

## ETUDE DES RELATIONS ENTRE LA STRUCTURE CRISTALLINE ET L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE MOLECULES DES SERIES DI- ET TRIALCOYL ACETIQUES

BERNARD FERRANDES,<sup>1</sup> CLAUDINE COHEN-ADDAD,<sup>2</sup> JEAN-LOUIS BENOIT-GUYOD<sup>3</sup> et  
PIERRE EYMARD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> C.R.E.P.S.-26, rue Prosper-Mérimeé-38030-Grenoble; <sup>2</sup> Laboratoire de Spectrométrie Physique, B.P. n° 53-38041 Grenoble Cedex; <sup>3</sup> Laboratoire de Chimie et Toxicologie, UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Grenoble, avenue de Verdun-38240-Meylan, France

(Received 14 February 1974; accepted 13 May 1974)

**Abstract**—Dipropylacetic and tripropylacetic acids are anticonvulsant drugs which inhibit GABA-transaminase (GABA-T) competitively with regard to 4-aminobutyric acid (GABA). This is compared to the inhibition observed with carboxylic acids,  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{n-2} - \text{COOH}$  ( $3 \leq n \leq 8$ ). Several DPA and TPA derivatives have been synthesized and their crystal structure have been determined by X-ray diffraction. The results show a structural analogy between these compounds and the two preferential conformations of GABA, one planar, the other corresponding to a non planar, folded chain. The calculation of conformational energies for isolated molecules shows that this analogy may exist for molecules in solution. The role played by the two conformations of GABA and its structural analogues in their activities on central nervous system is discussed in relation to previous results.

SI LA présence de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) dans le système nerveux central des vertébrés a été décrite dès 1950,<sup>1</sup> ce n'est que quinze ans plus tard que la mise en évidence de son implication dans l'inhibition postsynaptique a débuté. Il a été montré:

- (i) Que le GABA produit une hyperpolarisation et un accroissement de la conductance des neurones centraux;<sup>2</sup>
- (ii) Que la picrotoxine et la bicuculline qui bloquent l'action dépressive du GABA, bloquent aussi l'inhibition postsynaptique du GABA;<sup>3-5</sup>
- (iii) Que le GABA est libéré du cortex, au niveau du quatrième ventricule, durant l'inhibition synaptique.

Par ailleurs, différents résultats obtenus à l'aide de techniques neurophysiologiques<sup>6</sup> renforcent l'hypothèse que le GABA est un neuromédiateur impliqué dans l'inhibition présynaptique de l'activité spinale.

La chute du taux de GABA provoquée par certaines drogues inhibitrices de la glutamate-décarboxylase (GAD): allylglycine, acide-3-mercapto-propionique, thiosemicarbazide, conduit à des crises convulsives.<sup>7-9</sup> On connaît cependant des drogues convulsivantes, dont le pentylénététrazol, qui ne modifient pas le taux cérébral de GABA.<sup>10</sup> D'autre part, certains produits (hydroxylamine, hydrazine) qui augmentent de façon plus ou moins importante le taux cérébral de GABA, ne permettent pas d'antagoniser les crises convulsives provoquées par la chute du taux de GABA.<sup>11</sup>

Godin *et al.*<sup>12</sup> ont observé que le propyl-2-valérate de sodium (dipropylacétate de sodium, DPA) augmente de façon importante le taux cérébral de GABA. Malgré les restrictions que nous évoquions ci-dessus, ces auteurs ont tenté de rapprocher cette observation du fait que le DPA est un anticonvulsivant antiépileptique.

Au cours de ce travail, nous avons vérifié que l'augmentation du taux intracérébral de GABA provoquée par le DPA avait pour origine une inhibition de la  $\gamma$ -aminobutyrate- $\alpha$ -cétoglutarate-transaminase (GABA-T), enzyme responsable de la dégradation du GABA.

Nous avons ensuite recherché si cette inhibition pouvait être provoquée par différents acides gras linéaires à courtes chaînes ou par deux acides gras disubstitués en  $\alpha$ : le dipropyl 2-2 valérate de sodium (tripropylacétate, TPA) et le méthyl 2 éthyl 2 valérate de sodium (méthyl éthyl propyl acétate, MEPA).

La mise en évidence d'une inhibition compétitive de la GABA-T nous a conduit à rechercher une analogie structurale entre GABA, DPA et TPA. La détermination des structures cristallines des dérivés du DPA et du TPA par diffraction des rayons X fera l'objet de la seconde partie de ce travail; ces structures ont été comparées à celles du GABA.

## MATERIEL ET METHODES

### (1) Méthodes biochimiques

(a) L'étude de l'inhibition de la GABA-T a été réalisée à l'aide de Gabase bactérienne (Worthington): cet extrait acellulaire contenant la  $\gamma$ -aminobutyrate transaminase (GABA-T) et la succino-semi aldéhyde deshydrogénase (SSADH) permet de suivre la vitesse de dégradation du GABA par enregistrement spectrophotométrique de la vitesse de réduction du  $\text{NADP}^+$  à 340 nm. La méthode employée, dérivée de celle de Jacoby<sup>13</sup> permet:

- (i) De déterminer la valeur de la constante d'affinité  $K_M$  de la GABA-T vis à vis du GABA (mesures réalisées à concentrations limitantes de GABA et saturantes d' $\alpha$ -cétoglutarate);
- (ii) De déterminer la valeur de la constante d'inhibition  $K_I$  de la GABA-T vis à vis de différents inhibiteurs.

(b) *Matériel et produits utilisés.* Spectrophotomètre UV Lerès S66 munis d'une tourelle enzymatique thermostatée à 30° et d'un spillog permettant l'impression automatique de la densité optique au millième près; sulfate de sodium, Prolabo RP; tris hydroxyméthyl amino méthane, Prolabo pur; 2 mercapto-éthanol, Fluka, puriss, p.a.; Acide  $\alpha$ -cétoglutarique, Merck;  $\text{NADP}^+$ : Boehringer; GABA, BDH, > 99%; les différents inhibiteurs ont été obtenus au CREP (Grenoble) ou chez différents fabricants (Fluka, Aldrich ...).

### (2) Synthèses chimiques des dérivés du DPA et du TPA étudiés par diffraction des rayons X<sup>14-17</sup>

L'identité de chaque composé est confirmée par les résultats de microanalyse et les spectres infra-rouge. Les résultats des analyses élémentaires portant sur carbone, hydrogène et azote ne sont pas publiés, étant conformes aux normes admises. Les spectres infra-rouge ont été déterminés sous forme de pastilles dans le bromure de potassium sur spectrophotomètre Beckman IR 8. Les points de fusion ont été déterminés en tube capillaire sur un appareil automatique Mettler FP1.

(a) *Préparation du dipropylacétamide*. A 20 ml d'ammoniaque 15 N (0,3 M) contenus dans un erlenmeyer refroidi au bain de glace, on ajoute 30 m-moles (4,9 g) de chlorure de dipropyle acétyle en 5 min. Le mélange réactionnel est agité 30 min puis dilué par 20 ml d'eau glacée. Les cristaux obtenus sont séparés, lavés par un peu d'eau glacée, essorés puis recristallisés dans de l'éthanol à 50°.

$F = 126^\circ$        $R = 78\%$

Aiguilles blanches, peu solubles dans l'eau froide, soluble dans l'eau bouillante et les solvants organiques.

(b) *Préparation du N-méthyl dipropylacétamide*. On fait agir 30 m-moles (4,9 g) de chlorure de dipropyl acétyle en solution dans 30 ml de benzène sur 60 m-moles (1,9 g) de méthylamine anhydre refroidie à 10°, en solution dans 30 ml de benzène. Le précipité de chlorhydrate est séparé, la solution benzénique lavée trois fois à l'eau, séchée, évaporée.

Le résidu est recristallisé deux fois dans l'éthanol à 96°.

$F = 108,7^\circ$        $R = 81\%$

Aiguilles blanches, solubles dans les solvants organiques, insolubles dans l'eau.

(c) *Préparation du N-propyl dipropylacétamide*. Il est préparé comme le produit précédent.

$F = 73,4^\circ$        $R = 64\%$

Poudre cristalline blanche, soluble dans les solvants organiques, insoluble dans l'eau.

(d) *Préparation du chloro-4-dipropyl acétamide*. On fait agir 30 m-moles (4,9 g) de chlorure de dipropyl acétyle en solution dans 30 ml de benzène sur 60 m-moles (7,7 g) de chloro-4 aniline en solution dans 60 ml de benzène.

Le précipité est séparé. Il est trituré avec de l'eau plusieurs fois pour dissoudre le chlorhydrate de chloro-4 aniline. Le résidu d'anilide insoluble est mis de côté.

La solution benzénique est lavée à l'eau jusqu'à absence de chlorure, séchée, évaporée. Le résidu d'évaporation est recristallisé deux fois dans l'éthanol à 96° puis joint au résidu insoluble du précipité précédent. Le tout est recristallisé dans l'alcool à 96°

$F = 170,4^\circ$        $R = 89\%$

Aiguilles blanches, solubles dans les solvants organiques, insolubles dans l'eau.

(e) *Préparation du chloro-2-trifluorométhyl-5-dipropyl acétanilide*. Il est préparé comme le produit précédent.

$F = 92^\circ$        $R = 63\%$

Poudre cristalline blanche, soluble dans les solvants organiques et insoluble dans l'eau.

(f) *Préparation du tripropylacétamide*. Il est préparé à partir du chlorure de tripropylacétyle de la même manière que le dipropylacétamide.

$F = 70^\circ$        $R = 72\%$

(g) *Préparation du N-propyl-tripropylacétamide*. Il est préparé à partir du chlorure de tripropylacétyle de la même manière que le N-propyl dipropylacétamide.

$F = 73^\circ$        $R = 68\%$

### (3) Méthodes de détermination des structures par diffraction des rayons X

Des monocristaux, prismatiques ou en forme d'aiguilles, incolores, de dimensions 0,2 à 0,4 mm cristallisent par évaporation de solutions des composés dans l'alcool éthylique.

Les structures ont été déterminées à partir des intensités diffractées par un monocristal, mesurées avec un diffractomètre automatique à quatre cercles Siemens.\* 800 à 2000 intensités sont utilisées, selon le composé. Les méthodes de résolution des structures sont classiques: La méthode de l'atome lourd pour les dérivés comportant un atome de brome ou de chlore, une méthode directe de multisolutions pour les autres composés permettent de localiser les atomes dans la maille cristalline.<sup>18</sup> Des affinements par une méthode de moindres carrés ajustent les intensités diffractées calculées aux intensités observées expérimentalement, et conduisent au modèle final de la structure.

#### (4) *Calculs d'énergies de conformation*

L'énergie de conformation d'une molécule est représentée dans un modèle classique de potentiels par la somme de quatre termes représentant respectivement les énergies de vibration, de déformation angulaire, de torsion et de Van der Waals.<sup>19</sup> Les trois premiers termes restent constants pour les différentes conformations d'une même molécule où, d'une part les longueurs des liaisons et les angles de valence sont maintenus fixes, et d'autre part les angles dièdres varient par pas de 120° à partir de la conformation initiale de façon à maintenir l'énergie de torsion à sa valeur minimale.<sup>19</sup>

Seul le terme représentant l'énergie de Van der Waals entre atomes non liés traduit de façon significative la différence entre deux conformations. Cette énergie s'exprime par la relation:

$$E_w = A/r^6 + B \exp(-Cr)$$

où  $r$  est la distance interatomique,  $A$ ,  $B$ ,  $C$  des constantes empiriques.<sup>19</sup>

Les calculs de l'énergie de Van der Waals effectués sur ordinateur† permettent de vérifier si la conformation d'une molécule observée à l'état cristallin, correspond à un minimum de l'énergie pour la molécule isolée (à l'état gazeux). Dans ce cas, le résultat doit être valable à l'état intermédiaire, pour les molécules en solution.

## RESULTATS

### (1) *Etude de l'inhibition de la GABA-T*

#### (a) *Inhibition de la GABA-T par le DPA*

A titre d'exemple, les résultats expérimentaux obtenus sont résumés sur la Fig. 1. L'inhibition de la GABA-T par le DPA est du type compétitif linéaire; la représentation des résultats en coordonnées  $1/v = f(I)$ , permet d'obtenir une constante d'inhibition  $K_I = 2$  mM. Cette valeur étant du même ordre de grandeur que la constante d'affinité de la GABA-T pour le GABA ( $K_M = 1,5$  mM), le DPA s'avère donc être un bon inhibiteur de cet enzyme. Ces résultats sont en accord avec de récentes mesures.<sup>20</sup>

\* Toutes les mesures ont été effectuées à l'Institut Laïe Langevin, Grenoble. Nous remercions M. Thomas pour son assistance technique.

† Nous remercions vivement H. Foucher et Y. Brunel, du Centre d'Etudes Nucléaires, Grenoble, France, pour leur aide dans l'utilisation du programme de calcul des énergies de conformation.

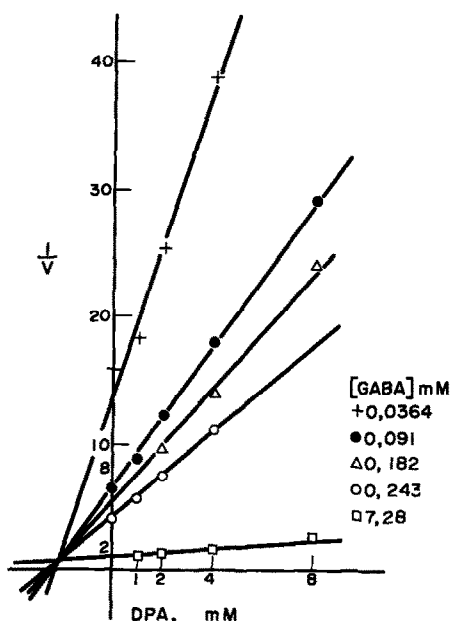


FIG. 1. Etude de l'inhibition compétitive de la GABA-T par le dipropylacétate de sodium (DPA): détermination graphique de la constante d'inhibition  $K_I$ . Le GABA a été utilisé aux concentrations respectives de 0,0364 (+), 0,091 (●), 0,182 (Δ), 0,243 (○) et 7,28 (□) mM pour juger de l'action de l'inhibiteur; la vitesse de réaction est exprimée en  $\Delta DO$  340 nm/10 min.

(b) *Inhibition de la GABA-T par différents acides carboxyliques linéaires*

Le DPA pouvant être considéré comme un dérivé de l'acide valérique, nous avons recherché si l'inhibition de la GABA-T pouvait être obtenue à l'aide d'acides gras linéaires à courtes chaînes: de  $C_3$  à  $C_8$ .

Les courbes  $1/v = f(I)$ , obtenues pour ces différents acides, sont similaires à celles présentées pour le DPA; les différentes constantes d'inhibition  $K_I$  ainsi calculées sont données dans le Tableau 1. La représentation graphique des résultats obtenus sous la forme  $\log_{10} K_I = f(\text{nombre d'atomes de carbone})$ , permet d'obtenir une droite pour les acides de 4 à 8 atomes de carbone (Fig. 2).

TABLEAU 1. ETUDE DE L'INHIBITION DE LA GABA-T PAR LES ACIDES CARBOXYLIQUES LINÉAIRES  $CH_3-(CH_2)_{n-2}-COOH$  ( $3 \leq n \leq 8$ )

Nombre de carbones (n)		3	4	5	6	7	8
Longueur de la chaîne carbonée (Å)	$C_n-O_1$	2,70	4,24	5,06	6,53	7,54	8,94
	$C_n-O_2$	3,69	4,92	6,18	1,43	8,69	9,94
$K_I$		1,6	0,8	1,5	3,5	66	12
$\log_{10} K_I$		0,204	-0,097	0,176	0,544	0,778	1,079

Les longueurs  $C_n-O$  sont calculées dans un modèle idéal des chaînes étendues ( $C-C = 1,54$  Å,  $C-O = 1,25$  Å).

La constante d'inhibition  $K_I$  est exprimée en mM.

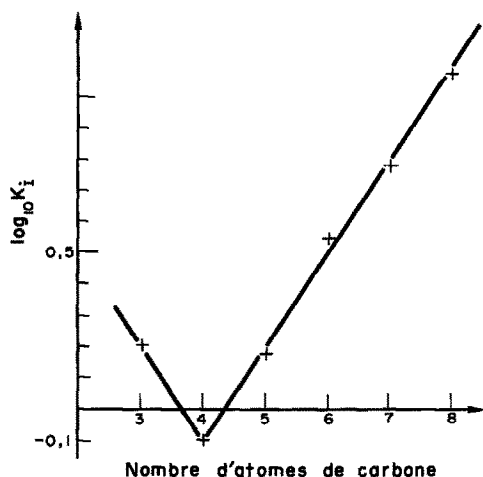


FIG. 2. Evolution de la constante d'inhibition de GABA-T mise en présence de différents acides carboxyliques linéaires  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n-2}-\text{COOH}$  en fonction de la longueur de la chaîne carbonée ( $3 \leq n \leq 8$ ).

Dans ces limites, il existe donc une relation liant la structure des molécules utilisées à la puissance de l'inhibition qu'elles produisent sur la GABA-T. Il ne nous semble pas exclu que cette relation soit en rapport direct avec le coefficient de partage des acides gras concernés. L'acide butyrique se révèle être le meilleur inhibiteur de l'enzyme. La constante d'inhibition obtenue au cours de nos essais ( $K_I = 0,8 \text{ mM}$ ) est proche de celle de la GABA-T du cerveau de rat obtenue à l'aide de l'acide 4-amino-tétrolique ( $K_I = 0,58 \text{ mM}$ ).<sup>21</sup>

Par ailleurs, il est remarquable de constater qu'il existe une excellente corrélation entre l'activité de la GABA-T de cerveau de boeuf mise en présence de différents substrats (GABA), acide  $\delta$ -aminovalérique, acide  $\epsilon$ -aminocaproïque<sup>22</sup> et l'inhibition de

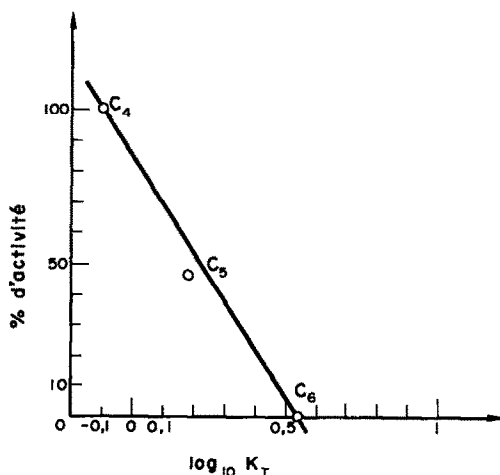


FIG. 3. Corrélation entre l'activité de la GABA-T de cerveau de boeuf<sup>22</sup> mise en présence de différents acides aminés substrats (GABA, acide  $\delta$  amino valérique, acide  $\epsilon$  amino caproïque) et la constante d'inhibition de la GABA-T bactérienne utilisée ici mise en présence des acides carboxyliques correspondants (acide butyrique, valérique, caproïque).

TABLEAU 2. ACTIVITÉ RELATIVE DE LA GABA-T DE CERVEAU DE BOEUF<sup>22</sup> EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS SUBSTRATS (ACIDES  $\alpha$ -AMINÉS) ET INHIBITION DE L'ENZYME PAR LES INHIBITEURS CORRESPONDANTS (ACIDES CARBOXYLIQUES) OBTENUS EN SUPPRIMANT LA FONCTION AMINE

Donneur du groupe aminé au niveau de la GABA-T	Activité relative de la GABA-T	Inhibiteur correspondant	Constante d'inhibition de la GABA-T, $K_i$
$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$ , GABA	100	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ acide butyrique	0,8
$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$	46	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$ acide valérique	1,5
$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$ acide $\epsilon$ -amino caproïque	0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ acide caproïque	3,5

la GABA-T utilisée ici lorsque celle-ci est mise en présence des inhibiteurs correspondants, obtenus en supprimant la fonction  $\omega$ -aminée (acides butyrique, valérique, caproïque (cf. Tableau 2, et Fig. 3).

(c) *Inhibition de la GABA-T par deux acides gras disubstitués en  $\alpha$*

La constante d'inhibition de la GABA-T obtenue en présence de TPA est 1,9 fois plus élevée que celle obtenue en présence de DPA: le TPA se révèle donc un inhibiteur de l'enzyme beaucoup moins puissant que le DPA. En revanche, le MEPA est un inhibiteur de la GABA-T nettement plus efficace que le DPA: le  $K_i$  obtenu avec le MEPA est 2,5 fois plus faible que celui trouvé en présence de DPA.

(2) *Détermination des structures cristallines par diffraction des rayons X*

(a) *Structure du GABA*

Des études antérieures montrent que, à l'état cristallin, le GABA peut adopter deux conformations préférentielles (voir Figs. 5 et 6). L'une observée pour le chlorhydrate du GABA (GABA-HCl)<sup>23</sup> est plane et correspond à une chaîne "trans" avec des distances N-O<sub>1</sub> de 5,16 Å et N-O<sub>2</sub> de 6,17 Å. L'autre correspond à une chaîne repliée, avec des distances N-O<sub>1</sub> de 4,22 et 4,40 Å et N-O<sub>2</sub> de 5,58 Å et 5,54 Å observées respectivement dans le GABA et le complexe GABA-Cu.<sup>24-26</sup> L'angle dièdre entre les plans P<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, N) et P<sub>3</sub> (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), d'une valeur nulle pour la conformation plane, est de 74°5 pour la conformation repliée.

(b) *Structures cristallines des dérivés du DPA et du TPA*

Nous avons déterminé la structure de six amides dérivées du DPA et du TPA (Tableau 3) par diffraction des rayons X.<sup>27-31</sup> La conformation des dérivés du DPA (composés 1 à 4) est toujours la même (Fig. 4a). Les atomes de la molécule se répartissent en trois plans, le plan P<sub>1</sub> du groupement amide (atomes C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, O, N), le plan P<sub>2</sub> du reste dipropyle (atomes C<sub>5</sub> à C<sub>8</sub>), le plan P<sub>3</sub> du groupement R. L'angle (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>) vaut toujours 90°; le reste dipropyle a une conformation de chaîne plane étendue de longueur 7,45 à 7,57 Å et s'oriente symétriquement par rapport au groupement amide.

Pour les dérivés du TPA (composés 5 et 6), on observe deux types de conformation. L'une, observée pour le *N*-propyl tripropylacétamide (PTPM) et le tripropylacétamide (TPM 2), est analogue à celle des dérivés du DPA (Fig. 4c). Elle comprend un groupement dipropyle plan (atomes C<sub>8</sub> à C<sub>11</sub>); le troisième groupe propyle (atomes C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>) est alors dans le plan du groupement amide. Dans l'autre conformation,

TABLEAU 3. DÉRIVÉS DU DPA ET DU TPA ÉTUDIÉS PAR DIFFRACTION DE RAYONS X

Formule générale	R	Nom des dérivés
$\begin{array}{c} \text{C}_3 \text{ H}_7 \\ \diagup \\ \text{CH-CO-NH-R} \\ \diagdown \\ \text{C}_3 \text{ H}_7 \end{array}$	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl	(1) Chloro-4 dipropylacétanilide
	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> BrCF <sub>3</sub>	(2) Bromo-2-trifluorométhyl-5 dipropylacétanilide
$\begin{array}{c} \text{C}_3 \text{ H}_7 \\ \diagup \\ \text{C} \text{---} \text{CO-NH-R} \\ \diagdown \\ \text{C}_3 \text{ H}_7 \\ \diagup \\ \text{C}_3 \text{ H}_7 \end{array}$	CH <sub>3</sub>	(3) <i>N</i> -méthyl dipropylacétamide
	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	(4) <i>N</i> -propyl dipropylacétamide
	H	(5) Tripropylacétamide
	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	(6) <i>N</i> -propyl tripropylacétamide



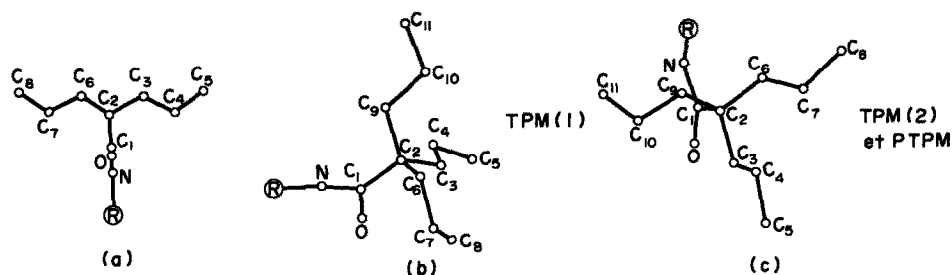


FIG. 4. Conformations des dérivés du DPA et du TPA à l'état cristallin. (a) Dérivés du DPA (d'après une projection sur le plan cristallographique (a, c) du *N*-propyl dipropylacétamide. (b, c) Dérivés du TPA (d'après une projection sur le plan cristallographique (a, c) du tripropylacétamide.

les groupements propyles ne sont jamais coplanaires deux à deux (TPM 1) (Fig. 4b).

Par ailleurs, excepté pour le TPM, les molécules s'enchainent de façon identique par liaison hydrogène  $N-H \dots O$ , dont la direction est proche d'un des axes cristallographiques.

#### (c) Energies de conformation. Conformations théoriques du DPA et du TPA

On observe la même conformation du reste dipropyle dans plusieurs dérivés du DPA. Elle est donc préférentielle à l'état solide. Les calculs ont été effectués sur l'anion  $DPA^-$ :  $(C_3H_7)_2-CH COO^-$  avec la conformation idéale décrite ci-dessus. Elle correspond à un minimum de l'énergie de Van der Waals: toute rotation d'un des groupes propyles entraîne une grande augmentation du terme  $E_W$ : cette conformation est donc très peu flexible et, en particulier, la conformation pour laquelle un des groupes propyles se trouve dans le plan du groupement amide conduit à une valeur très supérieure à l'énergie minimum et est donc très peu probable (Tableau 4). Les mêmes résultats sont obtenus pour le dipropylacétamide. De façon générale, pour les dérivés de l'acide,  $(C_3H_7)_2-CO-R$ , la présence du radical  $R$  entraîne des interactions de Van der Waals entre ce radical et le reste dipropyle très inférieures aux interactions entre les atomes du reste dipropyle lui-même.

La conformation la plus probable, peu flexible, est donc la même pour les molécules isolées à l'état gazeux, que celle obtenue à l'état cristallin.

Le résultat doit être applicable pour les molécules en solution, quel que soit le dérivé, donc pour le dipropylacétate lui-même.

TABLEAU 4. ENERGIES DE VAN DER WAALS CALCULÉES POUR DIFFÉRENTES CONFORMATIONS DU GABA ET DES DÉRIVÉS DU DPA ET DU TPA

Composés	Conformation (a) (kcal/mole)	Conformation (b) (kcal/mole)
GABA	-1,1	-0,4
DPA	-0,1	8
TPM	6,7	5,8
PTPM	—	5,5

GABA: (a) conformation repliée; (b) conformation plane.

DPA: (a) conformation observée dans tous les dérivés; (b) un des deux groupements propyles est amené dans le plan du groupement amide.

TPM: (a) molécule (1); (b) molécule (2).

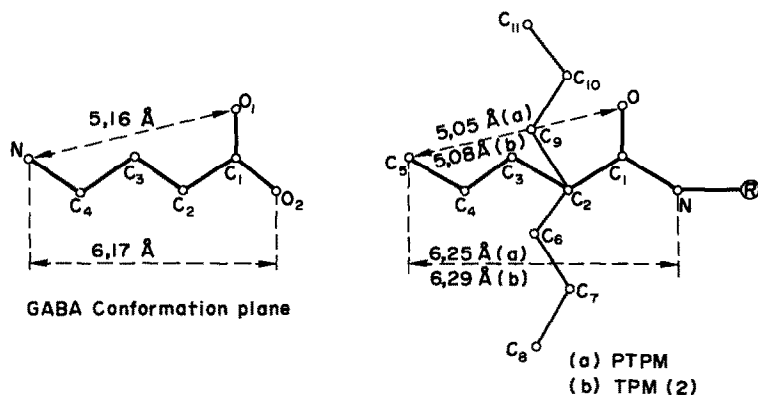


FIG. 5. Comparaison de la conformation plane de l'acide 4-aminobutyrique (GABA) avec celles du tripropylacétamide [TPM 2] et du *N*-propyl tripropylacétamide (PTPM).

Dans le cas des dérivés du TPA, les deux conformations observées expérimentalement dans le TPM, ainsi que celle du PTPM (identique à TPM(1)) conduisent à des valeurs voisines de l'énergie de Van der Waals calculée, soit 6,7, 5,8 et 5,5. kcal/mole respectivement.

L'introduction d'un radical R (groupement *N*-propyle du PTPM) pour les mêmes raisons que ci-dessus, n'influe pas sur la valeur de l'énergie.

D'après ces résultats, au moins deux conformations doivent être accessibles au TPA en solution; celui-ci se présente donc comme une molécule beaucoup plus flexible que le DPA.

Dans le cas du GABA, les deux conformations observées à l'état cristallin, conduisent également à des valeurs voisines de l'énergie de Van der Waals, soit -0,4 kcal/mole pour une chaîne plane idéale et -1,1 kcal/mole pour la forme repliée du GABA. Elles peuvent donc coexister en solution. Des calculs effectués avec des modèles d'orbitales moléculaires sont en accord avec ces résultats.<sup>32</sup>

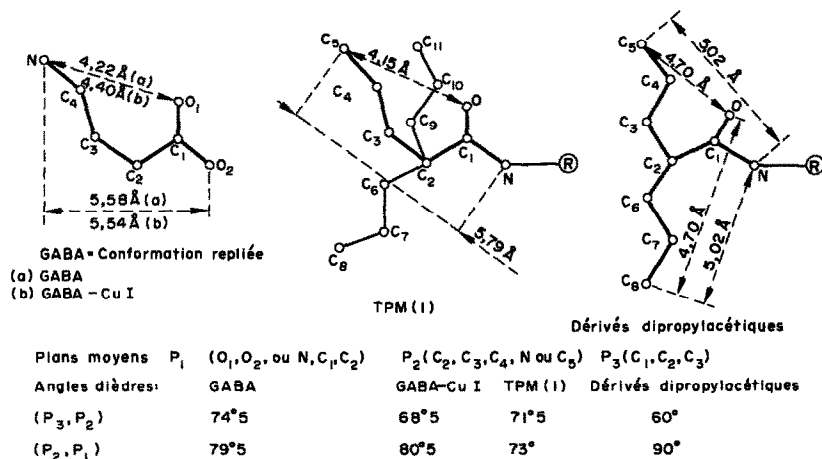


FIG. 6. Comparaison de la conformation repliée de l'acide 4-aminobutyrique (GABA) avec celles du tripropylacétamide [TPM 1] et des dérivés du DPA.

(d) *Comparaison des conformations du GABA, du DPA et du TPA et de leurs dérivés*

(i) *Analogie structurale entre le GABA, le TPA et ses dérivés.* La Fig. 5 montre l'analogie entre la conformation plane du GABA, le PTM et le TPM(2). Le groupement (O-N-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>) est assimilé à la chaîne (O<sub>1</sub>-O<sub>2</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-N) du GABA. Les deux chaînes sont comparables. Nous avons en effet vérifié, pour les deux dérivés du TPA, que le groupement ci-dessus est pratiquement plan, l'écart maximum calculé à ce plan étant de 0,06 Å; dans tous les cas les distances entre extrémités de la chaîne indiquées sur la figure 5 sont similaires.

Par ailleurs, la configuration spatiale du groupement (O-N-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>) du TPM (1) présente une très grande analogie avec la configuration repliée du GABA (Fig. 6). Ces chaînes sont formées de différents plans dont les équations ont été calculées. Dans les deux cas, les angles dièdres entre ces plans et les distances entre extrémités de la chaîne sont comparables comme le montrent les valeurs indiquées sur la Fig. 6. La distance C<sub>5</sub>-O du TPM (1) de 4,15 Å, très proche de la distance N-O<sub>1</sub> du GABA replié, est inférieure à la valeur correspondante de 5,08 Å dans la conformation plane. De même, les distances C<sub>4</sub>-O et C<sub>3</sub>-O du TPM (1), respectivement de 3,09 et 2,73 Å, sont comparables aux valeurs de 3,22 et 2,78 Å observées pour le GABA replié.

D'après le paragraphe 3, ces résultats doivent s'appliquer au tripropylacétate.

(ii) *Analogie structurale entre le GABA, le DPA et ses dérivés.* Une comparaison entre le GABA et la conformation du DPA et de ses dérivés est représentée sur la Fig. 6.

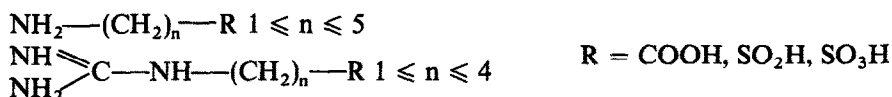
Seule la forme repliée du GABA présente une analogie avec ces dérivés. Chez ces derniers, les distances interatomiques valent: C<sub>3</sub> (ou C<sub>6</sub>)-O: 2,98 Å; C<sub>4</sub> (ou C<sub>7</sub>)-O: 3,54 Å; C<sub>5</sub> (ou C<sub>8</sub>)-O: 4,70 Å.

Dans le cas du GABA, les distances correspondantes valent respectivement 2,78, 3,22 et 4,22 Å. L'angle dièdre entre les plans P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> vaut 90° et diffère du dièdre équivalent dans le GABA.

On remarque que pour les dérivés du DPA, l'atome C<sub>3</sub> (ou C<sub>6</sub>) est hors du plan P<sub>1</sub>, à 1,25 Å de celui-ci. Par contre dans le GABA et dans le TPM(1), il n'est qu'à 0,3 et 0,1 Å respectivement de ce plan. Cependant, la conformation observée reste plus proche de la forme repliée du GABA que de sa forme plane. Dans le cas d'une conformation DPA plane, un de ces groupements propyles devrait se placer dans le plan P<sub>1</sub>, et les calculs d'énergies montrent que cette situation est peu probable.

## DISCUSSION

L'analyse des propriétés pharmacologiques d'acides aminés s'apparentant au GABA, a conduit à l'idée<sup>33</sup> que les agonistes du GABA devaient avoir pour formule générale:



D'autres molécules, telles que le  $\beta$ -hydroxy-GABA, le muscimol<sup>37</sup> et l'acide 4-amino-tétrolique (ATA) produisent également un effet dépresseur "GABA-like" au niveau du système nerveux central.

La recherche d'effets antagonistes du GABA et de ses agonistes a permis de mettre en évidence des molécules telles que la bicuculline, la picrotoxine et la benzyl penicilline.

L'étude d'une analogie de structure entre ces différentes molécules a conduit à l'idée<sup>32,34</sup> que les groupements fonctionnels impliquent au moins une charge cationique placée à une certaine distance d'un centre anionique ou d'une fonction lactone.

Il est actuellement admis<sup>34</sup> que les réponses biologiques opposées de ces deux classes de molécules doivent être recherchées dans les faits suivants:

Les agonistes sont, comme le GABA, des molécules flexibles (l'ATA faisant exception): ils peuvent adopter une conformation type "GABA étendu" et une conformation type "GABA replié";

Les antagonistes sont des molécules de structure relativement rigide ne pouvant adopter qu'une conformation repliée.

Le mécanisme d'action de ces produits au niveau d'un récepteur biologique peut alors être envisagé de la façon suivante.<sup>34</sup> Le GABA, ses agonistes et ses antagonistes compétitifs peuvent être "reconnus" par le récepteur sous leur forme repliée; il s'en suit une association récepteur-produit qui implique vraisemblablement des interactions électrostatiques. Alors que le complexe récepteur-antagoniste ne subit aucune évolution, le complexe récepteur-agoniste peut évoluer par changement de conformation du récepteur et grâce à la flexibilité de la molécule intéressée.

L'étude de la puissance relative de divers agonistes du GABA sur différentes préparations biologiques (jonction neuro-musculaire) d'écrevisse,<sup>35</sup> préparation de ganglion cervical supérieur de rat,<sup>36</sup> donne des réposes très proches; en ce qui concerne les  $\omega$  amino-acides, l'effet maximum correspond à une longueur de chaîne de  $3(\text{CH}_2)$ . Il est intéressant de noter que le classement de la puissance de ces produits comme substrats de la GABA-T de cerveau de boeuf<sup>22</sup> est identique. Néanmoins, si l'on peut retenir le modèle du dipole dans les premiers types d'expérience, le pH d'activité maximum de la GABA-T (pH 8,2), ne permet de considérer que la forme  $\text{R-COO}^-$  au niveau de cette enzyme.

Ce nouveau concept semble en bon accord avec le fait que des acides carboxyliques linéaires ou ramifiés se révèlent de bons inhibiteurs de l'enzyme. La corrélation mise en évidence Fig. 3 est d'ailleurs remarquable.

Le DPA, peu flexible, adopte une conformation cristalline comparable à la forme repliée du GABA; malgré l'existence du seul centre anionique, le DPA est un bon inhibiteur. Le TPA, relativement moins rigide que le DPA, peut adopter deux conformations pour lesquelles l'analogie structurale avec le GABA est très grande. Il est également inhibiteur de la GABA-T. Malgré leur flexibilité, les acides carboxyliques linéaires sont de bons inhibiteurs de l'enzyme. L'influence de la longueur de la chaîne sur la puissance de l'inhibition est mise ici en évidence; le meilleur inhibiteur est l'acide butyrique dont les caractéristiques structurales:

$$\text{C}_4 - \text{O}_1 = 4,24 \text{ \AA}, \quad \text{C}_4 - \text{O}_2 = 4,92 \text{ \AA}$$

correspondent à la longueur de la chaîne du GABA replié. D'après ces résultats, celle-ci correspondrait à la meilleure conformation pour l'étape de fixation sur le site récepteur de la GABA-T.

Si l'on accepte qu'une meilleure analogie structurale inhibiteur-GABA peut con-

duire à une inhibition importante de l'enzyme, le TPA devrait posséder un pouvoir inhibiteur plus élevé que le DPA. Néanmoins, le facteur stérique est insuffisant pour permettre l'obtention d'une relation structure-activité biologique, il est évident que le coefficient de partage joue également un rôle important. Les mesures effectuées pour les acides dans le couple octanol-eau montrent qu'il est plus faible pour le DPA ( $P = 2,82$ ) que pour le TPA ( $P = 3,64$ ).\*

L'inhibition importante de la GABA-T obtenue avec le MEPA serait donc due au fait que cet acide étant  $\alpha$  disubstitué, son analogie structurale avec le GABA doit être grande; son coefficient de partage ( $P = 2,05$ ) étant plus favorable que dans le cas du TPA.

En conclusion, nos résultats mettent en évidence une nouvelle classe d'antagonistes du GABA vis à vis de la GABA-T. Ces inhibiteurs peuvent être flexibles, la présence d'une forme dipolaire ne semble pas importante, mais ces molécules doivent posséder une fonction acide permettant très certainement la fixation sur le site récepteur de l'enzyme. De plus, une très bonne analogie structurale devrait exister avec le GABA. Contrairement aux conclusions de Beart *et al.*,<sup>21</sup> il nous paraît que les résultats obtenus ici plaident en faveur de la forme GABA-replié en ce qui concerne la reconnaissance de cette molécule par le site enzymatique.

*Remerciements*—Nous remercions très vivement Madame J. Lajzerowicz pour ses conseils toujours très fructueux, Monsieur A. Boucherle pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, ainsi que Monsieur A. Grand pour sa participation à l'étude cristallographique.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. E. ROBERTS et S. FRANKEL, *Fedn Proc.* **9**, 219 (1950).
2. G. BRUGGENCATE et I. ENGBERG, *Brain Res.* **25**, 431 (1971).
3. K. OBATA et S. M. HIGHSTEIN, *Brain Res.* **18**, 538 (1970).
4. K. OBATA, K. TAKEDA et H. SHINOZAKE, *Exp. Brain Res.* **11**, 327 (1970).
5. R. A. NICOLL, *Pharmacologist* **12**, 236 (1970).
6. J. A. BELL, *Dissertation Abstr. Intern.* **B32**, 2848 (1971).
7. C. LAMAR, JR., *J. Neurochem.* **17**, 165 (1970).
8. E. DE ROBERTIS, *Triangle* **12**, 39 (1972).
9. C. NITSCH, K. KATOAKA, J. S. KIM, I. S. BAK et B. CSILLIK, *Fifth Int. Congress on Pharmacology*, July 1972, San Francisco.
10. S. R. NAHORSKI, D. J. ROBERTS et G. G. STENART, *J. Neurochem.* **17**, 621 (1970).
11. E. W. MAYNERT et H. K. KAJI, *J. Pharmac. exp. Ther.* **137**, 114 (1962).
12. Y. GODIN, H. HEINER, J. MARK et P. MANDEL, *J. Neurochem.* **16**, 869 (1969).
13. W. B. JACOBY, *Meth. Enzym.* **5**, 765 (1962).
14. J. L. BENOIT-GUYOD, A. BOUCHERLE et G. CARRAZ, *Bull. Soc. Chim.*, 1660 (1965).
15. J. L. BENOIT-GUYOD, A. BOUCHERLE, G. CARRAZ, P. EYMARD et H. MEUNIER, *Chim. Ther.* **2**, 49 (1967).
16. J. L. BENOIT-GUYOD, A. BOUCHERLE, M. BENOIT-GUYOD, A. DARDAS, R. RUPP, P. EYMARD, G. CARRAZ, M. BOITARD, S. LEBRETON, H. BIEREL et H. MEUNIER, *Chim. Ther.* **5**, 336 (1968).
17. J. L. BENOIT-GUYOD, M. BENOIT-GUYOD et A. BOUCHERLE, *Chim. Ther.* **1**, 17 (1969).
18. G. H. STOUT et L. H. JENSEN, *X-ray Structure Determination, A practical Guide*. MacMillan, Londres (1968).
19. N. L. ALLINGER, A. M. MILLER, A. VAN CATLEDGE et J. A. HIRSCH, *J. Am. chem. Soc.* **89**, 4345 (1967).
20. S. SIMLER, L. CIESIELSKI, M. MAITRE, A. RANDRIANARISOA et P. MANDEL, *Biochem. Pharmac.* **22**, 1701 (1973).
21. P. M. BEART, M. L. UHR et G. A. R. JOHNSTON, *J. Neurochem.* **19**, 1849 (1972).
22. C. F. BAXTER et E. ROBERTS, *J. biol. Chem.* **233**, 1135 (1958).
23. K. I. TOMITA, *J. Brain Physiol.* **61**, 1 (1965).
24. K. I. TOMITA, H. HIGASHI et T. FUJIWARA, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **46**, 2199 (1973).
25. E. G. STEWARD, R. B. PLAYER et D. WARNER, *Acta Cryst.* **B29**, 2038 (1973).

\* Nous remercions Mr. Laruelle, CREP Grenoble pour ses mesures de coefficient de partage.

26. A. TAKENAKA, E. OSHIMA, S. YAMADA et T. WATANABE, *Acta Cryst.* **B29**, 503 (1973).
27. C. COHEN-ADDAD, J. LAJZEROWICZ, J. L. BENOIT GUYOD et A. BOUCHERLE, *Chim. Ther.* **7**, 384 (1972).
28. C. COHEN-ADDAD, *Acta Cryst.* **B29**, 157 (1973).
29. A. GRAND et COHEN-ADDAD, *Acta Cryst.* **B29**, 1149 (1973).
30. C. COHEN-ADDAD et A. GRAND, *Acta Cryst.* **B30**, 186 (1974).
31. A. GRAND, Thèse Doctorat 3e cycle, Grenoble, (1973).
32. D. WARNER, R. B. PLAYER et E. G. STEWARD, *First European Crystallographic Meeting*, Bordeaux (1973).
33. D. R. CURTIS et J. C. WATKINS, *Pharm. Rev.* **17**, 346 (1965).
34. E. G. STEWARD et R. B. PLAYER, Com. privée, à publier.
35. J. DUDEL, *Pflügers Archiv* **283**, 104 (1965).
36. N. G. BOWERY et D. A. BROWN, *Br. J. Pharmac.* **45**, 160 (1972).
37. G. A. R. JOHNSTON, D. R. CURTIS, W. D. DE GROAT et A. W. DUGGAN, *Biochem. Pharmac.* **17**, 2488 (1968).

**Résumé**—Les acides dipropylacétique (DPA) et tripropylacétique (TPA) sont des anticonvulsivants inhibiteurs compétitifs de la GABA-transaminase vis à vis de son substrat, l'acide 4-aminobutyrique (GABA). Cette inhibition est comparée à celle provoquée par les acides carboxyliques  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n-2}-\text{COOH}$  ( $3 \leq n \leq 8$ ). Plusieurs dérivés du DPA et du TPA ont été synthétisés et leurs structures cristallines déterminées par diffraction des rayons X. Les résultats montrent qu'une analogie structurale existe entre ces dérivés et les deux conformations préférentielles du GABA, l'une plane et l'autre non plane correspondant à une chaîne repliée. D'après les résultats des calculs d'énergies de conformation des molécules isolées, cette analogie doit exister pour les molécules en solution. Le rôle des deux conformations du GABA et de ses analogues structuraux dans leurs activités au niveau du système nerveux central est discuté en fonction de résultats antérieurs.