

Nouveaux produits

Synthèse et recherche d'une activité anti-convulsivante dans une nouvelle série de diaryl-4,6 pyridazinones-3 *N*-substituées

Pascal COUDERT^{1*}, Catherine RUBAT², Joële COUQUELET¹, Joseph FIALIP² et Pierre BASTIDE²; avec la collaboration technique de A.M. PRIVAT

¹Laboratoire de Chimie Thérapeutique; et

²Laboratoire de Pharmacologie et Pharmacie Clinique, Faculté de Pharmacie, 28, pl. Henri-Dunant, 63001 Clermont-Ferrand Cedex, France

(Reçu le 29 novembre 1988, accepté le 9 février 1989)

4,6-diaryl-3-pyridazinones / *N*-ethoxycarbonyl alkyl pyridazinones / *N*-carbamoyl alkyl pyridazinones / *N*-carbazoyl alkyl pyridazinones / anti-convulsant / sédatif

Introduction

La recherche de nouveaux anti-convulsivants apparaît comme un besoin dans la mesure où les médicaments actuellement disponibles sur le marché se montrent inefficaces chez un certain nombre de patients [1]. Par ailleurs, certains composés, notamment l'acide valproïque, la carbamazépine, la phénytoïne, le phénobarbital, peuvent entraîner des effets indésirables graves de type neuropsychique, hématologique ou hépatotoxique [2].

Récemment, des propriétés anti-convulsivantes ont été mises en évidence dans des structures différentes telles que des benzimidazolones [3], des alkylaminopurines [4] ainsi que des pyridazinones substituées en 2 par une chaîne comportant une fonction ester ou hydrazide [5, 6].

Ces dernières observations nous ont incités à préparer une série de diaryl-4,6 pyridazinones-3 substituées en 2 par une chaîne comportant le même type de fonction mais reliée à l'hétérocycle par un nombre variable de maillons carbonés. L'activité anti-convulsivante de ces composés a été évaluée par comparaison avec celle de la phénytoïne utilisée comme substance de référence.

Chimie

Les produits étudiés sont préparés à partir des diaryl-4,6 pyridazinones-1 **1** dont nous avons décrit la synthèse dans un précédent mémoire [7]. La première étape consiste en une attaque nucléophile du bromacétate d'éthyle ou de l'un de ses homologues supérieurs par les pyridazinones **1** conduisant aux esters **2** (Schéma 1). Ceux-ci mis en présence d'ammoniaque ou d'hydrate d'hydrazine permettent d'obtenir respectivement les amides **3** et les hydrazides **4**.

Tous les composés préparés ont été recristallisés et présentent un point de fusion net. Leur structure a été établie par spectrométrie infra-rouge et de RMN ¹H (Tableau I).

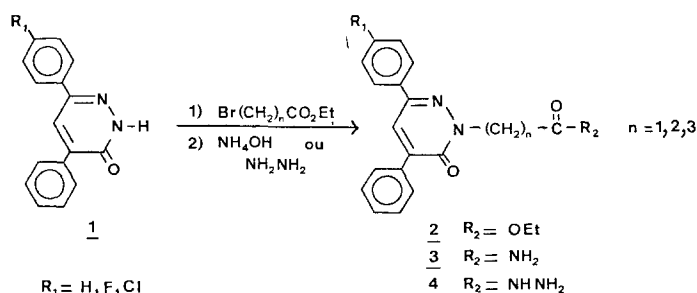


Schéma 1.

Résultats et Discussion

Dans un premier temps, l'activité anti-convulsivante a été recherchée chez la Souris par le test de l'électrochoc supra-maximal sur la cornée. A la dose de 50 mg / kg les composés **4a**, **4d** et **4e** assurent une protection des animaux supérieure à 65%, comparable à celle de la phénytoïne utilisée à la dose de 5 mg / kg (Tableau II). Comme le montre le calcul du R_M , l'intensité de cette activité ne peut pas être directement reliée à la lipophilie de ces composés.

L'activité neurosédatif objectivée par la diminution de la motilité spontanée, est très faible pour l'ensemble des composés. Parmi les dérivés actifs dans le test de l'électrochoc seuls les composés **4a**, **4d** et **4e** ont montré un important effet sédatif à 300 mg / kg. Il faut remarquer que dans l'ensemble les produits de cette série ne modifient que légèrement les fonctions motrices des animaux. La phénytoïne pour sa part ne manifeste aucun effet sédatif ni ataxie à la dose de 5 mg / kg (Tableau II).

Nous avons dans un deuxième temps approfondi l'étude des composés les plus actifs en recherchant une protection des animaux vis-à-vis d'agents convulsivants chimiques, le

pentétrazol et la bicuculline (Tableau III). Dans ces deux derniers tests, les différents produits et la phénytoïne ont été administrés à la même dose de 100 mg/kg.

Vis-à-vis des crises provoquées par le pentétrazol, seul le dérivé **4d** présente une activité significative en assurant

plus de 65% de protection aux animaux. La phénytoïne est quant à elle totalement inactive dans ce test.

Les composés **4a**, **4d** et **4f** protègent de façon significative les 2/3 des animaux des crises toniques induites par la bicuculline et assurent un taux de survie au moins égal

Tableau I. Composés préparés.

N°	R ₁	R ₂	n	Rdt (%)	F ^o C	Formule (PM)	IR (KBr) ν cm ⁻¹	RMN ¹ H (DMSO-d ₆) δ ppm
2a	H	OC ₂ H ₅	1	94	160	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₃ (334)	1750, 1650	1,30 (t, 3H, CH ₃), 4,25 (q, 2H, OCH ₂), 5,05 (s, 2H, NCH ₂), 7,80 (m, 11H, 2Ar et = CH)
3a	H	NH ₂	1	36	174	C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₂ (305)	3340, 1700, 1640	4,90 (m, 2H, NCH ₂), 7,70 (m, 11H, 2Ar et = CH), 7,80 (m, 2H, NH ₂)
4a	H	NHNH ₂	1	56	170	C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O ₂ (320)	3320, 1690, 1660	4,30 (m, 2H, NH ₂), 4,85 (s, 2H, NCH ₂), 7,80 (m, 11H, 2Ar et = CH), 9,40 (s, 1H, NH)
2b	F	OC ₂ H ₅	1	78	139	C ₂₀ H ₁₇ N ₂ FO ₃ (352)	1740, 1650	1,25 (t, 3H, CH ₃), 4,20 (q, 2H, OCH ₂), 5,05 (s, 2H, NCH ₂), 7,80 (m, 10H, 2Ar et = CH)
3b	F	NH ₂	1	58	227	C ₁₈ H ₁₄ N ₃ FO ₂ (323)	3340, 1690, 1650	4,75 (s, 2H, NCH ₂), 7,60 (m, 10H, 2Ar et = CH), 7,80 (m, 2H, NH ₂)
4b	F	NHNH ₂ , H ₂ O	1	81	141	C ₁₈ H ₁₇ N ₄ FO ₃ (356)	3480, 3300, 1680, 1635	3,40 (m, 2H, H ₂ O), 4,30 (m, 2H, NH ₂), 4,85 (s, 2H, NCH ₂), 7,80 (m, 10H, 2Ar et = CH), 9,40 (m, 1H, NH)
2c	Cl	OC ₂ H ₅	1	76	136	C ₂₀ H ₁₇ N ₂ ClO ₃ (368,5)	1750, 1650	1,20 (t, 3H, CH ₃), 4,20 (q, 2H, OCH ₂), 4,95 (s, 2H, NCH ₂), 7,80 (m, 10H, 2Ar et = CH)
3c	Cl	NH ₂	1	52	220	C ₁₈ H ₁₄ N ₃ ClO ₂ (339,5)	3340, 1680, 1650	4,80 (m, 2H, NCH ₂), 7,30 (m, 2H, NH ₂), 7,75 (m, 10H, 2Ar et = CH)
4c	Cl	NHNH ₂	1	80	180	C ₁₈ H ₁₅ N ₄ ClO ₂ (354,5)	3300, 1680, 1655	4,20 (s, 2H, NH ₂), 4,90 (s, 2H, NCH ₂), 7,80 (m, 10H, 2Ar et = CH), 9,45 (s, 1H, NH)
2d	H	OC ₂ H ₅	2	91	98	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃ (348)	1725, 1650	1,20 (t, 3H, CH ₃), 2,95 (t, 2H, CH ₂ CO), 4,20 (q, 2H, OCH ₂), 4,50 (t, 2H, NCH ₂), 7,85 (m, 11H, 2Ar et = CH)
4d	H	NHNH ₂	2	79	169	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₂ (334)	3260, 1670, 1645	2,70 (t, 2H, CH ₂ CO), 4,30 (m, 2H, NH ₂), 4,50 (t, 2H, NCH ₂), 7,80 (m, 10H, 2Ar et = CH), 9,20 (s, 1H, NH)
2e	F	OC ₂ H ₅	2	94	106	C ₂₁ H ₁₉ N ₂ FO ₃ (366)	1725, 1650	1,20 (t, 3H, CH ₃), 2,90 (t, 2H, CH ₂ CO), 4,10 (q, 2H, OCH ₂), 4,40 (t, 2H, NCH ₂), 7,75 (m, 10H, 2Ar et = CH)
4e	F	NHNH ₂	2	34	137	C ₁₉ H ₁₇ N ₄ FO ₂ (352)	3380, 1670, 1645	2,70 (t, 2H, CH ₂ CO), 4,20 (m, 2H, NH ₂), 4,50 (t, 2H, NCH ₂), 7,70 (m, 10H, 2Ar et = CH), 9,20 (s, 1H, NH)
2f	Cl	OC ₂ H ₅	2	87	126	C ₂₁ H ₁₉ N ₂ ClO ₃ (382,5)	1720, 1650	1,20 (t, 3H, CH ₃), 3,00 (t, 2H, CH ₂ CO), 4,20 (q, 2H, OCH ₂), 4,60 (t, 2H, NCH ₂), 7,90 (m, 10H, 2Ar et = CH)
4f	Cl	NHNH ₂	2	83	168	C ₁₉ H ₁₇ N ₄ ClO ₂ (368,5)	3320, 1660, 1640	2,80 (t, 2H, CH ₂ CO), 4,20 (m, 2H, NH ₂), 4,60 (t, 2H, NCH ₂), 7,95 (m, 10H, 2Ar et = CH), 9,30 (s, 1H, NH)
2g	H	OC ₂ H ₅	3	80	54	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₃ (362)	1730, 1645	1,25 (t, 3H, CH ₃), 2,20 (m, 2H, CH ₂), 2,50 (t, 2H, CH ₂ CO), 4,15 (q, 2H, OCH ₂), 4,40 (t, 2H, NCH ₂), 7,85 (m, 11H, 2Ar et = CH)
4g	H	NHNH ₂	3	66	136	C ₂₀ H ₂₀ N ₄ O ₂ (348)	3350, 1670, 1640	2,10 (m, 2H, CH ₂), 2,20 (m, 2H, CH ₂ CO), 4,10 (m, 2H, NH ₂), 4,20 (m, 2H, NCH ₂), 7,65 (m, 11H, 2Ar et = CH), 8,90 (m, 1H, NH)

Tableau II. Activités neurosédative et anticonvulsivante vis-à-vis d'agent convulsivant électrique.

Composés	Electrochocs No. d'animaux protégés		Motilité spontanée % de diminution		Rotarod No. d'animaux qui chutent		R_M
	50 mg / kg	100 mg / kg	100 mg / kg	300 mg / kg	100 mg / kg	300 mg / kg	
2a	—	2 / 12 (NS)	NS	—	—	—	-1,12
3a	—	3 / 12 (NS)	NS	—	—	—	0,82
4a	9 / 12 ^c	10 / 12 ^c	NS	43 ± 4 ^c	0 / 12 (NS)	0 / 12 (NS)	0,30
2b	—	2 / 12 (NS)	NS	—	—	—	-1,19
3b	—	4 / 12 (NS)	19 ± 5 ^c	—	—	—	0,82
4b	—	2 / 12 (NS)	NS	—	—	—	0,26
2c	—	1 / 12 (NS)	NS	—	—	—	-1,27
3c	—	4 / 12 (NS)	NS	—	—	—	0,78
4c	3 / 12 (NS)	11 / 12 ^c	NS	NS	0 / 12 (NS)	0 / 12 (NS)	0,24
2d	—	1 / 12 (NS)	NS	—	—	—	-0,90
4d	9 / 12 ^c	12 / 12 ^c	31 ± 4 ^c	71 ± 3 ^c	0 / 12 (NS)	7 / 12 ^b	0,86
2e	—	1 / 12 (NS)	NS	—	—	—	-0,95
4e	8 / 12 ^b	12 / 12 ^c	22 ± 5 ^c	74 ± 4 ^c	0 / 12 (NS)	12 / 12 ^c	0,95
2f	—	1 / 12 (NS)	NS	—	—	—	-1,00
4f	3 / 12 (NS)	9 / 12 ^c	23 ± 4 ^c	19 ± 7 ^c	0 / 12 (NS)	0 / 12 (NS)	0,82
2g	—	5 / 12 ^a	NS	—	—	—	-1,06
4g	4 / 12 (NS)	8 / 12 ^b	NS	48 ± 3 ^c	0 / 12 (NS)	0 / 12 (NS)	0,90
Phénytoïne							
2,5 mg / kg		2 / 12 (NS)		NS		0 / 12 (NS)	
5 mg / kg		8 / 12 ^b		NS		0 / 12 (NS)	

a: $P \leq 0,05$; b: $P \leq 0,01$; c: $P \leq 0,001$; (NS): non significatif par rapport au lot témoin correspondant.

Tableau III. Activités anticonvulsivantes vis-à-vis d'agents convulsivants chimiques.

Composés	Pentétrazol	Bicuculline		
	No. d'animaux protégés à 100 mg / kg	No. d'animaux protégés à 100 mg / kg		No. de survivants
		Crises cloniques	Crises toniques	
4a	2 / 12 (NS)	0 / 12 (NS)	9 / 12 ^c	8 / 12 ^b
4c	2 / 12 (NS)	0 / 12 (NS)	1 / 12 (NS)	1 / 12 (NS)
4d	8 / 12 ^b	3 / 12 (NS)	8 / 12 ^b	6 / 12 ^a
4e	1 / 12 (NS)	0 / 12(NS)	3 / 12 (NS)	1 / 12 (NS)
4f	2 / 12 (NS)	0 / 12 (NS)	7 / 12 ^b	8 / 12 ^b
4g	2 / 12 (NS)	0 / 12 (NS)	4 / 12 (NS)	2 / 12 (NS)
Phénytoïne	0 / 12 (NS)	0 / 12 (NS)	12 / 12 ^c	6 / 12 ^a

a: $P < 0,05$; b: $P < 0,01$; c: $P < 0,001$; (NS): non significatif par rapport au lot témoin correspondant.

à 50%. La phénytoïne protège tous les animaux des crises toniques et offre un taux de survie comparable. Vis-à-vis des crises cloniques provoquées par la bicuculline, seul le dérivé **4d** assure une légère protection qui n'est toutefois pas significative, la phénytoïne étant totalement inactive.

Du point de vue des relations structure-activité, les composés comportant une fonction hydrazide **4a-g** présentent les effets les plus importants. La longueur de la chaîne carbonée ainsi que la présence d'un halogène sur le noyau phényle ne semblent pas déterminants pour l'activité anti-convulsivante. La majorité des dérivés ont présenté des effets anti-convulsivants notables accompagnés de faibles effets secondaires sédatifs ou ataxiques. Le composé **4d** paraît être le plus intéressant car il manifeste une activité marquée significative dans les différents tests et notamment dans le test au pentétrazol, où la phénytoïne est inactive.

Protocoles expérimentaux

Chimie

La pureté des produits a été vérifiée systématiquement par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 F₂₅₄. Les points de fusion non corrigés ont été déterminés au Bloc Maquenne électrique. Les analyses élémentaires ont été effectuées au Service Central d'Analyses du CNRS de Vernaison; les résultats, qui correspondent aux valeurs théoriques $\pm 0,4\%$, ne figurent pas dans le présent mémoire.

Les spectres IR ont été enregistrés sur un appareil Beckman 4240 et les spectres de RMN ¹H sur un appareil Varian EM 360A, l'étalon interne étant le tétraméthylsilane.

Diaryl-4,6 éthoxycarbonylméthyl-2 pyridazinones-3 **2a, 2b, 2c**

Dans un ballon on introduit 0,02 mol de pyridazinone **1** en solution dans 40 ml d'éthanol absolu. On ajoute une solution d'éthylate de sodium préparée à partir de 0,46 g (0,02 at / g) de sodium dissous dans 20 ml d'éthanol absolu. Le mélange est porté à reflux 30 min. Le milieu réactionnel est ensuite refroidi et on y introduit goutte à goutte 3,34 g (0,02 mol) de bromacétate d'éthyle. On porte à reflux 24 h. Après refroidissement l'ester précipite; il est séparé par filtration, lavé à l'eau puis recristallisé dans l'éthanol.

Diaryl-4,6[(éthoxycarbonyl)-2' éthyl]-2 pyridazinones-3 **2d, 2e, 2f** et diphenyl-4,6[(éthoxycarbonyl)-3' propyl]-2 pyridazinone-3 **2g**

Dans un ballon on ajoute à 0,02 mol de pyridazinone **1** en solution dans 100 ml d'acétone, 0,03 mol de bromopropionate d'éthyle ou de bromobutyrate d'éthyle et 4,14 g (0,03 mol) de carbonate de potassium. Le mélange est maintenu sous agitation et porté 24 h à reflux. Après filtration à chaud, le solvant est évaporé sous vide et le résidu est repris par l'eau ou l'hexane. Le précipité obtenu est recristallisé dans un mélange eau-éthanol.

Diaryl-4,6 carbamoylméthyl-2 pyridazinones-3 **3a, 3b, 3c**

Dans une bombe d'attaque de 25 ml on introduit 0,0045 mol d'ester **2** en suspension dans 15 ml d'ammoniaque concentré additionné de 5 ml d'éthanol. Après fermeture, la bombe est chauffée pendant 24 h à 100°C puis refroidie à 0°C. Le précipité obtenu est séparé par filtration, lavé à l'eau puis recristallisé dans un mélange eau-éthanol.

Diaryl-4,6 carbazoylalkyl-2 pyridazinones-3 **4a-g**

On solubilise 0,01 mol d'ester **2** dans 15 g (0,3 mol) d'hydrate d'hydrazine puis on porte le mélange à reflux 4 h. Après refroidissement le précipité obtenu est recristallisé dans l'éthanol.

Pharmacologie

Nous avons utilisé des souris mâles albinos Iffa-Credo OF1 d'un poids de 20 ± 2 g. Les produits ont été administrés aux animaux, mis à jeun

24 h avant les tests par intubation œsophagienne en solution ou en suspension dans une solution aqueuse à 0,5% d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC). Les animaux ont été répartis pour chaque test en 3 lots de 12: un lot témoin recevant l'HPMC 0,5%, un lot de référence recevant la phénytoïne, un lot traité recevant le produit à tester.

Activité anti-convulsivante

Elle a été appréciée au moyen de trois tests: l'électrochoc supramaximal, le test au pentétrazol et le test à la bicuculline.

Le test de l'électrochoc supramaximal chez la Souris est effectué selon la technique de Krall [8]. Les substances sont administrées 30 min avant l'application d'un électrochoc supramaximal sur la cornée des animaux. L'absence de convulsions toniques représente le critère de protection. Le nombre d'animaux protégés est noté pour chacun des produits aux différentes doses.

Le test au pentétrazol est réalisé selon la méthode décrite par Krall [8] et Swinyard [9]. Les substances sont administrées 30 min avant l'injection par voie sous-cutanée d'une solution de pentétrazol à 0,85% dans du sérum physiologique à raison de 85 mg/kg. L'animal est observé pendant 30 min après l'administration du pentétrazol; le critère de protection est l'absence de crise clonique de plus de 5 s. Le nombre d'animaux protégés est noté pour chacun des produits.

Le test à la bicuculline est effectué selon la méthode de Heyer [10]. Les composés sont administrés dans les mêmes conditions que précédemment mais l'injection de l'agent convulsivant est pratiquée par voie intraveineuse dans la queue de la souris, à la dose de 0,68 mg/kg. On note la survenue ou non des crises convulsives, le type de la crise ainsi que le pourcentage de survie. Pour chacun de ces paramètres le nombre d'animaux protégés est noté.

Activité neurosédative

Elle a été appréciée par l'enregistrement de l'activité motrice spontanée chez la Souris selon la technique de Boissier et Simon [11] à l'aide d'un actimètre photoélectrique Apelex. Les différents produits sont administrés 30 min avant l'évaluation de la motilité spontanée qui est effectuée pendant 10 min en comptabilisant le nombre de traversées des rayons lumineux.

Activité neurotoxique

Elle a été recherchée par le test de la tige tournante ou « rotarod » selon Kinnard et Carr [12] chez la Souris. Les différents produits sont administrés 30 min avant le test; les animaux sont placés sur une tige en bois brut de 3 cm de diamètre tournant à la vitesse de 14 tours par min. On compte le nombre de souris tombant de la tige pendant 5 min.

Évaluation de lipophilie

La lipophilie a été évaluée selon la technique par chromatographie couche mince [13] sur plaque de gel de silice Merck 60 F₂₅₄ en utilisant comme phase mobile le mélange acétate d'éthyle et hexane (50:50). Les R_M ont été calculés à partir des valeurs expérimentales de R_F en utilisant la formule $R_M = \log [(1/R_F) - 1]$.

Les valeurs de R_M les plus faibles correspondent aux produits les plus lipophiles.

Analyse statistique

En ce qui concerne les différents tests de recherche d'une activité anti-convulsivante ainsi que pour le test du rotarod, l'évaluation statistique des résultats a été réalisée par le test du chi-2 (χ^2) avec une correction de Yates. Pour l'étude de l'activité neurosédative, les résultats sont exprimés selon le pourcentage moyen de variation par rapport au lot témoin HPMC. Une analyse de variance à deux facteurs suivie d'un test *t* de Student a été réalisée sur les résultats bruts obtenus.

Remerciements

Nous remercions M. le Professeur Pierre Tronche pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Références

- 1 Pavia M.R., Taylor C.P., Hershenson F.M., Lobbstaël S.J. & Butler D.E. (1988) *J. Med. Chem.* 31, 841-847

- 2 Davies-Jones G.A.B. (1988) in: *Meyler's Side Effects of Drugs—Encyclopedia of Adverse Reactions and Interactions* (Dukes M.N.G., ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 120–136
- 3 Chimirri A., De Sarro A., De Sarro G., Grasso S., Trimarchi G.R. & Zappala M. (1989) *J. Med. Chem.* 32, 93–95
- 4 Kelley J.L., Krochmal M.P., Lin J.A., McLean E.W. & Soroko F.E. (1988) *J. Med. Chem.* 31, 1005–1009
- 5 Nitelea I., Petrovanu M., Rucinski E., Caprosu M., Ciocoiu I., Stefanescu E., Carstea A. & Mihalcea I. *Rom. RO 75 836*; (1983) *Chem. Abstr.* 99, 139 959g
- 6 Nitelea I., Petrovanu M., Rucinski E., Caprosu M., Ciocoiu I., Stefanescu E., Carstea A. & Mihalcea A. (1983) *Rom RO 75 837*; *Chem. Abstr.* 99, 139 960a
- 7 Coudert P., Couquelet J. & Tronche P. (1988) *J. Heterocyclic Chem.* 25, 799–802
- 8 Krall R.L. (1978) *Epilepsia* 19, 409–429
- 9 Swinyard E.A., Brown W.C. & Goodman L.S. (1952) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 106, 319–330
- 10 Heyer E. (1981) *Neurology* 31, 1381–1390
- 11 Boissier J.R. & Simon P. (1965) *Arch. Int. Pharmacodyn.* 158, 212–221
- 12 Kinnard W.J. & Carr C.J. (1957) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 121, 354–361
- 13 Tomlison E. (1975) *J. Chromatogr.* 113, 1–45