

Hydroxylation de l'ellipticine chez le rat : structure des deux principaux métabolites. Synthèse de l'hydroxy-7 ellipticine.

Jean-Yves LALLEMAND*, Pierre LEMAITRE, Lee BEELEY, Pierre LESCA^(a)

et Daniel MANSUY*

Laboratoire de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure, associé au C.N.R.S. n°32, 24, rue Lhomond 75231 Paris cedex 05, France

(a) : Laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie Fondamentales du C.N.R.S. 205, route de Narbonne, 31078, Toulouse Cedex, France

(Received in France 19 December 1977; received in UK for publication 24 February 1978)

L'ellipticine (diméthyl-5,11-pyrido-[6H]-carbazole-[4, 3b]), 4a, et ses dérivés présentent diverses activités pharmacologiques (1-3), en particulier en chimiothérapie de certains cancers (4).

Chez le rat, l'ellipticine est principalement hydroxylée en position 9 (5-8) au niveau des monooxygénases à cytochrome P 450 détoxifiantes hépatiques (6,8), puis excrétée par la bile après conjugaison (5,7). La structure du métabolite hydroxylé principal a été établie par comparaison de son temps de rétention en chromatographie liquide-liquide sous pression, et de son spectre de masse, avec ceux d'un échantillon d'hydroxy-9-ellipticine (5, 7).

Dans le présent travail, nous avons pu isoler les deux principaux métabolites hydroxylés de l'ellipticine chez le rat *in vivo* et étudier leur structure notamment en RMN ¹H. Afin d'établir définitivement la structure du composé hydroxylé minoritaire, nous avons été amenés à faire la synthèse de l'hydroxy-7-ellipticine non décrite jusqu'alors.

Structure des deux métabolites hydroxylés de l'ellipticine

L'isolement de ces métabolites obtenus après injection à 2 rats de 8 mg d'ellipticine (IP) par rat et par jour pendant 2 jours, puis de 4 mg (IV) le troisième jour, récupération de la bile, traitement par la β-glucuronidase, extraction par l'acétate d'éthyle et chromatographie sur plaque, est réalisé

selon une méthode décrite (6). Le composé majoritaire (1,4 mg) a un spectre RMN ^1H superposable à celui d'un échantillon authentique d'hydroxy-9-ellipticine, ce qui permet d'établir définitivement la structure précédemment indiquée (5-8). Le composé minoritaire (0,2 mg) a un spectre de masse très proche de celui de l'hydroxy-9-ellipticine : m/e (210°C, 70 eV) : 262 (M^+), 247 ($M-15$), 233, 218, 204 ; par contre son spectre RMN est différent, tout au moins en ce qui concerne les signaux des 3 protons du noyau benzénique de l'indole. La nature de ces signaux (250 MHz, DMSO, δ ppm/TMS) : 7,06 (d, $J = 8$ Hz), 7,86 (d, $J = 8$ Hz) et 7,12 (t, $J = 8$ Hz) n'est compatible qu'avec une hydroxylation en 7 ou en 10. La similitude des déplacements chimiques du méthyle en 11 de ce métabolite (3,26 ppm) et de ceux du méthyle correspondant de l'hydroxy-9-ellipticine (3,22 ppm), ou de l'ellipticine (3,23 ppm), semble en défaveur d'une hydroxylation en 10 (9). La trop faible quantité du métabolite isolé n'a pas permis de confirmer la présence de l'hydroxyle en -7 par mise en évidence d'un effet Overhauser entre le méthyle en 11 et H-10 (16). Aux fins de comparaison, il était donc indispensable d'effectuer une synthèse univoque de l'hydroxy-7-ellipticine.

Synthèse de l'hydroxy-7-ellipticine 4c (Figure 1)

La méthoxy-7-ellipticine 4b a été préparée selon un schéma voisin de celui qui avait été utilisé pour la synthèse de l'ellipticine (10). La condensation du méthoxy-7-indole (11) avec l'hexanedione-2,5, selon (10), conduit au carbazole 1 (Rdt : 48% après chromatographie sur colonne, $\text{SiO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) : $F = 170^\circ\text{C}$; RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz), 2,5 (CH_3), 2,87 (CH_3), 3,98 (OCH_3), 6,9 (d, $J = 8,5$ Hz) H-7, 6,95 (d, $J = 7,5$ Hz) et 7,13 (d, $J = 7,5$ Hz) H-2 et H-3, 7,18 (t, $J = 8,5$ Hz) H-6, 7,8 (d, $J = 8,5$ Hz, couplage avec N-H 0,5 Hz) H-5 et 8,2 ppm (N-H).

La méthode de formylation employée pour la synthèse de l'ellipticine (10) ne conduit aux produits 2 et 2' qu'avec des rendements faibles. Par contre, l'action de POCl_3 dans le DMF, selon (12), sur le carbazole 1, conduit au formyl-carbazole attendu 2 avec un rendement de 47% : $F = 252^\circ\text{C}$; RMN ^1H (DMSO-d_6 , 250 MHz), 2,60 et 3,12 (CH_3), 4,00 (OCH_3), 7,10 (d, $J = 8$ Hz) H-7, 7,21

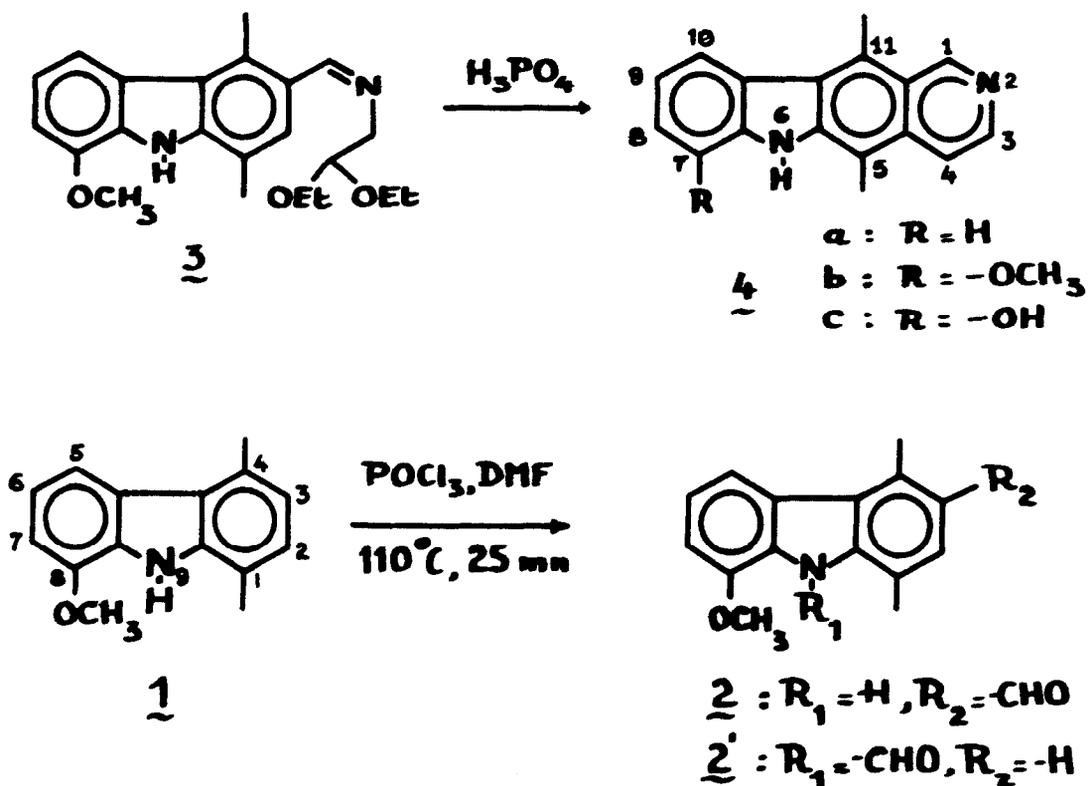


Figure 1

(t, $J = 8$ Hz) H-6, 7,65 (s) H-2, 7,85 (d, $J = 8$ Hz) H-5, 10,40 CHO et 11,70 ppm (N-H), et au produit de formylation sur l'azote, 2' (Rdt $\approx 10\%$) : F = 102°C ; RMN (CDCl_3 , 250 MHz), 2,60 et 2,76 (CH_3), 4,05 (OCH_3), 7,03 (dd, $J = 8,5$ et 1 Hz) H-7, 7,12 et 7,21 (d, spectre AB, $J = 7,5$ Hz) H-2 et H-3, 7,33 (t, $J = 8,5$ Hz) H-6, 7,73 (dd, $J = 8,5$ et 1 Hz) H-5, 10,1 (s) CHO, pas de NH. Les isomères 2 et 2' sont aisément séparés par chromatographie sur colonne ($\text{SiO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$), et le composé 2' peut être recyclé après saponification (KOH/MeOH). Un traitement du carbazole 2 par la diéthoxy-2,2-éthylamine, selon (1), conduit à l'intermédiaire 3 (Rdt : 81%), cyclisé en méthoxy-7-ellipticine, 4b, par action de l'acide orthophosphorique à 98% (140°C, 25 min.). Ce composé est purifié par sublimation sous vide (10^{-2} mm Hg, 220°C) puis chromatographié (SiO_2/MeOH) (Rdt : 18%), $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$, RMN ^1H (DMSO-d_6 , 250 MHz), 2,88 et 3,28 (CH_3), 4,05 (OCH_3), 7,21 (m) H-8 et H-9, 7,95 (d, $J = 5,5$ Hz) H-3, 8 (dd, $J = 8$ et 1 Hz) H-10, 8,45 (d, $J = 5,5$ Hz) H-4, 9,7 (s) H-1, 10,3 (s) H-6 ; U.V. λ max. (EtOH)

244 (35 000), 287 (65 000), 333 (4 600) nm ; λ_{max} . (EtOH + HCl) 254 (33 000), 284 (24 000), 304 (34 000).

Le chlorure de pyridinium pur, à 230°C (13), transforme 4b en hydroxy-7-ellipticine, 4c (Rdt = 45% après chromatographie, SiO₂/MeOH), ayant le même Rf (CCM, SiO₂, C₆H₆/AcOEt/EtOH/NH₄OH : 42/12/8/1), le même spectre RMN ¹H (DMSO-d₆, 250 MHz) : 2,96 et 3,26 (CH₃), 7,06 (dd, J=8 et 0,8 Hz) H-8, 7,12 (t, J=8 Hz) H-9, 7,86 (dd, J=8 et 0,8 Hz) H-10, 7,92 (d, J=5,5 Hz) H-3, 8,45 (d, J=5,5 Hz) H-4, 9,7 (s) H-1 et 11,5 (NH), le même spectre U.V. λ_{max} . (EtOH) 245 (31200), 288 (51 800) et 333 (4 300) nm ; λ_{max} . (EtOH + HCl) 255 (27 600), 285 (17000), et 306 (24 400) nm, et le même spectre de masse (vide supra) que le métabolite minoritaire d'hydroxylation de l'ellipticine chez le rat.

L'ellipticine est donc hydroxylée, chez le rat, dans les positions para et ortho de l'azote indolique. Des hydroxylations métaboliques en position para de l'azote ont été décrites pour le carbazole (14) et le tryptophane (15). Une étude des diverses caractéristiques biochimiques et pharmacologiques de l'hydroxy-7-ellipticine, produit nouveau de la série, est en cours.

References

- (1). J. CROS, A. THIBAUT et N. DAT-XUONG, C. R. Acad. Sci., Série D, 1975, 281, 1139
- (2). J. BENARD, N. DAT-XUONG et G. RIOU, C. R. Acad. Sci., Série D, 1975, 280, 1177
- (3). G. MICHEL, A. LEMOINE, N. DAT-XUONG et J. OLLE, C. R. Acad. Sci., Série D, 1975, 280, 1494
- (4). J.B. LE PECQ, C. GOSSE, N. DAT-XUONG et C. PAOLETTI, C.R. Acad. Sci., Série D, 1975, 281, 1365
- (5). V. REINHOLD, L. BITTMAN, R. BRUNI, K. THRUN and D. SILVEIRA, Proc. Am. Assoc. Cancer Research, 1975, 16, 135
- (6). P. LESCA, P. LECOINTE, C. PAOLETTI et D. MANSUY, C. R. Acad. Sci., Série D, 1976, 282, 1457
- (7). V.N. REINHOLD and R.J. BRUNI, Biomedical Mass Spectrometry, 1976, 3, 335
- (8). P. LESCA, P. LECOINTE, C. PAOLETTI and D. MANSUY, Biochem. Pharmacol., 1977, 26, 2169
- (9). A. DELBARRE, B.P. ROQUES, J.B. LE PECQ, J.Y. LALLEMAND et NGUYEN DAT XUONG, Biophys. Chem., 1976, 4, 275
- (10). L.K. DALTON, S. DEMERAC, B.C. ELMES, J.W. LODER, J.M. SWAIR and T. TEITEI, Austr. J. Chem., 1967, 20, 2715
- (11). A. KALIR, Israel. J. Chem., 1967, 5, 129
- (12). M. JULIA et J.Y. LALLEMAND, Bull. Soc. Chim. France, 1973, 2046
- (13). N. VAN-BAC, M. HERBERT, L. PICHAT, M.M. JANOT et N. DAT-XUONG, J. of Labelled Comp., 1974, 11, 241
- (14). S.R. JOHNS, S.E. WRIGHT, J. Med. Chem., 1963, 7, 158
- (15). J. RENSON, J. DALY, H. WEISSBACH, B. WITKOP and S. UDENFRIEND, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1966, 25, 504
- (16). B.P. ROQUES, S. COMBRISSE, R. OBERLIN and J. BARBET, Tetr. Lett., 1974, 1641