



**HAL**  
open science

# Synthèse totale d'un alcaloïde marin : Wakayine et étude d'analogues ayant une activité immunothérapeutique potentielle

Thomas Levy

## ► To cite this version:

Thomas Levy. Synthèse totale d'un alcaloïde marin : Wakayine et étude d'analogues ayant une activité immunothérapeutique potentielle. Chimie thérapeutique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30256 . tel-03231849

**HAL Id: tel-03231849**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03231849>**

Submitted on 21 May 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE  
TOULOUSE**

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Thomas LEVY**

Le 16 décembre 2020

**Synthèse totale d'un alcaloïde marin: Wakayine et étude  
d'analogues ayant une activité immunothérapeutique potentielle**

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unité de recherche :

**SPCMIB - Laboratoire de Synthèse et PhysicoChimie de Molécules d'Intérêt  
Biologique**

Thèse dirigée par

**Evelyne DELFOURNE**

Jury

**Mme Pascale Moreau, Rapporteur**

**M. Laurent Legentil, Rapporteur**

**Mme Valerie Thiery, Examinatrice**

**Mme Nancy de Viguerie, Examinatrice**

**Mme Evelyne DELFOURNE, Directrice de thèse**





# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE  
TOULOUSE**

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par  
**Thomas LEVY**

Le 16 décembre 2020

**Synthèse totale d'un alcaloïde marin: Wakayine et étude  
d'analogues ayant une activité immunothérapeutique potentielle**

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unité de recherche :

**SPCMIB - Laboratoire de Synthèse et PhysicoChimie de Molécules d'Intérêt  
Biologique**

Thèse dirigée par  
**Evelyne DELFOURNE**

Jury

**Mme Pascale Moreau**, Rapporteur  
**M. Laurent Legentil**, Rapporteur  
**Mme Valerie Thiery**, Examinatrice  
**Mme Nancy de Viguerie**, Examinatrice  
**Mme Evelyne DELFOURNE**, Directrice de thèse



A mes Parents

A ma Famille

A mes Amis

A mon Amour

« Je suis le maître de mon destin,  
Le capitaine de mon âme. » Nelson Mandela

« Ne me jugez pas par mon succès, jugez-moi par combien de fois je suis  
tombé et je me suis relevé. » Nelson Mandela



## Remerciements

Ce travail de recherche et sa rédaction n'auraient pas été possible sans l'implication d'un grand nombre de personnes à qui je tiens à adresser mes plus vifs remerciements.

Je tiens à remercier tout particulièrement Evelyne Delfourne pour m'avoir encadré dans ce travail de thèse et pour m'avoir aidé dans cette formation aussi bien sur le plan théorique, expérimental que personnel. Son investissement et son soutien dans ce projet se sont montrés sans limite.

Merci aux rapporteurs et aux examinateurs de ce manuscrit pour avoir accepté de juger mes travaux de thèses avec une mention spéciale pour Laurent Legentil dont la thèse (2004) réalisée sur cette même famille d'alcaloïdes marins a fait référence tout au long de ce travail.

Je remercie aussi Yves Genisson pour m'avoir accueilli au SPCMIB et les permanents et étudiants du laboratoire qui, pendant ces trois années, ont contribué à une ambiance de travail efficace et agréable.

Mes remerciements vont tout particulièrement à Frédéric Rodriguez, pour avoir su m'accompagner dans la partie « modélisation moléculaire » de ce travail et pour avoir su être disponible pour répondre à mes questions. Isabelle Fabing pour les séparations difficiles en HPLC, Christiane André-Barrès, pour sa relecture pertinente de cette thèse et les discussions scientifiques, et Nadine Leygue pour ses conseils pratiques et le partage de son expérience pour certaines manipulations méritent aussi d'être chaleureusement remerciées. Enfin, j'adresse également de sincères remerciements aux personnes des différents services d'analyse de l'ICT qui ont toujours su être à l'écoute de mes demandes.

Je voudrais aussi adresser une pensée amicale aux stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer durant ces trois années : Maelle Deleuzière, Christopher Herailh, Vincent Clamant, et Thomas Colin, leur compagnie et leur bonne humeur ont été précieuse au quotidien pour moi. Et puis un grand merci à mes amis et précédents thésards du labo : Aritz Perez, Gaëtan Azemat et Laurie Gonet pour leurs précieux conseils et leur présence dans les moments de détente.

Et enfin un Grand merci à tous mes amis, ma famille, et ma chérie sans qui ce manuscrit n'existerait pas. Merci de leur soutien et de leurs encouragements permanents.



## Liste des abréviations utilisées

ADN : Acide Désoxyribonucléique

APC : Antigen-Presenting Cell

ARN : L'acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

Bn : Benzyle

Boc : *tert*-Butoxycarbonyle

CAN : Nitrate de cérium et d'ammonium

CAR-T : Chimeric antigen receptor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

DC ou CD : cellules dendritiques

DCM : Dichlorométhane

DDQ : 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone

DDQ : 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone

DIBAL-H: Hydrure de diisobutylaluminium

DMAP : 4-Diméthylaminopyridine

DMF : N,N-Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

HPLC : Chromatographie liquide haute pression

IBX : Acide 2-iodoxybenzoïque

IC<sub>50</sub> : Concentration d'un médicament qui est requise pour une inhibition à 50 % *in vitro*.

IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase

IL : interleukine

INF- $\alpha$  ou  $\gamma$  : interférons  $\alpha$  ou  $\gamma$

IR : Infrarouge

LAH : Hydrure d'aluminium et de lithium

LAL : leucémie aigüe lymphoblastique

LE : ligand efficiencies

MVD : Molegro Virtual Docker

NaH : Hydrure de sodium

PDB : Protein Data Bank

PIDA : Diacétate d'iodobenzène

PIFA : Bis(trifluoroacetoxy)iodo benzene

PIM : 4-phenylimidazole

RMN ou NMR : Résonance Magnétique Nucléaire

RMSD : Root-Mean-Square Deviation

RX : Rayon X

SI : système immunitaire

TA ou RT : Température ambiante

TBAF : Fluorure de tétra-n-butylammonium

TDO : Tryptophan 2,3-dioxygenase

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

TMSCN : Cyanure de triméthylsilyle

Treg : Lymphocyte T régulateur

Trp : tryptophane

Ts : 4-toluènesulfonyl (tosyle)

TsCl : Chlorure de 4-toluènesulfonyl

UV : Ultraviolet

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (en anglais Vascular endothelial growth factor)

# Sommaire



**Introduction.....17**

**Chapitre I Mise au point bibliographique.....21**

**A. Le Cancer.....23**

1. Aspect sociétal.....23

2. Facteurs d'impact.....23

3. Définition du cancer.....24

4. Mécanisme de cancérisation.....24

5. Les traitement actuels contre le cancer.....26

5.1 Chirurgie.....26

5.2 Chimiothérapie.....26

5.3 Radiothérapie.....27

5.4 Hormonothérapie.....27

5.5 Thérapies ciblées.....27

5.6 Immunothérapie.....28

5.6.1 Système immunitaire et ses acteurs.....29

5.6.1.a Les lymphocytes B.....30

5.6.1.b Les lymphocytes T .....30

5.6.1.c Les cytokines .....31

5.6.1.d Les macrophages .....32

5.6.1.e Les cellules dendritiques.....33

5.6.1.f Les anticorps .....33

5.6.2 L'immunité antitumorale.....34

5.6.3 Les traitements immunothérapeutiques.....37

5.6.3.a Les injections d'interféron et d'interleukines.....38

5.6.3.b Les Vaccins.....39

5.6.3.c Les check point immunitaires et anticorps  
thérapeutiques.....40

5.6.3.d Les inhibiteurs de VEGF.....	41
5.6.3.e Les inhibiteurs d'IDO.....	41
<b>B. Les produits naturels marins.....</b>	<b>45</b>
1. La mer une source d'inspiration.....	45
2. Les pyrroloquinolines.....	45
<b>Chapitre II Etude de la synthèse totale de la Wakayine.....</b>	<b>51</b>
<b>A. Rappels bibliographiques.....</b>	<b>53</b>
<b>B. Synthèse totale de la Wakayine.....</b>	<b>55</b>
1. Première stratégie.....	56
2. Deuxième stratégie.....	62
3. Troisième stratégie.....	64
<b>Chapitre III Analyse structurale et docking d'IDO1.....</b>	<b>75</b>
<b>A. L'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO1) .....</b>	<b>77</b>
1.Caractéristique.....	77
2. Mécanisme enzymatique .....	78
3.Mécanisme d'inhibition.....	80
<b>B. Étude structurale de l'IDO1.....</b>	<b>80</b>
1. Collection de structures et architecture d'IDO1.....	80
<b>C. Analyse structurale.....</b>	<b>84</b>
1.Principes.....	84
2. Préparation et alignement des structures.....	84
3. Regroupement des structures.....	85
4. Élément de comparaison des structures.....	86
5. Regroupement des structures enzymatiques.....	87
6. Classification des structures.....	88
7. Choix des structures de référence.....	89

8) Choix de la structure utilisée pour l'arrimage moléculaire.....	93
<b>D. Docking.....</b>	<b>93</b>
1. Le processus d'arrimage.....	94
2. Protocoles d'arrimage utilisés.....	96
<b>E. Choix des Produits.....</b>	<b>100</b>
<b>Chapitre IV Synthèse d'analogues de la wakayine.....</b>	<b>103</b>
1. Première série.....	105
2. Deuxième série.....	109
3. Troisième série.....	109
4. Quatrième série.....	112
<b>Chapitre V Evaluation Biologique.....</b>	<b>115</b>
1. Tests d'activité.....	118
2. Interprétation des résultats.....	120
3. Etudes de docking.....	122
<b>Conclusion.....</b>	<b>129</b>
<b>Partie expérimentale.....</b>	<b>133</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>207</b>
<b>Molécules décrites.....</b>	<b>215</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>225</b>



# Introduction

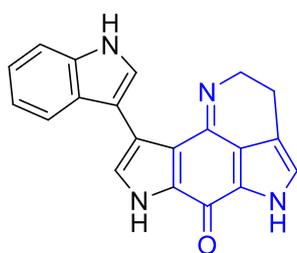


Le cancer est une maladie de plus en plus répandue dans le monde, elle est la première cause de mortalité en France devant les maladies cardio-vasculaires. Depuis une trentaine d'années, malgré ou à cause des progrès récents et continus en matière de dépistage et de méthodes de diagnostic permettant une détection plus précoce, le nombre de nouveaux cas est en constante augmentation. Le cancer représente donc un réel problème de santé publique ce qui en fait un des principaux axes de recherche. Il est important de mieux comprendre comment il apparaît et de mettre au point des traitements de plus en plus efficaces, adaptés à chaque patient et entraînant moins d'effets secondaires.

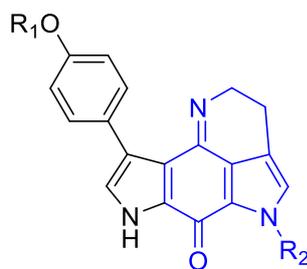
Parmi les différents types de traitements disponibles à ce jour, l'immunothérapie visant à mobiliser les défenses immunitaires du patient contre sa maladie est l'un des plus prometteurs. En 2018, les travaux de James Allison et Tasuku Honjo, portant sur un traitement par immunothérapie, ont d'ailleurs été récompensés par le prix Nobel de médecine. Ces résultats ont motivé la communauté scientifique à poursuivre et intensifier les recherches dans ce domaine, le développement de nouvelles molécules restant toujours une priorité

L'indoleamine-2,3-dioxygénase ou IDO1 et la tryptophane-2,3-dioxygénase sont des cibles très étudiées en immunothérapie, il a été montré que leur inhibition devrait permettre de stimuler l'action du système immunitaire pour lutter contre les cellules cancéreuses.

Les pyrroloquinolines, avec plus d'une soixantaine de métabolites décrits à ce jour, constituent une famille importante d'alcaloïdes marins, isolés pour la plupart, d'éponges ou d'ascidies. Nombre de ses représentants ont montré des activités biologiques intéressantes dont certaines relèvent des traitements anticancéreux. Pour notre part, nous avons focalisé notre attention sur la wakayine et les tsitsikammamines A et B qui comportent un cycle pyrrole fusionné au motif pyrroloquinoline.



wakayine



tsitsikammamine A,  $R_1 = R_2 = H$

tsitsikammamine B,  $R_1 = H, R_2 = Me$

methoxytsitsikammamine,  $R_1 = Me, R_2 = H$

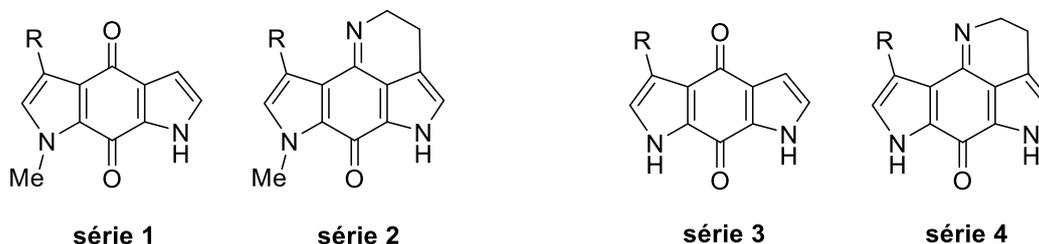
Récemment, la méthoxytsitsikammamine, a été décrite comme étant un bon inhibiteur d'IDO1 avec une activité inférieure au micromolaire dans un test enzymatique.

Le présent travail, a pour but d'étudier une synthèse totale de la wakayine et de définir de nouveaux inhibiteurs d'IDO1 et de TDO. Il s'articule autour de cinq parties :

Dans le premier chapitre, les différentes voies thérapeutiques utilisées actuellement dans la lutte contre le cancer sont présentées avec un focus particulier sur l'immunothérapie et ses cibles, dont l'IDO1 et la TDO, puis une seconde partie est consacrée aux pyrroloquinolines : tsitsikammamines et wakayine.

Le deuxième chapitre concerne la synthèse totale de la wakayine, aucune n'existant à ce jour, et notamment les différentes alternatives étudiées pour construire le motif bispyrroloquinone. Le troisième chapitre traite de l'étude *in silico* des interactions ligand/protéine à partir des données relatives aux structures RX des différents complexes reportés dans la PDB, notamment une classification structurale. Une étude de docking, basée sur les connaissances acquises et sur des paramétrages spécifiques, a ensuite permis d'expliquer certains résultats. Cette étude donne également des pistes intéressantes pour définir de nouvelles structures d'inhibiteurs potentiels.

Les voies de synthèse investiguées pour la synthèse totale de la wakayine ont permis d'étudier différentes séries d'inhibiteurs potentiels d'IDO1 et de TDO qui seront développées dans le quatrième chapitre.



Le cinquième et dernier chapitre, présente les évaluations biologiques des composés décrits dans ce travail, notamment leur capacité à inhiber les deux enzymes cibles IDO1 et TDO.

# **Chapitre I**

## **Mise au point bibliographique**



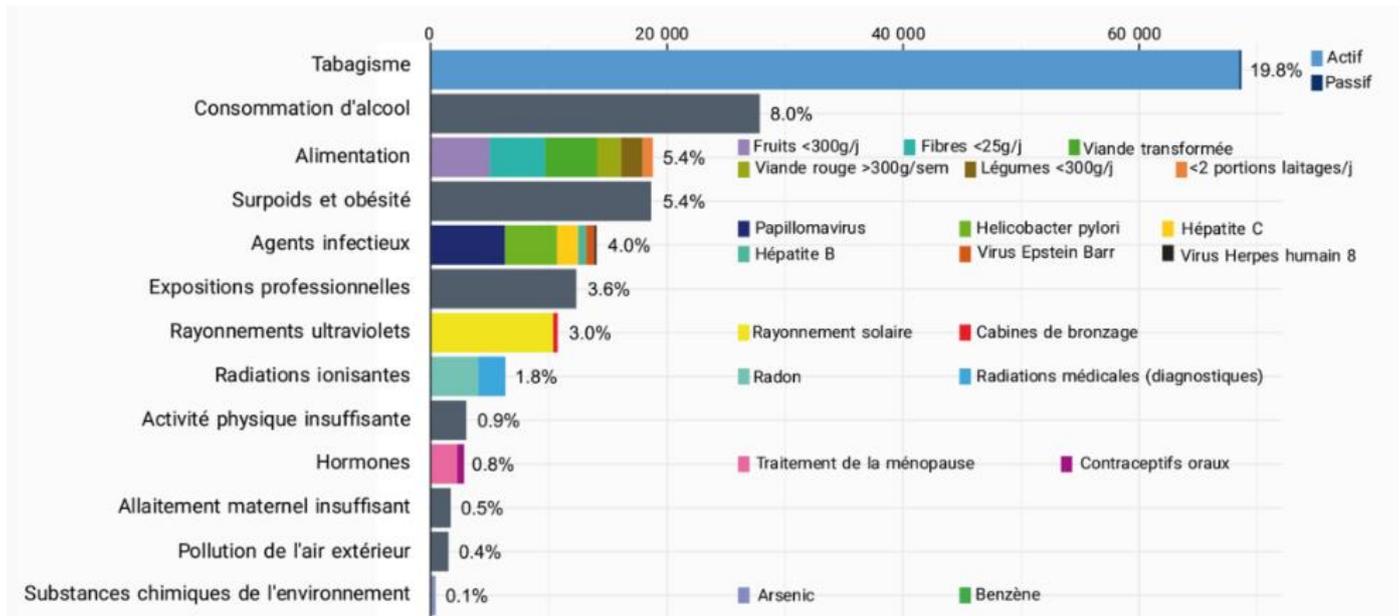
## **A. Le cancer**

### **1. Aspect sociétal<sup>1</sup>**

Les cancers et les maladies apparentées représentent la première cause de mortalité en France et dans les pays développés. Depuis 30 ans, malgré les progrès enregistrés sur la connaissance des différents cancers permettant de les détecter plus précocement et de mieux les traiter, le nombre de nouveaux cas a doublé. En 2018, on a enregistré 157 400 cas de décès consécutifs aux cancers dont 57% d'hommes. Chez ces derniers, le cancer du poumon se situe toujours au 1<sup>er</sup> rang devant les cancers colorectaux et de la prostate, tandis que chez les femmes, le cancer du sein figure toujours en tête suivi de près par le cancer du poumon et le cancer colorectal.

### **2. Facteurs d'impact**

Différents facteurs contribuent à promouvoir le cancer (Figure 1), la fréquence est liée à certains paramètres comme l'âge, le sexe, la prédisposition génétique, le mode de vie ou l'environnement. Parmi, ces facteurs de risque, l'alcool et le tabac sont responsables respectivement de 8 % et 20 % des cas. De tous les cancers attribuables à la consommation d'alcool, le cancer du sein est le plus fréquent (près de 8000 cas) suivi du cancer colorectal, de la cavité buccale et du pharynx, du foie, de l'œsophage et du larynx. La France se situe au troisième rang de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) en termes de consommation d'alcool pour les plus de 15 ans derrière la Lituanie et la République Tchèque. Le surpoids et l'obésité constituent aussi des facteurs de risque de 12 localisations de cancers qui pourraient être prévenus par une alimentation riche en fibres, en fruits et légumes et pauvre en produits gras et sucrés, sans excès de viande ainsi qu'une pratique régulière d'activités sportives. Certaines études montrent aussi que la pollution ou l'exposition répétées à des agents cancérigènes tels que l'amiante ou les phénols, ou des agressions provoquées par des rayonnements solaires, nucléaires jouent un rôle essentiel dans la promotion des cancers. On estime que 41% des nouveaux cas de cancers pourraient être évités si l'exposition aux facteurs de risques modifiables était optimale. La prévention et l'éducation de la population sont donc cruciales pour infléchir les données actuelles.



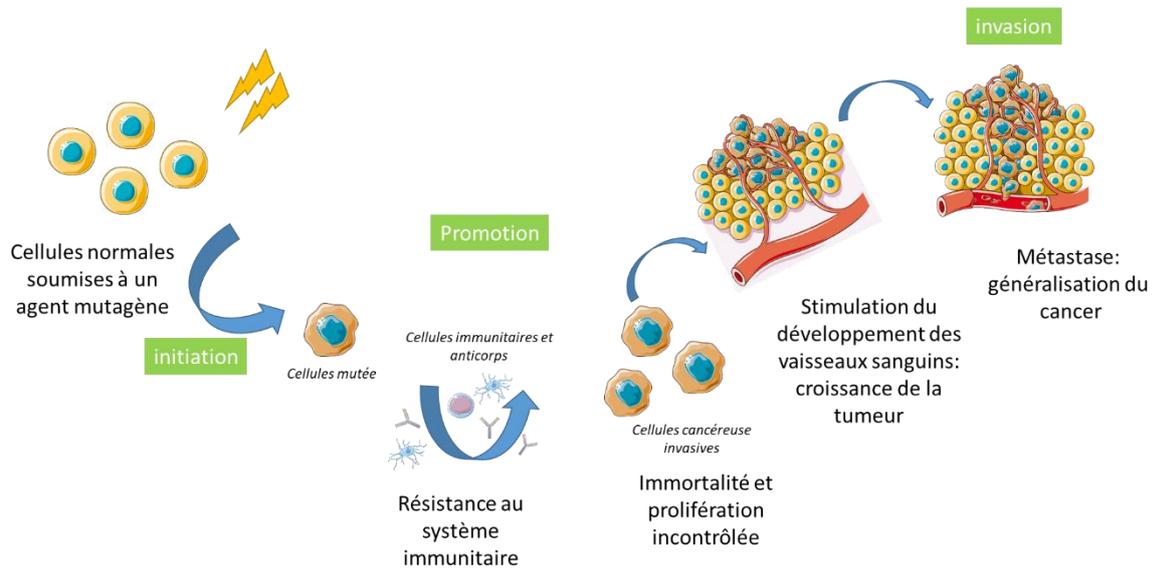
**Figure 1 :** Nombre de nouveaux cas de cancer attribuable au mode de vie et à l'environnement en France en 2015

### 3. Définition du cancer

Le cancer est une maladie qui se caractérise par une prolifération rapide et non régulée de cellules d'un tissu ou d'un organe. Ces cellules forment un amas appelé tumeur. Une tumeur peut se développer localement et rester uniquement dans le tissu où elle est apparue, dans ce cas, elle est dite bénigne, ou alors, les cellules qui la constituent peuvent se multiplier rapidement et migrer par voie lymphatique ou sanguine vers d'autres organes pour former des tumeurs secondaires nommées métastases, il s'agit alors de tumeurs malignes. Ce changement de comportement des cellules est dû à des mutations de l'ADN apparues sous l'action des facteurs d'impact énumérés plus haut.<sup>2</sup>

### 4. Mécanisme de cancérisation<sup>3</sup>

Le passage d'une cellule normale et différenciée à un amas cellulaire indifférencié et incontrôlé se fait selon trois principales étapes de cancérisation (Figure 2) : l'initiation (phase d'hyperplasie), la promotion (phase de dysplasie) et l'invasion (phase d'angiogenèse).



**Figure 2 : Mécanisme de cancérisation à partir d'une cellule saine**

L'étape d'initiation s'enclenche suite à la mutation d'une cellule saine par rayonnement, facteur chimique ou biologique qui va se transformer en « un mutant ». Cette cellule mutante peut acquérir la capacité d'activer des gènes oncogènes ou à l'inverse, l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces cellules modifiées développent une autonomie de croissance, une réplication rapide et illimitée, une insensibilité aux signaux antiprolifératifs, une résistance à l'apoptose. Il en résulte des cellules qui se multiplient indéfiniment et de manière totalement anarchique.

Durant l'étape de promotion, la cellule mutée va se diviser par mitose, les cellules filles posséderont donc la mutation, mais elles vont, elles aussi, en subir, ce qui donnera un ensemble de cellules avec un grand nombre de mutations. Ces cellules échappent à l'immuno-surveillance par des stratégies de camouflage malgré la présence d'antigènes tumoraux à leur surface. De plus de nouveaux vaisseaux sanguins vont alors apparaître pour amener tous les éléments dont ont besoin ces cellules tumorales pour se développer.

Ces amas de cellules forment donc une tumeur qui peut soit rester localisée et donc avoir un développement lent, ou bien, si ces cellules parviennent à franchir la barrière basale avec l'aide d'enzymes spécifiques, se répandre dans l'organisme grâce au système sanguin ou au système lymphatique et former des tumeurs malignes, c'est l'étape d'invasion.

Le cancer se développe donc à partir de cellules ayant un comportement anormal. Pour essayer de détruire ces cellules, plusieurs voies de thérapie ont été mises en place.

## **5. Les traitements actuels contre le cancer**

Il existe actuellement plusieurs méthodes de lutte contre le cancer. Parmi les plus classiques, on note la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie ou l'hormonothérapie. D'autres méthodes ont été investiguées ces dernières années, dont les thérapies ciblées ou l'immunothérapie qui sera plus particulièrement développée dans ce chapitre. Ces différentes méthodes peuvent être utilisées seules ou en combinaison pour un effet synergique. Le choix du/des traitements dépend du type de cancer, mais aussi du patient. Il convient de faire du cas par cas pour mettre en place le protocole le mieux adapté à chaque patient.

### **5.1. La chirurgie**

Cette méthode est utilisée de manière curative ou palliative. La méthode curative consiste en une ablation totale de la tumeur, mais aussi de quelques tissus avoisinants et des ganglions lymphatiques. Dans le cas d'une tumeur détectée assez tôt, l'ablation de la tumeur entraîne la guérison de l'individu. Elle est principalement utilisée pour les cancers du sein, du côlon et de l'estomac. La seconde méthode, qui consiste à ne retirer la tumeur que partiellement, intervient dans le cas d'une tumeur métastasée ou de localisation difficile. Elle peut aussi être utilisée pour faire des biopsies qui peuvent être utiles afin de dresser un portrait génétique de la tumeur (même si celle-ci est rarement homogène et avec un seul type de mutation) et déterminer le traitement adapté.

### **5.2. La chimiothérapie<sup>4</sup>**

Elle consiste à administrer des substances bloquant la division et la réplication des cellules infectées. Ces substances peuvent avoir différents modes d'action, on peut ainsi avoir des agents antimétabolites, des agents alkylants, des inhibiteurs de topoisomérases ou de polymérisation de la tubuline. Les cellules ne se renouvelant pas, elles sont alors éliminées par le système immunitaire. Le principal problème de cette méthode est qu'elle n'est pas spécifique, elle touche aussi bien les cellules cancéreuses que les cellules saines même si ces dernières se développent plus lentement. De ce fait, on note nombre d'effets secondaires. De même que la chirurgie, la chimiothérapie peut être curative et entraîner des guérisons (cancer du sang, ou des testicules, ...), ou alors palliative pour réduire l'avancée de la tumeur et de ces métastases. Elle sera alors couplée à un autre traitement pour essayer d'obtenir une guérison.

### **5.3. La radiothérapie**

Elle consiste à utiliser des rayonnements ionisants de manière la plus localisée possible pour ne « tuer » que les cellules infectées. Il existe plusieurs types de radiothérapie : radiothérapie conformationnelle 3D<sup>5</sup>, la curiethérapie<sup>6</sup> et la radiothérapie vectorisée<sup>7</sup>. La radiothérapie conformationnelle 3D consiste à appliquer un rayonnement ionisant ou électromagnétique (rayons X, rayons gamma, électron, neutron, ions ...) pour irradier la tumeur sans ajout d'agent de synthèse. Elle peut être utilisée dans de nombreux types de cancers, mais cause un grand nombre d'effets secondaires. La curiethérapie utilise des radio-isotopes (<sup>192</sup>iridium, <sup>137</sup>césium) placés à l'intérieur ou à proximité immédiate de la zone à traiter, elle est couramment utilisée comme un traitement efficace pour soigner le cancer du col de l'utérus, de la prostate, du sein ou de la peau. La radiothérapie vectorisée est l'administration d'un radioélément conjugué à un vecteur qui peut être peptidique ou un anticorps, dans le but de rendre le traitement plus spécifique.

### **5.4. L'hormonothérapie**

L'hormonothérapie est une méthode utilisable dans seulement certains types de cancer dit hormono-dépendants, c'est-à-dire qu'ils sont stimulés par des hormones naturellement présentes dans le corps, c'est souvent le cas des cancers du sein et de la prostate. On distingue deux types d'hormonothérapie :

- les traitements médicamenteux, qui agissent par voie générale sur toutes les cellules sensibles aux hormones. On parle de traitement systémique. On a par exemple, le Tamoxifène qui est un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (SERM) qui inhibe la croissance des cellules tumorales par un antagonisme compétitif des œstrogènes pour le cancer du sein.<sup>8</sup>
- les traitements non médicamenteux, qui consistent à stopper la production d'œstrogènes par les ovaires en les retirant par une intervention chirurgicale (ovariectomie) ou en les irradiant (radiothérapie).

Pour déterminer si un cancer est hormono-dépendant ou non il faut effectuer un examen anatomopathologique réalisé sur un fragment de la tumeur prélevé par biopsie.

### **5.5. Les thérapies ciblées**

Les thérapies ciblées ont pour objectif de bloquer la croissance ou la propagation de la tumeur, en interférant avec des anomalies moléculaires ou avec des mécanismes qui sont à l'origine du développement ou de la dissémination des cellules cancéreuses. Certaines thérapies ciblées

sont capables de s'attaquer précisément à ces perturbations. Leur action consiste à bloquer la transmission de certaines informations au sein des cellules qui les conduisent à se diviser et à proliférer de façon anarchique. Elles peuvent agir à différents niveaux de la cellule :

- sur les facteurs de croissance (qui sont des messagers déclenchant la transmission d'information au sein de la cellule),
- sur leurs récepteurs (qui permettent le transfert de l'information à l'intérieur de la cellule)
- sur des éléments à l'intérieur des cellules.

Les thérapies ciblées peuvent aussi empêcher la tumeur de fabriquer de nouveaux vaisseaux sanguins. En effet, lorsqu'une tumeur atteint une certaine taille, le réseau sanguin déjà existant n'est plus suffisant pour l'alimenter en nutriment et en oxygène. La tumeur va alors mettre en place de nouveaux vaisseaux sanguins qui diffèrent des vaisseaux normaux, pour s'assurer une bonne irrigation et permettre sa survie et sa croissance. Il s'agit de la néo-angiogénèse. Ces nouveaux vaisseaux peuvent également servir de porte d'entrée à la diffusion de métastases vers d'autres organes. Des thérapies ciblées, appelées antiangiogéniques, ont donc été développées pour empêcher la tumeur de former de nouveaux vaisseaux sanguins et ainsi limiter son développement.<sup>9</sup>

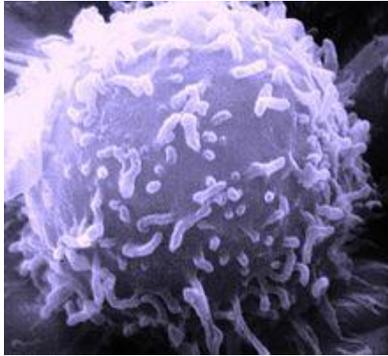
## **5.6. L'immunothérapie**

L'immunothérapie vise à détruire les cellules cancéreuses par l'action du système immunitaire (SI) du patient. Ce sont deux chercheurs, Tasuku Honjo<sup>10</sup> et James P. Allison<sup>11</sup>, récipiendaires du prix Nobel de Médecine 2018, qui ont commencé dès le milieu des années 1990, à mettre en évidence la possibilité d'utiliser le SI pour détruire les tumeurs. Vingt ans plus tard, l'immunothérapie est en passe de révolutionner la prise en charge de certains cancers, jusqu'alors incurables. Chercheurs et médecins explorent les nombreuses pistes possibles pour faire en sorte que le SI s'attaque de façon efficace aux cellules cancéreuses.

Le lieu de prolifération des cellules immunitaires, mais aussi de leur spécification est le système lymphatique.<sup>12</sup> Il est constitué de vaisseaux lymphatiques, de ganglions (aussi appelés nœuds lymphatiques) que l'on trouve dans presque toutes les parties du corps (dont les coudes, l'aîne, le cou et les aisselles) et d'organes qui sont reliés à toutes les parties du corps porteuses de lymphe. Cette lymphe est un liquide transparent contenant des lymphocytes et autres organites appartenant au SI. Les nœuds lymphatiques débarrassent la lymphe des microorganismes et autres débris avant qu'elle atteigne le sang, tandis que la rate épure le sang et détruit les érythrocytes inefficaces, déformés ou trop vieux. Les ganglions lymphatiques agissent comme

des filtres pour la lymphe et les lymphocytes : ils écartent les bactéries, les virus et d'autres corps étrangers.

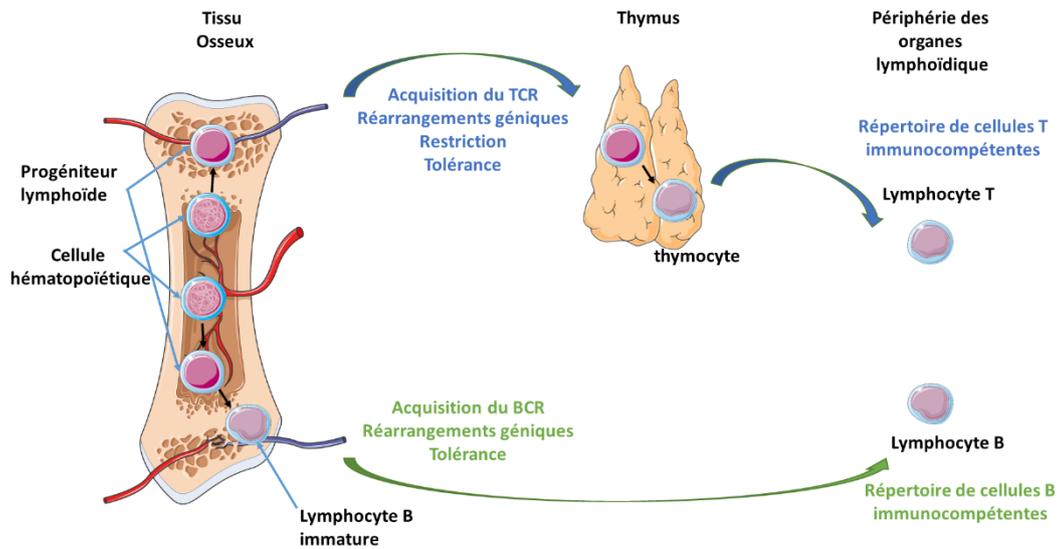
### 5.6.1. Le système immunitaire et ses acteurs



**Figure 3 :** *leucocyte ou globule blanc*

Le SI est constitué de cellules spécialisées présentes dans le sang, les ganglions lymphatiques, la rate et certains tissus. Il a deux rôles majeurs, discriminer le soi du non-soi et détruire ce non-soi. L'immunité est assurée par les cellules hématopoïétiques (aussi appelées cellules souches) et par des facteurs solubles tels que les cytokines. Les cellules souches sont à l'origine de la plupart des cellules impliquées dans la réponse immunitaire. Parmi les principaux effecteurs du SI, on compte les leucocytes ou globules blancs (Figure 3), et parmi eux les lymphocytes (d'environ 7 à 8  $\mu\text{m}$  de longueur). Ils représentent 20 à 30 % du taux des globules blancs dans une formule sanguine. Ils aident à apporter une réponse spécifique quand l'organisme a été envahi par des microorganismes et aident également le corps à lutter contre les tumeurs. Une fois libérés de la moelle rouge, les lymphocytes sont presque tous identiques, ils vont acquérir leur spécialisation (lymphocytes B ou T) au cours de la maturation qui déterminera leur rôle dans la défense immunitaire<sup>12</sup>.

On peut classer les lymphocytes de différentes façons, c'est le système CD (Cluster ou Classe de Différentiations) : CD4, CD8, etc. On peut aussi les différencier selon leur mode de maturation, selon qu'ils sont de type B (burso-dépendants, en fait isolés à l'origine dans les bourses de Fabricius chez les oiseaux d'où le B pour Bird) ou de type T (thymo-dépendants), (Figure 4).



**Figure 4 :** différenciation des cellules hématopoïétiques en lymphocytes

**a) Les lymphocytes B** ont pour rôle la fabrication d'anticorps. Le principe est le suivant : les lymphocytes B ont à leur surface des immunoglobulines, sortes de protéines qui sont spécifiques des antigènes que les lymphocytes ont pu rencontrer. Dès que les lymphocytes rencontrent à nouveau cet antigène, ils vont immédiatement fabriquer des anticorps qui vont neutraliser les antigènes dont ils sont spécifiques.

**b) Les lymphocytes T** effectuent leur maturation dans le thymus, une glande développée chez l'enfant, située à la base du cou. Plus de 80% des lymphocytes présents dans l'organisme sont des lymphocytes T. Suite à une sélection en fonction de leur capacité à reconnaître et à se lier aux protéines du CMH, les lymphocytes seront ainsi sélectionnés pour assurer l'immunosélectivité. Au cours de ces processus, seul 2% des lymphocytes T survivent et deviennent immunocompétents, les autres sont détruits par apoptose. De cette population de lymphocytes vont naître deux sous-populations, les lymphocytes CD4 et CD8.

#### ***Lymphocytes CD4 :***

Les lymphocytes CD4 (ou T4 ou encore lymphocytes **auxiliaires** ou **helper**) sont des lymphocytes non cytotoxiques vis-à-vis des cellules cancéreuses qui s'activent et se multiplient

après présentation d'antigène par les cellules dendritiques. Ils ont pour tâche de fabriquer des protéines appelées cytokines, telles que les interleukine-2 qui vont en stimuler d'autres. Une population particulière de CD4 est appelée régulatrice (**Treg**<sup>13</sup> ou suppresseur), elle est indispensable pour prévenir l'excès de fonction des lymphocytes T. Les Tregs ont pour rôle principal de réprimer l'activité des lymphocytes T, soit auto-immune, soit en fin de réaction immunitaire. Il en existe de deux types, les Tregs « naturels » (CD4, CD25 et high) qui agissent surtout par contact cellulaire et les Tregs (R1, H3...) « inductibles » par différentes stimulations antigéniques qui agissent surtout par la production de cytokines antiinflammatoire (TGFβ, IL10...).

### ***Lymphocytes CD8 :***

Il existe de même deux types de lymphocytes CD8 : les lymphocytes K (**Killer**) qui produisent une substance chimique appelée « lymphokine » qui est essentielle à la destruction des corps étrangers par les cellules B et les lymphocytes NK (**Natural Killer**) qui sont capables de provoquer la lyse de la membrane plasmique. Ils détruisent indifféremment par cytotoxicité les cellules infectées et tumorales avant que le système de défense adaptatif entre en action, en détectant l'absence de récepteurs du « soi » (molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Le terme cellules tueuses « naturelles » indique la non-spécificité de leur action destructrice. Les cellules NK ne sont pas phagocytaires. Leur façon de tuer consiste à attaquer la membrane de la cellule cible et à libérer plusieurs substances cytolytiques, dont la perforine (entraîne un trou dans la membrane plasmique) et les granzymes (entrent dans les cibles, où l'enzyme va dégrader les protéines, et induire la mise en apoptose de la cible). Les cellules NK sécrètent également des substances chimiques puissantes qui accentuent la réaction inflammatoire. Une fois leur rôle rempli, certains Lymphocytes CD8 vont mourir par apoptose alors que d'autres vont devenir des cellules mémoires qui ont une durée de vie extrêmement longue (quelques dizaines d'années) permettant ainsi une réponse rapide la fois suivante<sup>12</sup>.

### **c) Les cytokines**

Les cytokines sont des petites protéines (glycoprotéines) solubles impliquées dans la communication intra-cellulaire. Elles sont sécrétées par des effecteurs du système immunitaire ou par d'autres cellules ou tissus, agissant à distance. Parmi les cytokines, on peut citer les interférons et les interleukines<sup>14</sup>.

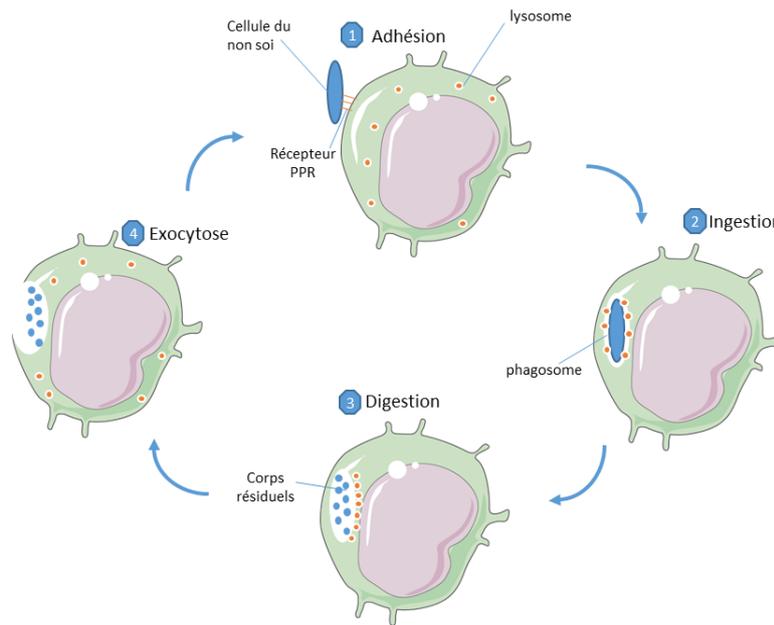
**Les interférons** chez la plupart des vertébrés, sont produits en réponse à la présence d'une

double hélice d'ARN étranger dans l'organisme. Ils ont pour rôle de défendre l'organisme des agents pathogènes tels que les virus, bactéries, parasites ou cellules tumorales. Par activation des lymphocytes NK et des macrophages, ils interfèrent avec la réplication virale dans les cellules de l'hôte (d'où leur nom), renforçant ainsi la réponse immunitaire.

*Les interleukines* sont ainsi nommées car les premières observations semblaient montrer qu'elles étaient exprimées par les globules blancs (leucocytes) en guise de moyen de communication (inter-leucocytes). Il existe aujourd'hui une trentaine d'interleukines, portant chacune un numéro qui lui est propre. On peut citer l'interleukine 1 (IL1) sécrétée par les macrophages pour stimuler la prolifération puis la différenciation des lymphocytes CD4 spécifiques à un antigène présent sur les membranes des macrophages et ayant préalablement été phagocytés par ces derniers. On peut aussi donner comme exemple, l'interleukine 2 (IL2) sécrétée par les lymphocytes T, résultant de la différenciation des CD4, donnant « l'autorisation » aux autres lymphocytes ayant reconnu le même antigène que lui de se diviser et de proliférer.

#### **d) Les macrophages**

Les macrophages appartiennent à la famille des phagocytes, surnommés les « gros mangeurs », ils sont le résultat de la maturation des monocytes. Ils ont pour rôle de maintenir une population de cellules « en bonne santé » et pour cela, ils vont détruire les cellules mortes, mal formées, infonctionnelles ou stressées permettant ainsi une réparation tissulaire. Les cellules cancéreuses vont être reconnues comme des agents pathogènes elles vont être attaquées par les macrophages et donc être phagocytées. Le mécanisme de phagocytose se déroule en plusieurs étapes (Figure 5), la première étape consiste en l'absorption de cellules du non-soi formant une cavité appelée le phagosome. Les macrophages produisent des cytokines (TNF) et d'autres agents responsables de leur activité (peroxyde d'hydrogène :  $H_2O_2$ , monoxyde d'azote : NO, radicaux libres :  $O_2^-$ ). La cellule étrangère va se faire désintégrer, il ne restera donc plus que des matières résiduelles qui seront expulsées par exocytose.



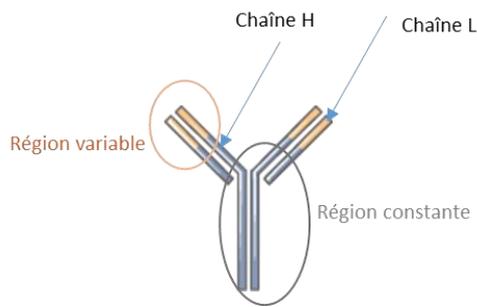
**Figure 5 : Mécanisme de phagocytose**

### e) Les cellules dendritiques

Les DC, comme les macrophages, font partie de la famille des phagocytes. Elles représentent le mieux le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ces organites vont venir capter les antigènes laissés par les attaques de l'immunité innée, et par différents mécanismes vont arriver à les exprimer à leur surface. Ainsi, elles les vont les présenter aux Les lymphocytes T immatures qui se spécialiseront dans le but de détruire les cellules comportant spécifiquement cet antigène.

### f) Les anticorps

Les anticorps ou immunoglobulines (Figure 6), sont sécrétés par les lymphocytes B activés ou par des plasmocytes. Ils se lient de manière spécifique aux antigènes du pathogène. Malgré leur grande variété, ils ont tous une structure commune : ils sont formés de quatre chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures (liaison soufre-soufre intra ou inter moléculaire). Ils sont composés de deux chaînes lourdes (H) et de deux chaînes légères (L), la région variable des anticorps permettra la reconnaissance des antigènes pathogènes.



**Figure 6** : structure d'un anticorps

Ils peuvent se trouver sous différentes formes : monomère, pentamère, dimère ...

Concrètement les anticorps ne détruisent pas les pathogènes mais ils forment un complexe antigènes-anticorps qui va les marquer et entraîner leur destruction par les macrophages.

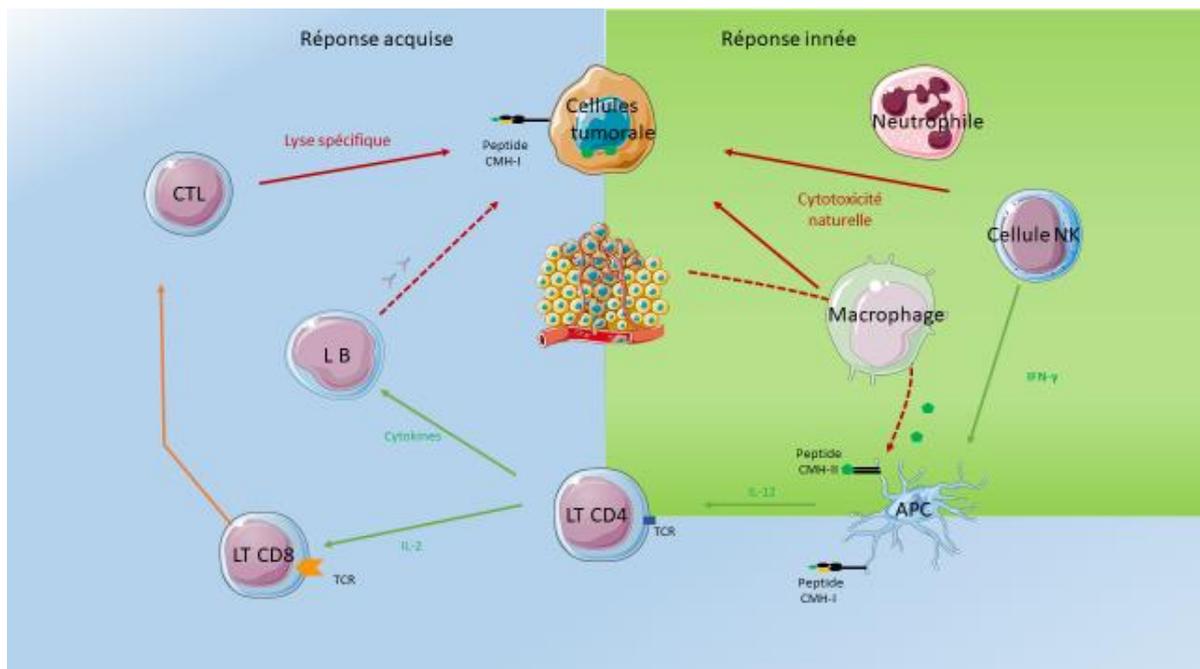
Ainsi, ils peuvent être utilisés comme vecteur en les couplant avec des cytotoxiques ou des isotopes radioactifs.

### 5.6.2. L'immunité antitumorale

Pour parer à toute menace, le SI met en place un processus d'immunosurveillance chargé de détecter et d'éliminer les agents pathogènes, il dispose ainsi de deux lignes de défense (Figure 7) :

-La première est **l'immunité innée** : dépourvue de mémoire, elle est immédiate, active dès la naissance et non spécifique. Elle veille en permanence afin de détecter les cellules anormales. Elle met en jeu le mécanisme de « phagocytose » où l'agent pathogène est détruit par des cellules du système immunitaire ayant reconnu l'étranger. Ce sont en particulier les lymphocytes NK, les phagocytes. On peut les voir comme de simples soldats qui se déploient rapidement et apportent une action directe sur le terrain. Au vu du grand nombre d'agressions que l'on subit chaque jour et du nombre de cancers que développent un individu, on peut penser que ce système est d'une grande efficacité. Malheureusement, il n'est pas toujours suffisant.

-Il existe aussi un deuxième processus plus long à se mettre en place, mais qui a une réponse beaucoup plus spécifique, c'est **l'immunité adaptative**. Elle nécessite une phase d'apprentissage de 5 à 7 jours au cours de laquelle les lymphocytes T et B apprennent à reconnaître la cible à éliminer. On peut voir ces acteurs comme des tireurs d'élite qui apportent une réponse beaucoup plus spécifique. Pour être activée, cette immunité doit d'abord rencontrer une substance étrangère spécifique (antigène) ou être sensibilisée par une exposition initiale avant de pouvoir protéger l'organisme contre cette substance, ce processus faisant perdre un temps précieux.



*Figure 7 : Mécanisme de défense antitumorale*

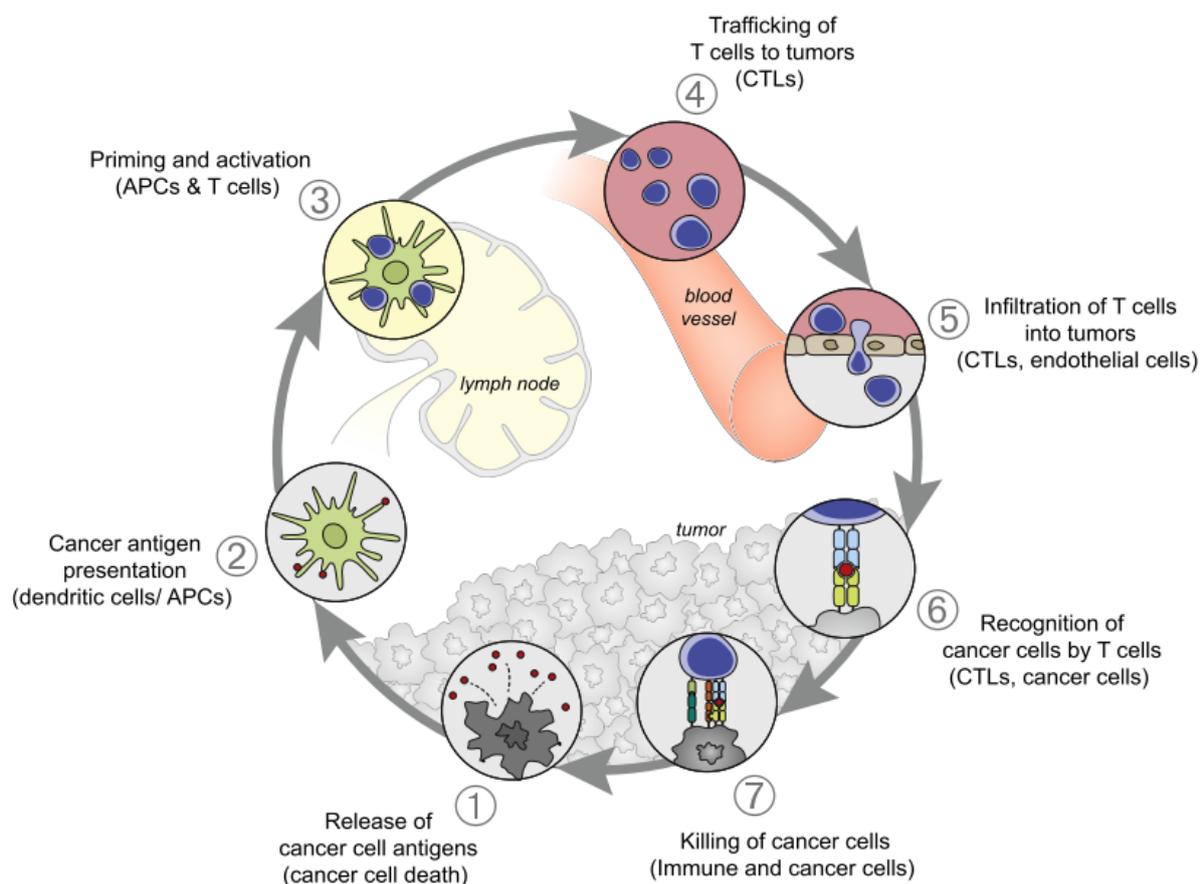
Les effecteurs spécifiques des antigènes comme les lymphocytes T : CD4 ou CD8 se retrouvent activés après présentation des antigènes tumoraux par des cellules présentatrices d'antigènes : Antigen-Presenting Cell (APC). On note notamment les Cellules Dendritiques qui capturent les antigènes des cellules tumorales mortes par apoptose. Une fois l'antigène tumoral capté, il va être présenté au lymphocyte durant sa phase de maturation dans les ganglions lymphatiques pour qu'il se spécifie, via des antigènes, contre les cellules tumorales. Ces dernières peuvent aussi être lysées par les lymphocytes T CD8 après reconnaissance de peptides associés à des molécules Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) exprimés à leur surface. De plus les lymphocytes B peuvent sécréter des anticorps qui s'attaqueront spécifiquement aux cellules tumorales. Le profil de l'ennemi est gardé en mémoire, l'organisme sera ainsi plus rapide à réagir lors d'une seconde rencontre. C'est donc au cours du temps que se développe une immunité adaptative performante. La vaccination se base sur cette capacité du SI à mémoriser un ennemi pour réagir promptement.

### **Le cycle immunitaire antitumoral**

Les recherches actuelles en immunothérapie tentent de comprendre comment le SI réagit lorsqu'il est confronté à une cellule tumorale. Différents travaux ont montré que les cellules de défense immunitaire étaient capables de réagir face au cancer, mais qu'il arrivait que la réponse

immune soit trop faible ou trop tardive. En effet, les cellules cancéreuses n'attendent pas passivement que le SI se déclenche, certaines d'entre-elles possèdent la capacité de se fondre dans le tissu environnant et de tromper le SI en lui faisant croire qu'elles ne représentent pas de danger. Certaines autres peuvent même prendre l'initiative et bloquer l'action des défenses immunitaires. Au bilan, l'activation seule du SI n'est donc pas suffisante pour induire une réponse, nos défenses étant confrontées à un « envahisseur » difficile à cibler. En parallèle plusieurs freins doivent donc être levés pour entraîner la destruction des cellules tumorales. Seule, la connaissance précise de l'ensemble de ces mécanismes permettra de débloquent le SI pour qu'il agisse contre les cancers. Les chercheurs Dan Chen et Ira Mellman ont proposé de modéliser la production de l'immunité en un processus cyclique qui peut être divisé en sept étapes principales (Figure 8).

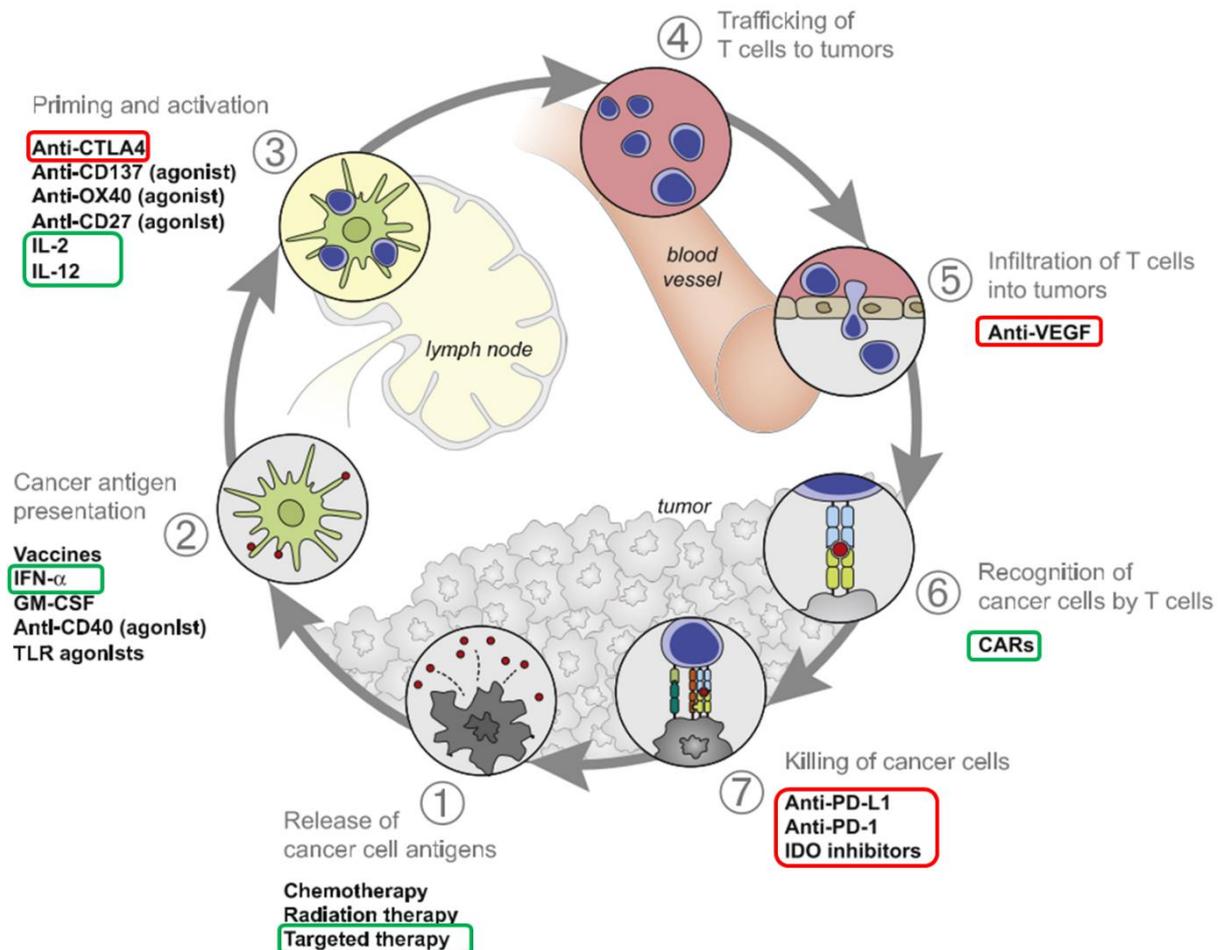
Dans la première étape, les néoantigènes créés par l'oncogenèse sont libérés et capturés par des cellules dendritiques. Ces dernières présentent ces antigènes capturés aux lymphocytes T immatures (étape 2), ce qui va entraîner la maturation et l'activation de ces lymphocytes T contre les antigènes tumoraux spécifiques qui sont considérés comme étrangers ou contre lesquels la tolérance centrale a été incomplète (étape 3). La nature de la réponse immunitaire est déterminée à ce stade, le rapport entre les cellules effectrices T et les cellules régulatrices T étant la clé du résultat final. Les lymphocytes activés vont alors se diriger vers les cellules tumorales cibles (étape 4), et infiltrer le lit tumoral (étape 5). On a ensuite, la reconnaissance de la cible et la liaison spécifiquement aux cellules cancéreuses par l'intermédiaire d'un récepteur des lymphocytes T (étape 6). Les cellules cancéreuses cibles sont ainsi tuées (étape 7), ce qui va libérer d'autres antigènes associés à la tumeur pour augmenter la réponse lors de la révolution suivante du cycle<sup>15</sup>.



**Figure 8 : Immunité face au cancer**

### 5.6.3. Les traitements immuno-thérapeutiques

Chaque étape du cycle immunitaire antitumoral requiert la coordination de nombreux facteurs qui vont ainsi fournir un large éventail de cibles thérapeutiques potentielles (Figure 9). Les facteurs stimulants, indiqués en vert, sont promoteurs de l'immunité, tandis que les inhibiteurs (en rouge) contrôlent le processus et réduisent l'activité immunitaire et/ou empêchent l'auto-immunité. Les protocoles d'immuno-thérapie antitumorale vont donc s'orienter selon deux axes principaux, soit stimuler le SI d'une façon très générale, soit attaquer spécifiquement les cellules cancéreuses. La figure présente quelques exemples d'immuno-thérapies utilisées couramment ou en évaluation clinique ou préclinique.



**Figure 9** : Les cibles en immunothérapie active, on note en vert les cibles à stimuler et en rouge celles à inhiber.

### a) Les injections d'interféron et d'interleukines

Comme nous l'avons vu précédemment il existe une classe de molécules capables d'orienter la réaction immunitaire de manière positive ou négative, ce sont les cytokines. Une méthode de lutte va consister à injecter directement au patient des interférons<sup>16</sup> (INF- $\alpha$  et/ou INF- $\gamma$ ) pour activer les lymphocytes T et NK, et les cellules dendritiques (**étapes 2 et 3**). Ces injections sont notamment utilisées dans certains cas de leucémies. Un autre type de cytokines : les interleukines (IL-2 et/ou IL-12) sont actuellement utilisées dans certains traitements de cancer du rein métastatique. Néanmoins, le principal problème avec ces techniques est qu'elles ne sont pas spécifiques et peuvent entraîner l'apparition d'effets secondaires qui peuvent déclencher des complications auto-immunes et donc aggraver le cas du patient.

## b) Les Vaccins

Puisque les cellules cancéreuses portent des antigènes qui permettent de les distinguer des cellules normales, on peut imaginer plusieurs façons de s'en servir. La première stratégie vise à la mise au point d'un vaccin. Pour le moment, on n'en dispose pas, du fait des multiples formes de cancer rendant impossible l'identification d'une cible commune contre laquelle diriger un éventuel vaccin. En revanche, on sait que certains cancers ont des causes infectieuses. Par exemple, les virus de l'hépatite B et C sont retrouvés dans le cancer du foie. De même, les infections au papillomavirus sont directement impliquées dans le cancer du col de l'utérus. Une seule voie s'offre alors : vacciner préventivement contre les virus associés au cancer.

D'autres vaccins, thérapeutiques ceux-là, sont utilisés chez des patients présentant la maladie (**étape 2**), ils ont pour but de stimuler les défenses immunitaires (activation des lymphocytes, production d'anticorps ...). L'activation du SI nécessite d'une part que l'intrus soit identifié et, d'autre part, qu'il le considère comme une menace. Cet apprentissage repose sur l'identification des antigènes tumoraux qui vont servir à diriger le système immunitaire vers les cellules tumorales. La présentation de cet antigène au système immunitaire peut passer par plusieurs types d'injection :

- Injection d'une copie synthétique de l'antigène tumoral, couplée à une molécule, dite adjuvant, capable de stimuler la réponse immunitaire.
- Injection des cellules dendritiques surchargées en antigène tumoral, pour stimuler les lymphocytes T.
- Injection de virus modifiés pour produire des antigènes tumoraux en grande quantité.

De telles approches ont déjà fait leurs preuves. Sipuleucel-T a été le premier vaccin à obtenir une autorisation de mise sur le marché aux États-Unis et en Europe (respectivement, 2010 et 2013) pour traiter certains cancers métastatiques de la prostate hormono-résistants.<sup>17</sup> D'une façon générale, l'inconvénient des vaccins est qu'ils ont une perte d'efficacité au cours du temps, une fois l'injection passée l'activité immunitaire ne fait que décroître, ce n'est donc pas un traitement curatif. De plus ils ne sont utilisables que si les cellules cancéreuses sont suffisamment différenciées des cellules saines.

Une seconde technique qui relève de la thérapie génique, va s'adresser à des patients chez qui le cancer a déjà été diagnostiqué. Elle va consister à injecter des cellules, c'est la « thérapie par cellules CAR-T<sup>18</sup> » (**étape 6**). Des lymphocytes T, d'un patient sont prélevés, cultivés *in vitro*, puis modifiés génétiquement de manière à leur faire exprimer un récepteur artificiel (le

« Chimeric Antigen Receptor »), une espèce de super radar qui reconnaît spécifiquement l'antigène tumoral à neutraliser. Après un délai de plusieurs semaines, ces lymphocytes T sont réinjectés au patient, prêts à tuer les cellules tumorales. Ce traitement a montré des résultats très impressionnants dans le traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique (LAL), mais n'a pas démontré son efficacité dans le cas de tumeurs solides.

### c) Les « check points » immunitaires et anticorps thérapeutiques

La découverte des premiers antigènes antitumoraux a ouvert la voie à une approche bien mieux ciblée. Les cellules tumorales expriment en effet à leur surface, des antigènes qui ne sont pas retrouvés dans les cellules normales. En plongeant au cœur même des rouages du SI, des chercheurs ont découvert qu'à côté des molécules qui actionnent les lymphocytes T, d'autres molécules, au contraire, les entravent ou les éteignent. Ces molécules constituent des freins moléculaires, ils sont assurés par des points de contrôle immunologiques appelés « checkpoints »<sup>19</sup>. Ces checkpoints empêchent les lymphocytes T de passer à l'attaque contre les cellules tumorales. James Allison et Tasuku Honjo ont identifié deux points de contrôle : PD-1 (**étape 7**) et CTLA4 (**étape 4**). Ils ont alors eu l'idée de neutraliser ces freins pour libérer les défenses antitumorales. (En langage imagé, on pourrait dire « qu'appuyer plus fort sur l'accélérateur - soit stimuler la réponse immunitaire au cancer - ne sert à rien si on ne lâche pas le frein à main). Les deux chercheurs parviennent à élaborer des traitements dits « inhibiteurs de checkpoints », des anticorps capables de bloquer l'action des protéines PD-1<sup>20</sup> et CTLA-4<sup>21</sup>. En 2011, un premier médicament anti-CTLA-4, appelé ipilimumab, est approuvé aux Etats-Unis et en Europe. Puis, en 2014, plusieurs anticorps anti-PD-1 et anti-PD-L1 (une protéine présente sur les cellules tumorales qui se lie au récepteur PD-1) sont commercialisés. Plus faciles à administrer, injectés par intra-veineuse toutes les deux à quatre semaines, ces traitements ont moins d'effets indésirables dans la plupart des cas. Des effets spectaculaires ont pu être observés, notamment chez des patients atteints de mélanome métastatiques, pour lesquels le pronostic était sombre. Avec les anti-PD-1 et PD-L1, chez 30% de ceux traités en première ligne, le mélanome n'évoluera plus jusqu'à cinq ans après le début du traitement. C'est cette découverte qui a fait l'objet du prix Nobel de médecine 2018. En France, un premier traitement, le Keytruda (pembrolizumab, 5200 euros l'injection) sera désormais remboursé par la sécurité sociale. Au-delà de PD-1 et CTLA-4, il y aurait en réalité environ une cinquantaine de checkpoints freinant la réaction immunitaire en cas de cancer. Plus la collection de freins est complète et combinée, mieux le cancer se développe. A l'avenir, pour avoir une action la

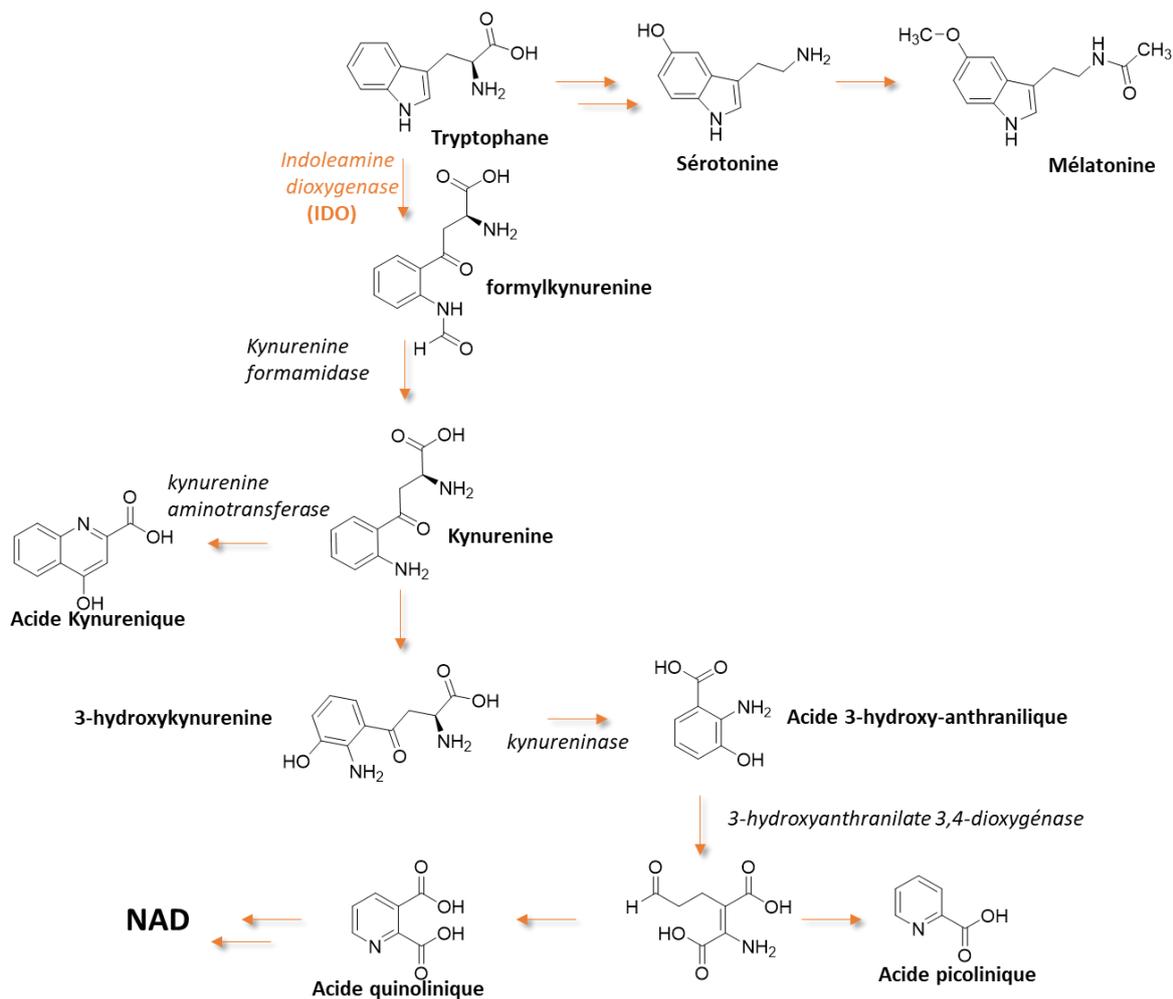
plus efficace possible, l'idée est de cibler plusieurs points de contrôle en même temps, à l'instar d'un antibiotique à large spectre.

#### **d) Les inhibiteurs de VEGF (étape 5)**

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire<sup>22</sup> est une protéine dont le rôle est de déclencher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse) nécessaire pour accompagner la croissance des tissus et le développement des organes du corps humain. Il intervient dans la croissance des tumeurs pour satisfaire leur besoin en oxygène et en nutriments. L'inhibition du VEGF permet d'arrêter la croissance tumorale (voir plus haut paragraphe 5.5 sur les thérapies ciblées).

#### **e) Les inhibiteurs d'IDO (étape 7)**

L'IDO ou indoleamine-2,3-dioxygénase est une enzyme à hème intracellulaire surexprimée dans les cancers (poumon, prostate, pancréas ...). Elle est induite par l'expression de cytokines telles que les INF- $\gamma$ , mais aussi par les cellules dendritiques et les cellules cancéreuses<sup>23</sup>. L'IDO est l'enzyme qui catalyse la première étape, qui est aussi l'étape limitante, de la voie de catabolisme du tryptophane (Trp) en Kynurénine ; il est à noter que 95 % du tryptophane est métabolisé en Kynurénine (Figure 10). Il existe deux sortes d'IDO<sup>24</sup>, IDO1 et IDO2 qui catalysent la même réaction biochimique, mais avec des vitesses différentes. IDO2 est exprimée seulement dans le foie et le rein, beaucoup plus faiblement que IDO1 (en comparaison, seulement 3 à 5 % de son activité). Il existe aussi, une autre enzyme capable de cataboliser le tryptophane mais présentant une distribution différente de celle de l'IDO, c'est la tryptophan-2,3-dioxygénase (TDO). Cette dernière est aussi présente chez les bactéries. TDO est transcrite uniquement dans le foie, son expression au niveau des protéines n'est pas établie, et sa fonction majeure est de contrôler la concentration en Trp dans le sang. IDO2 ARN messenger est exprimée à de faibles niveaux dans le placenta et le foie (l'expression des protéines n'est pas connue), tandis qu'IDO1 montre une forte expression des protéines dans les organes périphériques de la lymphe (ganglions lymphatiques, rate et amygdales).



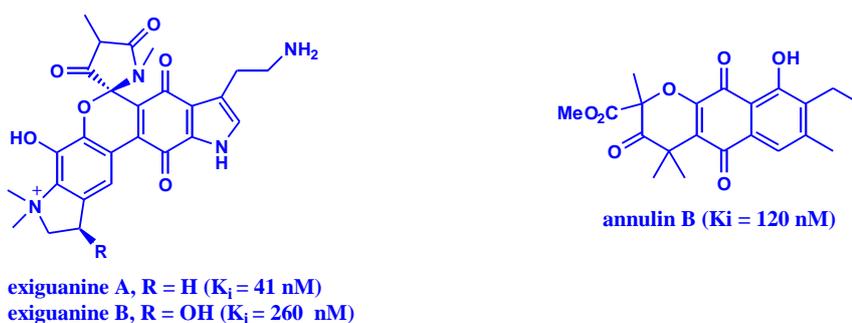
**Figure 10 :** Voie de catabolisme du tryptophane

Dans le cas de différents cancers, il a été observé une surexpression d'IDO1 et TDO<sup>25</sup> associée à des niveaux élevés de Kynurénine, conduisant le plus souvent à de mauvais diagnostics. L'enzyme exerce une activité d'immunosuppression sur les lymphocytes T. La déplétion de concentration en tryptophane dans le microenvironnement tumoral et/ou l'augmentation de la concentration en Kynurénine vont supprimer la réponse immunitaire des lymphocytes T de plusieurs manières :

- les lymphocytes T se retrouvent en quiescence ce qui va inhiber leur activité cytotoxique.
- les lymphocytes T vont avoir une perte d'activité ce qui va entraîner leur apoptose
- les lymphocytes T naïfs vont être transformés en Tregs chargés d'inhiber les lymphocytes T, ce qui diminue encore l'efficacité de la réponse immunitaire<sup>26</sup>.

### *Les inhibiteurs d'IDO*

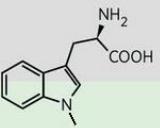
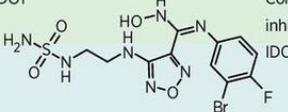
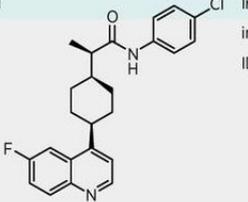
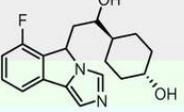
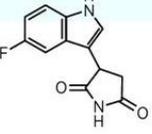
A partir du moment où l'IDO a été identifiée comme une cible potentielle pertinente en immunothérapie, différents inhibiteurs de l'enzyme ont été proposés.<sup>27</sup> Parmi les plus actifs proposés, on note différents métabolites issus du milieu marin comme les exiguanines A et B<sup>28</sup> comportant un motif indolique, ou l'annulin B (Figure 11).<sup>29</sup>



**Figure 11 :** *inhibiteurs d'IDO issus du milieu marin*

D'autres composés avec des motifs différents ont été découverts par : dérivatisation de produits naturels, criblage à haut débit ou conception basée sur la structure. Au bilan, à ce jour, moins d'une dizaine de molécules sont en essais cliniques ou précliniques comme inhibiteur d'IDO1 ou comme inhibiteur dual IDO1/TDO (tableau 1).<sup>30</sup>

Même si les observations initiales ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur d'IDO1 seul ne suffisait pas à constituer une thérapie efficace, il a très vite été mis en évidence que des stratégies d'association par exemple avec des inhibiteurs de PD-1/L1 étaient performantes. Une littérature importante supporte aussi l'intérêt prometteur de cibler l'IDO en combinaison avec des thérapies anticancéreuses classiques telles que la chimiothérapie ou la radiothérapie. Néanmoins, il est à noter que l'échec de nombreux essais impliquant l'épacadostat (Cf Tableau 1) reporté très récemment, a mis en évidence la nécessité d'une recherche approfondie des modes d'action des composés avant de lancer des schémas combinatoires.

Drug	Company	Target	Structure	Mechanism	Dosing	Human IDO1 enzymatic assay (IC <sub>50</sub> )	Human IDO1 cell-based assay (IC <sub>50</sub> )	Human TDO enzymatic activity	Phase of development
<b>Indoximod</b>	NewLink	Tryptophan mimetic		Stimulates mTOR kinase to reduce T-cell autophagy (49)	1200 mg BID (77)		>2.5 mM (HeLa cells) (46) -30 uM (Human DCs)	Nonselective	III
<b>Epacadostat</b>	Incyte	IDO1		Competitive inhibition of IDO1 (46)	100 mg BID (59)	72 nM (46)	7-23 nM (46)	>100-fold (46)	III
<b>BMS986205</b>	Bristol-Meyers Squibb	IDO1		Irreversible inhibition of IDO1 (78)	150 mg QD (79)		1 nM (HEK293 cells) 2 nM (IFNγ-stimulated HeLa cells) (44)	>100-fold (44) >2 uM in HEK293 cells	III
<b>Navoximod</b>	NewLink	IDO1		Noncompetitive inhibition of IDO1	50-800 mg BID (80)	28 nM (82)	75 nM (81)	10-20-fold (78)	Ib
<b>PF-06840003</b>	iTeos	IDO1		Noncompetitive inhibition of IDO1 (82)	250-500 mg BID (83)	120 nM (82)	1100 nM (82)	>100-fold (82)	I
<b>KHK2455</b>	Kyowa Hakko Kirin	IDO1	Not available	Competitive inhibition, apo-conformation (84)	1 mg QD (85)		14 nM (84)	>100-fold (84)	I
<b>RG70099</b>	Roche	IDO1/TDO	Not available	Competitive inhibition	Unspecified	16 nM (69)	12 nM (69)	6-fold (69)	Preclinical
<b>IOM-E</b>	Merck	IDO1	Not available	Unknown	Unspecified		100 nM (70)	>100-fold (70)	Preclinical
<b>IOM-D</b>	Merck	IDO1/TDO	Not available	Unknown	Unspecified		365 (70)	10 nM (70)	Preclinical

© 2018 American Association for Cancer Research

CCR Reviews

AAGR

**Tableau 1** : Molécules en développement clinique comme inhibiteurs d'IDO

Depuis quelques années, les médicaments d'immunothérapie, qui cherchent à déclencher une réponse du corps contre les cellules cancéreuses, ont bouleversé la prise en charge des cancers, montrant dans certains cas des résultats spectaculaires. Cependant, il est important de noter qu'ils ne sont efficaces que chez 20 à 30% des patients, avec souvent des disparités d'un cancer à l'autre. Identifier des marqueurs prédisant la réponse à ce type de traitements est donc un enjeu primordial, notamment compte-tenu de leur coût et de leur toxicité, pour éviter d'exposer

inutilement des patients. Concernant cela, beaucoup de recherches sont en cours. Les différentes pistes s'intéressent notamment à la flore intestinale<sup>31</sup>, en étudiant la notion d'immunoscore<sup>32</sup>, à des études bio-informatiques de marqueurs chez les patients<sup>33</sup> ou à d'autres marqueurs comme les structures lymphoïdes tertiaires (SLT)<sup>34</sup>.....

## **B. Les produits naturels marins**

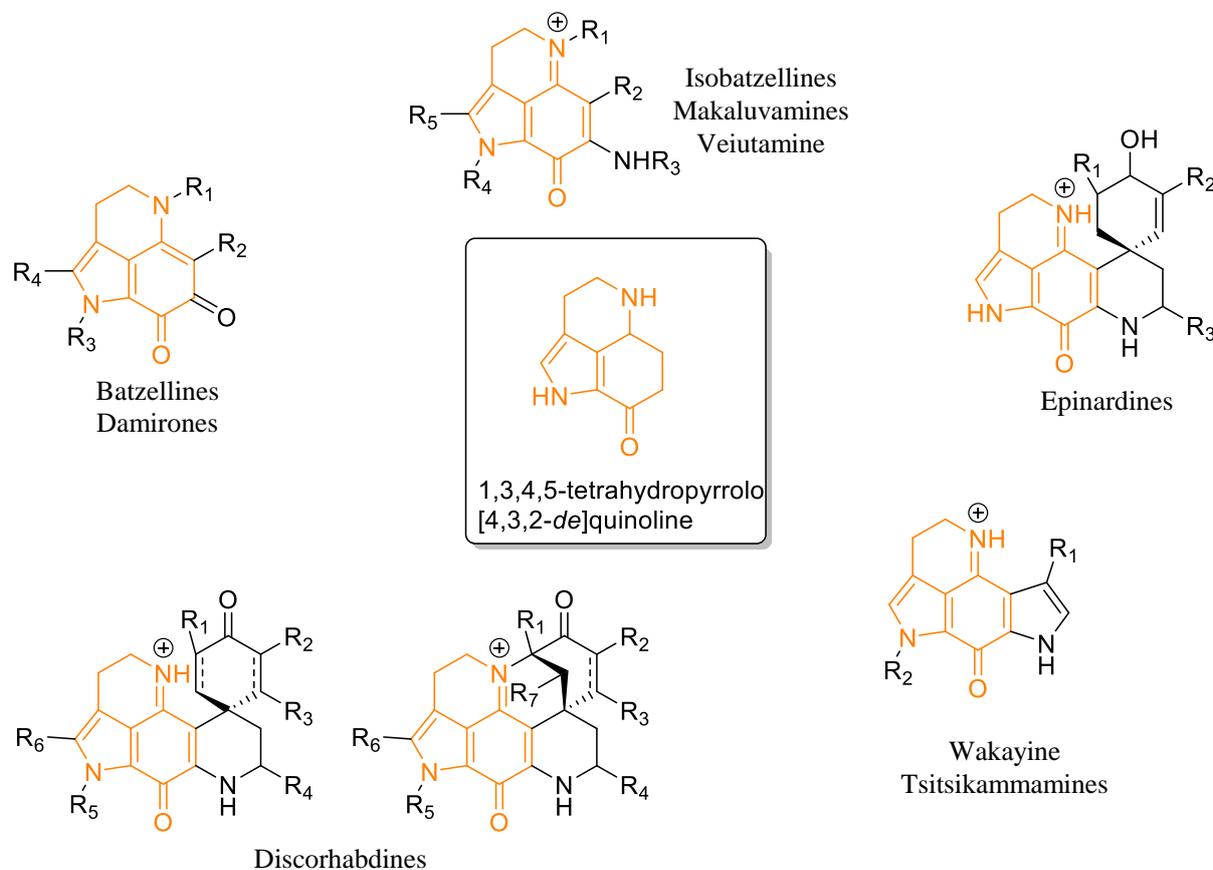
Comme indiqué précédemment, parmi les premiers inhibiteurs d'IDO reportés dans la littérature, certains ont été isolés du milieu marin, notamment les exiguanines A et B comportant un motif indole (voir *Figure 11*). Ces résultats nous ont amenés à évaluer l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'IDO1, de composés de type pyrroloiminoquinone sur lesquels nous travaillions dans le cadre de la mise au point de la synthèse totale de l'alcaloïde marin, la Tsitsikammamine A (*Figure 12*). Certains se sont révélés être de bons inhibiteurs.<sup>35</sup>

### **1. La mer une source d'inspiration**

Les mers et les océans recouvrent 70 % de la surface du globe terrestre et représentent à peu près 90% de la biosphère. Un peu partout dans les pays développés, des chimistes ont commencé à les explorer systématiquement pour y trouver des produits à activité pharmacologique issus aussi bien de végétaux que d'animaux marins. Ils constituent donc un milieu propice d'investigations, d'autant qu'on peut y observer une compétition pour la vie qui n'a pas d'équivalent sur terre. En effet, certains organismes sessiles (qui ne peuvent se mouvoir rapidement) se sont adaptés en se munissant d'une protection externe (carapace ou coquille), d'autres, plus fragiles car dépourvus de défense physique, ont dû développer des substances actives pour se défendre des agresseurs. C'est le cas, notamment, des ascidies et des éponges qui vivent soit isolées soit en colonies. Les substances chimiques qu'elles produisent sont d'autant plus puissantes qu'elles doivent agir en milieu dilué. Différentes activités telles qu'antimicrobienne, cytotoxique, algicide, etc, ... ont été rapportées pour les molécules issues de ces organismes marins. Elles peuvent être rangées en différentes catégories : stéroïdes, polycétones, sesquiterpènes, polyacétylènes, sulfoglycolipides, carraghénanes, fucoïdanes, hydroquinones... Parmi toutes ces familles, les alcaloïdes, qui sont des molécules à base azotée, le plus souvent hétérocyclique, représentent plus de 30% des molécules marines décrites. Nous nous intéressons plus particulièrement à la famille des pyrroloquinolines.

## 2. Les pyrroloquinolines

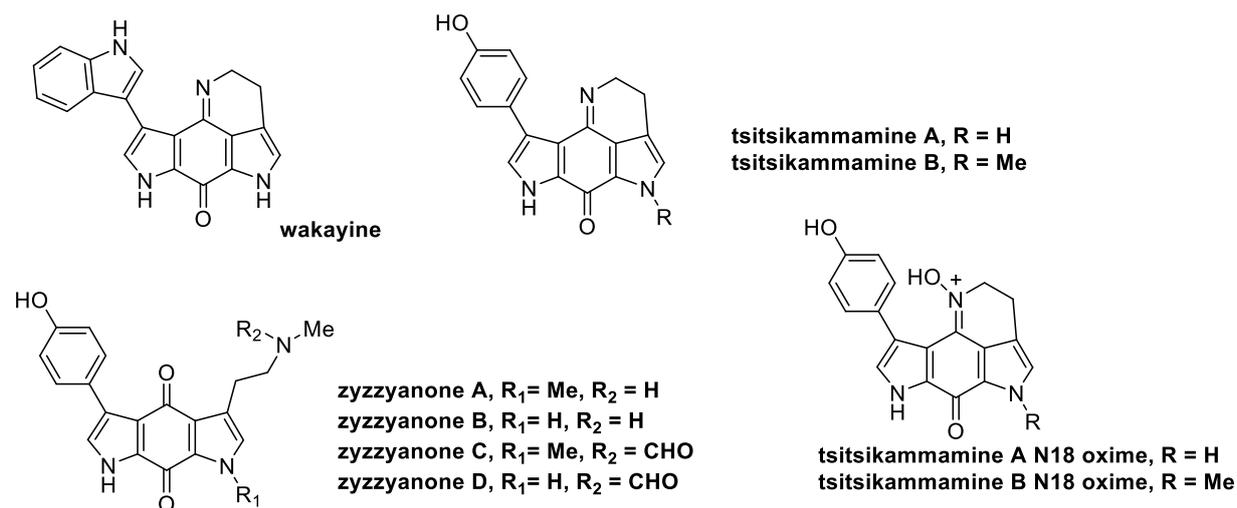
Les pyrroloquinolines constituent une des familles les plus importantes d'alcaloïdes isolés d'organismes marins (pour la plupart, des éponges et des ascidies). Plus d'une soixantaine de métabolites dont la structure s'organise autour du squelette tricyclique 1,3,4,5-tétrahydropyrrolo[4,3,2-de]quinoline mais peut compter jusqu'à sept cycles, ont été décrits à ce jour (Figure 12). Ces composés ont fait l'objet de nombreuses études, car ils possèdent un panel d'activités biologiques très large.<sup>36</sup>



**Figure 12 :** Différents membres de la famille des pyrroloquinolines

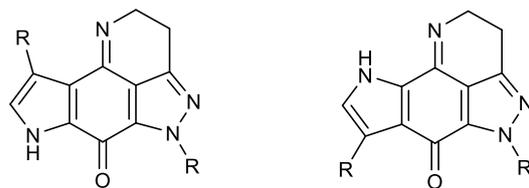
Dans notre équipe, nous nous intéressons plus particulièrement à trois membres de cette famille, les tsitsikammamines A et B et la wakayine, dont la structure comporte un deuxième cycle pyrrole fusionné au motif pyrroloquinoline (Figure 13). Les tsitsikammamines A et B ont été isolées d'une éponge *Latrunculid Tsitsikamma favus* récoltée en Afrique du Sud en 1996.<sup>37</sup> Deux autres métabolites apparentés, les N-oximes-tsitsikammamines A et B ont aussi été décrites en 2004<sup>38</sup>, lorsque cette même éponge a été réexaminée. La wakayine est issue de l'ascidie *Clavelina* trouvée près des îles Fiji en 1991.<sup>39</sup> Il est à noter qu'un autre groupe d'alcaloïdes, les zyzzyanones A-D, n'appartenant pas à la famille des pyrroloquinolines, mais

présentant le même motif bis-pyrroloquinone que les tsitsikammamines et la wakayine, ont été isolées de l'éponge australienne *Zyzzya fuliginosa*.<sup>40</sup>



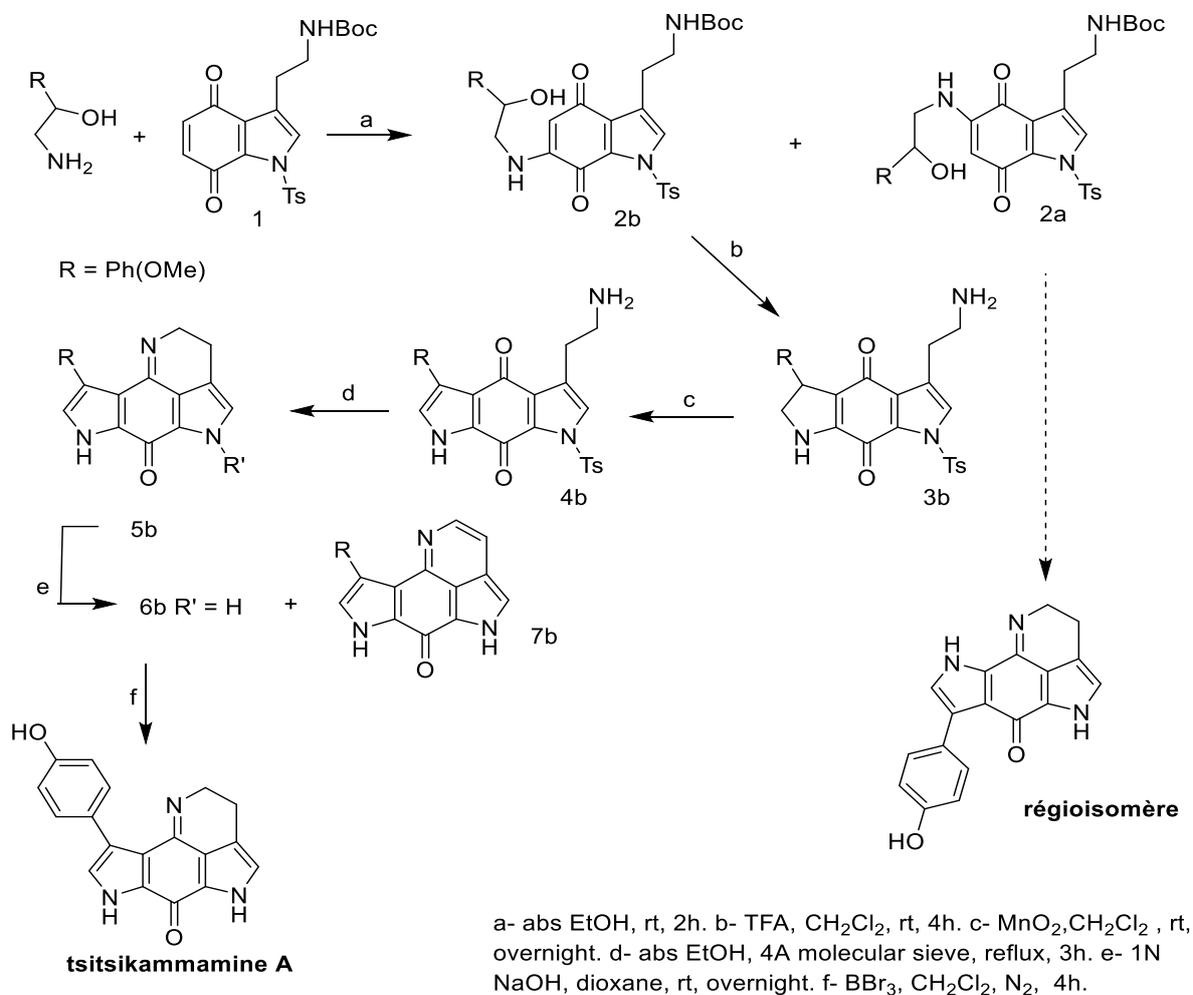
**Figure 13** : Alcaloïdes marins comportant un motif bis-pyrroloquinone

Les tsitsikammamines et la wakayine ont été décrites comme possédant des activités cytotoxiques et antifongiques, de plus, une bonne activité antimicrobienne a pu être observée pour la wakayine. L'activité cytotoxique décrite pour la wakayine<sup>41</sup> ( $IC_{50} = 1,53 \mu M$  vis-à-vis de HCT-116) a suscité un grand intérêt et rapidement, des biologistes ont montré qu'elle était capable d'interférer avec la topoisomérase I, avec un mode d'action comparable à celui de la camptothécine. Elle inhibe cependant l'enzyme à des concentrations 10 fois plus importantes que la camptothécine. De plus, la wakayine étant une molécule plane, elle est un intercalant puissant de l'ADN. Après intercalation au niveau des bases de l'ADN, la wakayine se lie au complexe ADN-Topo I covalent pour former un complexe clivable stable qui peut être inhibé à forte concentration de produit ( $667 \mu M$ ). Cette action stabilisante sur le complexe, par intercalation dans l'ADN, est propre à la wakayine et n'existe pas chez la camptothécine. D'autre part, à l'inverse de la camptothécine, la wakayine ne semble pas inhiber la réplication de l'ADN, mais elle augmente plutôt l'activité catalytique de la Topoisomérase I, provoquant des ruptures multiples de l'ADN, menant ainsi à la mort cellulaire. Ces propriétés particulières, nous ont conduits dans le cadre d'une thèse précédente (thèse de Laurent Legentil)<sup>42</sup> à étudier des composés aza-analogues des produits naturels pour définir des agents anticancéreux inhibiteurs potentiels des Topoisomérases I ou/et II (Figure 14).<sup>43</sup>



**Figure 14:** Aza-analogues of wakayin and tsikammamines

A ce jour, il n'existe aucune synthèse de la wakayine. En 2009, nous avons publié la seule et unique synthèse de la tsitsikammamine A<sup>44</sup> décrite à ce jour. Cette synthèse est basée sur une réaction de Michael entre l'indoledione 1 et le 2'-amino -1-(4-méthoxyphenyl) éthanol (Schéma 1).

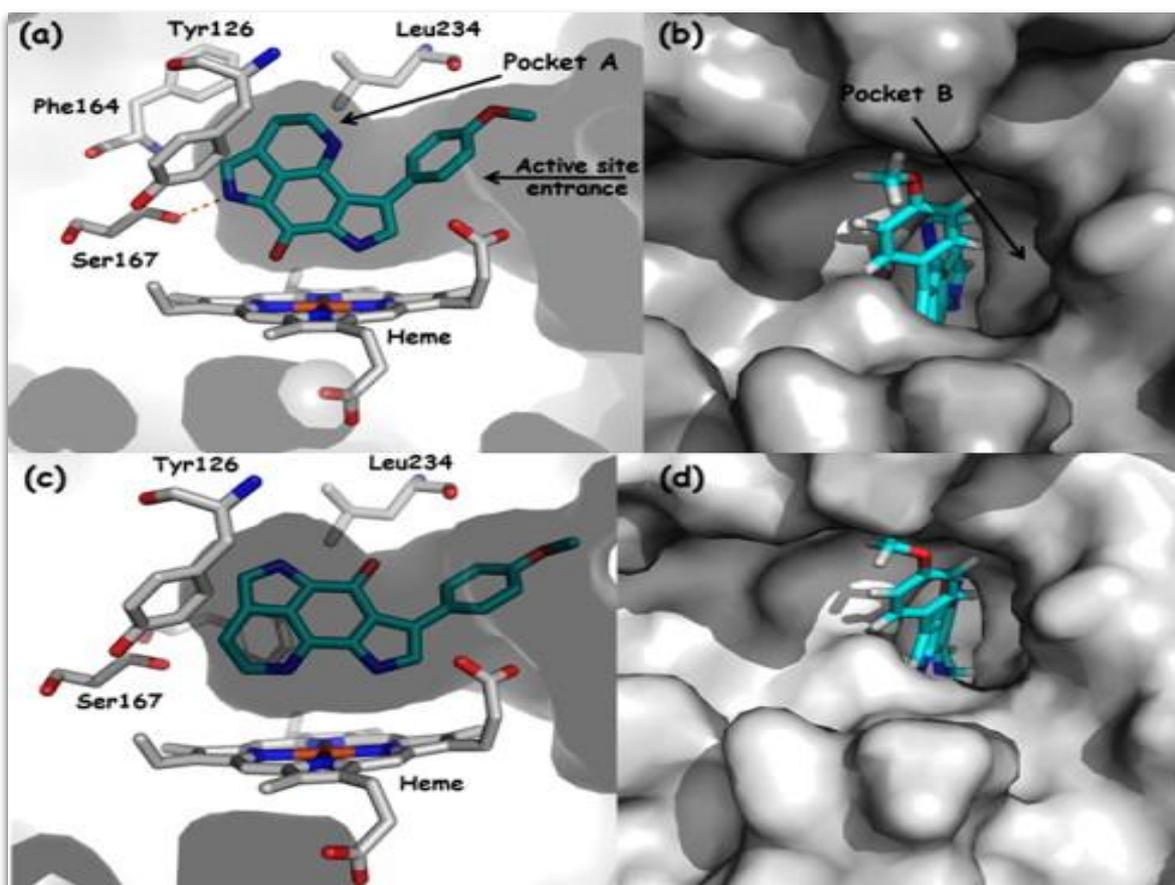


**Schéma 1 :** Synthèse totale de la tsitsikammamine A

Deux régioisomères **2a** et **2b** sont formés dans cette réaction. La formation du deuxième cycle pyrrole se fait en deux étapes : cyclisation par le TFA pour former le cycle à 5 chaînons (avec la déprotection concomitante du Boc), puis action du MnO<sub>2</sub> pour l'aromatiser. Le dernier cycle du motif pyrroloquinoline est formé par reflux dans l'éthanol avec du tamis moléculaire. Le groupement tosyl est d'abord clivé en milieu basique (1N NaOH /dioxanne), puis le groupement méthoxy est clivé à son tour par action du BBr<sub>3</sub> pour conduire au produit final. La même séquence est réalisée sur chaque isomère séparément. Le composé **2b** conduit à la tsitsikammamine tandis que le composé **2a** conduit à son régioisomère.

Tous les intermédiaires de la synthèse de la tsitsikammamine, ainsi que les produits finaux ont été évalués vis-à-vis de leur inhibition de l'IDO1 et de la TDO, dans le cadre d'une collaboration avec Eduard Dolusic, Luc Pilotte et Benoît Van den Eynde du Ludwig Institut de Bruxelles. Certaines molécules, notamment la méthoxy-tsitsikammamine **6b**, ont montré une activité intéressante IC<sub>50</sub> = 0,9 μM. Dans un test enzymatique cependant que d'autres intermédiaires se sont révélés actifs dans un test cellulaire. Ce travail a été publié en 2013.<sup>35</sup>

Pour comprendre les résultats obtenus lors de ce travail, notamment, les disparités observées entre les composés menant à la tsitsikammamine et leurs régioisomères, nous avons étudié, par modélisation moléculaire (programme GOLD) le mode de liaison des composés **6b** et de son régioisomère **6a** au sein de l'enzyme IDO1 (Figure 15). Pour les deux isomères, le motif pyrroloquinoline se positionne dans la poche hydrophobe A du site actif de l'enzyme. Pour **6b**, l'interaction se fait via une liaison hydrogène avec la Ser167, et la complexation à l'atome de fer de l'hème qui s'opère avec le C=O (distance de 2,89 Å, angle d'environ 120°). Le composé est aussi stabilisé par des interactions hydrophobes avec Tyr126, Ph164 et Phe163. On note une bonne complémentarité de géométrie entre le motif pyrroloquinoline et la poche A de l'IDO. La poche B, au contraire, n'est, elle, que partiellement occupée par la chaîne latérale méthoxy-phényl. Si on considère maintenant, le composé **6a** qui présente une moins bonne activité inhibitrice (IC<sub>50</sub> = 7.1 μM), le composé semble adopter un mode de liaison inverse de celui observé pour **6b**, probablement pour permettre une meilleure adaptation de la chaîne latérale. Dans cette orientation, la pyrroloiminoquinone interagit avec le même atome de fer via l'azote du cycle à 6 du motif pyrroloquinoline (la distance est de 4 Å). La liaison hydrogène avec la Ser 167 ne se fait plus, ni les interactions hydrophobes. Ce moins bon ancrage de **6a** par rapport à **6b** dans le site actif de l'IDO, explique peut-être la moins bonne activité observée. Par contre, de la même façon que pour **6b**, la poche B de l'enzyme, n'est que partiellement occupée par la chaîne latérale pour **6a**.



*Figure 15 : Vues de (a) 6b et (c) 6a arrimées dans le site actif de l'IDO1 (code PDB 2DOT) montrant la poche A de l'enzyme, et (b) 6b and (d) 6a montrant la poche B de l'enzyme.*

C'est vers l'optimisation de l'occupation de cette poche B qu'il faudra aller pour designer des inhibiteurs potentiels.

# **Chapitre II**

## **Etude de la synthèse totale de la Wakayine**

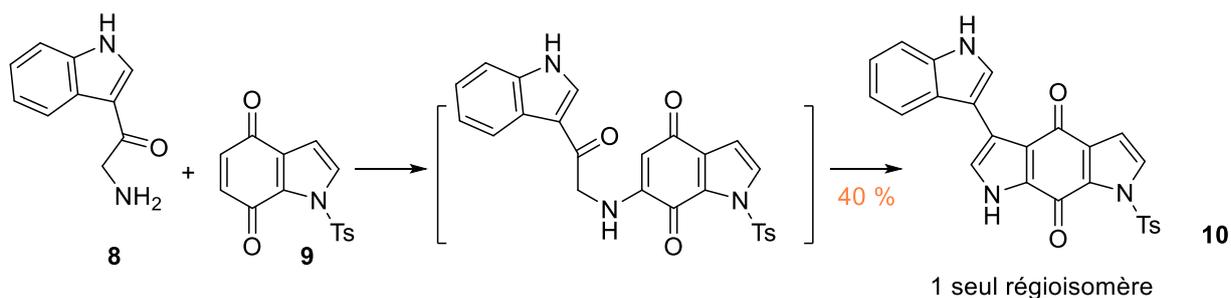


La synthèse totale des produits d'origine naturelle constitue un challenge important et essentiel, notamment pour obtenir des quantités de produits nécessaires pour la mise en œuvre des évaluations biologiques. La synthèse d'alcaloïdes à noyau pyrroloquinoline s'est développée au cours de ces vingt dernières années, compte-tenu de l'activité potentielle de ces molécules à structures originales.<sup>45</sup> La synthèse des trois membres de cette famille, les tsitsikammamines A et B et la wakayine comportant un deuxième cycle pyrrole fusionné au motif pyrroloquinoline, va passer par la formation du motif bispyrroloquinone.

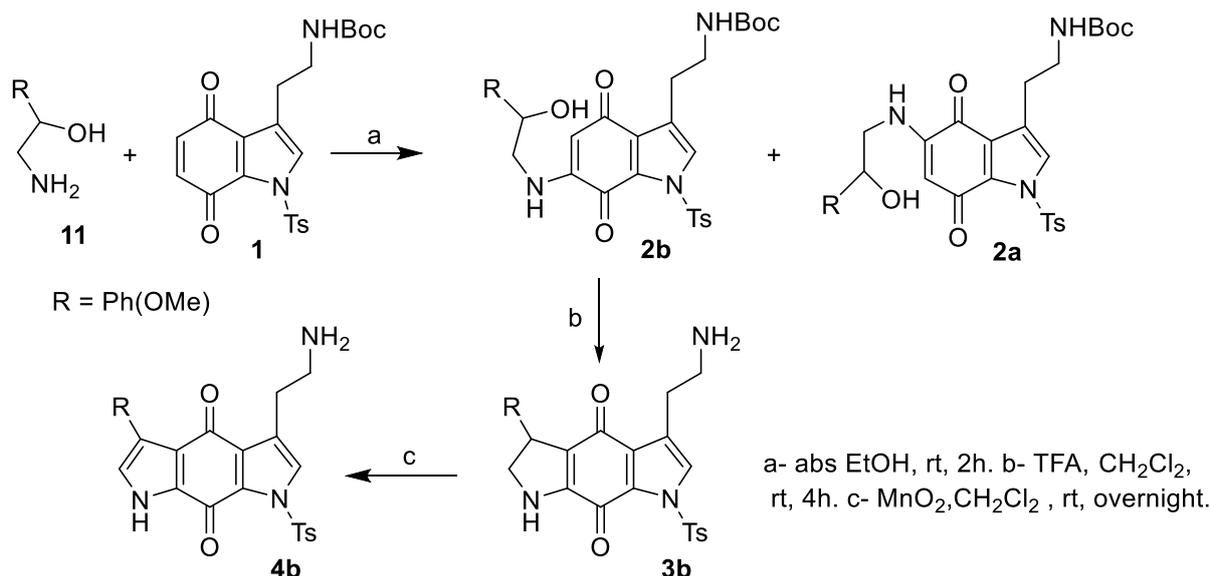
## A. Rappels bibliographiques

Différentes stratégies ont été mises en œuvre pour la construction du motif bispyrroloquinone.

La première réaction a été décrite, en 1999, par Barret et Roué<sup>46</sup>, elle consiste en la condensation de l'indole- $\beta$ -cétoamine **8** sur la tosylindoledione **9** (dans une stoechiométrie 5/1) dans l'éthanol à température ambiante. Un intermédiaire, qui n'a pas été isolé, est postulé dans cette réaction qui conduit au composé **10** avec un rendement de 40%. Il est à noter qu'un seul régioisomère est obtenu.

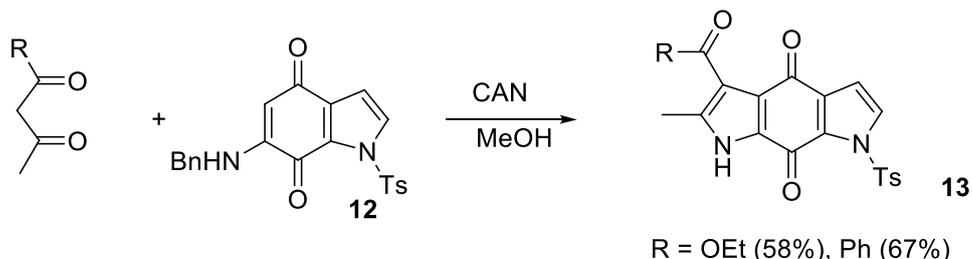


En 2009, notre équipe a proposé la seule synthèse totale de la tsitsikammamine A<sup>47</sup> (Schéma 2) existante à ce jour, dans laquelle la formation du motif bispyrroloquinoline se fait en 3 étapes : tout d'abord, l'indoledione **1** réagit avec la  $\beta$ -hydroxyamine **11** pour donner le mélange des deux régioisomères **2a** et **2b** qui sont ensuite cyclisés par action du TFA avec déprotection concomitante du groupement protecteur BOC. Dans la dernière étape, le cycle précédemment formé est aromatisé par action du  $MnO_2$  pour conduire au composé **4b**.



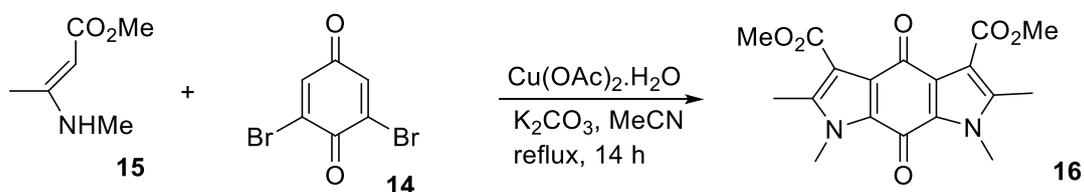
**Schéma 2 : Synthèse totale de la tsitsikammamine.**

La même année, Velu et ses collaborateurs publient une nouvelle méthode de formation du motif bispyrroloquinone faisant intervenir la mise en réaction d'un composé  $\beta$ -dicarbonylé sur la NH-benzylindole-1,2-dione **12** en présence de CAN<sup>48</sup>.



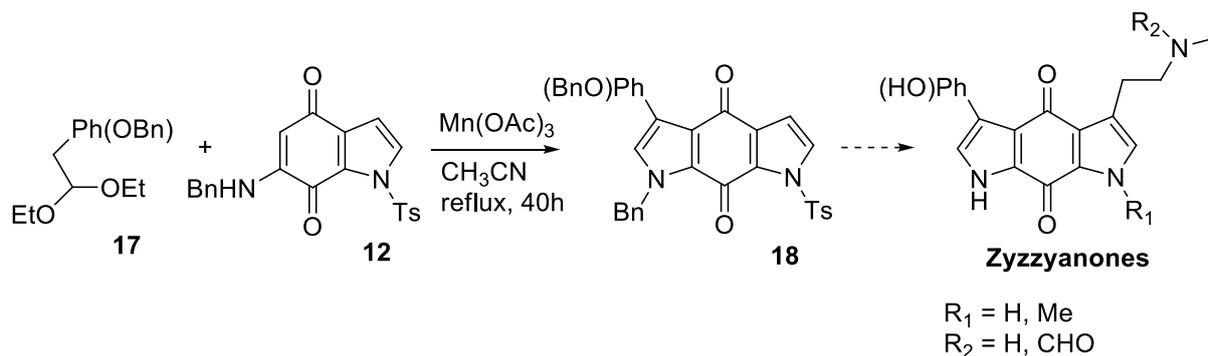
On obtient dans ce cas des dérivés **13** avec des rendements variables selon que l'on parte d'un  $\beta$ -cétoster ou d'une  $\beta$ -dicétone.

En 2013, Moody *et al.*<sup>49</sup> décrivent la formation du motif bispyrroloquinone à partir de la réaction mettant en jeu la dibromo-dihydroquinone **14** et le composé **15** en présence de sel de cuivre pour conduire au composé **16**.

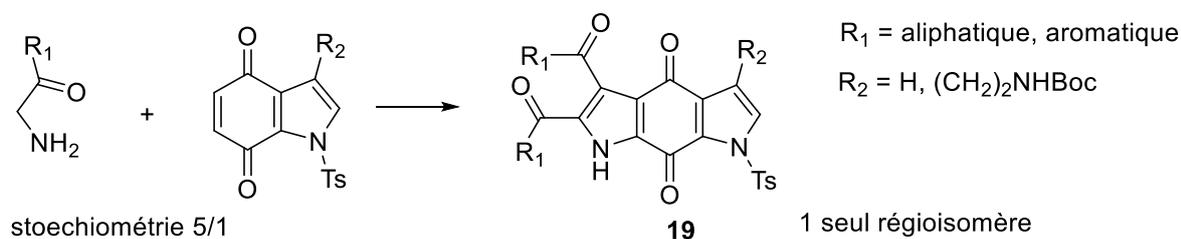


Dans une autre alternative à la construction du motif tricyclique, Velu *et al.*,<sup>50</sup> font de nouveau

intervenir la NH-benzylindole-1,2-dione **12** qui cette fois est condensée sur le 1-(benzyloxy)-4-(2,2-diéthoxyethyl)benzène **17**, pour donner la bispyrroloquinone **18**. Cette réaction constitue l'étape de base dans la synthèse totale des zyzzyanones.



Plus récemment, notre équipe a rapporté une méthode permettant d'aboutir à des composés de type **19**, comportant le motif pyrroloquinoline.<sup>51</sup> En effet, lors de la mise au point de la synthèse de la Tsitsikammamine A, une des premières voies que nous avons explorée a été de reprendre la méthode décrite par Barret et Roué (voir plus haut). La réaction de condensation de l'indole- $\beta$ -cétamine **8** sur la tosylindole-1,2-dione **9**, dans les conditions décrites par les auteurs ne conduit pas au composé **10** attendu, mais à des composés de type **19**. Nous avons généralisé cette réaction à des composés comportant comme substituant R<sub>1</sub> aussi bien des noyaux aromatiques que des groupements aliphatiques.



Il est à noter que dans cette réaction, un seul régioisomère est obtenu.

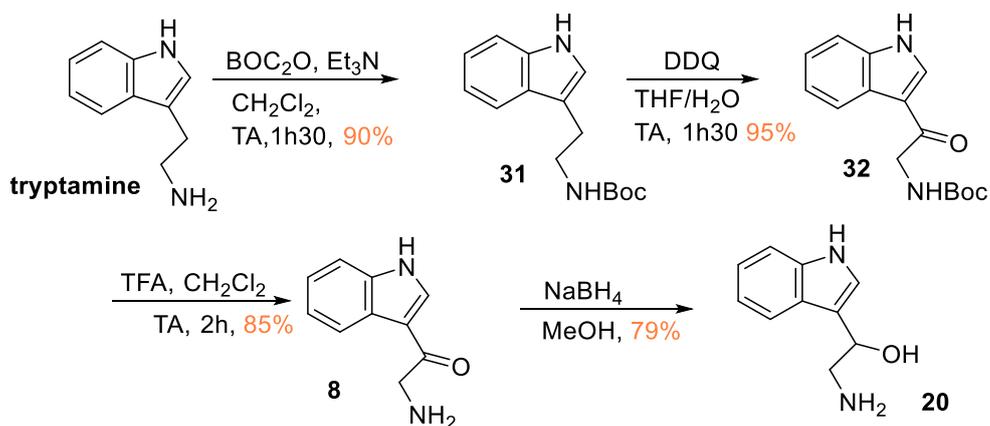
## B. Synthèse totale de la wakayine

La synthèse de la wakayine a été envisagée selon différentes stratégies qui ont été étudiées soit alternativement, soit en simultané. Dans la mesure où dès le départ on a envisagé de tester les différents intermédiaires de synthèse sur l'IDO, la plus grande diversité était recherchée.



Dans la première étape, le 2,5-diméthoxybenzaldéhyde **21** est nitrée par l'acide nitrique fumant dans l'acide acétique pour donner le dérivé **22**. La seconde étape fait intervenir une réaction de Henry consistant en l'attaque du nitrométhane sur l'aldéhyde pour former, après élimination d'une molécule d'eau, le composé nitrovinyle correspondant **23**. L'obtention du diméthoxyindole **24** est réalisée par réduction cyclisante de **23** à l'aide du formiate d'ammonium en présence de palladium sur charbon. L'indole est ensuite mis en jeu dans une réaction de Mannich pour donner quantitativement la gramine correspondante **25**. Après quaternisation de la diméthylamine à l'aide de l'iodure de méthyle, la fonction nitrile est rajoutée par réaction de substitution, à l'aide du cyanotriméthylsilane en présence de fluorure de tétrabutylammunium pour conduire au composé **26** avec un rendement de 90 %. Ce dernier composé est tout d'abord réduit par l'hydrure de lithium et d'aluminium, l'amine **27** ainsi obtenue est protégée d'abord par le BOC donnant le composé **28** puis tosylée par le chlorure de tosyloyle. Dans la dernière étape le dérivé **29** ainsi obtenu est oxydé par le CAN en quinone **1**. Au bilan ce premier synthon est obtenu en 9 étapes avec un rendement global de 18%. Il est à noter que ce schéma réactionnel peut être réalisé sans problème à une échelle consistant à partir de 100 g de composé **21**.

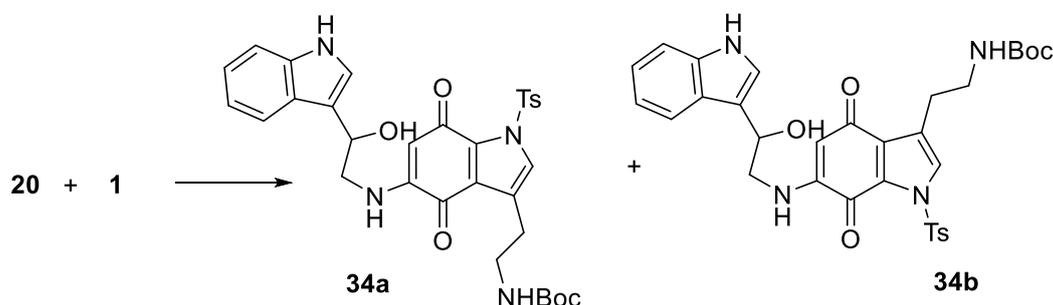
Le 2-amino-1-(1H-indol-3-yl)éthanol **20** est synthétisé selon la méthode de Oikawa et al. (Schéma4).<sup>53</sup> Après protection de la tryptamine par le BOC par action du di-*tert*-butyl dicarbonate en présence de triéthylamine, le composé **31** résultant est oxydé par le DDQ pour donner avec un rendement de 80% le dérivé **32**. Ce composé est tout d'abord déprotégé par l'acide trifluoroacétique pour conduire au composé **8**. L'action du borohydrure de sodium sur ce dernier composé conduit à l'alcool **20**.



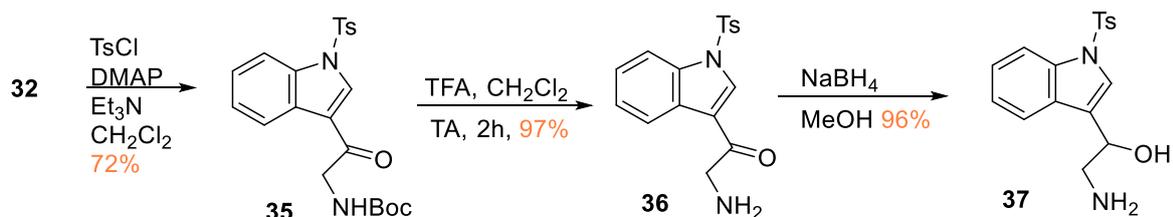
**Schéma 4 : Synthèse de l'hydroxyamine 20.**

## Synthèse

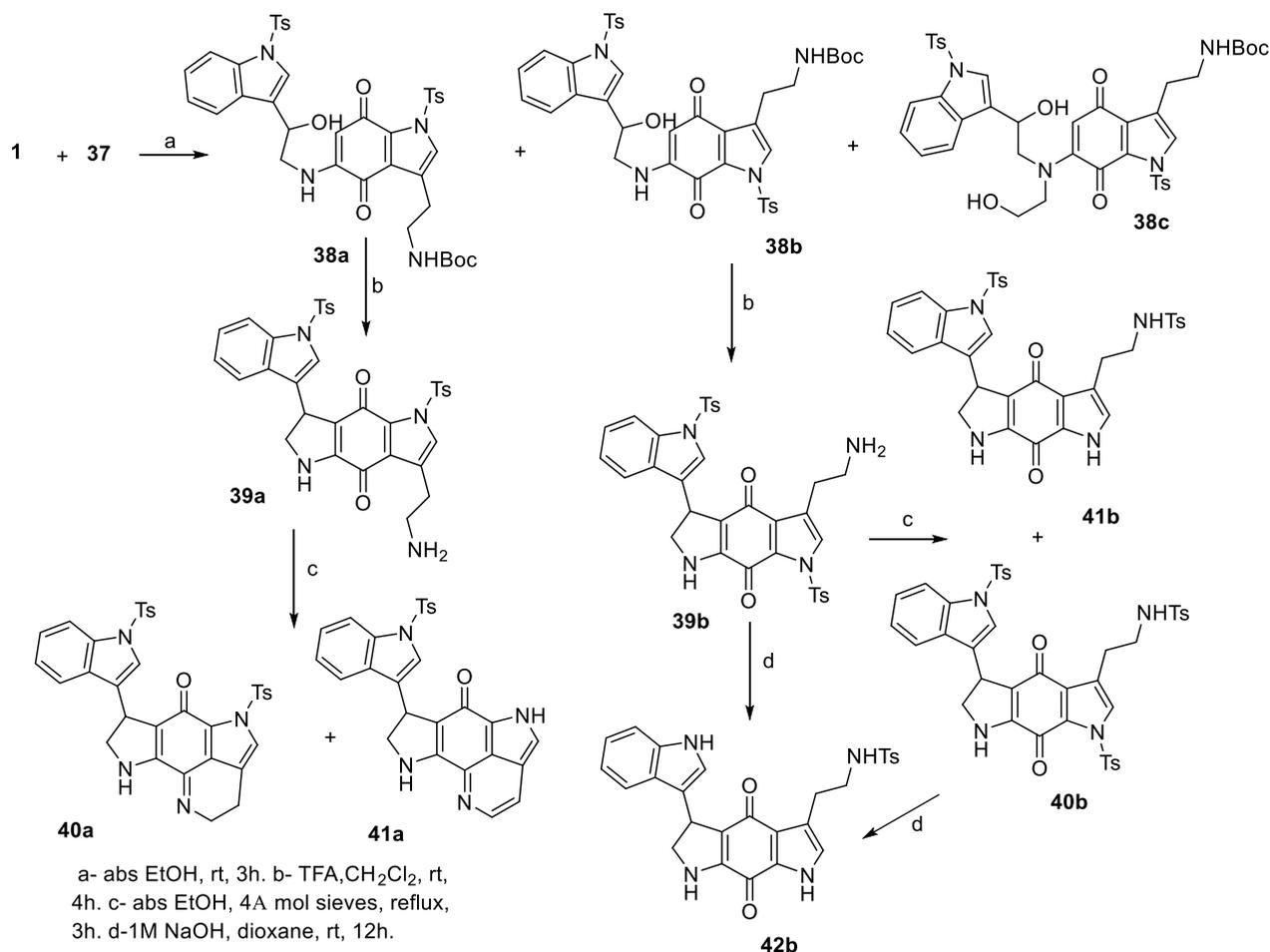
Comme attendu, le couplage de Michael de la  $\beta$ -hydroxyamine **20** sur l'indedione **1** dans l'éthanol donne, de la même façon que pour la synthèse de la tsitsikammamine, un mélange de deux régioisomères **34a** et **34b** dans un rapport 1 : 1, avec un rendement de 70 %.



L'action du TFA sur ces composés a conduit à un mélange de nombreux produits, ce qui nous a amenés à protéger l'azote de l'indole par un groupement tosylé. Cette protection est réalisée sur la cétone **32** pour donner le composé **35**, la fin de la séquence qui est la même que précédemment permet d'aboutir à l'hydroxyamine **37**.

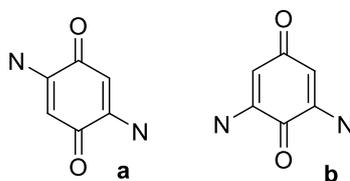


Le couplage de Michael de cette hydroxyamine sur l'indoledione **1** donne les adduits **38a** et **38b** avec des rendements respectifs de 42 et 38% (Schéma 5). On isole aussi comme produit secondaire **38c**, pour lequel il est difficile de donner un mécanisme de formation.



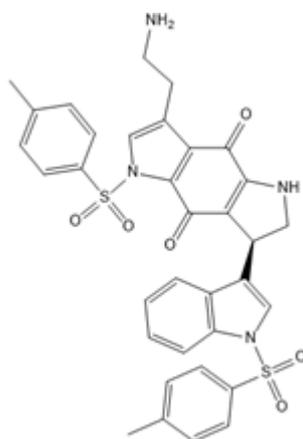
**Schéma 5** : Adaptation de la synthèse de la tsitsikammamine

Ces composés sont cyclisés séparément par action de l'acide trifluoroacétique avec clivage concomitant du groupement protecteur BOC pour donner les dérivés **39a** et **39b**. La détermination de la structure de chacun de ces isomères a été réalisée par RMN du <sup>13</sup>C, à partir de la règle empirique que nous avons définie lors de travaux précédents.<sup>54</sup> En effet si l'on considère les déplacements chimiques des C=O dans chacun des régioisomères, on observe que dans les régioisomères de type a, on a  $\Delta_{CO}$  proche de 0 ppm, tandis que dans les régioisomères de type b, on a  $\Delta_{CO} \sim 12$  ppm.

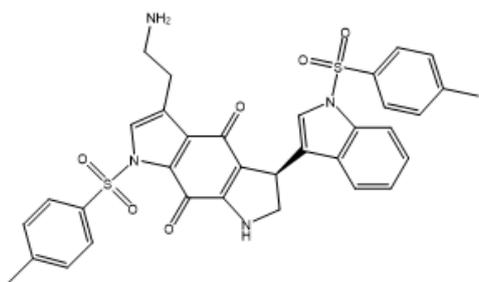
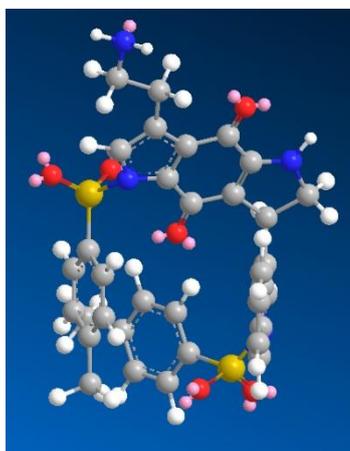


Malgré différentes conditions mises en jeu : i) MnO<sub>2</sub>, HCCl<sub>3</sub>,  $\Delta$ , ii) 10% Pd/C, toluene,  $\Delta$ , iii) DDQ, THF/H<sub>2</sub>O, TA, il n'a pas été possible d'aromatiser ce cycle à cinq chaînons formé lors

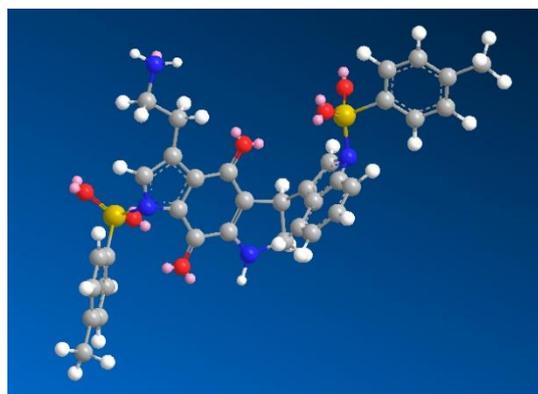
de la réaction précédente. Nous avons néanmoins poursuivi la séquence mise au point pour aboutir à la tsitsikammamine. A partir du composé **39a**, la formation du cycle à six chaînons pour achever la formation du motif pyrroloquinoline a été réalisée à reflux dans l'éthanol sous Argon, en présence de tamis moléculaire 4 A, permettant d'aboutir au dérivé **40a**. Il est à noter que si la réaction est menée à l'air, on isole aussi le composé **41a**. Les conditions de cyclisation appliquées au composé **39b** ne permettent pas la formation du cycle à six chaînons mais ont conduit aux dérivés tritosylés **40b** (65%) ou ditosylés **41b** (28%). Une façon d'expliquer la formation de ces composés pourrait être qu'une première molécule de composé **39b** sert de base pour détosyler une deuxième molécule, on a à ce moment-là présents dans le milieu, les composés **39b**, **39b'** (correspondant à **39b** détosylé) et le tosyl libéré. Ce dernier va pouvoir se fixer sur l'amine terminale de ces composés donnant ainsi **40b** et **41b** respectivement, avec des rendements dépendants de la cinétique de ces réactions. Il est par contre difficile d'expliquer pourquoi cette réactivité est observée dans le cas du régioisomère **39b** et pas dans le cas de **39a**.



**39a**



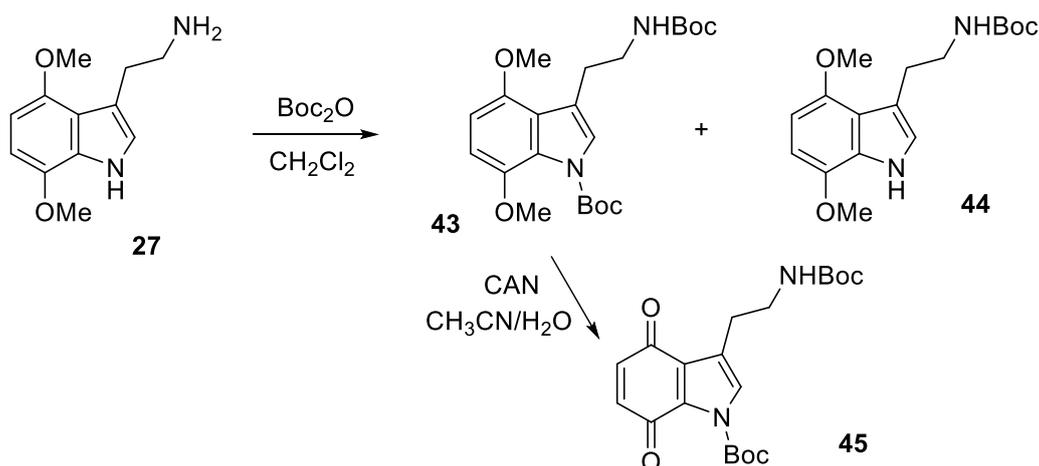
**39b**



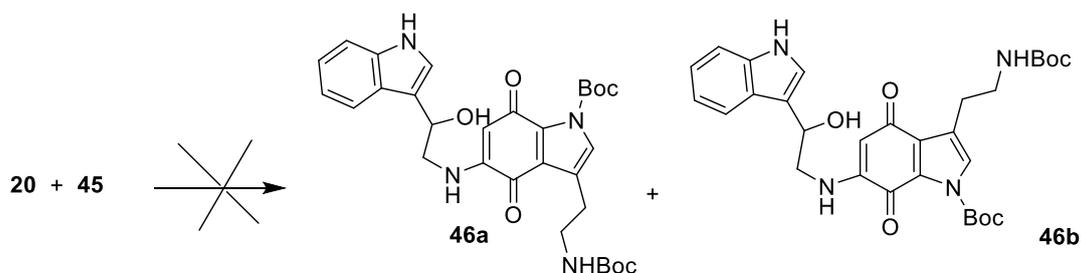
Une explication pourrait être que dans le cas du régioisomère **39a**, on observe des interactions pouvant être stabilisantes ( $\pi$ -stacking) entre les deux groupements tosyloxy ce qui empêche la migration de celui porté par le tricyclic bispyrroloquinoline vers l'amine primaire. Cette stabilisation n'est pas observée dans le cas de l'isomère **39b**.

Pour nous affranchir de ce phénomène, nous avons essayé de cliver le groupement tosyloxy préalablement à la réaction de cyclisation. Lorsque **39b** est mis en réaction dans un mélange dioxane/NaOH 1N, on obtient le composé **42b**. Ces mêmes conditions de réaction appliquées au composé **40b** conduisent aussi à **42b**. Nos tentatives pour cliver le groupement tosyloxy de l'amine terminale, i) CsF/célite, CH<sub>3</sub>CN,  $\Delta$ , ii) Li, naphthalène, THF, -78°C, se sont révélées infructueuses.

Comme l'utilisation du groupement protecteur tosyloxy nous a menés dans une impasse, nous avons envisagé de le remplacer par un BOC se clivant en milieu acide. La synthèse de l'indoledione **45** est réalisée en deux étapes à partir du dérivé diméthoxyindole correspondant **27**. La première étape consistant en la protection des azotes par action du BOC<sub>2</sub>O mène majoritairement au composé **43** attendu avec un rendement de 70% et on isole aussi 22% du composé monobocqué **44**. La deuxième étape consiste en l'oxydation quantitative de **43** par le CAN.

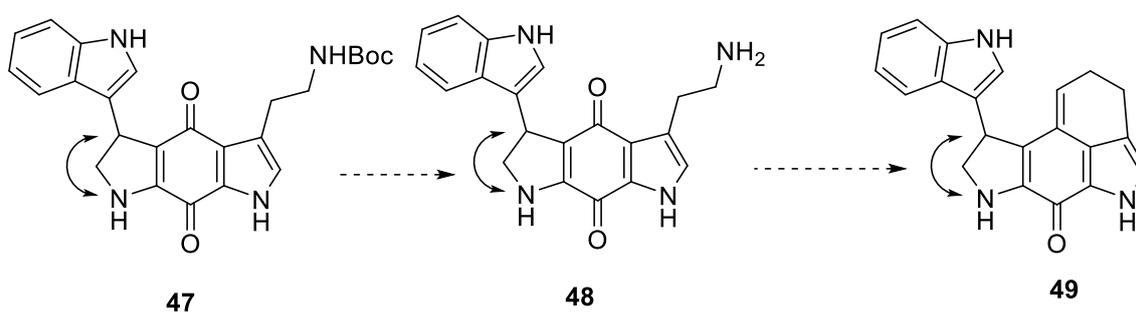


Pour le moment, un seul essai de la réaction de couplage impliquant l'indoledione **45** et l'hydroxyamine **20** a pu être réalisé selon les conditions décrites précédemment.



Elle n'a pas conduit aux adduits attendus **46a** et **46b**, mais pour le moment cette réaction a été réalisée sur de trop petite quantités pour en faire une analyse concluante.

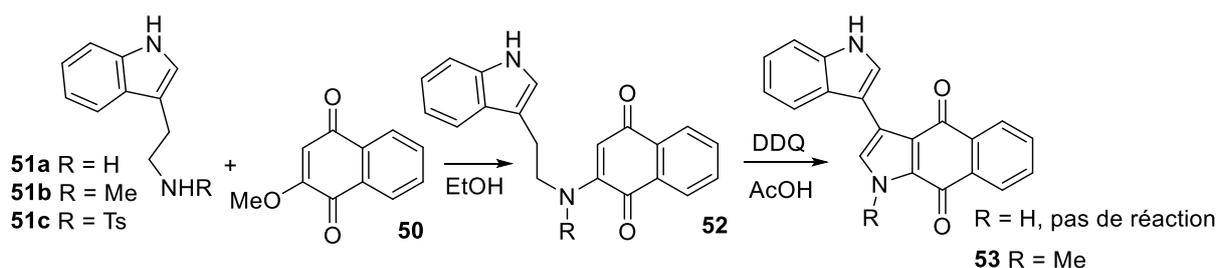
Cette stratégie de synthèse est toujours en cours d'étude, elle va se poursuivre comme indiqué ci-dessous



On ne sait pas encore si cette voie va aboutir mais même si ce n'est pas le cas, elle a conduit à des composés d'intérêt dans le cadre des inhibiteurs d'IDO1 qui seront traités dans le chapitre 4.

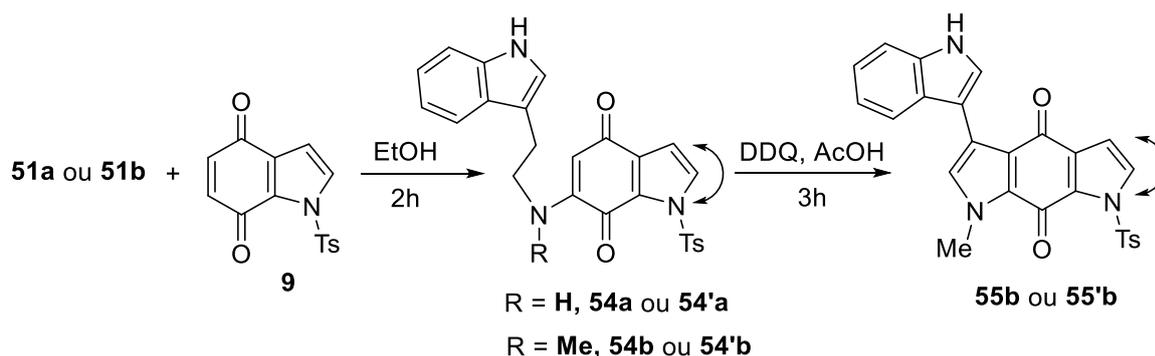
## 2. Deuxième stratégie

La méthode de Baret et Roué<sup>46</sup> décrivant la formation du deuxième cycle à 5, (même si, comme on l'a vu plus haut, elle n'a pas donné le composé postulé par les auteurs), était inspirée d'une réaction précédemment rapportée par Zhang et ses collaborateurs<sup>55</sup>.



Cette réaction met en jeu la tryptamine **51a** ou la méthyltryptamine **51b** et la méthoxynaphtoquinone **50** pour donner l'adduit **52** sur lequel on fait réagir le DDQ dans l'acide acétique pour conduire à la formation d'un cycle à cinq chaînons. Si la réaction met en jeu la tryptamine, on n'observe pas la formation de pyrrolonaphtoquinone, par contre si c'est la méthyltryptamine, le dérivé **53** est obtenu avec un rendement de 78 %.

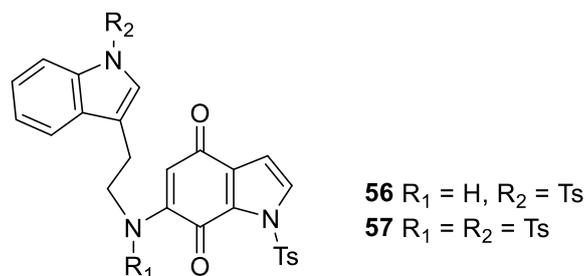
Pour notre part, nous nous sommes demandés, ce que cette réaction donnerait si la méthoxynaphtoquinone **50** était remplacée par une indoledione. A ce stade, compte-tenu du nombre d'étapes pour obtenir l'indoledione **1**, nous avons choisi de travailler avec l'indoledione **9**, obtenue en 2 étapes (tosylation pour conduire à **30** puis oxydation par le CAN) à partir de la diméthoxyindole **24**, soit 5 étapes et un rendement de 44 % à partir du diméthoxybenzaldéhyde **21** (schéma 1).



*Schéma 6 : Méthode de formation du motif pyrroloquinoline inspirée de Zhang*

L'addition de Michael est réalisée à la fois sur **51a** et **51b** (Schéma 6). Elle conduit à un mélange d'adduits **54a/54'a** et **54b/54'b** respectivement. La réaction de **54b/54'b** avec le DDQ dans l'acide acétique permet d'obtenir les produits attendus **55b** et **55'b**. Dans un premier temps, nous avons voulu voir s'il était facile de cliver le groupement méthyle, même si peu de méthodes sont disponibles dans la littérature. Pour notre part, nous avons essayé, mais sans succès, une réaction d'oxydation catalysée par des métalloporphyrines mimant l'action du cytochrome P450.<sup>56</sup>

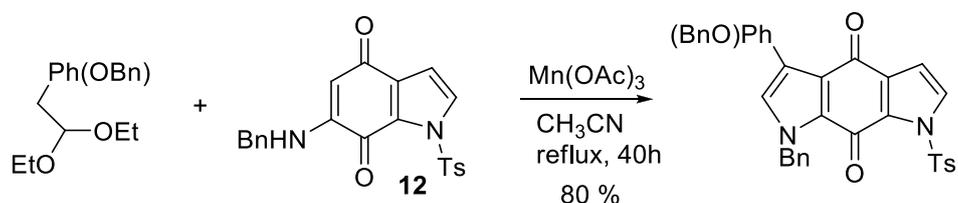
La deuxième idée a été de remplacer le groupement méthyle par un autre groupement protecteur plus facile à cliver. Pour cela, nous avons synthétisé la tosyltryptamine **51c**, qui malheureusement, ne s'est pas condensée sur l'indoledione **9**.



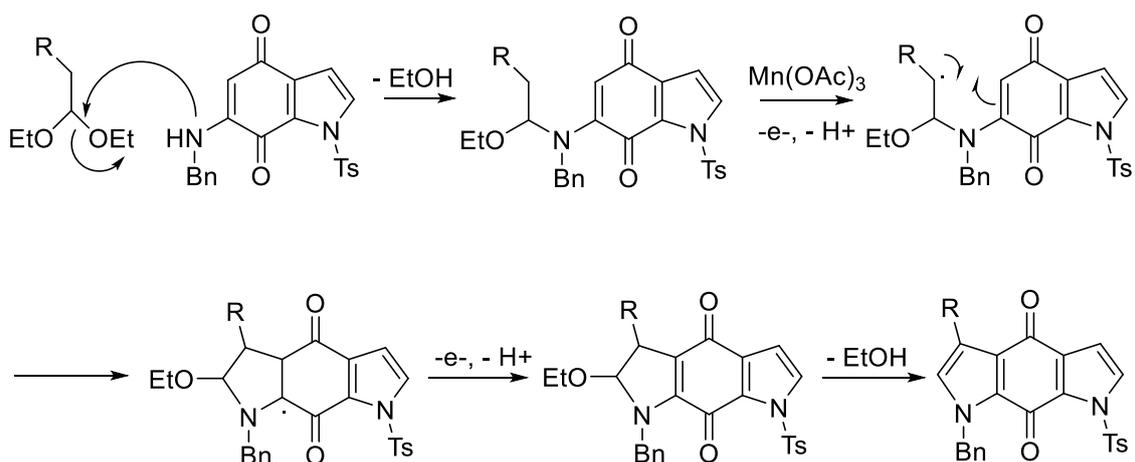
Nous avons alors essayé, d'introduire le groupement tosylo au niveau de l'adduit **54a**, mais sans succès, car dans ce cas, c'est l'azote plus réactif du groupement indole qui est protégé conduisant au dérivé **56**. Nous n'avons pas réussi ensuite à tosyler ce composé pour former le composé **57**, ce qui nous a conduit à abandonner cette stratégie. Il est à noter toutefois, qu'elle a permis de mettre à jour une nouvelle méthodologie pour construire le motif bispyrroloquinone.

### 3. Troisième stratégie

La troisième voie que nous avons investiguée pour préparer la wakayine, est basée sur la réaction utilisée par Velu *et al.* en 2013, qui consiste à construire le motif bispyrroloquinone à partir d'un acétal, d'une benzylindoledione et de triacétate de manganèse.<sup>57</sup>



Dans la suite de ce document, nous appellerons ce type de réaction « réaction de Vélou ». Cette réaction procède selon un mécanisme radicalaire décrit dans le Schéma 7:

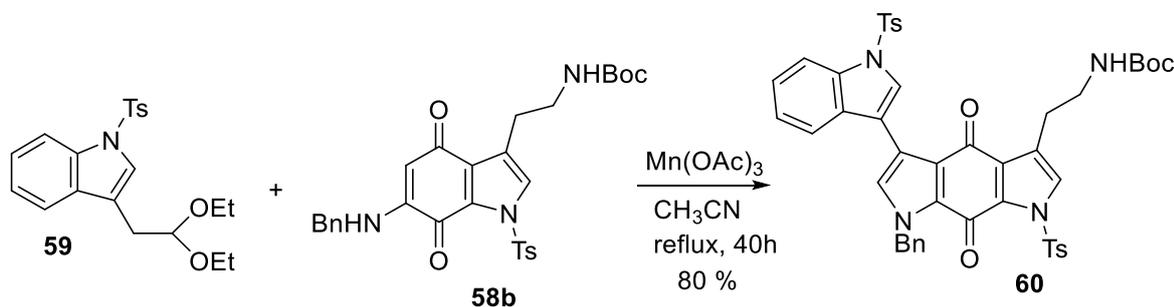


**Schéma 7:** Mécanisme de la réaction de Velu

Le mécanisme est déclenché par l'attaque du doublet non liant de l'azote sur le carbone de l'acétal, impliquant le départ d'EtOH. La formation d'un radical est initiée par le  $Mn(OAc)_3$  ce qui entraîne la cyclisation pour créer le cycle à cinq chaînons. Enfin, l'étape de terminaison consiste à aromatiser ce cycle avec le départ du second groupement EtOH.

#### Première réaction de Velu étudiée

Par rapport à notre problématique, dans la première réaction de Velu que nous avons étudiée, nous avons remplacé l'indoledione **12** par la NHBn-indoledione **58b** et l'acétal utilisé par cet auteur par le tosylindole acétal **59**.



La synthèse de l'indoledione **58b**, préalablement décrite par Velu *et al.*, met en jeu l'action de la benzylamine, dans un mélange éthanol/THF.<sup>58</sup> Nous l'avons obtenue, pour notre part, par action de la benzylamine dans l'éthanol de l'indoledione **1** avec un rendement de 16 %. Il est à noter que dans notre cas, nous obtenons aussi 19% de son régioisomère **58a**.

L'acétal **59** a été obtenu à partir de l'acide 2-(1H-indol-3-yl) acétique (Schéma 8). Dans une première étape, l'acide de départ est estérifié dans un mélange éthanol/acide sulfurique pour

donner le composé **61**. Cet ester est ensuite protégé pour conduire au dérivé tosylé **62** qui est réduit par le DIBAL-H à  $-78^{\circ}\text{C}$  pour donner l'aldéhyde **63** qui est immédiatement mis en jeu dans l'étape suivante. Dans la dernière étape, l'acétal est obtenu par action de  $\text{CH}(\text{OEt})_3$  dans l'éthanol en présence de  $\text{HBF}_4\text{-SiO}_2$  selon un protocole précédemment reporté par Kumar *et al.*<sup>59</sup> Au bilan, le composé **59** est obtenu en 4 étapes avec un rendement de 21%.

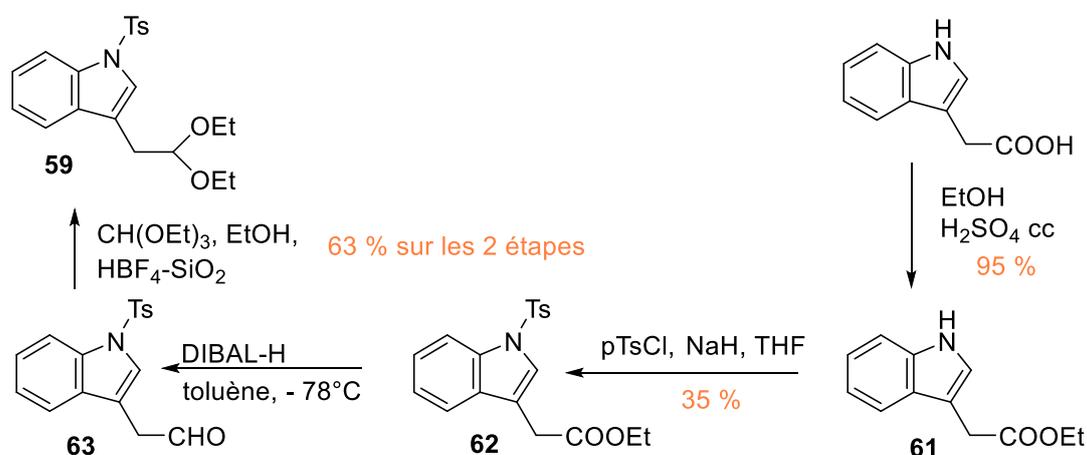
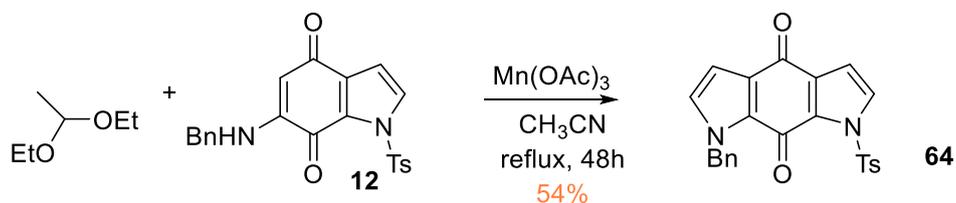


Schéma 8: Synthèse de l'acétal **59**.

La réaction de Velu entre **59** et **58a**, n'a pas conduit à la formation de la bispyrroloquinone attendue **60** ; aucune réaction n'est observée.

#### Deuxième réaction de Velu étudiée

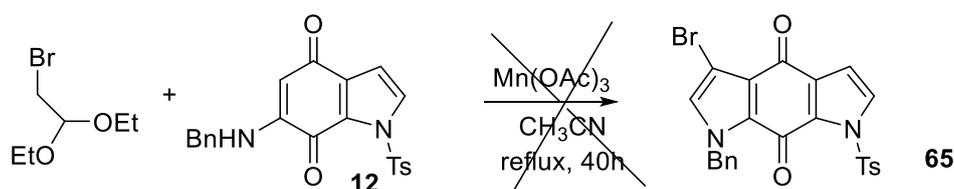


La deuxième réaction de Velu que nous avons étudiée fait intervenir le 1,1-diéthoxyéthane et l'indole-3-carboxyaldéhyde tosylé **12**. Ce dernier composé, par analogie avec la préparation de l'indole-3-carboxyaldéhyde tosylé précédente **58a**, a été obtenu par action de la benzylamine sur l'indole-3-carboxyaldéhyde **9** conduisant aussi de la même manière à son régioisomère **12'**, le rapport isomérique étant de 27/73 et le rendement de 84%. La réaction de Velu conduit à la bispyrroloquinone **64** avec un rendement

de 62 %. Il paraissait opportun, à ce stade, dans le cadre de la mise au point de la synthèse de la wakayine de regarder s'il était possible d'introduire un halogène pouvant permettre par la suite de greffer d'autres motifs. Nous avons donc, mais sans succès, en utilisant différentes conditions expérimentales, tenté de bromer ce composé **64** sur un, ou deux carbones en  $\beta$  des azotes des cycles à 5 chaînons. Dans la plupart des cas, on a obtenu des mélanges de produits difficilement exploitables.

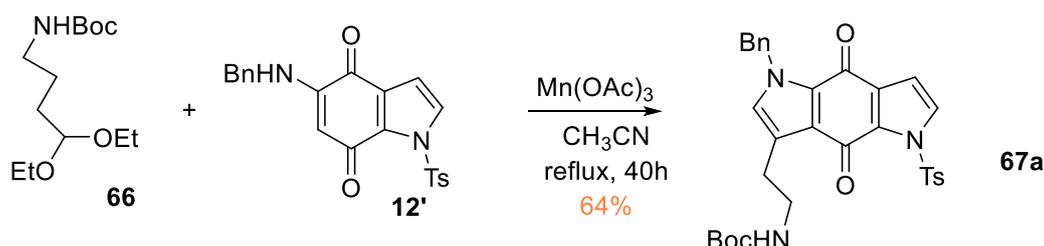
### Troisième réaction de Velu étudiée

Tout naturellement, dans la réaction de Velu suivante que nous avons testée, l'acétal intervenant dans la réaction précédente a été remplacé par le 2-bromo-1,1-diéthoxyéthane. Là non plus, la réaction n'a pas permis de synthétiser le composé **65** attendu.



### Quatrième réaction de Velu étudiée

Dans les stratégies de Velu envisagées précédemment, notre idée était que cette réaction permette de construire le deuxième cycle pyrrole portant potentiellement le substituant indole de la wakayine, la construction du motif pyrroloquinoline se faisant selon la stratégie mise au point pour la tsitsikammamine. Devant le nombre d'échecs auxquels nous avons été confrontés, nous nous sommes dit qu'il serait peut-être judicieux que la réaction de Velu permette de construire plutôt le cycle à 5 chaînons pouvant potentiellement induire la formation du motif pyrroloquinoline. Pour cela, la réaction de Velu suivante que nous avons étudiée a fait intervenir l'acétal **66**.

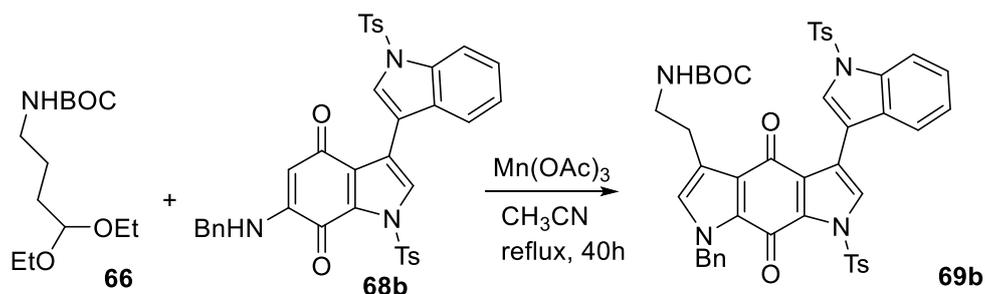


Il est préparé à partir de l'acétal-amine commercial correspondant par protection de l'amine

par le BOC avec un rendement quantitatif. La condensation de **66** sur la NHBn-indoledione **12** donne comme attendu la pyrroloquinone **67** avec un rendement de 64 %.

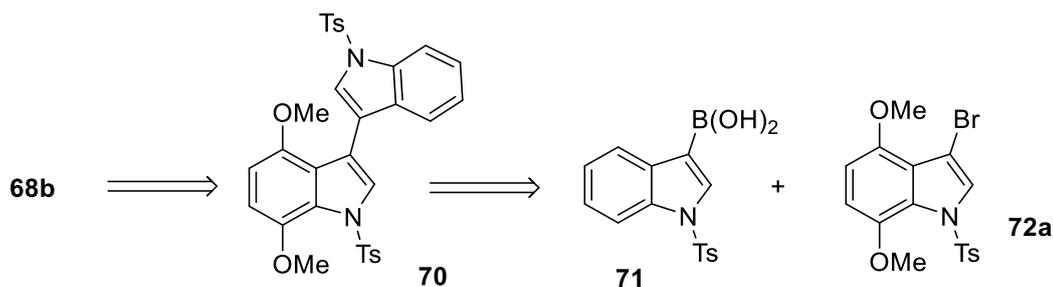
#### Cinquième réaction de Velu étudiée

Finally, in the same spirit, the reaction of Velu that remains to be studied will consist of condensing the acetal precursor **66** on the NHBn-indoleione **68b**.

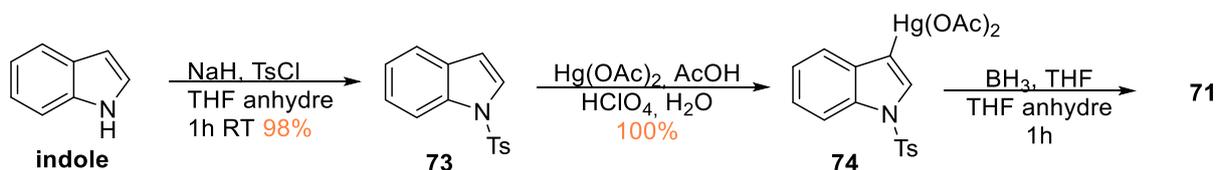


#### *Obtention du synthon 68b*

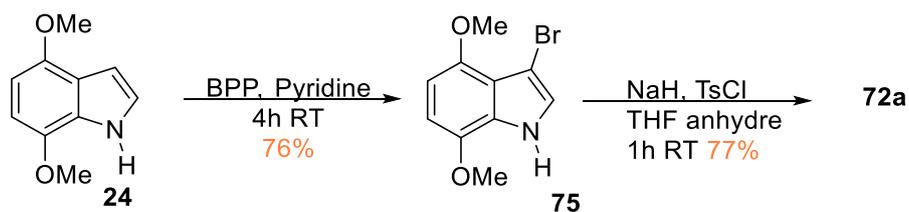
The indoleione **68b** is synthesized from the dimethoxyindole **70**, prepared based on a Suzuki reaction between the boronic acid **71** and the bromo-dimethoxyindole **72a**.



The synthesis of the boronic acid **71** was carried out in 3 steps by repeating the protocol established by Wang and Liu.<sup>60</sup> The indole is first protected as the tosylated derivative **73**, which is then treated with mercuric diacetate to give compound **74**. In the final step, the action of  $\text{BH}_3$ -tetrahydrofuran in THF, followed by hydrolysis, leads to the boronic acid **71**. The overall yield of this sequence is 82 %.



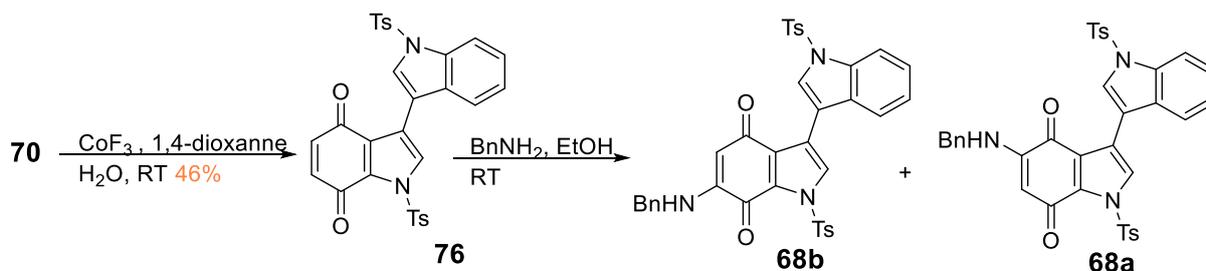
Le bromodiméthoxyindole **72a** est obtenu en 2 étapes à partir du diméthoxyindole **24** : bromation par le pyridinium perbromide<sup>61</sup> dans la pyridine pour donner le bromodiméthoxyindole **75** avec un rendement de 76 %. La protection de l'azote de l'indole sous forme de groupement tosylo par action du chlorure de tosylo en présence d'hydrure de sodium conduit au composé **72a** (rendement 77 %).



Dans le cadre de la thèse de Laurent Legentil, nous avons été amenés à mettre au point une **réaction de Suzuki** analogue à celle étudiée ici. Elle faisait intervenir le même dérivé bromé **72a**, avec comme acide boronique, l'acide 1-(phenylsulfonyl)-3-indole boronique qui est un produit commercial (125 euros/g). Compte-tenu du coût de ce composé, nous avons choisi, dans le cadre du présent travail, d'utiliser l'acide boronique **71** dont la synthèse pour 1 g de produit représente un coût dix fois moindre.

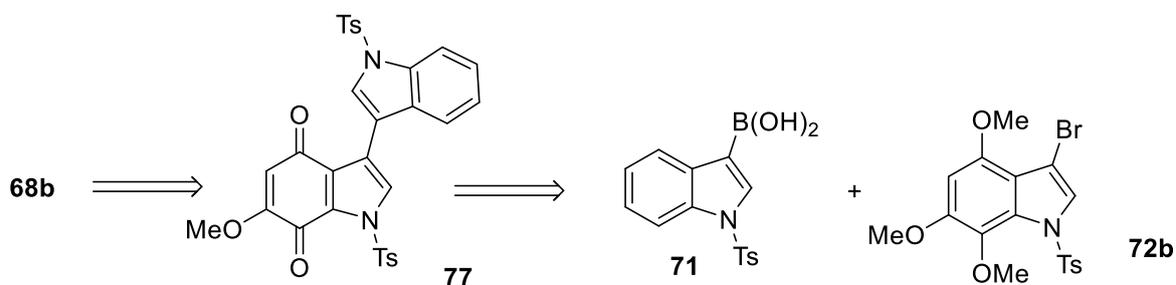
Les conditions préalablement mises au point pour la réaction de Suzuki ont néanmoins été reprises. La réaction entre les synthons **71** et **72a** est menée à reflux dans le diméthoxyéthane (DME) en présence de carbonate de césium en utilisant le palladium tétrakistriphénylphosphine comme catalyseur. Le rendement de cette réaction en composé **70** est de 75 %.

L'étape suivante pour pouvoir réaliser la réaction de Velu va consister à préparer la NHBn-indoledione **68b**. Pour cela, l'adduit de Suzuki **70** doit tout d'abord être oxydé en quinone correspondante **76**.



Après avoir testé différentes conditions d'oxydation : PIFA ou PIDA dans  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ , CAN dans  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ , nous avons repris les conditions utilisées par Laurent Legentil, mettant en jeu le trifluorure de cobalt dans un mélange 1,4-dioxane/ $\text{H}_2\text{O}$ , même si elles conduisent à la quinone **76** avec un rendement modeste de 46 %. Celle-ci est ensuite mise en réaction avec la benzylamine dans l'éthanol à température ambiante, pour aboutir à l'indoledione **68a** ainsi qu'à son régioisomère **68b**. Au bout de 48h de temps de réaction, le rapport régioisomérique estimé par  $^1\text{H}$  RMN à partir du signal du  $\text{CH}_2$  du groupement benzyle, est de 70/30, et le rendement de cette réaction de 15 %. Comme nous avons attribué ce mauvais rendement à l'hétérogénéité du milieu, la réaction a été conduite en milieu homogène dans un mélange  $\text{EtOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  permettant d'obtenir au bout de 24h, un rendement de 85 % mais sans changer le rapport régioisomérique. La séparation des deux régioisomères étant difficile, elle a d'abord été réalisée par HPLC analytique sur un aliquote de la réaction de façon à pouvoir caractériser séparément chaque isomère.

Dans le but de contourner le problème de régiosélectivité qui mène minoritairement au composé d'intérêt **68b**, ce composé étant de plus, difficile à séparer de son régioisomère **68a**, nous avons exploré une autre voie de synthèse pouvant permettre de conduire de façon univoque à **68b**.

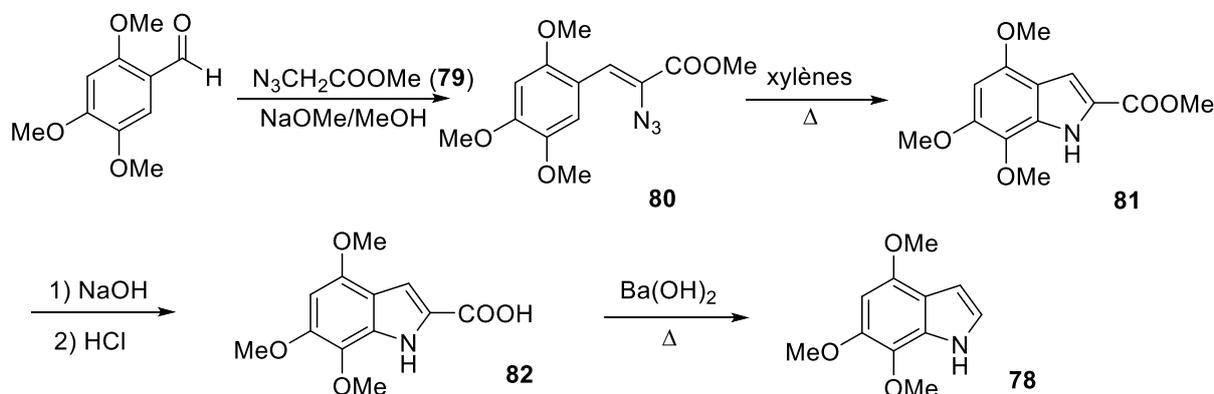


Pour cela, nous nous sommes inspirés d'une publication de Velu et al., décrivant les synthèses des Makaluvamine D et Discorhabdin C. Dans ce travail, les auteurs préparent le composé triméthoxyindole **78** qui permet ensuite d'obtenir la quinone correspondante. L'action d'une amine sur cette quinone permet la substitution nucléophile du groupement méthoxy.<sup>58</sup>

Dans notre cas, le but va être de remplacer dans la réaction de Suzuki le dérivé bromé **72a** par

le dérivé bromé **72b** pour former après oxydation le synthon intermédiaire **77**. L'action de la benzylamine sur **77** devrait donner le composé **68b**.

Nous avons pensé que **78** pourrait nous permettre de préparer **72b**. Nous avons donc repris la synthèse du composé **78** réalisée à partir du 2,4,5-triméthoxybenzaldéhyde (Schéma 9).



*Schéma 9: Synthèse du triméthoxyindole 78.*

Celui-ci est mis en réaction avec le méthyl 2-azidoacetate **79**, préparé par substitution nucléophile à partir du dérivé bromé correspondant, pour donner le composé **80**. La cyclisation de ce dernier dans le xylène à reflux conduit à l'ester **81** qui est tout d'abord saponifié en acide **82**, puis décarboxylé.

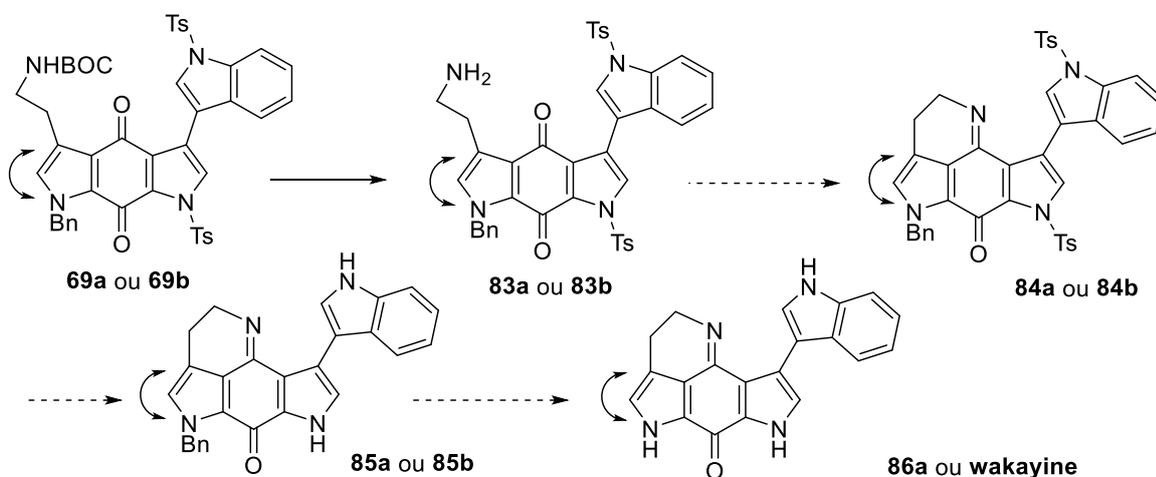
Nous avons ensuite tenté, mais sans succès, différentes conditions pour bromer le composé **78** : i) pyridinium perbromide, ii) Br<sub>2</sub> dans du DMF, ou encore iii) HIO<sub>3</sub> avec du KBr ce qui nous a conduits à revenir à la stratégie précédente.

### **Réaction de Velu**

La réaction de Velu se fait alors entre l'acétal **66** et le mélange des NHBn-indolediones **68a** et **68b**, en présence de triacétate de manganèse dans l'acétonitrile à reflux pendant 4 jours. Le mélange d'adduits **69a** et **69b** est ensuite séparé des produits de départ n'ayant pas réagi, ceux-ci étant de nouveau, mis en réaction. En opérant de cette manière, on estime à 80 % le rendement de cette réaction. A ce stade aussi, la séparation des régioisomères est difficile, et seul le régioisomère **69a**, dont l'assignation structurale a été réalisée par RMN du <sup>13</sup>C (voir méthode plus haut), a pu être obtenu pur.

### Fin de la synthèse de la wakayine (Schéma 10)

L'étape suivante va consister tout d'abord à construire le cycle à 6 chaînons du motif pyrroloquinoline



*Schéma 10 : Dernières étapes de la synthèse de la wakayine.*

Pour cela, comme pour la synthèse de la tsitsikammamine A, le groupement protecteur Boc doit être clivé préalablement à la réaction de cyclisation opérée dans l'éthanol absolu en présence de tamis moléculaire et à reflux. Pour le moment, ces deux étapes ont été conduites sur l'adduit de Velu **69a**. La réaction de clivage du Boc conduit à l'amine libre attendue **83a** avec un rendement de 89%. Pour le moment la réaction de cyclisation a été réalisée sur une très petite quantité, les spectres protons et carbones du produit formé semblent en accord avec ceux du produit attendu, mais ce résultat reste à confirmer.

Nous avons remonté suffisamment de matière pour espérer aller au bout, même si nous nous sommes heurtés à différents problèmes de reproductibilité de rendement en augmentant les échelles des synthèses. A ce stade, nous disposons de 12 g de composés **70** et de près de 1 g de mélange d'isomères **69a** et **69b** résultant de la réaction de Velu. La question est de savoir maintenant, si on opérera les étapes suivantes sur le mélange des deux isomères en purifiant juste un aliquote à chaque étape pour caractériser chaque intermédiaire, ou si à une étape donnée, les deux régioisomères seront séparables pour qu'on puisse aller au bout de la synthèse à partir de chacun.

L'étude de la synthèse totale de la wakayine a été envisagée selon trois stratégies

différentes. Même si pour le moment aucune n'a permis d'aboutir à la wakayine, celle inspirée de la réaction de Wang (deuxième stratégie) a permis de mettre à jour une nouvelle méthode pour construire le motif bispyrroloquinone tandis que les deux autres, la première basée sur l'adaptation de notre schéma de synthèse de la tsitsikammamine (première stratégie) et la deuxième basée sur une réaction de Velu (troisième stratégie) sont toujours en cours.



# **Chapitre III**

## **Analyse structurale et docking d'IDO1**



La tsitsikammamine A ( $IC_{50} = 0,9 \mu M$ ) et la wakayine ( $IC_{50} = 1,53 \mu M$ ) constituent un point de départ intéressant pour définir de nouveaux agents anticancéreux dans la mesure où elles possèdent une bonne affinité vis-à-vis d'IDO1. Une étude *in silico* des interactions entre l'enzyme et des molécules analogues des deux pyrroloquinolines sera réalisée dans le but, à partir de la comparaison des résultats *in silico* et *in vivo* de rationaliser ces résultats pour « designer » au mieux les futurs inhibiteurs potentiels. Nous mènerons une réflexion quant aux différences et à la complémentarité entre modélisation et tests biologiques.

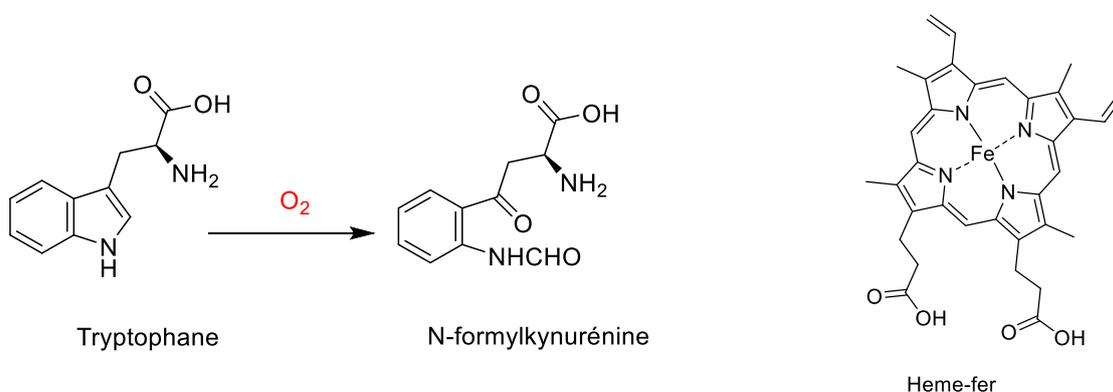
L'approche *in silico* qui utilise une méthodologie d'arrimage moléculaire (docking), s'intéresse aux interactions entre la molécule et le site actif d'une enzyme, dans notre cas. L'affinité de la molécule pour cette dernière est calculée sous différentes formes (énergies de liaison, scores de docking, descripteurs...) et est ultérieurement comparée à des données expérimentales (constantes d'association-dissociation, constante d'inhibition, pourcentages d'inhibition, ...) de manière à définir des relations structure-fonction.

Malgré le côté rationnel de cette séquence, il ne faut pas perdre de vue que certains composés pourront être choisis en fonction d'autres raisons telles que : la facilité de synthèse, les convictions du chimiste, la difficulté d'étude par des méthodes d'arrimage.

## A. L'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO1)

### 1. caractéristiques

L'IDO est une hème-enzyme intracellulaire qui catalyse la première étape, qui est aussi l'étape limitante, de la voie de catabolisme du tryptophane (Figure 16).



**Figure 16** : réaction catalysée par l'IDO

L'IDO1 n'est pas la seule enzyme à remplir le rôle de dégradation du tryptophane, elle possède en effet 2 isoenzymes. La première l'IDO2, très proche d'un point de vue structural (même

masse de 45kDa et 43% de similitude dans leur séquence<sup>62</sup>) est aussi une enzyme hème monomérique, qui se localise seulement dans le foie et les reins. L'autre iso-enzyme est la TDO (tryptophane-2,3-dioxygénase), mais à la différence des deux autres, c'est une protéine tétramérique constituée de 2 sous-unités identiques avec une masse de 167 kDa.

Comme son nom l'indique l'IDO1 appartient à la classe des dioxygénases, celles-ci étant des enzymes oxydoréductases. De la génération énergétique d'adénosine triphosphate (ATP), à la dégradation de xénobiotiques, l'utilisation du dioxygène comme oxydant biologique est largement répandue et variée. Dans le cas des monooxygénases, un seul atome de dioxygène est incorporé dans le substrat, l'autre étant réduit en une molécule d'eau. Les dioxygénases, elles, catalysent l'oxydation d'un substrat sans la réduction d'un atome d'oxygène en une molécule d'eau.

Les dioxygénases de fer mononucléaires, ou les dioxygénases non hème-dépendantes, utilisent toutes un fer catalytique unique pour incorporer un ou les deux atomes de dioxygène dans un substrat. Malgré cet événement d'oxygénation commun, les dioxygénases de fer mononucléaires sont diverses dans la façon dont l'activation du dioxygène est utilisée<sup>63</sup>. Par exemple, le clivage des liaisons C-C, l'hydroperoxydation des acides gras, le clivage des liaisons C-S et l'oxydation du thiol sont toutes des réactions catalysées par les dioxygénases de fer mononucléaire.

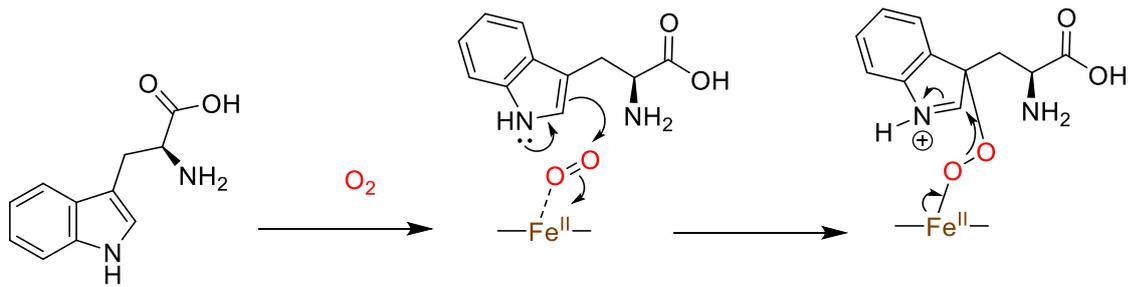
Alors que la plupart des dioxygénases dépendantes du fer utilisent un cofacteur de fer non hémique, l'oxydation du tryptophane en N-formylkynurénine est catalysée soit par la tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO) soit par l'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO1), qui sont toutes les deux des hème-dioxygénases.

La TDO est tryptophane spécifique tandis que l'IDO1 peut oxyder un large éventail de substrats contenant un motif indole tels que la mélatonine, la sérotonine ou la tryptamine.

## **2. Mécanisme enzymatique**

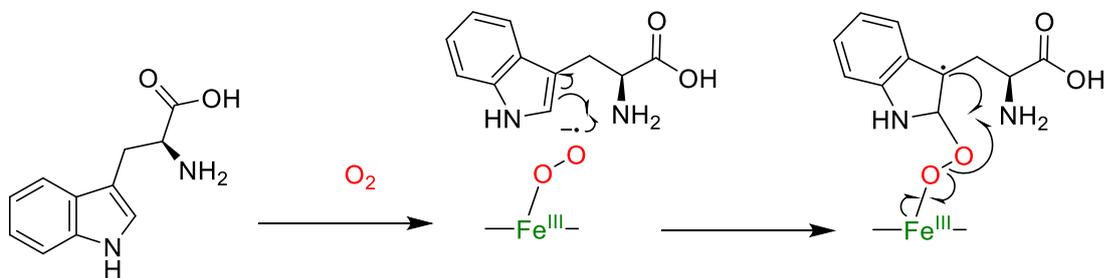
Plusieurs mécanismes sont postulés pour la réaction de clivage oxydatif du tryptophane, par le dioxygène en position 2,3, pour donner la N-formylkynurénine, mais à ce jour, aucun n'est admis avec certitude.<sup>64</sup> Différentes études réalisées sur une période de 50 ans, amènent à penser que l'oxydant actif pour induire le clivage est un adduit hème-superoxyde. Deux mécanismes différents sont postulés pour l'expliquer, soit une addition électrophile, soit une addition radicalaire.

*Addition électrophile :*



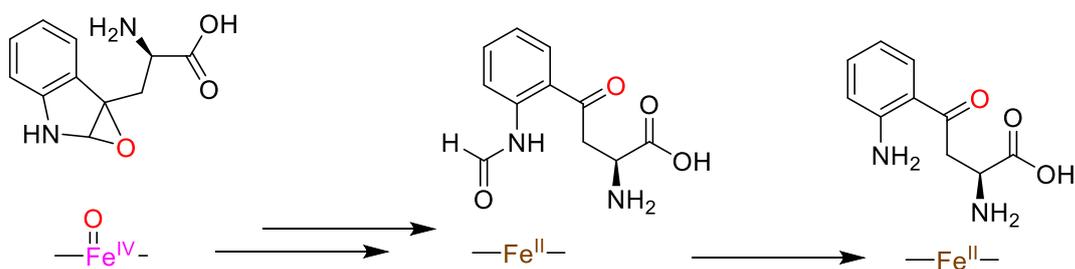
Le double non liant de l'azote va rabattre ses électrons en alpha de celui-ci. Puis les électrons de la double liaison vont attaquer un oxygène du dioxygène, qui va à son tour faire une liaison avec l'atome de fer de l'hème. Dans un second temps, le fer restitue l'excès électronique accumulé, ce qui vient rompre la liaison O-O, formant, par un transfert électronique, l'époxyde.

*Addition radicalaire :*



La double liaison du tryptophane va subir une coupure homolytique entraînant la formation d'un radical sur le carbone le plus substitué et une liaison entre le dioxygène et le  $Fe^{III}$  préalablement associés. Dans un deuxième temps, la liaison O-O va se rompre de manière homolytique pour former une fois encore l'époxyde et le  $Fe^{4+}=O$ .

Curieusement, comme on peut le noter, ces deux mécanismes de clivage génèrerait un même intermédiaire clé  $Fe^{IV}=O$ . Pour finir on aurait le retour du Fer au degré d'oxydation 2 et la formation du kynurénine grâce à l'ouverture du cycle époxyde.



### 3. Mécanisme d'inhibition

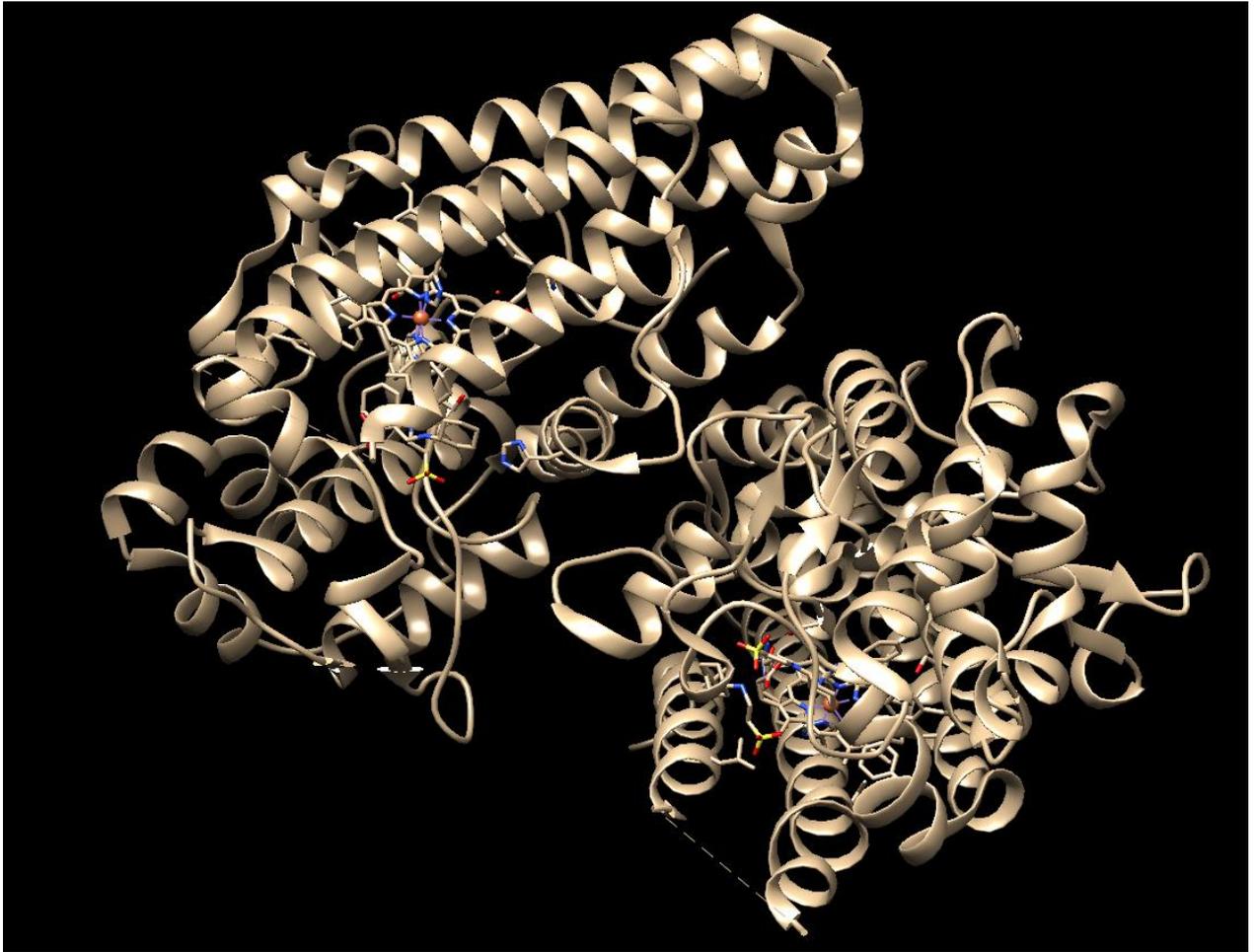
Différents types d'inhibition ont pu être observés pour l'IDO1 selon les différents inhibiteurs : compétitif, non compétitif, irréversible, etc... ceux en essais cliniques sont décrits dans le **Tableau 1** (p. 44).<sup>30</sup>

## B. Étude structurale de l'IDO1

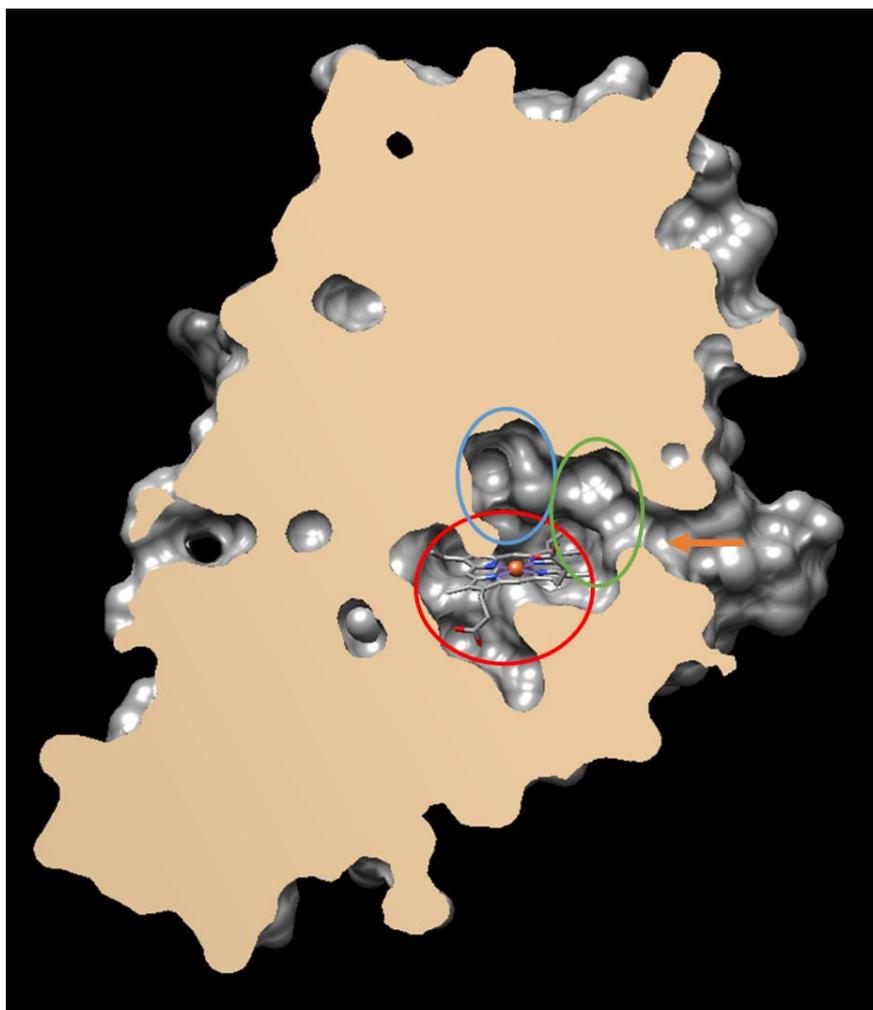
### 1. Collection de structures et architecture d'IDO1

Cette étude *in silico* a été réalisée grâce à la disponibilité de structures de l'IDO1, complexées-avec différents ligands (ligandées) et étudiées par cristallographie RX. Ces structures sont disponibles dans la Protein Data Bank <sup>65</sup> (PDB). La collection de structures est établie à partir du domaine UniProt P14902 <sup>66</sup> (I23O1\_HUMAN) qui correspond à IDO1.

Dans la première structure RX, reportée en 2006 (Figure 17)<sup>67</sup>, l'enzyme a été cristallisée avec le 4-phenylimidazole (PIM) avec une résolution de 2,3 Å. Dans cette structure, on observe la présence d'un agent de cristallisation : le NHE (2-[N-cyclohexylamino]ethanesulfonic acid). La structure globale de l'IDO montre deux domaines hélicoïdaux avec l'hème entre eux. Une analyse avec des mutations sur l'IDO montre qu'aucun des résidus d'acides aminés polaires dans la poche distale de l'hème n'est essentiel à l'activité, ce qui suggère que contrairement aux monooxygénases contenant de l'hème (par exemple, la peroxydase et le cytochrome P450), aucun groupe protéique de l'IDO1 n'intervient dans l'activation du dioxygène. À ce jour 43 structures RX sont à dénombrer.



**Figure 17** : Première structure RX d'IDO1 avec une molécule de PIM, on observe 2 fois l'enzyme (maille cristalline) avec la présence de NHE (2 molécules). Cette structure se trouve sous la référence : 2D0T.



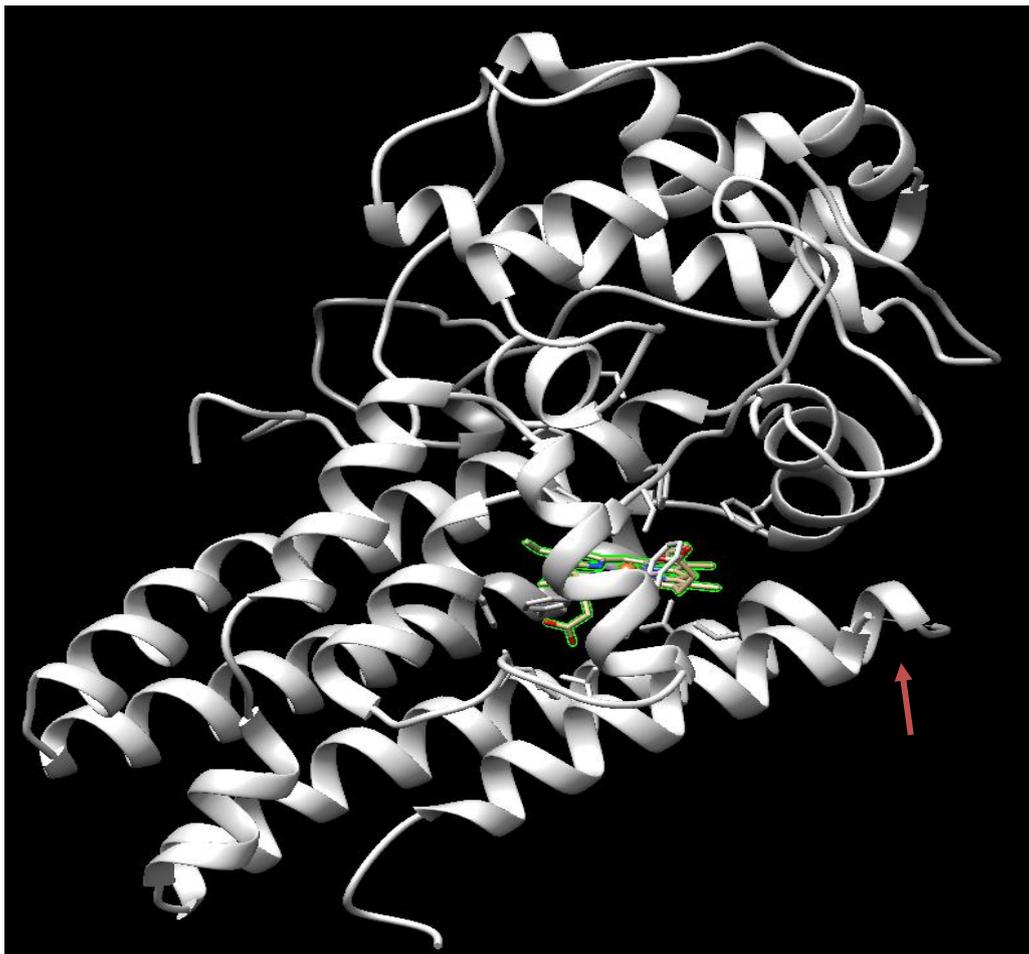
**Figure 18 :** Coupe de l'enzyme IDO1, on observe dans le cercle rouge l'hème fer. Dans le cercle bleu on observe une poche du site actif : A, et en vert une seconde poche : B. La flèche orange indique l'entrée du site actif.

L'IDO1 possède un site actif relativement profond composé de deux poches hydrophobes qui seront respectivement appelées poche A et B. La poche B est proche de l'entrée du site actif, la poche A se trouve un peu plus en profondeur, elle contient l'hème fer (Figure 18)<sup>68</sup>. Le but pour obtenir une inhibition va donc être de faire des molécules qui remplissent au mieux ces poches tout en ayant des interactions avec l'hème fer et des interactions potentielles avec des acides aminés proches du site actif.

C'est grâce à ce type d'instantanés que l'on peut faire des expériences d'arrimage moléculaire pour essayer de trouver de potentiels inhibiteurs. Il faut cependant garder à l'esprit que la modélisation n'est qu'un outil, doté d'une certaine résolution, dépendant de paramètres de calcul et de la fiabilité de structures RX. Dans notre cas, cette approche permet d'expliquer des

résultats, poser des questions et nous aider dans la conception de nouvelle molécule. En rappelant que toute expérience *in silico* devrait être croisée avec des résultats expérimentaux, de manière à dégager des relations structure-fonction pour aller vers des approches plus prédictives.

Chaque structure RX est différente au vu de la dynamique de l'enzyme en milieu biologique. Il existe donc des variations structurales qu'il faut prendre en compte pour essayer de rationaliser ces différences. Dans le cas d'IDO1 elle possède en plus une chaîne latérale mobile (Figure 19).



**Figure 19** : L'IDO1 avec l'hème fer.

L'enzyme est en gris avec son cofacteur, l'hème fer en surbrillance (vert). On observe au bout de la flèche orange une partie de la molécule qui n'apparaît pas (non résolue) dans la structure. C'est une chaîne latérale mobile d'une longueur de 19 acides aminés, elle peut éventuellement venir fermer le site actif qui peut donc avoir plusieurs conformations.

## C. Analyse structurale

### 1. Principes

Il s'agit d'une démarche qui se déroule en plusieurs étapes :

- La recherche des structures cristallisées des protéines publiées dans la littérature et dans la base de données PDB (Protein Data Bank) d'accès libre sur internet.
- La préparation et l'alignement des structures pour l'étape d'analyse. Il s'agit de séparer les unités asymétriques (chaines cristallisées) et de les comparer entre elles, de manière à disposer d'une ou de plusieurs structures (monomères) représentative de l'entrée (structure globale) PDB. Sont retenues celles qui présentent des différences (structurales, cofacteurs, ligands ...) au niveau du site actif. Puis ces monomères sont alignés contre une structure de référence, de manière à disposer d'une collection de structures dans le même référentiel tridimensionnel. Une des résultantes de cet alignement est que les autres molécules (ligands, cofacteurs, eau ...) sont également alignées. Ce qui permet de comparer leur placement (position, orientation, topologie) ou leurs réseaux d'interactions et d'en tirer différentes informations telles que des positions privilégiées et conservées sur l'ensemble de la collection de structures.
- Le regroupement de structures de l'enzyme. Ici nous sommes dans le cas d'une enzyme flexible où le site semble acquérir une adaptation induite au ligand. Dès lors, le site de liaison aura différentes topologies et réseaux d'interactions. Il faut donc regrouper les différentes structures (sous forme de cluster) par rapport à ces éléments structuraux et éventuellement les corrélés à des ligands et à leurs propriétés. La méthodologie correspondante est décrite dans la suite.
- En ce qui concerne l'arrimage moléculaire, le choix d'une ou de plusieurs structures (dites canoniques) représentatives de chaque cluster.

### 2. Préparation et alignement des structures

En 2020, la PDB inclue 48 structures ligandées (hème ou inhibiteur), une fois toutes les structures collectées, elles sont superposées pour obtenir une représentation du site actif qui nous donne le plus d'informations possible en termes d'invariants et de fluctuations, à la fois pour le placement et les interactions coté ligands et la dynamique structurale (déformations et flexibilité) de la protéine. Ce travail utilise essentiellement le logiciel UCSF/Chimera <sup>69</sup>. Les structures sont éclatées selon le nombre d'unités asymétriques ce qui génère un nombre de chaines (unités asymétriques ou monomères) par structure, soit à la main avec un éditeur de

texte soit en utilisant Discovery Studio Visualizer 2016 (DSV) <sup>70</sup>. Il faut également repérer les molécules qui sont dans le site de liaison, à éliminer les chaînes qui ne présentent pas une structure résolue dans le site, de manière à obtenir un index des monomères, permettant leur annotation par la suite. Ce travail a produit 52 structures de chaînes protéiques. Parfois deux chaînes sont présentes pour une même structure, si elles présentent suffisamment de différences.

Une fois ce travail réalisé une banque de données simplifiée et éclatée, sera prête à être utilisée. Une étape d'alignement structural, dans le même espace de coordonnées, de tous les monomères obtenus est primordiale pour la comparaison des invariants structuraux, en particulier au voisinage du site actif. Cet alignement est réalisé avec le module Matchmaker <sup>71</sup> de Chimera qui combine une méthode d'alignement de séquences et d'alignement structural. Chaque chaîne est alignée contre la chaîne A de la structure 2D0T (formellement 2D0Ta) puis comparée vis-à-vis de 2D0Ta et des monomères.

### **3. Regroupement des structures**

Les structures sont alignées, mais il est souvent difficile de comparer, à l'œil et en 3D, des nuages de points (les atomes de la structure) ou des surfaces moléculaires. Il est nécessaire de définir un point de vue pertinent (une projection selon un plan de coupe) et des descripteurs de manière à simplifier l'analyse et faciliter un point de vue global.

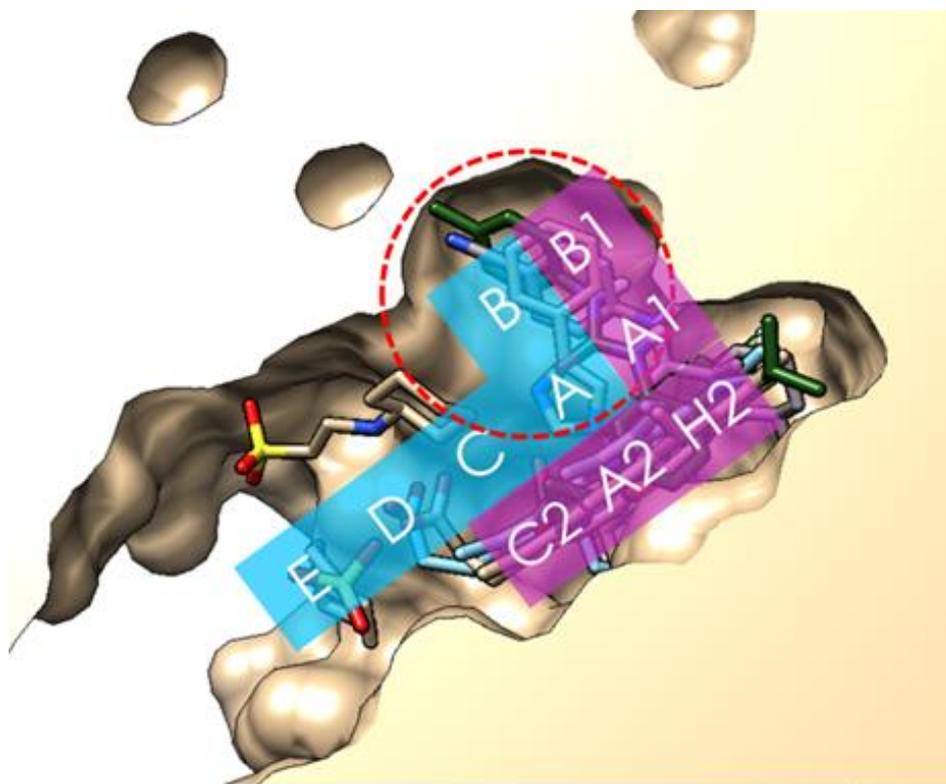
Dans le cas d'IDO1, nous avons utilisé une superposition des sites selon un plan de coupe, qui nous donne une idée de la topologie dans l'axe sagittal (dans la grande longueur des ligands). Si les structures sont très similaires (ce qui est le cas de cette enzyme), les sites de liaisons apparaîtront alignés et alors les ligands le seront aussi, ce qui permettra de procéder aux différentes comparaisons structurales, au niveau du site de liaison (conformation, résidus, molécules d'eau ...) et au niveau des ligands (interactions, pharmacophores ...) co-cristallisés. Nous avons également généré des descripteurs, ils concernent les structures (occupation de poches par exemple) et les ligands (forme, topologie, interactions ...). Idéalement les descripteurs sont définis d'une manière indépendante, et servent à la classification des structures. Si le choix des descripteurs induit un regroupement des structures (mieux, s'il éclaire sur de possibles relations structure-fonction) on considère que l'analyse structurale a probablement un bon niveau de pertinence et de description du système.

Une fois ce travail fait, dans le cas d'IDO1, les structures ont pu être regroupées en plusieurs clusters (A à E). Nous discuterons ici que des groupes qui sont ligandés et dont la structure du site actif est de type ouvert. Une fois que les groupes sont établis, on a pu retenir une structure

de monomère par groupe.

#### 4. Élément de comparaison des structures

Le long de ce même axe sagittal on définit des quadrants pour l'occupation par le ligand (Figure 20).

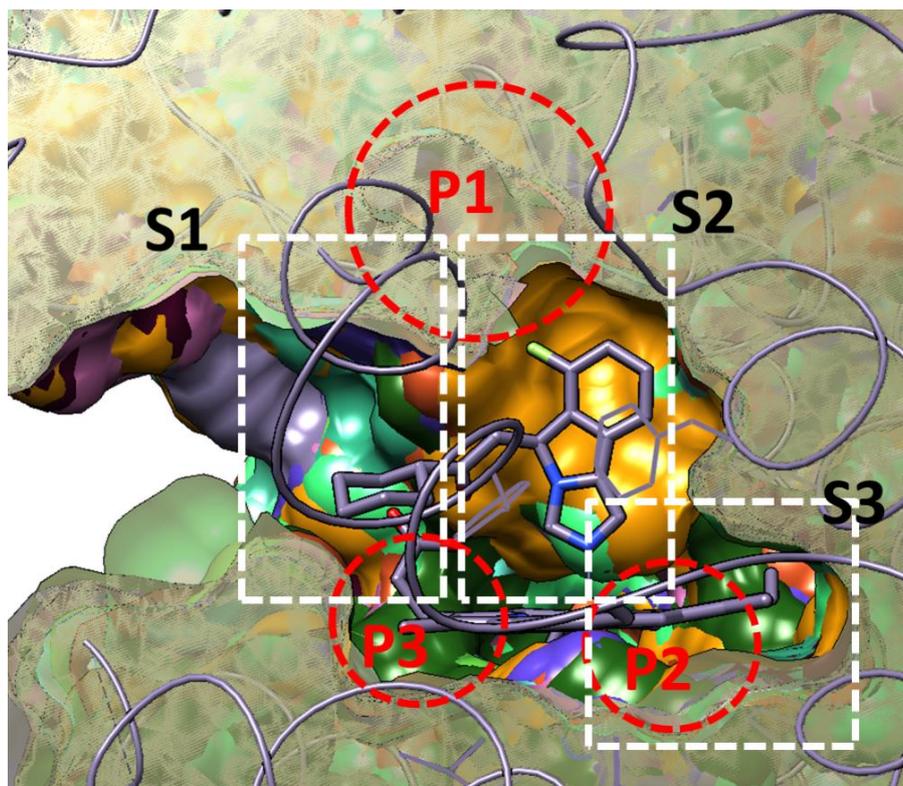


*Figure 20 : Définitions des quadrants le long de l'axe sagittal*

Cette méthode, peut apparaître simpliste au premier abord, mais si les quadrants sont choisis d'une manière pertinente (en connaissant le système et non par le hasard d'un système de coordonnées), elle produit généralement des résultats très intéressants en termes de représentation cognitive des ligands.

Par exemple on peut immédiatement faire la différence entre un ligand B(A) comme le PIM (essentiellement centré dans le cercle rouge) et un ligand plus grand ou positionné vers l'entrée du site, qui inclura les quadrants CDE comme le 5PJ de 5EK2a. De même un ligand occupant la place de l'hème inclura les quadrants A2, H2.

On utilise également le signe + pour exprimer l'extension d'un ligand dans une direction, par exemple +B si le ligand développe une partie dans la direction AB ou H2+ s'il dirige un substituant important vers une poche au fond du site (sous le quadrant H2).



*Figure 21 : définition des zones d'occupation par les ligands*

On annote la liste des structures par la présence de l'hème ; par l'occupation d'une zone par un ligand (S1 à l'entrée du site, S2 au centre du site, S3 au fond du site) et par la présence d'une liaison de coordination vers l'hème, par la présence d'un cycle vis-à-vis de l'hème (Figure 21).

## **5. Regroupement des structures enzymatiques**

Les descripteurs sont comparés entre eux et vis-à-vis des structures, de manière à définir 5 clusters principaux [A à E] qui présentent des analogies croisées et regroupent des structures dont le site de liaison et le ligand présentent des analogies croisées. Ces clusters sont définis par des comparaisons visuelles et des données topologiques (ouverture du site actif, présence d'hème ou non, volume du site actif, occupation spatiale du ligand...). On distingue également des sous-clusters (par exemple [A, A1, A2]) qui présentent quelques variations dans le groupe, ou qui sont suffisamment distinguables notamment pour l'ouverture du site actif (OPEN contre OPEN+, respectivement pour [A] et [A1]). Puis chaque cluster/sous-cluster d'intérêt est défini par une structure représentative, par exemple 5EK2a pour le cluster [A1] et 2DT0a pour [A]. Le tableau 2 regroupe ces informations. Prenons le cas du cluster [A], traduit en langage courant, ce groupe est de type OPEN (le site de liaison est bien ouvert mais moins que [A1])

qui est OPEN+), il comporte 10 chaînes, les parties S1-S2 du site sont occupées (entrée et centre du site en vis-à-vis de l'hème), l'hème est toujours présent, les ligands occupants sont de type B(A)CDE (à l'exception de PIM isolé qui est B(A)). Autrement dit, des ligands qui ont une enveloppe commune avec le PIM (ex : 2D0Ta) mais qui s'étendent vers l'entrée du site. L'intérêt de ces descripteurs est qu'ils permettent d'avoir une vision globale et précise, à l'aide de quelques informations.

Ces descripteurs peuvent être étendus en utilisant des descripteurs chimiques calculés (masses moléculaires, nombre de torsions, indices topologiques tels que Wiener, logP...) de manière à aller vers un système SAR. Dans le cas d'IDO1, ces quelques indices nous permettent de définir les clusters et de choisir, d'une manière rationnelle (avec une vue globale sur les complexes protéine-ligands connus), la ou les structures qui seront utilisées pour le docking.

## 6. Classification des structures

Les différentes structures sont reportées dans le tableau 2. L'ordre de classement est identique à celui de la PDB (important pour retrouver les structures. Les références bibliographiques correspondantes sont indiquées dans le tableau en annexe.

Struct	Année	NoR	Res	Eu-ligands	Surface	HétC	Dative	Topologie	Hème	Cluster	Sites
2D0Ua	2006	r1	3.40	CYN, 2NHE	OPEN		N:Fe	(A)	HEM	[A]	S2
2D0Ta	2006	r1	2.30	PIM, 2*NHE	OPEN	Hc5	N:Fe	B(A)	HEM	[A]	S1, S2
4PK5a	2014	r2	2.79	PKJ	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
4PK5b	2014	r2		PKJ	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
4PK6a	2014	r2	3.45	PKL	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)CD	HEM	[A1]	S1-S2
4PK6b	2014	r2		PKL	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)CD	HEM	[A1]	S1-S2
4U72a	2015*	-	2.00	PIM, 2*NHE	OPEN+	Hc5	N:Fe	B(A)	HEM	[A]	S1, S2
4U74a	2015*	-	2.31	PIM, 2*NHE	OPEN	Hc5	N:Fe	B(A)	HEM	[A]	S1, S2
6AZWa	2018	r3	2.78	C51	OPEN*			+B1(A1)H2+	HEM	[D]	S2-S3
6AZVa	2018	r3	2.75	C4V	OPEN*			+B(A1)A2H2+	HEM	[D]	S2-S3
6AZUa	2018	r3	2.82	-	FLAT				HEM	[E]	
5EK4a	2016	r4	2.64	5PF	OPEN+	Hc5	N:Fe	B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
5EK3a	2016	r4	2.21	5PK	OPEN+	Hc5	N:Fe	B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
5EK2a	2016	r4	2.68	5PJ	OPEN+	Hc5	N:Fe	B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
5ETWa	2016	r4	2.70	XNL	OPEN+	Hc6	(N):Fe	B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
6CXVa	2018	r6	2.60	CYN, TRP, ZCW	CLOS++			B(A)CD	HEM	[B]	S2,(S3)
6CXUa	2018	r6	2.49	CYN, TRP	CLOS++			B(A)CD	HEM	[B]	S2
6DPRa	2018	r7	3.20	H7P	? (psd)			CDE+	HEM	?	S1,(S3)
6DPRb	2018	r7		H7P	OPEN*			B(A1)H2+	-	[D]	S2-S3
6DPQa	2018	r7	2.94	2*GOL	CLOS+			{C}	HEM	[C]	(S1)
6DPQb	2018	r7		H7P, 2*GOL	OPEN*			B(A1)H2A2	-	[D]	(S1),S2,(S3)
6E35a	2018*	-	2.41	CYN, TRP	CLOS++			B(A)CD	HEM	[B]	S2,(S3)

6E35b	2018*	-		CYN, TRP	CLOS++			B(A)CD	HEM	[B]	S2
6E46d	2018	r8	2.09	TRP	CLOS++			B(A)CD	HEM	[B]	S2-S3
6E45a	2018	r8	2.00	2*GOL	FLAT			{E+}	HEM	[E]	(S1),(S3)
6E45b	2018	r8		-	FLAT			-	HEM	[E]	-
6E40a	2018	r8	2.31	BBJ	OPEN		NO:Fe	B(A)CDE	HEM	[A]	S1-S2
6E42c	2018	r8	2.10	HQJ	OPEN	Hc5	N:Fe	B(A)	HEM	[A]	S2,(S3)
6E41a	2018	r8	2.29	HQS	OPEN		NO:Fe	B(A)CDE	HEM	[A]	S1-S2
6E41b	2018	r8		HQS	OPEN		NO:Fe	B(A)CDE	HEM	[A]	S1-S2
6E44a	2018	r8	1.90	-	FLAT			-	HEM	[E]	-
6E43a	2018	r8	1.71	HQM, BEZ	OPEN#			B(A1)H2A2C2	-	[D1]	S2,(S3)
6F0Aa	2018	r9	2.26	C82	CLOS++	Hc5	N:Fe	+B(A)	HEM	[B]	S2
6PU7b	2019	r10	2.43	OY4	OPEN+			B(A)CD+	HEM	[A1]	S1-S2
6PZ1b	2019	r11	2.65	2*AOJ	CLOS++			B(A)C	HEM	[B]	S2,(S3)
6R63b	2019	r12	2.89	2JTB	CLOS++	Hc5	N:Fe	B(A)	HEM	[B]	S2,(S3)
6TUEc	2020*	-	2.61	K	FLAT+			{E}	HEM	[E1]	-
6MQ6a	2018	r7	3.05	GOL	FLAT			{C}	HEM	[E]	(S1)
6MQ6b	2018	r7		H7P, 2*GOL	OPEN*			B(A1)H2+	-	[D]	(S1),(S2),S2-S3
6KW7a	2020	r13	3.02	DYC	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)	HEM	[A1]	S1
6KOFa	2020	r13	2.26	DO9	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
6KPSa	2020	r13	2.25	DU6	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
6V52a	2020	r14	1.78	QPV	OPEN			B(A1)H2+	-	[A2]	S2-S3
5WHRa	2017	r15	2.28	AOJ	CLOS++			B(A)CD	HEM	[B]	S2
6O3la	2019	r16	2.69	LKP	OPEN+	Hc5	N:Fe	B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
5XE1a	2017	r5	3.20	IUU	OPEN		NO:Fe	B(A)C	HEM	[A]	S2
5WMVa	2017	r17	2.60	CYN, TRP	CLOS++			B(A)CD	HEM	[B]	S2
5WMUa	2017	r17	2.40	CYN, TRP	CLOS++			B(A)CD	HEM	[B]	S2
5WMXa	2017	r17	2.69	CYN, TRP	CLOS++			B(A)CD	HEM	[B]	S2
5WMWa	2017	r17	3.03	CYN, TRP	CLOS++			B(A)CD	HEM	[B]	S2
5WN8a	2017	r17	2.50	BBJ	OPEN		NO:Fe	B(A)CDE	HEM	[A]	S1-S2
6WJY	2020	r18	1.91	U41	OPEN			B(A1)H2+	-	[A2]	S2-S3

**Tableau 2** : Classification des structures : en **cyan**, la structure utilisée comme référence dans les alignements 3D (Matchmaker/ UCSF Chimera), en **jaune** la structure utilisée pour le docking, (ces choix seront justifiés par la suite). Nb : les données ont été mises à jour le 26/08/2020.

## 7. Choix des structures de référence

Dans un premier temps l'analyse de chaque cluster se fait par superposition de tous les ligands appartenant à ce cluster, puis on note les différentes interactions avec le site actif de l'enzyme.

### Cas du cluster [A]

Le tableau 3 regroupe les structures appartenant au cluster [A]. On a pour toutes:

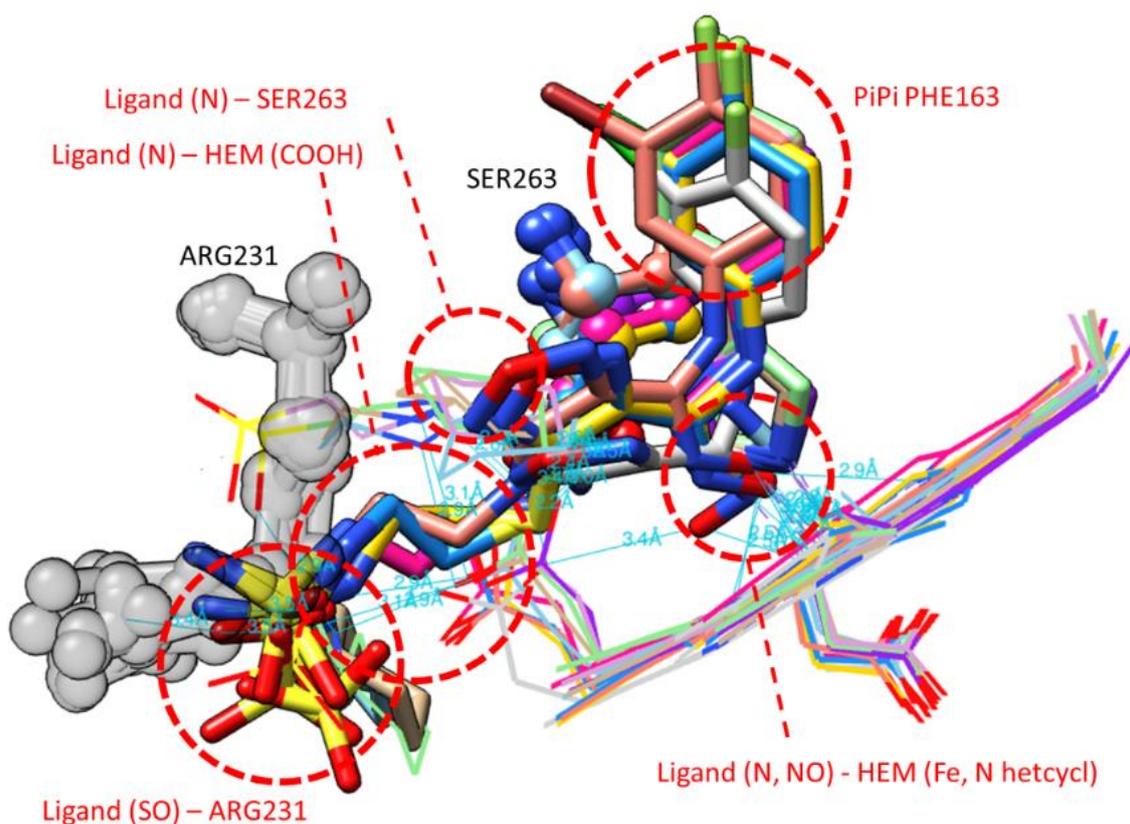
- Une surface de type OPEN et la présence de l'hème
- Une interaction de l'hème (Fe ou/et azote des cycles) avec le ligand
- Une interaction avec SER263 (liaison hydrogène)
- Une interaction  $\pi\pi$  avec PHE163 vers un cycle aromatique du ligand

- Une occupation de la cavité avant (S1 : entrée du site) et centrale (S2 : au-dessus de l'hème) avec une topologie B(A) qui peut s'étendre jusqu'à E (CDE).

Struct	Année	NoR	Res	Eu-ligands	Surface	HétC	Dative	Topologie	Hème	Cluster	Sites
2D0Ua	2006	r1	3.40	CYN, 2NHE	OPEN		N:Fe	(A)	HEM	[A]	S2
2D0Ta	2006	r1	2.30	PIM, 2*NHE	OPEN	Hc5	N:Fe	B(A)	HEM	[A]	S1, S2
4U72a	2015*	-	2.00	PIM, 2*NHE	OPEN+	Hc5	N:Fe	B(A)	HEM	[A]	S1, S2
4U74a	2015*	-	2.31	PIM, 2*NHE	OPEN	Hc5	N:Fe	B(A)	HEM	[A]	S1, S2
6E40a	2018	r8	2.31	BBJ	OPEN		NO:Fe	B(A)CDE	HEM	[A]	S1-S2
6E42c	2018	r8	2.10	HQJ	OPEN	Hc5	N:Fe	B(A)	HEM	[A]	S2,(S3)
6E41a	2018	r8	2.29	HQS	OPEN		NO:Fe	B(A)CDE	HEM	[A]	S1-S2
6E41b	2018	r8		HQS	OPEN		NO:Fe	B(A)CDE	HEM	[A]	S1-S2
5XE1a	2017	r5	3.20	IUU	OPEN		NO:Fe	B(A)C	HEM	[A]	S2
5WN8a	2017	r17	2.50	BBJ	OPEN		NO:Fe	B(A)CDE	HEM	[A]	S1-S2

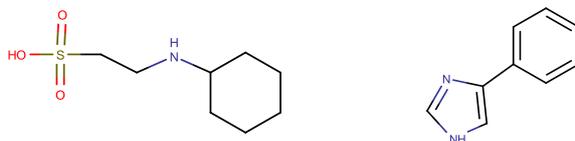
*Tableau 3 : analyse du cluster [A]*

Lors de la superposition des ligands, on observe 4 interactions majeures :  $\pi\pi$  stacking (PHE163) vers C6 aromatique ; ARG231 vers SO<sub>3</sub> ; Hème (COOH) vers NH (chaîne du ligand) ; SER263 vers NH substitué (cas de IUU) ; Hème (Fe + N aromatiques) vers N-OH ou N (aromatique, cyanide) du ligand (Figure 22).



*Figure 22 : superpositions des ligands du cluster [A]*

La référence choisie est donc PIM avec 2 molécules de NHE car elle possède toutes les interactions nécessaires, avec une résolution suffisante (il s'agit d'un choix arbitraire, qui n'est pas seulement basé que sur des données structurales, qui tient aussi compte de la suite du processus, notamment les calculs d'arrimage moléculaire).



*Molécules PIM et NHE*

### Cas du cluster [A1]

Les clusters [A1] et [A2] sont homogènes (de structure très proche), proches de [A], de type ouvert (OPEN) et même un peu plus ouvert (classe OPEN+) dans le cas de [A1]. Par rapport au cluster [A], la colonne topologie montre qu'il s'agit de ligands plus grands, ils incluent B(A) comme le cluster [A], mais presque systématiquement CDE, vers l'entrée du site. Dans le cas de [A] seuls les ligands HQS et BBJ étaient de type B(A)CDE, les autres occupations de l'entrée se faisaient par des molécules additionnelles.

Struct	Année	NoR	Res	Eu-ligands	Surface	HétC	Dative	Topologie	Hème	Cluster	Sites
4PK5a	2014	r2	2.79	PKJ	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
4PK5b	2014	r2		PKJ	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
4PK6a	2014	r2	3.45	PKL	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)CD	HEM	[A1]	S1-S2
4PK6b	2014	r2		PKL	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)CD	HEM	[A1]	S1-S2
5EK4a	2016	r4	2.64	5PF	OPEN+	Hc5	N:Fe	B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
5EK3a	2016	r4	2.21	5PK	OPEN+	Hc5	N:Fe	B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
5EK2a	2016	r4	2.68	5PJ	OPEN+	Hc5	N:Fe	B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
5ETWa	2016	r4	2.70	XNL	OPEN+	Hc6	(N):Fe	B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
6PU7b	2019	r10	2.43	OY4	OPEN+			B(A)CD+	HEM	[A1]	S2-S3
6KW7a	2020	r13	3.02	DYC	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)	HEM	[A1]	S1
6KOFa	2020	r13	2.26	DO9	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
6KPSa	2020	r13	2.25	DU6	OPEN+	Hc5	N:Fe	+B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
6O31a	2019	r16	2.69	LKP	OPEN+	Hc5	N:Fe	B(A)CDE	HEM	[A1]	S1-S2
6V52a	2020	r14	1.78	QPV	OPEN			B(A1)H2+	-	[A2]	S2-S3
6WJY	2020	r18	1.91	U41	OPEN			B(A1)H2+	-	[A2]	S2-S3

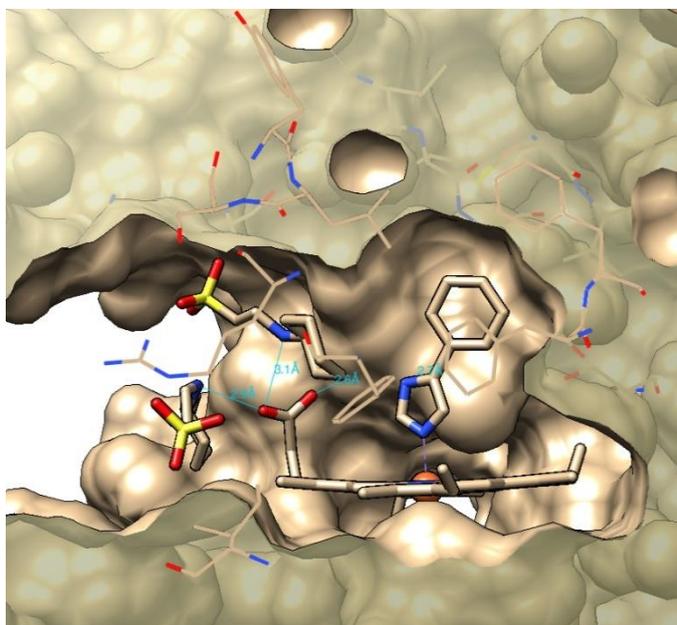
*Tableau 4 : Formation du cluster [A]*

Les surfaces [A], [A1] et [A2] sont très proches. Les surfaces [A1] sont un peu plus ouvertes (OPEN+) que les surfaces [A], notamment à cause de ligands plus longs dans les quadrants B-B1, ce qui ouvre la poche P1. Les surfaces [A2] ont la poche P3 fermée, car l'hème n'est pas présent et la protéine est repliée.

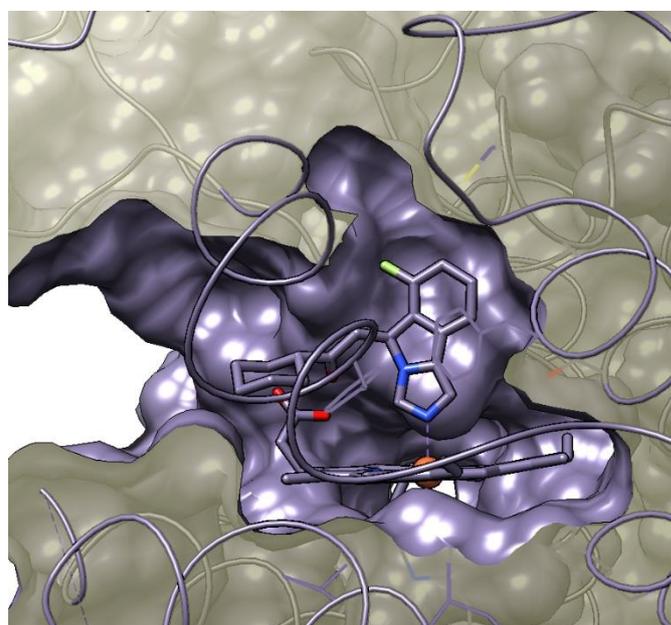
Le cluster [A1] (Figure 22) est associé à un sous-cluster [A2] proche des clusters [D] et qui inclut de grands ligands (QPV, U41) occupant les zones S2 et S3 (poche P2) donc le fond du

site (pas l'entrée). Les ligands QPV:6V52a et U41:6WJYa ont tendance à avoir la même enveloppe 3D.

À la vue de la classification et des options choisies pour la conception des ligands (occupation de l'entrée du site : zones S1-S2, présence du ligand), le cluster [A1] (Figure 24) est le plus intéressant pour le docking en termes de potentialités (un peu plus ouvert que le cluster [A] (Figure 23) et sans anomalies particulières).

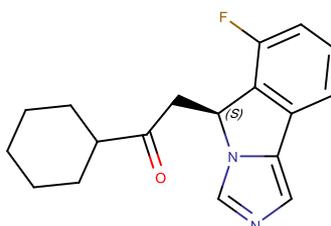


**Figure 23 : Cluster [A]**  
*OPEN / 2D0Ta (utilisée pour l'alignement structural). P1 fermée, P3 ouverte, présence de l'hème. Zones préférentielles S1-S2. Ligands de type : B(A){CDE}.*



**Figure 24 : Cluster [A1]**  
*OPEN++ / 5EK2a (utilisée pour le docking). P1 et P3 ouvertes, présence de l'hème. Zones préférentielles S1-S2. Ligands de type : {+}B(A)CDE.*

Différentes structures peuvent être utilisées pour représenter le cluster [A1], on utilise 5EK2a, De même que précédemment, il possède toutes les interactions nécessaires, une résolution moyenne, proximités dans la structure chimique des ligands, une partie non résolue de l'enzyme très faible, il est donc notre choix (arbitraire).



**Molécule de 5EK2a**

## 8) Choix de la structure utilisée pour l'arrimage moléculaire

Les méthodes d'arrimage moléculaire s'appliquant à une enzyme, il faut donc disposer d'une structure 3D, si possible complète. Mais lorsque plusieurs structures sont disponibles dans la PDB, la question se pose de savoir laquelle choisir. Plusieurs possibilités existent, par exemple choisir la structure la plus complète ou ayant la meilleure résolution. Dans certains cas, ces approches ont du sens, mais si un grand nombre de structures est étudié, il est plus intéressant de toutes les analyser en profondeur, de manière à obtenir une ou des structures les plus représentatives de l'ensemble ou de la diversité de la collection.

Dans la mesure où ici, nous disposons déjà d'une analyse structurale, nous utiliserons la structure représentative d'un cluster pour l'arrimage moléculaire. Nous nous orientons vers 5EK2a et le cluster [A1] pour les raisons évoquées précédemment mais aussi par le fait qu'il s'agit de l'inhibiteur le plus efficace de la collection puisqu'il possède une activité de l'ordre du nanomolaire.

A partir du moment où la structure est choisie, on peut travailler sur le paramétrage du docking. Sachant que les structures de ligands sont peu flexibles (peu d'angles de torsions et de chaînes aliphatiques) et comportent beaucoup de multi-cycles plans, on pourra se diriger vers des algorithmes GPU-based pour les calculs. Ceux-ci sont plus rapides que les CPU (de 10 à 100 fois), ils sont dédiés au criblage de molécules mais fonctionnent également bien pour de l'arrimage classique, sachant que la fonction de score finale sera de type classique (non GPU).

## D. Docking

Un calcul d'arrimage moléculaire revient à obtenir une prédiction quantitative de l'affinité entre un ligand et une protéine ou un complexe protéine-cofacteur. Dans la plupart des cas, il ne s'agit pas d'une mesure d'énergie, mais d'une ou plusieurs fonctions de score (ex : MolDock et Rerank dans notre cas <sup>72</sup>) idéalement indépendantes, dont on peut croiser les résultats. On peut également en déduire des valeurs dérivées (descripteurs, métriques ...) destinées à faciliter le classement des ligands (en termes d'affinités prédites) ou la comparaison des résultats. Par exemple, on utilise souvent les valeurs de scores divisées par le nombre d'atomes (C, N, O) 'lourds'. Dans le cas d'IDO1, au stade du projet, nous n'avons pas encore de résultats *in vitro* sur la protéine (pourcentages d'inhibition, IC50, KI, ...) qui nous permettraient d'établir des corrélations entre affinités théoriques (docking) et valeurs d'inhibition. L'analyse des résultats de l'arrimage se bornera à être explicative. En d'autres termes, est ce qu'un ligand pourrait interagir, potentiellement, avec la protéine ?

## 1. Le processus d'arrimage

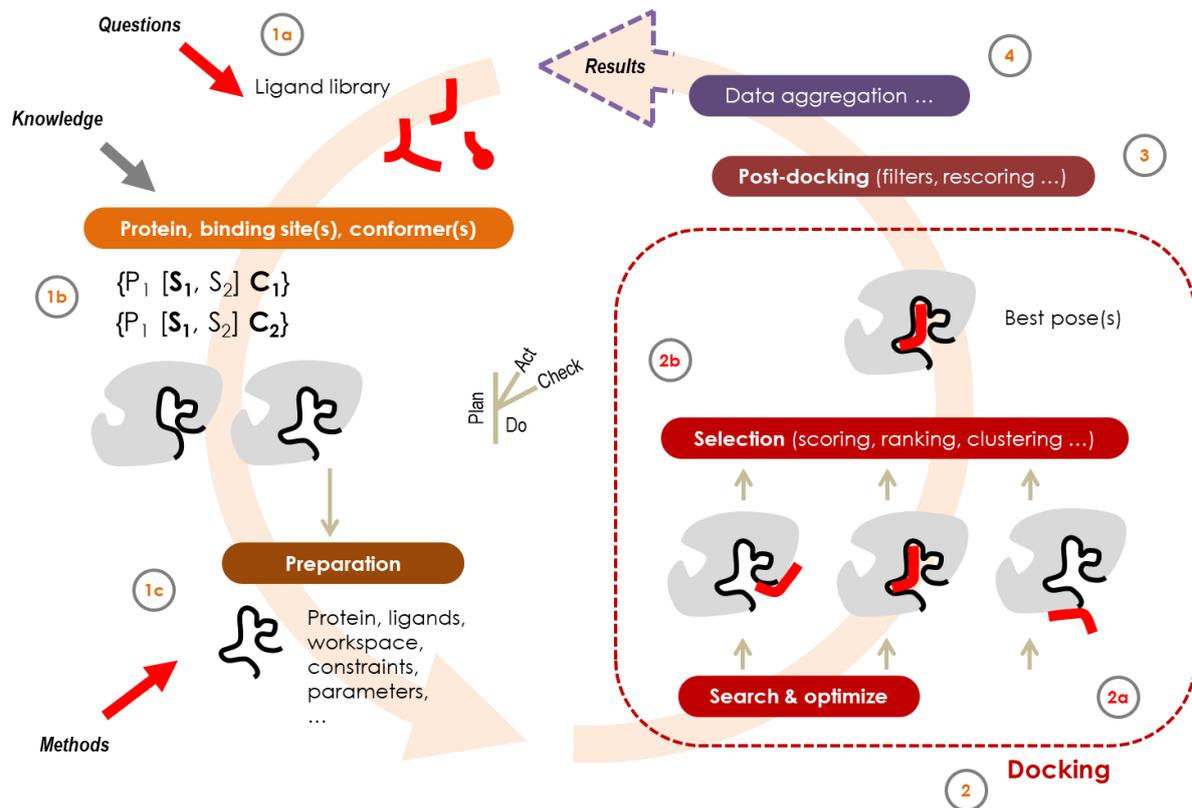
L'étude du site de liaison des différents ligands avec IDO1, a identifié les résidus protéiques impliqués dans le phénomène de reconnaissance moléculaire ainsi que les pharmacophores du ligand essentiel à ce processus. Ces informations ont été converties en contraintes pour le calcul et en éléments d'analyse. A partir de ces connaissances, les composés (analogues de la tsitsikammamine) seront arrimés à IDO1. L'analyse des résultats d'arrimage moléculaire nous éclairera sur les caractéristiques moléculaires intéressantes en termes d'affinité vis-à-vis du site actif d'IDO.

### Principe et processus

Généralement, les techniques d'arrimage moléculaire<sup>73</sup> permettent de prédire, par des méthodes de calcul, les structures de complexes ligand-enzyme en partant d'un ensemble variable de conformations et d'orientations du ligand (flexible ou non flexible) et parfois du récepteur (chaines latérales, résidus flexibles ou non).

Le processus global (Figure 25) se déroule en différentes étapes présentées ici comme consécutives, mais ce n'est pas toujours le cas (selon le logiciel utilisé) :

- La première étape (points 1 et 2) consiste à paramétrer le site de liaison (choix des résidus impliqués, flexibilité des résidus, contraintes, ...).
- La deuxième étape dite d'arrimage moléculaire (docking) permet de lancer tous les calculs de géométries possibles pour le complexe et de calculer les scores correspondants ;
- La troisième phase (appelée «clustering») consiste à sélectionner/trier et regrouper les scores. Il s'agit de faire ressortir des conformations représentatives (que nous appelons poses). Cette étape peut être directement issue de la seconde ou être complétée par des calculs intermédiaires prenant en compte par exemple une minimisation du complexe ou un calcul de dynamique moléculaire.
- La quatrième étape consiste en l'analyse des résultats. Elle implique souvent une inspection visuelle de chaque pose, des calculs de descripteurs, également des mesures d'écart ou encore des analyses statistiques.



**Figure 25 :** Processus global d'arrimage (docking et scoring).

En général, le processus d'arrimage, au sens strict, concerne l'étape 2 et une partie de l'étape 3. Un score est, au sens large, une métrique qui doit rendre compte de l'affinité d'un ligand pour son enzyme et doit permettre de comparer des ligands différents. Le nombre de fonctions de score existant est élevé (de l'ordre d'une centaine)<sup>68</sup>, ce qui veut dire qu'il y a toujours des arguments en faveur de l'une ou de l'autre. D'une manière générale, une fonction de score peut inclure des éléments liés au calcul de l'énergie du complexe enzyme-substrat. Par exemple, des termes liés aux interactions hydrogènes, électrostatiques, Van der Waals, peuvent être injectés dans la fonction. Celle-ci peut également incorporer des termes liés à des connaissances ou à différents facteurs de pondération.

Les fonctions de scores sont testées sur des jeux de test («training set»), correspondant à des complexes protéines-ligands où la géométrie (conformations, structures PDB du complexe) et les affinités ( $K_d$ ,  $\Delta G$ ) de liaison sont connues. Cela permet en retour de modifier la fonction pour qu'il y ait la meilleure corrélation entre affinités expérimentales et affinités théoriques.

La fonction doit être paramétrée de manière à ce que les calculs reproduisent au mieux :

- les géométries (RMSD minimales entre la conformation cristallographiée et la conformation calculée du ligand)

-le «ranking» (ordonnancement) des ligands (corrélation entre score et une grandeur expérimentale rendant compte de l'affinité du ligand pour la protéine). Ceci signifie que les ligands avec le meilleur score (en général la valeur la plus négative possible, mais elle ne possède pas d'unité) correspondent aux ligands ayant la meilleure affinité vis-à-vis de l'enzyme, et que cette corrélation prédiction-expérience sera la plus linéaire possible. Une fonction de score est donc dépendante à la fois du «training set» et de sa définition intrinsèque. Il faut cependant noter que la fonction de score n'est pas le seul élément critique d'un processus de docking-scoring. Il s'agit d'un processus d'optimisation, où l'algorithme utilisé pour minimiser la fonction de score sera plus ou moins efficace face à un problème donné, même s'il arrive à convergence (et non arrêt après un nombre fixé de pas de calcul). La manière dont l'outil d'arrimage sélectionne la « conformation/pose » de meilleur score est également importante. En effet selon l'algorithme de clustering utilisé, la répartition entre les poses significatives après un calcul, peut être différente. D'autres paramètres s'ajouteront également lors des calculs sous contraintes (par exemple, l'utilisation de pharmacophores ou la flexibilité des chaînes latérales des résidus du site actif).

## **2. Protocoles d'arrimage utilisés**

Le logiciel « Molegro Virtual Docker » (MVD) a été sélectionné pour les calculs d'arrimage moléculaire de par sa disponibilité au laboratoire, sa grande modularité des paramètres (contraintes, pharmacophores, docking, scoring, clustering) et sa précision d'arrimage. Il permet également d'avoir une évaluation différenciée (composantes de la fonction de scores accessibles à l'utilisateur) de l'affinité vers le cofacteur et vers le ligand.

Nous avons utilisé deux méthodes de docking : un protocole P1-GPU orienté criblage, qui donne de bon résultats avec des molécules de taille petite à moyenne, et un protocole P2-OPT qui est basé sur un algorithme de recherche classique et implémente la flexibilité totale des résidus du site de liaison. Ce second protocole (plus lent et plus fin) est plus efficace lorsque les molécules ont une masse moléculaire plus élevée et des angles de torsions en nombre. Il sera utilisé pour raffiner les résultats dans le cas des molécules les plus actives.

### Paramétrage

L'espace de recherche consiste en une sphère de 15 Å, capable d'englober les plus grands ligands possibles et centrée autour du ligand 5PJ.

Le protocole P1-GPU est basé sur une approche d'arrimage rigide au niveau de la protéine et un algorithme de criblage spécifique basé sur un processeur GPU (Nvidia Tesla CUDA). La phase de recherche utilise une approximation de la fonction MolDock basée sur une grille de 0.3 Å et un optimiseur (MVD, 6000 pas de recherche) sans prise en compte des molécules d'eau présentes dans le site. Le protocole est paramétré pour produire 100 calculs (runs) indépendants (les RMSD des poses correspondantes sont considérés comme suffisamment différents par l'algorithme de classification). Après docking les poses sont re-scorées par MolDock et Rerank, avec une minimisation d'énergie et un placement optimal des atomes pour les liaisons hydrogène.

Le protocole P2-OPT est basé sur une approche d'arrimage flexible au niveau de la protéine (softened potentials) et un optimiseur classique (CPU, MolDock portant le même nom que la fonction de score et intégré au logiciel). La classification structurale nous a permis de définir 20 résidus, paramétrés comme flexibles : ALA260, ALA264, ARG231, CYS129, GLN266, ILE354, LEU154, LYS238, MET295, PHE163, PHE164, PHE226, SER167, SER235, SER263, TYR126, TYR233, VAL125 et VAL130. Ces résidus sont principalement distribués sur la partie supérieure de l'hème et à l'entrée du site. Le nombre d'itérations est fixé à 3000, valeur suffisante pour assurer la convergence des calculs sur l'ensemble des molécules traitées. Le protocole renvoie 20 runs indépendants, après une minimisation finale différente de celle utilisée dans P1-GPU. Dans le cas de P2-OPT, les chaînes latérales et le squelette de la protéine sont minimisées (2000 itérations par phase). Une molécule d'eau du site est prise en compte dans le calcul en tant qu'atome déplaçable. La méthode donne constitutivement une valeur des scores MolDock et de Rerank.

Pour l'ensemble des calculs, ce dispositif est complété par un profil pharmacophorique appelé : « template ». L'étude structurale nous a montré qu'il existe une position très précise et conservée, des atomes d'azote engagés dans la liaison de coordination (Fe de l'hème). Cette connaissance est transformée en contrainte pour le calcul, qui vise à favoriser un atome du même type à cette place, avec une certaine force et un rayon d'action. Il n'y a pas d'autres types de pharmacophores (par exemple : positions de donneurs/accepteurs de liaisons H, stériques, aromatiques) dans l'espace de recherche. Le template est implémenté sur une grille de 0.3 Å de résolution et une sphère de 1.8 Å, centrée sur la position moyenne de ces azotes, il concerne un atome unique, avec 4 propriétés (cyclique, charge négative, accepteur hydrogène, occupation stérique) dotées d'un paramétrage spécifique (attraction, force). La diversité des poses obtenues démontre que la contrainte n'induit pas un biais dans les calculs (contrainte trop forte orientant les résultats).

Dans les deux cas, le clustering est ajusté à 1.7 Å de RMSD, de manière à produire un peu plus de poses conformes qu'avec un paramétrage standard (une valeur de 2 Å) sans trop affecter la diversité des poses. Ce paramétrage est important, car quels que soient les résultats de l'arrimage, c'est lui qui sélectionne indirectement l'écart entre les différentes poses représentatives d'un 'run' donné.

Les liaisons de coordination posent souvent un problème pour les outils de docking et nécessitent de passer par une approximation. Par exemple simuler un radical ou une interaction électrostatique avec Fe (positif) en chargeant négativement l'azote, l'objectif étant simuler une liaison dative sans l'établir formellement (car il s'agirait alors d'une liaison covalente). A cet effet, certains composés possédant un groupe NH<sub>2</sub> libre peuvent simuler la liaison électrostatique par une charge fictive, nous l'avons utilisé pour faire des essais avec les ligands co-cristallographiés. Mais dans le cas des composés à tester, certains sont substitués sur ce type d'atome ou en comportent plusieurs. Nous avons évité d'introduire un biais potentiel dans les calculs, et nous avons utilisé simplement le profil pharmacophorique.

### Sélection des poses

Dans les deux cas (protocole P1-GPU et P2-OPT) les poses produites sont évaluées avec deux fonctions de scores MolDock et Rerank. Ce type d'approche 'consensus' est souvent nécessaire car le but est de mettre au point un filtre pour le criblage des molécules potentiellement inhibitrices d'IDO1. On privilégiera alors les poses (« fortes ») correspondant à la fois aux meilleures valeurs des deux types de scores. Il s'agit d'un critère lié à l'efficacité, mais qu'il ne faut pas toujours considérer comme une fin en soi. Par exemple, une petite molécule (fragment), sous-structure d'un ligand connu, pourra se lier dans une zone du site différente de celle qui correspondait au ligand co-cristallisé de référence. Les scores peuvent être meilleurs, mais ce n'est pas pour autant que le résultat aura plus de sens. Pour cette raison, le critère d'efficacité devrait être doublé par un critère de conformité, issu des analyses structurales, qui nous permettra de prédire la zone d'interaction et de la conformation d'un groupement chimique du ligand. Par exemple s'il y a toujours une ou plusieurs interactions reproduites sur une diversité de ligands (un réseau de liaisons hydrogène) il faut en tenir compte et ne pas s'arrêter systématiquement à une valeur d'affinité ou d'énergie d'interaction.

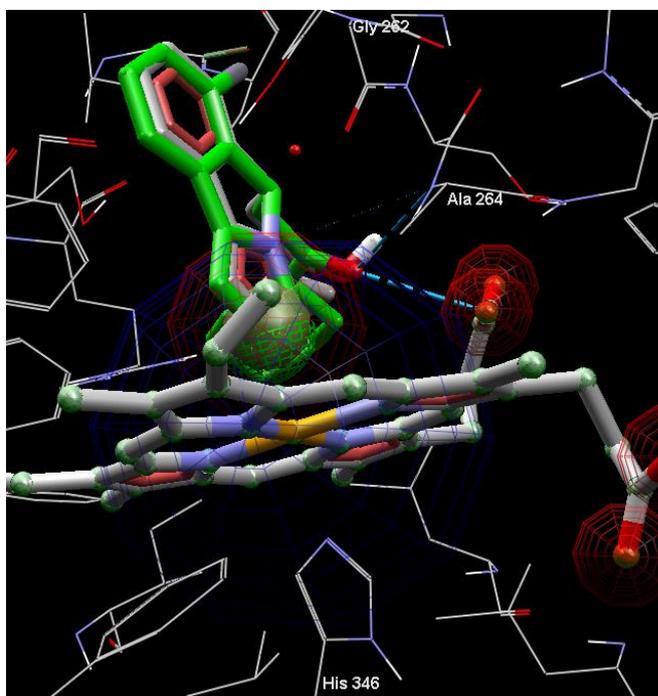
### Reproduction de la cristallographie

Cette phase vise à reproduire la configuration du ou des ligands dans la ou les structures prises pour référence, de manière à valider le paramétrage. L'analyse se fait en analysant la pose forte

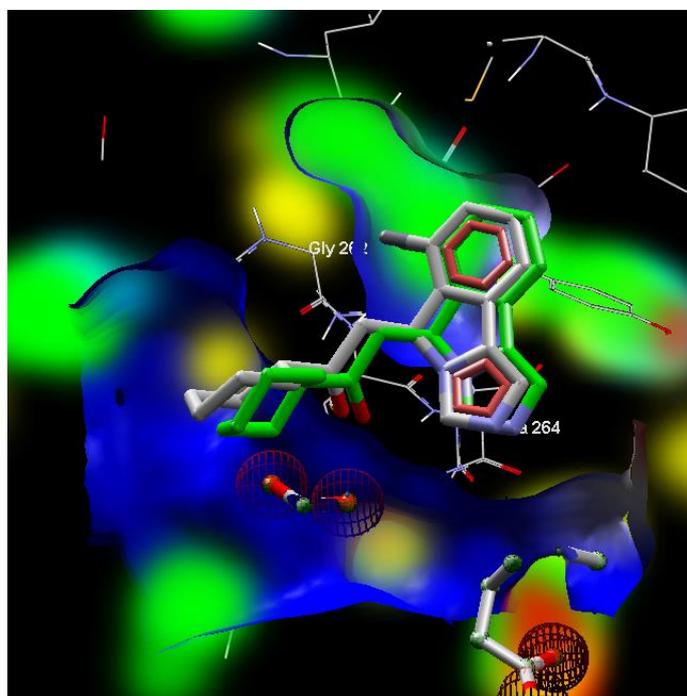
et en calculant une valeur de RMSD (root mean-square deviation) qui correspond à une mesure de distance entre deux nuages de points (les atomes des deux conformations à comparer : ligand dans la structure RX vs. ligand obtenue par l'arrimage). Généralement, un RMSD est considéré comme acceptable (cela dépend de la structure du ligand) dès lors qu'il est inférieur à 1.4 Å, pour valider la reproduction d'une structure cristallographique.

Les calculs sur 5PJ dans 5EK2a permettent d'arriver à des RMSD inférieurs à 0.7 Å, voir jusqu'à 0.3 Å, ce qui est très intéressant. D'une manière générale on constate que le classement par le score Rerank est plus optimal que le classement par MolDock.

On note, conformément à l'étude structurale, le peu de liaisons hydrogène, à la différence des ligands du cluster [A] : essentiellement avec le COOH de l'hème et l'azote de la liaison peptidique d'ALA264. Interactions électrostatiques avec l'hème et HIS346 (sous l'hème). Il n'y a pas de prépondérance particulière entre les interactions (somme globale) Ligand-Protéine et Ligand-Cofacteur (Figure 26).



**Figure 26 :** *Vue vers l'arrière du ligand 5PJ (perpendiculaire au fond du site), la meilleure pose est en vert, la conformation cristallographie en gris. La sphère avec une grille indique une interaction électrostatique, les liaisons hydrogène sont marquées en pointillés bleus.*

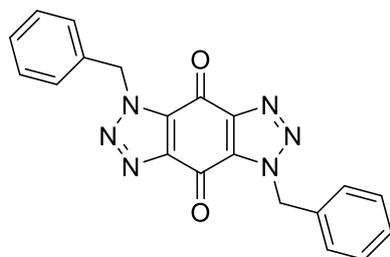


**Figure 27 :** *carte d'énergie (de côté, entrée du site vers la gauche).*

Sans surprise, la carte d'énergie montre que les zones favorables en vert (Steric, sur lesquelles on peut étendre les ligands) concernent les poches P1, P2, P3 et l'entrée du site (vers le dessus), (Figure 27). Les zones liées aux interactions électrostatiques (bleu) concernent la partie occupée par l'hème. Les zones HBond donor ou acceptor (Jaune) ne sont pas toujours bien identifiées, mais d'une manière générale, on retrouve les éléments de l'analyse structurale dans ce type de visualisation.

## E. Choix des Produits

Depuis le début des années 2010, de nombreuses études de screening ayant pour but la recherche d'inhibiteurs d'IDO1 ont vu le jour<sup>74-76</sup>. Une publication de Wang *et al* de 2018, reporte une série d'inhibiteurs d'IDO1 « désignés » par docking et modélisation moléculaire assez proches de nos structures.<sup>77</sup> La molécule Roxy-WL ayant la meilleure affinité pour IDO présente un IC<sub>50</sub> de 1 nM, tout en montrant une bonne sélectivité vis-à-vis de nombreuses kinases (337 kinases étudiées), (Figure 28).



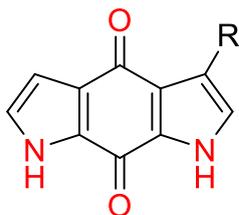
**Figure 28:** Roxy-WL IC<sub>50</sub> = 1nM, 1,5-dibenzylbenzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,2,3]triazole)-4,8(1H,5H)-dione.

Cette molécule a de plus donné de très bons résultats sur les tests cellulaires : elle réduit la transformation des lymphocytes T CD4+ en TReg et le rapport Kyn/Trp. Administrée à des souris porteuses de mélanome B16F10, elle diminue la croissance de la tumeur de 91.5%.<sup>77</sup>

ROXY-WL a été arrimée par les auteurs dans la structure 4PK5a qui fait également partie du cluster [A1] comme 5PK2a, mais il n'existe pas de structure cristallographique. Néanmoins, nous reproduisons la conformation de la publication dans notre système (5PK2a) en incluant certains contrôles. Par exemple, la reproduction de la conformation sur ligand cristallographique PKJ (de 4PK5a) dans 5PK2a, avec un RMSD de 1.4 Å et une superposition totale de la partie en vis-à-vis de l'hème.

Ce composé ayant une structure tricyclique proche de nos molécules, nous avons décidé de faire plusieurs séries de composés comportant tous un motif tricyclique ou tétracyclique (Figure 28). Ces molécules ont été synthétisées (chapitre analogues) puis testées (chapitre

évaluation biologique).



**Figure 29** : Motif de base des analogues avec les atomes électro-négatifs susceptibles d'interagir avec l'hème, en rouge.

Une confrontation des études de docking avec les résultats d'inhibition sur l'enzyme obtenus sera réalisée et décrite dans la partie discussion du chapitre 5 (Evaluation biologique).

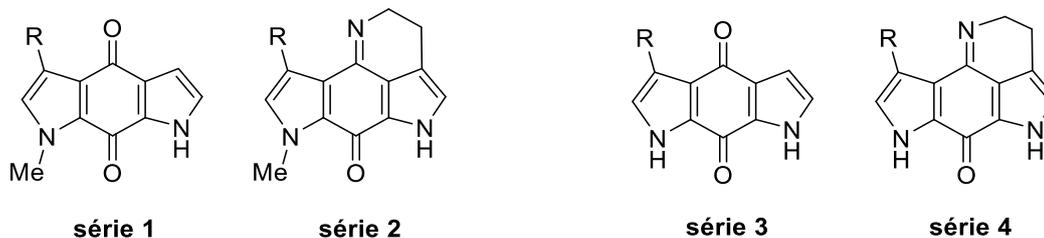


# **Chapitre IV**

## **Synthèse d'analogues de la wakayine**



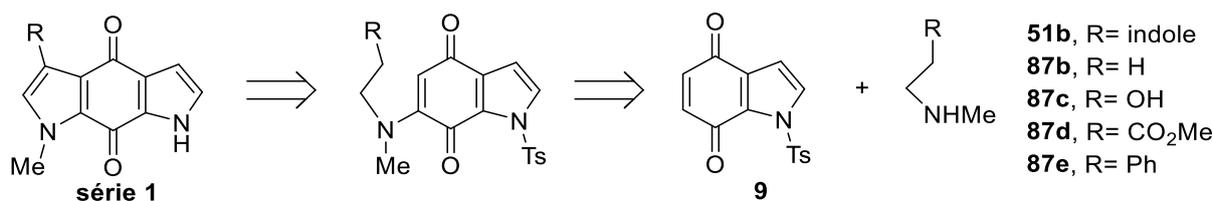
Au cours de ces recherches concernant les analogues des produits naturels comme inhibiteurs potentiels d'IDO1 quatre séries de composés ont été étudiées.



Ce travail a été mené en parallèle de celui sur la synthèse totale de la wakayine ce qui nous a permis d'utiliser les différentes stratégies étudiées pour préparer les analogues.

### 1. Première série

Ainsi, pour accéder à la première série d'analogues, nous avons mis à profit la réaction que nous avons mise au point pour construire le motif bispyrroloquinoline en nous inspirant du travail de Zhang. Ainsi le schéma de rétrosynthèse est le suivant :

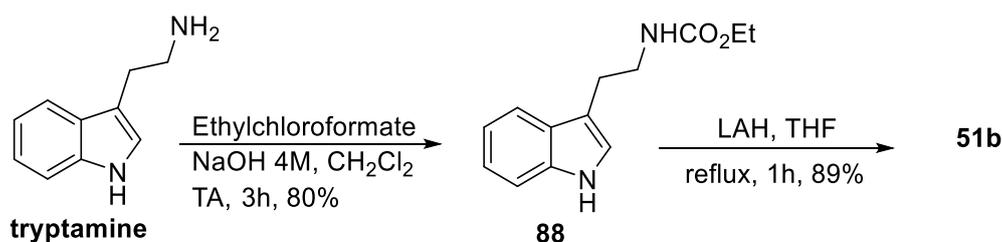


La formation du tricycle est basée sur l'addition de Michael d'une amine **51b** ou **87b-87e** sur l'indoledione **9**.

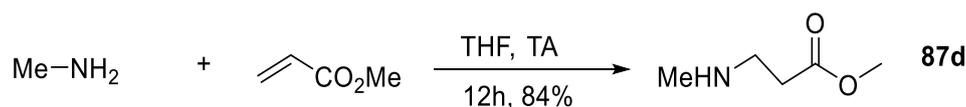
#### *Obtention des amines de départ*

Dans le but de créer une plateforme où un groupement fonctionnel permettrait par des réactions simples d'introduire des groupements encombrants, cinq amines différentes ont été utilisées. Trois étaient commerciales **87b**, **87c**, **87e** et deux autres ont dû être synthétisées, **51b** et **87d**. La *N*-méthyltryptamine **51b** est préparée en deux étapes à partir de la tryptamine qui est tout d'abord transformée en carbamate d'ester **88** correspondant par l'action de l'éthylchloroformate en présence de NaOH 4N, avec un rendement de 80%<sup>78</sup>.

Ce dernier est ensuite réduit par le LAH pour fournir l'amine **87a** souhaitée avec un rendement de 89%. Le rendement global de ces deux étapes est de 71%.

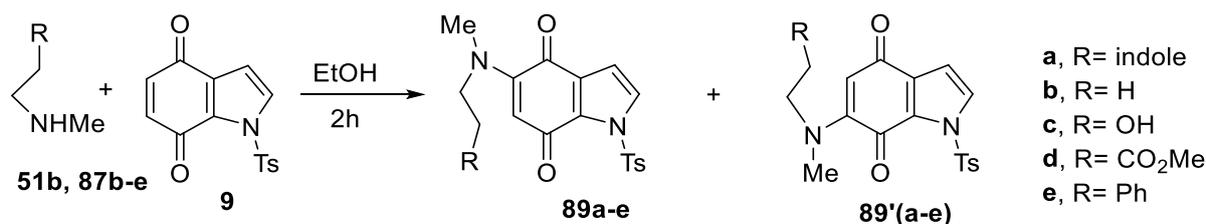


La méthyl 3-(méthylamino)propanoate **87d** a été obtenue avec un rendement de 84%, par réaction de la N-méthylamine sur le méthylacrylate dans le THF.

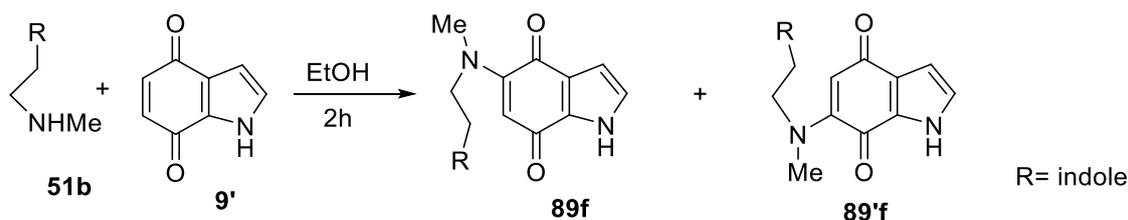


### Réaction de couplage

La réaction de couplage entre l'indoledione **9** et les amines **51b** et **87b-e**, se fait à température ambiante dans l'éthanol absolu, reprenant ainsi les conditions mises au point (voir p 63), pour aboutir à deux régioisomères **89** et **89'**.



Nous avons aussi fait une réaction de couplage en mettant en jeu l'amine **51b** et l'indoledione non protégée par le tosyloxy **9'** obtenue par oxydation par le CAN du diméthoxyindole **24**.



Les différents essais réalisés sont reportés dans le tableau 5. Les rendements sont compris entre 8 et 86%, les meilleurs étant obtenus lorsque R' est un noyau aromatique (R' = Ph ou indole,

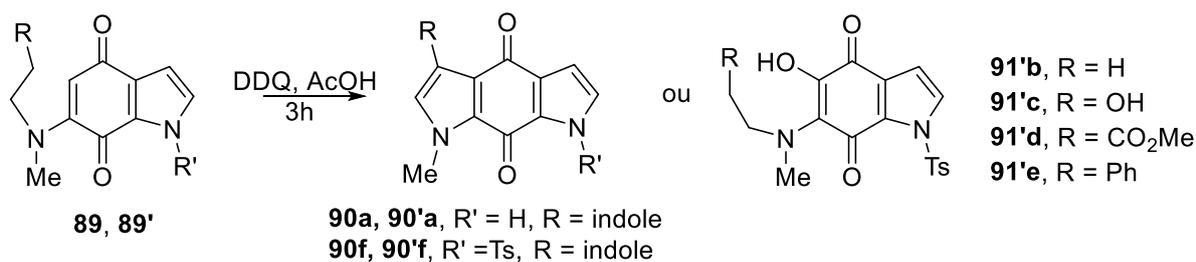
respectivement 86 et 67%). Dans la plupart des cas, les deux régioisomères ont pu être séparés par flash chromatographie, sauf lorsque R' correspondait à un OH (seul **89'c** a pu être obtenu pur) ou dans le cas de la quinone non protégée par un tosyle (**89f/89'f**).

R	R'	Rendement global (mélange isomères, %)
<b>9</b> : Ts	<b>51b</b> : indole	<b>89a/89'a</b> 60
	<b>87d</b> : COOMe	<b>89d/89'd</b> 45
	<b>87c</b> : OH	<b>89c/89'c</b> 34
	<b>87b</b> : H	<b>89b/89'b</b> 39
	<b>87e</b> : Ph	<b>89e/89'e</b> 51
<b>9'</b> : H	<b>87a</b> : indole	<b>89f/89'f</b> 8

*Tableau 5 : rendements des réactions de couplage.*

### Réaction de cyclisation

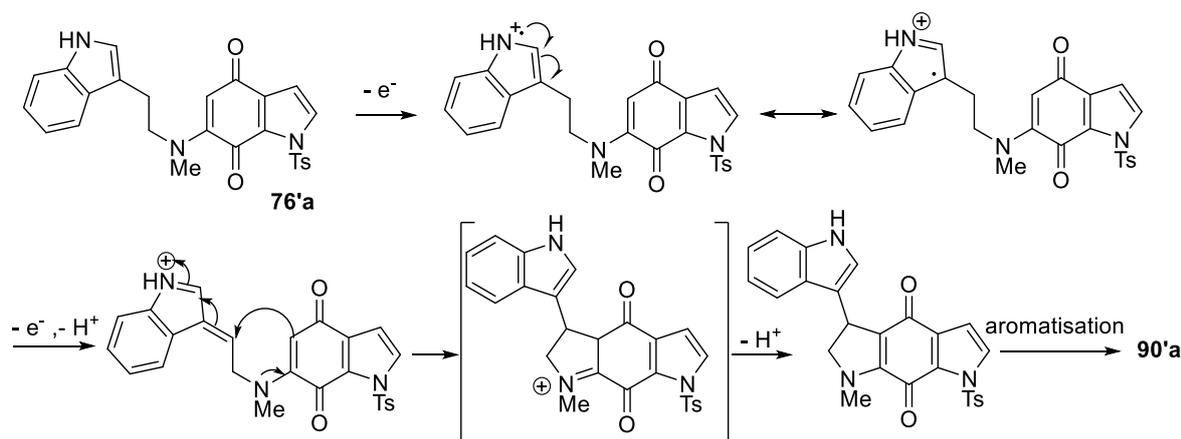
La réaction de cyclisation de ces composés vise à former le deuxième cycle pyrrole. Dans cette étape, les conditions ont été adaptées des travaux de l'équipe de Zhang,<sup>55</sup> qui utilisait le DDQ comme oxydant dans l'acide acétique comme solvant. Dans un premier temps, l'acide acétique a été remplacé par le dichlorométhane, qui dans le cas des deux régioisomères de l'indole conduit à des rendements équivalents, avec un work-up de réaction plus facile à mettre en œuvre. Quand cette réaction est réalisée sur le mélange de régioisomères **89f/89'f**, les composés **90f/90'f** sont obtenus avec un rendement équivalent (Schéma 11).



*Schéma 11 : Voie d'accès à la première série d'analogues*

Comme précédemment, l'identification des différents régioisomères a été réalisée à partir des spectres RMN  $^{13}\text{C}$ , ce qui nous a alors permis de remonter à l'identification des composés avant cyclisation.<sup>54</sup>

Parmi les autres composés, cette réaction de cyclisation n'a été étudiée que pour les deuxièmes régioisomères **89'b-e**. Elle n'a pas conduit au composé attendu mais à la formation d'un produit hydroxylé non cyclisé **91'b-e**, avec des rendements de l'ordre de 50%. Au vu de ces résultats, nous avons tout d'abord essayé de comprendre pourquoi la réaction de cyclisation n'avait lieu que quand le substituant était un indole, indépendamment du caractère aromatique de ce dernier puisqu'elle n'intervient pas non plus dans le cas du composé **89'e**.

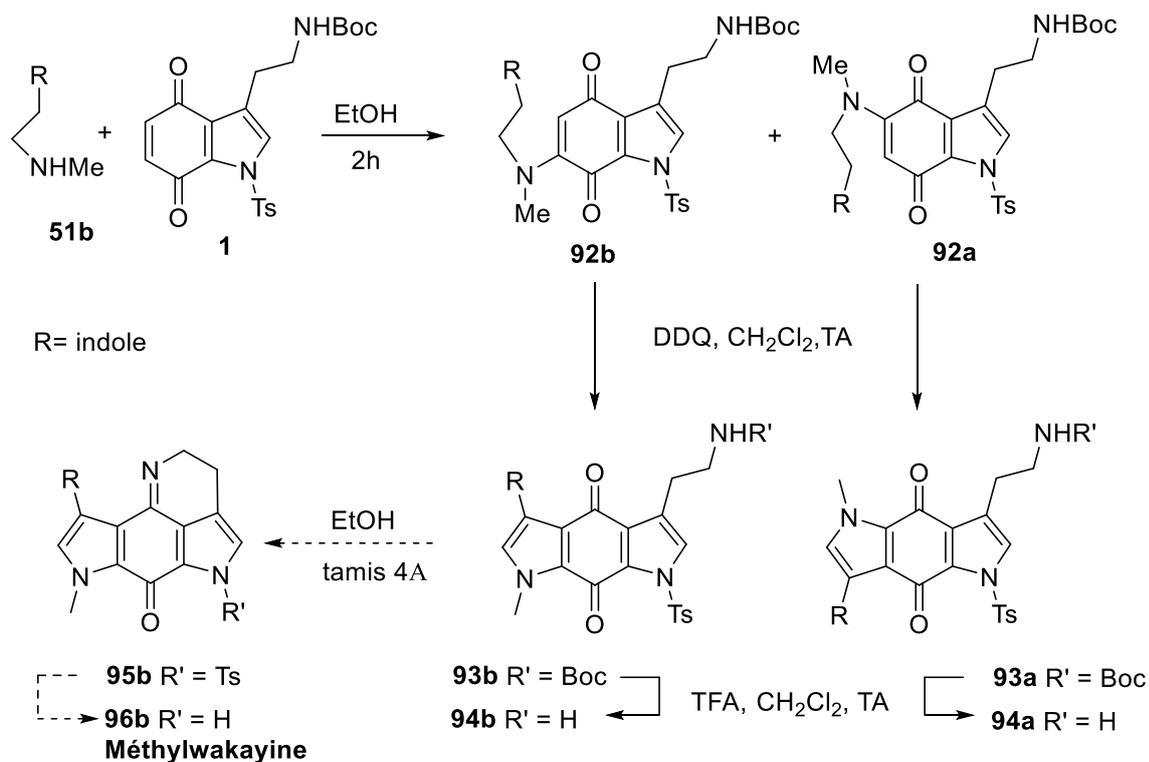


*Schéma 12 : Mécanisme d'obtention du composé 90'a.*

Notre explication est que l'arrachement d'un électron du doublet de l'azote de l'indole initie la réaction de cyclisation, chose qui n'est pas possible quand on a un autre substituant que l'indole (Schéma 12). En toute rigueur, il faudrait regarder ce qu'il se passe si l'azote de l'indole est protégé.

## 2. Deuxième série

Cette réaction inspirée de Zhang a aussi été appliquée en mettant en jeu la méthyltryptamine **51b** et l'indoledione **1** (Schéma 13).

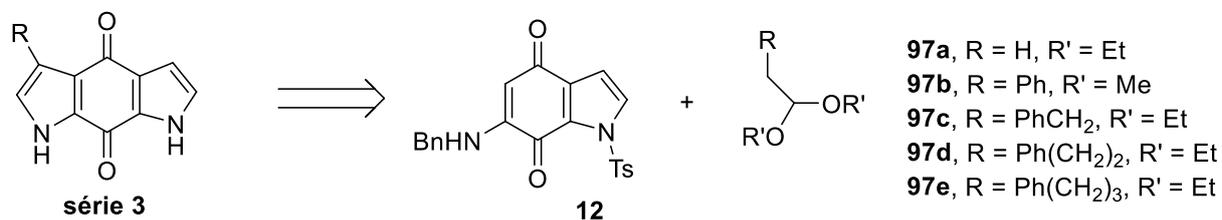


*Schéma 13 : Voie d'accès aux composés de la série 2.*

Elle a conduit comme précédemment aux adduits correspondants **92a** et **92b** qui sont ensuite cyclisés par action du DDQ pour donner les composés tricycliques **93a** et **93b**. Les composés **94a** et **94b** sont obtenus par clivage du groupement Boc par le TFA. Pour le moment la formation du dernier cycle n'a été effectuée que sur ce dernier composé, conduisant ainsi au dérivé **95b**, dont il reste encore à cliver le tosyl pour effectuer la cyclisation qui devrait permettre obtenir la méthylwakayine **96b**.

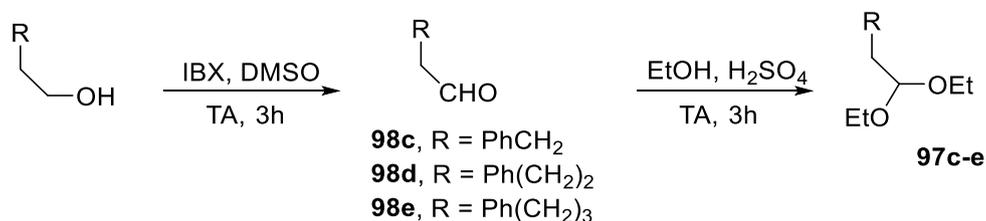
### 3. Troisième série

La troisième série d'analogues étudiée a été synthétisée sur la base de la réaction de Vélou mettant en jeu la NH-benzylindole-1,2-dione **12** et différents acétals pour construire le motif bispyrroloquinone.



### Obtention des acétals de départ

Conformément au travail de design reporté dans le chapitre 2, les différents acétals ont été choisis de façon à regarder quelle était l'influence de l'allongement de la chaîne portée par le cœur bispyrroloquinone sur l'activité de l'enzyme. L'acétaldéhyde diéthylacétal **97a** et le phénylacétaldéhyde diméthylacétal **97b** sont des produits commerciaux. Les autres, **97c-e**, ont été synthétisés en deux étapes à partir des alcools correspondants.



La première étape consiste à oxyder la fonction alcool en aldéhyde **98** par action de l'IBX. L'acétalisation de l'aldéhyde pour donner l'acétal **97** est réalisée ensuite, dans l'éthanol en présence de quelques gouttes d'acide sulfurique.<sup>50</sup>

### Réaction de Velu

L'indoledione **12** est portée à reflux pendant 48h, avec les différents acétals en présence de triacétate de manganèse dans l'acétonitrile (Schéma 14).

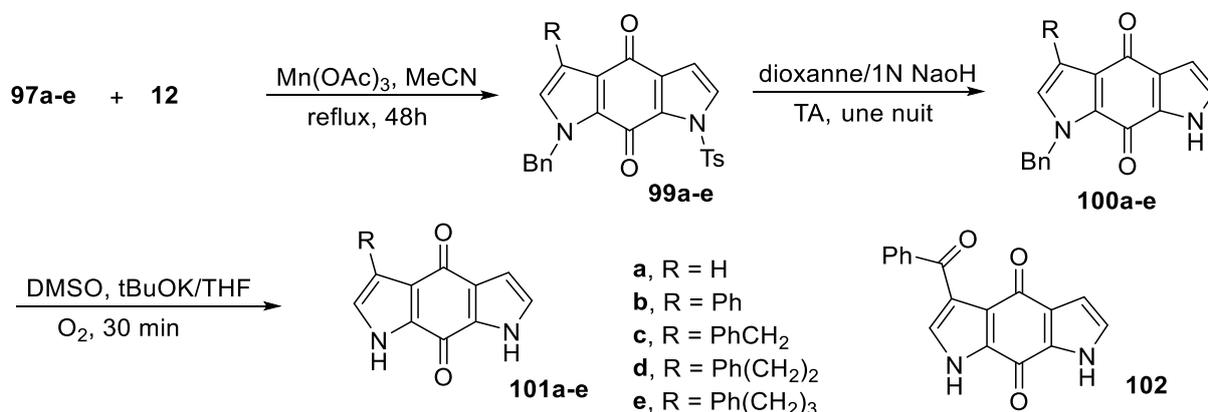
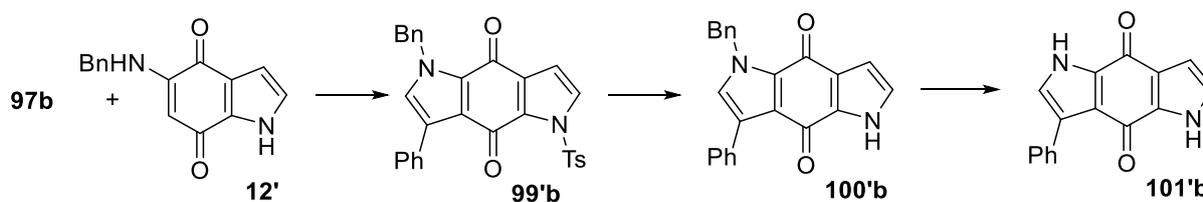


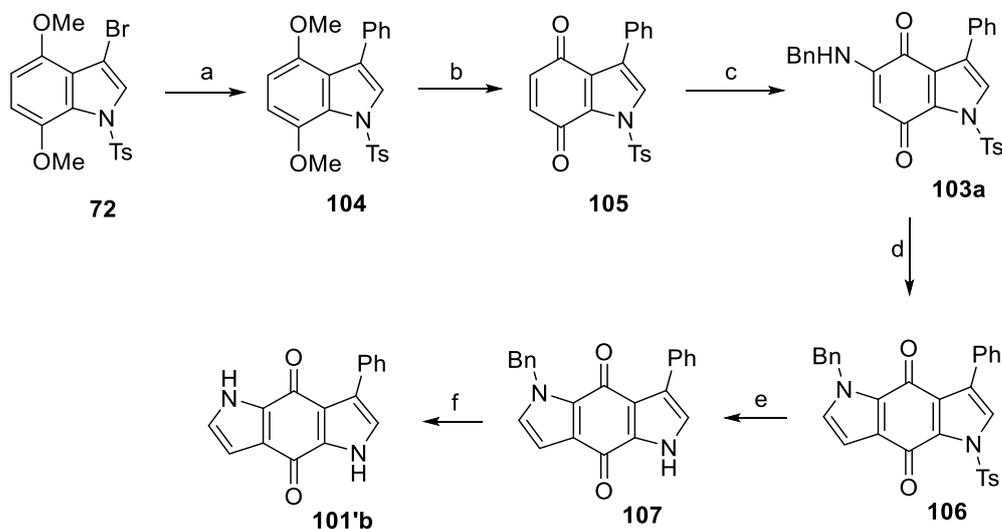
Schéma 14 : Voie d'accès aux composés de la série 3.

Les adduits de Velu sont obtenus avec des rendements allant de 40 à 66%. La réaction de Velu

dans le cas de l'acétal **97b** a aussi été réalisée sur l'indolédione **12'** pour conduire à l'adduit **99'**.



Par ailleurs, l'indolédione **103a** est obtenue à partir du bromodiméthoxyindole **72a**, en reproduisant la séquence ayant permis d'aboutir aux composés **68a** et **68b**, à savoir, réaction de Suzuki pour obtenir le composé **104** suivie de l'oxydation par le CAN (**105**) et de l'action de la benzylamine sur le dérivé oxydé obtenu pour mener au composé **103a**.



a-  $\text{PhB(OH)}_2$ , DME,  $\text{Pd(PPh}_3)_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , toluene/MeOH reflux. b- CAN,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ . c-  $\text{BnNH}_2$ , EtOH d- **97a**,  $\text{Mn(OAc)}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ . e- NaOH 1M Dioxane. f-  $t\text{BuOK}$ , THF,  $\text{O}_2$ , DMSO.

**Schema 15** : Deuxième voie d'accès au composé **101'b**.

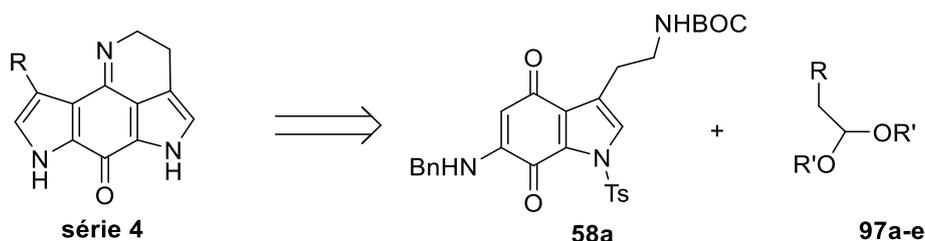
La réaction de Velu entre l'acétal **97a** et l'indolédione **103a**, réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, n'a formé qu'un seul régioisomère **106** avec un rendement de 79%. Après clivage des groupements protecteurs, on obtient aussi le composé **101'b** (Schéma 15).

### Réactions de déprotection

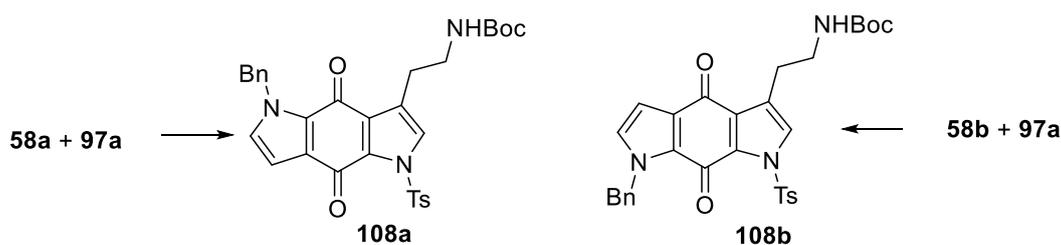
Pour tous les adduits obtenus **99a-e**, **99'b** et **106**, la détosylation s'opère dans un mélange NaOH 1N/dioxanne pour conduire quantitativement aux composés attendus **100a-e**, **100'b** et **107**. La réaction de débenzylation se fait elle, dans le DMSO en présence de tert-butylate de potassium et en faisant buller de l'oxygène. Les rendements varient de 44 à 76%. Dans le cas du composé **99c**, on obtient seulement 27% de produit débenzylé attendu **101c** ainsi que 32% d'un produit secondaire **102**. Il semble que la débenzylation de l'azote de l'indole se soit faite correctement mais que le deuxième groupement benzyle de la molécule ait été pour une partie, oxydé.

### 4. Quatrième série

Cette quatrième série d'analogues étudiée est aussi synthétisée sur la base de la réaction de Vélú mettant en jeu les NH-benzylindolediones **58a** ou **58b** au lieu de la NH-benzylindoledione **12** :



Deux réactions de Vélú ont été étudiées pour cette série, mettant en jeu alternativement **58a** ou **58b** et comme deuxième partenaire de la réaction, l'acétaldéhyde diéthylacétal **97a**. Les adduits correspondants **108a** et **108b** ont été obtenus avec des rendements de 76 et 56 % respectivement.



Il reste encore à fermer le quatrième cycle et cliver les groupements protecteurs pour valider

cette voie d'accès aux composés de cette série. Le choix de l'acétal mis en jeu dans la réaction de Velu sera guidé par les résultats biologiques obtenus pour les composés de la série 3.

En mettant à profit les différentes stratégies investiguées dans l'étude de la synthèse totale de la wakayine, quatre différentes séries d'analogues originaux tricycliques et tétracycliques ont pu être obtenues. Les deux premières séries résultent de la réaction de construction du motif bispyrroloquinone mise au point dans ce travail, tandis que les deux autres utilisent une réaction de Velu.



# **Chapitre V**

## **Evaluation Biologique**



La sélection d'une molécule pour en faire un « lead » passe par différentes phases :

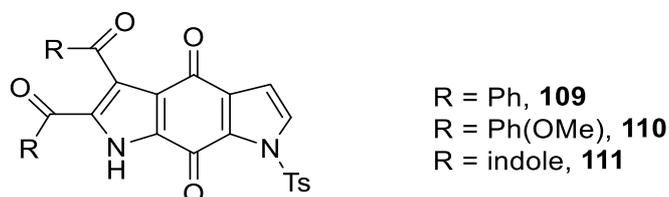
- La première peut être une phase *in silico*, basé sur l'arrimage moléculaire du ligand potentiel ou le criblage d'une bibliothèque de composés. Cette phase est dite 'structure-based', car elle utilise la structure 3D de la cible (enzyme, récepteur, transporteur) et le calcul de l'affinité (prédite) entre la protéine et le (les) ligand(s). Cette phase peut également être de type 'ligand-based', dans ce cas des calculs chemoinformatiques basés sur des descripteurs chimiques ne concernant que les ligands sont utilisés pour sélectionner un candidat.
- La deuxième est le test enzymatique qui est réalisé dans des conditions optimales pour le fonctionnement de l'enzyme (co-facteur, tampon réactionnel, pH, température...). Ce type de test sert à déterminer l'activité *in vitro* d'un composé sur l'enzyme d'intérêt, qui peut être traduite par un pourcentage d'inhibition, un IC<sub>50</sub>, ou une constante d'inhibition (K<sub>i</sub>). Cette phase peut également inclure un test de liaison directe ou indirecte (microcalorimétrie, résonance plasmonique de surface, Thermal Shift Essay ...) visant à obtenir une constante de dissociation (K<sub>d</sub>) ou une mesure permettant d'évaluer la liaison.
- La troisième est la phase *ex vivo*, notamment les tests cellulaires, dans notre cas, basés sur des cellules modifiées génétiquement pour surexprimer l'enzyme. Dans cet essai, un composé donné doit avoir d'autres caractéristiques que d'être seulement un inhibiteur de l'enzyme. En effet, il doit être soluble dans le milieu, ne pas s'agréger sur la protéine, passer les membranes, ne pas être toxique pour la cellule.

Chacune des trois étapes précédentes est importante. Même si elles vont en se complexifiant, elles sont toutes informatives et constituent un système de sélection positive pour arriver vers les étapes qui relèvent du *in vivo*, où la drogue sera testée directement sur un individu vivant (animal ou humain).

D'une manière générale lorsque l'on utilise une structure ligandée issue de la PDB, nous partons déjà, d'une certaine mesure d'une molécule 'lead' puisque la cristallographie (ou la RMN) nous montre les modes de liaisons à la protéine. On parle alors de 'positive design' puisqu'il s'agit d'optimiser le 'lead' et non d'éliminer des candidats.

Le travail de synthèse effectué nous a permis d'obtenir des molécules originales analogues des produits naturels. Tous les intermédiaires ainsi que les molécules finales ont été évaluées ou sont en passe de l'être dans le cadre d'une collaboration avec Luc Pilotte et Benoît Van den

Eynde du Ludwig institut de Bruxelles. De plus nous avons ajouté à ce panel de molécules, les composés **109**, **110** et **111** appartenant à notre librairie.

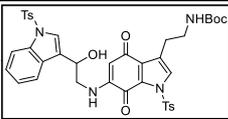
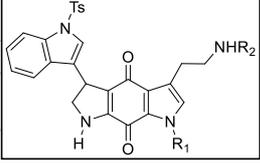
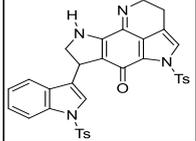
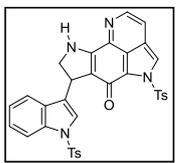
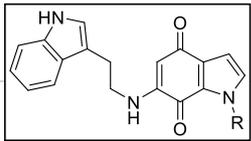
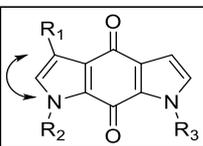
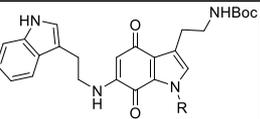
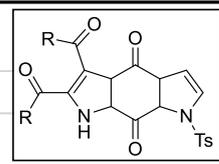


### 1. Tests d'activité

La capacité des différents composés à inhiber la dégradation du tryptophane ainsi que la production de kynurénine a été déterminée sur des cellules HEK 293-EBNA exprimant hIDO1 et hTDO.

Cet essai cellulaire global correspondant à la troisième phase décrite plus haut, évalué à la fois, le potentiel inhibiteur d'un composé donné vis-à-vis de l'IDO et de la TDO, sa cytotoxicité potentielle ainsi que l'inhibition des transporteurs du tryptophane et des effets sur les métabolites de ce dernier.

Les tests ont été conduits comme indiqué en partie expérimentale. Les quantités de tryptophane résiduel ou de kynurénine produite sont déterminées par HPLC selon leur temps de rétention et leur absorption UV à 280 et 360 nm respectivement. La viabilité des cellules est aussi mesurée à la fin de la période d'incubation. Dans un premier screening, les inhibiteurs potentiels sont testés à deux concentrations 25 et 12,5  $\mu\text{M}$ , cette concentration est réduite ensuite le cas échéant. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant.

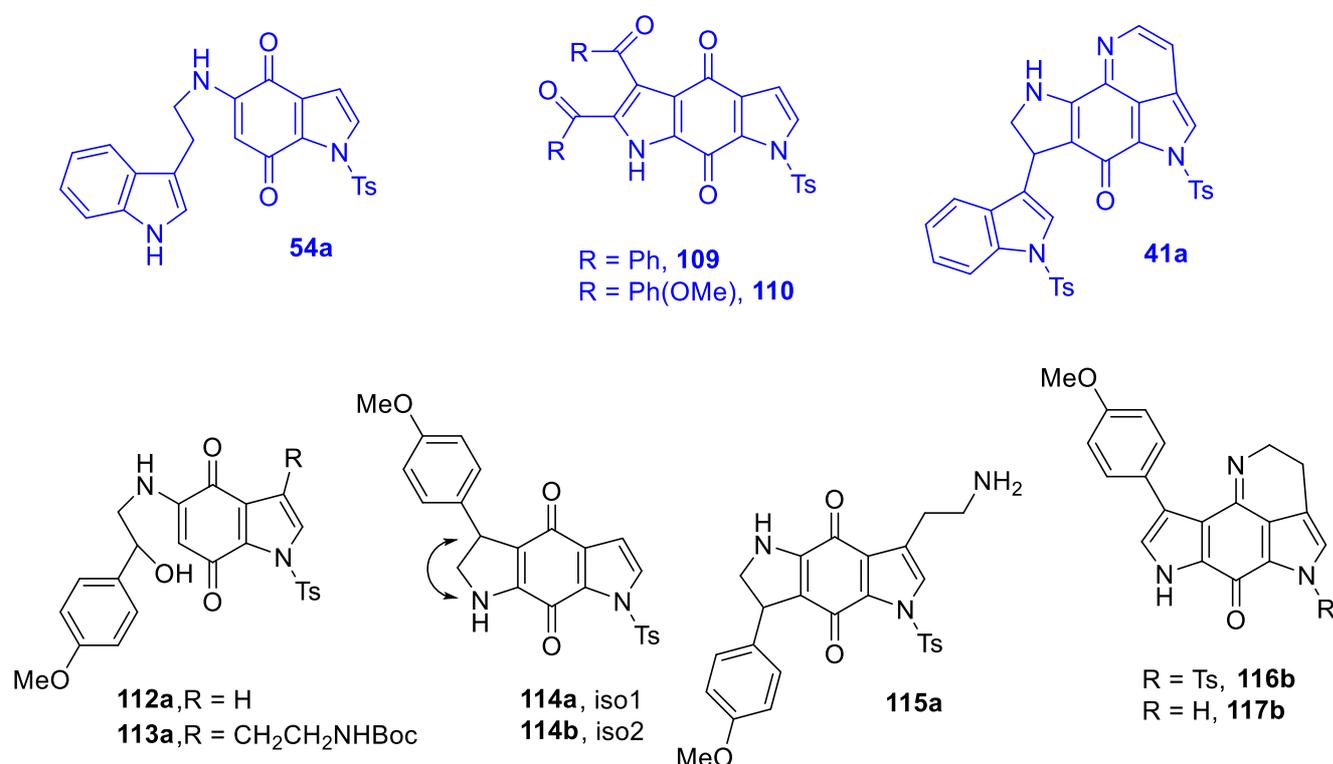
	numéro	iso	R1	R2	R3	Via	IDO	TDO	Via	IDO	TDO	Via	IDO	TDO	Via	IDO	TDO
							25 $\mu$ M			12,5 $\mu$ M			6,25 $\mu$ M			3,12 $\mu$ M	
	38a	1					-35	-76		-8	-14		-8	-1			
	38b	2					16	7		19	8		18	15			
	39a	1	Ts	H			10	-8		10	4		11	3			
	39b	2	Ts	H			16	8		10	15		7	10			
	40b	2	Ts	Ts			13	11		10	7		6	14			
	41b	2	H	Ts			12	16		10	14		9	12			
	40a	1					27	12		14	16		10	10			
	41a	1					49	34		42	25		34	24			
	54a	1	H			26	39	67	56	38	31	69	28	12	75	23	5
	54'a	2	H			84	11	0	99	13	0	98	9	-3	98	2	-8
	99a	2	H	Bn	Ts	114	10	1	109	12	8						
	99b	2	Ph	Bn	Ts	113	19	-6	110	20	-3						
	99'b	1	Ph	Bn	Ts	112	9	-5	110	10	-1						
	99c	2	CH2Ph	Bn	Ts	108	13	-8	106	12	-6						
	99d	2	(CH2)2Ph	Bn	Ts	112	2	0	109	0	1						
	99e	2	(CH2)3Ph	Bn	Ts	113	8	5	105	5	-2						
	101a	2	H	H	Ts	110	-9	-1	108	-8	0						
	101b	2	Ph	H	Ts	106	14	50	107	10	30						
	101c	2	CH2Ph	H	Ts	86	-19	-16	95	-17	-18						
	102	2	COPh	H	Ts	111	0	13	109	1	1						
	101d	2	(CH2)2Ph	H	Ts	95	11	11	75	9	1						
	101e	2	(CH2)3Ph	H	Ts	108	-1	-11	105	0	-14						
	90f	1	indole	Me	H	95	28	-8	97	26	-1	98	20	2	100	12	2
	90'f	2	indole	Me	H	88	27	-3	96	21	0	96	12	3	98	8	2
	106	1	Ph	Ts	Bn	107	23	-7	102	17	-4						
	101'b	1	Ph	H	H	110	-2	-4	107	-1	1						
		108a	1					10	-3		9	7		8	2		
108b		2															
	109	2	Ph			111	61	28	102	62	55	152	58	27	99	52	15
	110	2	Ph(OMe)			100	63	-1	105	63	3	97	63	6	94	61	4
	111	2	indole			75	24	-9	82	25	-2	81	22	1	87	16	-1

**Tableau 6 :** inhibition des différents analogues vis-à-vis de l'IDO1 et de la TDO et viabilité des cellules.

## 2. Interprétation des résultats

Parmi les 32 composés testés à ce jour, 8 ont révélé des activités inhibitrices intéressantes. Les dérivés **90f**, **90'f** et **110** inhibent sélectivement l'IDO1, tandis que cinq composés **40a**, **41a**, **54a**, **101b** et **109** inhibent à la fois les deux enzymes (Tableau 6).

Il nous a paru pertinent pour la discussion des relations structure/activité d'inclure les composés de type tsitsikammamine **112a**, **113a**, **113b**, **114a**, **114b**, **115a**, **116a** et **117b** ayant donné les meilleurs résultats d'inhibition de l'IDO1 dans le test cellulaire à 10  $\mu$ M et de les comparer avec ceux obtenus pour nos quatre composés les plus actifs à 12,5  $\mu$ M (Figure 30).<sup>35</sup>



**Figure 30** : Composés ayant donné les meilleurs résultats dans le test d'inhibition cellulaire de l'IDO, exceptés 113a et 117b, (en bleu : présent travail, en noir : série tsitsikammamine ; a et b correspondent aux régioisomères 1 et 2 respectivement).

	12,5 $\mu$ M (%)		10 $\mu$ M (%)
<b>54a</b>	38	<b>112a</b>	37,3
<b>109</b>	62	<b>113a</b>	17.4
<b>110</b>	63	<b>114a</b>	54.2
<b>41a</b>	42	<b>114b</b>	40,2
<b>41a</b>		<b>115a</b>	40,2
		<b>116b</b>	32
		<b>117b</b>	19.4

*Tableau 7 : activités inhibitrices vis-à-vis de l'hIDO1*

Les dérivés **54a** et **112a** correspondant à des structures ouvertes donnent sensiblement la même activité, la nature du substituant aromatique en bout de chaîne, ou la présence d'un substituant hydroxyle ne semblent pas avoir d'influence sur l'activité. Par contre, l'ajout d'une chaîne  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$  sur le cycle à cinq chaînons de l'indoleidone a conduit dans le cas de **113a** à une réduction de l'activité. Le même phénomène est observé dans le présent travail pour le composé **108a**. Les meilleurs composés dans la série tsitsikammamine **114b** et **115b** comprennent tous deux un motif tricyclique non complètement aromatique. Le composé **39a**, le plus directement comparable à **115a**, avec comme noyau aromatique un indole (Ts) au lieu d'un  $\text{Ph(OMe)}$ , n'est pas actif, indiquant dans ce cas, l'importance de la nature du substituant aromatique.

Le composé tétracyclique **41a**, comportant aussi un cycle à cinq chaînons non complètement aromatique, présente une bonne activité. Ce composé est à associer à **116b** qui a montré une activité comparable. Il est à noter que son régioisomère **116a** avait lui, montré une toxicité cellulaire n'ayant pas permis de déterminer sa capacité inhibitrice vis-à-vis de l'IDO. Aucun des composés pour lesquels le motif tricyclique est complètement aromatique (motif bispyrroloquinone), exceptés **90f** et **90'f**, n'est actif. Ceci est en accord avec des observations précédentes qui ont montré que l'analogue complètement aromatique de **114b** était un moins bon inhibiteur d'IDO1. Les meilleurs composés dans le présent travail sont les dérivés **109** et **110** (Tableau 6). Tous deux comprennent deux substituants sur le deuxième cycle pyrrole et ont des activités supérieures à celles de tous les composés que nous avons étudiés à ce jour. Le remplacement d'un phényle par un  $\text{Ph(OMe)}$  n'a pas eu d'incidence, par contre son

remplacement par un indole diminue l'activité (composé **111**) de moitié comme observé dans le cas des composés **39a/115a**.

Aucun des composés étudiés dans la série tsitsikammamine n'avait montré d'activité vis-à-vis de la TDO. Dans le présent travail, plusieurs s'avèrent intéressants, notamment, **41a**, **54a** et **109**, déjà cités ainsi que **101b** (respectivement, 25, 55, 31, et 30% d'inhibition à 12,5  $\mu$ M). Il semble difficile à ce stade d'établir des grandes lignes de relation structure/activité.

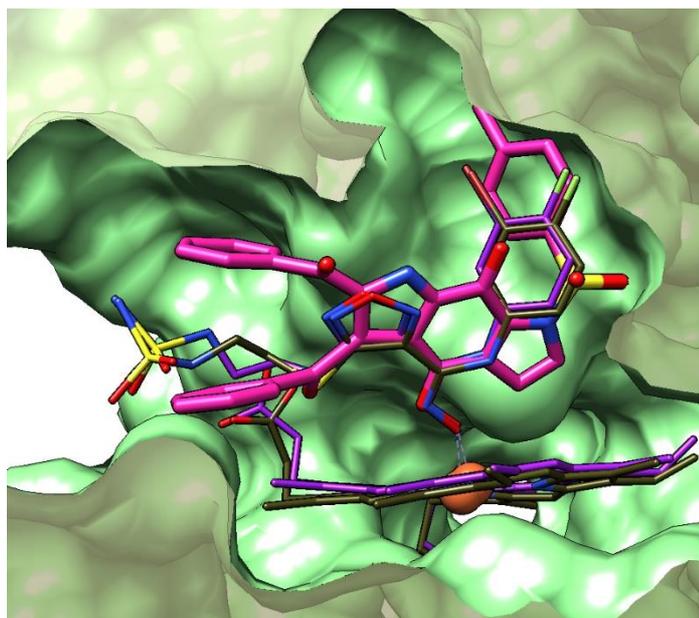
### 3. Etudes de docking

Dans le but de comprendre les affinités observées, nous avons étudié le mode de liaison des composés dans le site actif de l'IDO1 en utilisant deux méthodes d'arrimage moléculaire<sup>73</sup> (docking) et le logiciel Molegro Virtual Docker.<sup>72</sup> Nous rappelons qu'avant de réaliser l'étude d'arrimage moléculaire, une classification des structures présentes dans la PDB<sup>79</sup> et correspondant au domaine UniProt<sup>80</sup> P14902 a été effectuée (cf. Chapitre 3).

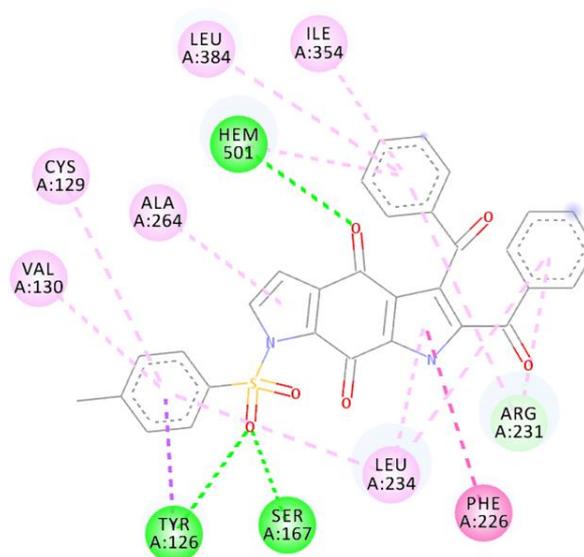
#### Cas du composé **109**

La meilleure pose pour **109** montre de nombreuses similitudes avec les composés de type oxadiazole BBJ et HQS qui sont co-cristallisés dans les structures PDB 6E40 et 6E41 respectivement (Figure 31).<sup>66</sup> Les structures 6E40a et 6E41a font partie du cluster [A] comme 2DT0a.

Deux groupes d'interactions remarquables (liaisons hydrogènes) concernent les azotes de l'hème au voisinage du Fe, et les résidus SER167 et TYR126. Ces interactions sont facilitées par le groupement tosylole qui permet la forme classique en L de nombreux ligands d'IDO1, au-dessus du plan de l'hème. Un autre élément de conformité : les cycles (tosylole et bispyrroloquinone) se trouvent dans un plan similaire à celui adopté par la plupart des ligands IDO1 complexés avec l'hème. Les groupements phényles partagent un placement canonique avec les ligands complexés à IDO1. La figure 32, concernant la molécule **110** montre ce type d'enveloppe commune (**110** vs. **DO9**) à l'entrée du site (partie basse).



**Figure 31** : meilleure pose de docking pour **109** (protocole OPT) (rose, gros trait) dans le site de liaison de 5EK2a (vert clair, surface moléculaire) par rapport aux ligands cristallographiés BBJ (violet, de 6E40a) et HQS (kaki, de 6E41a) après alignement structural.



#### Interactions

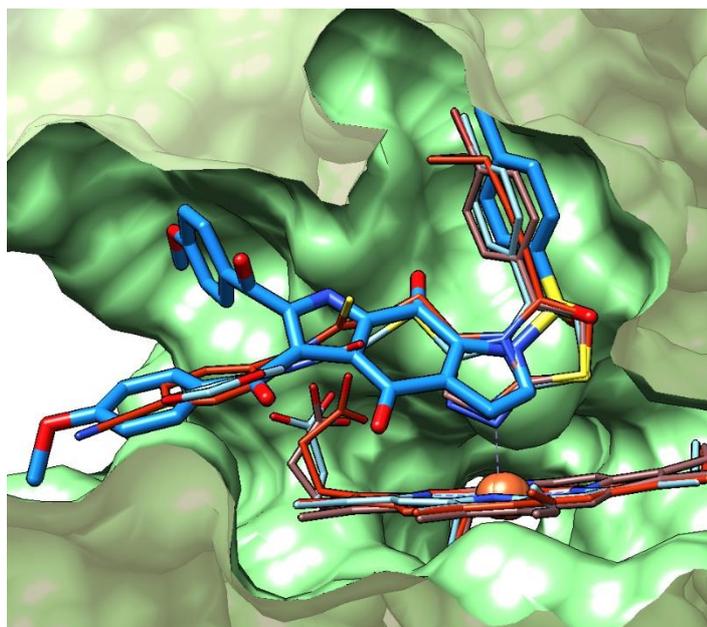
	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Sulfur
	Carbon Hydrogen Bond		Pi-Pi T-shaped
	Pi-Cation		Alkyl
	Pi-Donor Hydrogen Bond		Pi-Alkyl

Il est intéressant de noter qu'un groupement carbonyle de **109** est aligné avec le groupe hydroxylamine de BBJ et HQS qui réalise une liaison dative avec le Fe de l'hème.

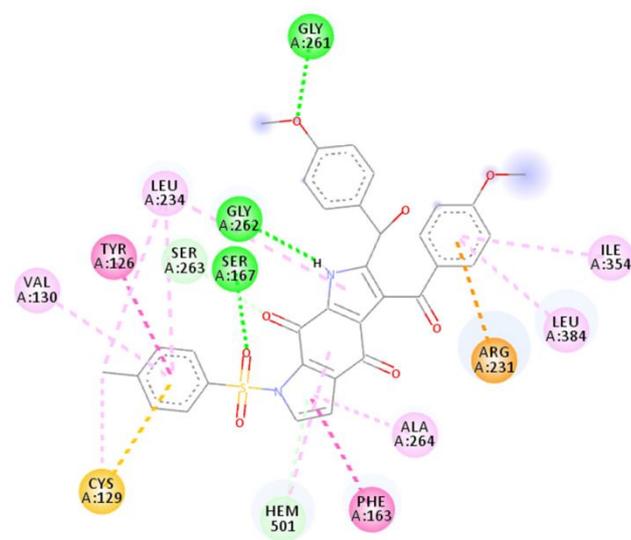
Le positionnement de **109** apparait donc potentiellement conforme et remarquable au vu de ces résultats.

#### Cas du composé **110**

La meilleure pose pour **110** est différente de celle de son analogue **109**, mais partage la forme globale en forme de L, permise par le placement du groupement tosylo à l'intérieur du site de liaison et perpendiculaire à l'hème.



**Figure 32** : meilleure pose de docking pour **110** (protocole OPT) (bleu, gros trait) dans le site de liaison de 5EK2a (vert clair, surface moléculaire) par rapport aux ligands cristallographiés DO9 (rouge, de 6KOFa), PKJ (bleu clair, de 4PK5a) et DYC (marron, de 6KW7a) après alignement structural.



#### Interactions

	Conventional Hydrogen Bond		Pi-Sulfur
	Carbon Hydrogen Bond		Pi-Pi T-shaped
	Pi-Cation		Alkyl
	Pi-Donor Hydrogen Bond		Pi-Alkyl

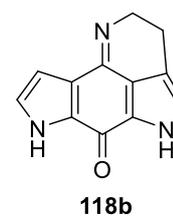
Ce groupement tosyloxy présente la même interaction (liaison hydrogène) avec la SER167. On retrouve certaines similitudes (forme, plans) avec les ligands connus de IDO1, en particulier PKJ de 4PK5a<sup>81</sup>, DO9 de 6KOFa et DYC de 6KW7a<sup>82</sup>.

On notera que ces structures protéiques sont classées dans le même cluster que 5EK2a. Le schéma des interactions est différent de celui de **109**, avec plus d'implication des interactions Pi (cycles, cations, soufre). Trois liaisons hydrogènes sont trouvées pour ce composé avec des interactions supplémentaires Pi-soufre (CYS129) et Pi-Cation (ARG231). La pose correspondante de **110** est plus proche du centre de l'hème que dans le cas de son homologue **109** mais n'est pas impliquée dans une interaction avec l'hème car le groupe carbonyle du motif bispyrroloquinone est trop éloigné. Par contre, l'un des cycles à 5 chaînons de **110** est très bien placé sur le centre de l'hème, en position canonique (généralement occupée par un atome d'azote engageant une liaison de coordination avec le Fe). On note qu'un atome d'azote n'est pas trouvé à cette position pour le composé **110** mais que cet élément sera à prendre en compte pour le design d'un inhibiteur optimal.

Là encore, le positionnement apparaît remarquable, et reproduit des éléments de conformité, notamment vis-à-vis du recouvrement avec PKJ, DO9, DYC et de la position du cycle à 5 chaînons vis-à-vis du Fe de l'hème.

Ces résultats sont inattendus, même si des expériences de placement préliminaires de certains ligands présentant un groupement sulfonamide à l'entrée du site (c'est le cas de BBJ et HQS), nous avaient indiqué qu'il pouvait en être de même avec un groupement tosyle. Il s'agissait d'une potentialité que nous avons utilisée pour la conception des molécules. Les résultats obtenus avec le protocole P1-GPU, sur l'ensemble des ligands ayant une activité, sont moins fins que ceux obtenus par un algorithme implémentant une flexibilité au niveau du site de liaison, mais ils vont tous dans le même sens : le tosyle est placé vers l'intérieur (meilleures poses).

Concernant le rôle crucial que semble avoir le groupement tosyle dans le placement du ligand qui le comporte au niveau du site actif d'IDO1, il nous a paru intéressant de voir comment se positionnerait la molécule **116b** ayant montré plus d'activité que son analogue non tosylé **117b** dans le test cellulaire, ainsi que leur équivalent **118b** non substitué.

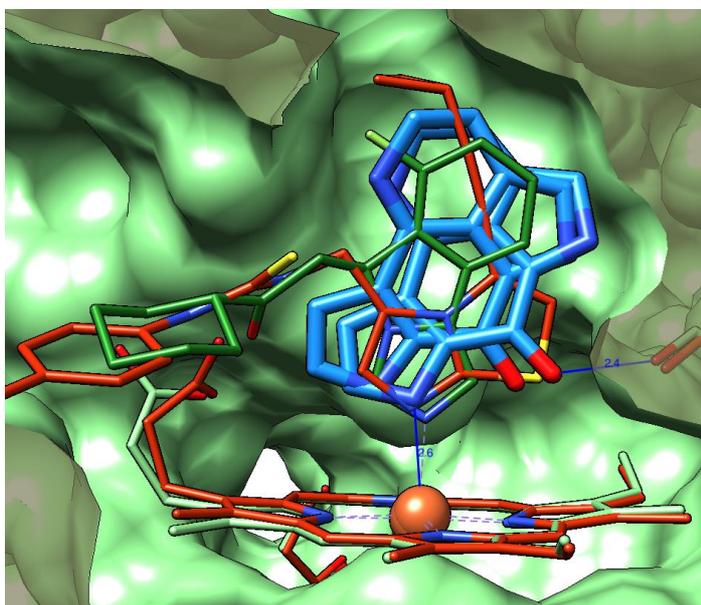


#### Cas de composés basés sur le noyau bispyrroloquinoline

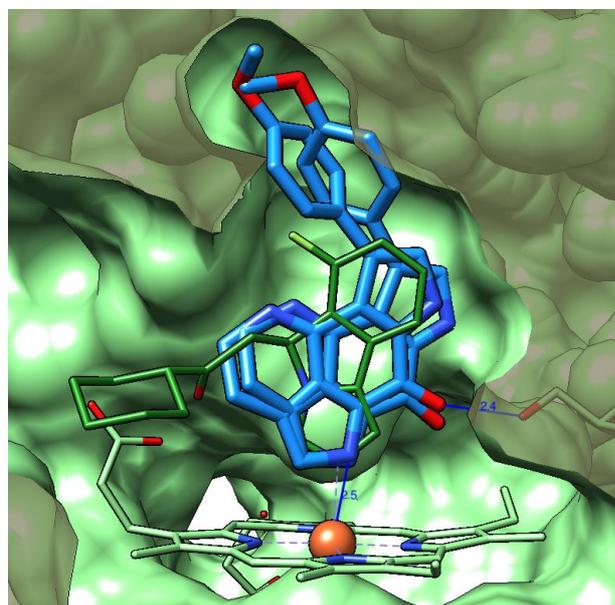
N'ayant pas d'équivalent cristallographique dans ce cas, nous comparerons les résultats avec le 5PJ qui est le ligand co-cristallisé de 5EK2a. Les protocoles d'arrimages ont également été testés, dans cette structure, en termes de contrôles avec ce ligand 5PJ (RMSD égal à 0.62 Å) et le PKJ (RMSD égal à 1.47 Å). Les recouvrements sont excellents, d'une manière générale, le protocole P1-GPU fonctionne bien avec des petites molécules qui sont assimilables à des fragments et le protocole P2-OPT est plus efficace avec les composés de masse moléculaire plus élevée.

La Figure 33 montre les meilleurs résultats d'arrimage (protocole P1-GPU et P1-OPT) pour le composé **118b** mettant en évidence que le noyau bispyrroloquinoline est capable d'adopter une position conforme dans la branche verticale du L et dans le même plan canonique que les ligands cristallographiques. On note que l'azote d'un des deux cycles à 5 est également positionné d'une manière canonique, en vis-à-vis du Fe de l'hème (distance 2.6 Å). On

remarque également la possibilité (à droite) d'une interaction avec la SER167 (2.4 Å entre l'oxygène du groupement carbonyle et celui de l'hydroxyle de la sérine).



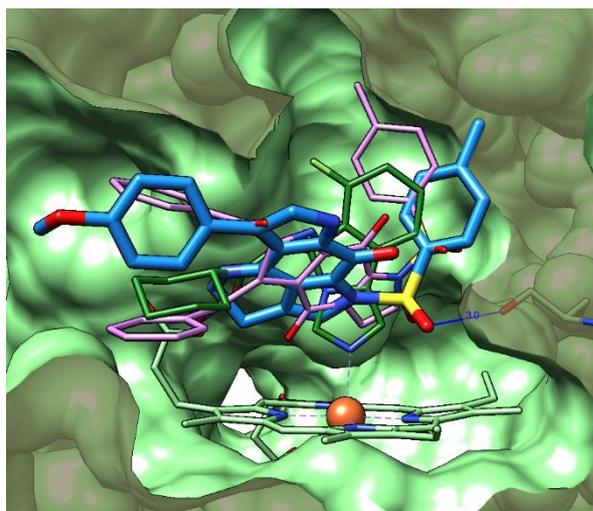
**Figure 33** : composé **118b** : meilleures poses MolDock issues des protocoles P1-GPU et P1-OPT (bleu) par rapport à 5PJ (vert) de 5EK2a et à DO9 (rouge) de 6KOFa. La SER167 est représentée à droite de la figure.



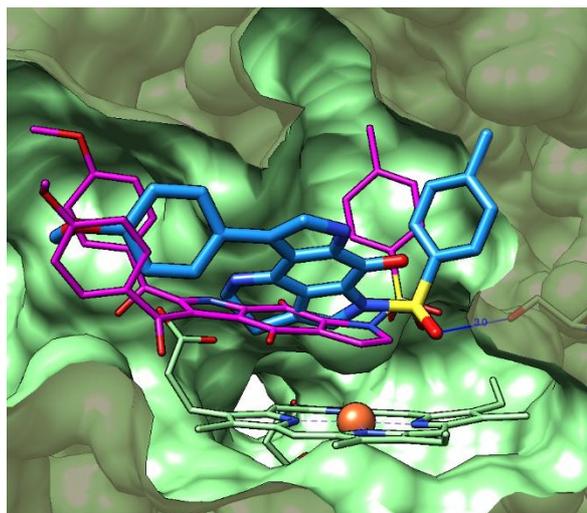
**Figure 34** : composé **117b** : fluctuation des meilleures poses MolDock et Rerank (bleu) par rapport à 5PJ (vert) de 5EK2a. La SER167 est représentée à droite (sous le plan de coupe de la surface moléculaire).

Si on s'intéresse à la perturbation apportée par l'introduction du groupement méthoxy-phényl (composé **117b**, Figure 34) nous constatons que le noyau bispyrroloquinoline est encore capable d'adopter une conformation planaire conforme avec une distance N-Fe de 2.5 Å et O-SER167 de 2.4 Å. Le méthoxy-phényl semble tout à fait capable d'occuper la poche hydrophobe A qui prolonge la topologie en L des ligands. On note tout de même un changement d'orientation du multi-cycle par rapport à **118b** et certaines poses (scores défavorables) sont capables de placer le méthoxy-phényl à l'entrée du site.

Lorsque le groupement tosyl (composé **116b**) s'ajoute à ce schéma, la perturbation devient évidente : les meilleures poses MolDock (figures suivantes) placent le tosyl à l'intérieur du site, avec la potentialité d'une interaction avec SER167. Si on compare avec le dérivé **109** (Figure 35) on constate un alignement des plans cycliques. Si on compare avec le dérivé **110** (Figure 36) on constate une quasi-superposition de la partie soufre-oxygène du tosylo. La distance avec SER167 de 5EK2a est encore de 3 Å.



**Figure 35** : composé **116b** : meilleure pose (bleu) par rapport à 5PJ (vert, 5EK2a) et à la meilleure pose de **109** (rose).



**Figure 36** : composé **116b** : meilleure pose (bleu) par rapport à la meilleure pose de **110** (rose vif).

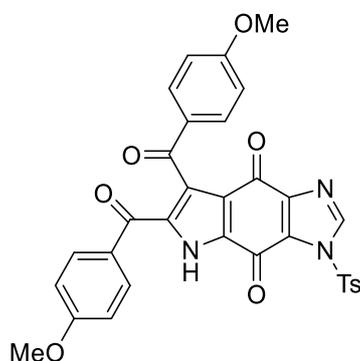
Ce résultat doit être modéré, il faut noter dans ce cas une forte variété d'orientations différentes selon les poses, même si la meilleure pose semble conforme aux résultats obtenus avec le noyau bispyrroloquinone. En tout état de cause, la modélisation du noyau bispyrroloquinone (3 cycles) n'est pas encore totalement aboutie, le paramétrage de P2-OPT est identique à celui utilisé pour les composés basés sur le noyau bispyrroloquinoline (5 cycles) et devra être optimisé pour confirmer ces résultats.

Ce travail nous a permis de mettre à jour deux composés de structures inédites dans la mesure où ils comportent deux substituants sur l'un des deux cycles pyrrole du motif bispyrroloquinone. Ces analogues des produits naturels wakayine et tsitsikammamine sont à ce jour les plus actifs vis-à-vis de l'inhibition d'IDO1 de cette famille de composés.

Les études de docking réalisées sur ces deux composés ont montré un placement en L dans le site catalytique, conforme à ce qui est observé pour d'autres ligands de l'enzyme reportés dans la littérature. Elles mettent aussi en évidence le rôle important du substituant tosyloxy qui permet le positionnement de ces deux composés dans la partie profonde du site (poche hydrophobe A). Les deux substituants Ph ou Ph(OMe), se situent eux dans l'entrée du site ou poche hydrophobe B, la remplissant de façon plus optimale que ce qui avait été observé pour la méthoxytsitsikammamine, composé de référence de cette étude.

Le fait que le positionnement de **110** se fasse sans qu'aucune complexation à l'hème ne puisse

s'opérer, laisse une marge de progression pour le design d'inhibiteurs potentiels. Une première idée pourrait être d'introduire un deuxième atome d'azote au niveau du cycle à cinq chaînons placé sur le centre de l'hème. On pourrait par exemple étudier la molécule suivante:



Cette molécule pourrait ensuite être optimisée en ajoutant la possibilité d'une deuxième interaction impliquant le carbonyle de l'hème, ce type d'interaction étant rencontré dans différents ligands cristallographiques et étant reproductible au niveau de l'arrimage moléculaire.

# Conclusion



Le projet de recherche que nous avons mené dans le cadre de cette thèse avait deux objectifs : aboutir à une synthèse totale de l'alcaloïde marin wakayine et définir de nouveaux inhibiteurs potentiels des enzymes IDO1 et TDO.

La mise au point d'une synthèse totale du produit naturel a nécessité un travail de synthèse important visant à investiguer différentes stratégies pour construire le motif bispyrroloquinone. Ainsi, trois routes ont été étudiées ayant en commun de partir d'une indoledione. Dans les deux premières, le motif indole est introduit via l'autre agent de la réaction : une  $\beta$ -hydroxyamine (2-amino-1-(1H-indol-3-yl)ethan-1-ol) ou une méthyltryptamine (2-(1H-indol-3-yl)-N-méthylethanamine) respectivement, tandis que dans la troisième, ce motif indole est constitutif de l'indoledione (6-(benzylamino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione). Pour le moment, aucun de ces schémas de synthèse n'a mené à la wakayine, même si deux d'entre eux, le premier et le troisième sont toujours en cours d'étude. Le second schéma, bien qu'il constitue une voie originale pour obtenir le motif bispyrroloquinone, a mené à une impasse dans la mesure où il s'est avéré ensuite impossible de le déméthyliser. Néanmoins, cette étude a généré un grand nombre d'intermédiaires qui sont autant d'inhibiteurs potentiels à évaluer.

L'étude *in silico* des interactions ligand/protéine à partir des données relatives aux structures RX des différents complexes reportés dans la PDB à ce jour (44 complexes décrits) a permis de mettre à jour l'étude structurale d'IDO1 et de conduire des études de docking afin d'optimiser le design d'inhibiteurs potentiels de l'enzyme.

Différentes séries d'analogues des produits naturels, inhibiteurs potentiels d'IDO1 et de TDO ont pu être obtenus sur la base des méthodes mises en œuvre pour la synthèse totale de la wakayine.

Une partie (les autres sont en cours) des produits synthétisés dans cette étude a été testée vis-à-vis de l'inhibition de l'IDO1 et de la TDO. Deux analogues des produits naturels wakayine et tsitsikammamine sont à ce jour les meilleurs inhibiteurs d'IDO1 connus dans cette famille de composés.

Les études de docking réalisées sur ces deux composés ont montré un placement en L dans le site catalytique de l'enzyme et mettent aussi en évidence le rôle important du substituant tosylé et la bonne occupation de la poche hydrophobe B située en entrée du cycle. Cette étude permet de dégager des lignes fortes pour définir de nouvelles structures d'inhibiteurs potentiels.



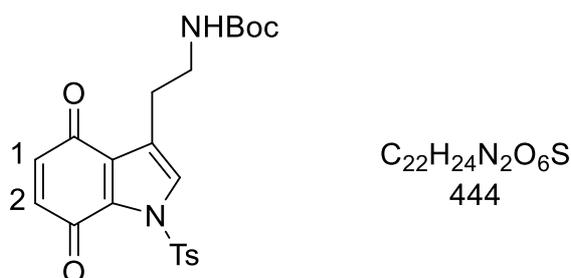
# **Partie expérimentale**



## Chemistry

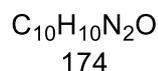
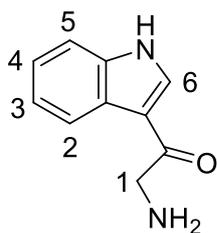
<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were performed on Bruker Avance 300 or Avance 500 (cryoprobe TCI <sup>1</sup>H {<sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P}) spectrometers with the chemical shifts of the remaining protons of the deuterated solvents serving as internal standards. IR spectra were obtained on a Perkin-Elmer 883 spectrophotometer. Mass spectra were recorded on a GCT premier waters mass spectrometer for CI and High resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a UPLC Xevo G2 Q TOF Waters spectrometer for ESI. Reagents were purchased from commercial sources and used as received. Flash-chromatography was performed on silica gel (15-40 μM) by means of the solvent systems indicated below.

### tert-butyl (2-(4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (1)



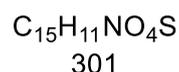
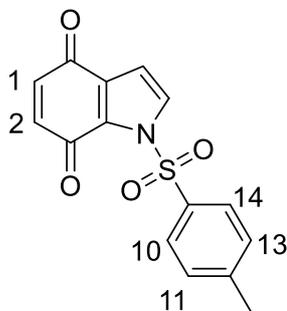
To a solution of compound **28** (4 g, 8.4 mmol) in a mixture CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O (280 mL: 140 mL) was added CAN (13.88 g, 25.3 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 15 min and was concentrated under vacuum. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL) was added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted (2 x 200 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give the expected product as an orange oil (3,60 g, 95%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.40 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Ts), 2.95 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N, J = 6.8 Hz), 3.39 (td, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N, J = 6.8 and 7.2 Hz), 4.71 (s, NH), 6.52 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 10.2 Hz), 6.58 (d, 1H, C<sub>1</sub>H and C<sub>2</sub>H, J = 10.2 Hz), 7.34 (d, 2H, C<sub>13</sub>H and C<sub>14</sub>H, J = 8.2 Hz), 7.65 (s, 1H, C = CHN), 8.01 (d, 2H, C<sub>12</sub>H and C<sub>15</sub>H, J = 8.2 Hz). <sup>13</sup>C R.MN (CDCl<sub>3</sub>): 21.77, 25.88, 28.36 (3C), 40.13, 86.40, 122.80, 128.06, 129.11 (2C), 129.68 (2C), 133.81, 135.65, 136.19, 137.05, 137.88, 146.25, 155.91, 174.74, 184.40. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3380, 1755, 1706, 1663, 1365, 1178 cm<sup>-1</sup>. MS (EI) m/z: 444.14 (100.0%); 445.14 (23.8%); 446.13 (4.5%).

### 2-amino-1-(1H-indol-3-yl)ethan-1-one (8)



To a suspension of compound **32** (1 g, 3.65 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) was added dropwise over a period of 1 h, TFA (5 mL). Stirring was maintained for 30 min. additional. Then the solution was concentrated under vacuum. EtOAc (50 mL) and saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution (5 mL) were added and the mixture was vigorously stirred for 10 min. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated to give the expected compound as a coloured oil (630 mg, 100 %).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 3.93 (s, 2H,  $\text{C}_1\text{H}$ ); 7.16-7.23 (m, 2H,  $\text{C}_3\text{H}$  and  $\text{C}_4\text{H}$ ); 7.47 (d, 1H,  $\text{C}_5\text{H}$ ,  $J = 7.3$  Hz); 8.17 (d, 1H,  $\text{C}_2\text{H}$ ,  $J = 7.0$  117); 8.33 (s, 1H,  $\text{C}_6\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 31.26, 112.71, 114.68, 121.71, 122.30, 123.33, 125,87, 133.90, 137.02, 207.17. IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 3340, 1694  $\text{cm}^{-1}$ . MS (EI)  $m/z$ : 174 (100%), 175(10%).

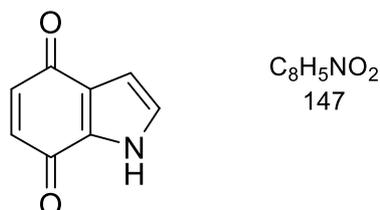
### 1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (9)



To a solution of compound **30** (1.25 g, 3.7 mmol) in a mixture  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (50 mL: 25 mL) was added CAN (6.14 g, 11.2 mmol). The mixture was stirred at RT for 30 min and was concentrated under vacuum.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) was added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted (2 x 50 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash-chromatography (PE/ EtOAc 80: 20) to give quantitatively the expected compound as a yellow solid (1.11 g), mp 120  $^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.42 (s, 3H, PhTs); 6.53 (d, 1H,  $\text{C}_1\text{H}$  or  $\text{C}_2\text{H}$ ,  $J = 10.3$  Hz); 6.59 (d, 1H,  $\text{C}_1\text{H}$  or  $\text{C}_2\text{H}$ ,  $J = 10.3$  Hz); 6.72 (d, 1H,  $\text{CH}=\text{CHNTs}$ ,  $J = 3.1$  Hz); 7.34

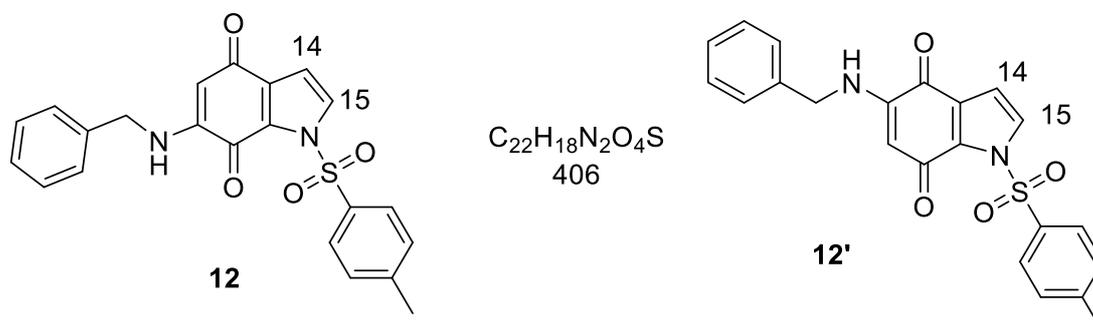
(d, 2H, C<sub>11</sub>H and C<sub>13</sub>H, J = 8.3 Hz); 7.79 (d, 1H, CH=CHNTs, J= 3.7 Hz); 8.02 (d, 2H, C<sub>10</sub>H and C<sub>14</sub>H, J = 8.3 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.87, 107.84, 129.23, 129.55, 129.74, 129.79 (2C), 130.70 (2C), 133.78, 135.79, 146.46, 174.82, 183.03. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3468, 1670, 1383, 1134 cm<sup>-1</sup>. MS (IE): m/z 301 (M<sup>+</sup>, 4%), 237 (49), 222 (56), 155(100).

### 1H-indole-4,7-dione (9')



To a solution of compound **24** (4 g, 2.2 mmol) in a CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O mixture (280 mL / 140 mL) was added CAN (3.6 g, 6.6 mmol). The reaction medium was stirred at room temperature for 15 min and concentrated under vacuum. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL) was added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted (2 x 200 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to give the expected product as an orange oil (3.2g, 95%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 6.66 (d, 1H, CH = CHNTs, J = 2.0 Hz); 6.74 - 6.70 (m, 2H); 7.11 (t, 1H, CH = CHNTs J = 2.7Hz); 9.75 (br s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 107.0, 123.4, 123.8, 128.1, 135.8, 137.2, 180.8, 184.9. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3232, 2924, 1643, 1495, 1389, 1103, 1082, 1050, 843, 751 cm<sup>-1</sup>. MS (EI) m/z: 147.03 (100.0%), 148.04 (8.7%).

### 6-(benzylamino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (12) and 5-(benzylamino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (12')

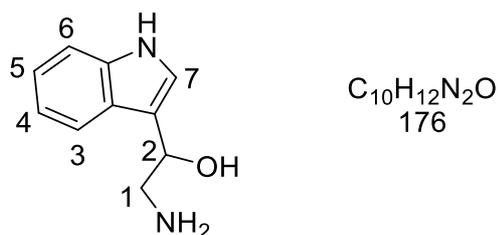


To a solution of benzylamine (711 mg, 6.64 mmoles) in EtOH (48 mL), was added dropwise compound **9** (1 g, 3.32 mmol) in EtOH (24 mL). The mixture was stirred for 2 h. and concentrated over vacuum. The crude product was purified by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give the regioisomers (1.14 g, 84%).

(**12**) fuchsia solid (23%), mp 73 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 4.28 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, J = 6 Hz); 6.09 (s, 1H, CN=CH-C=O); 6.76 (d, 1H, C<sub>14</sub>H, J = 3 Hz); 7.31-7.42 (m, 7H, Ph and Ts); 7.84 (d, 1H, C<sub>15</sub>H, J = 3 Hz); 8.03 (d, 2H, Ts, J = 9 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.80, 47.30, 97.51, 108.62, 126.93, 127.77 (2C), 128.20, 128.93 (2C), 129.0 (2C), 129.79 (2C), 131.31, 133.93, 134.35, 135.68, 146.23, 147.86, 170.23, 181.48. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3286, 3139, 1672, 1617, 1373, 1132. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 407.1066, found 407.1066.

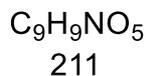
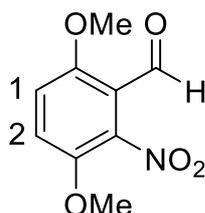
(**12'**) fuchsia solid (61%), mp 77 °C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): 2.5 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 4.29 (d, 2H, CH<sub>2</sub>-NH, J = 6 Hz); 6.09 (s, 1H, CN=CH-C=O); 6.72 (d, 1H, C<sub>14</sub>H, J = 3 Hz); 7.22-7.37 (m, 7H, Ph and Ts), 7.73 (d, 1H, C<sub>15</sub>H, J = 3 Hz), 8.05 (d, 2H, Ts, J = 9 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.80, 47.29, 97.51, 108.62, 126.94, 127.77 (2C), 128.18, 128.93 (2C), 129.99 (2C), 129.79 (2C), 131.31, 133.93, 134.34, 135.70, 146.23, 147.86, 170.22, 181.46. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3364, 1675, 1595, 1370, 1173. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 407.1066, found 407.1068.

### 2-amino-1-(1H-indol-3-yl)ethan-1-ol (**20**)



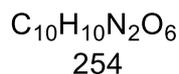
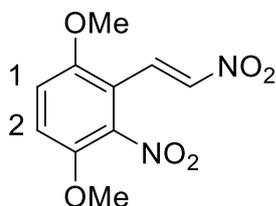
To a solution of ketoamine **33** (2 g, 11.4 mmol) in MeOH (125 mL) was added portionwise NaBH<sub>4</sub> (2.2 g, 57 mmol). The mixture was stirred for 3 h and water (150 mL) was added. After concentration over vacuum to remove MeOH, the mixture was extracted by CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 150 mL). The organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give the expected compound as a white solid (1.6 g, 79 %), mp 97 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 2.82 (m, 2H, NH<sub>2</sub>); 4.72 (m, 1H, C<sub>1</sub>H); 4.94 (m, 1H, C<sub>1</sub>H); 5.77 (br s, 1H, OH); 6.97 (t, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 8 Hz); 7.04 (td, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 8 Hz); 7.20 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 2.2 Hz); 7.35 (d, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 8 Hz); 7.62 (d, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 8 Hz); 10.87 (br s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 47.59, 67.01, 111.94, 117.13, 118.84, 119.61, 121.37, 122.78, 126.17, 136.89. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3633, 3340, 1694 cm<sup>-1</sup>. MS (ED): m/z 176.09 (100.0%), 177.10 (10.8%).

### 3,6-dimethoxy-2-nitrobenzaldehyde (**22**)



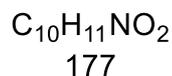
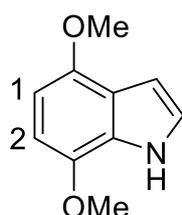
To a solution of 2,5-dimethoxybenzaldehyde (100 g, 0.6 mol) in glacial acetic acid (600 mL) was added dropwise so that the temperature does not rise above 10 °C, 100 % HNO<sub>3</sub> (61.5 mL, 1.44 mol). After 1h30 stirring at 15 °C, the mixture was filtered. The precipitate was washed with minimum amount of cold glacial acetic (100 mL) and put in suspension in EtOH (500 mL). The mixture was refluxed for 15 min. and let cool overnight. The precipitate was filtered and washed with isopropanol to give the expected compound as a pale-yellow (106 g, 83 %), mp 166 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.93 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 7.08 (d, 1H, C<sub>1</sub>H, J = 9 Hz); 7.25 (d, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 9 Hz); 10.34 (s, 1H, CHO). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 56.83, 57.30, 114.16, 116.27, 116.73, 120.03, 144.60, 155.36, 186.14. IR (CHCl<sub>3</sub>): 1617, 1694 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 211 (M<sup>+</sup>, 100%); 193 (7); 135 (76).

### (E)-1,4-dimethoxy-2-nitro-3-(2-nitrovinyl) benzene (**23**)



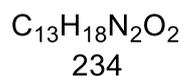
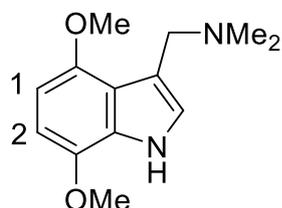
A solution of compound **22** (80 g, 0.38 mol), ammonium acetate (50.8 g, 0.66 mol) and nitromethane (104 mL, 1.91 moles) in glacial acetic acid (230 mL) was warmed at 80 °C for 4 h. Isopropanol (150 mL) was then added and the heating was maintained 30 min. The suspension was let at RT for 2 h more and filtered. The precipitate was washed with isopropanol and dried to give the expected compound as an orange solid (83 g, 86%), mp 190 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 3.88(s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.96 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 7.05 (d, 1H, C<sub>1</sub>H, J = 9.3 Hz); 7.14 (d, 1H, C<sub>2</sub>H J = 9.3 Hz); 7.72 (d, 1H, CH=CHNO<sub>2</sub> J = 13.6 Hz); 7.95 (d, 1H, CH=CHNO<sub>2</sub>, J = 13.6 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 56.72, 57.19, 112.21, 113.23, 116.58, 127.36, 142.48, 144.75, 152.85 (2C). IR (CHCl<sub>3</sub>): 1642 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 254 (M<sup>+</sup>, 100%); 179 (45); 165(49); 150 (66); 108 (51).

#### 4,7-dimethoxy-1H-indole (24)



To a suspension of compound **23** (30 g, 0.12 mole) and ammonium formate (37.2 g, 0.59 mol) in EtOH (500 mL) was added at 0 °C, 15% Pd/C (30 g.). The mixture was refluxed for 1 h. After cooling, the mixture was filtered and the filtrate was concentrated over vacuum. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL) was added to the residue and the solution so-obtained was washed with water (3 x 200 mL). After drying over MgSO<sub>4</sub> and concentration over vacuum, the crude product was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 90: 10) to give the expected compound as a white solid (17.5 g, 84%), mp 127 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 3.92 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.39 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.4Hz); 6.52 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.4 Hz); 6.63 (dd, 1H, CH=CHNH, J = J' = 2.4 Hz); 7.11 (dd, 1H, CH=CHNH, J = J' = 2.4 Hz); 8.4 (br. s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 55.77 (2C), 98.83, 100.38, 101.57, 120.06, 122.75, 127.60, 141.21, 147.83. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3482, 2910, 1527, 1348 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 177 (M<sup>+</sup>, 98%); 162 (100).

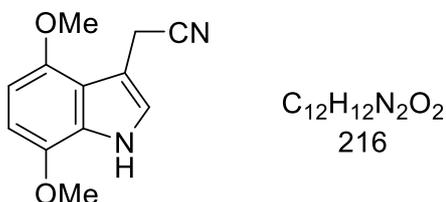
#### 1-(4,7-dimethoxy-1H-indol-3-yl)-N,N-dimethylmethanamine (25)



To a solution of 50% of dimethylamine in water (3.81 mL, 29.94 mmol), acetic acid (4 mL) and 37% formaldehyde in water (2.19 mL, 28.81 mmol) was added compound **24** (5 g, 28.25 mmol). The reaction was stirred vigorously for 3 h. After this time, the viscous solution was poured into 10% NaOH/ice (50 mL: 50 g). The reaction media was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to give the product as an oil (6.61 g, 100%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): 2.66 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 4.18 (s, 2H, CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>); 4.21 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.22 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.67 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.0 Hz); 6.80 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.0 Hz); 7.24 (d, 1H, C=CHN, J = 2.1 Hz); 9.65 (br s, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 43.53 (2C), 53.86, 55.52, 55.90, 98.83, 101.27, 112.1, 118.76, 124.52, 128.05, 141.09, 148.55. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3019, 1720, 1519 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 234.14 (100.0%); 235.14

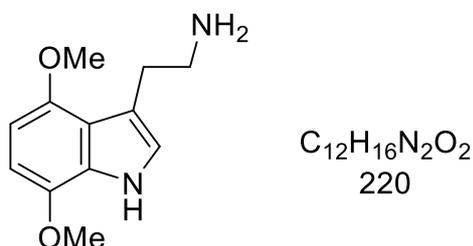
(14.1%).

### 2-(4,7-dimethoxy-1H-indol-3-yl)acetonitrile (26)



To a suspension of compound **25** (6.61 g, 28.25 mmol) in  $CH_2Cl_2$  / toluene mixture (80: 150 mL) was added methyl iodide (3.7 mL, 56.49 mmol). The reaction was stirred at room temperature overnight. The solution was concentrated under reduced pressure and the residue was dissolved in THF (130 mL).  $TMSCN$  (4.91 mL, 42.37 mmol) was first added and then with vigorous stirring,  $TBAF$  (1N in THF, 85 mL, 85 mmol) was also added. After 1 h of additional stirring, the solution was evaporated under reduced pressure and the residue dissolved in  $CH_2Cl_2$  (200 mL). This organic layer was washed with water (3x100 mL), dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The residue was purified by flash chromatography ( $CH_2Cl_2$ ) to give the expected product as a white solid (5.67 g, 94%), mp: 140 ° C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 3.87 (s 3H,  $OCH_3$ ); 3.90 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 4.04 (s, 2H,  $CH_2CN$ ); 6.35 (d, 1H,  $C_1H$  or  $C_2H$ ,  $J = 8.2$ , Hz); 6.51 (d, 1H,  $C_1H$  or  $C_2H$ ,  $J = 8.2$  Hz); 7.10 (s, 1H,  $C=CHN$ ); 8.33 (s br, NH).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 15.78, 55.49, 55.72, 98.95, 102.24, 105.80, 117.58, 119.15, 121.27, 128.29, 140.94, 148.59. IR ( $CDCl_3$ ): 3334, 2260, 1520, 1353, 1258, 1089  $cm^{-1}$ . MS (EI) m/z: 216.09 (100.0%); 217.09 (13.0%).

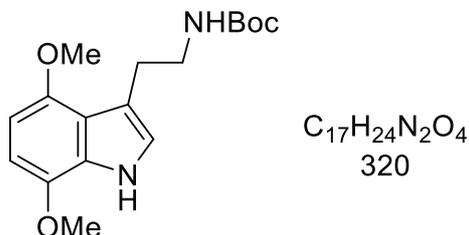
### 2-(4,7-dimethoxy-1H-indol-3-yl)ethan-1-amine (27)



To a suspension of  $LiAlH_4$  (550 mg, 14.5 mmol) in  $Et_2O$  (5 mL) was added dropwise compound **26** (600 mg, 2.42 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (20 mL). The solution was stirred for 15 min.  $H_2O$  (0.5 mL) then 10%  $NaOH$  (0.5 mL) and again water (1 mL) were added. Stirring was continued for 10 min and the mixture was filtered on celite. The filtrate was evaporated under reduce pressure

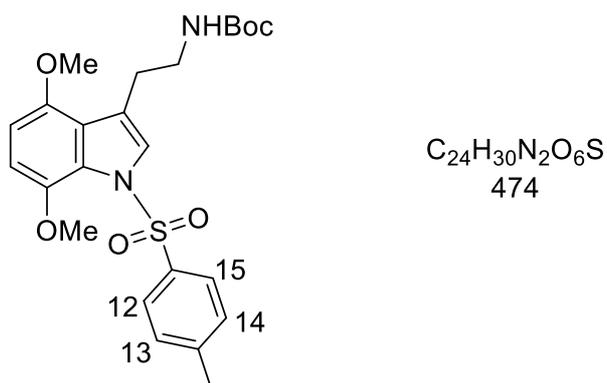
to give the expected product as an oil (500 mg, 95%). The unstable product **27** was directly involved in the next reaction.

**tert-butyl (2-(4,7-dimethoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (28)**



To a solution of compound **27** (1.76 g, 8.02 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (45 mL) was added di-*tert*-butyl dicarbonate (1.75 g, 8.02 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight and it was filtered to give the expected compound as a white crystal (2.30 g, 90%), mp: 180 ° C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 1.40 (s, 9H,  $(CH_3)_3$ ); 3.02 (t, 2H,  $CH_2-CH_2-N$ ,  $J = 6.5$  Hz); 3.42 (td, 2H,  $CH_2-CH_2-N$ ,  $J = 6.8$  and 6.5 Hz); 3.88 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 3.90 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 4.85 (s large, NH); 6.34 (d, 1H,  $C_1H$  or  $C_2H$ ,  $J = 8.2$  Hz); 6.49 (d, 1H,  $C_1H$  or  $C_2H$ ,  $J = 8.2$  Hz); 6.89 (d, 1H,  $C=CHN$ ,  $J = 2.1$  Hz); 8.21 (br. s, NH).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 26.84, 28.42 (3C), 42.07, 55.33, 55.68, 78.78, 98.30, 101.49, 114.22, 118.52, 121.08, 128.51, 141.00, 148.90, 156.16. IR (KBr): 3263, 1690, 1500, 1257  $cm^{-1}$ . MS (EI) m/z: 320.17 (100.0%), 321.18 (18.4%), 322.18 (1.6%).

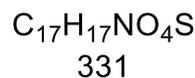
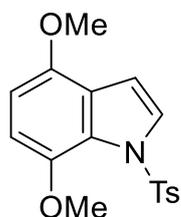
**tert-butyl (2-(4,7-dimethoxy-1-tosyl-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (29)**



To a solution of compound **28** (260 mg, 0.69 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was added under  $N_2$ , NaH (60% dispersed in oil, 55 mg, 1.39 mmol). After 5 minutes of stirring at room temperature, di-*tert*-butyl dicarbonate (227 mg, 1.04 mmol) was added and stirring was maintained for 1 h. Cold water (1 mL) and  $CH_2Cl_2$  (10 mL) were added. The organic phase

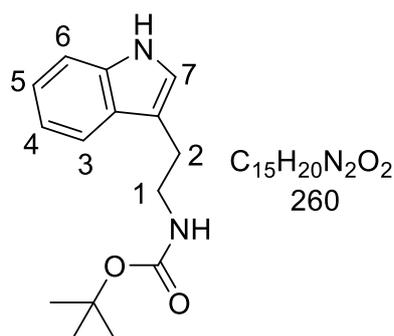
was separated, washed with water (3x10 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 99: 1) to give the compound as a yellow oil (200 mg, 60%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.42 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Ts); 2.99 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>NHBoc, J = 6.2 Hz); 3.44 (td, 2H, CH<sub>2</sub>-NHBoc, J = 6.2 and 6.4 Hz); 3.60 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.73 (br. s, NHBoc); 6.48 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.8 Hz); 6.57 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.8 Hz); 7.23 (d, 2H, C<sub>13</sub>H and C<sub>14</sub>H, J = 8.2 Hz); 7.52 (s, 1H, C = CHNTs); 7.69 (d, 2H, C<sub>12</sub>H and C<sub>15</sub>H, J = 8.2 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.67, 27.13 (3C), 28.49, 41.06, 55.62, 56.48, 79.09, 103.47, 107.89, 117.78, 122.71, 125.45, 126.62, 127.22 (2C), 129.39 (2C), 137.49, 142.04, 144.06, 148.66, 156.05. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3453, 1707 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 474.18 (100.0%); 475.19 (26.0%); 476.18 (4.5%).

#### 4,7-dimethoxy-1-tosyl-1H-indole (30)



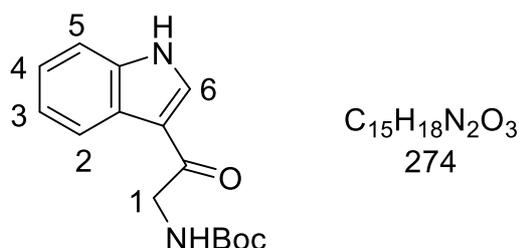
To a solution of compound **24** (2 g, 11.3 mmol) in anhydrous THF (100 mL) was added under nitrogen atmosphere NaH (60 %, dispersed in oil, 1.81 g, 45.19 mmol). After 10 min stirring, *p*-tosylsulfonyl chloride (3.2 g, 16.95 mmol) was added and stirring continued for 1 h. Water (50 mL) was first added carefully and then CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL). The organic layer was separated, washed with water (3x100 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. The crude product was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 90: 10) to give quantitatively the expected compound as a yellow oil (3.75 g). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.36 (s, 3H, PhTs); 3.62 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.48 (d, 1H, C<sub>1</sub>H J = 8.6 Hz); 6.56 (d, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 8.6 Hz); 6.74 (d, 1H, CH=CHNTs, J = 3.7 Hz); 7.22 (d, 2H, C<sub>11</sub>H et C<sub>13</sub>H, J = 8.4 Hz); 7.70 (d, 2H, C<sub>10</sub>H and C<sub>14</sub>H, J = 8.4 Hz); 7.73 (d, 1H, CH=CHNTs, J = 3.7 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.67, 55.84, 56.45, 103.30, 104.10, 107.60, 123.94, 125.73, 127.37 (2C), 137.32, 142.03, 144.21, 147.40. IR (CHCl<sub>3</sub>): 2926, 1499, 1363, 1176 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 331 (M<sup>+</sup>, 85%); 176 (100); 148 (99); 133 (95).

**tert-butyl (2-(1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (31)**



To a solution tryptamine (5g, 31.2 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (100 mL), was added at 10 °C,  $Et_3N$  (13 mL, 93.62 mmol) and  $Boc_2O$  (7.49 mg, 34.33 mmol). After 1h30 stirring, the organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with  $CH_2Cl_2$  ( $3 \times 100$  mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over  $MgSO_4$ , and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography ( $CH_2Cl_2$ ) to give the product as a white solid (6.75g, 83%), mp: 96°C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 1.46 (s, 9H,  $(CH_3)_3$ ); 2.95 (t, 2H,  $C_2H$ ,  $J = 6.7$  Hz); 3.45 (m, 2H,  $C_3H$ ); 4.65 (br s, 1H, NH); 6.97 (br s, 1H,  $C_7H$ ); 7.10 (t, 1H,  $C_4H$ ,  $J = 7.0$  Hz); 7.19 (t, 1H,  $C_5H$ ,  $J = 7.3$  Hz); 7.32 (d, 1H,  $C_6H$ ,  $J = 7.9$  Hz); 7.59 (d, 1H,  $C_3H$ ,  $J = 7.9$  Hz); 8.26 (br. s, 1H, NH Ar).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 40.9, 79.1, 111.2, 112.9, 118.7, 119.3, 122.0, 122.1, 127.5, 136.4, 156.0. IR  $cm^{-1}$  1696, 2953, 3367. MS (m/z): 260 (M+).

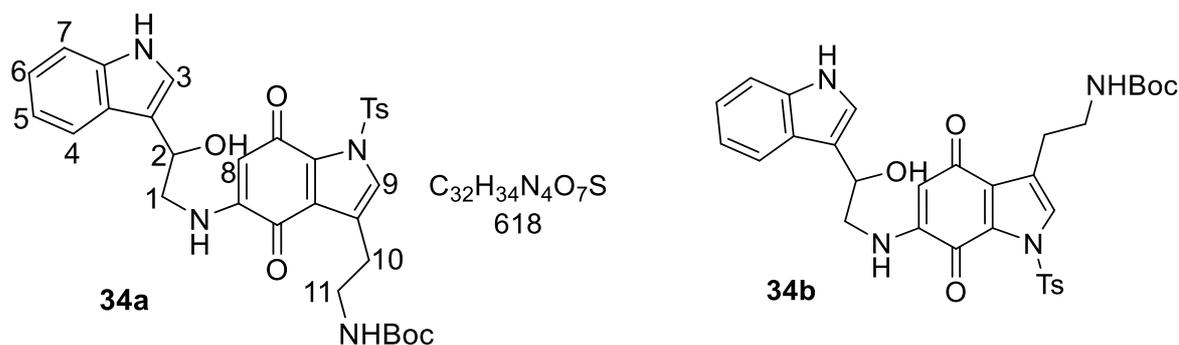
**tert-butyl (2-(1H-indol-3-yl)-2-oxoethyl)carbamate (32)**



To a solution of **31** (2.4 g, 9.5 mmol) in THF/ $H_2O$  (64 mL: 8 mL) was added DDQ (4.43g, 19 mmol). The mixture was stirred for 1h30 at room temperature. The solvent was removed under vacuum and NaOH 0.1M (90 mL) was added. The mixture was filtered and the precipitate was washed with water and  $Et_2O$  to give quantitatively the product as a white solid, mp 197 °C.  $^1H$  NMR( $CDCl_3+CD_3OD$ ): 1.39 (s, 9H,  $(CH_3)_3$ ); 4.40 (s, 2H,  $C_1H$ ); 7.15-7.19 (m, 2H,  $C_3H$  and  $C_4H$ ); 7.33-7.38 (m, 1H,  $C_5H$ ); 7.91 (s, 1H,  $C_6H$ ); 8.14-8.18 (m, 1H,  $C_2H$ ).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3+CD_3OD$ ): 27.9, 46.7, 79.7, 111.7, 114.3, 121.3, 122.2, 123.1, 125.1, 132.3, 136.5,

156.3, 190.0. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3327, 3259, 1687, 1646 cm<sup>-1</sup>. MS (EI) m/z: 274.13 (100.0%), 275.14 (16.2%), 276.14 (1.2%).

**tert-butyl (2-(5-((2-hydroxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (34a)** and **tert-butyl (2-(6-((2-hydroxy-2-(1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (34b)**



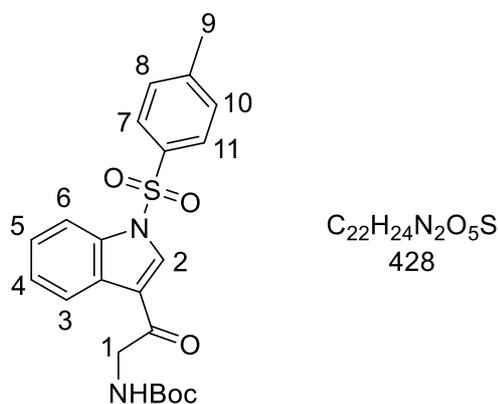
To a suspension of hydroxyamine **1** (610 mg, 3.43 mmol) in EtOH (12 mL) was added dropwise a solution of indole **20** (760 mg, 1.71 mmol) in EtOH (24 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 98: 2) to give the two isomers (1.06g, 70%)

**34a:** <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.36 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 3.22 (q, 2H, C<sub>10</sub>H, J = 6 Hz); 3.40 (t, 2H, C<sub>11</sub>H, J = 6 Hz); 3.61 (m, 1H, C<sub>1</sub>H); 4.09 (q, 1H, C<sub>1</sub>H, J = 5.2 Hz); 5.31 (s, 1H, C<sub>8</sub>H); 5.38 (m, 1H, C<sub>2</sub>H); 6.85 (t, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 6 Hz); 6.96 (t, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 8 Hz); 7.06 (m, 2H, C<sub>5</sub>H and C<sub>4</sub>H); 7.30 (d, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 2.3 Hz); 7.35 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 8 Hz); 7.49 (d, 2H, Ts); 7.81 (s, 1H, C<sub>9</sub>H); 7.96 (d, 2H, Ts); 10.95 (br. s, 2H, NH Ar). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 21.66, 25.67, 28.70(3C), 49.68, 55.39, 64.86, 77.95, 96.69, 111.92, 116.88, 118.92, 119.64, 121.52, 122.87, 123.60, 126.25, 127.26, 128.44 (2C), 130.06, 130.44 (2C), 130.78, 134.19, 136.82, 146.56, 148.53, 156.08, 170.38, 182.20. IR (KBr): 3556, 3202, 1635, 1502, 1165 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z calcd: 619.2250 found 619.2251.

**34b:** <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.35 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 3.22 (q, 2H, C<sub>10</sub>H, J = 6 Hz); 3.40 (t, 2H, C<sub>11</sub>H, J = 6 Hz); 3.61 (m, 1H, C<sub>1</sub>H); 4.09 (q, 1H, C<sub>1</sub>H, J = 5.2 Hz); 5.31 (s, 1H, C<sub>8</sub>H); 5.38 (m, 1H, C<sub>2</sub>H); 6.85 (t, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 6 Hz); 6.96 (t, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 8 Hz); 7.06 (m, 2H, C<sub>5</sub>H and C<sub>4</sub>H); 7.30 (d, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 2.3 Hz); 7.35 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 8 Hz); 7.30 (d, 2H, Ts); 7.81 (s, 1H, C<sub>9</sub>H); 7.92 (d, 2H, Ts); 10.92 (br. s, 2H, NH Ar). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 21.66,

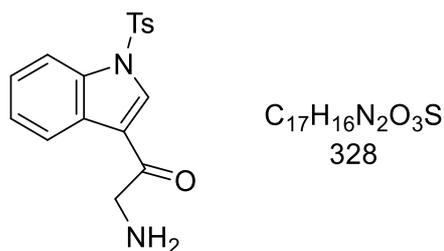
25.67, 28.70(3C), 49.68, 55.39, 64.86, 77.95, 96.69, 111.92, 116.88, 118.92, 119.64, 121.52, 122.87, 123.60, 126.25, 127.26, 128.44 (2C), 130.06, 130.44 (2C), 130.78, 134.19, 136.82, 146.56, 148.53, 156.08, 170.38, 182.20. IR (KBr): 3565, 3220, 1653, 1520, 1156  $\text{cm}^{-1}$ . MS (EI):  $m/z$  calcd: 619.2250 found 619.2253.

**tert-butyl (2-oxo-2-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (35)**



To a solution of **32** (3 g, 10.95 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 mL), was added  $\text{Et}_3\text{N}$  (4.6 mL, 34.1 mmol) and DMAP (133 mg, 1.09 mmol). After 5 min stirring, *p*-toluenesulfonyl chloride was added (3.2 g, 16.4 mmol). The reaction was stirred for 30 min. The solution was washed with water (3 x 100 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under vacuum to give the product as a yellow powder (1.01 g, 73%), mp 146  $^\circ\text{C}$ .  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ ): 1.48 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ); 2.36 (s, 3H,  $\text{C}_9\text{H}$ ); 4.57 (d, 2H,  $\text{C}_1\text{H}$ ,  $J = 4.7$  Hz); 5.52 (br. s, 1H, NH); 7.28 (d, 2H,  $\text{C}_8\text{H}$  and  $\text{C}_{10}\text{H}$ ,  $J = 8.2$  Hz); 7.42-7.27 (m, 2H,  $\text{C}_4\text{H}$  and  $\text{C}_5\text{H}$ ); 7.84 (d, 2H,  $\text{C}_7\text{H}$  and  $\text{C}_{11}\text{H}$ ,  $J = 8.2$  Hz); 7.96 (d, 1H,  $\text{C}_6\text{H}$   $J = 7.5$  Hz); 8.27-8.24 (m, 1H,  $\text{C}_3\text{H}$ ); 8.32 (s, 1H,  $\text{C}_2\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ ): 21.6, 28.3, 47.8, 79.7, 113.1, 118.5, 122.7, 124.9, 125.9, 127.1, 130.2, 131.6, 134.2, 134.6, 146.0, 155.8, 190.2. IR (CsI): 3412, 1712, 1667, 1536, 1502, 1446  $\text{cm}^{-1}$ . MS (EI):  $m/z$  428 ( $\text{M}^+$ , 2), 298 (100), 217 (3), 155 (45), 91 (58).

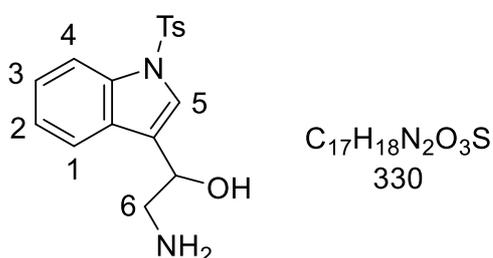
**2-amino-1-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)ethan-1-one (36)**



To a suspension of compound **35** (1g, 2.33 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) was added dropwise TFA

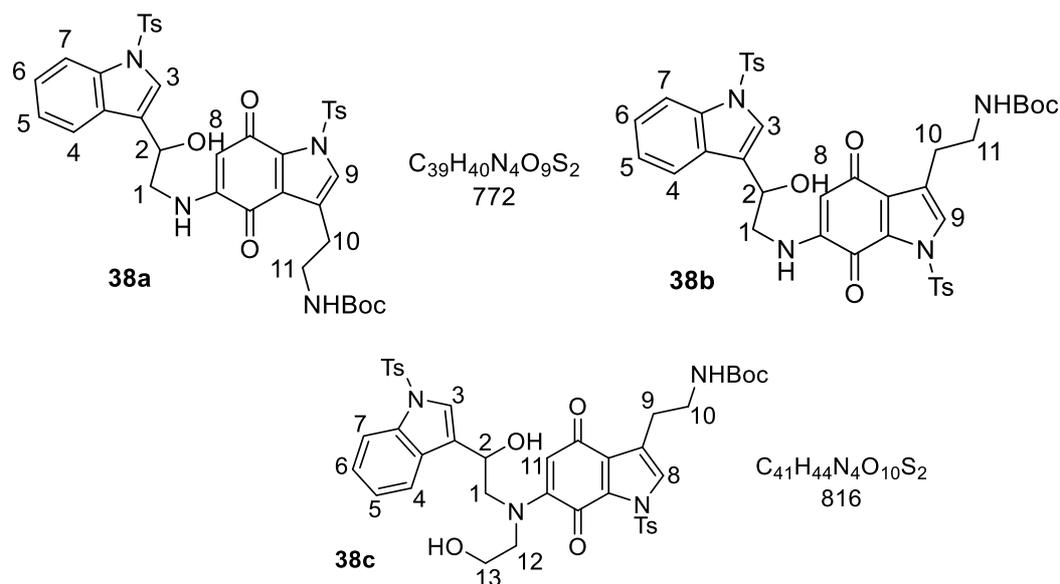
(5 mL). The mixture was stirred for 3h. After concentration under reduced pressure, the residue was triturated in Et<sub>2</sub>O. Filtration gave the expected compound as a white solid (1 g, 97 %), mp 182 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 2.35 (s, 1H, CH<sub>3</sub> Ts); 4.59 (m, 2H, C<sub>6</sub>H); 7.42 (dd, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 7.3 and 7.7 Hz); 7.46 (d, 2H, Ts, J = 8.2 Hz); 7.45-7.49 (m, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 6 Hz); 7.98 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 7.3 Hz); 8.05 (d, 2H, Ts J = 8.2 Hz); 8.18 (d, 1H, C<sub>1</sub>H, J = 7 Hz); 8.27 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 21.66, 45.50, 113.77, 117.70, 122.48, 125.83, 126.71, 127.13, 127.90 (2C), 128.33, 131.12 (2C), 133.84, 134.41, 135.73, 147.14, 158.41, 189.25. IR (KBr): 3235, 1672, 1532, 1170 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 330.10 (100.0%), 331.11 (18.4%), 332.10 (4.5%).

### 2-amino-1-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)ethan-1-ol (37)



To a suspension of compound **36** (450 mg, 1.37 mmol) in MeOH (15 mL) was added portionwise, NaBH<sub>4</sub> (260 mg, 6.8mmol). The reaction media was stirred for 3 h. After concentration under reduce pressure, water (50 mL) was added and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to give the product as a yellow powder (370 mg, 82 %), mp 182 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.16 (t, 2H, NH<sub>2</sub>, J = 7.1 Hz); 2.28 (s, 1H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.76 (m, 2H, C<sub>6</sub>H); 4.75 (t, 1H, CH-OH); 7.21 (t, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 7.2 Hz); 7.31 (t, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 7.2 Hz); 7.35 (d, 2H, Ts, J = 8.2 Hz); 7.59 (s, 1H, C<sub>5</sub>H); 7.66 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 7.2 Hz); 7.82 (d, 2H, Ts, J = 8.2 Hz); 7.89 (d, 1H, C<sub>1</sub>H, J = 7.2 Hz). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 21.48, 42.24, 67.90, 113.68, 119.60, 121.28, 123.61, 125.16, 125.97, 127.16 (2C), 130.27, 130.68 (2C), 130.88, 134.27, 134.64. IR (KBr): 3355, 1446, 1372, 1170 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>- MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S: 329.0960, found 329.0966.

**tert-butyl (2-(5-((2-hydroxy-2-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (38a) and tert-butyl (2-(6-((2-hydroxy-2-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (38b) and tert-butyl (2-(6-((2-hydroxy-2-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)ethyl)(2-hydroxyethyl)amino)-4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (38c)**



To a solution of hydroxylamine **37** (1.6 g, 4.85 mmol) in EtOH (15 mL) was added dropwise a solution of quinone **1** (1.1 g, 2.43 mmol) in EtOH (35 mL). After 4 h stirring at room temperature, the mixture was concentrated under vacuum and the crude product was purified by flash-chromatography ( $CH_2Cl_2/MeOH$  99:1) to give the products

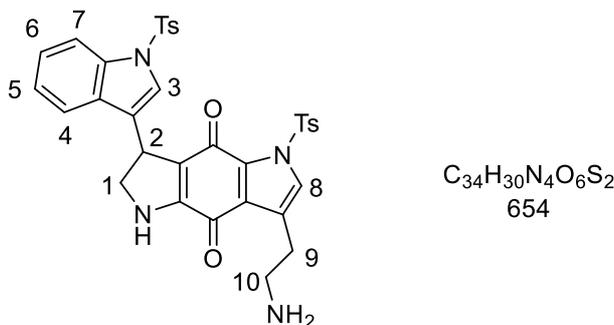
**38a**: dark fuschia solid (630 mg, 34 %), mp 115 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 1.45 (s, 9H); 2.37 (s, 3H); 2.44 (s, 3H); 2.95 (t, 2H,  $J = 6.7$  Hz); 3.43 (m, 4H); 4.74 (br. s, 1H); 5.19 (t, 1H,  $J = 5.8$  Hz); 5.21 (s, 1H); 6.13 (t, 1H,  $J = 5.6$  Hz); 7.23-7.28 (m, 3H); 7.33-7.39 (m, 3H); 7.55 (s, 1H); 7.56 (d, 1H,  $J = 10.6$  Hz); 7.61 (s, 1H); 7.80 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz); 8.00 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz); 8.01 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 21.60, 21.77, 26.22, 28.39 (3C), 40.04, 48.11, 65.64, 79.38, 97.79, 113.88, 119.90, 122.10, 122.35, 123.42, 123.49, 124.53, 125.25, 125.93, 126.91 (2C), 128.13, 129.06 (2C), 129.46 (2C), 130.00, 130.04 (2C), 132.80, 134.26, 135.00, 135.37, 145.24, 145.81, 147.17, 155.95, 174.99, 179.58. IR (ATR): 3365, 1673, 1597, 1365, 1171. HRMS (ESI) calcd for  $C_{39}H_{40}N_4O_9NaS_2$  795.2134 (MNa<sup>+</sup>), found 795.2146.

**38b**: dark fuschia solid (680 mg, 36 %), mp 143 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 1.45 (s, 9H); 2.37 (s, 3H); 2.46 (s, 3H); 3.00 (t, 2H,  $J = 6.7$  Hz); 3.38-3.49 (m, 4H); 4.89 (br. s, 1H); 5.22 (t, 2H,  $J = 6.3$  Hz); 5.30 (s, 1H); 6.14 (t, 1H,  $J = 5.7$  Hz); 7.23-7.29 (m, 3H); 7.34-7.38 (m, 3H); 7.60 (d,

1H, J = 7.6 Hz); 7.62 (s, 1H); 7.69 (s, 1H); 7.80 (d, 2H, J = 8.2 Hz); 8.00 (d, 1H, J = 8.2 Hz); 8.02 (d, 2H, J = 8.2 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.59, 21.78, 25.75, 28.40 (3C), 40.51, 48.14, 79.31, 97.71, 113.89, 119.89, 122.29, 123.47, 123.50, 123.57, 125.26, 126.90 (2C), 127.34, 128.15, 128.91 (2C), 129.81 (2C), 129.90, 130.08 (2C), 130.20, 130.61, 133.90, 134.92, 135.38, 145.30, 146.20, 147.71, 156.08, 169.90, 183.27. IR (ATR): 3360, 1678, 1593, 1364, 1170. HRMS (ESI) calcd for C<sub>39</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>NaS<sub>2</sub> 795.2134 (MNa<sup>+</sup>), found 795.2123.

**38c** dark fuschia solid (220 mg, 10 %). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.43 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.99 (t, 2H, C<sub>9</sub>H, J = 6.7 Hz); 3.40 (q, 2H, C<sub>10</sub>H, J = 6Hz); 3.52 (d, 2H, C<sub>1</sub>H, J = 6 Hz); 3.93 (dd, 2H, C<sub>12</sub>H, J = 6 Hz and 9 Hz); 4.11 (dd, 2H, C<sub>13</sub>H, J = 6 Hz and 9 Hz); 4.88 (br s, 1H, NHBoc); 5.30 (s, 1H, C<sub>11</sub>H); 6.01 (t, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 6 Hz); 7.24-7.26 (m, 3H, Ts and C<sub>5</sub>H); 7.32-7.37 (m, 3H, Ts and C<sub>6</sub>H); 7.66 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 7.67 (s, 1H, C<sub>8</sub>H); 7.69 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 6 Hz); 7.79 (d, 2H, Ts, J = 6 Hz); 7.96 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 6 Hz); 8.00 (d, 2H, Ts, J = 6 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.59; 21.78; 25.69; 28.39 (3C); 40.56; 49.03 (2C); 79.15; 97.94; 106.44; 113.71; 120.78; 121.21; 123.53; 123.65; 124.84; 125.09; 126.90 (2C); 127.18; 127.35; 128.85 (2C); 129.13; 129.69; 129.81 (2C); 130.08 (2C); 130.60; 133.98; 134.88; 135.51; 145.34; 146.17; 147.80; 156.07; 170.05; 183.36. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>41</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub> 817.2532, found 817.2534.

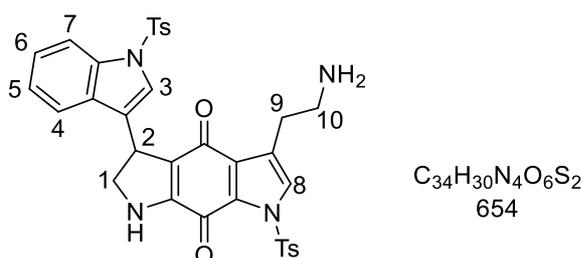
**7-(2-aminoethyl)-5-tosyl-3-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)-2,3-dihydropyrrolo[2,3-f]indole-4,8(1H,5H)-dione (39a)**



To a solution of compound **38a** (50 mg, 0.065 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.6 mL) was added dropwise TFA. The mixture was stirred for 4 h. After concentration over vacuum, NaOH 1N (5 mL) was added and this aqueous layer was extracted by CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The crude product was purified by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5) to give the expected product as a blue solid (15 mg, 36 %), mp 167 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 2.29 (s, 3H); 2.41 (s, 3H); 2.69-3.20 (m, 6H); 4.36 (d, 1H, J = 6.0 Hz); 4.70 (t, 1H, J = 6.0 Hz); 7.01 (d, 1H, J = 3.0 Hz); 7.12 (t, 1H, J = 6.0 Hz); 7.28-7.34 (m, 3H); 7.49 (d, 2H, J = 9.0 Hz); 7.55 (d, 1H, J = 6.0 Hz); 7.61 (d, 1H, J = 9.0 Hz); 7.65 (d, 2H, J = 9.0

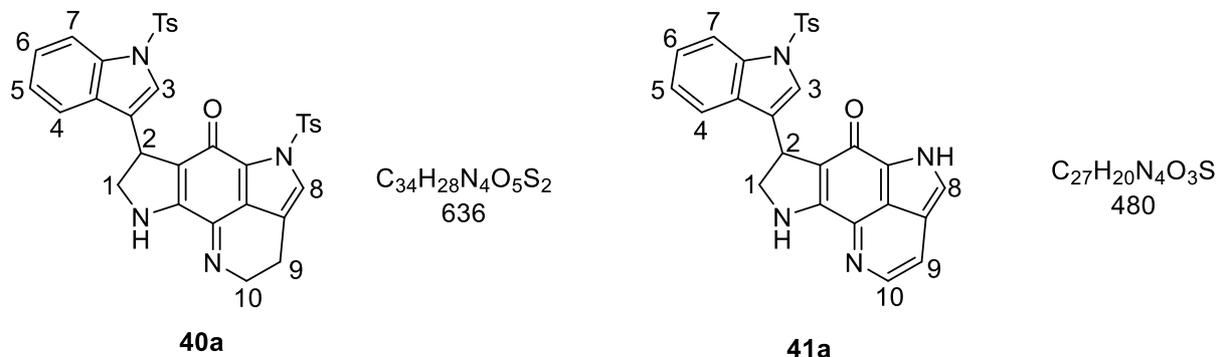
Hz); 7.81 (s, 1H); 8.01 (d, 2H, J = 9.0 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.49, 21.71, 29.71, 39.63, 51.66, 66.36, 107.82, 108.59, 115.60, 120.23, 121.37, 124.79, 127.58 (2C), 127.81, 129.01, 129.08 (2C), 129.60, 129.82 (2C), 129.88 (2C), 129.93, 131.4, 132.95, 133.37, 135.23, 141.89, 142.27, 144.81, 146.60, 170.23, 182.40. IR (ATR): 3310, 1681, 1610, 1582, 1512, 1352, 1175 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>34</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> 655.1685, found 655.1653.

**3-(2-aminoethyl)-1-tosyl-5-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)-6,7-dihydropyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,5H)-dione (39b)**



Same procedure as for compound **39a**, involving compound **38b** (50 mg, 0.065 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.6 mL). After purification, the expected compound was obtained as a blue solid (27 mg, 64 %), mp 150 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 2.29 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.90-3.01 (m, 6H), 4.08 (br. s, 2H), 4.32 (m, 1H), 4.69 (m, 1H), 7.01 (d, 1H, J = 3.0 Hz), 7.12 (t, 1H, J = 6.0 Hz), 7.28-7.32 (m, 3H), 7.48 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.55 (d, 1H, J = 6.0 Hz), 7.61 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 7.65 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.78 (s, 1H), 8.01 (d, 2H, J = 9.0 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.49, 21.72, 29.72, 39.86, 51.53, 66.39, 107.82, 109.22, 115.58, 120.25, 121.37, 124.64, 127.67 (2C), 127.82, 128.78, 129.16, 129.19 (2C), 129.60, 129.62 (2C), 129.77 (2C), 129.93, 132.95, 133.33, 135.23, 141.89, 142.27, 144.81, 146.60, 174.26, 179.27. IR (ATR): 3380, 1821, 1621, 1580, 1542, 1354, 1167 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>34</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> 655.1685, found 655.1664.

**5-tosyl-7-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)-2,3,5,7,8,9-hexahydro-6H-dipyrrolo[4,3,2-de:3',2'-h]quinolin-6-one (40a) and 7-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)-5,7,8,9-tetrahydro-6H-dipyrrolo[4,3,2-de:3',2'-h]quinolin-6-one (41a)**

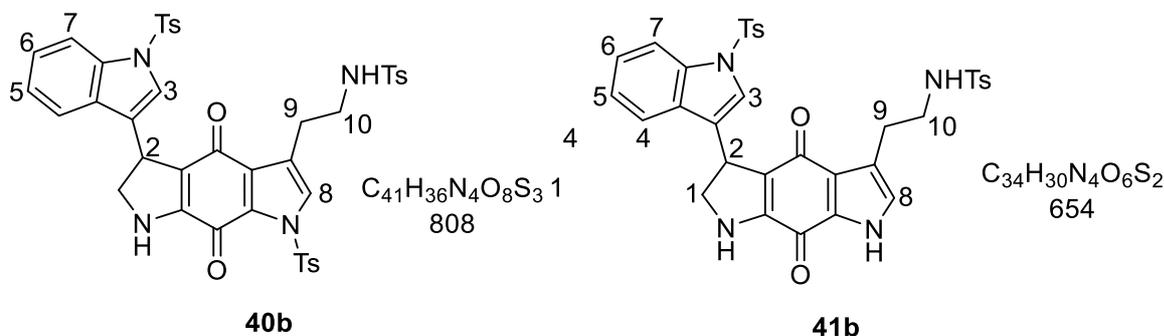


A mixture of compound **39a** (200 mg, 0.306 mmol) and 4Å molecular sieve (2 g) in absolute EtOH (17 mL) was refluxed overnight. After filtration, the filtrate was concentrated and purified by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 99: 1) to give:

**40a**: violin solid (45 mg, 23%), mp 221°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.83 (td, 2H, C<sub>9</sub>H J = 1.1 Hz and J = 7.5Hz); 3.11 (m, 1H, C<sub>2</sub>H); 4.20 (m, 3H, C<sub>1</sub>H and C<sub>10</sub>H); 4.68 (m, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.05 (br. s, 1H, NH); 7.11 (td, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 0.9 and 7.7 Hz); 7.16 (d, 2H, Ts, J = 8 Hz); 7.26 (td, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 0.9 and 7.7 Hz); 7.34 (s, 1H, C<sub>8</sub>H); 7.35 (d, 2H, Ts, J = 7.1 Hz); 7.40 (t, 1H, C<sub>3</sub>H J = 1.1 Hz); 7.50 (d, 1H, C<sub>7</sub>H J = 7.6 Hz); 7.58 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 7.80 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 7.9 Hz); 8.09 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 18.16, 21.51, 21.74, 29.71, 49.71, 51.72, 109.07, 111.42, 115.89, 116.23, 120.43, 122.63, 123.61, 124.26, 124.87, 127.32 (2C), 128.60, 128.73 (2C), 129.64 (2C), 129.79 (2C), 130.64, 133.03, 133.44, 134.95, 141.90, 143.17, 144.57, 145.47, 152.85, 174.00. IR (ATR): 3345, 1777, 1667, 1348, 1163. IR (ATR): 3281, 1701, 1620, 1587, 1530, 1355, 1168 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>) calcd for C<sub>34</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> 636.1501, found 636.1525.

**41a**: yellow solid (90 mg, 62%), mp 160°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 3.34 (m, 1H, C<sub>2</sub>H); 4.43 (m, 1H, C<sub>1</sub>H); 4.89 (m, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.16 (m, 2H, C<sub>5</sub>H and C<sub>7</sub>H) 7.17 (d, 2H, Ts, J = 8 Hz); 7.62 (t, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 8 Hz); 7.63 (d, 2H, Ts, J = 8.3 Hz); 7.70, (d, 1H, C<sub>8</sub>H, J = 2.7 Hz); 7.74 (d, 1H, C<sub>9</sub>H, J = 5.9 Hz); 7.75 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 7.86 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 8 Hz); 8.43 (d, 1H, C<sub>10</sub>H, J = 5.9 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.50, 19.71, 66.75, 110.62, 111.82, 115.87, 117.67, 119.39, 120.30, 120.36, 124.39, 124.77, 127.42 (2C), 128.45, 129.78 (2C), 129.84, 130.83, 132.80, 133.18, 140.77, 141.99, 143.81, 144.52, 146.57, 174.02. IR (ATR): 3342, 1768, 1669, 1348, 1164. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>27</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S 481.1334, found 481.1330.

**N-(2-(4,8-dioxo-1-tosyl-5-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)-1,4,5,6,7,8-hexahydropyrrolo[3,2-f]indol-3-yl)ethyl)-4-methylbenzenesulfonamide (40b) and N-(2-(4,8-dioxo-5-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)-1,4,5,6,7,8-hexahydropyrrolo[3,2-f]indol-3-yl)ethyl)-4-methylbenzenesulfonamide (41b)**



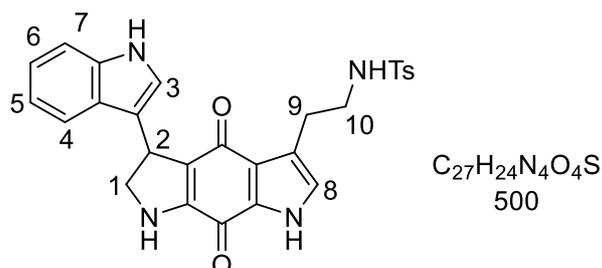
Same procedure as for **40a/41a** involving, compound **39b** (60 mg, 0.092 mmol) in absolute EtOH (5 mL) and 4Å molecular sieve (720 mg). Purification by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99: 1) gave:

**40b**: blue solid (48 mg, 65%), mp 162°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.95 (t, 2H, C<sub>9</sub>H, J = 6.2 Hz); 3.06 (m, 1H, C<sub>2</sub>H); 3.34 (q, 2H, C<sub>10</sub>H, J = 6.2 Hz); 4.13 (m, 1H, C<sub>1</sub>H); 4.75 (m, 1H, C<sub>1</sub>H); 5.00 (t, 1H, NHTs, J = 4.5 Hz); 6.83 (m, 1H, NH); 7.14 (t, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 7.9 Hz); 7.15 (s, 1H, C<sub>8</sub>H); 7.18 (d, 2H, Ts, J = 7.6 Hz); 7.19 (d, 2H, Ts); 7.31 (t, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 7.5 Hz); 7.44 (d, 2H, Ts, J = 8.2 Hz); 7.50 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 7.5 Hz); 7.60 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 7.61 (d, 2H, J = 8.2 Hz); 7.66 (d, 2H, Ts, J = 8.2 Hz); 7.82 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 8.0 Hz); 8.08 (d, 2H, Ts, J = 8.5 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 21.47, 21.54, 21.86, 25.50, 43.63, 51.89, 66.48, 108.09, 108.79, 115.98, 120.62, 122.85, 125.02, 126.85 (2C), 127.35 (2C), 129.22 (2C), 129.39, 129.51, 129.65 (2C), 129.69 (2C), 129.88 (2C), 130.01, 130.37, 132.81, 133.67, 135.45, 137.28, 142.12, 142.21, 143.21, 144.82, 146.48, 169.92, 182.890. IR (ATR): 3324, 1789, 1672, 1358 1111 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>41</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>3</sub> 809.1773, found 809.1793.

**41b**: blue solid (17 mg, 28%), mp 194°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.33 (s, 3H, Ts); 2.39 (s, 3H, Ts); 2.93 (t, 2H, C<sub>9</sub>H, J = 6.2 Hz); 3.10 (m, 1H, C<sub>2</sub>H); 3.31 (m, 2H, C<sub>10</sub>H); 4.24 (m, 1H, C<sub>1</sub>H); 4.82 (m, 1H, C<sub>1</sub>H); 5.22 (m, 1H, NHTs); 6.90 (s, 1H, C<sub>7</sub>H); 6.92 (m, 1H, NH); 7.09 (t, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 7.35 Hz); 7.19 (d, 2H, Ts, J = 8.2 Hz); 7.23 (s, 1H, C<sub>8</sub>H); 7.24 (d, 2H, Ts, J = 7.8 Hz); 7.29 (t, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 7.7 Hz); 7.43 (d, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 7.4 Hz); 7.63 (d, 2H, Ts, J = 8.3 Hz); 7.69 (d, 2H, Ts, J = 8.2 Hz); 7.81 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 8.1 Hz); 9.45 (br. s, 1H, NHAr). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)

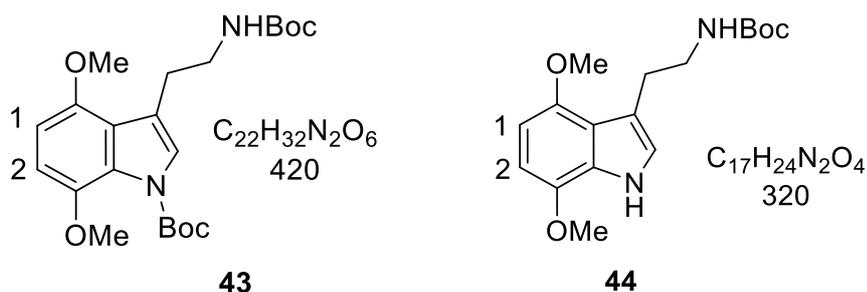
21.49, 21.54, 25.55, 43.63, 51.87, 66.74, 108.79, 109.73, 115.88, 120.51, 123.76, 124.62, 125.00, 126.50, 126.93 (2C), 127.39 (2C), 128.99, 129.08, 129.56 (2C), 129.90 (2C), 130.34, 132.95, 134.73, 137.25, 141.99, 142.23, 143.09, 144.82, 172.01, 183.44. IR (ATR): 3340, 1669, 1596, 1168  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ,  $\text{MH}^+$ ) calcd for  $\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2$  655.1685, found 655.1703.

**N-(2-(5-(1H-indol-3-yl)-4,8-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydropyrrolo[3,2-f]indol-3-yl)ethyl)-4-methylbenzenesulfonamide (42b)**



A solution of **41b** (26 mg, 0.04 mmol) in dioxane/NaOH 1M (1: 1, 4ml), was stirred overnight.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5ml) and some drops MeOH were added. The resulting organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified by flash chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ) 90: 10) to give the expected compound as a grey/blue solid (18 g, 90%), mp 236°C.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 2.30 (s, 3H, Ts); 2.93 (t, 2H,  $\text{C}_9\text{H}$ ,  $J = 6.2$  Hz); 3.17 (m, 1H,  $\text{C}_2\text{H}$ ); 3.30 (m, 2H,  $\text{C}_{10}\text{H}$ ); 4.08 (m, 1H,  $\text{C}_1\text{H}$ ); 4.34 (m, 1H,  $\text{C}_1\text{H}$ ); 4.75 (m, 1H, NHTs); 7.12 (t, 1H,  $\text{C}_3\text{H}$ ,  $J = 7.35$  Hz); 7.16 (s, 1H,  $\text{C}_3\text{H}$ ); 7.25 (d, 1H,  $\text{C}_8\text{H}$ ,  $J = 8.2$  Hz); 7.29 (t, 1H,  $\text{C}_6\text{H}$ ,  $J = 7.7$  Hz); 7.31 (d, 2H, Ts,  $J = 8.2\text{Hz}$ ); 7.49 (s, 1H,  $\text{C}_7\text{H}$ ); 7.62 (d, 1H,  $\text{C}_4\text{H}$ ,  $J = 8.1$  Hz); 7.69 (d, 2H, Ts,  $J = 8.2\text{Hz}$ ); 8.16 (br. s, 2H, NHAr).  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ): 21.44, 24.19, 39.15, 52.02, 65.39, 106.99, 110.64, 115.76, 120.33, 121.27, 124.25, 125.46, 127.83 (2C), 128.38, 129.14, 129.36, 130.47 (2C), 130.66, 132.82, 133.02, 141.59, 144.21, 145.30, 172.10, 182.90. IR (ATR): 3320, 1656, 1594, 1165  $\text{cm}^{-1}$  MS (EI):  $m/z$   $\text{M}+\text{H} = 501.1586$

**tert-butyl-3-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-4,7-dimethoxy-1H-indole-1-carboxylate (43) and tert-butyl (2-(4,7-dimethoxy-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (44)**

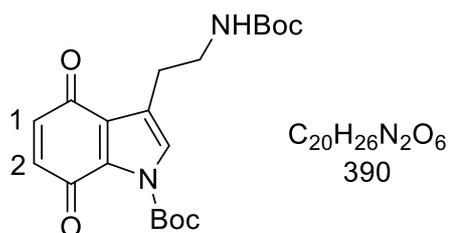


To a solution of compound **27** (200 mg, 0.9 mmol) in anhydrous THF (15 mL) was added, under N<sub>2</sub>, NaH (60% dispersed in oil, 145 mg, 3.63 mmol). After 5 min stirring, di-*tert*-butyl dicarbonate (417 mg, 1.9 mmol) was added and stirring was maintained for 1 h. Water (5 mL) and then CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) were added. The solution organic layer was recovered and washed with water (2 x 20 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give the compounds

**43** colorless oil (230 mg, 60%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.40 (s, 9H, C (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1.60 (s, 9H, C (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.96 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>N, J = 5.8 Hz); 3.41 (td, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>N, J = 5.8 and 6.2 Hz); 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.74 (br. s, NH); 6.53 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.4 Hz); 6.69 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.4 Hz); 7.19 (s, 1H, C=CHNBoc). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 26.91 (3C), 27.86, 28.32 (3C), 41.02, 55.40, 56.59, 78.76, 83.03, 103.00, 107.68, 117.31, 122.23, 125.21, 126.53, 142.87, 148.50, 149.27, 155.93. IR (CHCl<sub>3</sub>): 1728 cm<sup>-1</sup>. MS (EI) (m/z): 420 (M<sup>+</sup>, 22%); 320 (27); 264 (25); 190 (100).

**44** colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.40 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 3.02 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N; J = 6.5 Hz); 3.42 (td, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N, 6.8 and 6.5 Hz); 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) 4.85 (br s, NH); 6.34 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.2 Hz); 6.49 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.2 Hz); 6.89 (d, 1H, C=CHN, J = 2.1 Hz); 8.21 (br. s, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 26.84, 28.42 (3C), 42.07, 55.33, 55.68, 78.78, 98.30, 101.49, 114.22, 118.52, 121.08, 128.51, 141.00, 148.90, 156.16. IR (KBr): 3263, 1690, 1500, 1257 cm<sup>-1</sup>. MS (EI) (m/z): 320 (M<sup>+</sup>, 21%); 264 (23); 190 (100).

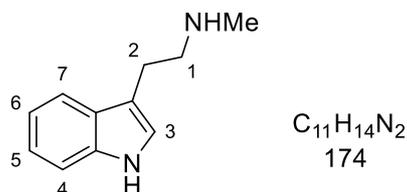
**tert-butyl 3-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-4,7-dioxo-4,7-dihydro-1H-indole-1-carboxylate (45)**



Same procedure as for compound **1** involving **38** (1.0 g, 2.38 mmol), CH<sub>3</sub>CN/ H<sub>2</sub>O (15 mL: 7.5 mL) and CAN (2.25 g, 5.24 mmol) in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (15 mL / 7.5 mL), the solution being stirred at 0 ° C, for 30 min. After work-up, the crude product was purified by flash chromatography (PE / AcOEt 70:30) to give the product as a red solid (850 mg, 91%), mp: 100 ° C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.38 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1.59 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.90 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>N, J = 5.8 Hz); 3.34 (td, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>N, J = 6.2 Hz); 4.72 (br s, 1H, NHBoc); 6.52 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.4 Hz); 6.59 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.4 Hz); 7.29 (s, 1H, C=CHNBoc). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 25.86

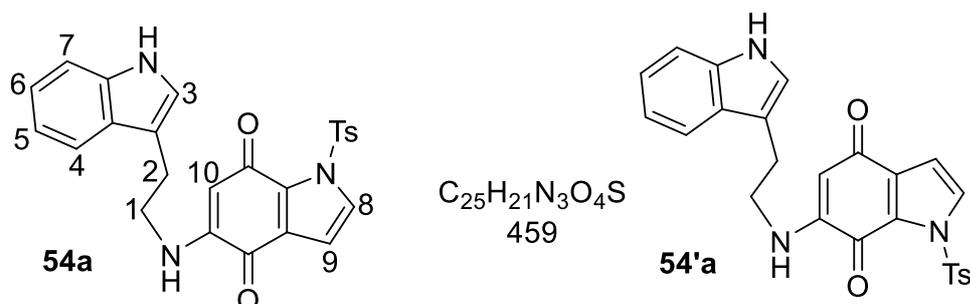
(3C), 27.55, 28.36 (3C), 40.21, 79.25, 86.49, 98.74, 122.68, 127.56, 130.72, 135.64, 137.87, 147.46, 155.91, 175.30, 184.87. IR (CHCl<sub>3</sub>): 1652, 1682, 1694, 3390 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 390 (M<sup>+</sup>, 1%); 243 (10); 173 (32); 161 (53).

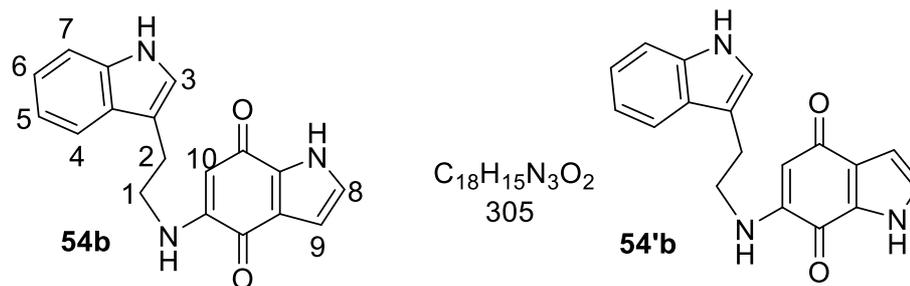
### 2-((1H-indol-3-yl)-N-méthylethanamine (51b)



To a solution of **88** (13.78 g, 59.4 mmol) in dry THF (110 mL) under N<sub>2</sub> at 0 °C was added portionwise LAH (6.76 g, 178 mmol). The mixture was refluxed for 1 h and then cooled to 0 °C. Water (3 mL) and 15% aqueous solution of NaOH (3 mL) were carefully added. After filtration, the precipitate was washed with THF (30 mL). The filtrate was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure to give the compound as a beige solid (9.24 g, 89%), mp 82 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.47 (s, 1H, NHMe); 2.35 (s, 3H, Me); 2.81–2.86 (m, 2H, C<sub>2</sub>H); 2.89–2.94 (m, 2H, C<sub>1</sub>H); 6.80 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 7.03 (td, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 7.4 and 1.2 Hz); 7.10 (td, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 7.4 and 1.2 Hz); 7.19 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 7.6 Hz); 7.54 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 7.6 Hz); 9.52 (1H, s, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 25.42, 35.99, 51.82, 111.32, 112.91, 118.65, 118.85, 121.59, 122.45, 127.30, 136.53. HRMS (FAB, MH<sup>+</sup>) calculated for C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>, 175.1235, found 175.1235).

### 5-((2-((1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (54a) and 6-((2-((1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (54'a) and 5-((2-((1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-1H-indole-4,7-dione (54b) and 6-((2-((1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-1H-indole-4,7-dione (54'b)





To a solution of indoleione **21** (480 mg, 1.59 mmol) in absolute ethanol (140 mL) was added portionwise tryptamine (1.3 g, 7.95 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 2h. After concentration over vacuum, the crude product was purified by flash-chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) to give the two expected compounds **54a** and **54'a** and the elution solvent was changed ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  99: 1) to give the second ones **54b** and **54'b**:

**54a**: pink fuschia solid (59 mg, 8%), mp 115 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.45 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  Ts); 3.12 (t, 2H,  $\text{C}_2\text{H}$ ,  $J = 6.9$  Hz); 3.43 (q, 2H,  $\text{C}_1\text{H}$ ,  $J = 6.9$  Hz); 5.26 (s, 1H,  $\text{C}_{10}\text{H}$ ) 5.84 (br t, 1H, NH,  $J = 5.6$  Hz); 6.67 (d, 1H,  $\text{C}_9\text{H}$ ,  $J = 3.3$  Hz); 7.07 (d, 1H,  $\text{C}_3\text{H}$ ,  $J = 2.4$ Hz); 7.16 (td, 1H,  $\text{C}_5\text{H}$ ,  $J = 1$  Hz and 8 Hz); 7.25 (td, 1H,  $\text{C}_6\text{H}$ ,  $J = 1$  Hz and 8 Hz); 7.36 (d, 2H, Ts,  $J = 8.2$  Hz); 7.41 (d, 1H,  $\text{C}_7\text{H}$ ,  $J = 8.2$  Hz); 7.59 (d, 1H,  $\text{C}_4\text{H}$ ,  $J = 7.8$  Hz); 7.70 (d, 1H,  $\text{C}_8\text{H}$ ,  $J = 3.3$  Hz); 8.04 (d, 2H, Ts,  $J = 8.2$  Hz); 8.10 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 21.78, 24.05, 42.77, 97.49, 107.16, 111.40, 112.00, 118.43, 119.70, 122.16, 122.44, 126.83, 126.93, 127.71, 129.13 (2C), 129.46 (2C), 132.69, 134.27, 136.43, 145.85, 147.02, 175.08, 178.82. IR (ATR) 3306, 1652, 1631, 1374  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ,  $\text{MH}^+$ ) calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$  460.1331, found 460.1331.

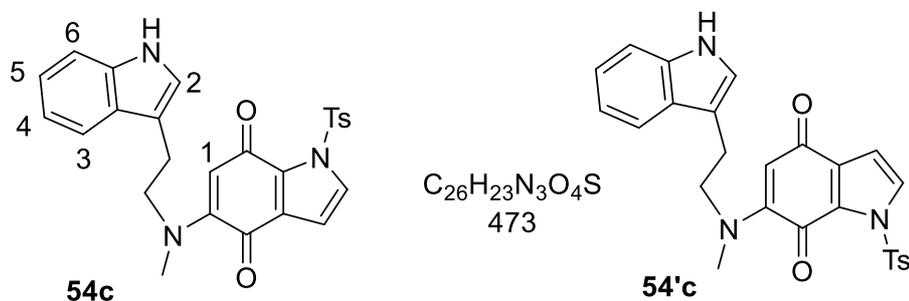
**54'a**: pink fuschia solid (80 mg, 11%), mp 111 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.53 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  Ts); 3.10 (t, 2H,  $\text{C}_2\text{H}$ ,  $J = 6.6$  Hz); 3.43 (q, 2H,  $\text{C}_1\text{H}$ ,  $J = 6.7$  Hz); 5.37 (s, 1H,  $\text{C}_{10}\text{H}$ ); 5.93 (t, 1H, NH,  $J = 5.6$  Hz); 6.74 (d, 1H,  $\text{C}_9\text{H}$ ,  $J = 3.1$  Hz); 7.06 (d, 1H,  $\text{C}_3\text{H}$ ,  $J = 2.3$  Hz); 7.15 (dq; 1 H,  $\text{C}_5\text{H}$ ,  $J = 1$ Hz and 7 Hz); 7.24 (dq, 1H,  $\text{C}_6\text{H}$ ,  $J = 1$  Hz and 7 Hz); 7.35 (d, 2H, Ts,  $J = 1$  Hz and 8.7 Hz); 7.41 (td, 1H,  $\text{C}_7\text{H}$ ,  $J = 1$  Hz and 8.2 Hz); 7.58 (dd, 1H,  $\text{C}_4\text{H}$ ,  $J = 1$  Hz and 7.9 Hz); 7.81 (d, 1H,  $\text{C}_8\text{H}$ ,  $J = 3.2$  Hz); 7.99 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4$  Hz); 8.16 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 21.79, 24.13, 42.95, 96.64, 108.62, 111.41, 111.95, 118.46, 119.67, 122.20, 122.42, 126.91, 126.92, 128.87 (2C), 129.79 (2C), 131.27, 133.95, 134.53, 136.46, 146.17, 148.09, 170.12, 181.37. IR (ATR) 3308, 1653, 1632, 1375  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ,  $\text{MH}^+$ ) calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$  460.1331, found 460.1343.

**54b**: pink fuschia solid (224 mg, 46%), mp 228 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 3.01 (t, 2H,  $\text{C}_2\text{H}$ ,  $J = 7.4$  Hz); 3.40 (q, 2H,  $\text{C}_1\text{H}$ ,  $J = 6.9$  Hz); 5.21 (s, 1H,  $\text{C}_{10}\text{H}$ ); 6.41 (d, 1H,  $\text{C}_9\text{H}$ ,  $J = 2.5$  Hz);

7.00 (td, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 1.1 Hz and 8 Hz); 7.09 (td, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 1 Hz and 8 Hz); 7.15 (t, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 5.9 Hz); 7.25 (t, 1H, C<sub>8</sub>H, J = 2.5 Hz); 7.26 (s, 1H, NH, J = 1.8 Hz); 7.36 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 8 Hz); 7.56 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 8 Hz); 10.88 (br s, 1H, NH); 12.62 (br s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 23.73, 43.38, 107.40, 111.65, 111.90, 118.67, 118.81 (2C), 121.22, 123.50, 124.11, 127.57, 134.80, 136.72, 150.03, 177.13, 178.37. IR (ATR) 3420, 3288, 1673, 1603, 1392 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 306.1243, found 306.1247.

**54'b**: pink fuschia solid (107 mg, 22%), mp 209 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 3.01 (t, 2H, C<sub>2</sub>H, J = 7.4 Hz); 3.42 (q, 2H, C<sub>1</sub>H, J = 6.9 Hz); 5.20 (s, 1H, C<sub>10</sub>H); 6.48 (d, 1H, C<sub>9</sub>H, J = 2.5 Hz); 7.00 (m, 2H, C<sub>5</sub>H and NH); 7.08 (td, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 1 Hz and 8 Hz); 7.25 (d, 1H, C<sub>8</sub>H, J = 2.5 Hz); 7.32 (t, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 5.9 Hz); 7.35 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 8 Hz); 7.57 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 8 Hz); 10.87 (br s, 1H, NH); 12.41 (br s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 23.76, 43.34, 96.31, 107.92, 111.71, 111.89, 118.67, 118.80, 121.46, 123.46, 127.59, 128.42, 128.60, 129.20, 136.72, 148.89, 172.30, 182.20. IR (ATR) 3388, 1654, 1623, 1600, 1397 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 306.1243, found 306.1230.

**5-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)(methyl)amino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (54b) et 6-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)(methyl)amino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (54b')**



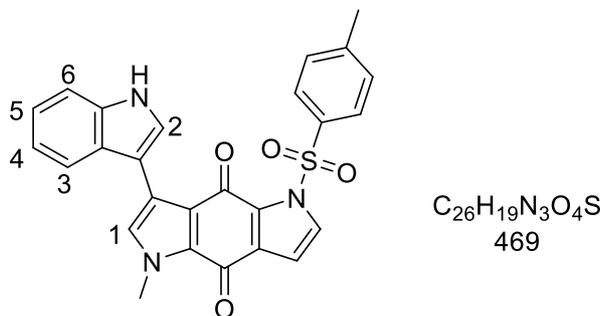
A solution of methyl tryptamine (1.09 g, 6.3 mmol) in absolute ethanol (15 mL) was added dropwise to a solution of indole-dione 21 (0.38 g, 1.25 mmol) in absolute ethanol (16 mL). After 2h stirring at room temperature, the mixture was concentrated over vacuum and the crude product was purified by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99.5: 0.5) to give the expected compounds:

**54c**: pink fuschia solid (180 mg, 12%), mp 175 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.45 (s, 3H); 2.95 (s, 3H); 3.10 (t, 2H, J = 7.2 Hz); 3.97 (t, 2H, J = 7.2 Hz); 5.34 (s, 1H); 6.55 (d, 1H, J = 3.3 Hz); 7.00 (d, 1H, J = 2.2 Hz); 7.16 (m, 2H); 7.36 (d, 2H, J = 8.1 Hz); 7.63 (d, 1H, J = 3.3 Hz); 8.05 (d, 2H, J = 8.1 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.78, 24.38, 41.11, 56.10, 104.49, 107.69, 111.18,

112.45, 118.79, 119.66, 122.28, 122.65, 127.02, 127.42, 128.80, 129.10 (2C), 129.44, 131.09 (2C), 134.54, 136.31, 145.75, 151.28, 174.22, 184.42. IR (ATR) 3366, 1674, 1624, 1369  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ,  $\text{MH}^+$ ) calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$  474.1488, found 474.1483.

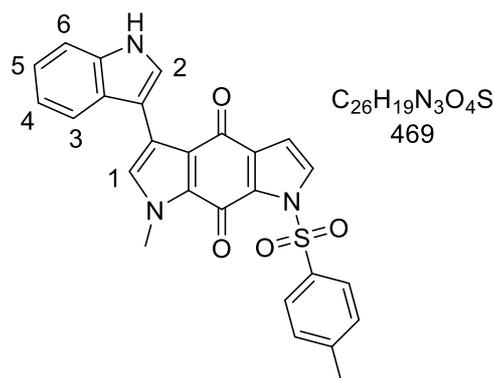
**54'c**: pink fuschia solid (710 mg, 48%), mp 175 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.43 (s, 3H); 2.98 (s, 3H); 3.11 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz); 3.92 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz); 5.38 (s, 1H); 6.66 (d, 1H,  $J = 3.3$  Hz); 7.08 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz); 7.22 (m, 2H); 7.39 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz); 7.64 (br. s, 1H); 7.75 (d, 1H,  $J = 3.3$  Hz); 8.13 (d, 2H,  $J = 8.1$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 21.76, 24.28, 41.01, 55.67, 103.82, 107.56, 111.18, 112.57, 118.98, 119.72, 122.27, 122.59, 127.19, 127.33, 128.98 (2C), 129.65 (2C), 130.22, 132.20, 134.49, 136.24, 145.90, 152.80, 175.08, 183.67. IR (ATR) 3365, 1670, 1618, 1370  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ,  $\text{MH}^+$ ) calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$  474.1488, found 474.1491.

### 5-(1H-indol-2-yl)-1-méthyl-5-tosylpyrrolo[2,3-f]indole-4,8(1H,5H)-dione (55b)



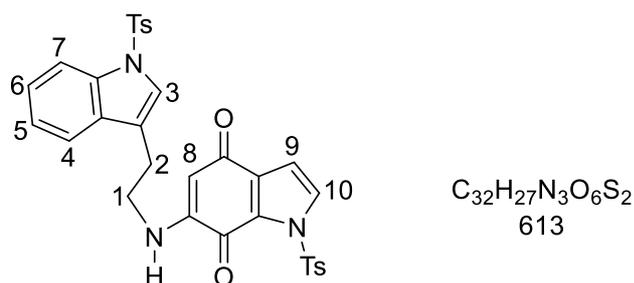
Same procedure as for **55'b** involving **54b** (140 mg, 0.3 mmol),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (9 mL) and DDQ (140 mg, 0.6 mmol). Purification by flash chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH 99.5: 0.5) gave the expected compound as a purple solid (40 mg, 28%). Mp 260 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.43 (s, 3H, Ts); 4.10 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ); 6.78 (d, 1H,  $\text{CH} = \text{CHNTs}$ ,  $J = 3.3$  Hz); 7.17-7.27 (m, 3H,  $\text{C}_4\text{H}$  and  $\text{C}_3\text{H}$  and  $\text{C}_1\text{H}$ ); 7.33 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4$  Hz); 7.48 (d, 1H,  $\text{C}_6\text{H}$ ,  $J = 8.2$  Hz); 7.72 (d, 1H,  $\text{C}_3\text{H}$ ,  $J = 7.8$  Hz); 7.76 (d, 1H,  $\text{CH} = \text{CHNTs}$ ,  $J = 3.3$  Hz); 8.04 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4$  Hz); 8.25 (d, 1H,  $J = 3.0$  Hz); 8.35 (br s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 21.74, 36.94, 107.43, 107.68, 111.52, 119.64, 120.21, 120.31, 122.12, 126.22, 126.78, 128.95, 128.98 (2C), 129.16, 129.49 (2C), 129.87, 131.49, 132.54, 134.60, 136.01, 145.58, 171.84, 174.06. IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 3370, 1735, 1647, 1629  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ,  $\text{MH}^+$ ) calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ : 470.1175 found 470.1173.

### 3-(1H-indol-3-yl)-1-methyl-7-tosylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (55b')



The derivative **54b'** (200 mg, 0.4 mmol) was dissolved in  $CH_2Cl_2$  (12.5 mL) and DDQ (200 mg, 0.9 mmol) was added. The mixture was stirred at RT for 2 h and the solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography ( $CH_2Cl_2$  / MeOH 99.5: 0.5) to give the product as a purple solid (150 mg, 75%), mp 260 ° C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 2.47 (s, 3H); 4.07 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>); 6.81 (d, 1H, CH = CHNTs, J = 3.2 Hz); 7.24 (m, 2H, C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub>); 7.21-7.27 (m, 3H, C<sub>1</sub>H, C<sub>4</sub>H, C<sub>5</sub>H); 7.38 (d, 2H, Ts, J = 8.5 Hz); 7.46 (d, 1H, J = 7.3, 1.5 Hz); 7.77 (d, 1H, CH = CHNTs, J = 3.2 Hz); 8.07 (d, 2H, Ts, J = 8.5 Hz); 8.35 (br s, 1H, NH); 8.39 (d, 1H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 21.78, 37.28, 107.74, 108.34, 108.34, 111.59, 119.57, 119.80, 120.30, 122.17, 122.21, 126.13, 126.70, 128.82, 128.92 (2C), 129.29, 129.59 (2C), 130.61, 133.90, 134.53, 136.09, 145.79, 167.13, 178.84. IR ( $CHCl_3$ ): 3311, 1732, 1654, 1633  $cm^{-1}$ . HRMS (DCI- $CH_4$ ,  $MH^+$ ) calculated for  $C_{26}H_{20}N_3O_4S$ : 470.1175 found 470.1157.

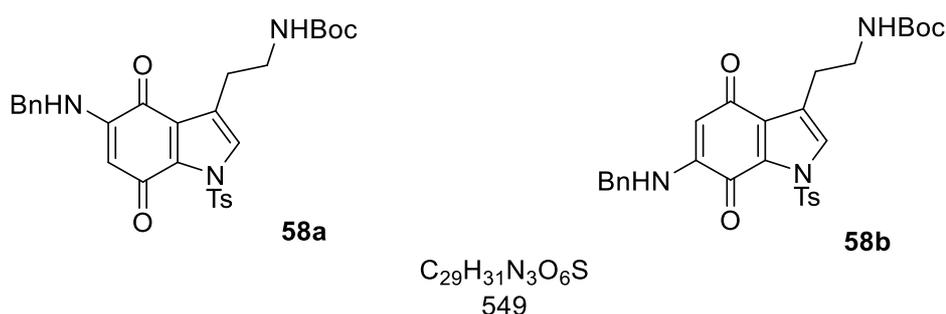
### 1-tosyl-6-((2-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)ethyl)amino)-1H-indole-4,7-dione (56)



To a solution of indoledione **54a** (120 mg, 0.26 mmol) in THF (5 mL) was added *t*BuOK (64 mg, 0.57 mmol) and after 5 min stirring *p*-TsCl (102 mg, 0.52 mmol) was added. The mixture was stirred additional 1 h.  $CH_2Cl_2$  (40 mL) and water (10 mL) were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with  $CH_2Cl_2$  (2 x 20 mL). The combined organic layers were dried over  $MgSO_4$  and concentrated under vacuum. Purification of the crude product by flash-chromatography ( $CH_2Cl_2$ /MeOH 99: 1) led to the expected product as a

fuschia solid (150 mg, 75%), mp > 260 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.43 (br s, 1H, NH); 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 3.01 (td, 2H, C<sub>2</sub>H, J = 0.8 and 6.9 Hz); 4.06 (q, 2H, C<sub>1</sub>H; J = 6.8 Hz); 5.33 (s, 1H, C<sub>8</sub>H); 6.69 (d, 1H, C<sub>9</sub>H, J = 3.3 Hz); 7.23 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 7.25 (dt, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 1 Hz and 7.8 Hz); 7.34 (td, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 1 Hz and 7.8 Hz); 7.38 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 7.42 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 7.50 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 7.6 Hz); 7.73 (d, 1H, C<sub>10</sub>H, J = 3.3 Hz); 7.77 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 7.99 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 8.3 Hz); 8.09 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 21.54, 21.82, 26.65, 43.81, 107.52, 113.85, 118.42, 119.18, 123.23, 123.72, 125.10, 125.61, 126.86 (2C), 128.20, 128.63, 129.31 (2C), 129.69 (2C), 129.91 (2C), 130.27, 131.08, 133.80, 135.10, 135.27, 142.42, 144.93, 146.14, 168.62, 177.09. IR (ATR): 3311, 3259, 1722, 1634, 1623 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>): calcd for C<sub>32</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> 613.1341, found 613.1351.

**tert-butyl (2-(5-(benzylamino)-4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (58a) and tert-butyl(2-(6-(benzylamino)-4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (58b)**

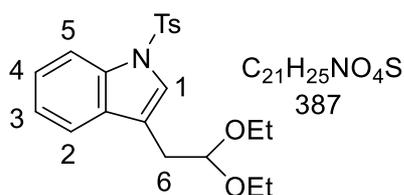


To a solution of quinone (**1**) (1.8 g, 3.99 mmol) in EtOH/ THF (1: 1, 58 mL) was added benzylamine (860 mg, 7.98 mmol). The solution was stirred overnight and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give the expected compounds

**58a**: red solid (417 mg, 19%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.45 (s, 9H); 2.44 (s, 3H); 2.95 (t, 2H, J = 6.7 Hz); 3.42 (q, 2H, J = 6.7 Hz); 4.27 (d, 2H, J = 5.8 Hz); 4.71 (br. s, 1H); 5.21 (s, 1H); 6.08 (br. t, 1H, J = 5.7 Hz); 7.24-7.39 (m, 7H); 7.55 (s, 1H); 8.01 (d, 2H, J = 8.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.78; 28.41 (3C); 29.72, 40.14; 49.96; 98.21; 122.09, 124.52, 125.85, 127.52 (2C); 128.03; 128.94 (2C); 129.11 (2C); 129.44 (2C); 132.87; 134.27; 135.93; 145.80; 147.04; 155.96; 174.99; 179.85. HRMS ((DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calculated for C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S: 550.2012 found 550.1996.

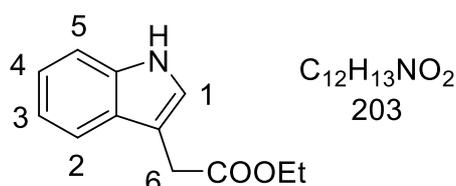
**58b**: red solid (352 mg, 16%), mp 154 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.41 (s, 9H); 2.43 (s, 3H); 2.98 (t, 2H, J = 6.4 Hz); 3.39 (q, 2H, J = 6.4 Hz); 4.23 (d, 2H, J = 5.6 Hz); 4.87 (br s, 1H); 5.29 (s, 1H); 6.02 (br t, 1H, J = 5.6 Hz); 7.24 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.30-7.40 (m, 5H); 7.67 (s, 1H); 7.97 (d, 2H, J = 8.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.80, 28.41 (3C), 29.72, 40.57, 47.19, 98.06, 122.02, 123.61, 127.72 (2C), 128.13, 128.90 (2C), 128.97 (2C), 129.77 (2C), 130.18, 130.70, 134.00, 135.82, 146.10, 147.50, 156.08, 170.21, 183.27. HRMS ((DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calculated for C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S: 550.2012 found 550.1985.

### 3-(2,2-diethoxyethyl)-1-tosyl-1H-indole (59)



To the aldehyde **63** (104 mg, 0.45 mmol), and triethyl orthoformate (76 mg, 0.5 mmol) in dry EtOH (1 mL) was added HBF<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> (a tip of a spatula). The reaction was stirred until complete disappearance of starting material (TLC). After two days the solution was filtered on célite and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The solvent was removed under vacuum and the crude product was purified by flash-chromatography (PE/ EtOAc 8:2) to give the compound as an oil (110 mg, 63%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.20 (t, 6H, (CH<sub>3</sub>) Et, J = 7 Hz); 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 3.00 (d, 2H, C<sub>6</sub>H-CH, J = 6.7 Hz); 3.43-3.70 (m, 4H, CH<sub>2</sub> Et); 4.74 (t, 1H, C<sub>6</sub>H-CH, J = 6.7 Hz); 7.23 (d, 2H, Ts, J = 8 Hz); 7.26 (td, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 1.2 and 7.8 Hz); 7.33 (td, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 1.2 and 7.8 Hz); 7.49 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.56 (d, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 7.8 Hz); 7.77 (d, 2H, Ts, J = 8 Hz); 8.01 (d, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 7.8 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 15.28 (2C), 21.53, 30.08, 61.83 (2C), 102.15, 113.65, 118.23, 119.69, 122.97, 124.18, 124.57, 126.74 (2C), 129.75 (2C), 131.24, 135.07, 135.38, 144.70. MS (EI) m/z: 387.15 (100.0%), 388.15 (22.7%), 389.15 (4.5%), 389.16 (2.5%), 390.15 (1.0%).

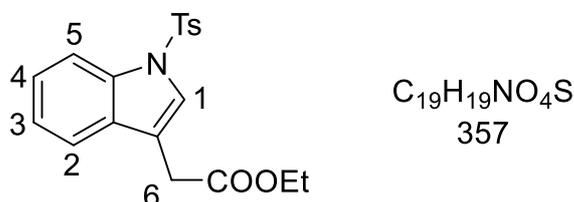
### ethyl 2-(1H-indol-3-yl)acetate (61)



To a solution of indole acetic acid (3 g) in EtOH (340 mL) was added concentrate H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The

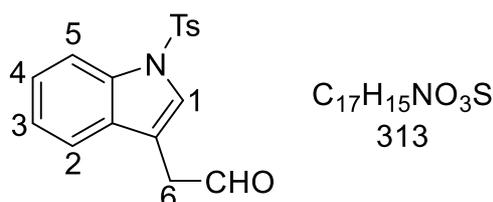
solution was reflux for 20 h and concentrated over vacuum. EtOAc (20 mL) was added and this organic layer was washed with NaHCO<sub>3</sub> saturated solution, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to give the compound as a white solid (3.3g, 95%), mp 44°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.27 (t, 3H, CH<sub>3</sub> Et, J = 7.8 Hz); 3.72 (s, 2H, C<sub>6</sub>H); 4.11 (q, 2H, CH<sub>2</sub> Et, J = 7.2 Hz); 6.99 (t, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 7.2 Hz); 7.08 (t, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 7.2 Hz); 7.24 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.35 (d, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 8.0 Hz); 7.49 (d, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 7.8 Hz); 10.94 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 14.35, 30.26, 62.93, 102.17, 113.67, 118.25, 119.71, 122.99, 124.59, 131.20, 135.09, 135.33, 144.74. IR (KBr): 3155, 3010, 2935, 1735, 1570. MS (EI) m/z: 203[M<sup>+</sup>].

### ethyl 2-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)acetate (**62**)



Same procedure as for compound **23** involving compound **61** (1.65 g, 8.13 mmol), THF (46 mL), NaH (60% dispersed in oil, 1.3g, 32.5mmol) and after 10 min *p*TsCl (2.3 g, 12.2 mmol). After work-up the crude product was purified by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 95: 5) to give the expected compound as a pale yellow solid ( 1.1 g, 35%), mp 100°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.28 (t, 3H, CH<sub>3</sub> Et, J = 6.8 Hz,); 2.37 (s, 3H CH<sub>3</sub> Ts); 3.71 (s, 2H, C<sub>6</sub>H); 4.21 (q, 2H, CH<sub>2</sub> Et, J = 6.8 Hz); 7.23 (d, 2H, Ts, J = 8.0 Hz); 7.27 (t, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 7.2 Hz); 7.36 (t, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 7.2 Hz); 7.52 (d, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 7.2 Hz); 7.61 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.80 (d, 2H, Ts, J = 8.0 Hz); 8.00 (d, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 7.2 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 14.2, 21.5, 31.1, 61.1, 113.6, 115.2, 119.6, 123.2, 124.7, 124.8, 126.8, 129.9, 130.5, 135.0, 135.3, 144.9, 170.5. ATR-IR 2981, 1733, 1596, 1367, 1171 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI-TOF, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>S 358.1113, found 358.1107.

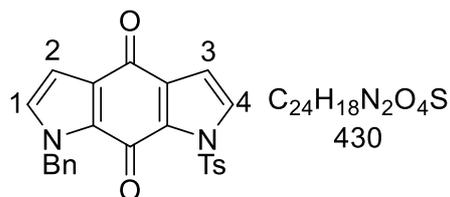
### 2-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)acetaldehyde (**63**)



To a solution of ester **62** (1.3 g, 6.4 mmol) in dry toluene (80 mL), was added dropwise DIBAL-

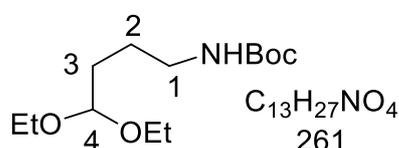
H (1M solution in toluene, 16.1 mL, 16.1 mmol) at  $-78^{\circ}\text{C}$  and under  $\text{N}_2$ . After 30 min water (100 mL) was added and the organic was separated. The aqueous layer was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 50 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under vacuum. Purification of the crude product by flash-chromatographie (PE/ EtOAc 8: 2), gave the expected compound as a ocher solide (1.42 g; 71%), mp  $121^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.34 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  Ts); 3.75 (dd, 2H,  $\text{C}_6\text{H}$ ,  $J = 2.2$  and  $1.0$  Hz); 7.24-7.21 (m, 2H, Ts); 7.25 (ddd, 1H,  $\text{C}_3\text{H}$ ,  $J = 8.0$  and  $7.4$  and  $1.0$  Hz); 7.35 (ddd, 1H,  $\text{C}_4\text{H}$ ,  $J = 8.0$  and  $7.4$  and  $1.0$  Hz); 7.42 (dt, 1H,  $\text{C}_3\text{H}$ ,  $J = 7.9$  and  $1.0$  Hz); 7.57 (br. t,  $\text{C}_1\text{H}$ , 1H,  $J = 7.9$  and  $1.0$  Hz); 7.77-7.79 (m, 2H, Ts); 8.01 (dt, 1H,  $\text{C}_2\text{H}$   $J = 8.3$  and  $0.9$  Hz); 9.75 (t, 1H, CHO,  $J = 2.1$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 21.7, 40.0, 113.0, 113.9, 119.4, 123.5, 125.1, 125.3, 127.0, 130.5, 135.2, 135.3, 145.2, 198.0. IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 3020, 2400, 1729, 1601  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (EI): calculated for  $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}$ : 313.0773, found 313.0784.

#### 1-benzyl-7-tosylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (64)



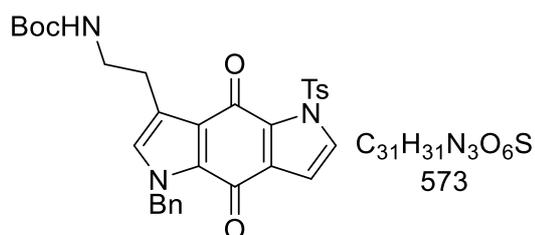
A suspension of quinone **12** (300 mg, 0.74 mmol), 1,1-diethoxyethane (4.5g, 38.2 mmol) and  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (4.6 mg, 10.85 mmol) in dry acetonitrile (125mL) was refluxed for 48h. After filtration over celite, the solvent was removed under vacuum and the residue was purified by flash-chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) to give the product (160 mg, 54%), mp  $176^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.46 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  Ts); 5.56 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  Bn); 6.61 (d, 1H,  $\text{C}_2\text{H}$ ,  $J = 2.8$  Hz); 6.77 (d, 1H,  $\text{C}_3\text{H}$ ,  $J = 3.2$  Hz); 6.80 (d, 1H,  $\text{C}_1\text{H}$ ,  $J = 2.8$  Hz); 7.18-7.22 (m, 2H); 7.28-7.34 (m, 5H); 7.75 (d, 1H,  $\text{C}_4\text{H}$ ,  $J = 3.2$  Hz); 8.01 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4$  Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) 21.79, 52.17, 107.78, 108.08, 127.77(2C), 127.85(2C), 128.04, 128.75(2C), 129.06 (2C), 129.34, 129.49 (2C), 129.54, 131.09, 132.66, 134.21, 136.33, 145.77, 167.21, 178.61. IR ( $\text{CHCl}_3$ ) 3399, 1772, 1736, 1693, 1364  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ,  $\text{MH}^+$ ) calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  431.1078 found: 431.1072.

#### tert-butyl (4,4-diethoxybutyl)carbamate (66)



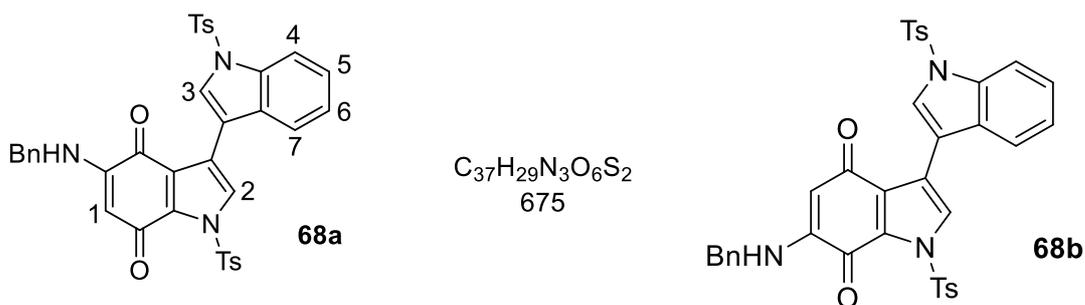
4-Aminobutyraldehydediethylacetal (977 mg, 6.058 mmol) was dissolved in THF (40 mL), and then Et<sub>3</sub>N (1.43 mL, 11.22 mmol), di-*tert*butyldicarbonate (2.336 g, 11.22 mmol) and DMAP (10 mg, 0.082 mmol) were added. The mixture was stirred at RT for 18 h, and concentrated under vacuum. Purification of the crude product by flash-chromatography (increasing polarity from 5 % to 40 % EtOAc in pentane) gave the title compound (1.40 g, 99 %) as a colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.25 (t, 6H, CH<sub>3</sub>, J = 8.8 Hz); 1.48 (s, 9H, CH<sub>3</sub> Boc); 1.85 (q, 2H, C<sub>3</sub>H, J = 6.3 Hz); 3.26 (quint, 2H, C<sub>2</sub>H, J = 6.1 Hz); 3.22–3.77 (m, 6H); 4.58 (t, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 6.3 Hz); 4.95 (br. s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 15.3 (2C), 25.1, 28.4 (3C), 30.9, 40.3, 61.2 (2C), 79.0, 102.6, 155.9. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3360, 1786, 1715, 1698 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI-MNa<sup>+</sup>) calcd for C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub> calcd for 284.1838 found: 284.1835.

**tert-butyl(2-(1-benzyl-4,8-dioxo-5-tosyl-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[2,3-f]indol-3-yl)ethyl)carbamate (67a)**



To a solution of quinone 12' (140 mg, 0.25 mmol) and acetaldehydediethylacetal (1.52 g, 12.91 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (43 mL) was added Mn(OAc)<sub>3</sub> (1.6 g, 3.67 mmol). The mixture was refluxed for 2 days. After filtration over celite and concentration under vacuum, the crude product was purified by flash-chromatography (PE/ EtOAc 8 : 2) to give the compound as a yellow solid (110 mg, 76%), mp 192 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.43 (s, 9, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Ts); 3.01 (t, 2 CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHBoc, J = 6.4 Hz); 3.43 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Boc, J = 6.4 Hz); 5.56 (s, 2H, CH<sub>2</sub> Bn); 6.54 (d, 1H, CH=CH-NBn, J = 3 Hz); 6.78 (d, 1H, CH=CH-NBn, J = 3 Hz); 7.19 (d, 2H, Ts, J = 6.7 Hz); 7.29-7.36 (m, 6H); 7.59 (s, 1H, CH); 8.03 (d, 2H, Ts, J = 6.7Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.75, 26.05, 28.39 (3C), 40.32, 51.95, 108.36, 123.03, 127.43 (2C), 127.59, 128.03, 128.11, 128.88 (2C), 128.93 (2C), 129.17, 129.24, 129.58 (2C), 129.62, 131.72, 134.37, 136.30, 143.50, 145.72, 156.00, 171.56, 175.72. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S 574.2012, found: 574.2025.

**5-(benzylamino)-1,1'-ditosyl-1H,1'H-[3,3'-biindole]-4,7-dione (68a) and 6-(benzylamino)-1,1'-ditosyl-1H,1'H-[3,3'-biindole]-4,7-dione (68b)**

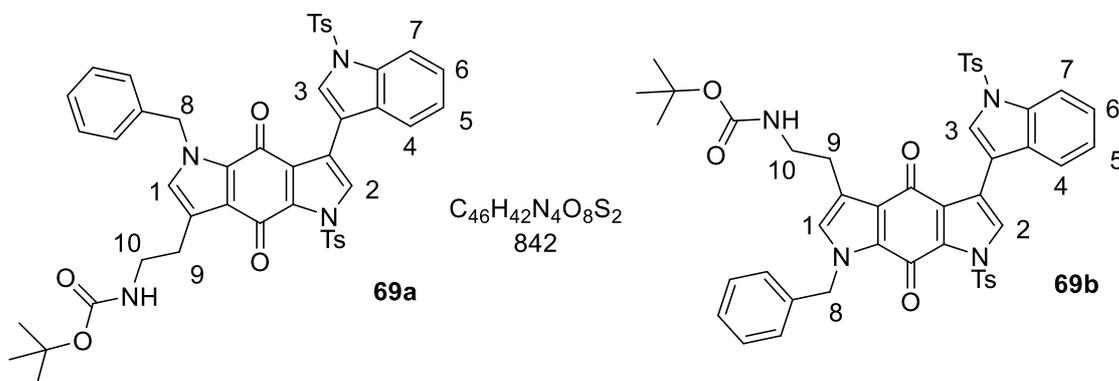


To a solution of quinone **76** (91 mg, 0.16 mmol) EtOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9: 1, 15 mL), benzylamine (26 mg, 0.24 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h. The solvent was evaporated over vacuum and the residue was purified by flash-chromatography (PE/AcOEt 8: 2) to give the mixture of the two expected regioisomers (136 mg, 15%). Analytical HPLC performed on Acquity BEH C18 1.7 $\mu$ m 2.1x100 mm column (H<sub>2</sub>O + 0.1 HCOOH/CH<sub>3</sub>CN + 0.1 HCOOH) allowed the separation of each regioisomer)

**68a**: yellow solid, mp 228 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 4.31 (s, 2H, CH<sub>2</sub> Bn, J = 5.6 Hz); 5.31 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 5.98 (t, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 5.4 Hz); 7.21-7.44 (m, 11H); 7.66 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 8.4 Hz); 7.72 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 7.2 Hz); 7.90 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 8.07 (s, 1H); 8.08 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 8.32 (s, 1H, C<sub>2</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 21.58, 21.81, 47.12, 97.95, 112.44, 113.88, 120.31, 123.07, 123.66, 124.95, 127.01 (2C), 127.61 (2C), 128.15, 129.01 (2C), 129.24 (2C), 129.31, 129.50 (2C), 129.95 (2C), 133.43, 134.12, 134.89, 135.14, 135.78, 145.02, 146.05, 146.36, 147.49, 174.89, 178.74. IR (CHCl<sub>3</sub>) 3326, 1688, 1622, 1598 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>37</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> 676.1576 found 676.1561.

**68b**: yellow solid, mp 202 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 4.29 (s, 2H, CH<sub>2</sub> Bn, J = 5.6 Hz); 5.42 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 6.21 (t, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 5.6 Hz); 7.27 (d, 1H, J = 8.8 Hz); 7.29-7.44 (m, 10H); 7.66 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 6.7 Hz); 7.94 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 8.05 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 8.09 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 6.7 Hz); 8.17 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 8.39 (s, 1H, C<sub>2</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 21.59, 21.83, 47.23, 98.91, 111.97, 113.86, 117.40, 120.11, 123.54, 124.24, 124.74, 127.10 (2C), 127.61, 127.76 (2C), 128.17, 129.00 (2C), 129.04 (2C), 129.13, 129.45, 129.83 (2C), 129.94 (2C), 133.78, 134.80, 135.16, 135.82, 135.78, 144.93, 146.38, 146.74, 147.07, 170.78, 181.96. IR (CHCl<sub>3</sub>) 3333, 1647, 1605, 1572 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>37</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> 676.1576 found 676.1562.

**tert-butyl(2-(1-benzyl-4,8-dioxo-7-tosyl-5-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)-1,4,7,8-tetrahydropyrrolo[3,2-f]indol-3-yl)ethyl)carbamate (69a) and tert-butyl(2-(1-benzyl-4,8-dioxo-5-tosyl-7-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[2,3-f]indol-3-yl)ethyl)carbamate (69b)**



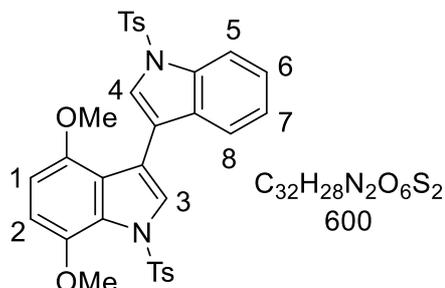
A suspension of quinone (**69**) (76 mg, 0.113 mmol), Ketal (**66**) (286 mg, 0.861 mmol) and Mn(OAc)<sub>3</sub> (232 mg, 0.861 mmol) in dry acetonitrile (10mL) was refluxed for 48h. After filtration over celite, the solvent was removed over vacuum and the residue was purified by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give the expected regioisomers

**69a:** Yellow solid, mp 206 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.48 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 3.05 (t, 2H, C<sub>9</sub>H, J = 7.2 Hz); 3.84 (t, 2H, C<sub>10</sub>H, J = 7.2 Hz); 5.55 (s, 2H, C<sub>8</sub>H); 6.12 (br s, 1H, NHBoc); 6.67 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.17-7.41 (m, 11H); 7.59 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 7.7 Hz); 7.92 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 8.01 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 8.07 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 8.1 Hz); 8.09 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 8.23 (s, 1H, C<sub>2</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 21.57, 21.79, 28.02 (3C), 29.71, 45.83, 51.89, 82.10, 112.80, 113.88, 116.41, 120.31, 123.41, 123.52, 124.27, 124.78, 127.10 (2C), 127.33, 127.46, 127.53 (2C), 127.55, 128.04, 128.73, 128.86 (2C), 129.21 (2C), 129.55 (2C), 129.61, 129.70, 129.86 (2C), 132.64, 134.22, 134.86, 135.12, 136.45, 144.88, 145.91, 152.46, 172.36, 174.37. IR (CHCl<sub>3</sub>) 3399, 1772, 1736, 1693, 1364 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>46</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> 843.2522 found 843.2484.

**69b:** Yellow solid, mp 204 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.40 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 3.01 (t, 2H, C<sub>9</sub>H, J = 7.2 Hz); 3.82 (t, 2H, C<sub>10</sub>H, J = 7.2 Hz); 5.51 (s, 2H, C<sub>8</sub>H); 6.66 (br. s, 1H, NHBoc); 6.95 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.18-7.41 (m, 11H); 7.59 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 7.7 Hz); 7.93 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 8.01 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 8.04 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 8.1 Hz); 8.03 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 8.25 (s, 1H, C<sub>2</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.59, 21.79, 27.94 (3C), 29.71, 45.81, 51.97, 82.10, 112.97, 113.80, 116.59, 120.51, 123.30, 123.48, 124.72, 125.24, 127.09,

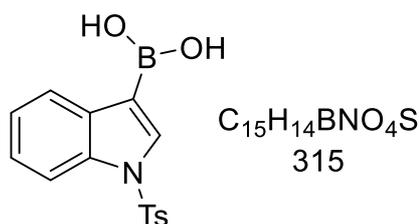
127.12 (2C), 127.81 (2C), 127.96, 128.51, 128.73 (2C), 129.03, 129.06 (2C), 129.12, 129.46 (2C), 129.48, 129.83, 129.92 (2C), 132.11, 134.16, 134.85, 135.20, 136.36, 144.88, 145.76, 152.50, 166.89, 179.50. IR (CHCl<sub>3</sub>) 3402, 1775, 1737, 1691, 1367 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>46</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> 843.2522 found 843.2491.

#### 4,7-dimethoxy-1,1'-ditosyl-1H,1'H-3,3'-biindole (70)



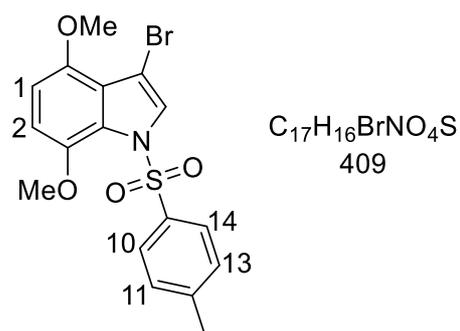
A mixture of 3-bromo-4,7-dimethoxy-1-tosyl-1H-indole **65** (2 g, 4.87 mmol), (1-tosyl-1H-indol-3-yl) boronic acid **71** (1.6 g, 5.1 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.65 g, 0.56 mmol) and 2M CsCO<sub>3</sub> (7.3 mL) in degassed DME (78 mL) was refluxed overnight. After filtration on celite, H<sub>2</sub>O (50 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated over vacuum. The crude product was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 8: 2) to give the expected compound as a white solid (2.19 g, 75 %), mp 92 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 3.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O); 3.70 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O); 6.60 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.8 Hz); 6.70 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.8 Hz); 7.28 (d, 2H, CH Ts, J = 8.4 Hz); 7.32 (d, 2H, CH Ts, J = 8.3 Hz); 7.30-7.40 (m, 2H); 7.68 (d, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 7.2 Hz); 7.81 (d, 2H, CH Ts, J = 8.4 Hz); 7.85 (s, 1H, C<sub>4</sub>H); 7.86 (d, 2H, CH Ts, J = 8.3 Hz); 7.97 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 8.08 (d, 1H, C<sub>8</sub>H, J = 8.2 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.59, 21.66, 55.38, 55.63, 104.48, 108.14, 111.81, 113.53, 115.49, 120.97, 121.70, 123.27, 124.54, 125.72, 126.83 (2C), 127.28 (2C), 129.43 (2C), 129.89 (2C), 130.01, 130.91, 134.85, 135.54, 137.27, 141.96, 144.31, 144.85, 145.18, 148.44. IR (CHCl<sub>3</sub>) 3141, 2910, 1506, 1348 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>32</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> 601.1467, found 601.1456.

#### (1-tosyl-1H-indol-3-yl)boronic acid (71)



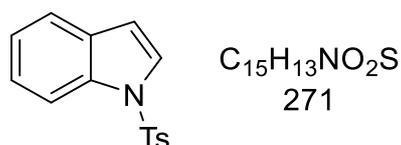
To a solution of **67** (3.4 g, 6.4 mmol) in THF (100 mL) was added, at 23 °C, a solution of borane (1 M in THF, 32 mL, 32 mmol). The mixture was stirred for 1 h and water (38 mL) was added slowly. After filtration and concentration under vacuum, the residue was extracted with EtOAc (2x60 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated over vacuum. Trituration of the crude product with hexane gave the expected compound as an ecru solid (1.72 g, 85%), used without further purification in the next step.

### 3-bromo-4,7-dimethoxy-1-tosyl-1H-indole (72a)



To a solution of compound **68** (6.8 g, 26.56 mmol) in anhydrous THF (150 mL) was added under nitrogen atmosphere NaH (60 %, dispersed in oil (4.25 g, 106.25 mmol)). After 10 min stirring, p-tosyl chloride 7.6 g, 39.84 mmol) was added and stirring continued for 1 h. Water (50 mL) was first added carefully and then CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL). The organic layer was separated, washed with water (3x100 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. The crude product was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 80: 20) to give the expected compound as a pale yellow solid (3.75 g, 75 %), mp 174 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Ts); 3.61 (s, 3H OCH<sub>3</sub>); 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.54 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.8 Hz); 6.60 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.8 Hz); 7.26 (d, 2H, C<sub>11</sub>H et C<sub>13</sub>H, J = 8.1 Hz); 7.71 (d, 2H, C<sub>10</sub>H and C<sub>14</sub>H, J = 8,1 Hz); 7.78 (s, 1H, CHNTs). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 21.72, 56.35 (2C), 94.01, 105.02, 108.48, 120.96, 125.86, 127.12, 127.41 (2C), 129.50 (2C), 136.91, 141.71, 144.57, 147.96. IR (KBr): 3141, 1506, 1363, 1172 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 409.00 (100.0%), 411.00 (97.3%), 412.00 (17.9%), 410.00 (16.2%).

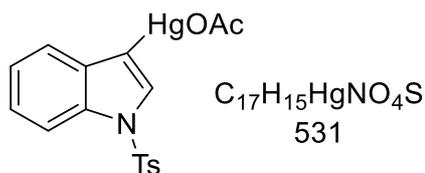
### 1-tosyl-1H-indole (73)



To a solution of indole (3 g, 25.6 mmol) in anhydrous THF (60 mL) was added under nitrogen

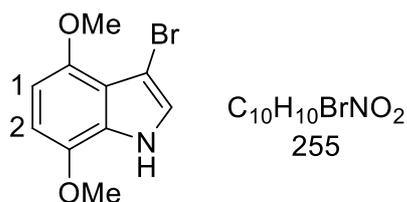
atmosphere NaH (60 %, dispersion in oil 1.65 g, 38.4 mmol). After 30 min stirring, p-tosyl chloride (5.4 g, 27.6 mmol) was added and stirring continued overnight. Water (50 mL) was first added carefully. After concentration over vacuum EtOAc (100 mL) was added. The organic layer was separated, washed with NaHCO<sub>3</sub> saturated solution (40 mL), brine (40 mL) and dried over sur MgSO<sub>4</sub>. The crude product was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 70: 30) to give the expected compound as a white solid (6.75 g, 97 %), mp 87 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 7.94 (m, 1H); 7.87 (m, 2H); 7.79 (d, J = 3.6 Hz, 1H); 7.60 (m, 1H); 7.39 (d, J = 8.1 Hz, 2H); 7.33 (m, 1H); 7.24 (m, 1H); 6.83 (m, 1H); 2.31 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.18, 108.95, 113.39, 121.33, 123.21, 124.46, 126.24, 126.63, 129.74, 130.68, 134.72, 135.09, 144.88. FTIR: 3142, 3114, 3064, 2958, 2924, 1722, 1597, 1445, 1372, 1263, 1177, 1133 cm<sup>-1</sup>. HRMS (EI) calcd for C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>NS (M<sup>+</sup>) 271.0667, found 271.0671.

#### acetyl(oxo)(1-tosyl-1H-indol-3-yl)mercury (74)



To a solution of compound **73** (3 g, 11.1 mmol) in glacial acetic acid (75 mL), was added mercuric acetate (3.6 g, 10.5 mmol). After 10 min stirring, perchloric acid (5 drops) was added and stirring was continued overnight. Water (40ml) was added. Filtration gave the expected compound as a white solid (5.75 g, 98%), mp 179 °C, this compound being relatively instable, it was used without further purification in the next step. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 8.00 (d, 1H); J = 8.4 Hz), 7.84 (d, 2H, J = 8.4 Hz); 7.73 (d, 1H, J = 7.8 Hz); 7.49 (s, 1H); 7.39 (d, 2H, J = 7.8 Hz); 7.32–7.19 (m, 2H); 2.31 (s, 3H); 1.97 (s, 3H). IR (CHCl<sub>3</sub>) 1641 cm<sup>-1</sup>.

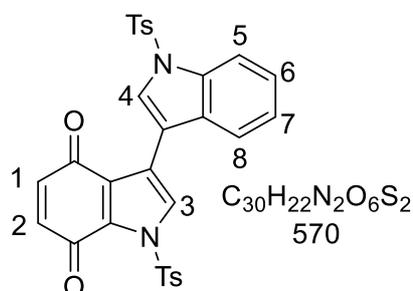
#### 3-bromo-4,7-dimethoxy-1H-indole (75)



To a solution of compound **24** (9 g, 51 mmol) in pyridine (50 mL) was added dropwise at 0 °C

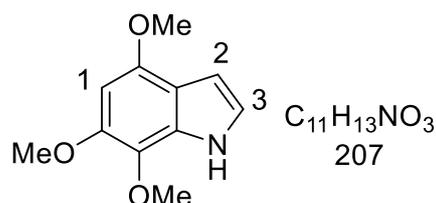
and so that temperature does not exceed 2 °C pyridinium perbromide, hydrobromide (17.90 g, 56 mmol) in pyridine (85 mL). The mixture was stirred at RT for 4 h. The solution was poured into Et<sub>2</sub>O (200 mL). After filtration, the filtrate was washed with 1M HCl (4x100 mL), 1M NaOH (2 x 100 mL) and water (2 x 100 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated over vacuum to give the expected compound as a brown solid (10 g, 77 %), mp 70 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.38 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.06 Hz); 6.48 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.06 Hz); 7.07 (d, 1H, C=CHN, J = 2.56 Hz); 9.29 (br. s, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 55.73, 56.22, 89.18, 100.4, 102.38, 117.41, 122.78, 127.74, 140.78, 148.04. IR (CHCl<sub>3</sub>) 3141, 1510 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 256 (M<sup>+</sup>, 72%); 240 (100); 136 (100); 84 (80).

### 1,1'-ditosyl-1H,1'H-[3,3'-biindole]-4,7-dione (76)



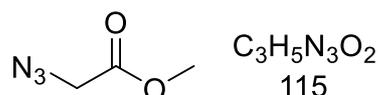
To a solution of compound **63** (200 mg, 0.32 mmol) in dioxane (4mL) was added CoF<sub>3</sub> (300 mg, 2.56 mmol) and water (100 μL). The mixture was vigorously stirred at room temperature, under Ar atmosphere, for 2h. Water (20 mL) was added. The mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. Purification of the crude product by flash-chromatography (PE/AcOEt 8: 2) gave the expected compound as a dark fuschia solid (84 mg, 46 %), mp 251°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 6.61 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.8 Hz); 6.68 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.8 Hz); 7.27 (d, 2H, CH<sub>2</sub> Ts, J = 8.4 Hz); 7.29 (d, 2H, CH<sub>2</sub>Ts, J = 8.3 Hz); 7.30-7.43 (m, 3H); 7.67 (d, 1H, J = 7.2 Hz); 7.94 (d, 2H, CH<sub>2</sub> Ts, J = 8.4 Hz); 8.10 (d, 2H, CH<sub>2</sub> Ts, J = 8.3 Hz); 8.18 (s, 1H, C<sub>4</sub>H); 8.35 (s, 1H, C<sub>3</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.61, 21.85, 111.81, 113.96, 116.85, 120.05, 123.70, 124.98, 126.39, 127.09 (2C), 127.60, 127.83, 129.24, 129.29 (2C), 129.78 (2C), 129.97 (2C), 130.44, 133.57, 134.87, 135.08, 136.35, 137.07, 145.08, 146.59, 175.04, 183.08. IR (CHCl<sub>3</sub>): 1660, 1374, 1185 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> 571.0998, found 571.0975.

#### 4,6,7-trimethoxy-1H-indole (78)



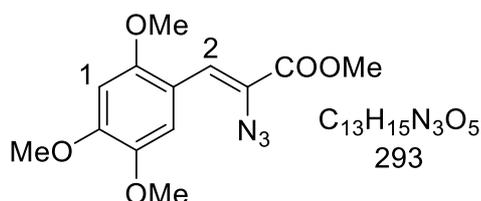
A solution of compound (**82**) (251mg, 1 mmol) in diphenylether (5ml) was refluxed for 1h. After cooling, the mixture was deposited on a silicagel column and eluted first with PE to remove diphenylether and then with  $CH_2Cl_2$  to give the expected compound as a white solid (140 mg, 68%), mp 107°C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 3.97 (s, 9H); 6.30 (s, 1H,  $C_1H$ ); 6.60 (dd, 1H,  $C_2H$ , J = 2.2 and 3.2 Hz); 7.09 (dd, 1H,  $C_3H$ , J = 2.2 and 3.2 Hz); 8.26 (s, 1H, NH).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 55.7, 57.9, 61.0, 90.9, 100.2, 114.6, 122.3, 129.4, 131.1, 147.0, 148.9. MS (EI): 207 ( $M^+$ , 82), 192 (100), 176 (6) 164 (13), 149 (51), 133 (33), 120 (36), 104 (15), 91 (41), 63 (22).

#### Methyl 2-azidoacetate (79)



To a solution of methyl-2-bromoacetate (1.3 g, 8.5 mmol) in DMSO (35 mL) was added  $NaN_3$  (829 mg, 12.8 mmol). The mixture was stirred at RT for 20 h. Cold water (80 mL) was added and the mixture was extracted with  $Et_2O$  (3x50 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over  $MgSO_4$  and concentrated over vacuum to give the expected ester as a colorless oil (902 mg, 92%).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 3.89 (s, 2H); 3.80 (s, 3H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 168.9, 52.8, 50.4. HRMS ( $CH_4-MH^+$ ) calcd for  $C_3H_5N_3O_2$ : 116.0462, found 116.0460.

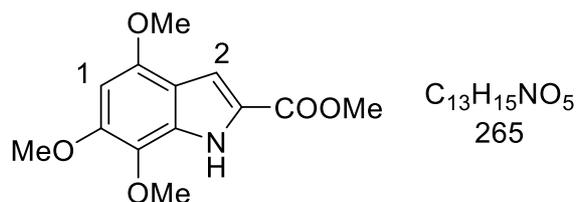
#### Methyl (Z)-2-azido-3-(2,4,5-trimethoxyphenyl) acrylate (80)



A solution of sodium methoxide (25% w, 115 mL, 532 mmol) in MeOH (187 mL) was cooled to -8°C under  $N_2$ . A solution of 2,4,5-trimethoxybenzaldehyde (25 g, 128 mmol) and methyl

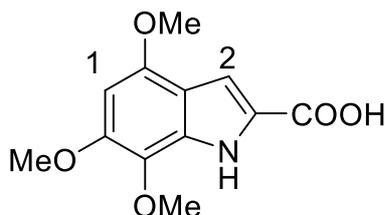
azidoacetate (**79**) (59 g, 513 mmol) in a mixture of MeOH (50 mL) and anhydrous THF (100 mL) was added dropwise with stirring to the first methoxide solution, maintaining the temperature at -8 °C for 45 min. The mixture was stirred for an additional 2 h while the temperature was maintained below 5 °C. The resulting heterogeneous mixture was poured over ice (1 kg) and stirred manually. The precipitate which separated was filtered, washed with water, and dried over CaCl<sub>2</sub> in a vacuum desiccator. The product thus obtained was dissolved in EtOAc (600 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Removal of solvent from the dried extract afforded practically pure expected compound as a bright yellow solid (27.6 g, 74% yield), mp 119 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.89 (s, 6H, (OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.92 (s, 3H, C(O)OCH<sub>3</sub>); 6.48 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.37 (s, 1H, C<sub>2</sub>H); 7.91 (s, 1H, C<sub>8</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 52.6, 55.9, 56.4, 56.5, 96.2, 113.4, 113.8, 119.4, 122.3, 142.5, 151.4, 153.5, 164.4. MS (EI) m/z 265 (M - N<sub>2</sub>, 28), 250 (52), 233 (45), 218 (100), 206 (71), 190 (55).

#### Methyl 4,6,7-trimethoxy-1H-indole-2-carboxylate (**81**)



Compound **80** (3.2 g, 79 mmol) was added slowly to boiling xylenes (500 mL) with stirring over a period of 3 h. The reaction mixture was refluxed for 3 h. The solvent was completely removed and MeOH was added to the residue. Filtration afforded the product as a white solid (20.7 g, 99%), mp 122 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 3.91 (s, 9H, (OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 3.94 (s, 3H, C(O)OCH<sub>3</sub>); 6.26 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.26 (d, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 2.3 Hz); 9.04 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 51.8, 55.6, 57.5, 61.1, 90.7, 107.2, 114.8, 125.6, 128.7, 132.6, 149.6, 150.5, 162.1. MS (EI) m/z: 265 (M<sup>+</sup>, 61), 250 (37), 233 (30), 218 (100), 204 (8), 190 (49), 162 (11), 117 (12).

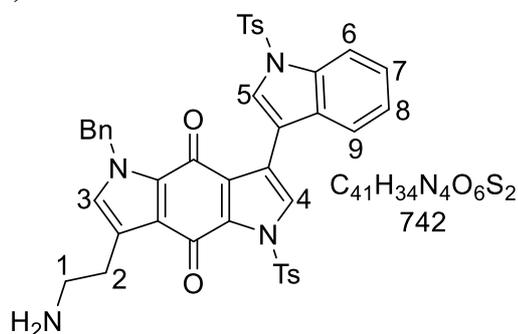
#### 4,6,7-trimethoxy-1H-indole-2-carboxylic acid (**82**)



Compound **81** (20.5 g, 77 mmol) was added to 2M NaOH solution (400 mL), and the suspension was heated until it became a clear solution. Then it was refluxed for 30 min, cooled to room

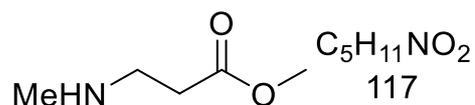
temperature, and acidified with 6M HCl. The precipitate was filtered, washed with water (500 mL), and dried over CaCl<sub>2</sub> in a vacuum desiccator. After crystallization from MeOH the expected compound was obtained as a white solid (19.3 g, 98%), mp 190 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.38 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 6.98 (d, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 2.2 Hz); 11.52 (s, 1H, NH); 12.64 (s, 1H, COOH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 55.5, 57.3, 60.7, 90.9, 105.8, 114.1, 127.2, 128.8, 132.7, 149.1, 149.5, 162.3. MS (EI) m/z: 251 (M<sup>+</sup>, 67), 236 (62), 218 (100), 190 (64), 144 (19), 117 (20). HRMS: Calcd for C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O 251.0793 found 251.0796.

**3-(2-aminoethyl)-1-benzyl-5-tosyl-7-(1-tosyl-1H-indol-3-yl)pyrrolo[2,3-f]indole-4,8(1H,5H)-dione (83a)**



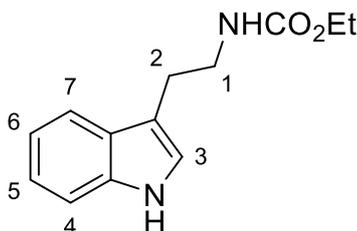
To a solution of **69a** (198mg, 0.235 mmol) in dry CHCl<sub>3</sub> (7ml) was added dropwise TFA (3.5mL). The solution was stirred for 3 h. After concentration under vacuum, the crude product was purified by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98: 2) to give the compound as an orange solid (155 mg, 89%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.93 (t, 2H, C<sub>2</sub>H, J = 6.5 Hz); 3.34 (q, 2H, C<sub>1</sub>H, J = 6.5 Hz); 5.46 (s, 2H, CH<sub>2</sub> Bn); 6.54 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 7.16-7.18 (m, 5H); 7.32-7.39 (m, 7H) 7.63 (d, 1H, CH Ar, J = 7.5 Hz); 7.69 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 7.94 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz) 8.09 (d, 1H, C<sub>9</sub>H, J = 8.1 Hz); 8.51 (s, 1H, CH Ar). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.48, 21.52, 25.77, 29.72, 43.80, 51.76, 113.95, 113.96, 117.91, 120.32, 121.80, 121.96, 123.34, 123.40, 123.51, 124.61, 126.90 (2C), 127.07 (2C), 127.30, 127.68 (2C), 127.87, 128.05, 128.82 (2C), 129.54 (2C), 129.74, 129.84 (2C), 131.87, 133.73, 135.01, 136.46, 137.09, 143.22, 144.85, 174.91, 175.48. HRMS (EI-MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>41</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> 743.2000, found 743.2043.

### Methyl-3-(methylamino)propanoate (87d)



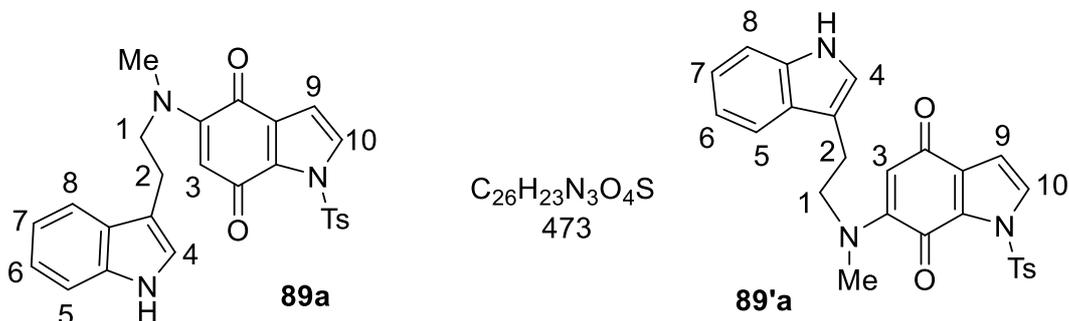
Methyl acrylate (1.05 mL, 0.012 mol) was added to a solution of methylamine in THF (6.6 mL, 0.013 mol) and the reaction was stirred for 12 h. Evaporation of the solvent gave the product as a yellow oil (1.15 g, 84%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.50 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 2.74 (t, 2H, CH<sub>2</sub>, J = 6.0 Hz); 2.91 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.72 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 32.10, 33.90, 35.84, 52.28, 172.46. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3377, 1756, 1575, 1387 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 117.08 (100.0%), 118.08 (5.4%).

### Ethyl-2-(1H-indole-3-yl)ethylcarbamate (88)



A suspension of tryptamine (1.9 g, 12 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) was slowly added at 0 °C to a 4N NaOH solution (3 mL). After 5 min of stirring, ethyl chloroformate (1.3 mL, 1.2 mmol) was added. The mixture was stirred for 3 h and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added. The organic layer was separated and washed with water (3 x 100 mL). The solution was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. Purification of the crude product by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 99.5: 0.5) gave the compound as a yellow oil (2.55g, 91%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.27 (t, 3H, CH<sub>3</sub> Et); 3.01 (t, 2H, CH<sub>2</sub> Et); 3.56 (d, 2H, C<sub>1</sub>H); 4.14 (q, 2H, C<sub>2</sub>H); 7.07 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 7.17 (td, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 7.5 and 7.1 and 1.1Hz); 7.25 (td, 1H, C<sub>7</sub>H, 7.1 and 7.8 and 1.1Hz); 7.29 (s, 1H, C<sub>5</sub>H); 7.41 (dd, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 7.5 and 1.1Hz); 7.65 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 7.8Hz); 8.15 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 14.4, 25.8, 41.4, 61.7, 111.6, 112.8, 118.7, 120.2, 121.7, 122.2, 127.3, 136.4, 153.5. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3408, 3326, 1698, 1522, 1258 cm<sup>-1</sup>. HRMS (FAB+) calcd for C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 232.1211, found: 232.1212.

**5-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)(methyl)amino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (89a) and 6-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)(methyl)amino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (89'a)**

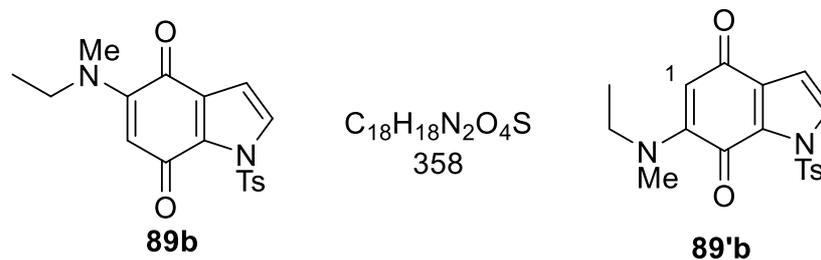


A solution of methyl tryptamine **51b** (1.09 g, 6.3 mmol) in absolute ethanol (15 mL) was added dropwise to a solution of indole-dione **9** (0.38 g, 1.25 mmol) in absolute ethanol (16 mL). After 2h stirring at room temperature, the mixture was concentrated over vacuum and the crude product was purified by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99.5: 0.5) to give the expected compounds:

**89a**: pink fuschia solid (180 mg, 12%) mp 175 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Me); 3.10 (t, 2H, C<sub>2</sub>H, J = 7.2 Hz); 3.97 (t, 2H, C<sub>1</sub>H, J = 7.2 Hz); 5.34 (s, 1H, C<sub>3</sub>H), 6.55 (d, 1H, C<sub>9</sub>H, J = 3.3 Hz), 7.00 (d, 1H, C<sub>8</sub>H, J = 2.2 Hz), 7.16 (m, 4H), 7.36 (d, 2H, Ts, J = 8.1 Hz), 7.63 (d, 1H, C<sub>10</sub>H, J = 3.3 Hz), 7.65 (br. s, 1H, NH); 8.05 (d, 2H, Ts, J = 8.1 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.78, 24.38, 41.11, 56.10, 104.49, 107.69, 111.18, 112.45, 118.79, 119.66, 122.28, 122.65, 127.02, 127.42, 128.80, 129.10 (2C), 129.44, 131.09 (2C), 134.54, 136.31, 145.75, 151.28, 174.22, 180.42. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 474.1488, found 474.1483.

**89'a**: pink fuschia solid (710 mg, 48%), mp 175 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Me); 3.11 (t, 2H, C<sub>2</sub>H, J = 7.2 Hz); 3.92 (t, 2H, C<sub>1</sub>H, J = 7.2 Hz); 5.38 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 6.66 (d, 1H, C<sub>9</sub>H, J = 3.3 Hz); 7.08 (d, 1H, C<sub>8</sub>H, J = 2.2 Hz); 7.22 (m, 4H); 7.39 (d, 2H, Ts, J = 8.1 Hz); 7.64 (br.s, 1H, NH); 7.75 (d, 1H, C<sub>10</sub>H, J = 3.3 Hz); 8.13 (d, 2H, Ts, J = 8.1 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.74, 24.27, 40.98, 55.65, 103.84, 107.54, 111.12, 112.58, 118.88, 119.71, 122.27, 122.56, 127.33, 128.96 (2C), 129.41, 129.63 (2C), 130.19, 132.19, 134.50, 136.23, 145.87, 152.78, 172.82, 180.80. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 474.1488, found 474.1491.

**5-(ethyl(methylamino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (89b) and 6-(ethyl(methylamino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (89'b)**

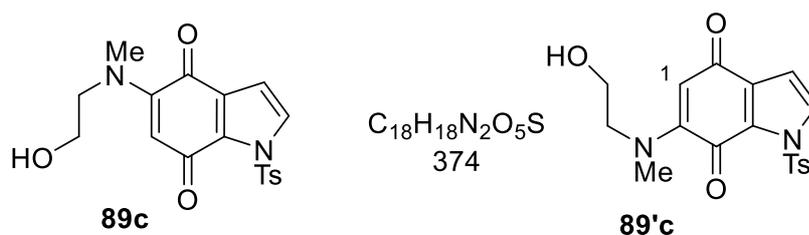


Ethyl methylamine (295 mg, 5 mmol) was added to the solution of indoledione **9** (300 mg, 1 mmol) in ethanol (13 mL) and the reaction is stirred for 2 h. The solvent was concentrated over vacuum the crude product was purified by flash chromatography ( $CH_2Cl_2$  / MeOH 99.5: 0.5).

**89b** (pink solid, 20 mg, 8%), mp: 104 ° C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 1.25 (t, 3H,  $CH_2CH_3$ ,  $J = 7.0$ Hz); 2.45 (s, 3H,  $CH_3$  Ts); 3.02 (s, 3H, NMe); 3.61 (q, 2H,  $CH_2CH_3$ ,  $J = 7.0$  Hz); 5.39 (s, 1H,  $C_1H$ ); 6.67 (d, 1H,  $CH=CHNTs$ ,  $J = 3.3$  Hz); 7.35 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4$ Hz); 7.67 (d, 1H,  $CH=CHNTs$ ,  $J = 3.3$ Hz); 8.05 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4$  Hz).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 12.78, 21.78, 40.11, 49.35, 104.21, 107.69, 127.55, 128.82, 129.13 (2), 129.45 (2C), 131.32, 134.40, 145.78, 150.51, 174.29, 180.60. HRMS (DCI- $CH_4$ ,  $M^+$ ) calcd for  $C_{18}H_{18}N_2O_4S$  358.0987, found 358.0987.

**89'b** (pink solid, 90 mg, 31%), mp: 106 ° C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 1.29 (t, 3H,  $CH_2CH_3$ ,  $J = 7.0$ Hz); 2.48 (s, 3H,  $CH_3$  Ts); 3.11 (s, 3H, NMe); 3.61 (q, 2H,  $CH_2CH_3$ ,  $J = 7.0$ Hz); 5.74 (s, 1H,  $C_1H$ ); 6.71 (d, 1H,  $CH=CHNTs$ ,  $J = 3.2$ Hz); 7.40 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4$ Hz); 7.76 (d, 1H,  $CH=CHNTs$ ,  $J = 3.2$ Hz); 8.07 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4$ Hz).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 12.73, 21.79, 40.03, 49.49, 103.27, 107.60, 129.02, 129.42 (2C), 129.62 (2C), 130.35, 132.41, 134.44, 145.91, 152.42, 172.70, 180.90. HRMS (DCI- $CH_4$ ,  $M^+$ ) calcd for  $C_{18}H_{18}N_2O_4S$  358.0974 found 358.0973.

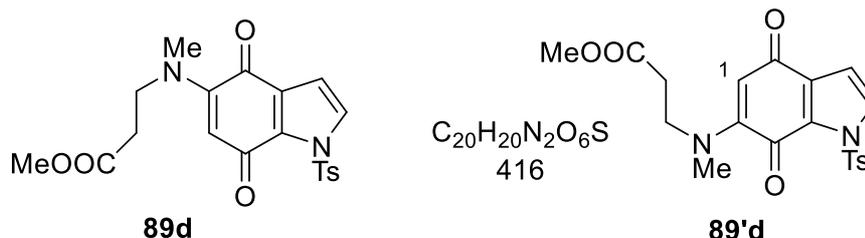
**5-((2-hydroxyethyl)(methyl)amino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (89c) and 6-((2-hydroxyethyl)(methyl)amino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (89'c)**



To a solution of 2-(methylamino)ethanol **87b** (0.6 mL, 7.5 mmol) in EtOH (7.5 mL) was added a solution of indoledione **9** (460 mg, 1.5 mmol) in EtOH (19, 5 mL), stirring was maintained

for 2 hours. After concentration, the crude product was purified by flash chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) to give a mixture of the two regioisomers as a pink solid (191 mg, 34%) which were not separable,  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ ,  $m/z$  373 ( $\text{M}^-$ , 100%).

**methyl 3-((4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-5-yl)(methyl)amino)propanoate (89d) and methyl 3-((4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-6-yl)(methyl)amino)propanoate (89d')**

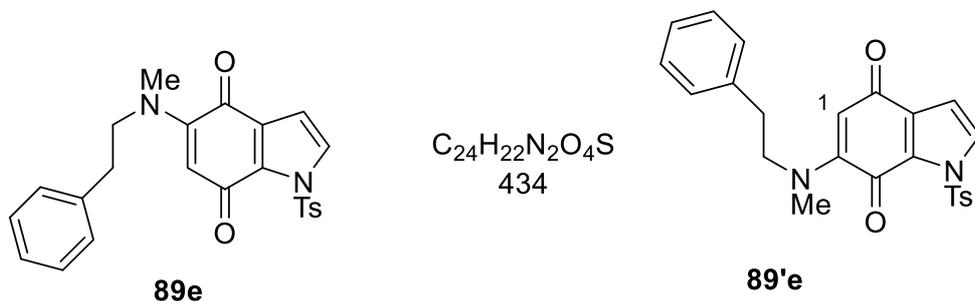


To a solution of indoleione **9** (1 g, 3.3 mmol) in ethanol (23 mL) was added a solution of amine **88d** (1.9 g, 16.6 mmol) in ethanol (10 mL). The mixture was stirred for 2 h. The solvent was concentrated under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / MeOH 99.5: 0.5) to give the expected compounds (620 mg, 45%)

**89d** pink solid, mp: 114 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.47 (s, 3H, Ts); 2.70 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 7.1\text{Hz}$ ); 2.99 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ); 3.70 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.90 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 7.1\text{Hz}$ ); 5.35 (s, 1H,  $\text{C}_1\text{H}$ ); 6.67 (d, 1H,  $\text{CH}=\text{CHNTs}$ ,  $J = 3.3\text{Hz}$ ); 7.35 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4\text{Hz}$ ); 7.68 (d, 1H,  $\text{CH}=\text{CHNTs}$ ,  $J = 3.3\text{Hz}$ ); 8.06 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4\text{Hz}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 21.78, 33.12, 41.05, 50.20, 51.92, 105.32, 107.77, 127.80, 128.92, 129.13 (2C), 129.48 (2C), 131.02, 134.28, 145.89, 150.27, 171.80, 174.33, 180.43. HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ,  $\text{MH}^+$ ) calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ : 417.1120 found 417.1110.

**89d'** pink solid, mp: 130 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.47 (s, 3H, Ts); 2.69 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 7.0\text{Hz}$ ); 3.00 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ); 3.72 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.84 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 7.0\text{Hz}$ ); 5.46 (s, 1H,  $\text{C}_1\text{H}$ ); 6.69 (d, 1H,  $\text{CH}=\text{CHNTs}$ ,  $J = 3.2\text{Hz}$ ); 7.38 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4\text{Hz}$ ); 7.76 (d, 1H,  $\text{CH}=\text{CHNTs}$ ,  $J = 3.2\text{Hz}$ ); 8.04 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4\text{Hz}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 21.78; 32.98; 40.96; 50.26; 51.93; 104.35; 107.55; 129.08 (2C); 129.33; 129.63 (2C); 130.50; 132.19; 134.25; 146.03; 152.08; 171.83; 172.53; 181.05. HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ,  $\text{MH}^+$ ) calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ : 417.1120, found 417.1114.

**5-(methyl(phenethyl)amino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (89e)** and **6-(methyl(phenethyl)amino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (89'e)**

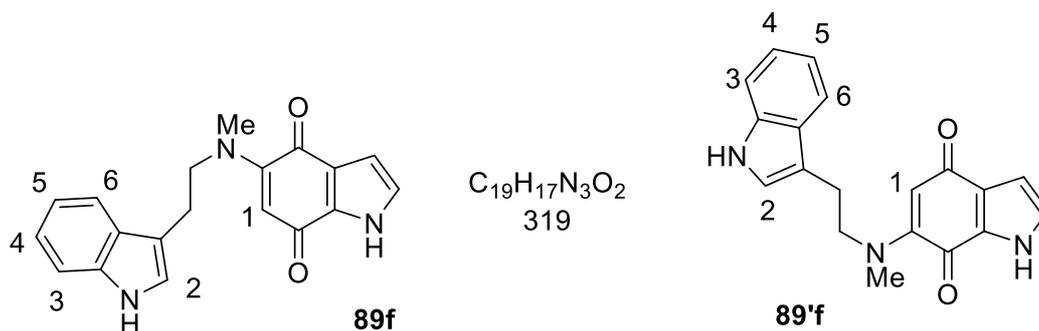


To a solution of N-methyl phenylethylamine **88e** (1 mL, 7.5 mmol) in ethanol (8 mL), was added dropwise a solution of indole-dione **9** (450 mg, 1.5 mmol) in EtOH (20 mL). The reaction medium was stirred for 2 h. After concentration of the solvent under vacuum, the crude was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 97: 3) to give the expected adducts (330 mg, 51%).

**89e**: pink solid, mp 62 °C: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.93 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph, J = 7.8 Hz); 2.94 (s, 3H, CH<sub>2</sub>-NMe); 3.85 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-NMe, J = 7.8 Hz); 5.39 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 6.67 (d, 1H, CH=CHNTs, J = 3.2 Hz); 7.20-7.33 (m, 5H); 7.35 (dd, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 7.76 (d, 1H, CH=CHNTs, J = 3.2 Hz); 8.08 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.80, 34.85, 41.44, 56.36, 104.56, 107.74, 126.60, 128.65 (2C), 128.87, 128.99 (2C), 129.08 (2C), 129.48 (2C), 129.69, 131.19, 134.40, 138.35, 145.83, 150.42, 174.27, 180.60. IR (ATR): 1803, 1685, 1596, 1372 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S: 435.1379, found 435.1366.

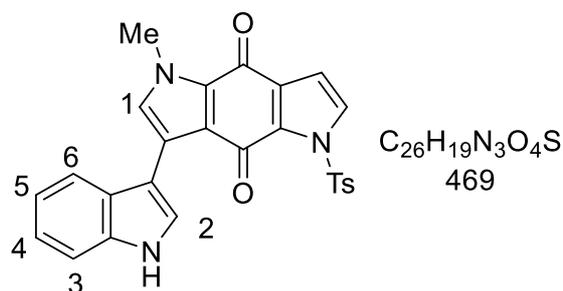
**89'e**: pink solid, mp 60°C: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.45 (s, 3H, Ts); 2.94 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph, J = 7.8 Hz); 2.94 (s, 3H, NMe); 3.85 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-NMe, J = 7.8 Hz); 5.36 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 6.67 (d, 1H, CH=CHNTs, J = 3.3 Hz); 7.18-7.27 (m, 5H); 7.36 (d, 2H, Ts, J = 8.5 Hz); 7.68 (d, 1H, CH=CHNTs, J = 3.3 Hz); 8.06 (d, 2H, Ts, J = 8.5 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.79, 34.84, 41.11, 56.24, 103.72, 107.53, 126.70, 128.72 (2C), 129.01 (2C), 129.08 (2C), 129.45, 129.62 (2C), 130.34, 132.18, 134.43, 138.30, 145.97, 152.45, 172.77, 180.95. IR (ATR): 1802, 1684, 1594, 1370 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>): calcd for C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S: 435.1379, found 435.1373.

**5-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)(methyl)amino)-1H-indole-4,7-dione (89f) and 6-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)(methyl)amino)-1H-indole-4,7-dione (89'f)**



A solution of quinone **24** (240 mg, 1.63 mmol) EtOH (10 mL) was added to a solution of amine **51b** (568 mg, 3.26 mmol) was EtOH (6 mL). The mixture was stirred for 2 h and the solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography ( $CH_2Cl_2$  / MeOH 95: 5) to give the mixture of the two regioisomers which could not be separated, as a purple solid (40 mg, 8%).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ ): 2.99 (s, 3H,  $CH_3$ -NMe); 3.05 (d, 2H,  $CH_2$ -indol); 3.91 (d, 2H,  $CH_2$ -NMe); 5.77 (s, 1H,  $C_1H$ ); 6.36 (d, 1H,  $CH=CHNH$ ,  $J = 2.7$  Hz); 6.44 (d, 1H,  $CH_2H$ ,  $J = 6$  Hz); 6.98-7.10 (m, 3H,  $C_4H$  and  $C_5H$  and NH); 7.03 (m, 1H,  $C_3H$ ); 7.34 (d, 1H,  $CH=CHNH$ ,  $J = 2.7$  Hz); 7.67 (d, 1H,  $C_6H$ ,  $J = 6.0$ Hz); 10.86 (br s, 1H, NH). For the second regioisomer, only the signals in italics are replaced by: 3.02 (s, 3H, N- $CH_3$ ); 6.45 (d, 1H,  $CH=CHNH$ ); 7.65 (dd, 2H,  $C_6H$ ,  $J = 6.0$ Hz). IR (ATR): 3382; 1673; 1595; 1457; 1124. HRMS (DCI- $CH_4$ ,  $MH^+$ ): calcd for  $C_{19}H_{17}N_3O_2$ : 320.1399, found: 320.1402.

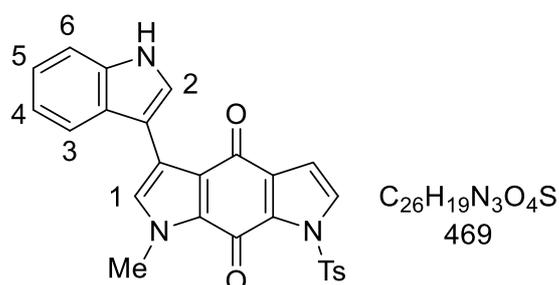
**3-(1H-indol-3-yl)-1-methyl-5-tosylpyrrolo[2,3-f]indole-4,8(1H,5H)-dione (90a)**



To a solution of compound **89a** (140 mg, 0.3 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (9 mL), was added DDQ (140 mg, 0.6 mmol). The mixture was stirred for 2h at room temperature. After concentration under vacuum, the crude product was purified by flash-chromatography ( $CH_2Cl_2$ /MeOH 99.5: 0.5) to give the expected product as a violin solid (40 mg, 28%), mp > 260 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 2.43 (s, 3H,  $CH_3$  Ts); 4.10 (s, 3H,  $NCH_3$ ); 6.78 (d, 1H,  $CH=CHNH$ ,  $J = 3.3$  Hz); 7.17-7.27 (m, 3H,

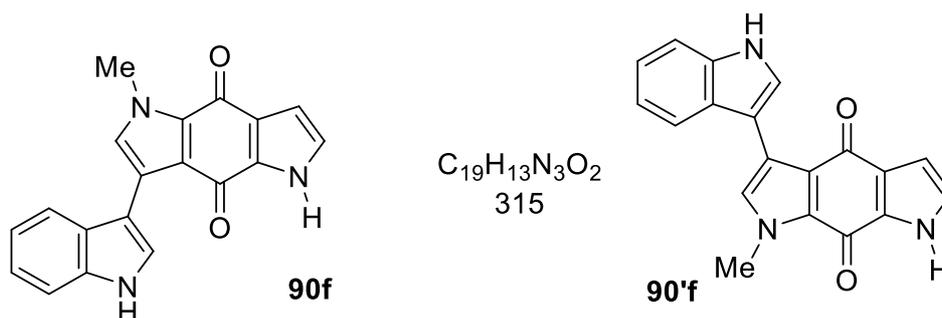
C<sub>4</sub>H and C<sub>5</sub>H and C<sub>1</sub>H); 7.33 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 7.48 (d, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 8.2 Hz); 7.72 (d, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 7.8 Hz); 7.76 (d, 1H, CH=CHNH, J = 3.3 Hz); 8.04 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 8.25 (d, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 3.0 Hz); 8.35 (br. s, NH, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.74, 36.94, 107.43, 107.68, 111.52, 119.64, 120.21, 120.31, 122.12, 126.22, 126.78, 128.95, 128.98 (2C), 129.16, 129.49 (2C), 129.87, 131.49, 132.03, 132.54, 134.60, 136.01, 145.58, 171.84, 174.06. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>26</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 470.1175, found 470.1173.

### 3-(1H-indol-3-yl)-1-methyl-7-tosylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (90'a)



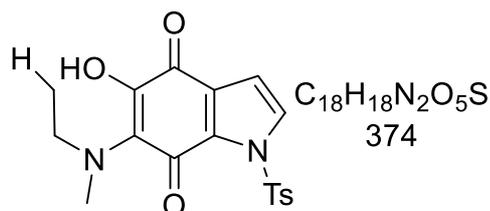
Same procedure as for compound **90f** involving compound **89'a** (200 mg, 0.4 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12 mL) and DDQ (200 mg, 0.9 mmol). Purification by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 99.5: 0.5) led to the expected product as a violin solid (150 mg, 75%), mp > 260 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 4.07 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>); 6.81 (d, 1H, CH=CHNH, J = 3.2 Hz); 7.24 (m, 2H, C<sub>4</sub>H and C<sub>5</sub>H); 7.21-7.27 (m, 3H, C<sub>1</sub>H and C<sub>3</sub>H and C<sub>6</sub>H); 7.38 (d, 2H, Ts, J = 8.5 Hz); 7.77 (d, 1H, CH=CHNTs, J = 3.2 Hz); 8.07 (d, 2H, Ts, J = 8.5 Hz); 8.35 (br. s, 1H, NH); 8.39 (d, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 3.2 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.78, 37.28, 107.74, 108.34, 111.59, 119.57, 119.80, 120.30, 122.17, 122.21, 126.13, 126.70, 128.82, 128.92 (2C), 129.29, 129.59 (2C), 130.49, 130.61, 133.90, 134.53, 136.09, 145.79, 167.13, 178.84. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>26</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 470.1175, found 470.1157.

### 3-(1H-indol-3-yl)-1-methylpyrrolo[2,3-f]indole-4,8(1H,5H)-dione (90f) and 3-(1H-indol-3-yl)-1-methylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (90'f)



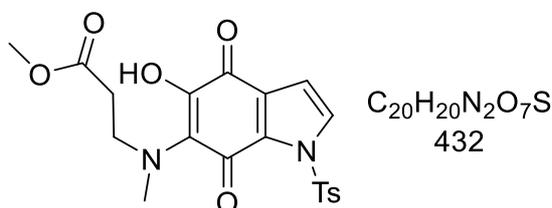
Same protocol as for compound **90a** involving the mixture **89f** / **89'f** (40 mg, 0.125 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.5 mL) and DDQ (40 mg, 0.176 mmol). Purification by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 98: 2) gave the two expected regioisomers as a purple solid (30 mg, 77%). These compounds were characterized by LCSM (IE): m / z 316 (MH<sup>+</sup>, 100%).

**6-(ethyl(methyl)amino)-5-hydroxy-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (91'b)**



Same protocol as for compound **90f** involving the compound **89'b** (41 mg, 0.11 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.6 mL) and DDQ (52 mg, 0.23 mmol). Purification by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 98: 2) gave the expected compound as a blue solid (20 mg, 51%), mp > 250 ° C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>, J = 7.4 Hz); 2.49 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts, J = 7.0 Hz); 3.17 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>, Ts); 3.28 (br s, 1H, OH); 3.49 (q, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 6.58 (d, 1H, CH=CHNTs, J = 3.2 Hz); 7.41 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz); 7.74 (d, 1H, CH=CHNTs, J = 3.2 Hz); 8.07 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.83, 29.71, 31.93, 39.96, 40.74, 53.45, 101.11, 105.38, 107.78, 108.74, 109.83, 111.75, 129.10 (2C), 129.91 (2C), 160.30, 174.12. IR (ATR): 3370, 1672, 1617, 1595, 1530 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 374.09 (100.0%), 375.10 (19.5%), 376.09 (4.5%), 376.10 (1.8%), 376.10 (1.0%).

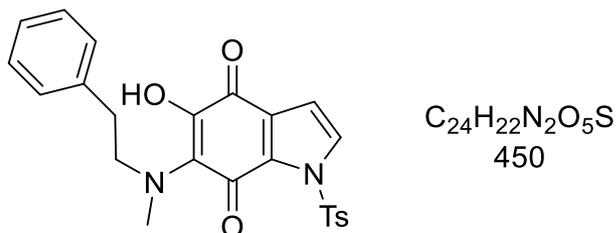
**methyl3-((5-hydroxy-4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-6-yl)methyl)amino) propanoate (91'd)**



Same protocol as for compound **90'f** involving the compound **89'd** (80 mg, 0.19 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.1 mL) and DDQ (86 mg, 0.38 mmol). Purification by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 97: 3) gave the expected product as a blue solid (40 mg, 51%), mp > 260 ° C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.49 (s, 3H, Ts); 2.77 (q, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, J = 7.2 Hz); 3.16 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>); 3.28 (br s, 1H, OH);

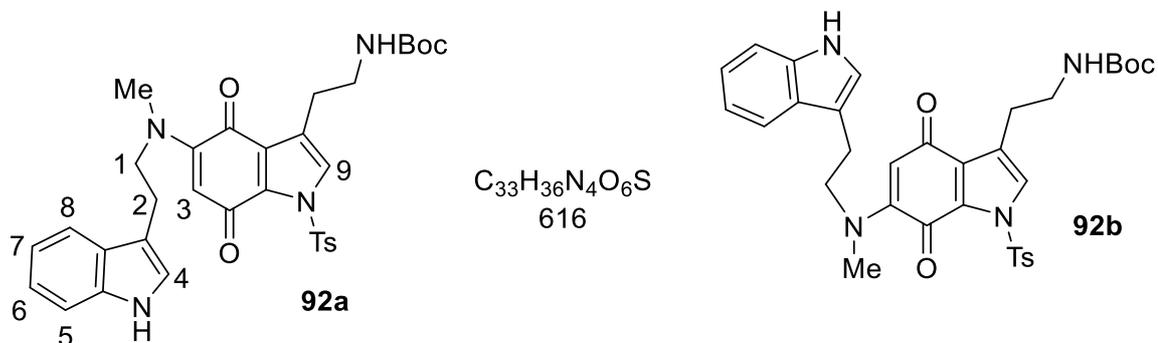
3.53 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.75 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, J = 7.2 Hz); 6.58 (d, 1H, CH=CHNTs, J = 3.2 Hz); 7.41 (d, 2H, Ts, J = 8.1Hz); 7.76 (d, 1H, CH=CHNTs, J = 3.2 Hz); 8.05 (d, 2H, Ts, J = 8.1 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.84, 32.11, 34.84, 40.29, 52.14, 108.73, 111.61, 129.01 (2C), 129.97 (2C), 132.13, 133.37, 137.13, 138.69, 146.67, 151.45, 169.10, 171.81, 174.23. MS (EI): m/z: 432.10 (100.0%), 433.10 (21.6%), 434.09 (4.5%).

**5-hydroxy-6-(methyl(phenethyl)amino)-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (91'e)**



Compound **90'c** (50 mg, 0.18 mmol) was dissolved in AcOH (3.5 mL) and DDQ (81 mg, 0.36 mmol) was added. The reaction medium was stirred for 2 h. The solvent was evaporated and 1N NaOH solution (3 mL) was added. The mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). The organic layer was separated, washed with water (3 x 20 mL) and dried over MgSO<sub>4</sub>. After concentration, the crude product was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 95: 5) to give the expected product as a blue solid (10 mg, 18%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.48 (s, 3H, Ts); 3.02 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph, J = 7.0Hz); 3.24 (s, 3H, NMe); 3.35 (br s, 1H, OH); 3.74 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>-N, J = 7.0 and 9.0Hz); 6.54 (d, 1H, CH=CH-NTs, J = 3.2Hz); 7.13-7.30 (m, 5H); 7.39 (d, 2H, Ts, J = 8.5Hz); 7.73 (d, 1H, CH=CH-NTs, J = 3.2Hz); 8.07 (d, 2H, Ts, J = 8.5Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.84; 34.97; 41.94; 57.90; 107.70; 111.89; 126.67; 128.49; 128.68 (2C); 129.03; 129.16 (2C); 129.83; 129.95; 130.65; 133.89; 138.00; 138.38; 146.40; 150; 67; 151.49; 171.59; 174.31. HRMS (DCI CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calculated for C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S: 451.1328, found 451.1325.

**tert-butyl (2-(5-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)(methyl)amino)-4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (92a) and tert-butyl (2-(6-((2-(1H-indol-3-yl)ethyl)(methyl)amino)-4,7-dioxo-1-tosyl-4,7-dihydro-1H-indol-3-yl)ethyl)carbamate (92b)**

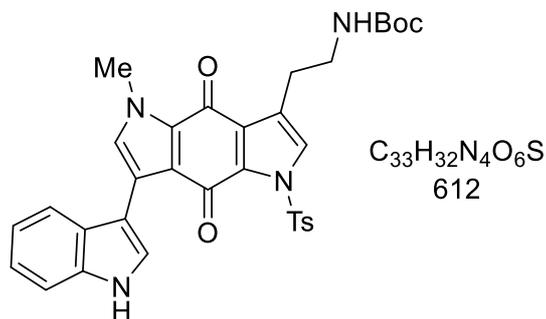


Same procedure as for compound **89a** involving methyl tryptamine **51b** (1.55 g, 9.0 mol) in EtOH (10 mL), indole-1,3-dione **1** (2 g, 4.5 mol) in EtOH (10 mL). Purification by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99 :1) gave the expected compounds:

**90a:** fuchsia solid (0.91 g, 33%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.47 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.78 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHBoc, J = 8.5 Hz); 2.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-N); 3.06 (t, 2H, C<sub>2</sub>H, J = 8.5 Hz); 3.36 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHBoc, J = 8.5 Hz); 4.00 (t, 2H, C<sub>1</sub>H, J = 8.5 Hz); 5.20 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 6.94 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 2.9 Hz); 7.10 (m, 2H, C<sub>6</sub>H and C<sub>7</sub>H); 7.34 (d, 2H, Ts, J = 10 Hz); 7.55 (m, 1H, CH); 7.69 (m, 1H, C<sub>5</sub>H); 8.01 (d, 2H, Ts, J = 10.5 Hz); 8.28 (br s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.77; 24.21; 25.96; 28.42 (3C); 40.08; 40.89; 55.13; 79.33; 104.52; 111.15; 112.30; 118.65; 119.56; 123.17; 122.21; 123.06; 125.34; 125.95; 126.99; 129.05 (2C); 129.39 (2C); 134.55; 136.24; 145.60; 148.29; 152.05; 156.05; 174.05; 181.60. HRMS (DCI CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S 617.2434, found 617.2433.

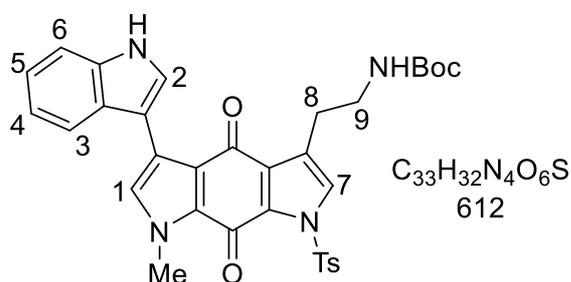
**90b:** fuchsia solid (1.06 g, 39%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.46 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 2.78 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHBoc and CH<sub>3</sub>-N); 3.08 (t, 2H, C<sub>2</sub>H, J = 8.5 Hz); 3.40 (q, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHBoc, J = 8.5 Hz); 3.93 (t, 2H, C<sub>1</sub>H, J = 8.5 Hz); 5.14 (s, 1H, C<sub>3</sub>H); 7.02 (d, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 2.9 Hz); 7.18 (m, 2H, C<sub>6</sub>H and C<sub>7</sub>H); 7.32 (d, 3H, Ts and C<sub>5</sub>H, J = 10 Hz); 7.54 (m, 1H, CH); 7.65 (m, 1H, C<sub>8</sub>H, J = ); 7.70 (m, 1H, C<sub>5</sub>H); 8.05 (d, 2H, Ts, J = 10.5 Hz); 8.32 (br s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.73; 24.03; 25.76; 28.44 (3C); 40.46; 40.65; 55.47; 79.26; 104.87; 111.17; 112.56; 118.84; 119.67; 122.16; 122.35; 122.77; 127.34; 128.52; 128.65; 128.89 (2C); 129.60 (2C); 129.92; 134.64; 136.32; 145.70; 152.95; 156.10; 172.84; 182.26. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S 617.2434, found 617.2426.

**tert-butyl (2-(5-(1H-indol-3-yl)-7-methyl-4,8-dioxo-1-tosyl-1,4,7,8-tetrahydropyrrolo[3,2-f]indol-3-yl)ethyl)carbamate (93a)**



Same procedure as for compound **90a** involving compound **92a** (600 mg, 0.97 mmol), DDQ (438 mg, 1.95 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (32 mL). Purification by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99 : 1) gave the expected compound as a violine solid (280 mg, 47%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.44 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 3.04 (t, 2H, C<sub>8</sub>H, J = 6.6 Hz); 3.45 (q, 2H, C<sub>9</sub>H, J = 6.6 Hz); 4.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-N); 7.17 (s, 1H, C<sub>7</sub>H); 7.18 (t, 1H, C<sub>5</sub>H, J = 8.1 Hz); 7.23 (t, 1H, C<sub>4</sub>H, J = 8.1 Hz); 7.28 (s, 1H, C<sub>1</sub>H), 7.36 (d, 2H, Ts, J = 8.3 Hz); 7.43 (d, 1H, C<sub>6</sub>H, J = 8 Hz); 7.59 (s, 1H, NHBoc), 7.72 (d, 1H, C<sub>3</sub>H, J = 8 Hz); 8.05 (d, 2H, Ts, J = 8.3 Hz); 8.26 (d, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 2.5 Hz); 8.44 (br s, 1H, NH). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.82; 26.05; 28.42 (3C); 37.14; 40.45; 79.17; 107.73; 111.61; 119.57; 119.61; 120.23; 122.19; 122.49; 123.20; 126.16; 126.47; 127.83; 128.90 (2C); 129.03; 129.55 (2C); 130.28; 130.31; 131.20; 134.60; 136.09; 145.67; 156.03; 170.92; 178.43). HRMS (DCI CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>33</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S 613.2121, found 613.2119.

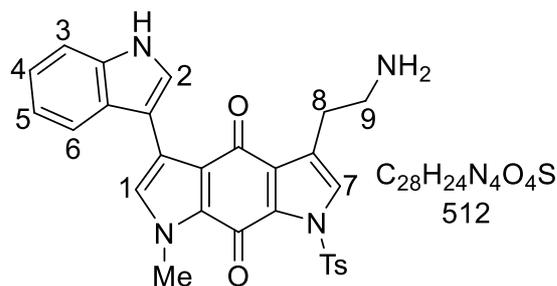
**tert-butyl (2-(7-(1H-indol-3-yl)-5-methyl-4,8-dioxo-1-tosyl-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[2,3-f]indol-3-yl)ethyl)carbamate (93b)**



Same procedure as for compound **90a** involving compound **92b** (570 mg, 0.93 mmol), DDQ (417 mg, 1.85 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (31 mL). Purification by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99 : 1) gave the expected compound as a violine solid (340 mg, 60%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.44 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 3.04 (t, 2H, C<sub>8</sub>H, J = 6.6 Hz); 3.45 (q, 2H, C<sub>9</sub>H, J = 6.6

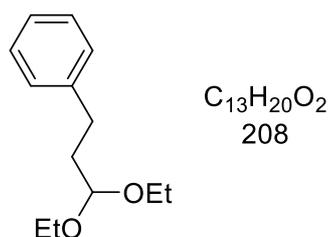


**3-(2-aminoethyl)-5-(1H-indol-3-yl)-7-methyl-1-tosylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (94b)**



Same procedure as for compound **39a** involving compound **93b** (120 mg, 0.196 mmol), TFA (5 mL),  $CH_2Cl_2$  (8 mL). Purification by flash-chromatography ( $CH_2Cl_2/MeOH$  90 :10) gave the expected compound as a violine solid (58 mg, 50%).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 1.77 (m, 2H,  $NH_2$ ); 2.43 (s, 3H,  $CH_3$  Ts); 3.08 (t, 2H,  $C_8H$ ,  $J = 7.2$  Hz); 3.12 (t, 2H,  $C_9H$ ,  $J = 7.2$  Hz); 3.96 (s, 3H, N-Me); 7.09 (t, 1H,  $C_4H$ ,  $J = 7.8$  Hz); 7.16 (t, 1H,  $C_5H$ ,  $J = 7.8$  Hz); 7.46 (d, 1H,  $C_3H$ ,  $J = 7.9$  Hz); 7.51 (d, 2H, Ts,  $J = 8.2$ Hz); 7.74 (s, 1H,  $C_7H$ ); 7.80 (d, 1H,  $C_6H$ ,  $J = 8$  Hz); 7.84 (s, 1H,  $C_1H$ ); 8.03 (d, 2H, Ts,  $J = 8.5$ Hz); 8.32 (d, 1H,  $C_2H$ ,  $J = 2.6$  Hz) 10.76 (s, 1H, NH).  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ ): 21.68, 24.36, 37.23, 38.97, 106.95, 112.33, 119.89, 119.95, 120.23, 121.14, 121.86, 125.97, 126.09, 127.56, 128.49, 128.78 (2C), 129.75, 130.19, 130.31 (2C), 131.09, 134.52, 136.63, 146.40, 166.39, 179.89. HRMS (DCI  $CH_4$ ,  $MH^+$ ) calcd for  $C_{28}H_{25}N_4O_4S$  513.1597, found 513.1580.

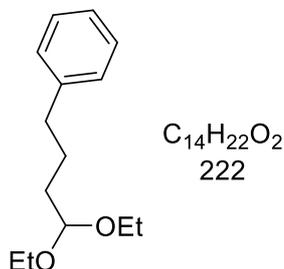
**(3,3-diethoxypropyl)benzene (97c)**



A solution of **98c** (830 mg, 6.1 mmol) and concentrated  $H_2SO_4$  (23  $\mu$ L) in dry EtOH (23 mL) was stirred at RT for 3 h. A  $NaHCO_3$  saturated solution (20 mL) was added and the mixture was concentrated under vacuum.  $H_2O$  (20 mL) and EtOAc (20mL) were added to the residu and the organic layer was separated, washed with water (3x20 mL) and dried over  $MgSO_4$ . Concentration under vacuum gave the expected compound as a clear yellow oil (1.1 g, 88 %).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 1.25 (t, 6H,  $(CH_3)_2$ ,  $J = 7.2$  Hz); 1.96-2.01 (m, 2H,  $CH_2$ -(CHO)); 2.71-2.75(m, 2H,  $CH_2$ -(Ph)); 3.52-3.71 (m, 4H,  $CH_2$ -O); 4.52 (t, 1H, CH-O); 7.21-7.31(m, 5H, CH-Ph).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 15.34 (2C); 30.98; 35.07; 60.99 (2C); 102.18; 125.77; 128.32 (2C); 128.37

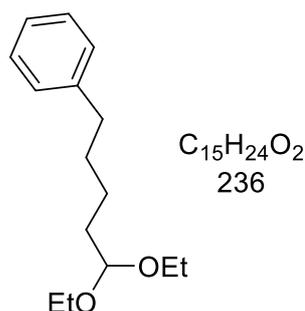
(2C); 141.76. FTIR (neat): 2974; 2926; 1377; 1122; 1063; 694  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$ : 208.3637, found 236.3634

**(4,4-diethoxybutyl)benzene (97d)**



A solution of **98d** (610 mg, 4.12 mmol) and concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (16  $\mu\text{L}$ ) in dry EtOH (16 mL) was stirred at RT for 3 h. A  $\text{NaHCO}_3$  saturated solution (20 mL) was added and the mixture was concentrated under vacuum.  $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL) and EtOAc (20 mL) were added to the residue and the organic layer was separated, washed with water (3x20 mL) and dried over  $\text{MgSO}_4$ . Concentration under vacuum gave the expected compound as a yellow oil (700 mg, 76 %).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.26 (t, 6H,  $(\text{CH}_3)_2$ ,  $J = 7.1$  Hz); 1.64 – 1.88 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$ ); 2.70 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ,  $J = 7.0$  Hz); 3.54 (tt, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ); 4.56 (t, 1H,  $\text{CH-O}$ ,  $J = 5.2$  Hz), 7.24-7.39 (m, 5H, Ph).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 15.39 (2C); 26.66; 33.25; 37.75; 60.98 (2C); 102.86; 125.78; 128.33 (4C); 142.35. FTIR (neat): 2977; 2928; 1373; 1129; 1063; 699  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$ : 222.3364, found 222.3368

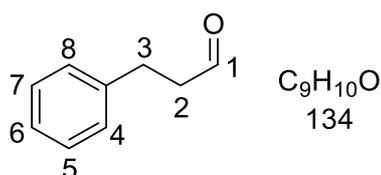
**(5,5-diethoxypentyl)benzene (97e)**



To a solution of aldehyde **98e** (570 mg, 3.85 mmol) in EtOH (50 mL), was added concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (14.5  $\mu\text{L}$ ) and the solution was stirred for 3h. After concentration under vacuum water (40 mL) and AcOEt (40 mL) were added. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with AcOEt (2 x 40 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under vacuum to give quantitatively the expect compound as a light yellow oil.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.25 (t, 6H,  $(\text{CH}_3)_2$ ,  $J = 7.1$  Hz); 1.32 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$ );

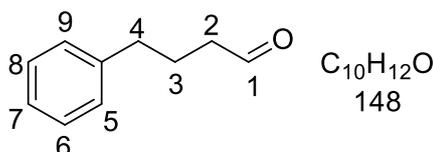
1.58 – 1.72 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$ ); 2.73 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ,  $J = 7.0$  Hz); 3.52 (tt, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ); 4.56 (t, 1H,  $\text{CH-O}$ ,  $J = 5.2$  Hz), 7.23-7.38 (m, 5H, Ph).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 15.38 (2C); 26.42; 33.25; 35.60; 37.75; 60.97 (2C); 102.85; 125.77; 128.32 (4C); 142.34. FTIR (neat): 2976; 2924; 1372; 1121; 1062; 693  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (DCI  $\text{CH}_4$ ) calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$ : 236.3623, found 236.3625.

### 3-phenylpropanal (98c)



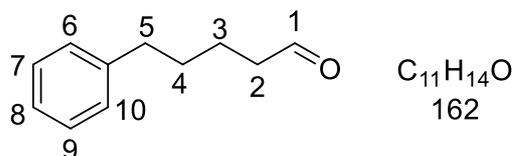
To a solution of 3-phenyl-1-propanol (1 g, 7.35 mmol) in DMSO (3.6 mL) was added IBX (3.08 g, 11.01 mmol). The mixture was stirred at RT for 3 h. EtOAc (84 mL) was then added. After filtration, the filtrate was washed with water (3 x 50 mL), brine (50 mL) and was dried over  $\text{MgSO}_4$ . Concentration under vacuum gave the expected compound as a yellow oil (0.96 g, 97%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.77 (tt, 2H,  $\text{C}_2\text{H}$ ,  $J = 6$  and 3 Hz); 2.97 (t,  $\text{C}_3\text{H}$ ,  $J = 6$  Hz); 7.22-7.31 (m, 5H); 9.85 (t, 1H, CHO).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 27.91; 45.04; 126.12; 128.13; 128.42; 140.20; 201.48. IR: 2928; 1739; 1032; 701,  $\text{cm}^{-1}$ . MS (EI):  $m/z$ : 134.07 (100.0%), 135.08 (9.7%)

### 4-phenylbutanal (98d)



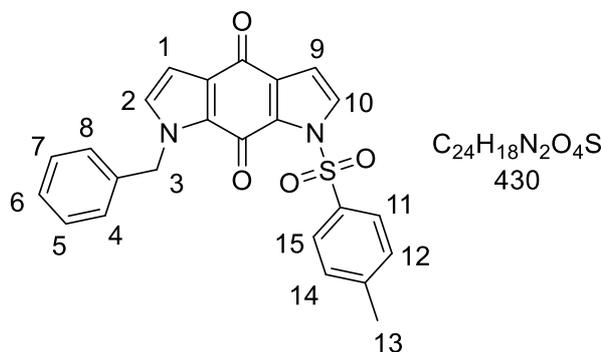
To a solution of 4-phenyl-1-butanol (1 g, 6.66 mmol) in DMSO (3.6 mL) was added IBX (3.1 g, 11.01 mmol). The mixture was stirred at RT for 10 h. EtOAc (75 mL) was then added. After filtration, the filtrate was washed with water (3x50 mL), brine (50 mL) and was dried over  $\text{MgSO}_4$ . Concentration under vacuum gave the expected compound as a yellow oil (0.61 g, 62 %).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.01 (m, 2H,  $\text{C}_3\text{H}$ ); 2.50 (td, 2H,  $\text{C}_2\text{H}$ ,  $J = 1.6$  Hz and  $J = 7.3$  Hz); 2.70 (t, 2H,  $\text{C}_4\text{H}$ ,  $J = 7.3$  Hz); 7.20-7.36 (m, 5H); 9.80 (t, 1H,  $\text{C}_1\text{H}$ ,  $J = 1.6$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 24.7; 35.7; 43.8; 127; 129.5 (2C); 142.9; 203.7. IR: 3026; 2861; 2722; 1724, 1603  $\text{cm}^{-1}$ . MS (EI):  $m/z$  209 (100), 91 (100).

### 5-phenylpentanal (98e)



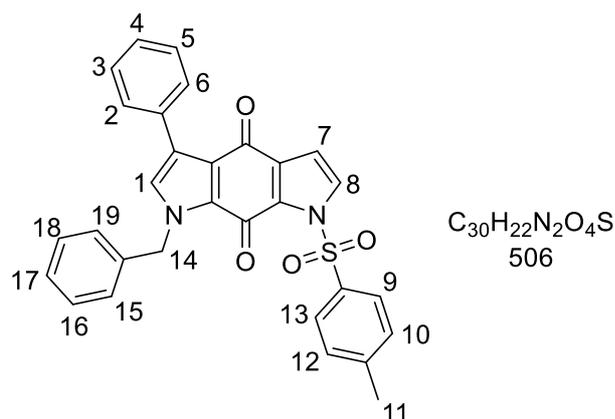
To a solution of 5-phenyl-1-pentanol (1 g, 6.1 mmol) in DMSO (3.2 mL) was added IBX (2.7 g, 4.87 mmol). The mixture was stirred at RT for 3 h. EtOAc (80 mL) was then added. After filtration, the filtrate was washed with water (3 x 30 mL), brine (50 mL) and was dried over  $MgSO_4$ . Concentration under vacuum gave the expected compound as a yellow oil (770 mg, 78 %).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 1.72 (m, 4H,  $C_4H$  and  $C_3H$ ); 2.49 (m, 2H,  $C_2H$ ); 2.69 (m, 2H,  $C_5H$ ); 7.21-7.36 (m, 5H); 9.79 (t, 1H,  $C_1H$ ,  $J = 1.8$  Hz).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 21.72; 30.93; 35.70; 43.76; 125.91; 128.42 (4C); 142.02; 202.69. IR: 2930; 1724,  $cm^{-1}$ . MS (EI):  $m/z$  162.10 (100.0%), 163.11 (11.9%).

### 1-benzyl-7-tosylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (99a)



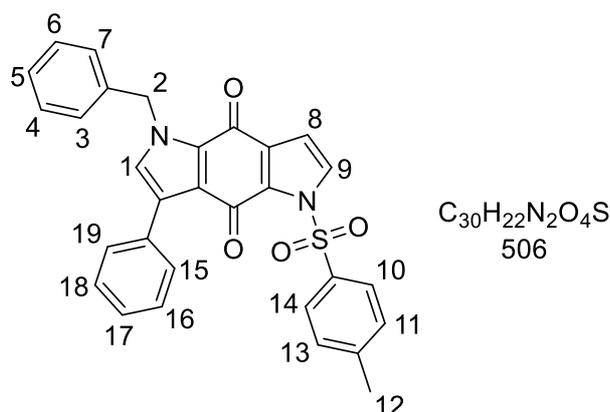
A suspension of quinone **12** (60 mg, 0.15mmol), acetaldehyde diethylacetal (900 mg, 7.63 mmol) and  $Mn(OAc)_3$  (911 mg, 2.17 mmol) in dry acetonitrile (25 mL) was refluxed for 72 h. After filtration over celite, the solvent was removed under vacuum and the crude product was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 8: 2) to give the expected compound as a bright yellow solid (40 mg, 62 %), mp 176 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 2.46 (s, 3H,  $C_{13}H$ ); 5.56 (s, 2H,  $C_3H$ ); 6.60 (d, 1H,  $C_2H$ ,  $J = 2.8$  Hz); 6.77 (d, 1H,  $C_8H$ ,  $J = 3.3$  Hz); 6.79 (d, 1H,  $C_1H$ ,  $J = 2.8$  Hz); 7.20 (dd, 2H,  $C_{12}H$  and  $C_{14}H$ ); 7.28-7.33 (m, 5H); 7.75 (d, 1H,  $C_{10}H$ ,  $J = 3.3$  Hz); 8.01 (m, 2H,  $C_{11}H$  and  $C_{15}H$ ).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 21.78; 52.16; 107.77; 108.07; 127.76; 127.84 (2C); 128.03; 128.74 (2C); 129.04; 129.33; 129.47 (2C); 129.51; 129.58; 131.08; 132.65; 134.21; 136.31; 145.74; 167.20; 178.61. IR ( $CHCl_3$ ): 1660  $cm^{-1}$ . HRMS (DCI- $CH_4$ ,  $MH^+$ ) calcd for  $C_{24}H_{19}N_2O_4S$  431.1066 found 431.1045.

### 1,3-dibenzyl-5-tosylpyrrolo[2,3-f]indole-4,8(1H,5H)-dione (99b)



A suspension of quinone **12** (400 mg, 0.99 mmol), phenylacetaldehyde dimethylacetal (1.3 g, 7.54 mmol) and  $Mn(OAc)_3$  (2.1 g, 7.54 mmol) in dry acetonitrile (88 mL) was refluxed for 72 h. After filtration over celite, the solvent was removed under vacuum and the residue was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 8: 2) to give the expected compound as a bright yellow solid (117 mg, 40 %), mp 174 °C.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ ): 2.47 (s, 3H,  $C_{11}H$ ); 5.62 (s, 2H,  $C_{14}H$ ); 6.75 (d, 1H,  $C_7H$ ,  $J = 3.2$  Hz); 6.88 (s, 1H,  $C_1H$ ); 7.24-7.42 (m, 10H); 7.60-7.64 (m, 2H,  $C_2H$  and  $C_6H$ ); 7.75 (d, 1H,  $C_8H$ ,  $J = 3.2$  Hz); 8.03 (m, 2H,  $C_{13}H$  and  $C_9H$ ).  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ ): 21.81; 52.16; 108.34; 122.77; 126.65; 127.77; 128.01 (2C); 128.07 (2C); 128.13; 128.63; 128.78 (2C); 128.80 (2C); 129.06 (2C); 129.48; 129.52 (2C); 130.45; 130.58; 132.38; 133.50; 134.25; 136.14; 145.78; 167.29; 178.56. IR ( $CHCl_3$ ) 1677; 1653  $cm^{-1}$ . HRMS (DCI- $CH_4$ ,  $MH^+$ ) calcd for  $C_{30}H_{23}N_2O_4S$  507.1379 found 507.1356.

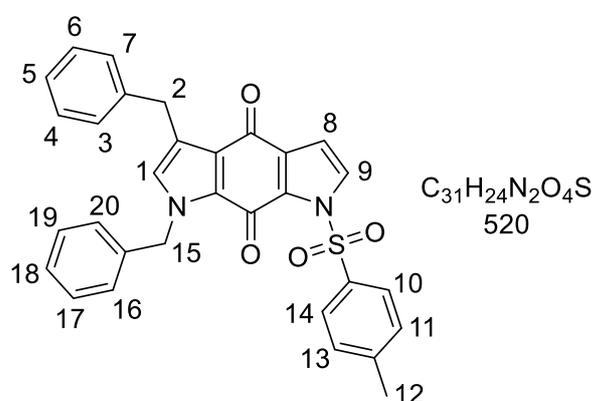
### 1-benzyl-3-phenyl-5-tosylpyrrolo[2,3-f]indole-4,8(1H,5H)-dione (99'b)



A suspension of quinone **12'** (200 mg, 0.49 mmol), phenylacetaldehyde dimethylacetal (650 mg, 3.77 mmol) and  $Mn(OAc)_3$  (1.1 g, 3.77 mmol) in dry acetonitrile (44 mL) was refluxed for 72 h. After filtration over celite, the solvent was removed under vacuum and the residue was

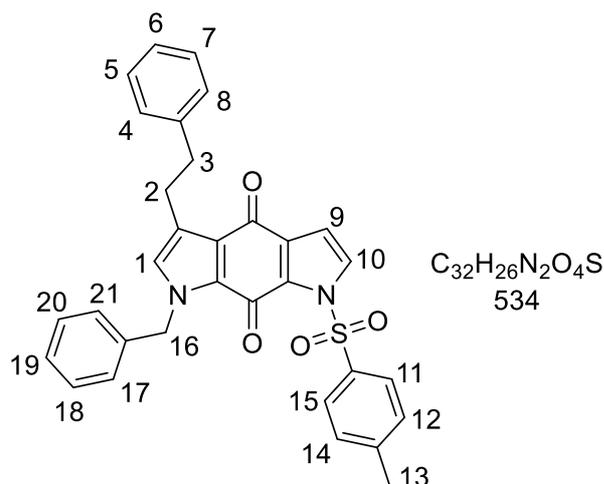
purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 7: 3) to give the expected compound as a yellow solid (120 mg, 48 %), mp 154 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.44 (s, 3H, C<sub>11</sub>H); 5.64 (s, 2H, C<sub>14</sub>H); 6,74 (d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 3.3 Hz); 6.91 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.27-7.43 (m, 10H); 7.53-7.57 (m, 2H, C<sub>2</sub>H and C<sub>6</sub>H); 7.74 (d, 1H, C<sub>8</sub>H, J = 3.3 Hz); 8.05 (m, 2H, C<sub>13</sub>H and C<sub>9</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.77; 52.28; 107.59; 123.23; 127.23; 127.60; 127.63 (2C); 128.04 (2C); 128.23; 128.85 (2C); 128.94 (2C); 128.96; 129.10; 129.27 (2C); 129.47 (2C); 129.95; 131.52; 132.10; 132.49; 134.31; 136.14; 145.76; 171.60; 174.33. IR (CHCl<sub>3</sub>) 1652 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 507.1379 found 507.1370.

### 1-benzyl-3-phenyl-5-tosylpyrrolo[2,3-f]indole-4,8(1H,5H)-dione (99c)



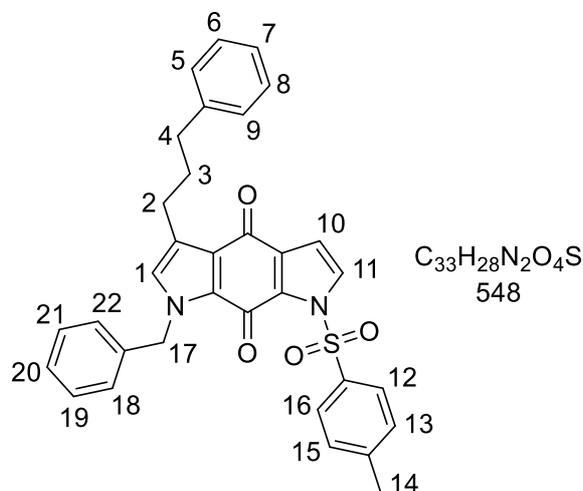
A suspension of quinone **12** (265 mg, 0.65mmol), (3,3-diethoxypropyl)-benzene **97c** (950 mg, 4.57 mmol) and Mn(OAc)<sub>3</sub> (1.3 g, 4.57 mmol) in dry acetonitrile (52 mL) was refluxed for 72 h. After filtration over celite, the solvent was removed under vacuum and the residue was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 7:3) to give the expected compound as a bright yellow solid (224 mg, 66 %), mp 158 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.45 (s, 3H, C<sub>12</sub>H); 4.12 (s, 2H, C<sub>2</sub>H); 5.48 (s, 2H, C<sub>15</sub>H); 6.47 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 6.75 (d, 1H, C<sub>8</sub>H, J = 3.2 Hz); 7.13-7.31 (m, 12H); 7.74 (d, 1H, C<sub>9</sub>H, J = 3 Hz); 7.99 (m, 2H, C<sub>14</sub>H and C<sub>10</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.79; 31.69; 52.00; 108.00; 124.08; 126.01; 126.18; 127.67 (2C); 127.91(2C); 128.44 (2C); 128.68 (2C); 128.81 (2C); 129.00 (2C); 129.28; 129.46 (2C); 129.70; 130.95; 133.02; 134.27; 136.50; 140.20; 145.69; 167.06; 179.54. IR (CHCl<sub>3</sub>) 1654 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>31</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 521.1535 found 521.1520.

### 1-benzyl-3-phenethyl-7-tosylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (99d)



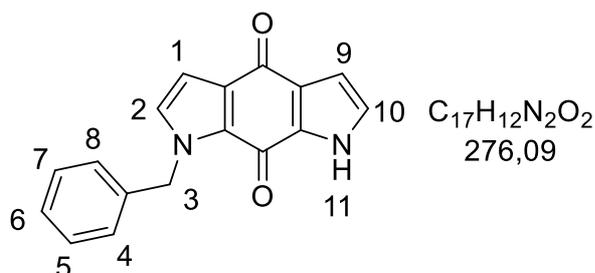
A suspension of quinone **12** (265 mg, 0.65mmol), (3,3-diethoxypropyl)-benzene **97d** (950 mg, 4.57 mmol) and  $Mn(OAc)_3$  (1.3 g, 4.57 mmol) in dry acetonitrile (52 mL) was refluxed for 72 h. After filtration over celite, the solvent was removed under vacuum and the residue was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 7:3) to give the expected compound as a bright yellow solid (224 mg, 66 %), mp 129 °C.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ ): 2.46 (s, 3H,  $C_{13}H$ ); 2.89 (m, 2H,  $C_2H$ ); 3.04 (m, 2H,  $C_3H$ ); 5.46 (s, 2H,  $C_{16}H$ ); 6.44 (s, 1H,  $C_1H$ ); 6.78 (d, 1H,  $C_9H$ ,  $J = 3.2$  Hz); 7.11-7.32 (m, 12H); 7.75 (d, 1H,  $C_{10}H$ ,  $J = 3.2$  Hz); 8.02 (m, 2H,  $C_{11}H$  and  $C_{15}H$ ).  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ ): 21.81; 27.78; 35.90; 51.93; 107.99; 124.33; 125.86; 126.09; 127.80 (2C); 127.91; 128.27 (2C); 128.47; 128.64 (2C); 128.68 (2C); 129.08 (2C); 129.23; 129.49 (2C); 129.72; 131.03; 133.02; 134.31; 136.48; 141.82; 145.73; 167.01; 179.60. IR ( $CHCl_3$ )  $1652\text{ cm}^{-1}$ . HRMS (DCI- $CH_4$ ,  $MH^+$ ) calcd for  $C_{32}H_{27}N_2O_4S$  535.1692 found 535.1689.

### 1-benzyl-3-(3-phenylpropyl)-7-tosylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (99e)



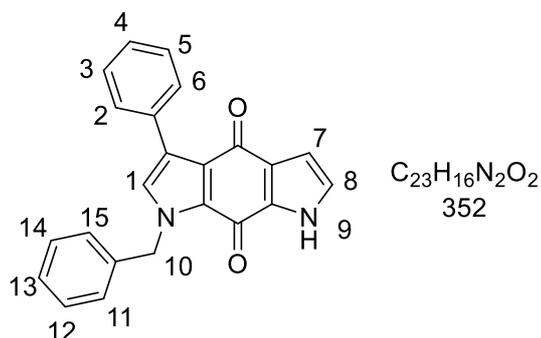
A suspension of quinone **12** (300 mg, 0.74 mmol), acetal **99e** (1.3 g, 5.2 mmol) and  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  (1.5 g, 5.2 mmol) in dry acetonitrile (60 mL) was refluxed for 72 h. After filtration over celite, the solvent was removed under vacuum and the residue was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 9: 1) to give the expected compound as a bright yellow solid (230 mg, 57 %), mp 135 °C.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ): 1.92 (m, 2H,  $\text{C}_3\text{H}$ ); 2.45 (s, 3H,  $\text{C}_{14}\text{H}$ ); 2.67 (m, 2H,  $\text{C}_2\text{H}$ ); 2.78 (m, 2H,  $\text{C}_4\text{H}$ ); 5.51 (s, 2H,  $\text{C}_{17}\text{H}$ ); 6.57 (s, 1H,  $\text{C}_1\text{H}$ ); 6.75 (d, 1H,  $\text{C}_{10}\text{H}$ ,  $J = 3.2$  Hz); 7.17-7.33 (m, 12H); 7.73 (d, 1H,  $\text{C}_{11}\text{H}$ ,  $J = 3.2$  Hz); 8.00 (m, 2H,  $\text{C}_{11}\text{H}$  and  $\text{C}_{15}\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) 21.81; 25.41; 31.27; 35.74; 51.96; 108.00; 124.37; 125.46; 129.92; 127.85 (2C); 127.99; 128.10; 128.33 (2C); 128.49 (2C); 128.74 (2C); 129.05 (2C); 129.23; 129.51 (2C); 129.76; 130.99; 133.05; 134.33; 136.59; 142.32; 145.73; 167.04; 179.56. IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $1653\text{ cm}^{-1}$ . HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ,  $\text{MH}^+$ ) calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  549.1848 found 549.1829.

### 1-benzylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (**100a**)



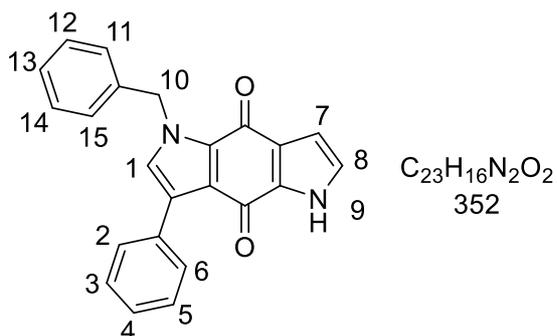
A solution of compound **99a** (130 mg, 0.302 mmol) in a mixture dioxane/1N NaOH (18 mL: 18 mL) was stirred at RT overnight. Water (20 mL) was added and the solution was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x40 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under vacuum to give quantitatively the expected compound as red solid (62 mg, 75 %), mp 204 °C.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ): 5.62 (s, 2H,  $\text{C}_3\text{H}$ ); 6.42 (d, 1H,  $\text{C}_2\text{H}$ ,  $J = 2.6$  Hz); 6.54 (d, 1H,  $\text{C}_9\text{H}$ ,  $J = 2.7$  Hz); 7.11 (d, 1H,  $\text{C}_1\text{H}$ ,  $J = 2.6$  Hz); 7.25-7.39 (m, 5H); 7.34 (d, 1H,  $\text{C}_{10}\text{H}$ ,  $J = 2,7$  Hz); 12,51 (s, 1H,  $\text{N}_{11}\text{H}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 51,54; 108.02; 108.09; 126.20; 127.60 (2C); 128.10; 129.07 (2C); 129.25; 129.45; 130.93; 132.73; 138.11; 169.27; 179.23. IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 3195; 1657;  $1626\text{ cm}^{-1}$ . HRMS (DCI- $\text{CH}_4$ ,  $\text{MH}^+$ ) calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$  277.0977 found 277.0967.

### 1-benzyl-3-phenylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (100b)



A solution of compound **99b** (100 mg, 0.198 mmol) in a mixture dioxane/1N NaOH (10 mL: 10 mL) was stirred at RT overnight. Water (10 mL) was added and the solution was extracted with  $CH_2Cl_2$  (3 x 30 mL). The combined organic layers were dried over  $MgSO_4$  and concentrated under vacuum to give quantitatively the expected compound as red solid (70 mg), mp 239 °C.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ): 5.67 (s, 2H,  $C_{10}H$ ); 6.46 (d, 1H,  $C_7H$ ,  $J = 2.5$  Hz); 7.12 (d, 1H,  $C_7H$ ,  $J = 1.85$  Hz); 7.28-7.40 (m, 8H); 7.57 (s, 1H,  $C_1H$ ); 7.67 (m, 2H,  $C_2H$  and  $C_6H$ ); 12.44 (s, 1H,  $N_9H$ ).  $^{13}C$  RMN (DMSO- $d_6$ ): 51.79; 108.29; 123.81; 126.03; 126.48; 127.66; 127.78 (2C); 127.97; 128.16; 128.26 (2C); 129.10 (2C); 129.19 (2C); 130.24; 130.64; 131.95; 133.31; 137.90; 169.28; 179.49. IR ( $CHCl_3$ ) 3213 1636, 1602  $cm^{-1}$ . HRMS (DCI- $CH_4$ ,  $MH^+$ ) calcd for  $C_{23}H_{17}N_2O_2$  353.1290 found 353.1288.

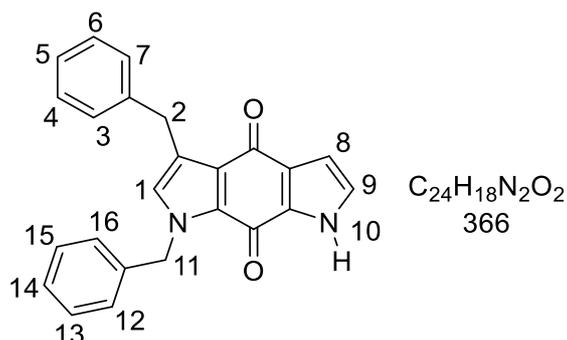
### 1-benzyl-3-phenylpyrrolo[2,3-f]indole-4,8(1H,5H)-dione (100'b)



A solution of compound **99b'** (105 mg, 0.199 mmol) in a mixture dioxane/1M NaOH (10 mL: 10 mL) was stirred at RT overnight. Water (10 mL) was added and the solution was extracted with  $CH_2Cl_2$  (3 x 30 mL). The combined organic layers were dried over  $MgSO_4$  and concentrated under vacuum to give quantitatively the expected compound as a red solid (72 mg), mp 237 °C.  $^1H$  RMN (DMSO- $d_6$ ): 5.66 (s, 2H,  $C_{10}H$ ), 6.45 (d, 1H,  $C_7H$ ,  $J = 2.5$  Hz); 7.17

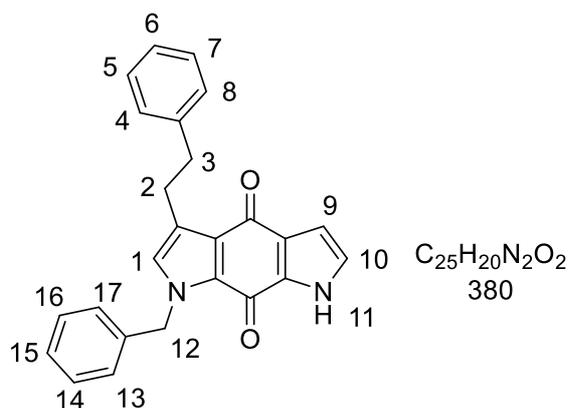
(d, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 1.85 Hz); 7.25-7.38 (m, 8H); 7.56 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.66 (m, 2H, C<sub>2</sub>H and C<sub>6</sub>H); 12.46 (s, 1H, N<sub>9</sub>H). <sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 51.77; 108.28; 123.82; 126.04; 126.47; 127.65; 127.76 (2C), 127.96, 128.15, 128.25 (2C), 129.13 (2C), 129.12 (2C), 130.22, 130.66, 131.97, 133.30, 137.92, 169.26, 179.49. IR (CHCl<sub>3</sub>) 3216, 1634, 1605 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 353.1290, found 353.1285.

### 1,3-dibenzylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (100c)



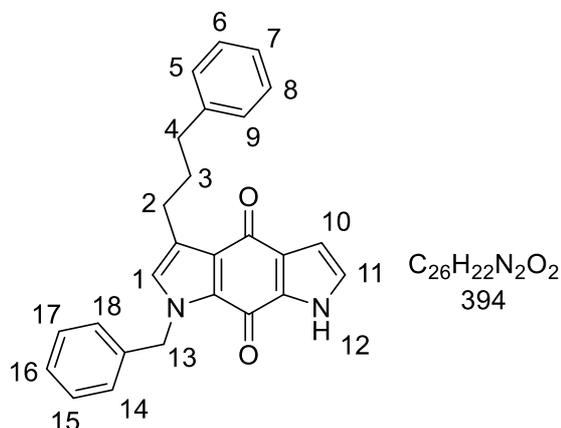
A solution of compound **99c** (164 mg, 0.315 mmol) in a mixture dioxane/1M NaOH (16 mL: 16 mL) was stirred at RT overnight. Water (20 mL) was added and the solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x40 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give quantitatively the expected compound an orange solid (114 mg), mp 190 °C. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 4.07 (s, 2H, C<sub>2</sub>H); 5.75 (s, 2H, C<sub>11</sub>H); 6.45 (dd, 1H, C<sub>8</sub>H, J = 1.1 Hz and J = 2.4 Hz); 7.07 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.08 (t, 1H, C<sub>9</sub>H, J = 2.4 Hz); 7.15 (m, 10H); 12.45 (br. s, 1H, N<sub>10</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 51.39; 51.55; 107.95; 125.13; 125.35; 126.17; 126.34; 127.45; 127.54 (2C); 128.07; 128.72 (2C); 128.95 (2C); 129.07 (2C); 129.57; 129.86; 132.52; 138.07; 141.24; 169.13; 180.49. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3200; 1622 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 367.1420 found 367.1436.

### 1-benzyl-3-phenethylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (100d)



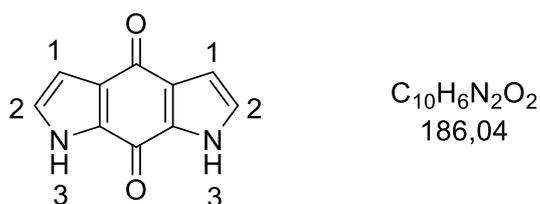
A solution of compound **99d'** (200 mg, 0.366 mmol) in a mixture Dioxane/1N NaOH (20 mL: 20 mL) was stirred at RT overnight. Water (30 mL) was added and the solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x40 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give quantitatively the expected compound as an orange solid (134 mg), mp 215 °C. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 2.89 (m, 2H, C<sub>3</sub>H); 2.97 (m, 2H, C<sub>2</sub>H); 5.54 (s, 2H, C<sub>12</sub>H); 6.48 (d, 1H, C<sub>9</sub>H, J = 2.5 Hz); 7.09 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.10 (d, 1H, C<sub>10</sub>H, J = 2.5 Hz); 7.17-7.38 (m, 10H); 12.45 (br. s, 1H, N<sub>11</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 27.90; 35.75; 51.37; 107.95; 125.41; 125.73; 126.09; 126.22; 127.49; 127.53 (2C); 128.01; 128.68 (2C); 128.84 (2C); 129.03 (2C); 129.55; 129.60; 132.54; 138.08; 142.23; 169.09; 180.56. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3187; 1619 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 381.1597 found 381.1597.

### 1-benzyl-3-(3-phenylpropyl)pyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (**100e**)



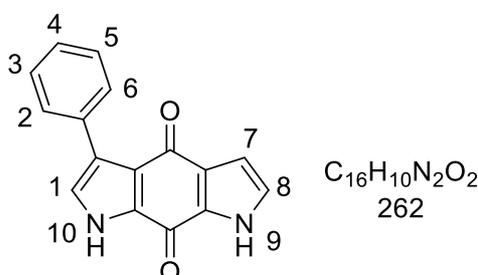
A solution of compound **99e** (180 mg, 0.302 mmol) in a mixture dioxane/1N NaOH (18 mL: 18 mL) was stirred at RT overnight. Water (30 mL) was added and the solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 40 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to give quantitatively the expected compound as an orange solid (128 mg), mp 181 °C. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.88 (m, 2H, C<sub>3</sub>H); 2.64 (t, 2H, C<sub>2</sub>H, J = 7.6 Hz); 2.73 (t, 2H, C<sub>4</sub>H, J = 7.3 Hz); 5.58 (s, 2H, C<sub>13</sub>H); 6.45 (d, 1H, C<sub>10</sub>H, J = 2,6 Hz); 7.09 (d, 1H, C<sub>11</sub>H, J = 2.6 Hz); 7.13-7.43 (m, 11H); 12.44 (br. s, 1H, N<sub>12</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) 25.38; 31.44; 35.49; 51.38; 107.91; 125.40; 126.06; 126.13; 126.29; 127.50; 127.61 (2C); 128.06; 128.72 (2C); 128.76 (2C); 129.06 (2C); 129.32; 129.62; 132.50; 138.18; 142.51; 169.12; 180.52. IR (CHCl<sub>3</sub>) 3206; 1654; 1618. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 395.1760 found 395.1757.

### pyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (101a)



To a solution of compound **100a** (54.7 mg, 0.2 mmol) in DMSO (20  $\mu$ L) was added dropwise KO $t$ Bu (1M in THF (2 mL, 0.2 mmol)). Oxygen was bubbled through this solution during 30 min. NH<sub>4</sub>Cl saturated solution (20 mL) was added and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. Purification of the crude product by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ MeOH 98: 2) gave the expected compound as a red solid (25 mg, 67 %), mp 270 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 6.49 (d, 2H, C<sub>1</sub>H, J = 2.6 Hz); 7.11 (d, 2H, C<sub>2</sub>H, J = 2.6 Hz); 12.58 (br. s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 108.33 (2C); 126.00 (2C); 127.76 (2C); 132.36 (2C); 168.81; 179.78. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3243; 3129; 1622 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 187.0508 found 187.0496.

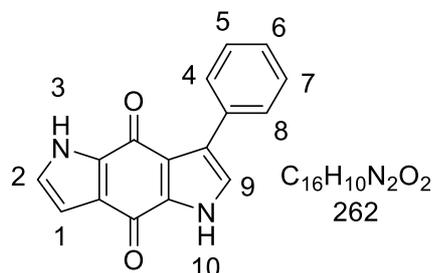
### 3-phenylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (101b)



To a solution of compound **100b** (49.7 mg, 0.14 mmol) in DMSO (20  $\mu$ L) was added dropwise KO $t$ Bu (1M in THF, 1.4 mL, 1.4 mmol). Oxygen was bubbled through this solution during 30 min. NH<sub>4</sub>Cl saturated solution (20 mL) was added and the solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. Purification of the crude product by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98: 2) gave the expected compound as a red solid (27 mg, 73 %), mp 286 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 6.49 (dd, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 2.5 Hz and J = 2.7 Hz); 7.14 (t, 1H, C<sub>8</sub>H, J = 2.5 Hz); 7.28-7.40 (m, 4H); 7.73-7.76 (m, 2H, C<sub>2</sub>H and C<sub>6</sub>H); 12.59 (s, 1H, N<sub>9</sub>H); 12.80 (s, 1H, N<sub>10</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 108.65; 122.26; 125.05; 126.33; 126.82; 127.40; 128.24 (2C); 128.82; 129.01 (2C); 131.45; 133.76; 134.06; 168.73; 179.96. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3262; 3186; 1620 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>)

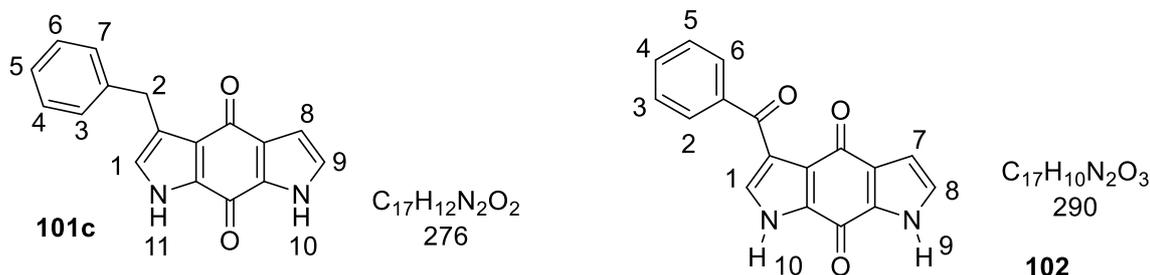
calcd for C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 263.0821 found 263.0820.

### 3-phenylpyrrolo[2,3-f]indole-4,8(1H,5H)-dione (101'b)



To a solution of compound **100'b** (125 mg, 0.43 mmol) in DMSO (0.6 μL, 8.4 mmol), was added dropwise *K*tBuOK (1M in THF (6 mL, 0.6 mmol). Oxygen was bubbled through this solution during 30 min. NH<sub>4</sub>Cl saturated solution (20 mL) was added and the solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. Purification of the crude product by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5) gave the expected compound as an orange solid (86 mg, 76 %), mp 283 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 6.51 (d, 1H, C<sub>1</sub>H, J = 2.5 Hz); 7.09 (d, 1H, C<sub>9</sub>H J = 2.4 Hz); 7.28-7.79 (m, 6H); 12.46 (br. s, 1H, N<sub>3</sub>H); 12.78 (br. s, 1H, N<sub>10</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 107.47; 120.88; 125.14; 125.57; 126.48; 127.41; 128.29 (2C); 128.91 (2C); 130.71; 133.68; 134.30; 135.00; 174.48; 174.72. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3220; 1624 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 263.0821 found 263.0815.

### 3-benzylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (101c) and 3-benzoylpyrrolo[3,2-f]indole 4,8(1H,7H)-dione (102)



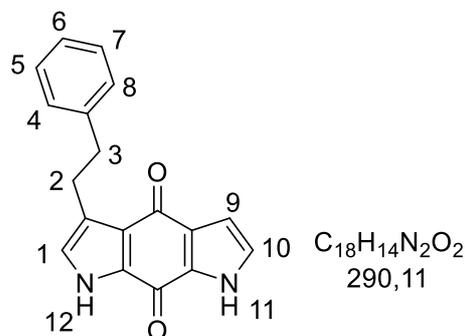
To a solution of compound **100c** (100 mg, 0.27 mmol) in DMSO (30 μL) was added dropwise *K*tBuO (1M in THF, 3 mL, 3 mmol). Oxygen was bubbled through this solution during 30 min. NH<sub>4</sub>Cl saturated solution (20 mL) was added and the solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. Purification of the crude product by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5) gave the

expected compounds **101c** and a by-product **102**.

**101c**: red solid (20 mg, 27 %), mp 104 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 3.85 (m, 2H, C<sub>2</sub>H); 6.47 (d, 1H, C<sub>8</sub>H, J = 2 Hz); 6.93 (t, 1H, C<sub>3</sub>H and C<sub>7</sub>H, J = 7.35 Hz); 7.05-7.31 (m, 6H); 12.33 (br. s, 1H, N<sub>10</sub>H); 12.49 (s, 1H, N<sub>11</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 31.76; 108.24; 122.62; 123.44; 125.99; 126.00; 128.12; 128.17 (2C); 128.85 (2C); 130.84; 131.70; 131.94; 144.21; 174.97; 181.07. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3200; 1626 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 277.0977 found 277.0977.

**102**: orange solid (24 mg, 32 %), mp 167 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 6.41 (dd, 1H, C<sub>7</sub>H, J = 2 Hz and J = 2.5 Hz); 6.50 (dd, 1H, C<sub>8</sub>H, J = 2 Hz and J = 2.5 Hz); 7.11 (t, 1H, C<sub>3</sub>H or C<sub>5</sub>H, J = 2.7 Hz); 7.15 (t, 1H, C<sub>3</sub>H or C<sub>5</sub>H, J = 2.7 Hz); 7.45-7.66 (m, 2H); 7.79-7.83 (m, 2H, C<sub>2</sub>H and C<sub>6</sub>H); 12.70 (s, 1H, N<sub>9</sub>H); 13.08 (m, 1H, N<sub>10</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 108.66; 123.58; 125.19; 126.00; 126.69; 128.86 (2C); 129.60 (2C); 131.60; 133.20; 133.34; 138.37; 168.93; 178.51; 191.47. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3376; 3190; 1622 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 291.0770 found 291.0770.

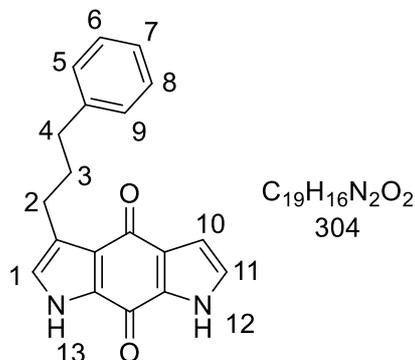
### 3-phenethylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (**101d**)



To a solution of compound **100d** (92 mg, 0.14 mmol) in DMSO (30 μL) was added dropwise K<sup>t</sup>BuO (1M in THF, 2.6 mL, 2.6 mmol). Oxygen was bubbled through this solution during 30 min. NH<sub>4</sub>Cl saturated solution (30 mL) was added and the solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x30 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. Purification of the crude product by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95: 5) gave the expected compound as a red solid (45 mg, 64 %), mp 270 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO d<sub>6</sub>): 2.88 (m, 2H, C<sub>3</sub>H); 2.97 (m, 2H, C<sub>2</sub>H); 6.48 (d, 1H, C<sub>9</sub>H, J = 2.5 Hz); 6.88 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 7.09 (d, 1H, C<sub>10</sub>H, J = 1.7 Hz); 7.16-7.33 (m, 5H); 12.33 (br. s, 1H, N<sub>11</sub>H); 12.52 (br. s, 1H, N<sub>12</sub>H). <sup>13</sup>C

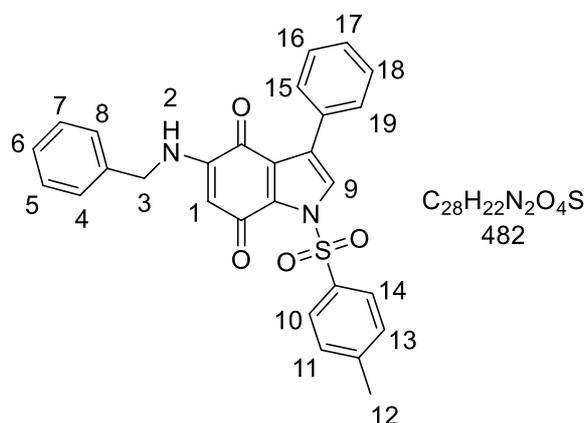
NMR (DMSO- $d_6$ ): 27.92; 36.00; 107.95; 108.22; 124.12; 125.88; 126.21; 126.40; 128.17; 128.70 (2C); 128.76 (2C); 132.16; 132.59; 142.43; 168.62; 181.03. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3235; 3129; 1621. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 291.1134 found 291.1125.

### 3-(3-phenylpropyl)pyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (101e)



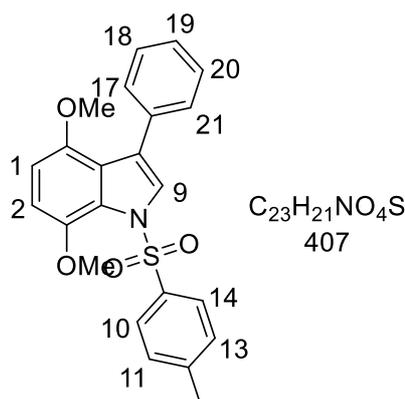
To a solution of compound **100e** (131 mg, 0.36 mmol) in DMSO (45  $\mu$ L) was added dropwise *K*tBuO (1M in THF, 3.7 mL, 3.7 mmol). Oxygen was bubbled through this solution during 30 min. NH<sub>4</sub>Cl saturated solution (30 mL) was added and the solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x30 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. Purification of the crude product by flash-chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95: 5) gave the expected compound as a red solid (109 mg, 44 %), mp 194 °C. <sup>1</sup>H NMR (DMSO- $d_6$ ): 1.89 (m, 2H, C<sub>3</sub>H); 2.63 (t, 2H, C<sub>2</sub>H, J = 7.8 Hz); 2.72 (t, 2H, C<sub>4</sub>H, J = 7.2 Hz); 6.45 (dd, 1H, C<sub>10</sub>H, J = 1.5 and 2.4 Hz); 6.93 (d, 1H, C<sub>1</sub>H, J = 2 Hz); 7.08 (t, 1H, C<sub>11</sub>H, J = 2.4 Hz); 7.15-7.32(m, 5H); 12.35 (br. s, 1H, N<sub>12</sub>H); 12.50 (br. s, 1H, N<sub>13</sub>H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ ): 25.49; 31.56; 35.53; 108.19; 124.16; 124.19; 125.86; 126.10; 126.81; 128.16; 128.71 (2C); 128.74 (2C); 132.09; 132.62; 142.56; 168.60; 180.98. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3373; 3234; 1626 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 305.1290 found 305.1279.

### 5-(benzylamino)-3-phenyl-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (103a)



To a solution of benzylamine (450 mg, 4.2 mmol) in EtOH (32mL), was added dropwise a solution of indoleione **105** (750 mg, 2.1 mmol) in EtOH (16 mL). The mixture was stirred overnight. After concentration under vacuum, the crude product was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 8: 2) to give the expected compound as a red solid (652 mg, 68 %), mp 157°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Ts); 4.28 (d, 2H, C<sub>3</sub>H, J = 5.6 Hz); 5.28 (s, 1H, C<sub>1</sub>H); 6.12 (t, 1H, N<sub>2</sub>H, J = 5.6 Hz); 7.2-7.5 (m, 10H); 7.60 (d, 1H, C<sub>15</sub>H or C<sub>19</sub>H, J = 1.5 Hz); 7.63 (d, 1H, C<sub>15</sub> or C<sub>19</sub>, J = 1.8 Hz); 7.79 (s, 1H, C<sub>9</sub>H); 8.08 (d, 2H, C<sub>10</sub>H and C<sub>14</sub>, J = 8.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.82; 47.06; 97.92; 125.70; 126.56 (2C); 127.52 (2C); 128.10 (2C); 128.21 (2C); 128.27 (2C); 128.96 (2C); 128.97 (2C); 129.23 (2C); 129.47 (2C); 134.21; 134.51; 136.00; 154.81; 171.59; 174.52. IR (CHCl<sub>3</sub>): 2935, 1732, 1598, 1364, 1145 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 482 (M<sup>+</sup>, 85%); 483.1371 (100); 484.1392 (35); 485.1415 (15).

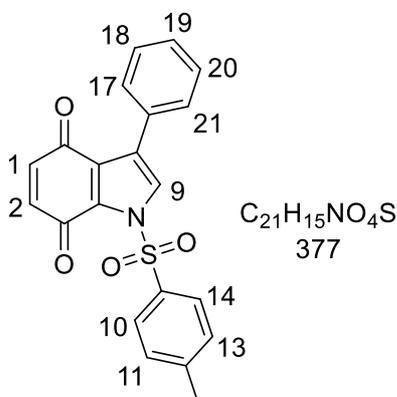
#### 4,7-dimethoxy-3-phenyl-1-tosyl-1H-indole (**104**)



A mixture of 3-bromo-4,7-dimethoxy-1-tosyl-1H-indole **72** (2 g, 4.87 mmol), phenylboronic acid (1.6 g, 5.1 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (564 mg, 0.49 mmol) and 2M CsCO<sub>3</sub> (7.3 mL) in degassed DME (78 mL) was refluxed overnight. After filtration on celite, H<sub>2</sub>O (50 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 8: 2) to give the expected compound as a white solid (1.95 g, 95 %), mp 138 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.4 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Ts); 3.65 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.67 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.57 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8,8 Hz); 6.65 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 8.8 Hz); 7.26 (d, 2H, C<sub>11</sub>H or C<sub>13</sub>H, J = 8,1 Hz); 7.35 (tt, 1H, C<sub>19</sub>H, J = 7,3 and 1.6 Hz); 7.41 (dd, 2H, C<sub>18</sub>H and C<sub>20</sub>H, J = 7.3 Hz); 7.61 (dd, 2H, C<sub>17</sub>H and C<sub>21</sub>H, J = 7.3 et 1.6 Hz); 7.77 (d, 2H, C<sub>10</sub>H and C<sub>14</sub>H, J = 8.1 Hz); 7.79 (s, 1H, CH<sub>NT</sub>s). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.72; 55.88; 56.46; 104.13; 107.99; 121.42; 122.21; 126.07; 126.99; 127.32 (2C); 127.65 (2C); 129.49 (2C); 129.90 (2C); 134.13; 137.46;

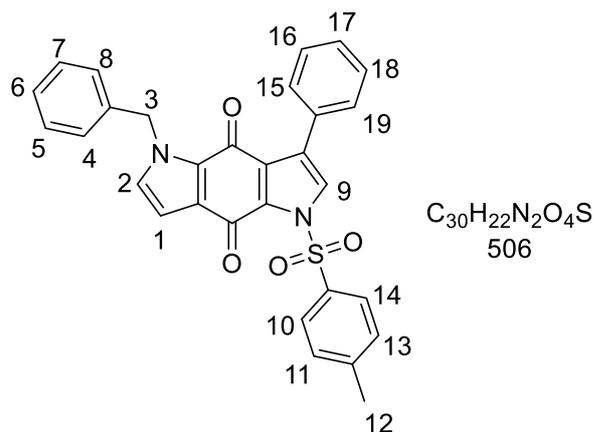
142.03; 144.28; 148.66. IR (CHCl<sub>3</sub>): 2935; 1732; 1598; 1364; 1145 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 407 (M<sup>+</sup>, 85%); 252 (100); 224 (100); 209 (99); 91 (73).

### 3-phenyl-1-tosyl-1H-indole-4,7-dione (105)



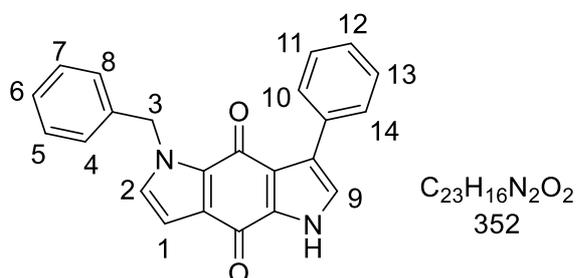
To a solution of compound **102** (2 g, 4.91 mmol) in a mixture CH<sub>3</sub>CN/ H<sub>2</sub>O (200 mL: 100 mL) was added CAN (8.08 g, 14.74 mmol). The mixture was stirred at RT for 15 min. After concentration to remove CH<sub>3</sub>CN, the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x200 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash-chromatography (PE/ EtOAc 80: 20) to give quantitatively the expected compound as an orange solid (1.1 g, 55%), mp 162 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 2.4 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Ts); 6.54 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 10.2 Hz); 6.59 (d, 1H, C<sub>1</sub>H or C<sub>2</sub>H, J = 10.2 Hz); 7.37 (d, 2H, C<sub>11</sub>H or C<sub>13</sub>H, J = 8.1 Hz); 7.38 (tt, 1H, C<sub>19</sub>H, J = 7.3 et 1,6 Hz); 7.43 (ddd, 2H, C<sub>18</sub>H and C<sub>19</sub>H, J = 7.3 and 1.6 Hz); 7.58 (dd, 2H, C<sub>17</sub>H and C<sub>21</sub>H, J = 7.3 and 1.6 Hz); 7.87 (s, 1H, CHNTs); 8.06 (d, 2H, C<sub>10</sub>H and C<sub>14</sub>H, J = 8.1 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 21.80; 125.63; 126.56; 127.32; 128.86 (2C); 128.98 (2C); 129.21 (2C); 129.46 (2C); 130.12; 131.38; 131.49; 133.76; 136.79; 137.35; 146.50; 175.92; 182.32. IR (CHCl<sub>3</sub>): 2987; 1676; 1367; 1148 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 377 (M<sup>+</sup>, 85%); 378.0811 (100); 379.0861 (65); 380.0946 (95); 381.0946 (25).

### 5-benzyl-3-phenyl-1-tosylpyrrolo[2,3-f]indole-4,8(1H,5H)-dione (106)



A suspension of quinone **103a** (1 g, 2.08 mmol), acetaldehyde diethylacetal (12.3 g, 103.72 mmol) and  $Mn(OAc)_3$  (8.08 g, 20.12 mmol) in dry acetonitrile (360 mL) was refluxed for 48 h. After filtration over celite, the solvent was removed under vacuum and the crude product was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 8: 2) to give the expected compound as a yellow solid (0.83 g, 79 %). mp 179°C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 2.46 (s, 3H,  $CH_3Ts$ ); 5.58 (s, 2H,  $C_3H$ ); 6.57 (d, 1H,  $C_1H$ ,  $J = 1.6$  Hz); 6.76 (d, 1H,  $C_2H$ ,  $J = 1.6$  Hz); 7.13-7.50 (m, 10H); 7.60 (d, 2H,  $C_{15}$  et  $C_{19}$ ,  $J = 1.8$  Hz); 7.79 (s, 1H,  $C_9H$ ); 8.09 (d, 2H,  $C_{10}H$  and  $C_{14}$ ,  $J = 8.4$  Hz).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 21.82; 51.86; 108.19; 126.60; 127.56 (2C); 127.61; 128.07 (2C); 128.12 (2C); 128.16 (2C); 128.84 (2C); 129.07 (2C); 129.26 (2C); 129.26 (2C); 129.58; 129.64 (2C); 131.70; 134.30; 136.33; 145.89; 171.88; 174.66. IR ( $CHCl_3$ ) 1657  $cm^{-1}$ . MS (EI):  $m/z$  506 ( $M^+$ , 85%); 507.1357 (100); 508.1400 (33); 535.1678 (17)

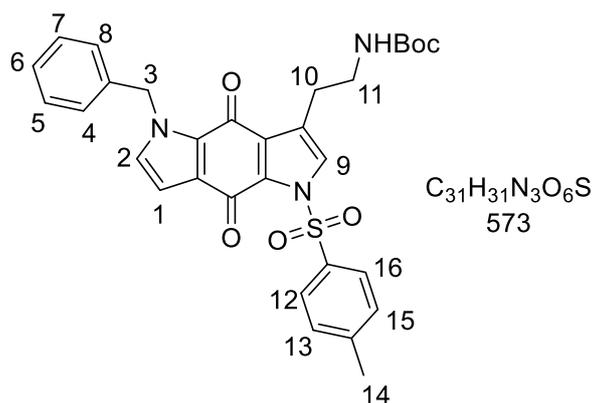
### 1-benzyl-5-phenylpyrrolo[3,2-f]indole-4,8(1H,7H)-dione (107)



A solution of compound **106** (300 mg, 593 mmol) in a mixture dioxane/1N NaOH (30 mL: 30 mL) was stirred at RT overnight. Water (30 mL) was added and the solution was extracted with  $CH_2Cl_2$  (3x60 mL). The combined organic layers were dried over  $MgSO_4$  and concentrated under vacuum to give quantitatively the expected compound as an orange solid (208 mg).  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ ): 5.69 (s, 2H,  $C_3H$ ); 6.64 (d, 1H,  $C_1H$ ,  $J = 2.8$  Hz); 6.78 (d, 1H,  $C_2H$ ,  $J = 2.8$  Hz);

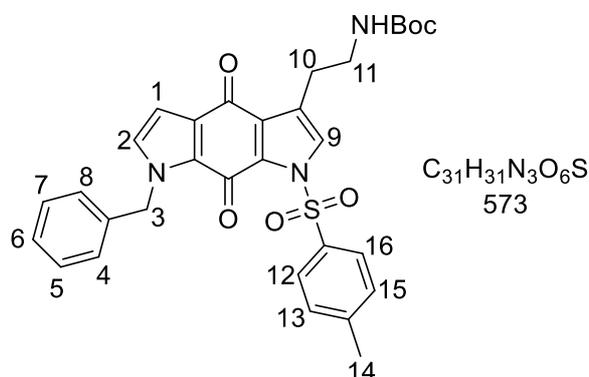
7.03 (d, 1H, C<sub>9</sub>H, J = 2.8 Hz); 7.2-7.5 (m, 8H); 7.69 (d, 2H, C<sub>10</sub>H et C<sub>14</sub>H); 9.61 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 51.93; 107.35; 122.35; 122.92; 126.60; 127.59 (2C); 127.63 (2C); 127.98 (2C); 128.11 (2C); 128.83 (4C); 129.19; 129.75; 130.05; 134.38; 171.88; 174.66. IR (CHCl<sub>3</sub>) 3213, 1636, 1602 cm<sup>-1</sup>. MS (EI): m/z 352 (M<sup>+</sup>, 85%); 353.1285 (100); 354.1315 (27); 381.1612 (20).

**tert-butyl-(2-(5-benzyl-4,8-dioxo-1-tosyl-1,4,5,8-tetrahydropyrrolo[2,3-f]indol-3-yl)ethyl)carbamate (108a)**



A suspension of quinone **58a** (140 mg, 0.25 mmol), acetaldehyde diethylacetal **95a** (1.52 g, 12.91 mmol) and Mn(OAc)<sub>3</sub> (1.6 g, 3.67 mmol) in dry acetonitrile (43 mL) was refluxed for 48 h. After filtration over celite, the solvent was removed under vacuum and the residue was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 8: 2) to give the expected compound as a yellow solid (110 mg, 76 %), mp 105°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.43 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ts); 3.01 (t, 2H, C<sub>10</sub>H, J = 6.4 Hz); 3.44 (q, 2H, C<sub>11</sub>H, J = 6.1 Hz); 4.77 (br s, 1H, NH); 5.56 (s, 2H, C<sub>3</sub>H); 6.55 (d, 1H, C<sub>1</sub>H, J = 2.8 Hz); 6.78 (d, 1H, C<sub>2</sub>H, J = 2.8 Hz); 7.20 (d, 1H, J = 6.7 Hz); 7.29-7.36 (m, 6H); 7.59 (s, 1H, C<sub>9</sub>H); 8.03 (d, 2H, Ts, J = 8.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 21.75, 26.05, 28.39 (3C), 40.32, 51.95, 108.36, 123.03, 127.43 (2C), 127.59, 128.03, 128.11, 128.88 (2C), 128.93 (2C) 129.17, 129.24, 129.58 (2C), 129.62, 131.72, 134.37, 136.30, 143.50, 145.72, 156.00, 171.56, 175.72. IR (CHCl<sub>3</sub>): 3183, 1656, 1599 cm<sup>-1</sup>. HRMS (DCI-CH<sub>4</sub>, MH<sup>+</sup>) calcd for C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S 574,2012 found 574.2025.

**tert-butyl-(2-(7-benzyl-4,8-dioxo-1-tosyl-1,4,7,8-tetrahydropyrrolo[3,2-f]indol-3-yl)ethyl)carbamate (108b)**



A suspension of quinone **58b** (70 mg, 0.125 mmol), acetaldehyde diethylacetal **95a** (760 mg, 6.46 mmol) and  $Mn(OAc)_3$  (800 mg, 1.84 mmol) in dry acetonitrile (22 mL) was refluxed for 48 h. After filtration over celite, the solvent was removed under vacuum and the residue was purified by flash-chromatography (PE/EtOAc 8: 2) to give the expected compound as a yellow solid (40 mg, 56 %), mp 115 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 1.43 (s, 9H,  $(CH_3)_3$ ); 2.45 (s, 3H,  $CH_3$  Ts); 3.01 (t, 2H,  $C_{10}H$ ,  $J = 6.7$  Hz); 3.44 (q, 2H,  $C_{11}H$ ,  $J = 6.2$  Hz); 4.78 (br s, 1H, NH); 5.54 (s, 2H,  $C_3H$ ); 5.56 (s, 2H,  $C_3H$ ); 6.57 (d, 1H,  $C_1H$ ,  $J = 2.8$  Hz); 6.79 (d, 1H,  $C_2H$ ,  $J = 2.8$  Hz); 7.18 (m, 2H, Ts); 7.28-7.32 (m, 6H); 7.60 (s, 1H,  $C_9H$ ); 8.00 (d, 2H, Ts,  $J = 8.4$  Hz).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ) 21.76, 26.00, 28.36 (3C), 40.48, 52.10, 107.65, 123.02, 127.43, 127.79 (2C), 127.88, 127.98(2C), 128.10, 128.70 (2C), 129.00, 129.30, 129.38, 129.42 (2C), 131.63, 134.28, 136.39, 145.58, 142.71, 155.99, 171.17, 180.22. IR( $CHCl_3$ ): 3195, 1654, 1602  $cm^{-1}$ . HRMS (DCI- $CH_4$ ,  $MH^+$ ) calcd for  $C_{31}H_{32}N_3O_6S$  574,2012 found 574.2000.

### Determination of IDO1 and TDO activities

The assay was performed in 96-well flat bottom plates seeded with 2 105 cells in a final volume of 200  $\mu$ L. To determine TDO or IDO activity, the cells were incubated overnight at 37 °C in IMDM supplemented with 2% FBS (Invitrogen). The plates were then centrifuged 10 min at 300 g, and 150  $\mu$ L of the supernatant were collected. The supernatant was analyzed by HPLC to measure the concentration of residual tryptophan and produced kynurenine, based on the retention time and the UV absorption (280 nm for tryptophan, 360 nm for kynurenine). For the HPLC analysis, 55  $\mu$ L of supernatant were mixed with 55  $\mu$ L of 6% (wt/vol) trichloroacetic acid to precipitate the proteins. After centrifugation, the supernatant (100  $\mu$ L) was collected and injected onto an Onyx Monolithic C18 column (Phenomenex). Tryptophan degradation and

kynurenine production were expressed as a percentage of the values obtained in the absence of inhibitor. A dose/response assay was then performed at four concentrations (3.12, 6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M). For each compound, the cell viability, expressed in percentage, was evaluated at the end of the incubation period.

# **Bibliographie**

- 1- Les cancers en France en 2018 - L'essentiel des faits et chiffres (édition 2019).
- 2- Viallard, J. F.; Lacombe, F.; Belloc, F.; Pellegrin, J. L.; Reiffers, J. *Cancer/Radiothérapie* **2001**, 5, 109-129.
- 3- Sarkar, S.; Horn, G.; Moulton, K.; Oza, A.; Byler, S.; Kokolus, S.; Longacre MK. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14, 21087–21113.
- 4- Boige, V.; Ducreux, M. Prévenir et traiter les complications digestives de la chimiothérapie anticancéreuse, *Bulletin du Cancer*, **2001**, 88, 163-73.
- 5- Lu, L.; Zeng, J.; Wen, Z.; Tang, C.; Xu, N. Transcatheter arterial chemoembolisation followed by three-dimensional conformal radiotherapy versus transcatheter arterial chemoembolisation alone for primary hepatocellular carcinoma in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2019**, Issue 2.
- 6- Van Limbergen, E.; Skowronek, J.; Pötter, R.; The GECESTRO handbook of brachytherapy, Belgium, ACCO, 2005, « General aspects ».
- 7- Manasi, K.; Mayekar, T.; Bivona G. Current Landscape of Targeted Therapy in Lung *Cancer Clin. Pharm. Ther* **2017**, 757-764.
- 8- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, **2011**, 378, 771-784.
- 9- L'Institut national du cancer : Les thérapies ciblées dans le traitement du cancer en 2015.
- 10- Iwai, Y.; Hamanishi, J.; Chamoto, K.; and Honjo, T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J. Biomed. Sci.* **2017**, 24, 26.
- 11- Sharma, P.; Allison, J.P. The future of immune checkpoint therapy, *Science* **2015**, 348, 56-61.
- 12- Cour immunologie medicale DC-UFR Lyon sud.
- 13-Zhao, H.; Liao, X.; Kang, Y. Tregs: Where We Are and What Comes Next?, *Front. Immunol.* **2017**, 8, 1578.
- 14- Lee, S.; Margolin, K. Cytokines in cancer immunotherapy, *Cancers*, **2011**, 3, 3856-3893.
- 15- Chen, D.S.; Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle, *Immunity*, **2013**, 39.
- 16- Myint, A.M.; Schwarz, M.J.; Steinbusch, H.W.M. Neuropsychiatric disorders related to interferon and interleukins treatment. *Metab. Brain Dis.* **2009**, 24, 55–68
- 17- Handy, C.E.; Antonarakis, E.S. Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: novel

- insights and future directions, *Future Oncol.* **2018**, *14*, 907-917.
- 18- Holzinger, A.; Barden, M.; Abken, H. The growing world of CAR T cell trials: a systematic review. *Cancer Immunol Immunother.* **2016**, *65*, 1433–1450.
- 19- Postow, M.A.; Callahan, M.K.; Wolchok, J.D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1974–1982.
- 20- Brahmer, J.R.; Tykodi, S.S.; Chow, L.Q.M.; Hwu, W.J.; Topalian, S.L.; Hwu, P.; Drake, C.G.; Camacho, L.H.; Kauh, J.; Odunsi, K.; Pitot, H.C.; Hamid, O.; Bhatia, S.; Martins, R.; Eaton, K.; Chen, S.; Salay, T.M.; Alaparthi, S.; Grosso, J.F.; Korman, A.J.; Parker, S.M.; Agrawal, S.; Goldberg, S.M.; Pardoll, D.M.; Gupta, A.; Wigginton, J.M. Safety and Activity of Anti–PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer, *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 2455-2465.
- 21- Snyder, A.; Makarov, V.; Merghoub, T.; Yuan, J.; Zaretsky, J-M.; Desrichard, A.; Walsh, L.A.; Postow, M.A.; Wong, P.; Ho, T.S.; Hollmann, T.J.; Bruggeman, C.; Kannan, K.; Li, Y.; Elipenahli, C.; Liu, C.; Harbison, C.T.; Wang, L.; Ribas, A.; Wolchok, J.D.; Chan T.A. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma, *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 2189-2199.
- 22- Cardones, A.R.; Banez, L.L. VEGF Inhibitors in Cancer Therapy, *Current. Pharmaceutical Design* **2006**, *12*, 387.
- 23- Selvan, S.R.; Dowling, J.P.; Kelly, W.K, Lin, J. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): Biology and Target in Cancer Immunotherapies. *Current Cancer Drug Targets* **2016**, *16*, 755-764.
- 24- Ye, Z.; Yue, L.; Shi, J.; Shao, M.; Wu T.; Role of IDO and TDO in Cancers and Related Diseases and the Therapeutic Implications; *J. Cancer* **2019**, *10*, 2771–2782.
- 25- Günther J.; Däbritz, J.; Wirthgen E. Limitations and Off-Target Effects of Tryptophan-Related IDO Inhibitors in Cancer Treatment, *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1801.
- 26- Dey, M.; Chang A.L.; Miska, J.; Qiao J.; Lesniak, M.S. The Role of Regulatory T Cells and Indoleamine-2,3-dioxygenase in Brain Tumor Immunosuppression. *Translational Immunotherapy of Brain Tumors* **2017**, 33-61.
- 27- Brochez L.; Chevolet, I.; Kruse, V. The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy; *Eur. J. Cancer* **2017**, *76*, 167-182.
- 28- Sofiyev V.; Lumb, J-P. Volgraf M.; Trauner, D. Total Synthesis of Exiguamines A and B Inspired by Catecholamine Chemistry. *Eur. J.* **2012**, *18*, 4999-5005.
- 29- Kumar, S.; Malachowski W.P.; DuHadaway J.B. Indoleamine 2,3-dioxygenase is the anticancer target for a novel series of potent naphthoquinone-based inhibitors. *J Med*

- Chem.* **2008**, *51*, 1706–1718.
- 30- Labadie, B.W.; Bao, R.; Luke, J.J. Reimagining IDO pathway inhibition in cancer immunotherapy via downstream focus on the tryptophan-kynurenine-aryl hydrocarbon axis. *Amer. Ass. Cancer. Res.* **2019**, *25*, 1462-1471.
- 31- Sears, C. L.; Pardoll, D. M. The intestinal microbiome influences checkpoint blockade. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 254-255.
- 32- Anitei, M-G.; Zeitoun, G.; Mlecnik, B.; Marliot, F.; Haicheur, N.; Tudosì, A-M.; Kirilovsky, A.; Lagorce, C.; Bindea, G.; Danciu, D.; Bruneval, P.; Scripcariu, V.; Chevallier, J-M.; Zinzindohoué, F.; Berger, A.; Galon, J.; Pagès, F.; Prognostic and Predictive Values of the Immunoscore in Patients with Rectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 1891-1899.
- 33- Gibney, G. T.; Weiner, L. M.; Atkins, M. B. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 542–551.
- 34- Sautès-Fridman, C.; Petitprez, F.; Calderaro J.; Fridman, WH. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 307–325.
- 35- Dolusic, E.; Larrieu, P.; Colette, D.; Rives, A.; Blanc, S.; Fraser, G.; Wouters, J.; Van den Eynde, B.; Maseree, B.; Delfourne, E.; Frédérick, R. Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory activity of marine alkaloid tsitsikammamine A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 47-54.
- 36- a) Antunes, E. M.; Copp, B. R.; Davies-Coleman, M. T.; Samaai, T. Pyrroloiminoquinone and related metabolites from marine sponges. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 62-72. b) Lin, S.; McCauley, E. P.; Lorig-Roach, N.; Tenney, K.; Naphe, C. N.; Yang, A-M.; Johnson, T. A.; Hernandez, T.; Rattan, R.; Valeriote, F. A.; Crews, P. Another look at pyrroloiminoquinone alkaloids-Perspectives on their therapeutic potential from known structures and semisynthetic analogues. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 98.
- 37- Hooper, G. J.; Davies-Coleman, M.T.; Kelly-Borges, M.; Coetzee, P. S. New alkaloid from South African Latrunculid sponge. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7135-7138.
- 38- Antunes, E. M.; Beukes, D. R.; Kelly, M.; Samaai, T.; Barrows, L. R.; Marshall, K. M.; Sincich, C.; Davies-Coleman, M. T. Cytotoxic pyrroloiminoquinones from four species of South African Latrunculid sponges. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1268-1276.
- 39- Copp, B. R.; Ireland, C. M.; Barrows, L. R. Wakayin: A Novel Cytotoxic Pyrroloiminoquinone Alkaloid from the Ascidian Clavelina Species, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4596-4597.
- 40- a) Utkina, N. K.; Makarchenko, A. E.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S. Zyzzyanones

- A, a novel pyrrolo[3,2-f]indole alkaloid from the Australian marine sponge *Zyzzya fuliginosa*. *Tetrahedron Lett.* 2004, 45, 7491-7494. b) Utkina, N. K.; Makarchenko, A. E.; Denisenko, V. A. *Zyzzyanones B-D*, dipyrroloquinones from the marine sponge *Zyzzya fuliginosa*. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1424-1427.
- 41- Kokoshka; J. M.; Capton, T. L.; Holden, J. A.; Ireland, C. M.; Barrows, L. R. Differences in the topoisomerase I cleavage complexes formed by camptothecin and wakayin, a DNA-intercalating marine natural product. *Anti-Cancer Drugs* **1996**, 7, 758-765.
- 42- Legentil, L. Etude d'aza-analogues des alcaloïdes marins de type pyrroloquinoline : wakayine et tsitsikammamine à activités antitumorale potentielle. Approches vers lka synthèse totale des produits naturels. Thèse de L'Université Paul Sabatier, **2004**.
- 43- a) Legentil, L.; Benel, L.; Lesur, B.; Delfourne, E. Synthesis and antitumor characterization of pyrazolic analogues of the marine pyrroloquinoline alkaloids: wakayin and tsitsikammamines. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2979-2988. b) Legentil, L.; Lesur, B.; Delfourne, E. Aza-analogues of the marine pyrroloquinoline alkaloids wakayin and tsitsikammamines: synthesis and topoisomerase inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 427-429.
- 44- Rives, A.; Delaine, T.; Legentil, L.; Delfourne, E.; Total synthesis of the marine pyrroloiminoquinone alkaloid tsitsikammamine A. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 1128-1130.
- 45- (a) Ding, Q.; Chichak, K.; Lown, J. W. *Curr. Med. Chem.* **1999**, 6, 1; (b) Urban, S.; Hickford, S. J. H.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G. *Curr. Org. Chem.* **2000**, 4, 765; (c) Antunes, E. M.; Copp, B. R.; Davies-Coleman, M. T.; Samai, T. *Nat. Prod. Rep.* 2005, 22, 62.
- 46- Barret, R.; Roué, N. Synthesis of a bis-pyrrolo-quinone structure analogue to wakayin. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 3889-3890.
- 47- Rives, A.; Delaine T.; Legentil L.; Delfourne E. Total synthesis of the marine pyrroloiminoquinone alkaloid tsitsikammamine A. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 1128-1130.
- 48- Murugesan, S.; Nadkarni, D.H.; Velu, S.E. A facile synthesis of bispyrroloquinone and bispyrroloiminoquinone ring system of marine alkaloids. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 3074-3076.
- 49- Inman, M.; Moody, C.J. Copper(II)-Mediated Synthesis of Indolequinones from Bromoquinones and Enamines. *Eur.J. Org. Chem.* **2013**, 11, 2179-2187

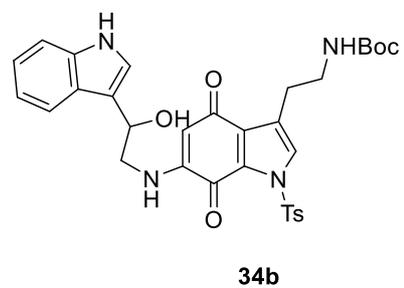
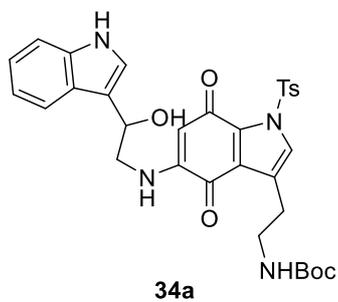
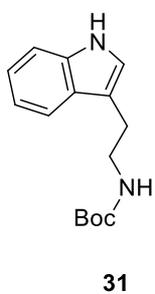
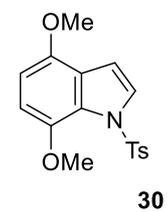
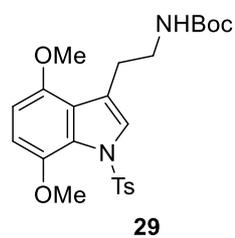
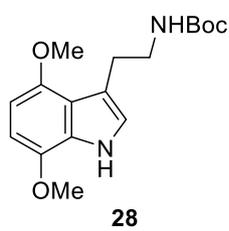
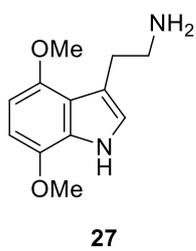
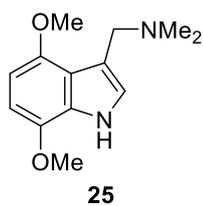
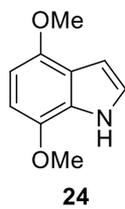
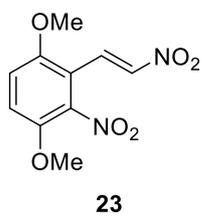
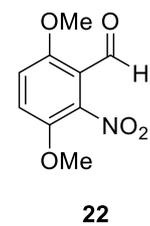
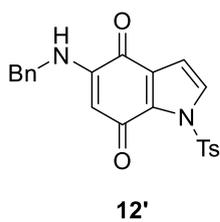
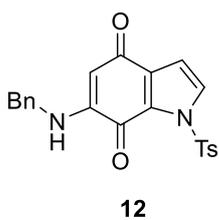
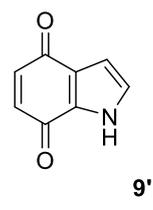
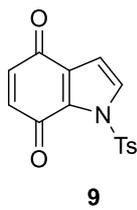
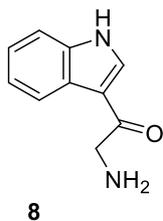
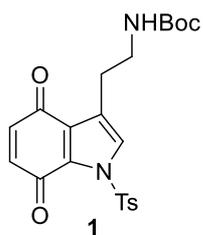
- 50- Nadkarni, D.H.; Murugesan, S.; Velu S.E. Total synthesis of zyzzyanones A-D. *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 4105-4113
- 51- Vanicat, A.; André-Barrès, C.; Delfourne, E. New reaction of formation of the fused tricyclic bispyrroloquinone ring system. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 342–345
- 52- Thèse Université Paul Sabatier, **2004**, Laurent Legentil.
- 53- Yonemitsu, O.; Oikawa, Y.; Yoshioka, T.; & Mohri, K. Synthesis of Pimprinine and Related Oxazolyindole Alkaloids from N-Acyl Derivatives of Tryptamine and Tryptophan Methyl Ester by DDQ Oxidation. *Heterocycles*, **1979**, *12*, 1457.
- 54- Chassaing, S.; Delfourne E. <sup>13</sup>C NMR discrimination of regioisomeric bispyrroloquinone/bispyrroloiminoquinone ring systems. *Magn. Res. Chem.* 2010, *48*, 9-12.
- 55- Zhang L.; Cava, M. P.; Rogers, R. D.; Rogers, L. M. *Tetrahedron Lett*, 1998, *39*, 7677
- 56- Nicolas, I.; Bijani, C.; Brasseur, D.; Pratviel, G.; Bernadou, J.; Robert. A. Metalloporphyrin-catalyzed hydroxylation of the N,N-dimethylamide function of the drug molecule SSR180575 to a stable N-methyl-N-carbinolamide, *Comptes Rendus Chimie*, **2013**, *16*, 1002-1007.
- 57- Dwayaja, H.; Nadkarni, I.; Murugesan, S.; Velu, S, E;. Total synthesis of zyzzyanones A-D, *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 4105-4113.
- 58- Velu, S. E.; Pillai, S. K.; Lakshmikantham, M. V.; Billimoria, A. D.; Culpepper, J. S.; Cava, M. P. Syntheses of the Marine Alkaloids Makaluvamine D and Discorhabdin C: The 4,6,7-Trimethoxyindole Approach, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 1800-1805.
- 59- Kumar, D.; Kumar, R.; Chakraborti, A, K. Tetrafluoroboric Acid Adsorbed on Silica Gel as a Reusable Heterogeneous Dual-Purpose Catalyst for Conversion of Aldehydes/Ketones into Acetals/Ketals and Back Again. *Synthesis*, **2008**, *8*, 1249-1256.
- 60- Wang, K.; Liu Z. Synthesis of Arcyriarubin A and Arcyriaflavin A via Cross-Coupling of Indolylboronic Acid with Dibromomaleimides. *Synthetic commun.*, **2008**, *40*, 144-150
- 61- Parrick, J.; Yahya, A.; Ijaz, A. S.; Yizun, J. Convenient preparation of 3,3-dibromo-1,3-dihydroindol-2-ones and indole-2,3-diones (isatins) from indoles. *J. Chem. Soc.*, **1989**, *11*, 2009-2015.
- 62- Qian, F.; Liao, J.; Vilella, J.; Edwards, R.; Kalinski, P.; Lele, S.; Shrikant, P.; Odunsi, K. Effects of 1-methyltryptophan stereoisomers on IDO2 enzyme activity and IDO2-mediated arrest of human T cell proliferation. *Cancer Immunol. Immunother.*, **2012**, *61*, 2013-2020.

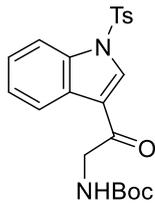
- 63- Leitgeb, S.; Nidetzky, B. Structural and Functional Comparison of 2-His-1-carboxylate and 3-His Metallocentres in Non-Haem iron(II)-dependent Enzyme, *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 1180-1186.
- 64- Monal, P.; Wijeratne, G.B. Modeling Tryptophan/Indoleamine 2,3-Dioxygenase with Heme Superoxide Mimics: Is Ferryl the Key Intermediate? *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1846-1856.
- 65- Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 235-242.
- 66- The UniProt consortium. *Nucleic Acids Res.*, **2019**, *47*, D506-515. <https://www.uniprot.org/uniprot/P14902>
- 67- Sugimoto, H.; Oda, S.; Otsuki, T.; Hino, T.; Yoshida, T.; Shiro, Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O<sub>2</sub> incorporation by a heme-containing dioxygenase, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **2006**, *103*, 2611-2616.
- 68- Jiang, T.; Sun, Y.; Yin, Z.; Feng, S.; Sun, L.; Li, Z. Research progress of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors. *Future Med. Chem.*, **2015**, *7*, 185-201.
- 69- Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E.; Comput, *J. Chem.*, **2004**, *25*, 1605-1612. <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>
- 70- Dassault Systèmes – Biovia Discovery Studio - <https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/>
- 71- Meng, E.C.; Pettersen, E.F.; Couch, G.S.; Huang, C.C.; Ferrin, T.E. Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics*. **2006**, *7*, 339-349.
- 72- R. Thomsen, M.H. Christensen. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 3315-3321.
- 73- Sousa, S.F.; Ribeiro, A.J.M; Coimbra, J.T.S.; Neves, R.P.P.; Martins, S.A.; Moorthy, N.S.H.N.; Fernandes, P.A.; Ramos, M.J. Protein-Ligand Docking in the New Millennium – A Retrospective of 10 Years in the Field. *Curr. Med. Chem.*, **2013**, *20*, 2296-2314.
- 74- Tianze, J.; Yingying, S.; Zhichao, Y.; Sen, F.; Liping, S.; Zhiyu, L. Research progress of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors. *Fut. Med. Chem.*, **2015**, *7*, 195-201.
- 75- Zhou, Y.; Peng, J.; Li, P.; Du, H.; Li, Y.; Li, Y.; Zhang, L.; Sun, W.; Liu, X.; Zuo, Z. Discovery of novel indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors by virtual screening. *Comp. Bio. Chem.*, **2019**, *78*, 306-316

- 76- Xing, Y.; Wang, X.; Sun, S.; Dong, Q.; Wu X.; Tang, W. Recent advances in the discovery of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors. *Med. Chem. Commun.*, **2019**, *10*, 1740-1754.
- 77- Xu, G.; Wang, T.; Li, Y.; Huang, Z.; Wang, X.; Zheng, J.; Yang, S.; Fan Y.; Xiang, R. A highly potent and selective inhibitor Roxyl-WL targeting IDO1 promotes immune response against melanoma. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2018**, *33*, 1089-1094
- 78- Mahale, S.; Bharate, S.B.; manda, S.; Sonali, P.J.; Bharate, S.; Jenkins, P.R.; Vishwakarma, R.A.; Chaudhur, B. Biphenyl-4-carboxylic acid [2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-methylamide (CA224), a non-planar analog of faspaplysin inhibits Cdk4 and tubulin polymerization: Evaluation of in vitro and in vivo anticancer activity. *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 9658–9672.
- 79- Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 235-242.
- 80- The UniProt consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.*, **2019**, *47*, D506-515.
- 81- Tojo, S.; Kohno, T.; Tanaka, T.; Kamioka, S.; Ota, Y.; Ishii, Y.; Kamimoto, K.; Asano, S.; Isobe, Y. Crystal Structures and Structure–Activity Relationships of Imidazothiazole Derivatives as IDO1 Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2014**, *5*, 1119-1123.
- 82- Peng, Y.H.; Liao, F.Y.; Tseng, C.Y.; Kuppusamy, R.; Li, A.S; Chen, C.H; Fan, Y.S.; Wang, S.Y.; Wu, M.H.; Hsueh, C.C.; Chang, J.Y.; Lee, L.C.; Shih, C.; Shia, K.S.; Yeh, T.K.; Hung, M.S.; Kuo, C.C.; Song, J.S.; Wu, S.Y.; Ueng, S.H. Unique Sulfur–Aromatic Interactions Contribute to the Binding of Potent Imidazothiazole Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2020**, *63*, 1642-1659.

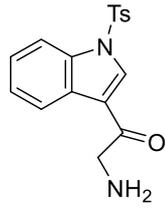
# **Molécules décrites**



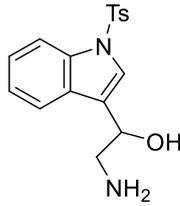




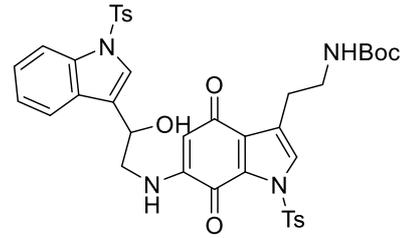
35



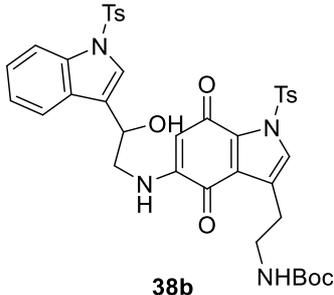
36



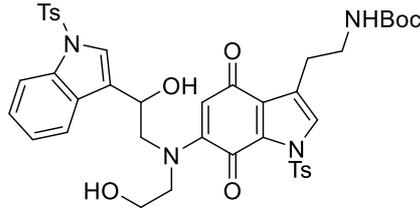
37



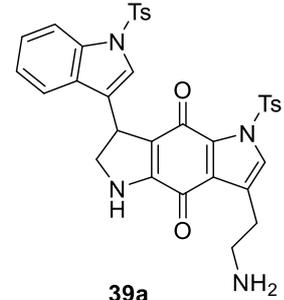
38a



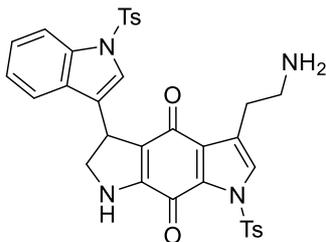
38b



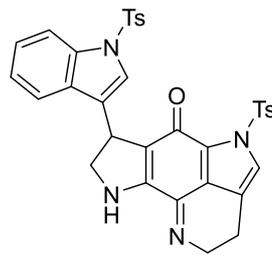
38c



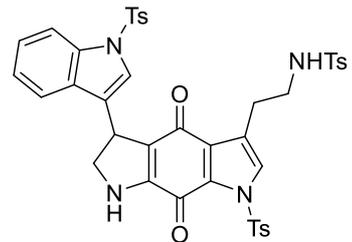
39a



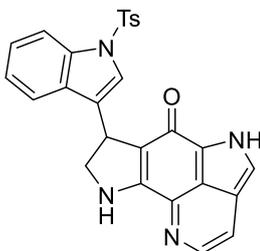
39b



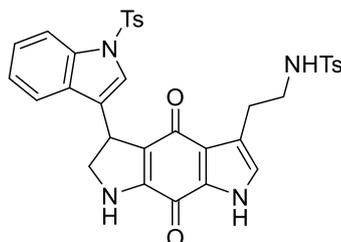
40a



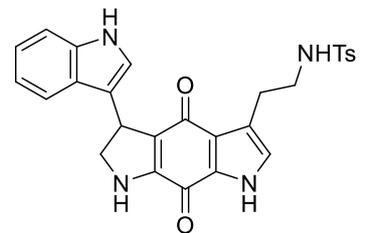
40b



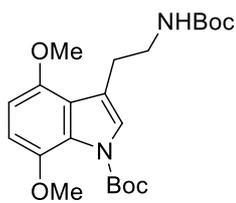
41a



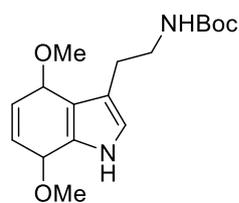
41b



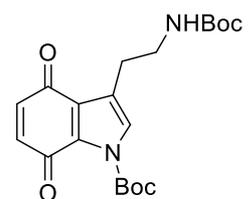
42b



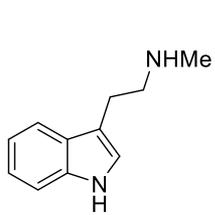
43



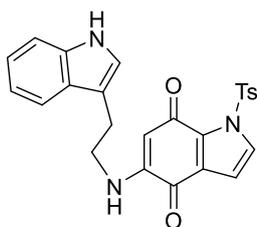
44



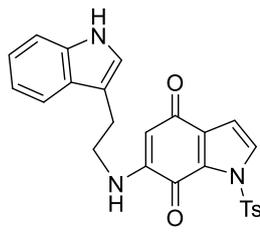
45



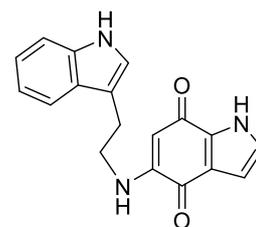
51b



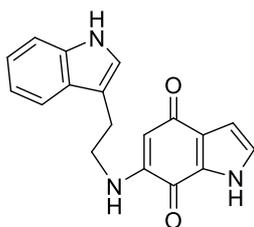
54a



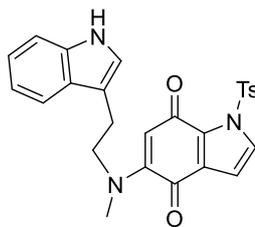
54'a



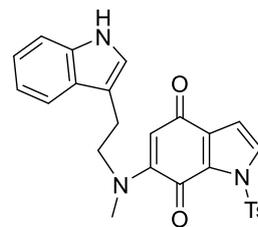
54b



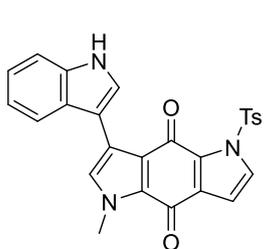
54'b



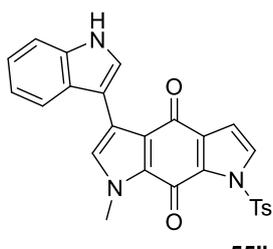
54c



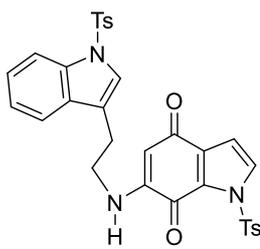
54'c



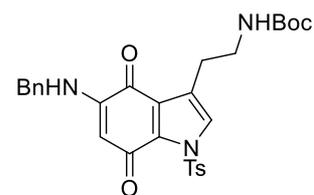
55b



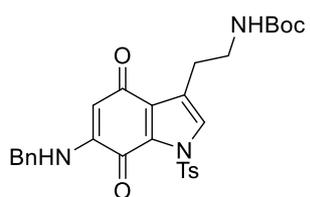
55'b



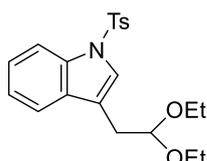
56



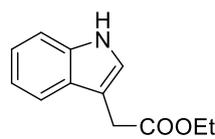
58a



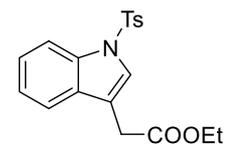
58b



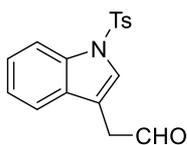
59



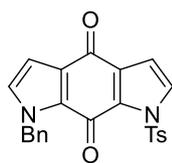
61



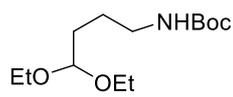
62



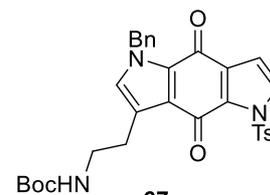
63



64

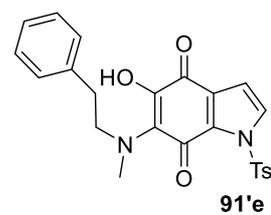
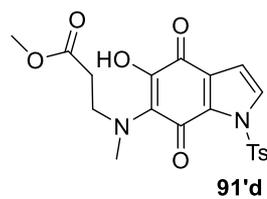
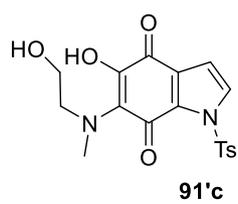
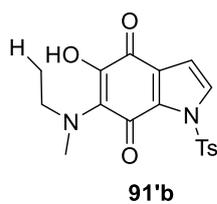
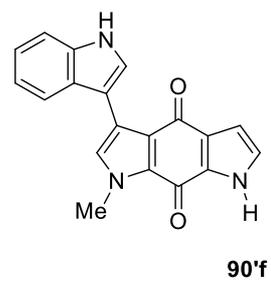
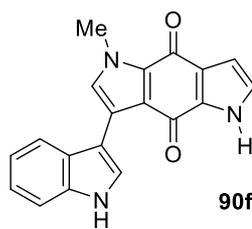
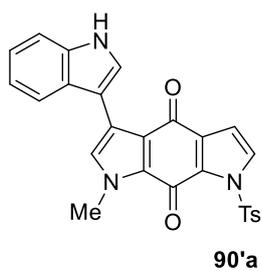
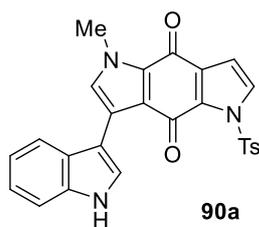
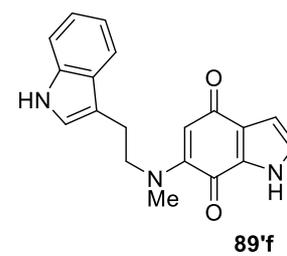
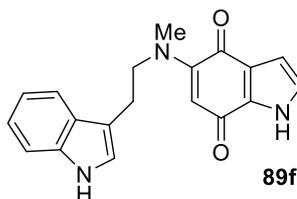
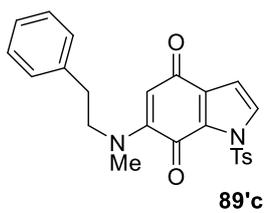
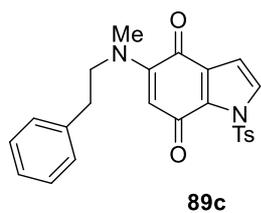
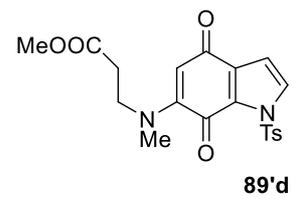
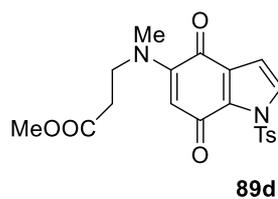
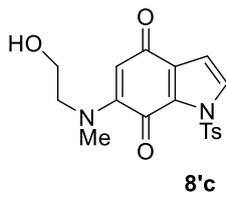
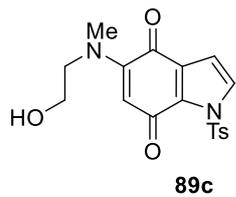
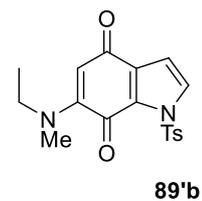
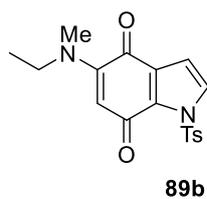
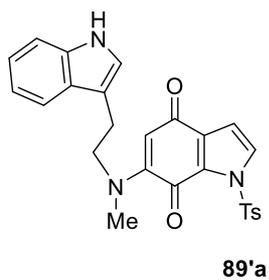
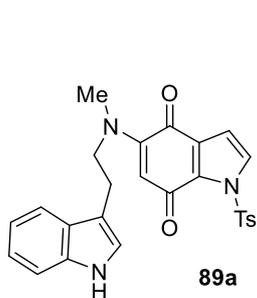


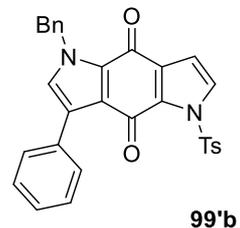
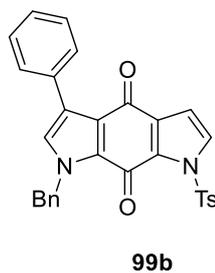
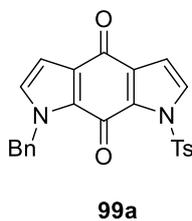
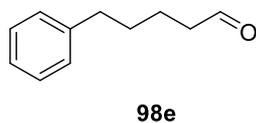
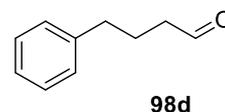
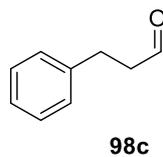
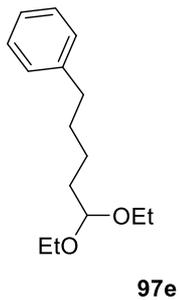
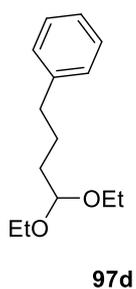
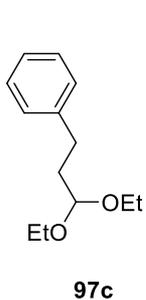
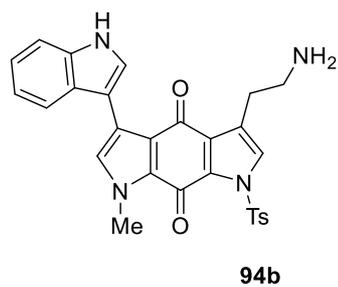
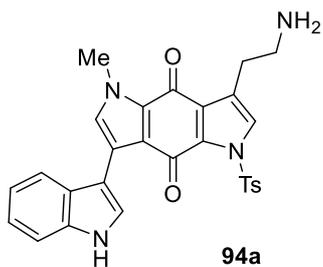
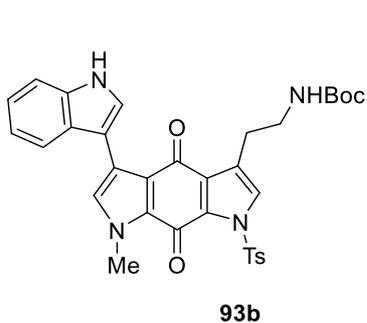
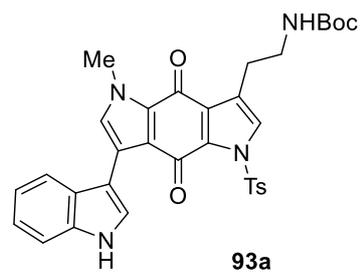
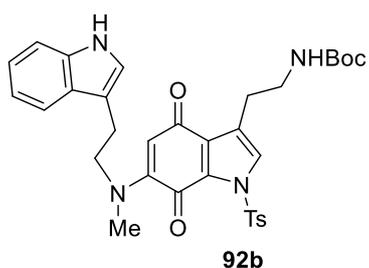
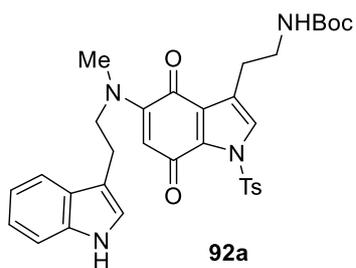
66

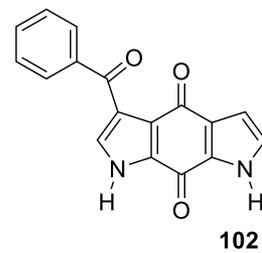
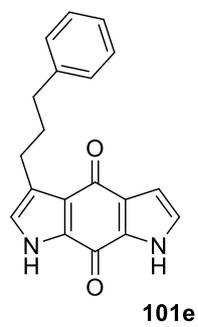
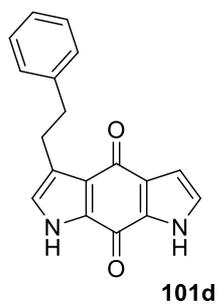
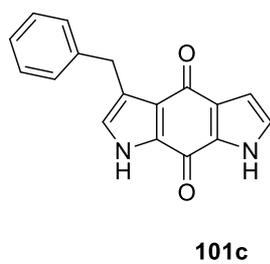
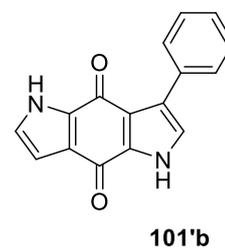
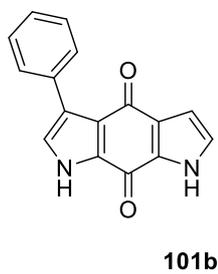
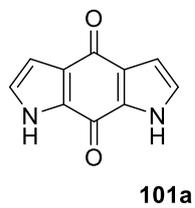
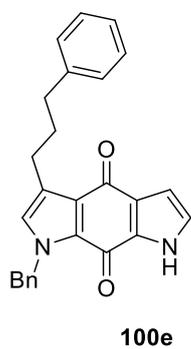
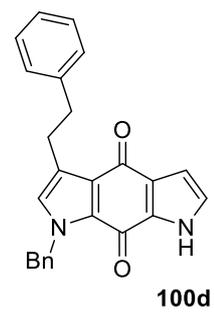
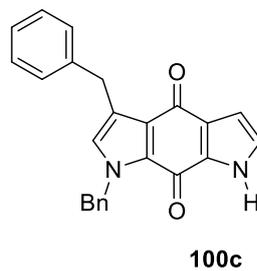
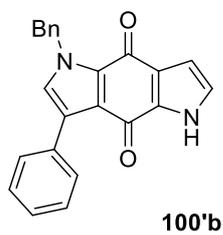
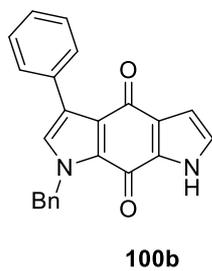
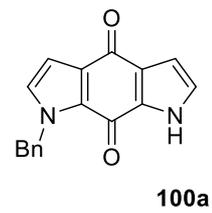
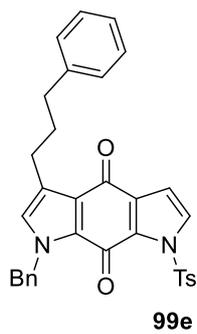
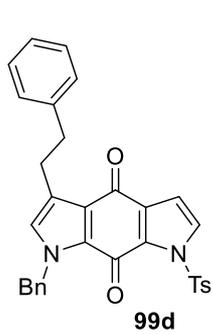
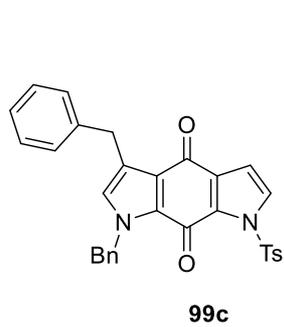


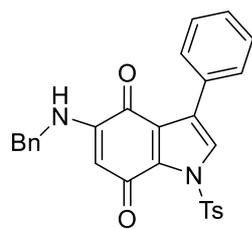
67a



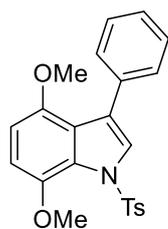




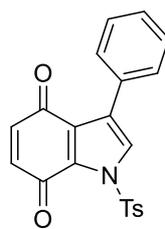




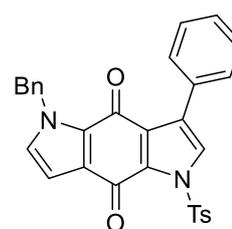
**103a**



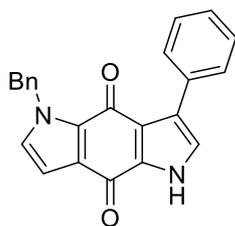
**104**



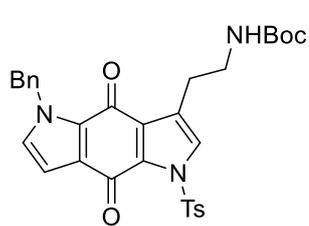
**105**



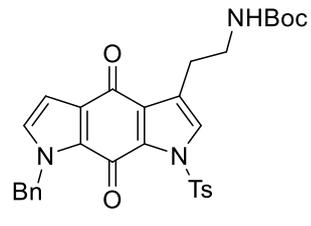
**106**



**107**



**108a**



**108b**

# **Annexes**



Tableau de références bibliographiques supplémentaires pour le chapitre modélisation moléculaire.

NoR	Référence bibliographique	Structures
r1	<b>H. Sugimoto &amp; al. (2006)</b> Proc Natl Acad Sci USA, 103: 2611-2616. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O <sub>2</sub> incorporation by a heme-containing dioxygenase. <a href="https://www.pnas.org/content/103/8/2611">https://www.pnas.org/content/103/8/2611</a>	2D0U, 2D0T
r2	<b>T. Kohno &amp; al. (2014)</b> ACS Med Chem Lett, 5: 1119-1123. Crystal Structures and Structure–Activity Relationships of Imidazothiazole Derivatives as IDO1 Inhibitors. <a href="https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ml500247w">https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ml500247w</a>	4PK5, 4PK6
r3	<b>M.T. Nelp &amp; al. (2018)</b> Proc Natl Acad Sci USA, 115: 3249-3254. J.T. Immune-modulating enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is effectively inhibited by targeting its apo-form. <a href="https://www.pnas.org/content/115/13/3249">https://www.pnas.org/content/115/13/3249</a>	6AZW, 6AZV, 6AZU
r4	<b>Y.H. Peng &amp; al. (2016)</b> J Med Chem, 59: 282-293. Important Hydrogen Bond Networks in Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor Design Revealed by Crystal Structures of Imidazoleisoindole Derivatives with IDO1. <a href="https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.5b01390">https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.5b01390</a>	5EK4, 5EK3, 5EK2, 5ETW
r5	<b>Y. Wu &amp; al. (2017)</b> Biochem Biophys Res Commun 487: 339-343. Structural insights into the binding mechanism of IDO1 with hydroxylamidine based inhibitor INCB14943. <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X17307271?via%3Dihub">https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X17307271?via%3Dihub</a>	5XE1
r6	<b>A. Lewis-Ballester &amp; al. (2018)</b> J Am Chem Soc, 140: 8518-8525. Inhibition Mechanisms of Human Indoleamine 2,3 Dioxygenase 1 <a href="https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.8b03691">https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.8b03691</a>	6CXV, 6CXUa
r7	<b>K.N. Pham &amp; al. (2018)</b> J Am Chem Soc, 140: 14538-14541. Mapping the Binding Trajectory of a Suicide Inhibitor in Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1. <a href="https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.8b07994">https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.8b07994</a>	6DPR, 6DPQ, 6MQ6
r8	<b>S. Luo &amp; al. (2018)</b> Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 74: 717-724. High-resolution structures of inhibitor complexes of human indole-amine 2,3-dioxygenase 1 in a new crystal form. <a href="http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S2053230X18012955">http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S2053230X18012955</a>	6E46, 6E45, 6E40, 6E42, 6E41, 6E44, 6E43
r9	<b>M.K. Swan &amp; al. (2018)</b> Chembiochem, 19: 552-561. New 4-Amino-1,2,3-Triazole Inhibitors of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Form a Long-Lived Complex with the Enzyme and Display Exquisite Cellular Potency. <a href="https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cbic.201700560">https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cbic.201700560</a>	6F0A
r10	<b>H. Zhang &amp; al. (2019)</b> ACS Med Chem Lett 10: 1530-1536. Discovery of Amino-cyclobutane-derived Indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitors for Cancer Immunotherapy. <a href="https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmchemlett.9b00344">https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmchemlett.9b00344</a>	6PU7
r11	<b>K.N. Pham &amp; al. (2019)</b> J Am Chem Soc, 141: 18771-18779. Structural Basis of Inhibitor Selectivity in Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 and Tryptophan Dioxygenase. <a href="https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jacs.9b08871">https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jacs.9b08871</a>	6PZ1
r12	<b>U.F. Roehrig &amp; al. (2019)</b> J Med Chem, 62: 8784-8795. Inhibition Mechanisms of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1). <a href="https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b00942">https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b00942</a>	6R63
r13	<b>Y.H. Peng &amp; al. (2020)</b> J Med Chem, 63: 1642-1659. Unique Sulfur–Aromatic Interactions Contribute to the Binding of Potent Imidazothiazole Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibitors. <a href="https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b01549">https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b01549</a>	6KW7,
r14	<b>C. White &amp; al. (2020)</b> ACS Med Chem Lett 11: 550-557. Strategic Incorporation of Polarity in Heme-Displacing Inhibitors of Indoleamine-2,3-dioxygenase-1 (IDO1). <a href="https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmchemlett.0c00010">https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmchemlett.0c00010</a>	6V52

r15	<p><b>S. Crosignani &amp; al. (2017)</b> J Med Chem 60: 9617-9629. Discovery of a Novel and Selective Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO-1) Inhibitor 3-(5-Fluoro-1H-indol-3-yl)pyrrolidine-2,5-dione (EOS200271/PF-06840003) and Its Characterization as a Potential Clinical Candidate. <a href="https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.7b00974">https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.7b00974</a></p>	5WHR
r16	<p><b>S. Kumar &amp; al. (2019)</b> J Med Chem 62: 6705-6733. Discovery of Clinical Candidate (1R,4r)-4-((R)-2-((S)-6-Fluoro-5H-imidazo[5,1-a]isoindol-5-yl)-1-hydroxyethyl)cyclohexan-1-ol (Navoximod), a Potent and Selective Inhibitor of Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1. <a href="https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b00662">https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.9b00662</a></p>	6O3I
r17	<p><b>A. Lewis-Ballester &amp; al. (2017)</b> Nat Commun, 8: 1693-1693. Structural insights into substrate and inhibitor binding sites in human indoleamine 2,3-dioxygenase 1 <a href="https://www.nature.com/articles/s41467-017-01725-8">https://www.nature.com/articles/s41467-017-01725-8</a></p>	5WMV, 5WMU, 5WMX, 5MMW, 5WN8
r18	<p><b>Q. PU &amp; al. (2020)</b> ACS Med. Chem. Lett. 11:8, 1548–1554. Discovery of Potent and Orally Available Bicyclo[1.1.1]pentane-derived Indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitors. <a href="https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmchemlett.0c00195">https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmchemlett.0c00195</a></p>	6WJY



## **Synthèse totale de l'alkaloïde marin : Wakayine et étude d'analogues à activité immunothérapeutique potentielle**

Les alcaloïdes marins Wakayine et Tsitsikammamine appartiennent à la famille des 1,3,4,5-tétrahydropyrrolo[4,3,2-*de*] quinolines. Récemment, certains analogues de ces molécules ont été décrits comme inhibant l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO1), une enzyme impliquée dans la capacité qu'ont certaines tumeurs à supprimer une grande partie de la réponse immunitaire potentielle. Ainsi, l'IDO1, de même que la tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO), qui est une enzyme apparentée catalysant la même réaction, sont des cibles thérapeutiques potentielles dans la lutte contre le cancer. L'étude réalisée pour mettre au point une synthèse totale de la wakayine est décrite. Les différentes stratégies envisagées sont basées sur la construction d'un motif bis-pyrroloquinone : la première fait intervenir une réaction d'addition de Michael entre une 3-éthylamine-indoledione diversement protégée et une  $\beta$ -hydroxyamine, la deuxième qui constitue une voie originale pour aboutir au motif bispyrroloquinone met en jeu une indoledione et la méthyltryptamine et la troisième consiste en la condensation d'un acétal sur une 6-benzyl-3-substituée-indoledione. Sur la base d'une étude structurale complète d'IDO1 et d'une étude de docking, des inhibiteurs potentiels ont été préparés. Leur capacité à inhiber IDO1 et TDO a été évaluée avec un test cellulaire. Certains composés présentent des activités intéressantes.

Mots Clef : alcaloïdes marins, pyrroloiminoquinones, wakayine, tsitsikammamine, indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO1), tryptophane-2,3-dioxygénase (TDO), agents immunothérapeutiques.

## **Total synthesis of the marine alkaloid: Wakayin and study of analogues with potential immunotherapeutic activity**

The marine alkaloids Wakayin and Tsitsikammamine belong to the 1,3,4,5-tetrahydropyrrolo [4,3,2-*de*] quinoline family. Recently, some analogues of these molecules have been described as inhibiting indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1), an enzyme involved in the ability of some tumors to suppress most of immune response. Thus, IDO1, along with tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO), a related enzyme catalyzing the same reaction, are potential therapeutic targets in the fight against cancer. The study carried out to develop a total synthesis of wakayin is described. The various strategies considered are based on the construction of a bis-pyrroloquinone unit: the first involves a Michael addition reaction between a 3-ethylamine-indoledione variously protected and a  $\beta$ -hydroxyamine, the second which constitutes an original route to end up with the bispyrroloquinone unit involves an indoledione and methyltryptamine and the third consists of the condensation of an acetal on a 6-benzyl-3-substituted-indoledione. Based on a comprehensive structural study of IDO1 and a docking study, potential inhibitors have been prepared. Their ability to inhibit IDO1 and TDO was evaluated in a cellular test. Certain compounds exhibit interesting activities.

Keywords: marine alkaloids, pyrroloiminoquinones, wakayin, tsitsikammamine, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1), tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO), immunotherapeutic agents