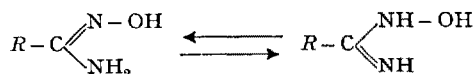


## Zusammenfassung

Hydratisiertes Phosphoroxychlorid besteht aus zyklischen und langkettigen Polyphosphorsäure-Chloriden, die nicht beständig sind und leicht hydrolysiert werden. Hydratisiertes Phosphoroxychlorid erlaubt die Synthese von langkettigen Thiaminpolyphosphorsäureestern, die mehr als drei Phosphorsäure-Reste je Molekül enthalten.

### Une nouvelle famille de composés tuberculostatiques: les amidoximes

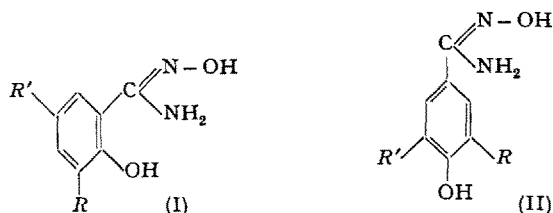
Les amidoximes (ou hydroxyamidines) possèdent la formule générale



et représentent une famille de composés organiques chez laquelle on n'a essayé que très rarement de détecter des substances pouvant présenter un intérêt physiologique ou pharmacodynamique<sup>1</sup>. A notre connaissance, les seules recherches faites en ce sens ont été celles de MERING<sup>2</sup>, qui, vers 1885, étudia sommairement la benzamidoxime et lui reconnut simplement une certaine toxicité, et celles beaucoup plus récentes de BUU-HOI et LECOCQ<sup>3</sup>, et de WALKER, TONKIN et FULLER<sup>4</sup>, qui étudièrent les propriétés des benzamidoximes substituées en position para par des radicaux soufrés ( $-SR$ ,  $-SO_2CH_3$ , etc...) et reconnurent à quelques composés de ce groupe une certaine activité antibactérienne vis-à-vis du streptocoque hémolytique, et antimalarique vis-à-vis du *Plasmodium gallinaceum*.

Dans le cadre d'une étude générale sur les relations entre l'activité tuberculostatique des molécules organiques et leur aptitude à fournir des complexes avec certains métaux tels que le cuivre<sup>5</sup>, nous nous sommes intéressés aux amidoximes, dont on sait depuis les travaux de TIEMANN<sup>6</sup>, de WERNER<sup>7</sup>, et de TSCHUGAEW<sup>8</sup>, qu'elles fournissent avec plusieurs métaux (cuivre, fer, nickel, etc.) des complexes internes de coordination vivement colorés. Les amidoximes que nous avons étudiées tout d'abord sont celles dérivant des acides salicyliques et parahydroxybenzoïques halogénés; en effet, une activité tuberculostatique notable avait déjà été décelée chez plusieurs dérivés de ces deux types d'acides, tels que les acides 5-chloro- et 5-bromosalicylhydroxamiques<sup>9</sup>, la 5-chlorosalicylhydrazide<sup>10</sup>, etc.

La synthèse de ces composés a été effectuée en faisant agir l'hydroxylamine sur les nitriles correspondants, selon la réaction de TIEMANN et KRÜGER<sup>1</sup>.



L'étude bactériologique a été faite sur des cultures de *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* (souche H37 Rv), sur milieu «tween 80» et albumine de DUBOS et DAVIS; la lecture est faite après 1, 2, et 3 semaines d'incubation à 37°.

Dans ces conditions, les dix amidoximes de types (I) et (II) étudiées ont donné les résultats suivants:

a) la 5-chlorosalicylamidoxime (I;  $R = H$ ,  $R' = Cl$ ), la 3:5-dichlorosalicylamidoxime (I;  $R = R' = Cl$ ), la 5-bromosalicylamidoxime (I;  $R = H$ ,  $R' = Br$ ), et la 5-iodosalicylamidoxime (I;  $R = H$ ,  $R' = I$ ) sont inhibitrices jusqu'à des concentrations de l'ordre de  $10^{-6}$ ;

b) la 3:5-dibromosalicylamidoxime (I;  $R = R' = Br$ ) et la 3:5-diiodosalicylamidoxime (I;  $R = R' = I$ ) sont inhibitrices jusqu'à des concentrations de l'ordre de  $10^{-5}$ ;

c) la 3:5-dichloro-4-hydroxybenzamidoxime (II;  $R = R' = Cl$ ), la 5-bromo-4-hydroxybenzamidoxime (II;  $R = H$ ,  $R' = Br$ ), la 3:5-dibromo-4-hydroxybenzamidoxime (II;  $R = R' = Br$ ), et la 3:5-diiodo-4-hydroxybenzamidoxime (II;  $R = R' = I$ ) sont inhibitrices jusqu'à des concentrations de l'ordre de  $10^{-4}$ .

Il résulte ainsi de nos recherches que la fonction amidoxime présente un intérêt certain en ce qui concerne la recherche des substances tuberculostatiques. L'activité élevée que présentent les salicylamidoximes halogénées est particulièrement remarquable, étant donné qu'il s'agit là de composés de structure chimique simple et de synthèse aisée. Des recherches systématiques sont en cours, afin d'arriver à une évaluation aussi complète que possible du potentiel tuberculostatique du groupe des amidoximes et de substances analogues.

N. P. BUU-HOI, M. WELSCH,  
N. D. XUONG, et K. V. THANG

Institut du Radium de l'Université de Paris, et Institut de bactériologie de l'Université de Liège, le 30 novembre 1953.

## Summary

The tuberculostatic properties *in vitro* of a number of benzamidoximes have been determined, and the halogenated salicylamidoximes have been found to display considerable activity.

<sup>1</sup> F. TIEMANN et P. KRÜGER, Ber. dtsch. chem. Ges. 17, 1685 (1884).

<sup>1</sup> Voir la monographie de N. P. BUU-HOI et P. CAGNIANT dans le *Traité de Chimie organique de Grignard*, t. 15 (Editeurs Masson, Paris 1948), p. 697.

<sup>2</sup> Citées par P. KRÜGER, Ber. dtsch. chem. Ges. 18, 1054 (1885).

<sup>3</sup> N. P. BUU-HOI et J. LECOCQ, Bull. soc. chim. [5] 13, 139 (1946).

<sup>4</sup> J. WALKER, I. TONKIN et A. FULLER, J. Chem. Soc. 1945, 633.

<sup>5</sup> N. P. BUU-HOI, N. D. XUONG, F. BINON et N. H. NAM, C. r. Acad. Sci. 235, 329 (1952). – N. P. BUU-HOI et N. D. XUONG, C. r. Acad. Sci. 237, 498 (1953). – C. DUVAL, N. P. BUU-HOI, N. D. XUONG et M. JACQUINOT, Microchimica Acta 3, 212 (1953).

<sup>6</sup> F. TIEMANN, Ber. dtsch. chem. Ges. 17, 126 (1884).

<sup>7</sup> A. WERNER, Ber. dtsch. chem. Ges. 27, 2197 (1894); 32, 1979 (1899).

<sup>8</sup> L. TSCHUGAEW, Ber. dtsch. chem. Ges. 40, 182 (1907).

<sup>9</sup> N. P. BUU-HOI, N. D. XUONG et N. H. NAM, C. r. Acad. Sci. 236, 635 (1953). – T. URBAŃSKI, Nature 166, 267 (1950). – T. URBAŃSKI, S. HORNING, S. SLOPEK et J. VERNULET, Nature 170, 753 (1952).

<sup>10</sup> N. P. BUU-HOI, N. D. XUONG, N. H. NAM, F. BINON et R. ROYER, J. Chem. Soc. 1953, 1358.

### A propos d'un dérivé de la colchicine: La tartrate de désacétylcolchicine

Lors de précédentes communications<sup>1</sup>, nous avons montré que le «nipple-test» (voir ci-dessous) est une méthode qui permet, entre autres, de juger et d'évaluer

<sup>1</sup> E. UEHLINGER, W. JADASSOHN, H. E. FIERZ, J. invest. Derm. 4, 331 (1941). – H. ISLER, Dermatologica 100, 301 (1950). – R. BRUN, E. BUJARD, W. JADASSOHN, E. CHERBULIEZ, R. PAILLARD et P. GAUDIN, Rev. suisse Path. Bact. 14, 612 (1951).

un effet stathmocinétique. Nos expériences avec la podophylline, la colchicine, et des dérivés ou des constituants de ces deux substances, nous avaient amenés à penser que l'effet stathmocinétique semble lié à la toxicité; citant BUJARD nous écrivions: «Le pouvoir pycnotique d'une substance est d'autant plus grand que sa toxicité est plus grande, aussi le phénomène de la caryoclasie présente-t-il un grand intérêt dans l'étude de la toxicologie.» Jusqu'à présent, les substances que nous avons examinées montraient un rapport

dose maximum tolérée

dose minimum efficace

(DMT/DME) de 2 environ.

Récemment, LEITER, DOWNING, HARTWELL et SHEAR<sup>1</sup> du National Cancer Institute de Bethesda publièrent des résultats très intéressants obtenus avec de nombreux dérivés de la colchicine. Plusieurs dérivés montraient des rapports DMT/DME très favorables et le tartrate de désacétylcolchicine (triméthylcolchicinic acid methyl ether d-tartrate) en particulier, se révélait le meilleur avec un rapport de 50. D'autres auteurs (B. GOLDBERG, L. G. ORTEGA, A. GOLDIN, G. E. ULLYOT et E. B. SCHOENBACH, Cancer 3, 124 (1950) ont également étudié ce produit. Leur rapport DMT/DME a été de 20 environ (sarcome 180 de la souris).

Les auteurs cités ci-dessus examinent leurs substances sur le sarcome 37 de la souris, et considèrent macroscopiquement et microscopiquement l'état de la tumeur «traitée», en comparaison avec une tumeur de contrôle. Au point de vue macroscopique ils notent l'amollissement de la tumeur, puis l'hémorragie et enfin la nécrose. Microscopiquement les figures observées par les auteurs américains sont les suivantes: rétrécissement des noyaux et rétraction du cytoplasme; ces premiers signes sont appelés «early cell damage»; 6 ou 8 h après l'injection les noyaux deviennent nettement pycnotiques; ce stade est appelé: «induced generalized pycnosis, or induced necrosis».

Tableau I

Substances	Doses injectées en mg/kg	Nombre de cobayes	Mortalité	Densité des mitoses bloquées*
Tartrate de désacétylcolchicine . . . . .	20	6	4/6	4,25
	10	4	0/4	3,5
	5	4	0/4	0
	2,5	4	0/4	0
Colchicine . . . . .	10	4	4/4	—
	7,5	4	3/4	—
	5,0	10	2/10	5
	3,75	4	0/4	2,2
	2,5	4	0/4	0

\* La densité des mitoses bloquées a été appréciée au moyen d'une échelle arbitraire étalonnée de 0 à 6. Les chiffres notés dans ce tableau n'ont donc qu'une valeur conventionnelle et sont les moyennes arithmétiques des appréciations faites d'après les cobayes restés en vie.

Les résultats de LEITER et coll. montrent que la colchicine par exemple ne donne qu'un rapport DMT/DME

de 2 (correspondant à nos résultats) tandis que le tartrate de désacétylcolchicine donne un rapport 25 fois meilleur. Rappelons que notre méthode (nipple-test) permet l'étude d'un effet stathmocinétique sur un tissu épithélial en prolifération (épiderme d'une tétine de cobaye traitée par un œstrogène). Comme les résultats obtenus au moyen des deux méthodes (sarcome 37 et nipple-test) pour la colchicine étaient concordants, il nous a paru intéressant de tester également ce nouveau produit par notre méthode.

Le tartrate de désacétylcolchicine nécessaire à nos expériences a été synthétisé par nous à partir de colchicine (voir partie expérimentale).

Résultats. Les résultats de nos expériences sont résumés dans le tableau I.

LEITER et coll. avaient trouvé pour le tartrate de désacétylcolchicine (sur la souris) une dose minimum efficace de 2 mg/kg et une dose maximum tolérée de 100 mg/kg. Nos résultats sont beaucoup moins favorables, et le rapport DMT/DME que nous obtenons pour le tartrate de désacétylcolchicine se trouve être du même ordre que celui déjà trouvé pour la colchicine.

Enfin, nous avons examiné la toxicité de notre produit sur des souris albinos (voir tableau suivant). Là également, nos résultats divergent sensiblement de ceux de LEITER et coll.; notre produit étant certainement pur, comme l'analyse l'a montré, cette discordance entre les valeurs de toxicité nous semble due à une différence entre les souris utilisées à Bethesda et à Genève. La DL<sub>50</sub> de ce produit pour la souris a été trouvée égale à 64 mg/kg par GOLDBERG et coll. (*loc. cit.*). Ce résultat-là correspond au nôtre.

Tableau II. Toxicité du tartrate de désacétylcolchicine sur la souris.

Doses injectées mg/kg	Nombre de souris	Mortes	Temps de survie h
100	5	4	24-96
70	5	5	24-93
40	5	0	—

Le rapport DMT/DME est une donnée très importante pour un produit ayant un effet stathmocinétique. Au point de vue pratique une substance présentant un rapport élevé serait certainement à essayer en clinique humaine pour le traitement des tumeurs malignes; il faut cependant être prudent car ce rapport DMT/DME peut être extrêmement variable suivant les méthodes et les animaux utilisés pour le test. On voit qu'étudié par deux méthodes dissemblables le tartrate de désacétylcolchicine a donné deux rapports DMT/DME très différents. Par contre la colchicine expérimentée sur le sarcome 37 de la souris et le nipple-test chez le cobaye donne deux rapports analogues. Ces faits sont à rapprocher de ceux trouvés par GREENSPAN, LEITER et SHAER<sup>1</sup>, qui ont montré, pour un constituant de la podophylline, que le rapport DMT/DME pouvait varier de 20 à 1, suivant la tumeur (transplantée sur souris) sur laquelle le produit a été testé.

Lors de nos expériences antérieures faites avec différents produits, de même que dans les résultats rapportés ici, nous n'avons jamais trouvé un rapport DMT/DME «favorable», c'est-à-dire s'éloignant sensiblement de 2. Nous rappelons cependant que nos examens biologiques ont été faits sur un tissu épithélial et sur le cobaye. Il

<sup>1</sup> J. LEITER, V. DOWNING, J. L. HARTWELL, M. J. SHEAR, J. Nat. Cancer Inst. 13, 379 (1952).

<sup>1</sup> E. M. GREENSPAN, J. LEITER, M. J. SHEAR, J. Nat. Cancer Inst. 10, 1295 (1950).

résulte donc de ces diverses expériences qu'il faut être extrêmement circonspect lorsqu'on veut extrapoler les résultats obtenus sur un animal ou un tissu à un autre animal ou un autre tissu.

### Partie expérimentale

**Nipple-test.** Une goutte d'une solution d'hormoestrol à 2  $\gamma$ /ml est appliquée sur une tétine (non pigmentée) d'un jeune cobaye mâle. Après 24 h on injecte (sous-cutané) la solution aqueuse du produit à examiner pour un effet stathmocinétique. 9 h après l'injection, la tétine est excisée et préparée pour l'examen histologique. On juge de l'effet du produit injecté d'après la densité des mitoses pycnotiques trouvées dans l'épiderme.

**Toxicité.** Les examens de toxicité sur le cobaye, comme pour la souris, ont été faits en injectant (sous-cutané) le produit en solution aqueuse. Ensuite les animaux ont été contrôlés pendant 5 jours.

### Préparation du d-tartrate de désacétylcolchicine (triméthylcolchicinic acid methyl ether d-tartrate)

1° Colchicine  $\rightarrow$  colchicine. 10 g de colchicine Sandoz et 200 cm<sup>3</sup> HCl 0,2N sont chauffés à reflux au bain-marie pendant 1 h 20. Rendement 7,5 g en colchicine crist. brute.

2° Colchicine  $\rightarrow$  désacétylcolchicine (selon ZEISEL<sup>1</sup>). 7,5 g de colchicine + 28 cm<sup>3</sup> HCl ( $d = 1,15$ ) sont chauffés au bain-marie pendant 2 h 50. Dilution avec 15–20 cm<sup>3</sup> d'eau (lavage) et extraction en trois fois avec 400 cm<sup>3</sup> CHCl<sub>3</sub> (1,2 l en tout). Le CHCl<sub>3</sub> est chassé à la vapeur. La solution aqueuse résiduelle est concentrée sous vide (à moitié). On filtre 480 mg de colchicine non transformée. On neutralise avec NaOH diluée, filtre le précipité volumineux qui s'est formé; cristallise dans le méthanol. On obtient 3,42 g de cristaux, F 156–158°.

3° Désacétylcolchicine  $\rightarrow$  désacétylcolchicine  $\rightarrow$  d-tartrate de désacétylcolchicine. 3,4 g de désacétylcolchicine sont méthylés par action (à température ordinaire) de diazométhane en solution étherée (15 g nitrosométhylurée). Après 5 h, le produit étant dissous (à part 0,5 à 0,6 g d'huiles qui collent sur les parois du ballon) on chasse le diazométhane en excès ainsi que l'éther (les huiles sont décantées auparavant et éliminées). On obtient 2,7 g de base méthylée brute. Les 2,7 g de base brute sont dissous dans 3–4 cm<sup>3</sup> d'éthanol et on ajoute 1,2 g d'acide d-tartrique (1 mol pour 1 mol) également dissous dans l'éthanol. On obtient un précipité collant, hygroscopique. On le reprend par 1/2 cm<sup>3</sup> d'eau et ajoute 4 à 5 cm<sup>3</sup> d'acétone. On chauffe légèrement et laisse se former un précipité finement cristallin, blanchâtre, F 200–210°, 340 mg. On reprend par l'acétone et lave à chaud; on retrouve 310 mg de cristaux. F 214–216°. Malgré une concentration et une attente prolongée aucun précipité ne peut plus être obtenu à partir des eaux-mères.

Réaction de ZEISEL sur les eaux-mères: négative avant hydrolyse, positive après action, à chaud, de HCl dil.

Les points de fusion sont pris au bloc et corrigés. Marge d'erreur jusqu'à 200°  $\pm$  2°, plus haut  $\pm$  3°C.

C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O<sub>11</sub>N Calc C 56,91 % H 5,57 % N 2,77 %  
trouvé C 56,82 % H 5,71 % N 2,79 %

Nous remercions le Dr PEISKER de Brugg qui a effectué l'analyse du produit.

**Addendum.** Dans des expériences précédentes (1951, *loc. cit.*) nous avons examiné l'effet d'un autre dérivé de la colchicine: la substance F de SANTAVY et REICHSTEIN (appelée maintenant Demecolcin, Ciba). Nous avons confirmé et élargi nos expériences avec ce produit. D'après SANTAVY, WINKLER et REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta*, 36, 1320, 1953: «...ist bei diesem Stoff das Verhältnis zwischen antimittotischer und allgemein toxischer Dosis bei der Ratte relativ günstig, so dass er möglicherweise für eine klinische Verwendung Interesse besitzt.» Les résultats que nous avons obtenus avec cette substance examinée sur le cobaye (nipple-test) n'ont pas été meilleurs que ceux que nous avons enregistrés avec d'autres produits stathmocinétiques. En effet, la dose de 1 mg/kg provoque chez le cobaye une mortalité importante; 0,5 mg/kg a une action stathmocinétique très nette, tandis que 0,25 mg/kg n'a plus qu'un effet très faible, presque nul.

R. BRUN et J. PRESS

Clinique universitaire de dermatologie, Laboratoire Vifor et Institut universitaire d'histologie et d'embryologie, Genève, le 17 décembre 1953.

### Summary

(1) Experiments made on the epidermis of the guinea pig's nipple ("nipple-test") have shown that desacetylcolchicine d-tartrate (trimethylcolchicinic acid methyl ether d-tartrate) does not give a better ratio

$$\frac{\text{maximum tolerated dose}}{\text{minimum effective dose}}$$

than colchicine, contrarily to the experiments with mice bearing Sarcoma 37 (LEITER *et al.*).

(2) The toxicity (mice) of desacetylcolchicine d-tartrate was greater in our experiments than in those of LEITER *et al.*

(3) The biological method and the chemical process are described.

### Micro-Hardness Measurements on Single Haversian Systems in Bone

Earlier investigations with aid of microradiographic techniques<sup>1</sup> have demonstrated that the amount of the inorganic component of bone varies in different types and structures of bone tissue.

A microradiogram registered with "soft" X-rays of a 230  $\mu$  thick ground cross-section of human femur shows the varying degree of mineralization of different Haversian systems. In the enlarged microradiogram the white areas have a larger amount of calcium salts than the darker ones (see Fig.).

On the section microradiographed, three groups of Haversian systems were tested with a metallographic micro-hardness testing equipment. The groups correspond to structures with low, medium, and high content of bone salts. (The difference in mineralization between "low" and "high" is not more than about 10%.) The size of the impression from the pyramidal diamond in the bone were measured in a metallographic microscope. The average area of the impression was about 0.005 mm<sup>2</sup>, and the hardness was calculated according to VICKERS' hardness scale (kg/mm<sup>2</sup>). As the bone is

<sup>1</sup> S. ZEISEL, *Mh. Chem.* 9, 10 (1888).

<sup>1</sup> R. AMPRINO and A. ENGSTRÖM, *Acta Anatomica* 15, 1 (1952).