, 126.8, 125.6, 125.3, 121.2, 112.7, 111.3, 71.0, 52.3, 47.8, 17.1. Anal. Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>·0.5 H<sub>2</sub>O: C, 76.49; H, 5.41; N, 4.69. Found: C, 76.56; H, 5.29; N, 4.67.

Acknowledgments We thank Pr. Houda Fillion for her encouragement and for the help she has given us in the preparation of the manuscript.

#### References

- 1) Knölker H.-J., Reddy K. R., Chem. Rev., 102, 4303-4427 (2002).
- Shin-ya K., Tanaka M., Furihata K., Hayakawa Y., Seto H., *Tetrahe*dron Lett., 34, 4943—4944 (1993).
- Shin-ya K., Kunigami T., Kim J.-S., Furihata K., Hayakawa Y., Seto H., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1768–1769 (1997).
- Shin-ya K., Shimizu S., Kunigami T., Furihata K., Seto H., J. Antibiot., 48, 574—578 (1995).
- Tanaka M., Shin-ya K., Furihata K., Seto H., J. Antibiot., 48, 326– 328 (1995).
- Bouaziz Z., Nebois P., Poumaroux A., Fillion H., *Heterocycles*, 52, 977–999 (2000).
- Poumaroux A., Bouaziz Z., Domard M., Fillion H., *Heterocycles*, 45, 585–596 (1997).
- Poumaroux A., Bouaziz Z., Fillion H., Domard M., Giraud J., Pétavy A.-F., Chem. Pharm. Bull., 47, 643–646 (1999).
- Aouacheria A., Néel B., Bouaziz Z., Dominique R., Walchshofer N., Paris J., Fillion H., Gillet G., *Biochem. Pharmacol.*, 64, 1605–1616 (2002).
- Bouaziz Z., Ghérardi A., Régnier F., Sarciron M.-E., Bertheau X., Fenet B., Walchshofer N., Fillion H., *Eur. J. Org. Chem.*, **11**, 1834– 1838 (2002).
- 11) Teuber H.-J., Staiger G., Chem. Ber., 87, 1251-1254 (1954).
- Albanese D., Landini D., Penso M., Spano G., Trebicka A., *Tetrahedron*, **51**, 5681—5688 (1995).
- 13) Teuber H.-J., Jellinek G., Chem. Ber., 87, 1841-1848 (1954).
- 14) Horner L., Sturm K., Chem. Ber., 88, 329–338 (1955).
- Nebois P., Cherkaoui O., Benameur L., Fillion H., Fenet B., *Tetrahe*dron, 50, 8457–8464 (1994).
- 16) Bernardes Genisson V., Nebois P., Domard M., Fillion H., Chem. Pharm. Bull., 48, 893-894 (2000).

HETEROCYCLES, Vol. 71, No. 1, 2007, pp. 27 - 38. © The Japan Institute of Heterocyclic Chemistry Received, 8th September, 2006, Accepted, 17th November, 2006, Published online, 24th November, 2006. COM-06-10882

# REGIOSELECTIVITY IN THE 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION REACTIONS OF NITRILE OXIDES AND ORGANIC AZIDES WITH BROMOCARBAZOLE-1,4-DIONES

Muriel Compain-Batissou,<sup>a</sup> Jacques Gentili,<sup>a</sup> Nadia Walchshofer,<sup>a</sup> Monique Domard,<sup>a</sup> Bernard Fenet,<sup>b</sup> and Zouhair Bouaziz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>University of Claude Bernard Lyon 1, ISPB, EA3741, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France. E-mail: bouaziz@univ-lyon1.fr <sup>b</sup>University of Claude Bernard Lyon 1, Department of NMR, 69622 Villeurbanne cedex, France

**Abstract** – The effect exerted by the presence of a bromine atom in 2 or 3 position of a carbazole-1,4-dione on the regiocontrol of 1,3-dipolar cycloaddition reactions with nitrile oxides and organic azides was investigated. Comparison with the results obtained with 2,3-unsubstituted-carbazole-1,4-dione shows that bromine substituents on *para*-carbazolequinones effectively orient the 1,3-dipolar cycloadditions. The regiochemistry observed may be explained by the orienting effect of the bromine atom independently of the values of the orbital coefficients.

# **INTRODUCTION**

As part of our investigations on the biological properties of aryl- and heteroaryl-condensed carbazolequinones, we have recently reported the synthesis of pyrido- and benzo-derivatives by Diels-Alder reaction of tricyclic carbazolediones with some azadienes<sup>1-3</sup> and carbodienes.<sup>4</sup> We have particularly studied the orienting effect of bromine atom in [4+2] cycloaddition of 2- or 3-bromocarbazole-1,4-dione with an azadiene. This reaction provided regioselectively the isomer in which the nitrogen atom of the azadiene was delivered at the brominated carbon of quinone. In continuation of this work, we planned to synthesize a series of isoxazolo- and triazolocarbazolequinone derivatives by the 1,3-dipolar cycloaddition reaction of carbazole-1,4-diones with nitrile oxides and azides respectively, and to investigate the orienting effect of bromine atom in this reaction. To date, few reports dealing with the 1,3-dipolar cycloaddition of quinones with nitrile oxides<sup>5-12</sup> and organic azides<sup>13-18</sup> have been reported in the literature and only one has described the regiocontrol effect of

bromine substituent on naphthoquinones in the reaction with nitrile oxides.<sup>12</sup> In this case, only the regioisomer in which the oxygen atom of nitrile oxide was linked to the brominated carbon of quinone was obtained.

In this work, we wish to report our results from a related study of the 1,3-dipolar cycloaddition reactions of unbrominated carbazolequinone (1a) and bromocarbazolequinones (1b) and (1c) towards both nitrile oxides (2a) and (2b) and organic azides (5a) and (5b).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Quinone (**1a**) was obtained starting from the commercially available 4-hydroxycarbazole by a chemoselective N-alkylation followed by oxidation with Frémy's salt. Bromoquinones (**1b**) and (**1c**) were prepared from the N-alkylated compound respectively by oxidation/bromination or by bromination/oxidation, according to the procedure which we have reported in a previous paper.<sup>1</sup> Nitrile oxides (**2a**) and (**2b**) were synthesized by dehydrogenation of the corresponding aldoximes with sodium hypochlorite.<sup>19</sup> Organic azides (**5a**) and (**5b**) can be prepared from the corresponding bromide or chloride by reaction with sodium azide in ethanol.<sup>20</sup>

# Cycloaddition of carbazolequinones (1a), (1b) and (1c) with nitrile oxides (2a) and (2b):

The reaction of quinone (1a) (Scheme 1) with nitrile oxide (2a) in THF at room temperature affords a 48% yield of a mixture of the regioisomeric adducts (3a) and (4a) in approximately equal proportions. In this case, the primary cycloadducts are not observed, certainly due to a rapid oxidation with 1a. The reaction with nitrile oxide (2b) requires the presence of basic  $Al_2O_3$  to give a 1:1 mixture of the regioisomeric compounds (3b) and (4b) in 50% overall yield. In absence of basic  $Al_2O_3$ , this reaction leads to a mixture of 3b and 4b plus the corresponding primary cycloadducts.



Scheme 1. Reaction of carbazolequinone (1a) with nitrile oxides (2a) and (2b).

In order to obtain the regioselective formation of the isoxazolocarbazolequinones (**3**) and (**4**), we turn our attention to the use of the 2- and 3- bromocarbazolequinones (**1b**) and (**1c**) in accordance with our study of the orienting effect of bromine in Diels-Alder cycloadditions (Scheme 2).

The reaction of **1b** with nitrile oxides (**2a**) and (**2b**) in THF at room temperature gave selectively **3a** and **3b** in 48 and 57% yields, respectively. In similar conditions, 3-bromocarbazolequinone (**1c**) reacted with **2a** and **2b** to give selectively **4a** and **4b** in 63 and 35% yields, respectively. The orienting effect of bromine atom in these reactions agrees with results reported by Behar and co-workers.<sup>12</sup>



Scheme 2. Reaction of bromocarbazolequinones (1b) and (1c) with nitrile oxides (2a) and (2b).

Concerning the reactive site of quinones in the 1,3-dipolar cycloaddition with nitrile oxides, it has been reported<sup>6,7</sup> that quinones have two kinds of potentially reactive sites. One is the carbon-oxygen double bond and the other is the carbon-carbon double bond. In our case, only the C=C cycloaddition reactions have been observed.

Proofs of the regiochemistry were made by <sup>1</sup>H-NMR NOE 1D experiments performed on isomers (**3b**) and (**4b**) (Figure 1). In the case of **3b**, an irradiation at 8.12 ppm (H-3') gives two responses: one on H-4' (7.81 ppm) and the other one on H-5 (8.36 ppm). Then, irradiation of the methyl signal at 1.52 ppm affords two responses: one on the CH<sub>2</sub> of the ethyl group (4.73 ppm) and the other one on H-8 (7.48 ppm). On the other hand, irradiation of the methyl signal (1.47 ppm) of compound (**4b**) gives four responses: one on H-6 (7.47 ppm), the second on the CH<sub>2</sub> of the ethyl group (4.70 ppm), the third one on H-3' (7.88 ppm) and the fourth one on the CH<sub>3</sub>-6' (2.71 ppm).



Figure 1. <sup>1</sup>H-NMR NOE 1D experiments

Moreover, IR spectra of the regioisomers (**3a**) and (**3b**) formed from the 2-bromocarbazolequinone (**1b**), show two absorption bands for the carbonyl groups while in the regioisomers (**4a**) and (**4b**) formed from the 3-bromocarbazolequinone (**1c**), the latter are not differentiated.

In order to better understand the regiochemistry of the [3+2] cycloaddition of quinones (1a), (1b) and (1c) towards nitrile oxides (2a) and (2b), we used Frontier Molecular Orbital theory and calculations of the respective LUMO and HOMO energy levels and orbital coefficients were carried out at the B3LYP theory level using the Gaussian 98 program.<sup>21</sup> Thus, the values given in Table 1 indicated that the energy difference between the LUMO of quinones and the HOMO of nitrile oxides is smaller than that between the HOMO of quinones and LUMO of nitrile oxides. This result suggests that the HOMO (nitrile oxide)-LUMO (quinone) interaction is the governing factor of this reaction. On the other hand, the values given in Table 2 indicated that the larger orbital coefficients were located at C-3 for quinones (1a), (1b) and (1c) while they are at the oxygen atom for the nitrile oxides (2a) and (2b).

MO LUMO
065 - 3.087
- 3.299
- 3.281
- 1.313
550 - 1.614

Table 1. Energy levels [eV] of FMO of carbazolequinones (1a-c) and nitrile oxides (2a,b).

Table 2. Orbital coefficients of carbazolequinones (LUMO) and nitrile oxides (HOMO).

0.221	
0.216	
0.234	
Oxygen atom	
0.419	
0.426	

The regiochemistry observed in the cycloaddition between 2-bromoquinone (**1b**) and nitrile oxides (**2a**) and (**2b**) can not be explained by the values of the orbital coefficients but by the orienting effect of the bromine atom. Indeed the oxygen atom of nitrile oxides attacks preferentially at C-2 of **1b**. For 3-bromoquinone (**1c**), both the values of the orbital coefficients and the regiocontrol effect of the bromine

atom orientate the cycloaddition to the formation of regioisomers (4a) or (4b) in which the oxygen atom of nitrile oxides was linked to the brominated carbon of quinone (C-3).

# Cycloaddition of carbazolequinones (1a), (1b) and (1c) with organic azides (5a) and (5b):

The unbrominated carbazolequinone (1a) reacted with an excess of benzyl azide (5a) in ethanol at room temperature to afford a mixture of the two possible isomeric products (6a) and (7a) in 55 and 13% yield, respectively. On the other hand, treatment of 1a with an excess of 4-methoxybenzyl azide (5b) in similar conditions, gave regioisomers (6b) and (7b) in 20 and 7% yield, respectively (Scheme 3).



Scheme 3. Reaction of carbazolequinone (1a) with azides (5a) and (5b).

When 2-bromocarbazolequinone (1b) was treated with azides (5a) or (5b) in acetonitrile at room temperature, we obtained the only regioisomers (6a) or (6b) in 50 and 43% yield, respectively. Alternatively, treatment of 3-bromocarbazolequinone (1c) with azides (5a) or (5b) in ethanol at room temperature gave a mixture of regioisomeric compounds (6a) (23%) and (7a) (51%) or (6b) (17%) and (7b) (31%) (Scheme 4).



Scheme 4. Reaction of bromocarbazolequinones (1b) and (1c) with azides (5a) and (5b).

For the regiochemistry assignment, we used the 2D  ${}^{1}\text{H}{}^{-13}\text{C}$  HMBC correlations for **6b** and **7b** (Figure 2). In the case of **6b**,  ${}^{4}J$  couplings were observed between C-4 and H of CH<sub>2</sub> of the ethyl group and between C-10 and H of CH<sub>2</sub> of the methoxybenzyl group. In the case of **7b**, both H of CH<sub>2</sub> of the ethyl group and H of CH<sub>2</sub> of the methoxybenzyl group had  ${}^{4}J$  couplings with C-4.



Figure 2. 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC correlations

Moreover, IR spectra of the regioisomers (**6a**) and (**6b**) formed from the 2-bromocarbazolequinone (**1b**), show two absorption bands for the carbonyl groups while in the regioisomers (**7a**) and (**7b**) formed in a majority from the 3-bromocarbazolequinone (**1c**), the latter are not differentiated.

The respective LUMO and HOMO energy levels of carbazolequinones (1a), (1b) and (1c) given in Table 1 and LUMO and HOMO energy levels of azides (5a) and (5b) given in Table 3 indicated that the HOMO (azide)-LUMO (quinone) interaction is the governing factor of this reaction. On the other hand, the values of the orbital coefficients of azides given in Table 4 indicated that the larger orbital coefficients were located at N-1 of 5a and 5b.

Azides	НОМО	LUMO
5a	- 6.822	- 0.827
5b	- 6.058	- 0.724

Table 3. Energy levels [eV] of FMO of azides (5a) and (5b).

Table 4.	Orbital	coefficients	of az	ides (H	IOMO).

Azides (HOMO)	N-1 <sup>a</sup>	N-3 <sup>a</sup>
5a	0.393	0.327
5b	0.075	0.048
	$ \overset{a}{R} \overset{-}{N} \overset{-}{N} \overset{+}{\overset{+}{N}} \overset{+}{\underset{1}{\overset{+}{N}}} $	

The regiochemistry observed in the cycloaddition of quinone (1a) and 2-bromoquinone (1b) with azides (5a) and (5b) agrees with the calculations. Indeed, N-1 of azides attacks at C-3 of quinones to give preferentially or exclusively regioisomers (6a) and (6b). But, in the case of 3-bromoquinone (1c), N-1 of azides adds preferentially to the unbrominated carbon C-2 of this quinone.

#### CONCLUSION

We have reported the regioselective synthesis of isoxazolocarbazolequinone and triazolocarbazolequinone derivatives by 1,3-dipolar cycloaddition reactions of bromocarbazolequinones respectively with nitrile oxides and azides. The regiochemistry observed in these reactions may be explained by the orienting effect of the bromine atom independently of the values of the orbital coefficients. Cycloadditions with nitrile oxides provide exclusively the regioisomers in which the oxygen atom was linked to the brominated carbon of the carbazolequinone. In the case of azides, we obtained preferentially or exclusively the regioisomers in which the N-1 atom was linked to the unbrominated carbon of the carbazolequinone. The regiochemistry obtained was unambiguously confirmed by <sup>1</sup>H-NMR NOE experiments and 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC correlations.

#### **EXPERIMENTAL SECTION**

**1. General**: Melting points were measured with a Büchi apparatus (capillary tube). The IR spectra were recorded with a Perkin-Elmer 1310 spectrophotometer. The NMR spectra were recorded with a Bruker AM 300 spectrometer (<sup>1</sup>H-NMR: 300 MHz, <sup>13</sup>C-NMR: 75 MHz). Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm using tetramethylsilane (TMS) as an internal reference. Coupling constant (*J*) values are given in Hz. Elemental analyses were performed at the Centre de Microanalyse du CNRS at Solaize, France. Calculations of the LUMO and HOMO energy and orbital coefficients were carried out at the B3LYP theory level using the Gaussian 98 program.

**2.** General procedure for the preparation of nitrile oxides (2a) and (2b) from aldoximes: A mixture of benzaldehyde oxime (539 mg, 4.45 mmol) or 6-methylpyridine carbaldehyde oxime (605 mg, 4.45 mmol) and 13% aqueous solution of sodium hypochlorite (6 mL) in THF (6 mL) was stirred for 15 minutes at room temperature and the resulting green solution of 2a or 2b was dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

# 3. [3+2]-Cycloadditions of nitrile oxides to carbazolequinones:

**3.1.** 9-Ethyl-3-phenylisoxazolo[5,4-*b*]carbazole-4,10(9*H*)-dione (3a): The solution of nitrile oxide (2a) prepared above was added dropwise to a stirred solution of 2-bromocarbazolequinone (1b) (152 mg, 0.5 mmol) in THF (10 mL). Stirring was maintained for 3 days at rt. The reaction mixture was evaporated to dryness in vacuum and the resultant product was taken up in  $Et_2O$  to give a red precipitate of 3a which

was purified by column chromatography on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/petroleum ether (1:1) as the eluent. It was obtained in 64% yield (110 mg). mp 244 °C. IR (KBr): 1673, 1658 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 1.52 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.74 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.39 (m, 1H, 6-H), 7.48 (m, 2H, 7-H and 8-H), 7.55 (m, 3H, Ar-H), 8.18 (m, 2H, Ar-H), 8.38 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 5-H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 15.61, 40.92, 111.47, 119.42, 120.44, 124.19, 124.70, 125.72, 126.97, 128.41, 129.01 (2C), 129.98 (2C), 131.47, 132.92, 140.26, 161.15, 167.43, 168.20, 177.24. Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. 0.5 H<sub>2</sub>O (351.36): C 71.79, H 4.30, N 7.97. Found: C 71.64, H 4.20, N 7.86.

**3.2. 5-Ethyl-3-phenylisoxazolo[4,5-***b***]carbazole-4,10(5***H***)-dione (4a): The solution of nitrile oxide (2a) prepared above was added dropwise to a stirred solution of 3-bromocarbazolequinone (1c) (152 mg, 0.5 mmol) in THF (10 mL). Stirring was maintained for 3 days at rt. The reaction mixture was evaporated to dryness in vacuum and the resultant product was taken up in Et<sub>2</sub>O to give a red precipitate of 4a which was purified by column chromatography on silica gel with EtOAc/petroleum ether (3:1) as the eluent. It was obtained in 69% yield (118 mg). mp 241 °C. IR (KBr): 1667 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): \delta ppm 1.47 (t,** *J* **= 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.73 (q,** *J* **= 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.42 (m, 1H, 8-H), 7.48 (m, 2H, 6-H and 7-H), 7.56 (m, 3H, Ar-H), 8.09 (m, 2H, Ar-H), 8.37 (d,** *J* **= 7.1 Hz, 1H, 9-H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): \delta ppm 15.50, 40.98, 111.66, 117.72, 118.00, 123.79, 124.100, 126.008, 126.90, 127.81, 129.02 (2C), 129.75 (2C), 131.50, 135.73, 139.57, 161.00, 168.724, 170.50, 175.01. Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. 0.1 H<sub>2</sub>O (344.15): C 73.29, H 4.16, N 8.14. Found: C 73.35, H 4.19, N 8.19.** 

**3.3.** 9-Ethyl-3-(6-methylpyridin-2-yl)isoxazolo[5,4-*b*]carbazole-4,10(9*H*)-dione (3b): The solution of nitrile oxide (2b) prepared above was added dropwise to a stirred solution of 2-bromocarbazolequinone (1b) (152 mg, 0.5 mmol) in THF (10 mL). Stirring was maintained for 3 days at rt. The reaction mixture was evaporated to dryness in vacuum and the resultant product was taken up in Et<sub>2</sub>O to give a red precipitate of 3b which was purified by column chromatography on silica gel with EtOAc/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) as the eluent. It was obtained in 58% yield (103 mg). mp 224 °C. IR (KBr): 1673 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  ppm 1.52 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.71 (s, 3H, 6'-CH<sub>3</sub>), 4.73 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.34 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 5'-H), 7.38 (m, 1H, 6-H), 7.48 (m, 2H, 7-H and 8-H), 7.81 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, 4'-H), 8.12 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 3'-H), 8.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 5-H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  ppm 15.61, 25.09, 40.96, 111.51, 119.64, 120.43, 123.19, 124.18, 124.68, 125.56, 125.75, 128.45, 132.99, 137.35, 140.28, 146.04, 159.73, 160.55, 167.33, 168.07, 176.91. Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>. 0.1 H<sub>2</sub>O (359.17): C 70.23, H 4.27, N 11.70. Found: C 70.24, H 4.30, N 11.66.

**3.4. 5-Ethyl-3-(6-methylpyridin-2-yl)isoxazolo[4,5-***b***]carbazole-4,10(5***H***)-dione (4b): The solution of nitrile oxide (2b) prepared above was added dropwise to a stirred solution of 3-bromocarbazolequinone** 

(1c) (152 mg, 0.5 mmol) in THF (10 mL). Stirring was maintained for 3 days at rt. The reaction mixture was evaporated to dryness in vacuum and the resultant product was purified by column chromatography on silica gel with EtOAc/ petroleum ether (1:3) as the eluent. **4b** was obtained in 35% yield (64 mg). mp 221 °C. IR (KBr): 1673 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  ppm 1.47 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.71 (s, 3H, 6'-CH<sub>3</sub>), 4.70 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 5'-H), 7.42 (m, 1H, 8-H), 7.47 (m, 2H, 6-H and 7-H), 7.80 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, 4'-H), 7.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 3'-H), 8.34 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 9-H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  ppm 15.44, 25.05, 40.96, 111.68, 117.68, 118.35, 122.68, 123.74, 124.09, 125.52, 126.00, 127.79, 135.72, 137.35, 139.51, 146.07, 159.71, 160.47, 168.48, 170.30, 174.43. Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>. 0.3 H<sub>2</sub>O (362.77): C 69.53, H 4.33, N 11.58. Found: C 69.68, H 4.37, N 11.49.

**3.5.** [3+2]-Cycloaddition of nitrile oxide (2a) to carbazolequinone (1a): The solution of nitrile oxide (2a) prepared above was added dropwise to a stirred solution of carbazolequinone (1a) (113 mg, 0.5 mmol) in THF (10 mL). Stirring was maintained for 3 days at rt. The reaction mixture was evaporated to dryness in vacuum to yield a mixture of regioisomeric compounds (3a) and (4a) which were separated by column chromatography on silica gel using, first  $CH_2Cl_2/$  petroleum ether (1:1) and then, EtOAc/ petroleum ether (3:1) as the eluent. **3a** was obtained in 24% yield (41 mg) and **4a** in 24% yield (41 mg).

**3.6.** [3+2]-Cycloaddition of nitrile oxide (2b) to carbazolequinone (1a): The solution of nitrile oxide (2b) prepared above was added dropwise to a stirred solution of carbazolequinone (1a) (113 mg, 0.5 mmol) in THF (10 mL). Then, basic alumina (1g) was added. Stirring was maintained for 3 days at rt. After filtration, the solvent was evaporated to yield a mixture of regioisomeric compounds (3b) and (4b) which were separated by column chromatography on silica gel using, first EtOAc/ petroleum ether (1:3) and then, EtOAc/  $CH_2Cl_2$  (1:1) as the eluent. **3b** was obtained in 25% yield (45 mg) and **4b** in 25% yield (45 mg).

**4** General procedure for the preparation of azides (5a) and (5b): To a solution of sodium azide (480 mg, 7.38 mmol) in EtOH (50 mL) was added benzyl bromide (1130 mg, 6.61 mmol) or 4-methoxybenzyl bromide (1330 mg, 6.61 mmol). The solution was heated at reflux for 24 h, cooled, diluted with water (40 mL) and extracted with  $Et_2O$  (3 × 30 mL). The combined organic solution was dried with  $Na_2SO_4$  and concentrated to provide colourless viscous oil of benzyl or 4-methoxybenzyl azide which was used without further purification.

**4.1. 1-Benzyl-5-ethyl**[**1**,**2**,**3**]**triazolo**[**4**,**5**-*b*]**carbazole-4**,**10**(**1***H*,**5***H*)-**dione** (**6a**): The benzyl azide (**5a**) prepared above was added dropwise to a stirred solution of 2-bromocarbazolequinone (**1b**) (152 mg, 0.5 mmol) in MeCN (10 mL). Stirring was maintained for 4 days at rt. The orange reaction suspension was

concentrated in vacuum then filtered to yield compound (**6a**) as an orange solid which was purified by recristallization from EtOH. It was obtained in 50% yield (90 mg). mp 279 °C. IR (KBr): 1678, 1667, 1652 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  ppm 1.48 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.76 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.98 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.35 (m, 3H), 7.46 (m, 3H), 7.53 (m, 2H), 8.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, 9-H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  ppm 15.51, 40.95, 53.72, 111.66, 118.00, 123.64, 124.37, 125.81, 127.72, 129.08 (2C), 129.27, 129.35 (2C), 134.65 (2C), 135.48, 139.47, 145.95, 172.67, 172.90. Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>. 0.4 H<sub>2</sub>O (363.59): C 69.37, H 4.66, N 15.41. Found C 69.41, H 4.44, N 15.48.

4.2. 5-Ethyl-1-(4-methoxybenzyl)[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]carbazole-4,10(1*H*,5*H*)-dione (6b): The 4-methoxybenzyl azide (5b) prepared above was added dropwise to a stirred solution of 2-bromocarbazolequinone (1b) (152 mg, 0.5 mmol) in acetonitrile (10 mL). Stirring was maintained for 3 days at rt. The orange reaction suspension was evaporated to dryness in vacuum and the resultant product was taken up in diethyl ether to give an orange precipitate of **6b** which was filtered and purified by column chromatography on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ petroleum ether (2:1) as the eluent. It was obtained in 43% yield (82 mg). mp 292 °C. IR (KBr): 1679, 1668, 1655 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 1.48 (t, J = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.76 (q, J = 6.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.93 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.90 (d, J = 8.52 Hz, 2H, Ar-H), 7.45 (m, 1H, 8-H), 7.49 (m, 2H, Ar-H), 7.52 (d, J = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 8.38 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 9-H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  ppm 15.37, 40.86, 53.26, 55.65, 111.55, 114.74 (2C), 118.85, 123.67, 124.45, 125.67, 126.96, 127.60, 130.58 (2C), 134.56, 135.60, 139.52, 146.01, 160.51, 172.73, 172.86. Anal. Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>. 0.6 H<sub>2</sub>O (397.22): C 66.52, H 4.87, N 14.10. Found: C 66.57, H 4.64, N 13.96.

**4.3.** [3+2]-Cycloadditions of benzyl azides (5a) to 3-bromocarbazolequinones (1c): The benzyl azide (5a) prepared above was added dropwise to a stirred solution of 3-bromocarbazolequinone (1c) (152 mg, 0.5 mmol) in EtOH (5 mL). Stirring was maintained for 2 weeks at rt. The orange reaction suspension was concentrated in vacuum then filtered to yield an orange solid of a mixture of regioisomeric compounds (6a) and (7a) which were separated by column chromatography on silica gel with  $CH_2Cl_2/$  petroleum ether (1:1) as the eluent. 6a was obtained in 23% yield (40 mg) and 7a in 51% yield (90 mg).

**3-Benzyl-5-ethyl[1,2,3]triazolo[4,5-***b***]carbazole-4,10(3***H***,5***H***)-dione (7a): mp 273 °C. IR (KBr): 1666 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 1.48 (t,** *J* **= 7.2 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.67 (q,** *J* **= 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.94 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.51 (m, 2H, Ar-H), 7.60 (m, 6H, Ar-H), 8.40 (dd,** *J* **= 7.9 Hz and** *J* **= 1.1 Hz, 1H, 9-H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 15.56, 40.84, 53.93, 111.25, 119.97, 124.42 (2C), 125.57, 128.24, 128.96 (2C), 129.33, 129.38 (2C), 133.56, 133.95, 134.48, 139.96, 147.12, 170.41, 175.44. Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>. 0.2 H<sub>2</sub>O (359.99): C 70.07, H 4.59, N 15.56. Found: C 70.10, H 4.42, N 15.55.** 

**4.4.** [3+2]-Cycloadditions of 4-methoxybenzyl azides (5b) to 3-bromocarbazolequinones (1c): The 4-methoxybenzyl azide (5b) prepared above was added dropwise to a stirred solution of 3-bromocarbazolequinone (1c) (152 mg, 0.5 mmol) in ethanol (5 mL). Stirring was maintained for 10 days at rt. The orange reaction mixture was evaporated to dryness in vacuum and the resultant product was taken up in Et<sub>2</sub>O then filtered to give an orange precipitate of a mixture of regioisomeric compounds (6b) and (7b) which were separated by column chromatography on silica gel with  $CH_2Cl_2$ / petroleum ether (2:1) as the eluent. 6b was obtained in 17% yield (30 mg) and 7b in 30% yield (53 mg).

**5-Ethyl-3-(4-methoxybenzyl)**[**1**,**2**,**3**]**triazolo**[**4**,**5**-*b*]**carbazole-4**,**10**(*3H*,**5***H*)-**dione** (**7b**)**:** mp 270 °C. IR (KBr): 1666 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 1.49 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.78 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.69 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 5.88 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.88 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.35 (m, 1H, Ar-H), 7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.46 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar-H), 8.43 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 9-H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 15.33, 40.58, 53.25, 55.46, 110.98, 114.42 (2C), 119.75, 124.21 (2C), 125.32, 126.40, 127.98, 130.31 (2C), 133.16, 133.75, 139.72, 146.92, 160.20, 170.26, 175.24. HRMS: calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> 386.1379; found 386.13736.

**4.5.** [3+2]-Cycloaddition of azide (5a) to carbazolequinone (1a): The benzyl azide (5a) prepared above was added dropwise to a stirred solution of carbazolequinone (1a) (113 mg, 0.5 mmol) in EtOH (5 mL). Stirring was maintained for 2 weeks at rt. The orange reaction suspension was concentrated in vacuum then filtered to yield a mixture of regioisomeric compounds (6a) and (7a) which were separated by column chromatography on silica gel with  $CH_2Cl_2/$  petroleum ether (1:1) as the eluent. 6a was obtained in 55% yield (98 mg) and 7a in 13% yield (23 mg).

**4.6.** [3+2]-Cycloaddition of azide (5b) to carbazolequinone (1a): The 4-methoxybenzyl azide (5b) prepared above was added dropwise to a stirred solution of carbazolequinone (1a) (113 mg, 0.5 mmol) in ethanol (5 mL). Stirring was maintained for 2 weeks at rt. The orange reaction mixture was evaporated to dryness in vacuum and the resultant product was taken up in Et<sub>2</sub>O then filtered to give an orange precipitate of a mixture of regioisomeric compounds (6b) and (7b) which were separated by column chromatography on silica gel with  $CH_2Cl_2$ / petroleum ether (2:1) as the eluent. 6b was obtained in 20% yield (39 mg) and 7b in 7% yield (14 mg).

#### REFERENCES

- 1. A. Poumaroux, Z. Bouaziz, M. Domard, and H. Fillion, *Heterocycles*, 1997, 45, 585.
- A. Poumaroux, Z. Bouaziz, H. Fillion, M. Domard, J. Giraud, and A.-F. Pétavy, *Chem. Pharm. Bull.*, 1999, 47, 643.

- Z. Bouaziz, A. Ghérardi, F. Régnier, M.-E. Sarciron, X. Bertheau, B. Fenet, N. Walchshofer, and H. Fillion, *Eur. J. Org. Chem.*, 2002, 1834.
- 4. M. Compain-Batissou, D. Latrèche, J. Gentili, N. Walchshofer, and Z. Bouaziz, *Chem. Pharm. Bull.*, 2004, **52**, 1114.
- 5. G. A. Conway, L. J. Loeffler, and I. H. Hall, J. Med. Chem., 1983, 26, 876.
- 6. T. Hayakawa, K. Araki, and S. Shiraishi, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1984, 57, 1643.
- 7. T. Hayakawa, K. Araki, and S. Shiraishi, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1984, 57, 2216.
- 8. B. Venugopalan, S. S. Iyer, P. J. Karnik, and N. J. De Souza, *Heterocycles*, 1987, 26, 3173.
- G. Brahmeshwari, S. Ramadevi, M. S. Rao, and T. V. Padmanabha Rao, *Indian J. Chem.*, 1991, 30B, 369.
- F. Farina, M. Victoria Martin, M. Munoz, M. Carmen Paredes, and R. Rodriguez, *Heterocycles*, 1995, 40, 413.
- G. Brahmeshwari, V. Rajeswar Rao, and T. V. Padmanabha Rao, *Indian J. Chem.*, 1995, 34B, 139.
- 12. J. L. Stevens, T D. Welton, J. P. Deville, and V. Behar, Tetrahedron Lett., 2003, 44, 8901.
- G. Alonso, M. Fuertes, M. T. Garcia-Lopez, F. G. De Las Heras, J. M. Infante, and M. Stud, *Eur. J. Med. Chem. Chimica Therapeutica*, 1978, 13, 155.
- 14. D. R. Bukle, H. Smith, B. A. Spicer, and J. M. Tedder, J. Med. Chem., 1983, 26, 714.
- 15. B. Husu, S. Kafka, Z. Kadune, and M. Tisler, Monatsh. Chem., 1988, 119, 215.
- 16. L. Benati, P. Carlo Montevecchi, and P. Spagnolo, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1991, 71.
- 17. I. T. Barnish, and M. S. Gibson, J. Chem. Res.-S, 1992, 208 and J. Chem. Res.-M, 1992, 1740.
- 18. F. Palacios, A. M. Ochoa de Retana, A. and J. Pagalday, Org. Prep. Proced. Int., 1995, 27, 625.
- 19. C. Ticozzi and A. Zanarotti, Tetrahedron Lett., 1994, 35, 7421.
- 20. D. R. Buckle, and C. J. M. Rockell, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1982, 627.
- M. J. Frisch, M. G. W. Trucks, G. H. B. Schlegel, and J. A. Pople, *Gaussian 98* (Revision A.10), Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 2001.

## **RESUME** en français

La toxoplasmose est une anthropozoonose ubiquitaire causée par *Toxoplasma gondii*. Malgré de nombreuses recherches, l'arsenal thérapeutique reste très restreint. L'objectif des travaux présentés dans ce mémoire est la synthèse de carbazolequinones et l'évaluation de leur efficacité sur *T. gondii*. Les carbazolequinones naturelles comme les calothrixines ont des propriétés antiparasitaires et cytotoxiques. La synthèse de *para-* et *ortho-*quinones de type benzo-, isoxazolo- et triazolo-carbazolequinones a été réalisée par application des réactions de cycloaddition [4+2] ou 1,3-dipolaires régiosélectives. La stratégie de synthèse à partir de dipolarophiles monobromés permet en effet, d'accéder sélectivement au régioisomère souhaité. Les attributions de structure des régiosiomères ont été confirmées par RMN <sup>1</sup>H NOE et par une étude des corrélations <sup>1</sup>H -<sup>13</sup>C HMBC. Concernant l'évaluation biologique *in vitro*, les composés inhibent la croissance de *T. gondii* comme la sulfadiazine et la pyriméthamine, avec une cytotoxicité sur les cellules myélomonocytiques THP1. Aucun des composés synthétisés n'inhibent la PNP, enzyme clé de la voie de sauvetage des purines, seule voie d'accès pour le parasite aux bases puriques. L'inhibition de la croissance de *T. gondii* par nos composés n'est pas liée directement liée à l'inhibition de la PNP.

# TITRE en anglais

New hetetocyclic quinones synthesis by Diels-Alder and 1,3-dipolar cycloaddition In vitro assessment of the activity against *Toxoplasma gondii*.

# **RESUME** en anglais

Toxoplasmosis is an ubiquitous anthropozoonosis induced by *Toxoplasma gondii*. Despite of several researchs, the whole stock of drugs remain restricted. The aim of the works in this report is the synthesis of carbazolequinones and valuation of efficacy against *T. gondii*. Natural carbazolequinones like Calothrixines exhibit antiparasitic et cytoxotoxic properties. The para- and ortho-quinones like benzo-, isoxazolo- and triazolo-carbazolequinones synthesis was investigate by regioselective [4+2] or 1,3-dipolar cycloaddition. The strategy of synthesis from monobromide dipolarophile can in fact have an access to required regioisomer with selectivity. Proofs of regiochemistry was made by NMR 1H NOE and study of correlation by <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC. Concerning biological assessment, compounds inhibit the growth of T. gondii like sulfadiazine and pyrimethamine with cytotoxicity against myelomonocytic THP1 cells. Any synthesised compounds inhibit PNP, key enzyme of purine salvage pathway, unique way for the parasit to have access to puric basis. The inhibition of growth of *T. gondii* by our compounds isn't due to inhibition of PNP.

# DISCIPLINE : Chimie-Biochimie

## **MOTS-CLES**

Carbazoquinones, Cycloaddition [4+2], Cycloaddition 1,3-dipolaire, Carbodiène, Oxyde de nitrile, Azoture, Toxoplasma gondii, Purine nucléoside phosphorylase.

# INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Chimie Organique ISPB Faculté de Pharmacie Université Claude Bernard Lyon 1 8 avenue Rockefeller 69373 Lyon Cédex 08 Tél : (33)4 78 77 71 38 Fax : (33)4 78 77 28 67 Laboratoire de Parasitologie - Mycologie médicale ISPB Faculté de Pharmacie Université Claude Bernard Lyon 1 8 avenue Rockefeller 69373 Lyon Cédex 08 Tél : (33)4 78 77 72 77