

Original article

Pharmacology

Synthèse et Etude pharmacologique de la 4-phényl-1, 5-benzodiazépin-2-one et ses dérivés

Pascal Manuele KANYONGA* ; Amina ZELLOU** ; Yahia CHERRAH **; El Mokhtar ESSASSI*

* Laboratoire de Chimie Organique d'hétérocyclique, Pole de Compétence Pharmacochimie Faculté de Sciences- Agdal, B.P : 1014, Avenue Ibn Batouta, Rabat, Maroc.

** Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, BP 6203 Rabat-Instituts, Maroc.

Pour correspondance : manuelekanyonga@yahoo.fr**RESUME**

L'étude de l'activité pharmacologique de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one, 4-phényl-1,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one, 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole synthétisées dans notre Laboratoire montrent que ces produits ne sont pas toxiques aux doses thérapeutiques et qu'ils sont doués d'effets sédatif, myorelaxant, anxiolytique mais, ne présentent pas d'effet hypnotique, ni cataleptique. Cependant, ces trois produits de synthèse potentialisent à des degrés différents l'effet hypnotique du Nesdonal.

Mots clés: 1,5-benzodiazépine, synthèse, toxicité aiguë, activité psychotrope.

SUMMARY.

The study of the pharmacological activity of the 4-phenyl-1,5-benzodiazépin-2-one, 4-phenyl-1,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one, 4-phenyl-1,5-benzodiazépin-2-thiol synthesized in our laboratory showed that these products are not toxic at therapeutic doses and possess sedative, muscle relaxant, anxiolytic effects, but do not present any hypnotic, or catalepsy effect. However, these three products potentiate synthesis to different degrees of the hypnotic effect Nesdonal.

Key word: 1,5-benzodiazepine, synthesis, acute toxicity, psychotropic activity.

INTRODUCTION.

Depuis leur découverte en 1957, les benzodiazépines suscitent toujours un intérêt considérable en thérapeutique; les 1,4-benzodiazépines constituent la famille la plus utilisée grâce à ses nombreuses propriétés pharmacologiques : tranquillisante, myorelaxante, anxiolytique [1, 2], antitumorales [3] et anticonvulsivante [1]. Cependant, les 1,5-benzodiazépines présentent non seulement un intérêt sur le plan de la réactivité, mais possèdent aussi des propriétés pharmacologiques intéressantes: tranquillisante, anticonvulsivantes, anxiolytique [4]

Plusieurs auteurs ont étudié la synthèse et la réactivité de la 1,5-benzodiazépine [5, 6,7] et ont prouvé que cette dernière, ainsi que ses dérivés ont une activité pharmacologique reconnue à la famille des benzodiazépines ; mais dans la plus part de cas leur synthèse utilise des méthodes nécessitant la mise en jeu de réactifs onéreux

voire même dangereux [8, 9, 10, 11,12]. Actuellement, seule la 7-chloro-1-méthyl-5-phényl-1,5-benzodiazépine-2,4-dione connue sous le nom de Clobazam est utilisée en clinique dans cette famille.

C'est ainsi que dans le cadre de nos recherches en série 1,5-benzodiazépine, nous nous sommes fixés comme objectif de synthétiser la 4-phenyl-1,5-benzodiazépin-2-one et ses dérivés en utilisant des réactifs usuels, facilement accessibles, d'évaluer leur toxicité et d'examiner les propriétés pharmacologiques de ces produits sur le système nerveux central, grâce à une série de tests comportementaux employés en psychopharmacologie.

MATERIEL ET METHODES**Produits**

La 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one a été synthétisé par condensation de l'o-phénylenediamine avec le benzoyleacétate d'éthyle

dans le xylène pendant une heure. [6,13,14]. Le produit obtenu a été soumis aux réactions d'hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon et de sulfuration par le pentasulfure de phosphore dans la pyridine [15], ce qui a permis d'obtenir : la 4-phényl-1,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one et la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole dont les structures sont présentées sur la figure 1. L'obtention de ces produits se fait selon le mode opératoire ci-dessous :

- 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one : dans un ballon de 250 ml ont été mélangés 10 mmoles d'ortho-phénylène-diamine et 11 mmole de benzoylacétate d'éthyle dans 100 ml de xylène. Le mélange a été porté à reflux pendant 1 heure et refroidi ; ce qui a permis d'obtenir un précipité qui a été filtré, lavé avec de l'éthanol, puis séché.

- 4-phényl-1,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one : dans un ballon de 100 ml contenant 5 mmole de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one a été ajoutée une pincée de Pd-C et 60 ml d'éthanol sous pression d'H₂. Après 48 heures, la solution a été filtrée. Le filtrat a été concentré à sec et recristallisé dans l'éthanol.

- 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole : dans un ballon de 250 ml ont été mélangés 10 mmoles de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one, 30 mmoles de P₂S₅ et 60 ml de pyridine. Le mélange a été porté à reflux pendant 1 heure, puis concentré. Le résidu a été lavé à l'eau chaude et séché.

Les structures de ces composés ont été élucidées sur la base des données spectrales et des paramètres physicochimiques (tableau 1) obtenus à partir des techniques ci-après : Les points de fusion non corrigés ont été mesurés à l'aide du banc chauffant Köffler. Les spectres de résonance magnétique nucléaire (¹H, ¹³C) ont été enregistrés sur un appareil AVANCE 300 Bruker opérant à 300 MHz, en solution dans le chloroforme deutérié. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport à la référence interne TMS. Les spectres de masse ont été effectués par impact électronique à l'aide l'appareil VARIAN MAT 311A.

Les spectres IR ont été enregistrés en film de KBr, sur un spectromètre IR-TF VERTEX 70 entre 600 et 4000 cm⁻¹.

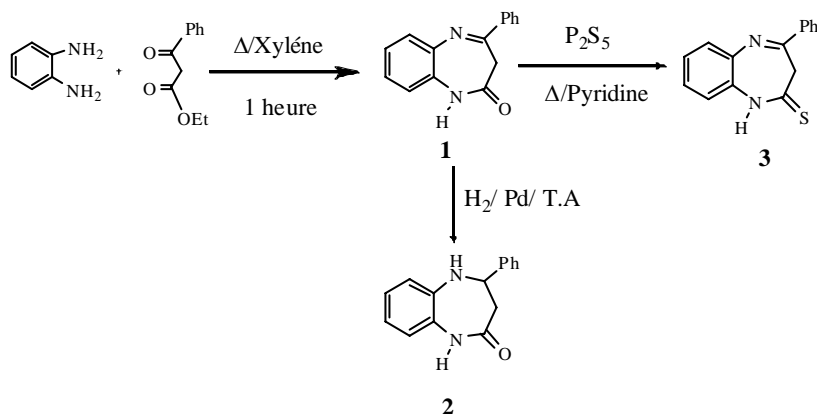


Figure 1: Schéma synthèse de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one[1], 4-phényl-1,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one [2], 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiol [3].

Tableau 1: Paramètres d'identification de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one, de la 4-phényl-1,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one et de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole.

Légende: s : singulet; m = massif

Produit	Rendement	Point de fusion	Données spectrales
4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one	90%	198-200°C (Éthanol)	- Spectre RMN ¹ H (CDCl ₃): 3, 4 ppm (2H, s, CH ₂); 7, 20 – 7, 90 ppm 9 H aromatiques, m); 9, 37 ppm (1H, s, NH) - Spectre RMN ¹³ C : 39,79 ppm (CH ₂); 121,82 – 130, 129,14ppm (C aromatique); 137,62 – 139,91 ppm (C aromatic 167,80 ppm (C=O) - Spectre IR: VC=O: 1670Cm-1 - Spectre de masse : M+ (m/z) = 236
4-phényl-1,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one	85%	176 – 178 (éthanol)	-Spectre RMN ¹ H : 7,10 ppm (H aromatiques, m) ; un multiplet à 5 ppm (H sur le C4) et un multiplet centré à 2,80 ppm (2H portés par le groupe méthylène en position 3.) - Le spectre IR pris dans le KBr montre la présence d'une bande à 1640 Cm ⁻¹ attribuable à VC=O et la disparition de VC=N. - Le spectre de masse : un pic moléculaire M+ (m/z) : 238
4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole	80%	222°C	- Spectre RMN ¹ H : CH ₂ : 3,9 ppm ; CH (aromatiques) : 7,2 – 7,9 ppm - Spectre de masse: M+ (m/z): 252 - Spectre IR : VC=S : 1140 Cm ⁻¹

Etudes pharmacologiques.

Produits testés : la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one, la 4-phényl-1,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one et la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole ont été testés en comparaison à Urbanyl (Clobazam) : 7-chloro-1-méthyl-5-phényl-1,5-benzodiazépine-2,4-dione utilisé comme substance de référence.

Animaux: L'expérience a été faite sur des souris Swiss et des rats Wistar issus du Laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat. Leur poids se situe entre 20 à 30 g pour les souris et 200 à 350 g pour les rats, nous avons utilisé les animaux de deux sexes, ils étaient maintenus dans les mêmes conditions de température (25±2°C), l'humidité relative était située entre 50 ± 5 %, et l'accès à l'eau et aux aliments à volonté [16]. L'utilisation des animaux a été faite en conformité avec les guides d'utilisation des animaux de Laboratoire [17, 18,19].

Etude de la toxicité aigue

Elle est déterminée selon la méthode de Lichfield et Wilcoxon [20, 21]. Nous avons utilisé 6 lots de 10 souris. Les animaux de chaque lot reçoivent une dose unique des composés testés par voie intra péritonéale sous forme d'une suspension dans la gomme arabique à 10 %. Les doses administrées par lot sont les suivantes: Lot 1: 100 mg/kg, Lot 2: 200 mg/kg, Lot 3: 400 mg/kg, Lot 4: 800 mg/kg, Lot 5: 1600 mg/kg, Lot 6: 2000 mg/kg. Les animaux ont reçu un volume de 0,4 ml pour 20 g de poids corporel, et ils étaient gardés en observation pendant 14 jours, nous avons relevé le nombre de décès, réalisé la pesée quotidienne et évalué de l'état de santé générale des animaux.

Etude de l'activité psychotrope

La mise en évidence de l'effet sédatif, tranquilisant, myorelaxant, hypnotique et cataleptogène a été réalisée grâce aux tests comportementaux suivants [22]:

Le test de la traction : Il consiste à suspendre des souris par les pattes antérieures à un fil métallique tendu horizontalement, et on compte le temps mis par la souris pour amener au moins une des pattes postérieure à toucher le fil. Une souris normale effectue un rétablissement en moins de 5 secondes, le cas contraire signifie que la souris est soumise à une action sédatrice.

Le test de la cheminée : Il consiste à placer une souris dans un tube de verre de 30 cm de longueur, disposé verticalement. La réponse est positive si la souris remonte le tube en moins de 30 secondes.

Le test de la planche à trous. Il permet d'explorer la curiosité et le désir de fuite de l'animal. Pour ce faire, on utilise une planche de 40x40 cm et de 1,8 cm d'épaisseur, percé de 16 trous de 3 cm de diamètre, régulièrement espacés. La souris est déposée au centre de la planche et on compte le nombre de fois où la souris plonge la tête dans un des trous au bout de 1, 2, 3, 4 et 5 minutes et on calcule la moyenne de trous explorés pendant 5 minutes.

La recherche de l'action hypnotique, les animaux reçoivent les produits par voie intra péritonéale, et on observe la perte du réflexe de redressement en plaçant les animaux sur le dos, ceux qui gardent cette position sont considérés comme hypnotisés, contrairement à ceux qui se retournent. Et on mesure alors le temps écoulé entre l'injection du produit et la suppression du réflexe de redressement, temps d'endormissement (T.E.), et le temps écoulé entre la disparition du réflexe de redressement et sa réapparition = temps de sommeil (T.S.).

La recherche de l'action catatonigène. On administre le produit par voie intra péritonéale aux rats et on suit toutes les 15 minutes l'évolution de la catalepsie. L'animal est considéré comme cataleptique, s'il accepte de croiser les pattes antérieures avec les pattes postérieures homolatérales, et le fait de garder cette position

implique une catalepsie importante. On note pour chaque animal le temps d'apparition de la catalepsie.

La recherche de l'interaction médicamenteuse. Chaque test nécessitait l'utilisation de trois lots d'animaux:

- un lot recevant le solvant de dilution (gomme arabique à 10%) et considéré comme témoin négatif

- un lot recevant l'Urbanyl (40 mg/Kg) et considéré comme témoin positif

- un lot recevant les produits testés à la dose de 50 mg/Kg, 100 mg/Kg, 200 mg/Kg.

Les doses utilisées pour ces tests étaient inférieures à la DL₅₀ et n'ont pas entraîné la mort des animaux lors de l'étude de la toxicité aiguë. Les animaux de chaque lot reçoivent une dose unique d'un des produits testés par voie intra péritonéale sous forme d'une suspension dans la gomme arabique à 10 %. Le volume administré était de 0,4 ml pour 20 g de poids corporel les souris et de 1 ml pour 100 g de poids corporel pour les rats.

RESULTATS

Toxicité aiguë

Dans nos conditions de travail, nous avons obtenu les valeurs suivantes : pour les trois produits : 1617,08 mg/Kg pour la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one, 1219,20 mg/Kg pour la 4-phényl-1,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one et 596,50mg/Kg pour la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole (Tableau 2).

Le suivi de l'évolution pondérale des animaux durant quinze jours montre de manière générale une diminution du poids corporel durant les trois premiers jours; passé ce délai, ce poids augmente normalement et devient supérieur au poids initial de l'animal traité (Figure 2).

Activité psychotrope

Les résultats sont exprimés par rapport aux lots témoin et de référence (Tableaux 3 et 4).

Tableau 2 : DL₅₀ de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one ; de la 4-phényl-1,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one ; et de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole.

	Voie Intra peritoneale (mg/Kg)	Limites de confiance à 95%
4-phenyl-1,5-benzodiazepin-2-one	1617,08	1450,34<DL ₅₀ <1803
4-phenyl-1,3,4-tetrahydro-1,5 benzodiazepin-2-one	1219,20	1113,49<DL ₅₀ <1334,98
4-phenyl-1,5-benzodiazepin-2-thiole	596,50	464,80<DL ₅₀ <724,3

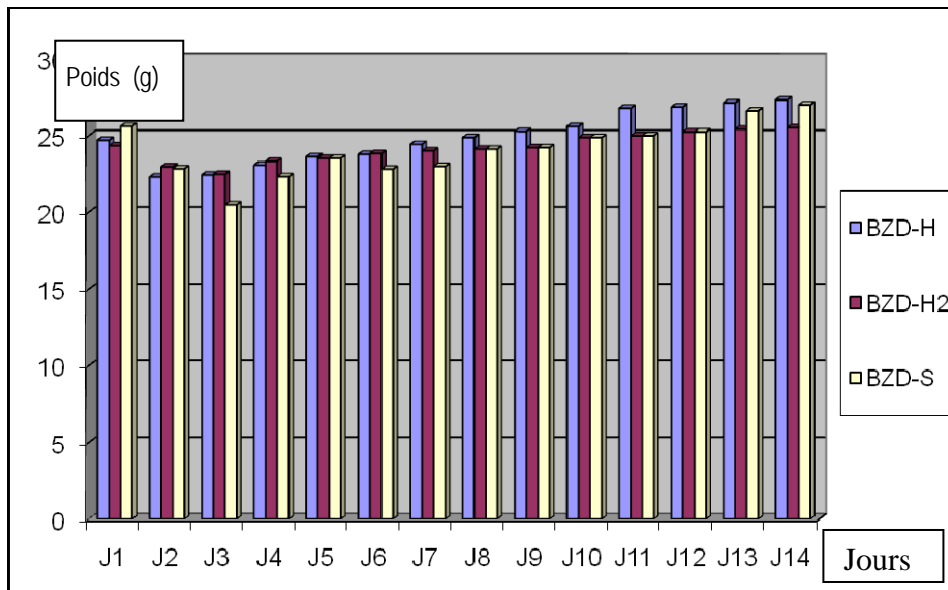


Figure 2: Evolution pondérale des animaux traités avec la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one ; de la 4-phényl-1,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one ; et de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole.

Test de la traction: Le temps de rétablissement, évalué à 30 minutes après administration des benzodiazépines est nettement supérieur au lot témoin. On note un nombre de chutes important pour le lot traité avec la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole, ce nombre diminue pour les lots traités avec la 4-phényl-1,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one et la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one.

Test de la cheminée: Les animaux traités présentent une perte d'initiative et de la curiosité, car le temps mis pour essayer de remonter le tube est très supérieur au lot témoin négatif, et aussi

par le fait que, la plupart n'ont pas essayé de remonter le tube durant les deux minutes d'observation.

Test de la planche à trous: les benzodiazépines réduisent le nombre cumulé de trous explorés (en rapport avec la curiosité) et le nombre d'espace parcouru entre deux trous (en rapport avec l'activité motrice). Pour notre étude, ce nombre diminue dans l'ordre: 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole < 4-phényl-1,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one < 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one.

Tableau 3 : Résultats de tests psychotropes de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one, de la 4-phényl-1,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one et de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole

					50 mg/Kg		100 mg/Kg			200 mg/Kg		
		Témoin	Référence (40 mg/Kg) n=4	BZD-2- one	BZD-H	BZD-S	BZD-2- one	BZD-H	BZD-S	BZD-2- one	BZD-H	BZD-S
Traction	Nombre de chutes	0	n=4	0	0	0	0	0	n=1	0	n=1	n=2
	Temps moyen de séjour	4,5	n=6 t=8,5	n=8 t=21,5 n=2 t>2	n=8 t=25,5 n=2 t>2	n=6 t=21,5 n=4 t>2	N=9 t=15,4 n=1 t>2	n=7 t=13 n=3 t>2	n=5 t=16,6 n=4 t>2	n=7 t=10,2 n=3 t>2	n=5 t=7,2 n=4 t>2	n=5 t=12,8 n=3 t>2
Cheminée	Réaction positive	n=10	n=3	n=2	0	0	0	0	0	0	0	0
	Temps moyen de remontée	3,8	n=23,7	n=8 t=16,37	n=10 t=28,4	n=10 t=32,8	N=6 t=20,4 n=4 t>2	n=7 t=31,6 n=3 t>2	n=7 t=38,6 n=3 t>2	n=4 t=26 n=6 t>2	n=5 t=36,4 n=5 t>2	n=5 t=43,4 n=5 t>2
Planche à trous	Trous explorés	35	12	17,6	13,4	11,4	12,6	9,6	8,6	10,6	9,2	7,2

n : nombre d'animaux, t : temps, **BZD-2-one** : 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one, **BZD-H**: 4-phényl-1,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one , **BZD-S** : 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole

Tableau 4 : Résultats de l'évaluation des interactions Médicamenteuses de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one, de la 4-phényl-1,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one et de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole

	Nesdonal 40 mg/Kg	Nesdonal 40 mg/Kg + Urbanyl 40 mg/Kg	Nesdonal 40 mg/Kg + 40 mg/Kg de produit		
	Témoin	Référence	BZD-2-one	BZD-H	BZD-S
T.E	5,2 ± 1,48 min	4,6 ± 1,14 min	7 ± 1,58 min	7,6 ± 0,89 min	6,7 ± 1,4 min
T.S	81 ± 9,27 min	162,2 ± 22,6 min	196 ± 7,87 min	172,6 ± 5,73 min	207 ± 9,77 min

T.E = Temps d'endormissement, T.S= Temps de sommeil, **BZD-2-one** : 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one, **BZD-H**: 4-phényl-1,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one , **BZD-S** : 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole

Effet hypnotique : Les trois produits testés n'ont pas présenté un effet hypnotique chez les rats.

Pouvoir cataleptique: Les trois produits testés n'ont pas présenté un effet cataleptique chez les rats.

Interaction médicamenteuse: Ces trois produits prolongent l'effet hypnotique du Nesdonal (synergie). Comparés entre eux, le pouvoir hypnotique croît de la manière suivante: 4-phényl-1,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one < 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one < 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

L'étude de la toxicité aiguë montre que la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one et la 4-phényl-1,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one sont moins toxiques que la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole. Cette forte toxicité de la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole peut s'expliquer par la présence de l'atome de soufre.

Lors d'étude de la toxicité aiguë, nous avons constaté durant les trois premiers jours après traitement que les animaux restés figés dans un coin de la cage, et nous avons aussi noté une diminution de poids corporel durant cette période et ce dernier redevient normal et parfois supérieur au poids initial de l'animal traité (soit $24,7 \pm 1,85$ g au J1 passant à $22,44 \pm 1,68$ g au J3, puis $23,07 \pm 2,39$ g au J4 et atteint $27,32 \pm 1,9$ g au J14 pour la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one; $24,34 \pm 1,12$ g au J1 passant à $22,48 \pm 2,7$ g au J3, puis $23,32 \pm 2,3$ g au J4 et atteint $25,51 \pm 2,09$ g au J14 pour la 4-phényl-1,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one ; $25,6 \pm 2,4$ g au J1 passant à $20,48 \pm 2,7$ g au J3, puis $22,32 \pm 2,3$ g au J4 et atteint $27,00 \pm 2,09$ g au J14 pour la 4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-thiole), ceci peut être dû à l'effet sédatif des produits, qui réduirait la consommation par les animaux de la nourriture et l'eau.

Au regard de nos résultats, nous pouvons déduire que la présence du cycle benzénique accolée à la diazépine diminue considérablement la toxicité, mais la présence dans la molécule d'atome de soufre (cas de 1,5-benzodiazépin-2-thiole), rend le produit plus toxique que les autres [5, 6, 7].

Au regard des résultats de tests psychotropes, nous constatons que ces produits possèdent une activité sédatif et myorelaxante, qui a été aussi observée par le fait que les animaux restés figés dans un coin de la cage, ceci confirment les observations faites par Zellou et al [6, 7] et

Chammache et al [5] sur des produits de la même famille. Les trois produits testés n'ont pas manifesté un pouvoir hypnotique, ni cataleptique chez les rats, ce qui confirment les résultats observés par certains auteurs.

L'examen de la toxicité aiguë des trois benzodiazépines expérimentées nous a permis de démontrer qu'elles ne sont pas toxiques aux doses thérapeutiques.

La recherche de l'activité psychotrope des produits testés (4-phényl-1,5-benzodiazépin-2-one, 4-phényl-1,3,4,5-tétrahydro-1,5-benzodiazépin-2-one, 3) démontre des effets sédatif, anxiolytique; myorelaxant et tranquillisant sur le système nerveux central (SNC) grâce à une batterie de tests comportementaux utilisés en psychopharmacologie, mais ces produits n'ont pas manifesté une activité hypnotique.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par l'Agence Marocaine de Coopération Internationale (AMCI), que nous remercions vivement.

REFERENCES

1. Fiaqui Cy et Coll. 1999. Synthesis and anticonvulsant activity; *J Heter Chem.* 36 (2): 377-380
2. Schorderet M et coll. 1992. *Pharmacologie Des Concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques.* Genève: Edition Slatkine, 337-347.
3. Kuo-Hsing I, Thoshiro I. 1978. Antitumor agents, *J. Med. Chem;* 21(7): 698-701.
4. Lullmann H, Klaus Mohr et Albrecht Ziegler. 2001. *Atlas de poche de Pharmacologie* (2nd édition). Flammarion. Paris, 376 p.
5. Chammache M. et Coll. 2001. Synthèse et étude pharmacologique dérivés de la 1,4-diazépine-5-one ; *Ann. Pharm Fr;* 59; 206-210.
6. Zellou A et Coll. 1998. Synthèse et étude pharmacologique des 1, 5-benzodiazépine-2-diones et leurs dérivés alkylés. *Ann. Pharm Fr;* 58(4) ; 169-174.
7. Zellou A et Coll. 1998. Synthèse et étude pharmacologique des 1, 5-benzodiazépine-2-dithiones et leurs dérivés alkylés. *Ann. Pharm Fr;* 58(4) ; 175-180.
8. Abdollahi-Alibeik M, Mohammadpoor-Baltork I, Yousefi B. H. 2006. Novel Synthesis of 1,5-Benzodiazepines Catalyzed by Silica-

- Supported Dodecatungstophosphoric Acid, 10^{ème} International ECSOC
9. Graham L. Patrick, Depovere P. 2002. *Chimie pharmaceutique*. De Boeck Université.
 10. Kirkiacharian.S. 1996. *Guide de chimie thérapeutique*, Ellipses, Paris, 576 p.
 11. Mi Kim J, Ka Young L and Jae Nyoung K. 2002. Synthesis of 3-(Arylmethylene)-1,5-benzodiazepin-2-ones from Baylis-Hillman Acetates, *Bull. Korean Chem. Soc.*, Vol. 23, No. 8. 1055
 12. Rajesh Kumar and Y. C. Joshi. 2007. Synthesis, spectral studies and biological activity of 3H-1, 5-benzodiazepine derivatives, *ARKIVOC* (xiii) 142-149
 13. Ahabchane N.H et Essassi E.M, 1999. : Les 1,5-Benzodiazépine-2-Ones précurseurs de divers systèmes hétérocycliques à caractère pharmacologique potentiel, *J Soc. Chim. de Tunisie*, 1 : 753.
 14. Essassi E M, Fifani J. 1987. *J Bull Soc Chim Belg*; 96 :63-69.
 15. Essassi E M. 1994. *Bull Soc Chem Belg*; 103 (11) : 679-686.
 16. Laroche M-J, Rousselet F. 1990. *Les animaux du laboratoire : Ethique et bonnes pratiques*. Masson, Paris.
 17. Anonyme. (1996). Guide pour les soins et l'utilisation des animaux de Laboratoire, Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy Press, Washington, D.C. 110 p.
 18. Ernest D. Olfert, DVM; Brenda M. Cross, DVM; et A. Ann McWilliam. 1993. Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation, Conseil canadien de protection des animaux, Volume 1.
 19. Laroche M-J, Fabiani P, Rousselet F. 1986. *Expertise toxicologique des médicaments*. Masson, Paris, 367 p.
 20. Boniface M, Boniface B, Cazin J.C, Cazin N et Luyckx M. 1972. Calcul sur ordinateur de la dose efficace par la méthode du probit. Application au calcul d'une dose lethale 50, *Bull. Soc. Pharm, Lille*, 4, 187.
 21. Dupont C. 1970. Détermination de la DL50 chez la souris, fiche technique n°6, *J.Pharmacol. f. 1. 3* : 407-414.
 22. Cherrah Y, Alaoui K, Faouzi My A. 2007. Travaux pratique de pharmacologie, 2ème année de Pharmacie, Faculté de médecine et de Pharmacie, Rabat, 45 p.