

Courte communication

Comparaison entre les sites de fixation de la [³H]phencyclidine (PCP) et de la [³H](thiényl-2)-1 cyclohexylpipéridine (TCP) dans le système nerveux central de rat

Isabelle CHAUDIEU, Jacques VIGNON, Michèle CHICHEPORTICHE, Ahmed EL HARFI, Jean-Marc KAMENKA* et Robert CHICHEPORTICHE

CNRS LP8402 (U.M.I.)—INSERM U249,
Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, 8, rue Ecole Normale, 34075 Montpellier Cedex, France

(Reçue le 18 novembre 1986, acceptée le 5 mars 1987)

Résumé — Une série de trente-deux molécules a été comparativement testée en compétition sur les sites de fixation de la [³H]PCP (phencyclidine tritiée) et de la [³H]TCP ((thiényl-2)-1 cyclohexylpipéridine tritiée). Une relation linéaire de bonne signification statistique a pu être établie entre les log IC_{50} correspondant à chaque site ce qui tend à démontrer l'identité des sites marqués par les deux radioligands. Cependant, cinq molécules ne répondent pas à la corrélation sans que cette déviation puisse s'expliquer en termes de structure ou de conformation.

Summary — Comparison of the binding sites of [³H]phencyclidine and [³H]1-(2-thienyl)cyclohexylpiperidine ([³H]TCP) in the rat central nervous system. Thirty two molecules in a series have been comparatively tested for their abilities to compete with [³H]PCP (tritiated phencyclidine) and [³H]TCP (tritiated 1-(2-thienyl)cyclohexylpiperidine) for binding to their respective sites. A good statistical linear relationship has been found between the log IC_{50} of each binding site. This seems to demonstrate the identity of the sites labeled by the two radioligands. However, five molecules did not correlate without explanation in structural or conformational terms.

phencyclidine receptor / [³H]phencyclidine / [³H]-1-(2-thienyl)cyclohexylpiperidine

Introduction

L'utilisation de la [³H]TCP ((thiényl-2)-1 cyclohexylpipéridine tritiée) pour marquer les sites correspondant au récepteur de la phencyclidine dans le SNC de rat s'est avérée intéressante aussi bien dans les expériences de compétition que dans celles d'autoradiographie. Ce ligand présente entre autres avantages, par rapport à la [³H]PCP (phencyclidine tritiée), ceux de posséder une meilleure affinité et de donner moins de liaison non spécifique [1, 2]. Son utilisation tend, semble-t-il, à se généraliser [3].

La question peut cependant se poser de savoir si les deux ligands radioactifs marquent strictement les mêmes sites à savoir le récepteur de la phencyclidine mis en évidence au moyen de [³H]PCP [4]. Pour essayer de répondre à cette question nous avons effectué des expériences comparatives de compétition sur les sites marqués par les deux ligands, dans les mêmes conditions, à l'aide d'une série de trente-deux molécules. Parmi celles-ci, vingt-quatre sont des dérivés ou des analogues (kétamine) de la phencyclidine, les autres

sont des molécules connues pour leur affinité pour les sites de la [³H]PCP (cyclazocine, dexodrol, SKF 10047) ou couramment utilisées pour différencier les sites opiacés κ , σ et les sites de la [³H]PCP (éthylcétocyclazocine, MR 2034, halopéridol [5—7] (Tableaux I et II).

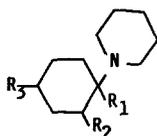
Résultats

Les résultats des études de compétition (IC_{50}) sont présentés dans le Tableau III. Ils montrent que certains composés possèdent pour l'un ou l'autre site une affinité élevée, comparable à celle de 1 (TCP), ce sont en particulier les dérivés 7, 10, 18, 20 et 31 (dexodrol). On ne note pas de modification dans l'ordre des affinités en fonction de l'énantiomère et du composé radioactif utilisé.

De façon à mieux mettre en évidence les similitudes ou différences pouvant exister entre les deux types de marquage, une relation a été recherchée entre les IC_{50} obtenues

* Auteur à qui la correspondance doit être adressée.

Tableau I. Structures phencyclidiniques utilisées.



	R ₁	R ₂	R ₃
1 TCP	thiényl-2	H	H
2 PCP	phényle	H	H
3	phényle	H	<i>t</i> -butyle(<i>cis</i>)
4 ^a	phényle	H	<i>t</i> -butyle(<i>trans</i>)
5	phényle	H	CH ₃ (<i>cis</i>)
6	phényle	H	CH ₃ (<i>trans</i>)
7 ^a	thiényl-2	CH ₃ (<i>cis</i>)	H
8	thiényl-2	CH ₃ (<i>trans</i>)	H
10	<i>m</i> -OH—phén.	H	H
11	<i>o</i> -CH ₃ —phén.	H	H
12	<i>m</i> -CH ₃ —phén.	H	H
13	<i>p</i> -CH ₃ —phén.	H	H
14	thiényl-2	H	<i>t</i> -butyle(<i>cis</i>)
15	thiényl-2	H	<i>t</i> -butyle(<i>trans</i>)
16	phényle	C=O	H
17 ^a	thiényl-2	H	CH ₃ (<i>cis</i>)
18 ^a	thiényl-2	H	CH ₃ (<i>trans</i>)
19	thiényl-2	H	OH(<i>trans</i>)
21	phényle	OH(<i>trans</i>)	CH ₃ (<i>cis</i>)
22	phényle	C=O	CH ₃ (<i>cis</i>)
9 ^b			
20 ^b			

^aMolécules ne répondant pas à la corrélation (Fig. 1).

^bCorrespondent respectivement à 2 et 1, avec une insaturation 3—4 sur la pipéridine.

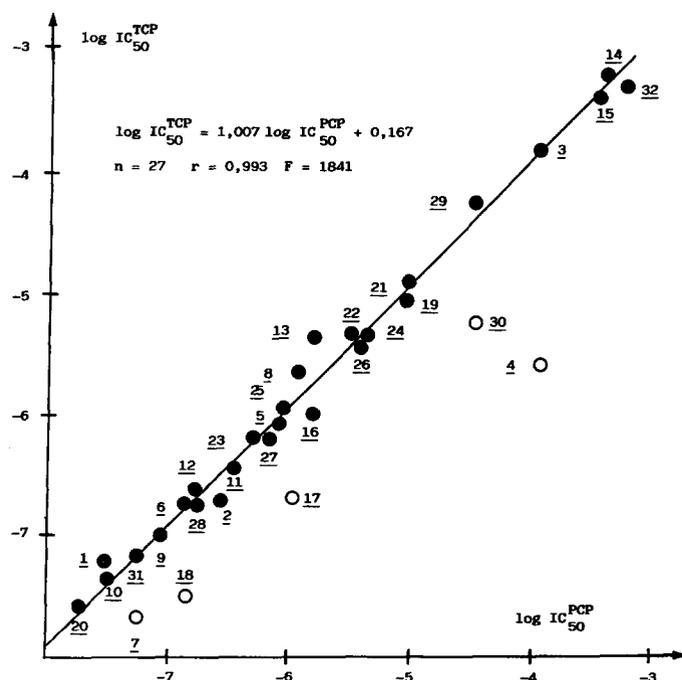


Fig. 1.

Tableau II. Autres structures utilisées.

23	(+)-kétamine	24	(-)-kétamine
25	(+)-SKF 10047	26	(-)-SKF 10047
27	(+)-cyclazocine	28	(-)-cyclazocine
29	éthylkétocyclazocine	30	MR 2034 ^a
31	dexoadrol	32	halopéridol

^aMolécule ne répondant pas à la corrélation (Fig. 1).

Tableau III. IC₅₀ (μM) et affinités relatives (R) des différents composés testés.

	[³ H]PCP		[³ H]TCP	
	IC ₅₀	R	IC ₅₀	R
1 TCP	0,026	9,615	0,063	1
2 PCP	0,250	1	0,200	0,315
3	100	0,002	170	< 10 ⁻³
4	104	0,002	2,900	0,022
5	0,800	0,312	1,200	0,052
6	0,130	1,923	0,190	0,332
7	0,040	6,250	0,019	3,316
8	1,000	0,250	2,500	0,025
9	0,080	3,125	0,100	0,630
10	0,030	8,333	0,045	1,400
11	0,310	0,806	0,370	0,170
12	0,310	0,806	0,370	0,170
13	1,300	0,192	5,000	0,013
14	370	< 10 ⁻³	680	< 10 ⁻³
15	316	< 10 ⁻³	500	< 10 ⁻³
16	1,500	0,166	1,000	0,063
17	1,000	0,250	0,210	0,300
18	0,136	1,838	0,034	1,853
19	8	0,031	10	0,006
20	0,017	14,705	0,026	2,423
21	8,5	0,029	12,6	0,005
22	3,00	0,083	5,01	0,013
23	0,710	0,352	0,900	0,070
24	3,41	0,073	4,60	0,014
25	1,00	0,250	1,40	0,045
26	3,69	0,068	4,00	0,016
27	0,580	0,431	0,680	0,093
28	0,150	1,666	0,200	0,031
29	30,0	8,333	68,1	< 10 ⁻³
30	50,0	0,005	6,8	0,009
31	0,050	5,000	0,068	0,926
32	520	< 10 ⁻³	610	< 10 ⁻³

Tampon 50 mM Hepes-Tris, pH 7,7.

dans les deux cas. On trouve, pour vingt-sept composés sur les trente-deux testés, une relation linéaire de bonne signification statistique (Fig. 1) de la forme:

$$\log IC_{50}^{TCP} = 1,007 \times \log IC_{50}^{PCP} + 0,167$$

$$n = 27; r = 0,993; F = 1841.$$

Discussion

Le fait de trouver une relation linéaire, de pente égale à l'unité et d'ordonnée à l'origine proche de zéro, laisse penser que pour les molécules concernées il n'existe pas de différence importante au niveau de l'interaction ligand—

récepteurs ce qui va dans le sens d'une identité entre les sites marqués par les deux molécules radioactives.

Cependant, quatre composés **4**, **17**, **18** et **30** (MR 2034) sont significativement plus efficaces dans le déplacement de la [³H]TCP que dans celui de la [³H]PCP tandis qu'un cinquième, **7**, a un comportement du même type de façon moins significative. Ces cinq molécules n'entrent donc pas dans la corrélation. Ceci appelle quelques remarques: 1) **4** a une structure très proche de **15** qui répond à la corrélation; le premier porte un noyau benzène le second un noyau thiophène. 2) **17** et **18** ont des structures très proches de celles de **5** et **6** qui répondent à la corrélation; les premiers portent un noyau thiophène, les seconds un noyau benzène. La différence d'affinité ne peut donc pas être attribuée spécifiquement au groupe aromatique. 3) **4** possède une structure quasi-rigide à noyau aromatique axial, **3** possède une structure du même type à noyau aromatique équatorial: seul le second répond à la corrélation. Par contre **14** et **15** conformationnellement identiques à **3** et **4** [15] ne présentent pas de différences significatives dans leurs affinités. Pour leur part, **17** et **18** ont une flexibilité conformationnelle (surtout **17**) globalement comparable à **5** et **6** [10]. Il ne semble donc pas possible non plus d'attribuer ces différences à des effets conformationnels bien que ceux-ci jouent un rôle important dans l'activité biologique dans la série de la phencyclidine [8, 9]. 4) **30** (MR 2034) est la (—)-*N*-(furyl-2)méthylène-normétazocine, une structure proche de **25** (ou **26**) (SKF 10047 ou *N*-allyl-normétazocine) et d'une façon plus générale des autres benzomorphans testés qui eux répondent à la corrélation.

Il semble donc que les différences observées entre les affinités pour les sites de [³H]PCP et [³H]TCP soient dues à la combinaison d'un ensemble complexe de propriétés physicochimiques plutôt qu'à un caractère structural ou conformationnel simple.

Les résultats obtenus dans ce travail suggèrent fortement que, dans nos conditions expérimentales, les sites marqués par les deux molécules tritiées sont identiques bien que cela ne semble pas vérifié pour quelques composés. Nous nous attachons à rechercher ce qui pourrait refléter au niveau comportemental les différences observées au niveau moléculaire pour les composés ne répondant pas à la corrélation.

Protocoles expérimentaux

Chimie

Une partie des dérivés ou des analogues de la phencyclidine utilisés a déjà été décrite: **1**, **2** [11, 12]; **3**, **4** et **5** [13]; **7** et **8** [8]; **9** et **20** [1]; **10** [14]; **14** et **15** [15]; **16**, **21** et **22** [16]. Nous ne décrivons ici que les composés nouveaux. Les échantillons des molécules **23**—**31** ont été fournis par le Docteur R. L. Balster, Medical College of Virginia, Richmond, que nous remercions; nous remercions également le Docteur Y. Agid, Hôpital Pitié—Salpêtrière, Paris, pour le don d'un échantillon du composé **32**.

Composés: **11**, **12** et **13**

Ces composés ont été obtenus par une réaction de Bruylants [11, 12] menée de façon habituelle à partir des bromotoluènes convenables. Les bruts obtenus ont été chromatographiés sur colonne (Aluminoxide,

Merck) et élués à l'éther de pétrole pur. **11**: F_{base} = incristallisable; F_{HCl} = 188—189; Rdt: 31%. **12**: F_{base} = 64—65; F_{HCl} = 164—165; Rdt: 40%. **13**: F_{base} = 64—65; F_{HCl} = 223—224; Rdt: 44%. Structures contrôlées par ¹³C RMN. Analyse: C₁₈H₂₈NCl (C, H, N).

Composés: **17** et **18**

Ces deux molécules ont été obtenues par une technique mise au point au laboratoire pour les analogues phénylés **6** et **7** [13, 17]. C'est ainsi qu'à partir des deux (thiényl-2)-1 méthyl-4 cyclohexanols isomères en mélange, on prépare les azides correspondants qui sont réduits en amines primaires qui, après cyclisation avec le dibromo-1,5 pentane, donnent le mélange brut de **17** et **18**. Ce mélange est chromatographié sur colonne (Aluminoxide, Merck). **17** est élué à l'éther de pétrole pur, **18** à l'éther de pétrole contenant 50% d'éther. Le rendement global est de 50%. **17**: F_{base} = incristallisable; F_{HCl} = 206—208. **18**: F_{base} = 68—69; F_{HCl} = 162—163. Structures contrôlées par ¹³C RMN. Analyse: C₁₆H₂₆NCl (C, H, N).

Composé: **19**

Il s'agit d'un sous-produit isolé lors d'une synthèse précédemment décrite [15]: la réaction du bromure de phénéthylmagnésium sur la (thiényl-2)-1 céto-4 cyclohexylpipéridine. La chromatographie sur colonne (Kieselgel 60, Merck) des produits secondaires de la réaction permet d'éluer **19** avec un mélange de 5% de méthanol dans l'éther. **19**: F_{base} = 141—142; F_{HCl} = 142—145. La structure contrôlée par ¹³C RMN est compatible avec celle d'analogues phénylés précédemment préparés [14]. Analyse: C₁₅H₂₄NOSCl (C, H, N).

Biochimie

Les affinités des divers composés testés ont été mesurées par des expériences de compétition sur des homogénats de cerveaux de rats. Les ligands radioactifs [³H]PCP (45 Ci/mmol) et [³H]TCP (62 Ci/mmol) ont été fournis par le Service des Molécules Marquées (CEA, Saclay, France). Le protocole expérimental a déjà été décrit [18] en détail. Une concentration fixe de ligand tritié (1 nM) est incubée en présence de concentrations croissantes de ligand non marqué et de l'homogénat (1 mg de protéine/ml) en milieu tampon 50 mM Hepes-Tris, pH = 7,7, à 25°C. A l'équilibre, la concentration de dérivé non marqué empêchant la fixation de 50% du ligand tritié (IC₅₀) reflète l'affinité de ce dernier pour le récepteur considéré.

Remerciements

Ce travail a été soutenu par la DRET (contrats 84/211 et 84/217) et par le PIRMED (ASP Neurodrogues No. 196).

Nous remercions Madame M. Michaud pour son assistance technique.

Références

- Vignon J., Chicportiche R., Chicportiche M., Kamenka J.-M., Geneste P. & Lazdunski M. (1983) *Brain Res.* 280, 194—197
- Vignon J., Privat A., Chaudieu I., Thierry A., Kamenka J.-M. & Chicportiche R. (1986) *Brain Res.* 378, 133—141
- Maragos W. F., Chu D. C. M., Greenamyre J. T., Penney J. B. & Young A. B. (1986) *Eur. J. Pharmacol.* 123, 173—174
- Vincent J.-P., Kartalovski B., Geneste P., Kamenka J.-M. & Lazdunski M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4678—4682
- Tam S. W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6703—6707
- Largent B. L., Gundlach A. L. & Snyder S. H. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4983—4987
- Goldman M. E., Jacobson A. E., Rice K. & Paul S. M. (1985) *FEBS Lett.* 190, 333—336
- Geneste P., Kamenka J.-M., Ung S. N., Herrmann P., Goudal R. & Trouiller G. (1979) *Eur. J. Med. Chem.* 14, 301—308
- Kamenka J.-M. & Geneste P. (1983) in: *Phencyclidine and Related Arylcyclohexylamines: Present and Future Applications* (Kamenka J.-M., Domino E. F. & Geneste P., eds.), NPP Books, Ann Arbor, pp. 1—12

- 10 El Harfi A. (1982) Doctorat de 3^e cycle, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier II, July 12
- 11 Parke, Davis & Co., British patent 836083, July 1, 1960
- 12 Mousseron M., Crouzet J.-C., Kamenka J.-M. & Stenger A. (1966) *Chim. Ther.* 1, 284—288
- 13 Geneste P., Herrmann P., Kamenka J.-M. & Pons A. (1975) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1619—1626
- 14 Kamenka J.-M., Chiche B., Goudal R., Geneste P., Vignon J., Vincent J.-P. & Lazdunski M. (1982) *J. Med. Chem.* 25, 431—435
- 15 Kamenka J.-M., Finiels A., El Harfi A., Vignon J., Lazdunski M. & Geneste P. (1984) *Eur. J. Med. Chem.* 19, 255—260
- 16 Kamenka J.-M., Michaud M., Geneste P., Vignon J. & Chicheportiche M. (1985) *Eur. J. Med. Chem.* 20, 419—424
- 17 Geneste P., Herrmann P., Kamenka J.-M. & Moreau J. (1976) *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas Belg.* 116—120
- 18 Vignon J., Vincent J.-P., Bidard J.-N., Kamenka J.-M., Geneste P., Monier S. & Lazdunski M. (1982) *Eur. J. Pharmacol.* 81, 531—542