

**ANALOGUES STRUCTURAUX DE LA SÉROTONINE COMME MARQUEURS D'AFFINITÉ
DES RECEPTEURS SÉROTONINÉRIQUES**

T. Huynh-Dinh¹, A. Namane¹, F. Babin¹, J. Igolen^{1*}, J.C. Rousselle², M.P. Fillion² et G. Fillion

¹ Unité de Chimie Organique, UA CNRS 487, Département de Biochimie et Génétique Moléculaire, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15.

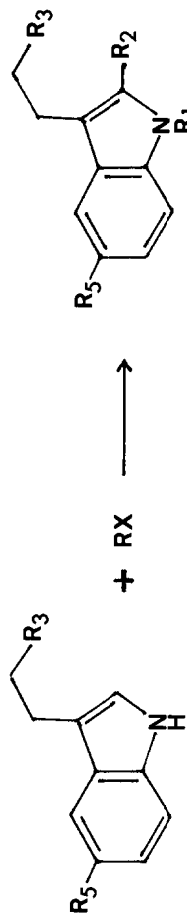
² Unité de Pharmacologie-Toxicologie, Département de Physiopathologie Expérimentale, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15.

Abstract: Derivatives of serotonin and bufotenine are synthesized as potential electrophilic or photoactivable labels for the serotonergic sites. The most promising compound is the azidoethyl-3 indole derivative 13 which presents a high affinity for the site; the corresponding binding appears specific and irreversible after photoactivation.

La sérotonine 1 (5HT) présente une activité pharmacologique importante sur le système vasculaire, digestif et plus particulièrement au niveau du système nerveux central [1]. Deux types de sites de reconnaissance de haute affinité 5HT₁ (K_D = 3 nM) et 5HT₃ (K_D = 15 nM) pour ce médiateur ont été mis en évidence sur les membranes synaptosomales de cerveaux de mammifères [2,3]; ces sites pourraient correspondre à des récepteurs fonctionnels intervenant dans des mécanismes de neurotransmission et de neuromodulation.

Afin de faciliter la purification et l'isolement de ces récepteurs sérotoninergiques, nous avons entrepris la synthèse de dérivés de la sérotonine 1 et de la bufoténine 2 comme marqueurs d'affinité électrophiles ou photoactivables et nous en avons ensuite recherché les propriétés de liaison sur les sites de reconnaissance de la 5HT par des études de compétition sur la [³H]5HT.

Dans un premier temps, diverses substitutions sur les sommets 1 (composés 4, 7, 8), 2 (composés 9, 10, 11, 12), 5 (composés 5, 6) et sur l'amine exocyclique (composés 3, 4) ont été effectuées avec deux marqueurs électrophiles: le chloro- ou bromoacétyle [4] et le p.fluorosulfonylbenzoyl [5] et un marqueur photolabile: le nitro-2 phénylesulfényle [6]. Les composés 11 et 12 ont été obtenus directement à partir de la sérotonine 1 et de la bufoténine 2 ou par



3-12

1,2 R = XCH₂COX= p.FSO₂OCOC1 X = Cl, Br= o.NO₂SC1

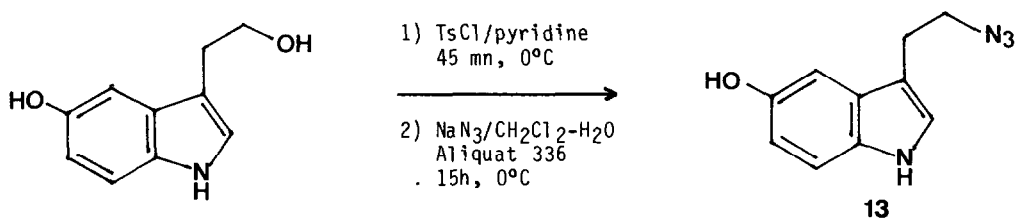
COMPOSE	R ₁	R ₂	R ₃	R ₅	CONDITIONS EXPERIMENTALES	Rdt (%)	F (°C)	DI ₅₀ nM
1 sérotonine			NH ₂	OH				
2 bufoténine	H	H	N(CH ₃) ₂					200
3			NHCOCH ₂ Cl	CH ₃ O	CHCl ₃ , 2 eq, 0°C, 30 mn t.a.	20	126	8 000
4	BrCH ₂ CO		NHCOCH ₂ Br		CH ₂ Cl ₂ , 2 eq, 0°C, 2h t.a.	10	136	10 000
5	H	H	N(CH ₃) ₂	FSO ₂ Ø	pyridine, 1 eq, 0°C, 2h t.a.	28	203	1 800
6			NH ₂	FSO ₂ Ø	pyridine, 1 eq, -10°C, 2h t.a	7	dec	100 000
7			N(CH ₃) ₂		DMF/NaH, 1 eq, -50°C, 15h, -14°C	25	dec	44 000
8	o.NO ₂ ØS		NH ₂	CH ₃ O	THF/NaH, 1 eq, -50°C, 15h, -14°C	18	84	100 000
9			N(CH ₃) ₂		CH ₃ COOH, 1 eq, 0°C, 4h 0°C	47	121	100 000
10		o.NO ₂ ØS	NH ₂		CH ₃ COOH, 1 eq, 0°C, 4h 0°C	23	155	56 000
11	H		N(CH ₃) ₂		CH ₃ COOH, 1 eq, 0°C, 2h 0°C	46	92	20 000
12			NH ₂	OH	CH ₃ COOH, 1 eq, 0°C, 3h 0°C	63	200	1 300
13		H	N ₃		voir schéma	25		2 et 100

déméthylation des dérivés 9 et 10 avec le chlorhydrate de pyridinium [7].

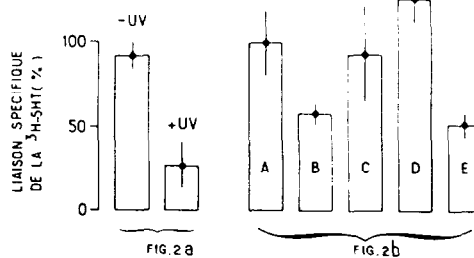
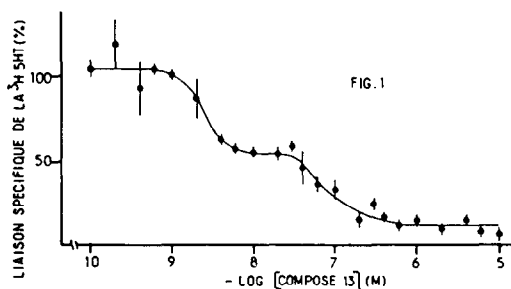
Les conditions expérimentales sont résumées sur le Tableau. Les dérivés de la tryptamine sont isolés par chromatographie sur colonne de silice ou en couche mince et leur structure caractérisée par l'analyse élémentaire, les spectres de masse et UV.

Dans une deuxième série expérimentale, les propriétés de liaison des analogues structuraux 3-12 ont été étudiées sur une préparation de membranes synaptosomales de tissu cérébral de rat. Comme le montrent les doses inhibitrices 50% observées, DI_{50} , (voir Tableau), une substitution sur l'un des sommets de la sérotonine décroît considérablement l'affinité pour le récepteur sérotoninergique.

Ces résultats nous amènent à penser qu'un marqueur photoactivable possédant une forte affinité pourrait être représenté par le composé 13 qui possède une très grande analogie de structure avec la sérotonine 1. Ce composé 13 est obtenu en 2 étapes à partir de l'hydroxy-5 tryptophol [8]



La Figure 1 illustre le déplacement de la $[^3H]5HT$ par le composé 13. Il présente 2 affinités apparentes, l'une correspondant à une DI_{50} de 3 nM et la seconde de 100 nM [9]. Ces deux constantes d'affinité apparentes pourraient correspondre à la liaison du composé 13 sur les sites de reconnaissance $5HT_1$ et $5HT_3$. Après irradiation des membranes synaptosomales [10,12] en présence du composé 13 la liaison réversible de la 5HT est fortement diminuée (70% à $1 \mu M$) (Fig. 2a). Cet effet est levé si l'incubation des membranes avec ce composé est réalisée en présence d'antagonistes sérotoninergiques préalablement à la liaison de la $[^3H]5HT$ [11]. Par contre, le spiropéridol (antagoniste dopaminergique) est inefficace pour prévenir l'effet du composé 13 (Fig. 2b).



En conclusion, l'hydroxy-5 azidoéthyl-3 indole 13 peut constituer un outil intéressant qui permettra l'isolement et la purification des sites de reconnaissance de la 5HT.

REFERENCES

- 1 G. Fillion, Edit. L.L. Iversen, S.D. Iversen et S.H. Snyder, BIOCHEMICAL STUDIES OF CNS RECEPTORS, Plenum Press, New-York and London, 1983, 139-166.
- 2 G. Fillion, J.C. Roussette, M.P. Fillion, D. Beaudoin, M. Goïny, J.M. Deniau et J. Jacob, Mol. Pharmacol., 1978, 14, 50-59.
- 3 C. Robaut, G. Gillet, M.P. Fillion, G. Fayolle-Bauguen, J.C. Roussette, S. Benkirane et G. Fillion, Brain Research, 1985, sous presse.
- 4a A.L. Mnzhoian et G.L. Papayan, Khim. Nauki USSR, 1961, 14(6), 603.
- b P.N. Stefanescu, Revista de Chimie (Bucarest) 1968, 19(8) 444.
- 5 P.K. Pal, W.J. Wechter et R.F. Colman, J. Biol. Chem., 1975, 250, 8140; Biochemistry, 1975, 14, 707.
- 6a R.M. Epand et T.E. Cote, Biochim. Biophys. Acta, 1976, 453, 365.
- b E. Scofone, A. Fontana et R. Rocchi, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1966, 25(2), 170; Biochemistry, 1968, 7(3), 971.
- 7 E.N. Shaw et D.N. Woolley, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1957, 96, 439.
- 8 UV (EtOH 96): épaulement 300 nm (4930), max 276 nm (7390); SM (ionisation chimique NH₃): m/e: 220(M+17), 204(M+1), 203(M), 175(M-281N₂); IR: 2105 cm⁻¹ (N₃).
- 9 250 µl de membranes synaptosomales (Cortex de rat) étaient incubées à l'équilibre (30 min à 22°C) dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH = 7,4 en présence de [³H] 5HT (20 nM) et ou non de concentrations croissantes (0,1 nM à 10 µM) du composé 13. [Le tampon d'incubation contenait des antiprotéases (Aprotinine : 5 unités/l; phénylméthylsulfonylfluoride, PMSF: 1 mM) et un inhibiteur des monoamine oxydases (MAO), la pargyline à 1 µM.] Le volume total de l'incubation était de 500 µl. La fixation non spécifique était déterminée en présence de 10 µM de 5HT non radioactive. A la fin de l'incubation, les radioactivités libre et liée étaient séparées par filtration sous vide sur filtres Whatman GF/B. La radioactivité retenue était mesurée par comptage en scintillation liquide. Chaque point de la courbe représente la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicats. Les barres représentent l'erreur standard.
- 10 Les membranes synaptosomales étaient incubées 30 min à 22°C en présence ou en absence de 1 µM du composé 13 dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH = 7,4. Elles étaient ensuite soit conservées à + 4°C pendant 5 min (-UV) soit irradiées durant le même temps (+UV). La distance de la lampe était de 70 cm (lampe Philips HPK 125). Les deux lots de membranes (-UV et +UV) étaient ensuite lavés par dilution et centrifugation et la liaison de 5HT tritiée (20 nM) mesurée après une nouvelle incubation de 30 min à 22°C. Chaque point est la moyenne de trois expériences réalisées en triplicats. Les barres représentent l'erreur standard.
- 11 250 µl de membranes synaptosomales étaient incubés à l'équilibre (30 min à 22°C) soit :
 - A - dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH = 7,4
 - B - en présence de 50 nM du composé 13
 - C - en présence de 50 nM du composé 13 et de 1 µM de méthiothépine (antagoniste sérotoninergique)
 - D - en présence de 50 nM du composé 13 et de 10 µM de cinansérine (antagoniste sérotoninergique)
 - E - en présence de 50 nM du composé 13 et de 10 µM de spiropéridol (antagoniste dopaminergique).
 A la fin de cette incubation, les différents incubats étaient irradiés pendant 5 min puis lavés deux fois par centrifugation, et la liaison de [³H]5HT (20 nM) mesurée sur chacun d'eux après une nouvelle incubation de 30 min à 22°C. Chaque point représente la moyenne de 3 mesures indépendantes et les barres l'erreur standard. Cette expérience a été reproduite deux fois.
- 12 Dans les conditions utilisées pour la photoactivation les membranes conservent leurs propriétés initiales de liaison. J.C Roussette, G. Gillet et G. Fillion, J. Pharmacol. (Paris), 1985, sous presse.

(Received in France 22 June 1985)