

Synthèse et influence de la stéréochimie sur l'activité anticonvulsivante d'aza-1 bicyclo[3.3.0]octanes

L Diafi¹, C Rubat², P Coudert¹, P Bastide², N Margoum¹, P Tronche^{1*}

¹Laboratoire de Chimie Thérapeutique;

²Laboratoire de Pharmacologie et de Pharmacie Clinique, Groupe de Recherche en Pharmacochimie,
Faculté de Pharmacie, 28, place Henri-Dunant, 63001 Clermont-Ferrand Cedex, France

(Reçu le 2 mai 1989; accepté le 20 juillet 1990)

Résumé — De nouveaux aza-1 bicyclo[3.3.0]octanes diastéréoisomères ont été préparés par photochimie. Ils ont été séparés par chromatographie et identifiés par une étude de RMN¹H à 300 MHz. Le dérivé *trans* a présenté des effets anticonvulsivants beaucoup plus marqués que l'isomère *cis*. La modélisation sur écran graphique des deux composés a montré l'importance pour l'activité de la position du noyau aromatique par rapport au plan moyen du système bicyclic.

Summary — **Synthesis and influence of the stereochemistry on anticonvulsant activity of 1-aza[3.3.0]bicyclo-octanes.** *New diastereo-isomeric 1-aza[3.3.0]bicyclo octanes have been prepared by a photochemistry process. They have been separated by chromatography and identified by 300 MHz 1H-NMR study. Trans derivative has shown more marked anticonvulsant effects than cis isomere did. Graphic modelling revealed the importance of the aromatic ring position in relation to bicyclic system for activity.*

1-aza[3.3.0]bicyclooctanes / photochemistry / anticonvulsant / motility / graphic modelling

La nécessité de découvrir de nouveaux agents anticonvulsivants est largement reconnue dans la mesure où plusieurs médicaments actuellement disponibles sur le marché peuvent entraîner des effets indésirables graves de type neuropsychique, hématologique ou hépatotoxique [1]. Les différentes molécules manifestant des propriétés anticonvulsivantes comportent plusieurs similitudes structurales dont la principale semble être la présence d'un hétérocycle azoté [2]. De plus, la plupart de ces composés possède souvent un groupement carbonyle et un noyau aromatique rattaché au système hétérocyclique [3].

Nous avons mis en évidence au cours de travaux antérieurs [4] des effets anticonvulsivants dans une série de dioxothiadiazabicyclo-octanes comportant ces caractéristiques structurales. Poursuivant nos recherches, nous avons préparé de nouveaux dérivés bicyclics azotés et phénylés, possédant une fonction alcool tertiaire à la place d'un groupement carbonyle. L'activité anticonvulsivante de ces composés a été comparée à celles de la phénytoïne, du phénobarbital, du valproate et de la carbamazépine, utilisés comme substances de référence.

Chimie

Les produits étudiés sont préparés à partir de la pyrrolidine *N*-substituée **1** dont la synthèse a été décrite par Schroth [5]. La méthodologie retenue au laboratoire pour édifier le système bicyclic aza-1 bicyclo [3,3,0] octane repose sur la formation du second cycle lactamique par une réaction photochimique. Pour cela, nous avons utilisé une variante de la réaction de Norrish type II [6, 7] basée sur l'arrachement intramoléculaire d'un atome d'hydrogène en α d'un atome d'azote amidique par un carbonyle en position δ (schéma 1).

L'irradiation d'une solution de pyrrolidine *N*-substituée **1** en solution dans le *tert*-butanol conduit au mélange des deux isomères bicyclics **3** et **4** avec un rendement global de 60%. Dans un deuxième temps, il nous a été possible de séparer ce couple de diastéréoisomères par chromatographie-flash sur colonne de gel de silice.

Les spectres infra-rouges des deux composés préparés présentent une bande d'absorption à 3380 cm⁻¹ attribuable à la fonction alcool et une bande à 1690 cm⁻¹ due au carbonyle de la fonction lactame. Leur stéréochimie a été déterminée par la mesure en

*Correspondance et tirés à part

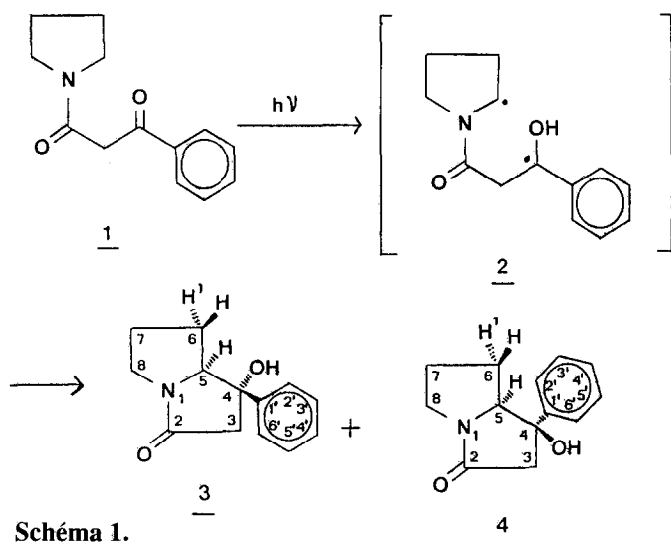


Schéma 1.

RMN ^1H à haut champ 300 MHz des effets de solvants induits par le groupement hydroxyle sur l'hydrogène en position 5. La validité de cette méthode a été largement démontrée, en particulier dans le cas d'azabicyclo x, y, o alcanes de structure voisine [7, 8] pour lesquels l'effet de solvant mesuré $\Delta_{\text{C}_5\text{D}_5\text{N}}^{\text{CDCl}_3} = \delta_{\text{CDCl}_3} - \delta_{\text{C}_5\text{D}_5\text{N}}$ est de l'ordre de $-0,20$ ppm pour l'isomère *cis* (H en 5 et OH en 4 du même côté par rapport en plan moyen de la molécule) et pratiquement nul pour l'isomère *trans* (H en 5 et OH en 4 de part et d'autre du plan moyen de la molécule). Les déplacements chimiques et les effets de solvant observés sont consignés dans le tableau I.

Les résultats montrent que le composé 3 est l'isomère *cis*, H en position 5 et OH du même côté du bicycle azoté ($\Delta_{\text{C}_5\text{D}_5\text{N}}^{\text{CDCl}_3} = -0,20$ ppm) et que le composé 4 est l'isomère *trans*, H en 5 et OH de part et d'autre du bicycle ($\Delta_{\text{C}_5\text{D}_5\text{N}}^{\text{CDCl}_3} = -0,00$ ppm).

Les spectres COSY de RMN ^1H conduisent aux filiations suivantes pour le composé 3: H(5) (4,20) – H(6) (0,78) – H(6', 7) (1,60) – H(7') (1,80) – H(8) (3,48) – H(8') (3,05), et pour le composé 4: H(5) (4,20) – H(6) (1,78) – H(6', 7, 7') (2,10) – H(8) (3,10) – H(8') (3,70).

Tableau I. Effets de solvant sur l'hydrogène en position 5.

Composés	Solvants		
	CDCl_3 δ ppm	$\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ δ ppm	$\Delta_{\text{C}_5\text{D}_5\text{N}}^{\text{CDCl}_3}$
3	4,18	4,38	$-0,20$
4	4,21	4,22	$-0,00$

La différenciation entre H(6) et H(6') a été réalisée par l'étude de l'effet NOE à partir de H(5): augmentation du signal de H(6') de 4% pour le composé 3 et de 8% dans le cas du composé 4. La valeur de blindage particulièrement élevée de H(6) dans le cas du dérivé 3 ($\delta = 0,78$) s'explique par l'effet d'anisotropie exercé par le cycle benzénique situé en position 4.

Résultats et Discussion

Les deux isomères testés n'ont pas montré de toxicité aiguë par voie orale aux doses utilisées: ils ont en effet une DL_{50} supérieure à 800 mg/kg.

Dans un premier temps, l'activité anticonvulsivante a été recherchée chez la souris par le test de l'électrochoc supramaximal sur la cornée. L'isomère 4 présente une activité non négligeable avec une DE_{50} de 38 mg/kg alors que le dérivé *cis* est peu actif, sa DE_{50} étant supérieure à 100 mg/kg (tableau II). La phénytoïne pour sa part est particulièrement active dans ce test avec une DE_{50} de 4 mg/kg. Nous avons ensuite recherché une éventuelle protection des animaux vis-à-vis d'agents convulsivants chimiques, le pentétrazol, la bicuculline, la strychnine et la trémorine (tableau II). Dans ces 4 derniers tests, les composés essayés ont été administrés à la dose de 100 mg/kg *per os*. Vis-à-vis des crises provoquées par le pentétrazol, aucun des deux isomères n'a révélé d'activité significative, seule une légère augmentation du temps d'apparition des crises a été notée. Dans ce test, la phénytoïne est inactive à la dose de 100 mg/kg, alors que le phénobarbital, la carbamazépine et le diazépam présentent respectivement des DE_{50} de 15, 17,5 et 0,5 mg/kg *po*. Le dérivé 3 protège 42% des animaux des crises toniques induites par la bicuculline alors que le 4 n'assure qu'une légère protection qui n'est toutefois pas significative. Vis-à-vis des crises cloniques provoquées par la bicuculline, seul l'isomère *trans* assure un taux de protection marqué de 50%, le composé 3 et la phénytoïne étant inactifs. En ce qui concerne le taux de survie des animaux dans ce dernier test, l'isomère 4 utilisé à la dose de 100 mg/kg est comparable à une dose de 200 mg/kg de valproate avec respectivement 75 et 80% d'animaux survivants. Le dérivé *cis* et la phénytoïne offrent pour leur part un taux de survie égal à 50%, le diazépam demeurant le plus actif avec un taux de 90% à 0,75 mg/kg *po*. Par ailleurs, les deux isomères n'ont montré aucune protection des animaux vis-à-vis des crises toniques à la strychnine et des tremblements induits par la trémorine (tableau II). De plus, aucun effet n'a été noté sur la sialorrhée provoquée par la trémorine. Dans ces deux derniers tests, la carbamazépine a présenté à la dose de 100 mg/kg une activité significative en assurant aux animaux une protection au moins égale à 70%, le diazépam pour sa part s'est montré particulièrement actif avec une DE_{50} de l'ordre de 1 mg/kg.

Tableau II. Toxicité aiguë, activités anticonvulsivante et neurosédative des isomères **3** et **4**.

Composés	DL ₅₀ mg/kg	Electrochocs DE ₅₀ mg/kg	Pentetrazol % d'animaux protégés à 100 mg/kg	Bicuculline % d'animaux protégés à 100 mg/kg	Crises cloniques	Crises toniques	% de Survivants à 100 mg/kg	Strychnine % d'animaux protégés à 100 mg/kg	Trémorine % d'animaux protégés à 100 mg/kg	20	Motilité spontanée +: augmentation -: diminution 50 (mg/kg)	100
3 cis	800	> 100	0	8 (NS)	42*	50*	0	0	0	4 ± 3 (NS)	7 ± 5 (NS)	- 1 ± 1 (NS)
4 trans	800	38(28-52) ^a	0	50*	25 (NS)	75***	0	0	0	17 ± 5**	18 ± 4**	41 ± 3***
Phénytoïne	Non testé	4,0(3,0-5,3) ^a	0	0	100***	50*	0	0	0	- 14 ± 5*	- 10 ± 4*	- 15 ± 5*
Phénobarbital	Non testé	4,6(3,0-7,0) ^a	15,0(13,4-16,8) ^a	50* ^b	90*** ^b	80*** ^b	0	DL à 100 mg/kg	(+)	13,0(6,1-27,6) ^a		
Valproate	Non testé	> 100	20 (NS)	50* ^c	80*** ^c	80*** ^c	0	0	(+)	210,0(133,7-331,1) ^a		
Carbamazépine	Non testé	5,5(4,6-6,5) ^a	17,5(12,1-25,2) ^a	0	100***	100***	70***	75***	- 6 ± 4 (NS)	- 8 ± 4 (NS)	- 20 ± 7*	
Diazepam	Non testé	4,0(3,4-4,8) ^a	0,5(0,3-0,8) ^a	80*** ^d	90*** ^d	90*** ^d	1,1(0,6-1,8) ^a	1,0(0,8-1,2) ^a	(-)	5,3(3,8-7,3) ^a		

^aDE₅₀ avec intervalle de confiance à 95%; ^btesté à 20 mg/kg; ^ctesté à 200 mg/kg; ^dtesté à 0,75 mg/kg; **P* ≤ 0,05; ***P* ≤ 0,01; ****P* ≤ 0,001; NS: non significatif.

Dans le test de la motilité spontanée, seul le composé **4** a manifesté un effet excitant marqué à 100 mg/kg, l'autre isomère étant totalement inactif dans ce test.

L'ensemble des résultats pharmacologiques met en évidence une différence de comportement assez nette entre les deux diastéréoisomères. L'activité anticonvulsivante qui pouvait être attendue compte tenu de la structure chimique des deux composés a bien été retrouvée; cependant l'activité de l'isomère **4** est nettement plus marquée que celle du dérivé **3**. De plus, la protection assurée aux animaux par les deux composés dans le test à la bicuculline est en faveur d'une action possible de ceux-ci sur la transmission GABA ergique, hypothèse déjà formulée à propos de la phénytoïne [9, 10]. Par ailleurs, aux doses auxquelles le composé **4** manifeste sa plus grande activité, il n'a pas été observé d'effet toxique ni d'effet sédatif.

Afin de mieux visualiser l'influence de la stéréochimie de ce type de structure sur l'activité anticonvulsivante, nous avons réalisé une première étude conformationnelle de nos composés à l'aide du programme informatique ALCHEMY II [11]. La figure 1 représente les deux isomères sous leur conformation énergétique la plus basse (composé **3**: *E* = 3,6 kcal/mol, composé **4**: *E* = 4,1 kcal/mol). On remarque immédiatement une disposition spatiale totalement différente du noyau aromatique par rapport au plan moyen du système azabicyclique. Les valeurs de couplage *J*₃ (H-C₅-C₆-H) différentes pour les deux isomères (partie expérimentale) semblent indiquer que le passage du phényle d'une face à l'autre de la molécule se traduit par une déformation de celle-ci et en particulier par une modification des angles dièdres

autour de la liaison C₅-C₆. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué la valeur de ces angles à l'aide du programme ALCHEMY et par l'équation de Karplus [12] (tableau III).

Quelle que soit la méthode de calcul utilisée, les valeurs trouvées pour les angles de torsion autour de la liaison C₅-C₆ ne diffèrent pas significativement pour les 2 isomères. La position du noyau aromatique par rapport au reste de la molécule dans le dérivé **4**, pourrait alors être plus importante dans l'émergence d'effets anticonvulsivants que l'isomérisation *cis-trans* en elle-même.

Protocoles expérimentaux

Chimie

La pureté des produits a été vérifiée systématiquement par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 F 254. Les points de fusion non corrigés ont été pris au microscope à platine chauffante Reichert. Les analyses élémentaires ont été effectuées au Service Central d'Analyse du CNRS de Vernaion; les résultats qui correspondent aux valeurs théoriques ± 0,4%, ne figurent pas dans le présent mémoire.

Les spectres IR ont été enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer 377 et les spectres de RMN ¹H sur un appareil Bruker 300 MSL. Les spectres de RMN du ¹³C ont été réalisés sur un appareil Jeol FX 60. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (δ) par rapport au tétraméthylsilane pris comme référence interne.

Préparation des aza-1 oxo-2 hydroxy-4 phényle-4 bicyclo[3.3.0]octanes **3** et **4**

Une solution de 1,2 g (0,0055 mol) de composé **1** dans 280 ml de *tert*-butanol est placée dans un réacteur en Pyrex puis irra-

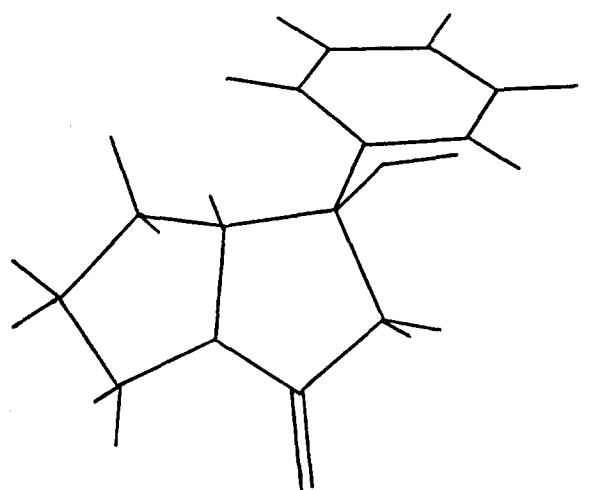
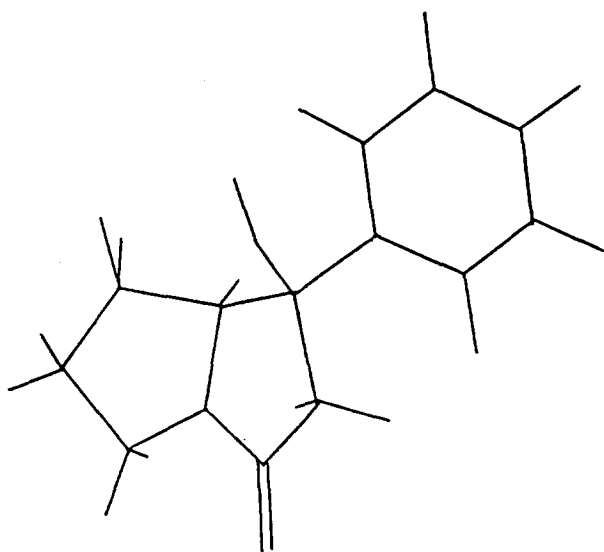
3: isomère *cis*4: isomère *trans*

Fig 1.

diée pendant 20 h au moyen d'une lampe à vapeur de mercure moyenne pression de 250 W. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié une première fois par chromatographie-flash sur colonne de gel de silice en utilisant l'acétate d'éthyle comme éluant. On isole ainsi 0,72 g (Rendement 60%) du mélange d'alcools isomères 3 et 4. Ces deux couples de diastéréoisomères sont ensuite séparés par une deuxième chromatographie-flash sur colonne de gel de silice en utilisant de nouveau l'acétate d'éthyle comme éluant.

Isomère cis 3. 0,33 g, Rdt = 27%, F = 118–119°C. RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm: 0,78 (m, 1H, CH en 6); 1,60 (m, 2H, CH' en 6 et CH en 7); 1,80 (m, 1H, CH en 7); 2,80 (s, 1H, OH échange avec D_2O); 3,05 (d, 1H, CH en 3, $J = 16,0$ Hz); 3,05 (m, 1H,

Tableau III. Valeurs approchées des angles dièdres autour de la liaison $\text{C}_5\text{-C}_6$ des isomères 3 et 4.

Angle dièdre	Méthode de calcul	Angle ($^\circ$)	
		3	4
H- $\text{C}_5\text{-C}_6\text{-H}$	Karplus	172	152
	ALCHEMY	167	168
H- $\text{C}_5\text{-C}_6\text{-H}'$	Karplus	23	23
	ALCHEMY	43	44

CH' en 8); 3,20 (d, 1H, CH en 3, $J = 16,0$ Hz); 3,48 (m, 1H, CH en 8); 4,20 (q, 1H, CH en 5, $J = 9,0$ et $7,0$ Hz); 7,40 (s, 5H, Ar).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm: 26,2 (C_6 et C_7); 41,8 (C_3); 50,2 (C_8); 73,0 (C_5); 78,6 (C_4); 125,5 (C_3' et C_5'); 127,8 (C_4'); 128,4 (C_2' et C_6'); 142,9 (C_1'); 173,0 (C_2).

Isomère trans 4. 0,20 g, Rdt = 17%, F = 175–176°C. RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm: 1,78 (m, 1H, CH en 6); 2,10 (m, 3H, CH' en 6 et CH_2 en 7); 2,70 (d, 1H, CH en 3, $J = 19,2$ Hz); 2,90 (s, 1H, OH échange avec D_2O); 3,10 (m, 1H, CH en 8); 3,50 (d, 1H, CH en 3, $J = 19,2$ Hz); 3,70 (m, 1H, CH' en 8); 4,20 (t, 1H, CH en 5, $J = 7,0$ Hz); 7,35 (m, 5H, Ar).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ ppm: 25,2 (C_7); 37,8 (C_6); 40,5 (C_3); 48,6 (C_8); 69,5 (C_5); 76,5 (C_4); 124,1 (C_3' et C_5'); 125,5 (C_4'); 126,6 (C_2' et C_6'); 142,0 (C_1'); 171,3 (C_2).

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 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 recevant la substance de référence, un lot traité recevant le produit à tester.

Toxicité aiguë

Elle a été recherchée par voie orale chez la souris. Les animaux maintenus dans une pièce à 20°C éclairée par la lumière du jour, sont observés par groupes de 6 pendant 24 h. Les survivants sont maintenus dans les mêmes conditions pendant une semaine.

Activité anticonvulsivante

Elle a été appréciée au moyen de 5 tests: l'électrochoc supramaximal, les tests au pentétraol, à la bicuculline, à la strychnine et le test à la trémorine.

Le test de l'électrochoc supramaximal chez la souris est effectué selon la technique de Krall [13]. 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 test au pentétraol est réalisé selon la méthode décrite par Krall [13] et Swinyard [14]. Les substances sont administrées 30 min avant l'injection sc d'une solution de pentétraol à 0,85% dans du sérum physiologique à raison de 85 mg/kg.

L'animal est observé pendant 30 min après l'administration du pentétilazol; le critère de protection est l'absence de crise clonique.

Le test à la bicuculline est effectué selon la méthode de Heyer [15]. Les composés sont administrés dans les mêmes conditions que précédemment mais l'injection de l'agent convulsivant est pratiquée iv dans la queue de la souris, à la dose de 0,68 mg/kg. On note la survenue de crises convulsives, le type de la crise ainsi que le pourcentage de survie.

Le test à la strychnine est réalisé selon la technique de Gouret [16]. Trente minutes après l'administration des substances à étudier, on injecte aux animaux sc une solution de strychnine à raison de 1,5 mg/kg. L'animal est observé pendant 1 h; l'absence de convulsions toniques représente le critère de protection.

Le test à la trémorine est effectué selon la méthode de Gouret [17]. Les substances sont administrées 30 min avant l'injection sc d'une solution de trémorine à raison de 50 mg/kg. Trente minutes après l'administration du cholinomimétique, l'intensité des tremblements est cotée de 0 à 3. L'effet de chaque substance est rapporté à celui des témoins puis exprimé en pourcentage. De plus, l'action des substances étudiées sur la sialorrhée provoquée par la trémorine est notée.

Activité motrice

Le test d'actimètre est effectué selon la technique de Boissier et Simon [15] à l'aide d'un actimètre photoélectrique Apelex. Les 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.

Analyse statistique

Les DE_{50} ont été calculées selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon [19]. L'évaluation statistique des résultats exprimés en pourcentage d'activité anticonvulsivante a été réalisée par le test du 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

Les auteurs remercient JC Gramain pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et G Dauphin pour sa participation à l'analyse des spectres de RMN.

Références

- 1 Davies-Jones GAB (1988) In: *Meyler's side effects of drugs - Encyclopedia of adverse reactions and interactions* (Dukes MNG, ed) Elsevier, Amsterdam, 120–136
- 2 Chimirri A, De Sarro A, De Sarro G, Grasso S, Trimarchi GR, Zappala M (1989) *J Med Chem* 32, 93–95
- 3 Kelley JL, Krochmal MP, Linn JA, Mc Lean EW, Soroko FE (1988) *J Med Chem* 31, 1005–1009
- 4 Papon MJ, Refouvelet B, Bastide P, Bastide J, Tronche P (1986) *Eur J Med Chem Chim Ther* 21, 355–358
- 5 Schroth W, Spitzner R, Hugo S (1982) *Synthesis* 199–203
- 6 Wagner PJ (1971) *Accounts Chem Res* 4, 168–177
- 7 Gramain JC, Ouazzani-Chahdi L, Troin Y (1988) *Tetrahedron Lett* 3185–3188
- 8 Azzouzi A, Dufour M, Gramain JC, Remuson R (1988) *Heterocycles* 27, 133–148
- 9 Lee B, Lundberg F, Olsen RW (1982) *Mol Pharmacol* 2, 320–324
- 10 Krogsaard-Larsen P (1981) *J Med Chem* 24, 1377–1383
- 11 ALCHEMY Version II (1988) *Tripos Associates Inc*, Saint-Louis, MO 63117, USA
- 12 Karplus M (1959) *J Chem Phys* 30, 11–15
- 13 Krall RL (1978) *Epilepsia* 19, 409–429
- 14 Swinyard EA, Brown WC, Goodman LS (1952) *J Pharmacol Exp Ther* 106, 319–330
- 15 Heyer E (1981) *Neurology* 31, 1381–1390
- 16 Gouret C, Linee P (1972) *J Pharmacol (Paris)* 3, 57–72
- 17 Gouret C (1973) *J Pharmacol (Paris)* 4, 105–128
- 18 Boissier JR, Simon P (1965) *Arch Int Pharmacodyn Ther* 158, 212–221
- 19 Litchfield JT, Wilcoxon F (1949) *J Pharmacol Exp Ther* 96, 99–113