

N° d'ordre : 1017

50376  
1982  
195

50376  
1982  
195

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

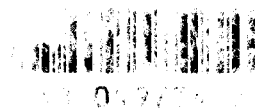
pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE**

par

Jacques FAHY

**INTERCALATION DE LA PROFLAVINE DANS L' ADN :  
SYNTHESE DE MODELES ET LEUR  
ETUDE SPECTROSCOPIQUE**



Soutenue le 17 décembre 1982 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :	MM.	J.E.	ANDERSON	Président
		J.	LHOMME	Rapporteur
		A.	LABLACHE-COMBIER	Examineur
		J.	NICOLE	Examineur
		M.	OLOMUCKI	Examineur
		G.	PONSINET	Examineur

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT  
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET  
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel*	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNOT Ernest	Biologie végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FOURET René	Physique du solide
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie physique

.../...

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, électrotechnique, automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre

Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences économiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAHIEU Jean Marie	Physique atomique et moléculaire.
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme NGUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	— Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie animale
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique

M. WATERLOT Michel  
M. WERNER Georges  
M. WOSNIAK Michel  
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale  
Informatique fondamentale appliquée  
Hydrométallurgie  
Algèbre

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Chimie Organique Biologique, sous la direction de Monsieur J. LHOMME, Professeur à l'Université de LILLE I.

Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour les enseignements et les conseils qu'il m'a dispensés, et pour la disponibilité qu'il a su me réserver dans l'évolution de ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur J.E. ANDERSON, Professeur au University College de LONDRES, pour l'aide précieuse et les conseils qu'il m'a apportés dans la réalisation des études par RMN.

Je remercie Monsieur J. NICOLE, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de LILLE, ainsi que M. DELANNOY, de son laboratoire, pour la contribution qu'ils ont apportée dans la précision des mesures effectuées dans ce travail.

J'exprime mes vifs remerciements à Messieurs A. LABLACHE-COMBIER M. OLOMUCKI et G. PONSINET, qui ont bien voulu faire partie de mon jury.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à mes camarades du laboratoire, pour l'amitié qu'ils m'ont toujours témoignée et pour leur aide, ainsi qu'à Madame RICART, qui a assuré avec beaucoup d'efficacité la dactylographie de ce travail.





<u>ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES</u> .....	62
I. INTRODUCTION.....	63
II. ETUDE DU MODELE PF-C <sub>3</sub> -Ade <u>13</u>	
A. SPECTROSCOPIE UV.....	69
B. ETUDE PAR RMN.....	74
III. ETUDE DU MODELE PF-C <sub>3</sub> -Thy <u>15</u>	
A. SPECTROSCOPIE UV.....	78
B. ETUDE PAR RMN.....	81
IV. ETUDE DE LA NATURE DES INTERACTIONS.....	83
V. CONCLUSION.....	90
ETUDE PRELIMINAIRE DES MODELES EN PRESENCE DE BASE COMPLEMENTAIRE.....	93
ETUDE PRELIMINAIRE DU MODELE Ade-C <sub>3</sub> -PF-C <sub>3</sub> -Thy <u>22</u> .....	97
<u>CONCLUSION</u> .....	102
<u>PARTIE EXPERIMENTALE</u> .....	108
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	128

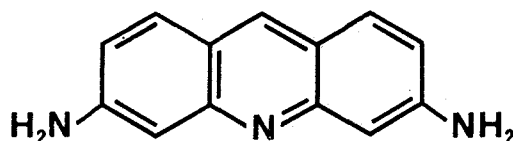
CHAPITRE I

-----

INTRODUCTION

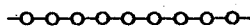
Après l'établissement de la structure en double hélice de l'ADN (Fig. 2) en 1953 par J.D. WATSON et F.H.C. CRICK (1), de nombreux travaux ont été menés afin d'étudier les interactions entre cette macromolécule et certains composés biologiquement actifs.

Parmi ceux-ci, on trouve les amino-acridines, notamment la proflavine (Fig. 1), qui est à l'origine du concept d'intercalation, et vraisemblablement le produit le plus étudié dans ce domaine (2).



*Fig. 1 : Diamino-3,6 acridine ou proflavine*

Dans ce travail, nous présentons une contribution à l'étude de ce phénomène par une approche originale basée sur la modélisation du complexe proflavine-ADN.



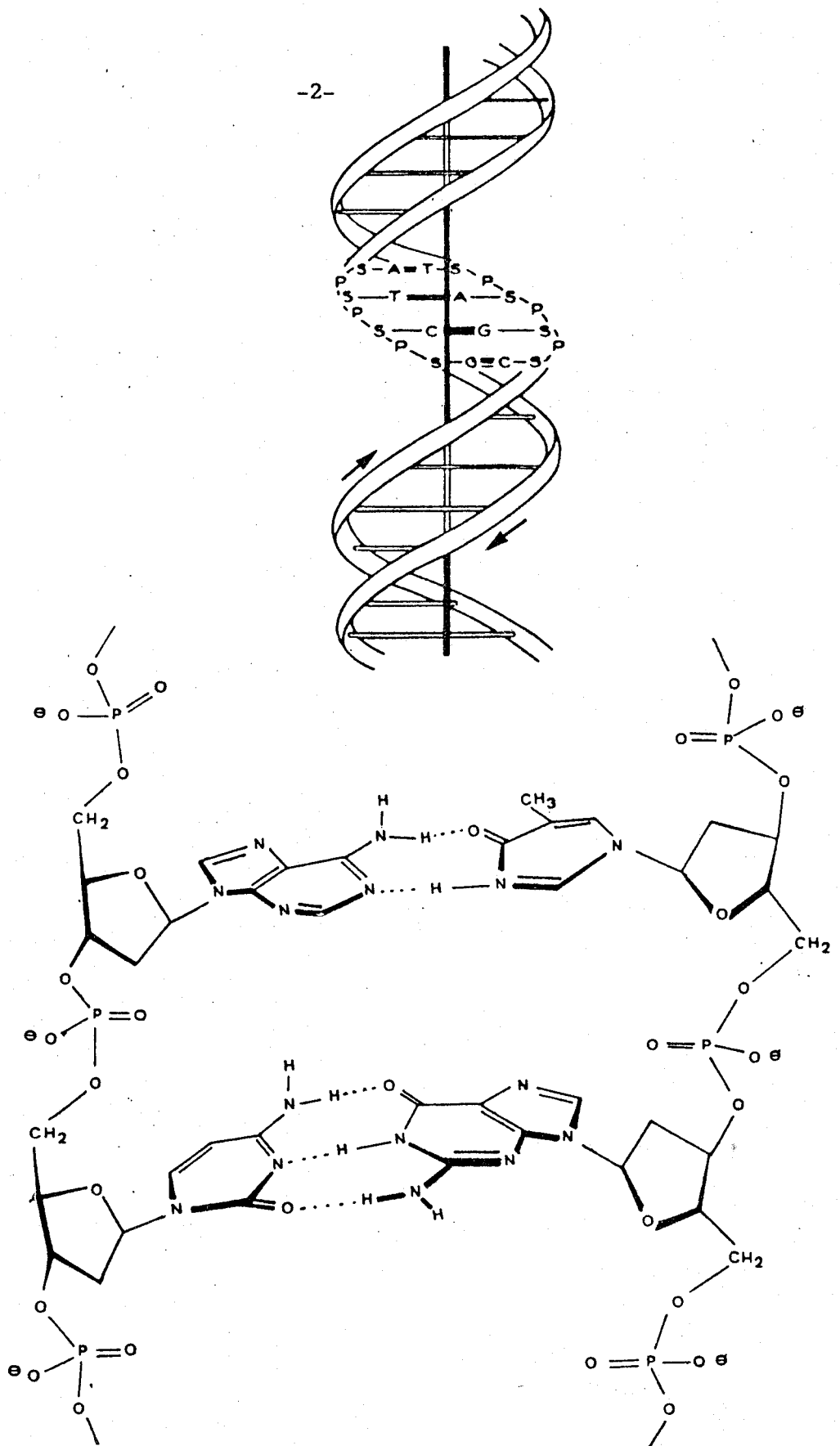


Fig. 2 : Schéma de la double hélice d'ADN  
(d'après J.D. WATSON et F.H.C. CRICK)

L'activité antiseptique de la proflavine est connue depuis le début du siècle (3), et son pouvoir mutagène depuis 1953 (4).

En étudiant son mode d'action, A.R. PEACOCKE et J.N.H. SKERRETT ont observé deux types d'interactions entre la proflavine et l'ADN (5). La plus faible (d'énergie d'activation de 2 kcal. mole<sup>-1</sup>) correspond à une liaison ionique entre le noyau acridine, protoné à pH physiologique, et les résidus phosphates de l'ADN (Fig. 3).

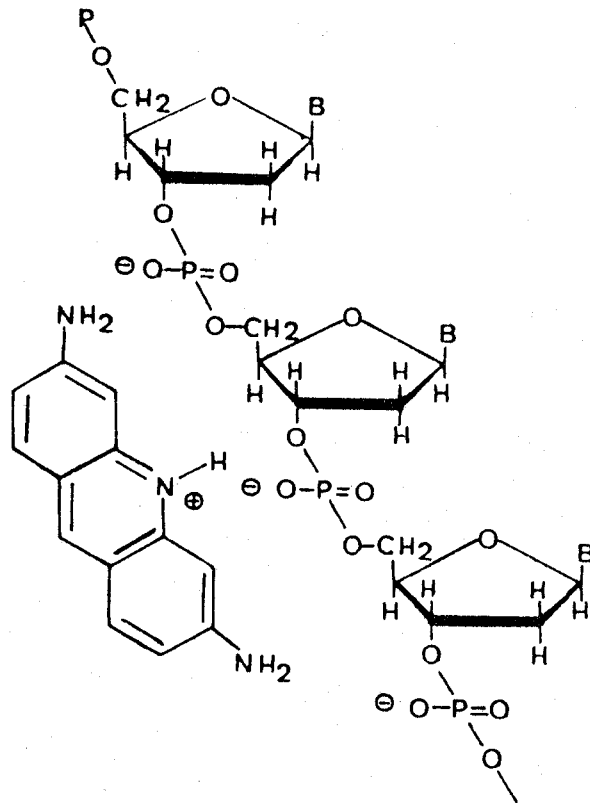
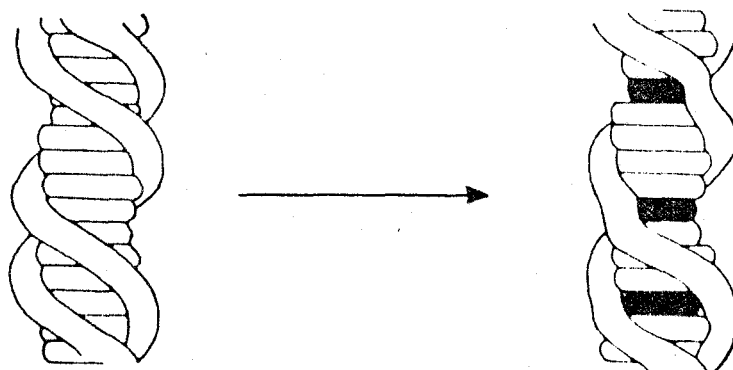


Fig.3 : Mode de liaison externe entre proflavine et ADN

La nature du second type d'interaction a été décrit par L.S. LERMAN en 1961 : il s'agit de l'intercalation de la molécule plane, qui vient s'insérer entre deux plateaux de bases nucléiques (6). Ceux-ci formant des plans parallèles distants de 3,4 Å, ce phénomène nécessite une déformation de l'ADN : l'énergie d'activation mesurée est de l'ordre de 10 kcal. mole<sup>-1</sup>.

Il faut donc que deux paires de bases adjacentes s'écartent l'une de l'autre pour que la proflavine puisse s'intercaler, ce qui revient globalement à un allongement de la macromolécule (Fig. 4), qui est mis en évidence par une diminution des constantes de sédimentation et une augmentation de la viscosité.

En présence d'intercalants, on observe également une augmentation des températures de fusion de l'ADN (7).

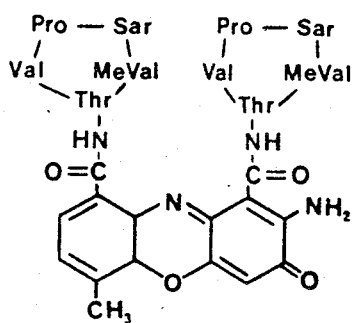


*Fig. 4 : Représentation schématique de l'intercalation avec allongement de l'ADN.*

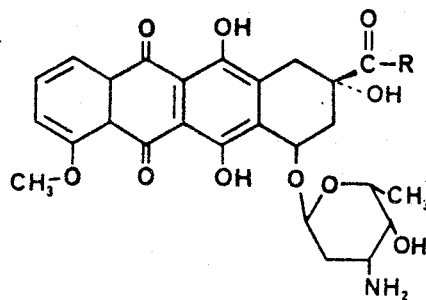
Il faut noter que ce phénomène n'entraîne pas de modifications dans l'appariement des bases par liaison hydrogène (6).

-o-o-o-o-o-o-o-o-

D'un point de vue biologique, les agents intercalants possèdent des propriétés très diverses. Certains appartiennent à la classe des antibiotiques utilisés dans la chimiothérapie du cancer, comme l'actinomycine, l'adriamycine et la daunorubicine (8). Des dérivés photosensibles comme les psoralènes ont une activité importante dans le traitement de maladies de la peau (psoriasis) (9). D'autres sont antimalariques, les plus connus étant la chloroquine et quinacrine (Fig. 5) (10).

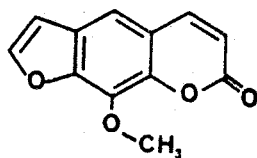


Actinomycine D

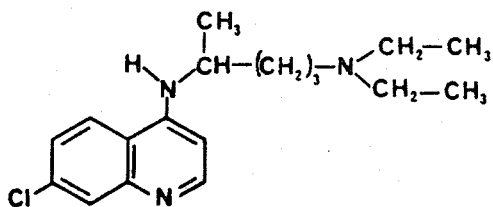


R = CH<sub>2</sub>OH : Daunomycine

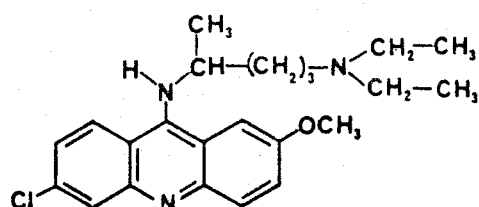
R = CH<sub>3</sub> : Adriamycine



Méthoxy-8 psoralène



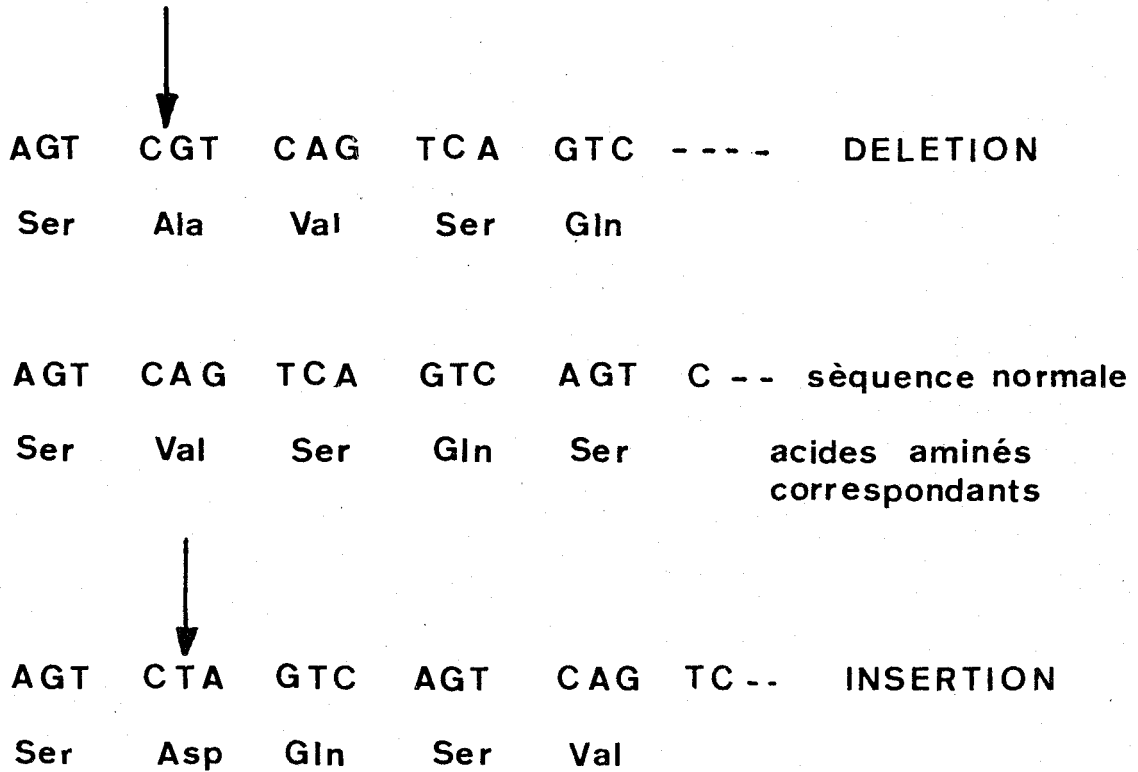
Chloroquine



Quinacrine

Fig. 5 : Structure de quelques agents intercalants

En général, les amino-acridines possèdent des propriétés mutagènes vis-à-vis des bactéries (12). Les mutations induites sont du type "frameshift", c'est à dire qu'il y a délétion ou insertion d'une ou plusieurs bases dans l'ADN, ce qui provoque un décalage dans l'enchaînement des nucléotides.



*Fig. 6 : Schématisation d'une mutation de type "Frameshift", avec insertion ou délétion d'une seule base.*

*(AGT représente la séquence de nucléotides comprenant les bases Adénine, Guanine, Thymine).*

Comme le montre la figure 6, le code génétique est décodé par triplets de nucléotides, correspondant, après transcription, à un acide aminé. L'insertion ou la délétion d'une base nucléique fait alors apparaître de nouveaux triplets, conduisant à un nouvel enchaînement d'acides aminés, donc à des protéines "mutantes".



La plupart de ces transformations sont soit létales, soit reconverties par le système de réparation enzymatique de l'ADN. A partir de souches de bactéries sélectionnées, B.N. AMES a mis au point une série de tests fiables et reproductibles, permettant de mettre en évidence le pouvoir mutagène d'un produit (11).

A partir de ces tests, une étude récente de relation structure|activité en série acridine a montré qu'un substituant amino en position 9 confère un caractère mutagène plus important par rapport aux autres amino-acridines. En ce qui concerne la proflavine, il semble que seule l'intercalation ne soit pas suffisante, et qu'une activation métabolique préalable (par voie enzymatique) soit nécessaire pour que les tests soient positifs (12).

Les travaux réalisés jusqu'à ce jour ne permettent pas encore de définir un schéma général de la mutation de type "frameshift" : les tests de AMES sont spécifiques de souches bactériennes bien déterminées, possédant chacune un métabolisme particulier, et des produits mutagènes pour une souche ne le sont pas obligatoirement pour une autre.

-0-0-0-0-0-0-0-0-

L'action de la lumière et la présence d'oxygène ont un rôle déterminant dans l'altération des bases nucléiques. Les propriétés photodynamiques de la proflavine sont connues depuis longtemps, et plusieurs produits d'oxydation ont été isolés après photosensibilisation par ce composé (13, 14).

Plusieurs auteurs ont remarqué une photodégradation de la guanine après irradiation dans le visible (400 à 500 nm) d'une solution d'ADN contenant de la proflavine (4, 15). Par contre, J.E. ROBERTS, travaillant sur des cellules en culture et opérant dans des conditions semblables, met en évidence une photo-oxydation de la cytosine et de la thymine, alors que la guanine ne semble pas affectée (16). Dans ces deux derniers cas, la structure des produits de dégradation n'a pas pu être déterminée.

Les résultats de ces études peuvent sembler contradictoires, mais les uns travaillent sur l'ADN isolé, alors que les autres

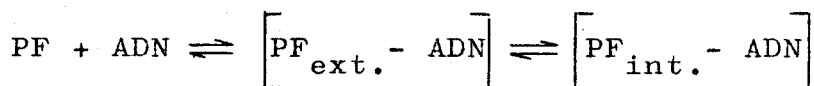
utilisent des cellules entières. Là encore, l'intervention d'une éventuelle métabolisation ne peut être négligée.

..o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

Quoiqu'il en soit, les mécanismes moléculaires de ces mutations ou dégradations locales de l'ADN ne sont pas encore élucidés (2,12).

Dans un premier temps, de nombreux travaux, essentiellement spectroscopiques, ont été réalisés afin de connaître la géométrie du complexe intercalant-ADN, et d'expliquer pourquoi de telles molécules ont une affinité particulière pour l'ADN.

Une étude cinétique de l'intercalation de la proflavine a permis de proposer le mécanisme suivant :



où la proflavine se trouve d'abord complexée, par liaisons de type ionique, à l'extérieur de la double hélice :  $PF_{ext.}$  (voir Fig. 3 p. 1), puis s'intercale entre deux plateaux de bases :  $PF_{int.}$ . Le passage entre la forme  $PF_{ext.}$  et  $PF_{int.}$  se fait sous l'effet simultané d'une torsion du squelette de l'ADN (Fig. 7).

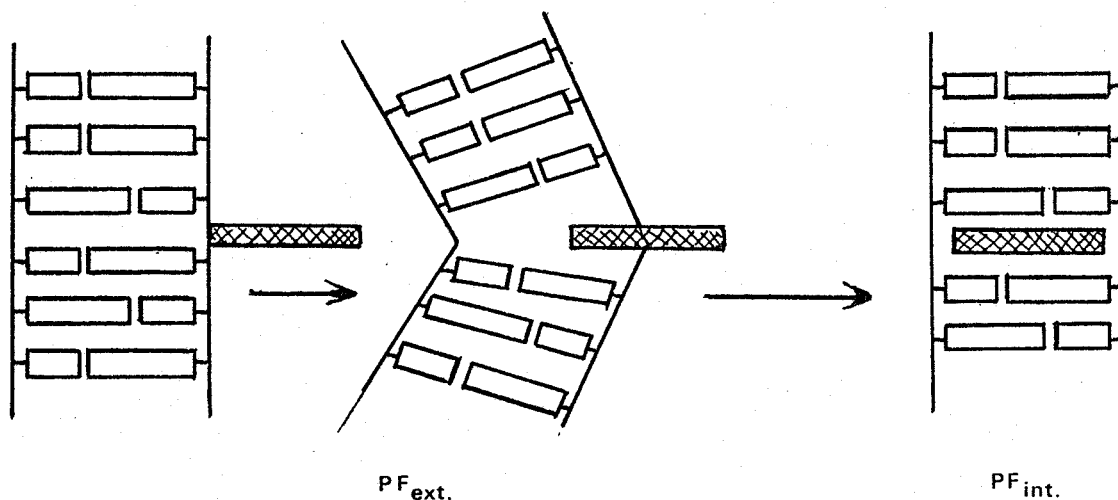


Fig. 7 : Schématisation du mécanisme d'intercalation

L'effet le plus caractéristique observé pour une molécule intercalée réside dans la perturbation de son spectre d'absorption (Fig. 8) :

- Effet hypochrome : diminution du coefficient d'extinction molaire du maximum d'absorption.
- Effet bathochrome : déplacement du maximum d'absorption vers les grandes longueurs d'onde (18).

Ces effets sont étudiés plus en détail dans le chapitre " Etude physico-chimique ".

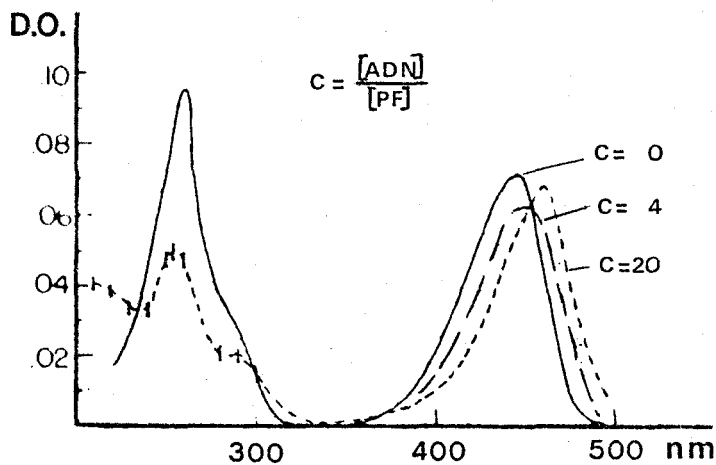


Fig. 8 : Variation du spectre U.V. de la proflavine en présence de concentration croissante d'ADN (d'après G. WEJLL et M. CALVIN)

Lorsque les acridines sont ainsi complexées, elles acquièrent une activité optique, par effet COTTON induit, ce qui rend possible leur étude par dichroïsme circulaire. Cette dernière constatation montre bien que l'intercalation est asymétrique, l'intercalant adoptant une certaine orientation vis-à-vis des bases nucléiques (19).

Les études de fluorescence apportent également des renseignements précieux pour l'étude des interactions spécifiques intercalants-bases nucléiques. On observe une diminution de l'intensité de fluorescence de la proflavine lorsqu'elle est intercalée (18, 20), et il y a une relation linéaire entre cette décroissance et le pourcen-

tage de paire de bases guanine-cytosine (21).

Cette différence spectroscopique de l'intercalant en fonction de la composition en bases nucléiques montre qu'il existe une hétérogénéité dans les sites d'intercalation (2).

0-0-0-0-0-0-0 -

L'interprétation de ces différents types de mesures a amené les conclusions suivantes sur le mécanisme et la géométrie de l'intercalation des acridines (19, 22) :

- L'énergie de liaison est d'environ  $10 \text{ kcal. mole}^{-1}$ .
- La longueur de l'ADN augmente avec le nombre de molécules intercalées.
- Les trois noyaux aromatiques des acridines ont une surface de  $38 \text{ \AA}^2$ , correspondant à peu près à la surface de deux bases complémentaires appariées ( $\approx 50 \text{ \AA}^2$ )  
Par exemple les quinoléines, composés bicycliques, présentent des interactions moins fortes avec les bases nucléiques (23).
- En plus des interactions de type Van Der Waals entre les noyaux aromatiques empilés, une force électrostatique semble intervenir : la protonation sur l'azote hétérocyclique des acridines stabilise l'intercalation.
- L'intercalant se trouve dans un plan parallèle à celui des bases nucléiques, et l'appariement de celles-ci par liaisons hydrogène n'est pas modifié.
- Dans le cas de la proflavine, des liaisons de type ionique entre les fonctions amines primaires et les groupements phosphates favorisent la formation du complexe (Fig. 9).

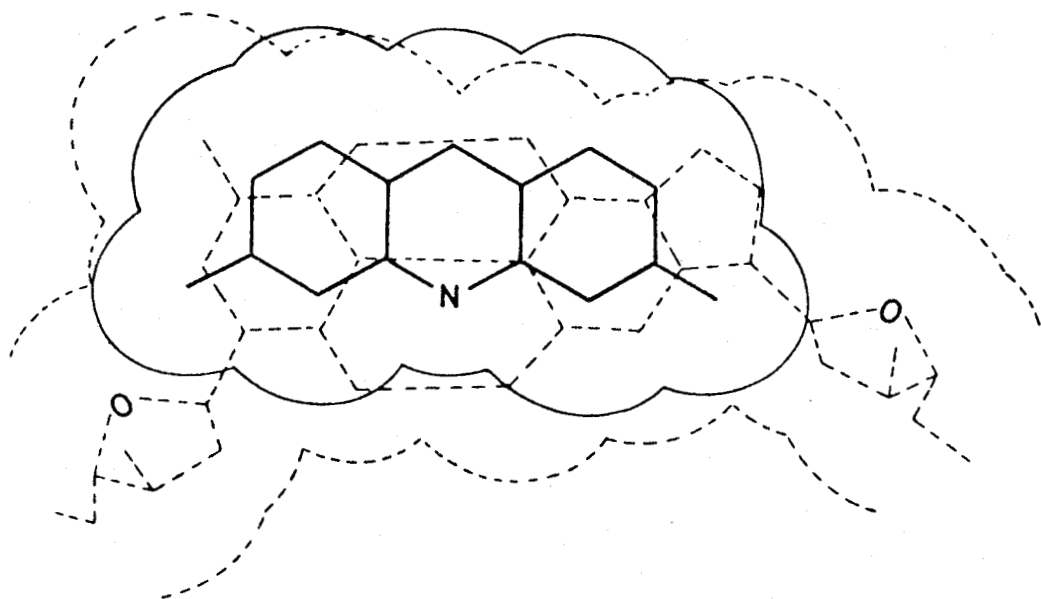
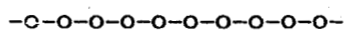


Fig. 9 : Géométrie postulée du complexe d'intercalation  
proflavine-ADN



D'autre part, plusieurs paramètres peuvent rendre difficile l'interprétation des mesures d'intercalation dans la macromolécule d'ADN :

- La structure de l'ADN est très sensible aux variations de pH et de force ionique, qui influencent beaucoup l'aptitude à l'intercalation. Ce phénomène ne peut donc pas être étudié dans des solvants organiques, ni à des pH variables.
- Les acridines ont tendance à s'auto-associer en milieu aqueux pour former des agrégats : il est donc nécessaire d'opérer à faible concentration (inférieure à  $5 \cdot 10^{-5}$  moles.  $l^{-1}$ ) pour s'affranchir des perturbations spectrales dues à ces empilements.

Le mode de liaison ionique des intercalants favorise, à concentration élevée en proflavine, le recouvrement des molécules à l'extérieur de l'ADN, ce qui conduit à des effets comparables à ceux de l'intercalation. Cela a pu être montré par spectroscopie dans l'UV en augmentant le rapport acide polyphosphorique|proflavine (18) (Fig. 10).

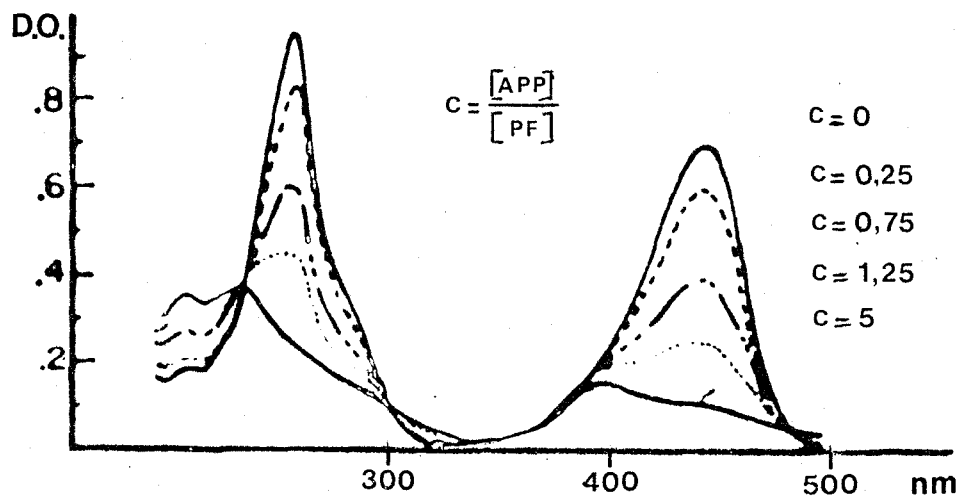


Fig. 10 : Effet de concentration croissante d'acide polyphosphorique sur l'absorption de la proflavine

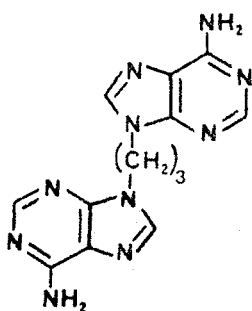
Enfin, une formulation quantitative et qualitative plus complète du phénomène sera possible si l'on connaît la nature exacte des interactions spécifiques entre les bases et intercalants : " a more quantitative formulation must await further information on the exact nature of the attractive forces involved and on the chemical structure of the drug-DNA complex " ; telle est la conclusion de S. GEORGHIOU dans un article-revue paru récemment dans "Photochemistry and Photobiology " (2).

-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

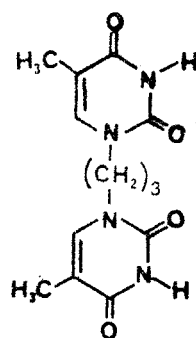
Afin d'éviter les problèmes inhérents à la complexité de structure de l'ADN et de mieux comprendre ces phénomènes, d'autres

voies d'accès à l'étude de l'intercalation ont été développées.

L'équipe de N.J. LEONARD a préparé des modèles synthétiques (Fig. 11) dans le but de mettre en évidence les interactions entre deux bases nucléiques, en absence des complications amenées par la structure propre de l'ADN.



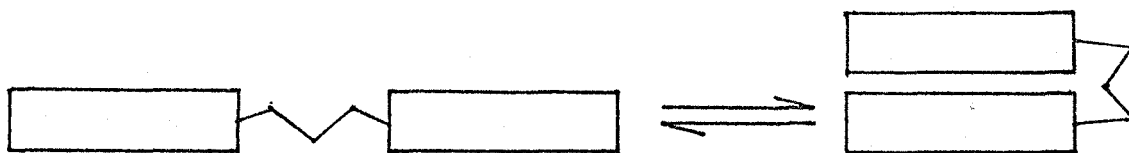
Ade-C<sub>3</sub>-Ade



Thy-C<sub>3</sub>-Thy

Fig. 11 : Modèles étudiés par N.J. LEONARD et ses collaborateurs

Les mesures spectroscopiques effectuées sur ces modèles ont montré l'existence d'un équilibre "forme ouverte  $\rightleftharpoons$  forme repliée" :



A des concentrations suffisamment faibles dans l'eau pour exclure la présence d'aggrégats, les auteurs ont décelé un effet hypochrome de la forme repliée par rapport aux produits de référence

Base - CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> .

Ces travaux ont montré que les propriétés de ces modèles reflètent bien celles de dinucléosides, qui sont considérés comme "miniaturisations" de l'ADN. Sur la base des résultats obtenus en spectroscopie d'absorption, un classement des forces d'interaction entre les bases a pu être établi : purine-purine > purine-pyrimidine >> pyrimidine-pyrimidine (24-26).

Dans le but d'étudier le mode d'action de plusieurs médicaments, dont les aptitudes à l'intercalation sont bien connues, une démarche analogue a été suivie : les produits représentés à la figure 12 ont été synthétisés, et leurs propriétés dynamiques et géométriques ont été mesurées (23, 27-33).

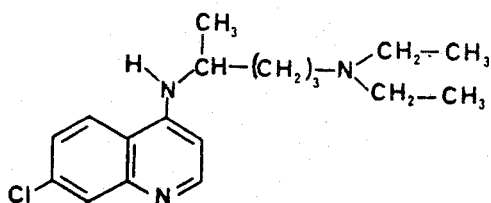
Les résultats obtenus par spectroscopie (d'absorption en UV et de RMN essentiellement) montrent que ces modèles reproduisent bien le phénomène d'intercalation, par comparaison avec ce qui a été observé dans l'ADN.

---

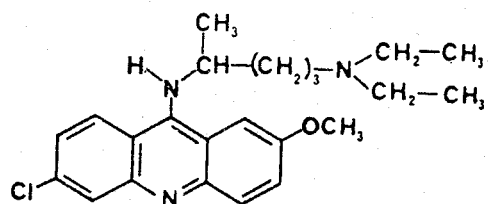
NOTE : Nous utiliserons les abréviations suivantes :

Ade	: Adénine	Thy	: Thymine
Cyt	: Cytosine	Gua	: Guanine
PF	: Proflavine	Acr	: Amino-9 chloro-7 méthoxy-2 acridine
C <sub>3</sub>	: -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>		

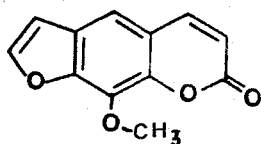




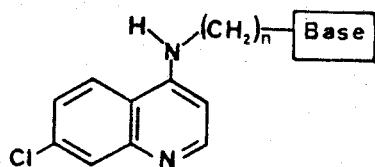
Chloroquine  
(antimalarique)



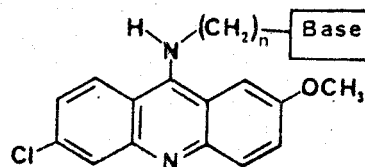
Quinacrine  
(antimalarique)



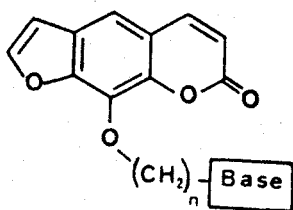
Méthoxy-8 psoralène  
(anti-psoriasis)



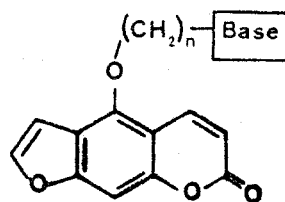
Q-C<sub>n</sub>-Base



Acr-C<sub>n</sub>-Base



(8)Pso-C<sub>n</sub>-Base



(5)Pso-C<sub>n</sub>-Base

Base = Ade, Thy, Gua

Fig. 12 : Médicaments intercalants et leurs modèles d'intercalation

Simultanément, une série de résultats ont confirmé la géométrie proposée par L.S. LERMAN (6) pour l'intercalation de la proflavine dans l'ADN.

D'une part, plusieurs cristaux de complexe proflavine-dinucléotides ont pu être analysés par diffraction de rayons X (37), et en particulier un complexe proflavine : CpG (3 : 2) (Fig. 13).

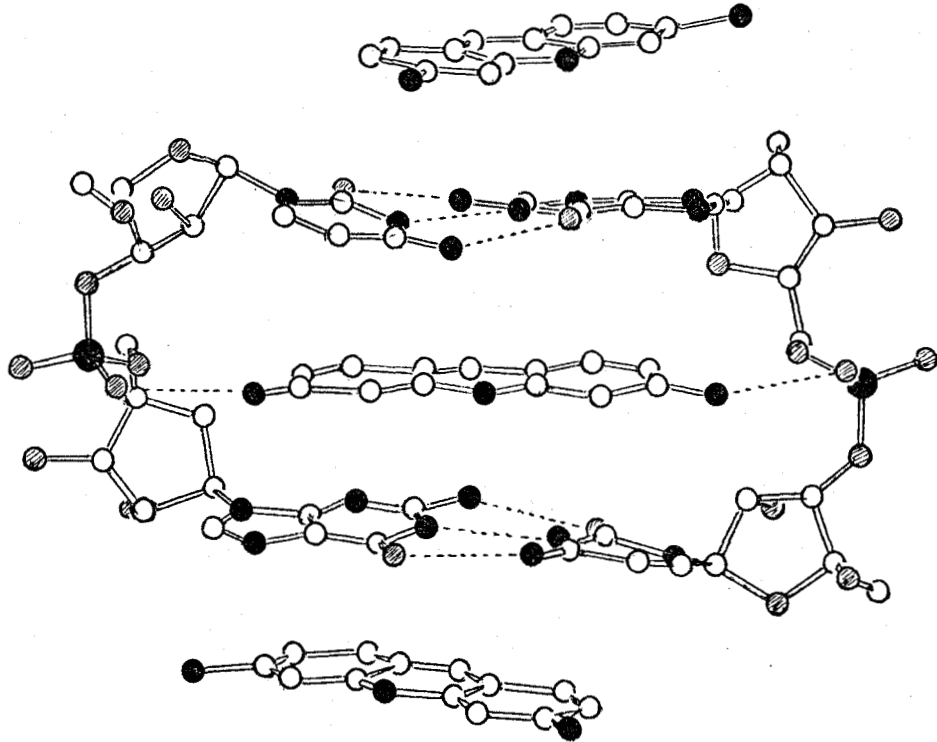
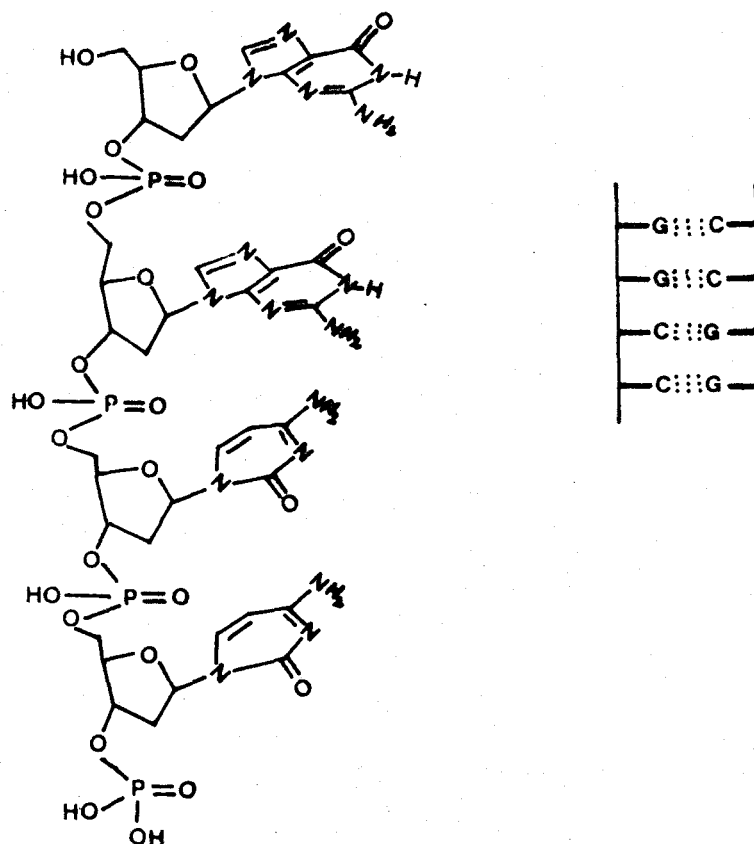


Fig. 13 : Structure du complexe proflavine : CpG

Dans cette structure, les bases (guanine et cytosine) sont appariées par 3 liaisons hydrogène, et possèdent un certain caractère d'hélicité. La molécule de proflavine intercalée se dispose de façon symétrique dans la cavité créée par les dinucléosides : l'atome d'azote hétérocyclique se trouve au centre de la paire de bases, et les fonctions amines primaires forment des liaisons hydrogène avec les groupes phosphates.

D'autre part, D.J. PATEL et L.L. CANUEL ont étudié par RMN l'intercalation de la proflavine dans deux dimères de tétranucléotides, dCdCdGdG et dGdGdCdC (35) (Fig. 14).



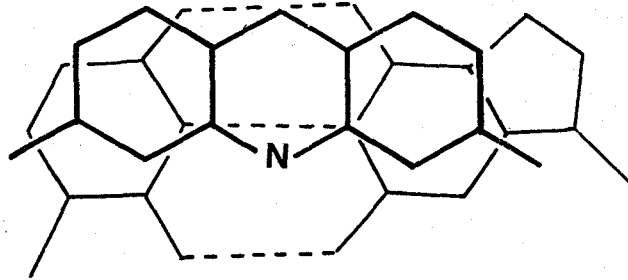
*Fig. 14 : Structure et auto-complémentarité du tétranucléotide dGdGdCdC*

Ces deux tétranucléotides sont autocomplémentaires, et s'associent en solution pour former une séquence miniature de l'ADN (36).

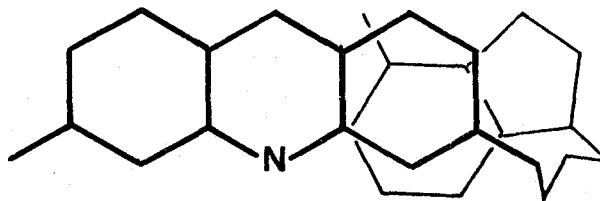
Les protons de la proflavine intercalée montrent des déplacements chimiques vers les hauts champs compris entre 0,5 et 0,85ppm. Cet effet est dû aux effets de courants de cycles, créant une anisotropie diamagnétique, lorsque deux noyaux aromatiques sont empilés (voir page 68, chapitre "Etudes physico-chimiques").

D'après ces valeurs, la géométrie du complexe a pu être déterminée : elle correspond au schéma précédent.

L'ensemble de tous ces résultats, obtenus par différentes méthodes spectroscopiques (absorption UV, dichroïsme circulaire, fluorescence, rayons X et RMN), concordent pour proposer le schéma suivant (Fig. 15a) :



*a : Géométrie de la proflavine intercalée dans l'ADN*



*b : Modèles synthétisés dans leur géométrie supposée*

*Fig. 15 : Essai de modélisation de l'intercalation de la proflavine*

-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

Dans ce travail, notre but est d'étudier spécifiquement les interactions d'empilement ("stacking") mises en jeu entre une base (ou un couple de bases) et un intercalant, en éliminant tous les autres types d'interaction qui interviennent également dans le processus d'intercalation (liaisons hydrogène, liaisons ioniques au niveau des phosphates,...).

En effet, toutes les approches précédemment décrites apportent des conclusions globales sur l'ensemble des interactions mises en jeu, et permettent difficilement d'accéder à la connaissance du phénomène d'empilement lui-même :

- Facteurs responsables de l'interaction.
- Nature des forces.
- Influence des substituants portés par la molécule intercalante.
- Sélectivité éventuelle pour une base ou un couple de bases.

Ce travail s'inscrit dans un objectif à long terme de recherche rationnelle de nouvelles molécules actives.

Connaissant avec exactitude les paramètres géométriques du complexe, nous avons préparé les modèles synthétiques PF-C<sub>3</sub>-Ade et PF-C<sub>3</sub>-Thy (Fig. 15b et 16), en reliant la proflavine par une de ses fonctions amines à une base nucléique, par l'intermédiaire d'une chaîne triméthylénique, dans l'espoir de mimer le plus fidèlement possible la structure reproduit fig. 15 a.

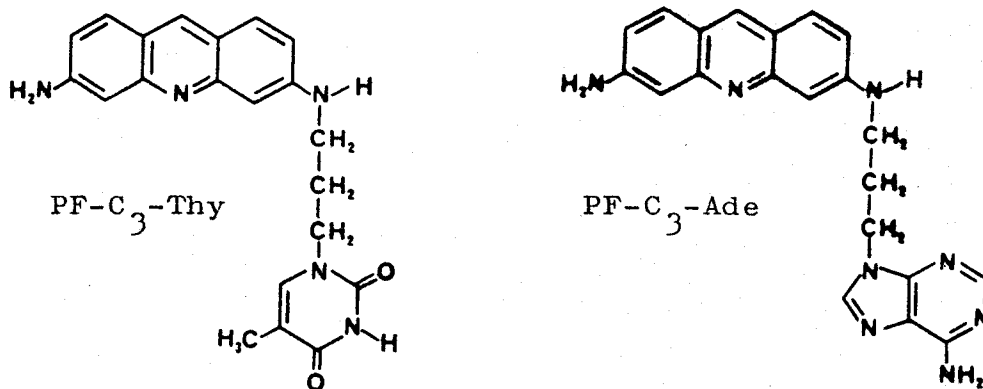


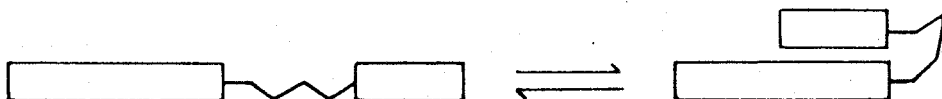
Fig. 16 : Modèles synthétisés pour l'étude de l'intercalation

L'introduction d'un chaînon de trois atomes de carbone entre deux groupements s'est révélée efficace pour favoriser leur rapprochement dans deux plans parallèles et en étudier les interactions possibles dans cette conformation (37).

-O-O-O-O-O-O-O-O-

La première phase de notre travail consistera à mesurer les paramètres spectroscopiques de ces produits par les techniques utilisées dans les études réalisées sur l'ADN. La comparaison des résultats nous permettra de conclure sur la validité de cette modélisation de l'intercalation.

- Par spectroscopie d'absorption, nous déterminerons l'aspect dynamique des modèles en étudiant l'équilibre conformationnel "forme ouverte  $\rightleftharpoons$  forme repliée"

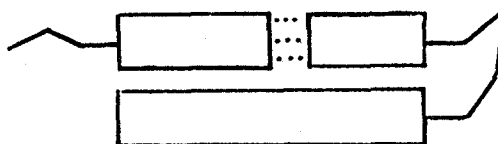


de façon à mesurer les forces d'interaction spécifiques à chaque base.

- Par RMN, nous confirmerons ces premières mesures, et nous aurons accès à la géométrie de ce complexe intramoléculaire.

Si l'interprétation de ces deux séries de mesures montre qu'il existe une bonne similitude entre les modèles et la proflavine intercalée dans l'ADN, nous pourrions envisager les expériences suivantes :

- En rajoutant au milieu la base complémentaire, nous pouvons espérer observer l'appariement du couple de bases, sous l'influence conjointe des forces d'empilement et des liaisons hydrogène :



Cette observation est probable dans la mesure où le produit Acr-C<sub>3</sub>-Ade (Fig. 12 p. 15) est à 100 % sous forme repliée dans l'eau jusqu'à 80°C.

- Inversement, le système nous permettrait d'étudier les liaisons hydrogène ce qui n'a jamais pu être observé dans l'eau.
- A l'aide de ce schéma, il nous serait possible de préciser la nature des réactions de photo-oxydation des bases catalysées par la proflavine, qui pourrait être une des causes de son pouvoir mutagène (Fig. 17 p. 22).

Un modèle du type PF-C<sub>3</sub>-Cyt serait susceptible de fixer sélectivement la guanine, et après irradiation, nous pourrions déterminer la structure des produits de dégradation.

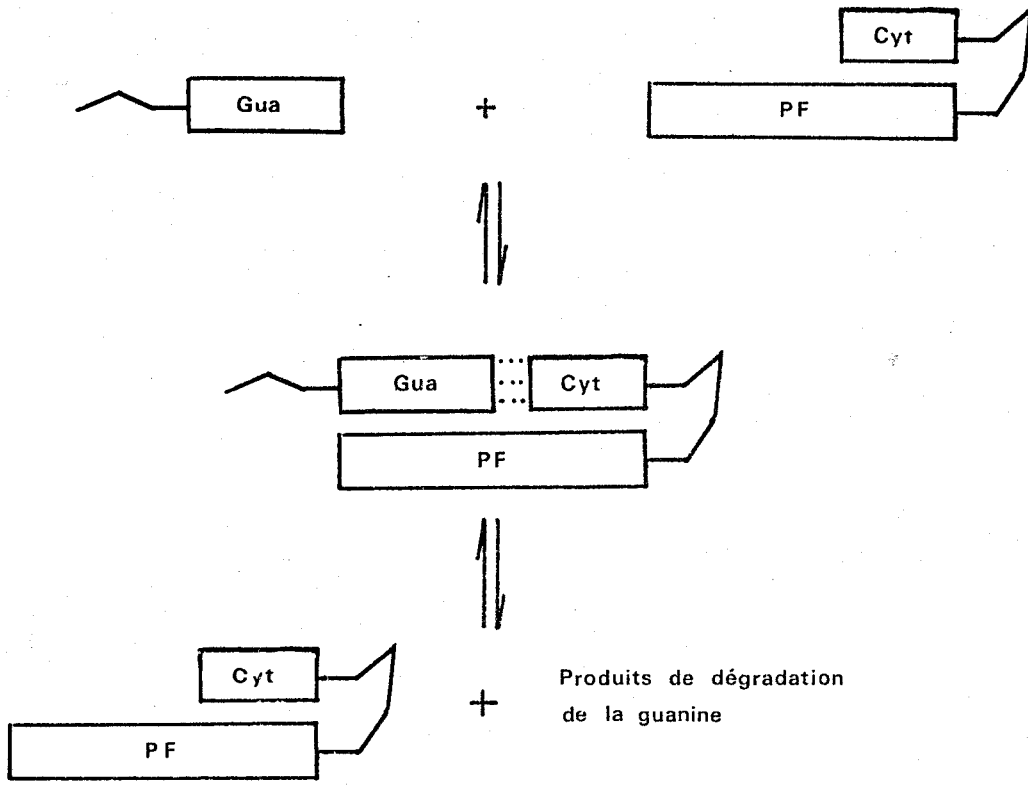
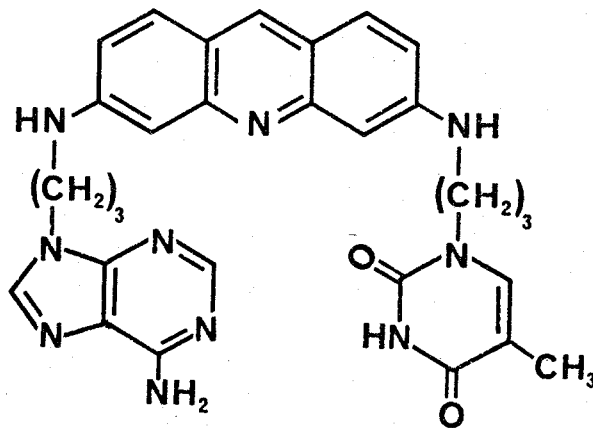


Fig. 17 : Hypothèse de photodégradation de la guanine catalysée par la proflavine

-0-0-0-0-0-0-0-0-

Une autre approche de l'étude des interactions entre proflavine et couple de bases consiste à préparer un modèle bifonctionnalisé, où les deux bases complémentaires sont fixées sur une même molécule de proflavine :

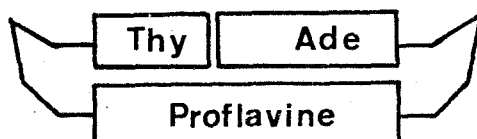


Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy





D'après l'examen des modèles moléculaires, ce produit est susceptible d'adopter la conformation suivante :



où la thymine et l'adénine sont appariées par deux liaisons hydrogène.

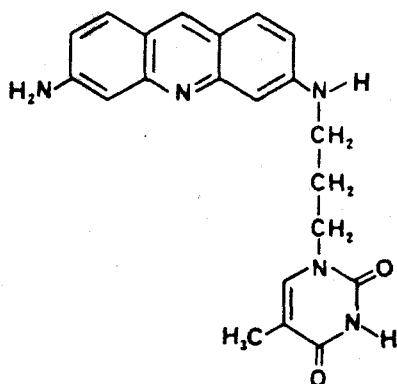
Si cette conformation est observée, ce modèle double sera d'un grand intérêt pour l'étude des effets de l'intercalant sur le couple de bases. En plus de la nature propre de l'appariement, nous pourrons, par exemple, apprécier l'influence de la charge positive de la proflavine sur la structure électronique des bases.

Ce produit constituera également une bonne référence pour analyser les effets observés lors des études des modèles PF-C<sub>3</sub>-Base en présence de leur base complémentaire.

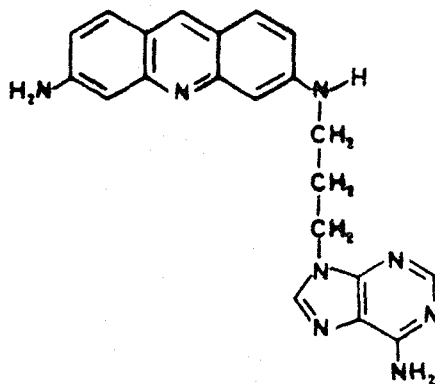
-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

Dans un premier temps, nous avons préparé les produits nécessaires à ces études :

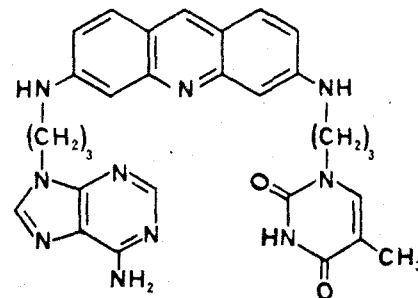
- Les modèles :



PF-C<sub>3</sub>-Thy

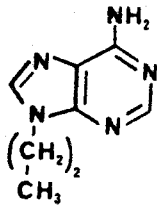


PF-C<sub>3</sub>-Ade

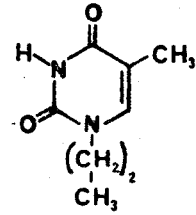


Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy

- Les références correspondantes :

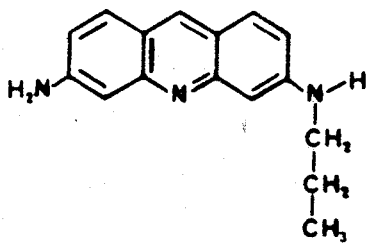


Ade-C<sub>3</sub>

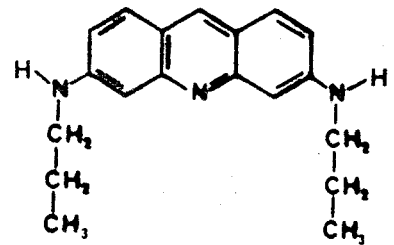


Thy-C<sub>3</sub>

(ces deux produits ont été préparés auparavant)



PF-C<sub>3</sub>



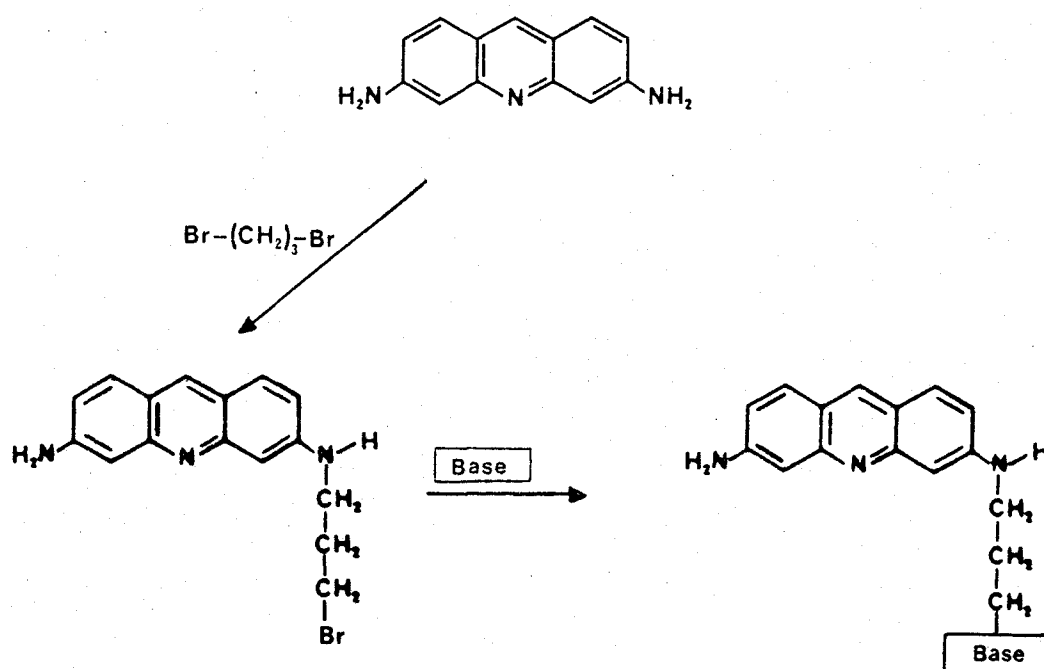
C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>

-----



## I. INTRODUCTION.

La voie de synthèse retenue pour obtenir les modèles PF-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Base est la suivante : la proflavine 1 est alkylée sur un des deux fonctions amines par le dibromo-1,3 propane, conduisant au produit intermédiaire-clef : PF-C<sub>3</sub>-Br (Fig. 1).



*Fig.1: Voie de synthèse retenue pour la préparation des modèles*

A partir de ce produit, nous pouvons aisément substituer le brome par attaque nucléophile par une base nucléique : adénine, thymine ou cytosine. Celles-ci possèdent toutes trois un hydrogène acide au site d'alkylation souhaité (Fig. 2).

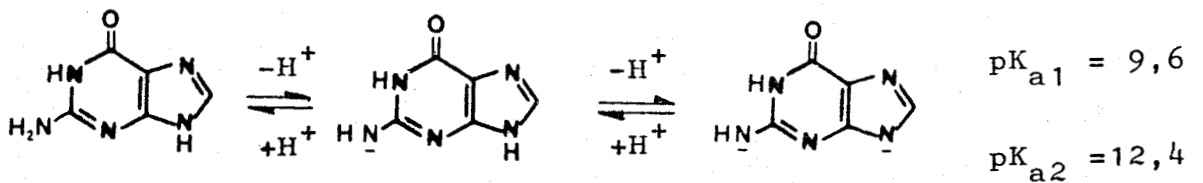
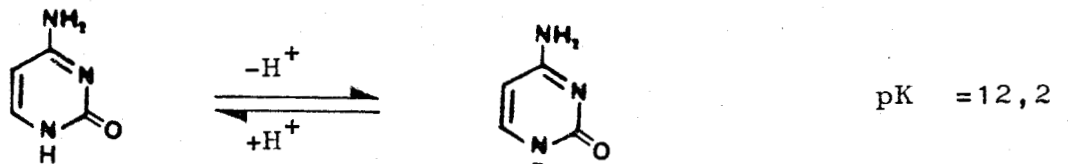
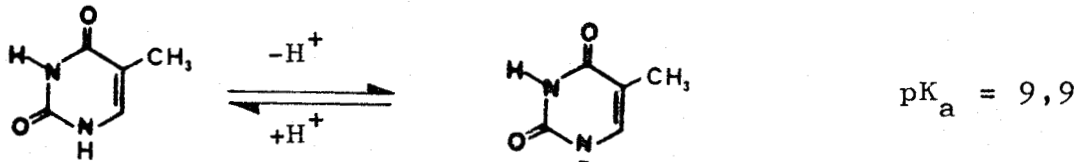
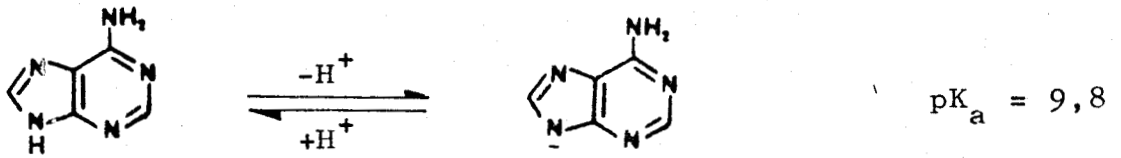
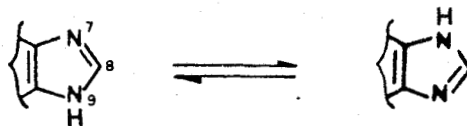


Fig. 2 : Valeurs des pKa des bases nucléiques

La synthèse de modèle comprenant la guanine nécessiterait le passage par une voie différente pour deux raisons :

- Le premier pKa (9,6) correspond à l'arrachement du proton de la fonction amine en 2.
- Le cycle imidazole présente une tautomérie (particulière à la guanine) :



peu favorable à une alkylation sélective en position 9.

Une autre voie de synthèse possible consiste à préparer les différentes bases alkylées  $\text{Base}-(\text{CH}_2)_3-\text{Br}$ , et à les faire réagir avec la proflavine (Fig. 3).

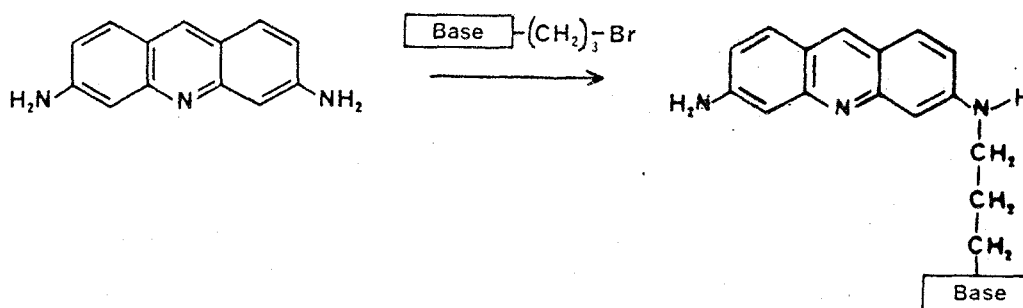


Fig. 3 : Autre voie d'accès aux modèles  $\text{PF}-(\text{CH}_2)_3-\text{Base}$

La synthèse des composés  $\text{Base}-(\text{CH}_2)_3-\text{Br}$  est déjà décrite (25), mais ceux-ci subissent facilement une cyclisation intramoléculaire (Fig. 4), rendant la préparation des modèles désirés difficile dès le départ. Cette approche n'a donc pas été utilisée.

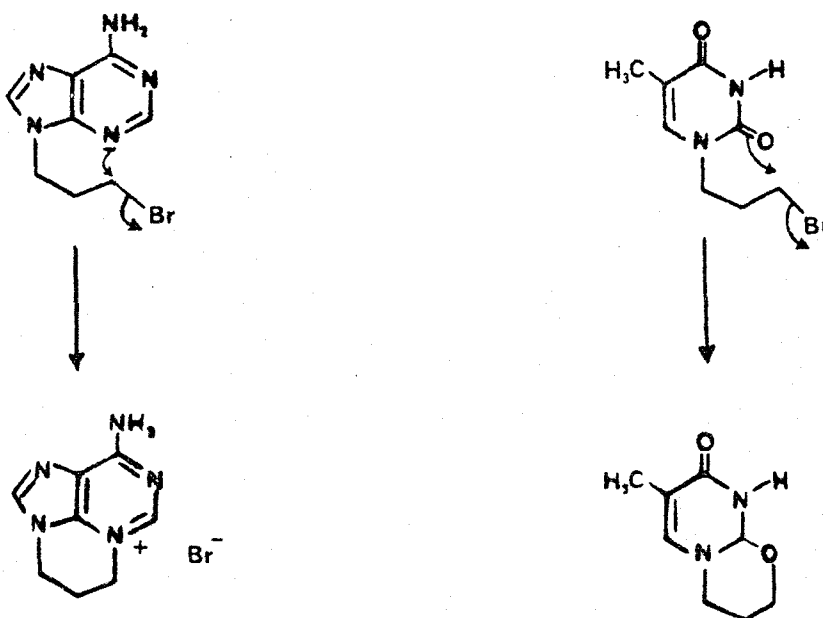


Fig.4 : Substitution intramoléculaire des  $\text{Base}-(\text{CH}_2)_3-\text{Br}$

En suivant la première voie, nous nous sommes tout d'abord attachés à mettre au point de bonnes conditions de préparation de l'intermédiaire-clef PF-C<sub>3</sub>-Br, de façon à ne pas être limités en quantité dès les premières étapes de notre synthèse.

Dans un premier temps, nous nous sommes placés dans le cas le plus simple, en faisant réagir la proflavine 1 avec le bromo-1 propane dans différentes conditions, afin de préparer le produit de référence PF-C<sub>3</sub> 2 (Fig. 1).

## II. PREPARATION DU PRODUIT DE RÉFÉRENCE : PF-C<sub>3</sub> 2.

### A. INTRODUCTION :

Les deux fonctions amines sont équivalentes. Le problème réside dans la recherche d'une méthode permettant la mono-fonctionnalisation la plus sélective possible, étant donnés les objectifs de rendement que nous nous sommes fixés. Pour cela, nous avons utilisé deux méthodes :

- Alkylation directe de la proflavine en présence de bases fortes.
- Introduction, sur une seule fonction amine, d'un groupe protecteur, favorisant l'alkylation, et dont les conditions de déblocage ne dégradent pas le produit.

### B. ALKYLATION DIRECTE :

Ce type de réaction repose sur la formation d'un anion amidure de proflavine, par arrachement d'un proton d'une fonction amine au moyen d'une base forte.

Notre hypothèse sur la sélectivité repose sur le fait que le mono-anion, étant moins acide que la proflavine, réagisse plus rapidement avec les bromoalcane.

De nombreux essais ont été effectués avec l'amidure de sodium dans l'ammoniac liquide. Après dissolution de la proflavine et formation de l'anion, le bromo-1 propane est ajouté au milieu (Fig. 5).

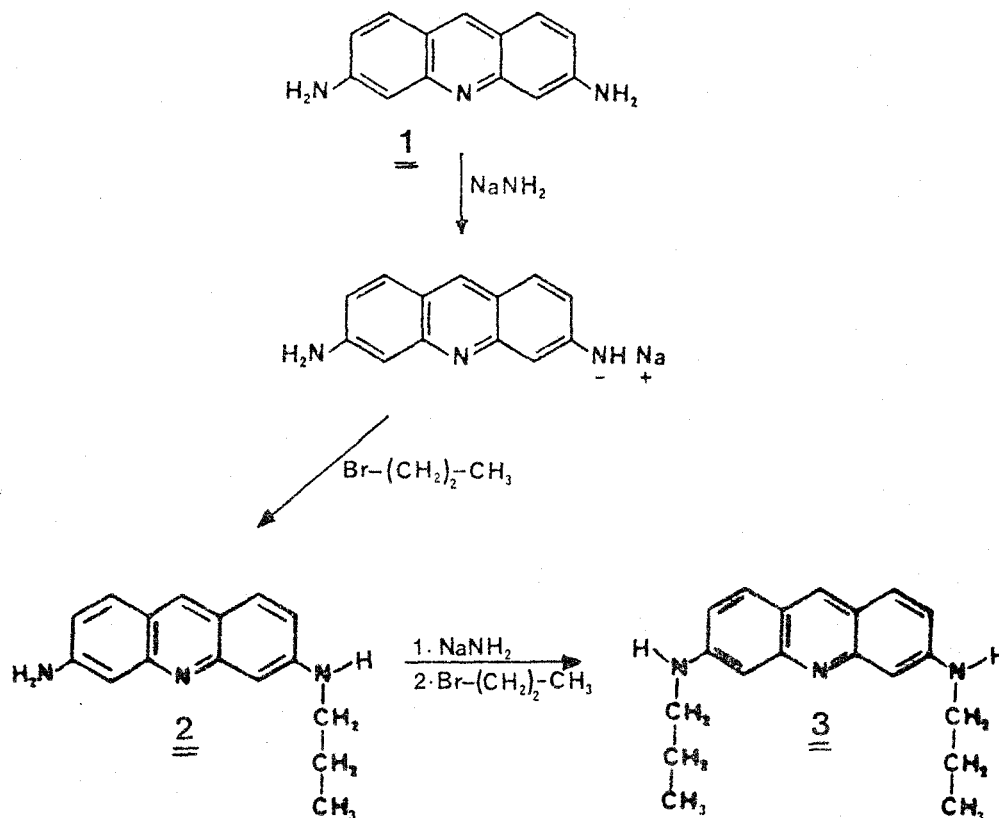


Fig. 5 : Alkylation directe de la proflavine

De cette manière, nous avons pu isoler en faible quantité le produit attendu PF-C<sub>3</sub> 2, mais toujours accompagné du dérivé bis-alkylé C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub> 3 et de la proflavine n'ayant pas réagi.

Nous avons fait varier les différents paramètres régissant la réaction à savoir :

- . La concentration en proflavine
- . La quantité de base utilisée
- . Le temps de formation de l'anion
- . La quantité de bromo-propane

Mais dans aucun cas nous n'avons pu augmenter sensiblement le rendement en PF-C<sub>3</sub> 2.



Nous avons alors recherché d'autres conditions, où l'anion de la proflavine serait ajouté lentement à un excès de bromo-1 propane, en espérant limiter au maximum la double alkylation (Fig. 5).

J. RENAULT et J. BERLOT ont mis au point de bonnes conditions d'alkylation de l'amino-4 quinoléine en utilisant les amidures alcalins dans le HMPT (38).

En nous basant sur ces résultats, nous avons formé l'anion de la proflavine par action de l'amidure de sodium dans le HMPT. Le mélange est ensuite additionné goutte à goutte au bromo-1 propane sous atmosphère inerte. Mais encore une fois, la proportion en produit 2 n'a pas été nettement améliorée par rapport aux essais précédents, quelles que soient les conditions opératoires.

Nous avons suivi l'évolution des réactions par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). La structure des produits formés a été déterminée par RMN et spectrométrie de masse, et confirmée par la suite par comparaison avec les échantillons obtenus par d'autres voies de synthèse.

D'autre part, nous avons été très limités par la faible solubilité et la forte polarité de ces produits, ce qui nous a posé de gros problèmes de purification. Cette méthode aurait pu être éventuellement retenue pour la préparation du produit de référence PF-C<sub>3</sub>2, mais compte-tenu des rendements observés et des difficultés de séparation, il n'était pas raisonnable de l'appliquer à la synthèse des modèles désirés PF-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Base.

En conclusion, cette voie permet bien d'obtenir les produits attendus, mais devant son manque de sélectivité, nous l'avons abandonnée pour nous tourner vers la recherche d'un groupe protecteur d'une seule des deux fonctions amines.

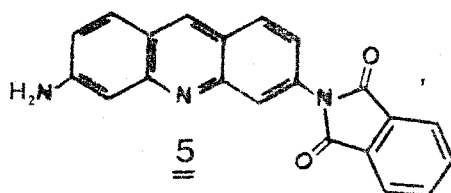
### C. RECHERCHE DE GROUPE PROTECTEUR :

L'hypothèse de travail est d'introduire sur la proflavine un groupe protecteur volumineux, qui change suffisamment les pro-

priétés de solubilité pour favoriser la précipitation du produit au fur et à mesure de sa formation.

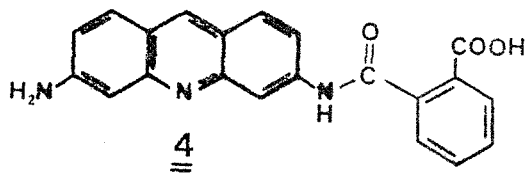
### 1| UTILISATION DE L'ANHYDRIDE PHTALIQUE.

Le but recherché était de préparer le monophthalimide de proflavine 5, et d'alkyler ensuite la fonction amine libre par l'une des méthodes décrites ci-dessus.



En faisant réagir la proflavine avec un léger excès d'anhydride phtalique dans l'acide acétique glacial à température ambiante, nous avons pu obtenir un seul produit. Le rendement est supérieur à 90 %, après purification par précipitation dans la soude et cristallisation dans l'éthanol absolu.

Mais les mesures spectroscopiques (RMN et IR (39)) ne sont pas en accord avec la structure du composé 5, alors que la spectrométrie de masse montre bien un pic à  $m/e = 339$ , ce qui correspond bien à la masse moléculaire attendue pour 5. L'analyse de ces données nous a fait supposer une forme acide amidique 4 pour ce produit :



ce qui explique l'absence de symétrie dans le spectre RMN, en ce qui concerne les protons du cycle phtalate.

De plus, l'hydrazine, qui hydrolyse les phthalimides et non les acides amidiques (40), est sans effet sur ce produit.

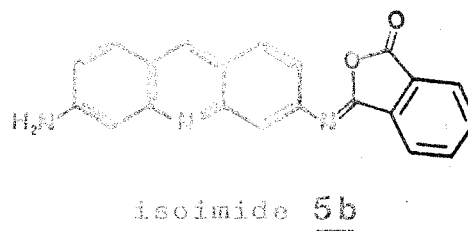
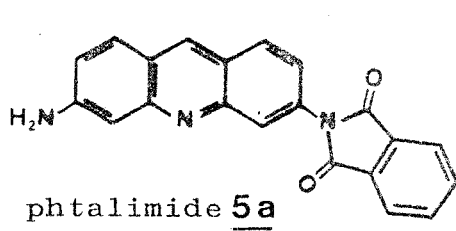
D'après les mesures d'intégration de pics en RMN, il est néanmoins certain qu'un seul groupement phthaloyle a réagi avec la proflavine, ce qui revient à une monofonctionnalisation sélective. Deux voies se présentent alors :

- Soit l'alkylation directe du composé 4, en espérant réaliser une monoalkylation.
- Soit la fermeture du cycle en phthalimide 5, suivie d'une alkylation.

#### A) Alkylation sur la forme ouverte 4

En présence d'amidure de sodium dans le HMPT et de bromo-1 propane dans les conditions décrites précédemment, le dérivé 4 conduit à un mélange réactionnel comprenant de nombreux produits difficilement séparables.

Nous avons alors utilisé l'iodeure de méthyle à la place du bromo-1 propane, dans l'espoir de mieux suivre la réaction, et nous avons obtenu instantanément deux produits, auxquels les structures 5a et 5b ont été attribuées ultérieurement sur la base des résultats complémentaires.



En essayant de les séparer par chromatographie liquide, nous avons remarqué qu'ils étaient en équilibre, et nous n'avons pas réussi à isoler 5b en quantité suffisante pour déterminer sa structure. Toutefois, par analogie avec les travaux réalisés sur le N-phénylphthalimide (41), nous pouvons supposer la forme isoimide pour 5b.

Parallèlement, une autre tentative d'alkylation dans des conditions plus douces a été réalisée dans la DMF en présence de carbonate de potassium et de bromo-1 propane. Nous avons obtenu les mêmes produits 5a et 5b.

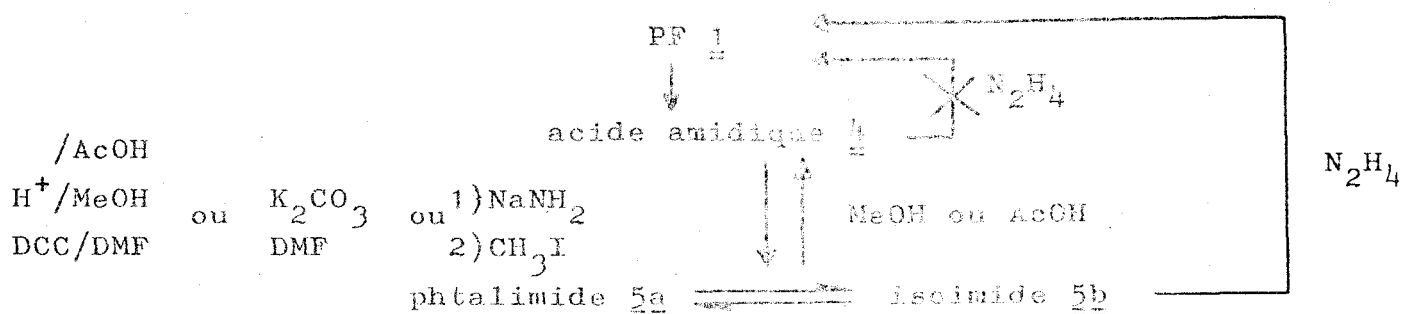
La spectroscopie RMN et IR nous a permis de constater l'absence de protons aliphatiques (donc l'alkylation n'avait pas eu lieu), et d'identifier le produit 5b comme étant le monophtalimide de la proflavine (l'hydrazinolyse de ce composé redonne la proflavine).

### B) Fermeture du cycle

Plusieurs méthodes ont été utilisées (42), aussi bien sur le composé brut 4 que sur son sel de sodium 4' :

- Par chauffage à reflux de l'acide acétique.
  - Par catalyse acide, à reflux du méthanol sec, saturé en acide chlorhydrique gazeux.
  - Par déshydratation avec la dicyclohexylcarbodiimide, dans la DMF à température ambiante,
- mais chacune de ces réactions a toujours donné le mélange des produits 5a et 5b.

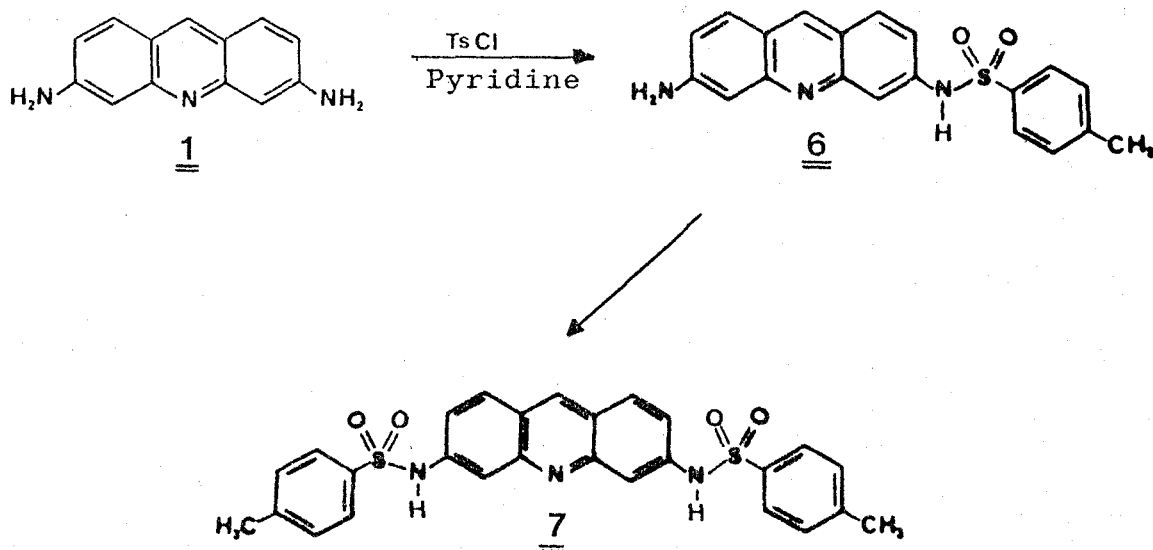
Tous nos résultats sont en accord avec le tableau suivant :



En conclusion, devant le manque de réactivité vis-à-vis de l'alkylation et l'existence de l'équilibre phthalimide  $\rightleftharpoons$  isoimide, nous avons préféré rechercher un autre groupe protecteur, malgré la mono-fonctionnalisation quasi-totale par le groupe phtaloyle.

## 2| UTILISATION DU CHLORURE DE TOSYLE.

Nous avons fait réagir la proflavine 1 avec le chlorure de tosylo dans la pyridine, réaction conduisant aux produits 6 et 7 :



La présence d'un groupement tosylo augmente fortement le caractère acide du proton porté par l'azote 3 (ou 6), et cette méthode a été largement utilisée dans la synthèse d'amines secondaires (43-45).

Nous avons travaillé en solution concentrée de proflavine dans la pyridine, de façon à ce que les produits formés précipitent dans le milieu.

Le meilleur rendement obtenu en dérivé mono-fonctionnalisé a été de 55 %, ce qui est élevé compte-tenu de l'équivalence des deux fonctions amines mises en jeu.

La structure du produit mono-tosylé 6 a été déterminée par RMN : on remarque la présence de deux protons échangeables à 6,46 ppm correspondant au groupement amino libre en position 6, d'un multiplet à 7,70 et d'un singulet à 2,26, attribués respecti-

vement aux quatre protons aromatiques et au groupe méthyle du radical tosylo.

Le spectre IR montre également deux bandes d'absorption caractéristiques des sulfonamides à 1175 et 1135  $\text{cm}^{-1}$ .

Le produit bis-tosylé 7 servira à obtenir les modèles bi-fonctionnalisés de la proflavine ( voir page 48).

#### D. ALKYLATION DE PF-Ts 6 :

En présence de bromo-1 propane et de carbonate de potassium dans la DMF ( 43, 44, 45) à température ambiante, le composé activé PF-Ts 6 donne, avec un rendement de l'ordre de 65 %, le dérivé 8, précurseur du produit de référence PF-C<sub>3</sub> 2 (Fig. 6) :

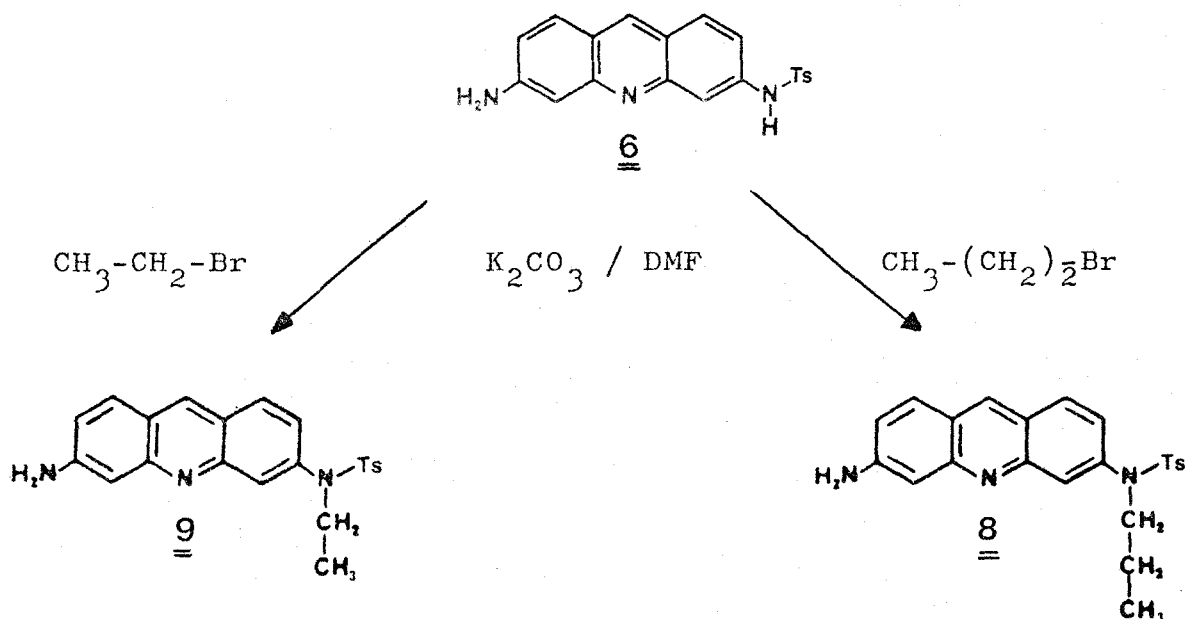


Fig. 6 : Alkylation de PF-Ts 6

L'étape suivante de détosylation conduit au composé désiré PF-C<sub>3</sub> 2, mais celui-ci, peu stable, s'est décomposé lors de toute tentative de purification. Malgré de nombreux essais, nous n'avons pas pu l'isoler de façon satisfaisante.

Devant cet échec, nous avons remplacé le bromo-1 propane

par le bromoéthane dans la réaction décrite ci-dessus (Fig. 6), en vue de préparer non plus une propyl-proflavine mais une éthyl-proflavine PF-C<sub>2</sub> 10 comme produit de référence (nous pouvons en effet penser que les propriétés spectroscopiques de ce dernier seront identiques à celles de PF-C<sub>3</sub> 2, notamment en ce qui concerne son absorption dans l'UV).

Remarquons que la séparation du mélange réactionnel par chromatographie sur colonne demande une grande quantité de silice (200 à 500 fois la masse de produit), et nécessite l'emploi de solvants ternaires chlorure de méthylène : éthanol : triéthylamine. Cette technique est extrapolée des méthodes de séparation des amines en CLHP analytique, où le rôle de la triéthylamine est de neutraliser les fonctions acides de la silice. Il faut noter que l'emploi d'alumine basique n'a pas donné d'aussi bons résultats.

#### E. DETOSYLATION : OBTENTION DE PF-C<sub>2</sub> 10 :

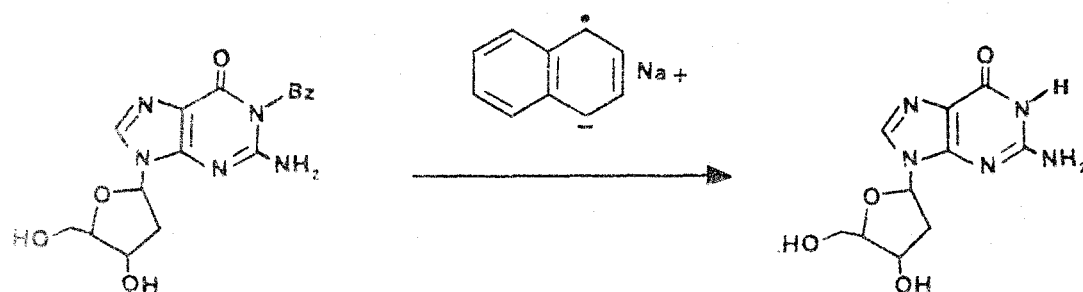
La rupture de la liaison azote-soufre requiert des conditions réactionnelles énergiques.

Deux méthodes sont notamment décrites dans la littérature (46) :

- coupure par intervention d'un radical-anion (sodium-naphtalène).
- hydrolyse acide.

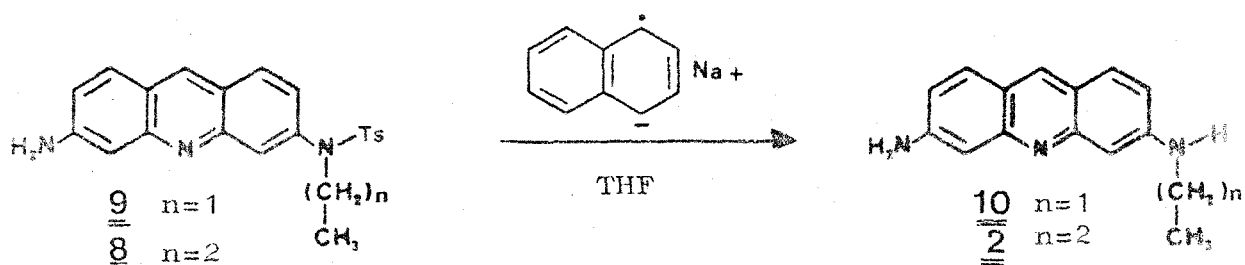
##### 1| UTILISATION DU SODIUM-NAPHTALÈNE.

Ce réactif a été utilisé dans le cas de molécules assez complexes, telles que des peptides protégés (47), ou des nucléosides benzylés (guanosine et uridine) (48) :



La guanine et l'uracile n'étant pas dégradées dans ces conditions, nous avons pensé que, lors de la dernière étape, les modèles PF-C<sub>3</sub>-Base supporteraient bien ce milieu.

Le radical-anion, formé par addition de sodium au naphthalène dans le THF anhydre, est ajouté à une solution de PF-Ts-C<sub>2</sub> 9 ou PF-Ts-C<sub>3</sub> 8. Les composés de référence PF-C<sub>2</sub> 10 et PF-C<sub>3</sub> 2 sont obtenus de façon quasi-quantitative après quelques minutes.



## 2| HYDROLYSE ACIDE.

Simultanément, selon la méthode décrite par P.D. CARPENTER et M. LENNON (49), nous avons hydrolysé ces mêmes produits 8 et 9 par un mélange acide acétique|acide sulfurique (6|4), dont l'entité réactive serait selon ces auteurs l'ion acylium  $\text{CH}_3-\overset{+}{\text{C}}(\text{OH})_2$ , environ 1000 fois plus acide que  $\text{H}_3\text{O}^+$  (50).

Par cette voie, les produits de référence PF-C<sub>2</sub> 10 et PF-C<sub>3</sub> 2 ont été également obtenus avec de bons rendements.

Afin de mieux connaître l'évolution des produits dans ce milieu, nous avons suivi la cinétique de réaction par CLHP, de façon à minimiser les risques de dégradation des modèles PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 et PF-C<sub>3</sub>-Thy 15. En fait, ces derniers ont à peu près le même comportement que les produits de référence : la réaction est terminée après 15 mn à 48°C.



3| CONCLUSION.

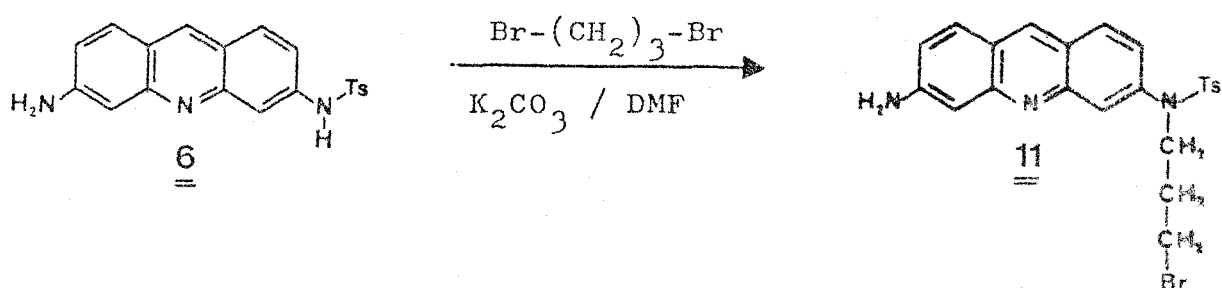
La purification de PF-C<sub>2</sub> 10 s'est avérée plus facile dans les conditions de l'hydrolyse acide plutôt qu'après coupure par le sodium-naphtalène. Dans le premier cas, le mélange précipite après refroidissement à 0°C, et il suffit de filtrer et laver à l'acétone pour enlever les traces d'acides résiduels ; dans l'autre cas, la présence du naphtalène et de ses dérivés sont une nouvelle source de difficultés dans la séparation des produits.

Nous avons donc retenu l'hydrolyse comme méthode de déprotection, qui sera appliquée aux modèles synthétisés par la suite.

III. PRÉPARATION DU PRODUIT INTERMÉDIAIRE-CLEF

PF-Ts-C<sub>3</sub>-Br 11 :

Ce produit est obtenu dans les mêmes conditions que le composé PF-Ts-C<sub>3</sub> 8, (page 36), en remplaçant le bromo-1 propane par le dibromo-1,3 propane :



Cette réaction est effectuée en présence d'un large excès de dibromo-1,3 propane, de façon à défavoriser la formation éventuelle de dimères de proflavine. Le rendement est égal à 63 %.

On remarque dans le spectre de RMN de 11 deux triplets à 3,60 et 3,30 ppm, correspondant respectivement aux protons N-CH<sub>2</sub> et CH<sub>2</sub>-Br.

Nous avons donc maintenant une bonne méthode de prépara-

tion de cet intermédiaire-clef PF-Ts-C<sub>3</sub>-Br 11, avec des rendements satisfaisants. Le seul inconvénient réside dans la faible sélectivité observée lors de la réaction de tosylation.

Nous avons essayé de tirer parti de la monofonctionnalisation à 100 % de la proflavine en présence d'anhydride phtalique, en tentant d'introduire un groupement tosyloxy sur la fonction amine libre, mais tous nos essais ont échoués, quelle que soit la forme (ouverte ou fermée) de la partie phtaloyle (Fig. 7) :

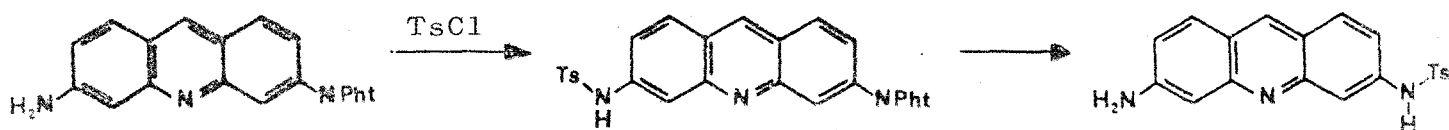


Fig. 7 : Tentative de tosylation sélective de la proflavine

Il reste maintenant à substituer le brome par une des bases nucléiques choisies, adénine et thymine. Nous n'avons pas, dans ce travail préparé le modèle PF-C<sub>3</sub>-Cyt, mais des essais préliminaires nous ont montré que l'intermédiaire PF-Ts-C<sub>3</sub>-Br 11 est utilisable pour sa synthèse.

#### IV. PRÉPARATION DU MODÈLE AVEC L'ADÉNINE PF-C<sub>3</sub>-ADE 13 :

Le pKa correspondant à l'arrachement du proton 9 de l'adénine est de 9,80. Il est donc possible, par action d'une base comme l'hydrure de sodium d'obtenir proprement l'anion adénylate correspondant (Fig. 8), en suspension dans la DMF et de le faire réagir sur un site électrophile.

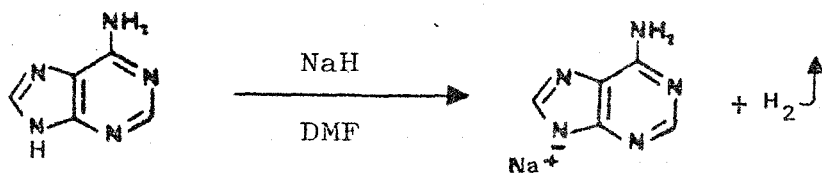
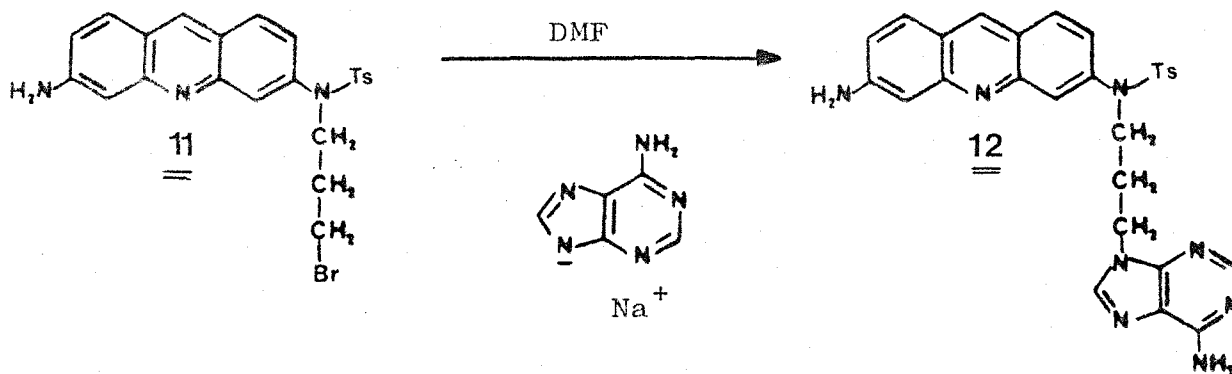


Fig. 8 : Formation d'adénylate de sodium

Cette méthode a été largement utilisée pour préparer des adénines substituées en 9 (24, 26), et notamment pour synthétiser les modèles équivalents en série amino-9 acridine (23).

#### A. FORMATION DU PRECURSEUR PF-Ts-C<sub>3</sub>-Ade 12 :

La substitution du bromé de l'intermédiaire clef 11 se fait en présence d'adénylate de sodium, à température ambiante et à l'abri de l'humidité. Cette réaction étant de type S<sub>N</sub>2, un large excès de réactif augmente la vitesse de formation du produit désiré 12, sans toutefois provoquer la formation de dérivés secondaires :



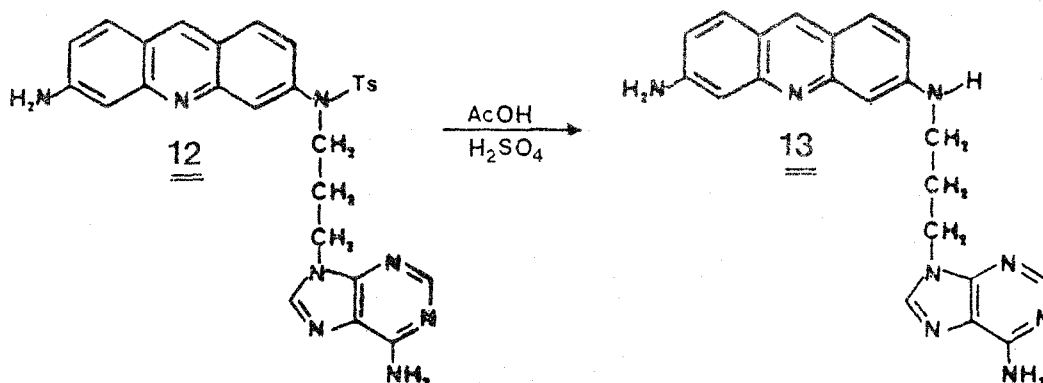
La précipitation du mélange réactionnel dans une solution d'ammoniaque à pH = 13 s'accompagne d'une solubilisation de l'adénine en excès.

Comme pour son précurseur, la purification de ce produit par chromatographie sur colonne demande une grande quantité de silice et l'élution par un solvant ternaire. Bien qu'ayant passé ce composé sur colonne plusieurs fois, en diminuant la polarité du solvant pour améliorer la séparation, nous n'avons pas pu en obtenir un échantillon analytiquement propre. De nombreux solvants et couples de solvants ont également été testés en vain pour tenter de cristalliser ce produit.

Néanmoins, sa structure est confirmée par RMN : les protons H<sub>2</sub> et H<sub>8</sub> de l'adénine forment deux singulets accolés à 8,05 ppm, et les protons du CH<sub>2</sub> en α du noyau imidazole de l'adénine résonnent à 4,20 ppm sous forme d'un triplet.

## B. DETOSYLATION : OBTENTION DU MODELE PF-C<sub>3</sub>-Ade 13

Les conditions de déblocage de la fonction amine par hydrolyse acide (acide acétique | acide sulfurique) mises au point sur le produit de référence PF-C<sub>2</sub> 10 nous ont permis d'obtenir le produit final PF-C<sub>3</sub>-Ade 13, avec un bon rendement :



La plus grosse difficulté a été d'obtenir un produit analytiquement pur, absolument indispensable pour les études spectroscopiques, et particulièrement UV. Ceci a pu être réalisé par chromatographie sur colonne d'alumine basique, en opérant sous pression avec un appareil CLHP préparative, avec recyclages successifs des fractions les plus pures. Après filtration et évaporation du solvant, le solide recueilli est dissous à chaud dans l'acide chlorhydrique 1N, et récupéré après précipitation à basse température sous forme de double chlorhydrate.

Le chromatogramme de CLHP ne comporte qu'un seul pic aux deux longueurs d'onde de détection (254 et 365 nm). La composition du produit a été confirmée par les résultats de l'analyse élémentaire, et par dosage des ions chlorure dans le laboratoire du Pr. NICOLE.

Le spectre de masse de ce composé montre le pic moléculaire (faible) à  $m/e = 384$ .

Le spectre de RMN (Fig. 9) montre deux fois deux protons échangeables à 7,00 et 5,76 ppm, correspondant respectivement aux fonctions amines primaires de l'adénine et de la proflavine, et deux

singulets rapprochés à 8,18 et 8,23 ppm caractéristiques des protons  $H_2$  et  $H_8$  de l'adénine.

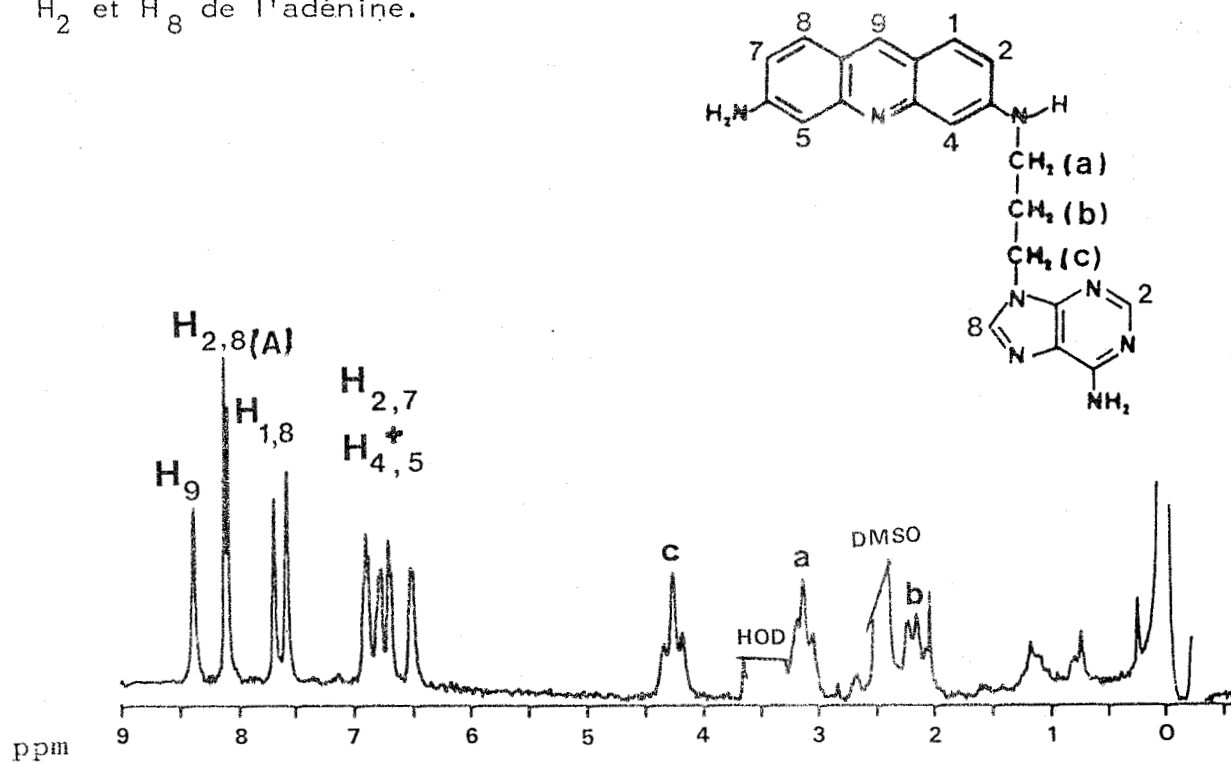
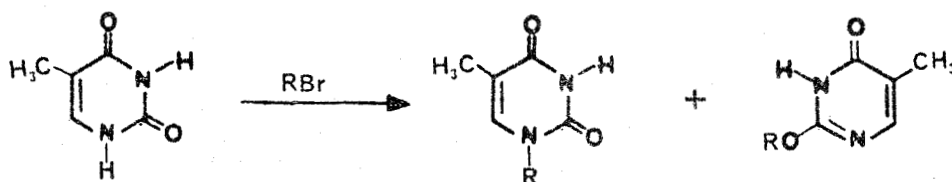


Fig. 9 : Spectre de RMN (80 MHz) de PF-C<sub>3</sub>-Ade 13  
(Solvant : DMSO (D<sub>6</sub>) + D<sub>2</sub>O)

## V. PRÉPARATION DU MODÈLE AVEC LA THYMINE PF-C<sub>3</sub>-THY 15 :

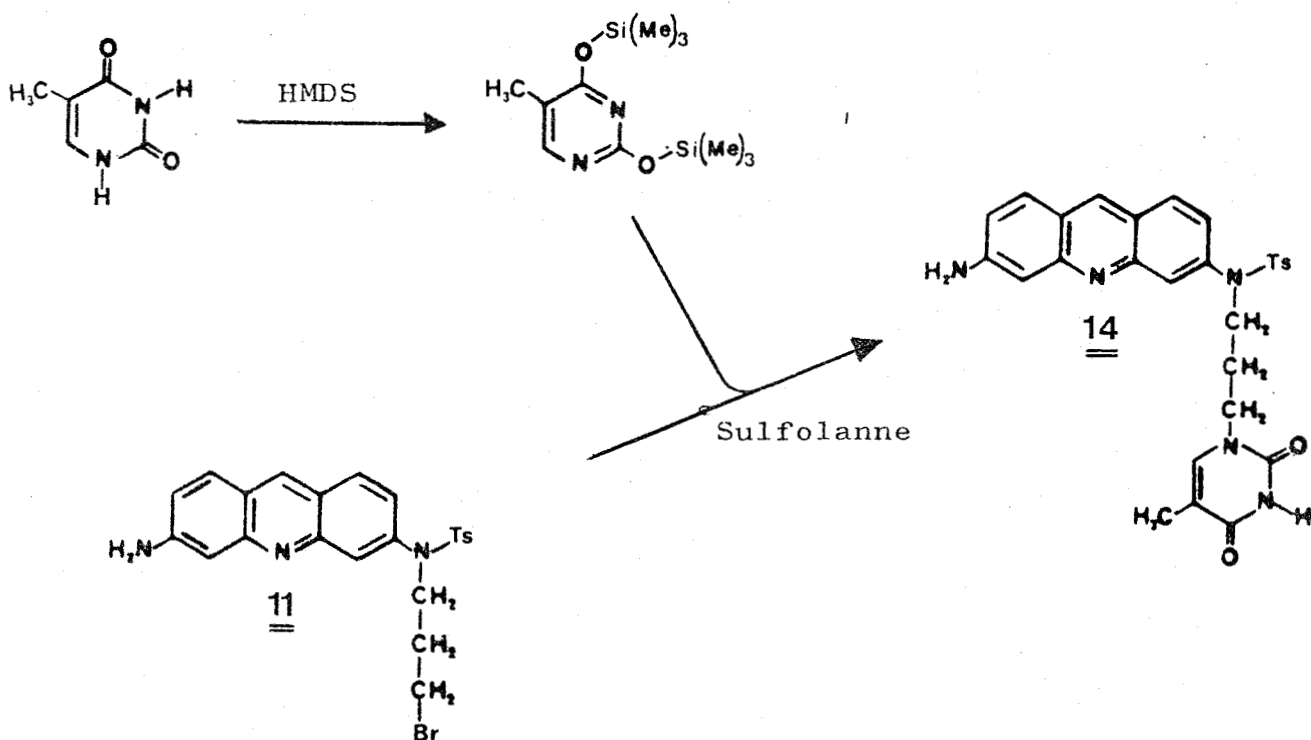
La thymine peut réagir par l'atome d'azote en position 1 avec un halogène-alcane en présence de carbonate de potassium (24) mais au cours de cette réaction on obtient une certaine proportion de dérivé O-alkylé :



Devant les difficultés de purification déjà rencontrées, nous avons préféré choisir une voie plus sélective, de manière à éviter la formation de produits O-alkylés. T. NISHIMURA et I. IWAI (51), et l'équipe N.J. LEONARD (24), ont proposé l'emploi d'un dérivé silylé obtenu par action de l'hexamethyldisylazane sur la thymine. Cette méthode a donné de bons résultats dans la synthèse des modèles Intercalant  $-(CH_2)_n$ -Thy effectuée au laboratoire (32).

### A. FORMATION DE PRECURSEUR PF-Ts-C<sub>3</sub>-Thy : 14

Nous avons fait réagir notre composé intermédiaire 11 avec la thymine silylée dans le sulfolane à 80°C et nous avons obtenu le précurseur 14 avec un rendement de l'ordre de 60 % :



La formation de sel quaternaire de pyrimidine, intermédiaire non isolé de cette réaction, est favorisée dans le sulfolane (52, 53).

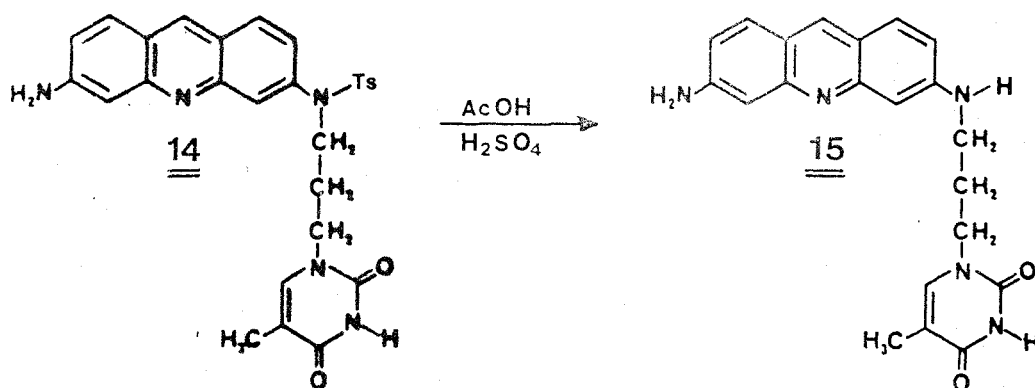
Nous avons purifié ce produit dans les mêmes conditions que son analogue en série adénine PF-Ts-C<sub>3</sub>-Ade 12 (voir page 41) et également dans ce cas, nous n'avons pas réussi à le purifier à 100 %.

La structure du précurseur 14 est confirmée par RMN, où l'on observe, pour la thymine, le proton H<sub>6</sub> (singulet) à 8,01ppm et le méthyl en position 5 à 1,62 ppm.

## B. DEPROTECTION : OBTENTION DU MODELE PF-C<sub>3</sub>-THY 15

Le réactif de déblocage précédemment employé peut également être utilisé avec le produit PF-Ts-C<sub>3</sub>-Thy 14, le composé de référence PF-C<sub>2</sub> 10 et le modèle PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 ayant été obtenus par cette voie. De plus, la thymine elle-même est synthétisée dans l'acide sulfurique (54) (par condensation de l'urée avec l'acide β-méthyl malique), ce qui implique qu'elle est stable dans ce milieu.

Nous avons effectivement obtenu le nouveau modèle PF-C<sub>3</sub>-Thy 15, avec un très bon rendement, mais nous nous sommes heurtés aux mêmes difficultés de purification qu'en série adénine.



Isolé sous forme de chlorhydrate, ce produit répond aux critères de pureté nécessaires aux études spectroscopiques : un seul pic est observé dans le chromatogramme de CLHP ; les ions chlorure ont également été dosés.

La masse moléculaire est confirmée par spectrométrie de masse (pic de faible intensité à m/e = 375). Le spectre de RMN dans le DMSO montre deux protons échangeables à 6,80 ppm, correspon-

nant à la fonction amine libre de la proflavine, et deux singulets à 7,59 et 1,67 ppm, attribués respectivement au proton H<sub>6</sub> et au groupe méthyle en position 5 de la thymine.

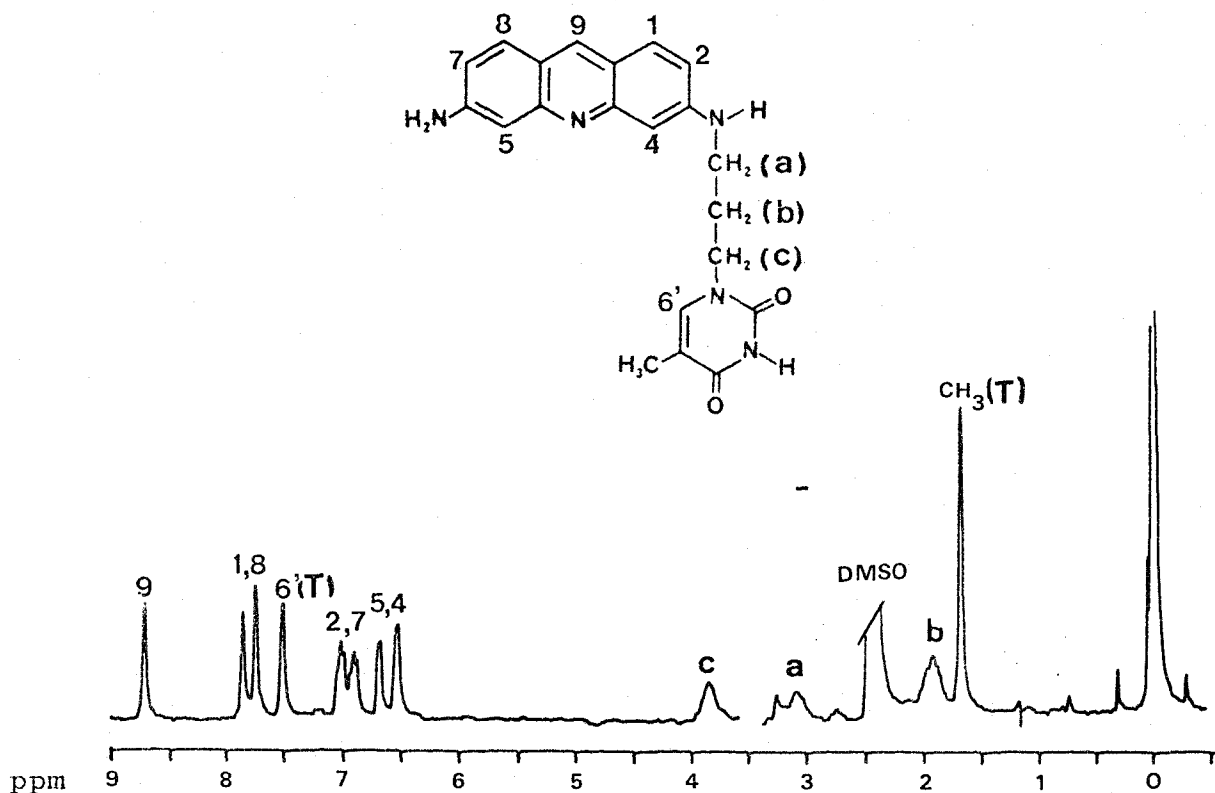


Fig. 10 : Spectre de RMN (80MHz) de PF-C<sub>3</sub>-Thy 15  
(solvant : DMSO (D<sub>6</sub>) + D<sub>2</sub>O)

## VI. CONCLUSION :

La synthèse par elle-même de ces modèles ne pose pas de problèmes particuliers, si ce n'est le manque de sélectivité vis-à-vis des deux fonctions amines de la proflavine.

Les rendements évalués grâce à l'analyse des bruts réactionnels par CLHP, sont dans la majorité des cas de l'ordre de 70 % à 80 %, mais il n'en est malheureusement pas de même pour les rendements obtenus après purification. Par exemple, si les fractions analytiquement pures recueillies après la dernière étape (détylosylation) ne dépassent pas 10 % de la masse théorique attendue, cela ne semble pas être dû à de mauvaises conditions de réaction, qui se fait bien quantitativement, d'après les chromatogrammes de CLHP ; toute la



perte en produit provient des purifications, souvent longues et fastidieuses dans cette série.

Quoi qu'il en soit, nous sommes maintenant en possession des trois molécules (avec la pureté analytique recherchée) nécessaires à l'étude détaillée des interactions entre proflavine et adénine ou thymine.

-----

PROFLAVINE BIFONCTIONNALISEE

## I. INTRODUCTION.

A partir du produit Ts-PF-Ts 7, isolé en premier lieu comme produit secondaire de la réaction de tosylation de la proflavine (voir page 35), il est possible d'obtenir une nouvelle série de modèles bi-fonctionnels, en opérant dans des conditions comparables aux précédentes (Fig. 1) :

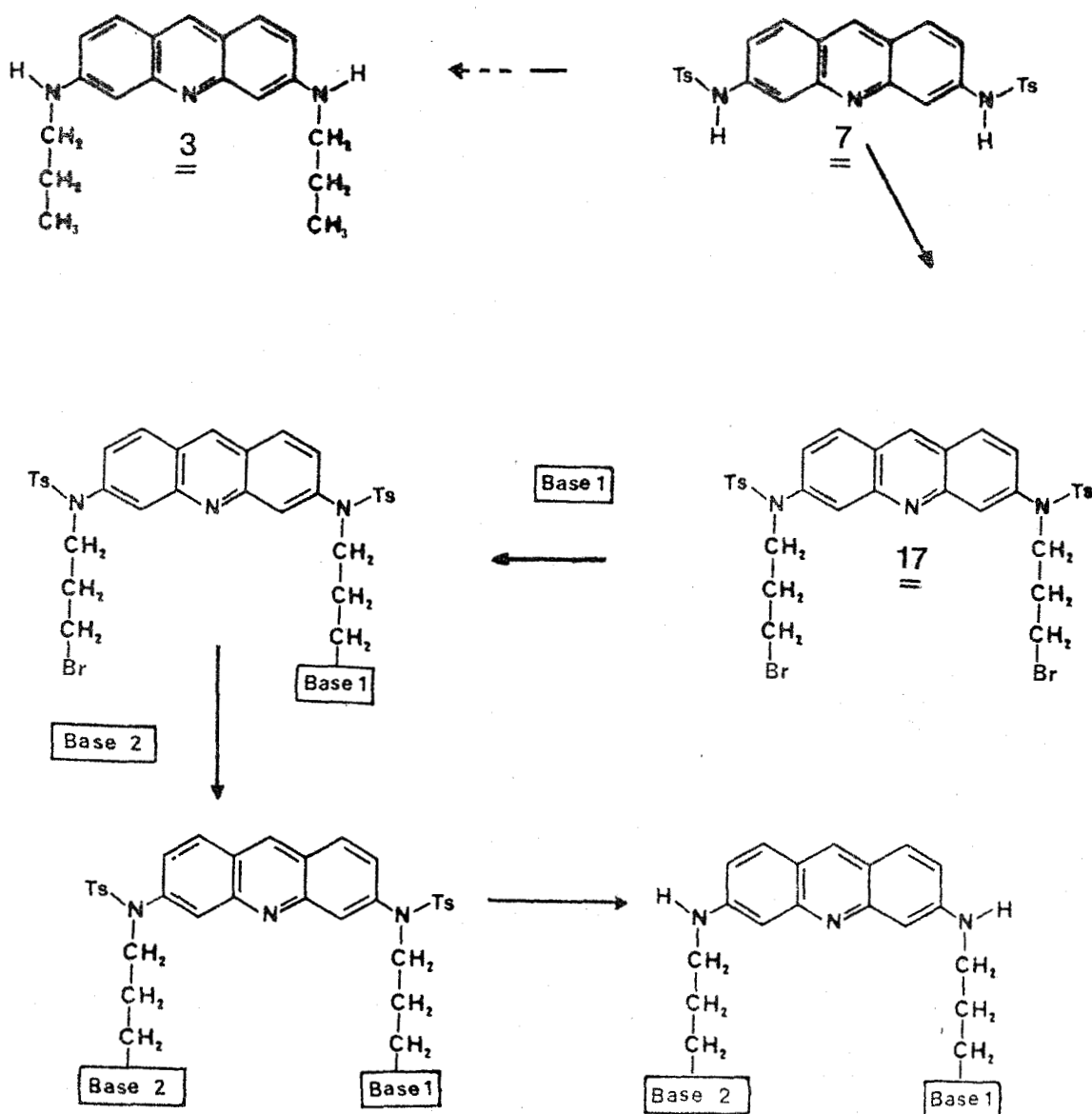


Fig. 1 : Schéma de synthèse des proflavines bifonctionnalisées

Selon la démarche suivie pour la synthèse des proflavines monofonctionnalisées, nous avons tout d'abord préparé le nouveau produit de référence  $C_3$ -PF- $C_3$  3, puis, en utilisant le dibromo-1,3 propane, nous avons obtenu le nouvel intermédiaire clef de cette voie: Br- $C_3$ -Ts-PF-Ts- $C_3$ -Br 17. Les deux sites électrophiles  $-CH_2$ -Br ainsi introduits peuvent alors réagir avec différents nucléophiles, et conduire aux modèles symétriques Ade- $C_3$ -PF- $C_3$ -Ade 20 et Thy- $C_3$ -PF- $C_3$ -THY, ou au modèle comprenant le couple de bases complémentaire : Ade- $C_3$ -PF- $C_3$ -Thy 22.

Les dérivés symétriques nous serviront, dans les études spectroscopiques, de références par rapport au produit 22.

Paradoxalement, la manipulation des produits de cette série est nettement plus aisée que précédemment : la présence d'un second groupe tosylo diminue fortement la polarité, et permet l'utilisation de solvants tels que l'acétate d'éthyle, le chlorure de méthyle, et même l'éther de pétrole dans certains cas.

## II. PRÉPARATION DU PRODUIT DE RÉFÉRENCE $C_3$ -PF- $C_3$ 3 :

Cette synthèse est réalisée en deux étapes :

- Double alkylation de Ts-PF-Ts 7 par le bromo-1 propane.
- Détosylation.

### A. ALKYLATION :

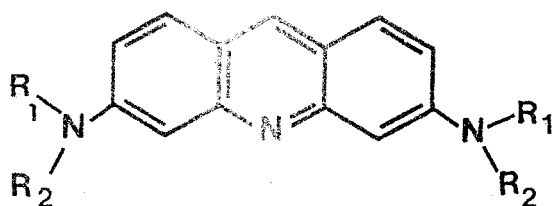
En présence de carbonate de potassium et de bromo-1 propane, la bis-tosyl-proflavine Ts-PF-Ts 7 conduit au produit  $C_3$ -Ts-PF-Ts- $C_3$  16 (Fig. 2), avec un rendement de 78 % en produit pur .

### B. DETOSYLATION :

les conditions d'hydrolyse acide par l'acide sulfurique et l'acide acétique nous ont permis d'obtenir quantitativement le nouveau produit de référence  $C_3$ -PF- $C_3$  3 (Fig. 2), sous forme de sulfate double, et analytiquement pur sans traitement ultérieur.

---

NOTE : Les cristaux obtenus sont incolores. Cette absence de coloration est observée chaque fois que les deux fonctions amines de la proflavine (sous forme de base libre) sont tosylées et alkylées :



$R_1 = \text{alkyl}$	}	coloré
$R_2 = \text{alkyl}$		
$R_1 = \text{tosyl}$	}	coloré
$R_2 = \text{H}$		
$R_1 = \text{tosyl}$	}	incolore
$R_2 = \text{alkyl}$		

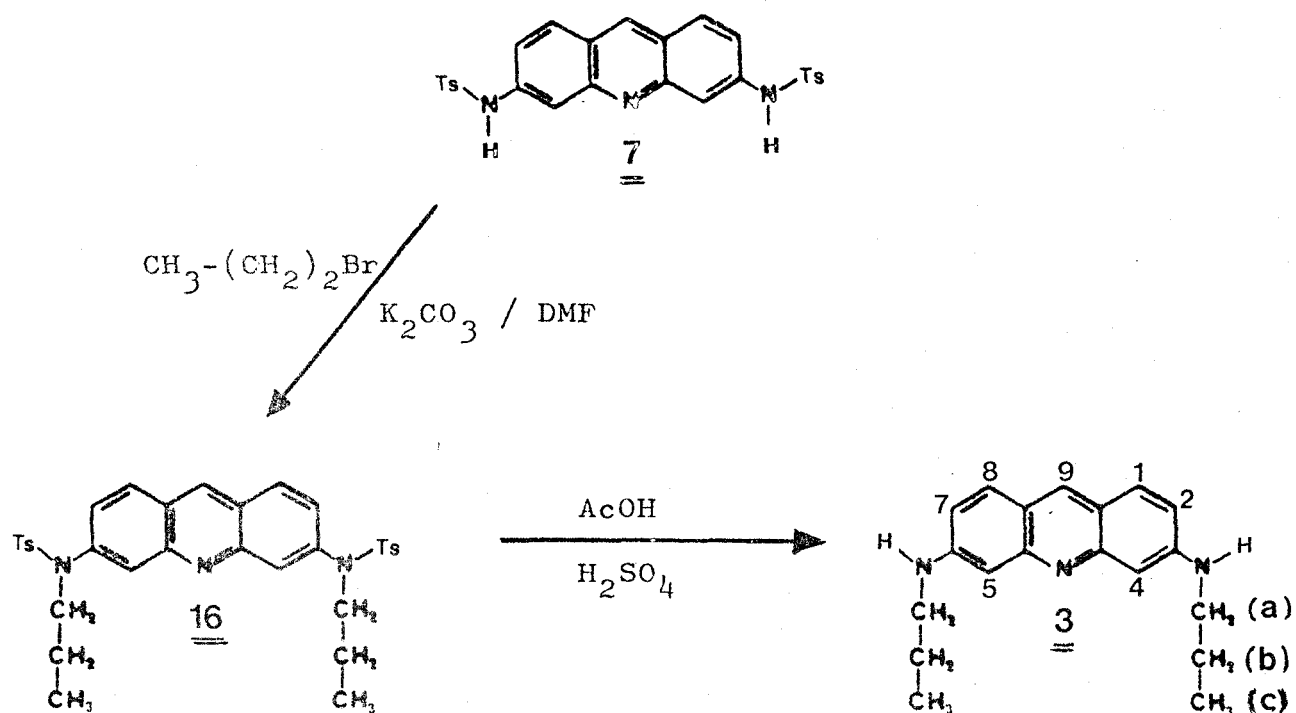


Fig. 2 : Synthèse du produit de référence  $\text{C}_3\text{-PF-C}_3$  3

Le spectre de RMN confirme la structure symétrique de ce dérivé (Fig. 3).

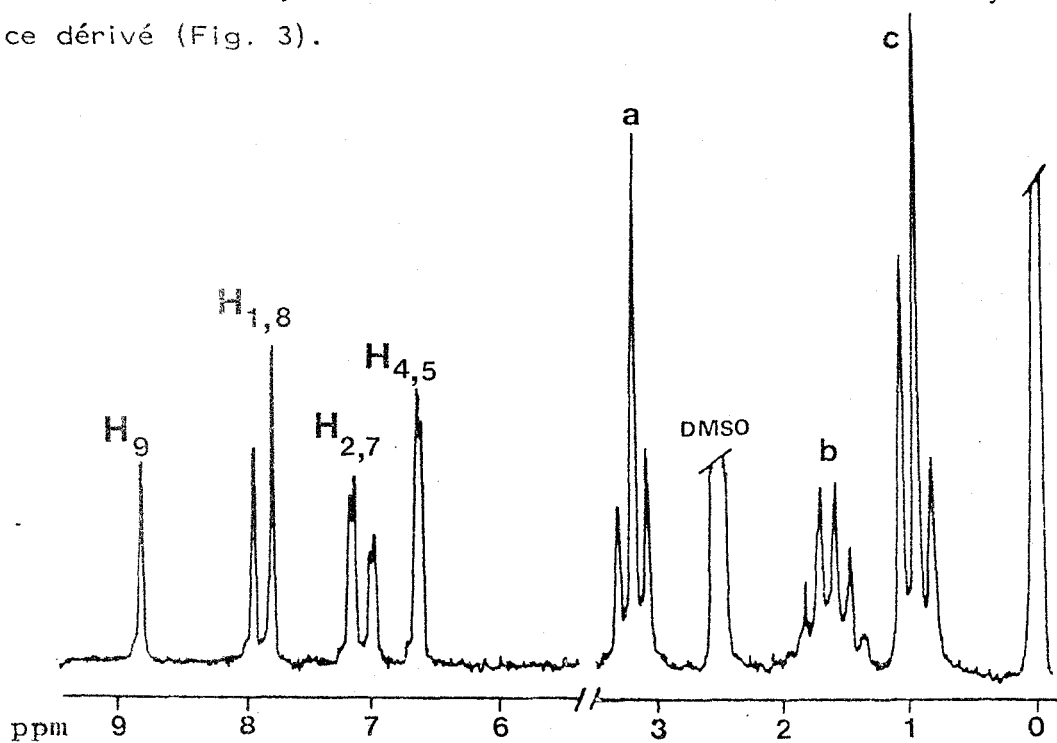
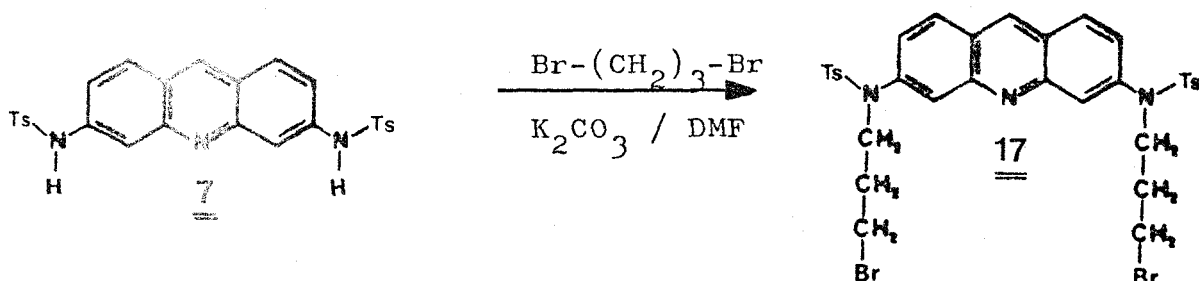


Fig. 3 : Spectre de RMN du produit de référence  $\text{C}_3\text{-PF-C}_3$  3  
 (solvant :  $\text{DMSO}(D_6) + D_2O$ )

### III. PRÉPARATION DU PRODUIT INTERMÉDIAIRE-CLEF : BR-C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub>-BR 17.

Le composé Ts-PF-Ts 7 est alkylé par le dibromo-1.3 propane en présence de carbonate de potassium dans la DMF, conduisant à l'intermédiaire 17 avec un rendement de 70 %.



Les dérivés de ce type, relativement instables, doivent être utilisés rapidement, mais peuvent se conserver quelques jours à -20°C sans décomposition importante.

Néanmoins, nous possédons une bonne méthode de préparation du produit 17, précurseur des modèles comprenant deux bases nucléiques.

Dans un premier temps, nous avons préparé le modèle symétrique Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Ade 20 en substituant les deux atomes de brome par deux équivalents de la base correspondante.

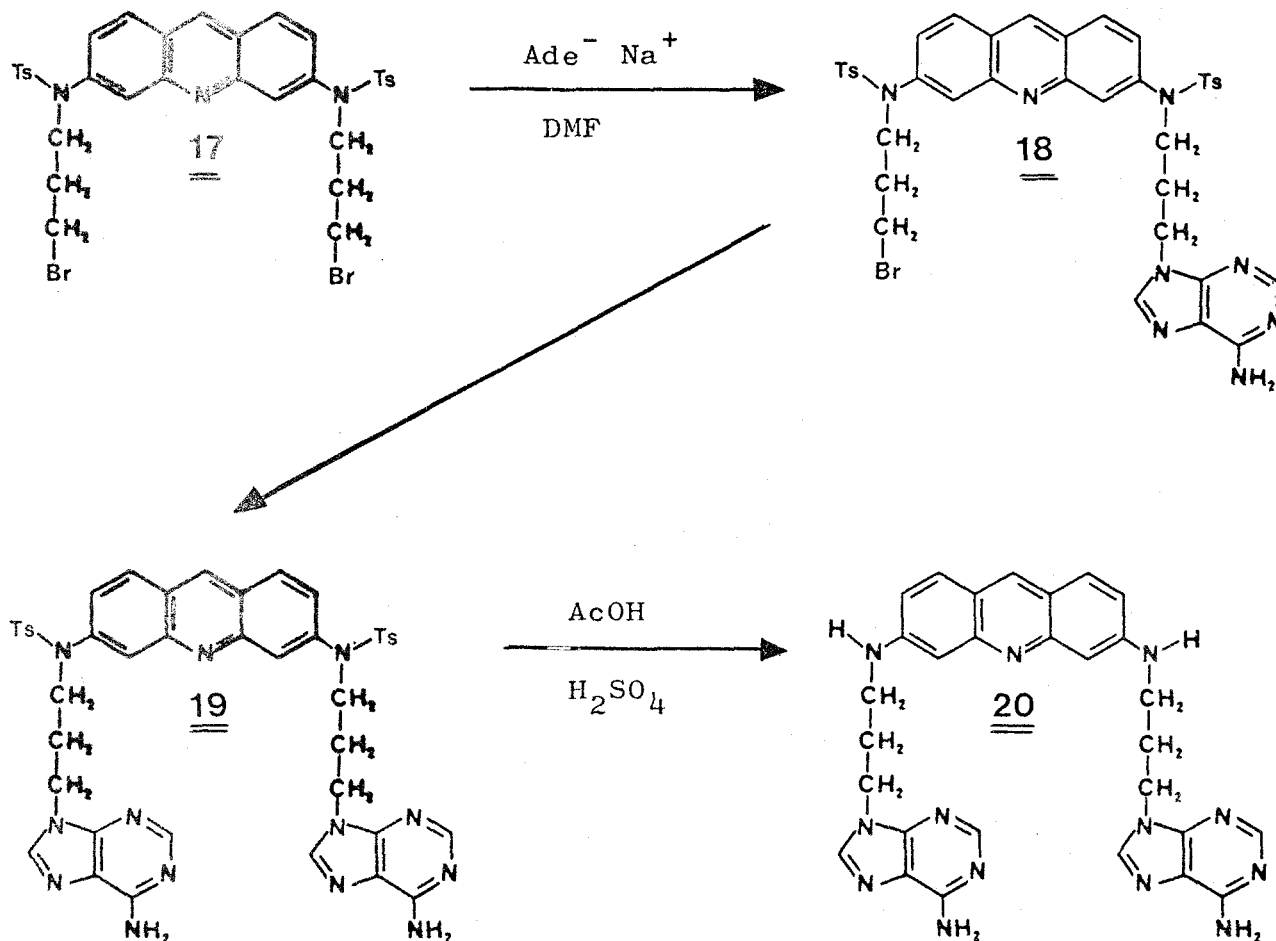
### IV. SYNTHÈSE DES MODÈLES BASE-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-BASE.

Dans les deux cas, nous avons utilisé les mêmes réactifs et les mêmes conditions opératoires que ceux qui avaient permis l'obtention des dérivés mono-fonctionnalisés de la proflavine.

#### A. PRÉPARATION DU MODELE Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Ade 20

Le produit intermédiaire 17, en présence d'un excès

d'adénylate de sodium, conduit au précurseur Ade-C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub>-Ade 19 : le rendement est de 46 %.



L'hydrolyse acide du dérivé 19 nous a ensuite permis d'obtenir le modèle symétrique Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Ade 20, dont la structure a été établie par RMN (Fig. 4) : en plus des 6 protons échangeables, on observe deux singulets accolés attribués aux protons H<sub>2</sub> et H<sub>8</sub> des adénines (intégrant pour 4 protons), les signaux correspondant à une acridine symétrique, ainsi que les trois multiplets des chaînes triméthyléniques, intégrant chacun pour 4 protons.

Toutefois, la très grande polarité de ce produit nous a empêché, jusqu'à maintenant, d'en isoler un échantillon rigoureusement pur.



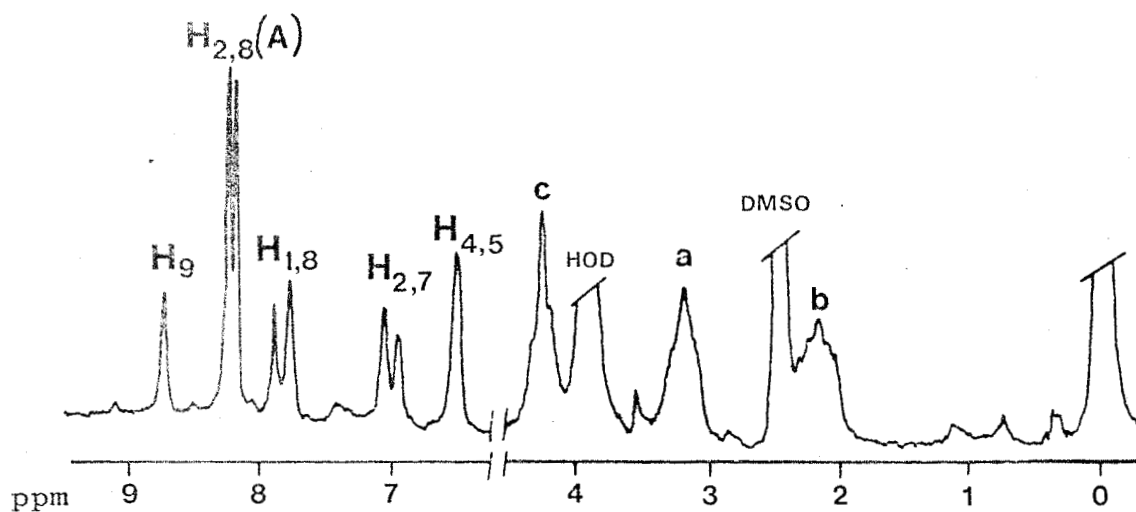
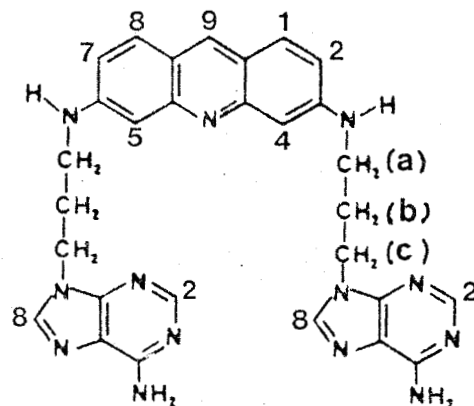


Fig. 4 : Spectre de RMN (80 Mhz) du modèle Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Ade 20  
(Solvant : DMSO(D<sub>6</sub>) + D<sub>2</sub>O)

### B. SYNTHÈSE DU MODÈLE Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy 22

Deux voies se présentent à partir du produit intermédiaire dibromé 17 pour parvenir à ce modèle (fig. 5) :

- soit fixer d'abord la thymine et ensuite l'adénine : voie (a).
- soit fixer d'abord l'adénine et ensuite la thymine : voie (b).

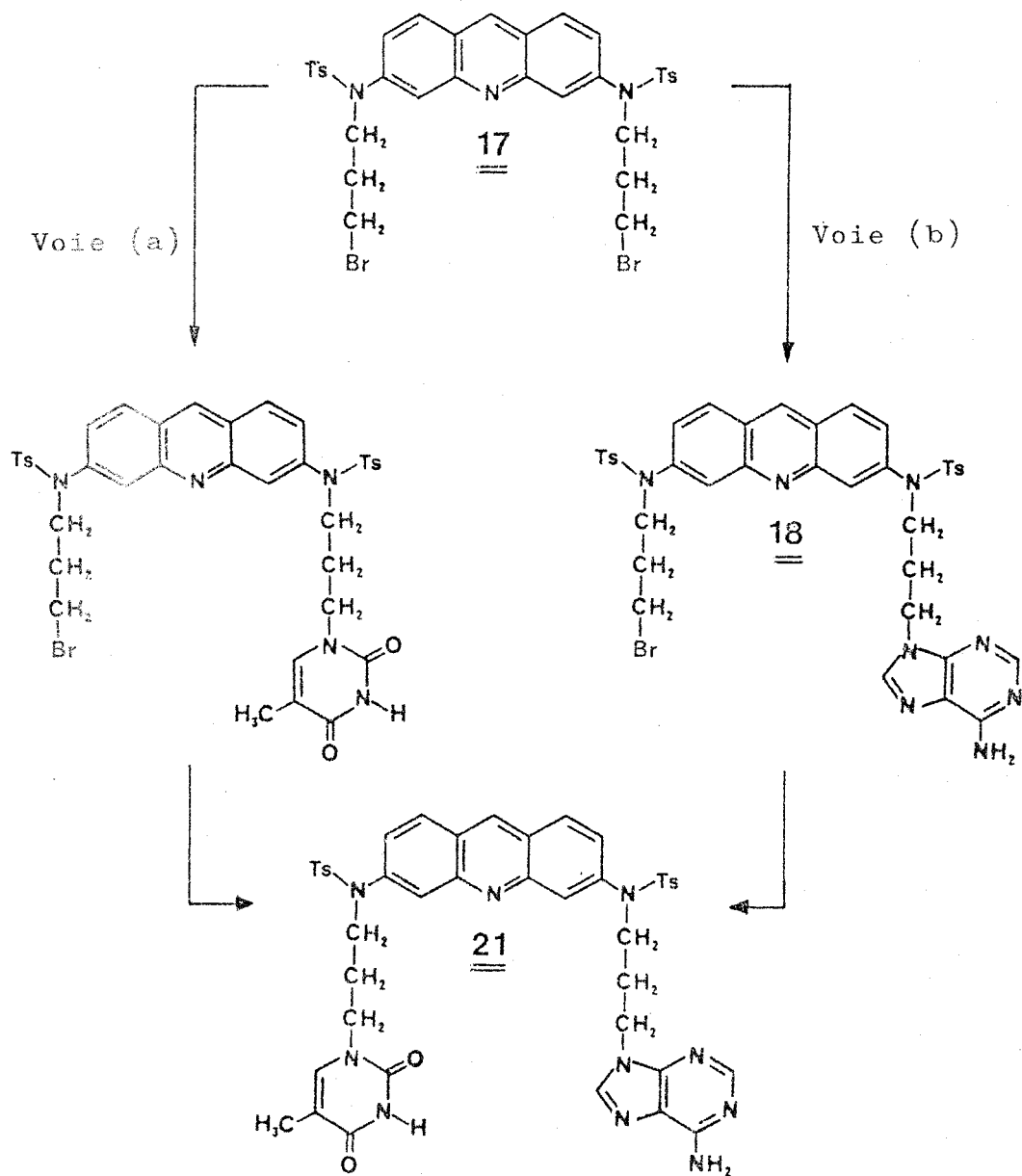
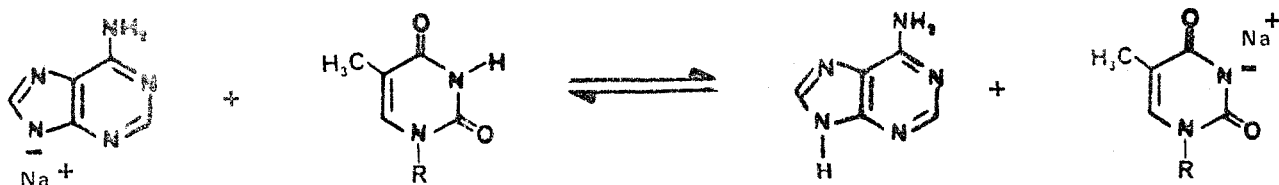


Fig. 5 : Voies d'accès au précurseur 21

Dans les deux voies, la première étape ne sera vraisemblablement pas sélective, et il faut s'attendre à obtenir un mélange de produits mono- et bi-fonctionnalisés.

Dans la voie (a), au niveau de la seconde étape, il existe un risque de réaction secondaire : par exemple, l'arrachement du proton en position 3 de la thymine par l'adénylaté de sodium :



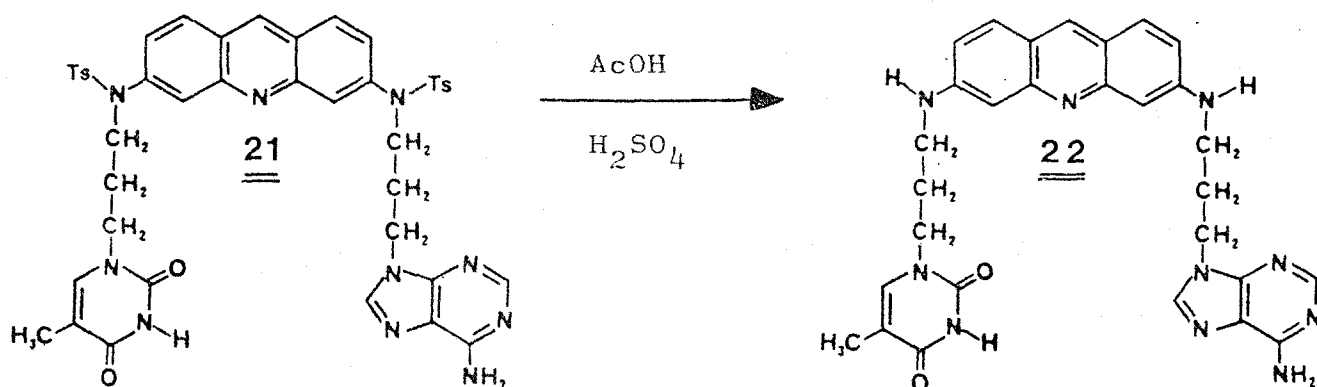
Nous avons donc choisi la voie (b), dans laquelle le produit mono-adénylé 18 ne comporte qu'un seul site électrophile  $-CH_2-Br$  susceptible de réagir avec la thymine silylée.

Après action de l'adénylate de sodium sur le composé 17, nous avons obtenu le produit 18 avec un rendement égal à 32% (voie (b) Fig. 5).

Ce dernier, en présence de thymine silylée dans le sulfolane conduit au composé 21, précurseur du modèle Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy 22 (rendement : 46 %).

La faible polarité de ce produit, due aux deux groupes tosyloxy, permet d'effectuer une bonne séparation sur colonne de silice (élution par un mélange chlorure de méthylène-éthanol). Connaissant les difficultés de purification des modèles finaux, nous avons espéré limiter ces problèmes en essayant d'obtenir un composé d'une grande pureté avant la dernière étape de détosylation.

Par hydrolyse acide, le dérivé 21 conduit au modèle bifonctionnalisé Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy 22 :



Le spectre de RMN mesuré dans le DMSO (Fig. 6) permet d'affirmer la structure de ce produit : en ce qui concerne le noyau acridine, les protons H<sub>4</sub> et H<sub>5</sub> (singulet à 6,58 ppm), H<sub>1</sub> et H<sub>8</sub> (doublet à 7,80 ppm) et H<sub>2</sub> et H<sub>7</sub> (doublet à 6,98 ppm) sont équivalents, indice d'une symétrie à ce niveau. Les protons H<sub>2</sub> et H<sub>8</sub> de l'adénine résonnent à 8,55 et 8,46 ppm, le proton H<sub>6</sub> de la thymine à 7,52 et le groupe méthyle en position 5 à 1,68 ppm.

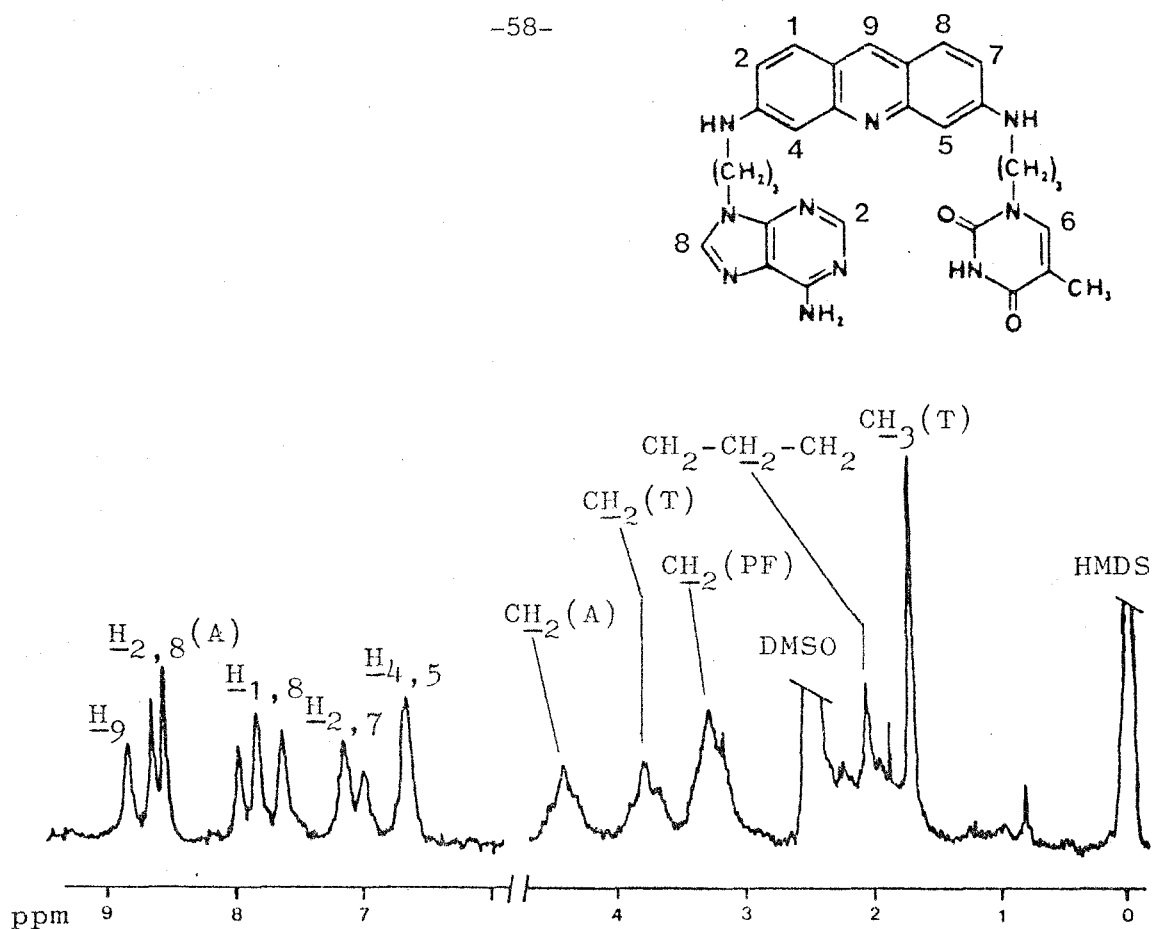


Fig. 6 : Spectre de RMN (80MHz) du modèle Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy 22  
(solvant : DMSO (D<sub>6</sub>) + D<sub>2</sub>O)

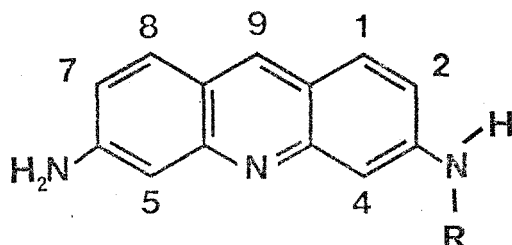
## V. CONCLUSION.

Le produit de référence C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub> 3 de cette série proflavine bi-fonctionnée a été obtenu avec de très bons rendements. Il faut remarquer que c'est le seul composé isolé au cours de ce travail qui ait répondu aux critères d'analyse recherchés après simple filtration du brut réactionnel.

Nous avons mis au point la synthèse d'un modèle du complexe d'intercalation proflavine-couple de bases complémentaires. Une étude physico-chimique complète sera possible lorsque nous posséderons une bonne technique de purification.

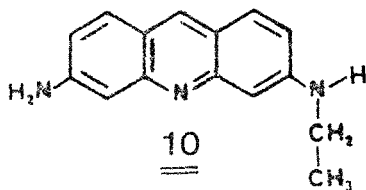
Toutefois, à partir des spectres de RMN en milieu aqueux, il nous sera possible de présenter des résultats préliminaires concernant la conformation de ce complexe.

REACTIVITE PARTICULIERE EN POSITION 4 ET 5  
DES DERIVES DE LA PROFLAVINE



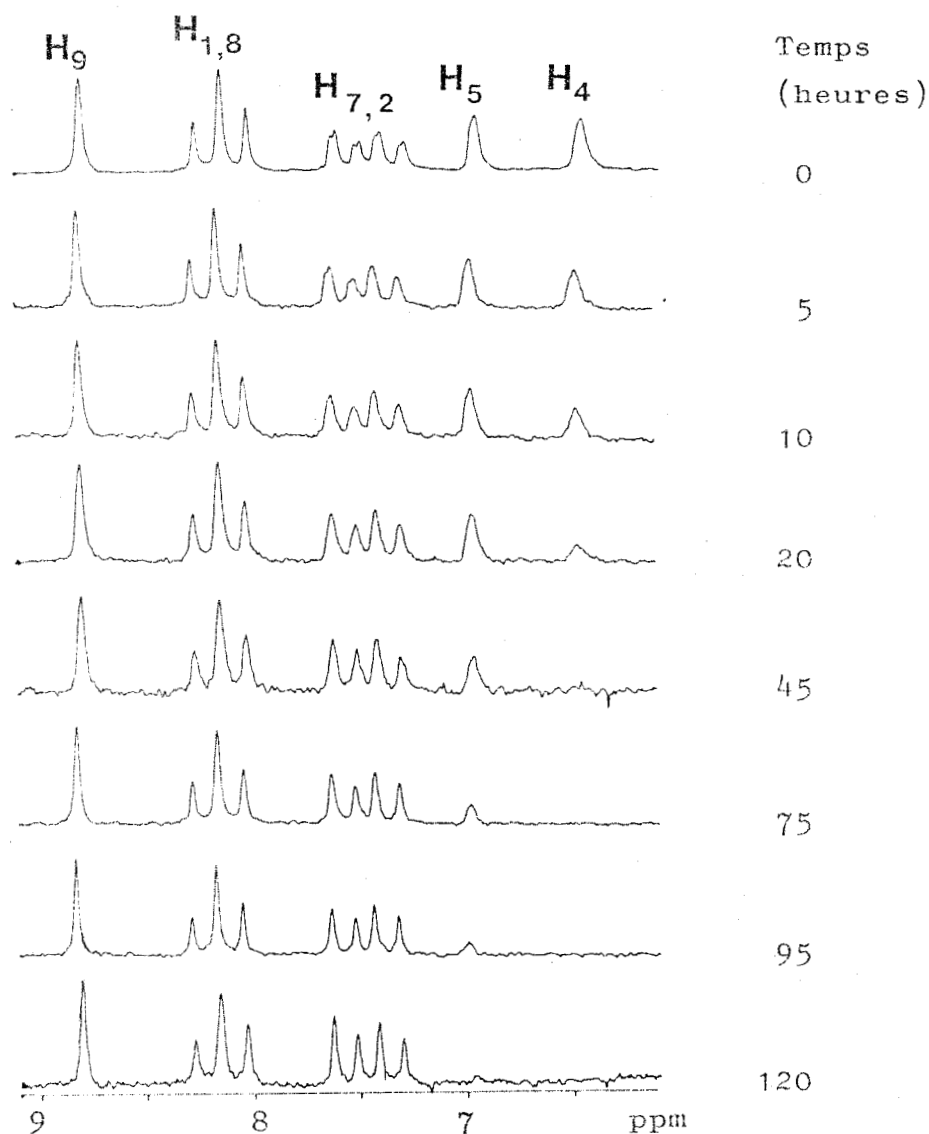
Au cours de la détermination de structure par RMN des produits de la série proflavine mono-fonctionnalisée, nous avons remarqué une diminution de l'intensité du signal correspondant au proton  $H_4$ . Ce phénomène a été observé dans le cas de solutions diluées (environ  $5 \cdot 10^{-5}$  moles.  $l^{-1}$ ) dans l'eau, nécessitant une longue période d'accumulation.

Nous avons supposé un échange hydrogène|deutérium, et pour étudier cette réaction, nous nous sommes placés dans le cas le plus simple, en observant les variations du produit de référence PF-C<sub>2</sub> 10.



Nous avons établi une cinétique de cette réaction, à 65°C, dans le milieu utilisé pour les études conformationnelles ( $D_2O$ ; tampon deutéroacétate; pD = 4,6).

La portion des spectres correspondant aux protons aromatiques est représentée ci-contre.



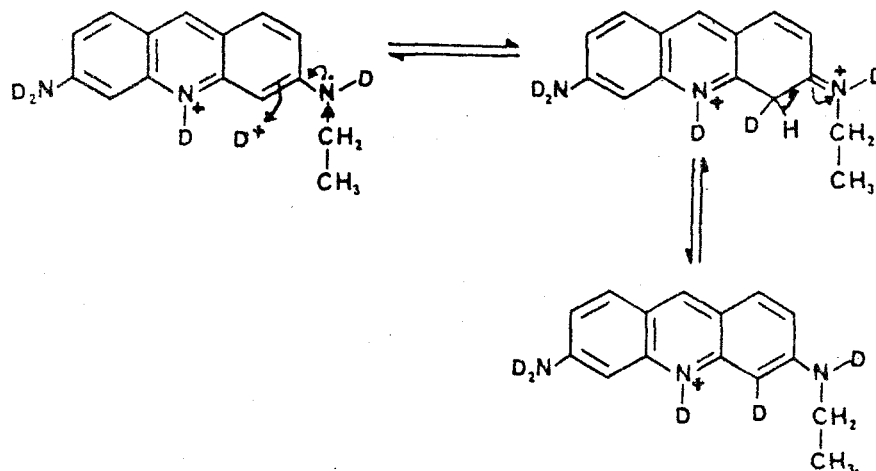
*Cinétique d'échange des protons H<sub>4</sub> et H<sub>5</sub> de PF-C<sub>2</sub> 10*

On observe un échange rapide du proton H<sub>4</sub> (t<sub>1/2</sub> ≈ 10 heures), et celui plus lent du proton H<sub>5</sub> (t<sub>1/2</sub> ≈ 40 heures). Ces échanges s'accompagnent de la disparition des couplages <sup>4</sup>J avec les protons H<sub>2</sub> et H<sub>7</sub>.

Une fois la réaction terminée, nous avons évaporé le solvant, resolubilisé dans l'eau (pour échanger le deutérium des fonctions amines en position 3 et 6) et isolé le produit. En spectrométrie de masse, le dérivé obtenu montre le pic moléculaire à m/e = 239, alors que celui du produit de départ PF-C<sub>2</sub> 10 est à m/e = 237. Les ions comprenant le noyau acridine (après coupure de la chaîne latérale) ont également leur masse augmentée de 2 unités.

Il s'agit donc bien d'un échange H/D.

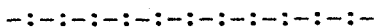
Pour expliquer cette réaction, nous pouvons proposer un mécanisme comparable à celui de la substitution électrophile :



L'échange plus rapide du proton  $H_4$  serait dû à l'effet donneur du groupe alkyle sur la fonction amine en position 3, stabilisant ainsi l'espèce iminium intermédiaire.

Nous avons été surpris par la rapidité de cette réaction, étant donnée la faible acidité du milieu. Ces résultats étant très récents, nous n'avons pas pu approfondir ce phénomène.

C H A P I T R E    I I I



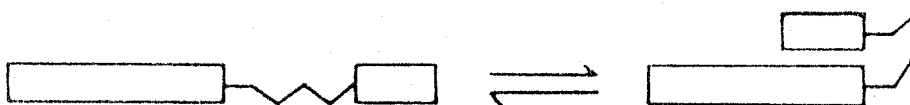
ETUDES    PHYSICO-CHIMIQUES



## I. INTRODUCTION,

Nous avons préparé deux produits PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 et PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 susceptibles d'adopter une conformation proche de celle observée dans l'ADN.

Nous pouvons maintenant effectuer les mesures spectroscopiques qui nous permettront d'étudier les interactions mises en jeu dans ces molécules dans l'équilibre "Forme ouverte  $\rightleftharpoons$  forme repliée " :



Cette étude nécessite l'utilisation de techniques permettant de travailler à faible concentration pour n'observer que des interactions intramoléculaires : les spectroscopies d'absorption UV et de RMN répondent à ces conditions.

Notre démarche est, en premier lieu, de comparer nos mesures à celles qui ont été décrites sur la proflavine intercalée dans l'ADN, et d'estimer ainsi si nos modèles reproduisent bien le phénomène d'intercalation.

### A. ABSORPTION EN UV :

#### 1 | PRINCIPE DE LA METHODE.

L'empilement de deux chromophores aromatiques peut provoquer des perturbations dans leur spectre d'absorption, notamment une diminution du coefficient d'extinction molaire : il s'agit de l'effet hypochrome.

Cette mesure est couramment utilisée dans l'étude de macromolécules biologiques ; sous forme de double hélice, l'ADN absorbe moins la lumière à 260 nm que sous forme de mono-brin, dans lequel l'empilement de bases nucléiques est plus ou moins désordonné. L'eau a une importance primordiale dans l'existence même de ce phénomène, à caractère "hydrophobe".

Pour déterminer un changement de structure de l'ADN, une méthode consiste à ajouter au milieu un solvant organique qui destabilise les empilements.

L'effet hypochrome, H %, est mesuré de la façon suivante

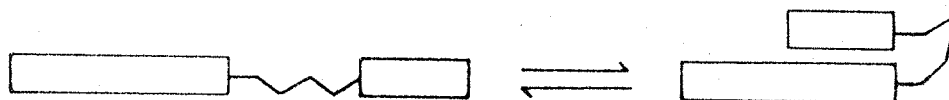
$$H \% = \left( 1 - \frac{f_{\text{"polymère"}}}{\sum f_{\text{monomères}}} \right) \times 100$$

où f est la force d'oscillateur, correspondant à l'intensité de la bande d'absorption considérée :

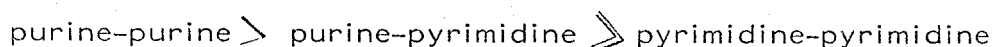
$$f = 4,32 \cdot 10^{-9} \int_{\lambda_2}^{\lambda_1} \frac{\epsilon(\lambda)}{\lambda^2} d\lambda$$

En l'absence d'interactions entre les noyaux aromatiques, H% = 0.

Des études effectuées dans l'eau sur les dinucléotides (55) et leurs analogues (24) ont mis en évidence l'existence d'une forme repliée de ces modèles par la mesure de leur effet hypochrome. L'étude de l'équilibre "forme ouverte  $\rightleftharpoons$  forme repliée" a permis



d'évaluer le degré d'empilement des bases entre elles, et, suivant les valeurs de H % (Tableau 1), de les classer selon leur aptitude à se complexer :



Dinucléotides	H %	Analogues	H %
ApA	6,8	Ade-C <sub>3</sub> -Ade	16,5
GpG	9,1	Gua-C <sub>3</sub> -Gua	15,8
CpC	4,9	Cyt-C <sub>3</sub> -Cyt	4,3
UpU	-3,6	Ura-C <sub>3</sub> -Ura	1,3
ApC	7,3	Ade-C <sub>3</sub> -Cyt	9,9
ApU	1,6	Ade-C <sub>3</sub> -Ura	8,0
GpC	7,2	Gua-C <sub>3</sub> -Cyt	13,9
GpU	-1,2	Gua-C <sub>3</sub> -Thy	11,1
GpA	6,0	Gua-C <sub>3</sub> -Ade	14,9

Thymine = méthyl-5 uracide.

*Tableau 1 : Valeurs de H % mesurées dans l'eau à 20°C pour les dinucléotides (55) et leurs analogues synthétiques (24)*

Remarquons que dans tous ces cas, les auteurs ont utilisé la grandeur H % de l'effet hypochrome comme une mesure semi-quantitative du degré d'empilement des chromophores.

D'après la théorie, élaborée essentiellement par I. TINOCO ET W. RHODES (56, 57), cet effet serait le résultat de l'influence du champ électrique créé par les électrons d'un chromophore sur le moment de transition électronique du chromophore opposé.

La géométrie d'empilement des deux noyaux serait un facteur important dans la valeur de H % : comme le montre la figure 1, un déplacement latéral inférieur à 55° serait susceptible de provoquer un effet hypochrome (58) :

$$\alpha = 90^\circ$$

$$\alpha = 55^\circ$$

$$\alpha < 55^\circ$$

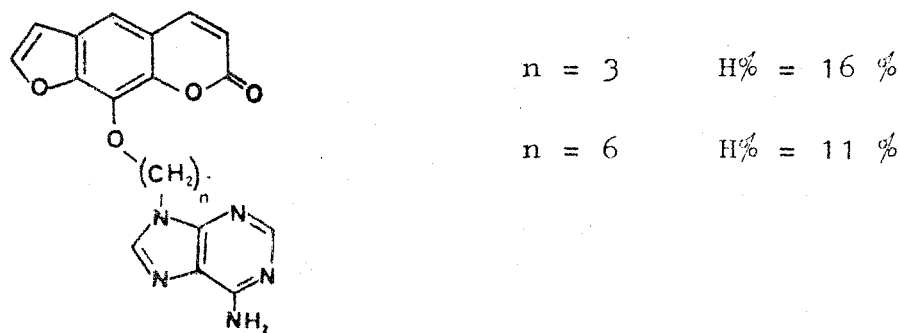
$$H\% > 0$$

$$H\% \simeq 0$$

$$H\% < 0$$

*Fig. 1: Variations de H% en fonction de déplacement relatif des chromophores (  $\alpha$  = angle formé par la droite joignant le centre des deux noyaux et le moment de transition de l'un d'eux).*

D'autre part, l'étude des modèles Pso-C<sub>n</sub>-Ade (Fig. 2) a montré que H % diminue quand la longueur de la chaîne augmente, ce qui est interprété par un accroissement des degrés de liberté dans la molécule, provoquant une variation de la proportion en complexe intramoléculaire (33) :



Pso-C<sub>n</sub>-Ade

Fig. 2 : Variation de H % en fonction de la longueur de chaîne

Bien qu'il n'existe pas de formulation théorique rigoureuse de l'origine et de la signification de l'effet hypochrome, l'ensemble de ces résultats permet d'interpréter cet effet comme une mesure de l'interaction de deux noyaux.

## 2| ETUDE DES MODELES.

Dans la pratique, à partir de leur spectre d'absorption, nous calculerons les forces d'oscillateurs des modèles PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 et PF-C<sub>3</sub>-Thy 15, que nous comparerons à celles du produit de référence PF-C<sub>2</sub> 10.

La valeur de l'effet hypochrome est obtenue de la manière suivante :

$$H \% = \left( 1 - \frac{f_{\text{PF-C}_3\text{-BASE}}}{f_{\text{PF-C}_2}} \right) \times 100$$

La force d'oscillateur du second produit de référence Base-C<sub>3</sub> n'intervient pas si l'on se place dans une région du spectre où ce composé n'absorbe pas.

Afin de s'affranchir des perturbations dues à l'auto-association importante de ce type de molécule dans l'eau, nous avons vérifié que les produits suivent la loi de BEER-LAMBERT dans la gamme de concentration choisie.

Etant donnée d'une part la faible stabilité de ces produits, leur caractère hygroscopique, et d'autre part la grande précision nécessaire pour interpréter nos résultats sans ambiguïtés, les solutions mères utilisées pour les études UV ont été dosées par M. DELAUNOIS dans le laboratoire du Pr. J. NICOLE : dosage acido-basique (Fig.3), et dosage des ions chlorures dans le cas des produits isolés sous forme de chlorhydrate.

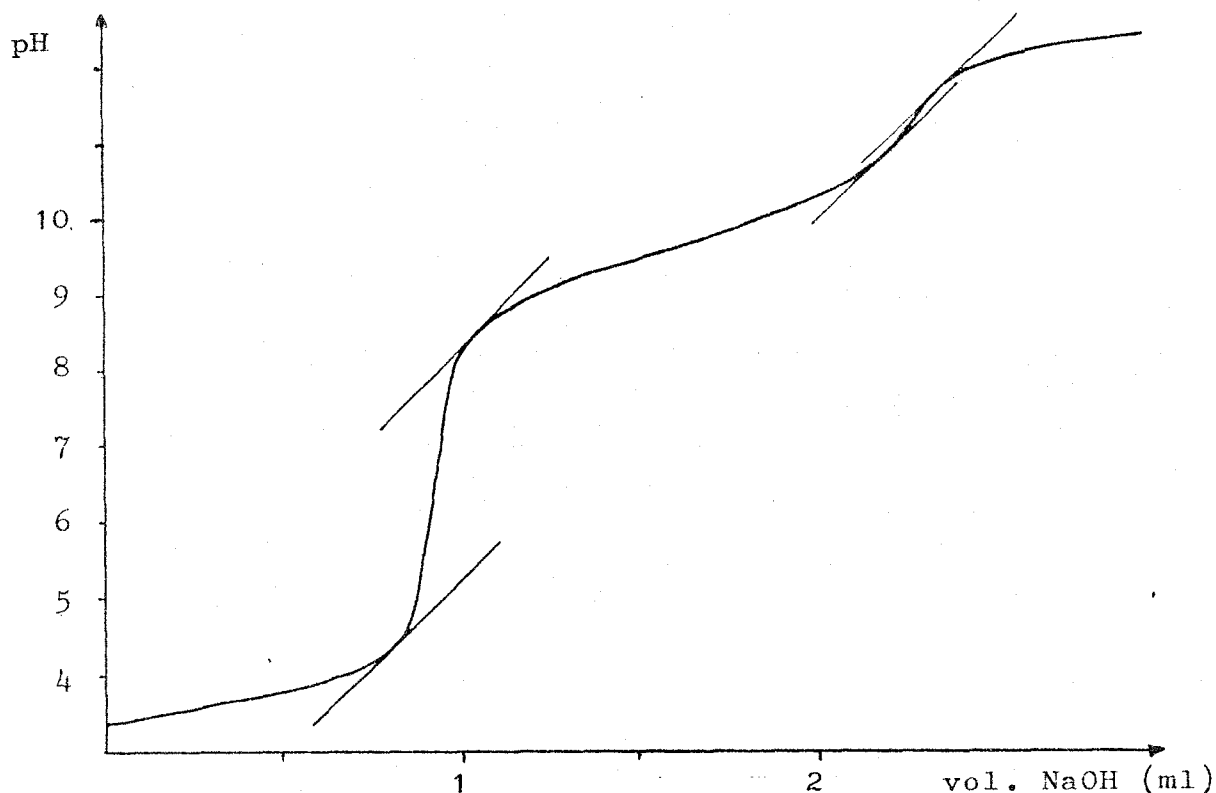
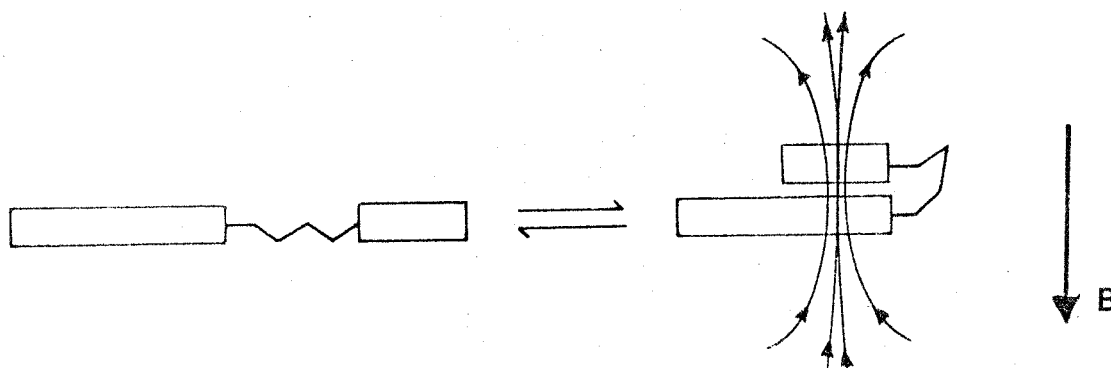


Fig. 3: Dosage acido-basique du modèle PF-C<sub>3</sub>- A de 13  
Solvant : éthanol ;  $c = 4,4 \cdot 10^{-4}$  moles.  $\text{l}^{-1}$

Cette technique nous a permis de connaître la concentration de nos solutions avec une bonne précision.

## B. ETUDE PAR RMN :

La spectroscopie de RMN permet de détecter avec une grande sensibilité les variations conformationnelles d'une molécule. Plusieurs travaux ont été réalisés dans le domaine que nous nous proposons d'étudier, à savoir l'observation du complexe intramoléculaire présent dans l'équilibre "forme ouverte  $\rightleftharpoons$  forme repliée", notamment en série dinucléotides (59) et intercalants de l'ADN (23,60).



Dans la forme complexée, l'anisotropie diamagnétique d'un cycle aromatique provoque un blindage des protons du cycle opposé par rapport aux signaux observés pour chaque système isolé.

Comme pour l'étude en spectroscopie d'absorption, nous devons nous affranchir des interactions intermoléculaires, et travailler en solution diluée.

Pratiquement, nous enregistrerons une série de spectres pour chaque produit à des concentrations comprises entre  $8 \cdot 10^{-4}$  et  $4 \cdot 10^{-5}$  moles.  $l^{-1}$ . Comme il existe d'importantes variations de déplacements chimiques  $\delta$  avec la concentration, nous extrapolerons la valeur de  $\delta$  pour chaque proton à dilution infinie. Pour un proton donné, la différence de déplacement chimique  $\Delta\delta$  entre le produit

de référence PF-C<sub>2</sub> 2 et les modèles PF-C<sub>3</sub> -Base nous fournira des informations complémentaires des mesures effectuées en UV, particulièrement sur la géométrie du complexe intramoléculaire.

## II. ETUDE DU MODÈLE PF-C<sub>3</sub>-ADE 13.

### A. SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION :

#### 1 | EFFET HYPOCHROME.

Afin d'opérer dans des conditions comparables aux mesures effectuées sur l'ADN, nous avons utilisé l'eau (contenant 5 % d'éthanol pour des raisons de solubilité des produits) comme solvant, et à pH = 5,5 de façon à protoner la totalité des noyaux acridine.

Nous avons comparé le spectre UV du modèle PF-C<sub>3</sub> -Ade 13 à ceux des deux produits de référence PF-C<sub>2</sub> 10 et Ade-C<sub>3</sub> (Fig. 4) à 20°C.

Nous avons vérifié que l'absorption de chacun de ces composés obéit à la loi de BEER-LAMBERT, et que la somme des spectres des produits de référence est égale au spectre du mélange de ces produits ; la différence observée n'est donc pas due à des interactions intermoléculaires.

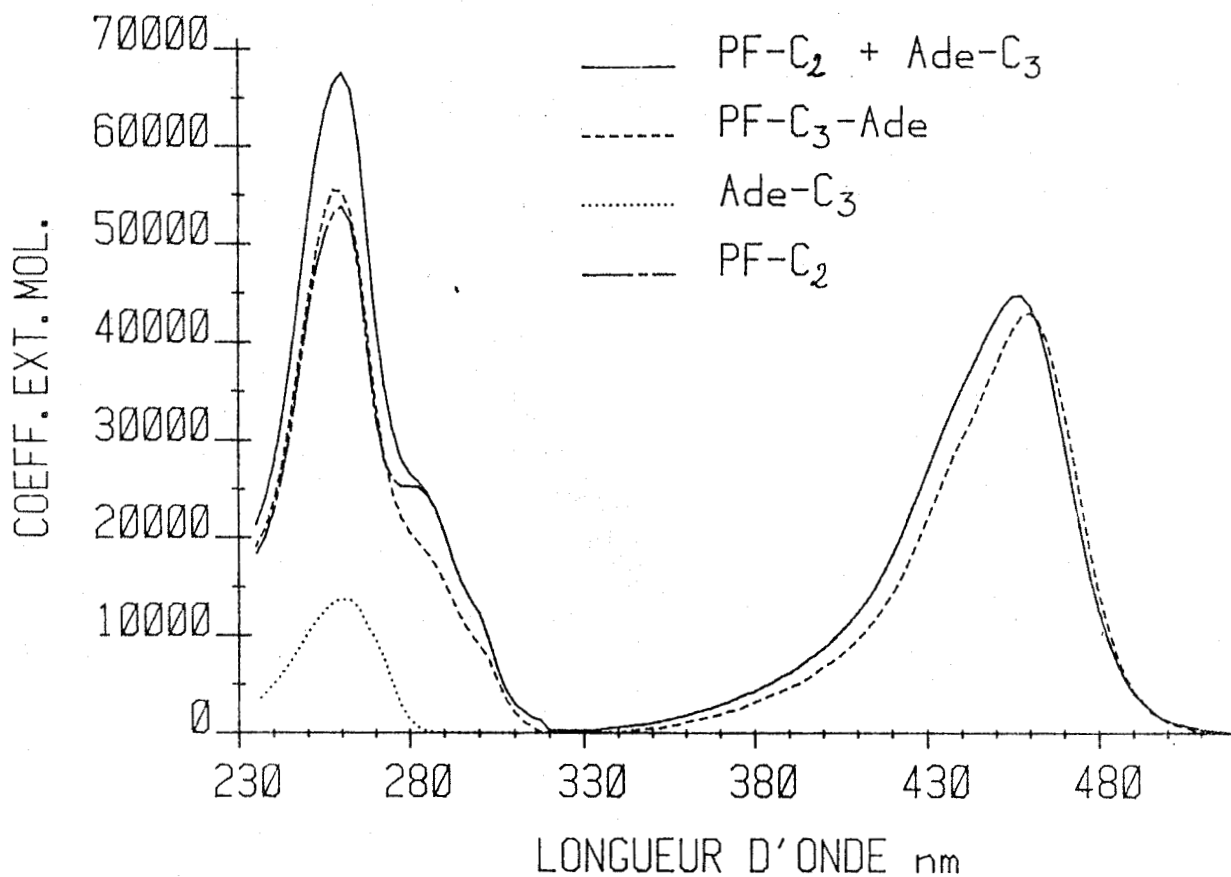


Fig. 4 : Spectres UV du modèle PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 et des produits de référence PF-C<sub>2</sub> 10 et Ade-C<sub>3</sub>

Solvant : H<sub>2</sub>O, pH= 5,5 ; 5 % éthanol ; c=1,5.10<sup>-5</sup> moles. l<sup>-1</sup> ; T=22°C

Dans le spectre de PF-C<sub>3</sub>-Ade, nous remarquons une diminution d'intensité au maximum d'absorption (460 nm), ainsi qu'un effet bathochrome de 2,5 nm.

Ces spectres sont directement comparables à ceux décrits par G. WEILL et M. CALVIN (Fig. 8 page 9) lors de leur étude d'intercalation de la proflavine dans l'ADN (18) : même déplacement vers les grandes longueurs d'onde et hypochromicité du même ordre ; cela montre qu'il s'agit d'un phénomène de même nature.

Nous avons mesuré l'effet hypochrome de PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 par rapport à PF-C<sub>2</sub> 10 entre 520 et 320 nm, domaine où Ade-C<sub>3</sub> n'absorbe pas :

$$H \% = 11,7 \% \\ 520-320$$



Le tableau 2 indique les valeurs de H % mesurées dans différents domaines d'absorption.

Domaine d'absorption (nm)	520-320	520-360	520-460	460-360
H %	11,7	10,8	-5,2	16,0

*Tableau 2 : Effet hypochrome (PF-C<sub>3</sub>-Ade) suivant le domaine de longueur d'onde*

Généralement, H % est mesuré pour une seule transition électronique ; nous avons choisi l'intervalle 520-360 nm de façon à obtenir une valeur plus précise ; les erreurs de mesure dans le domaine de faible absorption 360-320 nm introduisent des variations importantes sur la force d'oscillateur calculée, et donc une forte incertitude sur H %.

Cette valeur de 11,7 % est du même ordre de grandeur que celles présentées dans le tableau 1 (page 65). Il s'agit bien d'un indice d'une forte interaction entre les deux chromophores ; mais cette seule valeur n'est pas suffisante pour déterminer l'état de l'équilibre "forme ouverte  $\rightleftharpoons$  forme repliée" du complexe.

## 2| DEGRE D'EMPILEMENT.

Pour déterminer par spectroscopie UV la constante K de l'équilibre "forme ouverte  $\rightleftharpoons$  forme repliée", il nous faut connaître les caractéristiques UV du complexe pur en solution. Il faut donc faire varier un paramètre qui agit sur le pourcentage de forme complexée.

Dans ce but, et pour donner une signification à la valeur même de  $H\% = 11,7\%$ , nous avons étudié la variation de l'effet hypochrome en fonction de la température entre 0 et 75°C (Fig. 5).

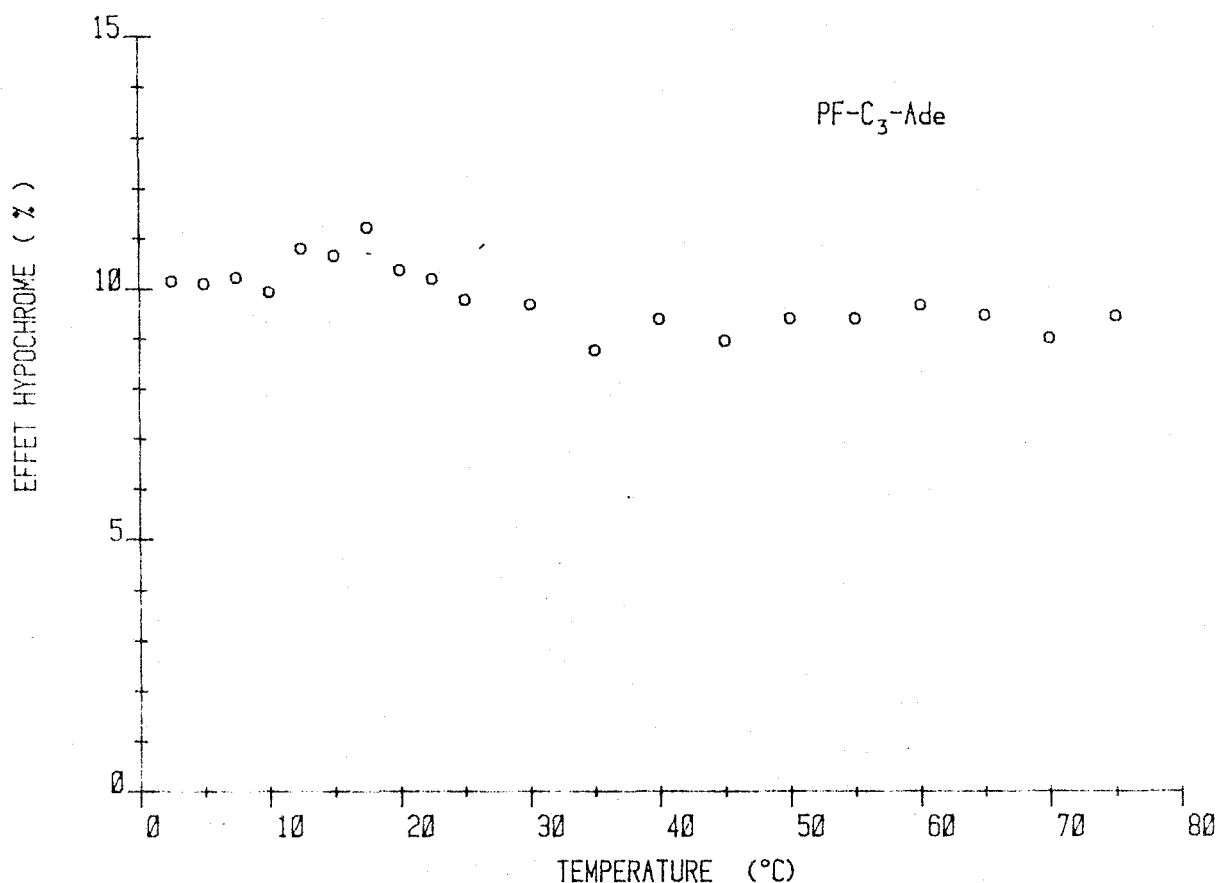


Fig. 5 : Valeurs de  $H\%$  en fonction de la température

Nous voyons que la valeur de  $H\%$  est constante jusqu'à 75°C, température la plus élevée à laquelle nous pouvons travailler avec le mélange eau-éthanol 5 %.

L'interprétation la plus probable de cette stabilité est que les interactions sont tellement fortes qu'elles ne sont pas perturbées dans ces conditions. Il semble donc que le complexe PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 est à 100 % sous forme repliée dans cette gamme de température.

Le modèle Acr-C<sub>3</sub>-Ade (Fig. 12 page 15) a montré les mêmes propriétés. Celles-ci ont été vérifiées par une étude en RMN et par calcul des valeurs théoriques de blindage des différents protons suivant les constantes d'écran de l'adénine et de l'acridine. Ce résultat confirme bien notre interprétation (23).

Nous avons bien obtenu les caractéristiques UV du complexe pur en solution. Mais pour déterminer les valeurs d'énergie d'interaction, il faut observer une variation du pourcentage de complexe avec la température, comme le montre la figure 6 pour le modèle Pso-C<sub>4</sub>-Ade (Fig. 12 page 15) (33) :

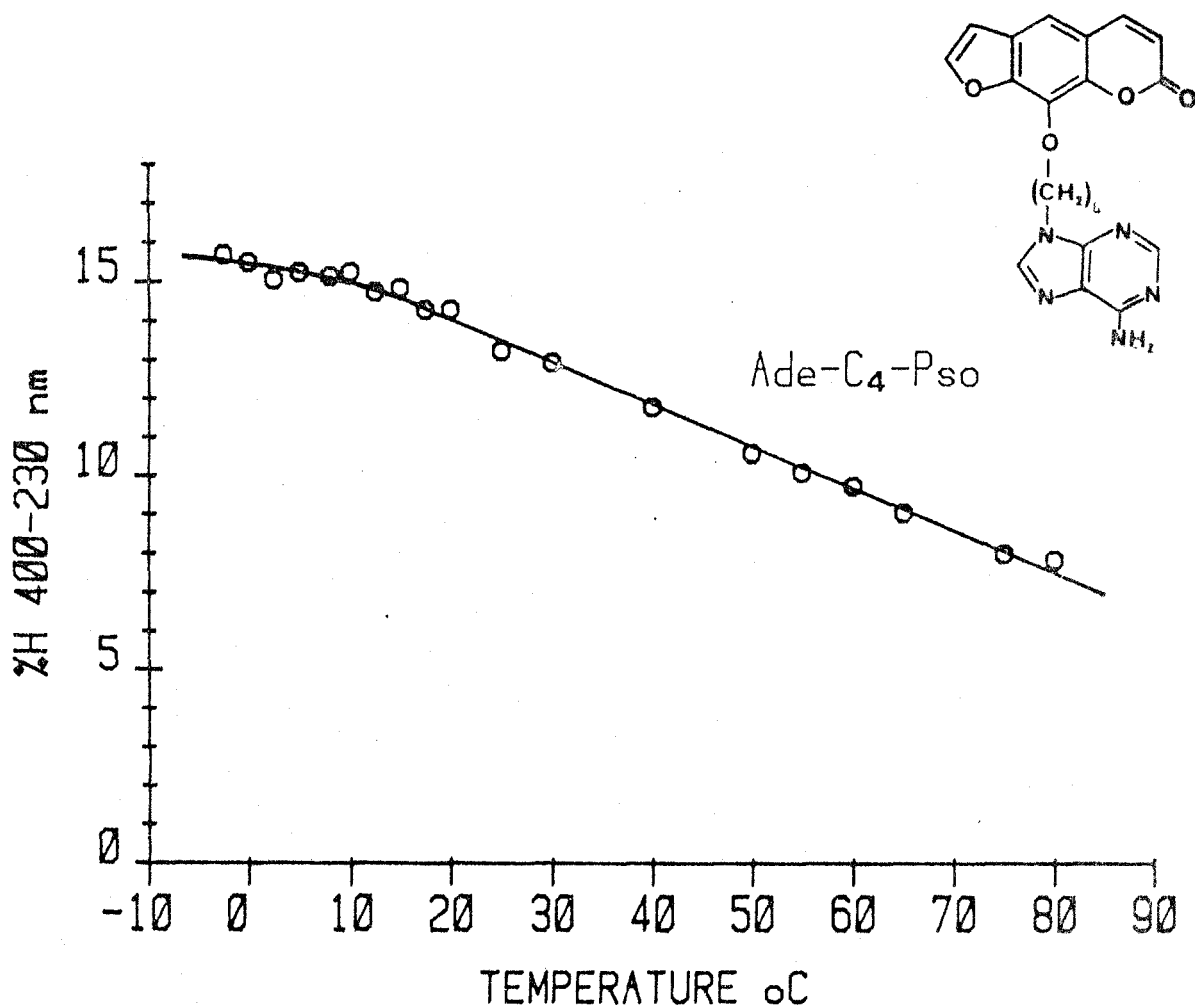


Fig. 6 : Variation de l'effet hypochromé du modèle Pso-C<sub>4</sub>-Ade en fonction de la température

La valeur de K est obtenue par la relation suivante

$$K = \frac{H \%}{\frac{H \% - H \%_{\max}}{\max}}$$

et permet d'accéder aux paramètres thermodynamiques  $\Delta H^\circ$  et  $\Delta S^\circ$  de l'équilibre "forme ouverte  $\rightleftharpoons$  forme repliée".

Le modèle PF-C<sub>3</sub> -Ade 13 ne montrant pas de variations d'effet hypochrome dans ces conditions, de tels calculs ne sont pas possibles.

Toutefois, nous pouvons en déduire que les forces mises en jeu sont extrêmement importantes.

### B. ETUDE PAR RMN :

Les spectres de RMN des produits PF-C<sub>3</sub> -Ade 13, PF-C<sub>2</sub> 10 et Ade-C<sub>3</sub> ne sont pas comparables directement, à cause de la formation possible d'aggrégats dans l'eau. Il est donc nécessaire de considérer seulement les déplacements chimiques  $\delta$  à dilution infinie.

Nous avons tracé les courbes de  $\delta$  en fonction de la concentration (entre  $8 \cdot 10^{-4}$  et  $5 \cdot 10^{-5}$  moles. l<sup>-1</sup>) pour PF-C<sub>3</sub> -Ade 13 et PF-C<sub>3</sub> 10 (Fig. 7). Le produit de référence Ade-C<sub>3</sub> a été étudié précédemment dans les mêmes conditions au laboratoire.

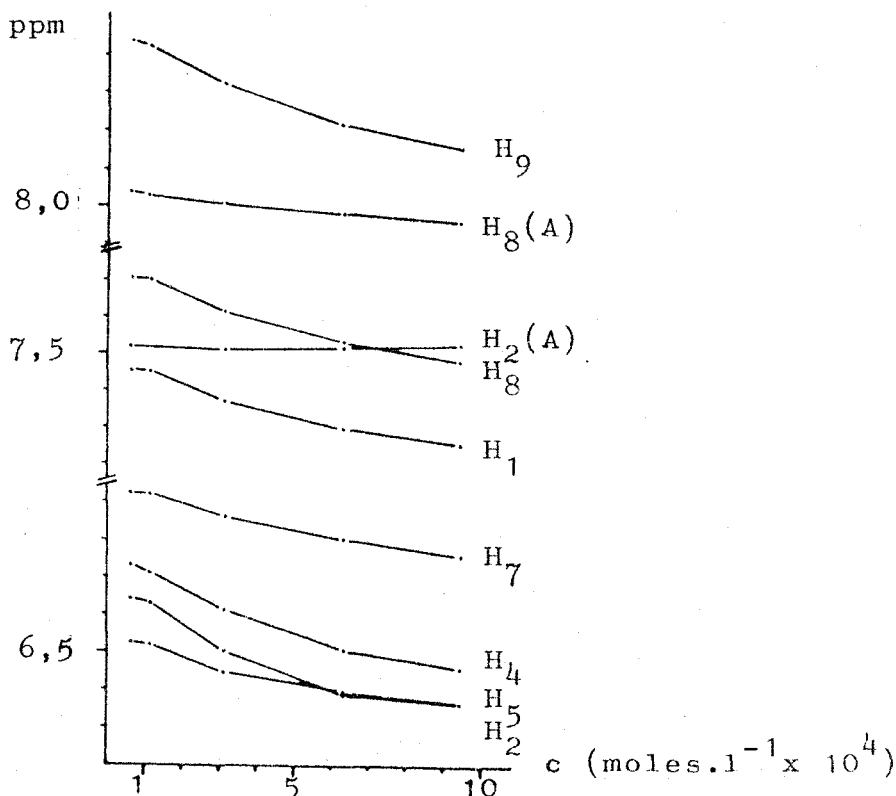


Fig. 7 : Variation des déplacements chimiques en fonction de la concentration

La partie correspondant aux protons aromatiques des spectres est représentée à la fig. 8.

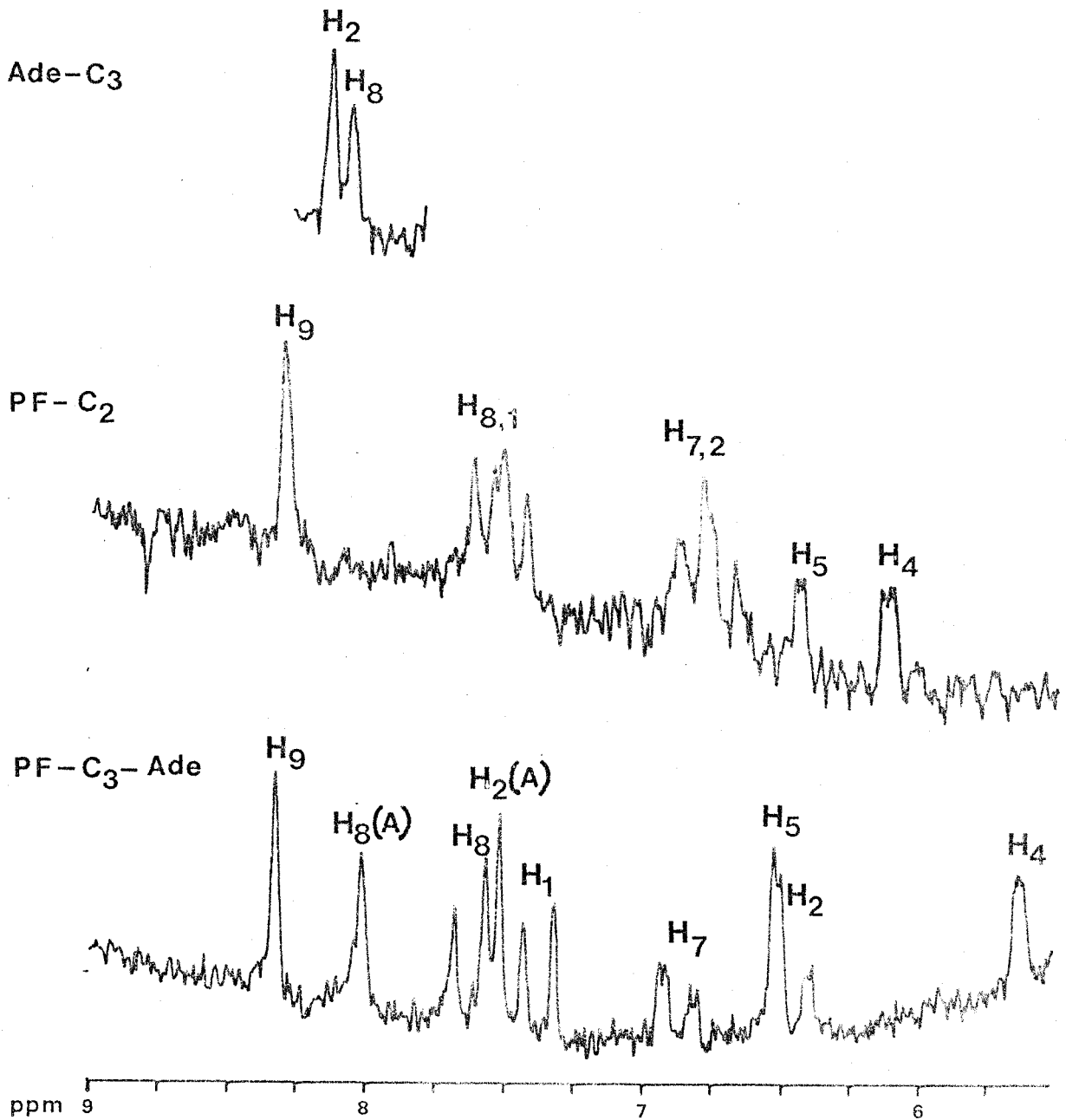


Fig. 8 : Spectres de RMN du modèle PF-C<sub>3</sub>-Ade et des deux produits de référence PF-C<sub>2</sub> et Ade-C<sub>3</sub>

(Solvant : D<sub>2</sub>O, pD=4,6 ; C=2.10<sup>-4</sup> moles.l<sup>-1</sup> ; T=27°C)



Nous observons une modification importante dans le spectre du modèle :

- un déblindage important du proton H<sub>2</sub> de l'adénine (  $\Delta\delta$  0,60 ppm à dilution infinie ) .
- les protons H<sub>1</sub> et H<sub>8</sub> de la proflavine résonnent sous forme de deux doublets distincts, ainsi que les protons H<sub>2</sub> et H<sub>7</sub> .
- le proton H<sub>4</sub> subit également un blindage considérable.

De façon à traiter quantitativement ces informations, nous avons calculé le  $\Delta\delta$  pour chaque proton :

$$\Delta\delta = \delta_{\text{référence}} - \delta_{\text{modèle}}$$

et ces valeurs sont reportées dans le tableau 3.

	H <sub>9</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>1</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>4</sub>		
PF-C <sub>3</sub>	8,52	7,75	7,65	6,95	6,84	6,68	6,35	H <sub>2</sub>	H <sub>8</sub>
Ade-C <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	8,12	8,05
PF-C <sub>3</sub> -Ade	8,46	7,71	7,46	6,93	6,53	6,65	5,77	7,52	8,04
$\Delta\delta$ (ppm)	0,06	0,04	<u>0,19</u>	0,02	<u>0,31</u>	0,03	<u>0,58</u>	<u>0,60</u>	0,01

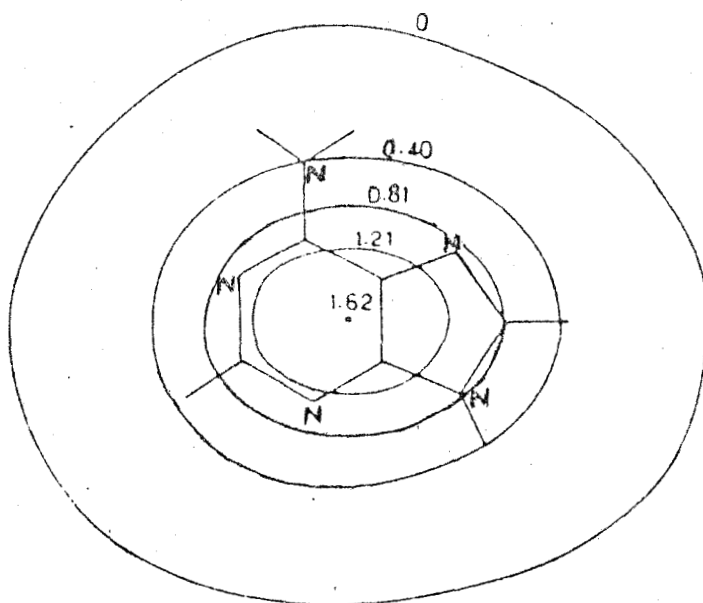
Tableau 3 : Valeur des  $\delta$  à dilution infinie pour PF-C<sub>3</sub>-Ade 13

Les déplacements chimiques vers les hauts champs sont dus à l'anisotropie diamagnétique créée par un système aromatique par rapport à l'autre : c'est le cas des protons H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> et H<sub>4</sub> de la proflavine, et du proton H<sub>2</sub> de l'adénine.

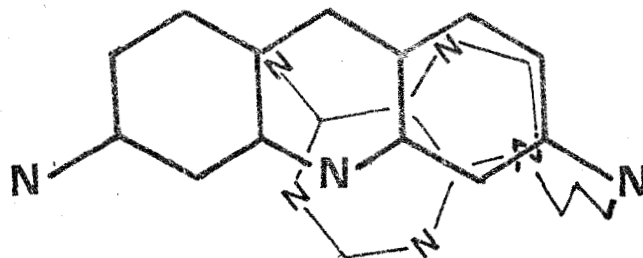
Les valeurs élevées de ces  $\Delta\delta$  sont caractéristiques de forces d'empilement très importantes. On remarque d'autre part que

les signaux correspondant à la chaîne triméthylénique forment des massifs mal résolus, signe que les protons portés par un même carbone ne sont plus magnétiquement équivalents. Cet effet est dû à une diminution des degrés de liberté de la chaîne, ce qui signifie que le complexe intramoléculaire est relativement figé.

Les courants de cycle calculés pour les bases nucléiques par G. GIESSNER-PRETTRE et B. PULLMANN ont permis d'obtenir la courbe d'iso-écran de l'adénine représentée ci-contre (61) :



En tenant compte des contraintes imposées par la longueur de chaîne (3 carbones) et des  $\Delta\delta$  mesurés pour les protons  $H_1$ ,  $H_2$  et  $H_4$  de la proflavine, nous pouvons proposer la géométrie suivante pour le complexe PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 :



La comparaison entre les  $\Delta\delta$  mesurés et les  $\Delta\delta$  déterminés d'après les courbes d'iso-écran montre que cette conformation est la plus probable.

Les résultats obtenus par cette technique confirment bien la forme repliée du modèle postulée après les mesures effectuées par spectroscopie d'absorption, avec une géométrie très proche de celle observée pour la proflavine intercalée dans l'ADN.

### III. ÉTUDE DU MODÈLE PF-C<sub>3</sub>-THY 15

#### . SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION :

Nous avons effectué les mêmes mesures pour ce modèle, dans des conditions semblables aux précédentes.

##### 1) EFFET HYPOCHROME.

La différence entre le spectre de PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 et le produit de référence PF-C<sub>2</sub> 10 est moins importante qu'en série adénine (Fig. 9).

On remarque une diminution du coefficient d'extinction molaire au maximum d'absorption, mais il n'y a pas d'effet bathochrome notable dans ce cas.

La valeur de l'effet hypochrome mesuré est :

$$H \% = \frac{6,8}{520-360} \%$$

Ce résultat concorde avec toutes les valeurs de la littérature concernant les différents modèles en série thymine ; les analogues de nucléotides pyrimidine-C<sub>3</sub> - pyrimidine, comme Thy-C<sub>3</sub> -Thy (24), ainsi que les Intercalant -C<sub>n</sub>-Thy (23,27,29,30,32, 33) montrent un effet hypochrome moins important qu'en série adénine (tableau 4).



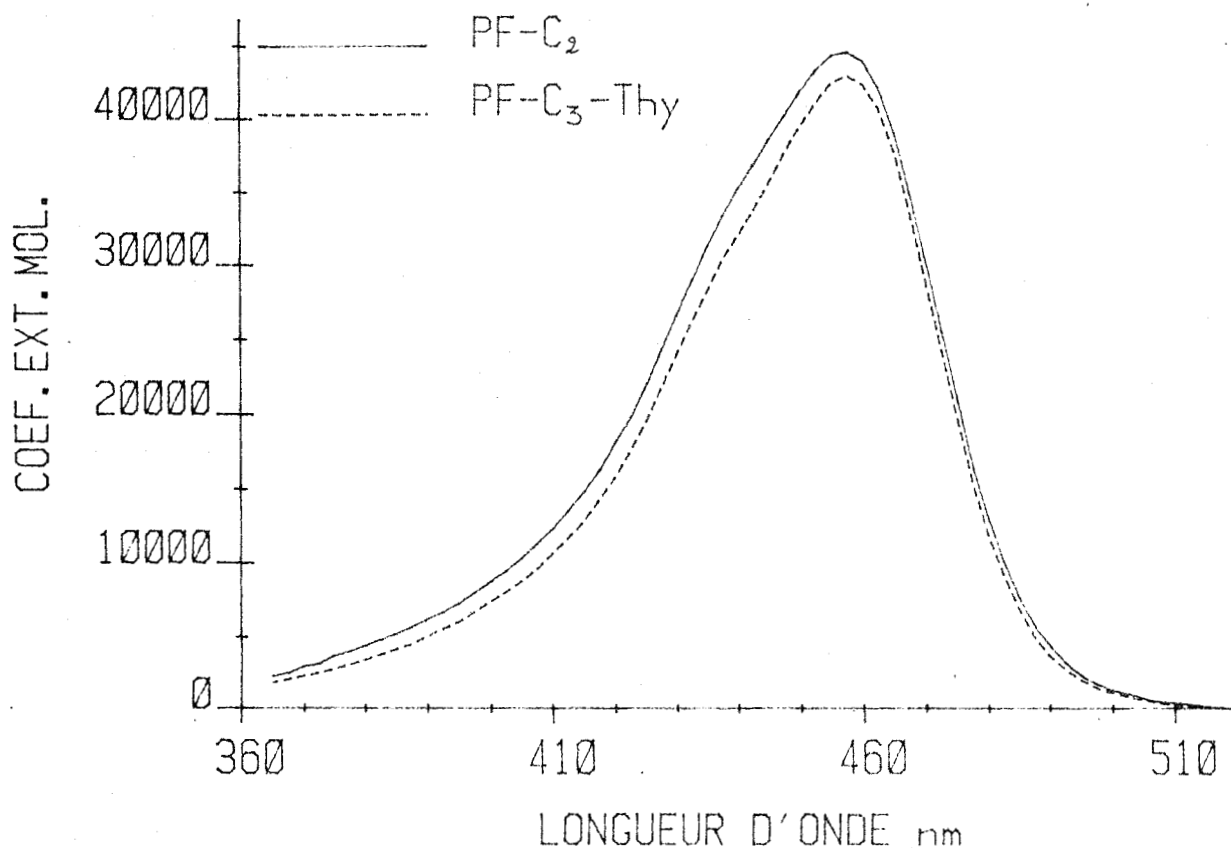


Fig. 9 : Spectre UV de PF-C<sub>3</sub>-Thu et de PF-C<sub>2</sub>  
 (solvant: H<sub>2</sub>O. pH = 5.5 : 5 % éthanol : c = 1.10<sup>-5</sup> moles. l<sup>-1</sup> : T = 22°C)

	H %		H %
Thy-C <sub>3</sub> -Thy	7 %	Ade-C <sub>3</sub> -Ade	16,5% (24)
Acr-C <sub>3</sub> -Thy	14 %	Acr-C <sub>3</sub> -Ade	20% (23)
Pso-C <sub>3</sub> -Thy	10 %	Pso-C <sub>3</sub> -Ade	15% (32,33)
PF-C <sub>3</sub> -Thy	6,8 %	PF-C <sub>3</sub> -Ade	11,7%

Tableau 4 : Valeurs de H % mesurées en série thymine et adénine pour les modèles présentés à la Fig.12 Page 15.



Cette différence dans les valeurs de H % peut être attribuée au fait que la thymine ne possède qu'un faible caractère aromatique, créant des perturbations moins importantes dans le spectre d'absorption de la proflavine.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons conclure qu'il existe bien des interactions importantes entre les chromophores du modèle PF-C<sub>3</sub>-Thy 15, de nature analogue à celles qui sont observées dans l'ADN.

## 2 | FORCE DES INTERACTIONS.

Selon la même démarche que pour le modèle PF-C<sub>3</sub>-Ade 13, nous avons suivi l'évolution de H % en fonction de la température, afin d'essayer de quantifier les forces mises en jeu lors de ces interactions (Fig. 10).

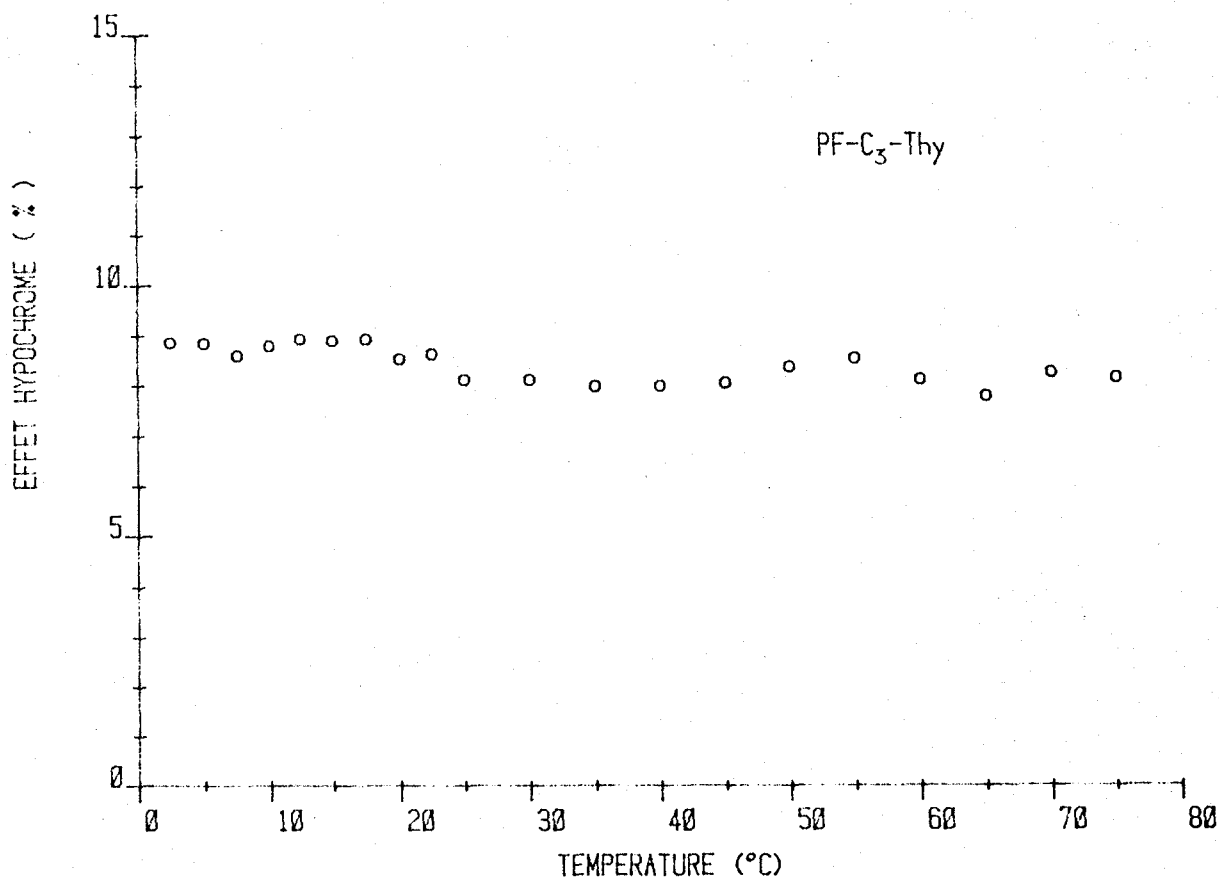


Fig. 10 : Valeurs de H % en fonction de la température

Le résultat obtenu est inattendu : l'effet hypochrome observé est constant jusqu'à 75°C, comme pour le composé PF-C<sub>3</sub>-Ade 13.

Il semble donc que les interactions entre la proflavine et la thymine persistent dans l'eau quel que soit le domaine de température, et donc que ce modèle soit entièrement sous forme complexée.

Les autres modèles Intercalant-Cn-Thy préparés dans notre laboratoire (Fig. 12, page 15) montrent tous une décroissance de H% quand la température augmente ; parmi ceux-ci, seul Acr-C<sub>3</sub>-Thy voit son degré de repliement diminuer très lentement dans ces conditions.

Les forces mises en jeu dans le complexe PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 semblent être supérieures à celles de tous les autres modèles étudiés au laboratoire.

## B. ETUDES PAR RMN :

De façon à confirmer les mesures effectuées en spectroscopie d'absorption, nous avons mené la même étude que pour le modèle PF-C<sub>3</sub>-Ade 13. Les spectres de RMN de PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 et des deux produits de référence sont représentés à la fig. 11.

A priori, aucun effet n'est attendu sur le noyau proflavine même si l'empilement est de 100 %, car l'effet de courant de cycle de la thymine est très peu important. L'étude de l'interaction ne peut donc se faire qu'en observant les signaux correspondant au proton H<sub>6</sub> et au groupement méthyle en position 5 de la thymine.

Nous avons extrapolé les valeurs de  $\delta$  à dilution infinie, en opérant à des concentrations variant entre  $3 \cdot 10^{-4}$  à  $4 \cdot 10^{-5}$  moles.l<sup>-1</sup>. Ces valeurs sont reportées dans le tableau 5.

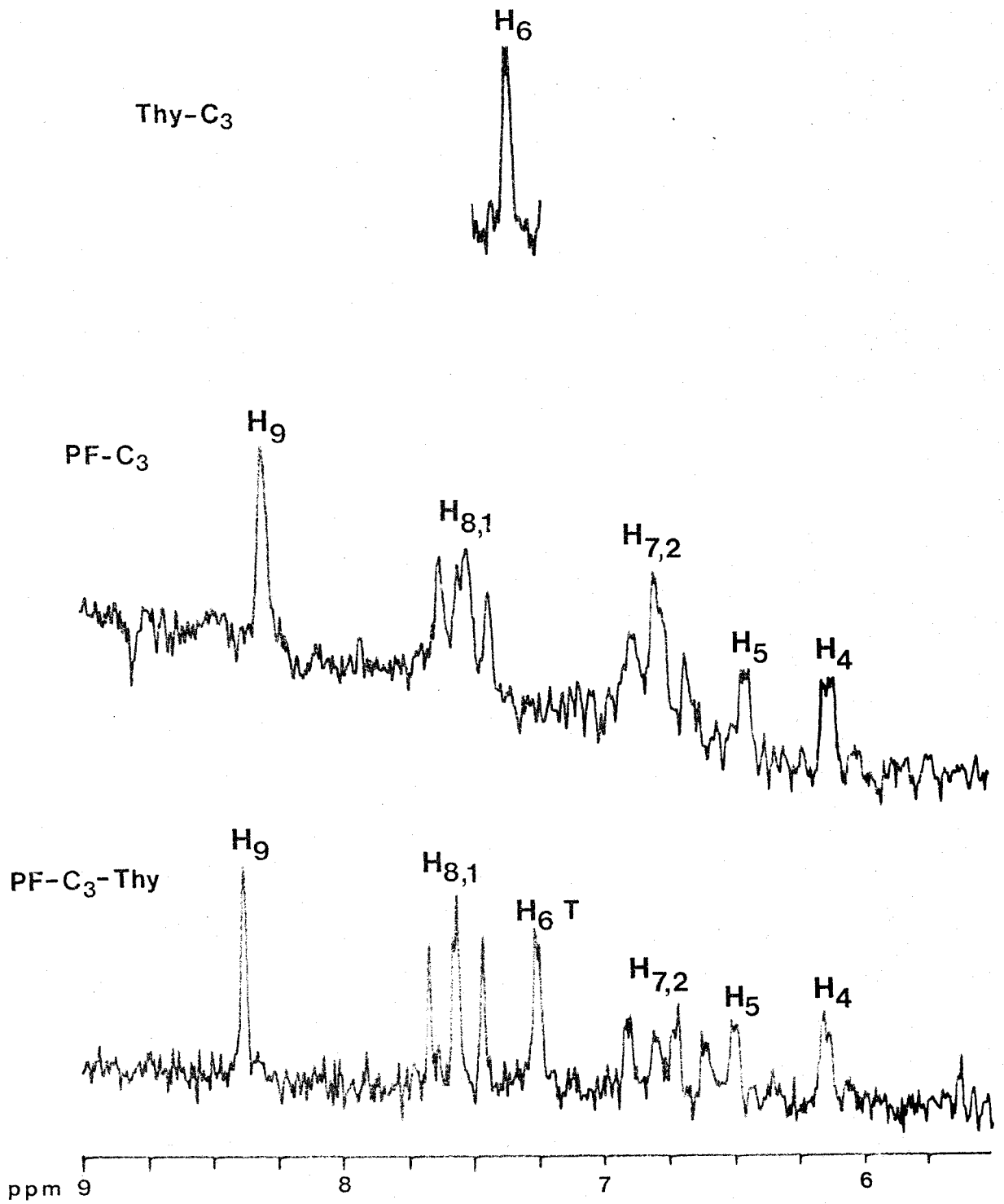


Fig. 11 : Spectres de RMN de PF-C<sub>3</sub>-Thy 15, PF-C<sub>2</sub> 10 et Thy-C<sub>3</sub>  
(solvant: D<sub>2</sub>O, pD = 4,6 ; C = 2.10<sup>-4</sup> moles. L<sup>-1</sup> ; T = 27°C)

	H <sub>9</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>1</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>6</sub> (T)	CH <sub>3</sub> (T)
Thy-C <sub>3</sub> (ppm)								7,37	1,72
PF-C <sub>3</sub> (ppm)	8,52	7,75	7,65	6,95	6,84	6,68	6,35		
PF-C <sub>3</sub> -Thy (ppm)	8,60	7,76	7,66	6,85	6,79	6,72	6,43	7,27	1,43
$\Delta\delta$ (ppm)	-0,08	-0,01	-0,01	0,10	0,05	-0,04	-0,08	0,10	0,29

Tableau 5 : Valeurs des  $\delta$  à dilution infinie pour PF-C<sub>3</sub>-Thy

On remarque deux valeurs significatives de  $\Delta\delta$  : le proton H<sub>6</sub> et le groupement méthyle en position 5 de la thymine subissent un blindage de 0,10 et 0,29 ppm respectivement. Il s'agit bien d'un indice de forte interaction entre les deux noyaux : dans le modèle Acr-C<sub>3</sub>-THY (Fig. 12 page 15), les  $\Delta\delta$  correspondants sont de 0,40 et 0,44 ppm dans la forme repliée.

Les informations fournies par l'étude en RMN de ce modèle ne permettent pas d'accéder à la géométrie du complexe, car nous ne disposons que de deux sondes caractéristiques : le proton H<sub>6</sub> et le groupement méthyle de la thymine.

Nous pouvons toutefois conclure qu'il existe bien des interactions fortes entre la proflavine et la thymine, ce qui confirme les résultats de l'étude faite en spectroscopie UV.

#### IV. ÉTUDE DE LA NATURE DES INTERACTIONS.

Les deux systèmes PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 et PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 sont sous forme complexée à 100 % dans l'eau quelle que soit la température.

Afin de déterminer la nature des forces qui favorisent ces très fortes interactions, nous avons mesuré l'effet d'un solvant organique sur ces complexes.

Nous avons choisi l'éthanol, transparent jusqu'à 230nm en UV, et permettant de travailler dans des mélanges eau-éthanol de composition variable. D'autre part, nous pourrions comparer les résultats obtenus avec ceux des autres modèles étudiés dans les mêmes conditions au laboratoire.

Travaillant en solution tamponnée dans les mélanges, la quantité d'acide acétique (ou d'acétate de sodium selon l'état du produit) nécessaire à la protonation du noyau acridine a été rajoutée à chaque solution dans l'éthanol pur.

#### A. INFLUENCE DU SOLVANT SUR LE SPECTRE D'ABSORPTION DU PRODUIT DE REFERENCE PF-C<sub>2</sub> 10 :

La figure 12 montre les spectres de ce produit obtenus à 5 % et 100 % d'éthanol.

On remarque un très important effet de solvant : le coefficient d'extinction molaire passe de 44700 à 62500 l. mole<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> dans l'éthanol pur, avec un déplacement de 10 nm vers les grandes longueurs d'onde.

Pour déterminer l'effet hypochrome, il nous faudra donc calculer les forces d'oscillateur des deux modèles PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 et PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 dans les mêmes conditions que le produit de référence à chaque pourcentage d'éthanol.

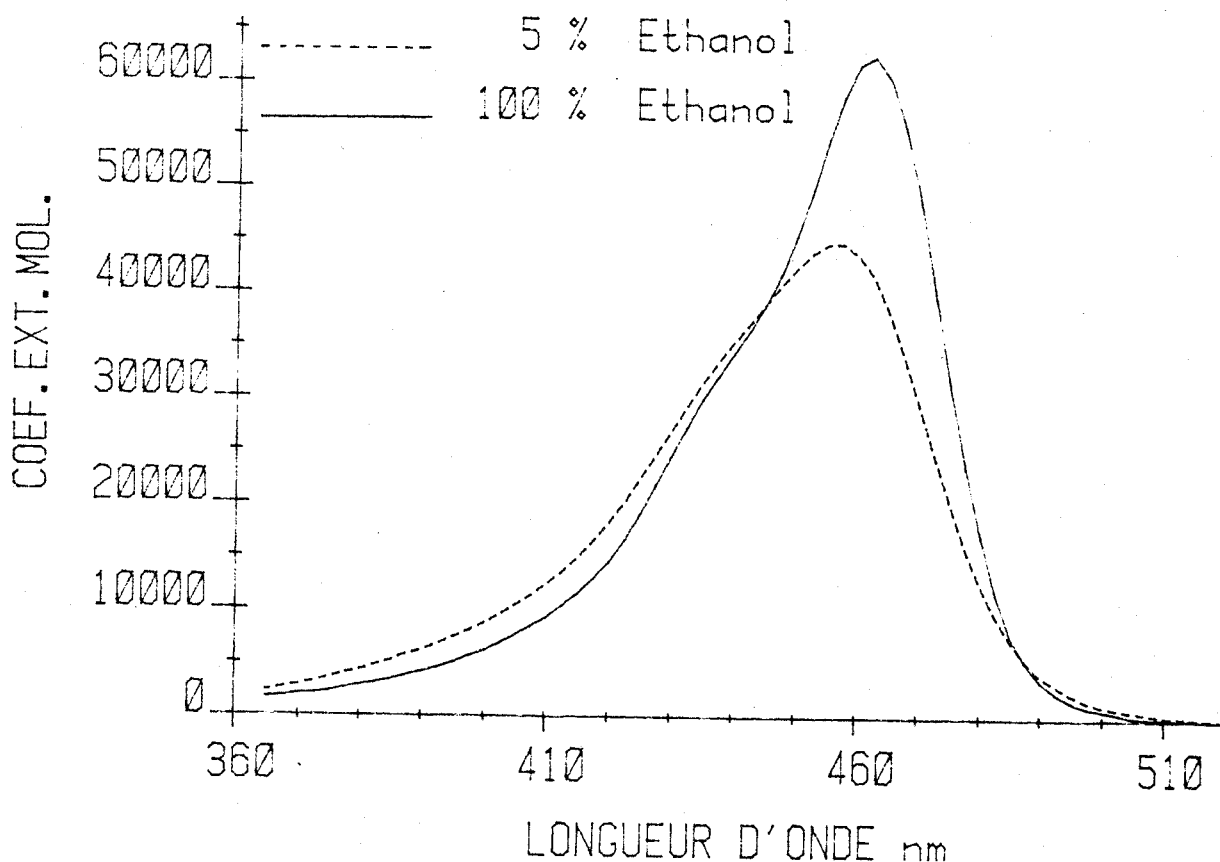


Fig. 12 : Spectre UV de PF-C<sub>2</sub> 10  
5 % et 100 % éthanol  $c = 1,6 \cdot 10^{-5}$  moles.  $\text{l}^{-1}$ ;  $T = 22^\circ\text{C}$

B. ETUDE DU MODELE PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 :

Les variations de forces d'oscillateur du produit de référence et du modèle PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 en fonction du pourcentage d'éthanol sont représentées à la fig. 13, ainsi que les effets hypochromes correspondants.

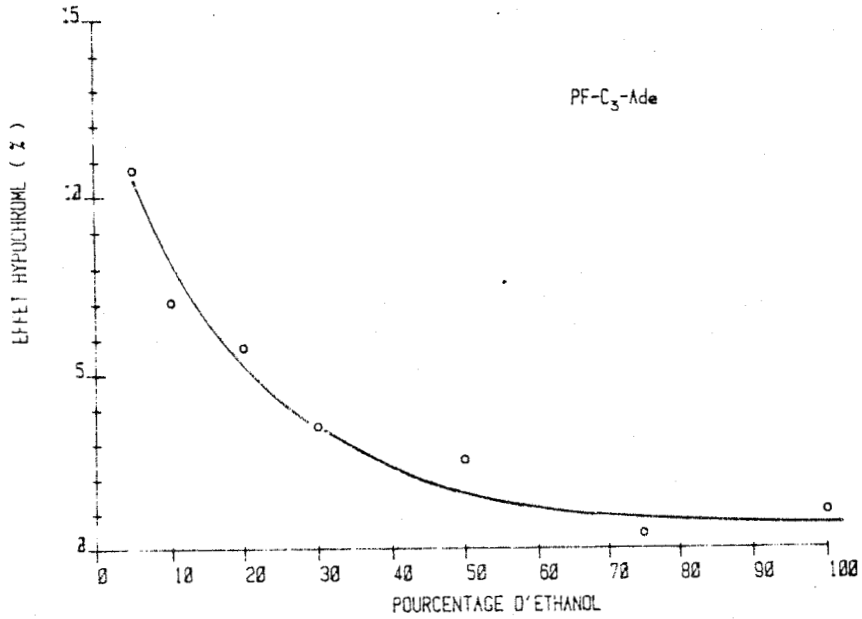
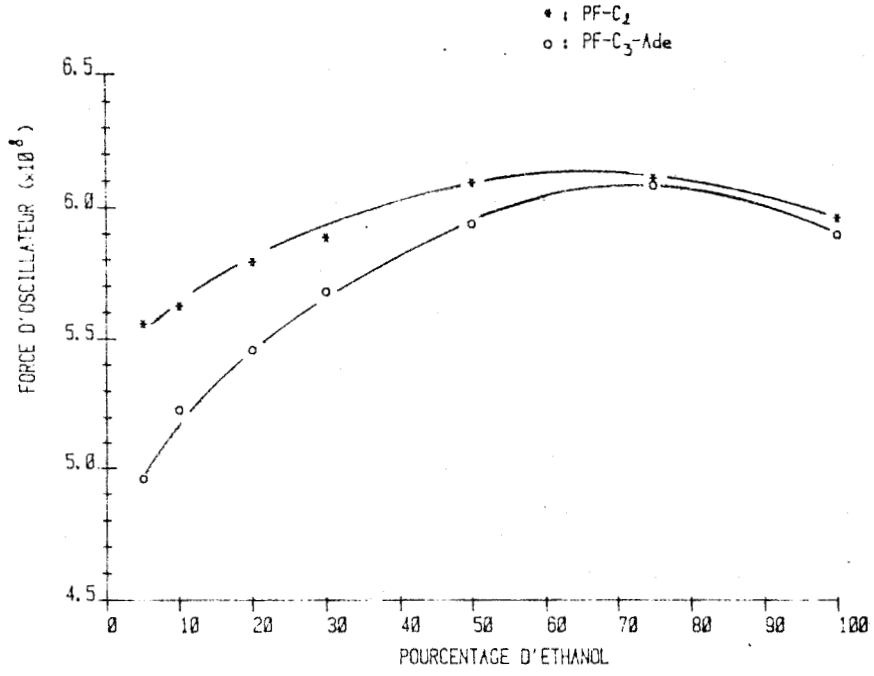


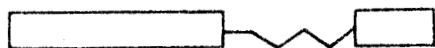
Fig. 13 : Effet du pourcentage d'éthanol sur les propriétés du modèle PF-C<sub>3</sub>-Ade 13





On observe une décroissance rapide de H % quand la teneur en éthanol augmente.

Dans l'éthanol pur, l'effet hypochrome est voisin de 0%, ce qui signifie que les interactions entre les deux noyaux ont presque entièrement disparu, donc que le modèle est essentiellement sous forme ouverte :



Les spectres de différence de coefficients d'extinction molaire  $\Delta\epsilon$  entre le produit de référence et le modèle ( $\epsilon_{PF-C_2} - \epsilon_{PF-C_3-Ade}$ ) illustrent bien ce changement de conformation (Fig. 14).

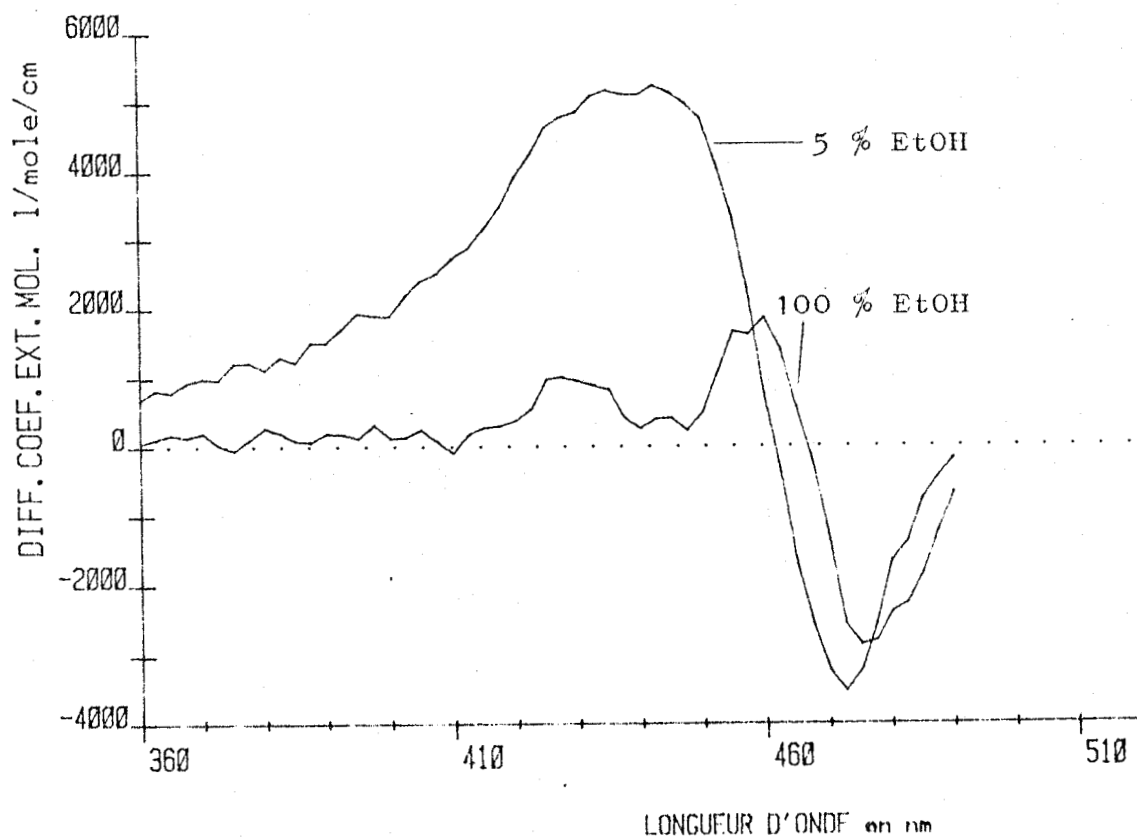


Fig. 14 : Spectres de différence entre PF-C<sub>2</sub> et PF-C<sub>3</sub>-Ade 5% et 100% d'éthanol

Dans l'éthanol pur, le  $\Delta\epsilon$  est toujours inférieur à  $2000 \text{ l. mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; la différence dans le domaine 460-360 nm, importante à 5 % d'éthanol et rendant essentiellement compte de la valeur de  $H \% = 11,7 \%$ , est quasi nulle à 100 % de ce solvant.

La décroissance de l'effet hypochrome en milieu organique est en faveur d'une nature essentiellement "hydrophobe" des interactions mises en jeu. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en série amino-4 quinoléine (29, 30), amino-9 acridine (23) et psoralène (32, 33).

Nous pouvons en déduire que la forme repliée de PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 dans l'eau est due à des interactions "proflavine-adénine" plus favorables, sur le plan énergétique, que "proflavine-eau" et "adenine-eau".

### C. ETUDE DU MODELE PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 :

Nous avons opéré dans les mêmes conditions que pour PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 en pourcentage variable d'éthanol.

Mais dans ce cas, les courbes de force d'oscillateur du produit de référence PF-C<sub>2</sub> 10 et du modèle PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 sont parallèles quand la teneur en éthanol varie : l'effet hypochrome résultant est donc constant sur toute la gamme, aux erreurs expérimentales près (Fig. 15).

Ce résultat est surprenant, dans la mesure où les bases pyrimidiques sont connues pour mettre en jeu des forces d'interaction moins importantes que les bases puriques. Les différents modèles Intercalant -C<sub>n</sub>-Thy étudiés au laboratoire (Fig. 12 page 15) montrent dans tous les cas :

- Une décroissance importante de  $H \%$  quand le pourcentage d'éthanol augmente.
- Un faible effet hypochrome dans l'éthanol pur, donc une faible proportion de forme complexée (23,29,32) ; par exemple, Pso-C<sub>3</sub>Ade  $H \% = 1,5 \%$ .

Il en est de même pour le modèle Thy-C<sub>3</sub>-Thy, analogue de dinucléotide (24).

Cette propriété particulière du modèle PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 ne nous permet pas de conclure sur la nature des interactions mises en jeu dans le complexe, comme nous l'avons fait pour le composé PF-C<sub>3</sub>-Ade 13, un tel phénomène n'ayant jamais été observé auparavant.

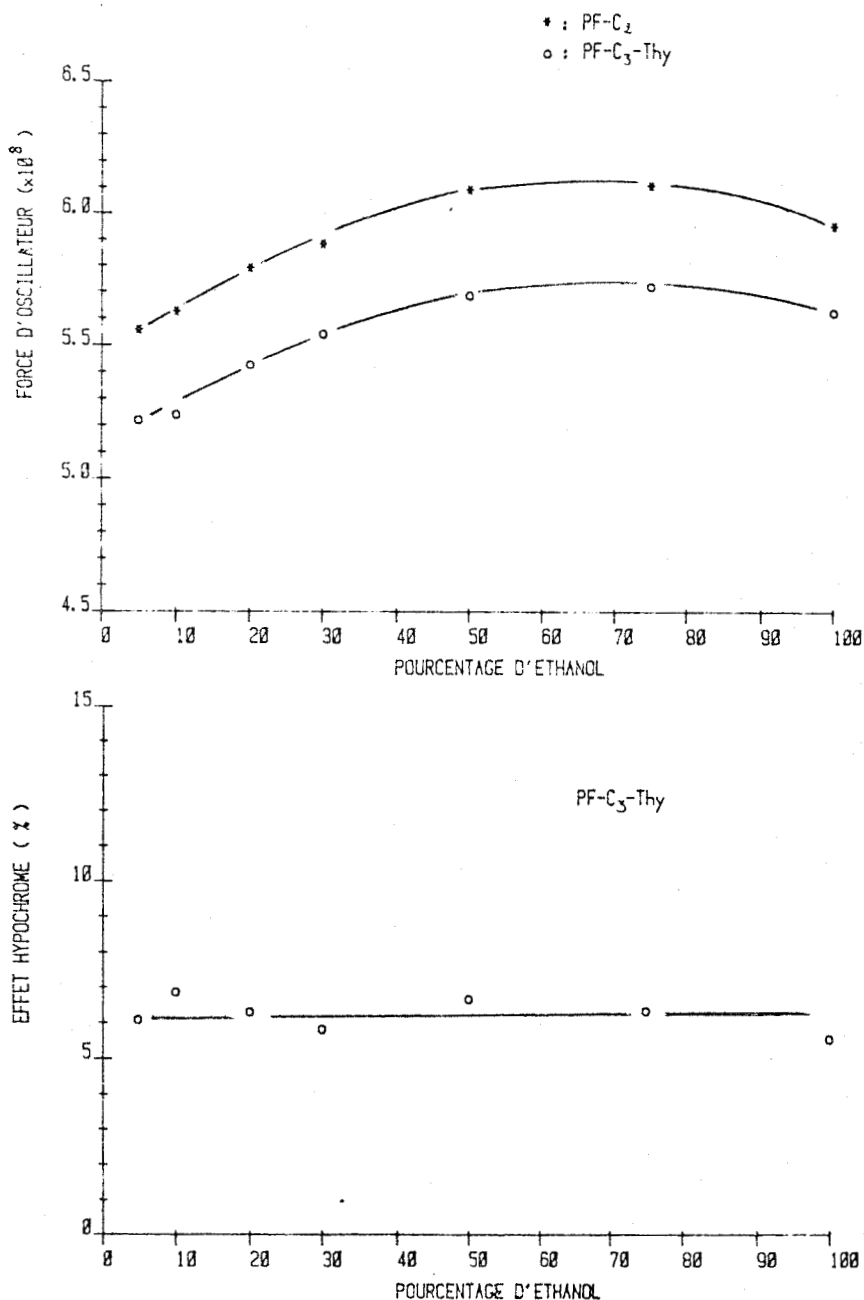


Fig. 15 : Effet de pourcentage d'éthanol sur les propriétés du modèle PF-C<sub>3</sub>-Thy 15

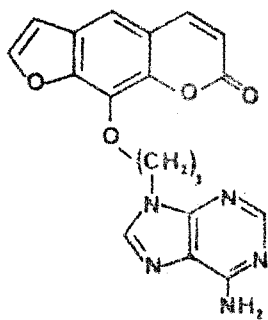
## V. CONCLUSION.

Nous avons montré que les modèles PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 et PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 existent à 100 % sous forme complexée dans l'eau.

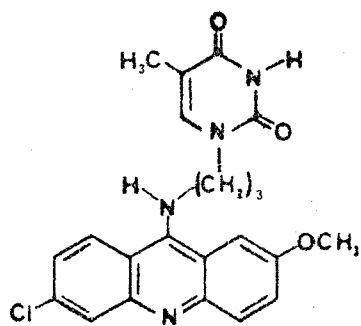
En spectroscopie UV, les valeurs d'effet hypochrome obtenues sont comparables aux résultats décrits dans d'autres séries. Le tableau 6 rassemble les valeurs de H % mesurées pour les produits présentés à la Fig. 16 dans différentes conditions.

	eau		éthanol	Ref.
	20°C	70°C	100%	
Ade-C <sub>3</sub> -Ade	16,5	-	0	(24)
Thy-C <sub>3</sub> -Thy	7	-	- 1,5	(24)
Q-C <sub>3</sub> - Ade	25,5	17	0	(26,29)
Q-C <sub>3</sub> -Thy	10	5	0	(26,29)
Acr-C <sub>3</sub> -Ade	20	20	10	(22)
Acr-C <sub>3</sub> -Thy	14	12	- 2	(22)
Pso-C <sub>3</sub> -Ade	14	9	1,5	(33)
Pso-C <sub>3</sub> -Thy	9	4	1	(32)
PF-C <sub>3</sub> -Ade	11,5	12	1	
PF-C <sub>3</sub> -Thy	7	7	8	

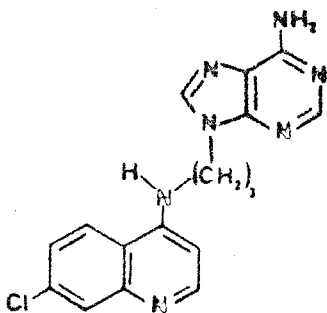
Tableau 6 : Valeurs de H% mesurées pour différents modèles



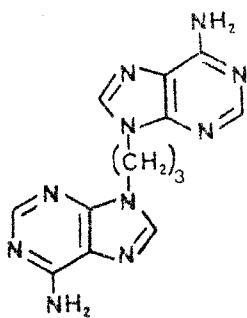
Pso-C<sub>3</sub>-Ade



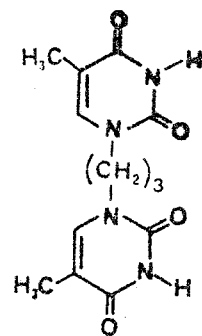
Acr-C<sub>3</sub>-Thy



Q-C<sub>3</sub>-Ade



Ade-C<sub>3</sub>-Ade



Thy-C<sub>3</sub>-Thy

Fig. 16 : Structure de quelques modèles étudiés

L'étude par RMN des modèles PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 et PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 confirme les résultats observés en UV, et fournit des informations sur la géométrie du complexe, particulièrement, dans le cas de PF-C<sub>3</sub>-Ade 13.

Les différences de déplacement chimique ( $\Delta\delta$ ) mesurées pour les modèles par rapport aux produits de référence (PF-C<sub>3</sub> 2, Ade-C<sub>3</sub> et Thy-C<sub>3</sub>) sont comparables à celles obtenues dans l'étude des modèles en série amino-4 quinoléine et amino-9 acridine (Tableau 7).

	$\Delta\delta$ (ppm)		$\Delta\delta$ (ppm)		Ref.	
	Adenine		Thymine			
	H <sub>2</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>6</sub>	CH <sub>3</sub>		
Q-C <sub>3</sub> -Ade	0,51	0,13			30	
Acr-C <sub>3</sub> -Ade	0,75	0,21	Acr-C <sub>3</sub> -Thy	0,40	0,44	23
PF-C <sub>3</sub> -Ade	0,60	0,01	PF-C <sub>3</sub> -Thy	0,10	0,29	

Tableau 7 : Valeurs de  $\Delta\delta$  entre les produits de référence (Ade-C<sub>3</sub> et Thy-C<sub>3</sub>) et différents modèles

Pour le modèle PF-C<sub>3</sub>-Ade 13, les mesures effectuées conduisent aux caractéristiques suivantes :

- Forme repliée à 100 % de 0 à 75°C (H% = 11,7%)
- Disparition des interactions en présence d'éthanol
- Les spectres UV sont directement comparables à ceux obtenus lors des études d'intercalation de la proflavine dans l'ADN.
- La géométrie du complexe est très proche de celle qui est décrite pour la proflavine intercalée dans l'ADN.

Le modèle PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 montre des propriétés particulières en solvant organique, que nous ne pouvons pas, actuellement, interpréter. Mais les études réalisées dans l'eau permettent de constater

que ce système possède les caractéristiques suivantes :

- Forme complexée à 100 % de 0 à 75°C ( $H\% = 6,8\%$ )  
(sans que l'on puisse en déterminer la géométrie).
- Persistance des interactions dans l'éthanol.

-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

### ETUDE PRELIMINAIRE DES MODELES EN PRESENCE DE BASE COMPLEMENTAIRE

Les liaisons hydrogène entre bases nucléiques n'ont jamais pu être observées dans l'eau au niveau des bases elles-mêmes. Elles ont été observées dans des solvants organiques comme le DMSO, le chloroforme, ou des mélanges DMSO-méthanol, en étudiant par RMN des solutions concentrées de dérivés des différentes bases ( 62 ).

D'autre part, les interactions d'empilement, de nature "hydrophobe", disparaissent en solvant organique. Cette propriété a été vérifiée pour le modèle PF-C<sub>3</sub>-Ade 13.

Si l'on considère ces modèles sous forme repliée dans l'eau, nous pouvons envisager qu'ils servent de "matrice" susceptible de fixer par liaison hydrogène leur base complémentaire. Il est possible qu'un tel phénomène apparaisse dans l'eau (ou dans un solvant aqueux), si la contribution des interactions hydrophobes entre la base complémentaire et le modèle PF-C<sub>3</sub>-Base est suffisamment grande.

Nous avons réalisé une étude préliminaire en spectroscopie UV dans ce sens, dans l'eau tamponnée à pH = 5,5 contenant 2 % d'éthanol (bien que, a priori, si la constante d'association de l'équilibre est faible, cette méthode soit peu sensible).

Les solutions de chaque composé PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 et PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 ont été mélangées avec des solutions à différentes concentrations de Thy-C<sub>3</sub> et Ade-C<sub>3</sub>, respectivement.

Les spectres de ces préparations ont été enregistrés entre 360 et 520 nm, où les BASE-C<sub>3</sub> n'absorbent pas, et comparés avec ceux du produit de référence PF-C<sub>2</sub> 10 dans les mêmes conditions (Fig. 17 et 18 page 95 et 96).

Nous n'observons pas de différence significative entre les deux séries de spectres : (modèle + Base-C<sub>3</sub>) et (PF-C<sub>2</sub> + Base-C<sub>3</sub>).

Un changement important est visible à des rapports élevés de Base-C<sub>3</sub>/modèle, particulièrement lorsqu'on mélange PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 avec Ade-C<sub>3</sub>. S. GEORGHIOU a décrit des variations semblables en étudiant les effets des nucléotides GMP (Guanosine monophosphate) et CMP (Cytosine monophosphate) sur l'absorption de la proflavine dans le même domaine de longueur d'onde. Cet auteur attribue la présence de points isobestiques à la formation de complexes spécifiques proflavine-nucléotide (2). Mais cette méthode ne permet pas de déterminer le type de complexe formé.

L'appariement des bases n'est pas exclu pour autant: la spectroscopie d'absorption n'est pas assez sensible pour détecter une variation de l'absorption d'un éventuel complexe si l'équilibre postulé est fortement déplacé vers la dissociation :



Nous devons donc faire une étude plus complète en utilisant d'autres solvants ou mélanges de solvants, offrant un compromis vis-à-vis des deux types de forces mises en jeu : interactions "hydrophobes" et liaison hydrogène.

Nous pourrions également utiliser d'autres techniques pour tenter de mettre en évidence une éventuelle sélectivité d'un modèle pour sa base complémentaire.

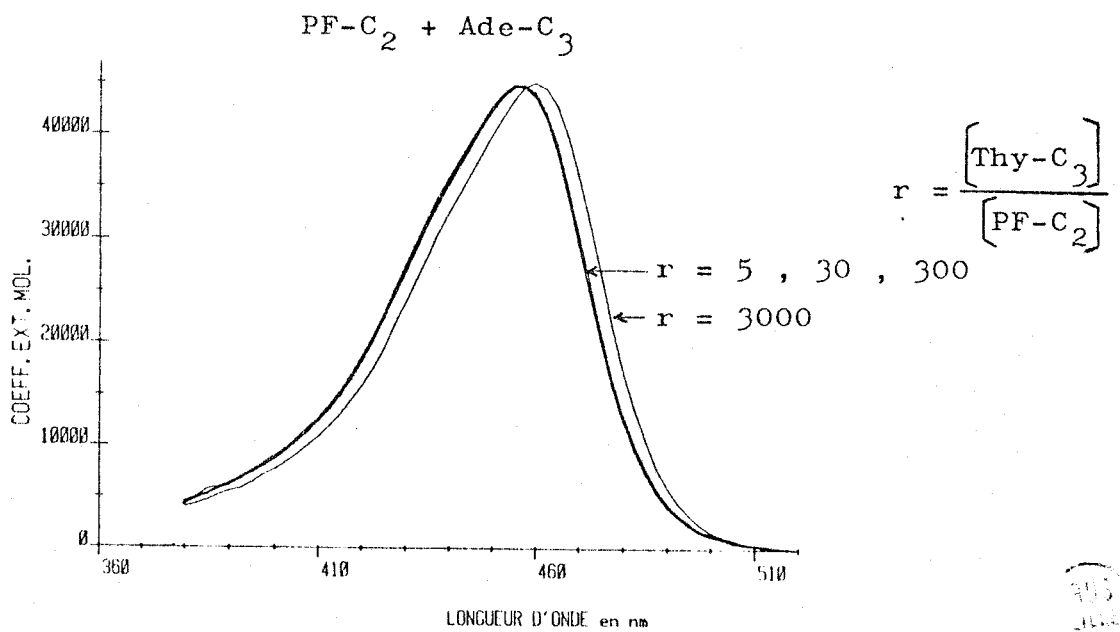
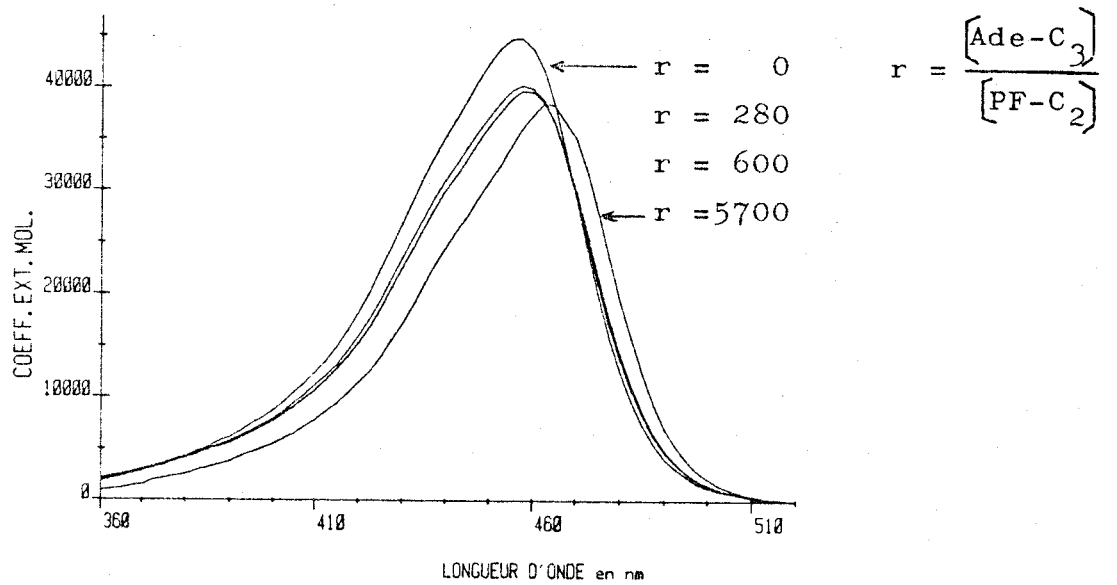
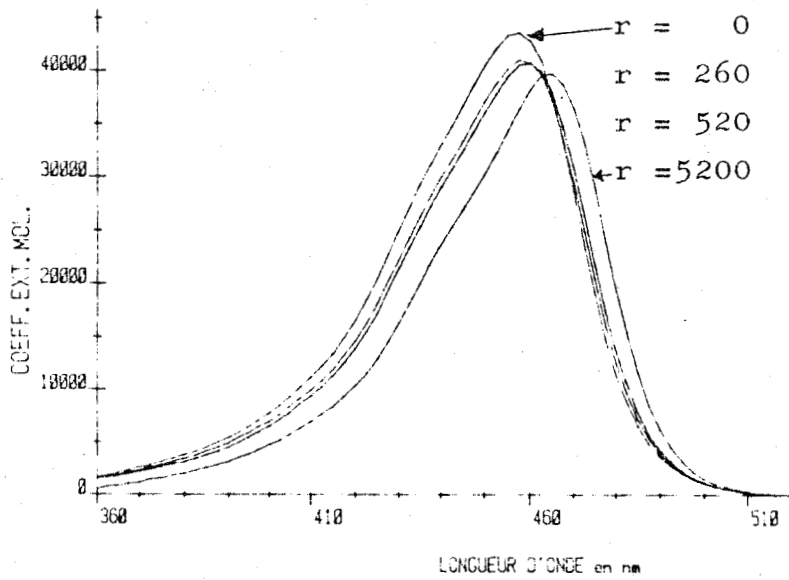
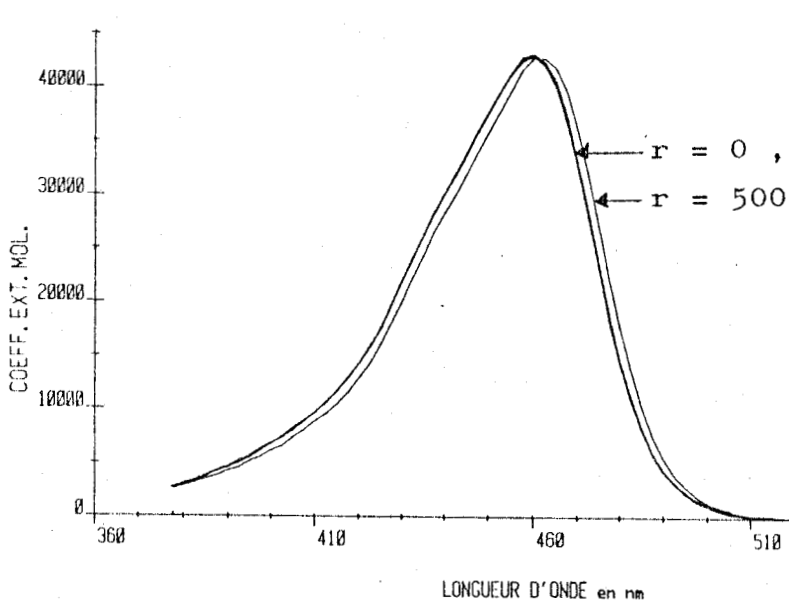


Fig. 17 : Variation des spectres d'absorption de PF-C<sub>2</sub> 10 en présence de Ade-C<sub>3</sub> et Thy-C<sub>3</sub>



$$r = \frac{[\text{Ade-C}_3]}{[\text{PF-C}_3\text{-Thy}]}$$

PF-C<sub>3</sub>-Thy + Ade-C<sub>3</sub>



$$r = \frac{[\text{Thy-C}_3]}{[\text{PF-C}_3\text{-Ade}]}$$

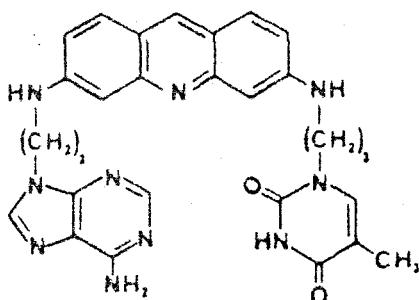
PF-C<sub>3</sub>-Ade + Thy-C<sub>3</sub>



Fig. : 18 : Variation des spectres d'absorption des modèles PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 et PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 en présence de base complémentaire

## ETUDE PRELIMINAIRE DU MODELE Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy

Nous nous sommes limités, jusqu'à présent, à une étude préliminaire par RMN du double modèle Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy 22.



Compte tenu des propriétés des modèles simples PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 et PF-C<sub>3</sub>-Thy 15, il est tout à fait probable que ce composé adopte une conformation repliée, les deux bases complémentaires pouvant être appariées.

Le faible solubilité de 22 ne nous a pas permis d'obtenir suffisamment de données pour extrapoler avec précision les déplacements chimiques à dilution infinie, mais nous pouvons cependant comparer de façon qualitative les spectres de ce double modèle à ceux des produits de référence C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub> 3 à des concentrations comparables (Fig.19).

Le tableau 8 montre les valeurs des déplacements chimiques pour chaque proton, à des concentrations comparables ( $3 \cdot 10^{-4}$  moles.l<sup>-1</sup>) en PF-C<sub>3</sub>-Thy 15, PF-C<sub>3</sub>-Ade 13, Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy 22 et C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub> 3.

	H <sub>9</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>1</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> (A)H <sub>8</sub> (A)H <sub>6</sub> (T)	CH <sub>3</sub> (T)
PF-C <sub>3</sub> -Thy	8,46	7,67	7,57	6,85	6,70	6,56	6,20		7,26 1,43
PF-C -Ade	8,32	7,62	7,37	8,86	6,51	6,45	5,61	7,51	8,00
de-C <sub>3</sub> -PF-C <sub>3</sub> -Thy	8,09	7,31	7,17	6,39	6,18	6,01	5,47	7,56	7,84 7,23 1,53
C <sub>3</sub> -PF-C <sub>3</sub>	8,04	7,33		6,59		5,93			

Tableau 8 : Valeurs des déplacements chimiques des protons de Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy 22 et des produits de référence

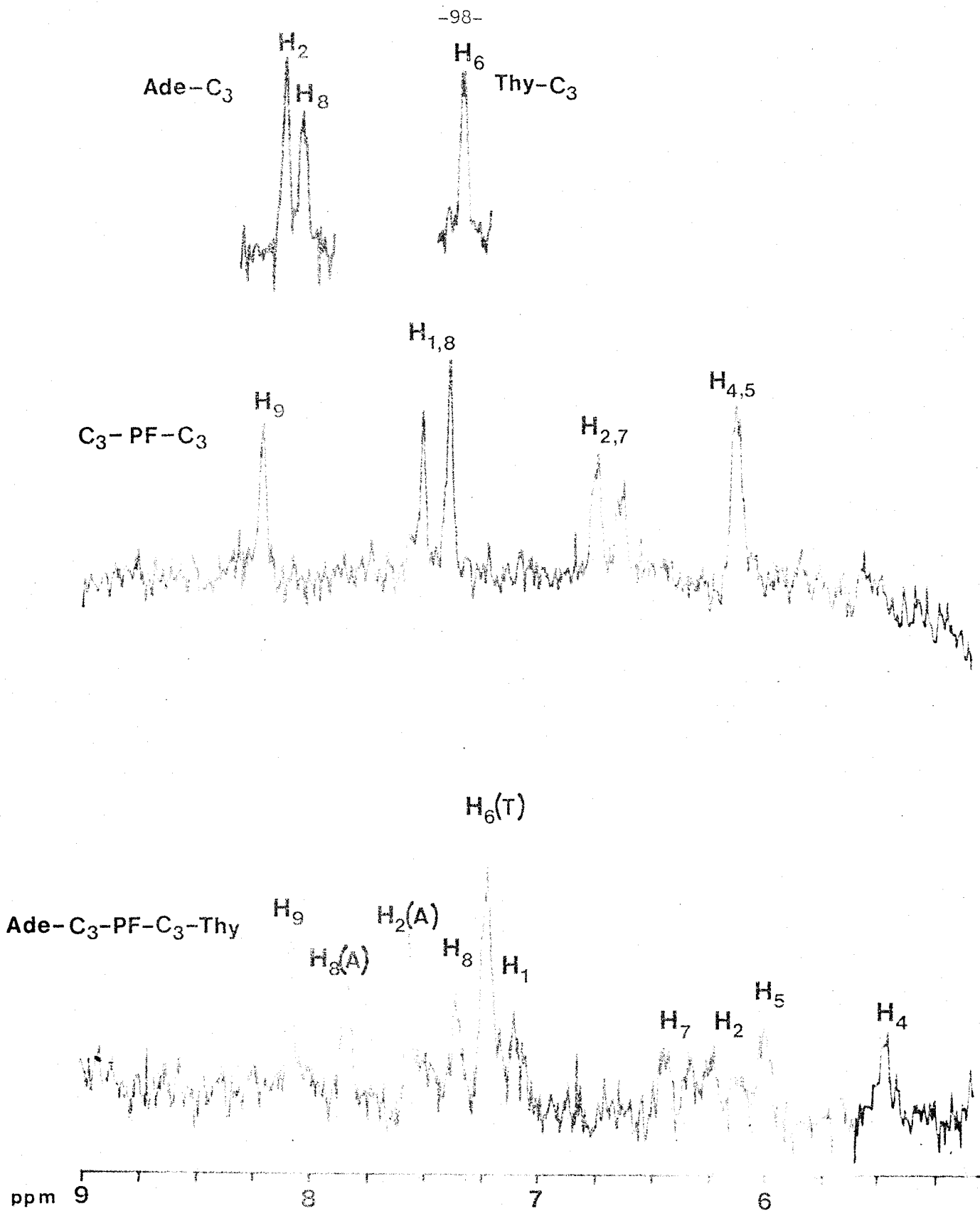


Fig. 19 : Comparaison des spectres du modèle Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy 22  
 et des produits de référence  
 (Solvant : D<sub>2</sub>O, pD 4,6 ; c = 2 · 10<sup>-4</sup> moles. l<sup>-1</sup>)

Dans le tableau 9, nous indiquons les différences de déplacements chimiques  $\Delta\delta$  observées pour les protons du double modèle:

$$\Delta\delta (\text{Ade-C}_3\text{-PF-C}_3\text{-Thy}) = \begin{bmatrix} \delta_{\text{C}_3\text{-PF-C}_3} \\ \delta_{\text{Ade-C}_3, \text{Thy-C}_3} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} \delta_{\text{Ade-C}_3\text{-PF-C}_3\text{-Thy}} \end{bmatrix}$$

ainsi que les valeurs de  $\Delta\delta$  obtenues précédemment :

$-\Delta\delta$  (PF-C<sub>3</sub>-Ade), par rapport à PF-C<sub>3</sub> 3 et Ade-C<sub>3</sub> (page 76)

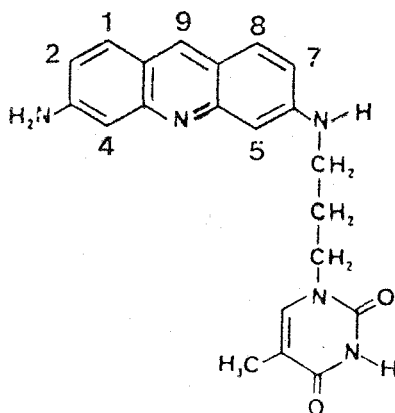
$-\Delta\delta$  (PF-C<sub>3</sub>-Thy), par rapport à PF-C<sub>3</sub> 3 et Thy-C<sub>3</sub> (page 83)

	H <sub>9</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>1</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> (A)	H <sub>8</sub> (A)	H <sub>6</sub> (T)CH <sub>3</sub> (T)
$\Delta\delta$ : PF-C <sub>3</sub> - <del>Ade</del>	0,06	0,04	<u>0,19</u>	0,02	<u>0,31</u>	0,03	<u>0,58</u>	<u>0,60</u>	0,01	
$\Delta\delta$ : PF-C <sub>3</sub> -Thy	-0,08	-0,01	-0,01	0,05	0,10	-0,08	-0,04	-	-	<u>0,10</u> <u>0,29</u>
$\Delta\delta$ : Ade-C <sub>3</sub> -PF-C <sub>3</sub> -Thy	-0,05	0,02	<u>0,16</u>	<u>0,20</u>	<u>0,41</u>	-0,08	<u>0,46</u>	<u>0,56</u>	<u>0,21</u>	<u>0,14</u> <u>0,19</u>

Tableau 9 : Valeurs de  $\Delta\delta$  pour les trois modèles  
 PF-C<sub>3</sub>-Ade 13, PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 et Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy 22



NOTE : Pour faciliter les comparaisons, la numérotation du cycle acridine du modèle PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 a été inversée.



Les valeurs de  $\Delta\delta$  (Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy) sont tout à fait comparables à celles observées pour chaque modèle simple. Par exemple, tous les protons de l'acridine sont déplacés de façon remarquablement identique dans le double modèle et dans le composé PF-C<sub>3</sub>-Ade 13.

En résumé, on retrouve bien la même influence de la proximité de la proflavine sur l'adénine et la thymine. La seule différence sensible est notée pour les protons H<sub>7</sub> de la proflavine ( $\Delta\delta = 0,20$  ppm) et H<sub>8</sub> de l'adénine ( $\Delta\delta = 0,21$  ppm dans le double modèle, à comparer à 0,01 ppm dans le modèle simple PF-C<sub>3</sub>-Ade 13).

La géométrie du complexe ternaire réunit donc celle des deux modèles simples PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 et PF-C<sub>3</sub>-Thy 15.

Nous pouvons envisager au moins deux types de conformations (a) et (b) de la forme complexée :



Le seul élément qui serait en faveur d'une forme (b) est donné par les valeurs du blindage des deux protons H<sub>7</sub> (proflavine) et H<sub>8</sub> (adénine) mentionnées précédemment :

$$H_7 : \Delta\delta = 0,20 \text{ ppm}$$

$$H_8(A) : \Delta\delta = 0,21 \text{ ppm}$$

L'examen des modèles moléculaires montre que l'appariement des deux bases par liaisons hydrogène est possible si :

- \*L'adénine recouvre entièrement la proflavine (donc le H<sub>8</sub>(A) subit un effet de courant de cycle plus important).
- \*La thymine recouvre une plus petite surface de la proflavine : le groupement méthyle en position 5 subit en effet ou blindage moins marqué (0,19 pour 0,29 ppm dans le modèle

\*PF-C<sub>3</sub>-Thy 15), et la double liaison 5-6 de la thymine se trouve juste au-dessus du proton 7 de la proflavine, qui montre un nouveau blindage de 0,20 ppm.

Ces premiers résultats sont très encourageants, dans la mesure où nous observons une forme de complexe ternaire entre la proflavine et le couple de bases. Une étude complémentaire sera nécessaire pour déterminer exactement la géométrie du modèle, en utilisant des moyens d'investigations plus sophistiqués.

-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-





Nous avons synthétisé, puis étudié sur le plan conformationnel un certain nombre de modèles du complexe d'intercalation de la proflavine dans l'ADN.

-0-0-0-0-0-0-0-0-0-

Au cours de la préparation de ces produits, nous avons mis en évidence une réactivité particulière des positions 4 et 5 du noyau acridine, qui sont le siège d'une réaction facile d'échange. Des travaux ultérieurs seront nécessaires pour exploiter cette réactivité.

-0-0-0-0-0-0-0-0-0-

De l'étude physico-chimique des modèles, nous pouvons tirer un certain nombre de conclusions, quant à la méthodologie suivie dans ce travail :

- Sur les techniques spectroscopiques utilisées.
- Sur la validité de la modélisation de ce type de phénomène.
- Sur les résultats obtenus par la mesure des interactions.

\* La spectroscopie d'absorption UV nous a permis de mettre en évidence une complexation intramoléculaire dans les modèles par les mesures d'effet hypochrome, et cela en opérant à faible concentration. Cette méthode est donc d'une grande sensibilité et d'une précision inattendue pour l'observation de ce genre d'interactions.

Ces résultats sont confirmés par l'étude par RMN, qui nous donne accès à la géométrie des complexes. A ce niveau, les deux techni-

ques UV et RMN sont bien complémentaires.

L'étude de la variation de l'effet hypochrome en fonction de la température permet d'obtenir des informations quantitative sur le degré de repliement des modèles, et par conséquent sur la puissance des interactions mises en jeu.

En outre, cette approche donne des résultats nouveaux et précis sur cette propriété toujours mal connue qu'est l'effet hypochrome.

La démarche suivie permet d'obtenir la grandeur de l'effet hypochrome  $H$  % pour deux chromophores existant à 100 % à l'état de complexe d'empilement, selon une géométrie bien définie, et déterminée par RMN.

\* L'utilisation de modèles Intercalant-C<sub>n</sub>-Base s'est révélée être très utile pour étudier spécifiquement les interactions d'empilement entre un intercalant et une base nucléique. On évite ainsi tous les problèmes inhérents à la présence d'interactions "intermoléculaires" : formation d'agrégats, de complexes multiples sans géométrie définie, etc...

De plus, une telle modélisation rend possible l'étude des interactions dans des conditions choisies à volonté : solvant, température pH..., ce qui permet de préciser la nature des interactions mises en jeu. Cette approche est évidemment impossible lorsqu'on examine la complexation d'une substance avec un acide nucléique.

\* Enfin, les résultats obtenus nous permettent de formuler les conclusions suivantes :

- Les forces mises en jeu dans le forme complexée des modèles sont très puissantes : cette forme persiste à 100 % jusqu'au 75°C.
- Les interactions proflavine-adénine disparaissent en présence de solvant organique : leur nature est donc de caractère

"hydrophobe". La stabilité de la forme complexée dans l'eau représente un résultat original sur la très forte énergie de ce type d'interactions, généralement classées dans les "liaisons de faible énergie".

- Par comparaison avec les mesures effectuées sur l'ADN en présence de proflavine, les modèles étudiés reproduisent bien le phénomène d'intercalation : les effets hypochrome et bathochrome sont bien dûs à l'empilement des chromophores. Cela justifie l'utilisation des techniques UV pour l'étude de l'intercalation d'une substance dans l'ADN.
- Les interactions attractives existant entre la proflavine et les bases nucléiques sont beaucoup plus puissantes qu'elles existent entre les bases elles-mêmes. Les modèles PF-C<sub>3</sub>-Base sont repliés à 100 % dans l'eau sur toute la gamme de température, alors que les modèles Base-C<sub>3</sub>-Base montrent une décroissance du degré de repliement quand la température augmente (30).
- Sur le plan thermodynamique, on comprend pourquoi l'intercalant détruit l'édifice régulier de l'ADN pour venir s'insérer entre deux plateaux de bases : les interactions "proflavine-base" qui en résultent sont plus élevées que les interactions "base-base" initiales.
- La complexation mesurée dans les modèles PF-C<sub>3</sub>-Base est plus importante qu'en série amino-4 quinoléine (23, 27-31). Cette observation est en accord avec les valeurs de constantes d'association calculées pour différents intercalants vis-à-vis de l'ADN : un système tricyclique possède une aptitude à l'intercalation supérieure à celle d'un système bicyclique.

Des mesures complémentaires seront nécessaires pour apprécier l'intervention éventuelle de forces électrostatiques. Cela peut être réalisé en calculant la variation d'effet hypochrome des modèles en fonction du pH. Les résultats obtenus en série amino-4 quinoléine ont montré que ces forces n'ont pas grande influence sur la complexation, même lorsque les deux noyaux sont chargés positivement (27, 28).

Une telle étude sera vraisemblablement utile pour expliquer les phénomènes particuliers observés avec le modèle PF-C<sub>3</sub>-Thy 15, pour lequel la forme complexée semble avoir une très grande stabilité.

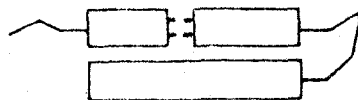
-0-0-0-0-0-0-0-0-0-

Les techniques utilisées au cours de ce travail n'ont pas permis l'observation directe de l'appariement d'un couple de bases complémentaires à partir des modèles PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 et PF-C<sub>3</sub>-Thy 15. Pour parvenir à cela, il faudra rechercher des systèmes de solvants qui favorisent la formation de liaisons hydrogène sans diminuer fortement le degré de repliement du complexe intramoléculaire.

-0-0-0-0-0-0-0-0-0-

Dans l'hypothèse de la formation d'un complexe mixte PF-C<sub>3</sub>-Base + Base complémentaire, nous pourrions tenter de réaliser des réactions de type "biomimétiques".

Même s'il n'existe qu'un faible pourcentage de complexe intermoléculaire :



nous pouvons envisager d'utiliser le modèle PF-C<sub>3</sub>-Cyt comme "matrice" capable de fixer sélectivement la guanine, et d'étudier le pouvoir photosensibilisateur de la proflavine vis-à-vis de cette base.

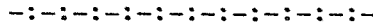
-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-

Dans la mesure où les propriétés intrinsèques du modèle Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy 22 le permettent, l'appariement de l'adénine avec la thymine pourra être mis en évidence en utilisant des techniques de RMN plus élaborées : D.J. PATEL a observé les protons échangeables impliqués dans les liaisons hydrogène de polynucléotides synthétiques dans un mélange H<sub>2</sub>O : D<sub>2</sub>O (4:1), en supprimant le signal de l'eau par une séquence d'impulsions approprié (63).

-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-

En conclusion, il est nécessaire d'approfondir l'examen spectroscopique de nos modèles, de façon à en connaître le mieux possible les paramètres dynamiques et conformationnels. Nous serons alors en mesure d'utiliser ces complexes comme sonde directe dans une étude physico-chimique plus complète des interactions mises en jeu et de la réactivité de la proflavine vis-à-vis des bases nucléiques.

PARTIE EXPERIMENTALE



## S Y N T H E S E S

Les points de fusion ont été pris sur un appareil TOTOLI.

Les spectres infra-rouge (IR) ont été enregistrés sur les spectromètres PERKIN-ELMER 237 et 157G.

Les réactions ont été suivies par CCM (gel de silice F<sub>254</sub> MERCK) et par CLHP analytique sur un appareil WATERS (colonne  $\mu$ -Bondapak RP-18, programmateur de solvant 660, deux pompes M-6000, détecteur 440 à 365 et 254 nm).

La purification des produits a été effectuée par chromatographie sur gel de silice KIESELGEL 60 et alumine 60 MERCK, et sur l'appareil de CLHP préparative JOBIN et YVON Chromatospac Prep.

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur des spectromètres BRUKER WP 60 et WP 80. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport à l'hexamethyldisiloxane pris comme référence interne (HMDS O).

**Abréviations :** s singulet ; d doublet ; t triplet ; m multiplet.

Les analyses élémentaires ont été effectuées par le Service Central de Microanalyses du CNRS.

Les spectres de masse ont été réalisés sur un spectromètre RIBER MAG 10-10.

Les spectres Ultra-Violet (UV) ont été enregistrés sur un spectrophotomètre BECKMAN ACTA M 5270.

### I. ALKYLATION DIRECTE DE LA PROFLAVINE 1.

- Propylamino-3 amino-6 acridine, PF-C<sub>3</sub> 2
- N,N-dipropyldiamino-3,6 acridine, C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub> 3

#### A. REACTIONS DANS L'AMMONIAC :

On ajoute le sodium (0,055 g pour un équivalent de proflavine) à 5 ml d'ammoniac liquide. Lorsque la solution est grise, on rajoute 0,500 g de proflavine 1 (2,4 mmoles). Le mélange devient rouge vif instantanément, et on laisse sous agitation pendant une heure.

L'addition de bromoalcane se fait goutte à goutte : 0,4 g (4,8 mmoles) pour 2 équivalents de bromo-1 propane.

Après deux heures d'agitation, on rajoute quelques cristaux de chlorure d'ammonium pour éliminer l'amidure de sodium en excès éventuel, et on laisse s'évaporer l'ammoniac.

Le solide récupéré est séparé sur colonne phase inverse à moyenne pression (ensemble de chromatographie préparative "DURAMAT"), avec les solvants suivants : eau|méthanol|acide phosphorique pur : PF-C<sub>3</sub> 2 et C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub> 3.

#### B. REACTIONS DANS LE HMPT :

La dispersion d'amidure de sodium est décantée et lavée plusieurs fois au pentane, et séchée ensuite sous azote. Pour 1,5 équivalents de proflavine, on en met 0,14 g (3,6 mmoles) en suspension dans 5 ml de HMPT, dans lesquels on rajoute 0,5 g (2,4 mmoles) de proflavine, le tout sous courant d'azote.

Après une heure, cette solution est filtrée, toujours sous azote, de façon à éliminer l'excès d'amidure de sodium, et ajoutée goutte à goutte à un mélange de 2,5 ml de HMPT et 2,5 ml de bromo-1 propane, largement en excès.

Après trois heures d'agitation, on précipite le mélange par 50 ml de soude 0,025 N, qu'on extrait plusieurs fois au chloroforme (200 ml au total). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Le solide restant, séparé par chromatographie dans les memes conditions que précédemment, contient les memes produits : PF-C<sub>3</sub> 2 et C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub> 3.

Leurs caractéristiques correspondent à celles des produits obtenus par l'autre voie de synthèse, en introduisant un groupe protecteur sur la proflavine.



- PF-C<sub>3</sub> 2.

F : 208-12°C

Masse : m<sub>e</sub> = 251.

RMN (D<sub>2</sub>O, 80 MHz) : 8,04 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 7,38 (1H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>8</sub>H) ; 7,27 (1H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>1</sub>H) ; 6,67 (1H, d, 9Hz), PF-C<sub>7</sub>H) ; 6,53 (1H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>2</sub>H) ; 6,20 (1H, s, PF-C<sub>5</sub>H) ; 5,78 (1H, s, PF-C<sub>4</sub>H) ; 2,86 (2H, t, J=7Hz; N-CH<sub>2</sub>) ; 1,51 (2H, m, J = 7Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ; 0,86 (3H, t, J = 7Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

UV (H<sub>2</sub>O|EtOH 5 % ; pH = 5,5) : λ<sub>max</sub> nm (ε) : 457,5 (44700) ; 264 (53600).

- C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub> 3.

RMN (D<sub>2</sub>O, 80MHz) : 7,79 (1H,s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 7,15 (2H, d, J 9Hz,, PF-C<sub>1</sub>H et PF-C<sub>8</sub>H) ; 6,43 (2H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>2</sub>H et PF-C<sub>7</sub>H); 5,64 (2H, s, PF-C<sub>4</sub>H et PF-C<sub>5</sub>H) ; 2,77 (4H, t, J = 7Hz, N-CH<sub>2</sub>) ; 1,49 54H, m, J = 7Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) ; 0,85 (6H, t, J = 7Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

UV (H<sub>2</sub>O|EtOH 5 % ; pH = 5,5) : λ<sub>max</sub> nm (ε) : 468 (55600) ; 387 (26800) ; 262 (59800).

## II. UTILISATION DE GROUPES PROTECTEURS.

### A. PHTALOYLATION DE LA PROFLAVINE : OBTENTION DE LA FORME ACIDE AMIDIQUE 4 :

A 200 ml d'acide acétique glacial à température ambiante, on ajoute 10 g (40 mmoles) de chlorhydrate de proflavine. La dissolution n'est pas totale. Sous agitation, on ajoute 9,1 (61 mmoles) d'anhydride phtalique. La réaction se fait sous azote à l'obscurité durant 24 heures.

On verse 100 ml d'éther éthylique dans le mélange pour faciliter la précipitation et la filtration du solide.

Celui-ci est dissous à chaud dans un minimum de soude normale et le sel de sodium de l'acide amidique 4' précipite lors du refroidissement(12 heures à +4°C). Après filtration on cristallise le produit dans

un mélange éthanol|acétone (9|1) ; on recristallise dans l'éthanol absolu (rendement = 92 %).

F : 168°C.

IR (Nujol) : 3530 ; 3375 ; 1665 ; 1260 ; 1598 ; 1570 ; 1490 ; 1460 ; 1395 ; 1380  $\text{cm}^{-1}$ .

Masse : m|e -17 = 339 (fermeture du cycle phtalate).

RMN (DMSO  $\text{D}_6$ , 80 MHz) : 13,77 (1H, s,  $\text{NH}-\text{C}=\text{O}$ ) ; 8,55 (1H, s,  $\text{PF}-\text{C}_9\text{H}$ ) ; 8,00 à 6,93 : protons aromatiques (10 H, m) ; 6,04 (2H, s,  $\text{NH}_2$ ).

UV (EtOH|AcOH 0,5 %) :  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon$ ) : 455 (22900) ; 393 (16250) ; 291 (31150) ; 261 (50700).

#### B. FERMETURE DU CYCLE EN PHTALIMIDE : OBTENTION DE 5

On dissout 0,05 g (0,13 mmoles) de sel de sodium de l'acide amidique 4' dans 1 ml de DMF, dans lesquels on rajoute 0,03 g (0,14 mmoles) de dicyclohexylcarbodiimide. Après 12 heures d'agitation à température ambiante, on évapore le solvant, et le solide restant est trituré dans l'éther éthylique et décanté. On obtient ainsi un mélange de la forme phtalimide 5a (majoritaire) et de la forme isoimide 5b.

IR (nujol) : 3430 ; 3350 ; 1789 ; 1772 ; 1742 et 1707 (carbonyles du phtalimide)  $\text{cm}^{-1}$ .

Masse : m|e = 339.

RMN (DMSO  $\text{D}_6$ , 60 MHz) : 8,81 (1H, s,  $\text{PF}-\text{C}_9\text{H}$ ) ; 8,05 à 7,00 : protons aromatiques ; 8,05 (4H, m, cycle phtalate) ; 6,25 (2H, s,  $\text{NH}_2$ ).

#### C. TOSYLATION DE LA PROFLAVINE : TOSYLAMINO-3AMINO-6 ACRIDINE PF-Ts 6, et N,N-DITOSYL DIAMINO-3,6 ACRIDINE Ts-PF-Ts 7

On dissout 5 g (24 mmoles) de proflavine 1 dans 100 ml de pyridine. On place le tout dans un bain à 0°C. On ajoute alors lentement

7,5 g (36 mmoles) de chlorure de tosylo.

Après 6 heures, on précipite les produits en ajoutant un grand volume d'eau (environ 1000 ml), et on laisse refroidir une nuit à 4°C.

Après décantation, le solide est séparé par chromatographie sur colonne de silice éluée par un mélange chloroforme|éthanol|triéthylamine (7|3|0,5).

Rendement en produit monotosylé 6 : 55 %.

- PF-Ts 6 :

F : 202-209°C.

IR (Nujol) : 3350 ; 3200 ; 1658 ; 1640 ; 1600 ; 1290 ; 1625 ; 1175 ; 1135  $\text{cm}^{-1}$ .

Masse :  $m/e = 363$ .

RMN (DMSO  $D_6$ , 80 MHz) : 8,62 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 7,87 à 6,83 : protons aromatiques (10H, m) ; 3,87 (2H, s, NH<sub>2</sub>) ; 2,29 (6H, s, CH<sub>3</sub>).

UV (EtOH ; 0,5 % AcOH) :  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon$ ) : 455 (23300) ; 391 (14000) ; 289 (28200) ; 267 (44700) ; 246 (17700).

Analyse : C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S, CH<sub>3</sub>OH

Calc. % C : 63,78 H : 5,35 N : 10,62 S : 8,10

Tr. % 64,09 5,22 10,67 7,86

- Ts-PF-Ts 7 :

F : 159-63°C.

IR (Nujol) : 1640 ; 1155 ; 1120 ; 1065 ; 900  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN (DMSO  $D_6$ , 80 MHz) : 10,96 (2H, s, HH) ; 8,77 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 8,02 à 7,27 : protons aromatiques (14H, m) ; 2,32 (6H, s, Ts-CH<sub>3</sub>).

UV (EtOH ; 0,5 % AcOH) :  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon$ ) : 414 (23000) ; 349 (16850) ; 276 (63200) ; 238 (35950).

Analyse : C<sub>27</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>

Calc. % : C : 62,65 H : 4,48 N : 8,12 O : 12,36

Tr. % : 62,75 4,50 7,85 12,45

III. ALKYLATION DE PF-Ts 6 PAR LE BROMO-1 PROPANE ET PAR LE BROMO-ETHANE : N-PROPYL, N-TOSYL DIAMINO-3,6 ACRIDINE, PF-Ts-C<sub>3</sub> 8, ET N-ÉTHYL, N-TOSYL DIAMINO-3,6 ACRIDINE, PF-Ts-C<sub>2</sub> 9.

(A) PF-Ts-C<sub>3</sub> 8

On dissout 0,5 g (1,3 mmoles) de produit mono-tosylé 6 dans 5 ml de DMF, en présence de 0,95 g (6,5 mmoles) de carbonate de potassium. On ajoute 0,47 ml (5,2 mmoles) de bromo-1 propane, et on laisse sous agitation à température ambiante pendant 24 heures, à l'obscurité et sous azote.

On filtre la solution, et on évapore le solvant. Le composé alkylé 8 est purifié par chromatographie sur colonne de silice éluée par un mélange chlorure de méthylène|éthanol|triéthylamine (9|1|0,1) (rendement 64 %). Cristallisation : isopropanol.

F : 197-201°C.

IR (Nujol) : 1640 ; 1610 ; 1340 ; 1160 ; 950 cm<sup>-1</sup>.

RMN (DMSO D<sub>6</sub>, 60 MHz) : 8,77 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 8,13 à 7,08 : protons aromatiques (10H, m) ; 6,29 (2H, s, NH<sub>2</sub>) ; 3,93 (2H, t, N-CH<sub>2</sub>) ; 2,72 (3H, s, Ts-CH<sub>3</sub>) ; 1,80 (2H, m, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 1,25 (3H, t, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

UV (EtOH|AcOH 0,5 %) : λ<sub>max</sub> nm (ε) : 4,66 (16050) ; 371 (11650) ; 280 (38000) ; 237 (35050).

(B) PF-Ts-C<sub>2</sub> 9

On opère de la même manière que pour le produit précédent en remplaçant le bromo-1 propane par le bromoéthane (rendement : 68 %). Cristallisation : isopropanol.

IV. HYDROLYSE DU GROUPEMENT SULFONAMIDE : OBTENTION DES PRODUITS DE RÉFÉRENCE : PROPYLAMINO-3 AMINO-6 ACRIDINE, PF-C<sub>3</sub> 2 ET ÉTHYLAMINO-3 AMINO-6 ACRIDINE, PF-C<sub>2</sub> 10.

(A) PF-C<sub>3</sub> 2

On dissout 1g (2,5 mmoles) du dérivé tosylé PF-Ts-C<sub>3</sub> 8 dans 5 ml de mélange acide acétique|acide sulfurique (3|2) à 0°C. On laisse revenir à température ambiante sous agitation, et après 20 mn, le brut réactionnel est précipité par refroidissement à -20°C. Après filtration et rinçage à l'acétone (3 fois 10 ml), le solide obtenu est chromatographié sur colonne de silice éluée avec le mélange méthanol|ammoniac (95|5).

Malgré plusieurs tentatives, le composé désiré PF-C<sub>3</sub> 3 n'a pas pu être purifié à 100 %. Sa structure a été confirmée par comparaison avec les propriétés du produit obtenu par alkylation directe de la proflavine.

(B) PF-C<sub>2</sub> 10

On opère dans les mêmes conditions que pour le produit précédent PF-C<sub>3</sub> 3 (rendement : 80 %). Cristallisation : éthanol.

F : 102-104°C.

IR (Nujol) : 1635 ; 1540 ; 1255 ; 1165 ; 1030 ; 870 cm<sup>-1</sup>.

Masse : m|e = 237.

RMN (D<sub>2</sub>O, 80 MHz) : 7,75 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 7,13 (1H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>8</sub>H) ; 6,98 (1H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>1</sub>H) ; 6,47 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 9Hz, <sup>4</sup>J = 1Hz, PF-C<sub>7</sub>H) ; 6,26 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 9Hz, <sup>4</sup>J = 1Hz, PF-C<sub>2</sub>H) ; 5,87 (1H, d, <sup>4</sup>J = 1Hz, PF-C<sub>5</sub>H) ; 5,38 (1H, d, <sup>4</sup>J = 1Hz, PF-C<sub>4</sub>H) ; 2,75 (2H, q, J = 7Hz, N-CH<sub>2</sub>) ; 1,05 (3H, t, J = 7Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

UV (H<sub>2</sub>O|EtOH 5 % ; pH 5,5) : λ<sub>max</sub> nm (ε) : 457,5 (44700) ; 264 (53600).

Analyse : C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O

Calc. % : C : 70,56    N : 6,71    N : 16,45

Tr. % :        70,50        6,73        16,29

V. PRÉPARATION DU PRODUIT INTERMÉDIAIRE-CLEF : N-(BROMO-3 PROPYL), N-TOSYL DIAMINO-3,6 ACRIDINE : PF-Ts-C<sub>3</sub>-Br 11.

On dissout 5 g (13 mmoles) de produit mono-tosylé 6 dans 50 ml de DMF, en présence de 9,5 g (6,5 mmoles) de carbonate de potassium. On ajoute 11 ml (102 mmoles) de dibromo-1,3 propane, en large excès de façon à éviter la formation de dimère de proflavine.

On laisse sous agitation pendant 15 heures, à l'obscurité et sous azote.

On filtre la solution et on évapore le solvant. Le composé bromé PF-Ts-C<sub>3</sub>-Br 11 est purifié par chromatographie sur colonne de silice éluee par un mélange chlorure de méthylène|éthanol|triéthylamine (8|2|0,1) (rendement : 63 %). Cristallisation : isopropanol.

F : 163-6°C.

IR (Nujol) : 1640 ; 1610 ; 1340 ; 1235 ; 1150 ; 1085 cm<sup>-1</sup>.

RMN (DMSO D<sub>6</sub>, 60 MHz) : 8,83 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 8,10 à 6,76 : protons aromatiques (10H, m) ; 6,14 (2H, s, NH<sub>2</sub>) ; 3,80 (2H, t, J = 7Hz, CH<sub>2</sub>-Br) ; 3,55 (2H, t, J = 7Hz, N-CH<sub>2</sub>) ; 2,13 (3H, s, Ts-CH<sub>3</sub>) ; 1,90 (2H, m, J = 7Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

UV (EtOH|AcOH 0,5 %) : λ<sub>max</sub> nm (ε) : 470 (18700) ; 371 (12300) ; 281 (37500) ; 240 (35700).

VI. N-[(ADÉNYL-9)-3 PROPYL], N-TOSYL DIAMINO-3,6 ACRIDINE : PF-Ts-C<sub>3</sub>-ADE 12

On dissout 1g (2 mmoles) de dérivé bromé PF-Ts-C<sub>3</sub>-Br 11 dans 10 ml de DMF, auxquels on ajoute 31 ml de suspension 0,1 M d'adénylate de sodium (1,5 équivalents, 3 mmoles) dans le même solvant. On laisse sous agitation pendant 30 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité.

La précipitation du produit à 0°C dans 500 ml de solution d'ammoniacale à pH = 13 s'accompagne de la solubilisation de l'adénine en excès. Le solide recueilli est filtré et séché, puis purifié par chromatographie

sur colonne de silice éluée par un mélange chlorure de méthylène|éthanol|triéthylamine (80|19|1). (rendement : 60 %).

F : 154-8°C.

IR (Nujol) : 1630 ; 1600 ; 1400 ; 1330 ; 1205 ; 1150  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN (DMSO  $\text{D}_6$ , 60 MHz) : 8,63 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 8,05 (2H, s, Ade-C<sub>8</sub>H et Ade-C<sub>2</sub>H) ; 7,96 à 6,90 : protons aromatiques (10 H, m) ; 7,00 (2H, s, Ade-NH<sub>2</sub>) ; 6,13 (2H, s, PF-NH<sub>2</sub>) ; 4,20 (2H, t, J = 7Hz, Ade-CH<sub>2</sub>) ; 3,65 (2H, t, J = 7Hz, PF-CH<sub>2</sub>) ; 2,31 (3H, s, Ts-CH<sub>3</sub>) ; 1,91 (2H, m, J = 7 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

UV (EtOH|AcOH 0,5 %) :  $\lambda_{\text{max}}$  nm ( $\epsilon$ ) : 466 (14050) ; 369 (10000) ; 278 (42800) ; 253 (24 300) ; 234 (37200).

## VII. HYDROLYSE DU GROUPEMENT SULFONAMIDE : N- [(ADENYL-9)-3 PROPYL] DIAMINO-3,6 ACRIDINE, PF-C<sub>3</sub>-ADE 13

On dissout 0,5 g (0,9 mmoles) du produit précurseur PF-Ts-C<sub>3</sub>-Ade 12 dans 2,5 ml à 0°C du mélange acide acétique|acide sulfurique (3|2). On laisse revenir à température ambiante sous agitation, et après 20mn, le brut réactionnel est précipité par refroidissement à -20°C. Le produit désiré PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 est obtenu après filtration et rinçage à l'acétone (3 fois 10 ml).

La purification est effectuée par CLHP préparative sur colonne d'alumine basique éluée au méthanol (3 chromatographies successives).

Après évaporation du solvant, le produit est remis en solution dans le méthanol et filtré (0,25  $\mu\text{m}$ ) et reconduit à sec. Après dissolution dans l'acide chlorhydrique 0,1N à 80°C, on laisse précipiter le composé PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 à +4°C pendant 24 heures. Après filtration, on recueille le modèle PF-C<sub>3</sub>-Ade 13 sous forme de double chlorhydrate.

Rendement : 80 % avant purification (moins de 10 % en produit pur).

F : 226-231°C.

IR (Nujol) : 1640 ; 1600 ; 1330 ; 1300 ; 1165  $\text{cm}^{-1}$

Masse :  $m/e = 384$  (faible).

RMN (DMSO  $D_6$ , 60 MHz) : 8,36 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 8,23 (1H, s, Ade-C<sub>2</sub>H ou Ade-C<sub>8</sub>H) ; 8,18 (1H, s, Ade-C<sub>2</sub>H ou Ade-C<sub>8</sub>H) ; 7,66 (2H, d, J 9Hz, PF-C<sub>8</sub>H et PF-C<sub>1</sub>H) ; 7,00 (2H, s, Ade-NH<sub>2</sub>) ; 6,90 (2H, d, J 9Hz, PF-C<sub>2</sub>H et PF-C<sub>7</sub>H) ; 6,80 (1H, s, PF-C<sub>5</sub>H) ; 6,63 (1H, s, PF-C<sub>4</sub>H) ; 5,76 (2H, s, PF-NH<sub>2</sub>) ; 4,31 (2H, t, J = 7Hz, Ade-CH<sub>2</sub>) ; 3,16 (2H, t, J = 7Hz, PF-CH<sub>2</sub>) ; 2,18 (2H, m, J = 7Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

UV (H<sub>2</sub>O|EtOH 5 % ; pH = 5,5) :  $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ ) : 460 (43 000) ; 257,5 (55500).

Analyse : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>8</sub>, 2HCl, 3H<sub>2</sub>O

Calc. % : C : 49,32 H : 5,51 N : 21,91 O : 9,38

Tr. % : 49,67 5,55 21,99 9,40

## VIII. N-[(THYMINYL-1)-3 PROPYL]DIAMINO-3,6 ACRIDINE : PF-C<sub>3</sub>-THY 15

### A. PREPARATION DE LA THYMINE SYLILEE :

On met à reflux dans 10 ml d'hexaméthylidisylazane (HMDS) 0,5g (4mmoles) de thymine, en présence d'une quantité catalytique de sulfate d'ammonium. Après 24 heures, on évapore le HMDS en excès, en évitant le contact avec l'humidité.

### B. CONDENSATION AVEC LE PRODUIT INTERMEDIAIRE 11 :

On dissout 1 g (2 mmoles) du dérivé bromé PF-Ts-C<sub>3</sub>-Br 11 dans 10 ml de sulfolane, qu'on ajoute directement dans le ballon contenant la thymine silylée. Après 48 heures d'agitation à 80°C à l'abri de l'humidité, le brut réactionnel est précipité dans 150 ml d'une solution à 0°C d'ammoniaque à pH = 12 (pour solubiliser la thymine en excès), puis filtré et séché.

Une purification grossière du produit PF-Ts-C<sub>3</sub>-Thy 14, de façon à retenir les impuretés les plus polaires, est effectuée par chromatogra-



phie sur colonne de silice éluée par le mélange chlorure de méthylène|éthanol|triéthylamine (80|19|1).

C. HYDROLYSE DU GROUPEMENT SULFONAMIDE : OBTENTION  
DU MODELE PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 :

Le précurseur PF-Ts-C<sub>3</sub>-Thy (environ 0,5 g) est dissous à 0°C dans 3 ml du mélange acide acétique|acide sulfurique (3|2) ; cette réaction s'effectue dans les mêmes conditions que pour les produits de référence PF-C<sub>3</sub> 2, PF-C<sub>3</sub> 10 et le modèle PF-C<sub>3</sub>-Ade 13.

La purification du modèle PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 est réalisée par chromatographie sur colonne d'alumine basique éluée au méthanol (3 fois successives). Le produit recueilli est dissous dans l'acide chlorhydrique 0,1 N et précipité à +4°C pendant 24 heures. Le composé PF-C<sub>3</sub>-Thy 15 est obtenu sous forme de monochlorhydrate. Rendement : 45 % avant purification (moins de 10 % en produit pur).

F : 208-12°C.

IR (Nujol) : 1690 ; 1650 ; 1600 ; 1560 ; 1295 ; 1230 ; 1160 cm

Masse : m/e = 375 (faible).

RMN (DMSO D<sub>6</sub>, 60 MHz) : 8,57 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 7,59 (1H, s, Thy-H<sub>6</sub>) ; 7,79 (2H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>1</sub>H et PF-C<sub>8</sub>H) ; 6,80 (2H, s, PF-NH<sub>2</sub>) ; 6,77 (2H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>2</sub>H et PF-C<sub>7</sub>H) ; 6,71 (1H, s, PF-C<sub>5</sub>H) ; 6,59 (1H, s, PF-C<sub>4</sub>H) ; 3,86 (2H, t, J = 7Hz, Thy-CH<sub>2</sub>) ; 3,23 (2H, t, J = 7Hz, PF-CH<sub>2</sub>) ; 1,90 (2H, m, J = 7Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 1,67 (3H, s, Thy-CH<sub>3</sub>).

UV (H<sub>2</sub>O|EtOH 5 % ; pH = 5,5) : λ<sub>max</sub> nm (ε) : 457,5 (43600), 260 (54000).

IX. N,N'-DIPROPYL, N,N'-DITOSYL DIAMINO-3,6 ACRIDINE : C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub>

16

On dissout 1 g (1,9 mmoles) du composé PF(Ts)<sub>2</sub> 7 dans 10 ml de DMF, dans lesquels on ajoute 1,15 g (7,7 mmoles, 4 équivalents) de car-

bonate de potassium et 5 ml (12,4 mmoles, large excès) de bromo-1 propane. On laisse 18 heures sous agitation à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Le solvant est évaporé sous vide (2 mm de mercure), et le produit désiré est purifié par chromatographie sur colonne de silice éluée avec le mélange chlorure de méthylène|éthanol (95 |5). Le solide blanchâtre recueilli, C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub> 16 est cristallisé dans l'acétate d'éthyle|éther de pétrole (8|2).

Rendement : 78 %.

F : 174°C.

IR (Nujol) : 1595 ; 1340 ; 1160 ; 1085 ; 900 cm<sup>-1</sup>.

UV. (EtOH|AcOH 0,5 %) : λ<sub>max</sub> nm (ε) : 368 (12900) ; 274 (42100) ; 256 (61900) ; 250 (58350).

Analyse : C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>

Calc. %	:	C	:	65,86	H	:	5,86	N	:	6,98	O	:	10,63
Tr. %				65,84			5,85			7,01			10,33

## X. OBTENTION DU PRODUIT DE RÉFÉRENCE N,N'-DIPROPYLDIAMINO-3,6

ACRIDINE : C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub> 3

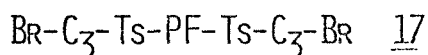
L'hydrolyse des groupes sulfonamides est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment : 1 g (1,6 mmoles) de produit C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub> 16 pour 5 ml du mélange acide acétique|acide sulfurique (3|2) à 0°C. Après précipitation au froid et filtration, le produit désiré C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub> 3 est obtenu analytiquement pur sous forme de double sulfate. Rendement : 90 %.

F : 210-13°C.

Analyse : C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub> · 2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Calc. %	:	C	:	46,61	H	:	5,56	N	:	8,58	O	:	26,14
Tr. %	:			46,51			5,57			8,51			26,10

XI. N,N'-DI(BROMO-3 PROPYL) N,N'-DITOSYL DIAMINO-3,6 ACRIDINE



Ce composé intermédiaire est obtenu dans les mêmes conditions que le produit C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub> 16, en remplaçant le bromo-1 propane par le dibromo-1,3 propane. Rendement : 55 %. Cristallisation : acétate d'éthyle|éther de pétrole (8|2).

F : 92-94°C.

IR (Nujol) : 1725 ; 1605 ; 134 ; 1230 ; 1162 ; 1145 ; 1125 ; 735 cm<sup>-1</sup>.

RMN (DMSO D<sub>6</sub>, 80 MHz) ; 9,05 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 8,05 (2H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>1</sub>H et PF-C<sub>8</sub>H) ; 7,66 (2H, s, PF-C<sub>4</sub>H et PF-C<sub>5</sub>H) ; 7,35 (10H, m, PF-C<sub>2</sub>H, PF-C<sub>7</sub>H et protons aromatiques des groupements tosyloxy) ; 3,84 (4H, t, J = 7 Hz, CH<sub>2</sub>-Br) ; 3,50 (4H, t, J = 7Hz, N-CH<sub>2</sub>) ; 2,33 (6H, s, Ts-CH<sub>3</sub>) ; 1,91 (4H, m, J = 7Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

uv (EtOH|AcOH 0,5 %) : λ<sub>max</sub> nm (ε) : 367 (11750) ; 350 (8100) ; 275 (40350) ; 257 (57700) ; 250 (53600).

XII. ADÉNYLATION DU DÉRIVÉ DIBROMÉ BR-C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub>-Br 17

- N-[(adényl-9)-3 propyl]N-(bromo-3 propyl) N,N'-ditosyl diamino-3,6 acridine : Ade-C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub>-Br 18.

-N,N'-[(adényl-9)-3 propyl] N,N'-ditosyl diamino-3,6 acridine : Ade-C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub>-Ade 19.

A. Ade-C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub>-Br 18

A une solution de 5 g (6,6 mmoles) du produit intermédiaire 17 dans 25 ml de DMF, on ajoute 80 ml d'une suspension d'adénylate de sodium 0,1 N dans le même solvant (7,9 mmoles ; 1,2 équivalents).

Après 3 heures sous agitation en atmosphère inerte, ce mélange est versé dans 1000 ml d'une solution à 0°C d'ammoniaque à pH = 13. Le précipité obtenu est filtré, séché, et purifié par chromatographie sur colonne de silice éluée par un mélange chlorure de méthylène|éthanol (98|2). On recueille le produit désiré 18 sous forme de poudre blanchâtre. Rendement : 32 %.

RMN (DMSO D<sub>6</sub>, 60 MHz) : 9,08 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 8,11 (2H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>1</sub>H et PF-C<sub>8</sub>H) ; 8,04 et 8,02 (2H, s, Ade-C<sub>2</sub>H et Ade-C<sub>8</sub>H) ; 7,74 (2H, s, PF-C<sub>4</sub>H et PF-C<sub>5</sub>H) ; 7,36 (10H, m, PF-C<sub>2</sub>H, PF-C<sub>7</sub>H et protons aromatiques des groupements tosyles) ; 7,20 (2H, s, Ade-NH<sub>2</sub>) ; 4,17 (2H, t, J = 7Hz, Ade-CH<sub>2</sub>) ; 3,66 (6H, m, PF-CH<sub>2</sub> et CH<sub>2</sub>-Br) ; 2,33 (6H, s, Ts-CH<sub>3</sub>) ; 1,93 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

#### B. Ade-C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub>-Ade 19

On opère dans les mêmes conditions que précédemment, en rajoutant un excès d'adénylate de sodium (2,5 équivalents) à la solution de produit dibromé 17 dans la DMF. Après 6 heures sous agitation, le produit désiré 19 est isolé de la même façon que le dérivé 18. Rendement 46 %.

RMN (DMSO D<sub>6</sub>, 80 MHz) : 9,07 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 8,10 (2H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>1</sub>H et PF-C<sub>8</sub>H) ; 8,02 et 8,00 (4H, s, Ade-C<sub>2</sub>H et Ade-C<sub>8</sub>H) ; 7,71 (2H, s, PF-C<sub>4</sub>H et PF-C<sub>5</sub>H) ; 7,35 (10H, m, PF-C<sub>2</sub>H, PF-C<sub>7</sub>H et protons aromatiques des groupements tosyles) ; 7,08 (4H, s, Ade-NH<sub>2</sub>) ; 4,16 (4H, t, J = 7Hz, Ade-CH<sub>2</sub>) ; 3,70 (4H, t, J = 7Hz, PF-CH<sub>2</sub>) ; 2,46 (6H, s, Ts-CH<sub>3</sub>) ; 1,91 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

XIII. CONDENSATION DE 18 AVEC LA THYMINE : N-[(ADÉNYL-9)-3  
 PROPYL] N'-[(THYMINYL-1)-3 PROPYL] NN'-DITOSYL DIAMINO-3,6  
 ADE-C<sub>3</sub>-TS-PF-TS-C<sub>3</sub>-THY 21

Une solution du dérivé bromé 18 (1,4 g ; 1,7 moles) dans 5 ml de sulfolanne est versée dans le ballon contenant 2 équivalents de thymine silylée (préparée dans les mêmes conditions que précédemment à partir de 0,43 g (3,4 mmoles) de thymine).

Après 24 heures à 80°C sous agitation et à l'abri de l'humidité, le brut réactionnel est versé dans 100 ml de solution à 0 C d'ammoniaque à pH 13. Le précipité obtenu est filtré, séché et purifié par chromatographie sur colonne de silice éluée par le mélange chlorure de méthylène|éthanol (92|8). Le composé désiré 21 est recueilli sous forme de poudre beige clair. Rendement : 48 %.

RMN (DMSO D<sub>6</sub>, 60 MHz) : 11,17 (1H, s, Thy-NH) ; 9,09 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 8,12 (2H, d, J = 9 Hz, PF-C<sub>1</sub>H et PF-C<sub>8</sub>H) ; 8,04 (2H, s, Ade-C<sub>2</sub>H et Ade-C<sub>8</sub>H) ; 7,75 (2H, s, PF-C<sub>4</sub>H et PF-C<sub>5</sub>H) ; 7,38 (11H, m, PF-C<sub>2</sub>H, PF-C<sub>7</sub>H, Thy-C<sub>6</sub>H, protons aromatiques des groupements tosyloxy) ; 7,13 (2H, s, Ade-NH<sub>2</sub>) ; 4,18 (2H, t, J = 7Hz, Ade-CH<sub>2</sub>) ; 3,73 (6H, m, PF-CH<sub>2</sub> et Thy-CH<sub>2</sub>) ; 2,34 (6H, s, Ts-CH<sub>3</sub>) ; 1,95 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 1,62 (3H, s, Thy-CH<sub>3</sub>).

UV (EtOH|AcOH 0,5 %) : λ<sub>max</sub> nm (ε) : 367 (10900) ; 273 (53850) ; 257,5 (70800).

XIV. HYDROLYSE DES GROUPEMENTS SULFONAMIDES :

N,N'-DI[(ADÉNYL-9)-3 PROPYL]DIAMINO-3,6 ACRIDINE :

ADE-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-ADE 20

N-[(ADÉNYL-9)-3 PROPYL] N'-[(THYMINYL-1)-3] PROPYL DIAMINO-3,6  
 ACRIDINE : ADE-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-THY 22.

On dissout chaque produit, Ade-C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub>-Ade 19 et Ade-C<sub>3</sub>-Ts-PF-Ts-C<sub>3</sub>-Thy 21, dans le mélange acide acétique|acide sulfurique (3|2), dans les mêmes conditions que précédemment : 0,5 g

(0,6 mmoles) de dérivé di-tosylé dans 3 ml du réactif d'hydrolyse à 0°C.

La purification s'effectue par chromatographie sur colonne de silice éluée par un mélange méthanol|ammoniaque (9|1), mais dans les deux cas, nous n'avons pas pu recueillir un produit rigoureusement pur. Rendement (avant purification) : 80 %.

- Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Ade 20 :

F : 218-22°C.

RMN (DMSO D<sub>6</sub>, 80 MHz) : 13,54 (2H, s, PF-NH) ; 8,78 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 8,16 et 8,12 (4H, s, Ade-C<sub>2</sub>H et Ade-C<sub>8</sub>H) ; 7,77 (2H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>1</sub>H et PF-C<sub>8</sub>H) ; 7,34 (s, 4H, Ade-NH<sub>2</sub>) ; 6,96 (2H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>2</sub>H et PF-C<sub>7</sub>H) ; 6,46 (2H, s, PF-C<sub>4</sub>H et PF-C<sub>5</sub>H) ; 4,26 (4H, t, J = 7Hz, Ade-CH<sub>2</sub>) ; 3,18 (4H, t, PF-CH<sub>2</sub>) ; 2,17 (4H, m, J = 7Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

- Ade-C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub>-Thy 22

F : 210-13°C.

IR (Nujol) : 3340 (large) ; 1640 ; 1605 ; 1345 ; 1150 ; 1030 cm<sup>-1</sup>.

Masse : PF-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup> m/e = 236

Ade-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup> m/e = 148

Thy-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup> m/e = 140

RMN (forme protonée) (DMSO D<sub>6</sub>, 60 MHz) : 11,17 (1H, s, Thy-NH) ; 8,74 (1H, s, PF-C<sub>9</sub>H) ; 8,57 (1H, s, Ade-C<sub>2</sub>H ou Ade-C<sub>8</sub>H) ; 8,46 (1H, s, Ade-C<sub>2</sub>H ou Ade-C<sub>8</sub>H) ; 7,79 (2H, d, J=9Hz, PF-C<sub>1</sub>H et PF-C<sub>8</sub>H) ; 7,52 (1H, s, Thy-C<sub>6</sub>H) ; 6,98 (2H, d, J = 9Hz, PF-C<sub>2</sub>H et PF-C<sub>7</sub>H) ; 6,73 (2H, s, PF-C<sub>4</sub>H et PF-C<sub>5</sub>H) ; 4,37 (2H, t, J = 7Hz, Ade-CH<sub>2</sub>) ; 3,74 (2H, t, J = 7Hz, Thy-CH<sub>2</sub>) ; 3,23 (4H, t, J = 7Hz, PF-CH<sub>2</sub>) ; 2,08 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>) ; 1,68 (3H, s, Thy-CH<sub>3</sub>).

UV (H<sub>2</sub>O|EtOH 5 % ; pH = 5,5) : λ<sub>max</sub> nm (ε) : 467,5 (53000)

## ETUDES PHYSICO - CHIMIQUES

### I. ETUDE PAR SPECTROSCOPIE UV

Les spectres d'absorption ont été enregistrés sur un spectrophotomètre BECKMAN 5270.

Les échantillons, d'environ 10 à 20 mg, pesés à  $10^{-6}$  g, ont été dissous dans 100 ml d'éthanol absolu (PROLABO) de façon à obtenir des solutions mères de concentration de  $2 \cdot 10^{-4}$  moles.  $l^{-1}$ . Les dosages acido-basiques ont été réalisés sur 50 ml de ces solutions à l'aide de soude 0,01 M, de façon à connaître la concentration avec précision. Dans le cas des produits isolés sous forme de chlorhydrate, les ions chlorures ont été dosés par une solution de nitrate d'argent 0,01 M.

Les solutions mères dans l'éthanol ont été diluées 20 fois dans un tampon acide acétique-acétate de sodium 0,05 M à  $pH = 5,5$ . La densité optique maximale de ces solutions, contenant alors 5 % d'éthanol, est d'environ 0,8.

La loi de BEER-LAMBERT a été vérifiée pour chaque produit dans le solvant utilisé sur une gamme de concentration comprise entre  $5 \cdot 10^{-6}$  et  $8 \cdot 10^{-5}$  moles.  $l^{-1}$ .

La mesure de  $H\%$  a été effectuée sur au moins trois solutions provenant de pesées différentes.

Les densités optiques sont relevées tous les 2,5 nm. A partir de ces valeurs, les forces d'oscillateur ont été calculées selon la méthode d'intégration de SIMPSON programmée sur un ordinateur HEWLETT-PACKARD 9825 A, couplé à un traceur de courbe 7225 A.

Les mesures de variation d'absorption en fonction de la température ont été effectuées dans une cellule thermostatée par un appareil BECKMAN CTC 250, au moyen d'une source chaude et d'une source froide (éthylène glycol circulant). Les spectres ont été enregistrés de 2,5 en 2,5°C entre 0 et 75°C.

## II. ÉTUDE PAR SPECTROSCOPIE DE RMN

Les études par RMN ont été effectuées sur un spectromètre BRUKER WP 80.

Des échantillons de 1 à 2 mg ont été dissous dans 3 ml de D<sub>2</sub>O contenant 0,5 % (en volume) de CD<sub>3</sub>COOD. Le pH a été ajusté à 4,6 en rajoutant la quantité nécessaire de NaOD 0,1 N. Par dilutions successives, nous avons obtenu une gamme de concentration de l'ordre de  $2 \cdot 10^{-3}$  à  $5 \cdot 10^{-5}$  moles. l<sup>-1</sup>. Nous avons utilisé le HMDS (hexaméthylidisiloxane) comme référence interne.

Les paramètres d'acquisition sont les suivants :

- irradiation du signal de HOD à une intensité de 22db|0,5 Watt
- longueur d'impulsion: 2,5 μs
- délai : 0,5 s
- fenêtre spectrale : 2000 Hz

Le nombre d'accumulations des FID varie de 1000 à 20000 suivant la concentration en échantillon.

L'extrapolation des déplacements chimiques à dilution infinie a été obtenue graphiquement.

Les valeurs de δ pour chaque proton des différents produits en fonction de la concentration sont reportées dans les tableaux suivants

- PF-C<sub>3</sub> 2

Concentration (moles.l <sup>-1</sup> )	H <sub>9</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>1</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>4</sub>
$1,9 \cdot 10^{-3}$	8,04	7,38	7,27	6,67	6,53	6,20	5,78
$9,5 \cdot 10^{-4}$	8,19	7,49	7,39	6,76	6,65	6,33	5,91
$7,1 \cdot 10^{-4}$	8,24	7,53	7,43	6,79	6,69	6,38	5,97
$4,7 \cdot 10^{-4}$	8,30	7,57	7,47	6,82	6,73	6,44	6,05
$1,9 \cdot 10^{-5}$	8,43	7,67	7,56	6,90	6,78	6,57	6,25



- C<sub>3</sub>-PF-C<sub>3</sub> 3

Concentration (moles.l <sup>-1</sup> )	H <sub>9</sub>	H <sub>1</sub> ,H <sub>8</sub>	H <sub>2</sub> ,H <sub>7</sub>	H <sub>4</sub> ,H <sub>5</sub>
1,23.10 <sup>-3</sup>	7,79	7,15	6,43	5,64
6,6.10 <sup>-4</sup>	7,91	7,23	6,51	5,77
3,1.10 <sup>-4</sup>	8,04	7,33	6,59	5,93
9,8.10 <sup>-5</sup>	8,23	7,47	6,71	6,15

- PF-C<sub>3</sub>-Ade 13

Concentration (moles.l <sup>-1</sup> )	H <sub>9</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>1</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>8</sub> (A)	H <sub>2</sub> (A)
9,4.10 <sup>-4</sup>	8,16	7,48	7,26	6,76	6,36	6,36	5,46	7,96	7,53
6,3.10 <sup>-4</sup>	8,22	7,53	7,30	6,80	6,40	6,39	5,51	7,98	7,52
3,1.10 <sup>-4</sup>	8,32	7,61	7,37	6,86	6,51	6,45	5,61	8,00	7,51
1,1.10 <sup>-4</sup>	8,42	7,70	7,45	6,92	6,52	6,63	5,71	8,02	7,52
6,3.10 <sup>-5</sup>	8,44	7,71	7,44	6,92	6,52	6,64	5,73	8,03	7,52

- PF-C<sub>3</sub>-Thy 15

Concentration (moles.l <sup>-1</sup> )	H <sub>9</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>1</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>6</sub> (T)	CH <sub>3</sub> (T)
8,6.10 <sup>-4</sup>	8,25	7,63	7,53	6,76	6,59	6,38	5,99	7,23	1,56
6,4.10 <sup>-4</sup>	8,34	7,58	7,48	6,82	6,63	6,45	6,08	7,26	1,54
4,3.10 <sup>-4</sup>	8,39	7,63	7,52	6,85	6,67	6,50	6,15	7,25	1,44
3,2.10 <sup>-4</sup>	8,46	7,67	7,57	6,85	6,70	6,56	6,20	7,26	1,43
1,0.10 <sup>-4</sup>	8,55	7,73	7,63	6,86	6,76	6,65	6,36	7,27	1,43

B I B L I O G R A P H I E

1. J.D. WATSON, F.H.C. CRICK, Cold Spr. Marb. Symp. Quant. Biol., 1953, 18, 123.
2. S. GEORGHIOU, Photochem. Photobiol., 1977, 26, 59.
3. C.H. BROWNING, J. Pathol. Chem., 1913, 18, 144.
4. A. NASIM, T. BRYCHCY, Mutation Research, 1979, 65, 261.
5. A.R. PEACOCKE, J.N.H. SKERRETT, Trans. Faraddy Soc., 1956, 52, 261.
6. L.S. LERMAN, J. Mol. Biol., 1961, 10, 367.
7. V. KLEINWACHTER,, Studia Biophysica, 1968, 6, 65.
8. J.B. LE PECQ, Chimiothérapie Anticancéreuse, Ed. Hermann, 1978.
9. P.S. SONG, K.J. TAPLEY, Jr., Photochem, Photobiol., 1079, 29, 1177.
10. P.E. THOMPSON, L.M. WERBEL "Medicinal Chemistry, vol. 12 : Antimalarial Agents", (G. DESTEVENS Ed.), Academic Press, N.Y. London, 1972.
11. a) B.N. AMES, F.D. LEE, W.E. DURSTON, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1973, 70, 782.  
b) B.N. AMES, W.E. DURSTON, E. YAMASAKI, F.D. LEE, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1973, 70, 2281.
12. B.R. BROWN, W.J. FIRST III, L.W. YIELDING, Mutation Research, 1980, 72, 373.
13. A. ALBERT, " The Acridines", Arnold London, 1966, p. 542.
14. K. ESKINS, Photochem. Photobiol., 1972, 15, 247.
16. J.E. ROBERTS, Photochem. Photobiol., 1981, 33, 61.
17. a) H.J. LI, D.M. CROTHERS, J. Mol. Biol., 1969, 39, 461.  
b) H.J. LI, D.M. CROTHERS, Biopolymers, 1969, 8, 217.
18. G. WEILL, M. CALVIN, Biopolymers, 1963, 1, 401.
19. A.R. PEACOCKE, "Heterocyclic Compounds : Acridines", Vol. 9, ACHESON, Wiley-Interscience, 1973, p. 743-7.

20. G. LOBER, Photochem. Photobiol., 1968, 8, 23.
21. R.K. TUBBS, W.E. DITTMARS, Q. VAN WINKLE, J. Mol. Biol., 1964, 9, 545.
22. A. ALBERT, "Selective Toxicity", CHAPMAN and HALL, London, 1979, p. 357-62.
23. J. BOLTE, C. DEMUYNCK, M.F. LHOMME, J. LHOMME, J. BARBET, B.P. ROQUES, J. Amer. Chem. Soc., 1982, 104, 760.
24. D.T. BROWNE, J. ELSINGER, N.J. LEONARD, J. Amer. Chem. Soc., 1968, 90, 7302.
25. N.J. LEONARD, R.F. LAMBERT, J. Org. Chem., 1969, 34, 3240.
26. N.J. LEONARD, K. ITO, J. Amer. Chem. Soc., 1973, 95, 4010.
27. J. BOLTE, C. DEMUYNCK, J. LHOMME, J. Amer. Chem. Soc., 1976, 98, 613.
28. J. BOLTE, C. DEMUYNCK, J. LHOMME, J. Med. Chem., 1977, 20, 106.
29. J. BOLTE, C. DEMUYNCK, J. LHOMME, J. Med. Chem., 1977, 20, 1607.
30. J. BOLTE, C. DEMUYNCK, J. LHOMME, M.C. FOURNIE-ZALUSKI, B.P. ROQUES, Biochemistry, 1979, 18, 4928.
31. J. BOLTE, C. DEMUYNCK, J. LHOMME, Bull. Soc. Chim. France II, 1980, p. 316.
32. J.L. DECOUT, J. LHOMME, Tet. Letters., 1981, 22, 1247.
33. J.L. DECOUT, J. LHOMME, Photochem. Photobiol., à paraitre.
34. a) S. NEIDLE, A. ACHARI, G.L. TAYLOR, H.M. BERMAN, H.L. CARRELL, J.P. GLUSKER, W.C. STALLINGS, Nature, 1977, 269, 304.  
b) H.M. BERMAN, W. STALLINGS, H.L. CARRELL, J.P. GLUSKER, S. NEIDLE, G. TAYLOR, A. ACHARI, Biopolymers, 1979, 18, 2405.  
c) H.S. SHIEH, H.M. BERMAN, M. DABROW, S. NEIDLE, Nucleic Acid Res., 1980, 8, 85.  
d) E. WESTHOF, M. SUNDARALINGAM, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1980, 77, 1852.
35. D.J. PATEL, L.L. CANUEL, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1977, 74, 2624.
36. D.J. PATEL, Biopolymers, 1977, 16, 1635.
37. N.J. LEONARD, Accounts Chem. Research, 1979, 12, 423.

38. J. RENAULT, J. BERLOT, Bull. Soc. Chim. France, 1971, 1, 211.
39. C. FAYAT, A. FOUCAUD, Bull. Soc. Chim. France, 1970, , 4501.
40. S.J. LEACH, H. LINDLEY , Aust. J. Chem., 1954, 7, 173.
41. D.H.R. BARTON, W.D. HOLLIS, "Comprehensive Organic Chemistry, Vol. (I.O. SUTHERLAND Ed.), PERGAMON Press, Oxford, N.Y., 1979, p. 982.
42. E. SCHOEDER, K. LUEBKE, "The Peptides, Vol. 1", Academic Press, N.Y. (E. GROSS Ed.), 1965.
43. F.E. RAY, L. SOFFER, J. Org. Chem., 1950, 15, 1037.
44. D.W. BROWN, C.M. TAYLOR, J. Chem. Soc. Perkin I, 1972, 2385.
45. T. SOGA, K. ODASHIMA, K. KOGA, tet. Letters, 1980, 21, 4351.
46. J. MARCH, "Advanced Organic Chemistry", Mc GRAW HILL, Kogakusha, 1977, p. 450.
47. S. LI, B. GORTLER, A. WARLING, A. BATTISTI, S. BANK, W.D. CLOSSON, J. Amer. Chem. Soc., 1967, 89, 5311.
48. K.D. PHILIPS, J.P. HORWITZ, J. Org. Chem., 1975, 40, 1856.
49. P.D. CARPENTER, M. LENNON, J.C.S. Chem. Comm., 1973, 664.
50. J. MARCH, "Advanced Organic Chemistry", Mc GRAW HILL, Kogakusha, 1977, p.227-32.
51. T. NISHIMURA, I. IWAI, Chem.Pharm. Bull. (Tokyo), 1964, 12, 352.
52. L.F. FIESER, M. FIESER, "Reagents for Organic Synthesis, Vol I", (FIESER-FIESER Ed.), J. WILEY., 1968, p. 1144.
53. C.K. BRADSHAW, J.C. PARHAM, J. Org. Chem., 1963, 28, 83.
54. D.J. BROWN, "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Vol. 16 : Pyrimidines", Interscience, J. WILEY, N.Y., London, 1962, Tome I, p. 258.
55. M.M. WARSHAW, I. TINOCO, J. Mol. Biol., 1966, 20, 29.
56. I. TINOCO, J. Amer. Chem. Soc., 1960, 82, 4785 ; 1961, 83, 5047.
57. W. RHODES, J. Amer. Chem. Soc., 1961, 83, 3609.
58. P.O.P. T'SO, "Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry, Vol. 2", (P.O.P. T'SO Ed.), Academic Press, N.Y. , London, 1974, p. 305.
59. S.I. CHAN, J.H. NELSON, J. Amer. Chem. Soc., 1969, 91, 168.

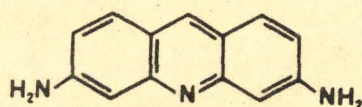
60. J. BARBET, B.P. ROQUES, S. COMBRISSE, J.B. LE PECQ, Biochemistry, 1976, 15, 2642.
61. C. GIESSNER-PRETTRE, B. PULLMAN, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, 70, 578.
62. a) L. KATZ, S. PENMAN, J. Mol. Biol., 1966, 15, 230. ~~1969~~  
b) R.A. NEWMARK, C.R. KANTOR, J. Amer. Chem. Soc., 1968, 90, 5010.  
c) L. KATZ, J. Mol. Biol., 44, 279. ~~1969~~  
d) H. IWAHASHI, H. SUGETA, Y. KYOGOKU, Biochemistry, 1982, 21, 631.
63. D.J. PATEL, A. PARDI, K. ITAKURA, Science, 1982, 216, 581.

-0-0-0-0-0-0-0-0-0-

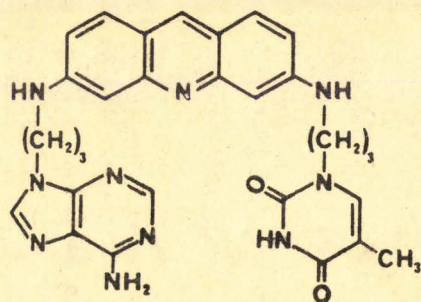


Après l'établissement de la structure en double hélice de l'ADN par J.D. WATSON et F.H.C. CRICK, de nombreux travaux ont été menés afin d'étudier les interactions entre cette macromolécule et certains composés biologiquement actifs.

Parmi ceux-ci, on trouve les aminoacridines, notamment la proflavine, qui est à l'origine du concept d'intercalation.



Dans ce travail, nous présentons une contribution à l'étude de ce phénomène par une approche originale basée sur la modélisation du complexe proflavine-ADN, l'objectif final étant de mettre en évidence



les facteurs structuraux responsables des interactions spécifiques entre l'intercalant et les couples de bases de l'ADN.

**MOTS-CLEFS** : ACRIDINE, INTERCALATION MOLECULAIRE, INTERACTION VAN DER WAALS, HYPOCHROMISME, LIAISON HYDROGENE