



HAL
open science

**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 HETEROCYCLIQUES 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° d'ordre 346-2007

Année 2007

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

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

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

À 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 transparaisaient 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_3	Tribromure de bore
BSA	bovine serum albumine
$\text{C}_2\text{H}_5\text{I}$,	Iodure d'éthyle
CI_{50}	Concentration inhibitrice 50 %
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Nitrate de cuivre
Cu_2O	Oxyde cuivreux
CuBr	Bromure cuivreux
CH_2Cl_2	dichlorométhane
DMF	diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
éq	équivalent
H_2SO_4	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
HDQ	1-Hydroxy-2-Docécyl-4(1H) Quinolone
HFF	human foreskin fibroblast : fibroblaste humain de prépuce
HMPT	Hexaméthylphosphorus triamide
Ki	constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur
KOH,	Potasse
LDA	Lithium diisopropylamide
M	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
$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	Triphénylphosphine de palladium
PdCl_2	Chlorure de palladium
Ppm	Partie par million
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
RMN	Résonance magnétique nucléaire
t BuOH	<i>Tert</i> -butanol
t BuOK	<i>Tert</i> -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 BIBLIOGRAPHIQUES	6
1) Alcaloïdes de structure ortho-carbazolequinone	6
2) Activités biologiques décrites pour ces alcaloïdes :	7
3) Les différentes voies de synthèse des ortho-carbazolequinones	7
4) Synthèse des benzocarbazole-5,6-diones	12
5) Réactions de Diels-Alder mettant en jeu des ortho-quinones	15
II-TRAVAUX PERSONNELS	19
1) Synthèse de carbazole-1,2-diones :	19
2) Réactions de cycloadditions [4+2] de la carbazole-1,2-dione	21
3) Synthèse de la carbazole-3,4-dione :	22
4) Oxydation de l'aminocarbazole avec le sel de Frémy	24
5) Réactions de cycloadditions [4+2] de la carbazole-3,4-dione	25
5.1) Réaction avec l'acétoxybutadiène	25
5.2) Réaction avec le cyclobutadiène	25
5.3) Réaction avec un azadiène	26
CHAPITRE 2 : CYCLOADDITIONS DIPOLAIRES-1,3 SUR DES PARA-CARBAZOLEQUINONES	28
I-DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	29
1) Alcaloïdes de structures para-carbazolequinones	29
2) Activités biologiques décrites pour ces alcaloïdes	31
3) Carbazolequinones ayant montré des propriétés biologiques intéressantes : antiparasitaires, antitumorales, antibactériennes	32
4) Cycloaddition de para-quinones avec les oxydes de nitriles	36
5) Cycloaddition de para-quinones avec les azotures	44
II-TRAVAUX PERSONNELS	49
1) Synthèse des para-carbazolequinones	49
2) Synthèse des oxydes de nitriles	53
3) Cycloaddition dipolaire-1,3 entre les para-carbazolequinones et les oxydes de nitriles	54
3.1) Réaction avec la para-carbazolequinone non bromée	54
3.2) Réaction avec les bromocarbazolequinones	55
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	62
5.1) Réaction avec la para-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	66
5.5) Conclusion	69
CHAPITRE 3 : PARTIE EXPERIMENTALE	70
MATERIELS ET METHODES	71

PARTIE II : ACTIVITES BIOLOGIQUES.....	103
CHAPITRE 1 : TOXOPLASMA GONDII ET LA TOXOPLASMOSE	104
I <i>TOXOPLASMA GONDII</i>	105
1) <i>Découverte du parasite</i>	105
2) <i>Classification et taxonomie</i>	107
3) <i>Morphologie</i>	107
3.1) Tachyzoïte ou trophozoïte.....	107
3.2) Kyste	107
3.3) Oocyste	109
4) <i>Cycle</i>	109
4.1) Félidé : hôte définitif.....	109
4.2) Animaux homéothermes : hôtes intermédiaires.....	110
4.3) La sporulation	111
II <i>LA TOXOPLASMOSE</i>	113
1) <i>Epidémiologie</i>	113
2) <i>Physiopathologie</i>	114
2.1) Rôle de l'immunité.....	114
2.2) Facteurs de pathogénicité	114
2.3) Physiopathologie des lésions.....	115
3) <i>Tableau clinique</i>	116
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	118
3.2.2. Toxoplasmose extra-cérébrale.....	118
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) <i>Diagnostic</i>	122
5) <i>Principaux schémas thérapeutiques</i>	122
5 1 Toxoplasmose en dehors de la grossesse, chez l'immunocompétent	122
5 2 Traitement de la toxoplasmose congénitale	122
5 2 1 Traitement ante - natal : prévention de la transmission materno-foetale	122
5 2 2 Traitement congénital de l'enfant.....	123
5 3 Toxoplasmose chez l'immunodéprimé.....	123
5 3 1 Traitement curatif.....	123
5 3 2 Traitement prophylactique secondaire.....	124
CHAPITRE 2 : TEST D'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE TOXOPLASMA GONDII	126
I <i>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	127
1) <i>Principaux médicaments</i>	127
1.1) Les macrolides et apparentés.....	127
1 2) Inhibiteurs de la déshydrofolate réductase (DHFR)	128
1.3) Les sulfamides.....	129
1 4) Autres médicaments	130
2) <i>Autres molécules actives contre Toxoplasma gondii</i>	131
II <i>TRAVAUX PERSONNELS</i>	161
1) <i>Introduction</i>	161
2) <i>Matériels et méthodes</i>	161

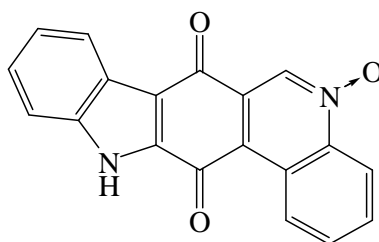
2.1) Culture cellulaire.....	161
2 1 1 Milieux	161
2 1 1 1 Milieu incomplet :	161
2 1 1 2 Milieu complet.....	161
2 1 2 Cellules.....	162
2 1 2 1 THP 1.....	162
2 1 2 2 <i>Toxoplasma gondii</i> souche RH	162
2 2) Test de cytotoxicité	162
2 3) Test d'inhibition de la croissance de <i>T. gondii</i>	164
3) <i>Résultats et Discussion</i>	167
4) <i>Conclusion</i> :	171
CHAPITRE 3 : TEST D'INHIBITION DE LA PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE DE TOXOPLASMA GONDII	172
I DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	173
II TRAVAUX PERSONNELS	178
1) <i>Introduction</i>	178
2) <i>Matériels et méthodes</i>	178
3) <i>Résultats</i>	179
4) <i>Conclusion</i>	181
CONCLUSION GENERALE	182
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	185
PUBLICATIONS	211

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 anthroponose ubiquitaire, habituellement bénigne et asymptomatique chez l'immunocompétent. La toxoplasmose se révèle redoutable chez l'immunodéprimé ou le fœtus. 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 immunodépression, 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*.

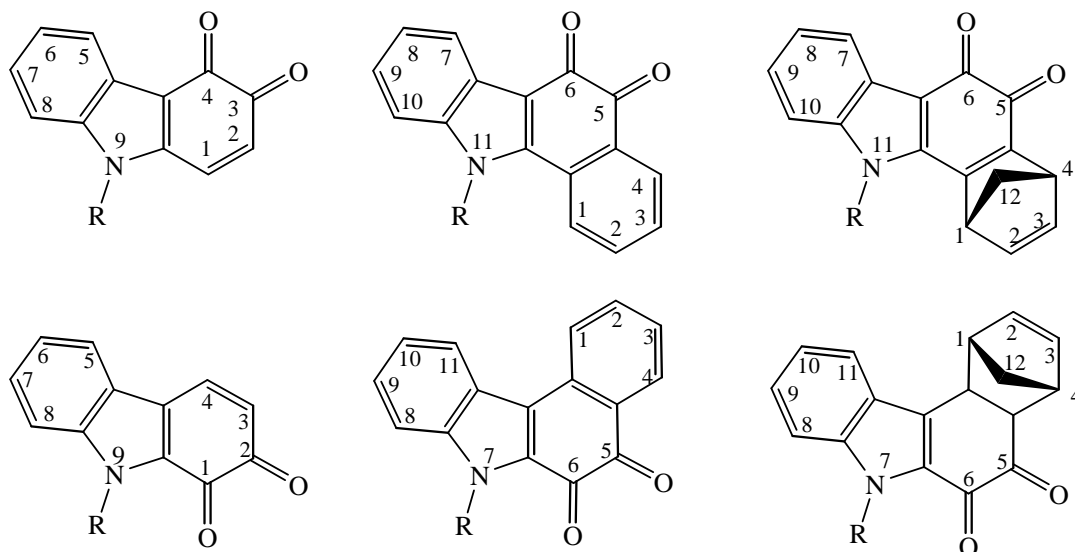
Les carbazolequinones sont des molécules qui ont montré des propriétés biologiques intéressantes. Un produit naturel comme la Calothrixine A extraite d'une cyanobactérie a montré une activité antimalarique à des concentrations nanomolaires.



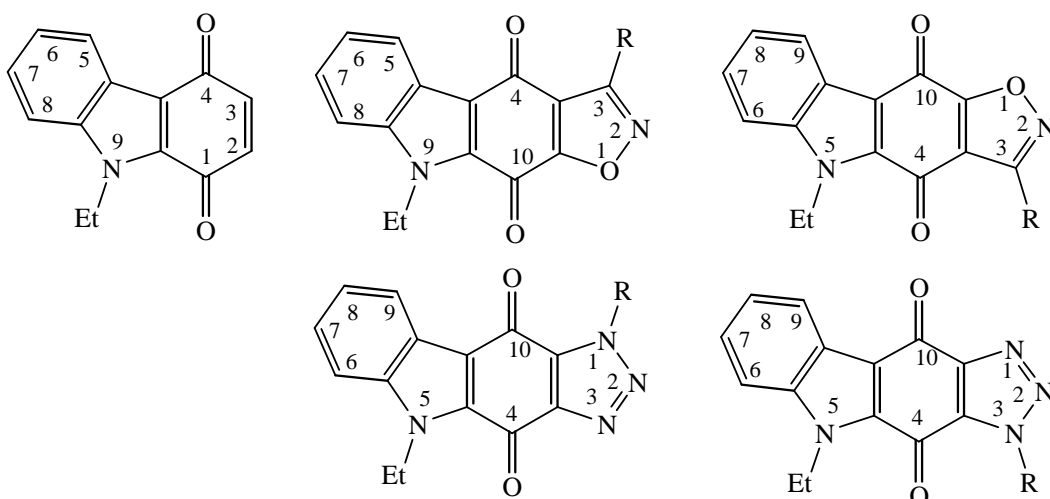
Calothrixine A
(*Calothrix cyanobacteria*)

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



Structure *para*-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.

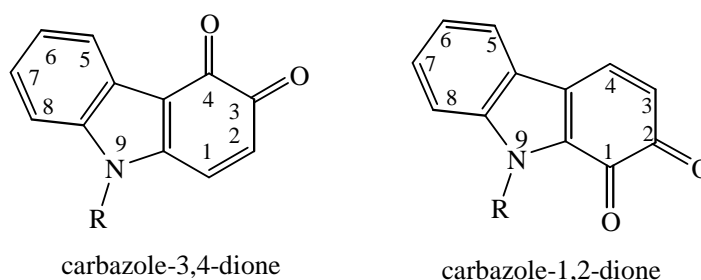
PARTIE I : SYNTHÈSE

CHAPITRE 1 : LES *ORTHO*-CARBAZOLEQUINONES ET DERIVES

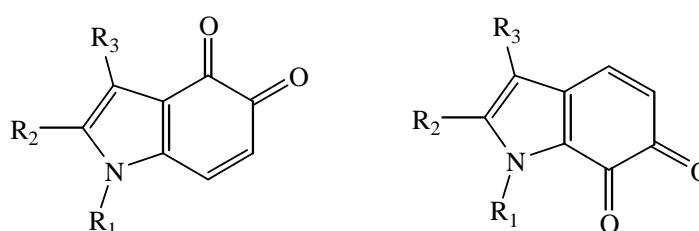
I-DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

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



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^{1 2 3}, *Streptomyces viridochromogenes* 2942-SVS3⁴, et *Streptomyces violaceus* 2448-SVT2⁵.

¹ K. Shin-Ya, M. Tanaka, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto. *Tetrahedron Letters*, **1993**, 34 (31), 4943 - 4944.

² N. Orihara, K. Furihata, H. Seto. *The Journal of Antibiotics*, **1997**, 50 (11), 979 - 981.

³ K. Shin-Ya, T. Kunigami, J. S. Kim, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto. *Biosc. Biotech. Biochem.*, **1997**, 61 (10), 1768 - 1769.

⁴ K. Shin-Ya, S. Shimizu, T. Kunigami, K. Furihata, H. Seto. *The Journal of Antibiotics*, **1995**, 48 (7), 574 - 578.

⁵ M. Tanaka, K. Shin-ya, K. Furihata, H. Seto. *The Journal of Antibiotics*, **1995**, 48 (4), 326 - 328.

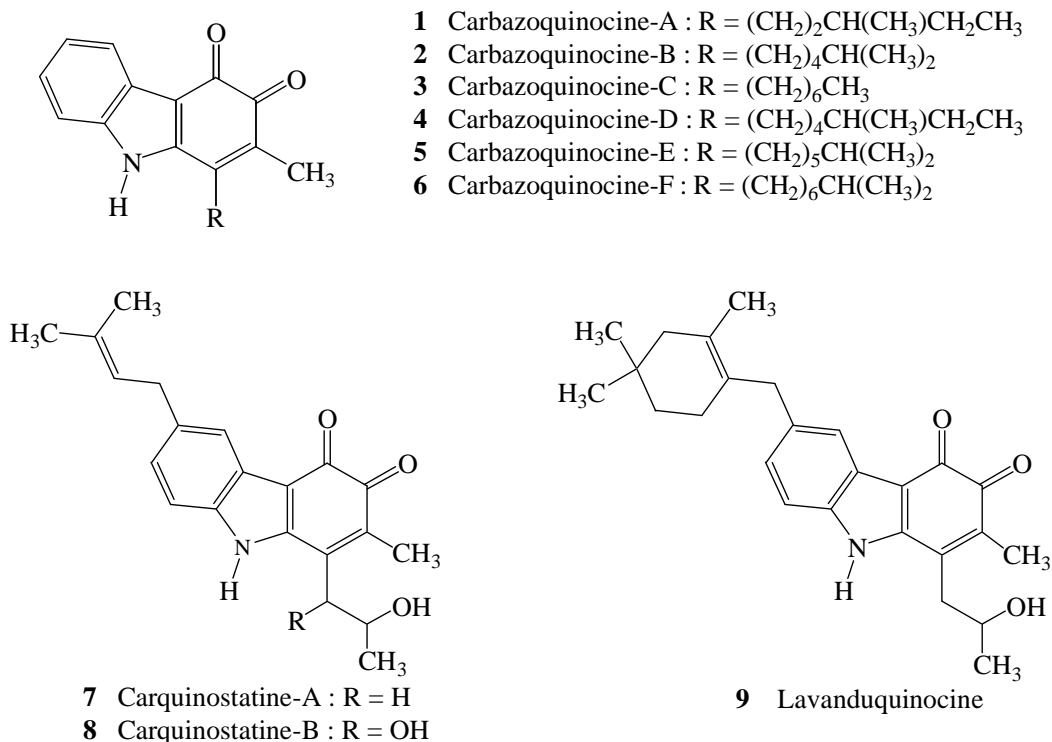


Schéma 1

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 ^{6 7 8 9} a permis la synthèse de molécules naturelles telles que la carbazoquinocine-C **3**, la carquinostatine-A **7** et la lavanduquinocine **9**.

La synthèse ⁶ de la carbazoquinocine-C **3** (Schéma 2) est ainsi réalisée à partir du 2,3-diméthoxytoluène **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

⁶ H.J. Knölker, W. Frohner. *Tetrahedron Letters*, **1997**, 38 (9), 1535 - 1538

⁷ H.J. Knölker, W. Frohner. *Synlett*, **1997**, 2, 1108 - 1110

⁸ H.J. Knölker, E. Baum, K.R. Reddy. *Tetrahedron Letters*, **2000**, 41 (8), 1171 - 1174

⁹ H.J. Knölker, K.R. Reddy. *Synlett*, **1999**, 5, 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.

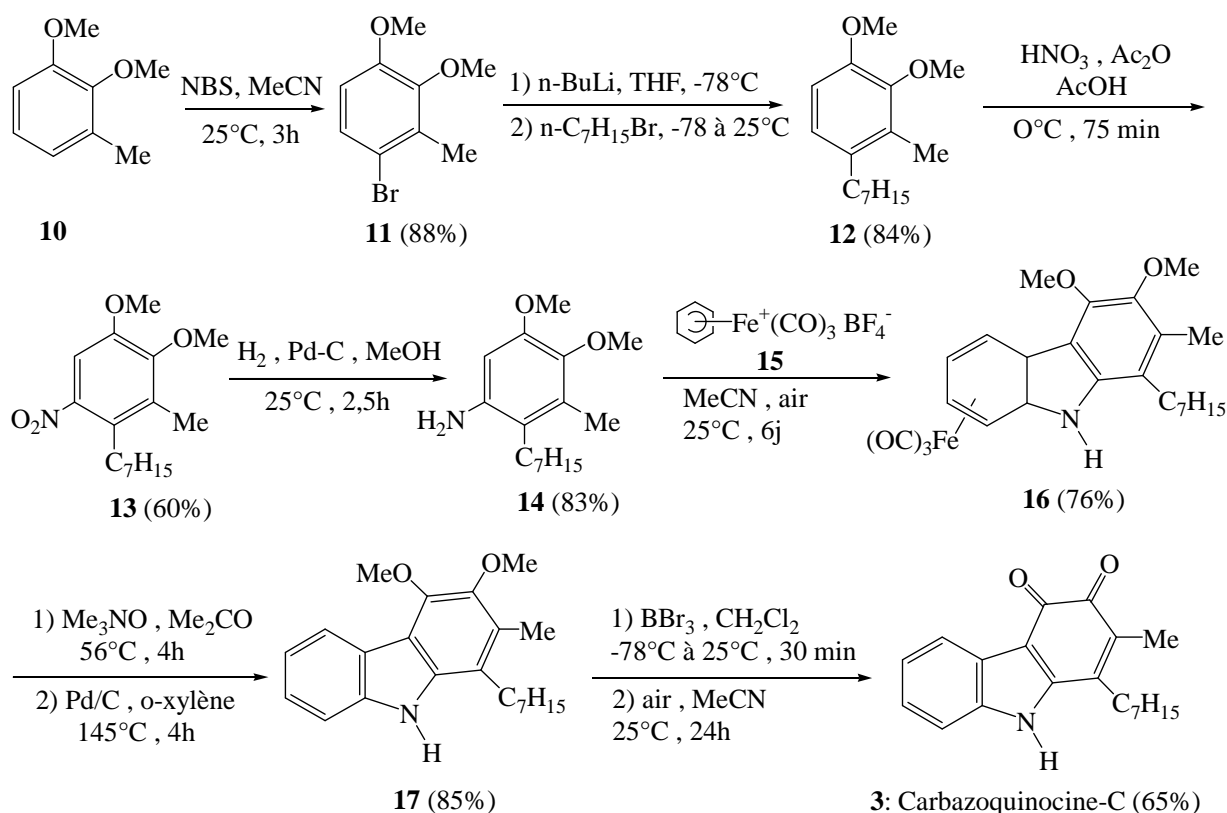


Schéma 2

Knölker et al 1999⁹ 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_3 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).

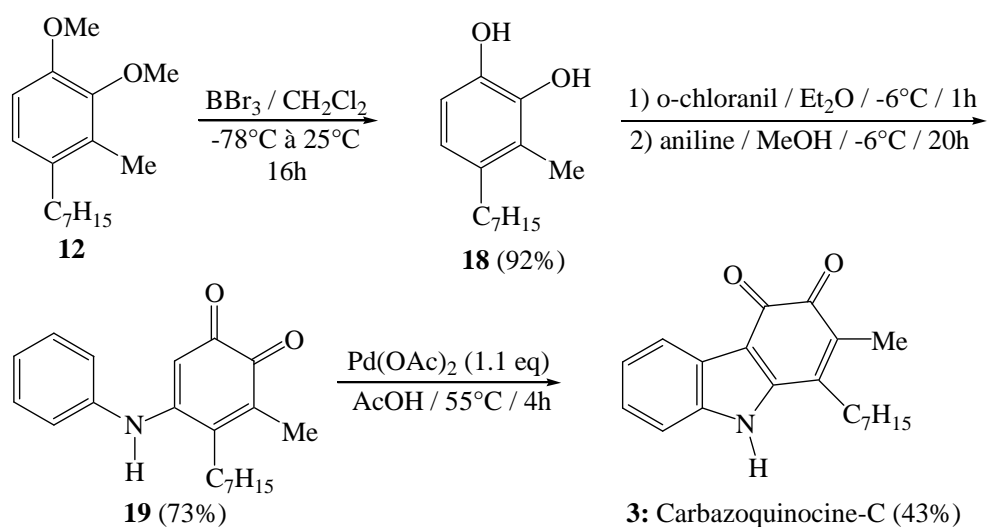


Schéma 3

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).

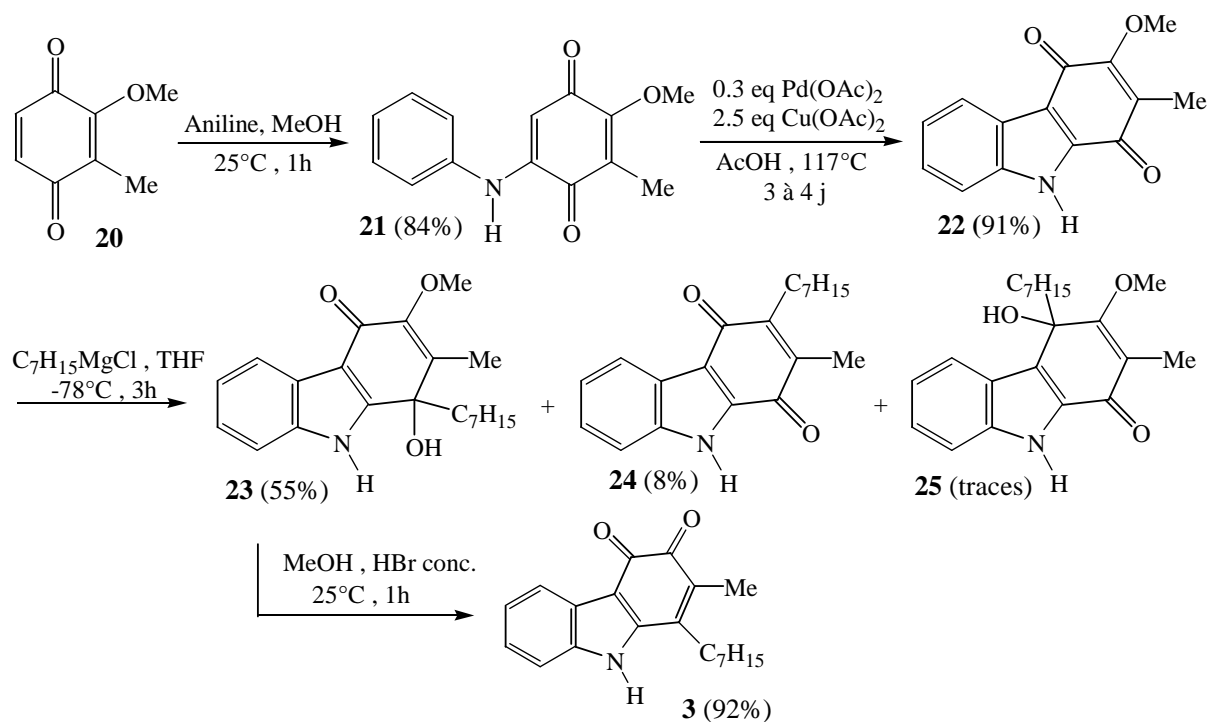


Schéma 4

La réaction du magnésien $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{MgCl}$ à -78°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.

¹⁰ H.J. Knölker, K.R. Reddy, A. Wagner . *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39 (45), 8267 - 8270

¹¹ H.J. Knölker, W. Frohner, K.R. Reddy. *Synthesis* **2002**, 4, 557 - 564

Les Carbazozoquinocines **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).

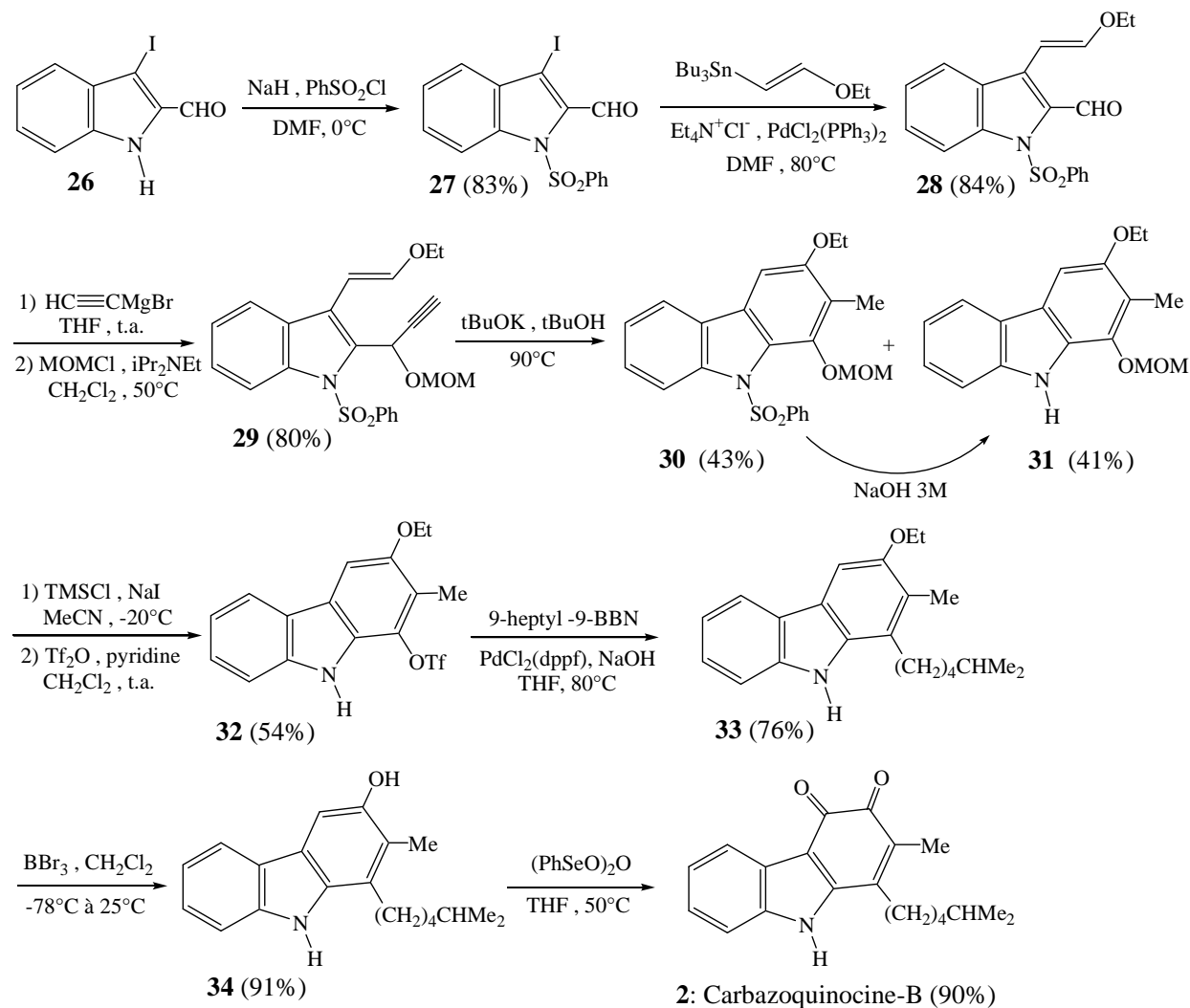


Schéma 5

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.

¹² T. Choshi, H. Fujimoto, E. Sugino, S. Hibino. *Heterocycles*, **1996**, 43 (9), 1847 - 1854

¹³ T. Choshi, H. Fujimoto, C. Nagayama, E. Sugino, S. Hibino. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62 (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 PdCl₂. L'heptylcarbazole **33** est traité par BBr₃ pour donner l'hydroxycarbazole **34** qui est ensuite oxydé par (PhSeO)₂O conduisant à la carbazoquinocine-B **2**.

Plus récemment, Aygün et Pindur 2000 et 2003^{14 15} 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-phénylesulfonylindole **35** (Schéma 6).

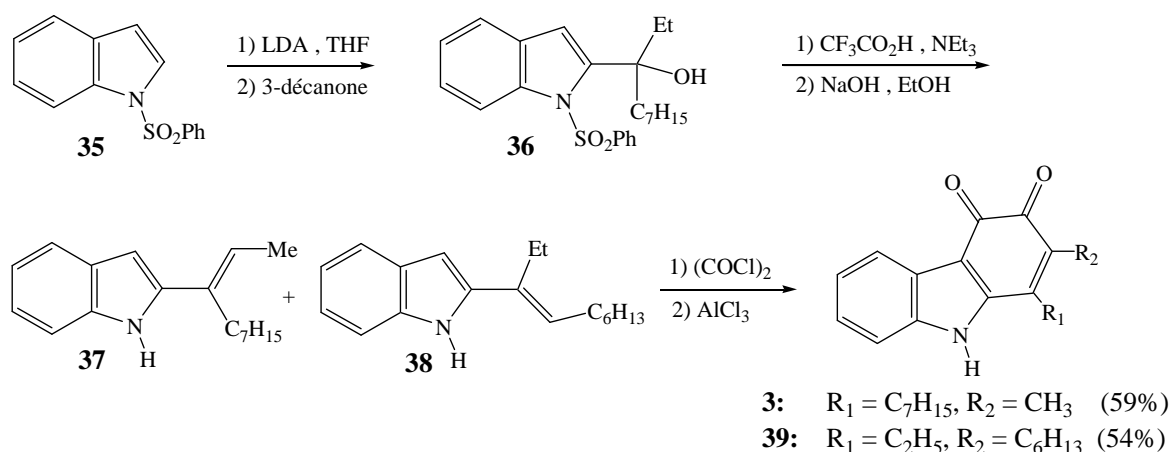


Schéma 6

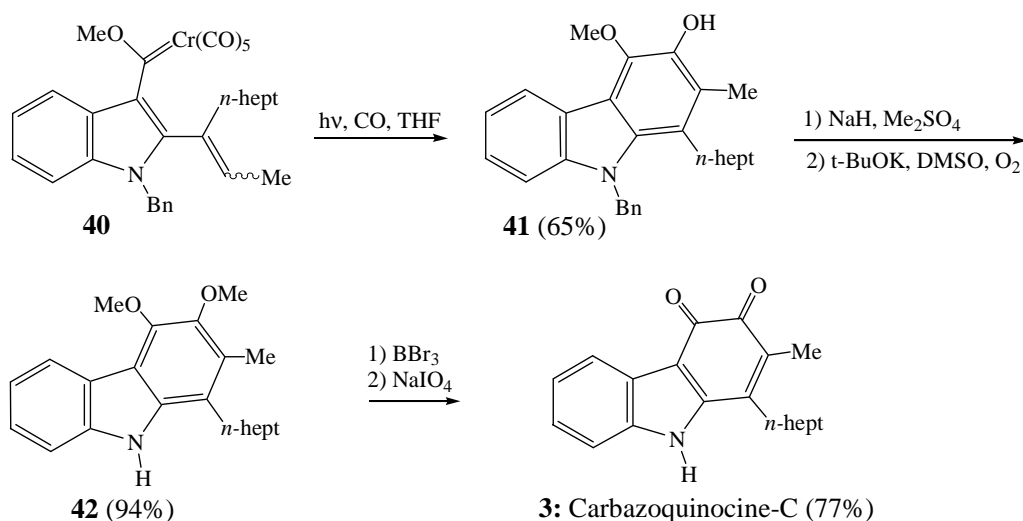
La première étape correspond à une alkylation du noyau indolique par addition nucléophile du carbanion formé en position 2, sur la 3-décanone conduisant à la formation de l'alcool **36**. Ce dernier est déshydraté puis déprotégé pour donner un mélange des deux vinylindoles régioisomères **37** et **38**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

Rawat et Wulff 2004¹⁶ ont préparé la carbazoquinocine-C **3** via une réaction de cyclisation photochimique d'un complexe 3-indolylocarbène (Schéma 7).

¹⁴ A. Aygun, U. Pindur. *Synlett*, **2000**, 12, 1757 - 1760

¹⁵ A. Aygun, U. Pindur. *J. Heterocyclic Chem.*, **2003**, 40 (3), 411 - 417

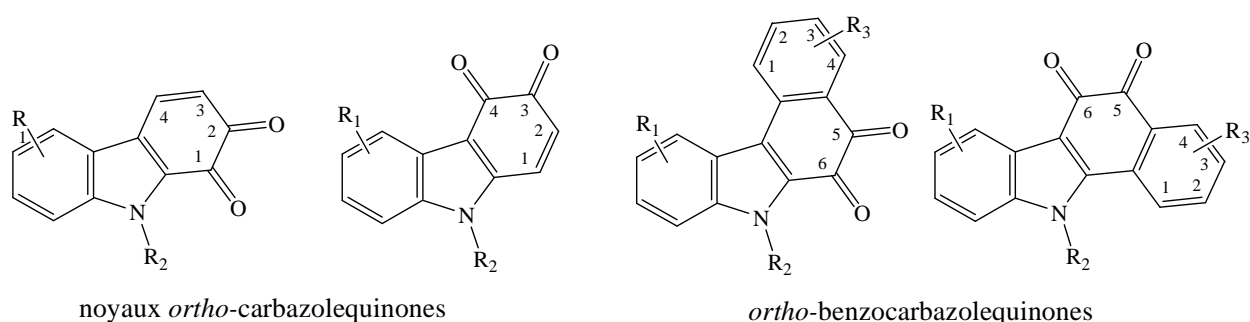
¹⁶ M. Rawat, W.D. Wulff. *Organic Letters*, **2004**, 6 (3), 329 - 332.



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_3 et enfin oxydation par NaIO_4 .

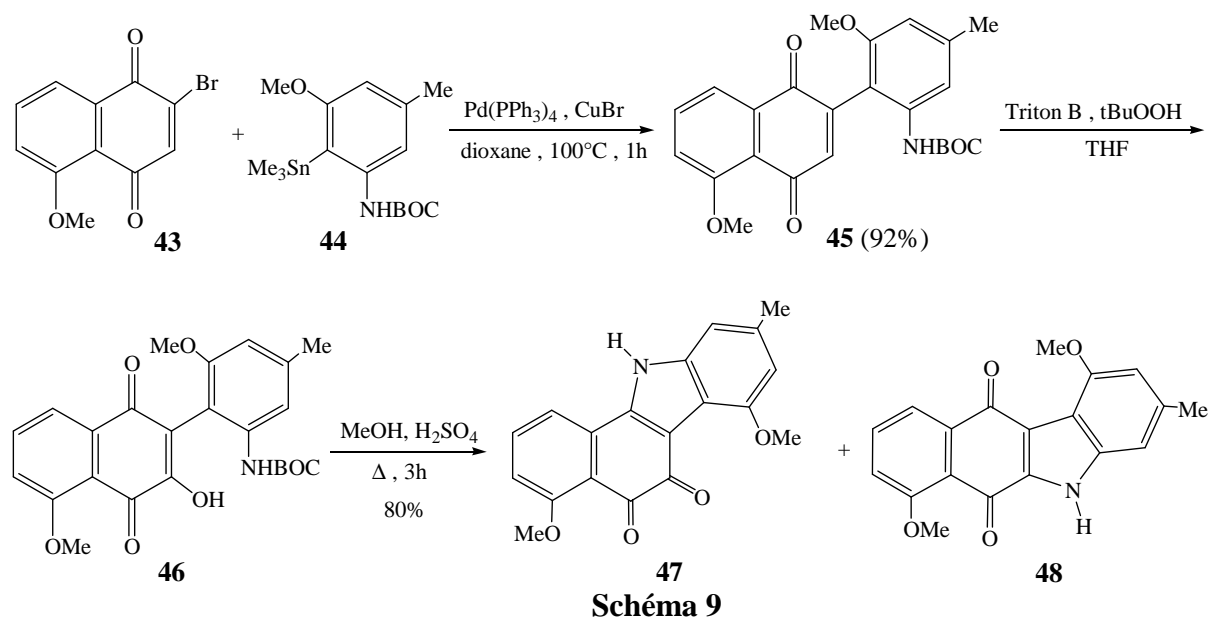
4) Synthèse des benzocarbazole-5,6-diones

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).



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 ¹⁷ consiste en un couplage de la *para*-bromoquinone **43** avec l'organostannane **44**, catalysé par Pd(PPh₃)₄ 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 H₂SO₄ 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 ¹⁸ consiste en une nitroarylation de 2-hydroxy-1,4-naphtoquinones **49**, suivie d'une réduction du groupement NO₂ 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 R₁, R₂ et R₃ (Schéma 10) et (Tableau 1).

¹⁷ A.M. Echavarren, N. Tamayo, O. De Frutos, A. Garcia. *Tetrahedron Letters*, **1997**, 53 (49), 16835 - 16846

¹⁸ K. Kobayashi, T. Taki, M. Kawakita, M. Uchida, O. Morikawa, H. Konishi. *Heterocycles*, **1999**, 51 (2), 349 - 354

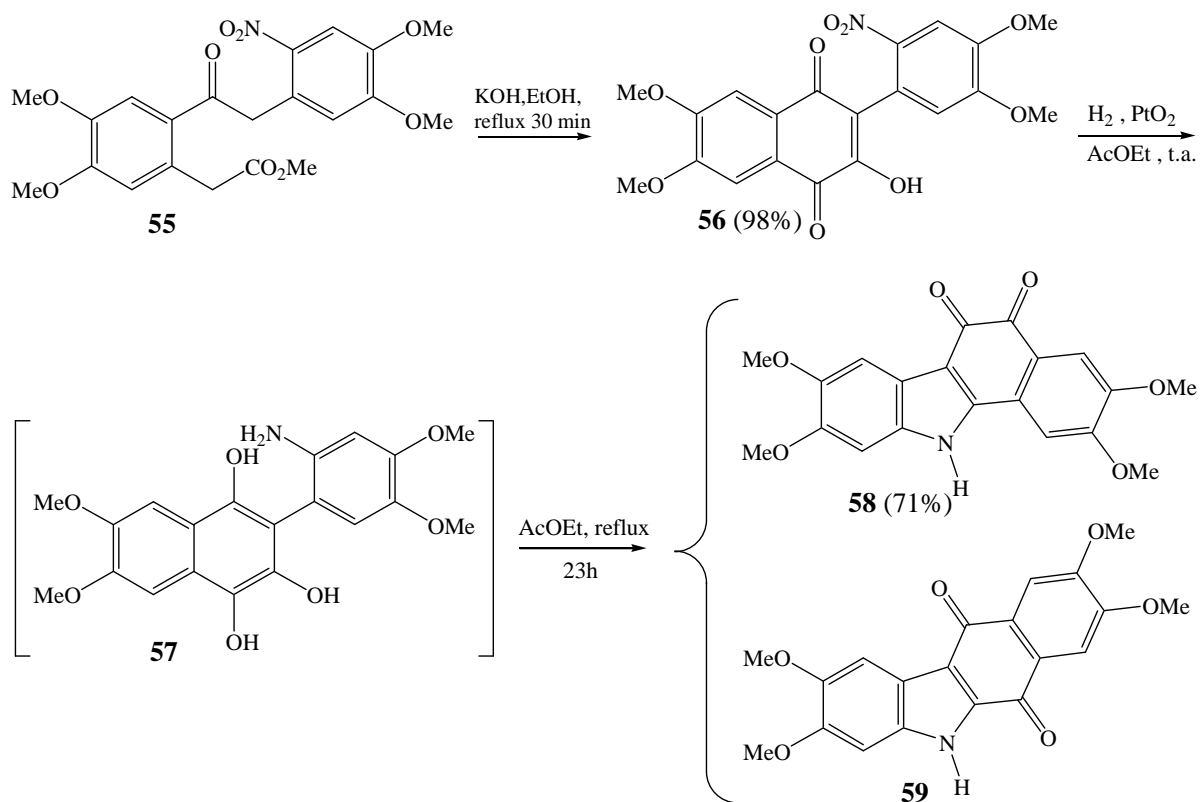


Schéma 11

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 laboratoire²⁰. 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**.

²⁰ V. Bernardes Genisson, P. Nebois, M. Domard, H. Fillion. *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, 48 (6), 893 - 894

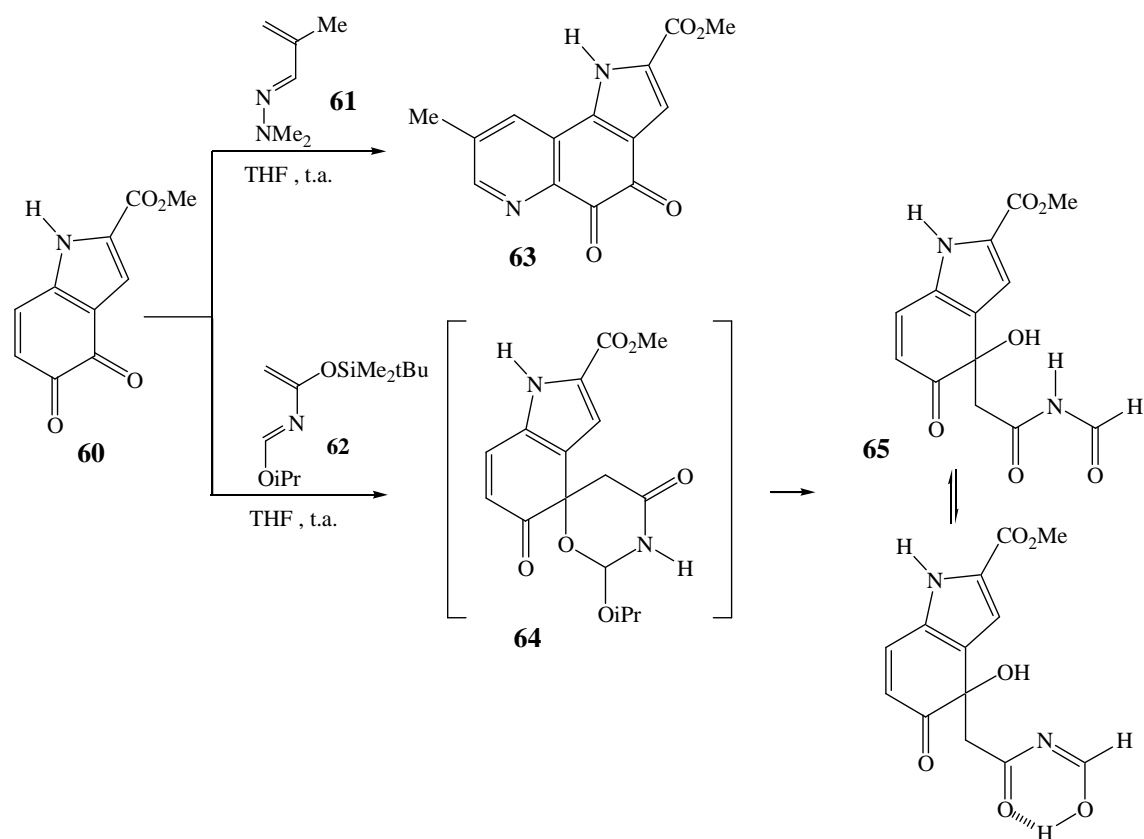


Schéma 12

Cai et al 1990²¹ 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-¹H NOE différentielle.

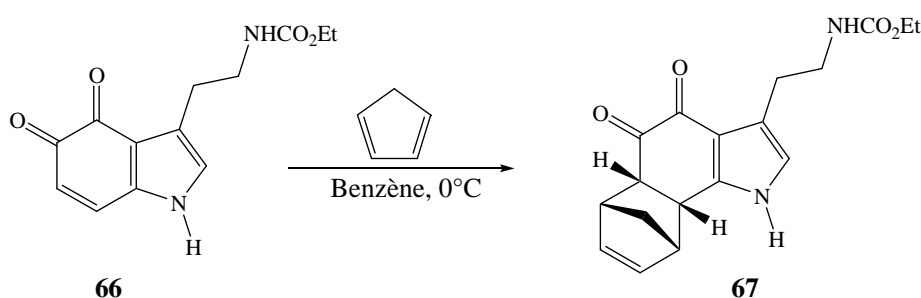


Schéma 13

Somei et al 1995²² 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)cyclohexène (Schéma 14). Dans ces réactions les adduits primaires n'ont pas été isolés et les régioisomères de **72**, **73** et **74**

²¹ P. Cai, J.K. Snyder, J-C. Chen, R. Fine, L. Volicer. *Tetrahedron Letters*, **1990**, 31 (7), 969 - 972

²² M. Somei, Y. Fukui, M. Hasegawa. *Heterocycles*, **1995**, 41 (10), 2157-2160

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

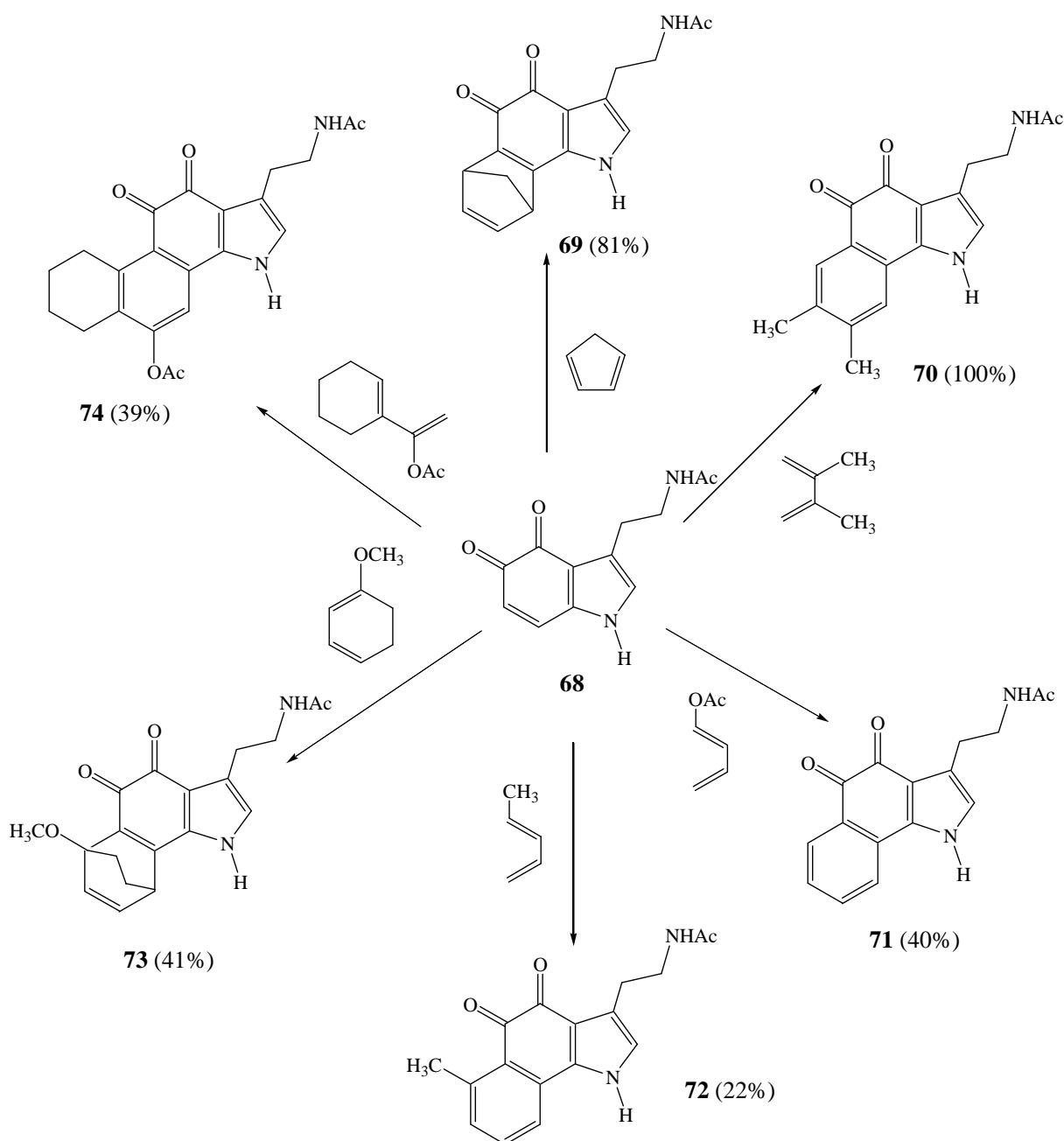


Schéma 14

S. V. Chernov et *al* 2000²³ 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

²³ S.V. Chernov, E.E. Shults, M.M. Shakirov, Y.V. Gatilov, I.Y. Bagryanskaya, G.A. Tolstikov. *Russ. J. Org. Chem.*, **2000**, 36 (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).

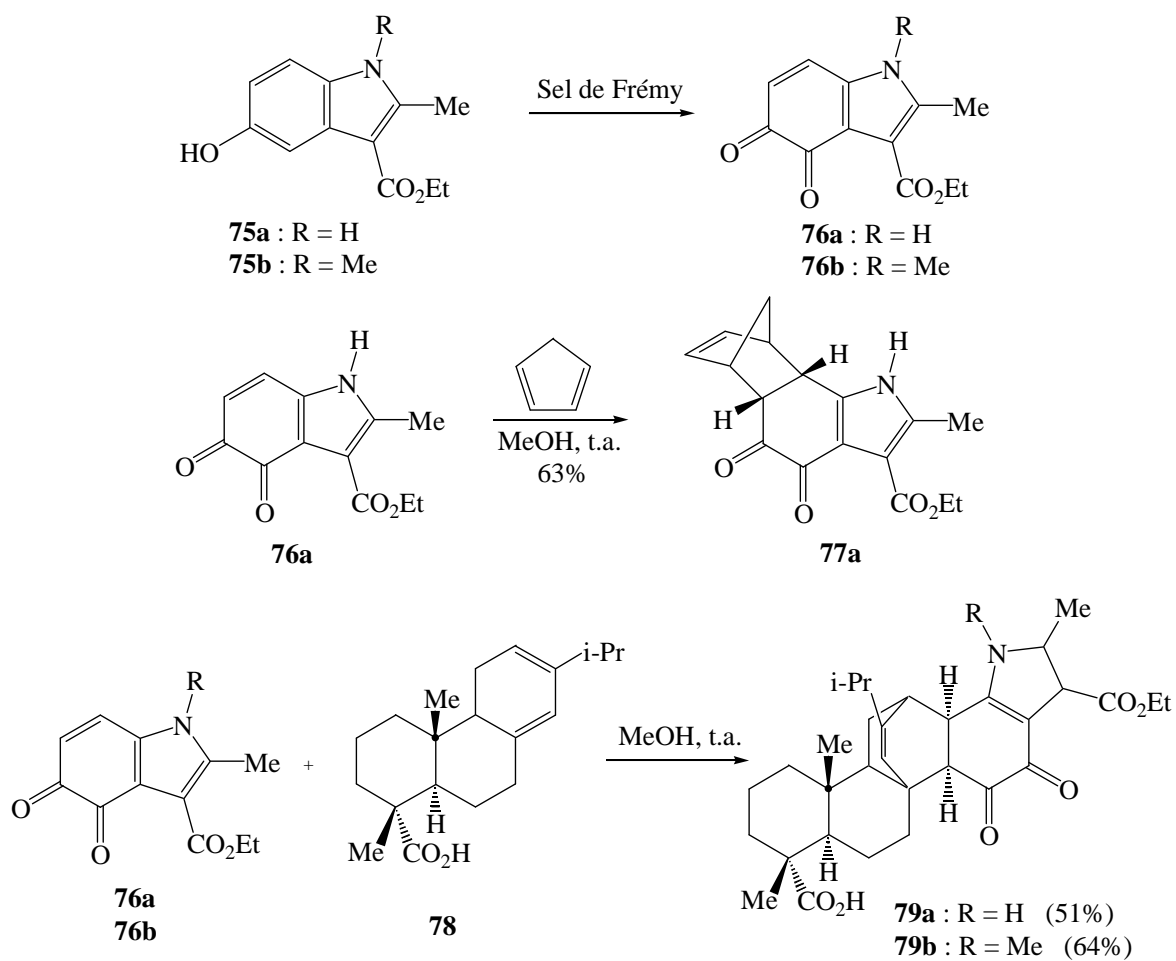


Schéma 15

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 2004²⁴ 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-(9*H*)-carbazole **80b** est obtenu par *N*-méthylation sélective du composé **80a** avec un rendement de 80% (Schéma 16).

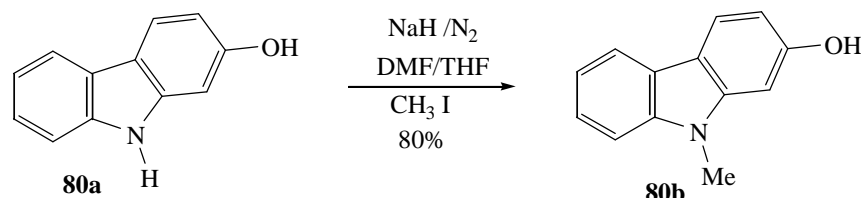


Schéma 16

Nous avons choisi d'effectuer cette alkylation chimiosélective selon la méthode mise au point par Albanese et al²⁵. 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).

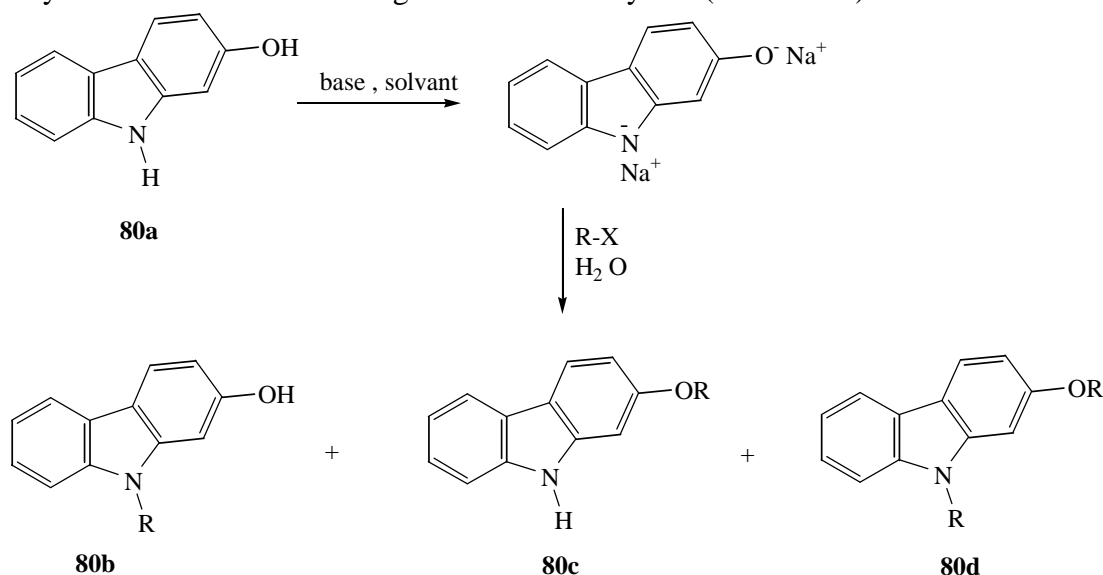


Schéma 17

²⁴ M. Compain-Batissou, D. Latrèche, J. Gentili, N. Walchshofer, Z. Bouaziz. *Chem. Pharm. Bull.*, **2004**, 52 (9), 1114 - 1116

²⁵ D. Albanese, D. Landini, M. Penso, G. Spano, A. Trebicka. *Tetrahedron*, **1995**, 51 (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 Zimmer²⁶ (Schéma 18).

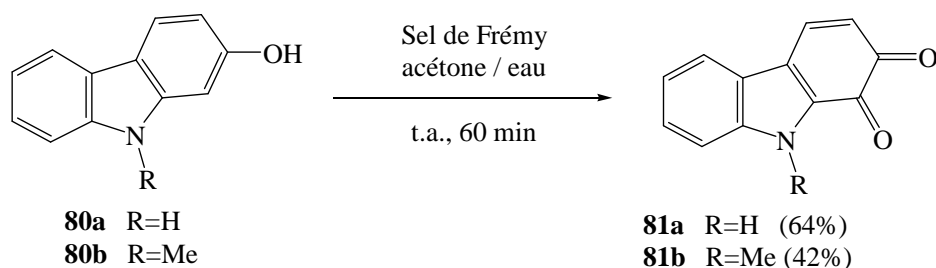


Schéma 18

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

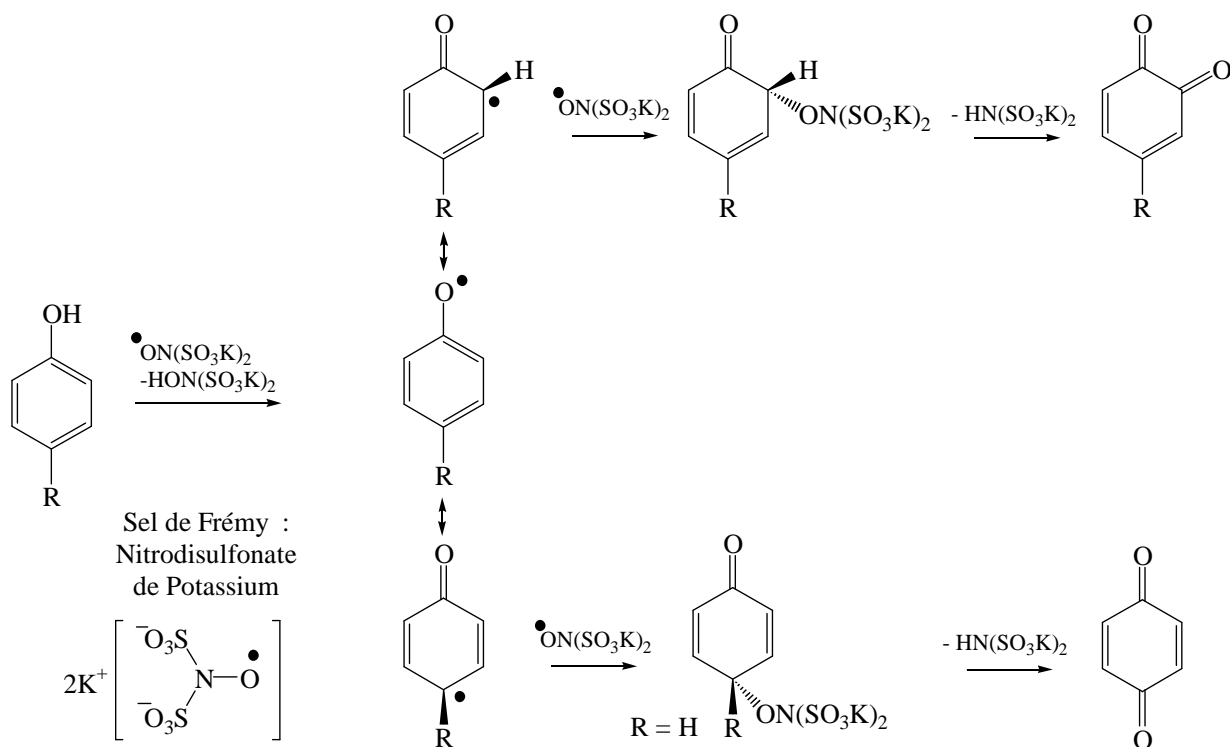


Schéma 19

²⁶ H. Zimmer, D.C. Lankin, S.W. Horgan. *Chem. Rev.*, **1971**, 71 (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,²⁷ ont montré que la N-alkylation de ces dérivés améliore leur solubilité, leur stabilité et de ce fait leur réactivité comme diénoophile 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.

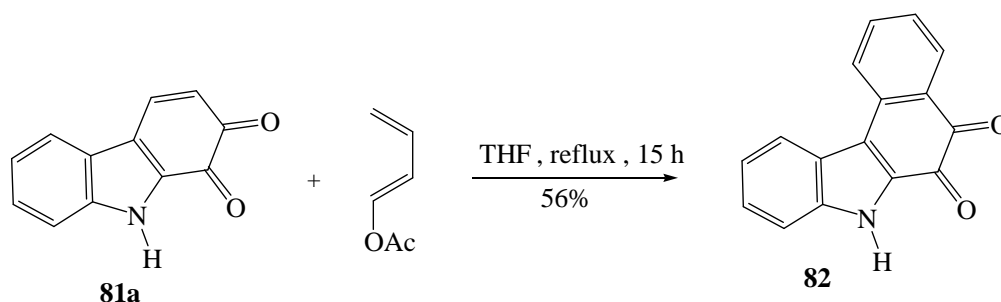


Schéma 20

La réaction avec le cyclopentadiène a été effectuée dans dichlorométhane CH₂Cl₂ à -10°C. Seul le cycloadduit *endo* **83** a été obtenu avec un rendement de 49%.

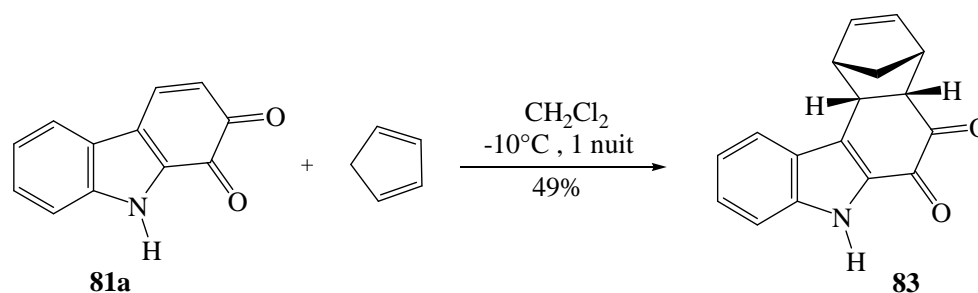
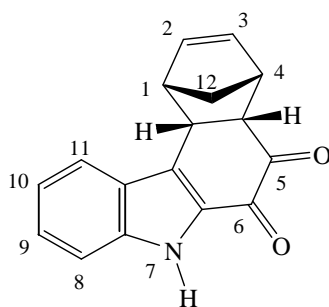


Schéma 21

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

²⁷ A. Poumaroux, Z. Bouaziz, M. Domard, H. Fillion. *Heterocycles*, **1997**, 45 (3), 585 - 596



83
Schéma 22

-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-¹H 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^{28 29 30} que dans les conditions des réactions de Diels-Alder, les *ortho*-quinones présentent des réactivités assez variées. Elles peuvent réagir comme carbodiènes, hétérodiènes, 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 3-aminocarbazole 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).

²⁸ L. Horner, H. Merz. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1950**, 570 (1), 89-120

²⁹ V. Nair, S. Kumar. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1996**, 443 - 447

³⁰ A. M. Echavarren, J. K. Stille. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110 (12), 4051 - 4053

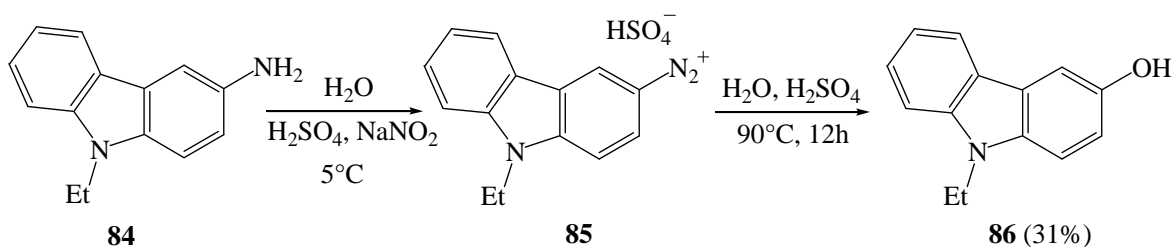


Schéma 23

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

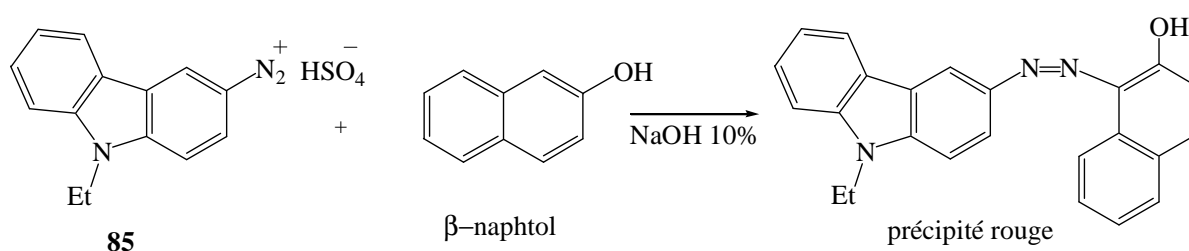


Schéma 24

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* 1973³¹ 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* 1977³² basée sur l'oxydation des radicaux aryles en phénols par les ions cuivres et qui consiste en l'addition de Cu_2O à une solution diluée du sel de diazonium dissous dans une solution contenant un large excès de nitrate de cuivre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. 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.

³¹ D.E. Horning, D.A. Ross, J.M. Muchowski. *Can. J. Chem. / Rev. Can. Chim.*, **1973**, 51 (14), 2347 - 2348

³² T. Cohen, A.G. Dietz Jr., J.R. Miser. *J. Org. Chem.*, **1977**, 42 (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 1971²⁶. Le rendement global pour l'obtention du produit **87** à partir de l'amine **84** est de 16 %.

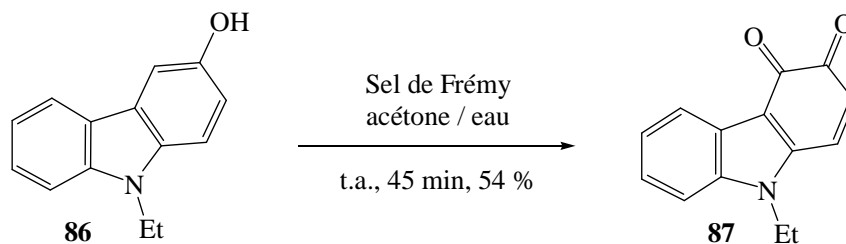


Schéma 25

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 procéderait 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^{33 34}.

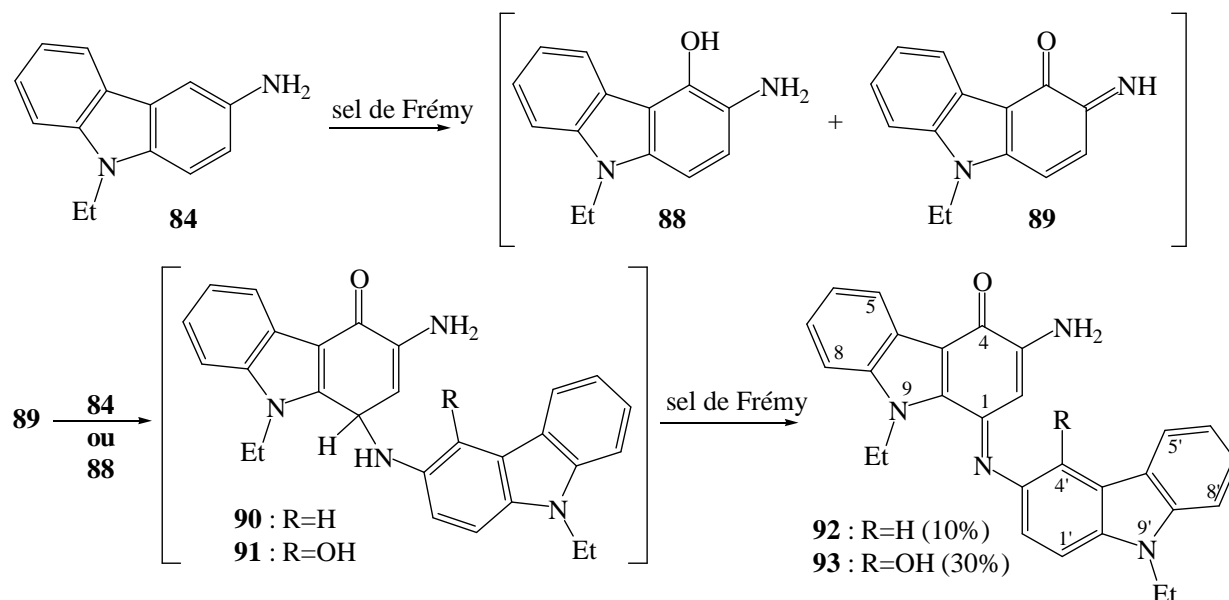
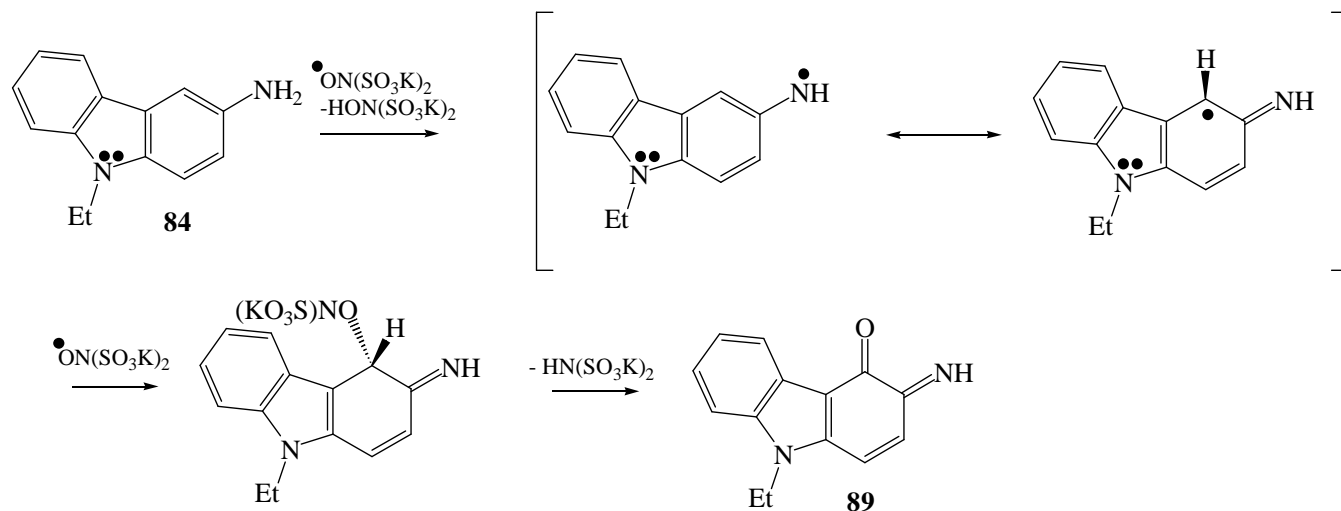


Schéma 26

³³ H.J. Teuber, G. Jellinek. *Chem. Ber.*, **1954**, 87 (12), 1841 - 1848

³⁴ L. Horner, K. Sturm. *Chem. Ber.*, **1955**, 88 (3), 329 - 338

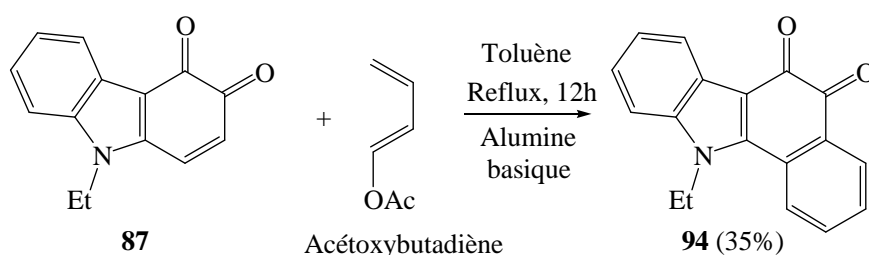
Le mécanisme d'oxydation d'amines aromatiques par le sel de Frémy a été décrit par Zimmer et *al*²⁶. Le radical stabilisé par l'effet mésomère donneur de l'atome d'azote se forme en *ortho* de l'amine primaire aromatique, la position en *para* étant substituée (Schéma 27).



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.



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).

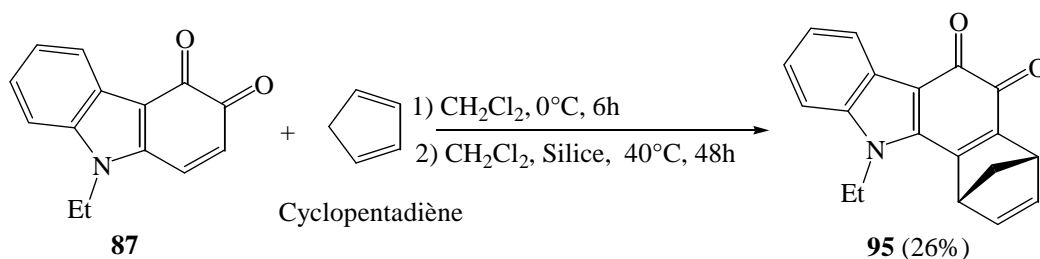


Schéma 29

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 carbazolequinone **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.

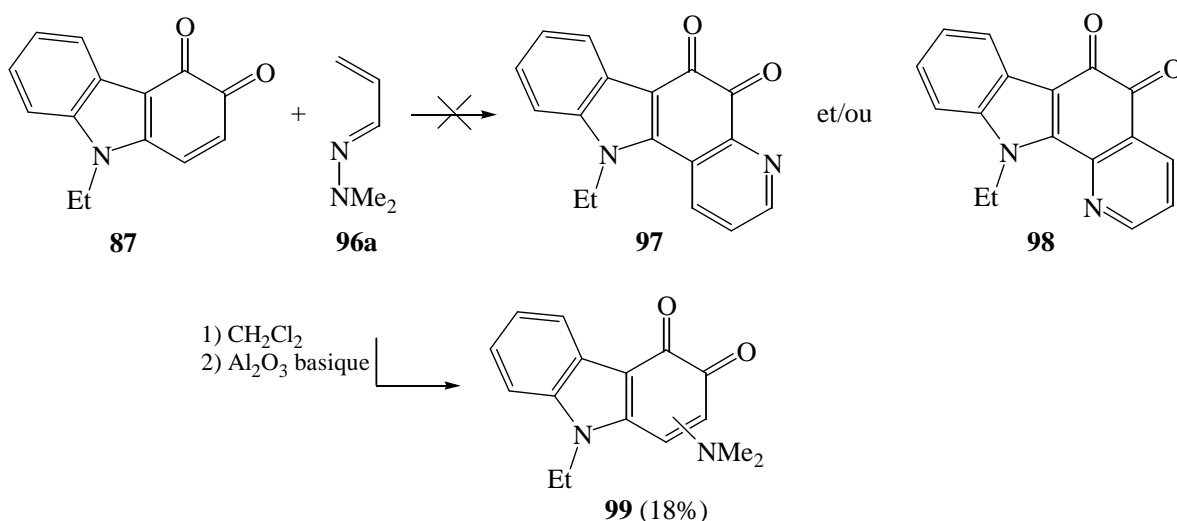


Schéma 30

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

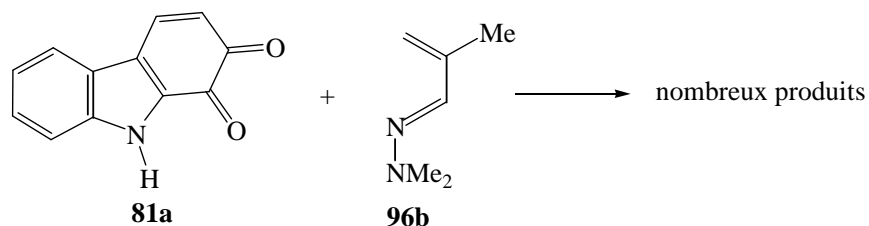


Schéma 31

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.

Tableau 2 : essais de cycloaddition entre **81a** et **96b**.

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

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 1,3-dipolaire entre une *para*-carbazolequinone et un oxyde de nitrile ou un azoture pour accéder à des molécules tétracycliques, répondant respectivement aux structures isoxazolo-carbazolequinone 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*^{35 36 37 38 39} et *M. koenigii*^{40 41} 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 oedèmes³⁶. *Clausena excavata* est utilisée pour soigner les douleurs abdominales, les morsures de serpents et comme agent de désintoxication^{42 43}. Le schéma 32 illustre les principaux alcaloïdes qui ont été isolés.

³⁵ H. Furukawa, T.S. Wu, T. Ohta, C.S. Kuoh. *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, 33 (10), 4132 - 4138

³⁶ T.S. Wu, T. Ohta, H. Furukawa, C.S. Kuoh. *Heterocycles*, **1983**, 20 (7), 1267 - 1269

³⁷ C. Ito, M. Nakagawa, T.S. Wu, H. Furukawa. *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39 (10), 2525 - 2528

³⁸ H. Furukawa, M. Yogo, C. Ito, T.S. Wu, C.S. Kuoh, *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, 33 (3), 1320 - 1322

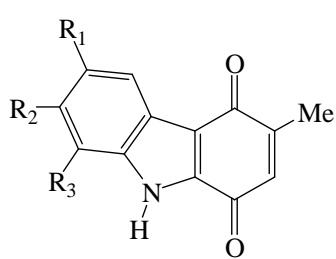
³⁹ C. Ito, T.S. Wu, H. Furukawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 36 (7), 2377 - 2380

⁴⁰ C. Ito, Y. Thoyama, M. Omura, I. Kajiura, H. Furukawa. *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, 41 (12), 2096 - 2100

⁴¹ C. Saha, B.K. Chowdhury. *Phytochemistry*, **1998**, 48 (2), 363 - 366

⁴² T.S. Wu, S.C. Huang, P.L. Wu, K.H. Lee. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 4 (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. *Tetrahedron*, **1999**, 55 (47), 13513 - 13520



$R_1 = R_2 = R_3 = H$: Murrayaquinone A (*M. euchristifolia*)³⁵

$R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = \text{prényle}$: Murrayaquinone B (*M. euchristifolia*)^{35, 36}

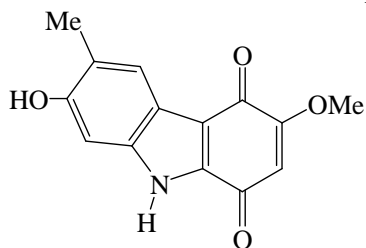
$R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = \text{géranyle}$: Murrayaquinone C (*M. euchristifolia*)³⁵

$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = \text{géranyle}$: Murrayaquinone D (*M. euchristifolia*)³⁵

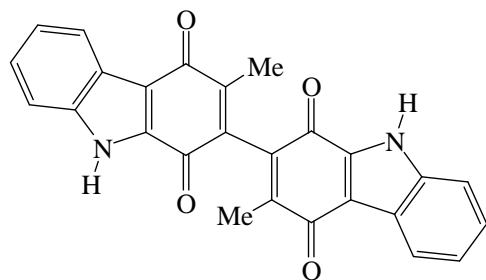
$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = \text{prényle}$: Murrayaquinone E (*M. euchristifolia*)³⁷

$R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = H$: Koeniginequinone A (*M. koenigii*)⁴¹

$R_1 = OMe, R_2 = OMe, R_3 = H$: Koeniginequinone B (*M. koenigii*)⁴¹

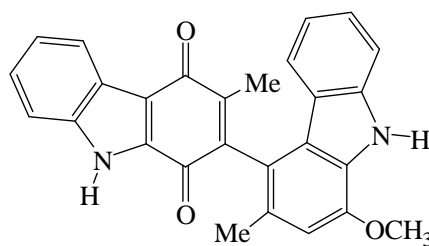


Clausenaquinone A (*Clausena excavata*)⁴²



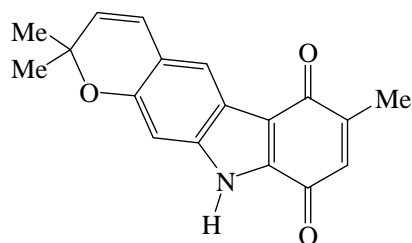
Bismurrayaquinone A

(*M. koenigii*)⁴⁰



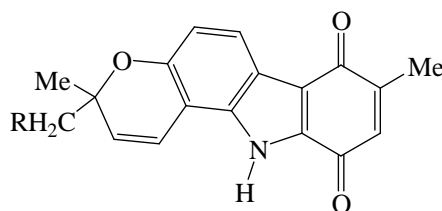
Bikoeniginequinone A

(*M. koenigii*)⁴⁰



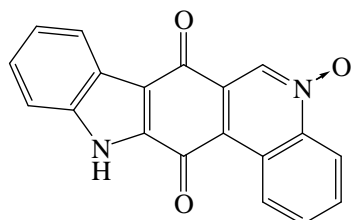
Pyrayaquinone A

(*M. euchrestifolia*)³⁸



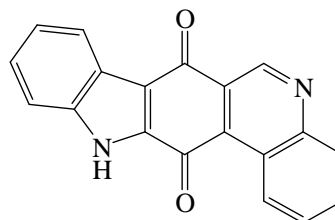
$R = H$: Pyrayaquinone B (*M. euchrestifolia*)³⁸

$R = \text{prényle}$: Pyrayaquinone C (*M. euchrestifolia*)³⁹



Calothrixine A

(*Calothrix cyanobacteria*)⁴³



Calothrixine B

(*Calothrix cyanobacteria*)⁴³

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 ⁴⁴. 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 % CI₅₀ respectivement à 2,58 et 3,85 µg/mL ⁴⁵. *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 CI₅₀ de 34 et 35 µg/ml à 24h. Ces tests ont permis de confirmer le rôle dans la dysenterie, mais ils réfutent le rôle de stimulant ou d'antidiabétique ⁴⁶.

La clausenaquinone A a montré une forte activité inhibitrice de l'agrégation plaquettaire chez le lapin : 100 % d'inhibition à 10 µg/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 µg/mL ³⁹.

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* ⁴⁷.

Les calothrixines A et B inhibent la croissance d'une lignée chloroquinorésistante de *Plasmodium falciparum* avec une valeur de CI₅₀ 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 CI₅₀ de 40 ± 9 nM et 350 ± 82 nM respectivement ⁴³.

La calothrixine A a montré également une activité inhibitrice de l'ARN polymérase d'*Escherichia coli* ⁴⁸. 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.

⁴⁴ K. Takeya, M. Itoigawa, H. Furukawa. *Eur. J. Pharmacol.*, **1989**, 169 (1), 137 - 145

⁴⁵ M. Itoigawa, Y. Kashiwada, C. Ito, H. Furukawa, Y. Tachibana, K.F. Bastow, K.-H. Lee. *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, *Pharmaceutical Biology*, **2004**, 42 (8), 610 - 620

⁴⁷ S. Tasler, G. Bringmann. *The Chemical Record*, **2002**, 2 (2), 114 - 127

⁴⁸ N.T. Doan, P.R. Stewart, G.D. Smith. *FEMS Microbiology Letters*, **2001**, 196 (2), 135 - 139

Elle a montré une activité pro-apoptotique sur les cellules cancéreuses humaines Jurkat⁴⁹ qui sont des cellules lymphocytaires T. Cette activité est temps et concentration dépendante. La CI₅₀ pour la calothrixine A a été mesurée 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 plasmiques (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 CI₅₀ 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 CI₅₀ < 1,6 µM sont facilement réduites en semiquinones correspondantes⁵⁰.

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 antitumorales 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.

⁴⁹ X. Chen, G.D. Smith, P. Waring, J. Appl. *Phycol.*, **2003**, 15 (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. *J. Med. Chem.*, **2004**, 47 (20), 4958 - 4963

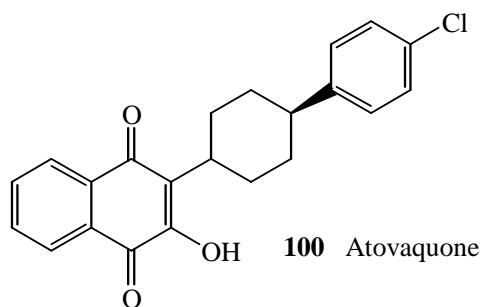


Schéma 33

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**⁵¹ (Schéma 34).

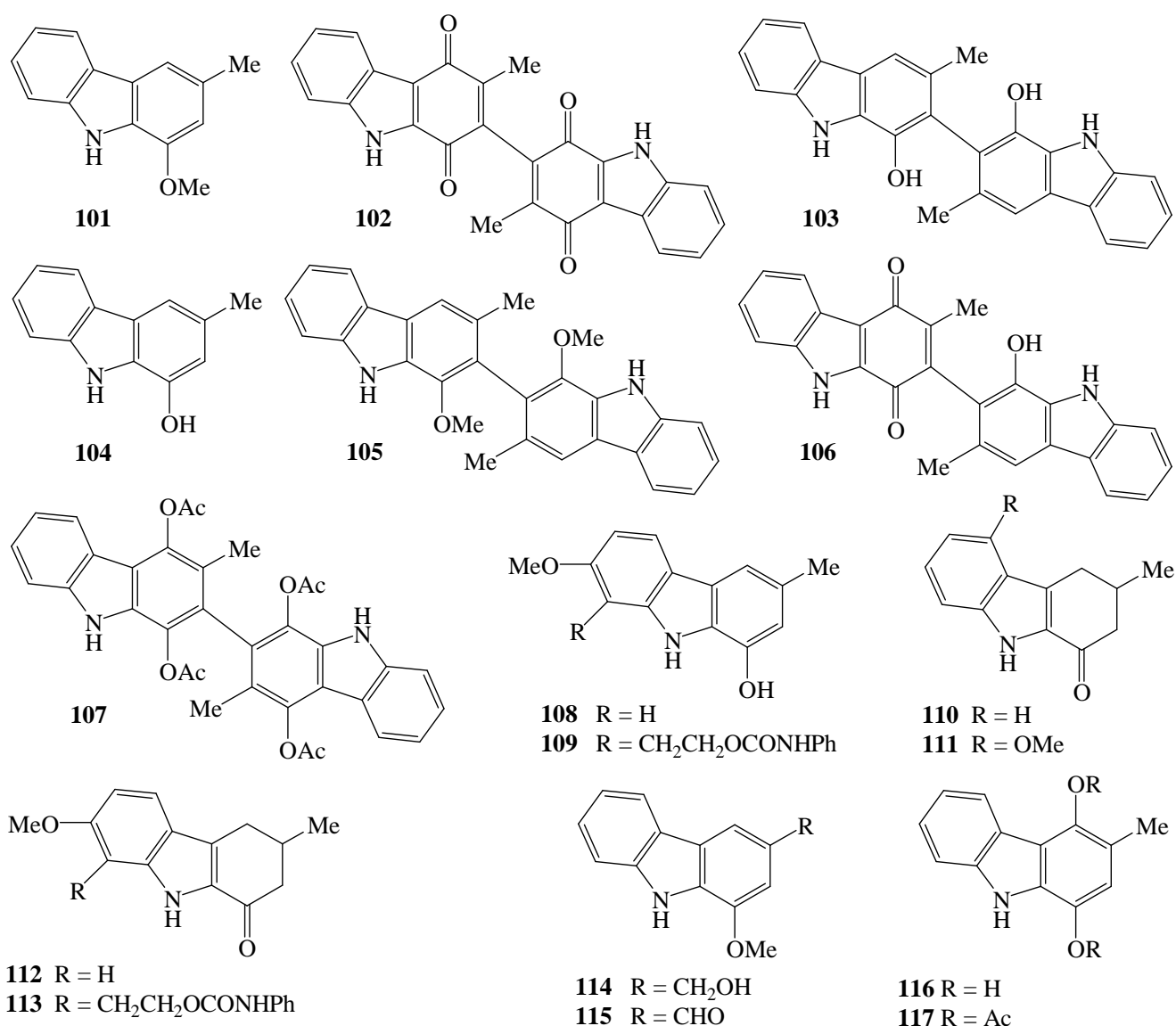


Schéma 34

⁵¹ G. Bringmann, A. Ledermann, J. Holenz, M.T. Kao, U. Busse, H.G. Wu, G. Francois, Guido. *Planta Medica*, **1998**, 64 (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. ⁵². 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.

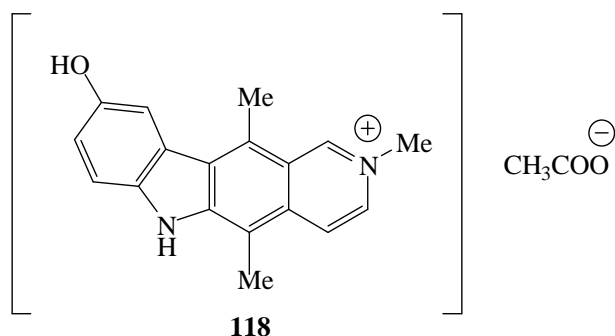


Schéma 35

L'équipe de Asche 2005 ⁵³ 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

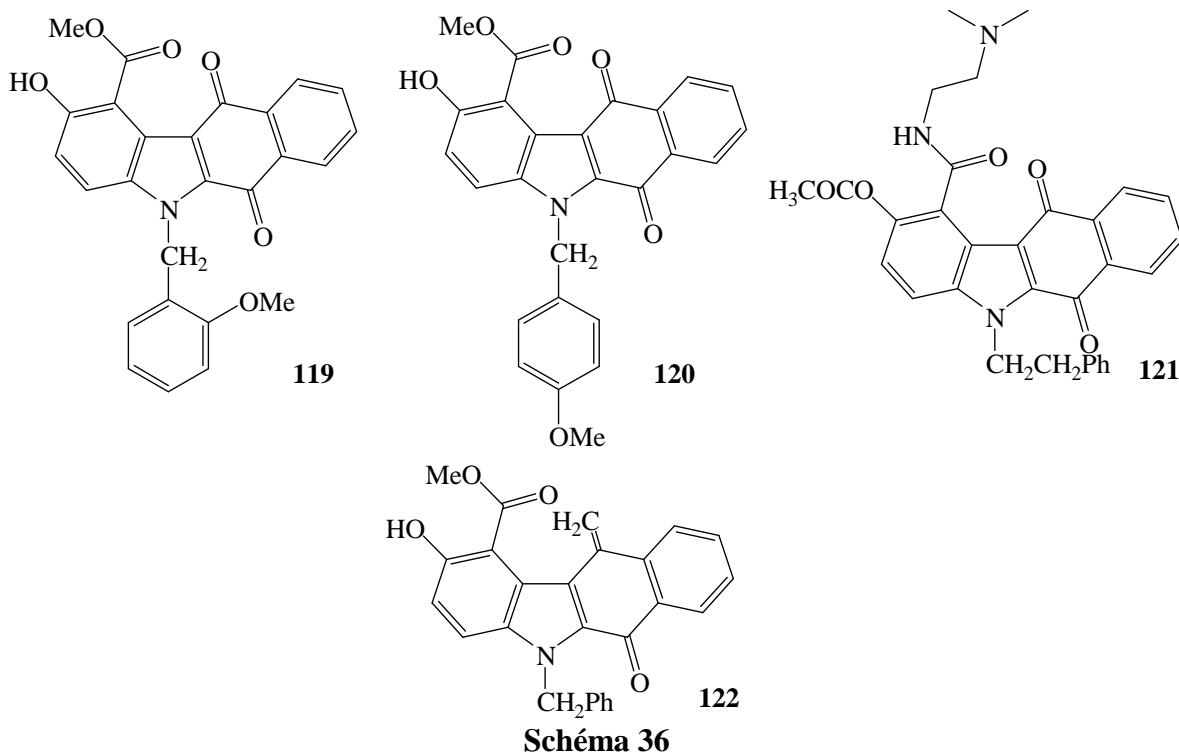


Schéma 36

⁵² Dossier du CNHIM 2004, XXV, 4-5, Anticancéreux : utilisation pratique (5^{ème} édition)

⁵³ C. Asche, W. Frank, A. Albert, U. Kucklaender. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2005**, 13 (3), 819-837.

La daunomycine **123** est un produit antibiotique cytotoxique, de la famille des anthracyclines. L'équipe de Tamura 1987⁵⁴ a synthétisé des analogues de la daunomycine **123** en introduisant un cycle carbazolequinone : c'est le composé **124**.

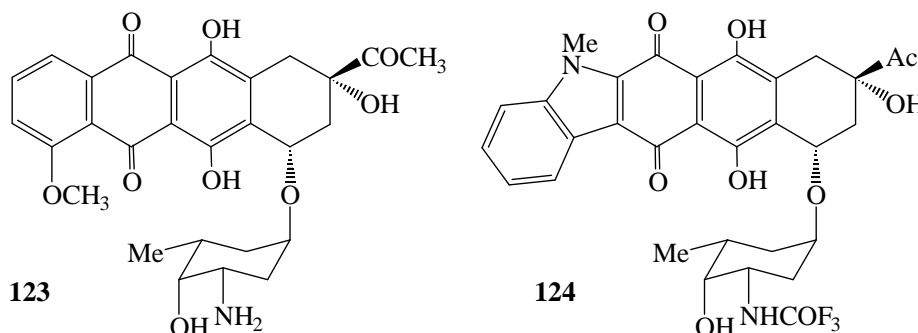


Schéma 37

Concernant l'activité anti-bactérienne, plusieurs équipes ont synthétisé des dérivés carbazoles quinones actifs. L'équipe de Hammam 1978⁵⁵ 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 1978⁵⁶ a synthétisé des thiazolocarbazolequinones **126** à **133** qui se sont révélés être bactéricides contre les bactéries gram + et gram -.

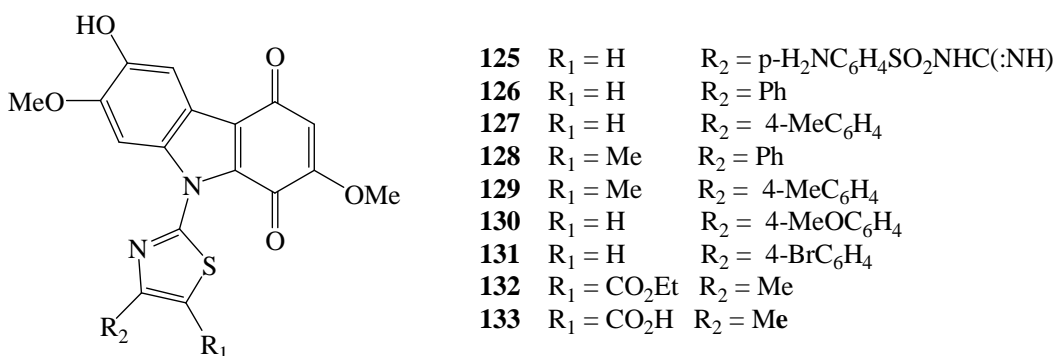


Schéma 38

L'équipe de Doan^{48 57} 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 conséquent la synthèse des protéines de *Bacillus subtilis*. La calothrixine A inhibent la répllication 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

⁵⁴ Y. Tamura, M. Kirihara, M. Sasho, S. Akai, J. Sekihachi, R. Okunaka, Y. Kita. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1987**, 19, 1474-1476.

⁵⁵ A.S. Hammam, M.A. Eldawy. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1978**, 17 (2), 145-152

⁵⁶ A.S. Hammam, H.S. El-Kashef. *Fac Revue Roumaine de Chimie*, **1978**, 23 (4), 587-593

⁵⁷ N.T. Doan, R.W. Rickards, J.M. Rothschild, G.D. Smith. *Journal of Applied Phycology*, **2000**, 12 (3-5), 409-416

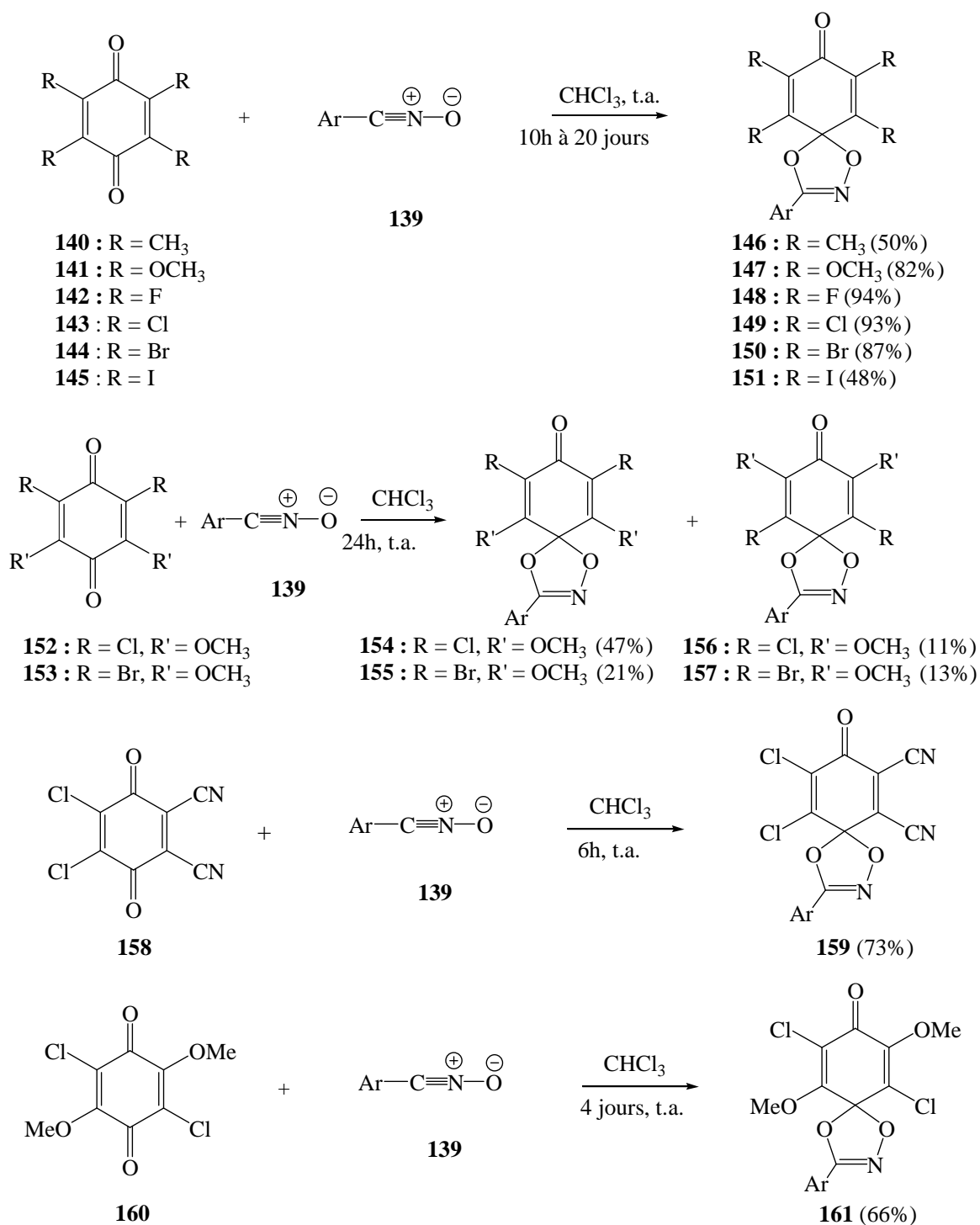
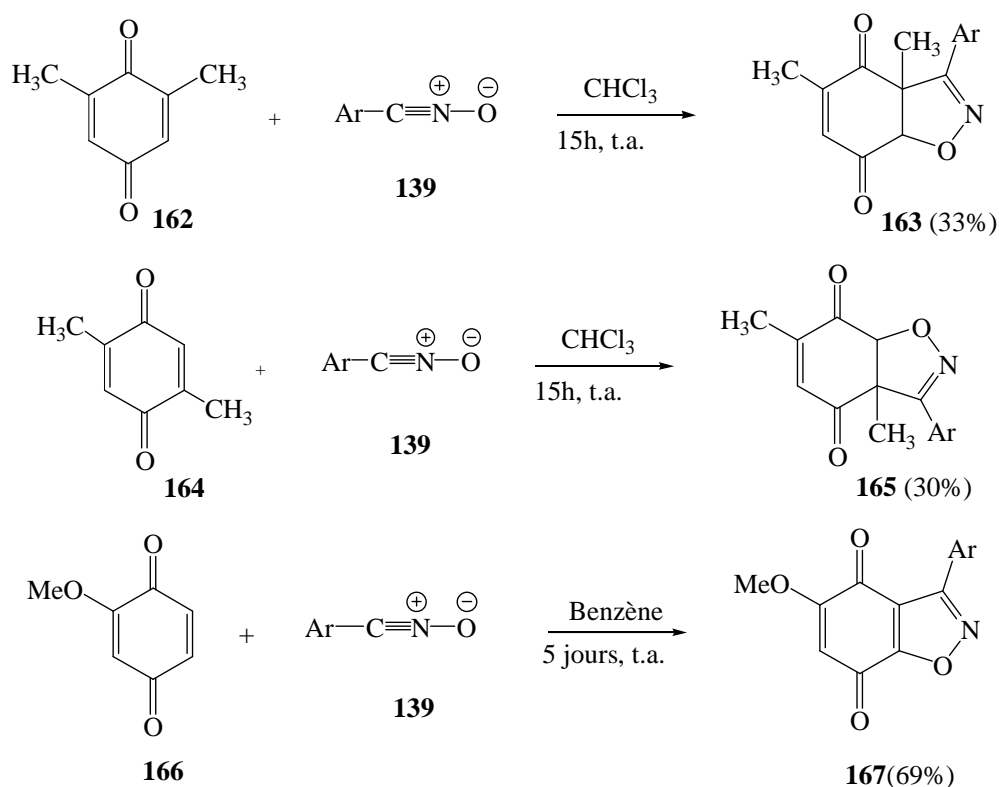


Schéma 40

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).

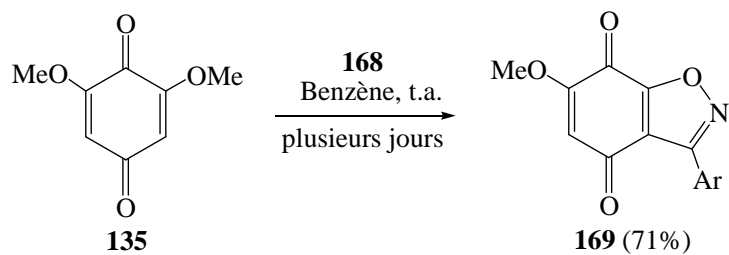


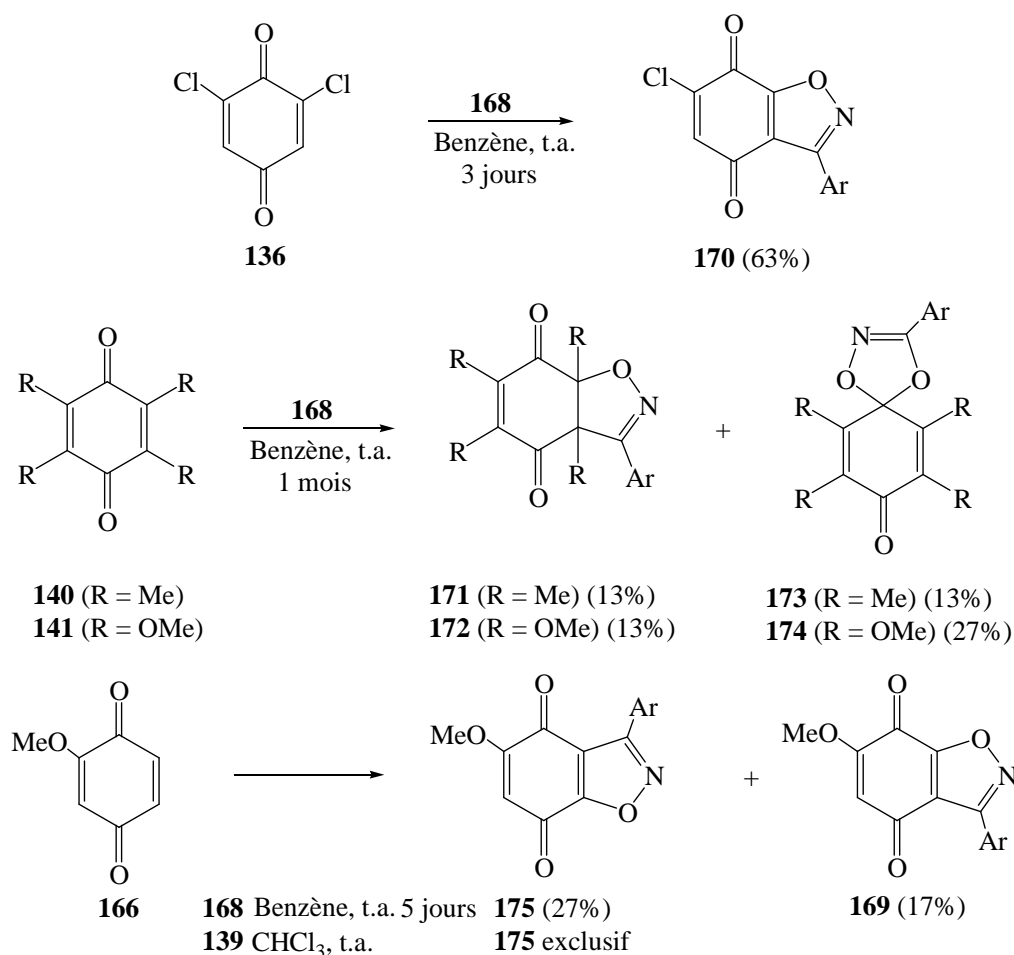
Ces mêmes auteurs ont également effectué des réactions de cycloaddition entre certaines de ces *p*-benzoquinones et l'oxyde de 2,6-dichlorobenzonitrile **168**. Ils ont obtenu des résultats assez différents que ceux obtenus avec l'oxyde de nitrile **139**.

- 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*⁶³ 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 Cl₂ en milieu basique (Schéma 43).

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

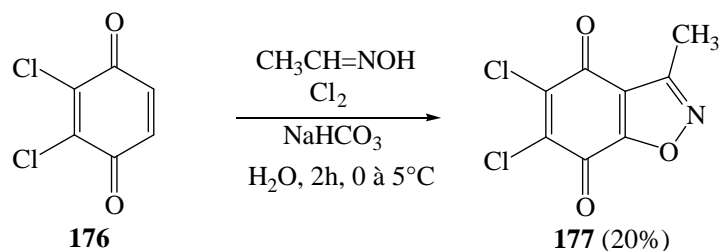


Schéma 43

G. Brahmeshwari et *al* 1991⁶⁴ 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).

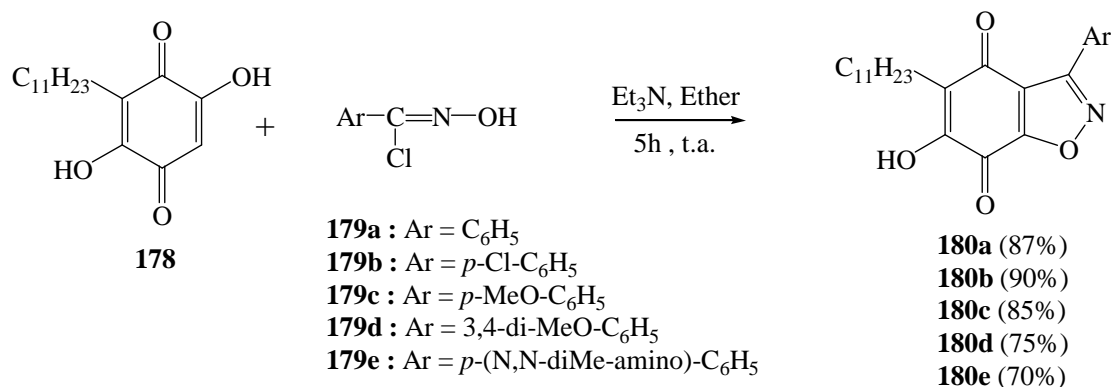


Schéma 44

Cette même équipe 1995⁶⁵ a par la suite synthétisé des isoxazonaphtoquinones **182 a-e**, à partir de l'hydroxynaphtoquinone **181** et les mêmes oxydes de nitrile que précédemment (Schéma 45).

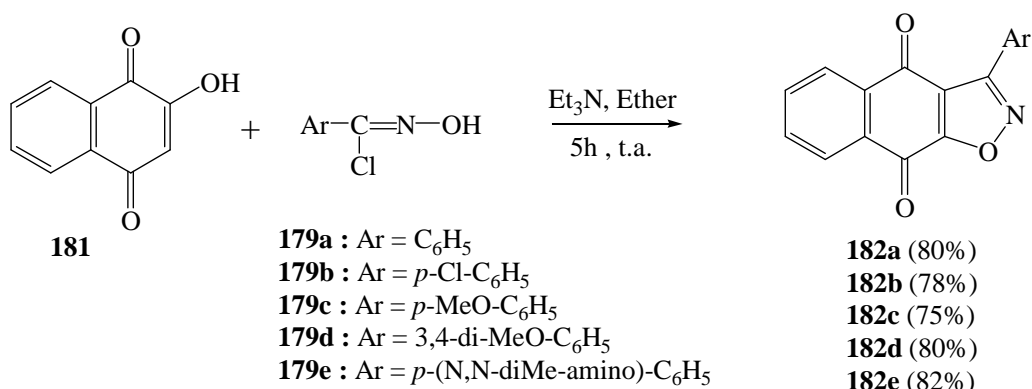


Schéma 45

⁶⁴ G. Brahmeshwari, S. Ramadevi, M.S. Rao, T.V. Padmanabha Rao. *Indian Journal of Chemistry*, **1991**, 30B, 369 - 370

⁶⁵ G. Brahmeshwari, V.R. Rajeswar Rao, T.V. Padmanabha Rao. *Indian Journal of Chemistry*, **1995**, 34B, 139 - 140

F. Farina *et al* 1995⁶⁶ 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).

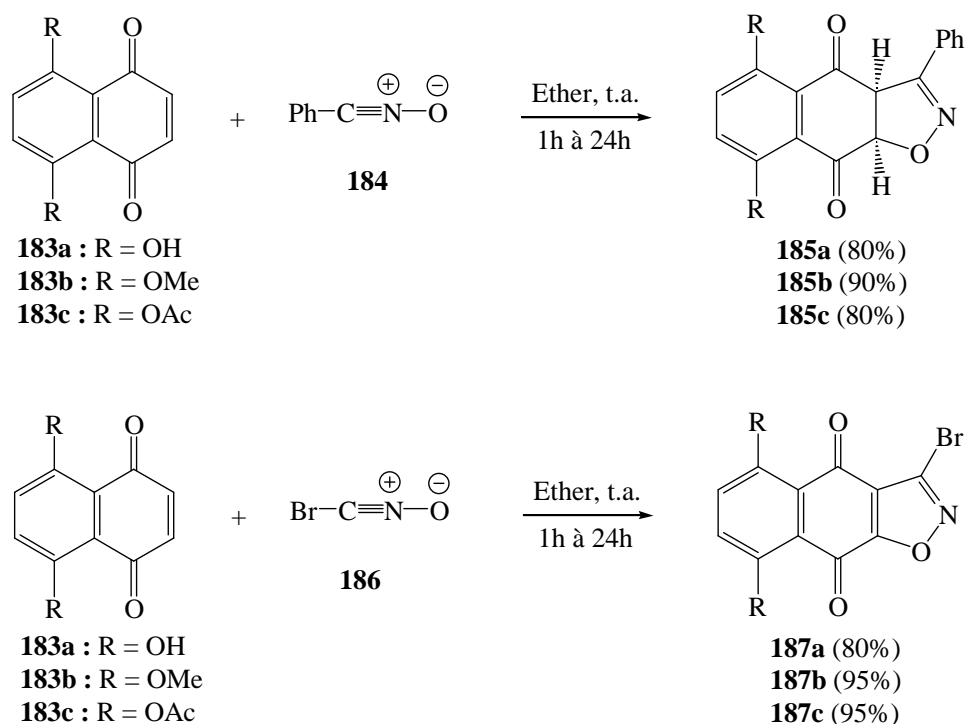


Schéma 46

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^1 , notamment sur le déplacement du proton de la fonction OH en position R_1 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^1 , d'un système AB entre 4,9 ppm et 5,5 ppm avec une constante de couplage de 10 Hz.

⁶⁶ F.Farina, M.V. Marin, M.Munoz, M.C. Paredes, R. Rodriguez. *Heterocycles*, **1995**, 40 (1), 413 - 424

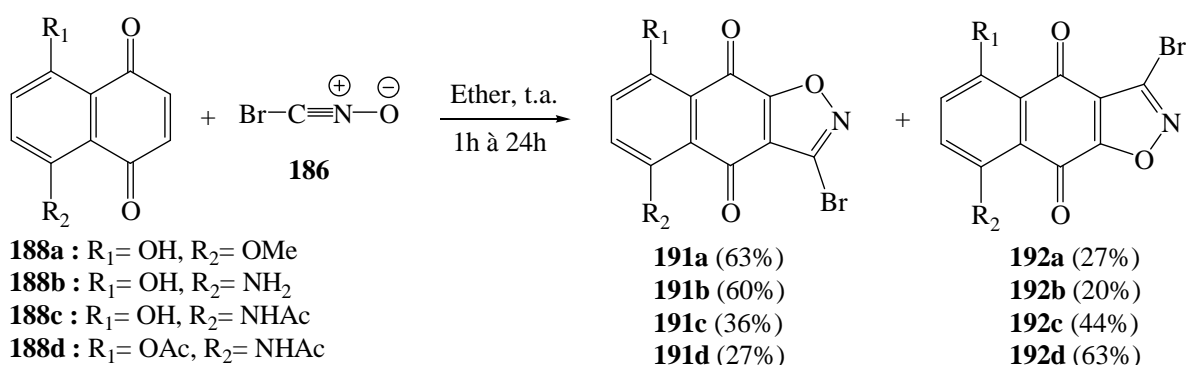
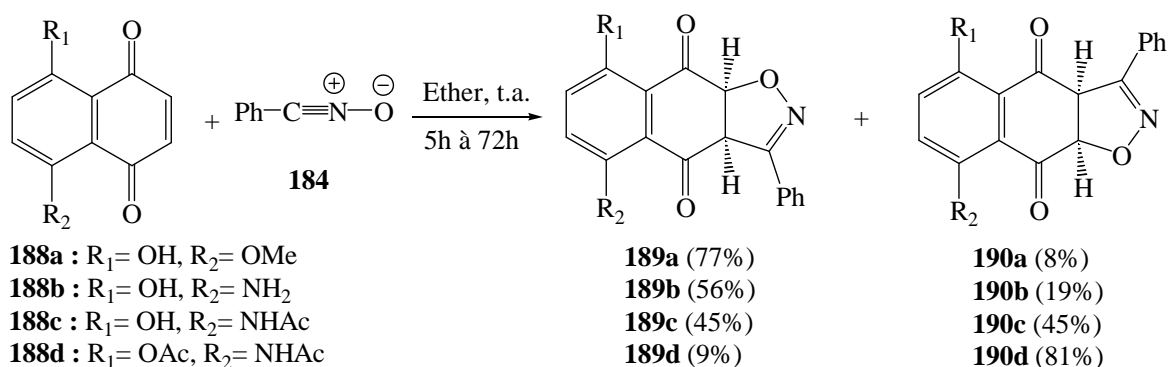


Schéma 47

B. Venugopalan et *al*⁶⁷ 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 isoxazoloquinolinequinone, 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 isoxazoloquinolinequinones **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.

⁶⁷ B. Venugopalan, S.Suresh Iyer, P.Jayant Karnik, N.J de Souza. *Heterocycles*, **1987**, 26 (12), 3173 - 3180

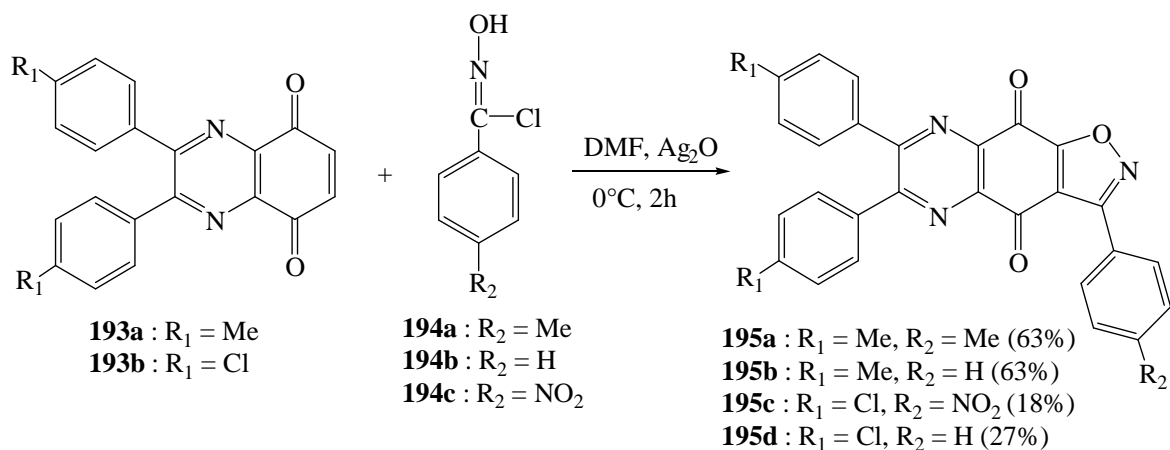


Schéma 48

J.L. Stevens et al 2003⁶⁸ 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).

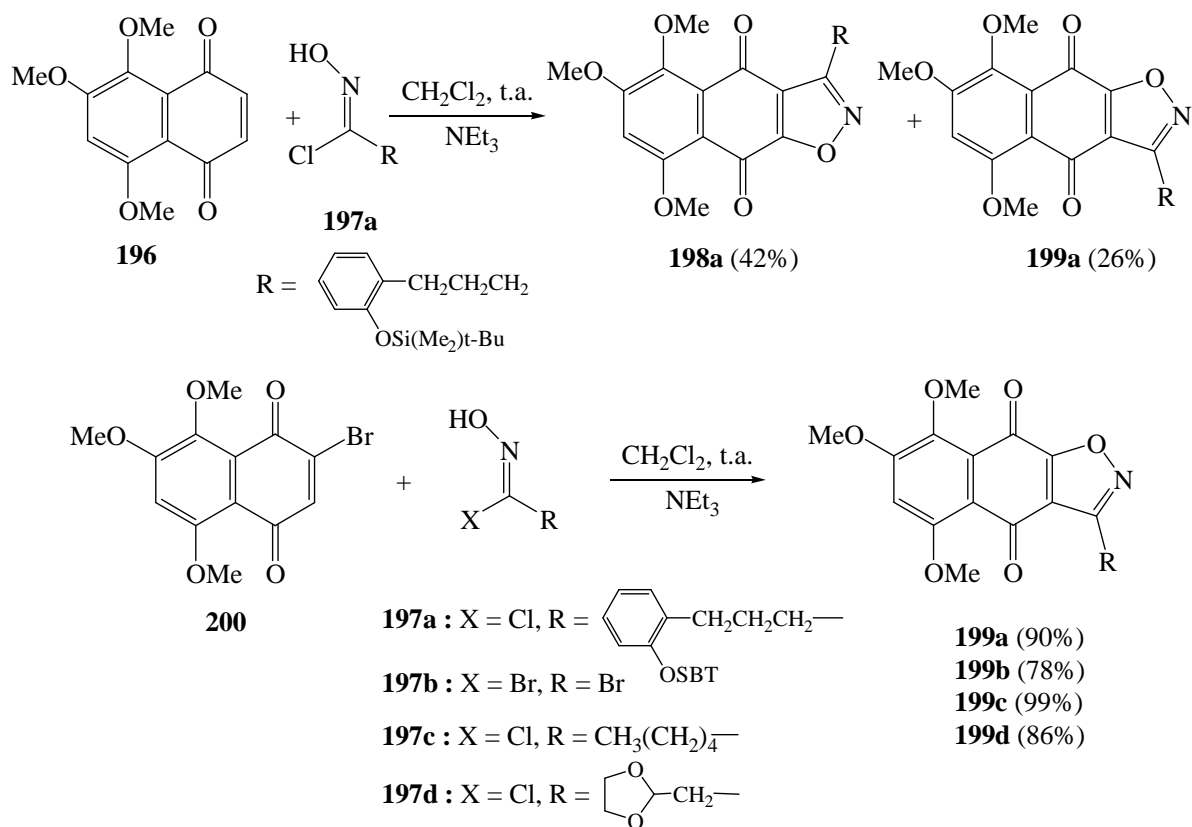


Schéma 49

⁶⁸ J.L. Stevens, T.D. Welton, J.P. Deville, V. Behar. *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44 (49), 8901 - 8903

5) Cycloaddition de *para*-quinones avec les azotures

G. Alonso et *al* 1978⁶⁹ 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 ¹H ou de spectroscopie UV n'ont pas permis aux auteurs de déterminer la structure exacte de ce régioisomère (Schéma 50).

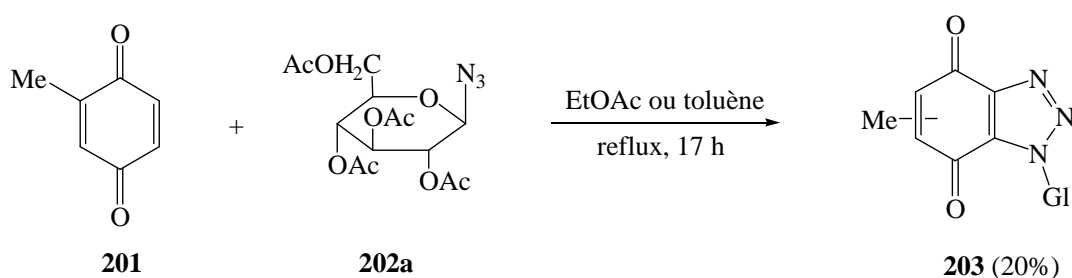


Schéma 50

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 naphtotriazole-diones **205**. Au reflux de l'acétate d'éthyle pendant 17 heures, elle donne un mélange de produits de structures différentes : les naphtotriazole-diones **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 N₂. Cette élimination étant favorisée par de hautes températures.

⁶⁹ G. Alonso, M. Fuertes, M.T. Garcia-Lopez, F.G. de las Heras, J.M. Infante, M. Stud. *Eur. J. Med. Chem.-Chimica terapeutica*, **1978**, 13 (2), 155 - 160

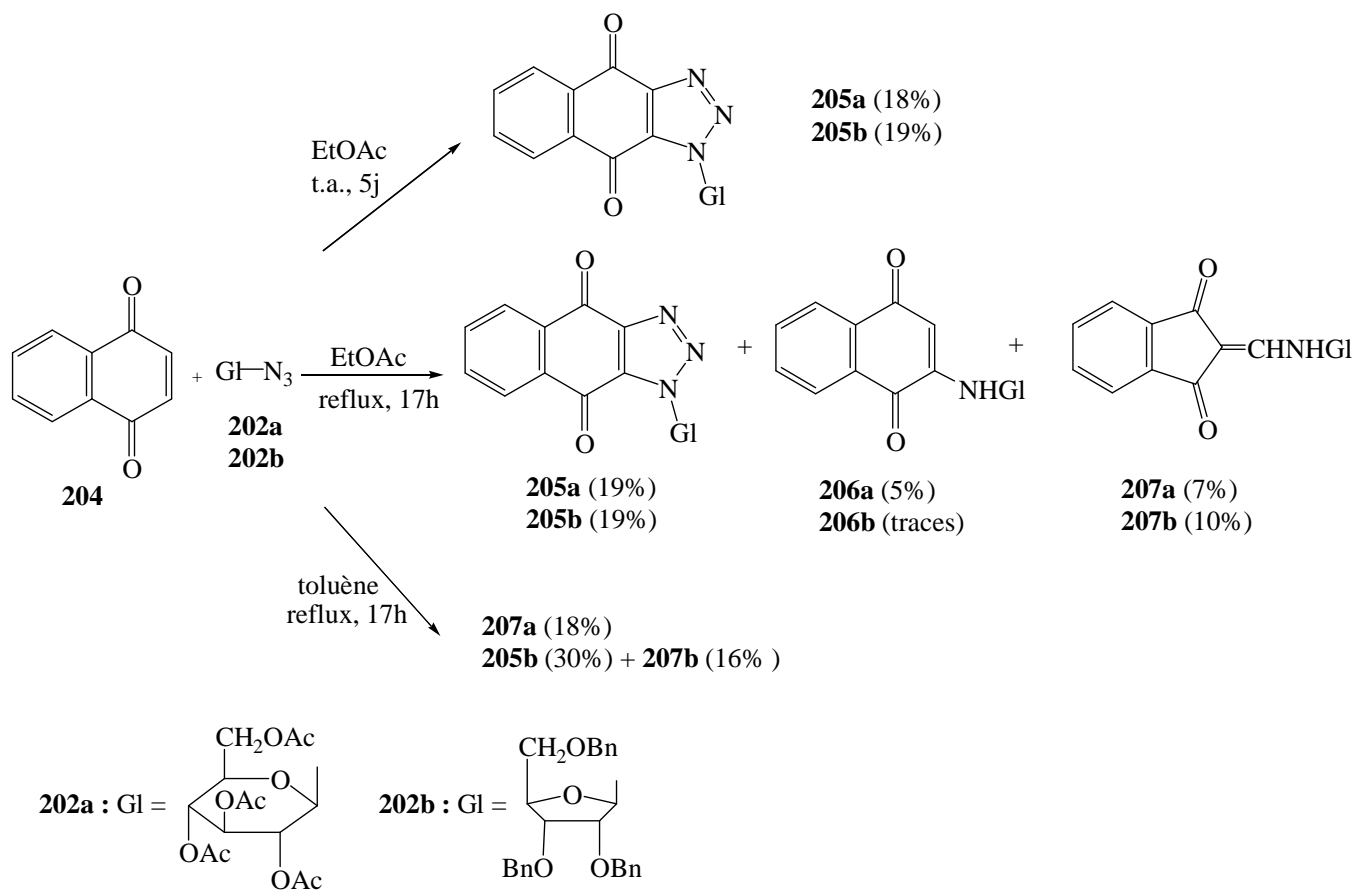


Schéma 51

D. R. Buckle et *al* 1983⁷⁰ ont préparé des naphtotriazoles 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 naphthoquinones **204** et **208** avec l'azoture **209**. Les dérivés **210a** et **210b** initialement formés sont ensuite débenzylés par l'acide trifluoroacétique pour donner les naphtotriazoles recherchés **211a** et **211b** (Schéma 52).

⁷⁰ R. Buckle, H. Smith, B.A. Spicer, J.M. Tedder. *J. Med. Chem.*, **1983**, 26 (5), 714 - 719

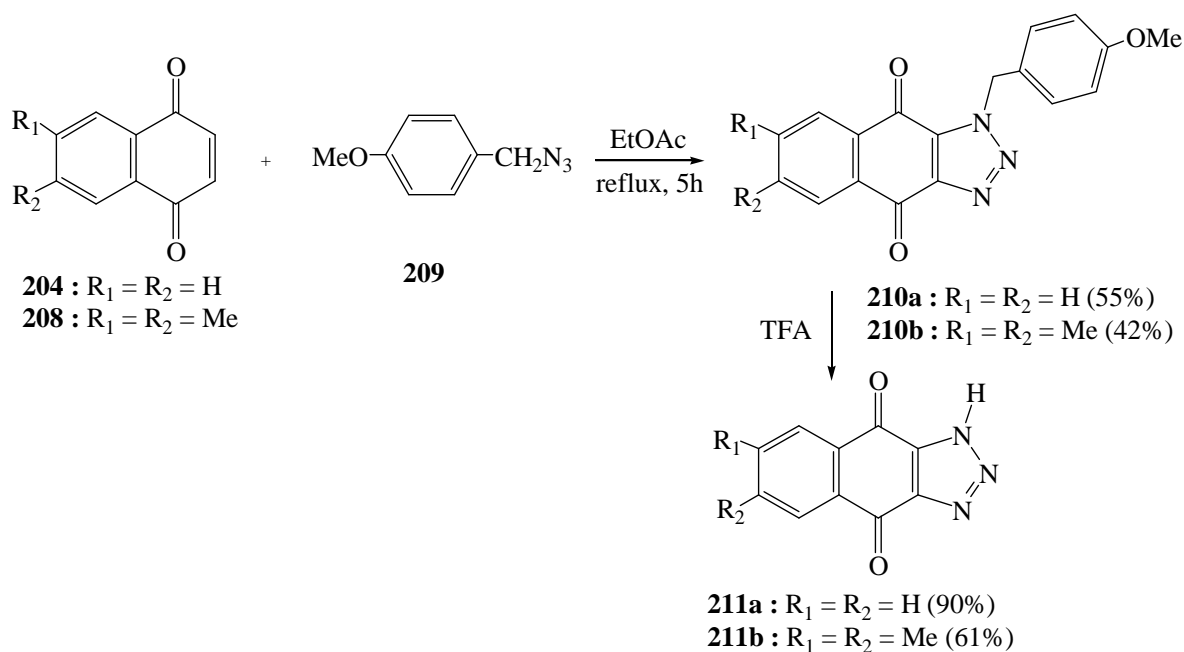


Schéma 52

Des dérivés fonctionnalisés en C5 ou en C6 sont ensuite obtenus à partir de **211a**⁷¹. 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).

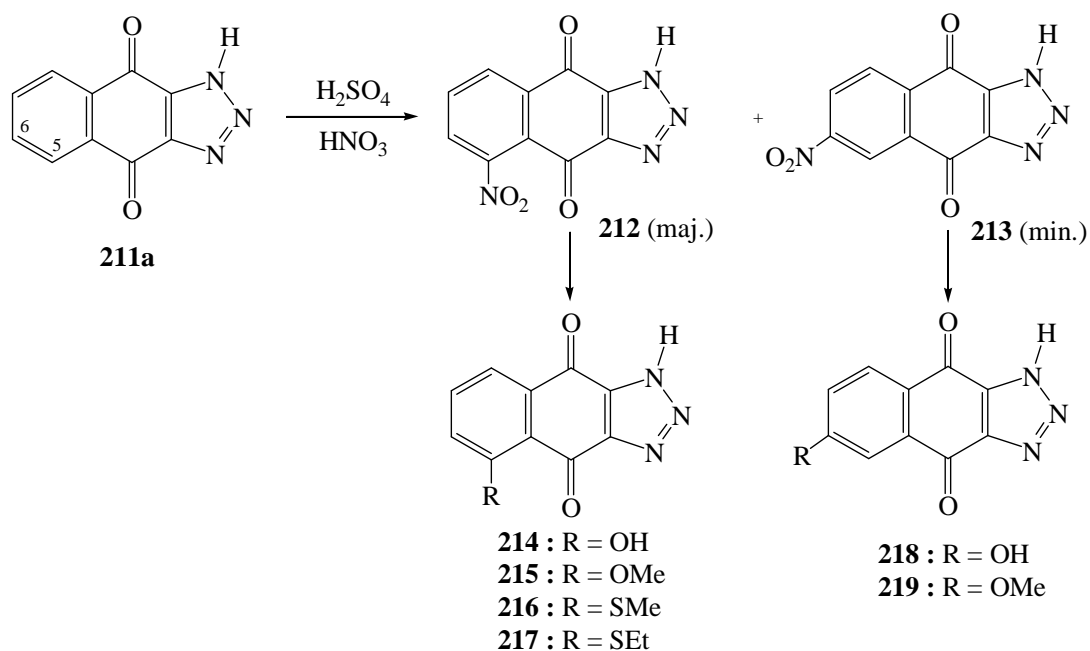


Schéma 53

⁷¹ J.M. Tedder, D.R. Buckle. *J. Chem. Research (S)*, **1983**, 12-13

La réaction de la naphtoquinone **204** avec l'azoture de triméthylsilyl **220**⁷², 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).

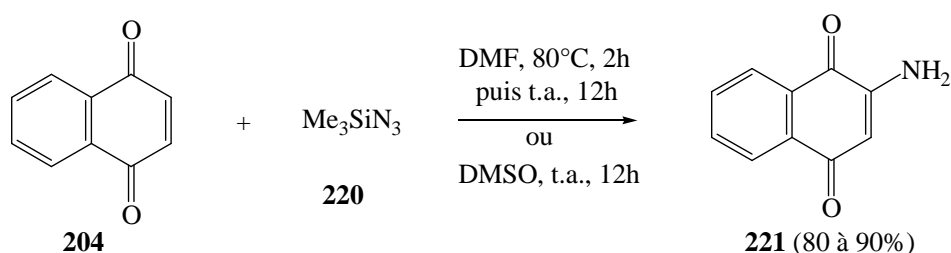
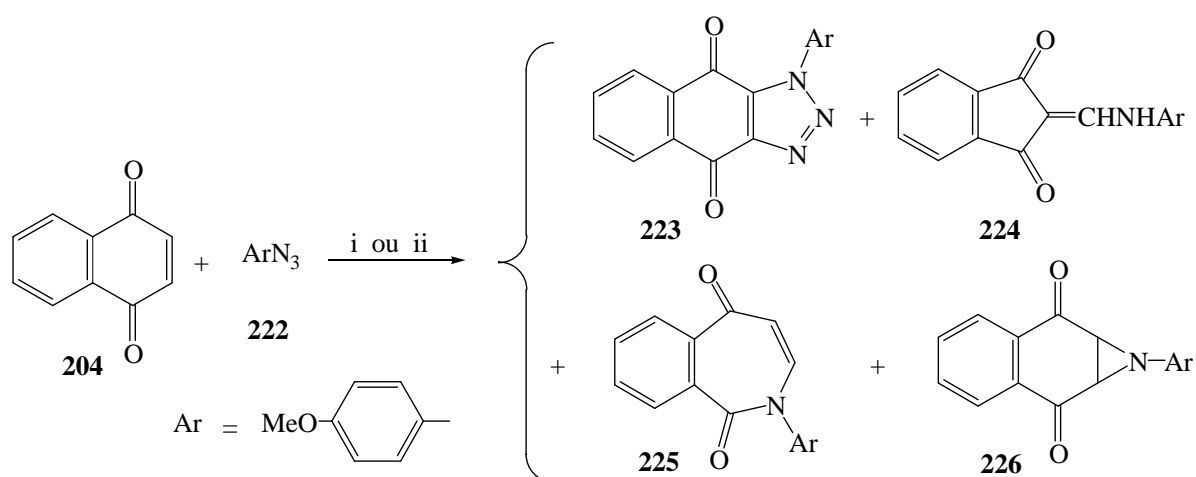


Schéma 54

L. Benati et *al* 1991⁷³ 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) C₆H₆, 60°C, 5 jours : **223**(1%) + **224**(46%) + **225**(20%) + **226**(31%)
 ii) HMPT, 60°C, 15h : **223**(62%) + **224**(3%)

Schéma 55

⁷² B.Husu, S. Kafka, Z. Kadunc, M. Tisler. *Monatshefte für Chemie*, **1988**, *119*, 215 - 222

⁷³ L. Benati, P. Carlo Montevicchi, P. Spagnolo. *J.Chem.Soc.Perkin Trans I*, **1991**, (1) 71 - 77

I. T. Barnish et *al* 1992 ⁷⁴ 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 ⁷⁵ 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%).

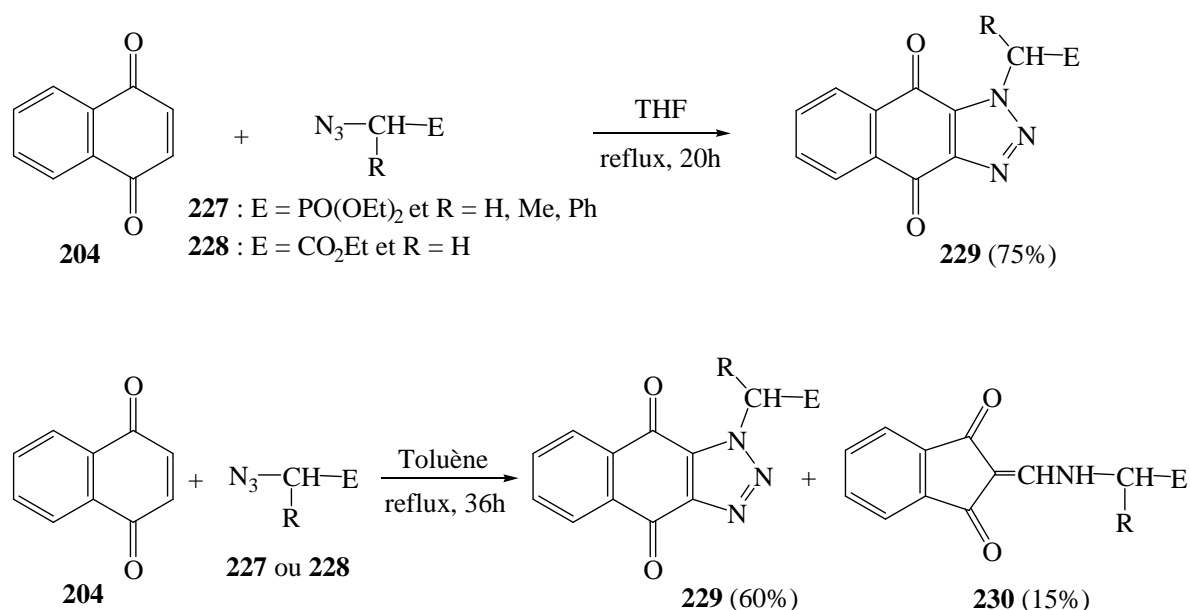


Schéma 56

⁷⁴ I.T. Barnish, M.S. Gibson. *J. Chem. Research (S)*, **1992**, 208, *J. Chem. Research (M)*, **1992**, 1740 - 1757

⁷⁵ F. Palacios, A.M. Ochoa de Retana, J. Pagalday. *Organic preparations and procedures int*, **1995**, 27 (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 ²⁷. 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).

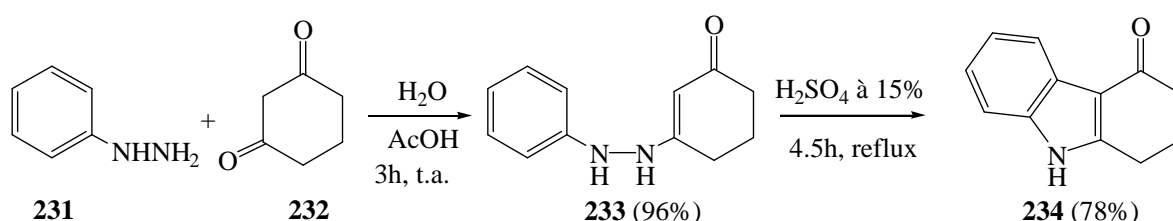
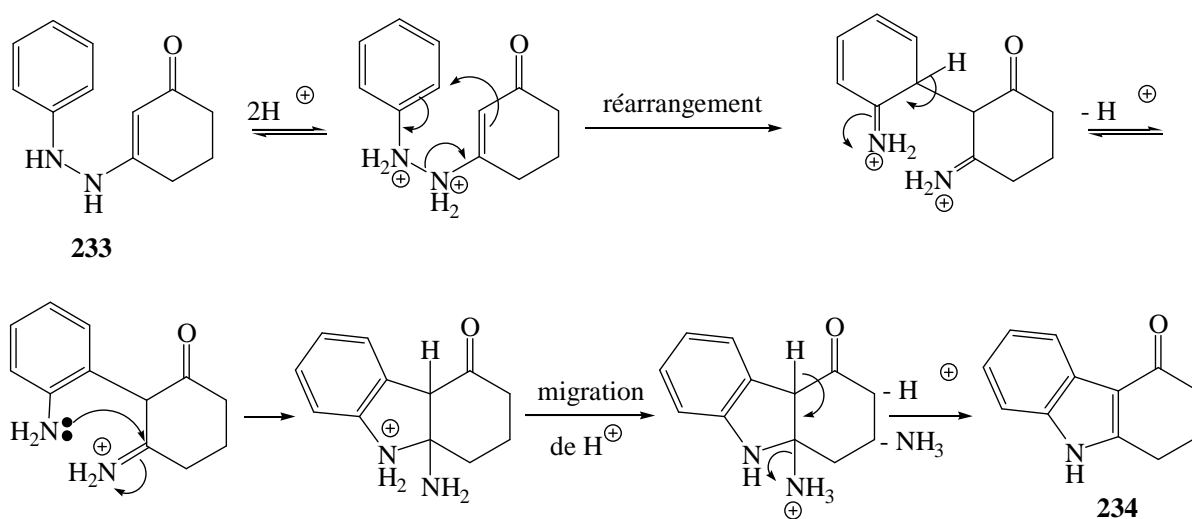


Schéma 57

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.

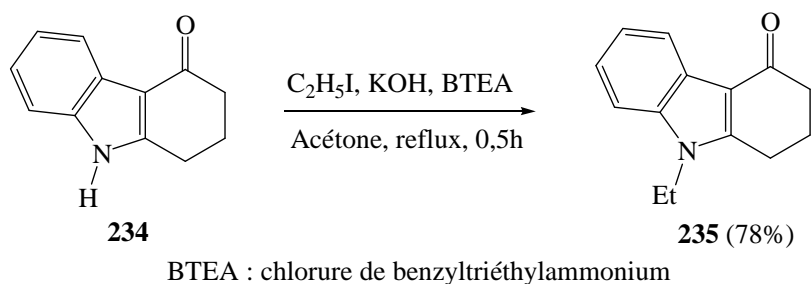


Schéma 59

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

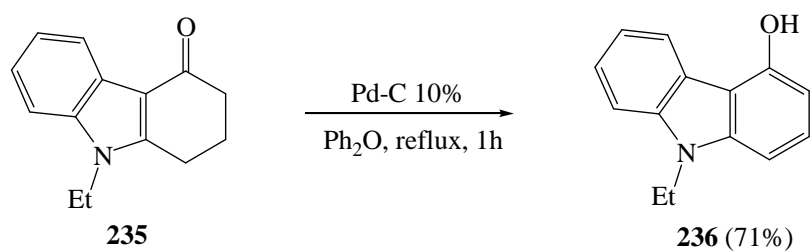
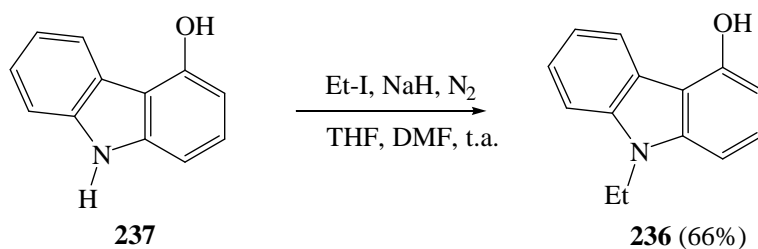


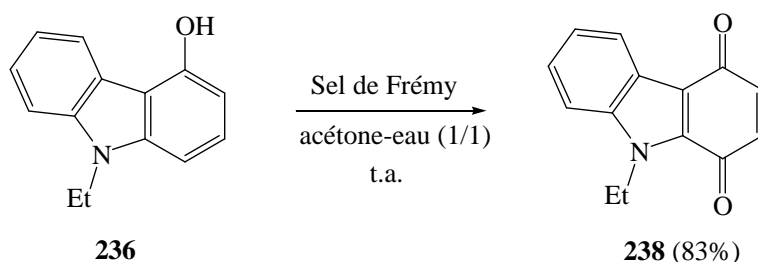
Schéma 60

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-(9H)-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 1995²⁵ 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).

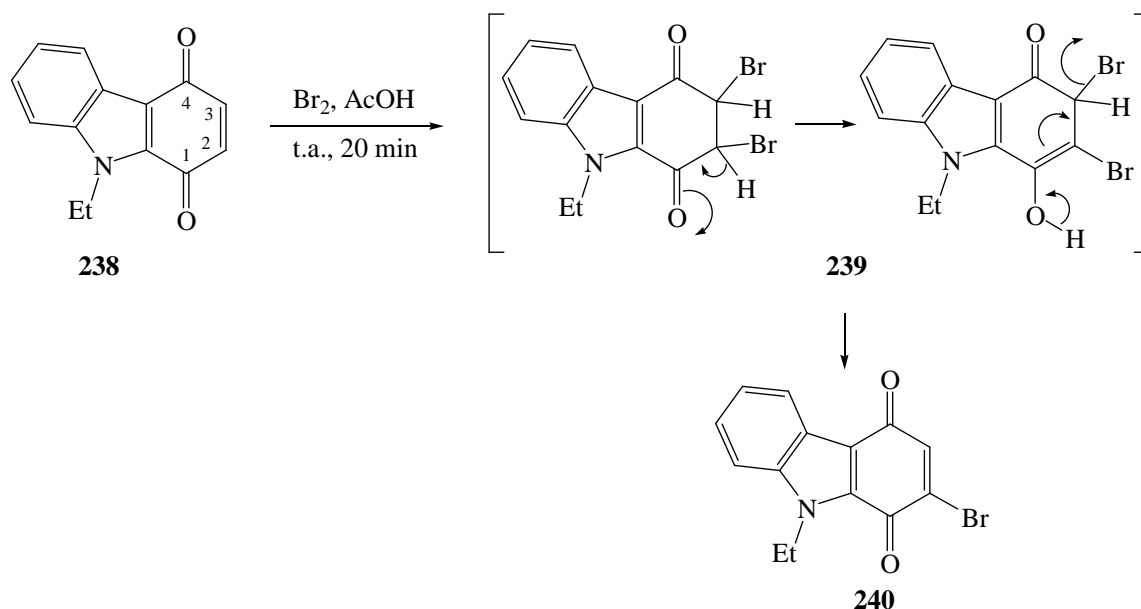


Le 4-hydroxycarbazole **236** est ensuite oxydé par le sel de Frémy dans un mélange acétone-eau à température ambiante pour conduire à la carbazolequinone **238** (Schéma 62).

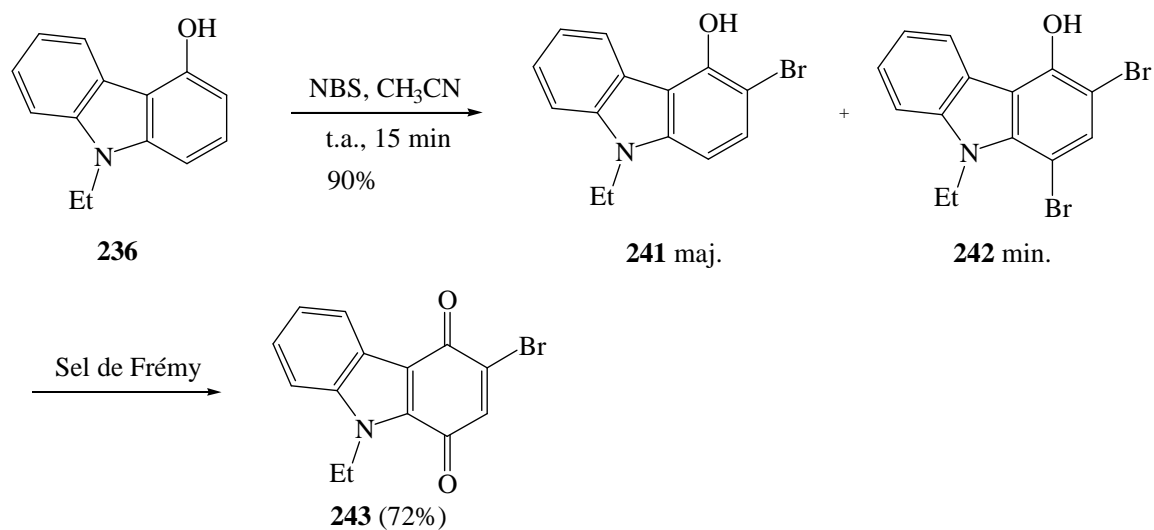


Nous avons synthétisé la 2-bromocarbazolequinone **240** par bromation de la carbazolequinone **238** au moyen de dibrome Br₂ (Schéma 63). Cette réaction procède par une addition de Br₂ sur la double liaison C=C de la quinone conduisant à l'intermédiaire dibromé **239**, suivie d'une élimination de HBr. 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.



La 3-bromocarbazolequinone **243** a été obtenue en deux étapes, à partir du 4-hydroxycarbazole **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).



2) Synthèse des oxydes de nitriles

Les oxydes de nitriles sont généralement préparés à partir d'aldoximes par une réaction d'halogénéation suivie d'une déshydrohalogénéation en milieu basique ⁷⁶ (Schéma 65).

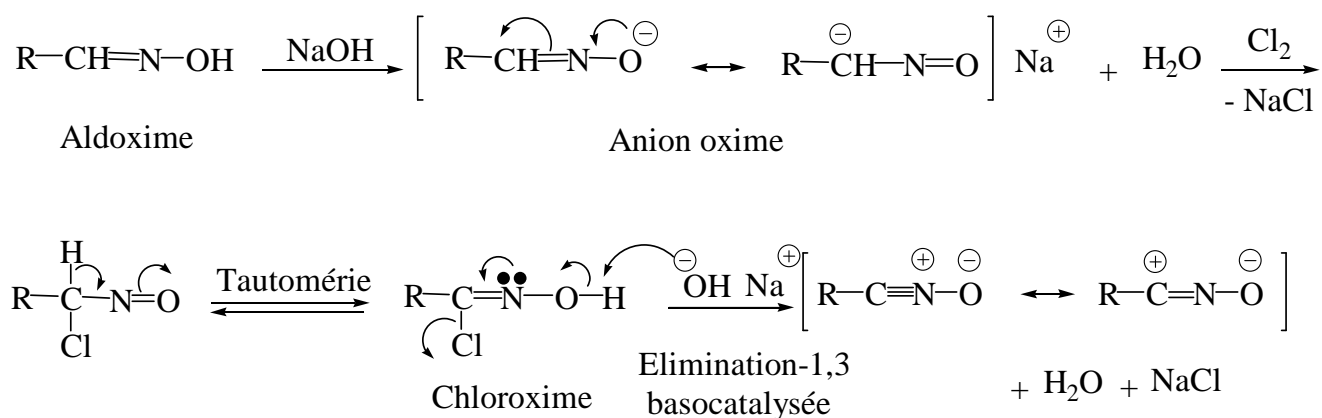


Schéma 65

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 ⁷⁷ (Schéma 66).

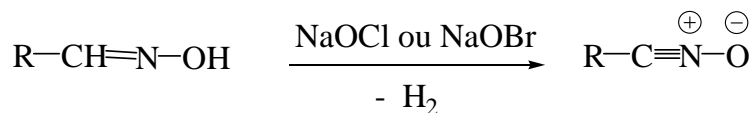


Schéma 66

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 6-méthylpyridine-2-carboxaldéhyde **245** par une réaction de déshydrogénation au moyen d'hypochlorite de sodium dans le THF à 0°C (Schéma 67).

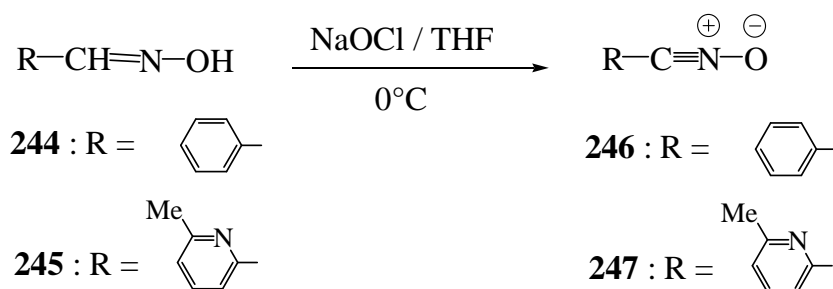


Schéma 67

⁷⁶ C. Grundmann, J.M. Dean. *J. Org. Chem.*, **1965**, 30 (8), 2809 - 2812

⁷⁷ C. Ticozzi, A. Zanarotti, *Tetrahedron Letters*, **1994**, 35 (40), 7421 - 7424

Il est connu que les oxydes de nitriles se dimérisent spontanément pour donner des oxydes d'oxadiazoles ⁷⁶ (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.

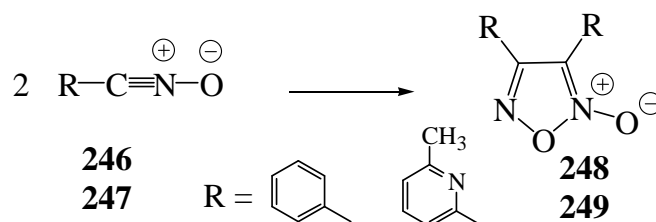


Schéma 68

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 ¹H 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**.

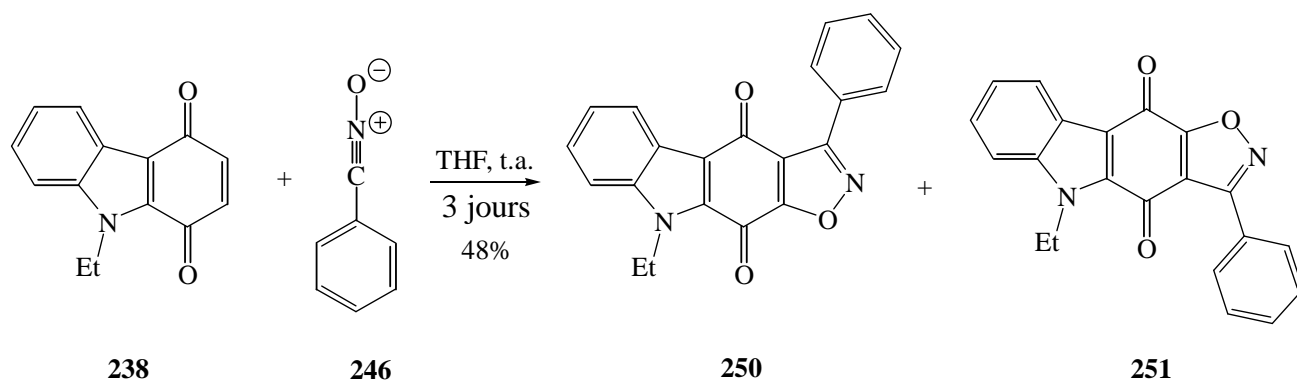
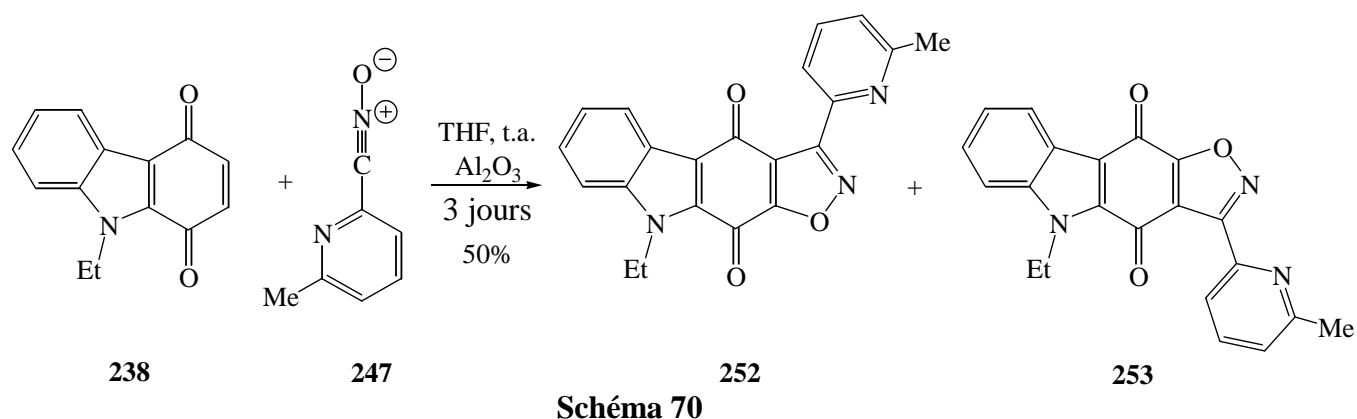


Schéma 69

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 ^1H , avec un rendement global de 50% (Schéma 70).



3.2) Réaction avec les bromocarbazolequinones

Dans une étude menée, dans notre laboratoire ^{27 78} 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).

⁷⁸ A. Poumaroux, Z. Bouaziz, H. Fillion, M. Domard, J. Giraud, A. F. Pétavy. *Chem. Pharm. Bull.*, **1999**, 47 (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.

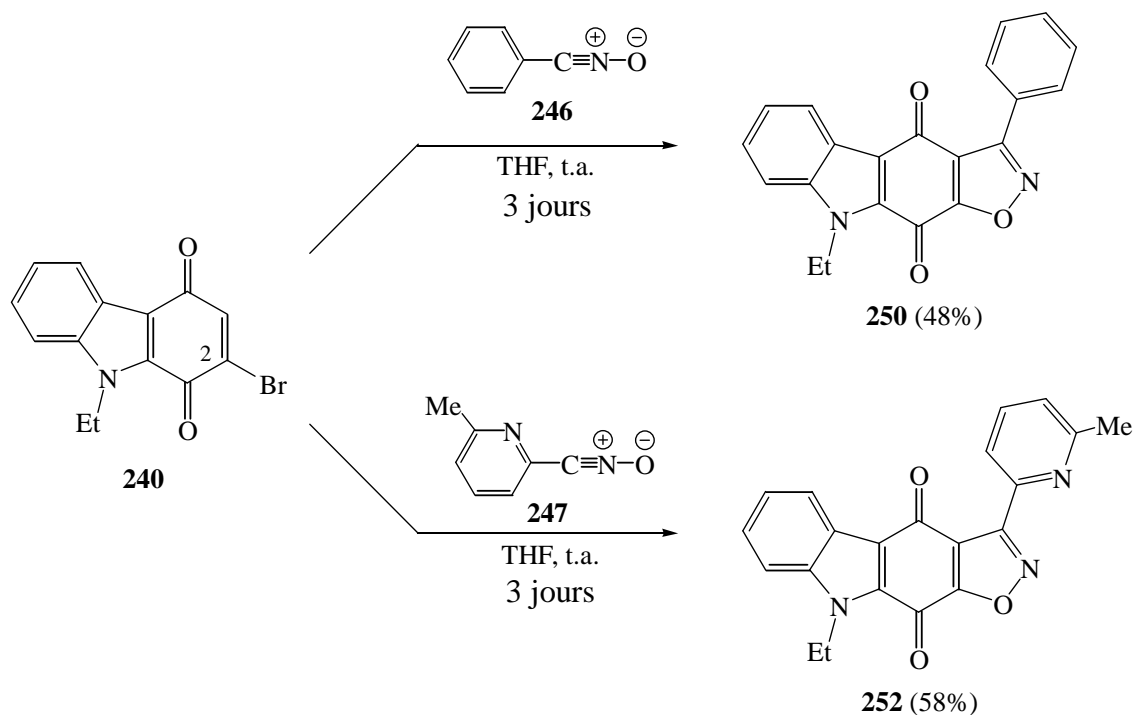


Schéma 71

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).

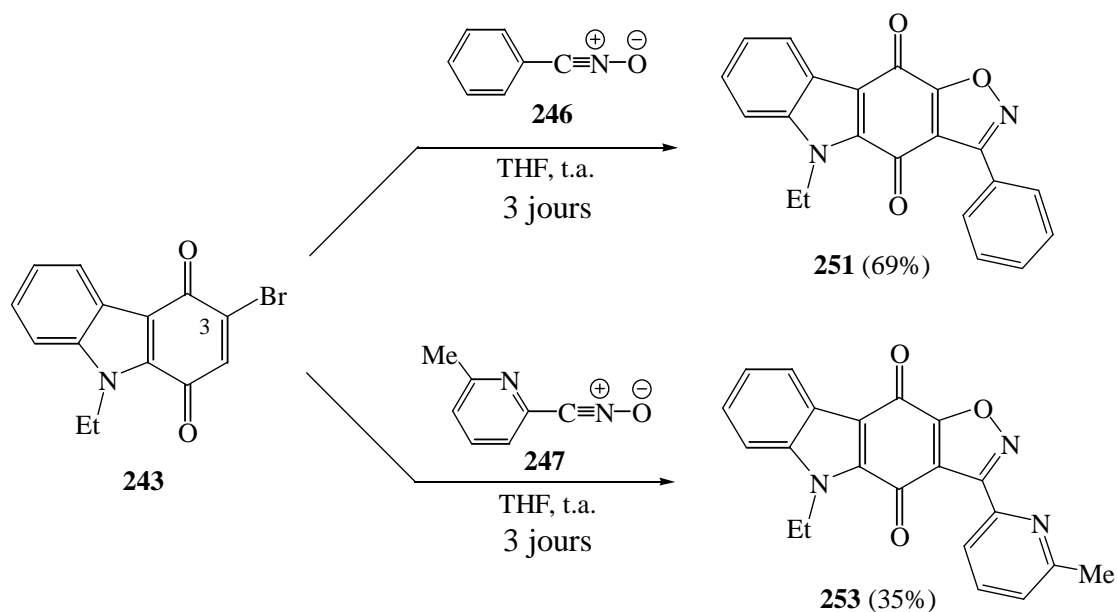


Schéma 72

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 ^1H 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 CH₃ du groupe éthyle à 1,52 ppm donne des réponses au niveau du CH₂ 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 CH₃ 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 (CH₂ du groupe éthyle) et à 2,71 ppm (CH₃-6'). 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 CH₃ du groupe éthyle à 1,47 ppm.

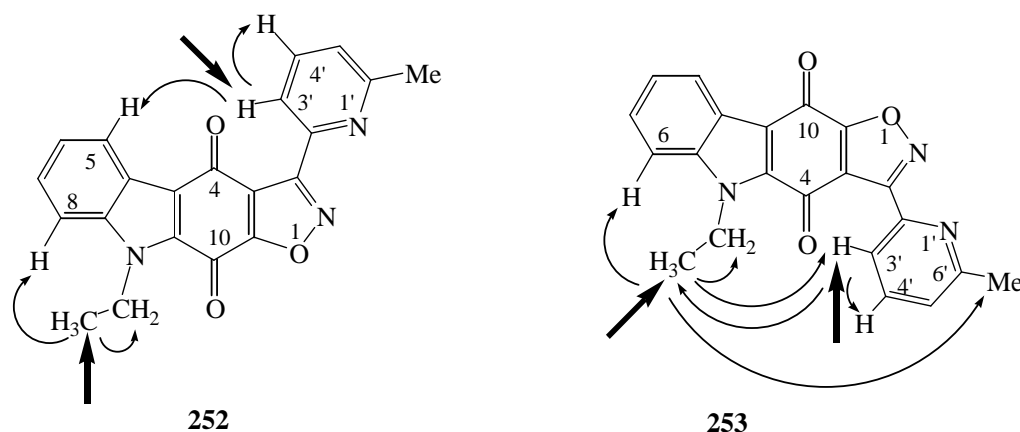


Figure 1

Nous n'avons pas réalisé d'expériences RMN ^1H 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^{-1} relatives aux deux carbonyles, tandis que les régioisomères **251** et **253** présentent une seule bande C=O à 1673 cm^{-1} pour le premier et à 1667 cm^{-1} pour le second. Cette caractéristique IR a déjà été observée pour des régioisomères de type pyridocarbazolequinones synthétisés au laboratoire dans de précédents travaux^{27 78}.

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^{79 80} fournie dans le package gaussian 98⁸¹. La fonctionnelle hybride B3LYP est devenue une des fonctionnelles les plus utilisées dans les travaux théoriques récents (Figures 2, 3 et 4).

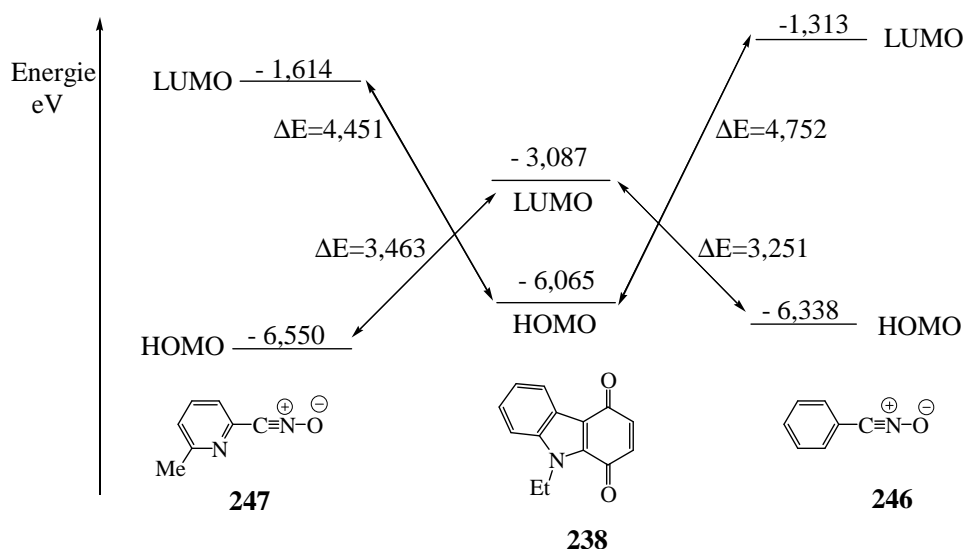


Figure 2

⁷⁹ C. Lee, W. Yang, R.G. Pan, *Phys. Rev. B.* **1988**, *37* (2), 785 - 789

⁸⁰ A.D. Becke, *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 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**

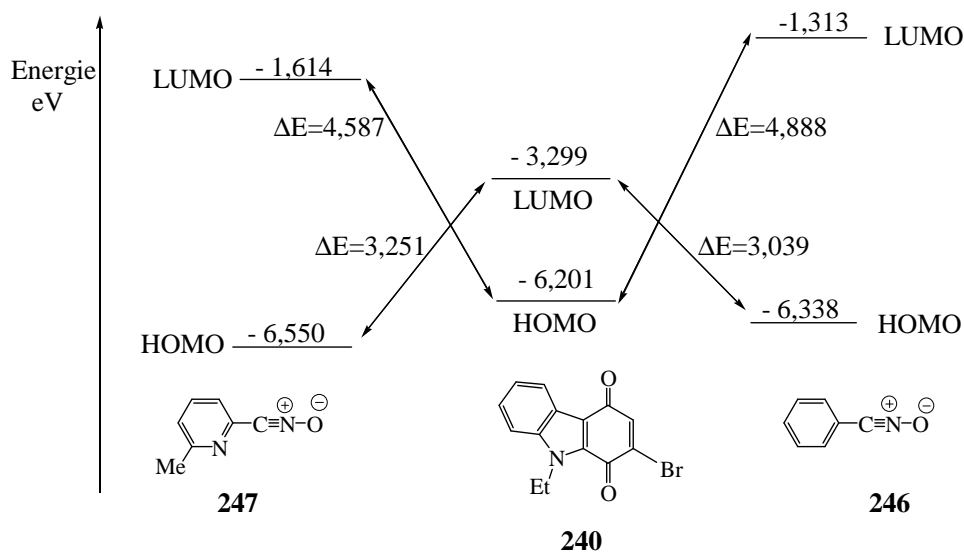


Figure 3

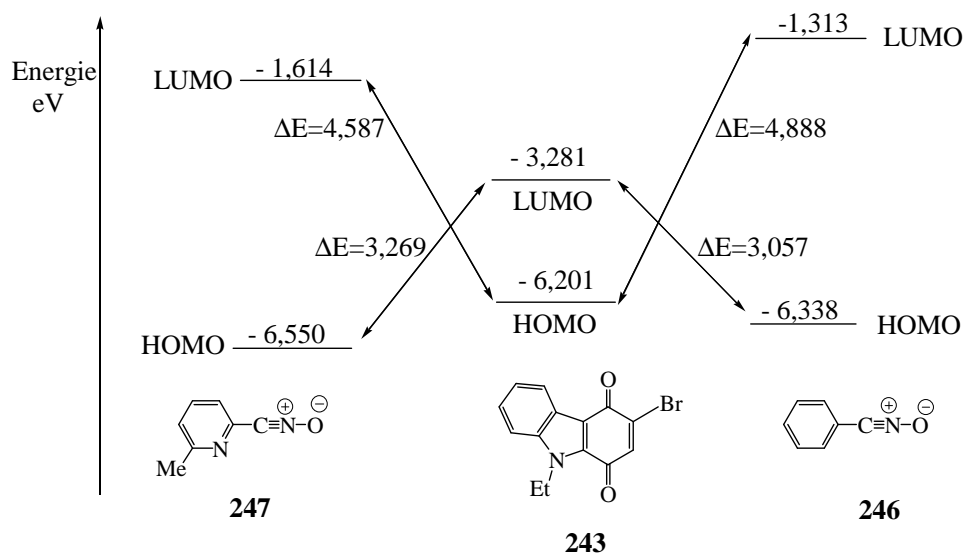


Figure 4

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** ($\Delta E = 3,463$ eV). L'état de transition de la réaction entre **238** et **246** est également stabilisé par l'interaction HOMO **246** / LUMO **238** ($\Delta E = 3,251$ 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).

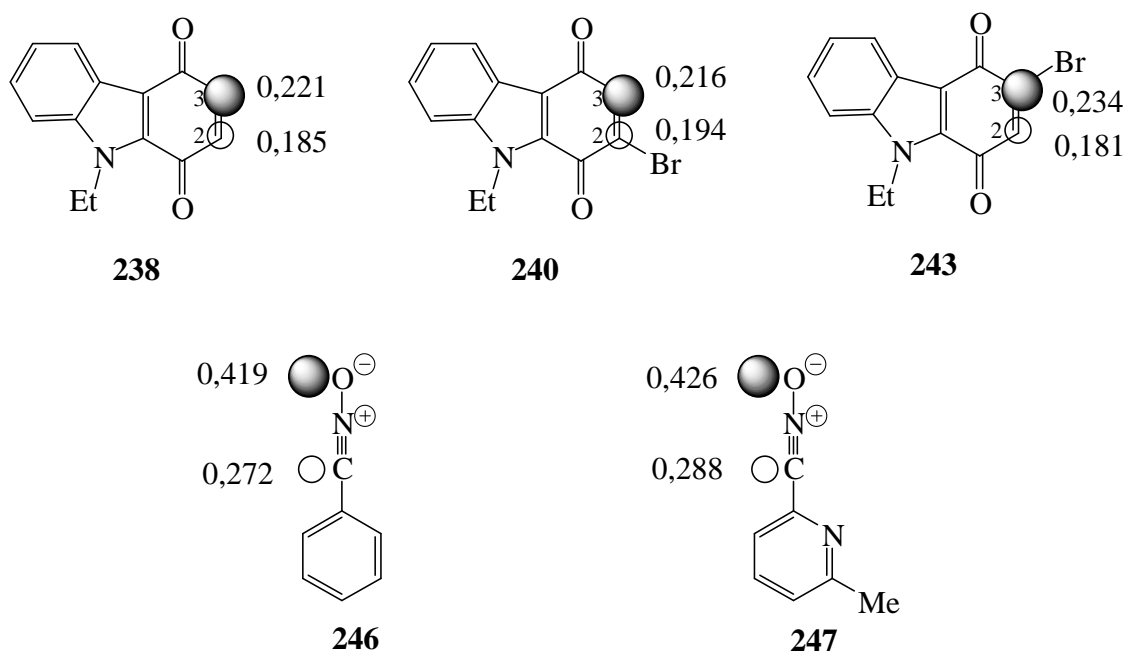


Figure 5

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 orbitaux, 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* 2003⁶⁸.

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* 1982⁸². 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.

⁸² D.R. Buckle, C.J.M. Rockell. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1982**, 627 - 630

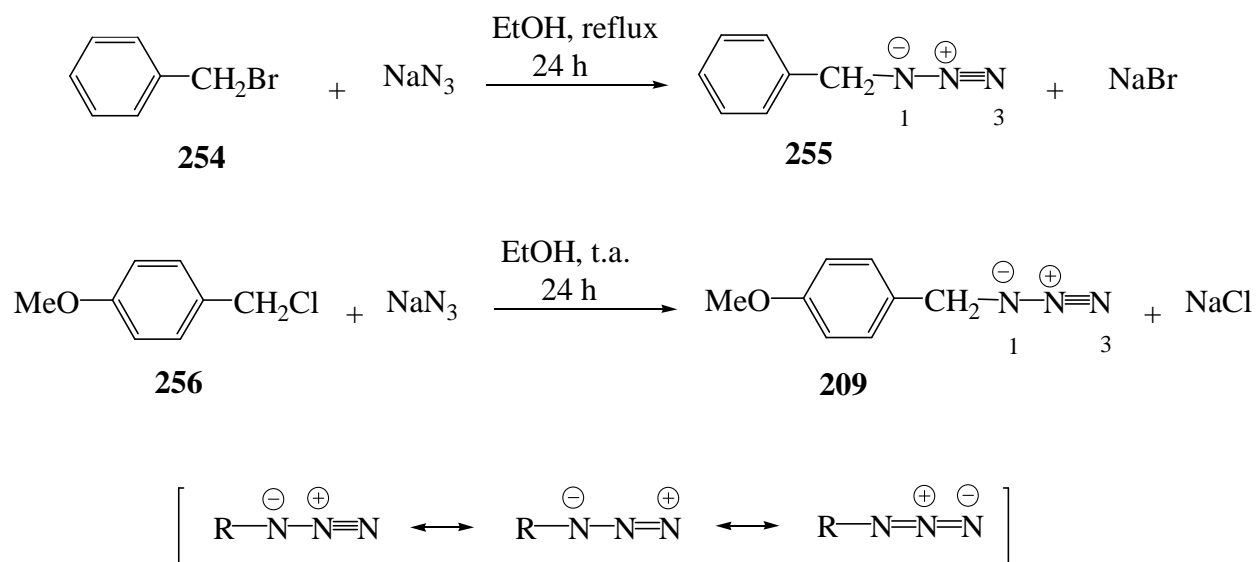


Schéma 73

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).

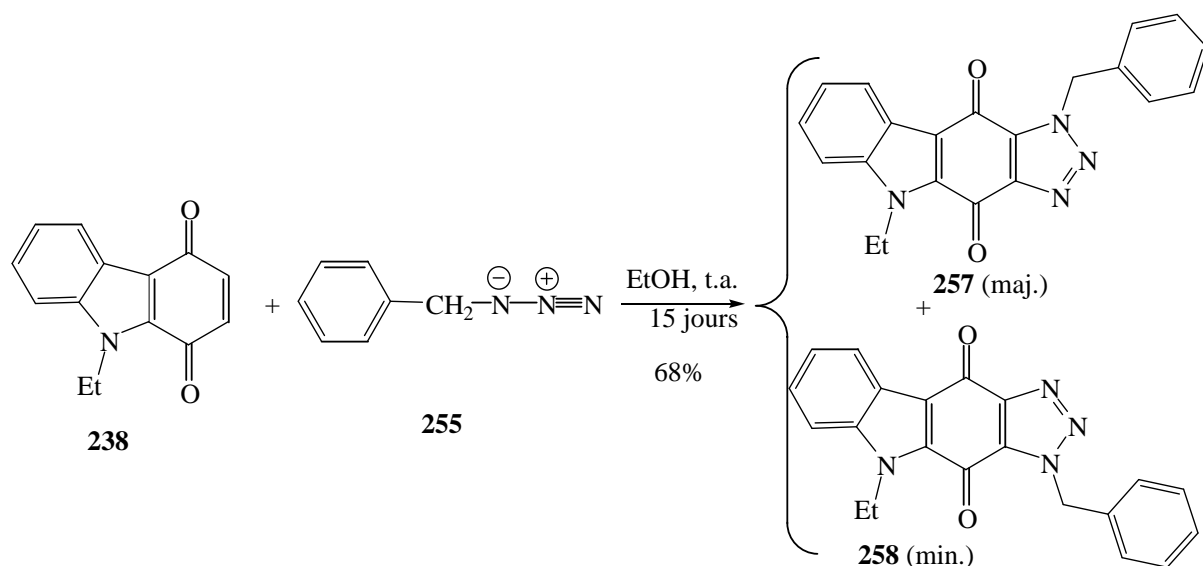


Schéma 74

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).

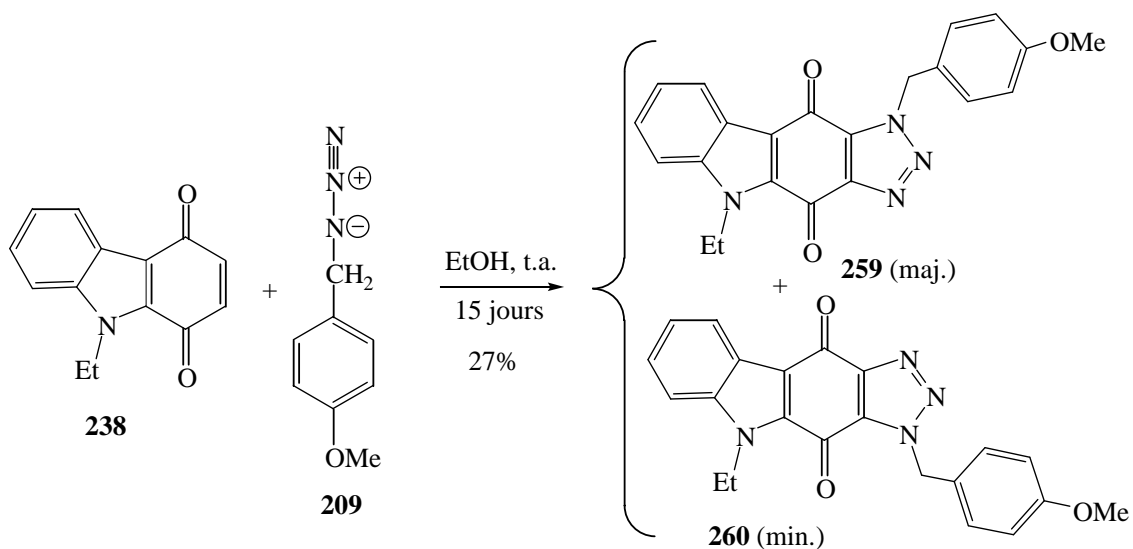


Schéma 75

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).

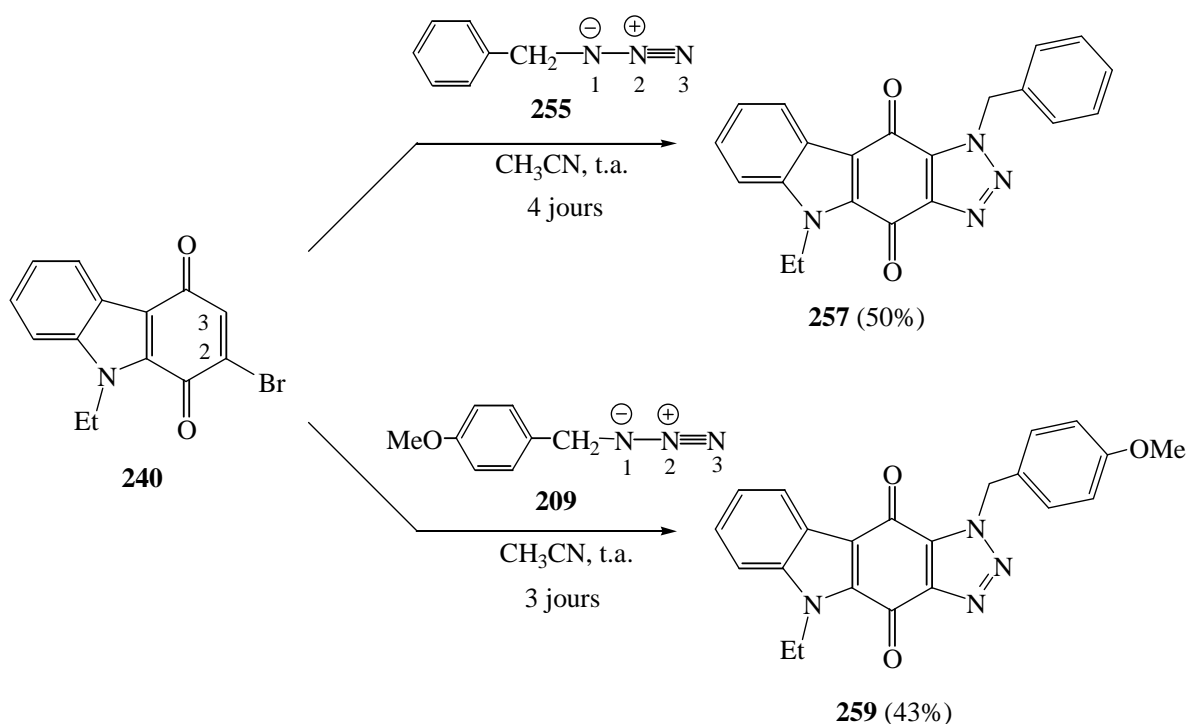
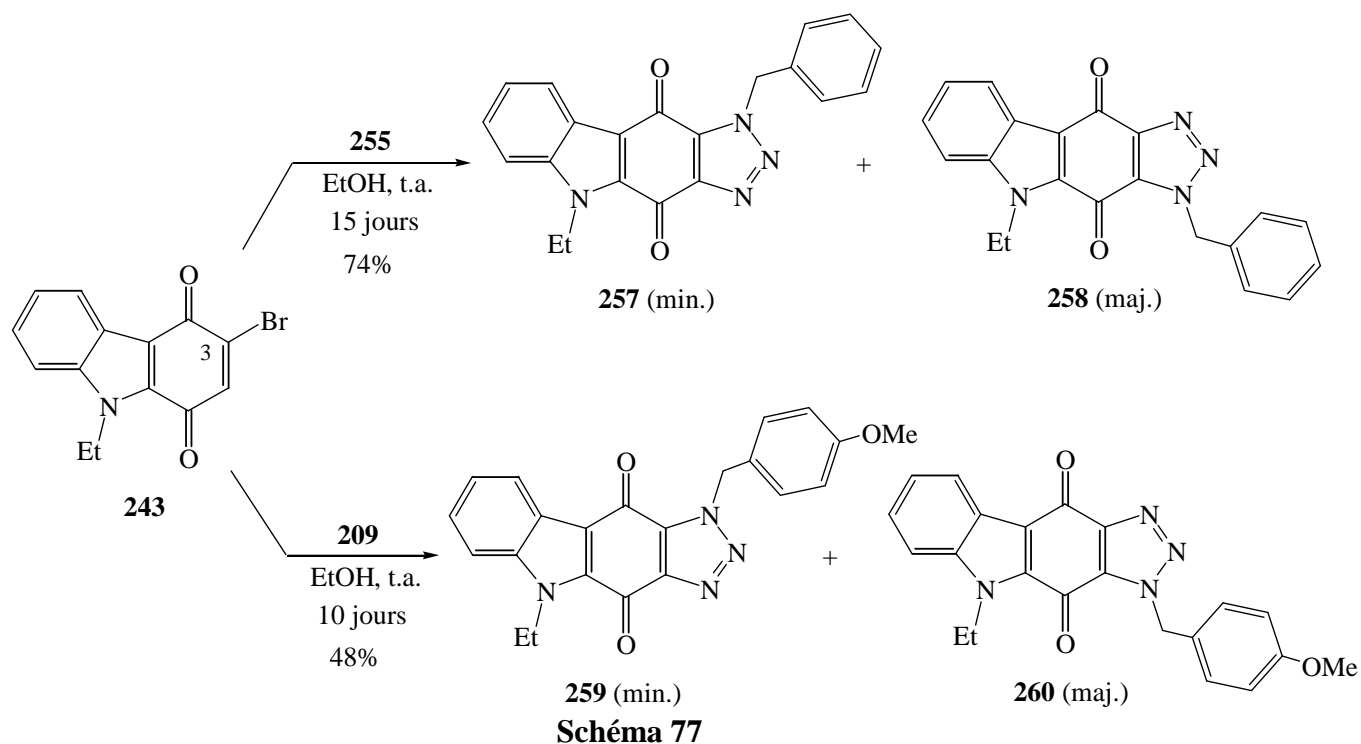


Schéma 76

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 ^1H - ^{13}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.

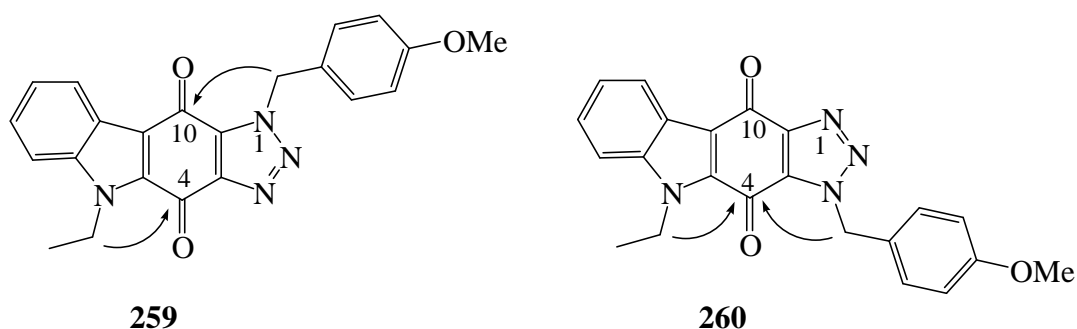


Figure 6

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

Concernant la RMN ^{13}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 carbonyles C-4 et C-10. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

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

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^{-1} pour **257** et 1679 et 1655 cm^{-1} pour **259**.

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

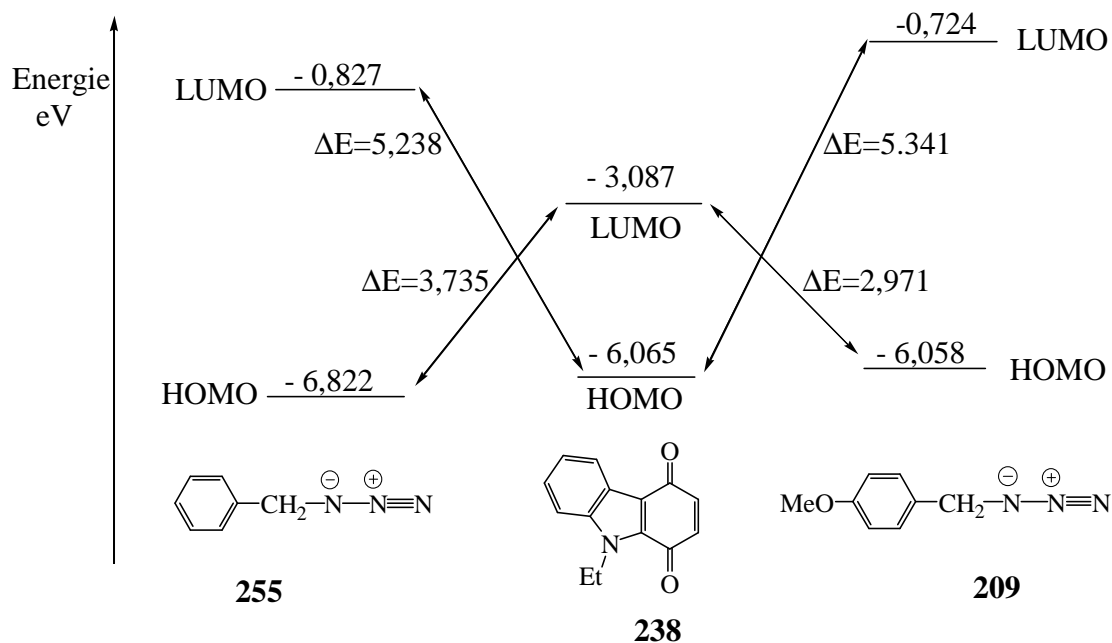


Figure 7

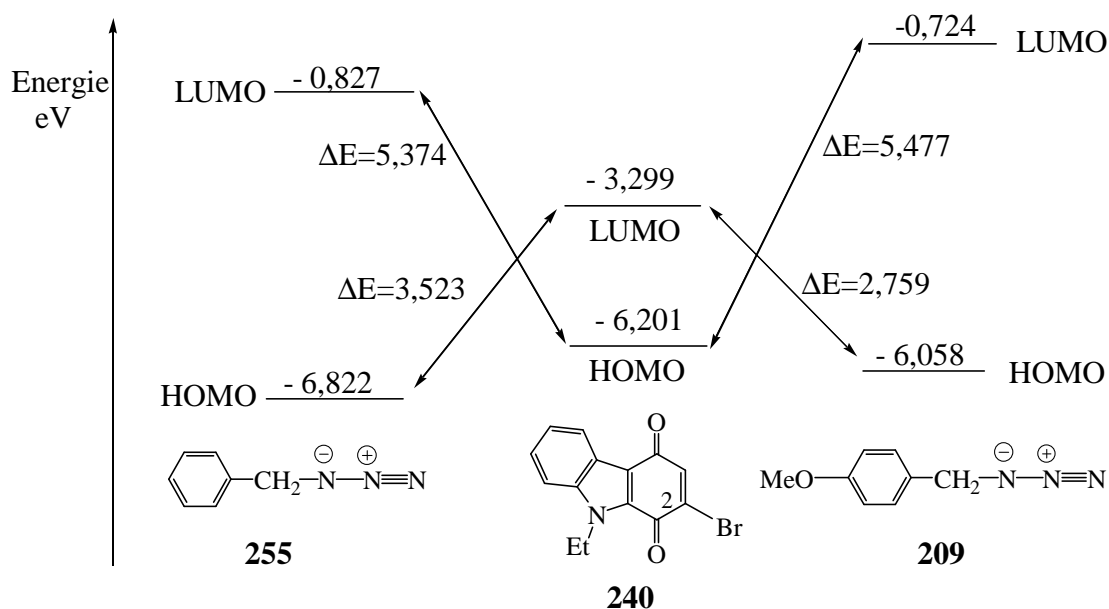


Figure 8

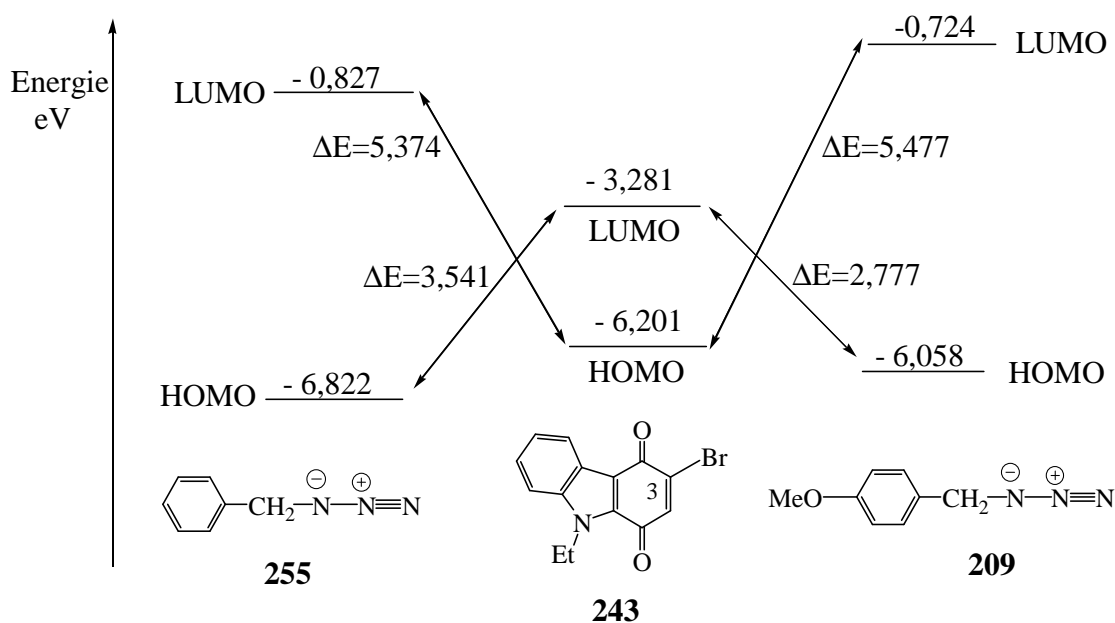
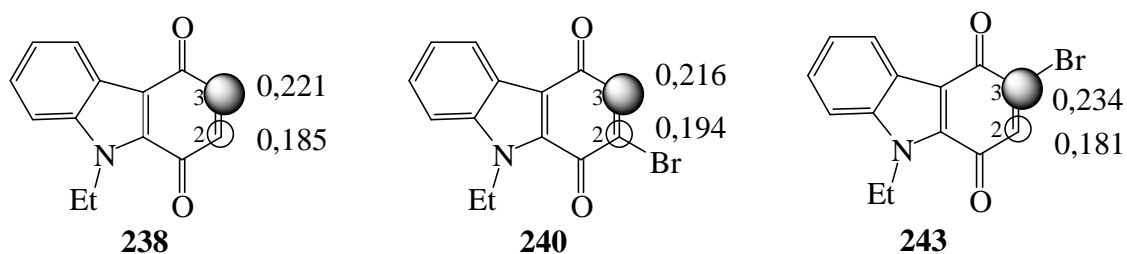


Figure 9

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).



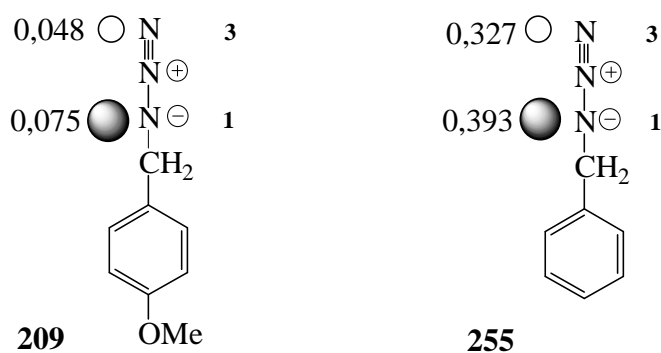


Figure 10

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 2-bromoquinone **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 »⁸³

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

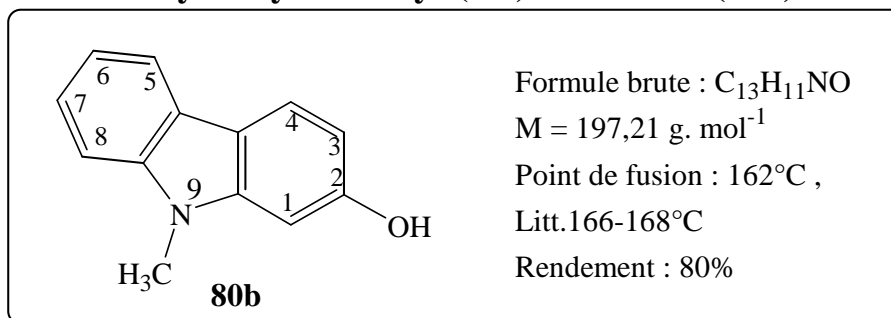
Les spectres de RMN ont été effectués à 300 MHz sur un appareil BRUKER AM 300 (¹H-NMR: 300 MHz, ¹³C-NMR: 75 MHz). Les produits ont été étudiés en solution dans CDCl₃ ou DMSO avec le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne.

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

⁸³ D.D. Perrin, W.L.F. Armarego, D.R. Perrin, Purification of Laboratory Chemicals, Pergamon Press Oxford, 2nd Ed. 1980

2-Hydroxy-9-méthyl-(9H)- carbazole (80b)



Mode opératoire:

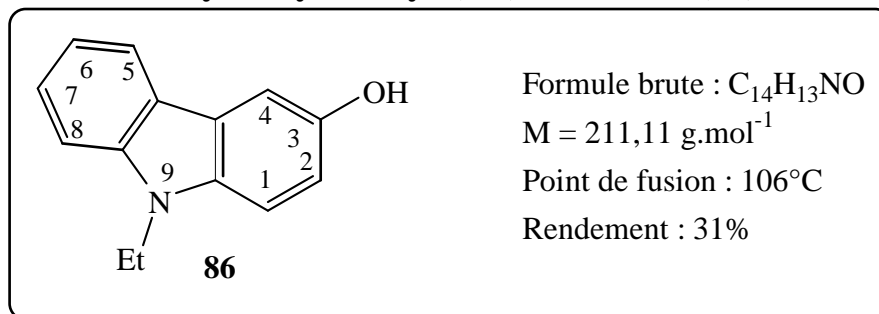
Dans un tricol sec, on pèse 250 mg (6,25 mmol, 2,5 éq.) de NaH 60%. Sous atmosphère d'azote, on ajoute goutte à goutte pendant 10 min, une solution contenant 457,5 mg (2,5 mmol, 1 éq.) de 2-hydroxycarbazole **80a**, 0,37 ml de DMF et 5 ml de THF anhydre.

Au bout de 10 min, on ajoute l'agent alkylant CH₃I : 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 repris dans l'eau et neutralisé avec HCl 1N. On filtre le précipité qui est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant: CH₂Cl₂/MeOH 2%). On obtient une poudre jaune ocre.

Infrarouge (KBr, ν cm⁻¹): 3360(O-H).

RMN¹H(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, CH₃).

3-Hydroxy-9-éthyl-(9H)-carbazole (86)



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_2SO_4 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 $NaNO_2$ dans 4 mL de H_2O . 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_2SO_4 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_2SO_4 anhydre. Le résidu obtenu après évaporation est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2). On obtient 0,614 g (2,91 mmol) d'hydroxycarbazole **86** de couleur beige.

IR (KBr, ν cm^{-1}) : 3300 (OH)

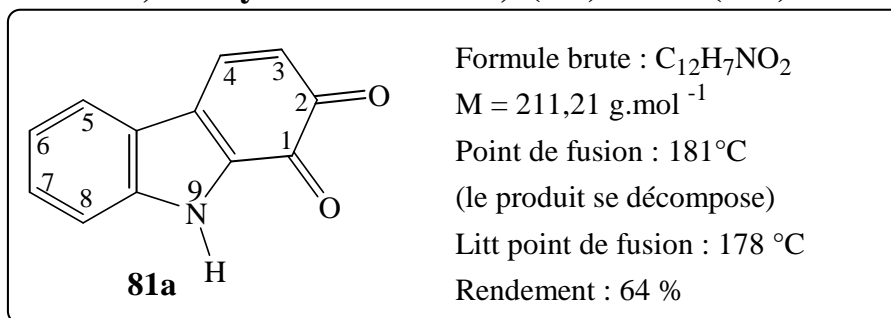
RMN 1H ($CDCl_3$, J Hz, δ ppm) : 8,03 (dd, 1H, $J = 7,7$ et 1,1 Hz, H-5); 7,54 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz, H-4); 7,47 (td, 1H, $J = 8,3$ et 1,1 Hz, H-7); 7,38 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, H-8); 7,27 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H-1); 7,19 (td, 1H, $J = 7,7$ et 1,1 Hz, H-6); 7,04 (dd, 1H, $J = 8,7$ et 2,3 Hz, H-2); 4,85 (s, 1H, OH); 4,33 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, $\underline{CH_2}CH_3$); 1,42 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, $CH_2\underline{CH_3}$)

Analyse élémentaire : $C_{14}H_{13}NO$, 0,4 H_2O

% 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 :

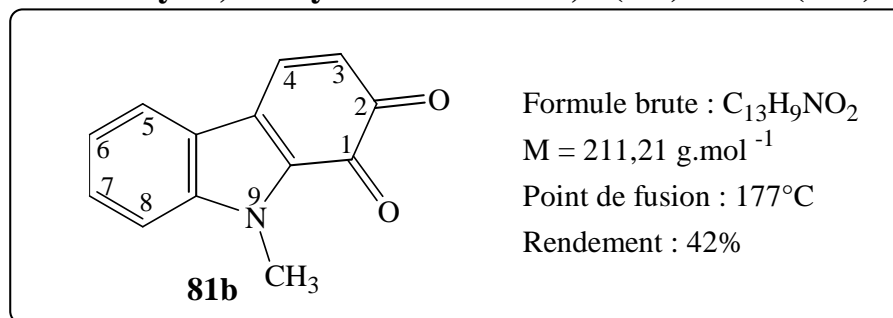
Dans un monocol de 500 ml, on dissout 1 g (5,45 mmol, 1 eq.) de 2-hydroxycarbazole **80a** dans 200 ml d'acétone. On ajoute goutte à goutte une solution contenant 3,66 g (13,5 mmol, 2,5 eq.) de sel de Frémy, 181 mg (1,32 mmol, 0,24 eq.) de KH_2PO_4 dans 200 ml d'eau permutée.

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_2SO_4 anhydre. Le résidu obtenu après évaporation est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$ 5 %). On obtient une poudre vert foncé.

Infrarouge (KBr, ν cm⁻¹) : 3260 (N-H) ; 1665 et 1640 (C = O).

RMN ¹H (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).

3-Méthyl-1,2-dihydrocarbazole-1,2-(9H)-dione (81b)



Mode opératoire :

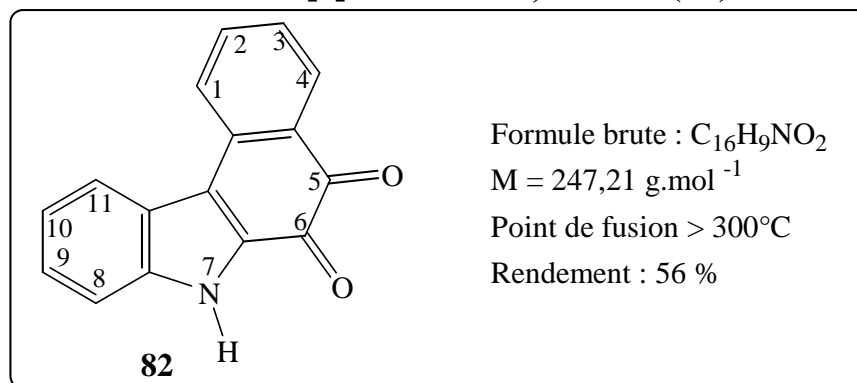
Dans un ballon de 100 ml , on dissout 120 mg (0,61mmol,1eq.) de 2-hydroxy-9-méthyl-(9H)-carbazole dans 25 ml d'acétone. On ajoute goutte à goutte , une solution contenant 408,5 (1,52mmol,2,5eq.) de sel de Frémy, 19,9 mg(0,15mmol,0,25eq) de KH_2PO_4 dans 25 ml d'eau permutée.

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_2Cl_2).

Infrarouge(KBr, ν cm⁻¹): 1670 et 1640 (C=O)

RMN¹H(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_3).

7H-Benzo[c]carbazole-5,6-dione (82)



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⁻¹) : 3320 (N-H) ; 1710 et 1680 (C = O).

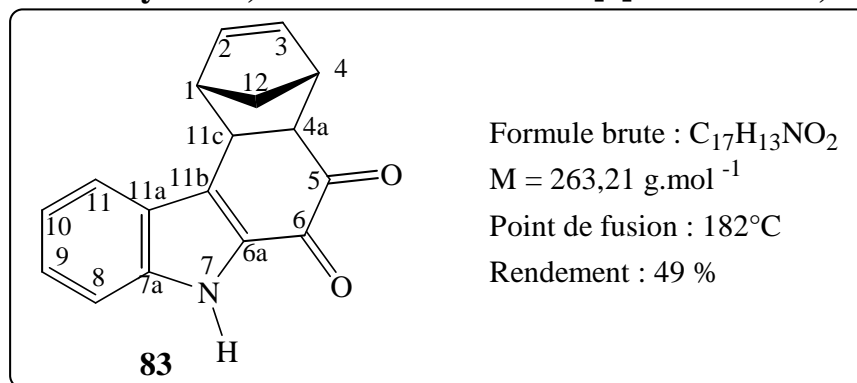
RMN ¹H (CDCl₃, δ ppm) : 12,4 (1H, s, N-H) ; 8,29 (1H, d, J=8,29 Hz) ; 8,18 (1H, d, J=7,73 Hz) ; 7,89 (1H, dd, J=7,72 Hz et J=1,32 Hz) ; 7,68 (1H, td, J=7,64 Hz et J=1,32 Hz) ; 7,44 (2H, m) ; 7,34 (1H, td, J=7,54 Hz et J=0,94 Hz) ; 7,25 (1H, td, J=6,6 Hz et J=1,51 Hz).

Microanalyse : $C_{16}H_9NO_2$, 0,3H₂O

% 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-dihydrocarbazole-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 : $CH_2Cl_2/MeOH$ 3 %), puis repris à froid dans le dichlorométhane. On obtient un produit jaune vif.

Infrarouge (KBr, ν cm⁻¹) : 3260 (N-H) ; 1700 et 1640 (C = O).

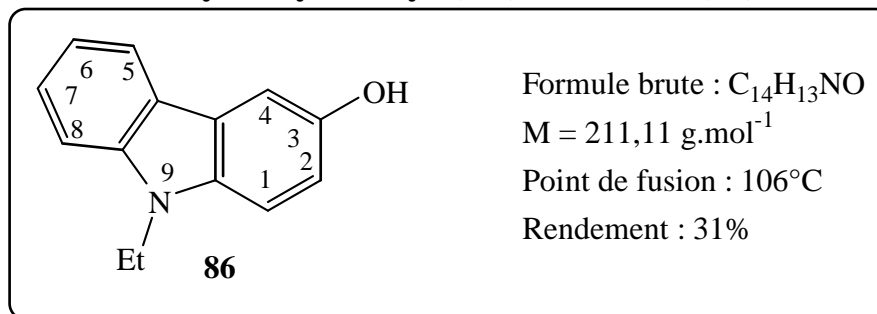
RMN ¹H (CDCl₃, δ ppm) : 8,9 (1H, s, N-H) ; 7,87 (1H, d, J=7,91Hz, H-11) ; entre 7,55 et 7,20 (3H aromatiques, m) ; 6,1 (1H, t, J=5,65 Hz et J=2,45 Hz, H-2 ou H-3) ; 5,58 (1H, t, J=5,28 Hz et J=3,02 Hz, H-2 ou H-3) ; 4,1 (1H, dd, J=7,16 Hz et J=3,77 Hz, H-11c) ; 3,59 (2H, s, H-1 et H-4) ; 3,42 (1H, dd,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

Microanalyse : $C_{17}H_{13}NO_2$, 0,7H₂O

% calculé : C 74, H 5,26, N 5,07

% trouvé : C 73,98, H 4,89, N 5,23

3-Hydroxy-9-éthyl-(9H)-carbazole (**86**)



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_2SO_4 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 $NaNO_2$ dans 4 mL de H_2O . 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_2SO_4 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_2SO_4 anhydre. Le résidu obtenu après évaporation est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2). On obtient 0,614 g (2,91 mmol) d'hydroxycarbazole **86** de couleur beige.

IR (KBr, ν cm^{-1}) : 3300 (OH)

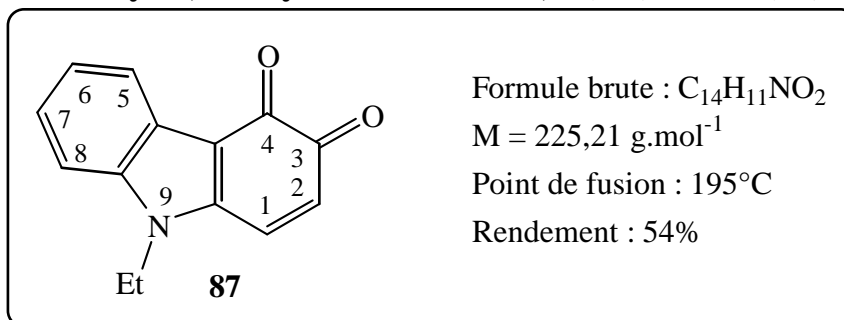
RMN 1H ($CDCl_3$, J Hz, δ ppm) : 8,03 (dd, 1H, $J = 7,7$ et 1,1 Hz, H-5); 7,54 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz, H-4); 7,47 (td, 1H, $J = 8,3$ et 1,1 Hz, H-7); 7,38 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, H-8); 7,27 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H-1); 7,19 (td, 1H, $J = 7,7$ et 1,1 Hz, H-6); 7,04 (dd, 1H, $J = 8,7$ et 2,3 Hz, H-2); 4,85 (s, 1H, OH); 4,33 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2CH_3); 1,42 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_2CH_3)

Analyse élémentaire : $C_{14}H_{13}NO$, 0,4 H_2O

% 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 KH₂PO₄ 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 Na₂SO₄ anhydre. Le résidu obtenu après évaporation est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂ / MeOH, 99,5/0,5). On obtient 0,327 g (1,45 mmol) de quinone **87** de couleur rouge.

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 1670, 1640 (C=O)

RMN ¹H (CDCl₃, J Hz, δ 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, CH₂CH₃); 1,43 (t, 3H, J = 7,4 Hz, CH₂CH₃)

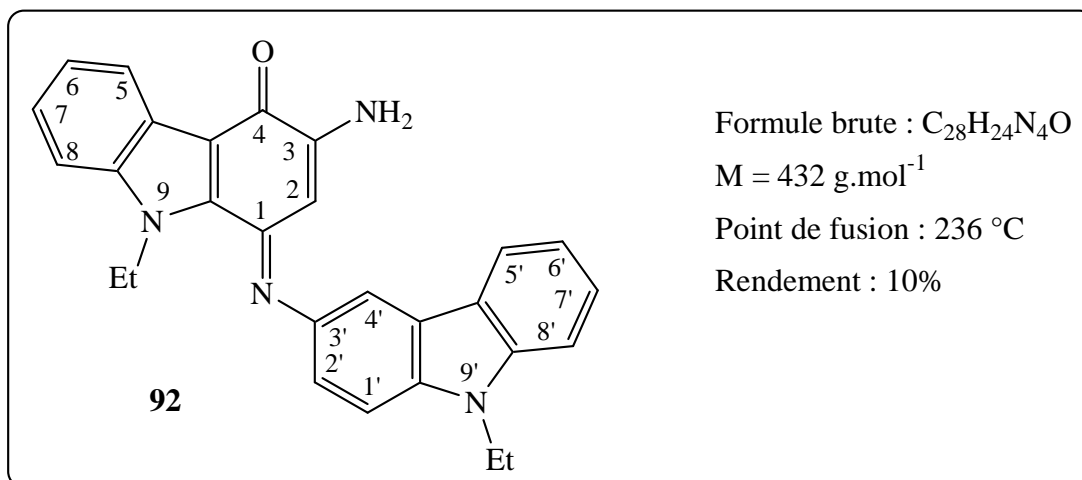
RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ ppm) : 16,74 (CH₃), 39,28 (CH₂), 113,12, 113,51, 121,60, 125,51, 125,54, 126,34, 129,45, 131,88, 138,41, 143,97, 173,15 (CO), 184,67 (CO)

Analyse élémentaire : C₁₄H₁₁NO₂, 0,3 H₂O

% 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 KH₂PO₄ 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, ν cm⁻¹) : 3460, 3360, 1635, 1595

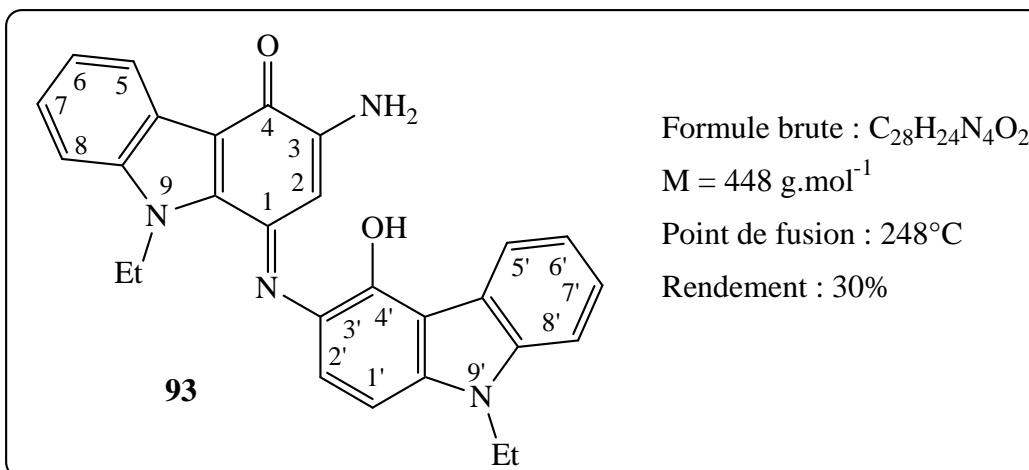
RMN ¹H (CDCl₃, J Hz, δ ppm) : 8,19 (d, 2H, J = 7,4 Hz); 7,77 (d, 1H, J = 7,4 Hz); 7,76 (s, 1H, H-4'); 7,68 (d, 1H, J = 8,5 Hz); 7,62 (d, 1H, J = 8,5 Hz); 7,49-7,33 (m, 3H); 7,21-7,13 (m, 2H); 6,34 (s, 2H, NH₂); 5,93 (s, 1H, H-2); 4,96 (q, 2H, J = 7,0 Hz, CH₂CH₃); 4,48 (q, 2H, J = 7,0 Hz, CH₂CH₃); 1,45 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH₂CH₃); 1,36 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH₂CH₃)

Analyse élémentaire : C₂₈H₂₄N₄O, 0,4 H₂O

% 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-9H-carbazol-3-yl) imino]-1,9-dihydro-4H-carbazol-4-one (93)



Mode opératoire :

Voir le composé précédent.

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 3500, 3380, 1625, 1585, 1550

RMN ¹H (DMSO-d₆, δ 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, NH₂); 6,04 (s, 1H, H-2); 5,03 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH₂CH₃); 4,42 (q, 2H, $J = 7,4$ Hz, CH₂CH₃); 1,41 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz, CH₂CH₃); 1,35 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH₂CH₃)

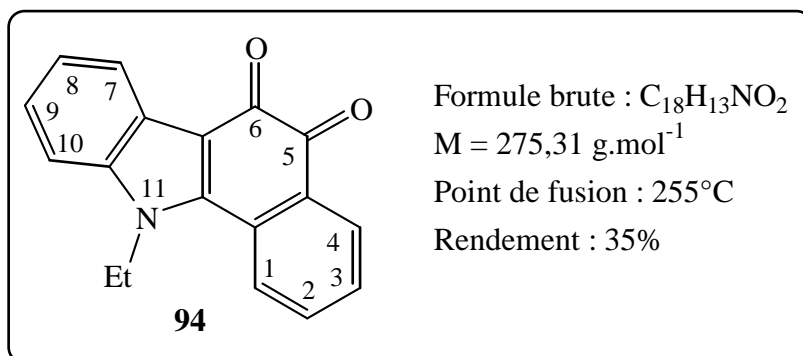
FAB-MS m/z 449 (M+H)⁺

Analyse élémentaire : C₂₈H₂₄N₄O₂, 0,4 H₂O

% 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, ν cm⁻¹) : 1690, 1630 (C=O)

RMN ¹H (CDCl₃, J Hz, δ 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, CH₂CH₃); 1,69 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, CH₂CH₃)

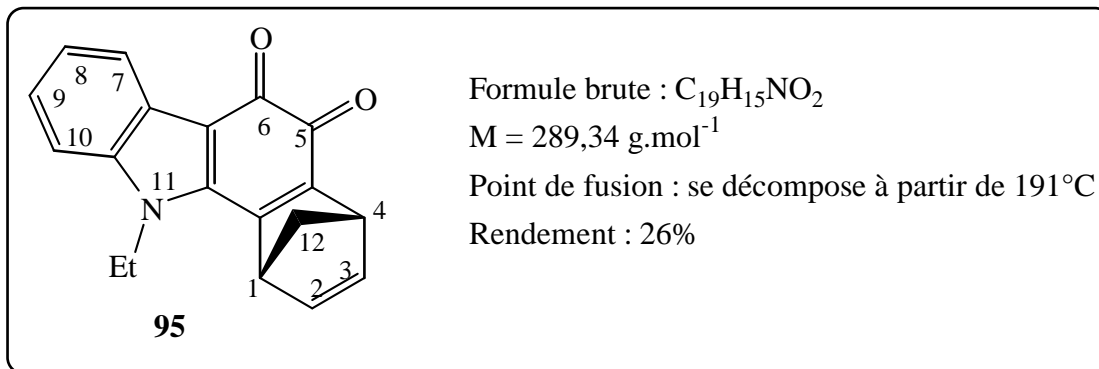
RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ ppm) : 15,59 (CH₃), 41,50 (CH₂), 112,42, 115,12, 121,95, 125,24, 125,82, 125,88, 125,93, 129,97, 130,83, 131,16,, 132,10, 136,28, 139,69, 143,62, 174,50 (CO), 182,42 (CO)

Analyse élémentaire : $C_{18}H_{13}NO_2$, 0,25 H₂O

% 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(11*H*)-dione (95)



Mode opératoire :

On dissout 0,150 g (0,67 mmol) de quinone **87** dans 6 mL de CH₂Cl₂. 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 plusieurs fois avec CH₂Cl₂. 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 : CH₂Cl₂ / MeOH, 98/2). Le composé **95** obtenu est de couleur vert foncé.

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 1625 (C=O)

RMN ¹H (CDCl₃, J Hz, δ 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, CH₂CH₃); 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, CH₂CH₃)

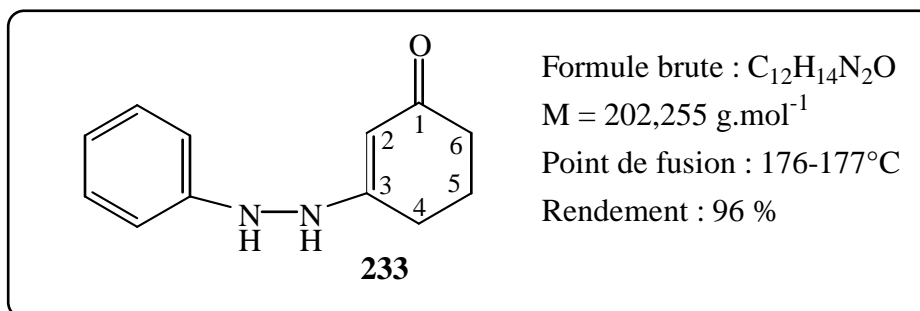
RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ ppm) : 17,11 (CH₃), 47,78 (CH₂), 52,28, 70,97, 111,34, 112,73, 121,17, 125,31, 125,57, 126,82, 127,03 138,81, 141,16, 144,37, 151,16, 151,36, 160,90,176,15 (CO), 178,58 (CO)

Analyse élémentaire : C₁₉H₁₅NO₂, 0,5 H₂O

% 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 goutte 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 filtration puis séché et recristallisé dans un mélange éthanol / eau. On obtient une poudre blanche (9,7g). La réaction est suivie en CCM (CH₂Cl₂ / MeOH 9 :1)

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 3250 (NH) , 1605 (C=O)

RMN ¹H (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, CH₂); 1,85 (m, 2H, CH₂)

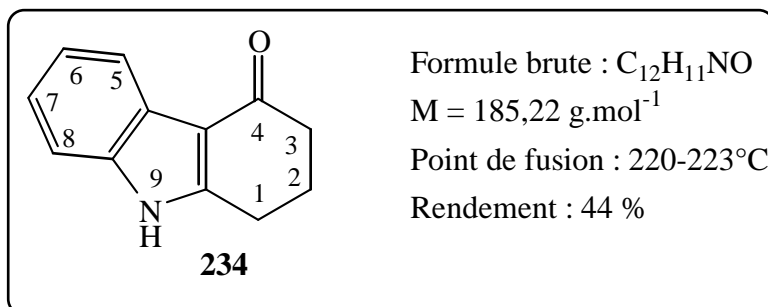
Litt. :

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

⁸⁴ J.K. Rodriguez, F. Temprano, C. Esteban-Calderon, M. Martinez-Ripoll. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1989**, 2117-2122

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

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



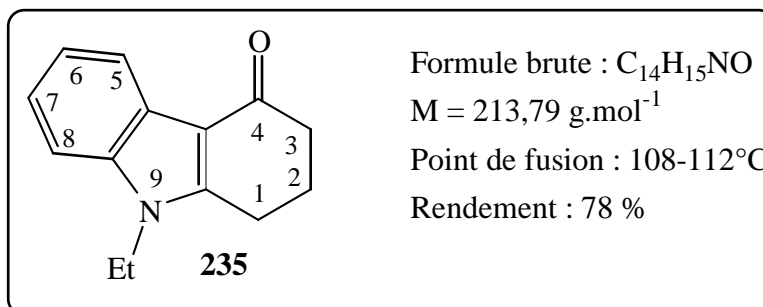
Mode opératoire :

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 (CH₂Cl₂/Acétate d'éthyle : 1 :1)

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 3110 (NH), 1610 (C=O)

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 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, CH₂); 2,60 (t, 2H, *J* = 6,4 Hz, CH₂); 2,24 (m, 2H, CH₂)

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 filtration 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 (CH₂Cl₂ pur).

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 1630 (C=O)

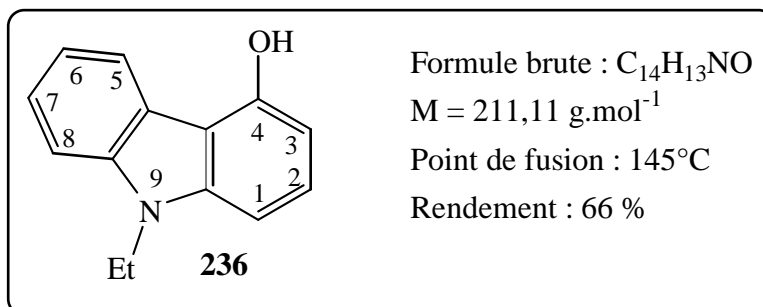
RMN ¹H (CDCl₃, J Hz, δ ppm) : 8,25 (m, 1H, H-5); 7,31-7,23 (m, 3H, H arom.); 4,13 (q, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂CH₃); 2,91 (t, 2H, J = 6,2 Hz, CH₂); 2,56 (t, 2H, J = 6,4 Hz, CH₂); 2,22 (m, 2H, CH₂); 1,39 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₂CH₃)

Litt. :

Point de fusion 107-109°C ⁸⁶

⁸⁶ H. Iida, Y. Yuasa, C. Kibayashi *J. Org. Chem.*, **1980**, 45, 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 CH₃CH₂I. 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 CH₂Cl₂. 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:CH₂Cl₂ / Ether de pétrole, 3/1). On obtient 3,8 g (18 mmol) de poudre blanche de l'hydroxycarbazole **236**.

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 3490 (OH)

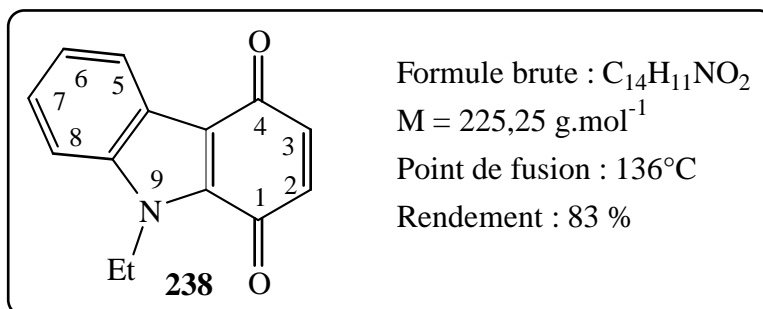
RMN ¹H (CDCl₃, J Hz, δ ppm) : 8,32 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-5); 7,50-7,24 (m, 4H, H arom.); 7,00 (d, 1H, J = 8,2 Hz, H arom.); 6,58 (d, 1H, J = 7,7 Hz, H arom.); 5,38 (s, 1H, OH); 4,35 (q, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂CH₃); 1,43 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₂CH₃)

Analyse élémentaire : C₁₄H₁₃NO

% 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 KH₂PO₄ 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 CH₂Cl₂, la phase organique est séchée sur MgSO₄. Le résidu obtenu après évaporation du solvant est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂ / Ether de pétrole, 1/1). On obtient 0,286 g de quinone **238** sous la forme d'une poudre rouge.

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 1660, 1640 (C=O)

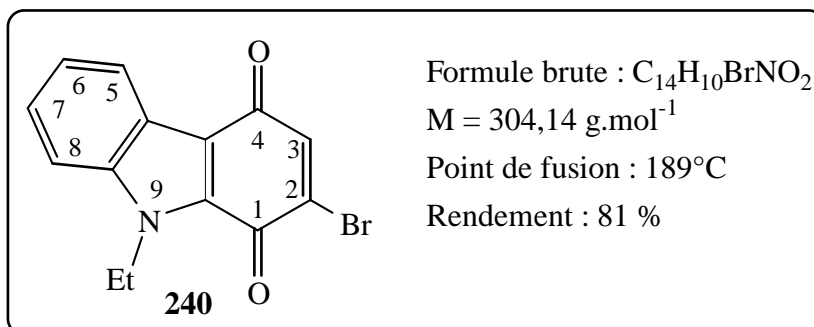
RMN ¹H (CDCl₃, J Hz, δ ppm) : 8,22 (d, 1H, J = 7,8 Hz, H-5); 7,40-7,26 (m, 3H, H arom.); 6,56 (système AB, 2H, J = 10,2 Hz, H-2 et H-3); 4,58 (q, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂CH₃); 1,38 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₂CH₃)

Analyse élémentaire : C₁₄H₁₁NO₂, 0,4 H₂O

% 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, $\nu \text{ cm}^{-1}$) : 1665, 1640 (C=O)

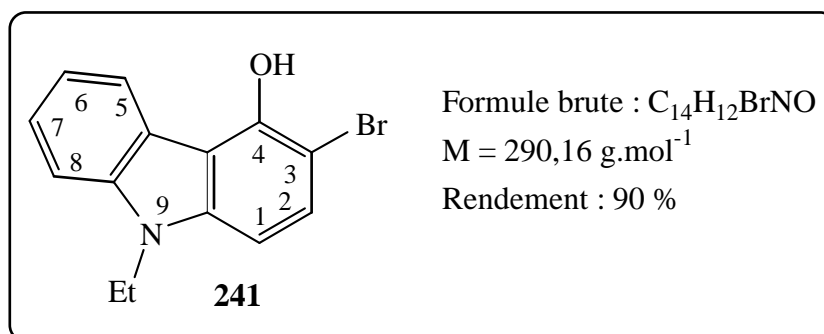
RMN 1H ($CDCl_3$, J Hz, δ ppm) : 8,25 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-5); 7,46-7,30 (m, 3H, H arom.); 7,19 (s, 1H, H-3); 4,65 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\underline{CH_2}CH_3$); 1,45 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, $CH_2\underline{CH_3}$)

Analyse élémentaire : $C_{14}H_{10}BrNO_2$

% 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, ν cm⁻¹) : 3520 (OH)

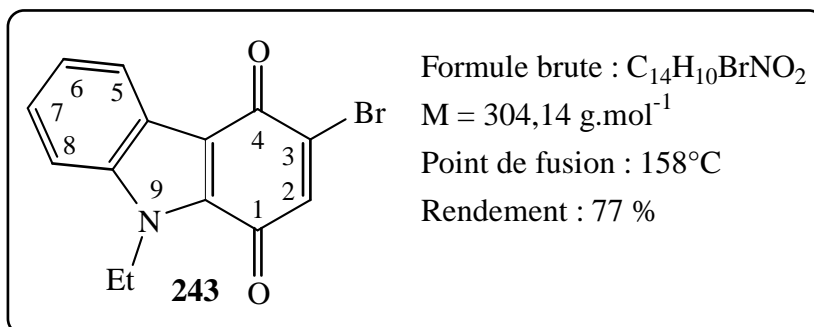
RMN ¹H (CDCl₃, J Hz, δ ppm) : 8,35 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-5); 7,51-7,46 (m, 2H, H arom.); 7,39 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-8); 7,31-7,28 (m, 1H, H arom.); 6,90 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-1); 6,1 (s, 1H, OH); 4,32 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH₂CH₃); 1,41 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH₂CH₃)

Analyse élémentaire : $C_{14}H_{12}BrNO$

% 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_2PO_4 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_2Cl_2 , la phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 / Ether de pétrole, 1/1). La bromoquinone **243** est obtenue sous la forme d'une poudre rouge (0,13 g).

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 1655 (C=O)

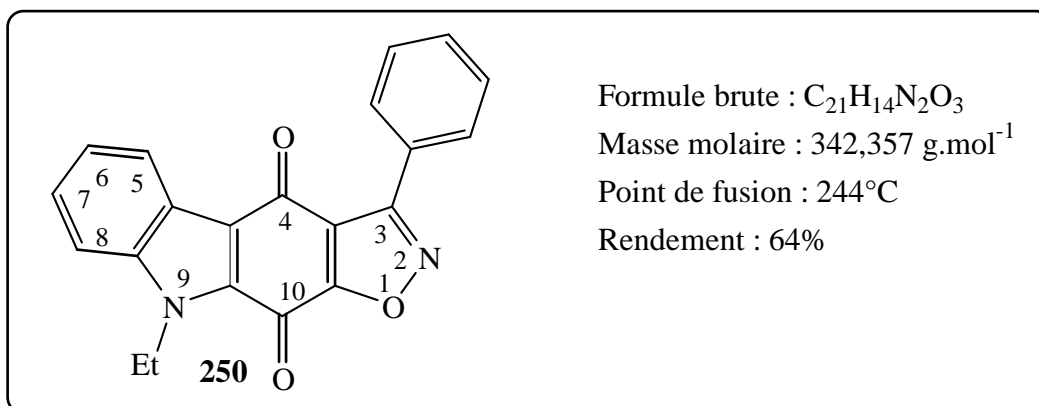
RMN ¹H (CDCl₃, J Hz, δ ppm) : 8,28 (m, 1H, H-5); 7,47-7,35 (m, 3H, H arom.); 7,13 (s, 1H, H-2); 4,63 (q, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂CH₃); 1,44 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₂CH₃)

Analyse élémentaire : $C_{14}H_{10}BrNO_2$, 0,15H₂O

% 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 : CH₂Cl₂ / Ether de pétrole, 1/1). On obtient 0,110 g (64%) de **250**.

250 est également purifié par recristallisation dans l'éthanol.

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 1673, 1658 (C=O)

RMN ¹H (CDCl₃, 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, CH₂CH₃); 1,52 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₂CH₃)

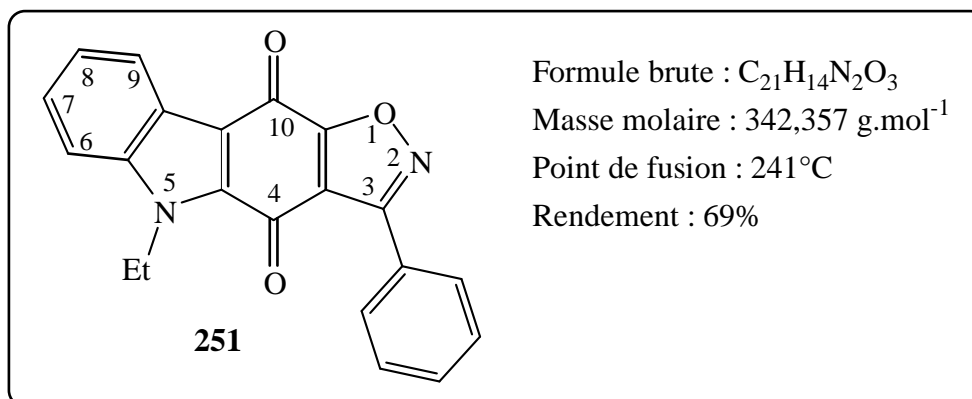
RMN ¹³C (CDCl₃, δ ppm) : 15,61 (CH₃), 40,92 (CH₂), 111,47 (CH), 119,42 (Cq), 120,44 (Cq), 124,19 (CH), 124,70 (Cq), 125,72 (CH), 126,97 (Cq), 128,41 (CH), 129,01 (2 CH), 129,98 (2 CH), 131,47 (CH), 132,92 (Cq), 140,26 (Cq), 161,15 (Cq), 167,43 (Cq), 168,20 (Cq), 177,24 (Cq)

Analyse élémentaire : C₂₁H₁₄N₂O₃, 0,5 H₂O

% 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, $\nu \text{ cm}^{-1}$) : 1667 (C=O)

RMN ^1H (CDCl_3 , 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, CH_2CH_3); 1,47 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH_2CH_3)

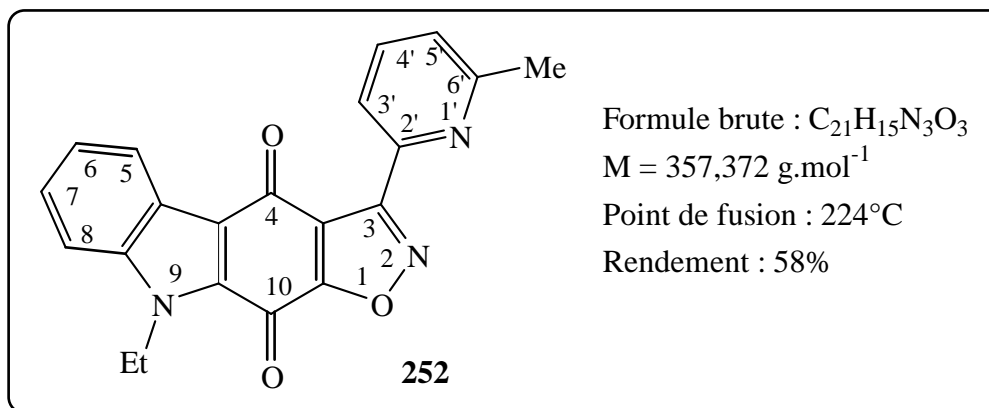
RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ ppm) : 15,50 (CH_3), 40,98 (CH_2), 111,66 (CH), 117,72 (Cq), 118 (Cq), 123,79 (CH), 124,10 (Cq), 126,01 (CH), 126,90 (Cq), 127,81 (CH), 129,02 (2 CH), 129,75 (2 CH), 131,50 (CH), 135,73 (Cq), 139,57 (Cq), 161,01 (Cq), 168,72 (Cq), 170,50 (Cq), 175,01 (Cq)

Analyse élémentaire : $C_{21}H_{14}N_2O_3$, 0,1 H_2O

% 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 (CH₂Cl₂) 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 : CH₂Cl₂ pur puis CH₂Cl₂ / AcOEt, 1/1). On obtient 0,105 g (58%) de **252**. **252** est également purifié par recristallisation dans l'éthanol.

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 1673 (C=O)

RMN ¹H (CDCl₃, J Hz, δ 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, CH₂CH₃); 2,71 (s, 3H, CH₃-6'); 1,52 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₃CH₂)

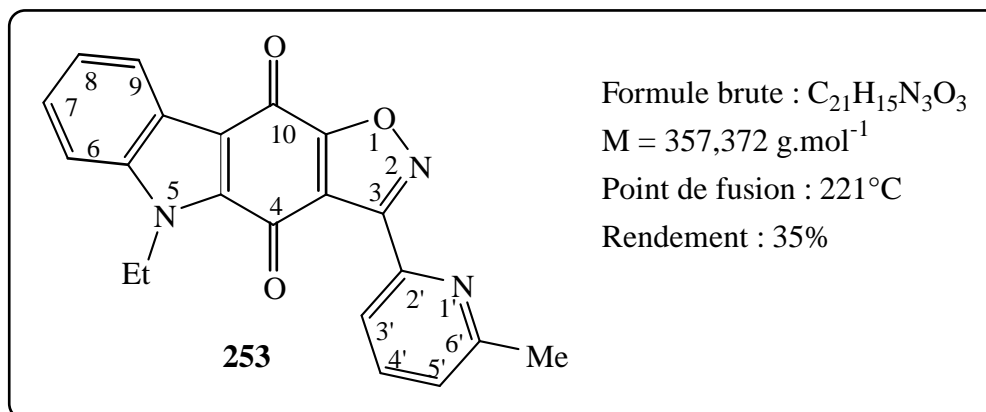
RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ ppm) : 15,61 (CH_3), 25,09 (CH_2), 40,96 (CH_3), 111,51 (CH), 119,64 (Cq), 120,436 (Cq), 123,19 (CH), 124,18 (CH), 124,68 (Cq), 125,56 (CH), 125,75 (CH), 128,45 (CH), 132,99 (Cq), 137,35 (CH), 140,28 (Cq), 146,05 (Cq), 159,73 (Cq), 160,56 (Cq), 167,33 (Cq), 168,07 (Cq), 176,91 (Cq)

Analyse élémentaire : $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3, 0,1 \text{ H}_2\text{O}$

% calculé : C 70,23, H 4,27, N 11,70

% trouvé : 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, ν cm⁻¹) : 1673 (C=O)

RMN ¹H (CDCl₃, J Hz, δ 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, CH₂CH₃); 2,71 (s, 3H, CH₃-6'); 1,47 (t, 3H, J = 7,2 Hz, CH₂CH₃)

RMN ¹³C (CDCl₃, δ ppm) : 15,44 (CH₃), 25,05 (CH₂), 40,96 (CH₃), 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),

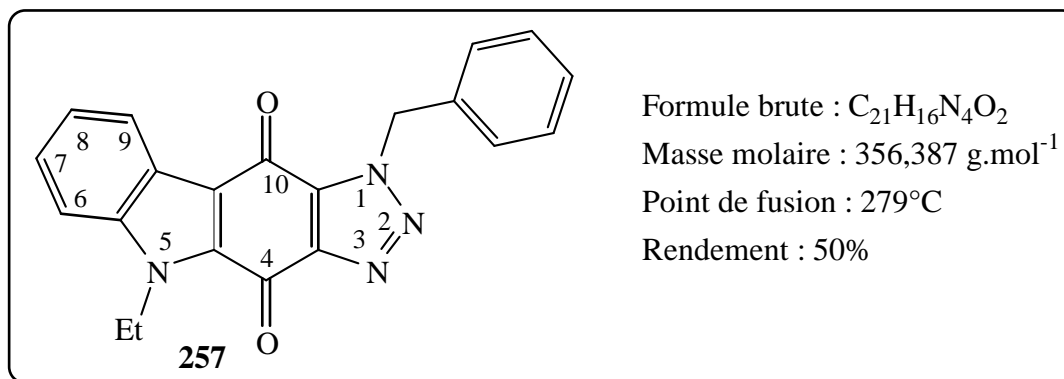
135,72 (Cq), 137,35 (CH), 139,51 (Cq), 146,07 (Cq), 159,71 (Cq), 160,47 (Cq), 168,48 (Cq),
170,30 (Cq), 174,43 (Cq)

Analyse élémentaire : $C_{21}H_{15}N_3O_3, 0,3 H_2O$

% 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 NaN₃ 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°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, ν cm⁻¹) : 1678, 1667, 1652

RMN ¹H (CDCl₃, 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, CH₂Ph); 4,76 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, CH₂CH₃); 1,48 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH₂CH₃)

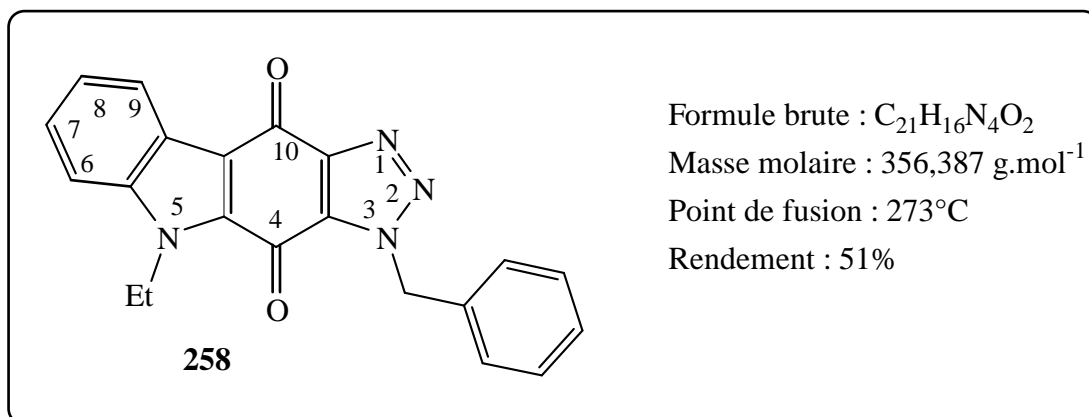
RMN ¹³C (CDCl₃, δ ppm) : 15,51 (CH₃), 40,95 (CH₂), 53,72 (CH₂), 111,66 (CH), 118,00 (Cq), 123,64 (CH), 124,37 (Cq), 125,81 (CH), 127,72 (CH), 129,08 (2 CH), 129,27 (CH), 129,35 (2 CH), 134,65 (2 Cq), 135,48 (Cq), 139,47 (Cq), 145,95 (Cq), 172,67 (CO), 172,90 (CO)

Analyse élémentaire : C₂₁H₁₆N₄O₂, 0,4 H₂O

% 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(3H,5H)-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, $\nu \text{ cm}^{-1}$) : 1666 (C=O)

RMN ^1H (CDCl_3 , 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, $\underline{\text{CH}_2}\text{Ph}$); 4,67 (q, 2H, $J = 7,2$ Hz, $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_3$); 1,48 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\underline{\text{CH}_3}$)

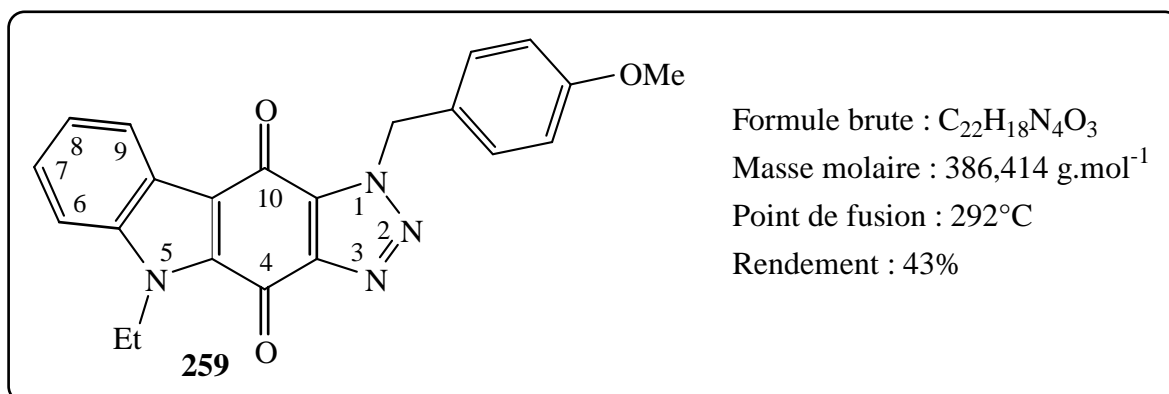
RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ ppm) : 15,56 (CH_3), 40,84 (CH_2), 53,93 (CH_2), 111,25 (CH), 119,97 (Cq), 124,42 (CH et Cq), 125,57 (CH), 128,24 (CH), 128,96 (2 CH), 129,33 (CH), 129,38 (2 CH), 133,56 (Cq), 133,95 (Cq), 134,48 (Cq), 139,96 (Cq), 147,12 (Cq), 170,41 (CO), 175,44 (CO)

Analyse élémentaire : $C_{21}H_{16}N_4O_2$, 0,2 H_2O

% 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(1*H*,5*H*)-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_3 , 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 $< 20^\circ\text{C}$. 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, $\nu \text{ cm}^{-1}$) : 1679, 1668, 1655

RMN ^1H (CDCl_3 , J Hz, δ ppm) : 8,38 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-9); 7,52 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-arom.); 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_2); 4,76 (q, 2H, $J = 6,9$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 3,80 (s, 3H, OCH_3); 1,48 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz, $\text{CH}_2\underline{\text{CH}_3}$)

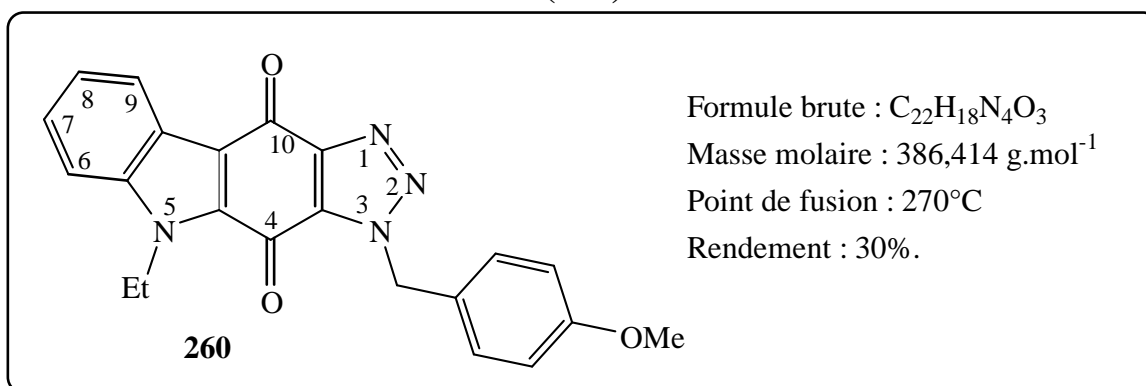
RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ ppm) : 15,37 (CH_3), 40,86 (CH_2), 53,26 (CH_2), 55,65 (CH_3), 111,55 (CH), 114,74 (2 CH), 118,85 (Cq), 123,67 (CH), 124,45 (CH), 125,67 (CH), 126,96 (Cq), 127,60 (Cq), 130,58 (2 CH), 134,56 (Cq), 135,60 (Cq), 139,52 (Cq), 146,01 (Cq), 160,51 (Cq), 172,73 (CO-10), 172,86 (CO-4)

Analyse élémentaire : $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$, 0,6 H_2O

% 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(3*H*,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 précédemment 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 : CH₂Cl₂ / Ether de pétrole 3/1 puis CH₂Cl₂ pur puis CH₂Cl₂ / 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, ν cm⁻¹) : 1666

RMN ¹H (CDCl₃, J Hz, δ 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, CH₂Ar); 4,69 (q, 2H, *J* = 7,2 Hz, CH₂CH₃); 3,78 (s, 3H, OCH₃); 1,49 (t, 3H, *J* = 7,2 Hz, CH₂CH₃)

RMN ¹³C (CDCl₃, δ ppm) : 15,33 (CH₃), 40,58 (CH₂), 53,25 (CH₂), 55,46 (CH₃), 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 C₂₂H₁₈N₄O₃ : 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^{41 51}. 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*⁸⁷. 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 tachyzoïtes⁸⁸. 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 1960⁸⁹.

⁸⁷ Z. Bouaziz, A. Ghérardi, F. Régner, M.E. Sarciron, X. Bertheau, B. Fenet, N. Walchshofer, H. Fillion. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 11, 1834-1838

⁸⁸ A. Wolf, D. Cowen, B. Paige. *Science*, **1939**;89 :226-227.

⁸⁹ G. Desmonts, J. Couvreur, F. Alison, J. Baudelot, J. Gerbeaux, M. Lelong. *Rev Fr Etudes Clin Biol.*, **1965**;10: 952-958.

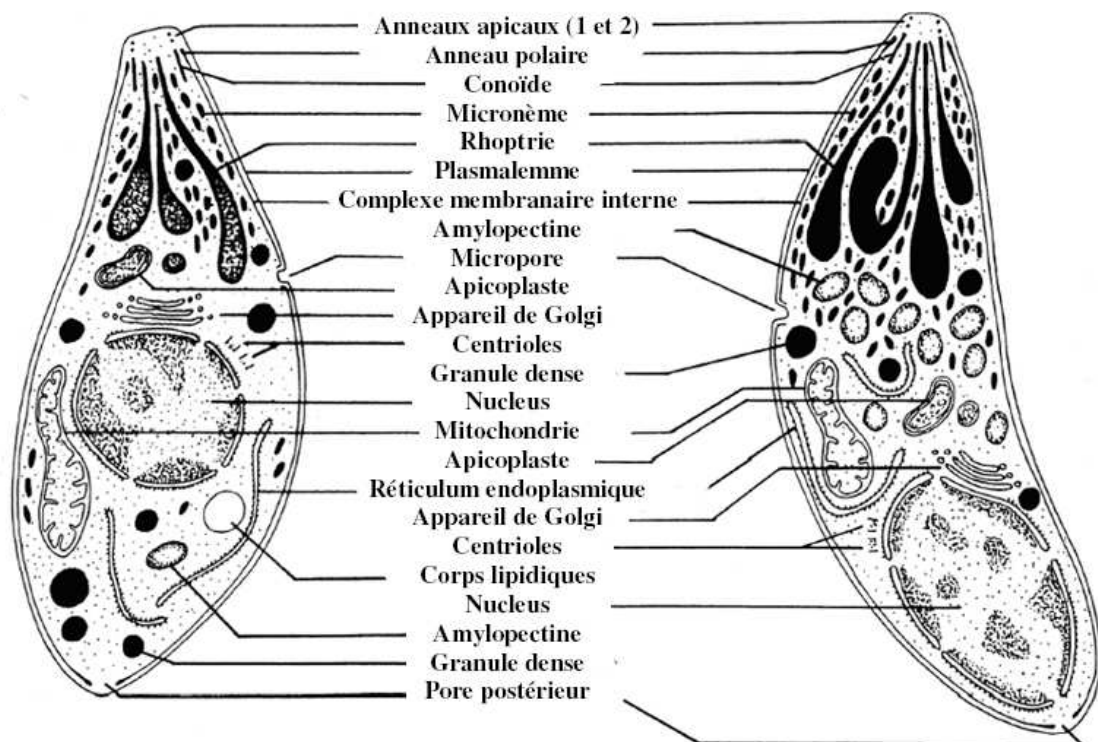


Figure 11 : Structure d'un tachyzoïte (gauche) et d'un bradyzoïte (droite) de *T. gondii* en microscopie électronique à transmission d'après Dubey et al. 1998⁹⁴

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^{90 91}.

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 aspect⁹⁴ 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 façon 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

⁹⁰ W.M. Hutchison. *Nature*, **1965**, 206: 961-962.

⁹¹ J.K. Frenkel, J.P. Dubey, M.L. Miller. *Science*, **1969**, 164, 432-33.

⁹² Site de l'université de Lille : cours de parasitologie sur la toxoplasmaose <http://arachosia.univ-lille2.fr/labos/parasito/Internat/courspar/toxopl.html> (consulté en 2007)

⁹³ Site de Wikipedia : http://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii (consulté en 2007)

⁹⁴ J.P. Dubey, D.S. Lindsay, C.A. Speer. *Clin Microbiol Rev.*, **1998**, 11 (2), 267-299.

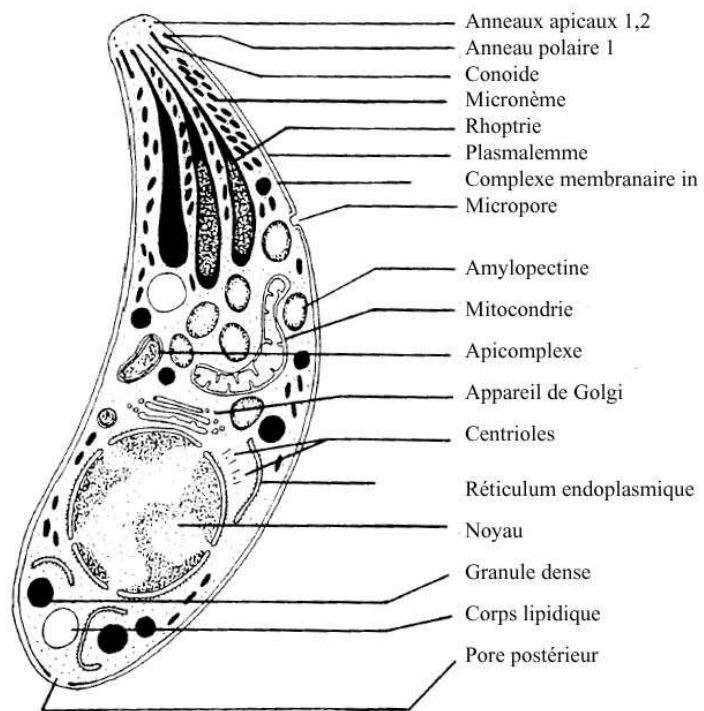


Figure 12 : Structure d'un sporozoïte de *T. gondii* en microscopie électronique d'après Dubey et al. 1998 ⁹⁴

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°C⁹⁵. Ils sont détruits après une congélation à -20°C pendant plusieurs jours, ou une cuisson à 70°C ou à 56°C pendant 30 min ou par salaison⁹⁵. 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 µm. Il est très résistant dans le milieu extérieur. Il est le résultat de la reproduction sexuée chez le félin 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 1,5µm 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 prolongée⁹². Ils résistent à l'acide gastrique, aux détergents, aux alcalis, aux acides. Il faut 1h avec de l'ammoniaque à 6% pour les détruire⁹⁵. 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 félins sauvages, l'hôte intermédiaire n'est pas spécifique, il s'agit d'animaux à sang chaud, c'est-à-dire les mammifères ou les oiseaux⁹⁶.

4.1) Félin : 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)

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., *Int J Parasitol.*, **1998**, 28, 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 μm , ne possède aucune division nucléaire, et son noyau est globuleux. Le microgamétocyte mâle est de forme sphérique (10 μm 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.

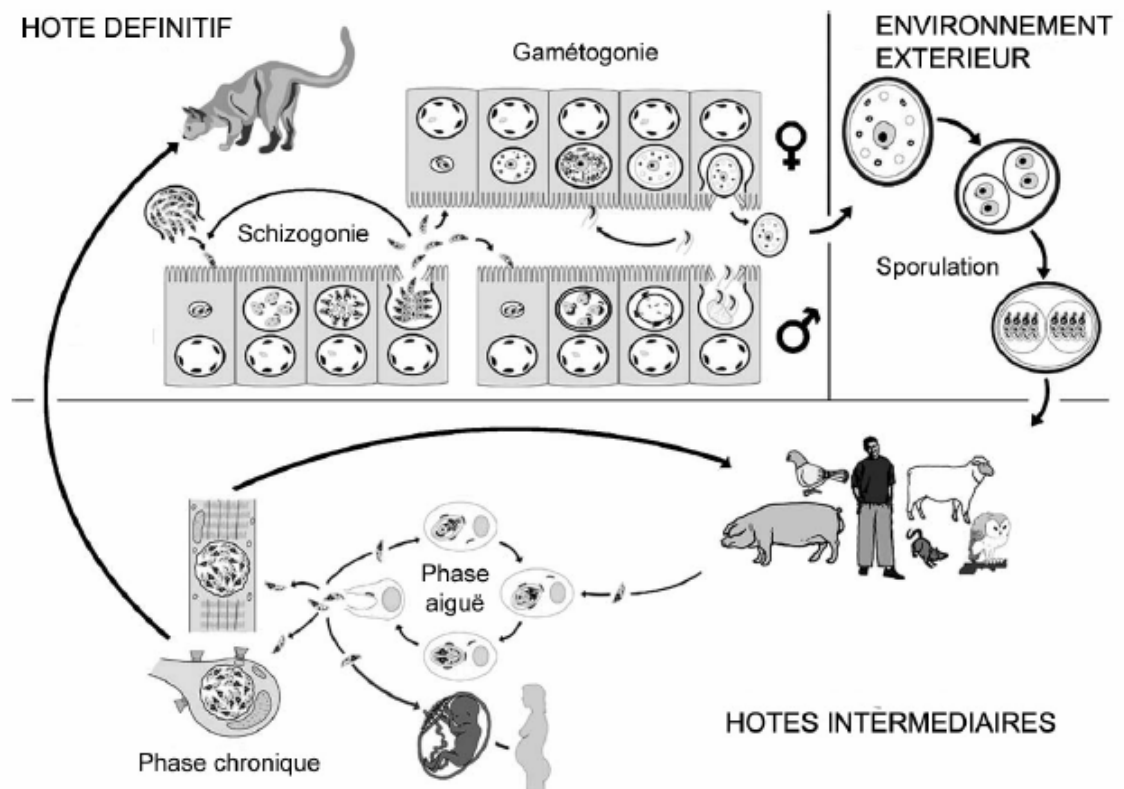


Figure 13 : Cycle parasitaire de *T. gondii*. d'après Ferguson 2004⁹⁷

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

⁹⁷ D.J.P. Ferguson *Int. J. Parasitol.*, 2004, 34, 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 aiguë 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°C⁹⁸. D'une façon générale, les oocystes perdent leur capacité à sporuler après congélation 1 jours à -21°C ou 7 jours à -6°C⁹⁹ ou après exposition à la chaleur 24 h à 37°C ou 10 minutes (min) à 50°C⁹⁶. La sporulation est encore possible après conservation des oocystes non sporulés à 4°C pendant 11 semaines¹⁰⁰. En conditions anaérobies, la sporulation peut être incomplète (arrêt au stade sporocyste) et produire des oocystes non infectants^{98 101}. La sporulation peut reprendre partiellement (4%) en conditions aérobies après 30 j d'anaérobiose⁹⁸.

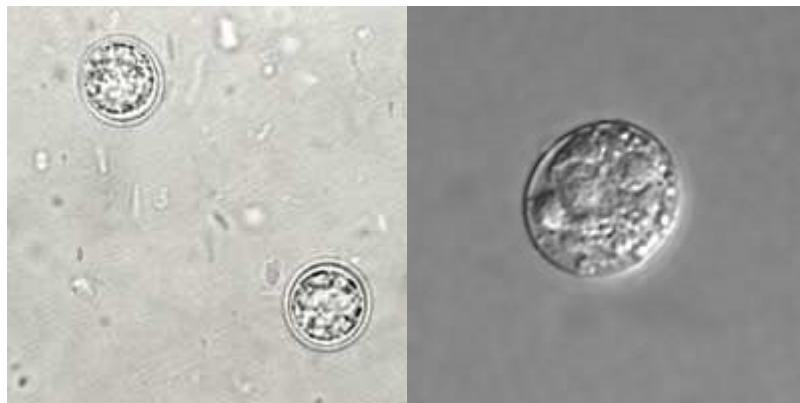


Figure 14 : Oocyste non sporulé Centers for Disease Control and Prevention (CDC)



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

⁹⁸ J.P. Dubey, N.L. Miller, J.K. Frenkel. *J. Exp. Med.*, **1970**, 132, 636-662

⁹⁹ J.K. Frenkel., J.P. Dubey. *J.Parasitol.*, **1973**, 59, 587-588

¹⁰⁰ D.S. Lindsay, B.L. Blagburn, J.P. Dubey. *Vet. Parasitol.*, **2002**, 103, 309-313.

¹⁰¹ J.P. Dubey, N.L. Miller, J.K. Frenkel. *J. Parasitol.*, **1970**, 56, 447-456

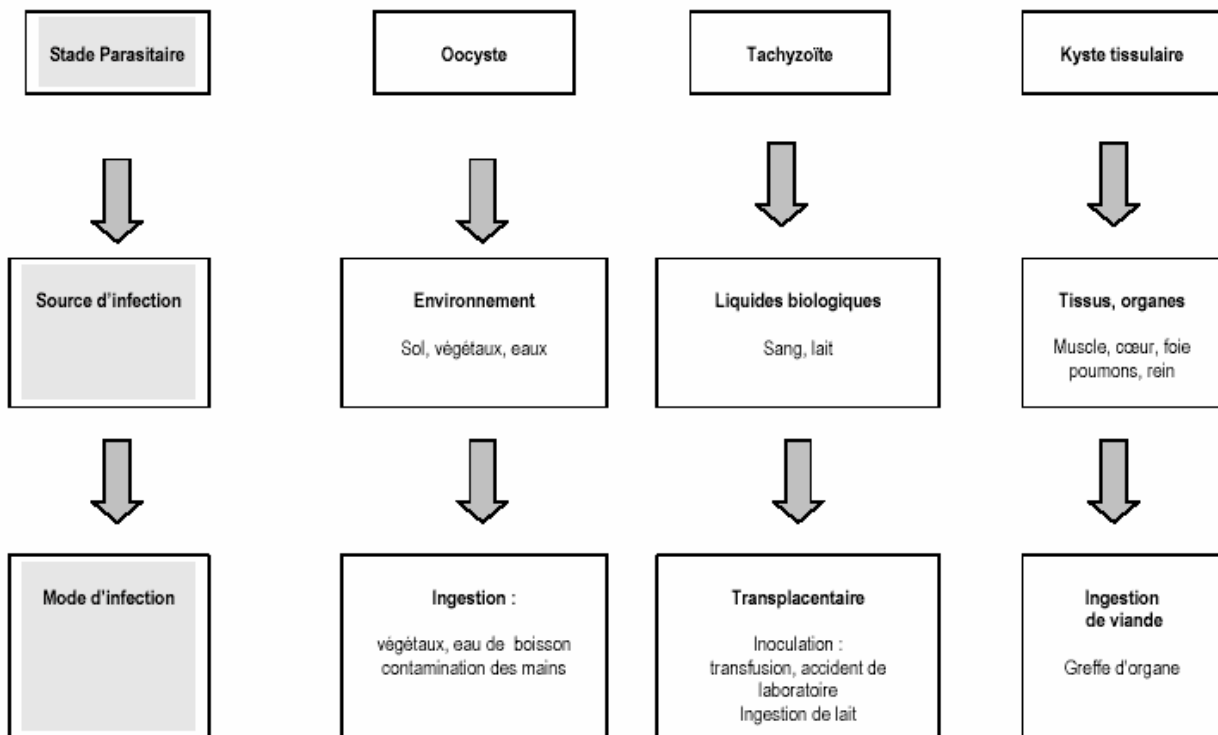


Figure 16 : Sources et modes de l'infection humaine à toxoplasmes ^{94 102}

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 %^{94 101}.

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 pays¹⁰¹.

La toxoplasmose est une parasitose avec trois réservoirs¹⁰²:

1^{er}: sol, eau, litière du chat: oocyste infestant.

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

3^{ème} : 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^{103 104}. Cette étude a été renouvelée lors de l'Enquête Nationale Périnatale 2003 avec la même méthodologie. La séroprévalence globale en 2003 est de 44%¹⁰⁵.

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)^{106 107 108}.

¹⁰² R. Evans, 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., BEH. **1996**, 51, 227-229.

¹⁰⁴ 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.

¹⁰⁵ F. Berger. Mémoire de Master M2 "Epidémiologie et recherche clinique". Université Paris XI. **2005**.

¹⁰⁶ F. Derouin, P. Thulliez, Y.J. Garin. *Pathol Biol*. **1991**, 39, 255-259.

¹⁰⁷ E. Candolfi, M.L. Partisani, E. De Mautort, S. Bethencourt, M. Frantz, T. Kien, J.M. Lang. *Presse Med.*, **1992**, 21, 394-395.

¹⁰⁸ 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 rétinoblastome. ⁹⁴

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 ⁹⁴. 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 ¹⁰⁹, caractérisées par une forte hyperplasie folliculaire, mais sans nécrose. Ces adénopathies cervicales 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. ⁹⁴

110

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 rétinobulbochoroïdite 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. ⁹⁴

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.

¹⁰⁹ R.E. Mc Cabe, R.G. Brooks, R.J.S. Dorfman. *Rev Infect Dis.* **1987**, 9, 754-774.

¹¹⁰ Moniteur de l'internat 4^{ème} tome , collectif, groupe LIAISONS, édition 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 ^{109 111}.

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 ¹¹², 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 rétinocoroïdites consécutives à une toxoplasmose récente, atteignant 14% des cas au cours de l'épidémie de Greater Victoria au Canada ¹¹³.

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 ¹¹⁴.

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,

¹¹¹ J. Diebold, J. Audouin, A. Letourneau, S. Caulet. *Revue Française des Laboratoires*. **1988**, 178, 83-89.

¹¹² J. Couvreur, P. Thulliez. *Presse Med.*, **1996**, 25, 438-42.

¹¹³ W.R. Bowie, A.S. King, D.H. Werker, J.L. Isaac-Renton, A. Bell, S.B. Eng, S.A. Marion. *Lancet*. **1997**, 350, 173-177.

¹¹⁴ 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 particulière¹¹⁸.

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^{119 120}¹²¹. 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 cérébrale¹²²^{123 124 125}. 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 allogénique¹²⁶.

¹¹⁵ S.K. Magid, L.J. Kagen. *Am J Med.*, **1983**, 75, 313-320

¹¹⁶ S.D. Mawhorter, D. Effron, R. Blinkhorn, P.J. Spagnuolo. *Clin Infect Dis.*, **1992**, 1, 1084-1088.

¹¹⁷ J. Chandénier, G. Jarry, D. Nassif, Y. Douadi, L. Paris, P. Thulliez, E. Bourges-Petit, C. Raccurt. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, **2000**, 19, 375-379.

¹¹⁸ B. Carne, 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**, 40, 4037-4044.

¹¹⁹ C. Pomeroy, G.A. Filice. *Clin Infect Dis.*, **1992**, 14, 863-870.

¹²⁰ F. Raffi, M. Tiab, O. Morin, F. Derouin. *Presse Med.*, **1992**, 28, 584-585.

¹²¹ C. Rabaud, T. May, J.C. Lucet, C. Leport, P. Ambroise-Thomas, P. *Clin Infect Dis.*, **1996**, 23, 1249-1254

¹²² B.J. Luft, Y. Naot, F.G. Araujo, E.B. Stinson, J.S. Remington. *Ann Intern Med.*, **1983**, 99, 27-31.

¹²³ G. E. Speirs, M. Hakim, R.Y. Calne, T.G. Wreghitt. *Clin Transplantation*, **1988**, 2, 257-260

¹²⁴ 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**, 42, 194-199.

¹²⁵ D.M. Israelski, J.S. Remington. *Curr Clin Top Infect Dis.*, **1993**, 13, 322-356.

¹²⁶ 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^{127 128}. Elle associe de la fièvre et une symptomatologie neurologique très diverse : céphalées, déficits moteurs ou sensitifs, comitialité, troubles psychiatriques^{128 129}. 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 radiologique¹³⁰.



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^{131 132 133}. On observe une grande variété de lésions cliniques, de type rétinocoréïdite, 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 associée¹³⁴. (figure 18)

¹²⁷ C. Leport, J.S. Remington. *Presse Med.*, **1992**, 21, 1165-1171

¹²⁸ 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**, 329, 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. *AIDS.*, **1997**, 11, 177-184.

¹³⁰ F. Gray, R. Gherardi, E. Wingate, J. Wingate, G. Fenelon, A. Gaston, A. Sobel, J. Poirier. *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 coll. *Am J Ophthalmol.*, **1992**, 114, 130-135.

¹³² G.N. Holland. *Am J Ophthalmology*, **2003**, 136, 973-988.

¹³³ G.N. Holland. *Am J Ophthalmology*, **2004**, 137, 1-17.

¹³⁴ I. Kuo, N.A. Rao. *Springer Sem Immunopathol.*, **1999**, 21, 161-177

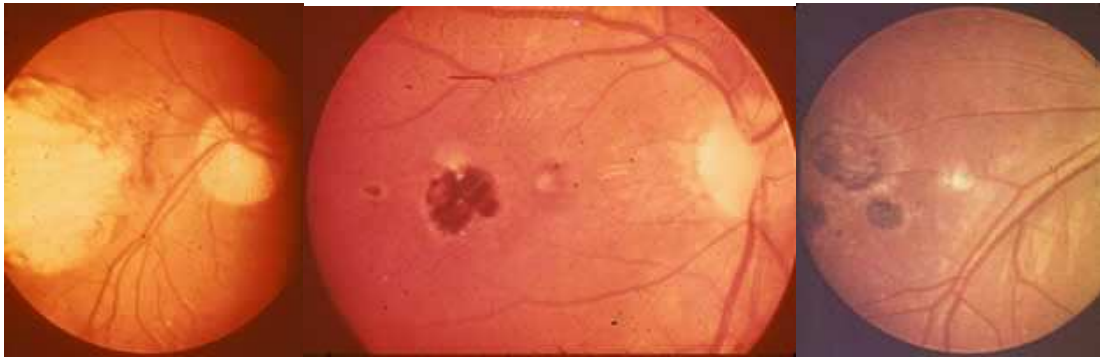


Figure 18 : rétinohoréidite, active , centrale ou péricphérique d'après Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

3.2.2.2. Localisation pulmonaire

Moins frquente, mais d'une extrême gravité, elle est observée chez des patients profondément immunodprimés et se caractérise par une pneumopathie hypoxémiante, avec un aspect radiologique de pneumopathie interstitielle^{119 121 135}. 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 choc¹³⁶.

3 2.2.3. Autres localisations et formes disséminées

De nombreuses autres localisations ont été décrites : médullaires, musculaires, cutanées, hépatiques, digestives, cardiaques, testiculaires^{135 137}.

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 infra-clinique. 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 1er 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

¹³⁵ C. Rabaud, T. May, C. Amiel, C. Katlama, C. Leport, P. Ambroise-Thomas, P. Canton. *Medicine (Baltimore)*. **1994**, 73, 306-314.

¹³⁶ J.C. Lucet, M.P. Bailly, J.P. Bedos, M. Wolff, B. Gachot, F. Vachon. *Chest.*, **1993**, 104, 1054-1058

¹³⁷ 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 inopinée¹⁴⁰. Il s'agit essentiellement de rétinoblastomes uni ou bilatéraux évoluant vers une cicatrisation pigmentée et/ou atrophique¹¹⁴.

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 :¹⁴¹

1. Atteinte neurologique avec hydrocéphalie (obstruction de l'aqueduc de Sylvius), microcéphalie, microphtalmie avec ou sans rétinoblastome. 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 naissance¹⁴².

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 rétinoblastome.

¹³⁸ D. Dunn, M. Wallon., F. Peyron., E. Pertersen., C. Peckham, R. Gilbert. *Lancet*, **1999**, 353, 1829-1833

¹³⁹ G. Desmonts, J. Couvreur. *Sem Hôp Paris*, **1986**, 62, 1418-1422

¹⁴⁰ F. Peyron, M. Wallon, C. Bernardoux. *N Engl J Med.*, **1996**, 334, 993-994.

¹⁴¹ G. Desmonts, J. Couvreur. In Conn RB (éditeur) "Current diagnosis" 7. WB Saunders Company, Philadelphia, **1974**, 274-297.

¹⁴² 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 ¹⁴³ 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.

¹⁴³ M. Wallon, L. Kodjikian, C. Binquet, J. Garweg, J. Fleury, C. Quantin, F. Peyron. *Pediatrics.*, **2004**, 113, 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^{94 144 145 146}.

5 2 Traitement de la toxoplasmose congénitale

5 2 1 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 fœtales¹⁴⁴. 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 est mieux établie^{147 148 149 150}, mais contestée par certains en l'absence d'étude prospective contrôlée^{151 152 153}.

¹⁴⁴ J. Couvreur, C. Lepout. Yu V.L., Merignac T.C., Barriere S.L.(ed) Williams & Wilkins. **1998**;600-612.

¹⁴⁵ F. Derouin. *Curr Opin Investig Drugs.*, **2001**,2, 1368-1374.

¹⁴⁶ L.H. Bosch-Driessen, F.D. Verbraak, M.S. Sutorp-Schulten, R.L. van Ruyven, A.M. Klok, C.B. Hoyng, A. Rothova. *Am J Ophthalmol.*, **2002**, 134, 34-40.

¹⁴⁷ F. Daffos, F. Forestier, M. Capella-Pavlovsky, P. Thulliez, C. Aufrant, D. Valenti, W.L. Cox. *N Engl J Med.*, **1988**, 318, 271-275.

¹⁴⁸ P. Hohlfeld, F. Daffos, P. Thulliez, C. Aufrant, J. Couvreur, J. MacAleese, D. Descombey, F. Forestier. *J Pediatr.*, **1989**, 5, 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.

5 2 2 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^{154 155 156 157}. Le traitement des rechutes et en particulier des rétinocoroidites toxoplasmiques aiguës associe préférentiellement pyriméthamine + sulfamide, éventuellement associés à une corticothérapie lorsque la composante inflammatoire est importante^{144 148 158}. D'autres alternatives thérapeutiques ont été proposées dans la toxoplasmose oculaire mais il manque des études cliniques comparatives^{159 160}.

5 3 Toxoplasmose chez l'immunodéprimé

5 3 1 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^{128 144}.

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

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. *Scand J Infect Dis.*, **1998**, 30, 295-300.

¹⁵⁰ 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**, 180, 410-415.

¹⁵¹ L. Gras, R.E. Gilbert, A.E. Ades, D. Dunn. *Int J Epidemiol.*, **2001**, 30, 1309-1313

¹⁵² R.E. Gilbert, L. Gras, M. Wallon, F. Peyron, A.E. Ades, D.T. Dunn. *Int J Epidemiol.*, **2001**, 30, 1303-1308.

¹⁵³ R. Gilbert, L. Gras. *BJOG.*, **2003**, 110, 112-20.

¹⁵⁴ J. Couvreur, Ph. Thulliez. *J Pédiatrie et de Puériculture.*, **1989**, 2, 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. *Clin Infect Dis.*, **1994**, 18, 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 coll. *Pediatrics.*, **1995**, 95, 11-20

¹⁵⁷ A.P. Brezin, P. Thulliez, J. Couvreur, R. Nobre, R. Mcleod, M.B. Mets. *Am J Ophthalmol.*, **2003**, 135, 779-84.

¹⁵⁸ G.N. Holland, K.G. Lewis. *Am J Ophthalmol.*, **2002**, 134, 102-114.

¹⁵⁹ P.A. Pearson, A.R. Piracha, H.A. Sen, G.J. Jaffe. *Ophthalmology*, **1999**, 106, 148-153

¹⁶⁰ M.R. Stanford, S.E. See, L.V. Jones, R.E. Gilbert. *Ophthalmology.*, **2003**, 110, 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 ¹⁶⁵, 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) ¹⁶⁶.

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 ¹⁶⁷.

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

¹⁶¹ 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

¹⁶² D. Torre, F. Speranza, R. Martegani, C. Zeroli, M. Banfi, M. Airoidi. *J Infect.*, **1998**, 37, 15-18.

¹⁶³ C. Katlama, B. Mouthon, D. Gourdon, D. Lapiere, F. Rousseau. *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. *Clin Infect Dis.*, **1997**, 24, 422-429

¹⁶⁵ J.F. Delfraissy (coordinateur). Rapport 2004 Ed. Médecine Flammarion, Paris., 164 pp.

¹⁶⁶ A.B. Foot, Y.J. Garin, P. Ribaud, A. Devergie, F. Derouin, E. Gluckman. *Bone Marrow Transplant.*, **1994**, 14, 241-245

¹⁶⁷ 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} .

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. *J Infect Dis.*, **2000**, 181, 1635-42.

¹⁶⁹ H. Furrer, M. Opravil, E. Bernasconi, A. Telenti, M. Egger *Lancet.*, **2000**, 355, 2217-2218.

¹⁷⁰ V. Soriano, C. Dona, R. Rodriguez-Rosado, P. Barreiro, J. Gonzalez-Lahoz. *AIDS.*, **2000**, 14, 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 parasite⁹⁴. 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 biliaire¹⁷¹.

Les autres macrolides¹⁷² comme l'azithromycine **262**¹⁷³, la roxithromycine¹⁷⁴ 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

¹⁷¹ VIDAL 2007

¹⁷² H.R. Chang, J.C.F. Pechere, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1988**, 32, 524-529

¹⁷³ J. Blais, V. Garneau, S. Chamberland. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, 37, 1701-1703

¹⁷⁴ B. Luft. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **1987**, 6, 479-481.

¹⁷⁵ F.G. Araujo, A.A. Khan, T.L. Slifer, A. Bryskier, J.S. Remington. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, 41, 2137-2140

toxoplasmoses cérébrales (traitement de deuxième intention) ou oculaires^{94 176 177 178}. Les macrolides et médicaments apparentés sont généralement bien tolérés ; des intolérances digestives, parfois graves, sont observées avec la clindamycine¹⁷¹.

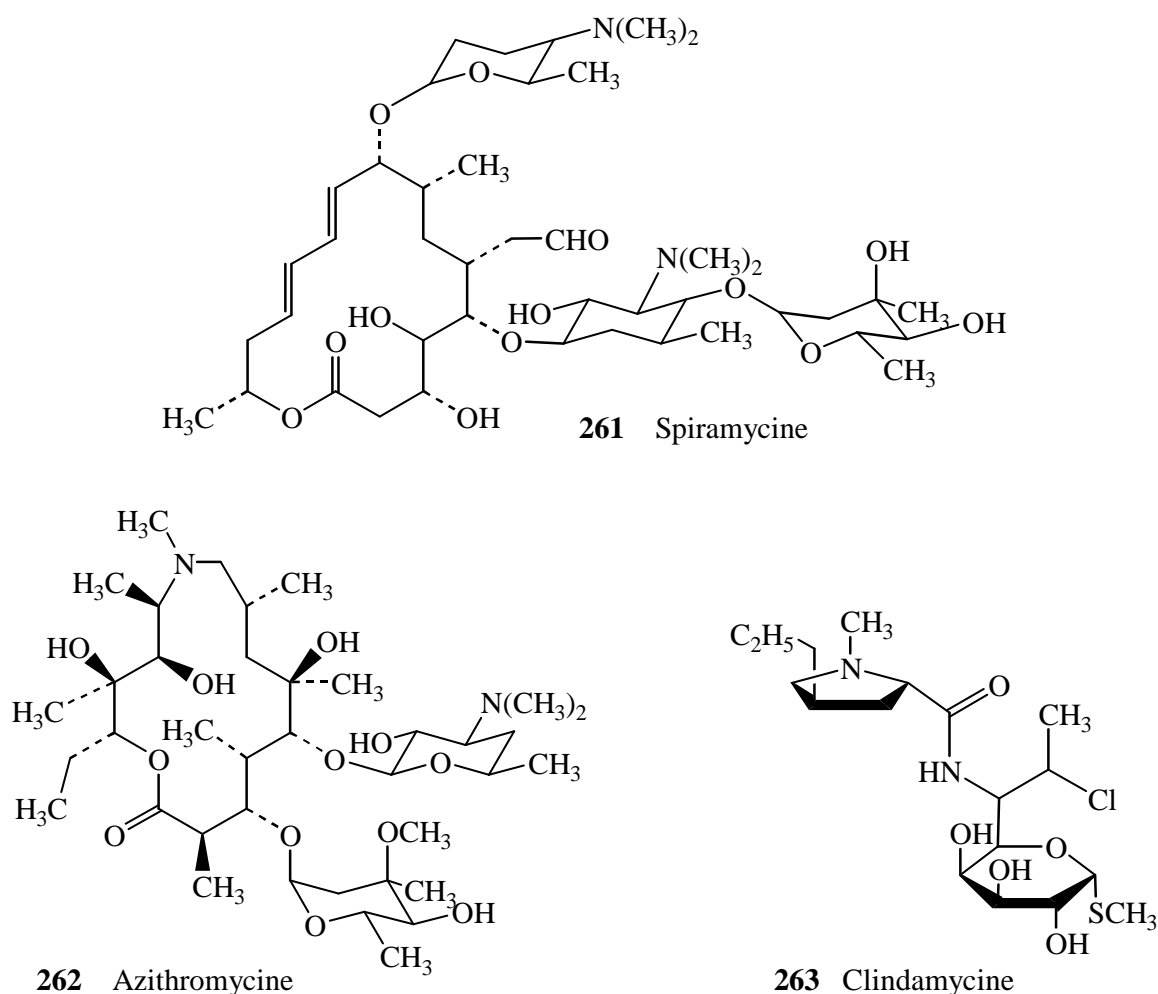


Schéma 78

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 µg/ml¹⁷⁹. 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

¹⁷⁶ J. Blais, C. Tardif, S. Chamberland *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, 37, 2571 - 2577

¹⁷⁷ B.R. Dannemann, D.M. Israelski, J.S. Remington. *Arch. Intern. Med.*, **1988**, 148, 2477 - 2482.

¹⁷⁸ J.M. Hofflin, J. S. Remington. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1987**, 31, 492 - 496

¹⁷⁹ F. Derouin, C. Chastang *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1989**, 33, 1753 - 1759

donner des réactions allergiques, des agranulocytoses, des leucopénies transitoires, des carences en acide folique pouvant entraîner une anémie mégalo-blastique. 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 ¹⁷¹. 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 ¹⁷⁹. 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 ¹⁷¹. 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 ⁹⁴.

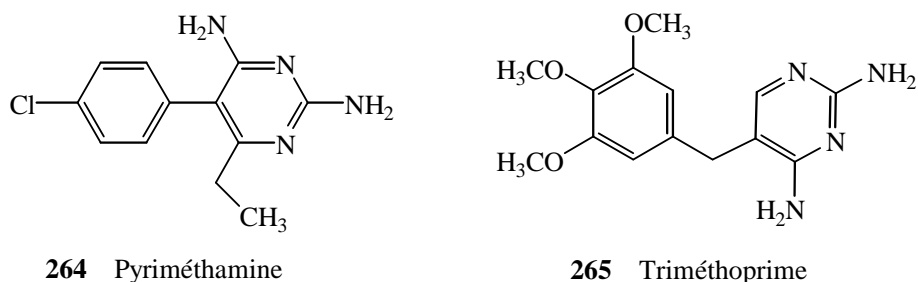
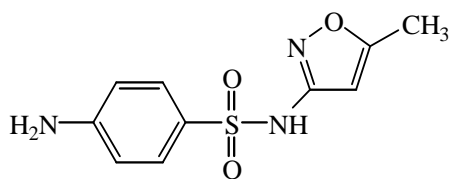


Schéma 79

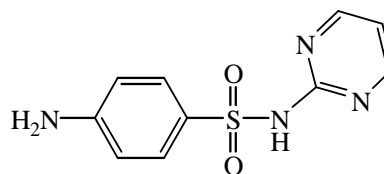
1.3) Les sulfamides

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 ¹⁷¹. 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 ⁹⁴. Parmi les associations les plus actives, figurent pyriméthamine + sulfadiazine, pyriméthamine + sulfadoxine (effet retard), et triméthoprime + sulfaméthoxazole ¹⁷⁹. 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

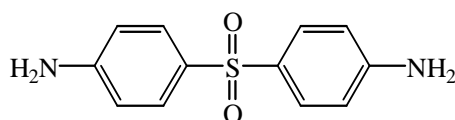
systématique d'acide folinique et/ou de signes d'intolérance cutanées, parfois graves tels que l'épidermolyse, syndrome de Lyell ¹⁷¹.



266 Sulfaméthoxazole



267 Sulfadiazine



268 Sulfone Dapsone

Schéma 80

1 4) 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 ¹⁷¹. L'atovaquone est une hydroxynaphtoquinone. La découverte de son effet anti-toxoplasmique a fait l'objet de nombreuses publications ^{180 181 182 183}. 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 ¹⁸⁴. 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.

¹⁸⁰ F.G. Araujo, J. Huskinson, J.S. Remington. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1991**, 35, 293–299

¹⁸¹ F.G. Araujo, J. Huskinson-Mark, W.E. Gutteridge, J.S. Remington *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, 36, 326–330

¹⁸² S. Romand, M. Pudney, F. Derouin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, 37, 2371–2378

¹⁸³ A.L. Baggish, D.R. Hill. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2002**, 46, 1163–1673, Minireview

¹⁸⁴ N. Scholer, K. Krause, O. Kayser, R.H. Muller, K. Borner, H. Hahn, O. Liesenfeld *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, 45, 1771–1779

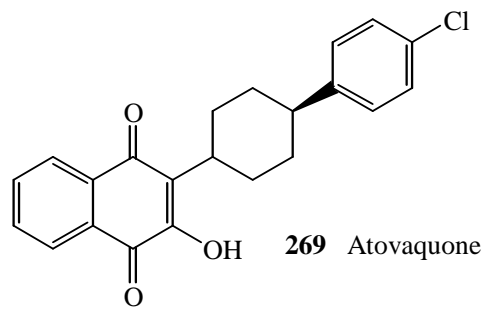


Schéma 81

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*¹⁸⁵. 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*¹⁸⁶.

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*¹⁸⁷. *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 µg/ml pour la pyriméthamine, 2,3 µg/ml pour le triméthoprime, 0,16 ng/ml pour le trimetrexate et 6,9ng/ml pour le piritrexime¹⁷⁹.

¹⁸⁵ J.A. Kovacs, C.J. Allegra, J.C. Swan, J.C. Drake, J.E. Parrillo, B.A. Chabner, H. Masur *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1988**, 32, 430–433

¹⁸⁶ F.G. Araujo, D.R. Guptill, J.S. Remington. *J. Infect. Dis.*, **1987**, 156, 828-830.

¹⁸⁷ C.J. Allegra, J.A. Kovacs, J.C. Drake, J.C. Swan, B.A. Chabner, H. Masur. *J. Clin. Invest.*, **1987**, 79, 478-482

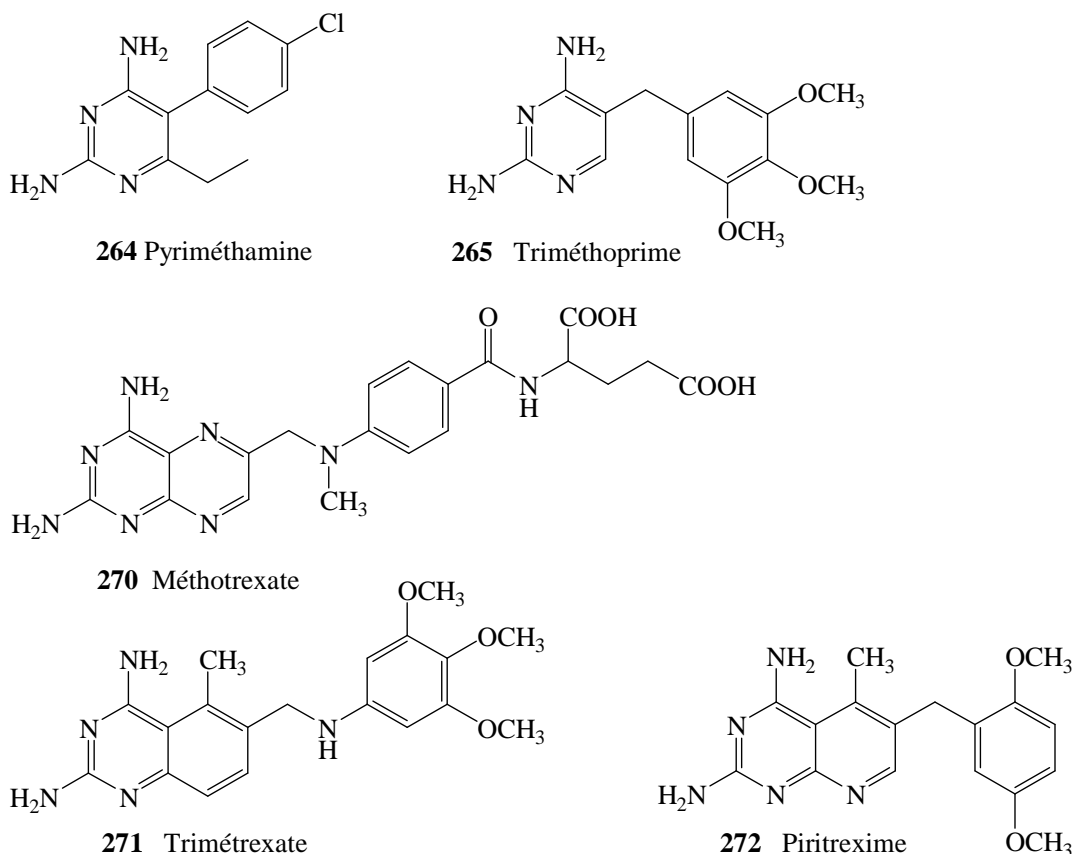


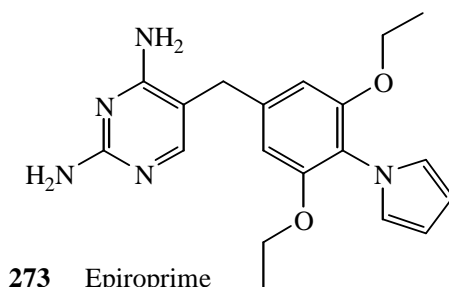
Schéma 82

L'épiroprime **273** seul ou combiné avec la dapsonne 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 dapsonne. Les effets *in vivo* sont synergiques avec la dapsonne, la pyriméthamine et la sulfadiazine ¹⁸⁸. La combinaison d'inhibiteurs de la DHFR (PS 15, l'épiroprime ou la pyriméthamine) et de dapsonne a été testée sur un modèle de rat, dans la prophylaxie d'une double infection par *T. gondii* et *P. carinii* ¹⁸⁹. Aucun des composés seuls ne prévient la toxoplasmose, mais la combinaison avec la dapsonne 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 triméthoprim, et il est inactif sur les DHFR humaines. La combinaison de l'épiroprime avec la dapsonne est synergique et montre une activité *in vitro* supérieure à la combinaison triméthoprim - sulfaméthoxazole sur la DHFR bactérienne ¹⁹⁰.

¹⁸⁸ H.R. Chang, D. Arsenijevic, R. Comte, A.M. Polak, R.L. Then, J.C. Pechere. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, 38, 1803–1807

¹⁸⁹ M. Brun-Pascaud, F. Oise Chau, L. Garry, D. Jacobus, F. Derouin, P.M. Girard. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, 40, 2067–2070

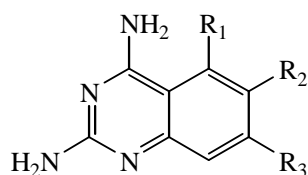
¹⁹⁰ H.H. Locher, H. Schlunegger, P.G. Hartman, P. Angehrn, R.L. Then *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, 40, 1376–1381



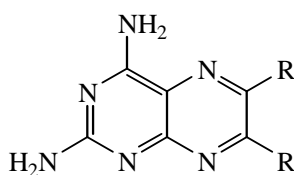
273 Epiroprime

Schéma 83

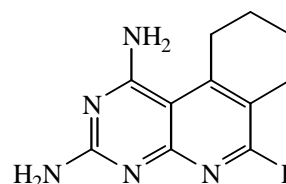
D'autres molécules inhibitrices de la DHFR ont été synthétisées et évaluées. Il s'agit de di-amino-quinazolines **274**, de di-amino-ptéridines **275**, de di-amino-tétrahydropyrimido-isoquinoline **276**, de di-amino-dihydrotriazines **277** et **278**¹⁹¹ (Schéma 84). Au total, cinquante et un composés 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 2,4-diaminoptéridines **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**.



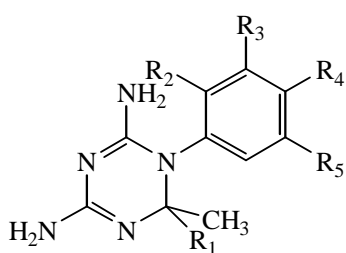
274 2,4-diaminoquinazolines avec des substituants en position 5, 6, ou 7



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

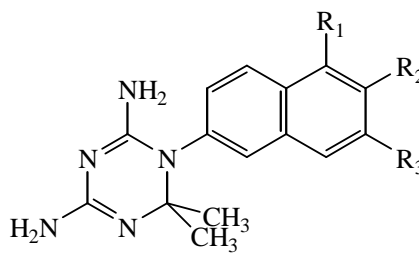


276 1,3-diamino-7,8,9,10-tétrahydro pyrimido[4,5-*c*] isoquinolines



277

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



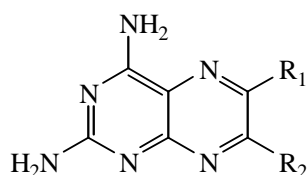
278

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

¹⁹¹ A. Rosowsky, J.B. Hynes, S.F. Queener *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1995**, *39*, 79–86

pyriméthamine **264**. Les concentrations inhibitrices 50 sont de l'ordre de 0,018 à 0,033 μM , comme inhibiteurs de la DHFR. Un de ces composés, le 6,7-dibutyl 2,4-diaminoptéridine **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 ¹⁹².



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

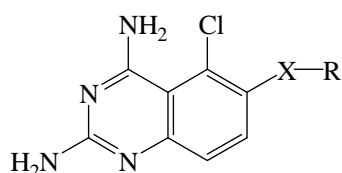
279 $R_1 = R_2 = i\text{-propyl}$

280 $R_1 = R_2 = i\text{-butyl}$

281 $R_1 = o\text{-méthoxyphényl}$ et $R_2 = \text{éthyl}$

Schéma 85

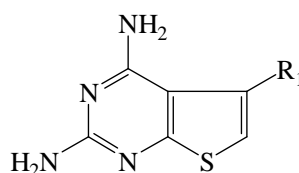
L'équipe de Lau 2001 ¹⁹³ a évalué 84 composés 2,4-diaminopyrimidine dicycliques et tricycliques comme inhibiteurs potentiels de la déshydrofolate réductase (DHFR) de plusieurs parasites incluant *Plasmodium falciparum*, et *Toxoplasma gondii*. Parmi ces composés, neuf composés (**282** à **290**) se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



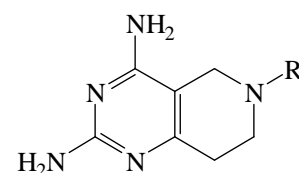
282 $X = \text{NHCH}_2$, $R = 2,5$ diméthoxyphényl

283 $X = \text{N(Me)CH}_2$, $R = 3,4,5$ triméthoxyphényl

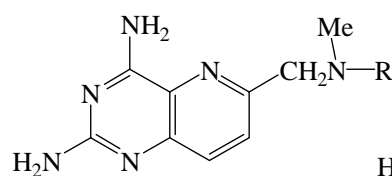
284 $X = \text{NHEt}$, $R = 2,5$ diméthoxyphényl



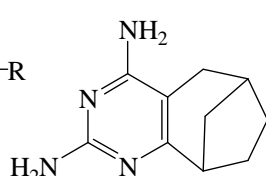
285 $R_1 =$
2-(2-bromo-3,4,5
triméthoxyphényl)éthyl



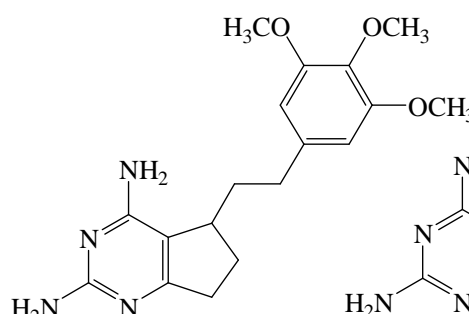
286 $R =$
2-bromo-3,4,5
triméthoxybenzyl



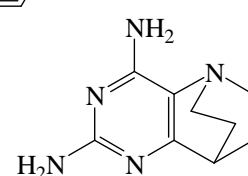
287 $R = 4$ chlorophényl



288



289



290

Schéma 86

¹⁹² H.C. Jackson, K. Biggadike, E. Mckilligin, O.S. Kinsman, S.F. Queener, A. Lane, J.E. Smith *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, *40*, 1371–1375

¹⁹³ H. Lau, J.T. Ferlan, V. Hertle Brophy, A. Rosowsky, C. Hopkins Sibley *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, *45*, 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 CI₅₀ de 6,4 µg/ ml ¹⁷⁹. 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 CI₅₀ sont de l'ordre de 8,9 à 42,7 µM. 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 ¹⁹⁴.

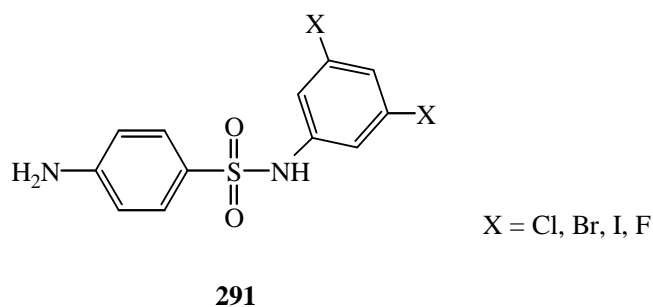


Schéma 87

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-naphthoquinones 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 µM pour l'atovaquone **269**, 0,11 µM et 0,10 µM pour les deux composés testés ¹⁹⁵.

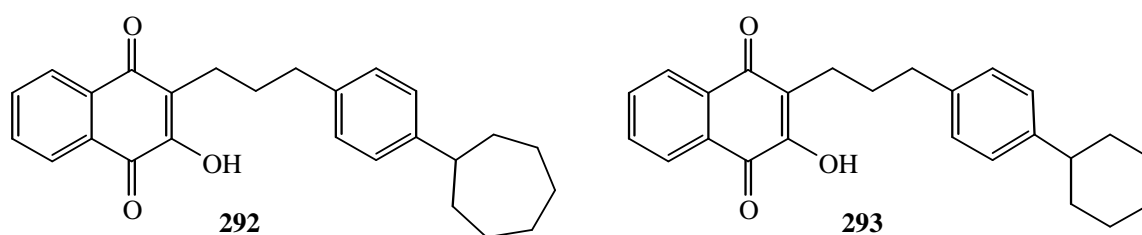


Schéma 88

Plus récemment, l'équipe de Ferreira 2002 ¹⁹⁶ a testé quatorze naphthoquinones naturelles ou synthétiques. *In vitro*, sept naphthoquinones ont montré une inhibition significative de la croissance de *T. gondii*, à des concentrations de 1 à 5 µg/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-

¹⁹⁴ L.C. Chio, L.A. Bolyard, M. Nasr, S.F. Queener *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, *40*, 727–733

¹⁹⁵ A.A. Khan, M. Nasr, F.G. Araujo *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, *42*, 2284–2289

¹⁹⁶ R.A. Ferreira, A.B Oliveira, S.A. Gualberto, R.W. Vitor *Parasite*, **2002**, *9* (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 ¹⁹⁷ 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* ¹⁹⁸. 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 % (CI₅₀) de doxycycline a été mesurée à 6,4 µg/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 intra-péritonéale.

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 moxifloxacin, d'autres sont commercialisées au Canada comme la gatifloxacin, et la trovafloxacin a été retirée du marché en 1997 suite à la survenue d'hépatites fulminantes.

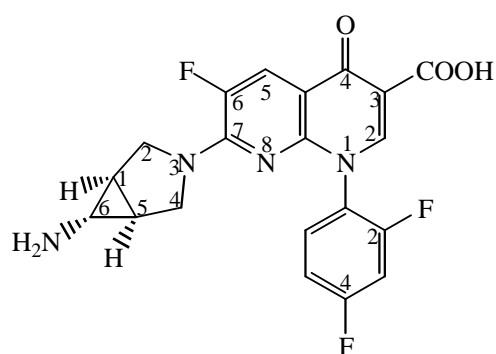
Avant d'être retiré du marché, la fluoroquinolone trovafloxacin **294** faisait l'objet d'investigation, en particulier par l'équipe de Khan. Elle s'est révélée être une molécule active contre *T. gondii*. D'autres fluoroquinolones ont été testées par l'équipe de Khan 1996 ¹⁹⁹ *in vitro* à des concentrations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

¹⁹⁷ R.A. Ferreira, A.B Oliveira, M.F. Ribeiro, W.L. Tafuri, R.W. Vitor *Exp Parasitol.*, **2006**, 113 (2), 125-129

¹⁹⁸ H.R. Chang, R. Comte, J.C. Pechere *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1990**, 34, 775-780

¹⁹⁹ A.A. Khan, T. Slifer, F.G. Araujo, J.S. Remington *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, 40, 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 µg/ml respectivement. La trovafloxacin **294** a été évaluée *in vivo* chez la souris. Un traitement des souris infectées par 100 à 200 mg/kg de trovafloxacin 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 trovafloxacin (25 mg/ kg/ jour) a été évaluée par cette même équipe en 1997²⁰⁰ *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 trovafloxacin à un autre anti-toxoplasmique comme la clarithromycine, la pyriméthamine ou la sulfadiazine est synergique.



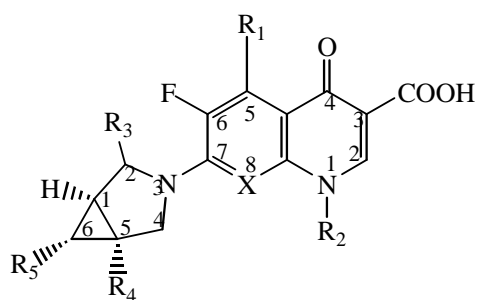
294 Trovofloxacin

Schéma 89

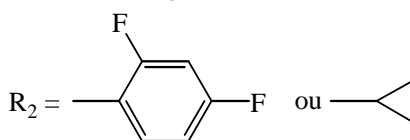
Cette même équipe en 1999²⁰¹ a évalué l'activité anti-toxoplasmique de plusieurs fluoroquinolones **295** dérivées de la trovafloxacin **294** (Schéma 90). L'inhibition de la réplication a été mesurée par la technique d'incorporation de [3H] uracile. La CI₅₀ est de 2,93 µM pour la trovafloxacin, et pour les 11 autres composés, elle varie de 0,53 à 14,09 µM. Six composés ont des CI₅₀ inférieures à celle de la trovafloxacin. 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.

²⁰⁰ A.A. Khan, T. Slifer, F.G. Araujo, R.J. Polzer, J.S. Remington *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, 41, 893–897

²⁰¹ A.A. Khan, F.G. Araujo, K.E. Brighty, T.D. Gootz, J.S. Remington *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, 43, 1783–1787



R₁ = H ou CH₃



R₃ = H ou CH₃

R₄ = H, NH₂ ou CH₂NH₂

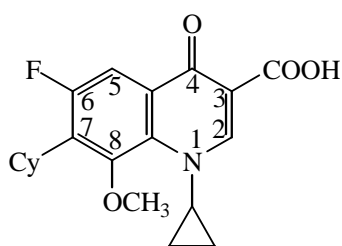
R₅ = H, NH₂, CH₂NH₂ ou NHCH₃

X = N ou C

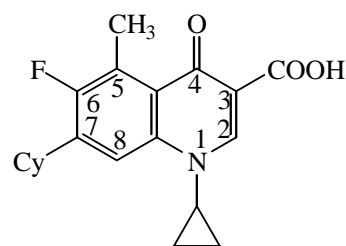
295 Fluoroquinolones

Schéma 90

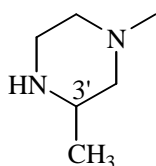
La gatifloxacinine **296** (Schéma 91) a été évalué *in vitro* sur *T. gondii*²⁰², elle inhibe la réplication intracellulaire des tachyzoïtes, avec une CI₅₀ de 0,21 mg/ml après 48h d'incubation. Elle a une action synergique avec la pyriméthamine. En effet après un traitement des cultures par de la gatifloxacinine et de la pyriméthamine (ratio 1 :1), et 48h d'incubation, l'effet synergique est démontré. Des doses de gatifloxacinine **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 gatifloxacinine **296** (200 mg/kg/jour) et de pyriméthamine (12,5 mg/kg/jour) donne 85% de survivants. Le traitement par la gatifloxacinine **296** seule donne 0% de survivant, et le traitement par la pyriméthamine seule donne 20% de survivants.



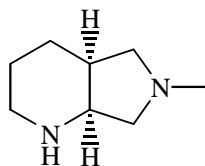
296 gatifloxacinine Cy = 3'-méthylpiperazine
297 moxifloxacinine Cy = piperidinopyrrolidine



298 grepafloxacinine Cy = 3'-méthylpiperazine



3'-méthylpiperazine



piperidinopyrrolidine

Schéma 91

²⁰² A.A. Khan, T.R. Slifer, F.G. Araujo, J.S. Remington *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, 45, 48–51

D'autres fluoroquinolones ont été testés par l'équipe de Gozalbes en 2000²⁰³ (Schéma 91). Sur les 24 composés évalués, 20 se sont révélées actives in vitro contre *T. gondii* avec des CI₅₀ de l'ordre de 10 mg/L. Les fluoroquinolones les plus actives sont la trovafloxacinine **296**, la grépafloracine **298**, la gatifloxacinine **296** et la moxifloxacinine **297**. Les CI₅₀ 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 gatifloxacinine et la moxifloxacinine (Schéma 91).

Les fluoroquinolones continuent de faire l'objet d'investigations. Les fluoroquinolones de références avec une activité importante anti-toxoplasmique restent la trovafloxacinine **294**, la gatifloxacinine **296** et la moxifloxacinine **297**. L'équipe d'Anquetin en 2004²⁰⁴, 2005²⁰⁵. et 2006²⁰⁶. a conçu de nouvelles fluoroquinolones par une analyse QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship). Les molécules synthétisées par l'équipe de Gozalbes en 2000²⁰³ ont été étudiées par analyse informatique, et les CI₅₀ 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-méthoxy-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 trovafloxacinine, la gatifloxacinine et la moxifloxacinine.

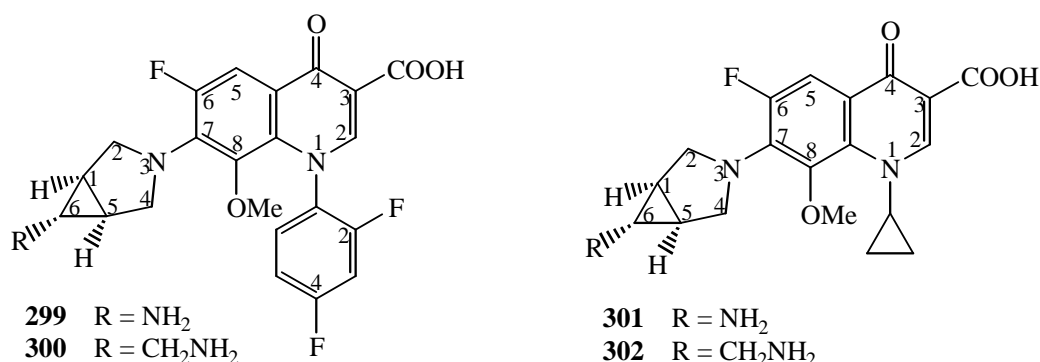


Schéma 92

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

²⁰³ R. Gozalbes, M. Brun-Pascaud, R. Garcia-Domenech, J. Galvez, P.M. Girard, J.P. Doucet, F. Derouin *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, 44, 2771-2776

²⁰⁴ 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**, 14 (11), 2773-2776

²⁰⁵ G. Anquetin, J. Greiner, P. Vierling *Curr Drug Targets Infect Disord.*, **2005**, 5 (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. *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, 41 (12), 1478-1493

in 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 µg /ml de rifabutine combinées avec des doses d'atovaquone de 0,01 à 0,02 µg/ 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 ²⁰⁷. 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 ²⁰⁸.

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 µg/ ml et 10 µg/ ml ²⁰⁹. 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 synergid, un composé constitué de quinupristine et de dalfopriline. *In vitro*, les 50% d'inhibition de la réplication intracellulaire des tachyzoïtes est atteinte pour le synergid, la quinupristine et la dalfopriline 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 synergid 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 dalfopriline seule donne 20% de souris survivantes. Le traitement avec 50 mg /kg/ jour de

²⁰⁷ S. Romand, C. Della Bruna, R. Farinotti, F. Derouin *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, 40, 2015–2020

²⁰⁸ F.G. Araujo, T. Slifer, J. S. Remington *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, 38, 570–575

²⁰⁹ F.G. Araujo, A.A. Khan, J.S. Remington *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, 40, 1335–1337

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

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

L'équipe de Chang 1989 ²¹² 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.

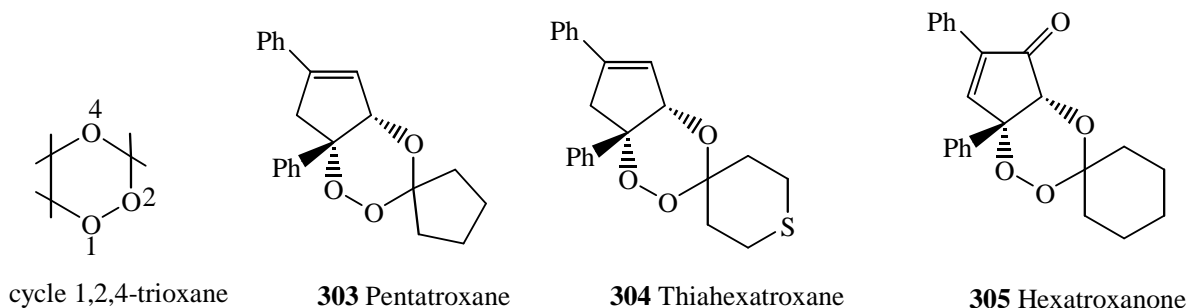


Schéma 93

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* ²¹³. 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.

²¹⁰ A.A. Khan, T.R. Slifer, F.G. Araujo, J.S. Remington *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, 43, 2043–2045

²¹¹ P.D. Walzer, A. Ashbaugh, M. Collins, M.T. Cushion *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, 45, 3234–3237

²¹² H.R. Chang, W. Jefford, J. Pechere *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1989**, 33, 1748–1752

²¹³ K. Ou-Yang, E. C. Krug, J. J. Marr, R. L. Berens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1990**, 34, 1961–1965

L'artémisinine à 0,4 µg/ml pendant 5 jours élimine les plaques de *T. gondii*. A des doses de 1,3 µg /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-éter-qinghaosu (artéether) **309** et le sec-butyl-éter-qinghaosu **312** sont plus actifs. Le méthyl-éter-qinghaosu (artémether) **308** est le plus actif.

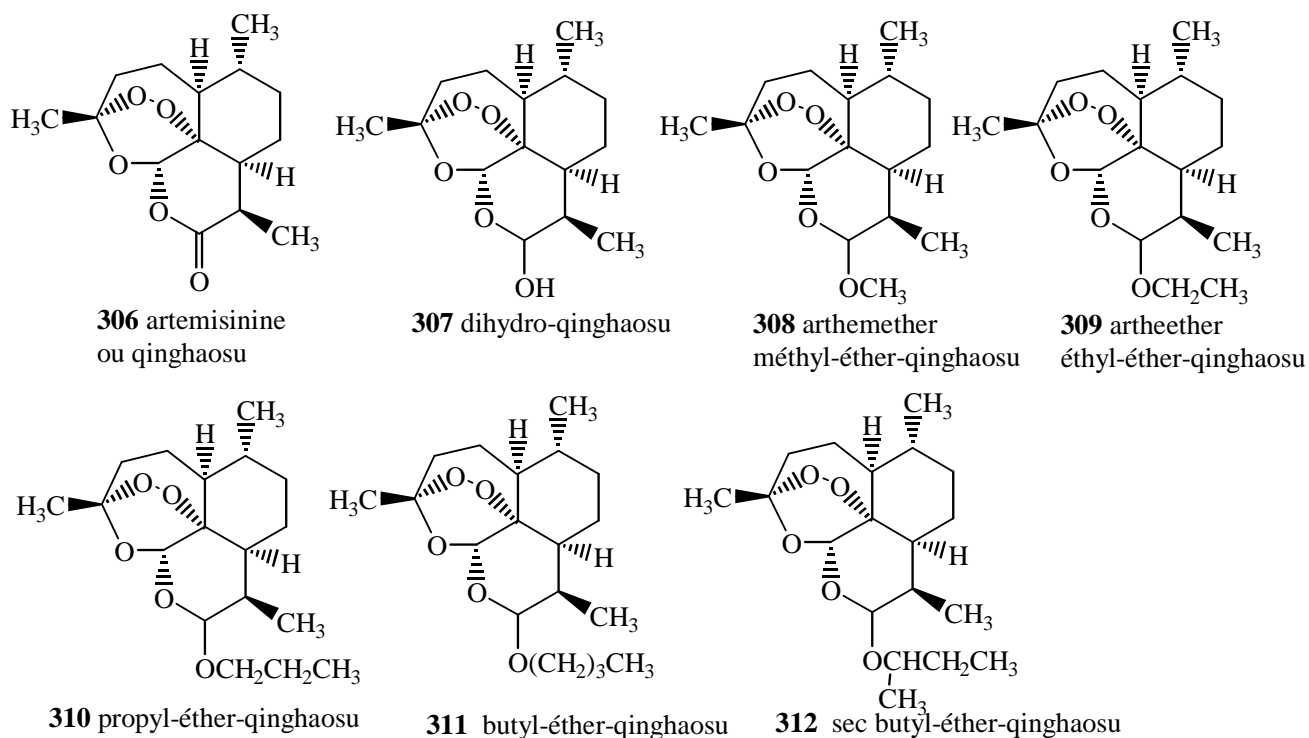


Schéma 94

L'équipe de Holfels en 1994 ²¹⁴ a testé plusieurs molécules, l'artémisinine éther (artéether) **309**, le cycloguanil, la méfloquine, le primaquine, le sulfate de quinine, le vérapamil, le trifluopérazine. L'artéether **309** à des doses supérieures ou égales à 0,5 µg/ml et le cycloguanil à des doses supérieures ou égales 1 µg/ml inhibent *T. gondii in vitro*. Le cycloguanil à 2,5 µg/ml combiné avec une concentration non inhibitrice de la sulfadiazine (25 µg/ml) inhibent la croissance de *T. gondii* de façon plus importante que le cycloguanil à 2,5 µg/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 µg/ml et le trifluopérazine à 0,5 µg/ml ne sont pas des inhibiteurs à ces concentrations basses, mais des concentrations plus importantes sont toxiques pour les cellules hôtes.

²¹⁴ E. Holfels, J. McAuley, D. Mack, W. K. Milhous, R. McLeod. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, 38, 1392–1396

L'équipe de Sarciron en 2000²¹⁵ a évalué l'effet de l'artésunate 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 µg/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 artésunate - 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 synthétisés²¹⁶ (Schéma 95). Ces composés ont des CI₅₀ de l'ordre de 8 à 0,7 µM. 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 µM alors qu'elle est de l'ordre de 340 µM à 1,560 µM pour les dérivés de l'artémisinine.

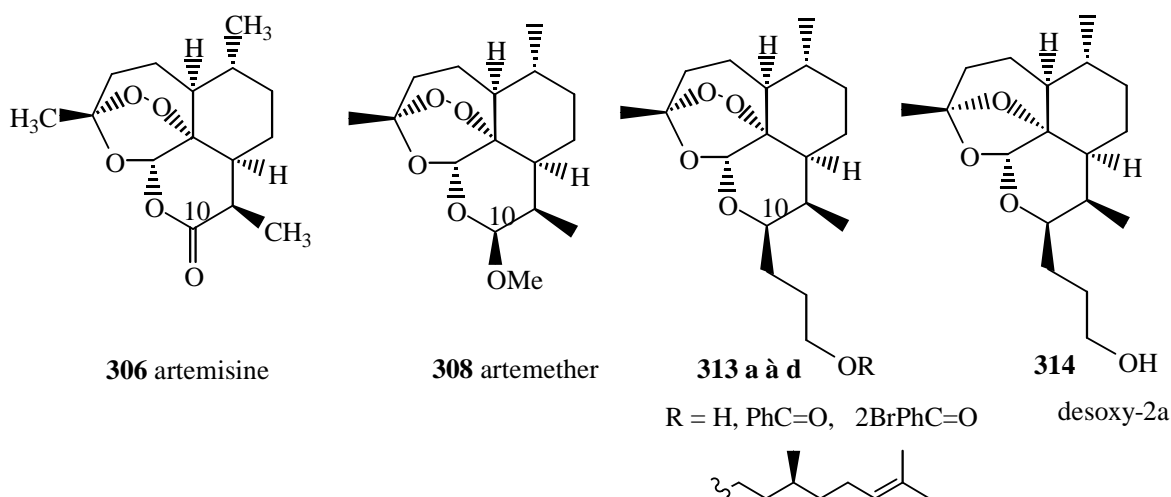


Schéma 95

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 viscérale¹⁷¹. 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

²¹⁵ M.E. Sarciron, C. Saccharin, A.F. Petavy, F. Peyron *Am J Trop Med Hyg.* **2000**, 62 (1), 73-76

²¹⁶ L. Jones-Brando, J. D'Angelo, G.H. Posner, R. Yolken *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2006**, 50, 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)²¹⁷.

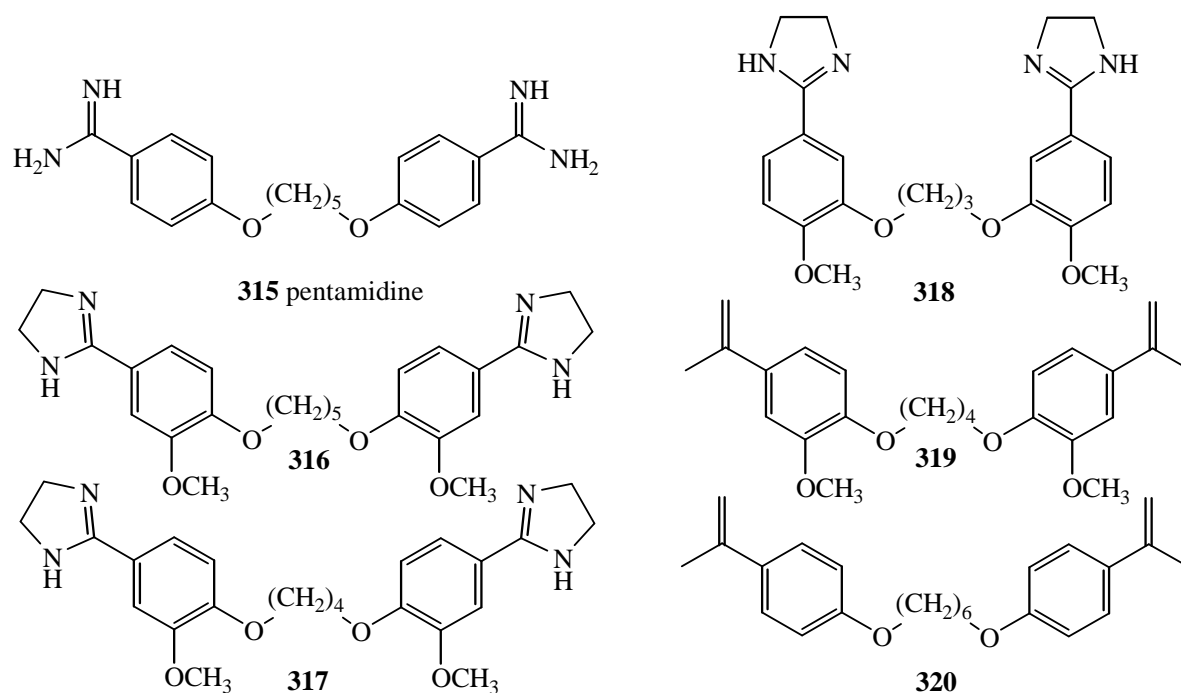


Schéma 96

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 fibroblasts) 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 μ M 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 employées²¹⁸.

²¹⁷ D.S. Lindsay, B.L. Blagburn, J.E. Hall, R.R. Tidwell *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1991**, 35, 1914–1916

²¹⁸ R. Estes, N. Vogel, D. Mack, R. Mcleod *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, 42, 2036–2040

L'équipe de Mack en 1984 ²¹⁹ a testé plusieurs molécules contre *T. gondii*, dont la ciclosporine A. Cette molécule a été décrite précédemment comme ayant une action sur *P. falciparum* ²²⁰. 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 ²¹⁹. Le métronidazole a aussi été testé dans les mêmes conditions, mais il s'est révélé inactif sur *T. gondii* ²¹⁶. L'équipe de Silverman 1997 ²²¹ 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 CI₅₀ 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 ($t_{1/2} < 20$ min), mais il existe une réversibilité, et c'est seulement au bout d'un temps de contact long (> 24 h), 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 ²²².

²¹⁹ D.G. Mack, R. Mcleod *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1984**, 28, 26–30

²²⁰ K. Thommen-Skott *Agents Action*, **1981**, 11, 770-773

²²¹ J.A. Silverman, M.L. Hayes, B.J. Luft, K.A. Joiner *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, 41, 1859–1866

²²² F.G. Araujo, T. Slifer *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1995**, 39, 2696–2701

L'équipe de Conseil 1999 ²²³ 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 bêta-galactosidase par lyse des cellules infectées suivie d'une réaction avec le rouge β -D-galactopyranoside et mesure de l'absorbance à λ 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 CO₂. 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-(2-aminoéthyl)-benzène sulfonyle préviennent l'invasion des cellules hôtes en affectant spécifiquement les cibles des parasites, de façon dose-dépendante avec des CI₅₀ 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 1 μ g/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 4 μ g/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 ²²⁵ 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

²²³ V. Conseil, M. Soete, J.F. Dubremetz *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, 43, 1358–1361

²²⁴ M.E. Sarciron, P. Lawton, C. Saccharin, A.F. Petavy, F. Peyron *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, 41, 1531–1536

²²⁵ F. Derouin, M. Santillana-Hayat *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, 44, 2575–2577

culture avec des fibroblastes, auxquels on ajoute les molécules à tester à des concentrations de 0,0005 à 100 µg/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 CI₅₀ de 5,4 et 4,0 µg/ml. Les effets toxiques pour 50% des cellules hôtes sont de 20 µg/ml pour la nelfinavir et de 40 µg/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*²²⁶. L'activité *in vivo* antiparasitaire, dirigée contre *Leishmania donovani* 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. donovani*, le risédronate est actif contre *L. donovani*, 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/kg²²⁷
228

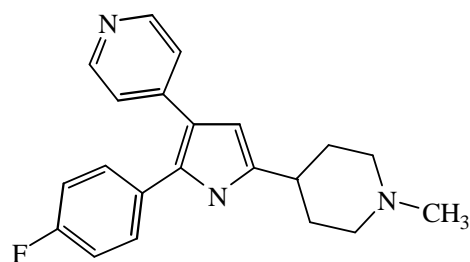
Le pyrrole trisubstitué 4-[2-(4-fluorophenyl)-5-(1-méthylpiperidine-4-yl)-1H-pyrrol-3-yl]pyridine **321** (Schéma 97) est un inhibiteur potentiel de la protéine kinase dépendant du GMP cyclique des apicomplexes. Ce composé a été évalué sur des souris infectées par *T. gondii*, par voie intra-péritonéale²²⁹. 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 déficientes en interféron gamma. Tant qu'elles sont traitées par le dérivé pyrrolé, les 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.

²²⁶ M.B. Martin, et al. *J. Med.Chem.*, **2001**, 44, 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 *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2002**, 46, 929–931

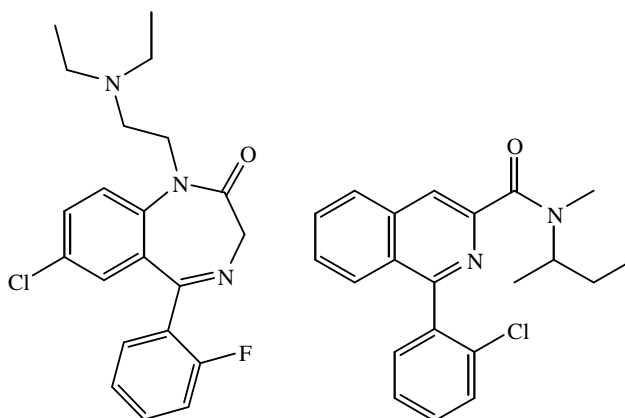
²²⁸ Y. Ling, G. Sahota, S. Odeh, J.M. Chan, F.G. Araujo, S.N. Moreno, E. Oldfield *J Med Chem.*, **2005**, 48 (9):3130-3140

²²⁹ B. Nare, J.J. Allocco, P.A. Liberator, R.G.K. Donald *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2002**, 46, 300–307



321
Schéma 97

Le flurazépam **322** s'est révélé être un inhibiteur de la croissance de *T. gondii in vitro* ²³⁰. 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* ²³⁰.



322 Flurazepam

323 PK 11195

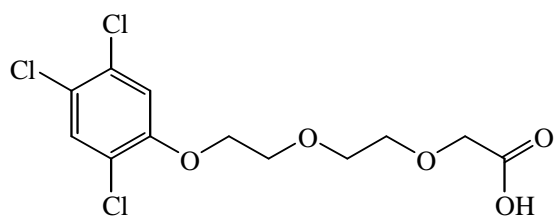
Schéma 98

L'équipe d'Asai en 2002 ²³¹ 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_{50} de l'ordre de 0,1 à 20 μ M. Les CI_{50} 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(3.3.1.1^{3,7})dec-1-ylcarbonyl]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-

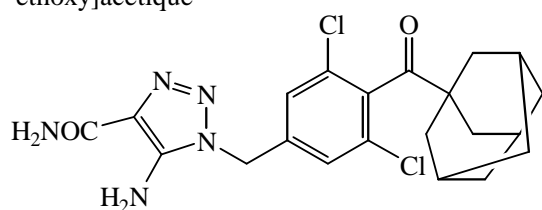
²³⁰ F. Dzierszynski, A. Coppin, M. Mortuaire, E. Dewailly, C. Slomianny, J.C. Ameisen, F. DeBels, S. Tomavo *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2002**, 46, 3197–3207

²³¹ T. Asai, T. Takeuchi, J. Diffenderfer, L.D. Sibley *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2002**, 46, 2393–2399

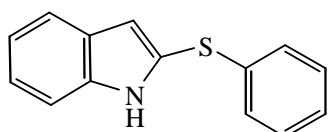
galactosidase. Les composés inhibiteurs potentiels sont ajoutés et le tout est incubé 48h à 37°C. Après une lyse des cellules et des parasites, l'activité galactosidase est quantifiée avec le rouge de chlorophénol D-galactopyranoside. Le nombre de tachyzoïtes est estimé à l'aide d'une courbe étalon. Ces composés inhibent aussi la réplication des tachyzoïtes *in vitro*, avec des CI_{50} de l'ordre de 7 à 50 μ M. Le composé le plus actif est le 2-phénylthio-indole **327**.



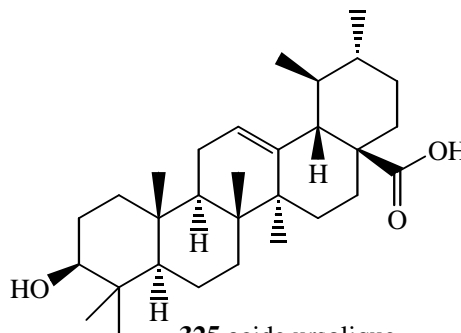
324 acide 2-[2-[2-(2,4,5-trichlorophénoxy)éthoxy]éthoxy]acétique



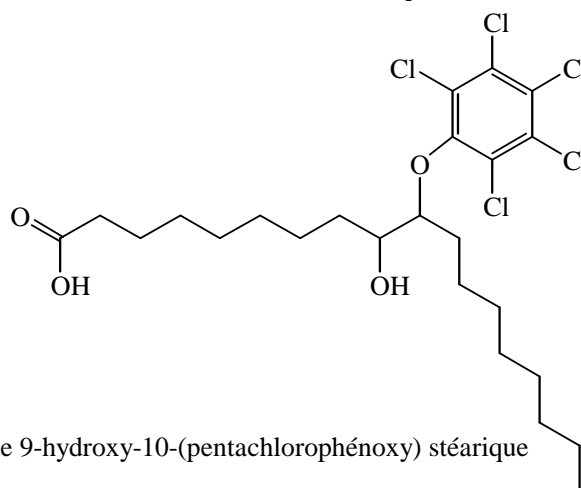
326 1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide, 5-amino-1-(3,5-dichloro-4-[tricyclo(3.3.1.1.3,7)dec-1-ylcarbonyl]phenyl)méthyle



327 2-phénylthio-indole



325 acide ursolique



328 acide 9-hydroxy-10-(pentachlorophénoxy) stéarique

Schéma 99

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_{50} de l'ordre 3,2 à 44 μ M .

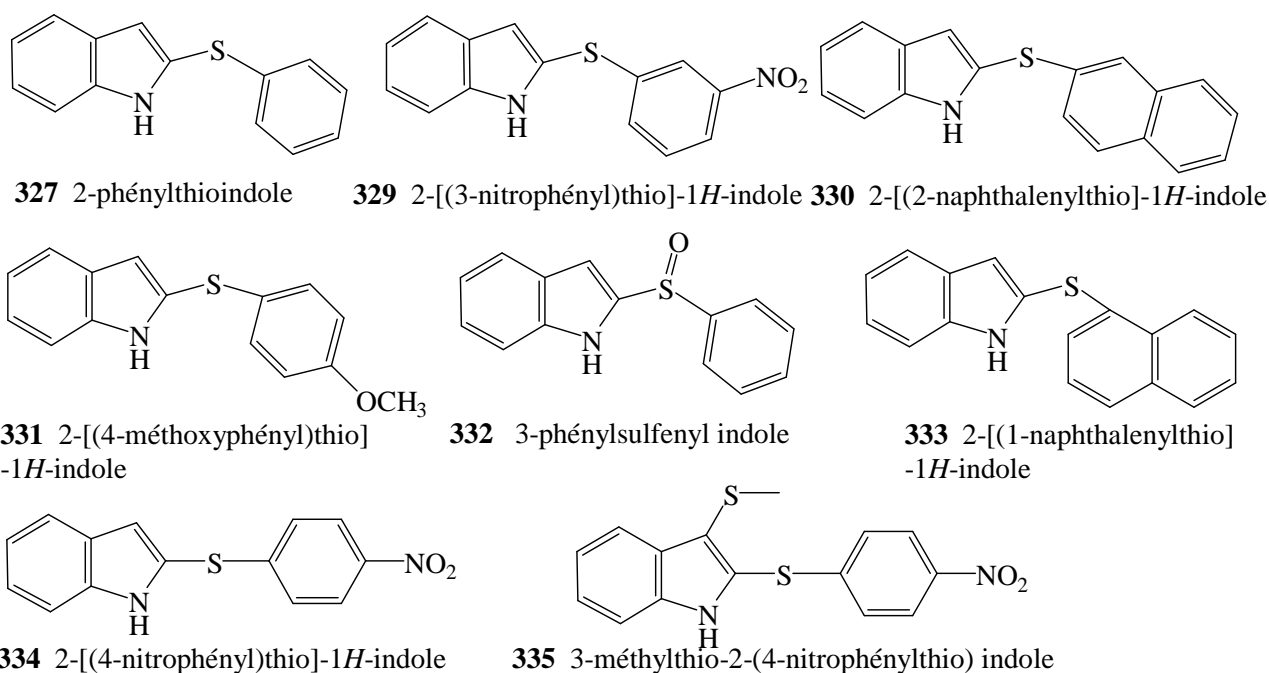


Schéma 100

L'équipe d'Atreya 2003²³² 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 carcinogénéicité. Le composé **336** inhibe la DHFR-TS de *T. gondii* avec une CI_{50} de 180 μ M. Ce composé fait l'objet de recherche concernant une potentielle action antimalarique²³³.

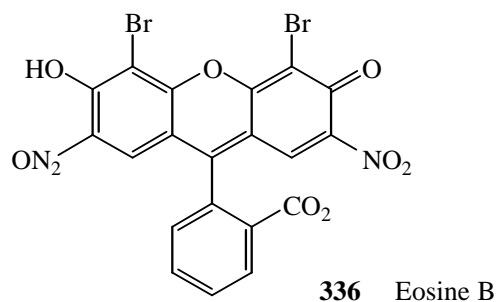


Schéma 101

²³² C.E. Atreya, E.F. Johnson, J.J. Irwin, A. Dow, K.M. Massimine, I. Coppens, V. Stempliuik, S. Beverley, K.A. Joiner, B.K. Shoichet, K. S. Anderson. *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. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2006**, *50*, 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 1995²³⁴ 1999²³⁵ et 2003²³⁶ s'est particulièrement intéressée aux composés de type benzylthioinosine, comme agent anti-toxoplasmique. L'analogue de purine nucléoside NBMPR (nitrobenzylthioinosine ou 6-[(4-nitrobenzyl)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'hypoxanthine-guanine-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 façon dose-dépendante, avec une CI₅₀ de 10 mM et sans toxicité apparente vis-à-vis des cellules hôtes. Les CI₅₀ 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 100μM. La mesure de l'absorbance se fait à λ 540 nm. D'autres composés 9-β-D-ribofuranosylpurines substitués en 6, qui sont de bons ligands de l'adénosine kinase du parasite²³⁴ ont aussi été testés. Parmi les produits testés, le 6-benzylthioinosine, le *p*-nitrobenzyl-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*²³⁵.

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 β-D adénosine et β-L adénosine. Ces transporteurs peuvent être inhibés par le nitrobenzylthioinosine ou les purines β-L nucléosides²³⁶.

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

²³⁴ M.H. Iltzsch, S.S. Uber, K.O. Tankersly, M.H. el Kouni. *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, *49*, 1501–1512

²³⁵ M.H. El Kouni, V. Guarcello, O.N. Al Safarjalani, F.N.M. Naguib *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, *43*, 2437–2443

²³⁶ O.N. Al Safarjalani, F.N.M. Naguib, M.H. el Kouni *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2003**, *47*, 3247–3251

substitution en position para du cycle phényle sont de meilleurs ligands que ceux substitués en *mé*ta ou *ortho* ²³⁷. L'équipe d'El Kouni en 2004 ²³⁸, en 2005 ²³⁹, a synthétisé de nombreux analogues du 6-benzylthioinosine **337**, comme substrats potentiels de l'adénosine kinase (Schéma 102) ^{240 241}.

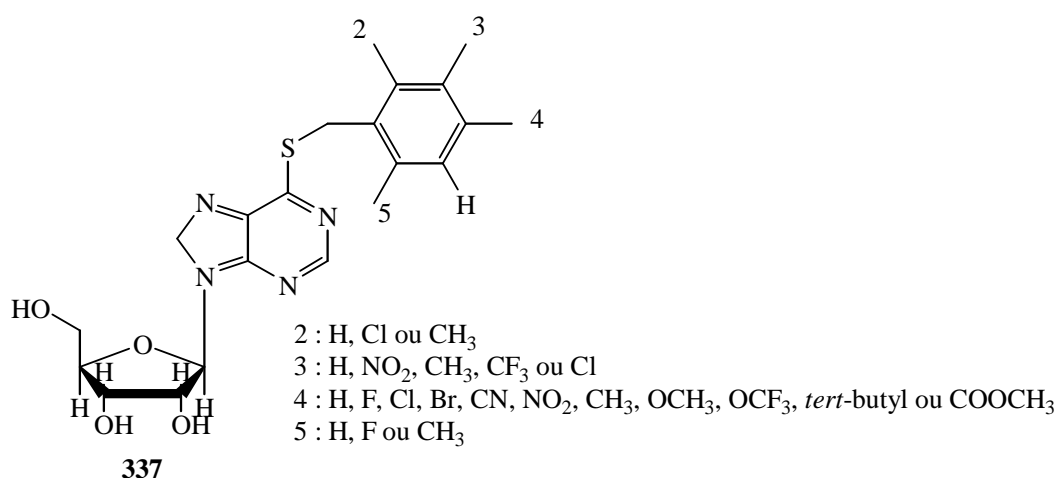


Schéma 102

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 méthyléniques non hydrolysables de TAD **339** et **340** (Schéma 103). Les K_i sont de 1,77 ± 0,73 μM pour **338**, 0,98 ± 0,48 μM pour **339** et 0,38 ± 0,5 pour **340** ²⁴²

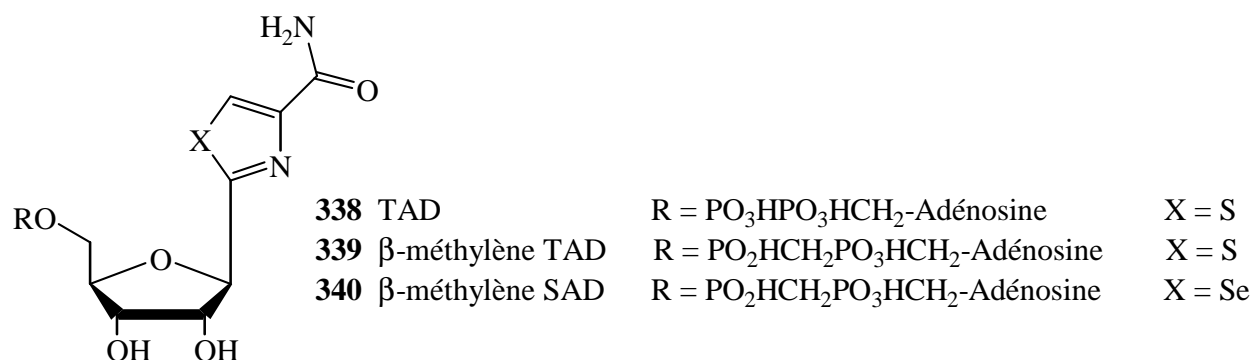


Schéma 103

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 *Biochemical Pharmacology*, **2005**, 69 (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 *J Med Chem.*, **2004**, 47 (8), 1987-96

²³⁹ A. Gupte, J.K. Buolamwini, V. Yadav, C.K. Chu, F.N. Naguib, M.H. el Kouni *Biochemical Pharmacology*, **2005**, 71 (1-2), 69-73

²⁴⁰ M.H. el Kouni *Curr Pharm Des.*, **2007**, 13 (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 *Biochemical Pharmacology*, **2007**, 73 (10), 1558-1572

²⁴² W.J. Sullivan Jr, S.E. Dixon, C. Li, B. Striepen, S.F. Queener *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49, 2172-2179

L'auréobasidine A, un inhibiteur d'une enzyme, l'IPC synthase (inositol phosphocéramide synthase) synthétisant un 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 β -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 ajoutée à différentes concentrations de 0,1 à 10 $\mu\text{g/ml}$. Après 48h, cette molécule inhibe la réplication de *T. gondii* avec des CI_{50} de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ 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 parasite²⁴³.

La triazine 4,6-diamino-1,2-dihydro-2,2-diméthyl-1-(2,4,5-trichlorophenoxypropyloxy)-1,3,5 triazine nommé WR99210 **342** (Schéma 104) inhibe *T. gondii in vitro* à des concentrations nanomolaires²⁴⁴. La souche RH de *T. gondii* est mise en culture avec des cellules HFF pendant une heure avant l'ajout de l'agent inhibiteur potentiel. Le [5,6-³H] uracile est ajouté et incubé pendant 20h. Les cellules sont comptées à l'aide d'un spectrophotomètre à scintillations. Le 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).

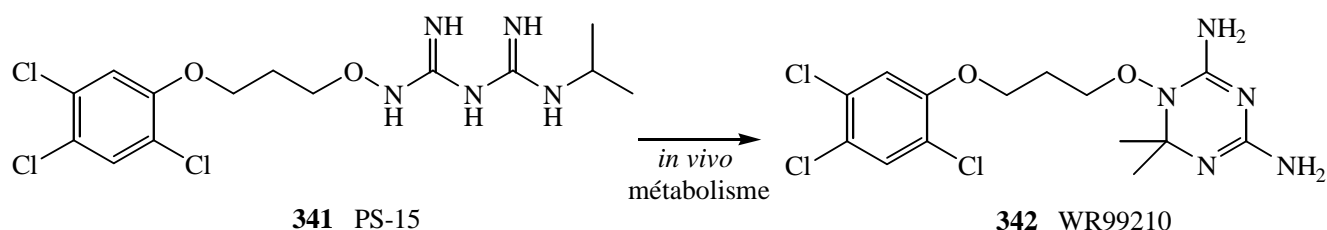
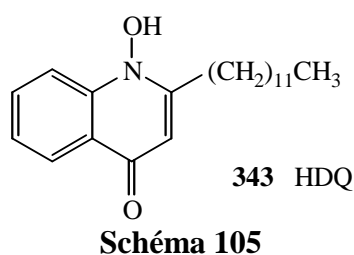


Schéma 104

²⁴³ S. Sonda, G. Sala, R. Ghidoni, A. Hemphill, J. Pieters *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49, 1794–1801

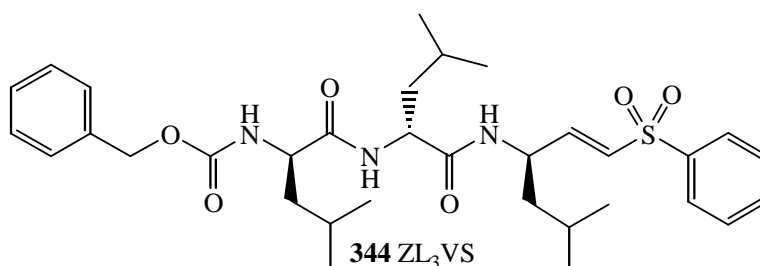
²⁴⁴ E.J. Mui, D. Jacobus, W.K. Milhous, G. Schiehsler, H. Hsu, C.W. Roberts, M.J. Kirisits, R. McLeod. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49, 3463–3467

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 déshydrogénase²⁴⁵. 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 CI₅₀ est de 2,4 ± 0,3 nM, valeur mesurée basée sur des essais mesurant la taille des vacuoles et la CI₅₀ 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.



²⁴⁵ A. Saleh, J. Friesen, S. Baumeister, U. Gross, W. Bohne *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2007**, 51, 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 2007²⁴⁶ 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 μ M alors que pour le composé **345**, la CI_{50} est de 12,5 μ M. Les parasites sont incubés 15 min avec les inhibiteurs de protéases à des concentrations de 1 à 50 μ M, 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 foetal 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 α 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 épifluorescence. L'activité des protéases cystéine est nécessaire pour la sécrétion des micronèmes et l'invasion des cellules par *T. gondii*.



²⁴⁶ C. Fen Teo, X. Wang Zhou, M. Bogyo, and V.B. Carruthers *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2007**, 51, 679–688

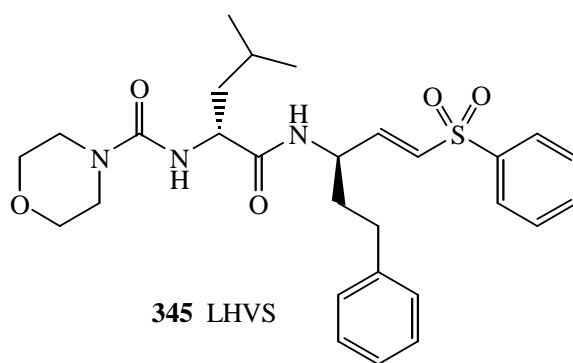
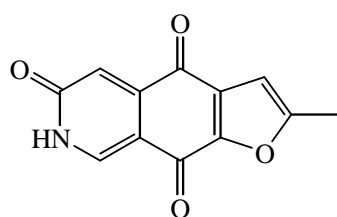


Schéma 106

L'équipe de Smith 2007²⁴⁷ a évalué le composé MC1626 (2-methylcarbethoxyquinoline) comme inhibiteur de la croissance de *T. gondii*. La CI_{50} était de l'ordre de 100 μ 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_{50} . A des concentrations supérieures à 300 μ M, aucune cellule hôte n'a semblé présenter des signes de dégradations.

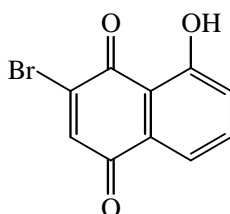
L'équipe de Walchshofer²⁴¹ a synthétisé de nombreux composés qui ont été testés comme antiparasitaires, contre *T. gondii*, certains ont été aussi testés contre *Leishmania*.

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 μ 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_{50} respectivement à 1,63 et 1,62 μ M²⁴⁸.



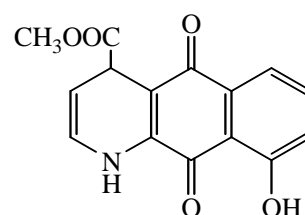
346

CI_{50} = 2,90 μ g/ml 12,663 μ M



347

CI_{50} = 1,28 μ g/ml 5,079 μ M

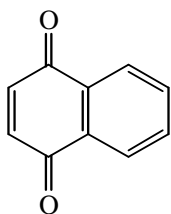


348

CI_{50} = 2,47 μ g/ml 8,697 μ M

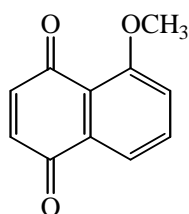
²⁴⁷ A.T. Smith, M.R. Livingston, A. Mai, P. Filetici, S.F. Queener, W.J. Sullivan, Jr. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2007**, 51, 1109–1111

²⁴⁸ M.E. Sarciron, P. Nebois, F. Pautet, A.F. Pétavy, H. F., N. Walchshofer *Parasitology Research*, **2002**, 88 (11), 969-971



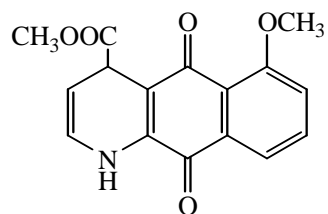
349

CI₅₀ = 1,28 µg/ml 5,423µM



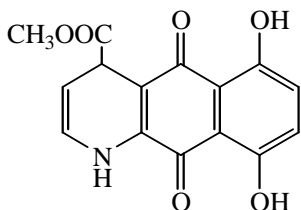
350

CI₅₀ = 2,30 µg/ml 13,068µM



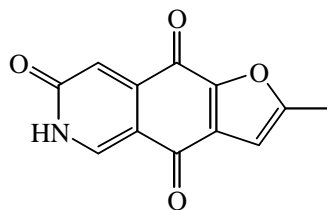
351

CI₅₀ = 1,25 µg/ml 4,194µM



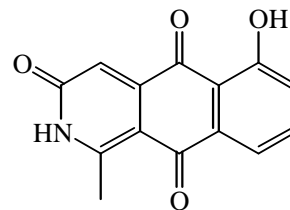
352

CI₅₀ = 2,18 µg/ml 7,569µM



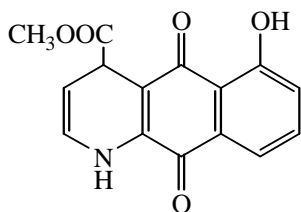
353

CI₅₀ = 1,20 µg/ml 5,854µM



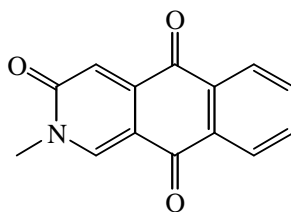
354

CI₅₀ = 2,00 µg/ml 8,23µM



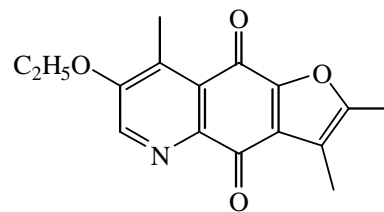
355

CI₅₀ = 1,00 µg/ml 3,534µM



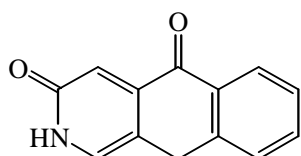
356

CI₅₀ = 1,94 µg/ml 8,546µM



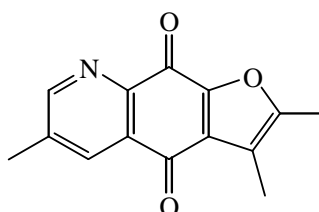
357

CI₅₀ = 0,98 µg/ml 3,438µM



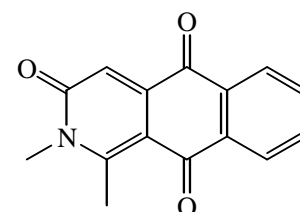
358

CI₅₀ = 1,86 µg/ml 8,122µM



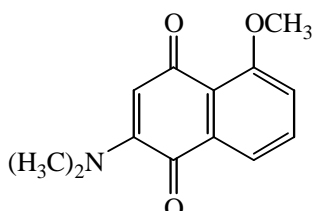
359

CI₅₀ = 0,94 µg/ml 4,069µM



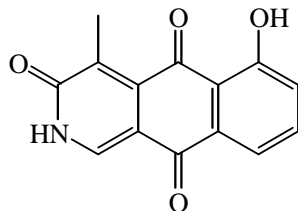
360

CI₅₀ = 1,80 µg/ml 7,469µM



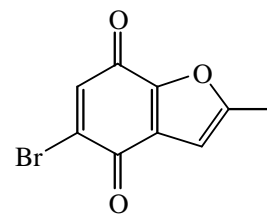
361

CI₅₀ = 0,92 µg/ml 3,958µM



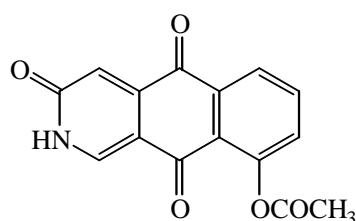
362

CI₅₀ = 1,76 µg/ml 7,242µM



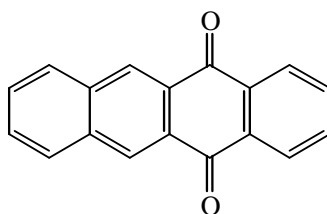
363

CI₅₀ = 0,87 µg/ml 3,610µM



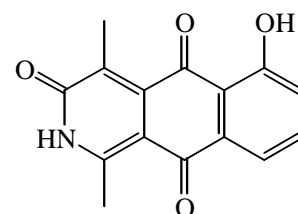
364

CI₅₀ = 1,64 µg/ml 6,052µM



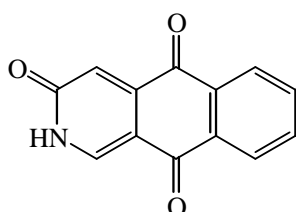
365

CI₅₀ = 0,42 µg/ml 1,628µM



366

CI₅₀ = 1,56 µg/ml 6,07µM



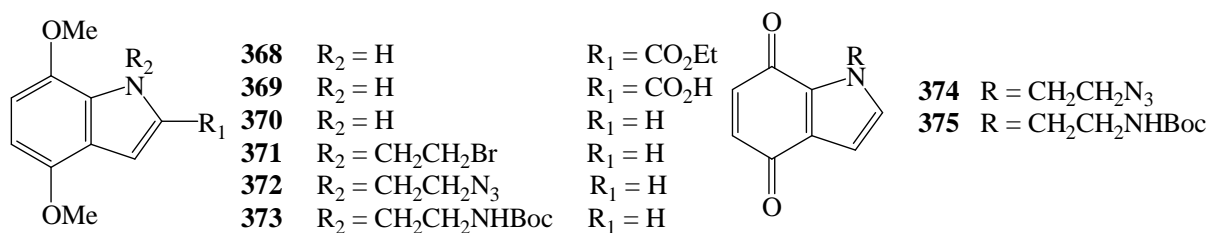
367

CI₅₀ = 1,30 µg/ml 6,103µM

Sulfadiazine CI₅₀ = 0,40 µg/ml 1,608µM
 Pyriméthamine CI₅₀ = 0,30 µg/ml 1,101µM

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 2003²⁴⁹ (Schéma 108). La souche RH de *T. gondii* est mise en culture avec des cellules THP1 de lignée myéломonocytaire humaine. *In vitro*, des essais ont montré une activité anti-*Leishmania* et anti-toxoplasmique, sans cytotoxicité sur les cellules THP1. Les CI₅₀ pour l'ensemble des composés **368** à **375** pour *T. gondii* sont comprises entre 0,0007 et 0,0051 µM. Les CI₅₀ sont égales à 0,0034 µM à la fois pour la pyriméthamine et la sulfadiazine. Concernant les tests de cytotoxicité, les CI₅₀ pour l'ensemble des composés **368** à **375** sont comprises entre 0,817 et 0,011 µM. Pour la pyriméthamine la CI₅₀ est de 0,010 µM et pour la sulfadiazine, la CI₅₀ est de 0,012 µM .



²⁴⁹ R.A. Tapia, Y. Prieto, F. Pautet, N. Walchshofer, H. Fillion, B. Fenet, M.E. Sarciron. *Bioorg Med Chem.*, **2003**, *11* (16), 3407-3412

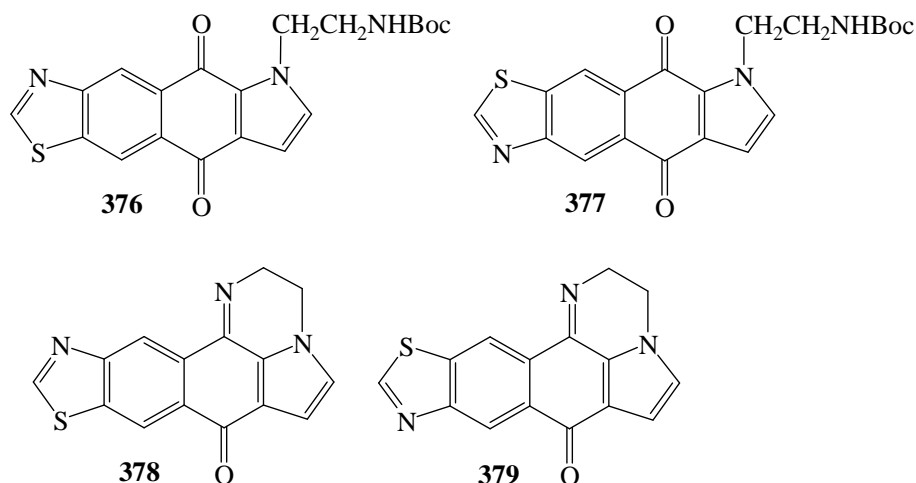


Schéma 108

Des naphthofuranquinones **385** et **386** et des naphthothiophenquinones **389** à **392** contenant un cycle thiazole fusionné ont été synthétisés par l'équipe de Tapia en 2003²⁵⁰ 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 naphthothiophenquinones **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_{50} 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.

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 *Bioorg Med Chem.*, **2003**, 11 (10), 2175-2182

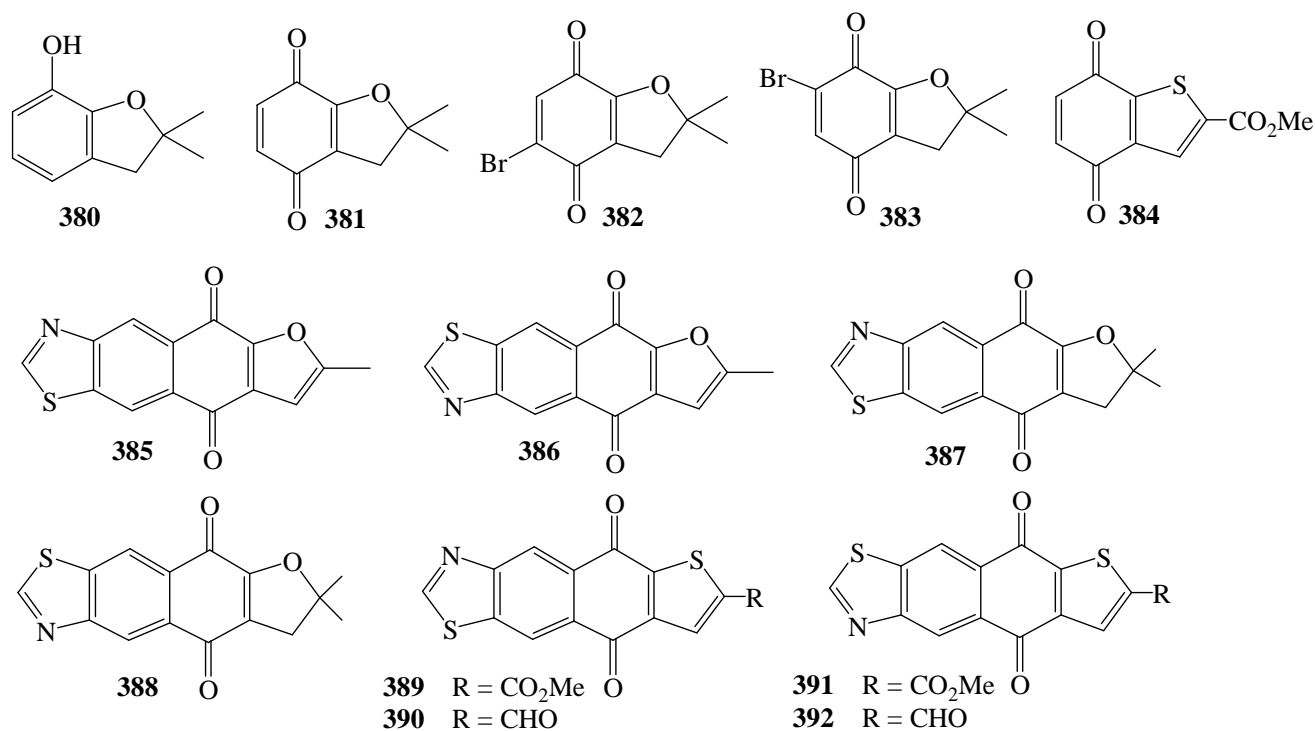


Schéma 109

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*²⁵¹. 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.

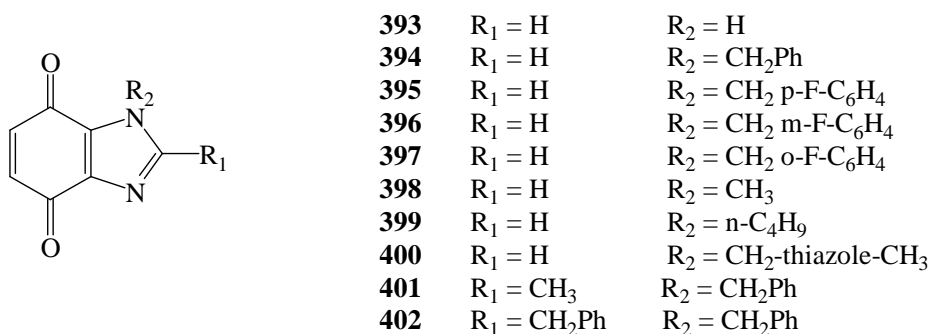


Schéma 110

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.

²⁵¹ F. Alvarez, A. Gherardi, P. Nebois, M.E. Sarciron, A.F. Petavy, N. Walchshofer. *Bioorg Med Chem Lett.*, **2002**, 12 (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

2 1 1 Milieux

2 1 1 1 Milieu 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 Stérvex ® de porosité 0,22 µm. 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 CO₂ alcalinise le milieu.

2 1 1 2 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 / l (Sigma Aldrich, France). Ce mélange est filtré sur un filtre Stérvex ® 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°C.

2 1 2 Cellules

2 1 2 1 THP 1

Les cellules de la lignée myéломocytique humaine THP 1 (ECACC 88081201 ; Sophia-Antipolis, France) ont été utilisées. Les cellules sont cultivées dans du milieu complet à + 37°C dans des flasques plastiques (Corning), placées en incubateur sous atmosphère de 5% en CO₂, 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 µl de la solution précédente à 10 mM et en complétant à 750 µl.

Les solutions diluées (SD1) à 25 µM sont préparées de la façon suivante : 10µl de SM1 sont prélevés, auxquels 990 µl de RPMI sont ajoutés. Pour le composé **253**, sa faible capacité de dissolution oblige à préparer une solution diluée différente : 50 µl de DMSO stérile sont ajoutés à 50 µl de SM1. Une deuxième solution mère (SM2) à 1,25 mM est ainsi obtenue. 20 µl de SM2 sont prélevés auxquels 980 µl de RPMI sont ajoutés. La solution diluée SD2 est ainsi obtenue à une concentration de 25 µM, 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 µl. Les composés sont testés à des concentrations de 5 µM, 1 µM, 0,5 µM et 0,1 µM. Pour obtenir une concentration finale de 5 ou 1 µM, 20 µl ou 4 µl de SD1 (ou SD2) sont prélevés et la solution est complétée à 100 µl. Pour obtenir, les concentrations à 0,5 et 0,1 µM, les solutions SD1 ou SD2 sont diluées au

dixième, ainsi les solutions SD3 et SD4 sont obtenues. 20 µl et 4 µl de SD3 et SD4 sont prélevés et complétés à 100 µl. SD1, SD2, SD3 et SD4 sont préparées avant chaque expérience. Certains composés ont été testés à la concentration de 0,2µM, dans le cas où la gamme précédente n'est pas suffisamment précise pour déterminer la CI₅₀.

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 λ 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 CO₂ 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 :

$100 \times (A \text{ p cell} - A \text{ p seul}) / A \text{ cell}$.

Le pourcentage d'inhibition est $100 - 100 \times (A \text{ p cell} - A \text{ p seul}) / A \text{ cell}$.

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 CI₅₀ 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.

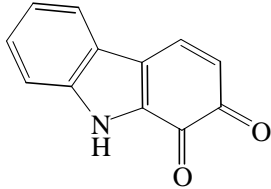
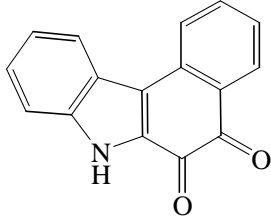
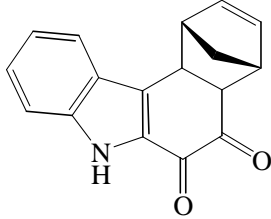
Les molécules synthétisées sont diluées comme précédemment. Les références utilisées ont été la pyriméthamine et la sulfadiazine (Sigma, L'isle d'Abeau, France). SD1, SD2, SD3 et SD4 sont préparées avant chaque expérience. Les tests sont réalisés en plaque de 96 puits de capacité 100 µl. Les composés sont testés à des concentrations de 0,2 µM, 0,1 µM.

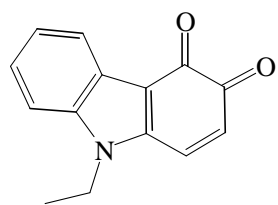
Les puits de contrôle contiennent du DMSO à la même concentration que les puits contenant les produits à tester.

La plaque est incubée 72h à 37°C sous 5% de CO₂ 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.

Tableau 4 : structure de molécules évaluées in vitro sur *T. gondii*

Molécules testées	Masse molaire (g/mol)	Quantité pesée (mg)	Concentration (mM)
 81a	197	1,97	10
 82	247	2,47	10
 83	263	2,63	10

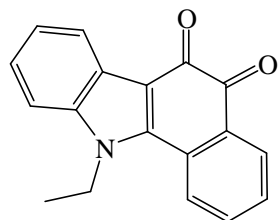


87

225

2,25

10

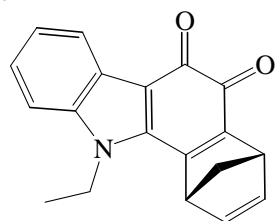


94

275

2,75

10

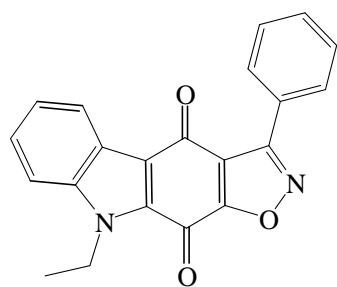


95

289

2,89

10

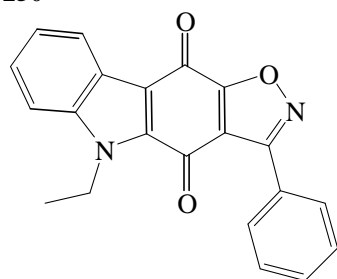


250

342

3,42

10

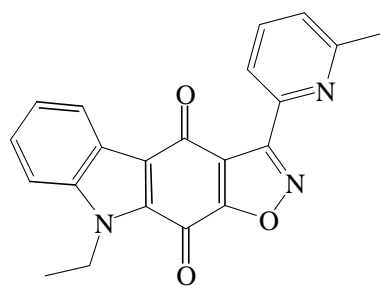


251

342

3,42

10

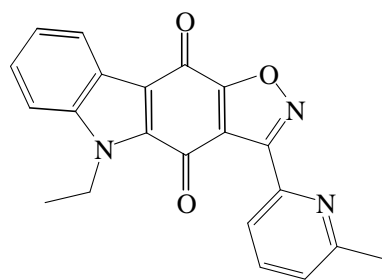


252

357

3,57

10

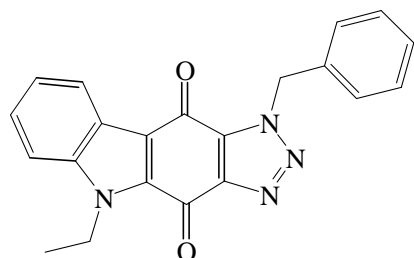


357

3,57

10

253

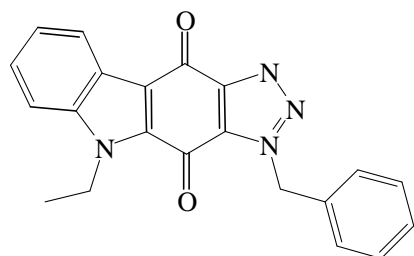


356

3,56

10

257

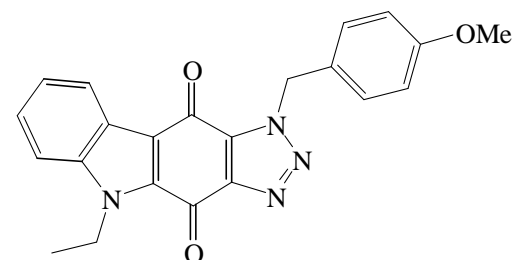


356

3,56

10

258

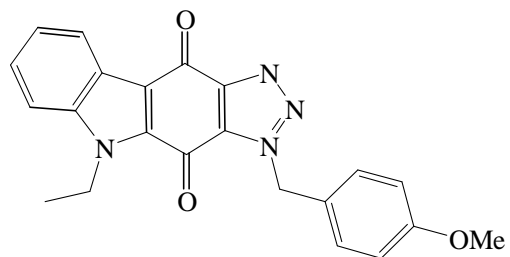


386

3,86

10

259

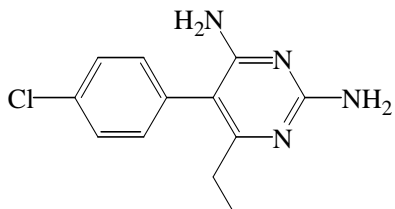


386

3,86

10

260

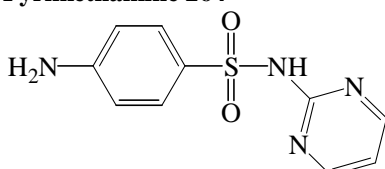


248,7

2,49

10

Pyriméthamine 264



272,3

2,72

10

Sulfadiazine 268

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 μM 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 μM . La concentration de 5 μM 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 μM , il a été testé à 0,2 μM . Les produits **259** et **260** étant particulièrement peu solubles, ils ont été testés à 0,2 μM . Quant au composé **253**, la différence de pourcentage d'inhibition entre 0,5 et 0,1 μM nous a amené à tester à la concentration intermédiaire de 0,2 μM . Grâce à ces données, la CI_{50} a été déterminée à l'aide du logiciel Graphprism®. Les résultats concernant la CI_{50} sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 5 : pourcentage d'inhibition de la croissance des cellules THP1

	5 μM	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 \pm 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 \pm 3,38
83	97,68 \pm 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 \pm 6,58	14,35 \pm 4,03	7,85 \pm 5,26	
94	100,71 \pm 3,49	85,01 \pm 3,33	91,59 \pm 4,10	10,24 \pm 6,75	32,62 \pm 2,80
95	93,36 \pm 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 \pm 5,57	
251			86,72 \pm 0,51	10,95 \pm 5,89	
252	98,04 \pm 7,56	98,07 \pm 1,68	26,61 \pm 3,57	0,97 \pm 5,67	
253	92,89 \pm 2,55	85,96 \pm 3,16	65,13 \pm 10,43	-1,88 \pm 8,97	11,47 \pm 3,17
257			81,67 \pm 5,72	6,75 \pm 6,77	
258			87,19 \pm 6,58	8,96 \pm 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 \pm 6,30	33,98 \pm 5,74
Pyriméthamine	44,56 \pm 8,03	31,23 \pm 3,58	28,46 \pm 2,36	13,57 \pm 9,81	
sulfadiazine	72,15 \pm 4,92		38,14 \pm 4,45	9,78 \pm 5,61	

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 μM . 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 μ M. Certains ont une action comparable aux molécules de références que sont la sulfadiazine et la pyriméthamine. A 0,2 et 0,1 μ M, aucun cristal de produit n'a été observé au microscope.

Tableau 6 : pourcentage d'inhibition de la croissance de *T. gondii* RH

	0,2 μ M	0,1 μ M
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 \pm 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

Le tableau 7 regroupe les CI₅₀ calculées par le logiciel Graphprism® pour les cellules THP1 et le parasite *Toxoplasma*.

Tableau 7 : CI₅₀ de THP1 et de *T. gondii* RH

	CI ₅₀ (μ M) THP1	CI ₅₀ (μ M) <i>T. gondii</i>
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_{50} égale respectivement à 0,201 et 0,205 μM . Les molécules **251** et **253** ont une CI_{50} 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_{50} est proche des molécules de référence à 0,233 μM , mais elle est peu cytotoxique (CI_{50} à 1,054 μM sur les THP1). Les molécules **81** et **83** présentent des caractéristiques similaires avec une CI_{50} à respectivement 0,247 et 0,252 μM , et une cytotoxicité moindre avec cette fois une CI_{50} à 0,769 et 0,794 μM . 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 cytotoxicité 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.

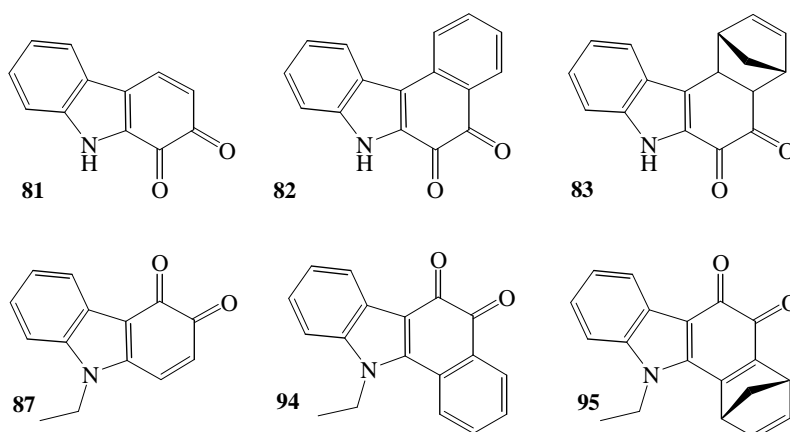


Schéma 111

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_{50} 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.

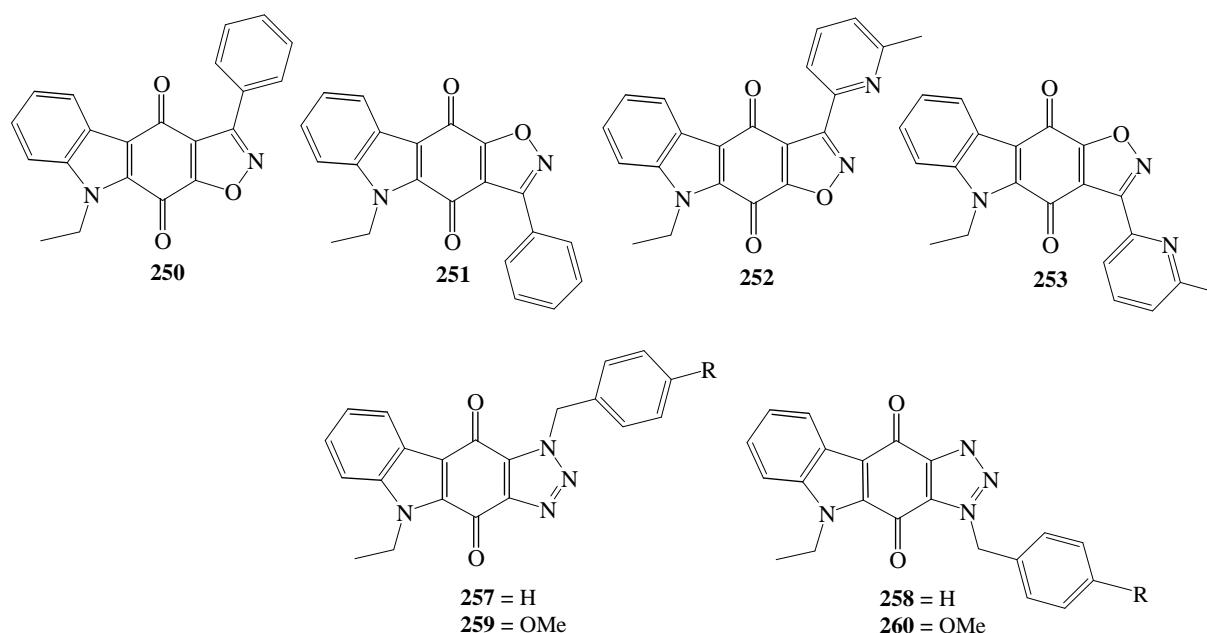


Schéma 112

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 purines⁸⁷: 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 purines²⁵²:

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 Krug²⁵³ 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 Chaudhary²⁵⁴ 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 Chaudhary²⁵⁴.

²⁵² R.B. Gilbertsen, J.C. Sircair 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 *The journal of biological chemistry*, **1989**, 264 (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 *The journal of biological chemistry*, **2004**, 279 (30), 31221 – 31227

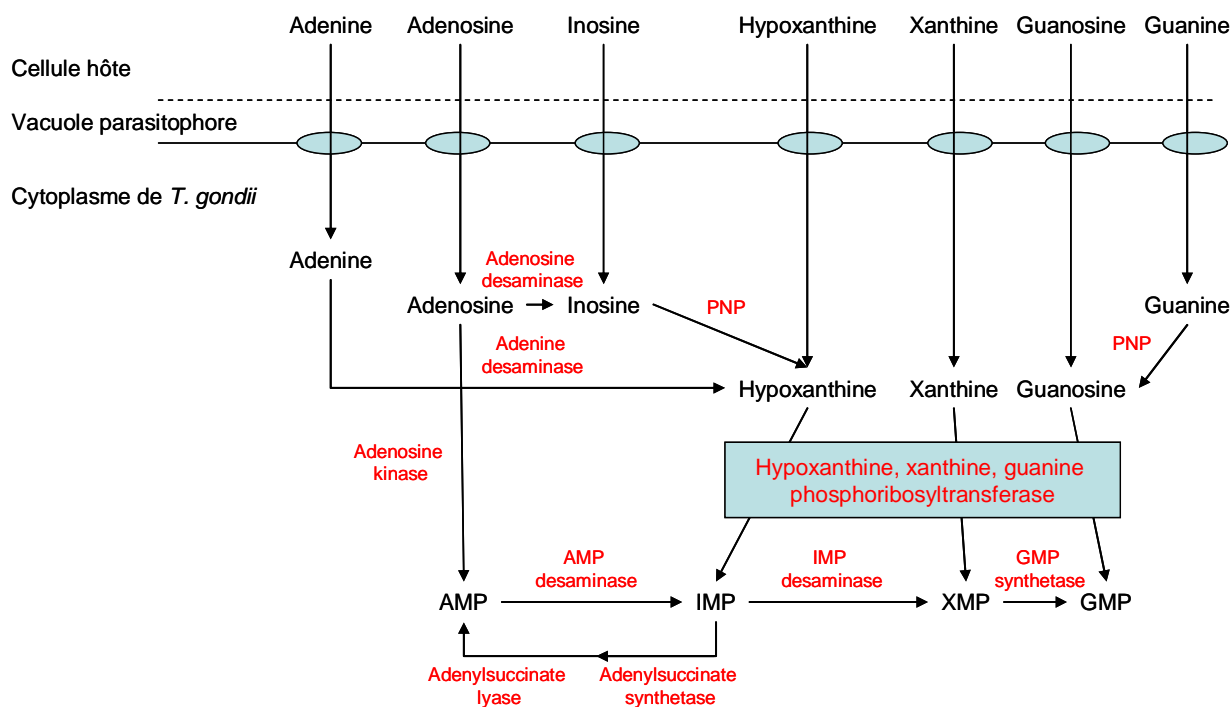
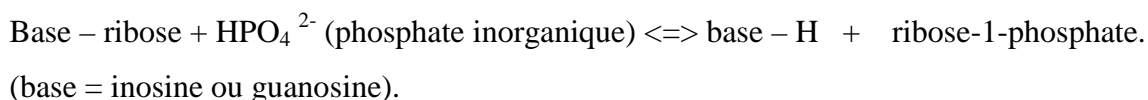


Figure 19

L'équipe de Sarciron en 1999²⁵⁵ 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.



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.

²⁵⁵ A. Ghérardi, M. E. Sarciron, A.F. Pétavy, F. Peyron *Life sciences*, 1999, 65 (17), 1733-1738

D'après Chaudhary ²⁵⁶, 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 www.toxodb.org). 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 ²⁵⁷, 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 ²⁵⁶ 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 CI₅₀ 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.

²⁵⁶ K. Chaudhary, L.M. Ting, K. Kim, D.S. Roos The journal of biological chemistry, **2006**, 281 (35), 25652 – 25658

²⁵⁷ A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar Pharmacology & therapeutics, **2000**, 88, 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)⁸⁷. Les dérivés testés étaient les suivants (Schéma 113) :

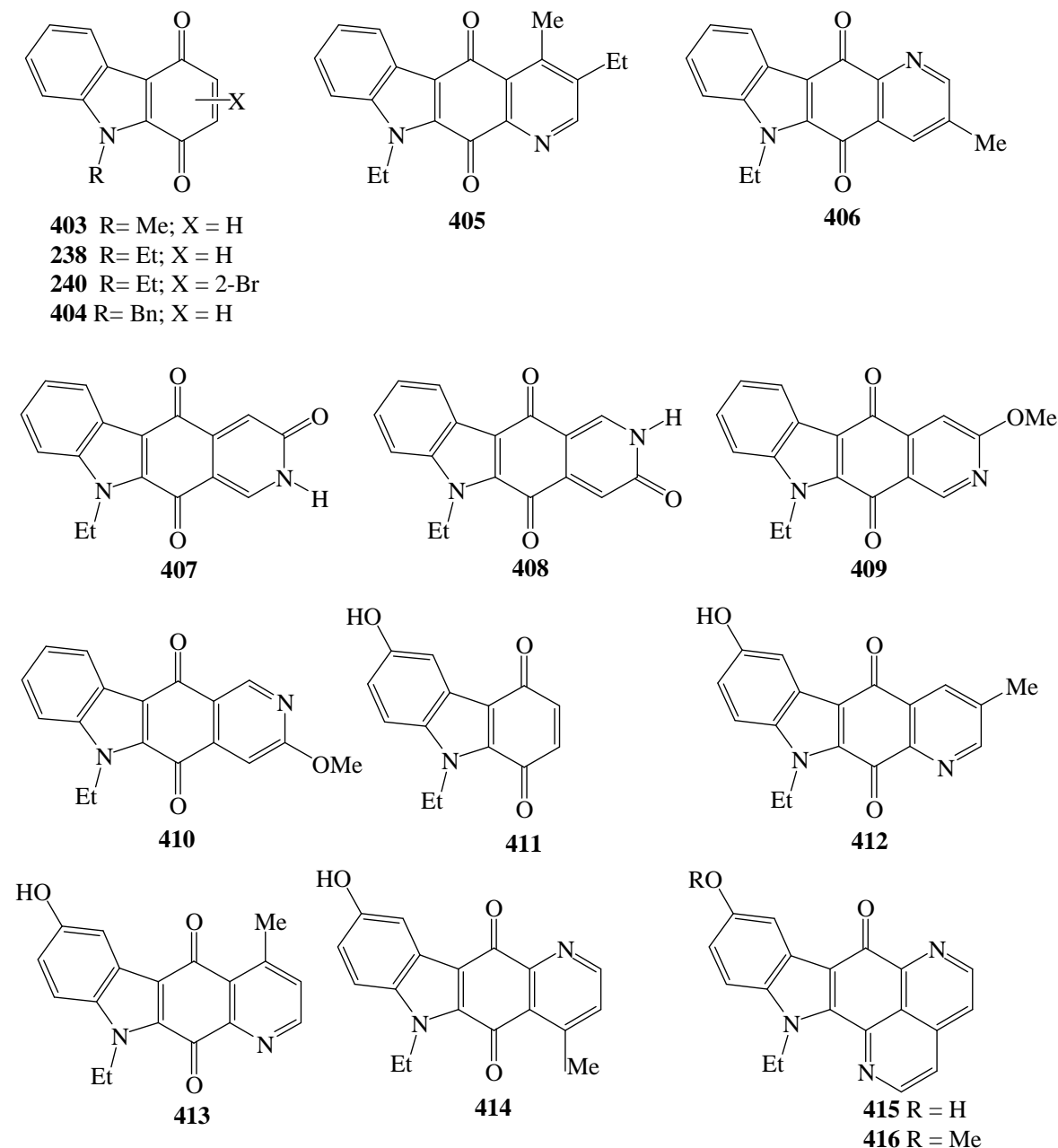


Schéma 113

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 K_i de l'ordre de 0,2 mM. La formycine a une valeur de K_i de l'ordre de 1,70 mM pour les deux souches et l'allopurinol ribose a une valeur de K_i 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 K_i 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 K_i 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 montrés plus actifs que les dérivés lactames correspondants **407, 408**. Les dérivés pentacycliques ont présentés une valeur de K_i 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 myéломocytiques 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 Ghérardi²⁵⁸. 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⁻¹. 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⁻¹. Après élimination du surnageant, le culot est remis en suspension et filtré sur filtre Millipore de 5µ. Après une centrifugation à 2000 g. min⁻¹, 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

²⁵⁸ Arnauld Ghérardi, Th D, Lyon1, 2001-2008.

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 ²⁵⁹. 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^{ème}, au 10^{ème} et ¼ 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 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 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 µg/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

²⁵⁹ Bradford *anal Biochem*, **1976**, 72, 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.

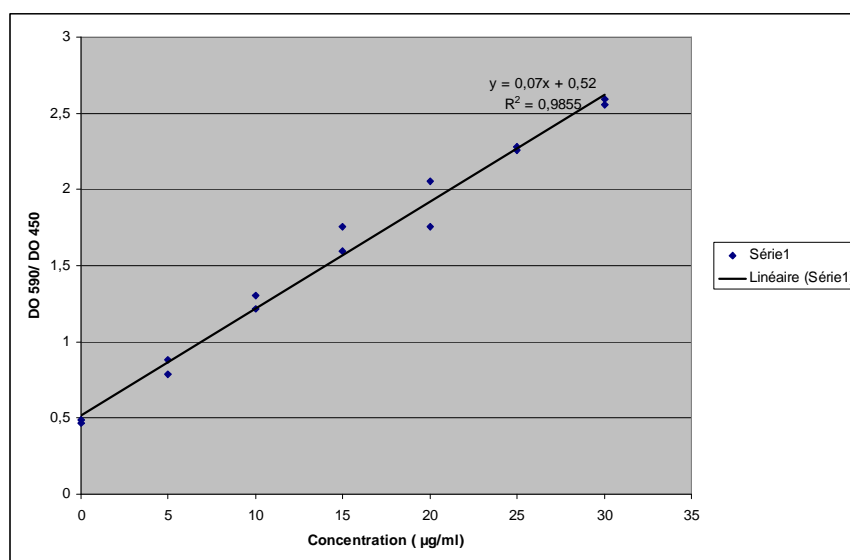


Figure 22 Droite d'étalonnage de la gamme Roti Nanoquant (Biorad).

Tableau 10

Ratio DO 590 / DO 450	Concentration (µg/ml)	Dilution préalable de l'échantillon	Concentration réelle 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 ^1H NOE pour les isoxazoloquinones et par une étude des corrélations ^1H - ^{13}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 CO₂ et à 37°C. Les composés testés se sont révélés être cytotoxiques sur les cellules THP1 à 5 et 1 µM et peu cytotoxique à 0,1 µM.

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 µM. 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

- [1] 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**, 34 (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 exfoliatus*.
The Journal of Antibiotics, **1997**, 50 (11), 979 - 981.
- [3] 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**, 61 (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**, 48 (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**, 48 (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**, 38 (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 (\pm)-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**, 41 (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 (\pm)-carquinostatin A.
Synlett, **1999**, 5, 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**, 39 (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**, 4, 557 - 564
- [12] T. Choshi, H. Fujimoto, E. Sugino, S. Hibino.
Synthesis of new tetracyclic oxazolocarbazoles as functionalized precursors to antioxidative agents, antiostatins and carbazoquinocins.
Heterocycles, **1996**, 43 (9), 1847 - 1854
- [13] T. Choshi, H. Fujimoto, C. Nagayama, E. Sugino, S. Hibino.
Total Syntheses of Carazostatin, Hyellazole, and Carbazoquinocins B-F.
J. Org. Chem., **1997**, 62 (8), 2535 - 2543
- [14] A. Aygun, U. Pindur.
A new and effective method to carbazoquinocin C and related carbazole-3,4-quinones 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**, 40 (3), 411 - 417
- [16] 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**, 53 (49), 16835 - 16846
- [18] 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**, 51 (2), 349 - 354
- [19] 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**, 58 (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**, 48 (6), 893 - 894
- [21] P. Cai, J.K. Snyder, J-C. Chen, R. Fine, L. Volicer.
Preparation, reactivity, and neurotoxicity of tryptamine-4,5-dione
Tetrahedron Letters, **1990**, 31 (7), 969 - 972
- [22] M. Somei, Y. Fukui, M. Hasegawa.
Preparations of tryptamine-4,5-diones, and their diels-alder and nucleophilic addition reactions
Heterocycles, **1995**, 41 (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**, 36 (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**, 52 (9), 1114 - 1116
- [25] D.Albanese, D.Landini, M.Penso, G.Spano, A.Trebicka.
Chemoselective N-alkylation of 2-hydroxycarbazole as a model for the synthesis of N-substituted pyrrole derivatives containing acidic functions.
Tetrahedron, **1995**, 51 (19), 5681 - 5688
- [26] H. Zimmer, D.C. Lankin, S.W. Horgan.
Oxidations with potassium nitrodisulfonate (Fremy's radical). Teuber reaction.
Chem. Rev., **1971**, 71 (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**, 110 (12), 4051 - 4053
- [31] D.E. Horning, D.A. Ross, J.M. Muchowski.

Synthesis of phenols from diazonium tetrafluoroborates; a useful modification
Can. J. Chem. / Rev. Can. Chim., **1973**, 51 (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**, 42 (12), 2053 - 2058
- [33] H.J. Teuber, G. Jellinek.
Reaktionen mit Nitrosodisulfonat, VII. Mitteil.: Oxydation von primären aromatischen Aminen
Chem. Ber., **1954**, 87 (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**, 88 (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**, 33 (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**, 20 (7), 1267 - 1269
- [37] C. Ito, M. Nakagawa, T.S. Wu, H. Furukawa.
New carbazole alkaloids from *Murraya euchrestifolia*.
Chem. Pharm. Bull., **1991**, 39 (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**, 33 (3), 1320 - 1322
- [39] C. Ito, T.S. Wu, H. Furukawa,
New carbazole alkaloids from *Murraya euchrestifolia*.
Chem. Pharm. Bull., **1988**, 36 (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**, 41 (12), 2096 - 2100
- [41] C. Saha, B.K. Chowdhury.
Carbazoloquinones from *Murraya koenigii*.
Phytochemistry, **1998**, 48 (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**, 4 (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**, 55 (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**, 169 (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**, 42 (8), 610 - 620
- [47] S. Tasler, G. Bringmann.
Biaryllic biscarbazole alkaloids: occurrence, stereochemistry, synthesis, and bioactivity.
The Chemical Record, **2002**, 2 (2), 114 - 127
- [48] N.T. Doan, P.R. Stewart, G.D. Smith.
Inhibition of bacterial RNA polymerase by cyanobacterial metabolites 12-epi-hapalindone E isonitrile and calothrixin A.
FEMS Microbiology Letters, **2001**, 196 (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**, 15 (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**, 47 (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**, 64(1), 54-57.

- [52] Dossier du CNHIM 2004, XXV, 4-5, Anticancéreux : utilisation pratique (5^{ème} édition)
- [53] C. Asche, W. Frank, A. Albert, U. Kucklaender.
Synthesis, antitumor activity and structure-activity relationships of 5H-benzo[b]carbazoles.
Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2005**, 13 (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**, 19, 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**, 17 (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**, 23 (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**, 12 (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**, 56 (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**, 50 (4), 910 - 913
- [60] S. Shiraishi, S. Ikeuchi, M. Seno, T. Asahara.
The reaction of 2,4,6-trimethylbenzotrile N-Oxide with polysubstituted *p*-benzoquinones.
Bull. Chem. Soc. Jpn., **1978**, 51 (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**, 57 (6), 1643 - 1649
- [62] T. Hayakawa, K. Araki, S. Shiraishi.
The reaction of nitrile oxides with methoxy *p*-benzoquinones.
Bull. Chem. Soc. Jpn., **1984**, 57 (8), 2216 - 2218

- [63] G.A. Conway, L.J. Loeffler, I.H. Hall.
Synthesis and antitumor evaluation of selected 5,6-disubstituted 1(2)H-indazole-4,7-diones
J Med Chem. **1983**, 26 (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**, 30B, 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**, 34B, 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-naphthoquinone derivatives.
Heterocycles, **1995**, 40 (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**, 26 (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**, 44 (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 terapeutica, **1978**, 13 (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**, 26 (5), 714 - 719
- [71] J.M. Tedder, D.R. Buckle.
Study on *v*-triazoles. Part 8. nucleophilic aromatic substitution (S_NAr) 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**, 119, 215 - 222
- [73] L. Benati, P. Carlo Montecvecchi, 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**, 27 (6), 625 - 635
- [76] C. Grundmann, J.M. Dean.
Nitriles oxides . V. stable aromatic nitrile oxides
J. Org. Chem., **1965**, 30 (8), 2809 - 2812
- [77] C. Ticozzi, A. Zanarotti,
Synthesis of a bifunctional 2,4-dihydroxy five carbon synthon. Enantiomerically
pure Δ^2 -isoxazolines by chromatographic resolution
Tetrahedron Letters, **1994**, 35 (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**, 47 (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**, 37 (2), 785 - 789
- [80] A.D. Becke,
Density-functional thermochemistry . III. The role of exact exchange
J. Chem. Phys., **1993**, 98 (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, 2nd 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 enamines 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 Nucleoside Phosphorylase.
Eur. J. Org. Chem. **2002**, 11, 1834-1838
- [88] A. Wolf, D. Cowen, B. Paige.
 Human toxoplasmosis : occurrence in infants as encephalomyelitis. Verification by transmission to animals.
Science, **1939**;89, 226-227.
- [89] G. Desmots, 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**, 10, 952-958.
- [90] W.M. Hutchison.
 Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*.
Nature, **1965**, 206: 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 toxoplasmose
<http://arachosia.univ-lille2.fr/labos/parasito/Internat/courspar/toxopl.html> (consulté en **2007**)
- [93] Site de Wikipedia : http://fr.wikipedia.org/wiki/Toxoplasma_gondii (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**, 11 (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**, 28, 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**, 34, 347-360

- [98] J.P. Dubey, N.L. Miller, J.K. Frenkel.
The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces.
J. Exp. Med., **1970**, 132, 636-662
- [99] J.K. Frenkel., J.P. Dubey.
Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts.
J.Parasitol., **1973**, 59, 587-588
- [100] D.S. Lindsay, B.L. Blagburn, J.P. Dubey.
Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions.
Vet. Parasitol., **2002**, 103, 309-313.
- [101] J.P. Dubey, N.L. Miller, J.K. Frenkel.
Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*.
J. Parasitol., **1970**, 56, 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**, 51, 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 "Épidémiologie 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**, 39, 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**, 21, 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 diphtheriae* 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**, 9, 754-774.
- [110] Moniteur de l'internat 4^{ème} 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**, 178, 83-89.
- [112] J. Couvreur, P. Thulliez.
Toxoplasmose acquise à localisation oculaire ou neurologique.
Presse Med., **1996**, 25, 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**, 350, 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**, 75, 313-320.
- [116] S.D. Mawhorter, D. Effron, R. Blinkhorn, P.J. Spagnuolo.
Cutaneous manifestations of toxoplasmosis.
Clin Infect Dis., **1992**, 1, 1084-1088.
- [117] J. Chandénier, 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**, 19, 375-379.
- [118] 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**, 40, 4037-4044.

- [119] C. Pomeroy, G.A. Filice.
Pulmonary toxoplasmosis.
Clin Infect Dis., **1992**, 14, 863-870.
- [120] F. Raffi, M. Tiab, O. Morin, F. Derouin.
Toxoplasmose cérébrale au cours d'une prio-infection toxoplasmique.
Presse Med., **1992**, 28, 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**, 23, 1249-1254.
- [122] 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**, 99, 27-31.
- [123] 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**, 2, 257-260.
- [124] 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**, 42, 194-199.
- [125] D.M. Israelski, J.S. Remington .
Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host.
Curr Clin Top Infect Dis., **1993**, 13, 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**, 29, 691-698.
- [127] C. Leport, J.S. Remington.
Toxoplasmose au cours du SIDA.
Presse Med., **1992**, 21, 1165-1171.
- [128] 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**, 329, 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**, 11, 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**, 114, 130-135.
- [132] G.N. Holland.
Ocular toxoplasmosis : A global reassessment. Part I : epidemiology and course of the disease.
Am J Ophthalmology, **2003**, 136, 973-988.
- [133] G.N. Holland.
Ocular toxoplasmosis : A global reassessment. Part II : Disease manifestations and management.
Am J Ophthalmology, **2004**, 137, 1-17.
- [134] I. Kuo, N.A. Rao.
Ocular disease in AIDS.
Springer Sem Immunopathol., **1999**, 21, 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**, 73, 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**, 104, 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**, 127, 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. Desmots, 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**, 62, 1418-1422.
- [140] F. Peyron, M. Wallon, C. Bernardoux.
Long-term follow-up of patients with congenital ocular toxoplasmosis.

N Engl J Med., **1996**, 334, 993-994.

- [141] G. Desmots, 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**, 113, 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**, 134, 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**, 318, 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**, 5, 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**, 30, 295-300.
- [150] W. Foulon, I. Villena, B. Stray-Pedersen, A. Decoster, M. Lappalainen, J.M. Pinon,
P.A. Jennum, 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**, 180, 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**, 30, 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**, 30, 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**, 110, 112-20.
- [154] J. Couvreur, Ph. Thulliez.
Devenir des toxoplasmoses congénitales.
J Pédiatrie et de Puériculture. ,**1989**, 2, 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**, 18, 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**, 95, 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**, 135, 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.
- [159] 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**, 110, 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 pyrimethamine-sulfadiazine for therapy of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS.
Antimicrob Agents Chemother., **1998**, 42, 1346 - 1349.
- [162] D. Torre, F. Speranza, R. Martegani, C. Zeroli, M. Banfi, M. Airoidi.
A retrospective study of treatment of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients with trimethoprim-sulphamethoxazole.
J Infect., **1998**, 37, 15 - 18.
- [163] C. Katlama, B. Mouthon, D. Gourdon, D. Lapiere, 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**, 24, 422 - 429
- [165] J.F. Delfraissy (coordinateur).
Prise en charge des personnes infectées par le VIH.
Rapport 2004 Ed. Médecine Flammarion, 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**, 14, 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**, 75, 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**, 181, 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**, 355, 2217 - 2218.
- [170] V. Soriano, C. Dona, R. Rodriguez-Rosado, P. Barreiro, J. Gonzalez-Lahoz.
Discontinuation of secondary prophylaxis for opportunistic infections in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy.
AIDS., **2000**, 14, 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**, 32, 524 - 529
- [173] J. Blais, V. Garneau, S. Chamberland.
Inhibition of *Toxoplasma gondii* protein synthesis by azithromycin
Antimicrob. Agents Chemother., **1993**, 37, 1701 - 1703
- [174] B. Luft.
In vivo and in vitro activity of roxithromycin against *Toxoplasma gondii* in mice.
Eur. J. Clin. Microbiol., **1987**, 6, 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 gondii* in vitro and in murine models of infection
Antimicrob. Agents Chemother., **1997**, 41, 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**, 37, 2571 - 2577
- [177] B.R. Dannemann, D.M. Israelski, J.S. Remington..
Treatment of toxoplasmic encephalitis with intravenous clindamycin.
Arch. Intern. Med., **1988**, 148, 2477 - 2482.
- [178] J.M. Hofflin, J. S. Remington.
Clindamycin in a murine model of toxoplasmic encephalitis.
Antimicrob. Agents Chemother., **1987**, 31, 492 - 496
- [179] F. Derouin, C. Chastang
In vitro effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*
Antimicrob. Agents Chemother., **1989**, 33, 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**, 35, 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**, 36, 326–330
- [182] 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**, 37, 2371–2378

- [183] A.L. Baggish, D.R. Hill
Antiparasitic Agent Atovaquone
Antimicrob. Agents Chemother., **2002**, 46, 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**, 45, 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**, 32, 430–433
- [186] F.G. Araujo, D.R. Guptill, J.S. Remington.
In vivo activity of piritrexim against *Toxoplasma gondii*
J. Infect. Dis., **1987**, 156, 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**, 79, 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**, 38, 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**, 40, 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**, 39, 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**, 40, 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**, 40, 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**, 42, 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**, 9 (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 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine.
Exp Parasitol., **2006**, 113 (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**, 34, 775–780
- [199] A.A. Khan, T. Slifer, F.G. Araujo, J.S. Remington
Trovaflaxacin Is Active against *Toxoplasma gondii*
Antimicrob. Agents Chemother., **1996**, 40, 1855–1859
- [200] A.A. Khan, T. Slifer, F.G. Araujo, R.J. Polzer, J.S. Remington
Activity of Trovaflaxacin in combination with other drugs for treatment of acute murine toxoplasmosis
Antimicrob. Agents Chemother., **1997**, 41, 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 Trovaflaxacin
Antimicrob. Agents Chemother., **1999**, 43, 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**, 45, 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**, 44, 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**, 14 (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**, 5 (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**, 40, 2015–2020
- [208] F.G. Araujo, T. Slifer, J. S. Remington
Rifabutin is active in murine models of toxoplasmosis.
Antimicrob. Agents Chemother., **1994**, 38, 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**, 40, 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**, 43, 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**, 45, 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**, 33, 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**, 34, 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**, 38, 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**, 62 (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**, 50, 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**, 42, 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**, 28, 26–30
- [220] K. Thommen-Skott
Antimalarial activity of cyclosporin
Agents Action, **1981**, 11, 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**, 41, 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**, 39, 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**, 41, 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**, 44, 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**, 44, 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**, 46, 929–931
- [228] Y. Ling, G. Sahota, S. Odeh, J.M. Chan, F.G. Araujo, S.N. Moreno, E. Oldfield
Bisphosphonate inhibitors of *Toxoplasma gondii* 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**, 46, 300–307
- [230] F. Dzierszynski, 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**, 46, 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**, 46, 2393–2399
- [232] C.E. Atreya, E.F. Johnson, J.J. Irwin, A. Dow, K.M. Massimine, I. Coppens, V. Stempluk, 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**, 50, 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**, 49, 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**, 43, 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**, 47, 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**, 69 (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**, 47 (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**, 71 (1-2), 69-73.
- [240] M.H. el Kouni
Adenosine metabolism in *Toxoplasma gondii*: potential targets for chemotherapy.
Curr Pharm Des., **2007**, 13 (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 N6-benzyladenosine analogues as potential anti-toxoplasma agents.
Biochemical Pharmacology, **2007**, 73 (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**, 49, 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**, 49, 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**, 49, 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**, 51, 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**, 51, 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**, 88 (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**, 11 (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**, 11 (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** , 12 (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**, 264 (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**, 279 (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**, 65 (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**, 281 (35), 25652 – 25658

- [257] A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar
Purine nucleoside phosphorylases : properties, functions and clinical aspects.
Pharmacology & therapeutics, **2000** , 88, 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**, 72, 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 Lyon 1; 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-cyclopentadiene 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 system¹ and possess various biologic activities (Chart 1).

The carquinostatins A and B were isolated from *Streptomyces exfoliatus* 2419-SVT2 and were shown to be potent neuronal protecting substances.^{2,3} Lavanduquinocin was isolated from *Streptomyces viridochromogenes* 2942-SVS3 and exhibit a strong neuronal cell protecting activity.⁴ The carbazoquinocins A–F were isolated from *Streptomyces violaceus* 2448-SVT2 and they showed strong inhibitory activity against lipid peroxidation.⁵

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.⁶ In a previous work we reported the synthesis,^{7,8} the induction of caspase-dependent cell death⁹ and the *Toxoplasma gondii* purine nucleoside phosphorylase inhibitory activity¹⁰ 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

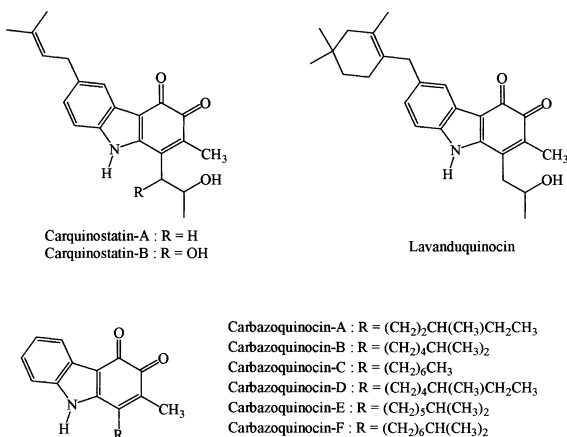


Chart 1

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.^{13,14}

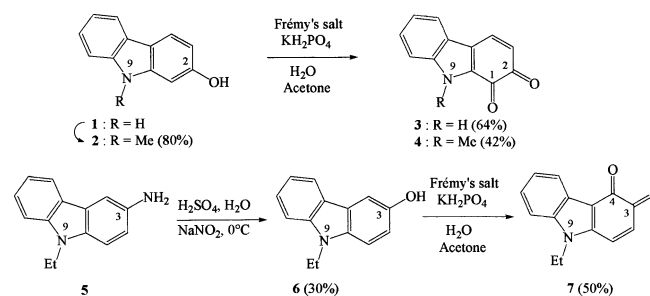


Chart 2

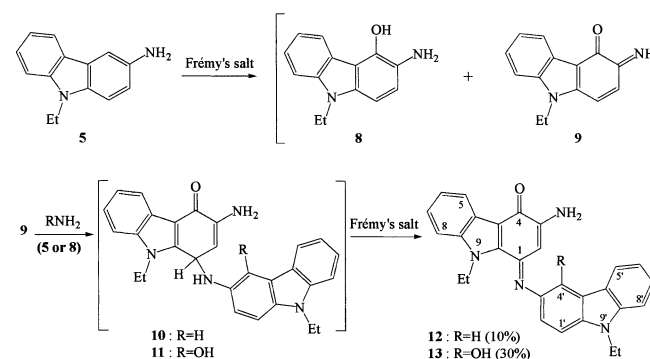


Chart 3

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: bouaziz@univ-lyon1.fr

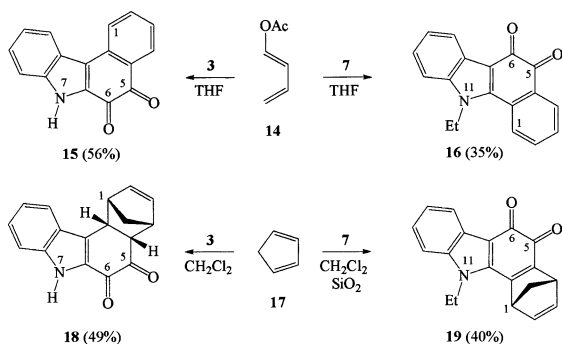


Chart 4

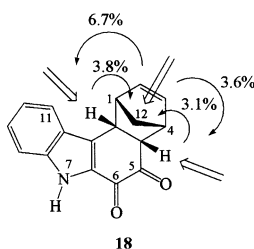


Chart 5

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] cycloaddition of *ortho*-benzofurandione¹⁵ and *ortho*-indoloquinone¹⁶ 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 $^1\text{H-NMR}$ 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 ($^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 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-9H-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 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98:2) as the eluent. Compound **2** was obtained as a yellow solid in 80% yield (ref. 12, 89%), mp 162°C (ref. 12, $166\text{--}167^{\circ}\text{C}$). IR (KBr) cm^{-1} : 3360. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 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, $J=8.2$ Hz, H-8), 7.34 (1H, td, $J=8.2, 1.1$ 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_3 -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(9H)-dione (3) The quinone **3** was obtained from hydroxycarbazole **1**. The crude mixture was purified by column chromatography on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (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^{-1} : 3260, 1665, 1640. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 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(9H)-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^{-1} : 1670, 1640. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 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). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 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 $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_2$, 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_2SO_4 (1 ml) in water (1.5 ml) was stirred at 0°C . Then, a cooled solution of NaNO_2 (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 H_2SO_4 in 2.5 ml of water) heated at reflux. After 5 min the reaction mixture was poured into ice water (30 ml), extracted with CH_2Cl_2 and dried with Na_2SO_4 . After removing the solvent under vacuum, the crude product was purified by column chromatography on silica gel with CH_2Cl_2 as the eluent. Compound **6** was obtained as a beige solid in 15% yield, mp 106°C . IR (KBr) cm^{-1} : 3300. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 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_2CH_3), 1.42 (3H, t, $J=7.3$ Hz, CH_2CH_3). Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}\cdot 0.4\text{H}_2\text{O}$: 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(9H)-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 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99.5:0.5) as the eluent. Compound **7** was obtained as a red solid in 50% yield, mp 195°C . IR (KBr) cm^{-1} : 1670, 1640. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 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). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 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 $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2\cdot 0.3\text{H}_2\text{O}$: 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_4 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-9H-carbazol-3-yl)imino]-1,9-dihydro-4H-carbazol-4-one (12) Compound **12** was obtained as a dark red solid in 10% yield, mp 236 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3460, 3360, 1635, 1595. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 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_2), 5.93 (1H, s, H-2), 4.96 (2H, q, $J=7.0$ Hz, CH_2CH_3), 4.48 (2H, q, $J=7.0$ Hz, CH_2CH_3), 1.45 (3H, t, $J=7.0$ Hz, CH_2CH_3), 1.36 (3H, t, $J=7.0$ Hz, CH_2CH_3). *Anal.* Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}\cdot 0.4\text{H}_2\text{O}$: 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-9H-carbazol-3-yl)imino]-1,9-dihydro-4H-carbazol-4-one (13) Compound **13** was obtained as a dark blue solid in 30% yield, mp 248 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3500, 3380, 1625, 1585, 1550. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 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_2), 6.04 (1H, s, H-2), 5.03 (2H, q, $J=7.0$ Hz, CH_2CH_3), 4.42 (2H, q, $J=7.4$ Hz, CH_2CH_3), 1.41 (3H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2CH_3), 1.35 (3H, t, $J=7.0$ Hz, CH_2CH_3). FAB-MS m/z 449 (M+H)⁺. *Anal.* Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2\cdot 0.4\text{H}_2\text{O}$: C, 73.79; H, 5.49; N, 12.29. Found: C, 73.87; H, 5.41; N, 12.36.

Benzo[c]carbazole-5,6(7H)-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 carbazolidione **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 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95 : 5) as the eluent to give compound **15** as a black solid in 56% yield, mp >300 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3320, 1710, 1680. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 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). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 181.5, 172.3, 141.0, 136.4, 135.7, 132.9, 130.6, 130.5, 128.5, 127.9, 123.9, 123.8, 123.3, 122.2, 114.7. *Anal.* Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_9\text{NO}_2\cdot 0.3\text{H}_2\text{O}$: 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(11H)-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 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98 : 2) as the eluent and obtained as an orange solid in 35% yield, mp 255 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 1690, 1630. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 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, CH_2CH_3), 1.69 (3H, t, $J=7.3$ Hz, CH_2CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 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 $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}_2\cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$: 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 carbazolidione **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 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97 : 3) as the eluent. Compound **18** was obtained as a

yellow solid in 49% yield, mp 182 °C. IR (KBr) cm^{-1} : 3260 1700, 1640. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 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). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 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 $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_2\cdot 0.7\text{H}_2\text{O}$: 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 carbazolidione **7** (0.15 g, 0.67 mmol) in CH_2Cl_2 (6 ml) stirred and cooled at 0 °C. The stirring was continued for 6 h at 0 °C. Then, 1.5 g of SiO_2 was added and the reaction mixture was stirred for 48 h at 40 °C. The mixture was filtered and SiO_2 washed with CH_2Cl_2 . The combined filtrates were concentrated under vacuum. Column chromatography of the residue, eluting with a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98 : 2) gave compound **19** as a dark green solid in 26% yield, mp 191 °C (decomp.). IR (KBr) cm^{-1} : 1625. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 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_2CH_3), 4.33 (1H, s, H-1 or H-4), 4.16 (1H, s, H-1 or H-4), 2.36 (2H, m, H-12), 1.58 (3H, t, $J=7.4$ Hz, CH_2CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 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 $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_2\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: 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

- Knölker H.-J., Reddy K. R., *Chem. Rev.*, **102**, 4303—4427 (2002).
- Shin-ya K., Tanaka M., Furihata K., Hayakawa Y., Seto H., *Tetrahedron 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).
- 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).
- Teuber H.-J., Jellinek G., *Chem. Ber.*, **87**, 1841—1848 (1954).
- Horner L., Sturm K., *Chem. Ber.*, **88**, 329—338 (1955).
- Nebois P., Cherkaoui O., Benameur L., Fillion H., Fenet B., *Tetrahedron*, **50**, 8457—8464 (1994).
- 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,^a Jacques Gentili,^a Nadia Walchshofer,^a Monique Domard,^a Bernard Fenet,^b and Zouhair Bouaziz^{a,*}

^aUniversity of Claude Bernard Lyon 1, ISPB, EA3741, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France. E-mail: bouaziz@univ-lyon1.fr

^bUniversity 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 azadienes¹⁻³ and carbodienes.⁴ 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 oxides⁵⁻¹² and organic azides¹³⁻¹⁸ 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.¹² In this case, only the regioisomer in which the oxygen atom of nitrile oxide was linked to the brominated carbon of quinone was obtained.

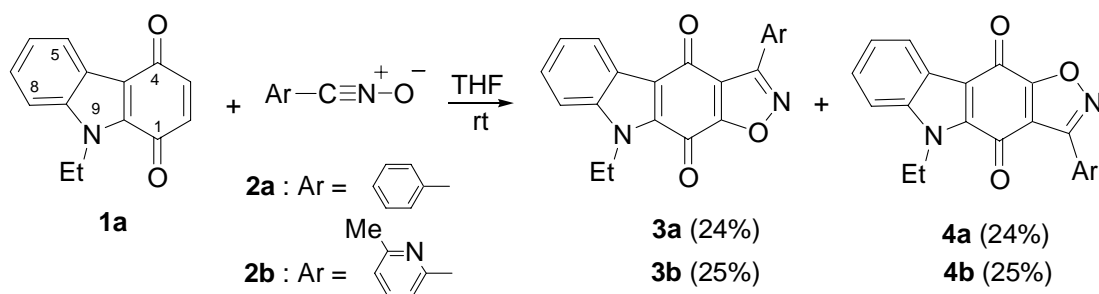
In this work, we wish to report our results from a related study of the 1,3-dipolar cycloaddition reactions of unbrominated carbazolequinone (**1a**) and bromocarbazolequinones (**1b**) and (**1c**) towards both nitrile oxides (**2a**) and (**2b**) and organic azides (**5a**) and (**5b**).

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.¹ Nitrile oxides (**2a**) and (**2b**) were synthesized by dehydrogenation of the corresponding aldoximes with sodium hypochlorite.¹⁹ Organic azides (**5a**) and (**5b**) can be prepared from the corresponding bromide or chloride by reaction with sodium azide in ethanol.²⁰

Cycloaddition of carbazolequinones (**1a**), (**1b**) and (**1c**) with nitrile oxides (**2a**) and (**2b**):

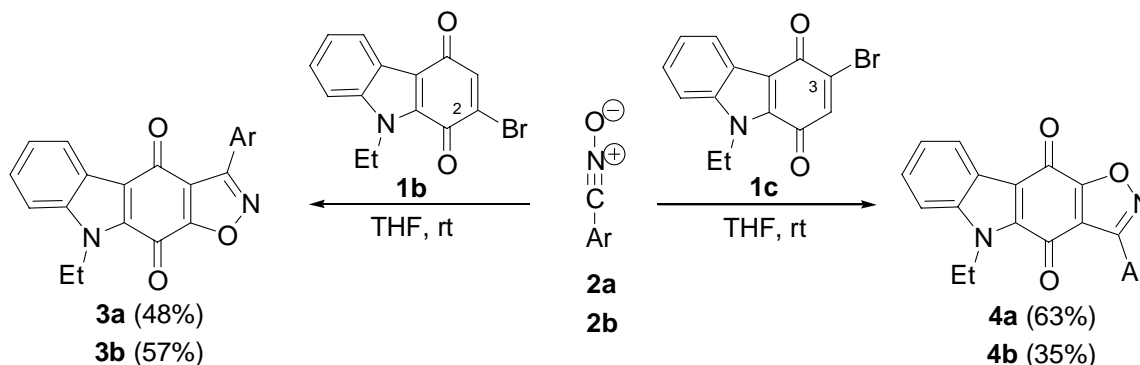
The reaction of quinone (**1a**) (Scheme 1) with nitrile oxide (**2a**) in THF at room temperature affords a 48% yield of a mixture of the regioisomeric adducts (**3a**) and (**4a**) in approximately equal proportions. In this case, the primary cycloadducts are not observed, certainly due to a rapid oxidation with **1a**. The reaction with nitrile oxide (**2b**) requires the presence of basic Al₂O₃ to give a 1:1 mixture of the regioisomeric compounds (**3b**) and (**4b**) in 50% overall yield. In absence of basic Al₂O₃, 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.¹²



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^{6,7} 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 ¹H-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 CH₂ 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 CH₂ of the ethyl group (4.70 ppm), the third one on H-3' (7.88 ppm) and the fourth one on the CH₃-6' (2.71 ppm).

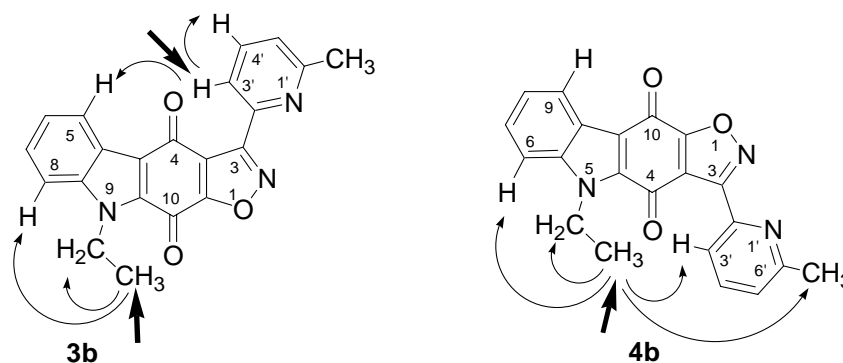


Figure 1. ¹H-NMR NOE 1D experiments

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.²¹ 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**).

Table 1. Energy levels [eV] of FMO of carbazolequinones (**1a-c**) and nitrile oxides (**2a,b**).

Carbazolequinones	HOMO	LUMO
1a	- 6.065	- 3.087
1b	- 6.201	- 3.299
1c	- 6.201	- 3.281
2a	- 6.338	- 1.313
2b	- 6.650	- 1.614

Table 2. Orbital coefficients of carbazolequinones (LUMO) and nitrile oxides (HOMO).

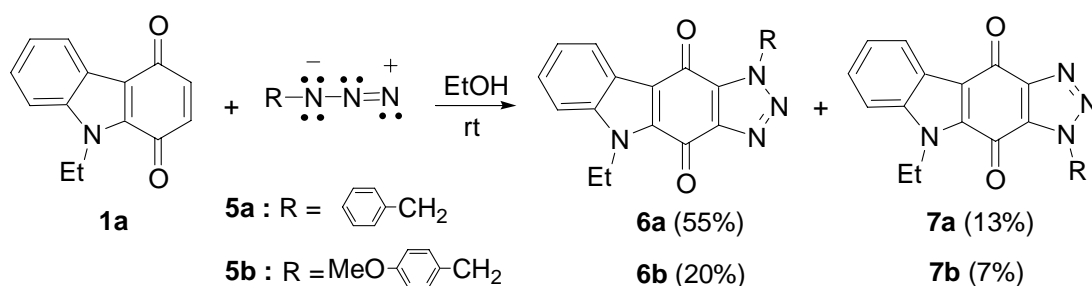
Carbazolequinones (LUMO)	C-2	C-3
1a	0.185	0.221
1b	0.194	0.216
1c	0.181	0.234
Nitrile oxides (HOMO)	Carbon atom	Oxygen atom
2a	0.272	0.419
2b	0.288	0.426

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).

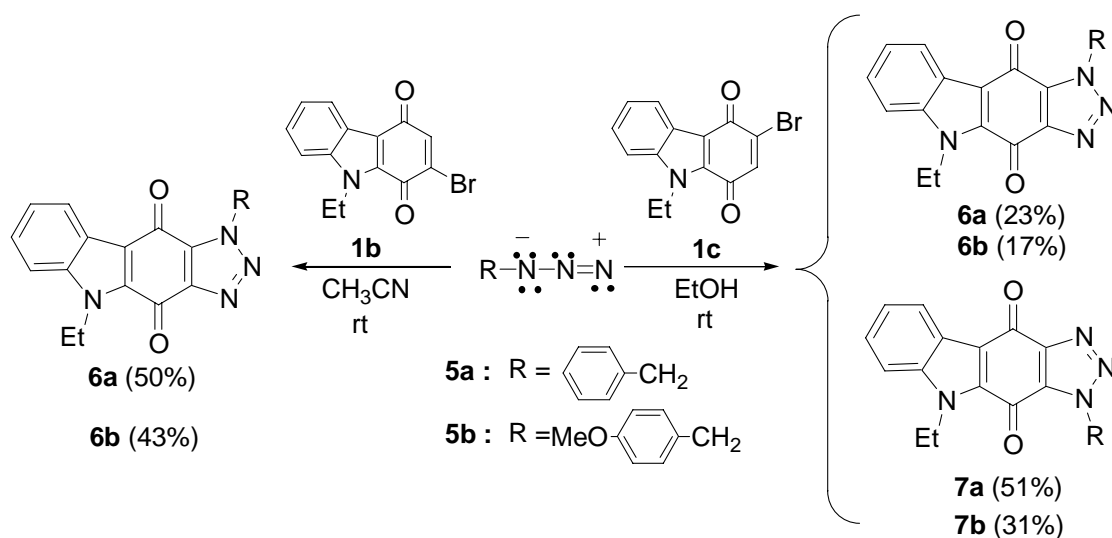
Cycloaddition of carbazolequinones (**1a**), (**1b**) and (**1c**) with organic azides (**5a**) and (**5b**):

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 ^1H - ^{13}C HMBC correlations for **6b** and **7b** (Figure 2). In the case of **6b**, 4J couplings were observed between C-4 and H of CH_2 of the ethyl group and between C-10 and H of CH_2 of the methoxybenzyl group. In the case of **7b**, both H of CH_2 of the ethyl group and H of CH_2 of the methoxybenzyl group had 4J couplings with C-4.

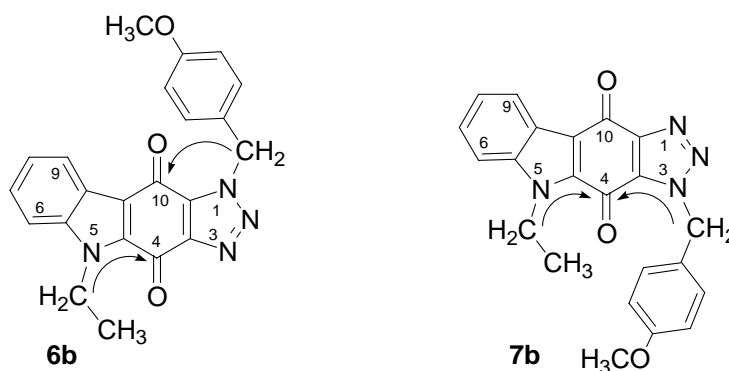


Figure 2. 2D ^1H - ^{13}C HMBC correlations

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.

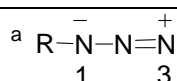
The respective LUMO and HOMO energy levels of carbazolequinones (**1a**), (**1b**) and (**1c**) given in Table 1 and LUMO and HOMO energy levels of azides (**5a**) and (**5b**) given in Table 3 indicated that the HOMO (azide)-LUMO (quinone) interaction is the governing factor of this reaction. On the 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**.

Table 3. Energy levels [eV] of FMO of azides (**5a**) and (**5b**).

Azides	HOMO	LUMO
5a	- 6.822	- 0.827
5b	- 6.058	- 0.724

Table 4. Orbital coefficients of azides (HOMO).

Azides (HOMO)	N-1 ^a	N-3 ^a
5a	0.393	0.327
5b	0.075	0.048



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 ¹H-NMR NOE experiments and 2D ¹H-¹³C 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 (¹H-NMR: 300 MHz, ¹³C-NMR: 75 MHz). Chemical shifts (δ) 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 Na₂SO₄.

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 Et₂O to give a red precipitate of **3a** which

was purified by column chromatography on silica gel with CH₂Cl₂/petroleum ether (1:1) as the eluent. It was obtained in 64% yield (110 mg). mp 244 °C. IR (KBr): 1673, 1658 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.52 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃), 4.74 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃), 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). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 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 C₂₁H₁₄N₂O₃ · 0.5 H₂O (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 Et₂O 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⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.47 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 4.73 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 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. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 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 C₂₁H₁₄N₂O₃ · 0.1 H₂O (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 Et₂O to give a red precipitate of **3b** which was purified by column chromatography on silica gel with EtOAc/CH₂Cl₂ (1:1) as the eluent. It was obtained in 58% yield (103 mg). mp 224 °C. IR (KBr): 1673 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.52 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃), 2.71 (s, 3H, 6'-CH₃), 4.73 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃), 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). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 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 C₂₁H₁₅N₃O₃ · 0.1 H₂O (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⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.47 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃), 2.71 (s, 3H, 6'-CH₃), 4.70 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃), 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). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 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 C₂₁H₁₅N₃O₃ · 0.3 H₂O (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 CH₂Cl₂/ 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/ CH₂Cl₂ (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 Et₂O (3 × 30 mL). The combined organic solution was dried with Na₂SO₄ 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 recrystallization from EtOH. It was obtained in 50% yield (90 mg). mp 279 °C. IR (KBr): 1678, 1667, 1652 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 1.48 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 4.76 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 5.98 (s, 2H, CH_2), 7.35 (m, 3H), 7.46 (m, 3H), 7.53 (m, 2H), 8.33 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, 9-H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 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 $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot 0.4 \text{H}_2\text{O}$ (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_2Cl_2 /petroleum ether (2:1) as the eluent. It was obtained in 43% yield (82 mg). mp 292 °C. IR (KBr): 1679, 1668, 1655 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 1.48 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 4.76 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 5.93 (s, 2H, CH_2), 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). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 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 $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 0.6 \text{H}_2\text{O}$ (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^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 1.48 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 4.67 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 5.94 (s, 2H, CH_2), 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). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 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 $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot 0.2 \text{H}_2\text{O}$ (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 Et₂O 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 CH₂Cl₂/ 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(3*H*,5*H*)-dione (7b): mp 270 °C. IR (KBr): 1666 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.49 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.78 (s, 3H, CH₃), 4.69 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₃), 5.88 (s, 2H, CH₂), 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). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 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 C₂₂H₁₈N₄O₃ 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 CH₂Cl₂/ 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 Et₂O 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 CH₂Cl₂/ 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.
2. A. Poumaroux, Z. Bouaziz, H. Fillion, M. Domard, J. Giraud, and A.-F. Pétavy, *Chem. Pharm. Bull.*, 1999, **47**, 643.

3. 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.
9. G. Brahmeshwari, S. Ramadevi, M. S. Rao, and T. V. Padmanabha Rao, *Indian J. Chem.*, 1991, **30B**, 369.
10. F. Farina, M. Victoria Martin, M. Munoz, M. Carmen Paredes, and R. Rodriguez, *Heterocycles*, 1995, **40**, 413.
11. 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.
13. 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.
21. 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 anthroponose 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 régioisomères ont été confirmées par RMN ¹H NOE et par une étude des corrélations ¹H -¹³C 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 à l'inhibition de la PNP.

TITRE en anglais

New heterocyclic 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 anthroponosis 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 ¹H-¹³C 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

