

Étude de la dimérisation en milieu acide de la mélatonine (5-méthoxy-*N*-acétyltryptamine) et de quelques dérivés apparentés. Oxydation de 2-arylindolines en 2-arylindoles

Catherine Charlet-Fagnère¹, Jacqueline Laronze¹, Jean-Yves Laronze^{1*}, Loïc Toupet²,
Richard Vistelle³, Denis Lamiabie³, Corinne Mouchard³, Pierre Renard⁴, Gérard Adam⁴

¹ Laboratoire de chimie thérapeutique, transformation et synthèse de produits naturels (URA CNRS 492),
Faculté de pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51, rue Cognacq-Jay, 51096 Reims cedex ;

² Groupe matière condensée et matériaux, Université de Rennes I, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex ;

³ Laboratoire de pharmacologie et pharmacocinétique, Faculté de pharmacie,
Université de Reims Champagne-Ardenne, 51, rue Cognacq-Jay, 51096 Reims cedex ;

⁴ Société ADIR, 1, rue Carle-Hébert, 92415 Courbevoie cedex, France

(Reçu le 28 novembre 1994 ; accepté le 13 novembre 1995)

Résumé – Le traitement en milieu acide de la 5-méthoxy-*N*-acétyltryptamine (mélatonine) et d'autres dérivés apparentés **1** conduit aux composés **2** (dimères-2,2') et **4** (dimères-2,6'). Les composés **2** qui se transforment facilement à nouveau en monomères **1**, pourraient être considérés comme des prodrogues de la mélatonine. Des résultats pharmacologiques préliminaires sont obtenus *in vitro* et *in vivo*. Enfin, l'oxydation des dimères **2** et **4** en bisindoles est examinée.

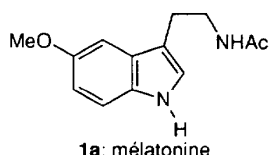
mélatonine / indole / dimérisation d'indoles / 2-arylindole / prodrogue

Summary – Studies on the dimerization of melatonin (5-methoxy-*N*-acetyltryptamine) and related compounds in acid medium. Oxidation of some 2-arylindolines into 2-arylindoles. Acid treatment of 5-methoxy-*N*-acetyltryptamine (melatonin) and other related derivatives **1** gave compounds **2** (2,2'-dimers) or **4** (2,6'-dimers). Compounds **2**, which easily revert to monomers **1**, could be considered as potential prodrugs of melatonin (preliminary *in vitro* and *in vivo* pharmacological data are given). Finally, the oxidation of dimers **2** and **4** to bisindoles **10** and **12** is considered.

melatonin / indole / indole dimerization / 2-arylindole / prodrug

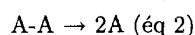
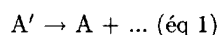
Introduction

La mélatonine **1a** est une hormone sécrétée par la glande pinéale, dont un rôle physiologique est de signaler au système nerveux central le passage du jour à la nuit. Ceci permet d'envisager d'utiliser cette molécule chez l'homme pour lutter contre certains troubles du sommeil, et les états dépressifs photopériodiques. Chez l'animal, elle permet de contrôler efficacement les périodes de reproduction et la fertilité chez certaines espèces [1].



Cependant, comme toutes les neurohormones, elle est rapidement dégradée dans les milieux biologiques (durée de demi-vie = 2 min [2]). Dans ce cas, la préparation de prodrogues A', substances qui génèrent progressivement le principe actif A après son introduction dans l'organisme (équation 1) permet d'augmenter artificiellement la durée de demi-vie.

Nous basant sur la chimie de l'indole, nous proposons une prodrogue A-A, dimère de A, susceptible après résorption de redonner la forme monomère et seulement elle par réaction inverse (équation 2).



De plus, le doublement de la masse relative, et l'apparition d'un caractère basique (qui permet de préparer des sels solubles) peuvent modifier sa distribution dans l'organisme et freiner le passage à travers la membrane hémato-encéphalique, vers le système nerveux central.

* Correspondance et tirés à part

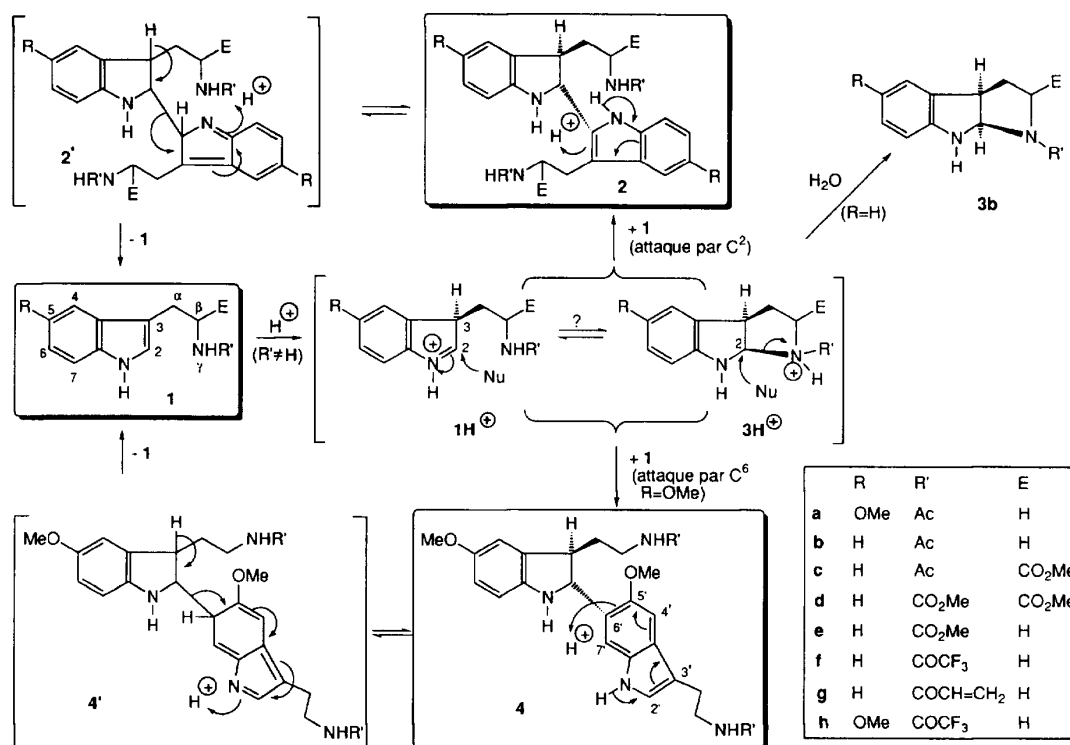


Schéma 1

Dans cet article, nous traiterons des conditions de la dimérisation de la mélatonine, et de divers dérivés de type *N*-acyltryptamine de formule générale **1** en dimère indole-indoline **2** et **4** et de la réversibilité de ces réactions (schéma 1).

En marge de ce travail, nous présenterons une préparation nouvelle de quelques dérivés de type 2-aryl-*N*-acyltryptamine **10**, **12**, **15**.

Enfin, quelques résultats préliminaires, concernant l'activité *in vitro* et la pharmacocinétique de dimères seront présentés.

Réaction de dimérisation (schéma 1)

La dimérisation de l'indole en milieu acide est une réaction connue depuis longtemps [3]. Elle fait intervenir la protonation d'une molécule en position 3 (**1H⁺**) : l'iminium qui en résulte sert d'électrophile pour une seconde molécule d'indole. Cependant, nous avons montré que cette réaction ne s'effectue pas avec la tryptamine : sans doute la protonation intervient-elle alors sur l'azote basique, et non en position 3 de l'indole, ce qui empêche la formation de l'intermédiaire **1H⁺**.

L'acylation de l'azote doit donc précéder la dimérisation, c'est pourquoi cette étude porte sur les dérivés *N*-acylé **1a** (mélatonine), **1b**, **1f**, **1g** et **1h**. Quelques résultats de la littérature se rapportent à cette approche. Ce sont des «peptidistes» japonais [4, 5] qui mettent fortuitement en évidence la formation de dimère indole-indoline de type **2** lors de traitement du *N*-acétyltryptophanate de méthyle **1c** (ou de peptide le

contenant) par l'acide fluorhydrique ou trifluoroacétique anhydre.

Mais, quelques années plus tard Hino [6] montre que les dérivés du tryptophanate de méthyle **1c** et **1d**, soumis à l'action de H₃PO₄ à 85 % ou de l'acide trifluoroacétique conduisent à des dérivés tricycliques **3c** et **3d**, respectivement.

Avec les dérivés de la tryptamine en présence d'acide phosphorique à 85 %, Hino obtient le dérivé tricyclique **3e** accompagné de 2 % de dimère **2e** à partir du carbamate **1e**, alors que l'amide **1b** conduit essentiellement au dimère **2b**, accompagné de trace du produit tricyclique **3b**. Ainsi, l'addition de l'azote extracyclique sur la position 2 de l'indole est-elle facilitée par la présence d'un groupement carbamoylé plutôt que acétylé; cette propriété a été observée par nous plus tard [7].

Dans un premier temps, nous avons repris les travaux de Hino, concernant la transformation de **1b** en **2b**. Il nous est apparu que l'utilisation d'acide phosphorique était peu commode; nous l'avons remplacé par l'acide trifluoroacétique utilisé en solution concentrée à température ambiante, à l'abri de la lumière. Au bout de 48 heures, le produit de départ a complètement disparu, et **2b** est obtenu avec un rendement de 81 % en produit isolé. La structure plane est facilement établie par étude des propriétés spectrales : spectre UV montrant la superposition des chromophores indole et indoline, spectre de masse donnant les deux ions indoliques à *m/z* 130 et 143. Les spectres de RMN ¹H et ¹³C, analysés par les corrélations COSY, HMBC, HMQC (tableaux I et II), confirment l'unicité du produit (un seul diastéréoisomère formé). C²-H apparaît sous forme d'un doublet à 4,80 ppm (*J* = 9 Hz), ce qui ne permet pas de

Tableau I. RMN ¹H des séries 2, 4, 5, 10, 12 et 15 (attributions réalisées par corrélations COSY, HMBC, HMQC. Solvant CDCl₃ sauf indication).

2: (2,3-dihydro) 10: (Δ-2)

4: (2,3-dihydro) 12: (Δ-2)

5: (2,3-dihydro) 15: (Δ-2)

Produit	1	2	3	4	5	6	7	α	β	γ	δ	ε	ζ	η	θ	ι	κ	λ	μ	ν	ξ	ο	π	ρ	σ	τ	υ	φ	χ	ψ	ω
2a	sl 4,11	d 4,76 J = 9	m 3,25	d 6,72 J = 2	s 3,72	dd 6,63 J = 2,9	d 6,54 J = 9	m 1,93	m 3,25	m 6,58*	s 1,90*	s 8,80	-	-	dd 6,78 J = 2,9	s 3,80	d 6,99 J = 2	s 8,85	m 8,70	-	-	dd 7,00-7,10	m 7,00-7,10	m 3,35-3,50	m 2,80-2,95	m 3,42-3,62	d 7,12 J = 9	m 2,90	m 3,42	m 6,76*	s 1,85*
2b	sl 4,27	d 4,80 J = 9	m 3,32	m 7,05	t 6,75 J = 7	m 7,05 J = 7	d 6,59 J = 7	m 1,94	m 3,24	m 6,59*	s 1,88*	s 8,80	-	-	t 7,11 J = 7	m 7,05	d 7,52 J = 7	s 8,85	m 8,80	-	-	t 7,05-7,15 massif	m 7,05-7,15	m 3,42-3,62	m 2,95-3,04	d 7,22 J = 7	d 7,10 J = 7	m 2,89-2,98	m 3,44	m 6,69*	s 1,80*
2f	sl 3,90	d 4,83 J = 9	m 3,35	m 7,05-7,15	t 6,80 J = 7	m 7,05-7,15 J = 7	d 6,66 J = 7	m 2,04	m 3,35	t 7,40	-	s 8,48	-	-	dd 7,05-7,15	-	d 7,53 J = 7	s 8,85	m 8,80	-	-	massif	massif	m 3,35-3,50	m 2,80-2,95	m 3,42-3,62	-	-	-	-	-
2g	sl 4,25	d 4,78 J = 8,5	m 3,30	m 7,00-7,10	t 6,70 J = 8	m 7,00-7,10 J = 8	d 6,58 J = 8	m 1,98	m 3,30	m 7,00-7,10	s 7,00-7,10	s 8,70	-	-	dd 7,00-7,10	-	d 7,51 J = 8	s 8,85	m 8,70	-	-	dd 7,00-7,10	m 7,00-7,10	m 3,35-3,50	m 2,80-2,95	m 3,42-3,62	-	-	-	-	-
4a	sl 4,00	d 5,00 J = 4,5	m 3,20	d 6,68 J = 2	s 3,70 J = 2,9	dd 6,64 J = 2,9	d 6,60 J = 9	m 1,95	m 3,25-3,45	t 5,75	s 1,95	s 8,35	s 6,90	-	-	s 3,90	s 7,01	s 8,85	s 8,35	-	-	-	-	t 3,90	t 3,90	s 7,23	s 7,10	q 3,52 J = 7	t 5,85	s 1,85	
4h	(1)	-	d 4,85 J = 4,5	m 3,15	s 6,60 (3)	s 6,65 (3)	d 6,65 (3)	m 1,90	m 3,25-3,42	t 8,49	-	(1)	s 8,85	-	s 3,80	s 3,80	s 6,95	s 8,85	-	-	-	-	s 3,80	s 3,80	q 3,45 J = 7	t 8,49	-	-	-	-	-
5a	sl 4,20	d 4,88 J = 4,5	m 3,32	d 6,69 J = 2	s 3,72 J = 2,9	dd 6,68 J = 2,9	d 6,59 J = 9	m 1,95	m 3,22-3,45	d 5,85	s 1,88	s 8,32 (3)	d 6,46	s 3,76	dd 6,40 J = 2,9	d 7,20	s 6,40	s 8,85	s 8,35	-	-	-	-	d 7,20	d 7,20	-	-	-	-	-	-
5b	sl 4,25	d 4,87 J = 4,5	m 3,28	d 7,03	m 6,68 J = 7	m 7,03	d 6,62 J = 7	m 1,92	m 3,19-3,39	t 6,04	s 1,85	s 3,80 (3)	d 6,45	s 3,74	dd 6,36 J = 2,9	d 7,17	s 6,36	s 8,85	s 8,35	-	-	-	-	d 7,17	d 7,17	-	-	-	-	-	-
10a (2)	s 8,01	-	-	d 7,07 J = 2	s 3,81	dd 6,80 J = 2,9	d 7,42	m 2,88	m 3,22	t 8,00	s 1,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10b (2)	s 11,2	-	-	d 7,68 J = 9	t 7,09 J = 9	t 7,17 J = 9	d 7,44	m 2,93	m 3,25	t 8,07	s 1,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10f	s 8,66	-	-	d 7,53 J = 9	t 7,12 J = 9	t 7,24 J = 9	d 7,40	m 2,95	m 3,48	t 6,58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12a (2)	s 10,70	-	-	d 7,68 J = 2	t 7,09 J = 2	dd 6,74 J = 2,9	d 7,24	m 2,76	m 3,26	t 7,89	s 1,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12h	s 8,62	-	-	d 7,02 J = 2	s 3,86*	d 6,86 J = 2,9	d 7,29	m 3,05	m 3,60	m 6,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15a	s 8,45	-	-	d 7,07 J = 2	s 3,80	s 6,85 J = 2,9	d 7,25	m 2,96	m 3,48	m 5,60	s 1,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15b	s 8,48	-	-	d 7,60 J = 7	t 7,10 J = 7	t 7,18 J = 7	d 7,25	m 3,00	m 3,51	m 5,54	s 1,76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(*) Attributions interchangeables avec la position primée. (1): CDCl₃-CD₃OD; (2): DMSO-d₆; (3): attributions interchangeables; (4): Hb ddt; (J = 1-19 Hz) 5,45 et 5,54 ppm; Ha-Hc: massif 6,0-6,2 ppm.

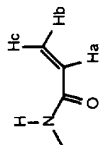


Tableau II. RMN ^{13}C des dérivés **2**, **4**, **5**, **10**, **12** et **15** (même solvant que le tableau I, sauf indication).

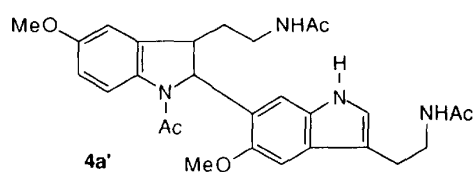
Produit	2	3	3a	4	5	5	OMe	6	7	7a	α	β	δ	2'	3'	3a'	4'	5'	5'	OMe	6'	7'	7'a	α'	β'	δ'
2a	61,2	47,6	131,9	111,7	153,8	55,9	112,8	110,2	143,5	31,7	36,8	(1)	137,1	109,2	128,7	100,6	153,9	55,9	110,6	111,7	130,6	24,6	40,6	(1)		
2b	60,7	47,4	130,1	123,9	119,3	-	127,9	109,4	149,8	31,9	36,8	(1)	136,2	109,5	128,3	118,4	119,3	-	121,9	110,0	135,5	24,6	40,7	(1)		
2f	60,2	47,6	129,0	123,9	119,9	-	128,0	109,9	149,5	30,7	37,0	(2)	136,2	108,5	128,4	118,2	119,7	-	122,4	111,0	135,4	23,8	41,1	(2)		
2g	60,4	47,5	129,6	123,9	119,4	-	127,9	109,4	149,7	31,4	36,7	(3)	135,4	109,3	128,1	118,4	119,3	-	122,0	111,0	136,0	24,7	40,7	(3)		
4a	62,4	48,2	133,1	111,2	151,3	55,7	112,8	109,7	144,0	33,9	37,3	(4)	122,7	112,3	127,9	99,2	153,6	55,9	126,5	109,0	131,1	25,3	39,8	(4)		
4h	62,3	48,1	132,7	110,9	150,9	55,1	112,8	110,1	143,7	32,8	37,3	(2)	122,6	110,8	126,8	98,6	153,6	55,5	126,0	108,5	130,9	24,2	40,1	(2)		
5a (5)	61,4	48,1	132,8	111,0	153,5	55,9	112,8	109,6	144,2	33,7	37,1	(5)	98,4	157,5	-	126,7	104,2	-	124,5	-	-	-	-	-		
5b (6)	60,8	47,8	130,8	124,1	118,3	-	127,5	108,6	150,2	33,7	37,0	(6)	98,3	157,3	-	126,5	104,0	-	124,3	-	-	-	-	-		
10a (7)	131,6	111,1	128,3	100,5	153,8	56,4	111,9	113,8	132,3	25,0	41,6	(7)	←	idem positions non primées	
10b (8)	128,0	115,5	127,3	118,7	119,0	-	121,8	111,6	136,5	25,4	39,7	(9)	←	idem positions non primées	
10f	123,5*	109,2*	127,5	118,4*	120,0*	-	123,0*	111,6*	136,5*	24,1	40,5*	(10)	124,0*	112,4*	127,5	118,5*	120,5*	-	123,3*	109,4*	135,9*	24,1	40,6*		
12a (8)	134,6	109,4	128,6	100,6	153,1	55,6*	110,6	111,7	131,1	25,5	39,7	(11)	124,2	112,1	127,7	99,8	151,3	55,8*	116,9	114,3	131,1	25,6	39,7	(11)		
12h	134,8	108,4	128,4	100,3	154,1	56,0	112,1	111,7	131,3	24,6	40,1	(12)	124,0	111,5	127,4	99,7	151,8	56,0	116,7	114,1	130,8	24,4	40,3	(12)		
15a (13)	133,2	109,6	128,5	100,4	153,9	55,9	111,4	111,9	130,7	24,5	39,6	(13)	99,1	157,9	-	131,9	104,7	-	114,0	-	-	-	-	-		
15b (14)	135,5	109,8	128,2	118,5	119,2	-	121,8	110,7	134,2	24,5	39,7	(14)	99,1	158,0	-	132,0	104,8	-	113,9	-	-	-	-	-		

(*) Attribution interchangeable avec la position primée (1) 22,9 et 23,1 : Me; 170,6 (2 signaux) : C=O. (2) q vers 157,5 ($J = 20$) : C=O. (3) 168,0 (2 signaux) : C=O; 130,6 et 130,9 : -CH=; 126,0 et 126,3 : =CH₂. (4) 23,1 et 170,2 : C=O. (5) 23,2 : CO-Me; 55,2 (2 signaux) : OMe benzène; 160,0 : C₁. (6) 22,9 : CO-Me; 55,1 (2 signaux) : OMe-benzène; 159,7 : C₁. (7) 22,6 : CO-Me (2 signaux); 169,6 : C=O. (8) DMSO-d₆. (9) 22,8 : Me; 169,6 : C=O. (10) q ($J = 20$) 157,0 : C=O; 120,4, 117,6, 113,7, 109,7 : CF₃. (11) 22,9 (2 signaux) : Me; 169,1 et 169,3 : C=O. (12) 120,6, 117,0, 113,1, 109,0 : CF₃; 157,0 q ($J = 20$) : C=O. (13) 23,1 : CO-Me; 55,5 (2 signaux) : OMe benzène; 160,9 : C₁. (14) 23,0 : CO-Me; 55,3, 55,4 : OMe benzène; 160,9 : C₁.

préciser pour l'instant la stéréochimie, qui sera discutée plus loin. De la même manière, les amides **1f** ($R' =$ trifluoroacétyl) et **1g** ($R' =$ acryloyl) dimérisent avec des rendements respectifs de 55 % et 59 % (non optimisés).

L'extension de cette réaction à la dimérisation de la mélatonine elle-même n'a pas été aussi simple que prévu. Dans les conditions précédentes (acide trifluoroacétique, température ambiante) un dimère indole-indoline est bien formé au bout de 72 h avec un rendement de 63 %; ses propriétés spectrales sont très comparables à celles du dimère de la *N*-acétyltryptamine **2b** pour ce qui concerne les spectres UV, IR, et de masse, mais les RMN ^1H et ^{13}C laissent penser qu'il existe des différences structurales affectant la région des aromatiques.

Ainsi, pour une formule **2a**, on serait en droit d'attendre un certain parallélisme pour la multiplicité des signaux de H^4 , H^6 et H^7 avec $\text{H}^{4'}$, $\text{H}^{6'}$ et $\text{H}^{7'}$. En fait, si l'on observe bien un système doublet fin à 6,68 ppm (H^4) doublet de doublet à 6,64 (H^6) et doublet large à 6,60 (H^7) correspondant à la partie indoline attendue, la partie indolique est porteuse de trois singulets à 6,90, 7,01 et 7,23 ppm. En RMN ^{13}C le nombre de carbones aromatiques tertiaires et quaternaires est bien celui attendu, mais parmi les quaternaires, les valeurs observées indiquent que la jonction s'effectue maintenant avec le C^6 du noyau benzénique, voisin du carbone porteur du groupement méthoxyle. De tels couplages existent dans les alcaloïdes dimères utilisés en chimiothérapie anticancéreuse comme la vincalécoblastine [8] où il existe une connexion en *ortho* du groupe méthoxy (qui est en position 5, dans ce dérivé) entre les deux monomères. En fait, la structure **4a**, qui résulte d'une connexion entre les positions 2 et 6', doit être attribuée au dimère formé, comme l'ont montré les études des spectres de corrélation par les méthodes COSY, HMBC, HMQC, qui permettent de mettre en évidence les carbones quaternaires au voisinage des carbones tertiaires. La préparation du dérivé *N*-acétylé **4a'** confirme ces hypothèses.



De la même manière, le dérivé **1h** (trifluorométhylé) conduit au dimère **4h** (55 %, non optimisé).

Une étude plus attentive de la réaction dans l'acide trifluoroacétique révèle que pendant les premières minutes de celle-ci, deux produits se forment (dont **4a**) en quantité approximativement identique (il n'est cependant pas sûr que la chromatographie sur couche mince (CCM) soit l'exact reflet du milieu réactionnel). Au bout de 2 heures le second produit commence à disparaître progressivement aux dépens de **4a**. L'isolement du second produit, et son étude RMN montrent qu'il s'agit du dimère 2,2' **2a**. Ainsi **2d** (2,6') serait le dimère thermodynamique et **2a** le dimère cinétique. La transformation de **2a** (remis en solution dans l'acide trifluoroacétique) en **4a** est totale en 72 heures à température ambiante.

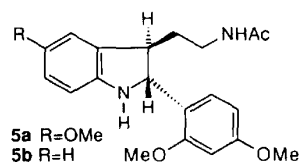
La dimérisation **1a** \rightarrow **2a** est bien une réaction réversible, puisque **4a** ne peut se former qu'à partir de **1a**. Ceci peut-être mis directement en évidence par le chauffage à 50 °C d'une solution de **2a** dans une solution d'HCl 0,9 M dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ 1:10; au bout de 2 heures la mélatonine **1a** est isolée avec un rendement de 52 %. Avec **4a** la réaction est beaucoup plus lente : au bout de 20 heures, 14 % de mélatonine seulement sont isolés (mais de nombreux produits polaires apparaissent, résultant peut-être d'hydrolyse de(s) groupement(s) amide, puisque la 5-méthoxytryptamine y est retrouvée). En milieu basique aqueux ($\text{Ba}(\text{OH})_2$, ou KOH) **2a** ne redonne pas la mélatonine alors que curieusement **2b** conduit à **1b** (baryte/ $\text{H}_2\text{O}/\text{DME}$, reflux 24 heures). Ainsi, le dimère **2a** s'avère-t-il être capable de redonner, en milieu acide, la mélatonine, ce qui constitue une condition nécessaire à son utilisation comme prodrogue de celle-ci. Pour améliorer la sélectivité de la dimérisation **2a/4a**, de très nombreux essais ont été menés en utilisant des milieux aqueux, hydroalcoolique, biphasique, en présence de divers acides organiques et minéraux. Finalement, l'acide chlorhydrique aqueux 6,7 M permet d'obtenir **2a** avec un rendement de 47 %, accompagné toutefois de 15 % de **4a**. Dans ces mêmes conditions, la dimérisation de **1b** en **2b** s'effectue avec un rendement supérieur à 80 %.

Les transformations indiquées schéma 1 pourraient rendre compte aussi bien des interconversions en milieu acide, que de la stéréochimie des produits formés. En milieu acide, **1** se protone en C^3 (1H^+), qui peut se cycliser alors en pyrroloindole protoné 3H^+ , surtout quand $R' = \text{CO}_2\text{Me}$. L'iminium 1H^+ ou l'acylaminal protoné 3H^+ [9, et références citées] réagit stéréospécifiquement avec un nucléophile ($=1$) sur la face la plus dégagée de 1H^+ , ou sur la face convexe de 3H^+ , soit par le carbone C^2 pour conduire aux dérivés **2**, soit par le carbone C^6 quand le système indolique est méthoxylé en 5.

La réaction inverse nécessite une migration 1,5 du proton $\text{N}^1\text{-H}$ pour **2**, et 1,7 pour **4**. Ces intermédiaires **2*** et **4*** peuvent alors se fragmenter comme indiqué par les flèches à partir de la position benzylique, pour conduire à deux molécules **1** par aromatisation.

Extension de la réaction ; stéréochimie des produits formés

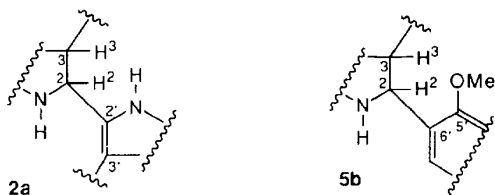
Cette réaction a été étendue au couplage entre la mélatonine **1a**, ou **1b** et le 1,3-diméthoxybenzène. Le produit mixte **5a** (56 %) est obtenu seul avec **1a**, alors qu'avec **1b**, la réaction est très rapide : **5b** est obtenu avec un bon rendement (69 %), mais du dimère indole-indoline **2b** s'est également formé (22 %) par auto-condensation. Dans les mêmes conditions, le méthoxybenzène ou le 1,2-diméthoxybenzène ne réagissent pas (ou pas assez vite), ce qui confirme qu'il s'agit bien d'une réaction de substitution électrophile aromatique.



La constante de couplage entre H^2 et H^3 pour **5a** et **5b** est de 4,5 Hz, comme pour le dimère 2,6' **4a**. Pour tous les dimères 2,2' cette constante est voisine de 9 Hz. Ceci semble donc lié à la présence ou non d'un groupement méthoxyle en position *ortho* du carbone de jonction.

Une étude par dynamique moléculaire a été menée comparativement pour **2a** et **5b**. Elle montre qu'après minimisation de l'énergie les angles des plans de l'indoline et du système aromatique qui lui est lié en position 2 (mesuré par l'angle $C^3-C^2-C^{2'}-C^{3'}$ pour **2a**, et $C^3-C^2-C^{6'}-C^{5'}$ pour **5b**) est de $62,8^\circ$ pour **2a** et $28,7^\circ$ pour **5b**. L'angle dièdre $H^3-C^3-C^2-H^2$ est de $143,80^\circ$ pour **2a** et de $108,80^\circ$ pour **5b**.

Après dynamique l'angle $C^3-C^2-C^{2'}-C^{3'}$ de **2a** est peu modifié ($43,4^\circ$), alors que $C^3-C^2-C^{6'}-C^{5'}$ de **5b** atteint $60,3^\circ$. Quant à $H^2-C^3-C^2-H^2$, il varie peu pour **2a** ($150,2^\circ$) alors que pour **5b**, sa valeur se rapproche de celle de **2a** ($146,2^\circ$).



Ainsi s'expliquent les différences observées en RMN 1H . La constante de 9 Hz correspond à un angle $H^3-C^3-C^2-H^2$ de l'ordre de 150° , qui est bien la valeur calculée pour **2a**. La valeur de 4,5 Hz observée pour **5b** correspond à un angle de l'ordre de 125° , intermédiaire entre les valeurs calculées avant et après dynamique. Elle est le reflet de la contrainte rotationnelle autour de la liaison 2-6' introduite par le groupement méthoxyle.

Le cliché de diffraction RX de **5b** confirme la géométrie *trans* au niveau de C^2 et C^3 . La valeur de l'angle $H^3-C^3-C^2-H^2 = 101,44^\circ$ se rapproche de la valeur avant dynamique.

Les produits de type **5** peuvent devenir par déshydrogénation de C^2-C^3 des 2-arylindoles qui sont des molécules intéressantes sur le plan pharmacologique : le zindoxifène **6** (anti-œstrogène antitumoral) [10], les amides de formule générale **7** qui sont des régulateurs de la synthèse des neurostéroïdes dans le système nerveux central [11]. De tels dérivés sont difficiles à préparer par arylation directe d'un dérivé organométallique de l'indole en position 2 [12, 13].

Par ailleurs, la staurosporine **8**, puissant inhibiteur de la protéine kinase C [14], possède l'enchaînement 2-indolyl-acyltryptamine du dimère **2b**. Le système 2,2'-biindolyle peut servir de support à des ligands spécifiques de métaux comme dans **9** [15].

Ceci a motivé une étude de l'oxydation de la partie indolinique des dimères préparés, en marge de nos travaux sur la mélatonine.

Oxydation des dérivés **2** et **4** : dimères indole-indole

Elle a été menée d'abord sur le dérivé **2b**, moins coûteux et plus aisé à préparer que les dimères de la mélatonine **2a** et **4a** (schéma 2).

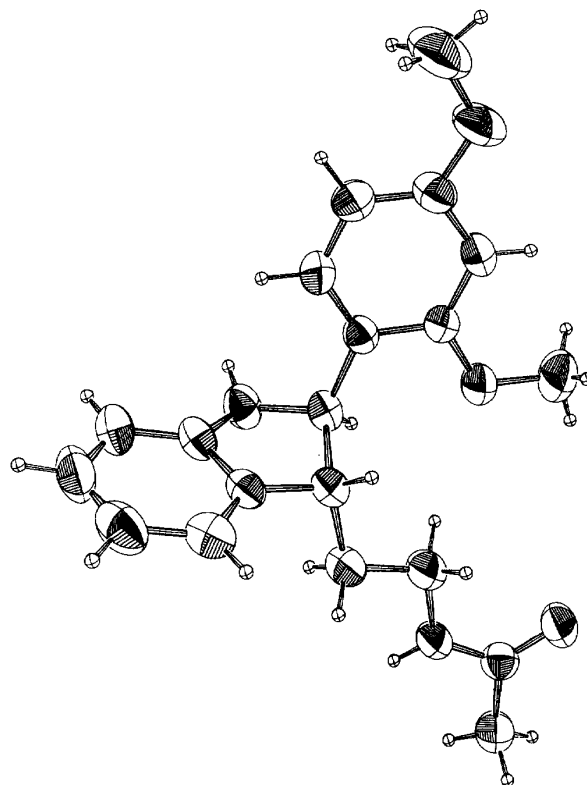
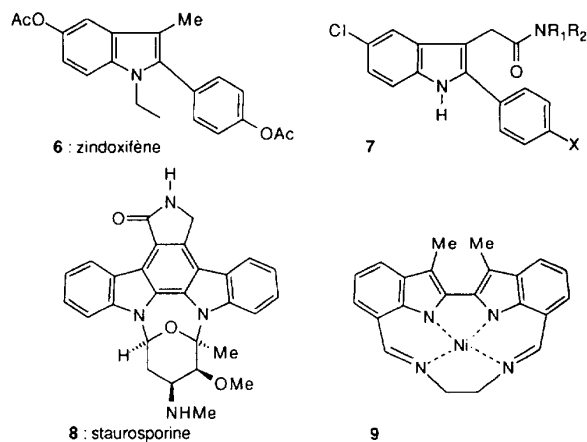


Fig 1



De très nombreuses méthodes n'ont donné aucun résultat exploitable : déshydrogénation en présence de catalyseurs [16, 17, 18], MnO_2 [19], anhydride phénylséléninique [20], DMSO [21], O_2 -TFA [22], $CuBr_2$, NCS, $tBuOCl$. L'utilisation de la DDQ [23] dans l'acide acétique permet pour la première fois d'isoler le produit attendu **10b** mais avec un très faible rendement (10 %) et accompagné d'un produit de «suroxydation» **11b**. Leurs structures sont établies d'après leurs propriétés spectrales. Pour **10b**, la masse exacte montre la perte de 2 hydrogènes par rapport à **2b**. Le spectre UV montre une absorption vers 314 nm. Les spectres RMN 1H et ^{13}C , enregistrés dans le $DMSO-d_6$, mon-

trent l'équivalence magnétique des deux systèmes indoliques (ce qui n'est pas retrouvé dans CDCl_3).

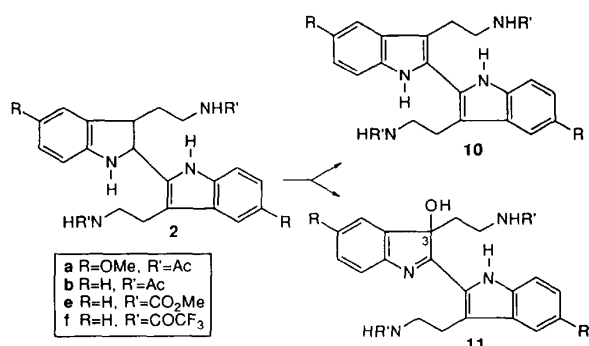


Schéma 2

Pour **11b**, la spectrométrie de masse haute résolution indique le gain d'un oxygène par rapport à **10b**. Le spectre UV est profondément modifié, avec un maximum d'absorption vers 355 nm. La présence de rotamère de l'un des groupements acétyle complique l'analyse des spectres de RMN. La RMN ^1H montre que si les deux chaînes acétylaminoéthyle sont dans un environnement différent, elles ne sont pas chimiquement modifiées, et toujours fixées à l'indole par un centre quaternaire. La RMN ^{13}C montre la présence d'un centre quaternaire à 85 ppm qui pourrait être le C^3 d'une 3-hydroxyindolénine. De telles oxydations sont courantes avec les indoles 2,3-disubstitués [24]; elles seraient facilitées ici par la présence des deux groupements indole.

Afin d'améliorer le rendement en **10b** nous avons essayé l'utilisation de l'eau oxygénée dans diverses conditions. En milieu neutre ou alcalin, aucune transformation notable n'est détectée; en présence de tungstate de sodium [25, 26], **10b** est obtenu majoritairement, mais le rendement en produit isolé reste modeste (35 %). Il est nettement amélioré avec le produit trifluoroacétylé **2f**, plus soluble, qui est transformé en **10f** avec 60 % de rendement.

En série mélatonine (schéma 3), dans ces conditions (H_2O_2 , Na_2WO_4), le dimère **4a** ne donne que 7 % de **12a** qui est facilement identifié par ses spectres de RMN ^1H et ^{13}C ; le produit majoritaire est la très instable hydroxyindolénine **13a**, caractérisée sur la base de son spectre UV avec maximum à 345 nm, son spectre de masse, et de RMN (en particulier un centre quaternaire à 80 ppm). Il est accompagné de faible quantité (4 %) d'un produit de formule $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ (mesuré par spectrométrie de masse haute résolution) ce qui correspond à la coupure oxydante d'une des chaînes latérales. Celle qui subsiste serait fixée sur une partie indolique comme le montrent les RMN ^1H et ^{13}C , ($\text{C}^{2'}$ à 125,2 ppm, C^3 à 112,7, $\text{C}^{\alpha'}$ à 25,1 et $\text{C}^{\beta'}$ à 39,7) valeurs très comparables à celles correspondantes pour la mélatonine. La formule proposée **14a** est compatible avec la présence de signaux à 185 ppm (C^3) et 160 ppm (C^2).

Ces résultats dans l'ensemble décevants nous ont amenés à essayer des systèmes oxydants moins vigoureux, en particulier l'oxygène en présence de catalyseur.

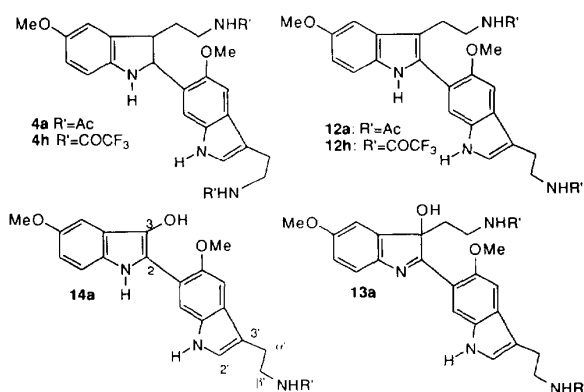


Schéma 3

Ainsi, l'oxygène moléculaire, en présence de complexes de Co^{II} (Co-Salen) comme catalyseur est réputé oxyder les indolines en indole [27]. Appliqué à **2b**, le procédé conduit exclusivement au produit «suroxydé» **11b** avec un rendement modéré (37 %)(schéma 2).

Nous nous sommes tournés alors vers l'utilisation de sels de Cu^{II} (CuCl_2) qui permettent de catalyser des réactions d'oxydation par l'oxygène moléculaire en présence de composés azotés basiques ([27] [28], [29], [30] et références citées).

Dans ce cas, l'espèce basique serait l'indoline elle-même : en solution dans le dichloroéthane (en présence de 0,1 équiv de CuCl_2 sec) le dimère indole-indoline **4a** se transforme lentement en **12a**, à température ambiante, dans une atmosphère d'oxygène (schéma 3). Au bout de 5 jours, le rendement en produit isolé est de 49 %. Curieusement, le dérivé trifluorométhylé **4h** réagit très rapidement; la solution change rapidement de couleur (du jaune au vert); au bout de deux heures le produit d'oxydation **12h** est isolé avec un rendement de 56 %. En l'absence de CuCl_2 , l'oxydation de **4a** en **12a** par l'oxygène dans le dichloroéthane est limitée (< 5 % au bout d'une semaine).

Le dimère 2,2' **2a** se comporte différemment : en présence de 0,1 équiv de CuCl_2 le dérivé attendu **10a** se forme rapidement, mais il est accompagné du produit «suroxydé» **11a** (schéma 2). Par exposition de la réaction à la lumière solaire, **10a** disparaît pour se transformer (apparemment) en **11a**. Le même résultat est encore obtenu lors d'essais de purification de **10a** sur plaque de silice, lors de migration à la lumière du jour.

Le dérivé **11a** se décompose très rapidement et n'a pu être caractérisé par RMN et par spectrométrie de masse. Toutefois son spectre UV avec un maximum à 355 nm, semble indiquer qu'il s'agit bien de l'hydroxyindolénine de structure indiquée.

L'obtention de **10a** est cependant possible si l'on utilise CuCl_2 à l'abri de toute lumière. La réaction est lente mais propre : elle ne conduit qu'à **10a**, mais au bout de 4 jours elle ne semble plus évoluer. Le milieu réactionnel est lavé par une solution aqueuse d'ammoniaque, afin d'éliminer les sels de cuivre; la purification par CCM permet d'isoler **10a** (20 %) en plus du produit de départ **2a** (52 % récupérés).

Le dimère non méthoxylé **2b** donne **10b** avec un très faible rendement (9 %) accompagné de traces de **11b** (2 %).

Finalement, cette réaction appliquée à **5a** et **5b** conduit aux indoles **15a** (44 %) et **15b** (60 %) (schéma 4). Ces rendements n'ont pas été optimisés.

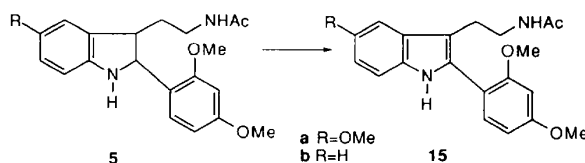


Schéma 4

Ainsi, nous avons montré que, par des méthodes originales, il a été possible d'oxyder les indolines préparées en indoles, et de préparer de cette manière quelques 2-arylindoles. Les 2,2'-bitryptamines de formule générale **10** étaient jusqu'à présent inconnues à l'exception de l'uréthane **10e** (schéma 2) préparé par Saito [31] par une méthode différente, dont la dernière étape se solde par un rendement faible (5 %).

Résultats biologiques préliminaires

Ils ont été menés dans deux directions : mesure in vitro de l'activité mélatonergique de dimères indole-indoline; évaluation chez l'animal du passage de la barrière hémato-encéphalique du dimère indole-indoline **4a**.

La mesure de l'effet mélatonergique propre des dimères est nécessaire pour évaluer son incidence éventuelle sur l'effet mélatonergique total. Il est réalisé par déplacement de la 2-¹²⁵I-iodomélatonine fixée sur des broyats de *pars tuberalis* de mouton. Les constantes d'affinité (cf tableau III) sont faibles comparativement à la mélatonine, mais non négligeables. Curieusement, tous les dérivés présentent un effet agoniste. De manière attendue, le dimère indole-indoline **12a** est le moins actif.

Tableau III. Constante d'affinité pour le site de fixation à la mélatonine

Produit	Ka (M)
Mélatonine (référence)	$1,7 \times 10^{10}$
2a	$5,5 \times 10^6$
2b	$1,1 \times 10^6$
4a	$2,2 \times 10^6$
4a'	$1,5 \times 10^6$
12a	$1,1 \times 10^5$

Le passage éventuel au niveau central a été évalué avec le dimère **4a** (2-6') plutôt qu'avec **2a** (2-2') pour minimiser le phénomène de réversion vers la mélatonine.

Dans un premier temps, **4a** est administré par voie IV chez le lapin à dose de 10 mg/kg. Du liquide céphalo-rachidien (LCR) est prélevé à intervalle de temps régulier [34], et analysé par CLHP. Il ne contient pas **4a** (seuil de détection 40 µg/L).

Dans un deuxième temps, **4a** est administré à dose de 5 mg/kg dans la carotide de rats. Les animaux sont sacrifiés à intervalle de temps régulier. Les cerveaux sont

broyés; les broyats, analysés par CLHP, ne contiennent pas **4a** (au seuil de détection).

Ainsi, le dimère **4a** ne se retrouve pas au niveau central, ni au niveau des tissus, ni au niveau des liquides.

Cette étude a mis en évidence l'existence de deux dimères indole-indoline de la mélatonine. L'un d'entre eux (**2a**, 2,2') redonne plus facilement la mélatonine en milieu acide. Il peut constituer un candidat prodrogue, n'ayant pas accès au compartiment central. Des études pharmacologiques sont maintenant nécessaires pour suivre in vivo les transformations de **2a**.

Partie expérimentale

Généralités

Tous les réactifs utilisés sont de pureté commerciale. Sauf indications contraires, les réactions sont réalisées sous atmosphère d'argon. Les chromatographies (sur couche mince ou circulaire) utilisent le gel de silice Merck n° 7749 Kieselgel 60 PGF₂₅₄.

Les points de fusion sont mesurés sur une platine Reichert, et ne sont pas corrigés. Les spectres UV sont mesurés sur un spectrophotomètre Varian 634, les longueurs d'onde des maximums d'absorption sont exprimées en nm. Les spectres IR sont enregistrés sur un appareil FTIR de BOMEM, muni d'un interféromètre COSMIC, les principales absorptions sont indiquées en cm⁻¹. Les spectres de RMN ¹H et ¹³C sont mesurés à respectivement 300 MHz et 75 MHz avec un appareil Bruker AC 300; les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS, et les constantes de couplage en Hz. Les données reportées dans les tableaux I et II ne figurent pas dans la partie expérimentale. Les spectres de masse sont mesurés sur un appareil haute résolution JEOL JMS D300, par impact électronique (énergie d'accélération = 70 eV); la valeur des rapports m/z est donnée pour les ions principaux; elle est suivie entre parenthèses de la valeur de son intensité relative.

Le spectre de diffraction RX de **5b** (échantillon : 0.20*0.25*0.25 mm) a été mesuré sur un diffractomètre automatique CAD4 ENRAF-NONIUS, (radiation du molybdène avec monochromateur au graphite).

L'analyse conformationnelle par la dynamique moléculaire a été réalisée par le logiciel Insight II en utilisant une station de travail Silicon Graphics IRIS Indigo R3000. Après construction de la molécule, une première minimisation est effectuée donnant une première valeur E₁ de l'énergie. La molécule est ensuite «chauffée» et cette dynamique est suivie d'une seconde minimisation donnant E₂.

L'analyse des échantillons biologiques est effectuée par CLHP et détection UV. Le système chromatographique est composé d'un chromatographe en phase liquide Varian Model 5000 (Varian, Sunnyvale, USA) équipé d'un injecteur à boucle (20 µL) Valco (Valco Instrument, Houston, USA) et d'un spectromètre UV (ABI Spectroflow 783, Ramsey, USA). La séparation est réalisée en phase inverse sur une colonne greffée C8 (Lichrospher 100 RP8, 5 µm, 250 mm x 4 mm id, Merck, Darmstadt, Germany) munie d'une précolonne de 5 cm de phase inverse Vydac (Vydac reverse phase, Varian, Sunnyvale, USA). La phase mobile est constituée d'un mélange tampon acétate (pH 3)/acétonitrile (70/30, V/V), dont le débit était de 1,2 mL/min. La détection est effectuée à la longueur d'onde de 220 nm.

Dimérisation des amides **1** dans l'acide trifluoroacétique : indolines **2** ou **4**

Une solution 0,5 M de l'amide **1** dans l'acide trifluoroacétique est maintenue à la température du laboratoire, sous atmosphère d'azote, pendant la durée indiquée dans le tableau.

La solution est alors diluée dans un mélange eau + glace, alcalinisée par NH_4OH , extraite par le chlorure de méthylène utilisé en 3 fois. La phase organique est récupérée par décantation, séchée par MgSO_4 et évaporée.

Le résidu est purifié, selon les quantités, par chromatographie sur couche mince (éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5) ou chromatographie circulaire (CHCl_3 , gradient de méthanol).

Amide 1	Quantité (mmol)	Durée de réaction (h)	Rendement en 2	Rendement en 4
a	0,5	72	–	63 %
a	2,5	2	20 %	35 %
b	6,2	48	81 %	
f	7,1	23	55 %	
g	1	36	59 %	
h	10	24		55 %

Condensation entre l'amide 1 et le 1,3-diméthoxybenzène

Une solution 0,5 M dans l'acide trifluoroacétique de l'amide 1 et de 1,3-diméthoxybenzène (5 équiv) est maintenue, le temps indiqué, à température ambiante, à l'abri de la lumière. Après extraction comme ci-dessus, les produits suivants sont obtenus :

Amide 1	Quantité (mmol)	Durée de réaction (h)	Rendement en 5	Autre produit (rdt)
a	0,20	4	56 %	–
b	0,25	2	69 %	5b (22 %)

Dimérisation des amides 1a et 1b dans l'acide chlorhydrique : indolines 2a, 4a et 2b

L'amide 1 est dissous dans une solution de molarité connue d'acide chlorhydrique aqueux (approximativement : 1 mmol dans 50 mL de la solution HCl). Au bout du temps indiqué, à température ambiante, la solution est refroidie et alcalinisée par l'ammoniac. Elle est extraite et purifiée comme décrit ci-dessus.

Amide 1	Quantité (mmol)	$[\text{HCl}]$ (mol/L)	Durée (h)	Rendement en 2	Rendement en 4
a	0,25	6,7	1	47	15
a	0,40	9,6	0,5	19	
b	0,30	3,9	72	35	
b	0,20	6,7	3	79	
b	0,20	9,6	1	81	

Transformation du dimère 2a en dimère 4a dans l'acide trifluoroacétique

Une solution de **2a** (46 mg, 0,2 mmol) dans l'acide trifluoroacétique (1 mL) est agitée, à température ambiante sous atmosphère inerte, jusqu'à disparition de **2a** (20-40 h). Après extraction (*vide supra*), **4a** (31 mg) est obtenu à l'état de pureté (68 %).

2a. UV : 228, 281, 301, 313.

IR (KBr) : 3 304, 2 938, 1 655, 1 638, 1 551.

Masse calc pour $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4$ = 464,2423, tr : 464,2369.
Masse : 464 (M^+ , 40), 378 (80), 333 (50), 319 (45), 210 (75), 173 (30), 160 (50), 91(100).

2b. UV : 225, 285, 294.

IR (KBr) : 3 289, 3 065, 2 941, 1 653, 1 643, 1 556.

Masse calc pour $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2$ = 404,2212, tr : 404,2260; 404 (M^+ , 45), 318 (100), 273 (45), 259 (65), 143 (70), 130 (95).

2f. F : 177-178 °C (CH_2Cl_2).

UV : 225, 286, 295.

IR (film) : 3 320, 2 940, 1 700, 1 640, 1 560.

Masse calc pour $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{F}_6\text{N}_4\text{O}_2$ = 512,1751, tr : 512,1751; 512 (M^+ , 1), 448 (1), 386 (2), 143 (20), 130 (100).

2g. UV : 225, 286, 293.

IR (sol CHCl_3) : 3 430, 3 325, 2 995, 1 660, 1 620, 1 600, 1 510.

Masse calc pour $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2$ = 428,2211, tr : 428,2186; 428 (3), 330 (4), 167 (15), 143 (100), 130 (85).

4a. UV : 227, 300.

IR (film) : 3 300, 1 630, 1 590. Masse calc pour $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4$ = 464,2423, tr : 464,2451; 464 (M^+ , 18), 392 (25), 378 (15), 232 (20), 173 (75), 160 (100).

4h. UV : 224, 298.

IR (film) : 3 320, 2 930, 1 700, 1 595.

Masse : 572 (M^+ , 75), 446 (75), 412 (25), 286 (10), 243 (45), 160 (100).

5a. UV : 232, 281, 312.

IR (film) : 3 304, 2 938, 2 836, 1 649, 1 612, 1 587.

Masse calc pour $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ = 370,1893, tr : 370,1932; 370 (M^+ , 100), 298 (100), 284 (45), 160 (40).

5b. F : 142-144 °C (CH_2Cl_2).

UV : 232, 248, 282, 306.

IR (film) : 3 306, 2 934, 1 655, 1 609.

Masse calc pour $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ = 340,1787, tr : 340,1761; 340 (M^+ , 60), 281 (35), 268 (85), 254 (40), 143 (83), 130 (100).

Caractéristiques cristallographiques : monoclinique, $P2_1/c$, $a = 13.642(2)$, $b = 10.219(1)$, $c = 14.809(2)$ Å, $\beta = 117.47(2)^\circ$, $V = 1831.6(5)$ Å³, $Z = 4$, $D_x = 1.234$ Mg m⁻³, $\lambda(\text{MoK}\alpha) = 0.70926$ Å, $\mu = 0.78$ cm⁻¹, $F(000) = 728$, $T = 294$ °K, R final = 0.034 pour 1 803 observations. Les paramètres de la maille ont été obtenus par affinement d'un ensemble de 25 réflexions à angle theta élevé. La collection de données ($2\theta_{\text{max}} = 50^\circ$, balayage $\omega/2\theta = 1$, $t_{\text{max}} = 60$ s, domaine hkl : h 0,16 k 0,12 l -17,17, contrôles d'intensité sans dérive significative (0.5 %)) a fourni 3 531 réflexions dont 1 803 indépendantes ($R_{\text{int}} = 0.011$) avec $I > 3\sigma(I)$. Après corrections de Lorentz et de polarisation, la structure a été résolue à l'aide des méthodes directes qui permettent de localiser tous les atomes non hydrogène de la molécule. Après affinement isotrope ($R = 0.12$) puis anisotrope ($R = 0.085$), les atomes d'hydrogène ont été localisés à l'aide d'une différence de Fourier (entre 0.53 et 0.21 eÅ⁻³). La structure complète a été affinée par matrice entière (x , y , z , β_{ij} pour C, O and N, x , y , z pour H; 299 variables et 1 803 observations; $w = 1/\sigma(F_o)^2 = [\sigma^2(I) + (0.04F_o^2)]^{-1/2}$) conduisant à $R = 0.038$, $R_w = 0.034$ et $S_w = 0.708$ (résidu $\Delta\rho \leq 0.14$ eÅ⁻³). Les facteurs de diffusion sont tirés des tables Internationales de cristallographie. Tous les calculs ont été réalisés à l'aide d'un ordinateur Digital MicroVAX 3100 avec le jeu de programmes MOLEN. Le matériel supplémentaire concernant l'étude cristallographique a été déposé au British Library à Boston Spa, Wetherby West Yorkshire, LS23 7QB UK, comme matériel supplémentaire n° SUP 9 402 (23 pages) et peut être obtenu en faisant la demande au Document Supply Center (rappeler le n° SUP correspondant).

Acétylation de **4a** : dérivé **4a'**

Une solution de **4a** (431 mg, 0,93 mmol), de 4-(diméthylamino)pyridine (5 mg, 0,05 équiv), de triéthylamine (0,14 mL, 1,1 équiv) et de chlorure d'acétyle (0,07 mL, 1,1 équiv) dans le chlorure de méthylène anhydre (20 mL), est portée à reflux 1,5 h. Après dilution dans 30 mL d'eau glacée, la solution est extraite par le dichlorométhane. Les phases organiques sont lavées à l'eau, puis à une solution à 5 % de CuSO₄, séchées (MgSO₄), évaporées. Le résidu (442 mg) est purifié par CCM (CH₂Cl₂/MeOH 98:2). Il permet d'obtenir 380 mg (81 %) de dérivé **4a'**.

4a'. UV : 224, 262, 298.

IR (film) : 3 300, 2 950, 1 630, 1 590.

RMN ¹H : 1,9 (s, 3H); 1,95 (s, 3H); 1,99 (s, 3H); 2,45 (s, 2H); 2,90 (t, *J* = 7, 2H); 3,00 (m, 1H); 3,40 (m, 1H); 3,50 (q, *J* = 7, 2H); 3,55 (m, 1H); 3,7 (s, 3H); 3,95 (s, 3H); 5,45 (d, *J* = 4,5, 1H); 5,88 (t, 1H); 6,05 (t, 1H); 6,62 (d, *J* = 2, 1H); 6,72 (dd, *J* = 2, *J* = 9, 1H); 6,80 (s, 1H); 6,91 (s, 1H); 7,08 (s, 1H); 8,21 (d, *J* = 9, 1H); 8,65 (s, 1H).

RMN ¹³C : 23,0; 23,2 (2 signaux); 25,2; 36,2; 37,0; 39,7; 48,3; 55,3; 55,5; 64,9; 99,1; 107,6; 110,9; 111,9; 112,5; 117,3; 122,9; 125,1; 126,6; 131,0; 135,5; 136,1; 150,1; 156,5; 169,2; 170,2 (2 signaux).

Masse : 506 (M⁺, 18), 392 (25), 232 (30), 173 (100), 160 (60).

Transformation des dimères indole-indoline **2a** et **4a** en mélatonine **1a** par HCl

Une solution 0,1 M d'indoline dans l'acide acétique est additionnée d'HCl aqueux 9,6 M (1 mL pour 10 mL). La solution est maintenue à 50 °C le temps indiqué. Après dilution dans l'eau glacée et alcalinisation par l'ammoniaque, elle est extraite et purifiée comme décrit ci-dessus.

Indoline	Quantité	Durée	Rendement	Indoline	Présence de
(mmol)	(h)	en 1a	en 1a	recupérée	5-méthoxy-tryptamine
2a	0,25	2	52	28	–
4a	0,50	20	14	40	+

Transformation de l'indoline **2b** en N-acétyltryptamine **1b** par la baryte

A une solution de **2b** (36 mg, 0,18 mmol) dans 15 mL de 1,2-diméthoxyéthane, sont ajoutés 10 mL d'une solution aqueuse saturée de baryte (0,15 M). Le mélange est porté à reflux pendant 24 h. Après dilution dans 50 mL d'eau, la solution refroidie est extraite par CHCl₃ (3 × 50 mL), séchée (MgSO₄), évaporée, pour donner un résidu de 40 mg qui, soumis à une CCM (CHCl₃/MeOH 95:5), fournit **1b** (21 mg, 58 %) et le produit de départ **2b** (traces : < 1 mg).

Oxydation des indolines **2**, **4**, **5** en indoles **10**, **12**, **15**, hydroxyindolénines **11**, **13** et 3-hydroxyindole **14**

• Oxydation de **2b** par la DDQ

Une solution de 61 mg de **2b** (0,15 mmol) et de 4 mg de DDQ (0,1 équiv) dans 4 mL d'acide acétique est agitée à 0 °C sous atmosphère d'oxygène pendant 16 h. Elle est versée dans 50 mL d'eau glacée, alcalinisée par NH₄OH, extraite par CHCl₃ (3 × 20 mL). Les phases chloroformiques, rassemblées, séchées par MgSO₄, évaporées, donnent un résidu de 60 mg

qui, chromatographié (CCM, éluant CHCl₃/MeOH 90:10), livre 6 mg de **10b** (moins polaire) et 7 mg de **11b** (plus polaire) de couleur jaune.

• Oxydation de **2b** par l'oxygène en présence de Co-salen

Une solution de 41 mg de **2b** (0,1 mmol) et de 7 mg de Co-salen (0,02 mmol, 0,2 équiv) dans 20 mL de méthanol est agitée 18 h à la température du laboratoire sous atmosphère d'oxygène. Le solvant est évaporé et le mélange complexe qui en résulte, soumis à une CCM, permet d'isoler le produit majoritaire **11b** (15 mg, 37 %).

• Oxydation par l'eau oxygénée en présence de Na₂WO₄

135 mg de **2b** (0,33 mmol) sont dissous dans 10 mL de méthanol. Sous agitation, 1 mL d'eau, 22 mg de Na₂WO₄ (0,07 mmol, 0,2 équiv) et 0,35 mL de H₂O₂ à 30 % (soit approximativement 10 équiv) sont ajoutés, à l'abri de la lumière. Au bout de 30 min, la solution est versée dans 30 mL d'eau, alcalinisée par NH₄OH, extraite par CHCl₃ (3 × 20 mL). Les phases organiques, séchées par MgSO₄, sont évaporées. Le résidu (134 mg) est soumis à une CCM qui permet d'isoler, par polarité croissante, **10b** (47 mg, 35 %), le produit de départ **2b** (10 mg) et **11b** (13 mg, 9 %).

De la même manière, la réaction de 165 mg (0,33 mmol) de **2f** conduit, après 35 min, à l'obtention de **10f** (98 mg, 60 %), **2f** (15 mg) et **11f** (< 1 mg).

La réaction de 665 mg (1,43 mmol) de **4a**, en présence de 10 équiv de H₂O₂ pendant 4 h, conduit, par polarité croissante, à **12a** (46 mg, 7 %), **14a** (24 mg, 4 %), **13a** (150 mg, 23 %).

• Oxydation par l'oxygène en présence de CuCl₂

Une solution de 560 mg (1,2 mmol) de **4a** dans 200 mL de 1,2-dichloroéthane est vigoureusement agitée en présence d'oxygène, après addition de CuCl₂ sec (60 mg). La réaction est poursuivie pendant 120 h. La suspension est filtrée. Le filtrat est évaporé, le résidu (424 mg) est séparé par CCM (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) et permet d'obtenir 274 mg de **12a** (49 %).

Dans les mêmes conditions, 50 mg (0,09 mmol) de **4h** en présence de 5 mg de CuCl₂ conduisent en 2 h à 28 mg de **12h** (56 %).

Dans les mêmes conditions, **2b** (79 mg, 0,19 mmol), en présence de 6 mg de CuCl₂, conduit, au bout de 24 h, au mélange de **10b** (moins polaire, 19 mg, 9 %) et de **11b** (plus polaire, 2 mg, 3 %).

Dans les mêmes conditions, **5a** (60 mg, 0,16 mmol), en présence de 4 mg de CuCl₂, conduit, en 3 h, à **15a** (26 mg, 44 %); **5b** (80 mg, 0,23 mmol), en présence de 6 mg de CuCl₂, conduit, en 4 h, à **15b** (48 mg, 60 %). L'action de l'oxygène sur **2a** (63 mg, 0,13 mmol) dissous dans le 1,2-dichloroéthane (25 mL) en présence de CuCl₂ (5 mg) est menée à température ambiante pendant 4 jours, sous vigoureuse agitation à l'abri de la lumière. Le milieu réactionnel est rapidement filtré, et agité avec 60 mL d'une solution d'ammoniaque à 10 % utilisée en trois fois. La dernière solution de lavage ne présente plus de coloration bleue décelable. La phase organique est séchée (MgSO₄) et évaporée. Le résidu (63 mg) est soumis à une CCM à l'abri de la lumière (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) qui permet d'isoler **10a** (13 mg, 21 %), moins polaire et le produit de départ **2a** (33 mg, 53 %).

10a. UV : 232,314.

IR (film) : 3 280, 1 660, 1 650.

Masse : 462 (M⁺).

10b. UV : 228, 315.

IR (film) : 3 340, 1 660, 1 640, 1 550.

Masse calc pour $C_{24}H_{26}N_4O_2$: 402,2056; tr : 402,2083; 402 (20), 251 (50), 249 (50), 143 (100), 130 (100).

10f. UV : 225, 315.

IR (film) : 3 310, 1 700, 1 550.

Masse calc pour $C_{24}H_{26}F_6N_4O_2$ = 510,1490, tr : 510,1481; 510 (M^+ , 35), 384 (80), 271 (80), 257 (60), 256 (60), 130 (80).

11b. UV : 234, 242, 355.

IR (film) : 3 280, 1 650, 1 630.

RMN 1H : 1,55 (s, 3H); 1,69 (s, 3H); 1,98 (m, 2H); 3,05 (m, 2H); 3,3-3,55 (m, 4H); 5,80 (t, 1H); 6,10 (m, 1H); 7,15 (t, $J = 9$, 1H); 7,20 (t, $J = 9$, 1H); 7,31 (t, $J = 9$, 1H); 7,33 (t, $J = 9$, 1H); 7,40 (d, $J = 9$, 1H); 7,42 (d, $J = 9$, 1H); 7,45 (d, $J = 9$, 1H); 7,62 (d, $J = 9$, 1H).

RMN ^{13}C ($CHCl_3 + CD_3OD$) : 21,6 (2 signaux); 22,8; 34,3; 36,5; 41,2; 85,6; 111,6; 118,3; 119,1; 119,8; 119,9; 122,3; 124,4; 125,9; 127,3; 129,4; 136,5; 139,0; 152,8; 171,1; 171,2; 174,2.

Masse calc pour $C_{24}H_{26}N_4O_3$: 418,1918; tr : 418,1909; 418 (20), 332 (30), 280 (45), 275 (40), 210 (30), 143 (80), 130 (100).

12a. UV : 232, 314.

IR (film) : 3 290, 2 920, 1 650.

Masse calc pour $C_{26}H_{30}N_4O_4$ = 462,2267, tr : 462,2415; 462 (M^+ , 20), 390 (55), 331 (30), 232 (10), 173 (40), 160 (40).

12h. UV : 232, 314.

IR (film) : 3 340, 1 700.

Masse : 570 (M^+ , 35), 444 (100), 154 (75).

13a. UV : 292, 345.

IR (film) : 3 280, 3 100, 2 940, 1 650.

RMN 1H ($DMSO-d_6$) : 1,65 (s, 3H); 1,84 (s, 3H); 1,85 (m, 1H); 2,08 (m, 1H); 2,73 (m, 1H); 2,85 (t, $J = 6,7$, 2H); 2,95 (m, 1H); 3,35 (q, $J = 6,7$, 2H); 3,80 (s, 3H); 3,85 (s, 3H); 6,35 (s, 1H); 7,08 (dd, $J = 2$, $J = 9$, 1H); 7,18 (d, $J = 2$, 1H); 7,20 (s, 1H); 7,22 (s, 1H); 7,54 (d, $J = 9$, 1H); 7,65 (s, 1H); 8,03 (t, 1H); 10,90 (s, 1H).

RMN ^{13}C ($DMSO-d_6$) : 22,7; 22,9; 25,4; 34,1; 36,8; 39,7; 56,2 (2 signaux); 79,6; 100,1; 109,3; 112,1; 112,3; 113,5; 114,2; 115,4; 125,2; 129,1; 130,9; 139,3; 140,2; 145,0; 152,0; 160,7; 169,3; 169,6.

Masse : 478 (M^+ , 10), 440 (45), 390 (60), 232 (40), 173 (35), 160 (40), 112 (85), 55 (100).

14a. UV : 216, 262, 306.

IR (film) : 3 300, 2 930, 1 700, 1 650.

RMN 1H : 1,9 (s, 3H); 2,85 (t, $J = 6,7$, 2H); 3,5 (q, $J = 6,7$, 2H); 3,85 (s, 3H); 3,90 (s, 3H); 5,88 (sl, 1H); 6,95 (s, 1H); 7,05 (dd, $J = 2$, $J = 9$, 2H); 7,15 (d, $J = 2$, 1H); 7,42 (s, 1H); 7,58 (d, $J = 9$, 1H); 8,75 (sl, 1H).

RMN ^{13}C : 23,2; 25,1; 39,7; 56,1; 56,3; 100,2; 108,0; 108,7; 112,7; 114,1; 115,2; 117,6; 125,1; 125,2; 130,0; 131,0; 135,1; 140,6; 152,5; 162,2; 170,4; 185,8.

Masse calc pour $C_{22}H_{23}N_3O_4$: 393,1689; tr : 393,1694; 393 (M^+ , 85), 321 (20), 259 (5), 231 (20), 218 (25), 59 (100).

15a. UV : 218, 309.

IR (film) : 3 279, 2 940, 1 651, 1 614, 1 578, 1 557.

Masse calc pour $C_{21}H_{24}N_2O_4$ = 368,1736, tr : 368,1719; 368 (M^+ , 25), 296 (100).

15b. UV : 220, 244, 301.

IR (film) : 3 403, 3 289, 2 940, 1 651, 1 614, 1 576, 1 460.

Masse calc pour $C_{20}H_{22}N_2O_3$ = 338,1630, tr : 338,1582; 338 (M^+ , 40), 279 (30), 266 (100), 250 (25), 235 (10).

Étude de la liaison des composés aux récepteurs à la mélatonine de la pars tuberalis de mouton

Préparation des cellules et membranes : des tissus frais de *pars tuberalis* de mouton sont obtenus à l'abattoir sur les animaux d'âge, de sexe et d'élevage différents. Les préparations de membranes sont réalisées selon la méthode décrite par Morgan [31]. Les membranes lavées sont mises en suspension dans un tampon (0,025 M Tris-HCl, 1 mM EGTA; pH : 7,5) réfrigéré, à une concentration finale de 0,1 équivalent *pars tuberalis* par 100 μ L.

Réactifs et produits chimiques : La 2- ^{125}I -iodomélatonine est synthétisée à partir d'iodogène et purifiée par CLHP pour obtenir une activité spécifique approximative de 2 000 Ci/mmol comme décrit par Morgan [32].

Etudes de binding : dans les expériences de binding compétitif 100 μ L de membranes en suspension sont ajoutées dans des tubes contenant 400 μ L de tampon avec approximativement 65 pM du ligand ^{125}I mélatonine et différentes concentrations des composés (10^{-14} – 10^{-4} M en concentration finale). Les réactions (2 h à 37 °C) sont stoppées en plaçant les tubes au froid et en ajoutant 500 μ L de gamma globuline de mouton à 1 % plus 1 mL de polyéthylène glycol froid, l'ensemble faisant l'objet d'une centrifugation. Le surnageant est éliminé et les protéines sont rincées et sont recentrifugées une dernière fois avant le comptage des protéines sur un compteur Gamma (Packard Instrument Co, Model 5010) de 74 % de rendement. Les paramètres de binding sont déterminés sans transformation des données par analyse informatique à l'aide du logiciel PROGRAM [33]. La constante d'affinité K_a est estimée pour tous les composés.

Étude du passage de 4a dans le LCR

L'étude est réalisée chez le Lapin néo-zélandais (2,7 kg) anesthésié (carbamate d'éthyle : 1,25 g/kg; voie IP) et curarisé (triiodoéthylate de gallamine; induction : 4 mg/kg; entretien : 2 mg/kg; voie IV). 4a est injecté en solution dans du soluté physiologique de chlorure de sodium à la dose de 10 mg/kg (volume injecté : 1 mL/kg; vitesse d'injection : 1 mL/min.) dans la veine marginale de l'oreille. Après cathétérisation de l'artère fémorale, les échantillons sanguins (1,5 mL) sont recueillis sur héparinate de lithium aux temps : 0 (avant injection) et 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 min après l'administration du produit. Le recueil de LCR est effectué en continu par intervalles de 15 min après implantation d'une canule guide au sein du troisième ventricule. Après centrifugation, les échantillons de LCR sont directement injectés dans le système chromatographique. Le plasma est préalablement extrait par l'éther avant injection du résidu sec repris par le méthanol dans le chromatographe. Les résultats obtenus montrent qu'au niveau sanguin les concentrations varient de 8,3 mg/L 5 min après l'injection à 0,4 mg/L après 180 min. Dans le LCR, les concentrations du dimère ont été inférieures à la limite de détection de la méthode analytique (40 μ g/L).

Étude du passage de 4a dans le tissu cérébral

La solution de 4a (1 mg/mL) est préparée après mise en contact du produit avec une quantité minimale d'acide acétique puis dissolution dans du soluté physiologique de chlorure de sodium. Trois rats mâles Wistar (300-320 g) sont anesthésiés au carbamate d'éthyle (1,25 g/kg; voie IP). Après cathétérisation de la carotide externe gauche et injection rapide du dimère (0,5 mL/100 g) à la dose de 5 mg/kg, les animaux sont sacrifiés aux temps 15, 30 et 60 min suivant l'administration du produit. Après exsanguination, les cerveaux sont lavés *in situ* au moyen d'une solution isotonique de chlorure de sodium glacé, prélevés puis conservés

à -20°C jusqu'au moment de l'analyse. Les concentrations du dimère dans le tissu cérébral sont déterminées à partir d'une prise d'essai exactement pesé de cerveau de rat (environ 200 mg) provenant de l'hémisphère droit ou gauche. Le tissu cérébral est broyé dans du méthanol (500 μL). Après centrifugation (10 000 t/min), un aliquot de la phase méthanolique est injecté dans le système chromatographique. Les résultats montrent que les concentrations intratissulaires de **4a** sont inférieures à la limite de détection de la méthode (soit 40 $\mu\text{g/mL}$).

Remerciements

Les auteurs remercient Bernard Maigret (Université de Nancy I) et Jean-Marc Nuzillard pour leurs fructueuses discussions, Jean Lévy pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, et la Société ADIR (groupe Servier) pour son aide matérielle.

Références

- Miles A, Philbrick DRS, Thomson C, In : *Melatonin Clinical Perspectives*; Oxford Medical Publications, 1988
- Fèvre-Montange M, *Presse Med* (1985) 14, 1659
- Remers WA, In : *Indoles*, Houlihan WJ Ed, Wiley, New York, 1972, Vol 25, part 1, p 66
- Omori Y, Matsuda Y, Aimoto S, Shimonishi Y, Yamamoto M, *Chem Lett* (1976), 805
- Hashizume K, Shimonishi Y, *Bull Chem Soc Jpn* (1981) 54, 3806
- Taniguchi M, Hino T, *Tetrahedron* (1981) 37, 1487
- Lévy J, Sapi J, Laronze JY, Royer D, Toupet L, *Synlett* (1992), 601
- Blasko G, Cordell GA, In : *The alkaloids : Antitumor Biindole from Catharantus roseus (L.)*, Brossi A, Suffness M, Eds, Academic, New York, 1990, Vol 37, p 1
- Nisole C, Uriac P, Toupet L, Huet J, *Tetrahedron* (1993) 49, 889
- Fürstner A, Jumbam DN, Seidel G, *Chem Ber* (1994) 127, 1125
- Kozikowski AP, Ma D, Brewer J, Sun S, Costa E, Romeo E, Guidotti A, *J Med Chem* (1993) 36, 2908
- Amat M, Hadida S, Bosch J, *Tetrahedron Lett* (1993) 34, 5005
- Kalinin VN, *Synthesis* (1992), 413
- Gribble GW, Berthel SJ, In : *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman Ed, Elsevier, Amsterdam, 1993, Vol 12, p 365
- Black DStC, *Synlett* (1992), 246
- Young TE, *J Org Chem* (1962) 27, 507
- Kiguchi T, Kuninobu N, Takahashi Y, Yoshida Y, Naito T, Ninomiya I, *Synthesis* (1989), 778
- Tsuji Y, Kotachi S, Huh KT, Watanabe Y, *J Org Chem* (1990) 55, 580
- Jansen ABA, Johnson JM, Surtees JR, *J Chem Soc* (1964), 5573
- Barton DHR, Lusinch X, Milliet P, *Tetrahedron Lett* (1982) 23, 4949
- Keirs D, Overton K, *J Chem Soc, Chem Commun* (1987), 1660
- Pelcman B, Gribble GW, *Tetrahedron Lett* (1990) 31, 2381
- Borror AL, Chinoporos E, Filosa MP, Herchen SR, Pizzo Petersen C, Stern CA, Onan KD, *J Org Chem* (1988) 53, 2047
- Witkop B, Patrick JB, *J Am Chem Soc* (1951) 73, 2196
- Somei M, Kawasaki T, *Heterocycles* (1989) 29, 1251
- Kawasaki T, Somei M, *Heterocycles* (1990) 31, 1605
- Inada A, Nakamura Y, Morita Y, *Chem Lett* (1980), 1287
- Arora PK, Sayre LM, *Tetrahedron Lett* (1991) 32, 1007
- Atlamsani A, Brégeault JM, *Synthesis* (1993), 79
- Capdevielle P, Maumy M, *Tetrahedron Lett* (1993) 34, 2953
- Saito I, Morii T, Matsugo S, Matsuura T, *J Chem Soc, Chem Commun* (1982), 977
- Morgan PJ, Williams LM, Davidson G, Lawson W, Howell HE, *J Neuroendocrinol* (1989) 1, 1
- Munson PJ, *Meth Enzymol* (1983) 92, 543
- Vistelle R, Wiczewski M, Arousseau M, *Brain Res Bull* (1989) 22, 919