

## Dérivés arylés et éthoxycarbonylés de 3,4-dihydro 2H pyrrole, 2H pyrrole et pyrrole immunoactifs sur le lymphocyte T humain

M Birouk<sup>1</sup>, S Harraga<sup>1</sup>, J Panouse-Perrin<sup>1</sup>, JF Robert<sup>1\*</sup>, M Damelin-court<sup>1</sup>,  
F Theobald<sup>2</sup>, R Mercier<sup>3</sup>, JJ Panouse<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Équipe de Chimie thérapeutique, UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques, Place St Jacques, 25030 Besançon Cedex;

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie du Solide Cristallin, Université de Paris XII, Paris;

<sup>3</sup>Laboratoire d'Électrochimie, UFR Sciences et Techniques, La Bouloie, 25030 Besançon Cedex, France

(Reçu le 27 novembre 1989; accepté le 6 juillet 1990)

**Résumé** — Plusieurs pyrroles, 2H pyrroles et 3,4-dihydropyrroles substitués en diverses positions par des groupements phényle et éthoxycarbonyle sont préparés afin d'étudier leur immunoactivité vis-à-vis du lymphocyte T humain *in vitro*. L'action la plus nette est observée lorsque sur le cycle pyrrole existent simultanément: une seule chaîne carboxylique en 2, un cycle aromatique en 5 et un substituant en 3, notamment un phényle ou un ester carboxylique. Une approche conformationnelle, réalisée en quantifiant l'anisotropie magnétique des phényles à l'aide des incréments de Johnson et Bovey, montre l'importance de la quasi orthogonalité du substituant en 3 vis-à-vis du cycle pyrrolique. Ainsi le 3,5-diphénylpyrrole-2-carboxylate d'éthyle **8** s'avère le plus intéressant: il est en particulier plus actif que le chlorhydrate de lévamisole lors des essais utilisant la transformation lymphoblastique en présence de PHA (phytohémagglutinine) et ceux mettant en jeu les récepteurs CD2 du lymphocyte T.

**Summary** — Aryl and ethoxycarbonyl derivatives of pyrroles, 2H pyrroles and 3,4-dihydropyrroles and their immunoactivity of human T lymphocytes. Several pyrroles, 2H pyrroles, 3,3-dihydropyrroles substituted in various positions with phenyl and ethoxycarbonyl groups, were prepared in order to study *in vitro* their immunoactivity on human T lymphocytes. The best action was observed when on the pyrrole cycle, a carboxylic chain in position 2, an aromatic cycle in 5, and a substituent in 3, particularly a phenyl or a carboxylic ester were simultaneously found to exist. A conformational approach, performed by magnetic anisotropy quantification of phenyls, using Johnson and Bovey increments, showed that the orthogonality of the substituent in 3 is important as regards the pyrrolic cycle. Thus, the ethyl 3,5-diphenylpyrrole-2-carboxylate ester **8** appears to be the most interesting as it is more efficient than the levamisole chlorhydrate in the tests connected with the lymphoblastic transformation in presence of PHA (phytohemagglutinin) and related to the mobilisation of CD2 receptors.

pyrrole / 2H pyrrole / 3,4-dihydropyrrole / human T lymphocyte / CD2 receptors / lymphoblastic transformation / PHA

La découverte des propriétés immunomodulatrices du lévamisole [1] a incité plusieurs d'entre nous à étudier son activité directement sur le lymphocyte T (LT) humain *in vitro* [2, 3]. Il a été démontré dans notre laboratoire que le tétramisole et le lévamisole augmentent, d'une part, le taux de transformation lymphoblastique induite par la phytohémagglutinine (PHA) [5] et, d'autre part, module la réponse des récepteurs CD2 (évaluée par les rosettes de mouton du lymphocyte T trypsiné [2, 3] ou par cytométrie de flux [4]). Ces méthodes d'évaluation de l'activité du tétramisole et du lévamisole devraient être en fait corrélées puisqu'il est vraisemblable, quoique encore discuté

[6], que la stimulation du LT passe par l'activation du récepteur membranaire CD2, voie alterne d'activation, indépendante de l'antigène [7, 8], qui procède d'un même mécanisme biochimique [9, 10].

Disposant de ces différentes méthodes d'évaluation, nous nous sommes proposés de les utiliser afin de mettre en évidence une action immunomodulatrice dans diverses séries chimiques. Ainsi, des composés de nature thiadiazabicycliques ont révélé un pouvoir immunostimulant vis-à-vis des LT humains activés par la PHA [5] ou trypsinés [3].

Le présent travail relate les résultats acquis sur plusieurs composés de structure pyrrolique et tente de dégager quelques éléments structuraux responsables de ce type d'activité qui mesure l'influence des substances sur le taux de multiplication du LT; celui-

\*Correspondance et tirés à part

ci s'évalue par induction mitogénique à l'aide d'une lectine comme la PHA (phytohémagglutinine).

On fait appel aussi au rôle joué par ces mêmes substances sur la molécule membranaire d'adhésion CD2 du LT puisque l'immunomodulation du LT est corroborée par de très nombreux travaux récents à propos de CD2 [10–14].

## Chimie

Huit structures différentes ont été étudiées (schéma 1). Elles se différencient non seulement par la nature de l'hétérocycle (pyrroline, 2*H* pyrrole et pyrrole), mais aussi par le nombre et l'emplacement des substituants (phényle, éthoxycarbone). La synthèse des composés **1** à **8** est représentée dans le schéma 2.

Le chlorhydrate d'aminomalonate de diéthyle est condensé, sans solvant, avec la benzylidèneacétophène pour obtenir **1** selon le protocole décrit par plusieurs d'entre nous [15, 16]. En effectuant une déshydrogénation au moyen du chloranile dans un

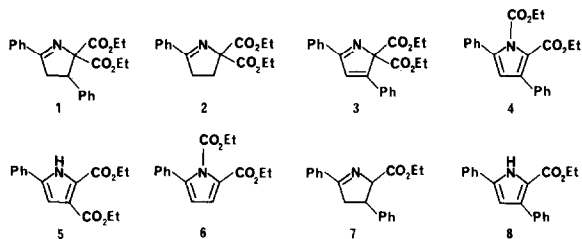


Schéma 1.

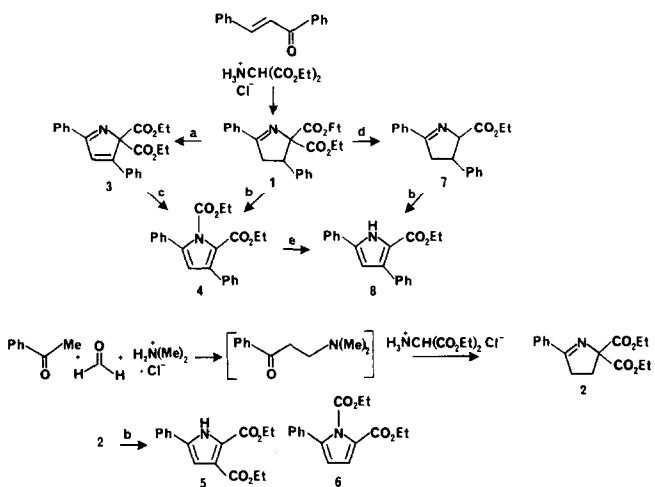


Schéma 2. a: chloranile dans le benzène à reflux, b: chloranile dans le xylène à reflux, c: xylène à reflux, d: HCl à reflux puis H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dans l'éthanol à reflux, e: DMSO à reflux.

solvant dont le point d'ébullition est supérieur à 100°C (dioxane, toluène ou xylène) on parvient au pyrrole **4** qui a été l'objet d'un réarrangement thermique et dont la structure a été confirmée par diffraction aux rayons X [17]. Par contre, la déshydrogénation de **1** dans des conditions plus douces, toujours en utilisant le chloranile, conduit au 2*H* pyrrole **3**. Il faut alors utiliser un solvant tel que le chloroforme, le tétrachlorure de carbone ou le benzène.

Le 2*H* pyrrole **3** peut être aisément transformé en pyrrole vrai ou 1*H* pyrrole **4** par simple chauffage dans le xylène à reflux. Dans ces conditions, le réarrangement thermique se produit confirmant les observations de Katritzky *et al* [18]. En effet, ces derniers ont montré que des 2*H* pyrroles de type **3** pouvaient s'isomériser selon un réarrangement sigmatropique 1-5 par simple chauffage dans un solvant tel que le xylène à reflux. Toutefois, il ne paraît pas exclu que ce type de réarrangement puisse procéder d'un mécanisme radicalaire comme tendent à le démontrer d'autres travaux dans ce domaine [19–21].

Le 5-phényl-3,4-dihydro 2*H* pyrrole-2,2-dicarboxylate de diéthyle **2** est obtenu selon Léonard [22]. En effet, les essais que nous avons réalisés en condensant le chlorhydrate d'aminomalonate de diéthyle sur la vinylphénylcétone obtenue *in situ* à partir de la base de Mannich correspondante (*cf* schéma 2), selon un procédé utilisé par certains d'entre nous dans d'autres séries [23], se sont révélés moins performants car les rendements observés sont faibles.

En procédant à la déshydrogénation de **2** au moyen du chloranile dans le xylène à reflux on obtient un mélange dans lequel **5** est prépondérant par rapport à **6**. La séparation de ces 2 isomères est réalisée par chromatographie sur couche mince préparative à l'aide du Chromatotron (Harrison Research).

Les composés ne possédant qu'une fonction ester ont été obtenus par décarboéthoxylation, soit de **1** par action d'acide chlorhydrique dans l'éthanol pour parvenir à **7**, soit de **4**, selon un procédé décrit par Katritzky *et al* [18], pour obtenir **8**. Nous avons vérifié que l'action du chloranile dans le xylène bouillant permettait le passage de **7** à **8**, ce qui confirme la validité de cette méthode de déshydrogénation pour transformer des composés pyrroliniques en 1*H* pyrroles, quand aucune transposition n'est possible. Dans le cas de **7**, il peut exister 2 diastéréoisomères selon la position respective du phényle en 3 et de l'éthoxycarbone en 2. Une étude RMN du proton sur le brut réactionnel montre l'existence d'un mélange dans lequel un isomère est nettement majoritaire (≈ 80%).

On parvient à l'isoler par distillation sous pression réduite après épimérisation en chauffant dans le toluène à reflux. En se référant à la conformation enveloppe que prend le cycle 2*H* pyrrole dans le cas de **1** [24] que l'on peut envisager également pour **7**,

les valeurs élevées de  $^3J H_2H_3$  (7,9 Hz) et de  $^3J H_3H_4$  (9 Hz) correspondent à une position *trans* axiale pseudoaxiale de  $H_2$  et de  $H_4$  par rapport à  $H_3$ . On en conclut que le diastéréoisomère obtenu est l'isomère *trans*, le plus stable puisque le phényle en 3 peut occuper une position équatoriale, l'éthoxycarbone étant pseudoéquatorial.

## Immunologie

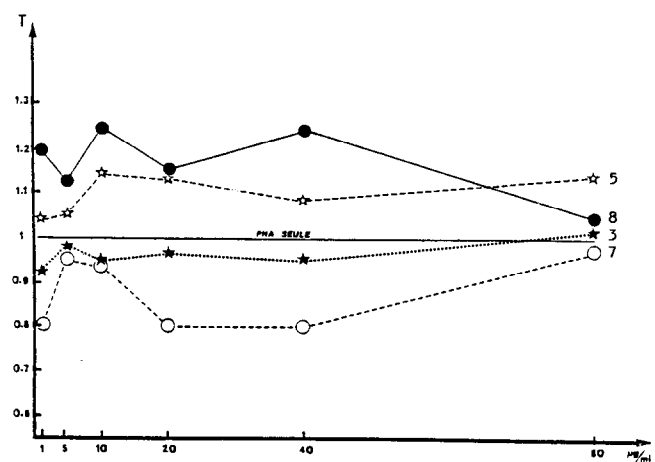
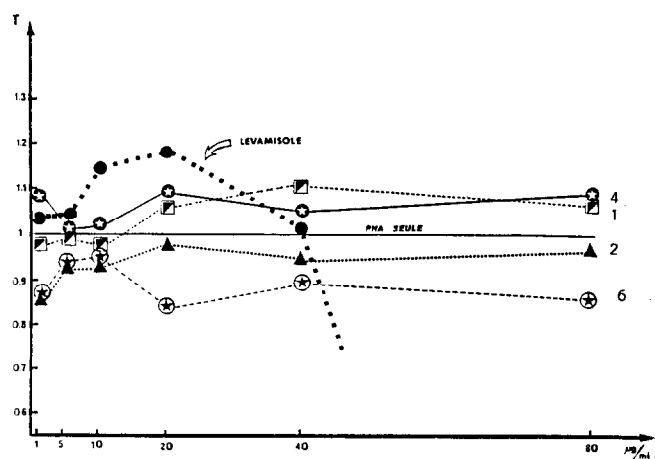
Chaque composé a été soumis à une évaluation de son action vis-à-vis de la multiplication des LT en présence de phytohémagglutinine (PHA). Pour ce faire, nous avons utilisé des lymphocytes T humains provenant de nombreux donneurs sains, selon le protocole décrit dans la partie expérimentale, en sélectionnant 11 bons répondeurs au test de transformation lymphoblastique, les autres ayant dû être éliminés car ils ne permettent pas de visualiser l'activité éventuelle des produits essayés quels que soient ceux-ci.

tionnant 11 bons répondeurs au test de transformation lymphoblastique, les autres ayant dû être éliminés car ils ne permettent pas de visualiser l'activité éventuelle des produits essayés quels que soient ceux-ci.

## Résultats

### Activation des LT

L'évaluation de l'activité des composés étudiés à différentes concentrations (mesurée par la valeur T, voir *Protocoles expérimentaux*) est illustrée par le tableau I. Celui-ci est établi à partir de 11 donneurs sur lesquels ont été essayés les 8 produits en prenant comme référence le chlorhydrate de lévamisole. Nous avons illustré les résultats observés pour un seul donneur par les courbes 1a et 1b. Celles-ci montrent la même relativité d'action que le tableau I, et ont l'avantage de permettre une visualisation plus concrète des effets observés. Certes, on aurait pu établir une courbe de type 1 à partir des moyennes déterminées d'après le tableau I, mais vu les fortes variations d'activité individuelle en fonction des donneurs, la courbe obtenue ne permettrait pas des comparaisons aussi fiables que ne le font les courbes 1a et 1b. Toutefois, nous devons signaler que l'ordre d'activité relatif est le même, que l'on utilise les moyennes ou 2 donneurs sélectionnés (D1 et D7).



**Fig 1.** Immunoréactivité des composés 1 à 8 sur des lymphocytes T humains activés par la PHA. Le rapport T (en ordonnées) correspond au nombre de cpm obtenu à partir des lymphocytes en présence du produit et de la PHA au nombre de cpm obtenu à partir de lymphocytes en présence de la PHA seule.

**Tableau I**

Composé	Donneur	Valeur de T en fonction des concentrations exprimées en µg/ml					
		1	5	10	20	40	80
1	D7	0,977	0,992	0,977	1,060	1,070	1,065
	D9	1,060	1,065	1,050	1,050	1,060	1,075
2	D7	0,850	0,923	0,924	0,980	0,941	0,967
	D9	1,050	1,045	1,030	1,000	0,950	0,970
3	D1	0,925	0,980	0,955	0,970	0,956	1,115
	D6	1,080	1,095	1,000	1,020	1,120	1,050
4	D4	0,850	0,950	0,900	0,855	1,000	1,050
	D7	1,084	1,016	1,022	1,095	1,050	1,100
	D8	1,095	1,080	1,060	1,065	1,050	1,055
	D10	1,045	1,030	1,035	1,090	1,060	1,020
5	D1	1,040	1,050	1,140	1,135	1,085	1,185
	D2	1,360	1,245	1,327	1,220	1,170	1,195
	D5	1,150	1,132	1,090	1,080	1,020	1,025
6	D7	0,875	0,940	0,950	0,844	0,960	0,855
	D8	1,055	1,040	1,020	1,00	1,05	0,95
	D10	1,000	1,050	1,045	1,035	1,020	1,015
7	D1	0,800	0,955	0,937	0,800	0,800	0,970
	D6	1,060	1,080	1,050	1,020	1,065	1,000
8	D1	1,200	1,125	1,240	1,155	1,240	1,050
	D2	1,740	1,560	1,520	1,600	1,457	1,375
	D3	1,140	1,130	1,090	1,155	1,170	1,080
	D4	0,970	1,000	1,015	1,130	1,090	1,110
Lévamisole	D7	1,035	1,045	1,145	1,180	1,015	0,500
	HC1	1,120	1,110	1,150	1,165	1,020	0,600

Par ailleurs, l'ensemble des composés ne montre pas de toxicité vis-à-vis du LT aux concentrations étudiées (1 à 80 µg/ml) contrairement au chlorhydrate de lévamisole dont l'activité diminue à des concentrations supérieures à 20 µg/ml et qui devient toxique au-delà de 40 µg/ml.

#### Action sur les récepteurs CD2

Il nous a paru intéressant de soumettre à cet essai le composé **8**, l'un des plus actifs de la série dans le test de la transformation lymphoblastique, afin de vérifier qu'il possède bien une action plus intéressante que celle du chlorhydrate de lévamisole, d'autant plus que ce test a montré son pouvoir discriminant dans d'autres séries [3]. Le tableau II vérifie notre hypothèse puisque **8** est capable de régénérer les sites de fixation des rosettes E des LT humains tryptinés à des concentrations minimales actives inférieures à celle des produits de référence utilisés (chlorhydrates de lévamisole et de tétramisole).

**Tableau II.** Concentration minimale active dans la régénération des sites de fixation des rosettes E des LT humains.

Composé	Concentration minimale active : m.mol/ml
Tétramisole HCl	$4,16 \times 10^{-6}$
Lévamisole HCl	$4,16 \times 10^{-7}$
Composé <b>8</b>	$10^{-8}$

#### Discussion

Si l'on essaie d'élaborer une approche des relations entre la structure et l'activité, on peut noter les points suivants:

— La présence d'un substituant en 3 paraît favorable au développement d'une activité immune sur le lymphocyte T. Celle-ci est nettement inférieure dans le cas des composés **2** et **6** sans substituant sur ce sommet.

— Lorsque la molécule possède deux groupements éthoxycarbonyle la meilleure activité se manifeste lorsque ceux-ci occupent une position vicinale en 2, 3 (composé **5**), plutôt qu'une position géminée en 2 (composés **1** et **3**). De plus, la présence d'une fonction carbamate ne paraît pas améliorer cette activité (composé **4**), surtout si le composé ne possède plus de substituant en 3 (**6**).

— L'existence d'un noyau pyrrole vrai semble être un facteur déterminant pour que l'effet immunologique puisse être notable, surtout s'il n'y a pas de substituant sur l'azote : en effet, le carbamate **4** révèle une action moins intense que celles de **5** et de **8**, surtout aux faibles concentrations.

En conséquence, l'activité la plus nette est observée lorsque, sur un pyrrole vrai, il existe simultanément une seule chaîne carbonylée en 2, un cycle aromatique en 5 et un autre substituant en 3 tel qu'on le rencontre pour **5** et **8**. Cette approche mérite d'être approfondie car elle ne tient pas compte de l'aspect conformationnel. Or, nous disposons des coordonnées cristallographiques des composés **1**, **2**, **3** et **4** et des données en RMN du proton de l'ensemble des composés étudiés. Les structures cristallines sont reportées dans la figure 2.

La pyrroline **1** n'est pas plane [24]. Elle se présente sous une forme enveloppe avec le carbone 3 pour sommet. Le phényle en 5 est pratiquement coplanaire au plan moyen du cycle pyrroline et celui en 3 fait un angle d'environ 65° afin d'occuper une position plus dégagée.

L'absence d'un phényle en 3 (cas du composé **2**) provoque la disparition de la forme enveloppe, tout en maintenant la coplanéité du phényle en 5 avec le plan de la pyrroline. Les deux esters occupent des positions pratiquement symétriques par rapport à l'ensemble des 2 cycles.

Le composé **3** qui est un 2H pyrrole, présente également une quasi planéité de l'ensemble des 3 cycles, les deux éthoxycarbonyles étant symétriques par rapport à ce plan. On retrouve donc une confrontation assez proche de celle de **2**.

Le composé **4**, qui est un pyrrole vrai, substitué à l'azote, possède une planéité au niveau de l'hétérocycle, mais les deux phényles ne sont pas coplanaires. Celui en 5 fait un angle de 30° et celui en 3 de 65° par rapport au plan du pyrrole [17].

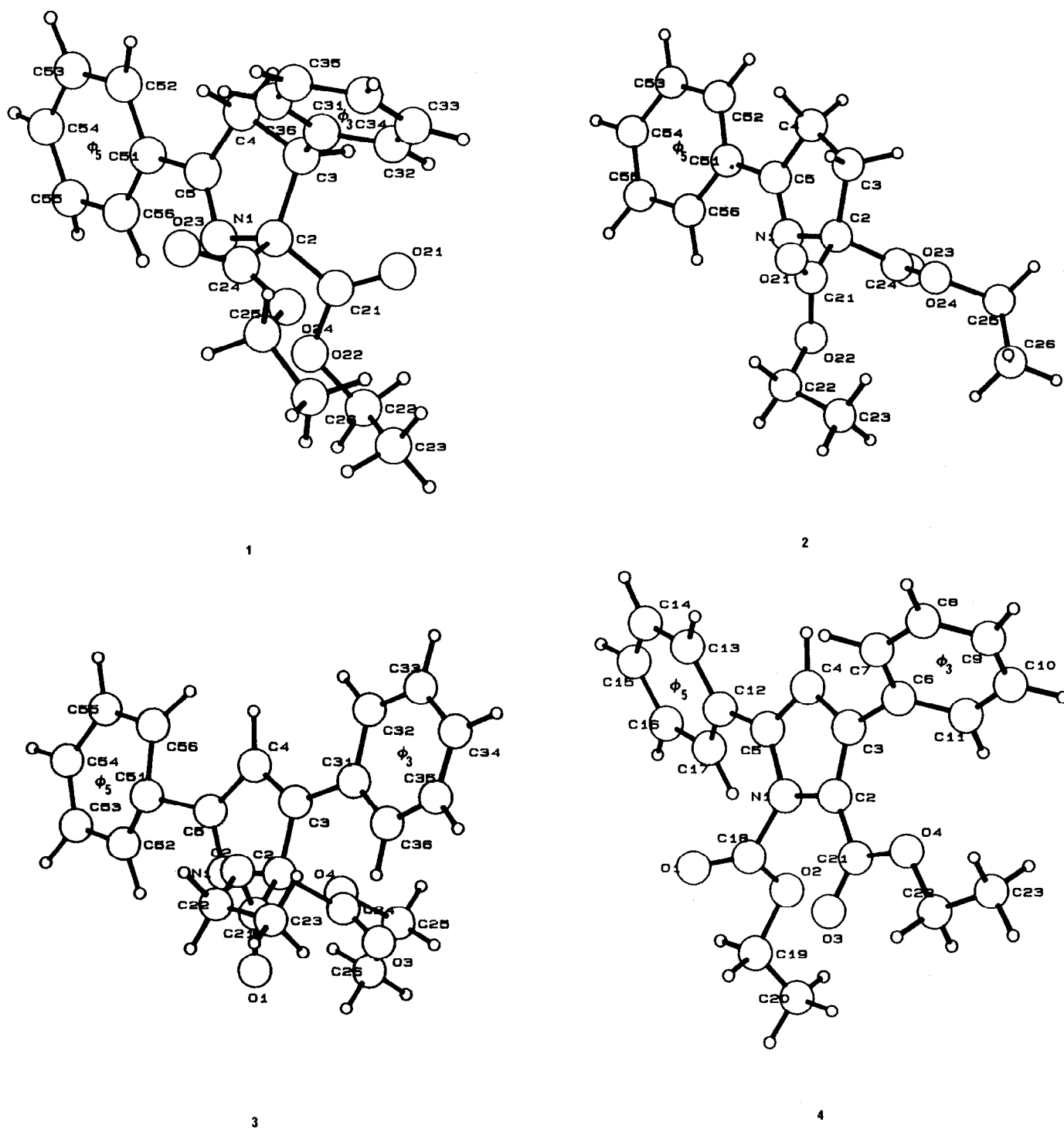
Il semble donc résulter de cette étude que, parmi les quatre produits précédents, ceux à structure plane ou symétrique (**2** et **3**) révèlent une activité légèrement inférieure à celle de **1** et **4** dont le gauchissement est beaucoup plus marqué.

En nous aidant de ces résultats cristallographiques et en nous intéressant plus particulièrement au déplacement chimique du ou des protons portés par le carbone 4, nous nous proposons d'aborder l'étude non seulement de la conformation, lorsque l'on passe de l'état solide en solution pour les composés **1**, **2**, **3** et **4**, mais aussi de la conformation des composés **5**, **6**, **7**, et **8** pour lesquels nous ne disposons que des seules données RMN. Pour ce faire, nous avons utilisé les incréments de Johnson et Bovey [25] qui permettent de quantifier l'anisotropie d'un phényle vis-à-vis des protons voisins en tenant compte de leur distance au centre du phényle (*cf Protocoles expérimentaux*).

Les incréments obtenus pour les composés **1**, **2**, **3** et **4** sont reportés dans le tableau III.

#### Cas des 3,4-dihydro 2H pyrroles

En retranchant les incréments ainsi déterminés des déplacements expérimentaux des protons en 4, car ils



**Fig 2.** Structures cristallines du 3,5-diphényl-3,4-dihydro 2*H* pyrrole-2,2-dicarboxylate de diéthyle 1, du 5-phényl-3,4-dihydro 2*H* pyrrole-2,2-dicarboxylate de diéthyle 2, du 3,5-diphényl 2*H* pyrrole-2,2-dicarboxylate de diéthyle 3, du 3,5-diphényl-pyrrole-1,2-dicarboxylate de diéthyle 4.

**Tableau III.** Calcul des incréments  $\sigma$ .

Composé	Proton	$\phi$	R(Å)	Z(Å)	R <sub>0</sub> (Å)	Z	$\sigma$	$\sigma$
1	H <sub>4</sub> '	$\phi_3$	3,77	0,57	3,75	0,40	2,70	0,46
	H <sub>4</sub> '	$\phi_5$	4,12	0,75	4,05	0,54	2,90	0,37
	H <sub>4</sub>	$\phi_3$	4,53	1,68	4,20	1,20	3,00	0,17
	H <sub>4</sub>	$\phi_5$	4,00	1,27	3,79	0,90	2,73	0,31
2	H <sub>4</sub> '	$\phi_5$	4,12	0,55	4,08	0,40	2,90	0,38
	H <sub>4</sub>	$\phi_5$	3,97	1,19	3,78	0,85	2,73	0,33
3	H <sub>4</sub>	$\phi_3$	4,25	1,07	4,11	0,77	2,95	0,30
	H <sub>4</sub>	$\phi_5$	3,93	0,38	3,91	0,27	2,80	0,44
4	H <sub>4</sub>	$\phi_3$	3,87	1,83	3,41	1,30	2,45	0,17
	H <sub>4</sub>	$\phi_5$	3,97	1,19	3,78	0,85	2,72	0,38

correspondent à un effet paramagnétique, on parvient aux valeurs calculées reportées dans le tableau IV.

On note une bonne convergence puisque les valeurs obtenues se situent aux alentours de 2,80 ppm. Ceci milite en faveur du maintien de conformation lorsque les composés sont en solution. En supposant une disposition analogue des 2 phényles dans le cas de la pyrroline 7 nous avons déterminé leur effet sur les protons H<sub>4</sub> et H<sub>4</sub>'. La valeur relativement élevée de  $J_{H_3H_4}$  permet de positionner H<sub>4</sub> en *trans* de H<sub>3</sub>, donc en *cis* du phényle en 3 avec un déplacement de 3,61 ppm. En appliquant le même mode de calcul que celui présenté dans le tableau IV, il vient:

$$\text{pour } H_4': 3,61 - 0,46 (\sigma\phi_3) - 0,37 (\sigma\phi_5) = 2,78 \text{ ppm}$$

$$H_4: 3,13 - 0,17 (\sigma\phi_3) - 0,31 (\sigma\phi_5) = 2,65 \text{ ppm}$$

Ces valeurs de  $\delta$  calculées sont moins convergentes que dans le cas des 2 autres 3,4-dihydro 2H pyrroles 1 et 2. Il se peut que le phényle en 3 puisse occuper une position légèrement différente car il n'existe qu'un seul éthoxycarbonyle en 2. Néanmoins, on peut en conclure une conformation assez semblable à celle de 1 quant à la position respective des 3 cycles.

#### Cas du 2H pyrrole 3

La valeur calculée pour H<sub>4</sub> est 7,35 - 0,30 ( $\sigma\phi_3$ ) - 0,44 ( $\sigma\phi_5$ ) = 6,61 ppm. Celle-ci est peu exploitable, car

**Tableau IV.** Déplacements chimiques théoriques calculés à partir des incréments  $\sigma$ .

Composés	Proton	$\delta$ Exp	$\sigma\phi_3$	$\sigma\phi_5$	$\delta$ Calculés
1	H <sub>4</sub> '	3,59	0,46	0,37	2,76
	H <sub>4</sub>	3,36	0,17	0,31	2,88
2	H <sub>4</sub> '	3,15	-	0,38	2,77
	H <sub>4</sub>	3,15	-	0,33	2,82

nous n'avons pas de valeur de référence, ni d'autres 2H pyrroles à comparer.

#### Cas des pyrroles

La valeur calculée pour H<sub>4</sub> dans le cas du pyrrole 4 doit nous permettre d'approcher la conformation des autres composés 5, 6 et 8. Pour 4 on a 6,35 - 0,17 ( $\sigma\phi_3$ ) - 0,38 ( $\sigma\phi_5$ ) = 5,80 ppm.

Cette valeur calculée correspond au déplacement chimique théorique du proton H<sub>4</sub> du pyrrole-1,2-dicarboxylate de diéthyle. Elle devrait être la même si l'on retranche l'effet du phényle en 5 dans le cas du composé 6. Le déplacement observé est de 6,25 ppm. Il convient donc d'avoir un incrément de 0,45 ppm pour retrouver la même valeur de 5,80 ppm. Ceci peut être réalisé pour une position quasi coplaire du phényle en 5 ( $\sigma = 0,44$  ppm pour ce même phényle dans le cas de 3, comme nous l'avons signalé dans le tableau III). Même si l'on considère une coplanéité non parfaite telle qu'on la rencontre dans 4 où l'on observe un angle de 30° pour le phényle en 5, l'incrément reste suffisamment élevé (0,38) pour conduire à une valeur calculée acceptable (6,25 - 0,38 = 5,87 ppm).

Le composé 5 présente un déplacement chimique expérimental de 6,90 ppm pour H<sub>4</sub>. Le phényle en 5 doit occuper une position voisine de la coplanéité étant donné l'absence de substituant sur l'azote. La valeur calculée doit donc être voisine de 6,45 ppm (6,90 - 0,44 ( $\sigma\phi_5$ )). Elle reste très éloignée des précédentes. Ceci est dû à l'existence de l'éthoxycarbonyle en 3 qui exerce un effet paramagnétique important. Or il est possible d'approcher ce dernier effet en comparant le déplacement chimique de H<sub>4</sub> appartenant au pyrrole (6,15 ppm) et celui de ce même proton appartenant au pyrrole-3-carboxylate d'éthyle (6,78 ppm) [26]. L'anisotropie se quantifie par un incrément de 0,63 qu'il faut retrancher de 6,45 ppm. On obtient 5,82 ppm, correspondant au déplacement chimique théorique de H<sub>4</sub> du pyrrole-2-carboxylate d'éthyle.

Dans le cas de 8,  $\sigma\phi_3$  doit être identique à l'incrément observé pour 4 et  $\sigma\phi_5$  doit être, là encore, de l'ordre de 0,44 en l'absence de substituant sur l'azote. La valeur calculée pour H<sub>4</sub> sera donc de : 6,60 ( $\delta$  expérimental) - 0,17 ( $\sigma\phi_3$ ) - 0,44 ( $\sigma\phi_5$ ) = 5,99 ppm. Elle est légèrement supérieure à celle obtenue dans le cas du composé 5 mais reste comparable.

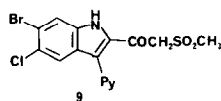
De cette approche on en déduit, non seulement le maintien des conformations lorsque l'on passe de l'état solide en solution, mais aussi la validité de l'utilisation des incréments pour l'étude des conformations à l'aide des données RMN.

Dans le cas des pyrroles vrais, parmi lesquels on rencontre les composés les plus intéressants sur le plan immunologique, on note que les plus actifs

semblent ceux qui possèdent un phényle en 5 dont le plan fait un angle minime avec celui de l'hétérocycle. Ceci est surtout réalisé lorsqu'il n'y a pas de substituant sur l'azote (composés **5** et **8**). Par contre, le phényle en 3 doit faire un angle nettement plus prononcé, voisin de l'orthogonalité (composés **8** et **4**).

## Conclusion

Nous avons pu montrer qu'un certain nombre de dérivés pyrroliques ou dihydropyrroliques ont des propriétés immunoactives notables sur le lymphocyte T humain *in vitro* plus marquées que celles du chlorhydrate de lévamisole pris comme produit de référence. Ces derniers possèdent tous au moins une chaîne carbéthoxylée en 2, un reste phényle ou carbéthoxyle en position 3 et en 5 un reste phényle. Il semble par ailleurs que doivent intervenir des facteurs conformationnels. La planéité du noyau pyrrole et une coplanéité de celui-ci avec le phényle en 5 apparaissent des facteurs favorables, sinon indispensables, à ce type d'activité. Si en 3 existe un reste phényle, ce dernier doit faire un angle marqué proche de l'orthogonalité avec le noyau pyrrole. Ceci permet de comprendre l'efficacité du composé **8** par rapport à celle des autres dérivés étudiés. Notons que des données structurales et conformationnelles voisines doivent également caractériser le composé **9** décrit par Smith *et al* [27] comme immunomodulateur qui possède avec en commun avec **8**, un noyau pyrrole, non substitué à l'azote, un reste phényle en 5,6 adjacent (donc plan), un noyau aromatique en 3 et un groupe carbonyle en 2.



Nous poursuivons actuellement cette étude en préparant de nouveaux dérivés pyrroliques substitués non seulement en 2 par une chaîne carbonylée mais aussi en 4 par un reste alkyle ou aryle, tandis que, par ailleurs, nous allons essayer de vérifier notre hypothèse de travail sur le plan conformationnel en déterminant la structure cristalline du composé **8**.

Enfin, ce travail est une approche, à l'aide d'essais *in vitro*, d'une immunoactivité qu'il convient de vérifier *in vivo* afin d'entrevoir des applications thérapeutiques. Néanmoins, il permet de procéder à un tri discriminant de nouvelles molécules puisqu'il apparaît nettement que, dans une même série, on parvient à identifier celles qui présentent une activité par rapport à celles qui n'en ont pas.

## Protocoles expérimentaux

### Chimie

Les points de fusions instantanés ont été déterminés en banc de Köfler et ne sont pas corrigés. Les spectres infrarouge ont été enregistrés sur un appareil Philips Unicam SP 1100 ou un appareil Bruker IFS 45 WHR après compression en pastille de bromure de potassium (5%).

Les spectres de RMN du proton ont été réalisés sur un spectromètre Perkin-Elmer R 24A (60 MHz) ou Bruker AC 200 (200 MHz). Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane utilisé comme référence interne, après dissolution des échantillons dans le deutériochloroforme (10%). Les analyses centésimales sont conformes aux normes admises ( $\pm 0,4\%$ ) et ne sont pas reportées.

### 3,5-Diphényl-3,4-dihydro 2H pyrrole-2,2-dicarboxylate de diéthyle **1**

Préparé selon Koch *et al* [15].

### 5-Phényl-3,4-dihydro 2H pyrrole-2,2-dicarboxylate de diéthyle **2**

On porte à reflux dans 7 ml de benzène et 7 ml de nitrobenzène un mélange de 4,2 g (0,04 mol) d'acétophène, 3,2 g de chlorhydrate de diméthylamine et 1,3 g de paraformaldéhyde. Après 30 min d'ébullition, on ajoute 6 g (0,044 mol) de chlorhydrate d'aminomalonate de diéthyle et on élève progressivement la température en surveillant les variations de couleur du milieu réactionnel qui passe du jaune clair à l'orange tandis que se forme des vapeurs blanches. Le chauffage est maintenu jusqu'à disparition de ces vapeurs et arrêté avant que le milieu prenne une teinte rouge. Après refroidissement, on ajoute 50 ml d'eau et 50 ml de benzène. La phase organique est récupérée, filtrée sur charbon actif et séchée sur sulfate de sodium anhydre. Après distillation sous pression réduite, le résidu huileux est repris par du méthanol bouillant qui abandonne des cristaux par refroidissement.

Rdt (calculé à partir du chlorhydrate d'aminomalonate de diéthyle): 10% (litt [22]: 30%); F = 77-78°C (litt [22]: 78°C) IR (cm<sup>-1</sup>): 1756, 1732 (v C=O ester), 1574 (v C=N), 1300, 1152 (v C-O). RMN (200 MHz)  $\delta$  ppm: 1,30 (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 2 x CH<sub>3</sub>); 2,62 (t, <sup>3</sup>J = 7,80 Hz, 2 x H<sub>3</sub>); 3,15 (t, <sup>3</sup>J = 7,80 Hz, 2 x H<sub>4</sub>); 4,30 (q, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 2 x CH<sub>2</sub>); 7,40 (m, 2H benzéniques); 7,95 (m, 3H benzéniques). Anal C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub> (C, H, N).

### 3,5-Diphényl 2H pyrrole-2,2-dicarboxylate de diéthyle **3**

On prépare une solution contenant 3 g (0,082 mol) de **1** dans 40 ml de benzène à laquelle on ajoute 2,19 g de chloranile (soit un excès de 10%). Le mélange qui prend une coloration orange est porté 6 h à reflux. Après refroidissement on ajoute à la solution qui est jaune doré 100 ml d'éther et transvase le tout dans un récipient contenant 200 ml d'une solution de soude à 10% qui prend une teinte verte. On maintient 1 h sous agitation et récupère ensuite la phase organique. Celle-ci est lavée par 100 ml d'eau, puis par 100 ml de soude à 10% et enfin par de l'eau jusqu'à neutralité des eaux de lavage. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et chassée sous pression réduite. Le résidu est repris par du méthanol bouillant. La solution, filtrée sur charbon actif, abandonne des cristaux.

Rdt 50%; F = 98-99°C. (Litt [18] 99°C). IR (cm<sup>-1</sup>): 1760, 1727 (v C=O ester); 1573 (v C=N); 1296, 1094 (v C-O). RMN (200 MHz)  $\delta$  ppm: 1,20 (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 2 x CH<sub>3</sub>); 4,20 (q, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 2 x CH<sub>2</sub>); 7,35 (s, H<sub>4</sub>); 7,20-7,50 (m, 5H benzéniques, Ph<sub>3</sub>); 7,60-8,20 (m, 5H benzéniques Ph<sub>5</sub>). Anal C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> (C, H, N).

### 3,5-Diphényl pyrrole-1,2-dicarboxylate de diéthyle 4

*Procédé 1: à partir de 1.* On opère de façon analogue à celle décrite précédemment pour obtenir 3, mais on utilise le xylène comme solvant et porte 12 h à reflux au lieu de 6 h.

Rdt 69%; F = 101–102°C (litt [18] 101–102°C). IR (cm<sup>-1</sup>): 1775 forte, 1752 moyenne (v C=O carbamate); 1740 moyenne, 1705 forte (v C=O ester); 1050, 1020 (v C-O). RMN (60 MHz) δ ppm: 1,15 (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 2 x CH<sub>3</sub>); 4,25 (q, <sup>3</sup>J = 7 Hz, CH<sub>2</sub> Et carbamate); 4,20 (q, <sup>3</sup>J = 7 Hz, CH<sub>2</sub> Et ester); 6,35 (s, H<sub>4</sub>); 7,10–7,70 (m, 10 H benzéniques). Anal C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> (C, H, N).

*Procédé 2: à partir de 3.* On porte 0,001 mol de 3 dans 30 ml de xylène à reflux pendant 1 h. Après élimination du solvant par distillation sous pression réduite (0,05 mmHg), le résidu obtenu est repris par du méthanol bouillant qui abandonne par refroidissement des cristaux incolores. Rdt 90%.

### 5-Phényl pyrrole-2,3-dicarboxylate de diéthyle 5 et 5-phényl pyrrole-1,2-dicarboxylate de diéthyle 6

On opère selon le procédé décrit pour déshydrogéner 1 à l'aide du chloranile dans le xylène à reflux. À partir de 2,5 g (0,01 mol) de 2, on obtient 0,75 g de produit brut (Rdt 30%) correspondant à un mélange de 5 et 6. Ceux-ci sont séparés par CCM sur gel de silice à l'aide d'un Chromatotron avec comme éluant un mélange éther éthylique–éther de pétrole (40/60).

5. Rdt 90% (du mélange); F = 71–73°C. IR (cm<sup>-1</sup>): 3316 (v NH), 1734 (v C=O ester en 2), 1675 (v C=O ester en 3); 1165, 1078 (v C-O); RMN (200 MHz) δ ppm: 1,30 (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, CH<sub>3</sub> Et ester en 3); 1,40 (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, CH<sub>3</sub> Et ester en 2); 4,38 (q, <sup>3</sup>J = 7 Hz, CH<sub>2</sub> Et ester en 3); 4,40 (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, CH<sub>2</sub> Et ester en 2); 6,90 (d, <sup>4</sup>J = 3 Hz, H<sub>4</sub>); 7,20–7,65 (m, 5H benzéniques); 9,20 ppm (s, large NH). Anal C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> (C, H, N).

6. Rdt 10% (du mélange) F = < 45°C. IR (cm<sup>-1</sup>): 1770 (v C=O carbamate); 1710 (v C=O ester), 1270, 1250 (v C-O). RMN (200 MHz) δ ppm: 1,20 (t, <sup>3</sup>J=7 Hz, CH<sub>3</sub> Et ester); 1,35 (t, <sup>3</sup>J= 7 Hz, CH<sub>3</sub> Et carbamate); 4,26 (q, <sup>3</sup>J=7 Hz, CH<sub>2</sub> Et ester); 4,28 (q, <sup>3</sup>J=7 Hz, CH<sub>2</sub> Et carbamate); 6,25 (d, <sup>3</sup>J=7 Hz, H<sub>4</sub>); 6,95 (d, <sup>3</sup>J=7 Hz, H<sub>3</sub>); 7,20–7,50 (m, 5H benzéniques). Anal C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> (C, H, N).

### 3,5-Diphényl-3,4-dihydro 2H pyrrole-2-carboxylate d'éthyle 7

On chauffe à reflux, pendant 18 h, 5 g (0,0137 mol) de 1 et 22 ml d'acide chlorhydrique 6 N. Après élimination du liquide sous pression réduite, le résidu huileux est repris plusieurs fois par du benzène afin d'éliminer l'eau par distillation de l'azéotrope formé. Le résidu final, repris par 25 ml d'éthanol absolu, est additionné de 2,5 ml d'acide sulfurique et porté à reflux pendant 3 h. Après concentration, sous pression réduite, le résidu est repris par une solution saturée de carbonate de sodium. La solution est soumise à une extraction par le chloroforme à 3 reprises. La phase organique, séchée sur sulfate de sodium anhydre, est distillée. On récupère finalement 2,20 g (Rdt 55,5%) d'un liquide, que l'on reprend par 20 ml de toluène. Après 2 h d'ébullition à reflux, on chasse le solvant et récupère 1,80 g de liquide distillant à 130°C, sous 0,5 mmHg. Il correspond à l'isomère *trans* 7a.

7a. Rdt = 50%. IR (cm<sup>-1</sup>): 1730 (v C=O), 1180 (v C-O), RMN (200 MHz) δ ppm: 1,28 (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, CH<sub>3</sub>), 4,22 (q, <sup>3</sup>J = 7 Hz, CH<sub>2</sub>), 4,93 (ddd, <sup>3</sup>J/H<sub>2</sub>H<sub>3</sub>=7,9 Hz, <sup>5</sup>J/H<sub>2</sub>H<sub>4</sub>=1,7 Hz, <sup>5</sup>J/H<sub>2</sub>H<sub>4</sub>=1,7 Hz, H<sub>2</sub>); 3,87 (ddd, <sup>3</sup>J/H<sub>3</sub>H<sub>4</sub>= 9 Hz, <sup>3</sup>J/H<sub>3</sub>H<sub>2</sub>= 7,9 Hz, <sup>3</sup>J/H<sub>3</sub>H<sub>4</sub>= 6,5 Hz, H<sub>3</sub>); 3,61 (ddd, <sup>3</sup>J/H<sub>4</sub>H<sub>3</sub>= 9 Hz, <sup>5</sup>J/H<sub>4</sub>H<sub>2</sub>= 1,7 Hz, <sup>2</sup>J/H<sub>4</sub>H<sub>4</sub>= 17,2 Hz, H<sub>4</sub>); 3,13 (ddd, <sup>2</sup>J/H<sub>4</sub>H<sub>4</sub>= 17,2 Hz, <sup>3</sup>J/H<sub>4</sub>H<sub>3</sub>= 6,5 Hz, <sup>5</sup>J/H<sub>4</sub>H<sub>2</sub>= 1,7 Hz, H<sub>4</sub>); 7,15–7,6 (m, 8H benzéniques); 7,85–8,10 (m, 2H benzéniques). Anal C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub> (C, H, N).

### 3,5-Diphényl pyrrole-2-dicarboxylate d'éthyle 8

*Procédé 1: à partir de 7.* On opère selon le protocole décrit pour la préparation de 3 à partir de 1 mais en utilisant le xylène comme solvant.

Rdt: 40%; F = 142–144°C (litt [18] 142°C). IR (cm<sup>-1</sup>): 3312 (v NH), 1660 (v C=O), 1266 (v C-O). RMN (200 MHz) δ ppm: 1,25 (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, CH<sub>3</sub>), 4,25 (q, <sup>3</sup>J = 7 Hz, CH<sub>2</sub>); 6,65 (d, <sup>4</sup>J = 3,10 Hz, H<sub>4</sub>); 7,20–7,70 (2 m, 10H benzéniques); 9,75 (s, large, NH). Anal C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub> (C, H, N).

*Procédé II: à partir de 4.* On dissout 2,5 g de 4 (0,01 mol) dans 50 ml de DMSO. Après chauffage à reflux pendant 2 h, on transvase le mélange dans un récipient contenant 50 ml d'eau et de la glace. On extrait ensuite 3 fois avec 50 ml d'éther. Les fractions organiques sont réunies, séchées sur sulfate de sodium anhydre. Après élimination de l'éther sous pression réduite, on recristallise le résidu de l'éthanol. Rdt 70%.

### Détermination des incréments de Johnson et Bovey

Ils sont déterminés à partir de la distance R séparant le proton du milieu du phényle et de la hauteur r du proton par rapport au plan du phényle, calculées à l'aide des programmes DIANG et MPLN. On accède ainsi à R<sub>0</sub>, distance séparant le centre du phényle au pied de la hauteur (cf fig 3). R<sub>0</sub> et r sont ensuite convertis en coordonnées sphériques correspondantes ρ = R<sub>0</sub>/1,39 et Z = r/1,39. On parvient ainsi à un couple de valeurs qui, à l'aide des abaques de Bovey [28], permet d'accéder à l'incrément σ.

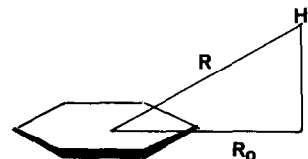


Fig 3.

### Immunologie

#### Multiplication des LT

*Réactifs.* Les lymphocytes T humains sont obtenus à partir de sang de donneurs sains provenant du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Besançon. Après isolement par centrifugation en gradient de Ficoll, la concentration est ajustée à 10<sup>6</sup>/ml dans le milieu 199 enrichi en glutamine (102 µg/ml). Le sérum humain AB (SAB) est préalablement décomplémenté pendant 30 min au bain-marie à 56°C. La phytohémagglutinine (PHA-C IBF lot n° 5745) est ajustée à une concentration de 7 mg/ml dans de l'eau distillée stérile. Après dilution, on obtient une concentration finale de 25 µg/ml. Pour chaque composé, on prépare une solution mère à 1120 µg/ml dans le milieu 199. On effectue des dilutions de façon à obtenir des concentrations de 1, 5, 10, 20, 40 et 80 µg/ml.

*Mode opératoire.* Pour chaque essai, on effectue une série de 3 tubes comme il est indiqué dans le tableau V. Le tube témoin LT et le tube PHA témoin doivent avoir la même concentration



Tableau V.

Tubes Réactifs	Tube "Témoin" lymphocytes T	Tube "PHA" "témoin"	Tube "Essais"
Solution de composé	-	-	0,1 ml
Lymphocytes 10 <sup>6</sup> /ml	1 ml	1 ml	1 ml
SAB	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
PHA	-	0,1 ml	0,1 ml
Eau distillée	0,1 ml	-	-
Milieu 199	0,1 ml	0,1 ml	-

en milieu de culture 199, soit 0,1 ml pour 1,4 ml ce qui implique la présence de 0,1 ml d'eau distillée dans le témoin LT au lieu et place de la PHA.

Après 48 h d'incubation en étuve à 37°C, on ajoute dans chaque tube 0,1 ml de thymidine tritiée à 10 µCi/ml. On maintient le contact pendant 18 h à 37°C. Le contenu de chaque tube, recueilli sur filtres en fibre de verre (collecteur d'échantillon Millipore 1225), est additionné de 10 ml de liquide à scintillation liquide afin de déterminer le nombre de coups par minute (cpm). Le nombre de cpm est proportionnel au nombre de cellules présentes ayant incorporé la thymidine tritiée.

**Lecture.** Pour chaque concentration de composé étudié, on détermine le rapport T correspondant au nombre de cpm obtenu à partir des lymphocytes en présence du produit et de la PHA au nombre de cpm obtenu à partir des lymphocytes en présence de PHA seule. Les valeurs ainsi déterminées sont reportées dans le tableau I et dans les figures 1a et b qui permettent de visualiser l'importance relative de la transformation lymphoblastique due à chaque composé pour chacune des concentrations étudiées et pour un seul et même donneur (D7 pour les composés 1, 2, 4, 6 et le lévamisole, D1 pour les composés 3, 5, 7, 8).

#### Test des rosettes modifié (lymphocytes trypsinés)

Seul le pyrrole 8 qui dans le test de multiplication de LT s'est révélé être l'un des plus intéressants a été étudié en utilisant le protocole mis au point sur les récepteurs CD2 du LT trypsiné. On opère selon le protocole décrit dans un mémoire précédent [3].

#### Remerciements

Les auteurs remercient les laboratoires Sterling Winthrop et Vetoquinol de leur soutien à ces recherches et le CRTS de Besançon (Directeur Prof Peters) pour nous avoir généreusement approvisionnés en poches de sang.

#### Références

- Renoux G, Renoux M (1971) *CR Acad Sci (Paris)* 272 D, 349
- Bonnefoy-Claudet G, Panouse-Perrin J (1986) In: *Proc 34th Colloq Protides of Biological Fluids*. Pergamon Press, Oxford, pp 645
- Refouvelet B, Tronche P, Couquelet J, Robert JF, Bonnefoy-Claudet G, Panouse-Perrin J (1987) *Eur J Med Chem* 22, 11
- Harraga S, Jan C, Panouse-Perrin J, Lamy B (1989) *Biol Cell* 67, 39a
- Brasleret-Ceresa M (1987) Doctorat Pharmacie Université de Franche-Comté
- Pantaleo G, Zocchi MR, Ferrini S, Poggi A, Tambussi G, Bottino C, Moretta L, Moretta A (1988) *J Exp Med* 168, 13
- O'Flynn K, Kreusky AM, Beverley PCL, Burakoff SJ, Linch DC (1985) *Nature* 313, 637
- Denning SM, Inck DT, Singer KH, Haynes BF (1988) In: *Immunobiology of Human T Lymphocyte Membrane Molecule*, p 144
- Danielian S, Fagard R, Alcover A, Acuto O, Fischer S (1989) *Eur J Immunol* 19, 2183
- Moingeon P, Chang HC, Sayre PH, Clayton LK, Alcover A, Gardner P, Reinherz EL (1989) *Immunol Rev* 111, 111
- Hu J, Vaquero C, Bismuth G, Eljaafari A, Bernard A, Levy JP, Sterkers G (1988) *Eur J Immunol* 18, 1123
- Carrera AC, Rincon M, De Landazuri MO, Lopez-Botet M (1988) *Eur J Immunol* 18, 961
- Makgoba MW, Sanders ME, Shaw S (1989) *Immunol Today* 10, 417
- Kabelitz D (1990) *Immunol Today* 11, 44
- Koch J, Robert JF, Panouse JJ (1975) *CR Acad Sci (Paris)* 286C, 95
- Robert JF, Koch J, Xicluna A, Panouse JJ (1980) *Spectrochim Acta* 36A, 535
- Laarif A, Théobald F, Birouk M, Robert JF (1984) *Acta Crystallogr* C40, 1278
- Katritzky AR, Sammes MP, Chung MW (1985) *J Chem Soc Perkin Trans I* 1973
- Laurent A, Mison P, Nafti A, Pelissier N (1979) *Tetrahedron Lett* 35, 2285
- Laurent A, Mison P, Nafti A, Pelissier N (1982) *Tetrahedron Lett* 23, 655
- Birouk M (1988) Doctorat ès Sciences Physiques, Université de Franche-Comté
- Leonard F (1965) US Pat 3,164,597; 05 01 1965
- Robert JF, Ombetta JE, Xicluna A, Panouse JJ (1982) *Spectrochim Acta* 38A, 821
- Théobald F, Birouk M, Robert JF (1982) *Acta Crystallogr* B 38, 1764
- Johnson CE, Bovey FA (1958) *J Chem Phys* 29 (5), 1012
- Batterham TJ (1973) *NMR Spectra of Simple Heterocycles*. John Wiley and Sons, NY, 150-151
- Smith SR, Terminelli C, Epps E, Natwick A, Umland S (1987) *Immunopharmacol Immunotoxicol* 9, 933
- Bovey FA (1969) *Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry*. Academic Press, NY, 265-274