

50376
1983
43

N° d'ordre : 588

50376
1983
43

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

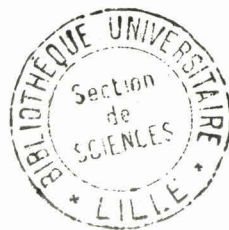
DOCTEUR ès SCIENCES PHYSIQUES

par

Jean-Luc DECOUT

Docteur en Sciences
Laboratoire de Recherche

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DU MODE D'ACTION DES
PSORALENES : INTERACTIONS ET PHOTOREACTIVITE
D'ALCOXY-8 PSORALENES AVEC LA
THYMINE ET L'ADENINE**



Soutenu le 20 Juin 1983 devant la Commission d'Examen

P. POTIER
R. BENSASSON
E. BISAGNI
J. LHOMME
M. HOSPITAL
A. LABLACHE-COMBIER
P. THOMAS

Président
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
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. JOURNAL 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	N'GUYEN 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 de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE, sous la direction de Monsieur le Professeur Jean LHOMME.

Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir confié ce sujet de recherche passionnant et m'avoir beaucoup appris tout au long de ce travail.

Messieurs les Professeurs A. LABLACHE-COMBIER et C. LOUCHEUX sont à l'origine de ma formation de chercheur et je voudrais leur en témoigner ma reconnaissance.

Mes vifs remerciements s'adressent aux personnes qui ont accepté de constituer le jury de cette thèse :

Monsieur R. BENSASSON, Maître de Recherche au Muséum National d'Histoire Naturelle.

Monsieur E. BISAGNI, Maître de Recherche à l'Institut Curie d'ORSAY.

Monsieur M. HOSPITAL, Directeur de Recherche à l'Université de BORDEAUX I.

Monsieur A. LABLACHE-COMBIER, Professeur à l'Université de LILLE I.

Monsieur P. POTIER, Directeur de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de GIF sur YVETTE.

Monsieur P. THOMAS, Professeur à l'Université de LILLE II.

Ce mémoire est le résultat d'un travail de groupe et je voudrais remercier ici ceux qui en ont permis la réalisation :

Georges HUART avec qui j'ai travaillé sur ce sujet.

Messieurs R.V. BENSASSON et J.R. RONFART-HARET qui ont étudié les modèles en photolyse éclair.

Monsieur C. COURSEILLE et M. HOSPITAL ainsi que les membres du laboratoire de Cristallographie de l'Université de BORDEAUX qui ont réalisé l'étude radiocristallographique.

Monsieur VOREUX, pour son aide en microinformatique.

Messieurs A. LABLACHE-COMBIER, C. LOUCHEUX, M. PECQUE ainsi que tous les membres des laboratoires de Chimie Organique Physique, de Chimie Macromoléculaire et de Catalyse Organique qui m'ont accueilli à l'occasion d'études particulières.

Mes camarades de laboratoire pour leur amitié et leur aide.

Madame RICART qui a dactylographié ce mémoire et Madame SAINLEGER qui en a réalisé l'impression.

S O M M A I R E

I N T R O D U C T I O N.....	1
C H A P I T R E I : S Y N T H E S E D E S M O D E L E S E T D E S C O M P O S E S D E R E F E R E N C E	15
I. Synthèse des composés modèles en série méthoxy-8 psoralène.....	17
A. Choix des schémas de synthèse.....	17
B. Synthèse des modèles du méthoxy-8 psoralène.....	21
C. Synthèse des modèles thymine-méthoxy-8 dihydro-4',5' psoralène.....	26
II. Synthèse des composés de référence.....	29
III. Modèles de la série du méthoxy-5 psoralène.....	31
C H A P I T R E II : E T U D E P H Y S I C O C H I M I Q U E.....	32
I. Etude physicochimique en solution.....	33
A. Introduction.....	33
B. Principe des méthodes utilisées.....	35
C. Etude dans l'eau.....	38
1) Interactions intermoléculaires.....	38
2) Etude UV.....	39
3) Etude en RMN.....	52
D. Nature des interactions, influence du solvant.....	59
1) Etude UV.....	59
2) Etude RMN.....	61
3) Conclusion.....	61
E. Conclusion de l'étude en solution.....	61
II. E T U D E R A D I O C R I S T A L L O G R A P H I Q U E.....	63
1) Structures cristallines des composés modèles.....	63
2) Principaux résultats.....	66
III. C O N C L U S I O N D E L ' E T U D E P H Y S I C O C H I M I Q U E.....	67

C H A P I T R E III : ETUDE PHOTOCHEMIQUE.....68

Etude en photolyse éclair de l'état excité triplet du noyau psoralène d'un des modèles (Thy-C₄-8Pso)..... 69

- 1) Propriétés de l'état excité triplet des psoralènes.....70
- 2) Etude du composé Thy-C₄-8Pso dans l'éthanol.....71
- 3) Etude du composé Thy-C₄-8Pso dans l'eau.....73
- 4) Conclusion.....75

Etude photochimique des modèles.....76

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....77

II. ETUDE DES MODELES THYMINE-PSORALENE.....80

A. Photoréactivité des modèles thymine-méthoxy-8 psoralène...80

- 1) Photoproduits attendus.....80
- 2) Essais préliminaires.....81
- 3) Etude dans l'éthanol.....86
- 4) Etude dans l'eau.....89
- 5) Photoréactivité des méthoxy-8 et propoxy-8 psoralènes- dans l'eau et dans l'éthanol.....91
- 6) Préparation des composés témoins.....94
- 7) Conclusion - Rendements de photoréaction.....97
- 8) Propriétés des photoproduits.....98

B. Photoréactivité des modèles thymine-méthoxy-5 psoralène...104

- 1) Irradiation à faible concentration.....104
- 2) Irradiation de solutions concentrées.....105
- 3) Remarques.....106

C. Conclusion.....106

- 1) Photoréactivité en séries méthoxy-8 et 5 psoralènes...106
- 2) Nature des photoproduits.....107
- 3) Comparaison des deux séries de modèles.....109

III. ETUDE DES MODELES THYMINE-DIHYDRO-4',5' PSORALENE.....111

A. Photoréactivité des modèles de la série du 8MOP.....111

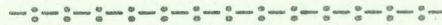
- 1) Influence du solvant.....111
- 2) Etude en présence d'eau.....112
- 3) Conclusion.....115

B. Photoréactivité d'un modèle de la série du 5MOP.....116

C. Conclusion.....117

IV.	PHOTOREACTIVITE DANS LE CRISTAL.....	118
A.	Photoréaction du composé Thy-C ₅ -8Pso 6e.....	118
B.	Photoréaction du composé Thy-C ₅ -4',5'dh 8Pso 10e.....	120
C.	Remarque.....	121
D.	Conclusion.....	121
V.	PHOTOREACTIVITE DES MODELES ADENINE-METHOXY-8 PSORALENE.....	122
	INTERCALATION DES MODELES DANS L'ADN.....	124
	CONCLUSION.....	126
	PARTIE EXPERIMENTALE.....	132
	BIBLIOGRAPHIE.....	171

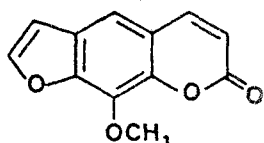
I N T R O D U C T I O N



Les acides nucléiques (ADN et ARN) occupent une place prépondérante parmi les macromolécules biologiques, étant essentiels à la division et à la croissance cellulaires. Toute modification chimique ou physique de ces systèmes aboutit à des désordres graves.

On constate que de nombreuses substances agissent au niveau de l'ADN, induisant, selon le cas, des réponses biologiques très variables. Parmi ces composés, on trouve aussi bien des substances utilisées en chimiothérapie: antibactériens, anticancéreux, antimalariques... que des substances essentiellement toxiques, mutagènes et cancérigènes.... Sur le plan structural toutes ces molécules présentent un point commun, celui de posséder une structure (ou un élément de structure) aromatique.

Parmi ces substances, les furocoumarines se distinguent tout particulièrement en raison de leurs diverses propriétés biologiques liées à une action photochimique sur les acides nucléiques.



Une furocoumarine linéaire ou psoralène :

le méthoxy-8 psoralène.

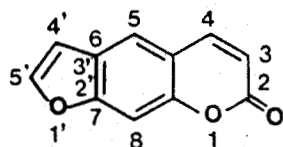
Bien que très étudié, le mécanisme d'action des furocoumarines au niveau de l'ADN n'est actuellement pas complètement élucidé.

Dans ce travail, nous présentons une contribution à l'étude de ce mécanisme à partir d'une approche originale qui consiste à modéliser les interactions et les photoréactions des psoralènes avec les bases de l'ADN.

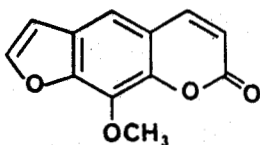
LES FUROCOUMARINES

Les furocoumarines sont des composés hétérocycliques oxygénés d'origine naturelle que l'on peut diviser en deux familles importantes :

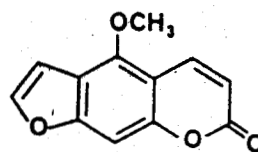
- Les furocoumarines "linéaires" ou psoralènes :



Psoralène *

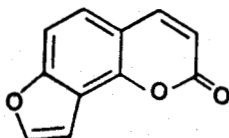


Méthoxy-8 Psoralène



Méthoxy-5 Psoralène

- Les furocoumarines "angulaires" ou angélicines :



Angélicine

On rencontre ces composés principalement dans deux familles de plantes (1) :

- Les Umbellifères (céleri, persil, panais, angélique...)
- Les Rutacées (oranger, citronnier, pamplemoussier...)

La fonction des furocoumarines dans ces plantes semble être l'inhibition de leur croissance dans certaines conditions (2).

* Furo(3,2-g)-1 benzopyranne one-7 ou furo(3,2-g)-coumarine.

PROPRIETES PHOTOBIOLOGIQUES DES FUROCOUMARINES (3,4) :

Quelques unes des propriétés photobiologiques des furocoumarines étaient connues des anciennes civilisations orientales (Indienne, Egyptienne..) depuis plus de 3000 ans (5). Des anciens manuscrits Indiens et Egyptiens du XIII^{ème} siècle font par exemple mention du traitement de leucodermies (vitiligo) par application sur la peau de cataplasmes faits à partir de plantes.

De nombreux cas de photodermatites apparaissant après une exposition au soleil d'une peau ayant été en contact avec certaines plantes sont également connus depuis longtemps.

Bien que très utilisées dans les remèdes de campagne, ces propriétés n'ont fait l'objet de recherches biologiques actives qu'à partir de 1938 (6).

Ces recherches trouvèrent leur aboutissement dans l'utilisation récente de certains psoralènes, en particulier du méthoxy-8 psoralène et du triméthyl-4,5',8 psoralène, dans le traitement de deux maladies de peau très répandues le vitiligo (5) et le psoriasis (depuis 1974 (7)). Le vitiligo se caractérise par l'apparition de simples ou de multiples plaques blanchâtres résultant d'une déficience des cellules produisant la mélanine. Le psoriasis est une autre maladie de peau se manifestant par une prolifération anormale de l'épiderme sous forme de plaques rougeâtres qui se développent sur n'importe quelle partie du corps. Cette maladie très invalidante et souvent défigurante atteint environ 2% de la population (8).

Le traitement utilisant conjointement les dérivés du psoralène en prise orale et l'exposition de la peau aux rayons UVA (320-400 nm) a été appelé PUVA thérapie et représente le principal traitement de ces maladies. Il permet de soigner environ 85 % des cas (8).

Les propriétés mélanogènes (4) des psoralènes ont également conduit à leur addition dans certaines crèmes solaires (on utilise en général le méthoxy-5 psoralène ou bergaptène). On trouve aussi des furocoumarines dans de nombreux produits employés en parfumerie, produits contenant des essences naturelles (eau de Cologne contenant de l'essence de bergamote (8)).

Toutes ces utilisations peuvent être accompagnées d'effets indésirables (érythèmes, prurits (10)) analogues à ceux observés depuis longtemps lors du contact de la peau avec certaines plantes suivi d'une exposition au soleil (feuilles de figuier, céleri, panais (11)).

Parallèlement au développement des applications des propriétés photobiologiques des furocoumarines, des travaux ont montré de nombreux effets mutagènes des psoralènes sur différentes souches de cellules et en présence de lumière (pour revue voir 3). Il est à noter ici, qu'en absence de lumière, les furocoumarines présentent également des effets mutagènes et bactéricides (pour revue, voir 12).

Récemment, des cancers de la peau ont été mis en évidence sur des souris badigeonnées avec des furocoumarines (méthoxy-8 et -5 psoralènes, angélicine) et exposées aux UVA (13, 14). Chez l'homme, les résultats concernant ces effets mutagènes et cancérogènes sont contradictoires (8, 15).

La PUVA thérapie est appliquée depuis une dizaine d'année dans le traitement du psoriasis. Il est donc encore tôt pour évaluer les risques chroniques de ce traitement, d'autant plus que les quelques données statistiques réunies font apparaître une forte influence de l'histoire du patient et du type de peau traitée sur l'apparition de tumeurs cutanées (15).

En raison à la fois de l'intérêt et des risques présentés par l'utilisation des furocoumarines, la photochimie et la photobiologie de ces composés ont été étudiées intensément (pour revues voir 3, 4, 11, 16, 17).

Ces recherches ont d'ailleurs conduit à de nouvelles applications de la photoréactivité de ces composés pour l'étude structurale d'ADN et d'ARN, la production de nouveaux vaccins antiviraux et le traitement photochimique de tumeurs (3, 18 à 20).

MECANISME D'ACTION PRESUME DES FUROCOUMARINES :

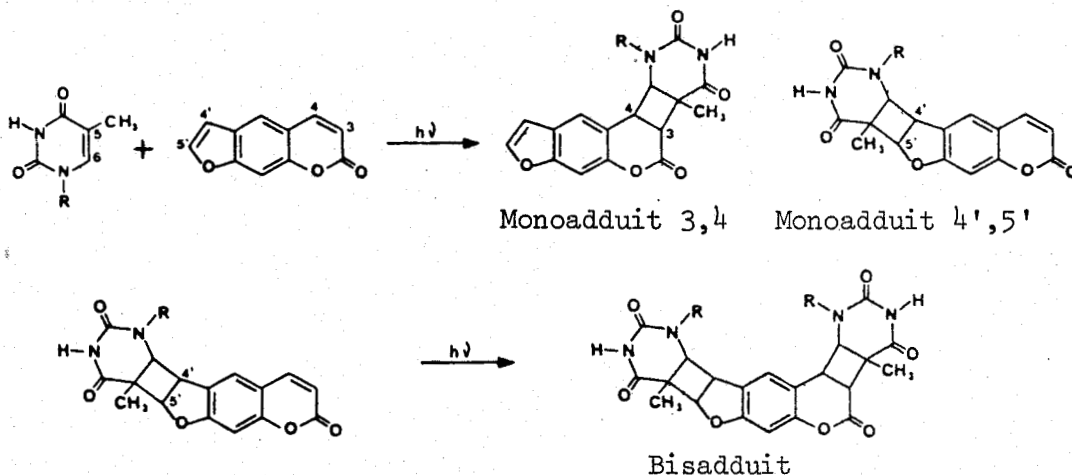
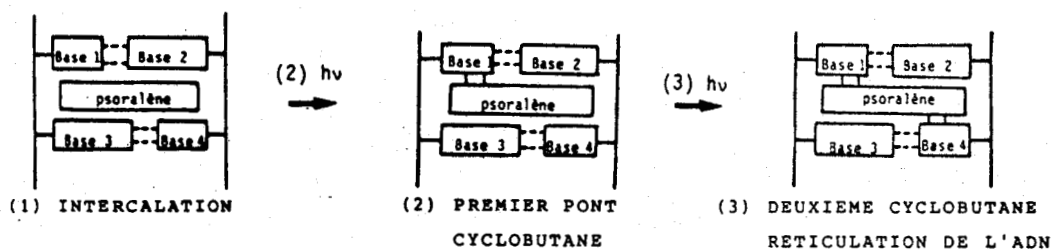
L'équipe de L. MUSAJO proposa, à la fin des années 60, un mécanisme moléculaire d'action des furocoumarines au niveau de l'ADN comportant deux étapes principales (pour revue voir 11, 21).

1ère étape : l'intercalation :

Comme de nombreux composés aromatiques (hydrocarbures polycycliques, acridines...), les furocoumarines sont capables de s'insérer entre deux couples de bases de l'ADN en formant un complexe dit d'intercalation.

2ème étape : les photoréactions :

Sous irradiation UV, il peut ensuite se produire une photoréaction entre la furocoumarine complexée et les bases pyrimidiques de l'ADN. La double liaison 5,6 d'une pyrimidine (thymine ou cytosine) peut s'additionner sur la double liaison 3,4 ou 4',5' de la furocoumarine pour former un cyclobutane. Deux types d'adduits sont ainsi formés : les monoadduits 3,4 et 4',5'. La géométrie du complexe d'intercalation des psoralènes* rend ensuite possible une seconde photoaddition sur la double liaison restante. Le bisadduit formé lie alors de façon covalente les deux brins de l'ADN : c'est la réticulation (crosslinking).



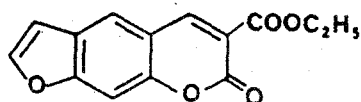
* Les angélicines, furocoumarines angulaires ne peuvent pas réagir une seconde fois en raison de leur géométrie.

Les propriétés photobiologiques des furocoumarines sont généralement reliées à leurs photoréactions avec les acides nucléiques bien qu'une action photochimique au niveau des protéines ait été mise en évidence (22, 23).

Il n'existe pas de résultats clairs corrélant les principales photoréactions aux activités biologiques, ni d'explication non contreversée des effets photobiologiques observés.

La différenciation des conséquences biologiques dues à la formation des monoadduits 3,4 ou 4',5' et du bisadduit est actuellement très discutée dans la stratégie à suivre pour mettre au point de nouvelles molécules actives n'ayant pas d'effets indésirables (non cancérogènes surtout).

Dans le cadre de la RCP "Groupe d'étude sur les furocoumarines et les molécules photoactives d'intérêt biologique et médical" mise en place par le CNRS, un certain nombre de nouveaux psoralènes, ne pouvant réagir que sur une seule double liaison (caractère monofonctionnel), ont été préparés et étudiés.



Carbéthoxy-3 psoralène

Le carbéthoxy-3 psoralène qui ne peut réagir qu'en position 4',5' s'est avéré efficace contre le psoriasis. Il n'est pas cancérogène mais pourvu d'une action photoallergique (probablement due à un pouvoir photodynamique générateur d'oxygène singulet) (24 à 27). D'autres furocoumarines "monofonctionnelles" actuellement en cours d'étude dans le cadre de cette RCP semblent prometteuses.

Bien qu'établi depuis une vingtaine d'années, le mécanisme photochimique d'action des psoralènes dans l'ADN comporte encore de nombreux points obscurs, en particulier en ce qui concerne les structures et les propriétés de tous les photoproduits formés, l'influence de l'intercalation, le rôle des différents états excités des psoralènes.....

Lorsque nous avons commencé ce travail en 1979, très peu de données moléculaires sur la structure des adduits envisagés dans l'ADN avaient été publiées dans la littérature (pour revue, voir 3).

APPROCHE RETENUE :

L'isolement et la caractérisation des photoproduits base-psoralène sont envisageables à partir de différentes approches :

* La photoréaction intermoléculaire entre une base et un psoralène (28 à 33).

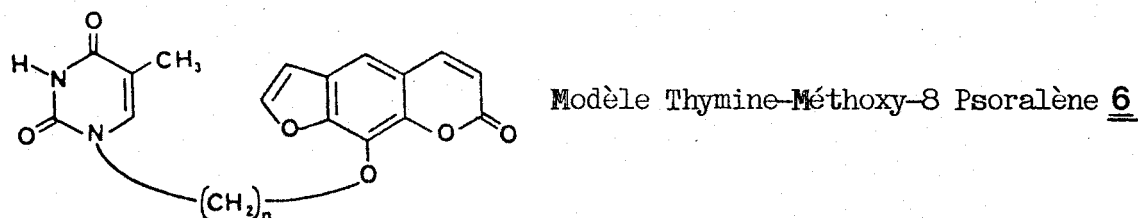
Cette approche est fortement limitée par les réactions de photodimérisation très rapides des psoralènes (34 à 38). Pour éviter ces photodimérisations, l'irradiation en solution gelée ou en phase solide est souvent utilisée.

Par exemple le premier monoadduit thymine 5,6 \diamond 4',5' psoralène (\diamond pont cyclobutane) a été isolé en 1967 par l'équipe de L. MUSAJO à partir de 5 litres de solution aqueuse contenant 150 mg de psoralène et 10 g de thymine gelée puis irradiée. La très faible quantité d'adduit isolé (1 mg) n'en a pas permis la caractérisation complète (28). En 1981, ce travail a été repris en utilisant le méthoxy-8 psoralène ou 8MOP, l'irradiation d'un film de 1 mm de solution gélée contenant $2 \cdot 10^{-4}$ M de 8MOP, $2 \cdot 10^{-2}$ M de thymine et $6 \cdot 10^{-3}$ M de benzophénone. Un photoadduit thymine 5,6 \diamond 4',5' méthoxy-8 psoralène fut ainsi isolé pour la première fois avec un rendement de 3 % (31).

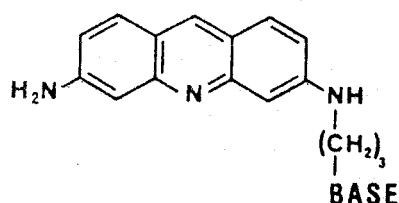
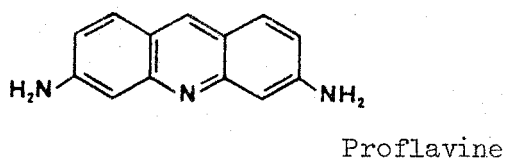
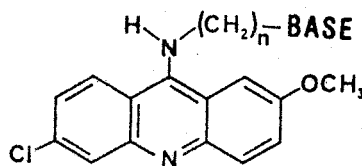
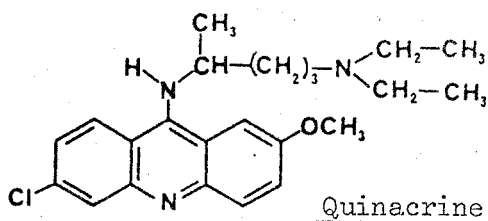
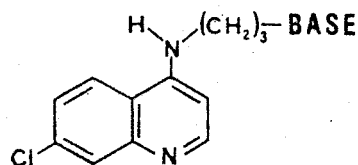
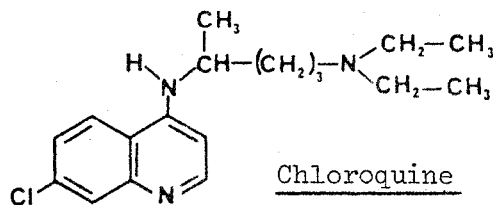
* L'étude de la photoaddition des psoralènes dans l'ADN.

Elle n'est pas plus aisée en raison des faibles taux de photoréaction et de la diversité des photoproduits formés. C'est à partir de 1981 que H. RAPOPORT et Coll. ont décrit cette étude très délicate réalisée à partir de différents psoralènes tritiés dont le méthoxy-8 psoralène (38, 39). Dans ce cas, ils ont ainsi caractérisé 4 monoadduits 3,4 et 4',5' à l'échelle du microgramme. En 1982, ils isolèrent et caractérisèrent pour la première fois différents bisadduits (40).

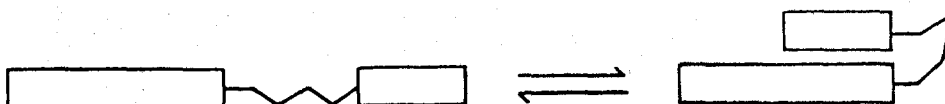
Afin d'apporter une contribution à la connaissance du mécanisme d'action moléculaire des psoralènes dans l'ADN, nous avons choisi de suivre une approche "intramoléculaire" que nous espérons plus sélective : la synthèse de composés modèles associant une base à un psoralène par une chaîne carbonée souple Base-(CH₂)_n-Psoralène, par exemple :



Cette approche est utilisée dans notre laboratoire pour étudier des composés d'intérêt biologique dont les aptitudes à l'intercalation sont bien connues, par exemple des composés antimalariques, chloroquine et quinacrine (41 à 46)



L'étude physicochimique de ces composés modèles a montré leur aptitude à se complexer de façon intramoléculaire. Le complexe formé s'est avéré de même nature que le complexe d'intercalation du composé actif "parent" et son étude a permis de préciser la nature et l'intensité des forces mises en jeu lors de l'intercalation.

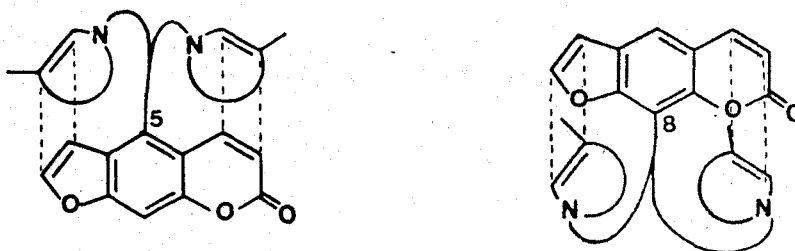


De tels composés base-psoralène peuvent ainsi constituer des modèles permettant d'étudier spécifiquement les interactions d'empilement mises en jeu dans le processus d'intercalation du psoralène dans l'ADN. Ils peuvent également favoriser les photoréactions base-psoralène dont nous pourrions étudier la nature et le mécanisme, en liaison avec la complexation.

Nous avons choisi tout d'abord de préparer des modèles de la thymine qui semble la base la plus photoréactive vis-à-vis des psoralènes d'après les résultats de la littérature (3).

La photoaddition entre la thymine et un psoralène peut conduire à la formation de 8 adduits différents en 3,4 ou 4',5', cis ou trans, syn ou anti (tête à tête ou tête à queue).

Dans les composés modèles que nous voulons préparer, il est possible de rendre compétitives les photoadditions qui conduisent à la formation de tous ces adduits. La chaîne qui relie la thymine au psoralène sera de longueur variable et pourra être fixée sur les positions 5 ou 8 du psoralène.

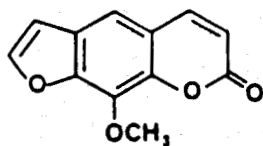


Nous avons utilisé une chaîne polyméthylénique de préférence à une chaîne incluant des hétéroatomes * pour plusieurs raisons :

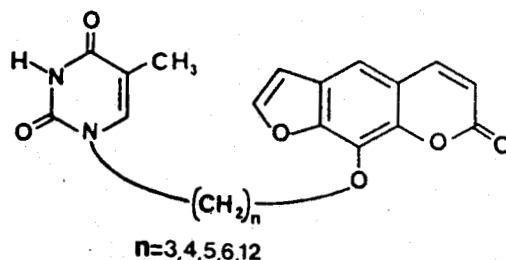
- La chaîne hydrocarbonée présente une contribution minimum dans les interactions d'empilement que nous voulons étudier, en particulier au niveau des interactions avec le solvant.
- Elle est inerte photochimiquement.
- La longueur de la chaîne peut être modifiée de façon progressive et aisée par additions successives de maillons méthyléniques : $n = 3, 4, 5, 6 \dots 12$. On peut ainsi dans une même série (par exemple, pour les modèles de la thymine liée à la position 8 du psoralène) comparer sans restriction aucune les différents composés préparés et mettre en évidence l'influence de la longueur du pont qui associe les deux systèmes aromatiques.
- La comparaison entre des séries différentes (par exemple, séries de la thymine liée en position 8 et 5 du psoralène) peut-être réalisée directement.

* Parallèlement à notre travail, un modèle dans lequel la thymine est reliée à un noyau de type méthoxy-8 psoralène par une chaîne polyoxyéthylénique a été préparé et étudié par A. CASTELLAN et J.P. DESVERGNE (47 à 49).

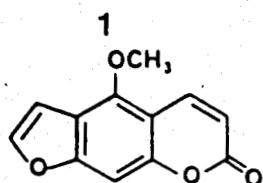
Les méthoxy-8 et 5 psoralènes 1 et 2, très employés dans la photothérapie de maladies de peau, conviennent tout à fait à la préparation de tels modèles :



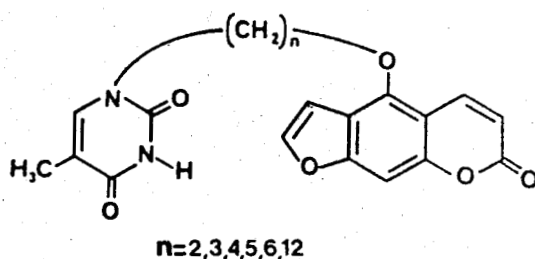
8MOP 1



Modèles Thymine-Méthoxy-8 Psoralène 6



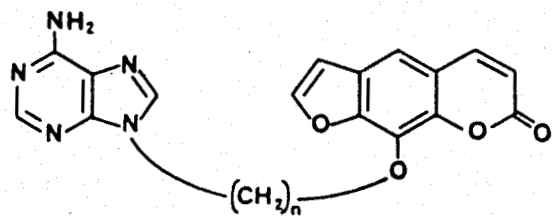
5MOP 2



Modèles Thymine-Méthoxy-5 Psoralène 15

L'utilisation d'une chaîne carbonée très longue ($n=12$) nous permettra de juger des contraintes géométriques apportées par des chaînes plus courtes ($n = 3, 4, 5$ et 6).

Nous avons également décidé de préparer des modèles de l'adénine et du méthoxy-8 psoralène 1.



$n=3,4,6$

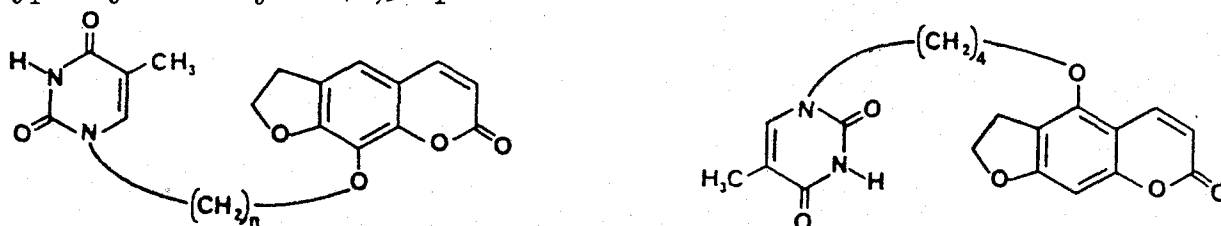
Modèles Adénine-Méthoxy-8 Psoralène 8

Notre premier objectif est d'étudier les interactions base-psoralène. Les études réalisées dans notre laboratoire sur d'autres modèles base-intercalant (en particulier quinoléine) ont montré l'intérêt des modèles adénine-intercalant pour obtenir des informations quantitatives sur les interactions dues à l'empilement de ces noyaux aromatiques (41 à 43, 45, 46).

Quelques auteurs ont décrit des résultats indiquant une photoréaction du psoralène avec l'acide polyadénylique (50) et du méthoxy-8 psoralène sur l'adénine du t-RNA (51). Mais il n'existe pas d'éléments connus sur ces photoréactions au niveau moléculaire. Les modèles adénine-psoralène permettront peut-être d'en obtenir.

Les premiers essais de photoréactivité des modèles thymine-méthoxy-8 psoralène nous ont montré la formation de nombreux photoproduits dont la nature varie beaucoup avec le solvant.

Il nous a donc semblé intéressant de synthétiser quelques modèles de type thymine-dihydro-4',5' psoralène :



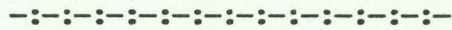
Modèles Thymine-Méthoxy-8 et 5 dihydro-4',5' Psoralènes 10, 16

La saturation d'une des doubles liaisons du psoralène devrait conduire à une simplification des possibilités de photoréaction.

Nous avons préféré préparer des composés hydrogénés en 4',5' plutôt qu'en 5,4 car les dihydro-4',5' psoralènes sont considérés comme de bons modèles des monoadduits thymine 5,6 \diamond 4',5' psoralène (\diamond pont cyclobutane). Ces deux types de composés ont en effet des propriétés d'absorption et des propriétés photophysiques très proches (37; 52, 53). De plus, en raison de leur zone d'absorption (300-400 nm), les monoadduits 4',5' peuvent être le siège d'une deuxième photoréaction dans l'ADN qui conduit à la liaison des deux brins de la double hélice. Nous avons donc là un bon modèle pour étudier cette deuxième photoréaction.

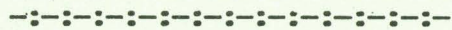
Ce mémoire décrit l'étude détaillée des composés modèles de la série du méthoxy-8 psoralène 1. Les modèles de la série du méthoxy-5 psoralène 2 ont été étudiés en collaboration avec G. HUART, étudiant de 3ème cycle et nous nous limiterons ici à résumer les principaux résultats obtenus dans cette série.

CHAPITRE I



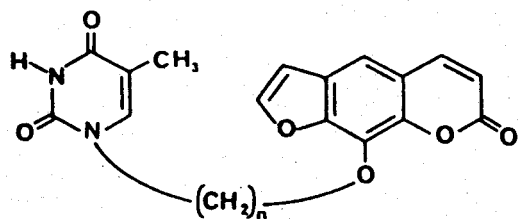
SYNTHESE DES MODELES

ET DES COMPOSES DE REFERENCE



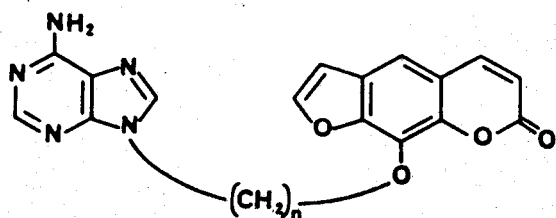
Dans ce chapitre, nous décrivons la synthèse des composés retenus pour notre étude :

Les composés modèles :



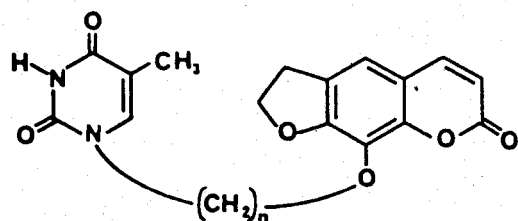
Thymine-méthoxy-8 psoralène

Thy-C_n-8Pso 6 c, d, e, f, l
n = 3, 4, 5, 6 et 12



Adénine-méthoxy-8 psoralène

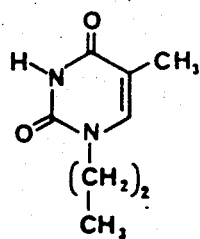
Ade-C_n-8Pso 8 c, d, f
n = 3, 4 et 6



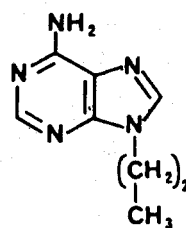
Thymine-méthoxy-8 dihydro 4',5' psoralène

Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10 c, d, e, f
n = 3, 4, 5 et 6

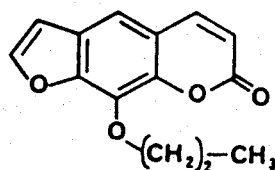
Les composés de référence



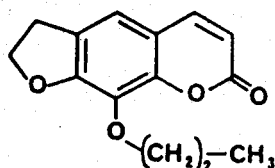
Propyl-1 thymine 11
Thy-C₃



Propyl-9 adénine 12
Ade-C₃



Propoxy-8 psoralène 13
8Pso-C₃



Propoxy-8 dihydro 4',5' psoralène 14
4',5'dh 8Pso-C₃

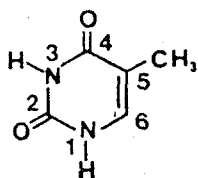


I. SYNTHESE DES COMPOSES MODELES EN SERIE METHOXY-8 PSORALENE :

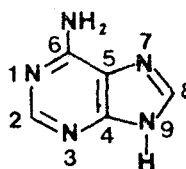
A. CHOIX DES SCHEMAS DE SYNTHESE :

1/ Fonctionnalisation des bases :

Dans l'ADN, la thymine et l'adénine sont liées au désoxyribose de la macromolécule, respectivement en positions 1 et 9.



Thymine

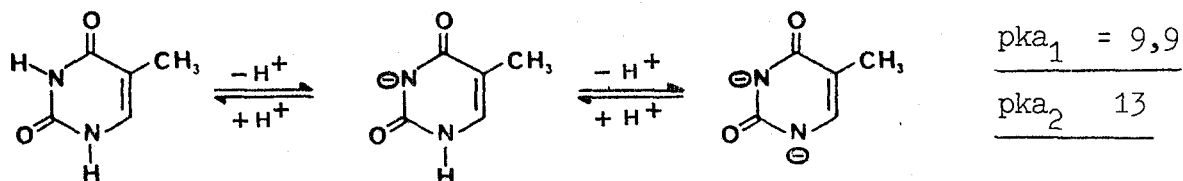


Adénine

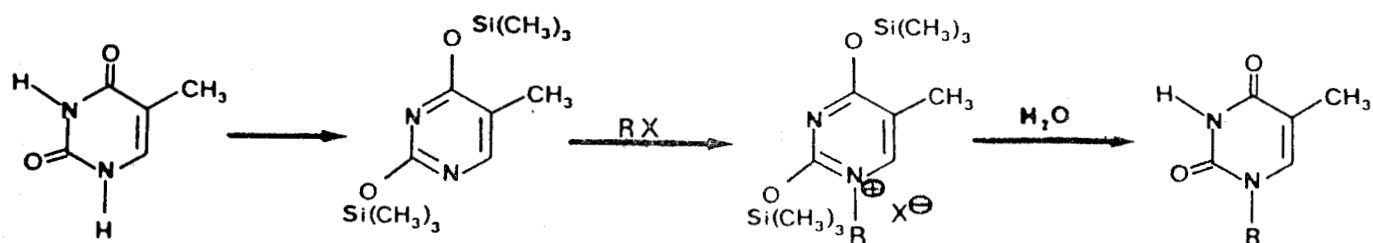
Par analogie, la chaîne carbonée liant la base au psoralène sera fixée sur ces positions dans les composés modèles que nous cherchons à préparer.

Les fonctionnalisations sélectives à partir de la thymine et de l'adénine ont été beaucoup étudiées par le groupe de N.J. LEONARD (54 à 56).

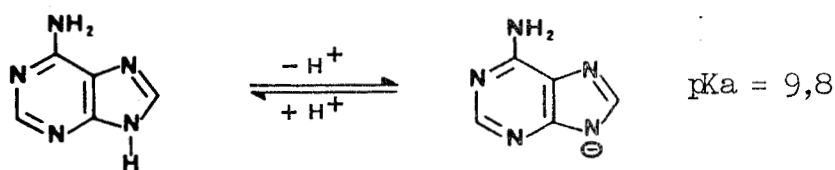
Dans le cas de la thymine, cette fonctionnalisation sélective n'est pas possible directement : en effet, en milieu basique c'est d'abord l'atome d'hydrogène porté par l'atome d'azote en position 3 qui est arraché par la base (57).



La méthode classique utilisée dans ce cas, consiste tout d'abord à protéger les fonctions carbonyles de la thymine par des groupements triméthylsilyls (54) : ces groupements empêcheront les réactions de O-alkylation, lors du traitement ultérieur par un agent alkylant. L'encombrement stérique apporté rendra la N-alkylation sélective sur l'atome d'azote en position 1.



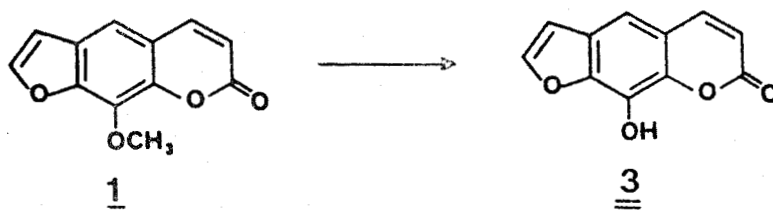
En ce qui concerne l'adénine, l'alkylation en position 9 peut être réalisée plus facilement. En milieu basique le proton est arraché :



L'ion adénylate formé peut ensuite réagir avec un agent alkylant (dérivé bromé) (55).

2/ Synthèses envisagées :

A partir du méthoxy-8 psoralène commercial 1, nous avons accès à l'hydroxy-8 psoralène 8HP 3 :



L'anion de ce phénol pourra être alkylé et fonctionnalisé par attaque électrophile. Ce dérivé constitue l'intermédiaire-clef de la synthèse des composés modèles.

Deux voies de synthèse sont ainsi envisageables :

VOIE 1

Dans une première étape, nous pouvons préparer des bases ω -bromo-alkylées. La synthèse d'un certain nombre de ces composés est décrite dans la littérature (à partir des deux méthodes indiquées précédemment (54, 55)).



Le dérivé bromé obtenu sera ensuite condensé avec l'anion de l'hydroxy-8 psoralène 8HP 3 :

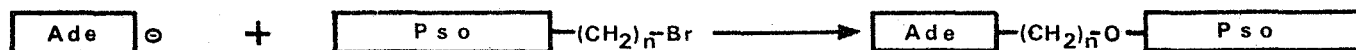
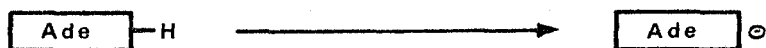
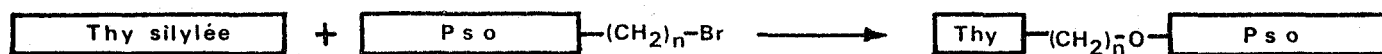


VOIE 2

Le phénate du 8HP peut être alkylé par un α, ω dibromoalcane :



L'attaque nucléophile de ce dérivé bromé pourra ensuite conduire aux modèles recherchés (suivant les deux méthodes de fonctionnalisation de la thymine et de l'adénine décrites précédemment) :



3/ Synthèse en série thymine-méthoxy-8 psoralène :

Dans ce cas, les deux voies sont envisageables.

La préférence sera cependant donnée à la VOIE 1 car :

D'une part, le méthoxy-8 psoralène 1 est un produit de départ coûteux. Dans la VOIE 1, le noyau psoralène apparaît dans deux étapes (déméthylation et condensation) alors que dans la VOIE 2, il intervient dans une troisième étape intermédiaire : la bromoalkylation du 8HP 3.

D'autre part, les intermédiaires Thymine-(CH₂)_nBr sont décrits dans la littérature pour n = 3, 4 et 6 (54, 58). Ces intermédiaires, une fois synthétisés seront utilisables dans la préparation d'autres modèles dérivant de la thymine (par exemple ceux du méthoxy-5 psoralène 2 et ceux de type dihydro 4',5' psoralène).

4/ Synthèse en série adénine :

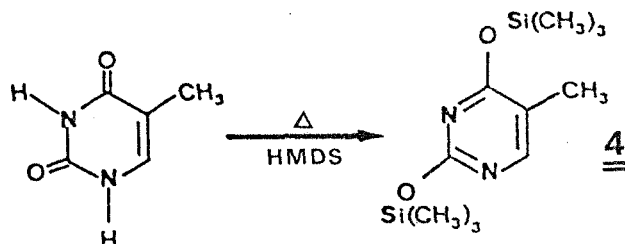
Dans ce cas, on choisira la VOIE 2.

N.J. LEONARD et R.F. LAMBERT (55) ont remarqué que l'obtention du dérivé Adénine 9-(CH₂)₃Br à partir de l'adénine est difficile (rendement 8 %). Cet intermédiaire, envisagé dans la VOIE 1, se cyclise facilement de façon intramoléculaire.

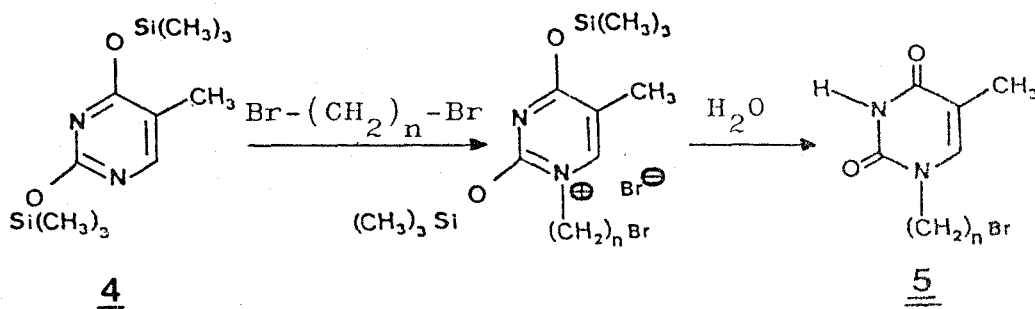


2/ Synthèse des modèles thymine-méthoxy-8 psoralène Thy-C_n-8Pso
6 (selon la VOIE 1) :

a) Préparation des (ω -bromoalkyl)-1 thymines : Thy-C_n-Br 5 :



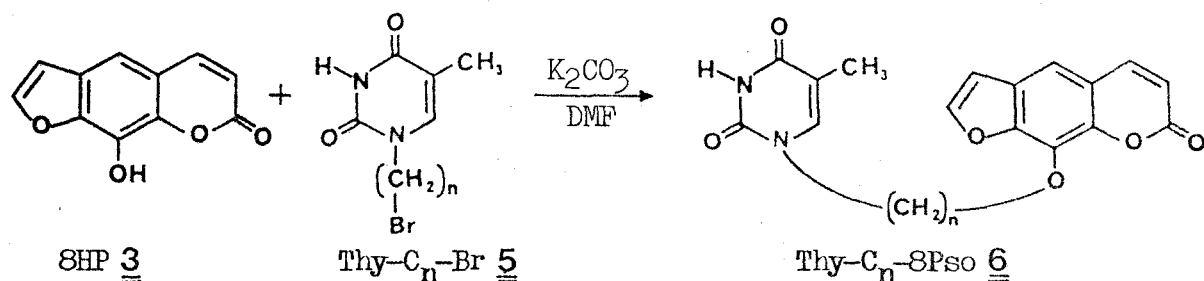
Les fonctions carbonyles de la thymine sont tout d'abord protégées par des groupements triméthylsilyls pour éviter les réactions de O-alkylation. La 0,0'-bistriméthylsilylthymine 4 est obtenue par réaction de la thymine avec l'hexaméthyl-1,1,1,6,6,6 disilazane à reflux.



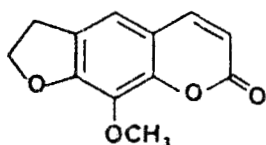
La thymine silylée est ensuite traitée avec un excès de α, ω -dibromoalcane. Le bromure d'ammonium quaternaire formé sur l'atome d'azote en position 1 est hydrolysé pour conduire à l'(ω -bromoalkyl)-1 thymine Thy-C_n-Br 5 recherchée.

Les composés 5 c, 5 d, 5 e, 5 f, 5 l possédant respectivement une chaîne alkyle de 3,4,5,6,12 atomes de carbone ont été ainsi préparés.

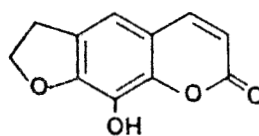
b) Obtention des composés modèles Thy-C_n-8Pso 6 :



5/ Synthèse en série thymine-méthoxy-8 dihydro-4',5' psoralène (4',5'dh 8MOP) :



4',5'dh 8MOP

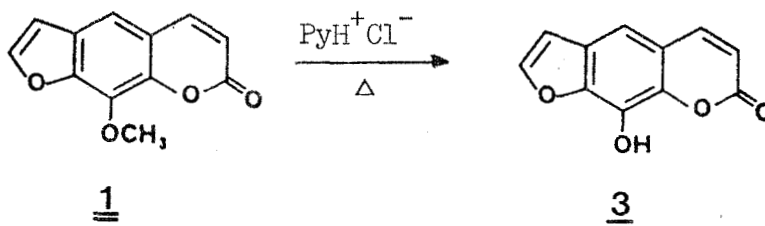


4',5'dh 8HP

Suivant la VOIE 1, nous pouvons envisager la synthèse de ces modèles à partir des composés Thy $-(CH_2)_n-Br$ préparés lors de la synthèse des modèles thymine-méthoxy-8 psoralène. Dans ce cas, l'hydroxy-8 dihydro-4',5' psoralène (4',5'dh 8HP) sera l'intermédiaire clé de la synthèse.

B. SYNTHÈSE DES MODÈLES DU METHOXY-8 PSORALÈNE 1

1/ Préparation de l'hydroxy-8 psoralène 3 :



Selon une méthode conseillée par E. BISAGNI, le méthoxy-8 psoralène 1 est déméthylé par le chlorure de pyridinium à reflux. L'hydroxy-8 psoralène 3 est obtenu facilement avec un rendement de 75 %, supérieur à ceux décrits dans la littérature pour d'autres voies de déméthylation (59, 60, 61).

Dans la littérature, les synthèses de nombreux éthers de l'hydroxy-8 psoralène 8HP sont décrites (59, 62, 63). Dans la majorité des cas, l'alkylation du 8HP 3 se fait dans l'acétone par réaction avec un dérivé halogéné en présence de carbonate de potassium.

Nous avons tout d'abord appliqué ces conditions à la condensation 8HP 3 + Thy-C_n-Br 5 : dans l'acétone, comme dans l'acétonitrile, la réaction s'est avérée partielle et très lente (48 heures à reflux). L'utilisation de la N,N-diméthylformamide (DMF) comme solvant à 70°C a permis d'augmenter fortement le rendement de la condensation (65 à 85 %) et de diminuer le temps de réaction (8 à 12 heures).

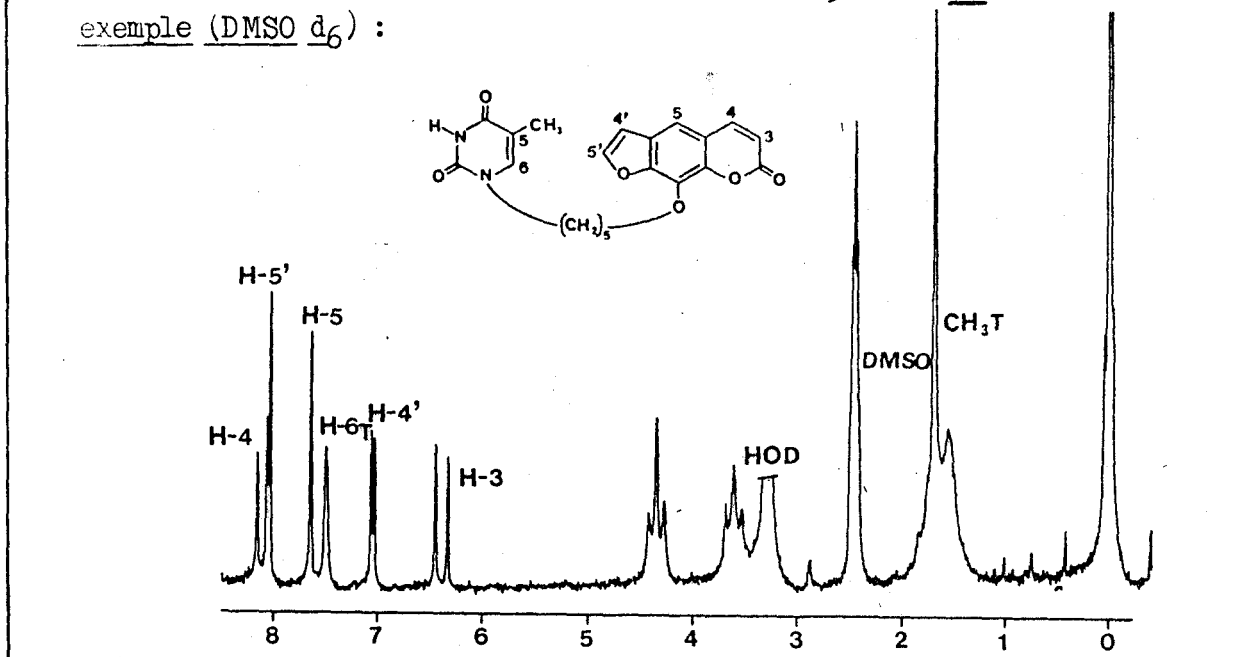
La purification des composés préparés a posé quelques problèmes en raison de leur très faible solubilité dans la plupart des solvants organiques. Nous avons utilisé principalement la chromatographie sur colonne de silice. Le dépôt et l'élution des produits ont été réalisés avec de l'acétate d'éthyle bouillant sur une colonne à double enveloppe thermostatée à 50°C par un courant d'eau chaude. Cette technique permet d'éviter la précipitation des produits qui a lieu à froid durant l'élution, l'acétate d'éthyle étant le seul solvant qui sépare de façon satisfaisante sur la silice les impuretés des composés modèles recherchés.

Les composés Thy-C_n-8Pso 6c, d, e, f, l (n = 3, 4, 5, 6 et 12) ont été préparés selon cette méthode.

Ces produits doivent avoir une excellente pureté pour permettre les études physicochimiques par spectrométrie UV et les études photophysiques et photochimiques. Cette pureté a donc été vérifiée par plusieurs techniques :

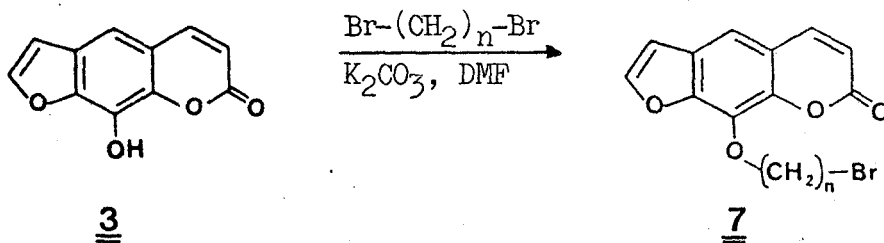
- * Chromatographie couche mince (CCM)
- * Chromatographie liquide analytique à hautes performances (CLHP)
- * Analyse élémentaire sur un échantillon représentatif de la totalité du produit préparé (1 à 2 g).

Spectre de RMN ^1H à 80 MHz du modèle Thy-C₅-8Pso 6e pris comme exemple (DMSO d₆) :



2/ Synthèse des modèles adénine-méthoxy-8 psoralène Ade-C_n-8Pso 8
(selon la VOIE 2) :

a) Préparation des (ω -bromoalkoxy)-8 psoralènes 8Pso-C_n-Br 7 :

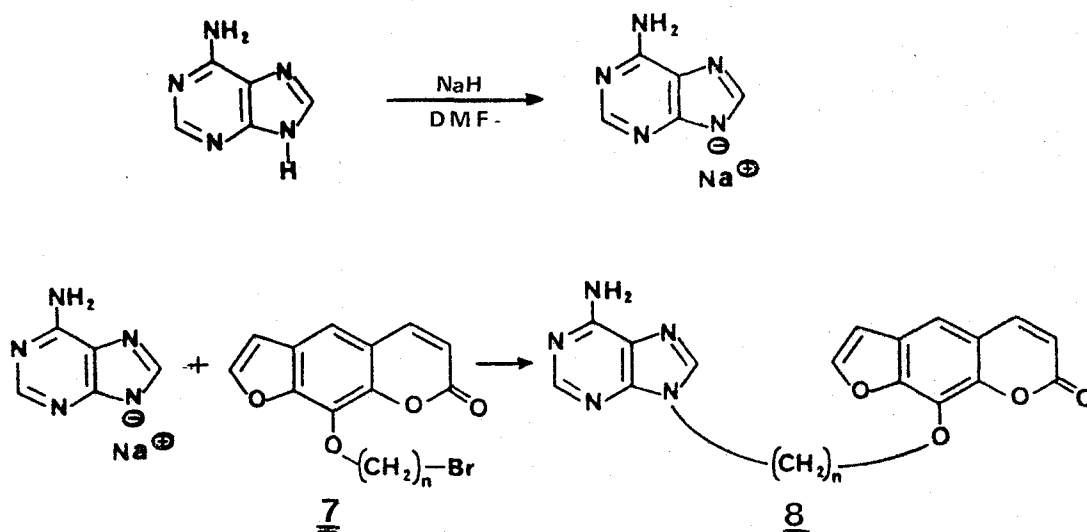


La synthèse de quelques uns de ces composés ($n = 3$ et 4) a été décrite par une équipe italienne (63). L'hydroxy-8 psoralène 3 est condensé avec un α, ω -dibromoalcane en excès dans l'acétone à reflux en présence de carbonate de potassium. Dans ces conditions, la réaction est très lente (48 heures) et les rendements sont assez faibles ($\approx 50\%$).

Comme lors de la condensation 8HP 3 + Thy-C_n-Br 5, la réaction 8HP + α, ω dibromoalcane menée à 70°C dans la DMF en présence de K_2CO_3 est plus rapide (3 à 5 heures) et donne de très bons rendements (75 % à 90 %).

Les composés 8Pso-C_n-Br 7c, 7d, 7f ($n = 3, 4$ et 6) ont ainsi été préparés.

b) Obtention des modèles Ade-C_n-8Pso 8 :



Les conditions utilisées pour condenser l'adénine sur l' ω -bromo alcoxy furocoumarine sont similaires à celles décrites par N.J. LEONARD et R.F. LAMBERT lors de la préparation de la propyl-9 adénine à partir de l'adénine et du bromo-1 propane (55).

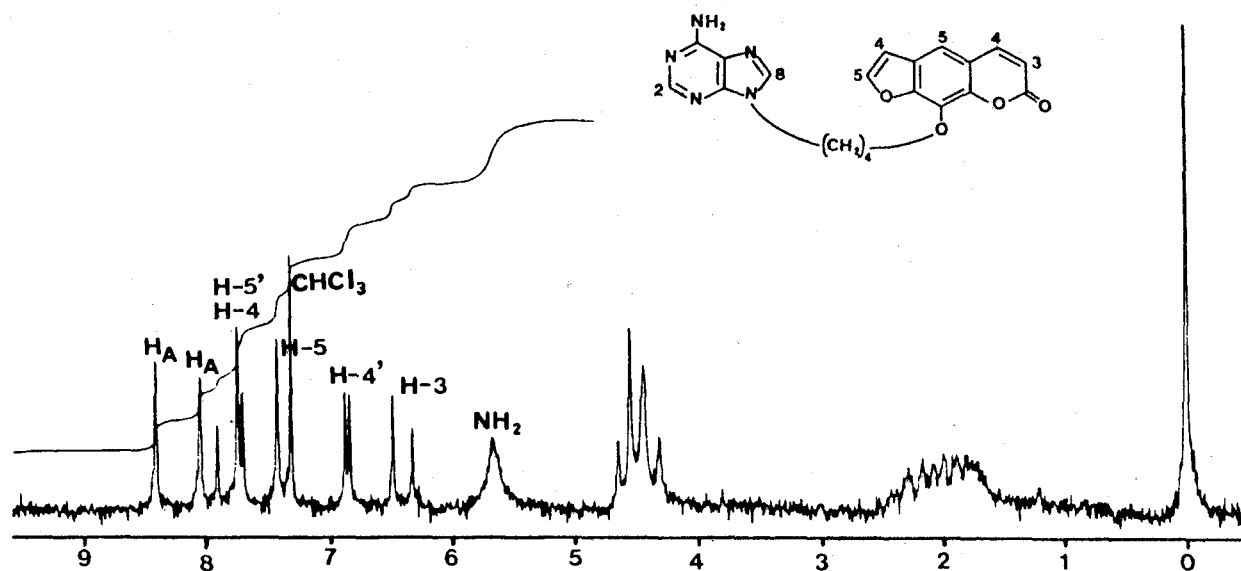
On obtient l'adénylate de sodium par action de l'hydrure de sodium sur l'adénine dans la DMF. La condensation de cet anion avec l'(ω -bromoalcoxy)-8 psoralène 7 in situ et à froid conduit aux modèles Ade-C_n-8Pso 8c, d, f ($n = 3, 4$ et 6). Les rendements obtenus sont faibles (20 %). A côté de l'adénine n'ayant pas réagi, nous trouvons de nombreux produits secondaires. Ces produits viennent probablement de l'addition nucléophile de l'ion adénylate sur la lactone du noyau psoralène.

On peut éliminer une partie de l'adénine restant par un lavage à la soude du solide obtenu après évaporation du solvant de réaction. Il faut noter que dans ces conditions la lactone du noyau psoralène peut s'ouvrir mais le cycle pyrone se reforme dès que l'on passe en milieu neutre.

La purification finale des produits s'est avérée difficile en raison de problèmes de solubilité et de séparation. Plusieurs chromatographies successives effectuées sur de petites quantités (0,1 à 0,2 g) conduisent aux produits purs (CCM, CLHP, analyse élémentaire).

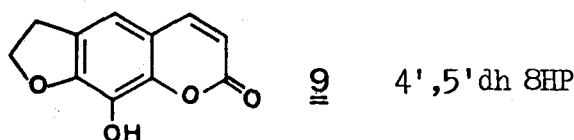
Les composés modèles Ade-C_n-8Pso 8c, d, f ($n = 3, 4$ et 6) ont ainsi été obtenus.

Spectre de RMN ^1H 60MHz du modèle Ade-C₄-8Pso 8d pris pour exemple (CDCl₃) :



C. SYNTHÈSE DES MODÈLES THYMINE-MÉTHOXY-8 DIHYDRO-4',5' PSORALÈNE
Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10 :

La synthèse de ces modèles selon la VOIE 1 implique l'hydroxy-8 dihydro-4',5' psoralène 9 comme intermédiaire.



1/ Préparation de l'hydroxy-8 dihydro-4',5' psoralène 4',5'dh8HP 9 :

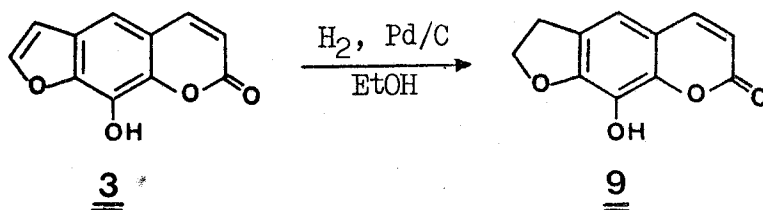
La synthèse de ce composé à partir du trihydroxy-1,2,3 benzène (pyrogallol) a été décrite par C. LAGERCRANTZ (64). Cette synthèse est longue et les rendements sont faibles (4 étapes, rendement global : 3 %).

Nous avons donc préféré rechercher des conditions d'hydrogénation sélective du noyau psoralène.

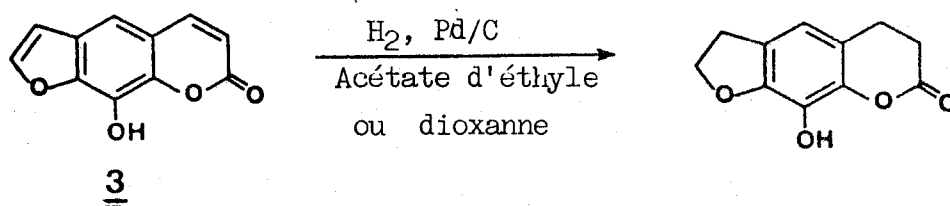
On trouve dans la littérature des conditions d'hydrogénation du méthoxy-8 psoralène sur les positions 4',5' (dans l'éthanol, avec du palladium sur charbon sous pression atmosphérique et à température ambiante). Mais la

déméthylation du méthoxy-8 dihydro-4',5' psoralène formé n'est pas connue.

Nous avons donc appliqué les conditions d'hydrogénation décrites pour le 8MOP 1 à l'hydrogénation de l'hydroxy-8 psoralène 8HP 3. Celle-ci conduit bien, dans l'éthanol, sélectivement à l'hydroxy-8 dihydro-4',5' psoralène 4',5' dh 8HP 9.

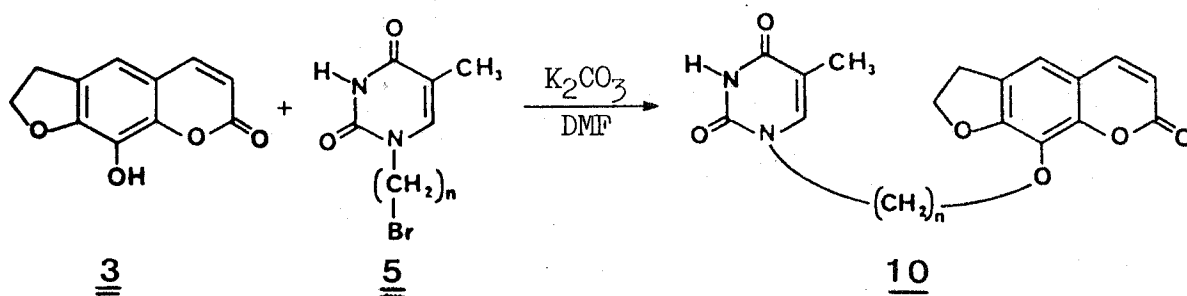


En raison de la faible solubilité du 8HP 3 dans l'éthanol et de façon à passer à des conditions d'hydrogénation préparative, nous avons étudié l'influence du solvant sur la sélectivité de l'hydrogénation. Dans l'acétate d'éthyle ou le dioxanne (meilleurs solvants du 8HP 3 que l'éthanol), nous n'observons pas de sélectivité : l'hydroxy-8 tétrahydro-3, 4, 4', 5' psoralène se forme très rapidement (produit isolé et caractérisé par RMN).



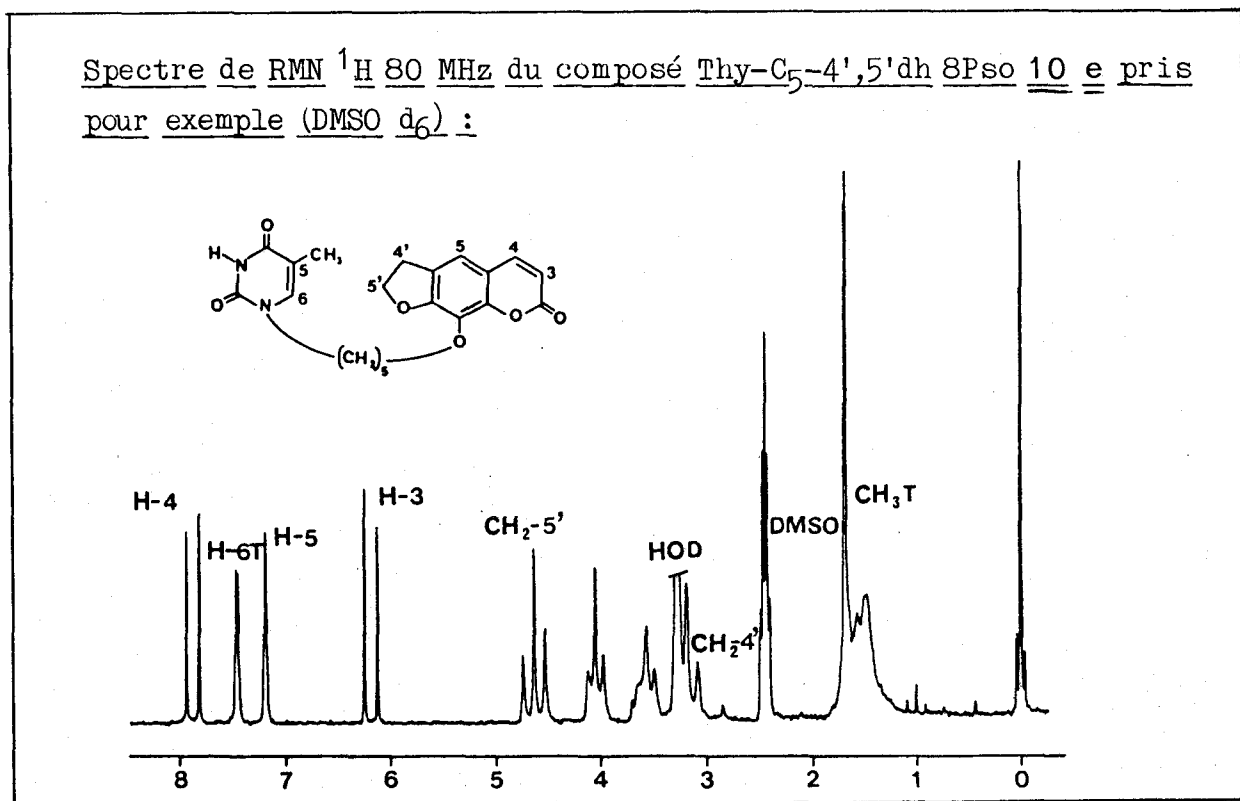
L'hydroxy-8 dihydro-4',5' psoralène 9 a donc été préparé par hydrogénation catalytique (Pd/C) du 8HP 3 en solution assez diluée dans l'éthanol. Dans ces conditions, la sélectivité est excellente (> 90 %, CLHP) et le rendement en produit pur est élevé (75 %).

2/ Obtention des modèles thymine-méthoxy-8 dihydro-4',5' psoralène Thy-C_n- 4',5' dh 8Pso 10 :



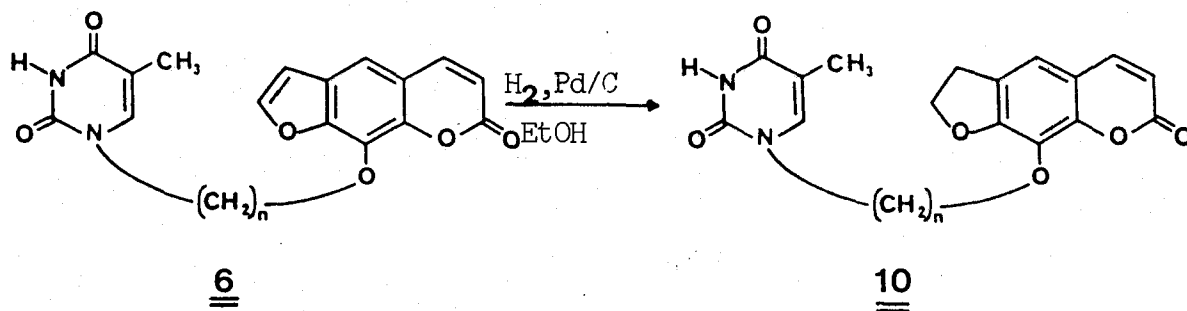
La condensation du 4',5'dh 8HP 9 et des composés Thy-C_n-Br 5 dans les conditions utilisées pour la préparation des modèles Thy-C_n-8Pso 6 conduit bien aux modèles attendus 10. Ces produits ont été purifiés de la même façon que les modèles Thy-C_n-8Pso 6, principalement par chromatographie sur colonne de silice en éluant avec de l'acétate d'éthyle bouillant.

Les modèles Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10c, d, e, f (n = 3, 4, 5, 6) ont été synthétisés avec une grande pureté (CCM, CLHP, analyse élémentaire).



Remarque :

Lors de nos essais d'hydrogénation, nous avons étudié la possibilité d'hydrogénation sélective des modèles Thy-C_n-8Pso 6.



Nous avons repris les conditions d'hydrogénation catalytique mises au point pour préparer le 4',5'dh 8HP 9. Dans ces conditions (Pd/C, Patm, Tamb, éthanol) :

- La propyl-1 thymine n'est pas hydrogénée.
- Les composés Thy-C_n-8Pso 6 sont sélectivement hydrogénés en 4',5' à plus de 80 %. Ceci a été mis en évidence par CLHP par comparaison avec des échantillons authentiques des modèles Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10 préparés à partir du 4',5'dh 8HP 9.

Cependant nous n'avons pas persévéré dans cette voie en raison de la très faible solubilité des modèles Thy-C_n-8Pso 6 en particulier dans l'éthanol (< 10⁻³ moles/l) et des difficultés de purification attendues pour des produits de polarités voisines.

II. SYNTHESE DES COMPOSES DE REFERENCE :

En vue des études physicochimiques des modèles préparés, nous avons synthétisé des composés destinés à servir de références pour chacun des noyaux aromatiques contenus dans les composés modèles Thy-C_n-8Pso 6, Ade-C_n-8Pso 8 et Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10 :

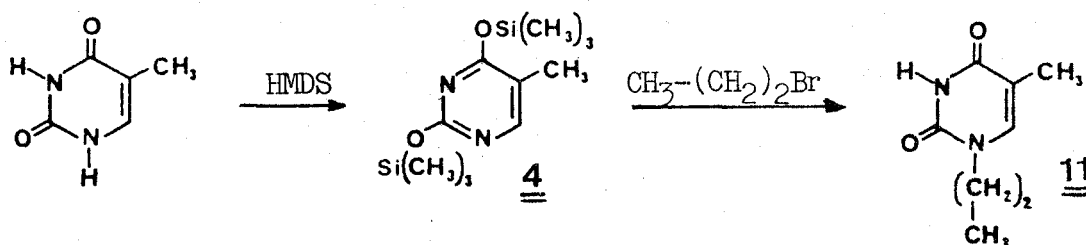
Noyau thymine : la propyl-1 thymine Thy-C₃ 11

Noyau adénine : la propyl-9 adénine Ade-C₃ 12

Noyau alcoxy-8 psoralène : le propoxy-8 psoralène 8Pso-C₃ 13

Noyau dihydro-4',5' psoralène : le propoxy-8 dihydro-4',5' psoralène 4',5'dh 8Pso-C₃ 14.

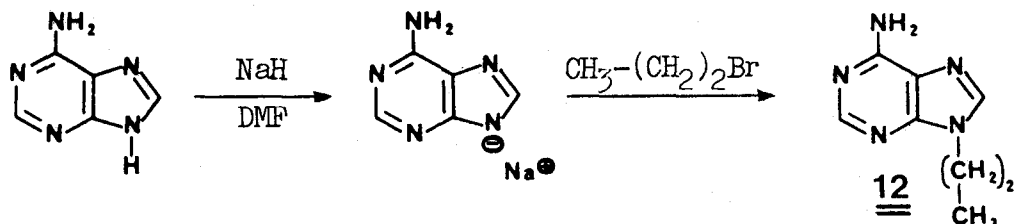
Propyl-1 thymine Thy-C₃ 11



Ce composé a été préparé suivant une méthode décrite par N.J. LEONARD et Coll. (54) en traitant la thymine silylée par un excès de bromo-1 propane.

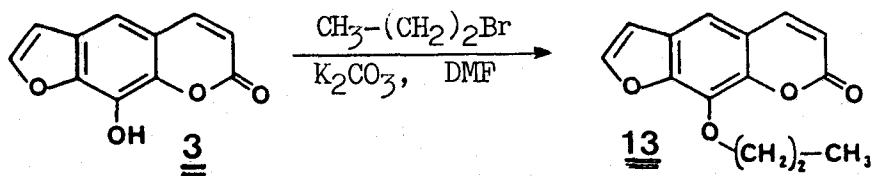
L'utilisation de la DMF comme solvant semble augmenter le rendement de la réaction (80 % au lieu de 50 %).

Propyl-9 adénine Ade-C₃ 12 :



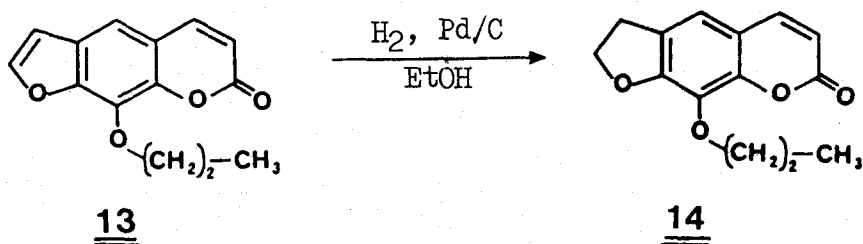
La synthèse de ce composé se fait par réaction de l'adénylate de sodium avec le bromo-1 propane suivant le mode opératoire décrit par N.J. LEONARD and R.F. LAMBERT (55).

Propoxy-8 psoralène 8Pso-C₃ 13 :



Ce composé est obtenu en faisant réagir le 8HP 3 avec un excès de bromo-1 propane en présence de carbonate de potassium dans la DMF à 70°C, conditions utilisées pour la préparation des modèles Thy-C_n-8Pso 6

Propoxy-8 dihydro-4',5' psoralène 4',5'dh 8Pso-C₃ 14 :



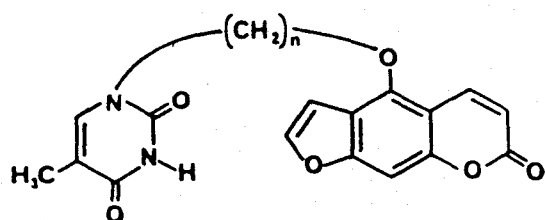
L'hydrogénation catalytique du 8Pso-C₃ 13, (autre composé de référence) dans les conditions utilisées pour la préparation du 4',5'dh 8HP 9, conduit au dérivé 4',5'dh 8Pso-C₃ 14 avec un très bon rendement (85 %).

En raison de la très grande importance de ces composés de référence dans l'étude physicochimique des modèles, la pureté de ces composés a été soigneusement vérifiée par chromatographie (CCM, CLHP) et par analyse élémentaire d'échantillons représentatifs de la quantité totale de produit préparé.

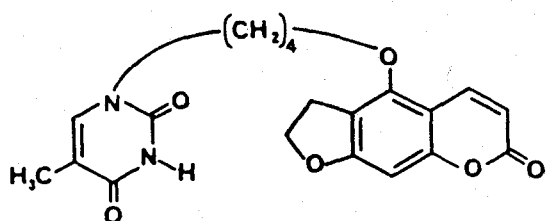
III. MODELES DE LA SERIE DU METHOXY-5 PSORALENE 2 :

Parallèlement à la synthèse et à l'étude des composés modèles du méthoxy-8 psoralène 1, Georges HUART a entrepris lors de sa thèse de 3ème Cycle, la synthèse et l'étude de modèles complémentaires de type méthoxy-5 psoralène 2.

Suivant des voies de synthèse similaires à celles qui ont été utilisées pour préparer les composés Thy-C_n-8Pso 6 et Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10, les modèles suivants ont été obtenus :

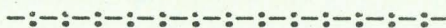


Thy-C_n-5Pso 15b, c, d, e, f, 1
n = 2, 3, 4, 5, 6 et 12

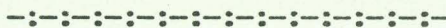


Thy-C₄-4',5'dh 5Pso 16

CHAPITRE II



ETUDE PHYSICOCHIMIQUE



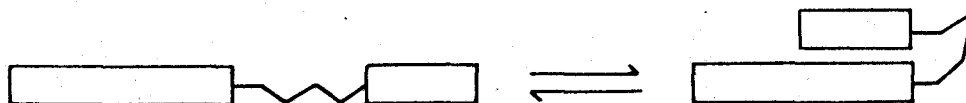
Nous avons synthétisé une série de modèles dans lesquels une base est associée à un psoralène. Nous allons maintenant rechercher dans les composés préparés, l'existence d'interactions d'empilement base-psoralène analogues à celles se produisant lors de l'intercalation du psoralène, en solution tout d'abord puis dans le cristal.

I. ETUDE PHYSICOCHIMIQUE EN SOLUTION

A. INTRODUCTION

Notre but est d'étudier les interactions moléculaires attractives qui conduisent à l'empilement base-psoralène et à l'intercalation des psoralènes dans l'ADN.

Dans le cas des composés préparés, l'existence de ces interactions devrait provoquer un repliement des molécules et la formation de complexes "noyau-noyau" intramoléculaires ("stacking") :



La mise en évidence de tels complexes et l'étude quantitative du repliement nécessitent l'utilisation de techniques expérimentales très sensibles et très précises permettant de travailler à des concentrations faibles de façon à éviter les interactions intermoléculaires.

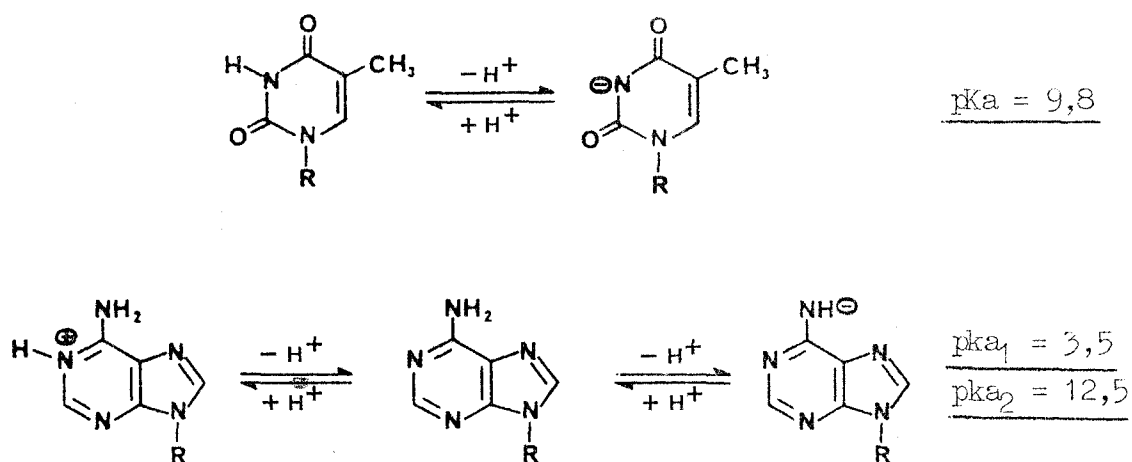
Précédemment, dans notre laboratoire, des composés analogues dans lesquels une base est associée à un noyau hétérocyclique intercalant, quinoléine ou acridine, ont été étudiés. Des interactions attractives très fortes, similaires à celles observées lors de l'intercalation des composés hétérocycliques "parents" ont été mises en évidence et étudiées par spectroscopie UV et par RMN (41 à 43, 45, 46).

Dans le cas des composés modèles du psoralène, nous utiliserons également ces deux techniques. La spectrophotométrie UV, très souvent employée pour mettre en évidence l'intercalation des psoralènes dans l'ADN (11), nous permettra de comparer la complexation, si elle se produit, à l'intercalation. Elle permet également une mesure de l'état de l'équilibre conformationnel dans des conditions variées. L'étude par RMN pourra donner des informations plus spécifiques sur la structure des complexes et pourra confirmer les résultats obtenus lors de l'étude UV.

Conditions de l'étude physicochimique :

Cette étude sera réalisée dans l'eau, constituant essentiel du milieu biologique, dans lequel l'intercalation des psoralènes a été observée.

Si nous examinons les équilibres de dissociation observés pour la thymidine et l'adénosine (66) :



Nous voyons que les bases présentes dans les modèles ne sont pas ionisées dans l'eau pure. Il en est de même pour la partie psoralène de ces composés, la lactone de la coumarine ne s'ouvrant qu'en milieu fortement basique.

Nous pourrions donc mener notre étude en solution aqueuse non tamponnée.

Les composés modèles se sont avérés très faiblement solubles dans l'eau pure. L'addition d'une faible proportion d'un solvant organique est indispensable pour la solubilisation, on ajoute donc :

* 5 % d'éthanol dans l'eau pour l'étude UV, le mélange obtenu permet d'obtenir les spectres jusqu'à 205 nm.

* 5 % de DMSO d_6 dans l'eau lourde lors de l'étude RMN. Le DMSO constitue le meilleur solvant des composés modèles et permet d'atteindre les concentrations nécessaires à l'étude par RMN.

De façon à définir la nature et l'intensité des forces mises en jeu lors du repliement des modèles, nous tenterons de faire varier la proportion de complexe en changeant la température (de 0 à 80°C dans l'eau) et le solvant (mélanges eau-éthanol, dichlorométhane, solvants transparents jusque 230 nm pour l'étude UV ; DMSO d_6 lors de l'étude RMN).

B. PRINCIPES DES METHODES UTILISEES

1/ Etude UV :

a) Principe de la méthode (67) :

La propriété que présente l'ADN à l'état natif d'absorber beaucoup moins la lumière que dans sa forme dénaturée (ou que les mononucléotides correspondants) est connue et utilisée depuis longtemps. Par exemple pour suivre la dénaturation de l'ADN, la méthode la plus couramment employée est la spectrophotométrie UV : la "fusion" est accompagnée d'une augmentation de l'absorption à 260 nm d'environ 40 %.

La diminution de l'absorption est donc une caractéristique du polymère organisé. On a montré que cette décroissance était plus précisément liée au fait que les chromophores impliqués (bases puriques et pyrimidiques) sont régulièrement empilés les uns au-dessus des autres.

Deux théories très voisines ont permis de rendre compte de ce phénomène, celle de TINOCO (68) et celle de RHODES (69). Pour l'ADN natif, en l'absence de transfert électronique d'une base à l'autre (complexe de transfert de charge), ces théories considèrent la perturbation amenée par le champ électrique d'une base sur le moment de transition électronique d'une

autre la . Ceci conduit à la notion d'effet hypochrome %H ou décroissance de l'absorption lors de l'empilement des bases.

Cet effet a été défini à partir des forces d'oscillateur f des transitions électroniques observées qui sont liées aux moments de ces transitions (70). Il peut se mesurer à partir des spectres d'absorption du polymère et de son (ou de ses) groupement(s) monomère(s).

$$\%H = \left(1 - \frac{f \text{ polymère}}{f \text{ monomère}}\right) \cdot 100$$

En accord avec cette théorie, des effets hypochromes ont été mis en évidence (et ont permis d'étudier de nombreuses interactions moléculaires) dans des polymères (71), des oligonucléotides (67, 72), des bichromophores (dinucléotides par exemple) (73, 74) et lors de l'intercalation de composés aromatiques plans dans l'ADN (75, 76).

b) Application de l'effet hypochrome à l'étude de bichromophores:

Dans l'eau, WARSHAW et TINOCO (73) ont mis en évidence un effet hypochrome significatif pour des dinucléotides. En relation avec des études de dichroïsme circulaire, cet effet a été relié à l'existence de formes repliées de ces dinucléotides et a permis d'estimer leur degré d'empilement.



A partir de ce résultat, le groupe de N.J. LEONARD a étudié un grand nombre de molécules dans lesquelles deux bases sont reliées par une chaîne carbonée (54, 56). La mesure de l'effet hypochrome observé a permis d'étudier l'équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée" et a été utilisée pour classer l'aptitude des bases à se complexer entre elles. Dans notre laboratoire, des effets hypochromes importants ont été mis en évidence pour des composés dans lesquels une base est associée à un intercalant de type quinoléine ou acridine. Ces effets ont été reliés à l'existence de formes repliées, la présence de ces formes a également été confirmée par RMN (41 à 43, 45, 46).

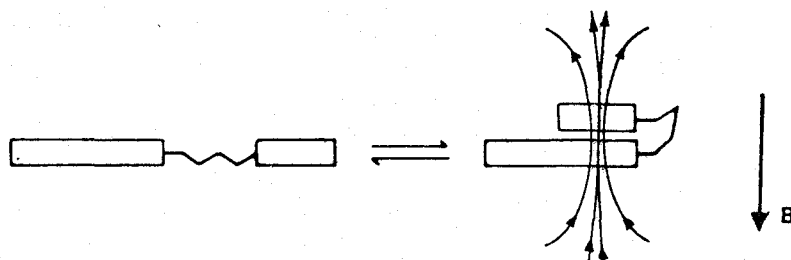
Dans le cas de bichromophores aromatiques plans, l'ensemble des travaux publiés permet donc d'interpréter l'effet hypochrome (%H) comme une mesure de l'interaction entre ces deux chromophores.

Néanmoins cette mesure demeure semi-quantitative, la valeur de cet effet $\%H$ est fonction de la nature des chromophores en interaction et de leurs orientations réciproques (67, 70, 77, 78). Dans l'état actuel des théories avancées, il semble que la grandeur de $\%H$ ne soit pas calculable avec précision.

2/ Etude par RMN :

La spectroscopie de RMN permet de détecter avec une grande sensibilité les variations conformationnelles d'une molécule.

De nombreux auteurs ont utilisé la RMN pour étudier les interactions mises en jeu lors du repliement de dimères aromatiques du même type que les composés modèles préparés. Citons pour exemples les travaux réalisés en série dinucléotides (67, 79, 80) ou en série bis-intercalants (de type acridine par exemple) (81, 82) et les travaux du laboratoire, qui ont porté sur l'étude de modèles base-quinoléine ou acridine antimalariques (45, 46).



La RMN du proton permet donc d'étudier le repliement intramoléculaire lors de l'équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée".

En absence d'interactions intermoléculaires, 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 (composés de référence).

La mesure précise des déplacements chimiques δ observés dans les mêmes conditions pour les composés modèles et leurs références, permet de déterminer pour chaque proton le blindage $\Delta\sigma$ dû à la complexation. $\Delta\sigma$ caractérise l'état de l'équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée".

$$\Delta\sigma \text{ (ppm)} = \delta \text{ référence (ppm)} - \delta \text{ modèle (ppm)}$$

En cas de repliement total, il est possible, dans certains cas, d'accéder à la structure du complexe.

C. ETUDE DANS L'EAU :

1/ Interactions intermoléculaires :

Dans l'eau, certains composés aromatiques ont tendance à s'associer sous la forme d'aggrégats.

Pour étudier l'équilibre de complexation des composés préparés, nous devons d'abord vérifier l'absence d'interactions intermoléculaires dans les conditions expérimentales utilisées.

En spectrophotométrie UV, l'absorption de chaque produit est régie par la loi de BEER-LAMBERT dans la gamme de concentrations dans laquelle nous travaillons ($5 \cdot 10^{-6}$ à $8 \cdot 10^{-5}$ moles/l). Nous avons également vérifié que les spectres d'absorption des mélanges équimoléculaires des composés de référence Thy-C₃ 11 + 8Pso-C₃ 13, Ade-C₃ 12 + 8Pso-C₃ 13 étaient identiques à la somme des spectres de ces composés pris séparément en solution diluée (eau-éthanol 95 : 5, 20°C).

Pour notre étude par RMN, nous avons tout d'abord étudié les composés de référence et les composés modèles en solutions diluées dans le mélange D₂O - DMSO d₆ (95 : 5). La gamme de concentrations dans laquelle nous avons travaillé s'est avérée très limitée en raison de la solubilité des produits et de la sensibilité de l'appareil 80MHz utilisé.

Cependant, nous n'avons pas observé de variations significatives des déplacements chimiques des protons aromatiques des composés Thy-C₃ 11, Ade-C₃ 12, 8Pso-C₃ 13, Thy-C₄-8Pso 6d et Ade-C₄-8Pso 8d entre 10^{-4} et $5 \cdot 10^{-5}$ moles/l (tableaux 22, 23 p 154-155).

Nous pouvons donc conclure à une absence d'interactions intermoléculaires dans cette gamme de concentration.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié par RMN le comportement de mélanges équimoléculaires des composés de référence Thy-C₃ 11 + 8Pso-C₃ 13 et Ade-C₃ 12 + 8Pso-C₃ 13. Les valeurs des déplacements chimiques observés pour des solutions de concentration égale à 10^{-4} moles/l sont reportées dans le tableau 22 p 154. Ces valeurs sont les mêmes que celles obtenues précédemment,

dans les mêmes conditions, pour les composés de référence (voir figures 8 et 9 p 55).

Ceci confirme l'absence d'interactions intermoléculaires qui avait été constatée lors de l'étude UV dans des conditions expérimentales proches.

Nous pouvons conclure à l'absence d'interactions intermoléculaires dans toutes nos conditions expérimentales.

2/ Etude UV :

a) Calcul de l'effet hypochrome :

Les psoralènes étudiés absorbent peu au-dessus de 320 nm. Leur spectre comporte de nombreuses transitions électroniques mal différenciées. La thymine et l'adénine absorbent dans une région voisine et en-dessous de 300 nm. L'effet hypochrome est donc mesuré sur plusieurs transitions électroniques. Pour cela, nous devons comparer le spectre d'absorption d'un modèle à la somme des spectres d'absorption des composés de référence correspondants. En effet, en absence d'interactions entre les chromophores, la somme des spectres des composés de référence doit être égale au spectre du modèle :

$$H = \left[1 - \frac{f \text{ modèle}}{(f \text{ Base-C}_3 + f \text{ Pso-C}_3)} \right] \cdot 100$$

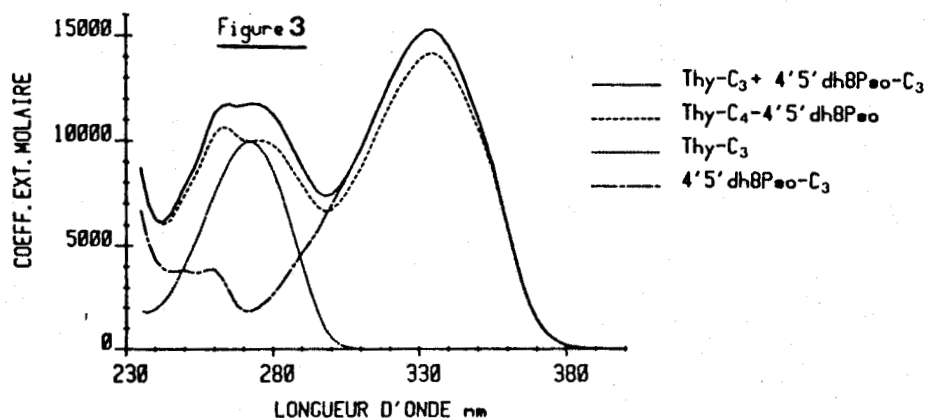
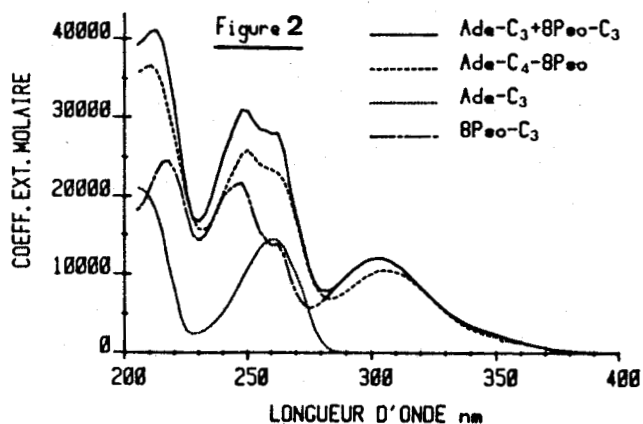
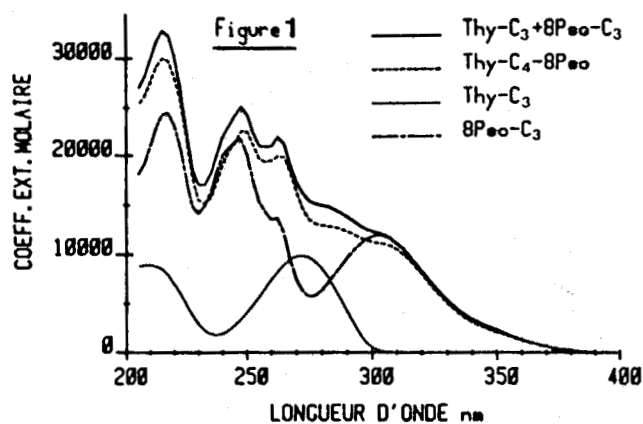
Les forces d'oscillateur f sont déterminées en intégrant les spectres d'absorption des composés modèles et de référence :

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

b) Résultats :

Dans un mélange eau-éthanol 95 : 5, nous avons enregistré à 20°C, les spectres de solutions diluées des différents composés. Seul le composé Thy-C₁₂-8Pso 61 n'a pas été étudié en raison de sa trop faible solubilité dans l'eau.

Tous les spectres des composés modèles comparés à ceux des composés de référence présentent dans l'eau un effet hypochrome assez important et un léger effet bathochrome (2 à 4 nm) (figures 1, 2, 3).



Figures 1, 2, 3 : Comparaison des spectres d'absorption des modèles Thy-C₄-8Pso 6d, Ade-C₄-8Pso 8d et Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d avec la somme des spectres des composés de référence correspondants Thy-C₃ 11, Ade-C₃ 12, 8Pso-C₃ 13 et 4',5'dh 8Pso-C₃ 14. Eau-éthanol 95 : 5, 20°C, 2 à 5.10⁻⁵ mole/l.

Ces effets sont l'indice de l'existence d'interactions d'empilement entre la base et le noyau psoralène dans les modèles. Ils traduisent un repliement important pour tous les composés en solution aqueuse.

BBS
LILLE

Intercalation des psoralènes dans l'ADN provoque également des effets hypochrome et bathochrome importants (11, 21).

Dans le cas du méthoxy-8 psoralène (8MOP) 1, l'étude de l'intercalation par spectrophotométrie UV est délicate : ce composé absorbe peu la lumière au-dessus de 300 nm, région dans laquelle l'ADN n'absorbe pas. Néanmoins, sur la bande d'absorption du 8MOP située à 302 nm, on a pu noter lors de l'intercalation un effet bathochrome de 8 nm ($\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$) et une hypochromicité * de 35 % (83).

Les effets observés dans l'eau pour les composés modèles étudiés sont analogues.

Il en va de même pour d'autres composés modèles base-intercalant (quinoléine, acridine, proflavine) étudiés au laboratoire (41 à 43, 45, 46).

A partir des spectres décrits précédemment, les effets hypochromes %H ont été calculés dans différents domaines d'absorption pour chacun des composés modèles étudiés (tableaux 1, 2, 3).

Modèles thymine-méthoxy-8 psoralène Thy-C_n-8Pso 6 :

Modèle	Thy-C ₃ -8Pso	Thy-C ₄ -8Pso	Thy-C ₅ -8Pso	Thy-C ₆ -8Pso
Domaine en nm	<u>6c</u>	<u>6d</u>	<u>6e</u>	<u>6f</u>
400-300 ^a	7,0	7,0	4,5	4,0
400-280	9,5	9,0	6,5	5,5
400-260	10,0	8,5	8,5	8,5
400-230 ^b	9,5	9,0	9,0	9,0
400-205 ^c	-	9,0	-	-

Tableau 1 : Effets hypochromes %H mesurés pour les composés Thy-C_n-8Pso 6c, 6d, 6e, 6f dans différents domaines d'absorption (eau-éthanol 95 : 5, 20°C). a : dans ce domaine, l'absorption de la thymine est négligeable ; b : minimum d'absorption commun aux modèles et composés de référence ; c : longueur d'onde limite dans nos conditions expérimentales.

* Par définition, l'hypochromicité correspond à la diminution de l'intensité d'absorption à une longueur d'onde définie.

Modèles adénine-méthoxy-8 psoralène Ade-C_n-8Pso 8 :

Modèle Domaine en nm	Ade-C ₃ -8Pso <u>8c</u>	Ade-C ₄ -8Pso <u>8d</u>	Ade-C ₆ -8Pso <u>8f</u>
400-300 ^a	10,0	8,0	7,0
400-290 ^a	12,0	10,5	9,0
400-280	12,5	11,5	10,0
400-260	10,0	10,5	9,0
400-250 ^b	13,0	14,0	11,5
400-205 ^c	12,0	12,5	9,0

Tableau 2 : Effets hypochromes %H mesurés pour les composés Ade-C_n-8Pso 8c, 8d, 8f dans différents domaines d'absorption (eau-éthanol 95 : 5, 20°C). a : dans ce domaine, l'absorption de l'adénine est négligeable ; b : minimum d'absorption commun aux modèles et composés de référence ; c : longueur d'onde limite dans nos conditions expérimentales.

Modèles thymine-méthoxy-8-dihydro 4',5' psoralène Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10 :

Modèle Domaine en nm	<u>10c</u> ; n=3	<u>10d</u> ; n=4	<u>10e</u> ; n=5	<u>10f</u> ; n=6
400-300 ^a	8,0	7,0	5,5	4,5
400-240 ^b	8,0	8,0	6,0	4,0
400-205 ^c	-	7,0	5,0	4,0

Tableau 3 : Effets hypochromes %H mesurés pour les composés Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10c, 10d, 10e, 10f dans différents domaines d'absorption (eau-éthanol 95 : 5, 20°C). a : dans ce domaine, l'absorption de la thymine est négligeable ; b : minimum d'absorption commun aux modèles et au composé de référence 4',5'dh 8Pso-C₃ 14 ; c : longueur d'onde limite dans nos conditions expérimentales.

BUS
LILL

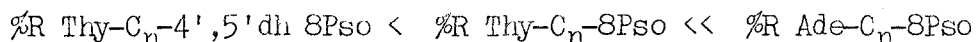
Dans les tableaux 1, 2 et 3, les valeurs de %H reportées sont à comparer entre elles, pour une même série de modèles avec une incertitude de $\pm 0,5$ unités et en valeur absolue de ± 1 unité.

On constate que toutes ces valeurs de %H sont significatives et notables, ce qui indique un repliement de tous les modèles considérés. Remarquons que ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles obtenues dans l'eau (20°C, pH = 7) pour différents dinucléotides (67, 73) ou pour des modèles analogues Base-(CH₂)_n-Base (54), par exemple : pour ApA, %H = 6,8 ; UpA %H = 1,4 ; Ade-(CH₂)₃-Ade, %H = 16,5 ; Ade-(CH₂)₃-Ura, %H = 8,0.

Dans la littérature, les valeurs de %H obtenues pour des systèmes portant différents chromophores ont généralement été comparées directement entre elles pour classer les affinités respectives de ces chromophores (54, 76). Cette approximation demande à être utilisée avec prudence.

Nous ferons quelques remarques à partir des valeurs de %H portées dans les tableaux 1, 2 et 3. Ces remarques seront confirmées lors d'études complémentaires (étude en température et par RMN).

- Ces valeurs de %H sont en faveur d'un degré de repliement %R qui se classe ainsi :



- Le degré de repliement semble diminuer avec l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée surtout dans le cas des composés Ade-C_n-8Pso 8 et Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10.
- Les spectres d'absorption UV des composés étudiés comportent de nombreuses transitions électroniques assez mal différenciées (voir figures 1, 2 et 3). La variation de %H avec le domaine d'absorption reflète très probablement pour une même série de modèles, des changements dans la structure "moyenne" des complexes formés.

Par exemple, dans le tableau 2, pour les composés Ade-C₃-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d, les degrés de repliement sont certainement proches car les

effets hypochromes mesurés sur l'ensemble du spectre (400-230 nm) sont voisins: %H 8c = 13, %H 8d = 14. Par contre, les variations des valeurs de %H avec le domaine d'absorption ne vont pas dans le même sens : %H 400-300 nm 8c: 10, 8d : 8. Ceci indique probablement que les structures "moyennes" des complexes formés pour ces deux composés sont un peu différentes.

Pour aller plus loin dans nos conclusions, il est maintenant nécessaire de relier quantitativement les effets hypochromes mesurés aux degrés de repliement de chacun des composés étudiés.

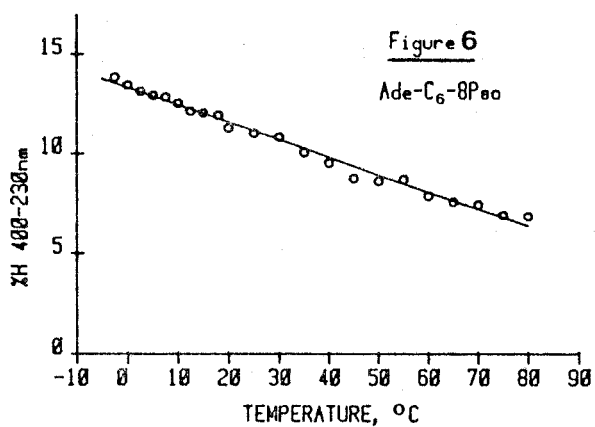
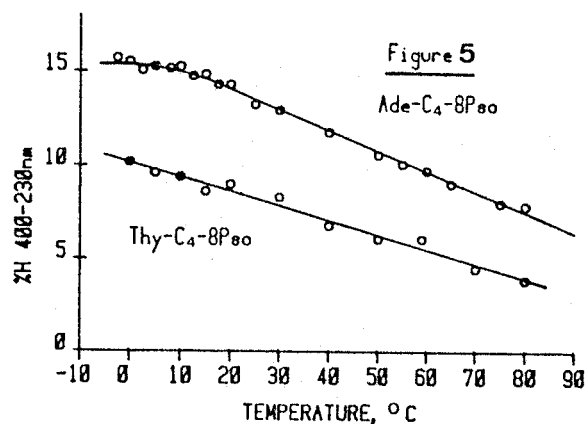
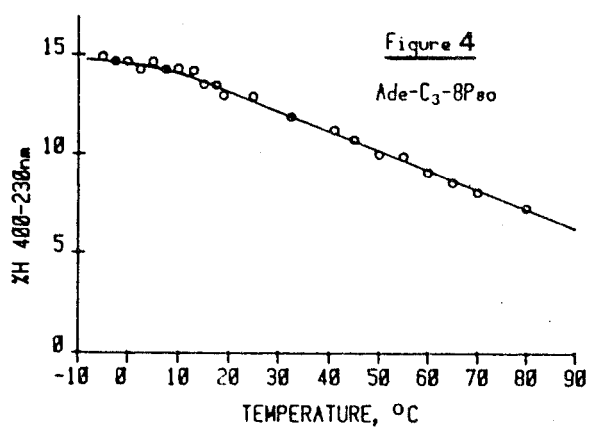
Degré de repliement - Force des interactions :



La détermination quantitative du degré de repliement des modèles n'est possible qu'à la condition de connaître séparément les caractéristiques d'absorption de la forme ouverte et celles du complexe formé.

Les caractéristiques UV de la forme ouverte sont accessibles à partir de celles des composés de référence. Il faut donc atteindre une complexation totale pour observer les caractéristiques d'absorption de la forme repliée seule en solution. La température est un paramètre que l'on peut faire varier et qui doit intervenir directement sur la position de l'équilibre formes ouvertes \rightleftharpoons formes repliées.

Nous avons donc étudié la variation de %H mesuré dans le mélange eau-éthanol 95 : 5 en fonction de la température pour les composés Thy-C₄-8Pso 6d et Ade-C_n-8Pso 8c, d, f. L'effet hypochrome %H a été mesuré entre -5 et +80°C à partir des spectres des modèles et de ceux des composés de référence relevés dans les mêmes conditions aux mêmes températures (Figures 4, 5, 6).



Figures 4, 5 et 6 : Variation de l'effet hypochrome %H (mesuré entre 400 et 230 nm) avec la température ; eau-éthanol 95 : 5.

Figure 4 : Ade-C₃-8P₈₀ 8c.

Figure 5 : Ade-C₄-8P₈₀ 8d et Thy-C₄-8P₈₀ 6d.

Figure 6 : Ade-C₆-8P₈₀ 8f.



On observe :

1. Une décroissance de %H avec l'augmentation de la température : le repliement diminue lorsque la température augmente.

2. Une valeur maximale de %H est atteinte à une température proche de 0°C pour les composés Ade-C₃-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d. Un palier est visible entre -5 et 10°C. Ces courbes sont discutées en termes d'analyse statistique dans la partie expérimentale (p 152). Cette analyse confirme clairement qu'au voisinage de 0°C nous atteignons des valeurs limites de l'effet hypochrome %H_{max}.

En tenant compte des erreurs expérimentales et de l'allure des courbes, nous estimons ces valeurs à :

$$15,0 < \%H_{\max} < 16,0 \text{ pour Ade-C}_3\text{-8Pso } \underline{\underline{8c}}$$

$$16,0 < \%H_{\max} < 17,0 \text{ pour Ade-C}_4\text{-8Pso } \underline{\underline{8d}}$$

L'interprétation la plus probable de ces paliers suppose que le degré de repliement augmente au fur et à mesure que la température diminue jusqu'à atteindre une valeur constante de 100 % aux basses températures.

L'obtention d'un tel palier constitue un outil très précieux pour analyser de manière quasi-quantitative le phénomène de complexation.

Nous arrivons à un repliement total au voisinage de 0°C pour les composés Ade-C₃-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d (ceci est tout à fait comparable aux résultats obtenus précédemment au laboratoire lors de l'étude UV et par RMN de composés du même type adénine-quinoléine ou adénine-acridine (43, 45, 46).

Les courbes %H = f(température) peuvent être analysées en terme de degré de repliement et peuvent permettre le calcul des grandeurs thermodynamiques mises en jeu lors de l'interaction adénine-psoralène.

Ceci est possible en considérant deux états limites : la forme ouverte et la forme repliée, et en faisant l'hypothèse selon laquelle la différence d'énergie entre ces deux états limites est grande comparée aux différences d'énergie entre les microétats d'une même forme limite. Un tel traitement a été utilisé à diverses reprises dans la littérature pour interpréter le degré de complexation intramoléculaire de dinucléotides (67, 76, 80, 84 à 87).

On peut ainsi calculer :

$$- \text{le degré de repliement } \%R = \frac{\%H}{\%H_{\max}} \cdot 100$$

- la constante de l'équilibre de complexation K à une température donnée:

$$K = \frac{\text{Forme repliée}}{\text{Forme ouverte}} = \frac{\%H}{(\%H_{\max} - \%H)}$$

Les degrés de repliement des composés Ade-C₃-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d ont été déterminés à différentes températures et sont indiqués dans le tableau 4.

Les droites de VAN'T HOFF représentant la variation du logarithme de la constante d'équilibre K en fonction de l'inverse de la température T, permettent d'obtenir les variations d'enthalpie ΔH° et d'entropie ΔS° mises en jeu lors de la complexation (voir pour exemple, la figure 7). Les valeurs obtenues sont portées dans le tableau 5. Elles sont les mêmes pour les composés Ade-C₃-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d : $\Delta H^\circ = -30 \pm 5 \text{ KJ/mol}$ et $\Delta S^\circ = -90 \pm 15 \text{ J/mol/deg}$. Ceci indique que l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée de C₃ à C₄ ne change pas les paramètres thermodynamiques de l'interaction adénine-psoralène.

Composés	Température en °C		
	0	20	60
Ade-C ₃ -8Pso ^a 15 < %H _{max} < 16	100 > %R > 90	>80	>55
Ade-C ₄ -8Pso ^a 16 < %H _{max} < 17	100 > %R > 90	>80	>55
Ade-C ₆ -8Pso 14 ^b < %H _{max} < 17 ^c	>80 ^d	>65 ^d	>45 ^d
Thy-C ₄ -8Pso 10,5 ^b < %H _{max} < 17 ^c	>60 ^d	>50 ^d	>25 ^d

Tableau 4 : Variation du degré de repliement (%R) avec la température pour les composés Ade-C_n-8Pso 8 et Thy-C₄-8Pso 6d (eau-éthanol 95 : 5). a : deux limites de %H max sont données en tenant compte des erreurs expérimentales. b : valeur la plus grande de %H observée à basse température. c : valeur la plus grande de %H_{max} observée et envisageable. d : %R est probablement proche de cette valeur.

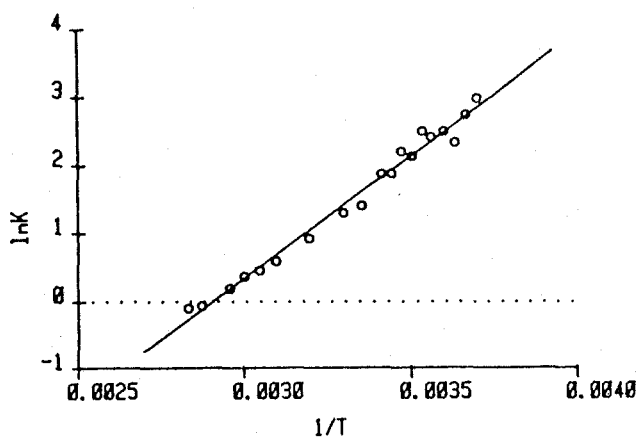


Figure 7 : Droite de VAN'T HOFF représentant la variation de ln K en fonction de 1/T dans le cas du composé Ade-C₄-8Pso 8d. K : constante d'équilibre forme ouverte-forme repliée. T : température en K ; %H_{max} = 16,5 ; eau-éthanol 95:5.

BUS
LILLE

Composés	%H _{max}	ΔH° KJ/mol	ΔS° J/mol/deg	r ^c
Ade-C ₃ -8Pso ^a	15,0	-36	-100	0,990
	15,5	-30	-90	
	16,0	-26	-77	
Ade-C ₄ -8Pso ^a	16,0	-35	-105	0,992
	16,5	-30	-88	
	17,0	-26	-77	
Ade-C ₆ -8Pso ^b	15,0	-23	-69	0,988
	16,0	-21	-61	0,994
	17,0	-17	-54	0,996

Tableau 5 : Variation des paramètres thermodynamiques ΔH° et ΔS° mis en jeu lors du repliement des composés Ade-C_n-8Pso 8c, d, f (eau-éthanol 95 : 5). a : Plusieurs valeurs de %H_{max} sont envisageables en raison des incertitudes. b : Les valeurs extrêmes de %H_{max} obtenues pour Ade-C₃-8Pso et Ade-C₄-8Pso ont été utilisées pour le calcul. c : r coefficient de corrélation de la régression.

Dans le cas du composé Ade-C₆-8Pso 8f, la courbe %H = f(T) n'atteint pas de palier (Figure 6) ; mais il est néanmoins possible de déterminer approximativement le degré de repliement. Il faut faire l'hypothèse selon laquelle %H_{max} est compris entre la valeur la plus grande mesurée pour ce composé à basse température (%H = 14, Figure 6) et la valeur maximale obtenue pour les composés Ade-C₃-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d (%H < 17, Figure 5). La valeur la plus grande de %H_{max} est la plus probable, les deux chromophores étant les mêmes et les structures des complexes formés assez voisines.

Ces calculs (tableau 4) indiquent un degré de repliement de 65% à 20°C pour ce composé, plus faible que celui déterminé pour les composés Ade-C₃-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d qui s'élève à 80%. Les valeurs de ΔH° et ΔS° ont aussi été estimées en formulant la même hypothèse :

-23 < ΔH° < -17 KJ/mole et -70 < ΔS° < -55 J/mole/deg (Tableau 5).

Modèles en série thymine :

La variation de %H en fonction de la température dans le cas du composé Thy-C₄-8Pso 6d est linéaire même au voisinage de 0°C (Figure 5). Il n'est donc pas possible de déterminer le degré de repliement des modèles Thy-C_n-8Pso 6 comme nous l'avons fait précédemment. Pourtant la valeur de %H_{max} trouvée pour les modèles de l'adénine peut nous fournir une indication approximative de ce degré de repliement. Si nous supposons que la valeur de %H_{max} correspondant à une complexation totale pour ces composés est comprise entre 10,5, la valeur la plus grande observée à 0°C pour le composé Thy-C₄-8Pso 6d (Figure 5) et 17, la valeur maximale observée pour les composés de la série adénine (Figure 6), nous trouvons un degré de repliement des composés Thy-C_n-8Pso de l'ordre de :

$$90\% > \%R > 50\% \text{ à } 20^\circ\text{C} \text{ (Tableau 4)}$$

Une valeur proche de 50% est la plus probable.

C. DISCUSSION :

Interactions adénine-psoralène :

Les composés Ade-C₃-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d ont montré des comportements voisins au cours de cette étude :

- Un repliement total au voisinage de 0°C (Figure 4 et 5).
- Des degrés de repliement très proches, quelle que soit la température (Tableau 4).
- Les paramètres thermodynamiques de l'interaction adénine-psoralène observée pour chacun d'eux sont identiques (Tableau 5) :

$$\Delta H^\circ = -30 \pm 5 \text{ KJ/mole et } \Delta S^\circ = -90 \pm 15 \text{ J/mol/degre}$$

Ceci est en accord avec les résultats du Tableau 2. Nous trouvons là deux valeurs voisines de l'effet hypochrome mesuré sur tout le spectre à 20°C:

%H 400-230 nm , 8c : 13,0 et 8d : 14,0

Pour ces deux composés 8c et 8d, il est cependant à noter des variations différentes de %H en fonction du domaine de calcul (Tableau 2) :

%H 400-300 nm, 8c : 10,0 et 8d : 8,0

%H 400-230 nm, 8c : 13,0 et 8d : 14,0

Dans les spectres UV enregistrés, on distingue de nombreuses transitions électroniques : bandes d'absorption de l'adénine (88) et du cycle psoralène (89, 90). Pour un modèle, les variations de %H avec le domaine d'absorption reflètent donc la manière dont les différentes transitions électroniques sont affectées par la complexation.

Dans le cas des composés Ade-C₃-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d, ces variations sont différentes bien que les degrés de complexation soient très voisins. Ceci indique que les structures "moyennes" des complexes formés sont un peu différentes.

Comme nous l'avons vu précédemment, ces deux complexes mettent en jeu les mêmes énergies.

Ces résultats confirment que l'hypothèse des deux états limites est tout à fait adaptée au traitement quantitatif des courbes %H = f(Température): un des états limites, le complexe, est bien constitué de microétats d'énergies voisines.

Pour le composé Ade-C₆-8Pso 8f, le repliement diminue fortement (Tableau 4) : à 20°C, il a été estimé à environ 65 %. Ceci s'explique en partie par l'augmentation des degrés de liberté du système ($\Delta S^\circ = -90$ J/mol/deg pour Ade-C₃-8Pso et Ade-C₄-8Pso, $-70 < \Delta S^\circ < -55$ J/mol/deg pour Ade-C₆-8Pso).

Les valeurs de ΔH° et ΔS° obtenues pour les composés Ade-C₃-8Pso et Ade-C₄-8Pso ($\Delta H^\circ = -30 \text{ KJ/mol}$, $\Delta S^\circ = -90 \text{ J/mol par degré}$) sont voisines de celles déterminées pour un dinucléotide de l'adénine : $\Delta H^\circ = -42 \text{ KJ/mol}$, $\Delta S^\circ = -126 \text{ J/mol/deg}$ (86) et pour un modèle Ade-C₃-Ade étudié au laboratoire : $\Delta H^\circ = -36 \text{ KJ/mol}$, $\Delta S^\circ = -90 \text{ J/mol/deg}$ (45).

Intéactions thymine-psoralène :

La figure 5 et les tableaux 1, 2 et 4 indiquent clairement que la thymine présente moins d'affinité pour le psoralène que l'adénine : à 20°C, %R Thy-C₄-8Pso 6d $\simeq 50\%$, %R Ade-C₄-8Pso 8d $> 80\%$. Il existe néanmoins un repliement appréciable dans l'eau pour tous les composés Thy-C_n-8Pso 6.

3/ Etude en RMN :

Cette étude a été considérablement limitée par l'insolubilité dans l'eau lourde des composés préparés ainsi que par la sensibilité de l'appareil de RMN utilisé.

Nous nous sommes essentiellement attachés à vérifier le repliement de trois modèles : Thy-C₄-8Pso 6d, Ade-C₄-8Pso 8d et Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d.

a) Résultats :

Nous avons tout d'abord enregistré les spectres de RMN ¹H 80 MHz des modèles Thy-C₄-8Pso 6d, Ade-C₄-8Pso 8d et Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d et ceux des composés de référence, en solution diluée (10⁻⁴ M) dans un mélange D₂O-DMSO d₆ 95 : 5 à 27°C (Figures 8, 9, 10).

Modèles Thy-C₄-8Pso 6d et Ade-C₄-8Pso 8d :

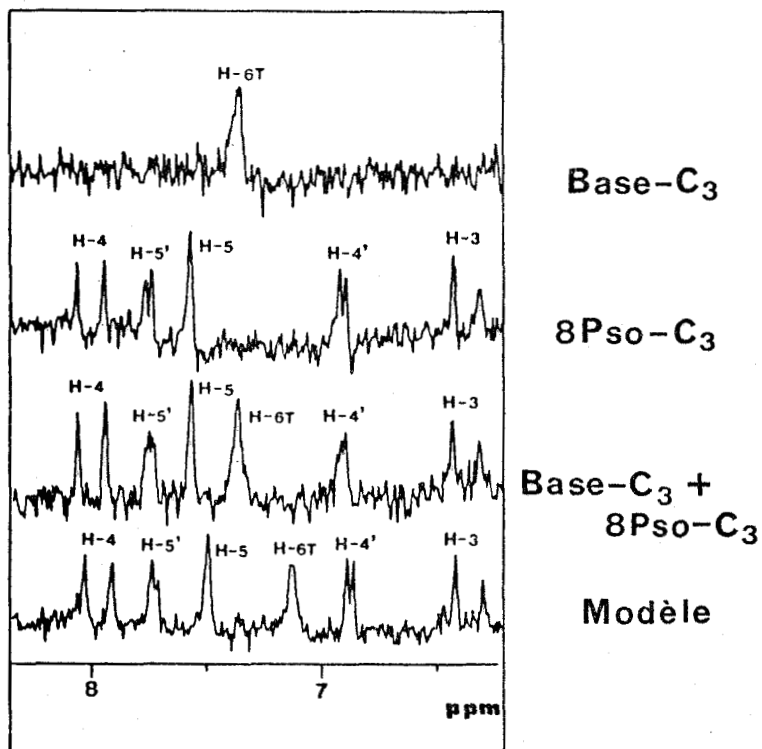


Figure 8

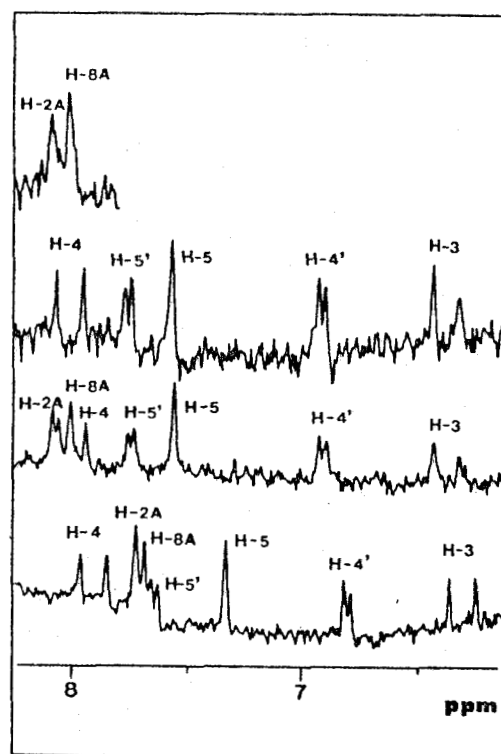


Figure 9

Figure 8 : Spectres de RMN ¹H 80 MHz des composés Thy-C₃ 11, 8Pso-C₃ 13, Thy-C₃ + 8Pso-C₃ en mélange équimoléculaire et Thy-C₄-8Pso 6d. D₂O-DMSO d₆ 95 : 5 ; 10⁻⁴ moles/l ; 27°C.

Figure 9 : Spectres de RMN ¹H 80 MHz des composés Ade-C₃ 12, 8Pso-C₃ 13, Ade-C₃ + 8Pso-C₃ en mélange équimoléculaire et Ade-C₄-8Pso 8d. D₂O - DMSO d₆ 95 : 5 ; 10⁻⁴ moles/l ; 27°C.



Modèle Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d :

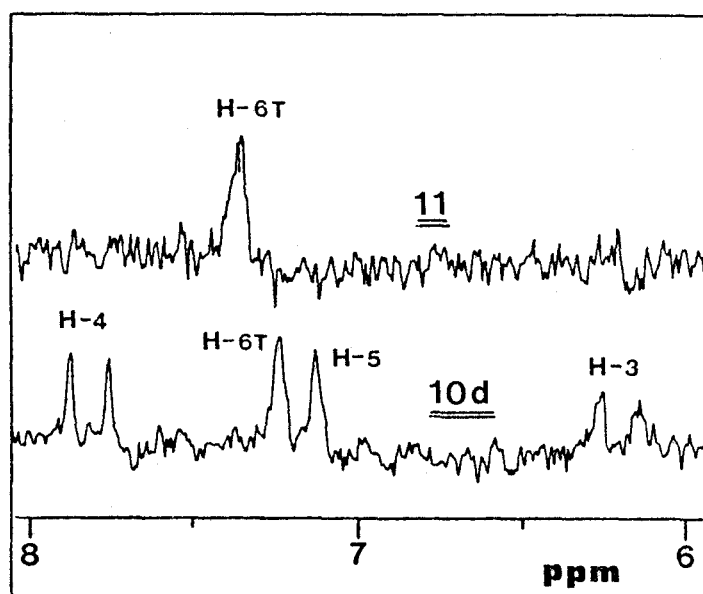


Figure 10 : Spectres de RMN ^1H 80 MHz des composés Thy-C₃ 11 et Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d. D₂O - DMSO d₆ 95 : 5 ; 10⁻⁴ moles/l ; 27°C.

Dans tous les cas, on constate sur les spectres enregistrés, des variations des déplacements chimiques (blindage) de certains protons des modèles, ce qui est le signe d'une association intramoléculaire des noyaux aromatiques base-psoralène.

Nous avons porté dans les tableaux 22,23 p 154-155 , les déplacements chimiques observés pour les protons aromatiques des différents composés étudiés. A partir de ces valeurs, nous avons déterminé les valeurs de blindage $\Delta\sigma$ pour chacun de ces protons (Tableau 6).

Composé	H-4	H-5'	H-5	H-4'	H-3	H-6T	CH ₃ T	H-2A	H-8A
Thy-C ₄ -8Pso	0,03	0,01	0,07	0,02	-0,02	0,22	0,23		
Ade-C ₄ -8Pso	0,10	0,10	0,23	0,10	0,06			0,37	0,34
Thy-C ₄ -4',5'dh8Pso	0,01		0,05		0,01	0,12	0,13		

Tableau 6 : Valeurs des blindages ($\Delta\sigma$ en ppm) observés lors du repliement intramoléculaire des modèles
 Thy-C₄-8Pso 64, Ade-C₄-8Pso 83, Thy-C₄-4',5'dh8Pso 104. D₂O-DMSO 95 : 5, 27°C, 10⁻⁴ moles/l.



b) Discussion :

Modèles Thymine-psoralène Thy-C₄-8Pso 6d et Thy-C₄-4'-5'dh 8Pso 10d :

Le courant de cycle de la thymine est extrêmement faible (91). Il en résulte que pour les composés Thy-C₄-8Pso 6d et Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d, les variations de déplacement chimique des protons du psoralène attendues sont très faibles voir inexistantes, même dans les conformations totalement repliées. Comme on peut le voir dans le tableau 6, les blindages $\Delta\sigma$ mesurés sont en effet négligeables.

Par contre, l'effet du cycle psoralène sur la thymine est important, par exemple pour le composé Thy-C₄-8Pso 6d $\Delta\sigma$ (H-6T) = 0,22 ppm et $\Delta\sigma$ (CH3T) = 0,23 ppm.

Ces valeurs sont significatives. Les différences de déplacement chimique ne sont pas attribuables à des interactions "intermoléculaires" comme cela a été démontré précédemment (p 38). Elles constituent donc un indice très fort en faveur du repliement de ces systèmes sans que toutefois on puisse les interpréter quantitativement en terme de degré de repliement.

Néanmoins, si on compare les valeurs obtenues pour les modèles Thy-C₄-8Pso 6d et Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d, on constate des valeurs toujours plus élevées pour le premier composé, par exemple $\Delta\sigma$ (CH3T) 6d : 0,23 ppm et 10d : 0,13 ppm. Ceci est en faveur d'une complexation plus importante pour le composé Thy-C₄-8Pso 6d par rapport au composé Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d.

Modèle Adénine-psoralène Ade-C₄-8Pso 8d :

Les blindages observés sur les protons 2 et 8 du noyau adénine sont très importants : $\Delta\sigma$ (H-2A) = 0,37 et $\Delta\sigma$ (H-8A) = 0,34 ppm. Ces deux protons sont affectés de façon similaire par la complexation, ce qui laisse penser que la surface de recouvrement adénine-psoralène est très grande.

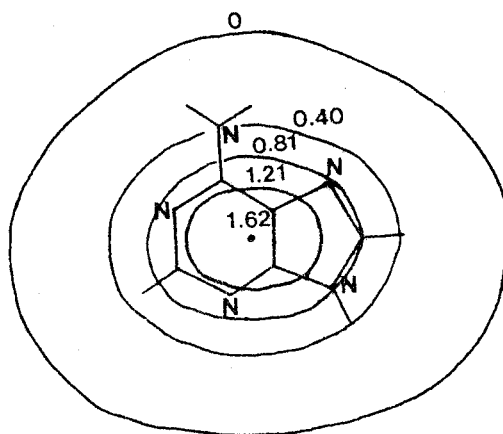
Ces valeurs $\Delta\sigma$ sont nettement plus élevées que celles observées pour le cycle thymine des composés Thy-C₄-8Pso 6d et Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d (Tableau 6). Ceci est l'indice d'un plus grand degré de repliement du composé Ade-C₄-8Pso 8d comparé à Thy-C₄-8Pso 6d, ce qui est en accord avec les résultats de l'étude UV.

Il est à remarquer également que les protons du psoralène sont affectés et notamment le proton H-5 ($\Delta\sigma = 0,23$ ppm). On sait qu'à la différence de la thymine, l'adénine présente un courant de cycle notable susceptible d'induire des blindages importants (91).

Géométrie du complexe intramoléculaire observé pour le composé Ade-C₄-8Pso 8d:

Dans le cas de composés dans lesquels l'adénine est associée à un intercalant, lorsque l'on atteint un repliement total, il est quelquefois possible de déterminer la structure du complexe formé (45, 46).

Le courant de cycle de l'adénine a été calculé par G. GIESSNER-PRETTRE et B. PULLMAN (91). Les courbes d'iso-écran qui en découlent peuvent permettre de déterminer la structure du complexe à partir des valeurs de blindage $\Delta\sigma$ mesurées. Ces courbes sont représentées ci-après, les valeurs indiquées sont des valeurs de blindage exprimées en ppm.



En ce qui concerne le composé Ade-C₄-8Pso 8d, nous pouvons estimer, en utilisant les résultats de l'étude UV, que ce composé est replié à environ 75 % dans le mélange D₂O - DMSO d₆ 95 : 5 à 27°C.

Nous pouvons accéder aux valeurs maximales de blindage $\Delta\sigma_{\text{max}}$ pour le complexe en faisant l'approximation de deux états limites (tableau 7) :

$$\Delta\sigma_{\text{max}} = \frac{\Delta\sigma \times 100}{75}$$

Protons	H-4	H-5'	H-5	H-4'	H-3	H-2A	H-8A
$\Delta\sigma_{\max}$	0,13	0,13	0,31	0,13	0,08	0,49	0,45

Tableau 7 : Valeurs de blindage $\Delta\sigma_{\max}$ en ppm attendues pour le complexe intramoléculaire formé lors du repliement du composé Ade-C₄-8Pso 8d
D₂O-DMSO d₆ 95 : 5.

Cependant, il est difficile de définir une seule structure pour le complexe à partir des courbes d'iso-écran de l'adénine. Les seules sondes dont nous disposons sont les protons du noyau psoralène, ceux-ci sont situés d'un même côté de la molécule et sont affectés de façon assez similaire. De plus, les courbes d'iso-écran du méthoxy-8 psoralène 1 seraient nécessaires pour interpréter les $\Delta\sigma$ des protons de l'adénine et à notre connaissance, elles ne sont pas publiées.

Les valeurs $\Delta\sigma_{\max}$ trouvées sont tout à fait compatibles avec les courbes d'iso-écran de l'adénine et permettent de définir au moins deux structures pour le complexe (Figure 11). La structure I est en meilleur accord avec les valeurs de $\Delta\sigma_{\max}$ trouvées mais les différences sont faibles compte-tenu des incertitudes.

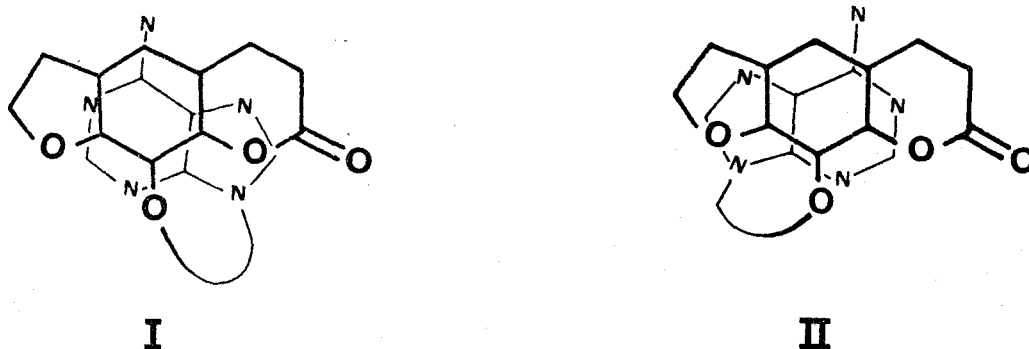


Figure 11 : Structures proposées (I et II) pour le complexe intramoléculaire formé lors du repliement du composé Ade-C₄-8Pso 8d.

D. NATURE DES INTERACTIONS, INFLUENCE DU SOLVANT :

Dans l'eau, tous les composés modèles présentent un fort degré de repliement. Nous avons étudié ce repliement dans différents solvants organiques de façon à préciser la nature des forces qui conduisent à l'empilement base-psoralène.

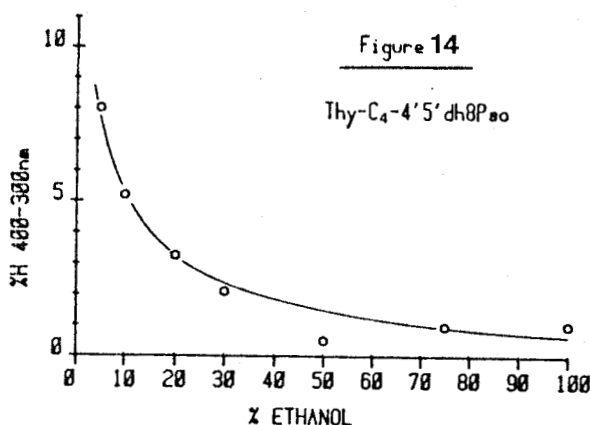
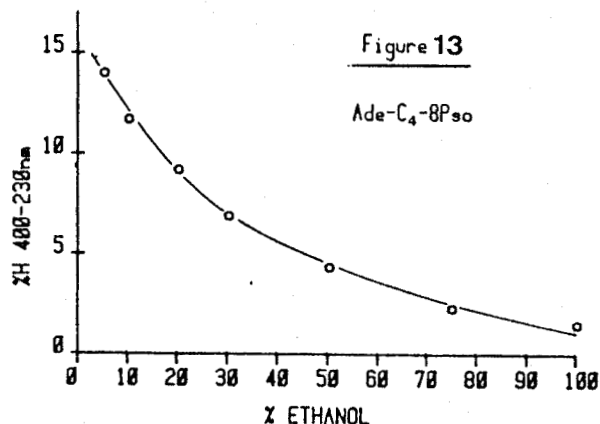
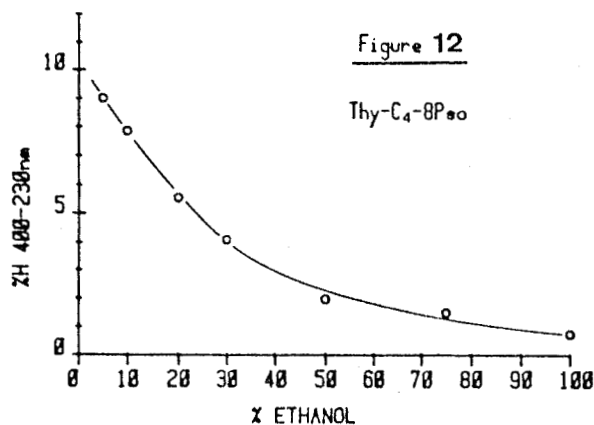
1/ Etude UV :

Nous avons étudié la variation de %H lorsque l'on augmente la proportion d'éthanol dans un mélange eau-éthanol pour les composés Thy-C₄-8Pso 6d (Figure 12), Ade-C₄-8Pso 8d (Figure 13) et Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d (Figure 14).

Pour ces trois composés, nous observons une décroissance très rapide de l'effet hypochrome lorsque la proportion d'éthanol augmente. Ceci peut être interprété comme une diminution très sensible du degré de repliement.

A partir des figures 12, 13, 14, nous pouvons estimer que lorsque le pourcentage d'éthanol dans l'eau passe de 5 à 30 %, le degré de repliement diminue de près de 50 % pour les composés Thy-C₄-8Pso 6d et Ade-C₄-8Pso 8d et de 75 % pour le composé Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d. Ces valeurs traduisent tout à fait l'effet promoteur de l'eau dans la complexation.

Dans l'éthanol pur, le repliement disparaît presque totalement pour tous les modèles 6, 8 et 10 : (%H 400-230 nm compris entre 0,5 et 1,5).



Figures 12, 13, 14 : Variation de l'effet hypochrome %H en fonction du pourcentage d'éthanol dans des mélanges eau-éthanol à 20°C.

Figure 12 : Thy-C₄-8Pso 6d, %H 400-230 nm ;

Figure 13 : Ade-C₄-8Pso 8d, %H 400-230 nm ;

Figure 14 : Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d, %H 400-300 nm.

BUS
LILLE

L'étude UV des composés Thy-C₄-8Pso 6d et Ade-C₄-8Pso 8d dans le dichlorométhane révèle également un repliement très faible (%H 400-230 nm = 1,5 à 20°C pour les deux modèles).

2/ Etude en RMN :

Les spectres de RMN des composés modèles Thy-C₄-8Pso 6d, Ade-C₄-8Pso 8d et Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d ainsi que ceux des composés de référence ont été enregistrés dans le DMSO d₆ à des concentrations d'environ 10⁻³ moles/l et à 27°C. Les valeurs des déplacements chimiques mesurés sont indiquées dans le tableau 24 p 156.

Les valeurs de blindage Δσ calculées sont pratiquement nulles, ce qui indique un repliement inexistant dans le DMSO d₆.

3/ Conclusion :

Tous ces résultats montrent que le repliement disparaît en solvant organique. Nous pouvons en conclure que les interactions mises en jeu lors de l'empilement base-psoralène dans les composés modèles et vraisemblablement lors de l'intercalation du psoralène sont essentiellement de nature hydrophobe.

E. CONCLUSION DE L'ETUDE EN SOLUTION

L'étude physicochimique des composés Thy-C_n-8Pso 6, Ade-C_n-8Pso 8 et Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10 a été menée en solution diluée par spectroscopie UV et de RMN.

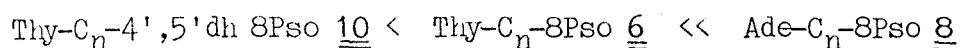
Les résultats acquis par ces deux techniques se confortent mutuellement :

- * Tous les modèles préparés présentent un fort degré de repliement dans l'eau à 20°C : voisin de 50% pour les composés Thy-C_n-8Pso 6, supérieur à 80% pour les modèles Ade-C_n-8Pso 8.

- * Les complexes formés lors de ce repliement sont de même nature que ceux formés lors de l'intercalation du psoralène dans l'ADN (effets hypochromes et bathochromes analogues) (11, 21, 83).

La plupart des résultats acquis en ce qui concerne la nature et l'intensité des forces mises en jeu lors du repliement peuvent fournir des indications de base sur les interactions moléculaires mises en jeu dans le processus d'intercalation des psoralènes dans l'ADN.

- * Pour les trois séries de composés préparés, le degré de repliement $\%R$ peut se classer ainsi :



Le degré de repliement semble lié à la surface totale des composés aromatiques susceptibles de se recouvrir :

- Plus grande surface du noyau adénine comparé au noyau thymine.
- Plus grande surface du noyau psoralène disponible dans le cas où le cycle furanne n'est pas hydrogéné.

- * Le repliement est plus important pour des composés portant des chaînes à 3 et 4 atomes de carbone. Il diminue nettement pour des chaînes à 5 et 6 atomes de carbone (Ade-C_n-8Pso 8 et Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10).

- * La baisse de la température provoque une augmentation du degré de repliement. Dans le cas des composés Ade-C₃-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d, le repliement est total au voisinage de 0°C.

- * Les interactions adénine-psoralène sont plus fortes que les interactions thymine-psoralène.

- * Les énergies d'interaction adénine-psoralène ont pu être déterminées:

$$\Delta H^\circ = -30 \pm 5 \text{ KJ/mol}, \Delta S^\circ = -90 \pm 15 \text{ J/mol/degre}$$

- * Ces énergies sont du même ordre de grandeur que celles mises en jeu lors de l'empilement de deux noyaux adénine (45, 86), ce qui est en accord avec le faible pouvoir intercalant des psoralènes (92). Elles sont également proches des énergies intervenant lors des interactions adénine-chloroquine, amino-quinoléine étudiée au laboratoire (45). Bien que de surfaces différentes, quinoléine et psoralène présentent donc des affinités comparables pour l'adénine.

Par contre, ces affinités sont plus faibles que celles mises en évidence entre l'adénine et la quinacrine, autre intercalant de type acridine étudié au laboratoire (46). Dans le cas du composé adénine-C₃-quinacrine, il a été observé un repliement total entre 0 et 80°C.

- * Les interactions mises en jeu sont de nature hydrophobe. L'empilement disparaît en solvant organique pour tous les modèles.

II. ETUDE RADIOCRISTALLOGRAPHIQUE :

Dans le but de déceler et d'étudier les interactions d'empilement base-psoralène dans le cristal, les structures cristallines de quelques uns des composés préparés ont été déterminées par diffraction des rayons X dans le laboratoire de cristallographie de l'Université de Bordeaux*.

Nous nous limiterons à résumer rapidement l'essentiel des résultats obtenus.

1/ Structures cristallines des composés modèles étudiés :

Ces structures sont représentées successivement par la vue en perspective de la molécule et la vue dans son arrangement dans le cristal.

* Le travail a été réalisé par J.P. BIDEAU, G. BRAVIC, C. COURSEILLE et R. EL COUHEN dans le laboratoire de M. HOSPITAL.

Composé Thy-C₄-8Pso 6d :

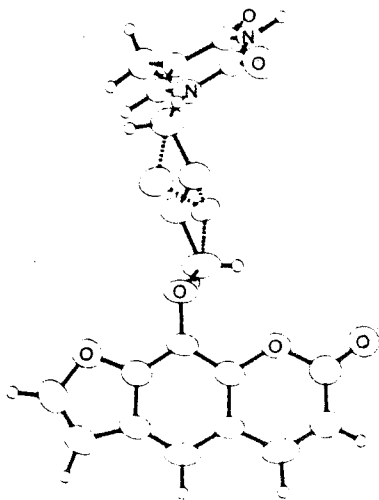


Figure 15

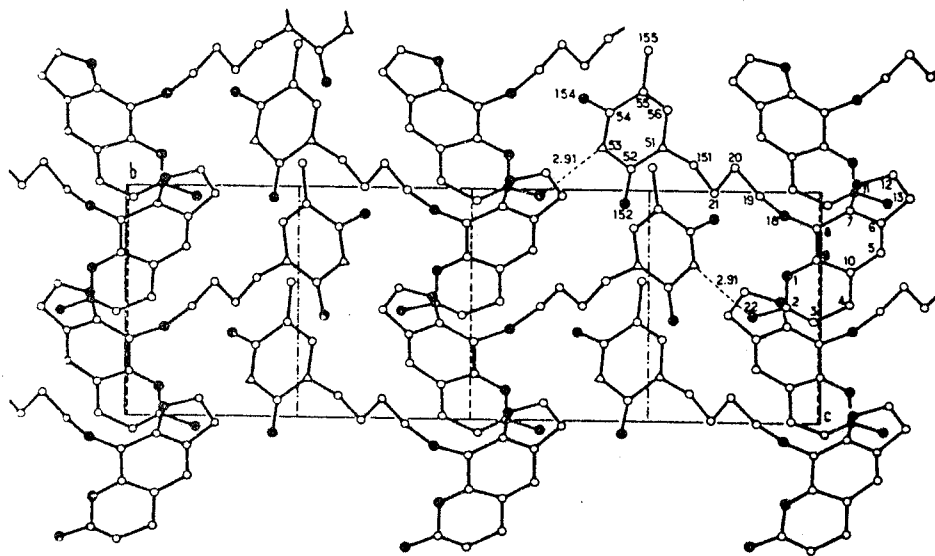


Figure 16

Figure 15 : Vue en perspective de la molécule de Thy-C₄-8Pso 6d

Figure 16: Arrangement moléculaire du composé Thy-C₄-8Pso 6d avec les liaisons hydrogène (Å).

Composé Ade-C₃-8Pso 8c :

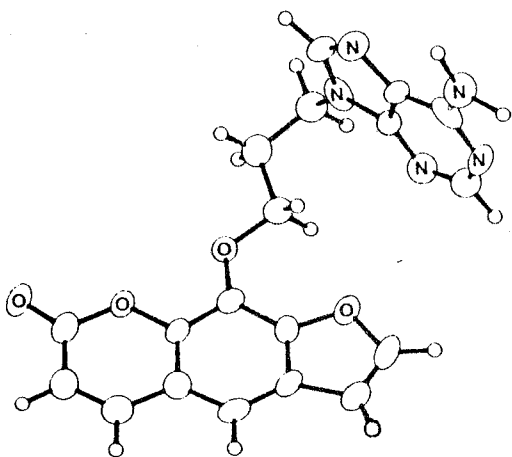


Figure 17

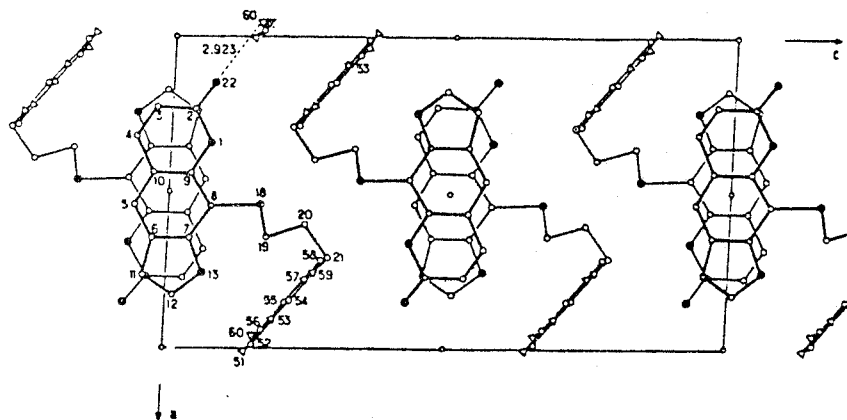


Figure 18

Figure 17 : Vue en perspective de la molécule de Ade-C₃-8Pso 8c

Figure 18 : Arrangement moléculaire du composé Ade-C₃-8Pso 8c

BUS
LILLE

Composé Ade-C₄-8Pso 8d :

Ce composé cristallise avec 2 molécules d'eau :

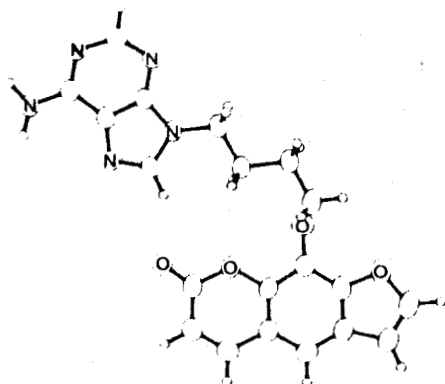


Figure 19

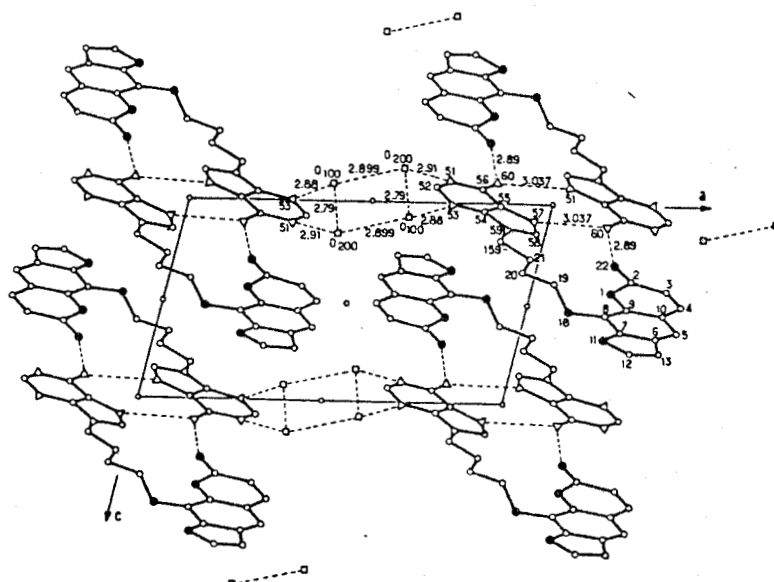


Figure 20

Figure 19 : Vue en perspective de la molécule de Ade-C₄-8Pso 8d.

Figure 20 : Arrangement moléculaire du composé Ade-C₄-8Pso 8d.

Composé Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e :

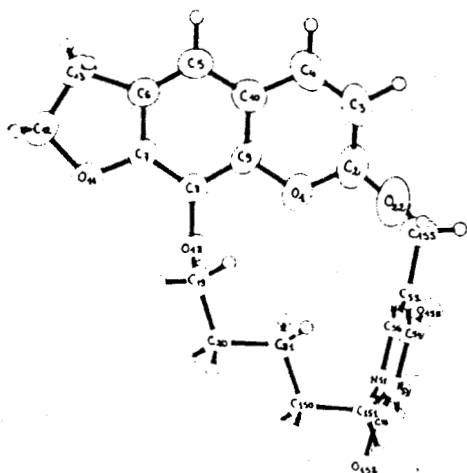


Figure 21

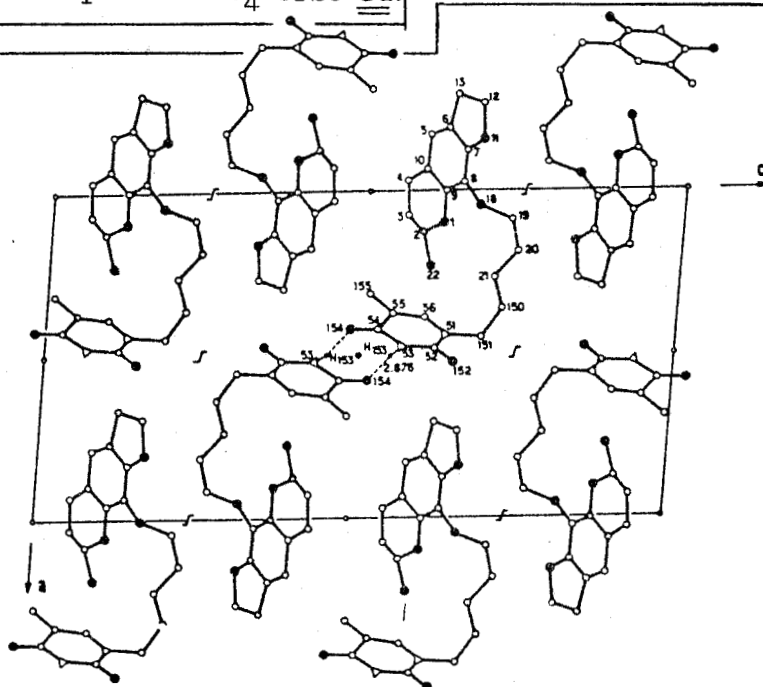


Figure 22

Figure 21 : Vue en perspective de la molécule de Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e.

Figure 22 : Arrangement moléculaire du composé Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e.

BUS
LILLE

2/ Principaux résultats :

Nous dégageons ici rapidement les points les plus marquants de cette étude.

Aucun empilement intramoléculaire n'a été observé, ce qui est généralement le cas pour ce type de composés comportant deux noyaux aromatiques différents.

Empilements intermoléculaires :

Un empilement intermoléculaire adénine-psoralène est observé pour le composé Ade-C₄-8Pso 8d. Dans le cristal, il y a formation de piles infinies adénine-psoralène. Les noyaux se trouvent à une distance de 3,5 Å et sont pratiquement parallèles (angle de 9°). Le recouvrement se fait dans des directions d'allongement du psoralène et de l'adénine perpendiculaires (figure 20). Cette structure permettra de proposer un modèle d'intercalation du méthoxy-8 psoralène dans l'ADN.

Liaisons hydrogène base-psoralène :

Dans le cristal du composé Thy-C₄-8Pso 6d chaque molécule est reliée à deux voisines par deux liaisons hydrogène identiques entre la fonction carbonyle du cycle psoralène et l'hydrogène porté par l'atome d'azote en position 3 du cycle thymine (figure 16).

Une autre liaison hydrogène base-psoralène est observée pour les composés Ade-C₅-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d. Elle lie la fonction carbonyle du cycle psoralène à un hydrogène du groupement amine du noyau adénine d'une autre molécule (Figures 18 et 20).

Recouvrement des doubles liaisons 3,4 de deux noyaux psoralène :

Dans le cristal du composé Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e, nous remarquons surtout la proximité (3,5 Å) des liaisons 3,4 des noyaux psoralène. Ces noyaux sont en trans l'un par rapport à l'autre et dans un arrangement tête à queue (figure 22).

Il a été observé dans ce cristal et dans celui du composé Thy-C₅-8Pso 6e, des photoréactions stéréosélectives. Ces photoréactions ont été étudiées et sont décrites dans l'étude photochimique (p. 118).

Dans le cas du composé Thy-C₅-8Pso 6e, la structure RX du photodimère formé a été déterminée à partir d'un cristal du composé Thy-C₅-8Pso exposé à la lumière du jour.

Il semble donc que cette photoréaction dans le cristal perturbe peu l'arrangement cristallin. L'avancement de la photoréaction pourra sans doute être suivie par radiocristallographie.

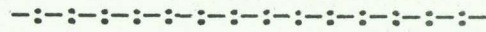
III. CONCLUSION DE L'ETUDE PHYSICOCHIMIQUE :

Deux types de résultats se dégagent de l'étude physicochimique des modèles Thy-C_n-8Pso 6, Ade-C_n-8Pso 8 et Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10 .

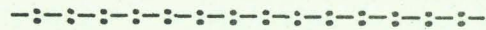
1. Nous connaissons maintenant le comportement conformationnel des composés modèles dans différents milieux (solution, cristaux). Cette connaissance sera utile lors des études de photoréactivité base-psoralène et également psoralène-psoralène : peut-être le repliement des modèles a-t-il une influence sur la photoréaction ?
2. L'étude de ces composés apporte une meilleure connaissance des interactions d'empilement base-psoralène en précisant la nature et l'intensité des forces qu'elles mettent en jeu.

Avec ce type de modèles, il est possible de tester l'influence de modifications structurales de l'intercalant sur son affinité pour différentes bases.

CHAPITRE III



ETUDE PHOTOCHEMIQUE

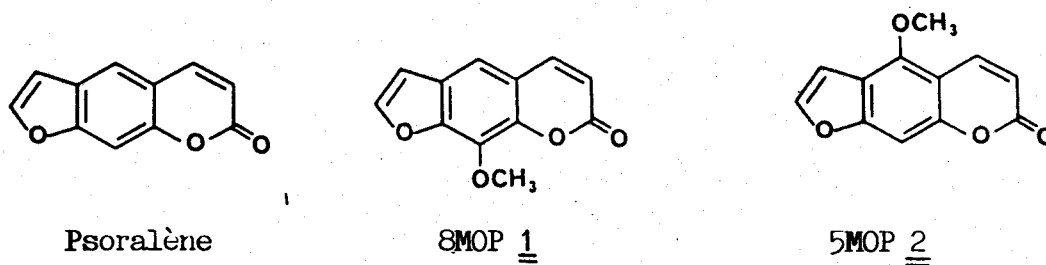


Nous connaissons le comportement conformationnel des modèles préparés. Dans l'eau, ces composés se présentent nettement sous une forme repliée dans laquelle les deux noyaux aromatiques pouvant photoréagir sont superposés. Par contre, dans les solvants organiques, ces interactions disparaissent et la forme étendue prédomine.

Dans ces différentes conditions, nous allons maintenant examiner leurs comportements photophysiques et photochimiques.

ETUDE PAR PHOTOLYSE ECLAIR DE L'ETAT EXCITE TRIPLET DU NOYAU PSORALENE :

Qu'il s'agisse du psoralène lui-même ou de ses dérivés méthoxylés tels que le 8MOP 1 et le 5MOP 2, l'état excité triplet apparait comme généralement responsable, dans l'ADN, de la première réaction de photoaddition sur la thymine (3, 83, 93).



La désactivation du triplet du psoralène par la thymine observée dans différents solvants (94, 95) et le fait que l'état triplet du psoralène intercalé dans l'ADN ait pu être étudié (96) sont tout à fait en accord avec le rôle prépondérant qui lui est attribué.

Par contre, un certain nombre de résultats obtenus récemment restent inexplicables :

. La vitesse de désactivation de l'état excité triplet du psoralène par la thymine libre est considérablement augmentée par la présence d'eau :

k_Q éthanol $< 4.10^7 \text{ s}^{-1}$ (95) , k_Q eau = $7,5.10^8 \text{ s}^{-1}$ (94)

Ce phénomène n'est actuellement pas clairement interprété.

. Dans différentes conditions, l'état excité triplet du méthoxy-8 psoralène (8MOP) ne semble pas affecté par la présence de la thymine (95,97). D'autre part, l'état triplet du 8MOP intercalé dans l'ADN a été mis en évidence et étudié (83,96). Ses caractéristiques sont très comparables, à l'état libre et à l'état complexé dans l'ADN.

Une connaissance plus approfondie des modifications de l'état excité triplet des psoralènes lors de leur intercalation dans l'ADN s'avère donc indispensable pour comprendre le mécanisme des photoréactions observées.

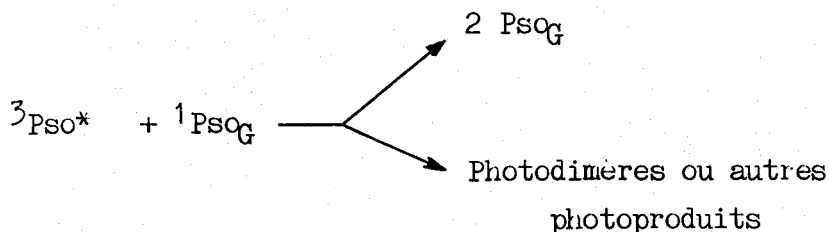
Les études physicochimiques UV et de RMN nous ont montré que les composés préparés pourraient être de bons modèles pour étudier l'influence de la complexation sur les propriétés de l'état triplet du méthoxy-8 psoralène. Dans ce but, le composé Thy-C₄-8Pso 6d a été étudié par photolyse éclair au Laboratoire de Biophysique du Muséum National d'Histoire Naturelle*. (Ce composé a été choisi plutôt que les autres analogues en raison de sa solubilité un peu plus élevée dans l'eau).

1/ Propriétés de l'état excité triplet des psoralènes :

Les spectres d'absorption triplet-triplet d'un grand nombre de furocoumarines ont été observés dans différentes conditions : l'allure des spectres obtenus varie beaucoup avec le solvant ; les rendements quantiques de passage intersystème singulet-triplet Φ_{ISC} sont faibles : par exemple, pour le 8MOP, Φ_{ISC} (benzène) = 0,011 et Φ_{ISC} (éthanol) = 0,02 (94,95).

Une des propriétés les plus marquantes de l'état triplet des psoralènes réside dans leur désactivation très rapide par des molécules restées à l'état fondamental (94). La vitesse de cette désactivation est pratiquement contrôlée par la diffusion.

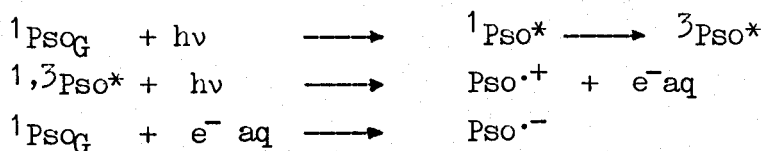
* L'étude a été réalisée par J.R. RONFARD-HARET dans le laboratoire de R. BENSASSON.



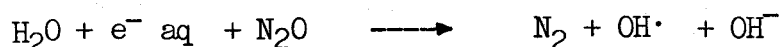
Cette désactivation peut ou non conduire à une photoréaction. La durée de vie de l'état excité triplet des psoralènes est donc assez courte, elle dépend fortement du solvant et de la concentration de la solution. Par exemple, la durée de vie intrinsèque de l'état triplet du 8MOP dans le benzène est de 1 μ s et de 10 μ s dans l'éthanol (94,95).

Dans l'eau, le spectre d'absorption triplet-triplet révèle une autre propriété remarquable des furocoumarines : leur photoionisation (98). En effet, lorsqu'une solution aqueuse de furocoumarine est éclairée avec un laser, on observe vers 700 nm sur le spectre, l'absorption caractéristique de l'électron solvaté.

Celui-ci est formé suivant un processus biphotonique. Le psoralène est tout d'abord excité par un premier photon. L'état excité formé absorbe un deuxième photon, ce qui conduit à l'obtention du radical cation et à la libération d'un électron. Cet électron se fixe sur une molécule de psoralène à l'état excité pour former un radical anion.



L'existence de cet électron est mise en évidence par sa réaction avec le protoxal N₂O :



Un barbotage de N₂O dans la solution conduit à la disparition de la contribution de l'électron solvaté dans le spectre observé ($\lambda_{\text{max}} = 720 \text{ nm}$, $\epsilon = 1,85 \cdot 10^4 \text{ l/mole/cm}$).

2/ Etude de l'état excité triplet du noyau psoralène du composé Thy-C₄-8Pso dans l'éthanol (forme ouverte) :

L'étude physicochimique réalisée a permis d'établir l'absence de repliement dans l'éthanol pour les composés modèles préparés.

Le spectre d'absorption triplet-triplet du composé Thy-C₄-8Pso a donc tout d'abord été enregistré dans l'éthanol à différentes concentrations et comparé avec celui du méthoxy-8 psoralène (8MOP).

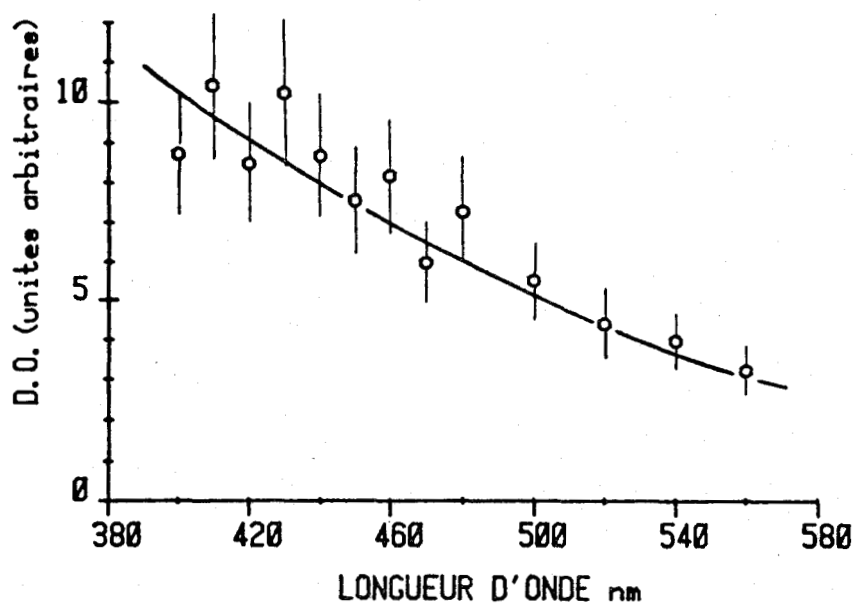
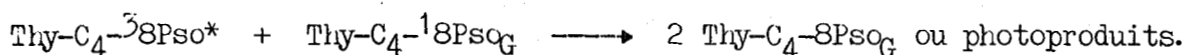


Figure 23 : Spectre d'absorption transitoire obtenu immédiatement après excitation par un éclair laser à 325 nm du composé Thy-C₄-8Pso 6d dans l'éthanol.

Le spectre obtenu (Figure 23) est très proche de celui du 8MOP (95). On constate également une forte influence de la concentration sur la durée de vie de l'état triplet. Une désactivation très rapide par des molécules à l'état fondamental a donc bien lieu comme dans le cas du 8MOP :

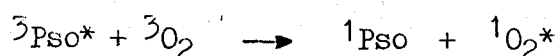


Par exemple, lorsque l'on passe d'une concentration de $2 \cdot 10^{-4}$ moles/l à une concentration de $4 \cdot 10^{-4}$ moles/l, la durée de vie du triplet diminue environ de moitié de 4 μ s à 2,2 μ s.

Cette observation est très intéressante en vue des études de photochimie des composés Thy-C_n-8Pso, en effet nous pouvons attendre une forte influence de la concentration sur la photoréactivité.

A partir des durées de vie τ_0 déterminées à différentes concentrations on peut définir des vitesses de disparition du triplet caractérisées par les constantes $k_c = 1/\tau_c$. L'ordonnée à l'origine de la droite portant k_c en fonction de la concentration nous donne la durée de vie du triplet τ_0 en l'absence de désactivation par l'état fondamental (durée de vie intrinsèque). La pente de cette droite correspond à la constante de vitesse k' de la désactivation.

La durée de vie du triplet en présence d'oxygène a également été déterminée. Elle est caractérisée par la constante de vitesse de désactivation par l'oxygène $k_Q O_2$.



Les résultats obtenus dans l'éthanol sont portés dans le tableau 8. Ils sont comparés aux valeurs décrites dans la littérature pour le 8MOP dans l'éthanol (95).

	τ_0 μs	k' $M^{-1} s^{-1}$	$k_Q O_2$ $M^{-1} s^{-1}$
Thy-C ₄ -8Pso	10	$1,05 \cdot 10^9$	$3,9 \cdot 10^9$
8MOP	10	10^9	—

Tableau 8 : Propriétés des états excités triplet des composés Thy-C₄-8Pso 6d et méthoxy-8 psoralène (8MOP) 1 dans l'éthanol.

Nous pouvons voir, dans le tableau 8, que dans l'éthanol, l'état excité triplet du noyau psoralène dans le composé Thy-C₄-8Pso a tout à fait les mêmes propriétés que l'état triplet du méthoxy-8 psoralène seul.

3/ Etude du composé Thy-C₄-8Pso dans l'eau (forme repliée) :

Le spectre d'absorption triplet-triplet du composé Thy-C₄-8Pso a été enregistré dans un mélange eau-éthanol 98:2 . L'étude physicochimique menée précédemment nous permet d'estimer un degré de repliement au moins égal à 50 % pour ce composé placé dans les mêmes conditions.

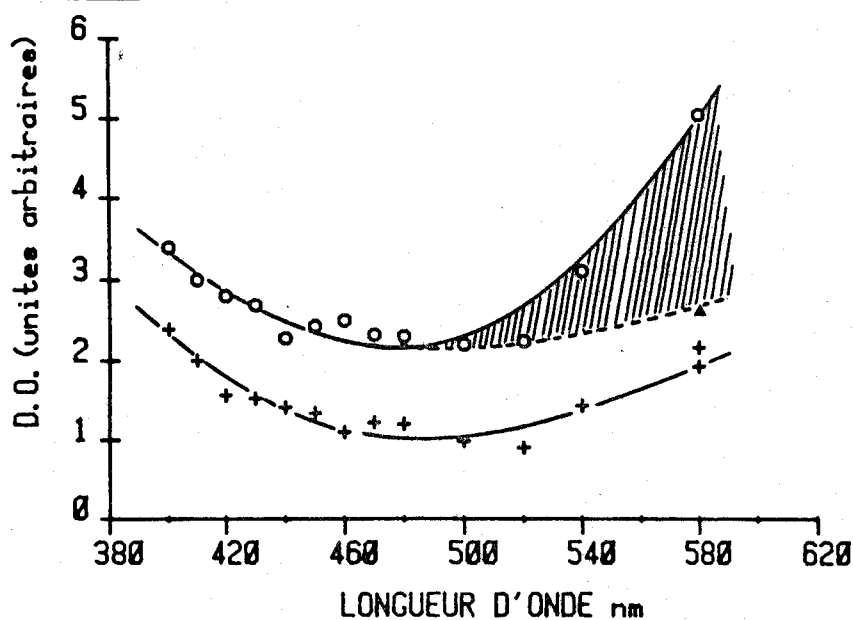


Figure 24 : Spectres d'absorption transitoires obtenus après excitation par un éclair laser à 265 nm du composé Thy-C₄-8Pso 6d dans un mélange eau-éthanol 98 : 2 .

o : Spectre obtenu immédiatement après l'excitation laser.

+ : Spectre obtenu 2,6 µs après l'excitation laser.

En hachuré contribution due à l'électron solvaté.

Le spectre obtenu est reporté sur la Figure 24. Ce spectre a une allure tout à fait analogue à celle du spectre du 8MOP dans l'eau (94) : Entre 400 et 470 nm, nous observons l'absorption triplet-triplet du noyau psoralène. Au dessus de 470 nm, une importante absorption due à l'électron solvaté est visible. Celle-ci disparaît après barbotage dans la solution d'un capteur d'électron, le protoxal . Comme le 8MOP, le composé Thy-C₄-8Pso se photoionise sous éclairage laser.

La concentration de la solution étant limitée par la solubilité dans l'eau du composé étudié, le spectre observé a une intensité très faible. Il

n'est donc pas possible dans ces conditions de mesurer toutes les caractéristiques de l'état excité triplet observé. Seule la durée de vie à une concentration de 5.10^{-5} moles/l a été mesurée, elle est d'environ 10 μ s, valeur à comparer à celle obtenue pour le 8MOP dans les mêmes conditions : 2,5 μ s à $4,5.10^{-5}$ moles/l (99).

Dans l'eau la durée de vie de l'état triplet du noyau psoralène complexé avec la thymine semble plus élevée que celle du 8MOP seul en solution.

4/ Conclusion :

Dans l'éthanol, les propriétés de l'état excité triplet du noyau psoralène des modèles Thy-C_n-8Pso sont identiques à celles de l'état triplet du 8MOP. Les composés modèles sont, dans ces conditions, sous forme étendue: ce résultat n'est donc pas surprenant (95).

Dans l'eau, le spectre d'absorption triplet-triplet du noyau psoralène a pu être enregistré malgré la faible solubilité du composé Thy-C₄-8Pso. Le spectre observé est similaire à celui du 8MOP seul en solution. Il faut noter cependant que de faibles différences ne sont probablement pas visibles en raison de la faible intensité des signaux enregistrés.

Il a été établi sans ambiguïté par spectroscopies UV et de RMN que le composé Thy-C₄-8Pso se trouvait, dans l'eau, sous une forme repliée pour plus de 50 % des molécules. Il est donc probable que l'état triplet du noyau psoralène n'est pas affecté sensiblement par les interactions d'empilement avec la thymine.

Ceci va dans le sens des résultats de la littérature :

- * En présence de thymine, il n'a pas été observé de désactivation du triplet du 8MOP (95, 97).
- * L'état excité triplet du 8MOP intercalé dans l'ADN a été observé (83,96). Les caractéristiques de ce triplet sont proches de celles du triplet du 8MOP libre, sa durée de vie, dix fois plus élevée après intercalation, pouvant peut-être s'expliquer par une viscosité plus importante du milieu.

Nos résultats sont compatibles avec cette dernière observation : dans l'eau, la durée de vie de l'état triplet du noyau psoralène présent dans le modèle Thy-C₄-8Pso est 4 fois plus élevée que celle du triplet du 8MOP libre.

Une conclusion définitive concernant ce phénomène nécessite une étude complémentaire. En effet, ces durées de vie dépendent des constantes de vitesse de désactivation des triplets par les molécules restées à l'état fondamental. Ces constantes sont probablement différentes dans l'eau pour le 8MOP et le composé Thy-C₄-8Pso, surtout en raison du repliement.

Il sera probablement difficile ici de conclure, la faible solubilité du 8MOP et du composé Thy-C₄-8Pso dans l'eau ne permettant pas de mesurer ces constantes et les durées de vie intrinsèques des triplets de façon précise.

Tous ces résultats se recoupent et indiquent que les caractéristiques de l'état excité triplet du 8MOP sont peu modifiées lors de la complexation avec la thymine de l'ADN.

Une photoréactivité accrue de l'état triplet du 8MOP vis-à-vis de la thymine n'est donc pas attendue lors de l'intercalation. Ceci est en accord avec la mise en évidence d'une photoaddition dans l'ADN de 8MOP à l'état triplet non intercalé conduisant à des monoadditions (100, 101).

Les modèles préparés se comportent tout à fait comme des modèles du méthoxy-8 psoralène 8MOP et non du psoralène.

ETUDE PHOTOCHEMIE :

Les études de photoréactivité des modèles ont été réalisées dans l'eau, solvant dans lequel nous avons observé d'importantes interactions psoralène-base, et dans différents solvants organiques qui font disparaître ces interactions.

L'irradiation de solutions désoxygénées des modèles a été réalisée à 365 nm, longueur d'onde utilisée dans la majorité des études photochimiques des furocoumarines.

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE :

Il est bien établi que les psoralènes sont capables de photoréagir avec les bases pyrimidiques des acides nucléiques (3). En outre, quelques travaux semblent montrer que le psoralène et le méthoxy-8 psoralène photoréagissent également avec l'adénine (respectivement dans l'acide polyadénylique (50) et le t-RNA (51)).

C'est aux photoréactions avec les bases pyrimidiques que sont attribués les principaux effets biologiques observés.

On peut noter que les psoralènes présentent une activité photodynamique génératrice d'oxygène singulet (3, 102) qui peut entraîner un certain nombre de conséquences biologiques (érythèmes, photoallergies...). Des réactions de photooxydation des psoralènes se produisent également en présence d'oxygène singulet (103, 104).

A la fin des années 60, l'équipe de L. MUSAJO proposa un mécanisme moléculaire pour l'action photochimique des furocoumarines dans l'ADN (11, 21).

Après intercalation, les psoralènes s'additionnent photochimiquement sur les bases pyrimidiques. Les doubles liaisons 3,4 ou 4',5' du psoralène peuvent réagir avec la double liaison 5,6 de la pyrimidine pour former des cyclobutanes (monoadduits 3,4 ou 4',5'). La photoréaction de deux doubles liaisons du psoralène peut conduire à la formation d'un bisadduit. Les deux brins de l'ADN sont alors liés de façon covalente.

Ce mécanisme reposait à l'époque sur quelques données obtenues surtout à partir de résultats de photodimérisation des psoralènes et de leurs photoréactions avec des bases libres .

De nombreux travaux avaient mis en évidence une photodimérisation très rapide des psoralènes (11, 34, 35). Cette réaction met en jeu essentiellement les doubles liaisons 3,4.

L'étude des photoréactions pyrimidines libres-psoralènes a été menée par l'équipe de L. MUSAJO dans des conditions expérimentales très difficiles * en raison des possibilités de photodimérisation des psoralènes (28). Un certain nombre de monoadduits en 4',5' ont été isolés à l'échelle du milligramme mais n'ont pas été complètement caractérisés :

Thymine 5,6 \diamond 4',5' psoralène (analyse de l'azote, RMN, UV).

Cytosine 5,6 \diamond 4',5' psoralène (analyse élémentaire proche, UV).

Thymine 5,6 \diamond 4',5' méthoxy-5 psoralène (UV).

En ce qui concerne les monoadduits 3,4, ils furent mis en évidence par chromatographie, par spectrométrie UV et par réirradiation à 254 nm quiconduit aux produits de départ.

Le mécanisme formulé à partir de ces résultats a été confirmé par de nombreuses études ultérieures :

Les calculs théoriques montrèrent en 1971 que la double liaison 3,4 des psoralènes est plus sujette à la cycloaddition que celle en 4',5' (105). Différents adduits entre la thymine ou la thymidine et la diméthoxy-5,7 coumarine furent ensuite isolés et caractérisés (30, 106).

Il fallut cependant attendre 1981, pour que les premiers résultats complets soient obtenus :

- * En 1981, S.Y. WANG et Coll. (31) décrivent la photoréaction intermoléculaire du méthoxy-8 psoralène 1 avec une base modifiée : la diméthyl-1,3 thymine. Cette photoréaction se fait dans l'acétonitrile gelé. Deux adduits diméthyl-1,3 thymine 5,6 \diamond 3,4-8MOP cis anti et cis syn se forment avec un rendement assez élevé : 25 % au total.

* Grand excès de thymine (x100), solution aqueuse de psoralène (10^{-3} à 10^{-4} moles/l), irradiation en solution gelée (5 à 15 litres).

* En 1982, pour la première fois, un adduit thymine 5,6 \diamond 4',5' méthoxy-8 psoralène cis syn fut obtenu et caractérisé complètement (RX) par l'équipe de E.J. LAND (32).

* Parallèlement, J.E. HEARST, H. RAPOPORT et Coll. étudièrent les photoréactions d'un certain nombre de psoralènes avec l'ADN (38, 39). Ils isolèrent et caractérisèrent de nombreux monoadduits à l'échelle du microgramme. Dans le cas du 8MOP 1 par exemple, ils obtinrent les adduits cis syn suivants :

Cytidine 5,6 \diamond 4',5' 8MOP	2 %
Thymidine 5,6 \diamond 4',5' 8MOP	50 %
Thymidine 5,6 \diamond 3,4 8MOP	20 %
Bis adduits	45 %.

Que ce soit lors de la photoréaction intermoléculaire thymine-psoralène ou lors de la photoaddition du psoralène dans l'ADN, on ne connaît pas encore les raisons qui conduisent à un monoadduit en 3,4 plutôt qu'à un monoadduit en 4',5'. Les proportions relatives de ces monoadduits ne sont d'ailleurs pas clairement établies. Par exemple, dans l'ADN, des études cinétiques indiquent la formation plus importante du monoadduit 3,4 (107), alors que parmi les monoadduits isolés (38, 39), c'est le monoadduit 4',5' qui prédomine (50 %). D'autre part, les calculs théoriques prévoient une photoréactivité accrue en 3,4 (105).

Il n'existe pas de réponse satisfaisante à toutes ces questions.

Le problème de la structure des bisadduits fut résolu en 1982 par l'équipe de H. RAPOPORT qui confirme la structure postulée (40). Ces auteurs montrèrent également que les monoadduits 4',5' sont à l'origine de la formation des bis adduits.

De nombreuses questions restent posées sur le mécanisme d'action des furocoumarines dans l'ADN :

- * Au niveau moléculaire :
 - . Nature des adduits minoritaires ou/et instables (avec l'adénine par exemple).
 - . Propriétés et importance des adduits formés.
 - . Mécanisme des photoréactions : influence de l'intercalation, rôle des états excités.....

- * Au niveau biologique :
 - . Relation entre les modifications chimiques de l'ADN et les activités biologiques observées.

II. ETUDE DES MODELES THYMINE-PSORALENE :

A. PHOTOREACTIVITE DES MODELES THYMINE-METHOXY-8 PSORALENE

Thy-C_n-8Pso 6 :

1/ Photoproduits attendus :

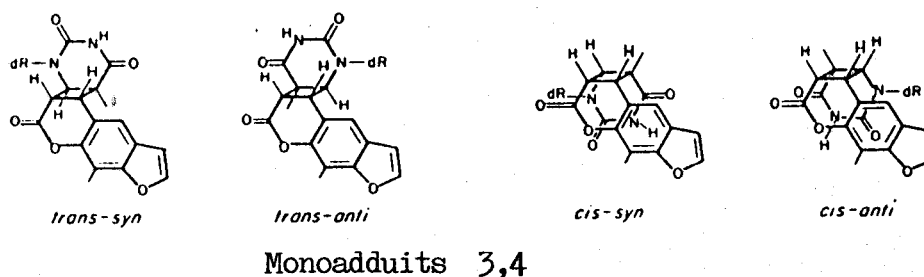
Nous pouvons dresser la liste des produits attendus, compte-tenu des résultats de la littérature et de la structure des composés préparés.

Tous les photoproduits thymine-psoralène isolés jusqu'à ce jour sont des adduits de type [2+2] résultant de la réaction de la double liaison 5,6 de la thymine sur une des deux doubles liaisons 3,4 ou 4',5' du psoralène avec formation d'un cyclobutane. Ces adduits peuvent présenter une stéréochimie cis ou trans, liée à la position des deux noyaux thymine et psoralène par rapport au plan du cyclobutane. Une structure syn ou anti est définie par l'orientation tête-queue des noyaux l'un par rapport à l'autre. Pour distinguer ces deux dernières configurations nous reprendrons la définition donnée par H. RAPOPORT et Coll. (38, 39, 40) :

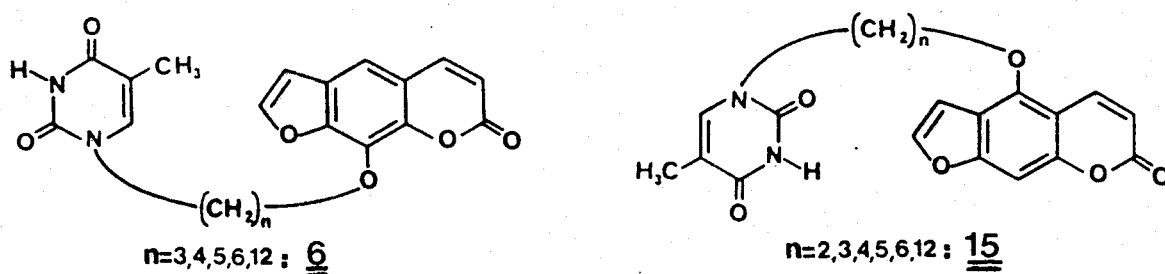
- * La configuration syn (tête à tête) correspond à une position adjacente sur le cyclobutane de l'azote 1 de la thymine et du carbone 2 ou de l'oxygène 1 du noyau psoralène.

* Dans la configuration anti (tête à queue), ces mêmes atomes sont liés à deux carbones du cyclobutane diagonalement opposés.

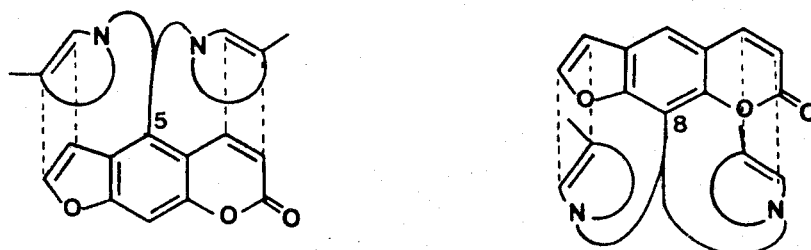
Au total, huit adduits thymine-psoralène sont envisageables lors de la photoréaction intermoléculaire.



Pour étudier ces photoadditions, nous avons préparés deux séries de modèles complémentaires, les modèles thymine-méthoxy-8 psoralène Thy-C_n-8Pso 6 et les modèles thymine-méthoxy-5-psoralène Thy-C_n-5Pso 15 (ceux-ci étant préparés par G. HUART, chercheur de 3^{ème} Cycle du laboratoire) :



Comme on peut voir sur le schéma ci-dessous et à partir de modèles moléculaires, les composés Thy-C_n-8Pso 6 et Thy-C_n-5Pso 15 pourront former des adduits [2+2] de façon équivalente en 3,4 ou en 4',5', en cis ou en trans. Par contre, les composés Thy-C_n-8Pso 6 ne conduiront qu'à des adduits syn et les composés Thy-C_n-5Pso 15 à des adduits anti.



Pour une série de modèles, la série Thy-C_n-8Pso 6, par exemple, nous pouvons donc attendre la formation de quatre adduits de type cyclobutane.

De même au niveau de ces modèles, la photodimérisation psoralène-psoralène reste possible. Pour éviter ces réactions, nous nous placerons lors de notre étude en milieu très dilué (10^{-5} à 10^{-4} moles/l).

2/ Essais préliminaires

Dans le but de mettre au point les conditions d'irradiation des divers modèles, nous avons été amenés à réaliser un certain nombre d'essais préliminaires en faisant varier différents paramètres tels que le solvant d'irradiation, la durée, la concentration.

a) Méthodologie :

En raison du très grand nombre d'essais à mener à haute dilution, nous avons mis au point une méthodologie d'identification rapide des photoproduits formés :

L'analyse des solutions irradiées se fait par chromatographie liquide hautes performances (CLHP). La détection des produits formés est réalisée par spectrophotométrie UV simultanément à deux longueurs d'onde 254 et 365 nm. Le rapport d'absorption à ces deux longueurs d'onde A (254/365) sera utilisé pour caractériser les photoproduits formés.

Les solutions irradiées seront réirradiées à 254 nm. Dans ces conditions, les photoadduits de type cyclobutane doivent reformer les composés modèles de départ (28, 29) et seront ainsi rapidement identifiés.

Enfin, parmi ces adduits, nous pourrions distinguer facilement les adduits 3,4 des adduits 4',5' à partir des résultats de la littérature (28, 29, 31, 32). En effet, les adduits 3,4 n'absorbent pas la lumière à 365 nm alors que les adduits 4',5' absorbent beaucoup plus à 365 nm que le modèle de départ.

b) Premières indications :

Les essais d'irradiation nous ont tout d'abord révélé une faible photoréactivité des composés Thy-C_n-8Pso 6. Même en solution diluée et malgré

des éclaircissements énergétiques importants (voir p 157), les temps d'irradiation nécessaires pour atteindre un équilibre photostationnaire sont longs (3 à 30h).

Influence du solvant :

La nature des produits formés varie beaucoup avec le solvant (eau, éthanol, acétonitrile, acétone, dichlorométhane, DMF, DMSO, mélanges eau-solvant organique). Pour de faibles concentrations en produit de départ (10^{-4} M), on observe, dans un solvant donné, un photoproduit souvent majoritaire, quelquefois instable et presque toujours accompagné d'une forte proportion de composé n'ayant pas réagi (Figure 25 et Tableau 9).

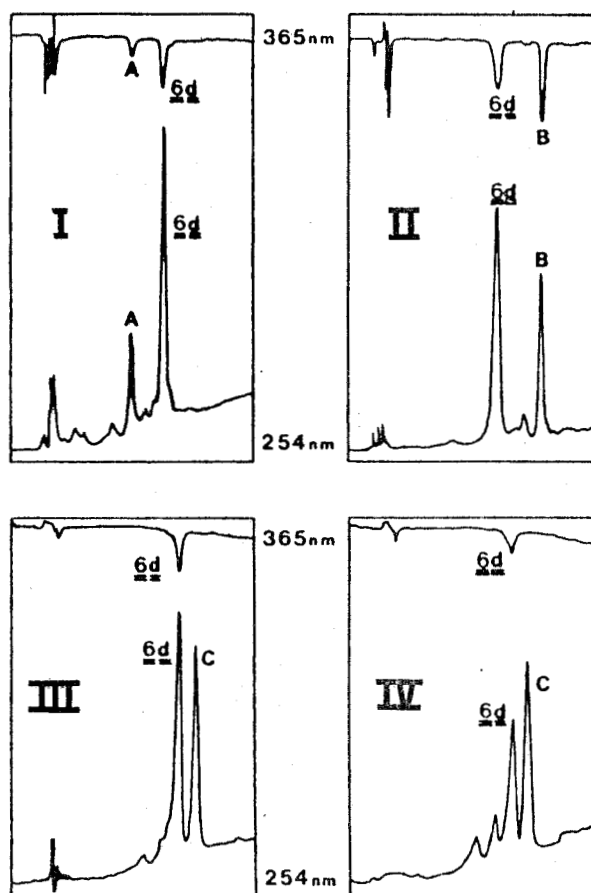


Figure 25 : Chromatogrammes (CLHP, PE 50) de solutions du composé Thy-C₄-8Pso 6d irradiées à 365 nm (3.10^{-5} moles/l).

I : Eau-éthanol 95 : 5, 8h d'irradiation, II : Ethanol, 4 h, III : Acétonitrile, 3 h, IV : Acétonitrile, 6h.

I, II, III : Proximité de l'état stationnaire, IV : L'irradiation est trop longue, le photoproduit se décompose au cours du temps bien que n'absorbant pas à 365 nm. A, B, C : Photoproduits majoritaires.

L'état photostationnaire est souvent difficile à obtenir, certains produits se décomposant en cours d'irradiation (dans l'acétonitrile, l'acétone, le mélange eau-acétone 50 : 50).

D'autres photoproduits ont la particularité d'absorber à la longueur d'onde d'irradiation, une exposition trop longue conduit à leur disparition (eau, éthanol, figure 25).

Dans le dichlorométhane, la DMF et le DMSO, les photoproduits sont plus nombreux, certains sont instables.

Influence de la concentration :

Comme le laissait prévoir l'étude en photolyse éclair du composé Thy-C₄-8Pso 6d, nous avons constaté une forte influence de la concentration :

1. Sur la nature et le nombre des photoproduits, ($C > 10^{-3}$ moles/l) (Tableau 9, composé Thy-C₄-8Pso 6d).
2. Sur la photoréactivité. Même pour des concentrations faibles ($< 10^{-3}M$), les temps d'irradiation nécessaires sont très longs (Tableau 9). Ils augmentent rapidement lorsque la concentration devient plus importante.

Concentration en composé irradié	$3 \cdot 10^{-5}M$	$10^{-4}M$	$3 \cdot 10^{-4}M$	$8 \cdot 10^{-4}M$
Thy-C ₄ -Pso τ	40 à 60%	< 40%	< 20%	nombreux photoproduits >15h
Cmax	1	3	2,5	
Ethanol t	3h	4h	7h	
Thy-C ₁₂ -SPso τ				
Cmax	1	1,5	1,4	1,3
Acétonitrile t	3h	7h	10h	20h

Tableau 9 : Photoréactivité des composés Thy-C_n-SPso 6 en fonction de la concentration.

Les valeurs indiquées ont été déterminées par analyse en CLHP pour des temps d'irradiation t conduisant à un équilibre photostationnaire.

τ : taux de réaction déterminé à partir de la proportion de composé irradié restant. Cmax : Concentration en photoproduit exprimée en unité arbitraire et calculée à partir des hauteurs de pics (CLHP) et des volumes injectés.

Nous avons observé dans tous les cas une diminution très importante du taux de photoréaction lorsque la concentration augmente. Par exemple, nous voyons sur le tableau 9, que pour les composés Thy-C₄-SPso 6d et Thy-C₁₂-SPso 6l irradiés respectivement dans l'éthanol et dans l'acétonitrile, la concentration maximale en photoproduit majoritaire n'augmente pas avec la concentration de départ.

La désactivation de l'état excité triplet du noyau psoralène par des molécules à l'état fondamental est probablement responsable de la diminution de cette photoréactivité lorsque la concentration augmente (phénomène mis en évidence lors de l'étude en photolyse éclair du composé Thy-C₄-SPso 6d).

c) Conclusion de ces essais :

La stabilité thermique des deux photoproduits majoritaires formés respectivement dans l'éthanol et dans l'eau, s'est avérée bonne alors que dans d'autres solvants, les photoproduits se décomposent à température ambiante ou à l'évaporation.

Nous avons donc choisi d'isoler les photoproduits formés dans ces deux solvants.

Nous nous placerons à des concentrations très faibles (de l'ordre de 10^{-4} moles/l) de façon à obtenir un taux de réaction maximum (Tableau 9).

3/ Etude dans l'éthanol :

Nous avons irradié à 365 nm des solutions dans l'éthanol des modèles Thy-C_n-SPso 6 à des concentrations de $3 \cdot 10^{-5}$ M.

Pour tous les composés, quelle que soit la longueur de la chaîne, on observe la formation d'un produit majoritaire.

Nous pouvons voir dans le tableau 10 que très vraisemblablement la nature de ce photoproduit ne varie pas avec la longueur de la chaîne carbonée (n = 3, 4, 5, 6 et 12), le rapport d'absorption A (254/365 nm) restant constant et les temps de rétention évoluant comme ceux des composés modèles.

Composés irradiés	Photoproduits majoritaires		Conditions d'élu-tion		
	t _R	A	t _R	A	CLHP
Thy-C ₃ -SPso ^a	7mn20	24,9	10mn00	10,6	PE 50
Thy-C ₄ -SPso ^a	7mn50	24,2	10mn10	10,4	PE 50
Thy-C ₅ -SPso ^a	8mn35	24,3	10mn45	10,5	PE 50
Thy-C ₆ -SPso ^a	9mn40	24,0	11mn25	10,4	PE 50
Thy-C ₁₂ -SPso ^a	9mn35	24,3	10mn55	10,4	PE 80
Thy-C ₁₂ -SPso ^b			11mn00	12,0*	PE 80

Tableau 10 : Caractéristiques CLHP des photoproduits formés lors de l'irradiation à 365 nm de solutions des composés Thy-C_n-SPso 6 dans l'éthanol (a), ou dans le mélange eau-éthanol 50 : 50 (b). t_R : Temps de rétention ; A : Rapport d'absorption 254/365 nm.

* Forte incertitude sur cette valeur en raison de la faible proportion de produit formé.

quilibre, il reste toujours une forte proportion du produit de départ (60 à 80 %). Cet état photostationnaire est difficile à atteindre, les photoproduits absorbent la lumière à 365 nm (Tableau 10) et une irradiation trop longue provoque leur décomposition.

En ce qui concerne la structure de ces composés, nous pouvons faire tout d'abord deux remarques :

- Réirradiés à 254 nm, les photoproduits ne conduisent pas aux modèles de départ, ce ne sont donc pas des adduits de type cyclobutane.
- Ces produits sont assez stables lors de l'évaporation de l'éthanol.

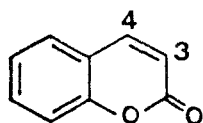
Dans le cas du composé Thy-C₄-8Pso 6d, la photoréaction se fait avec un rendement meilleur. Nous avons donc irradié ce composé en solution dans l'éthanol à une concentration d'environ 10⁻⁴ moles/l afin d'isoler le photoproduit majoritaire.

Après purification, quelques milligrammes ont été isolés.

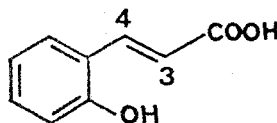
Les spectres de masse (impact électronique, ionisation chimique avec le méthane et l'ammoniac) indiquent une masse moléculaire probable de 428, qui correspond à la fixation d'une molécule d'éthanol sur le composé Thy-C₄-8Pso 6d (M = 382). Dans ces spectres, nous retrouvons les coupures classiques du noyau thymine.

La comparaison du spectre de RMN ¹H de ce photoproduit avec celui du composé de départ Thy-C₄-8Pso 6d révèle tout d'abord que la thymine est inchangée : les déplacements chimiques des protons H6 et CH₃ sont identiques dans les deux composés.

Nous trouvons également dans le spectre du photoproduit, les signaux des protons aromatiques du psoralène présentant toutefois une modification importante de la constante de couplage des protons en position 3 et 4. Cette constante passe de 10 Hz pour le composé de départ à 16 Hz. Cette augmentation de la constante de couplage est en faveur d'une ouverture de la lactone avec isomérisation cis-trans de la double liaison 3,4 : on trouve dans la littérature (108) les données suivantes :



$$J_{3,4} = 10\text{Hz}$$

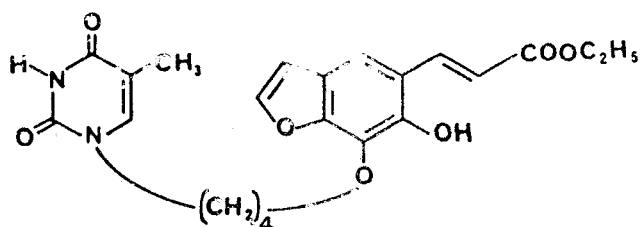


$$J_{3,4} = 16\text{Hz}$$

Les signaux d'un groupement éthyle sont visibles sur le spectre : un quadruplet centré à 4,20 ppm et un triplet à 1,30 ppm. Le déplacement chimique du quadruplet peut être comparé à ceux donnés dans la littérature (109).

- Pour un ester $R-COO\text{CH}_2-\text{CH}_3$ $\text{CH}_2 = 4,20 \text{ ppm}$
- Pour un éther de phénol $\text{Ph}-O-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ $\text{CH}_2 = 3,90 \text{ ppm}$

Ces données sont compatibles avec la structure suivante dans laquelle le groupement éthyle est engagé dans une fonction ester :



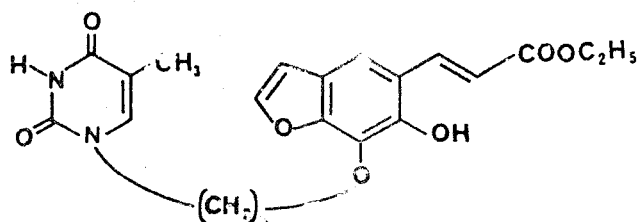
Cette structure a été confirmée par comparaison avec un échantillon authentique obtenu par une autre voie (composé 21, p 96-97).

Nous avons préparé par une autre voie un composé analogue ayant une chaîne carbonée plus longue ($n = 12$; composé 22).

Celui-ci a été identifié par CLHP au photoproduit formé lors de l'irradiation du modèle Thy- C_{12} -8Pso 61 dans l'éthanol.

En ce qui concerne les autres photoproduits issus des modèles Thy- C_n -8Pso 6 présentant des longueurs de chaîne différentes, nous avons vu précédemment que leurs caractéristiques CLHP étaient indépendantes de la longueur de cette chaîne ($n = 3, 4, 5, 6, 12$).

L'ensemble de ces résultats montre bien que la nature des photoproduits ne dépend pas de la longueur de la chaîne reliant la thymine au psoralène. Ces photoproduits ont la structure suivante :



4/ Etude dans l'eau :

L'irradiation à 365 nm de tous les composés Thy-C_n-8Pso 6 dans l'eau à une concentration de $3 \cdot 10^{-5}$ moles/l conduit à la formation d'un photoproduit dont la nature ne varie probablement pas avec la longueur de la chaîne carbonée (n = 3, 4, 5, 6, 12) comme l'indique le tableau 11 :

- Les rapports d'absorption A des photoproduits formés sont les mêmes.
- Les temps de rétention t_R de ces photoproduits suivent l'évolution de ceux des modèles t_R° .

Plusieurs remarques sont en faveur d'une photoréaction tout à fait comparable à celle qui se produit dans l'éthanol :

- * La nature des photoproduits semble ne pas être affectée par la longueur de la chaîne carbonée (Tableau 11).
- * Le composé Thy-C₁₂-8Pso 61 n'a pu être irradié dans l'eau pure à cause de son insolubilité. Irradié dans un mélange eau-éthanol 50 : 50, il donne deux produits ayant l'un, les mêmes caractéristiques chromatographiques que celles du photoproduit formé dans l'éthanol et l'autre, celles des photoproduits formés dans l'eau (Tableau 11).
- * Les temps de rétention en CLHP des photoproduits formés dans l'eau sont très sensibles au pH du mélange éluant. Dans le cas d'une addition d'eau, similaire à celle d'éthanol, nous attendons la formation d'un acide qui serait donc sensible au pH du mélange analytique.

Composés irradiés	Photoproduit majoritaire		Condition d'élu-tion		
	t _R	A	t _R	A	CLHP
Thy-C ₃ -8Pso ^a	7mn30	24,9	6mn00	20,9	PE 50 pH5
			6mn35	20,0	EI 50 pH5
Thy-C ₄ -8Pso ^a	8mn00	24,6	6mn25	20,4	PE 50 pH5
			7mn50	20,7	EI 50 pH5
Thy-C ₅ -8Pso ^a	8mn50	24,8	7mn25	20,5	PE 50 pH5
			4mn35	21,9	EI 60 pH5
Thy-C ₆ -8Pso ^a	9mn40	24,3	8mn05	20,7	PE 50 pH5
			6mn25	22,5	EI 60 pH5
Thy-C ₁₂ -8Pso ^b	9mn35	24,3	6mn35	20,7	PE 80 pH5
			7mn05	21,0	EI 80 pH5

Tableau 11 : Caractéristiques CLHP des photoproduits formés lors de l'irradiation de solutions aqueuses des composés Thy-C_n-8Pso 6. Solutions à 3.10⁻⁵M dans un mélange eau-éthanol 95 : 5 (a) ou 50 : 50 (b). t_R : Temps de rétention, A : Rapport d'absorption 254/365 nm.

Si ces hypothèses sont exactes, on peut relier directement les photoproduits obtenus dans l'eau et dans l'éthanol ; les esters formés dans l'éthanol devant conduire par hydrolyse aux acides obtenus dans l'eau.

Les mélanges de photoréaction obtenus dans l'éthanol ont donc été chauffés quelques minutes en présence de soude concentrée. Les produits d'hydrolyse ont été analysés par CLHP en éluant avec un milieu tamponné et comparés aux photoproduits observés dans l'eau (Tableau 12).

Bien que l'hydrolyse aboutisse dans certains cas (Thy-C₃-8Pso 6c et Thy-C₁₂-8Pso 6l) à la formation de plusieurs composés, l'un d'entre eux a toujours les mêmes caractéristiques CLHP (temps de rétention et rapport d'absorption) que celles des photoproduits formés dans l'eau (Tableau 12).

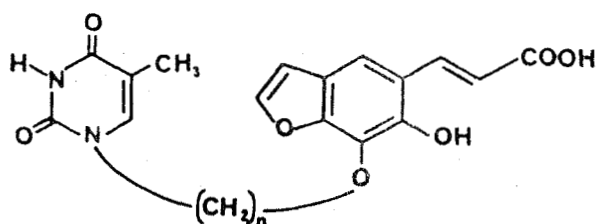
Composés irradiés	Produits d'hydrolyse		Photoproduits majoritaires		Conditions d'élu-tion CLHP
	t _R	A	t _R	A	
Thy-C ₃ -8Pso <u>6c</u>	5mn55	20,9	6mn00	20,9	PE 50 pH5
Thy-C ₄ -8Pso <u>6d</u>	6mn25	20,0	6mn25	20,8	PE 50 pH5
Thy-C ₅ -8Pso <u>6e</u>	7mn25	19,5	7mn25	19,5	PE 50 pH5
Thy-C ₆ -8Pso <u>6f</u>	8mn05	19,3	8mn05	20,0	PE 50 pH5
Thy-C ₁₂ -8Pso <u>6l</u>	6mn30	20,7	6mn35	20,0	PE 80 pH5

Tableau 12 : Caractéristiques CLHP des composés formés lors de l'hydrolyse de solutions des composés Thy-C_n-8Pso 6d dans l'éthanol préalablement irradiées à 365 nm (à l'équilibre photostationnaire). Ces caractéristiques sont comparées avec celles des photoproduits formés lors de l'irradiation de ces mêmes composés dans un mélange eau-éthanol 95 : 5. t_R : Temps de rétention, A : Rapport d'absorption 254/365 nm.

Nous avons préparé deux composés témoins Thy-C₄-8PsoCO₂H 19 et Thy-C₁₂-8PsoCO₂H 20 (p 96) ayant la structure de l'acide attendu.

Les caractéristiques CLHP de ces témoins sont identiques à celles des photoproduits mis en évidence lors de l'irradiation dans l'eau des composés Thy-C₄-8Pso 6d et Thy-C₁₂-8Pso 6l. Ces caractéristiques sont également les mêmes que celles des photoproduits formés à partir des autres modèles étudiés (Thy-C_n-8Pso : 6c, n = 3 ; 6e, n = 5 ; 6f, n = 6. Tableau 11).

La structure de ces photoproduits se trouve ainsi prouvée d'une manière non ambiguë :



En résumé, il apparaît que la photoréaction la plus importante se produisant à la fois dans l'eau et dans l'éthanol lors de l'irradiation des modèles Thy-C_n-8Pso 6 consiste en une ouverture du cycle pyrone de la furocoumarine.

A notre connaissance, cette photoréaction n'a pas été décrite dans la littérature pour le composé actif, le méthoxy-8 psoralène 1. Nous nous sommes donc attachés à mettre en évidence la formation éventuelle d'un photoproduit d'ouverture de ce composé.

5/ Photoréactivité des méthoxy-8 et propoxy-8 psoralènes 1 et 13 dans l'eau et dans l'éthanol :

Nous avons tout d'abord irradié à 365 nm des solutions de 8MOP 1 à une concentration d'environ $5 \cdot 10^{-5}$ moles/l dans l'eau.

Comme pour les modèles, nous observons une photoréactivité faible. Il se forme un photoproduit majoritaire qui absorbe la lumière à 365 nm. A l'équilibre photostationnaire, il reste une forte proportion de produit de départ (> 80 %) (Figure 26).

Irradié dans l'éthanol, le 8MOP 1 a un comportement photochimique comparable : il apparaît un photoproduit majoritaire, différent de celui formé dans l'eau (Figure 26).

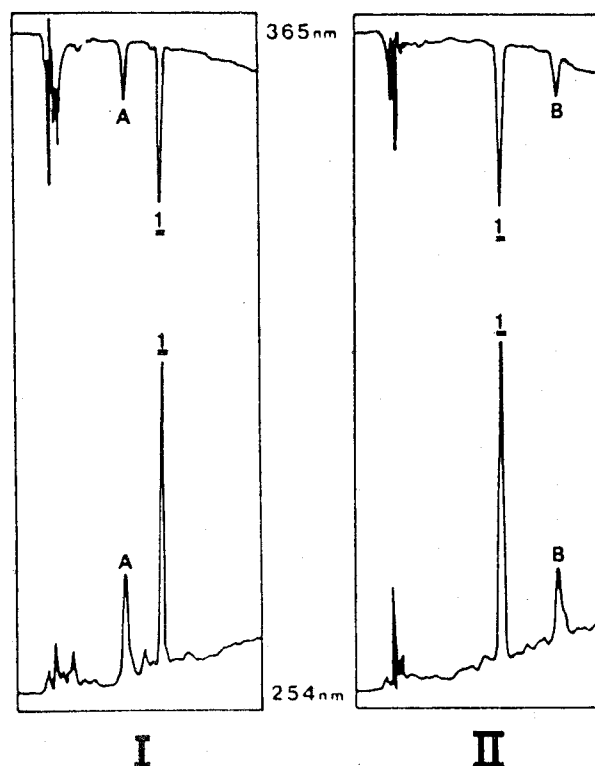


Figure 26 : Chromatogrammes CLHP de solutions de méthoxy-8 psoralène 1 irradiées à 365 nm ($5 \cdot 10^{-5}$ moles/l). I : Eau-éthanol 95 : 5, 8h d'irradiation. II : Ethanol, 6h d'irradiation. A, B : Photoproduits

majoritaires.

En raison des faibles photoréactivités observées et des concentrations utilisées, nous n'avons pas cherché à isoler ces photoproduits.

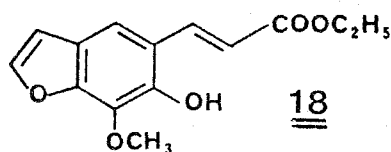
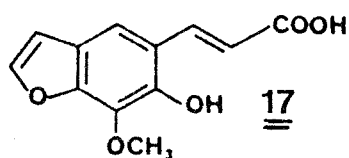
Après irradiation la solution éthanolique a été traitée en milieu basique. L'analyse CLHP indique la formation d'un composé qui est identifié au photoproduit obtenu lors de l'irradiation dans l'eau (Tableau 13).

Composés irradiés	Photoproduits majoritaires		Conditions d'élu-tion		
	t ^o _R	A	t _R	A	CLHP
8Pso-C ₃ ^a	10mn25	19,6	12mn25	8,9	PE 50
8MOP ^a	7mn35	19,6	10mn35	9,0	PE 50
8Pso-C ₃ ^b	10mn25	19,6	7mn50	20,0	PE 50
8MOP ^b	7mn35	19,6	5mn35	18,1	PE 50 pH5
			5mn35	18,5	EI 60 pH5
8MOP ^c			5mn35 ^c	17,3 ^c	PE 50 pH5
hydrolysé			5mn35 ^c	18,2 ^c	EI 60 pH5

Tableau 13 : Caractéristiques CLHP des photoproduits majoritaires formés lors de l'irradiation à 365 nm des composés 8Pso-C₃ 13 et 8MOP 1. a : Irradiation dans l'éthanol. b : Irradiation dans un mélange eau-éthanol 95 : 5. c : Caractéristiques du produit de saponification d'une solution de 8MOP irradié dans l'éthanol.

Le propoxy-8 psoralène 13 irradié en solution diluée dans l'eau et dans l'éthanol montre un comportement comparable (CLHP ; Tableau 13).

Tous ces résultats permettent de proposer les structures 17 et 18 pour les photoproduits issus de l'irradiation du 8MOP respectivement dans l'eau et dans l'éthanol :



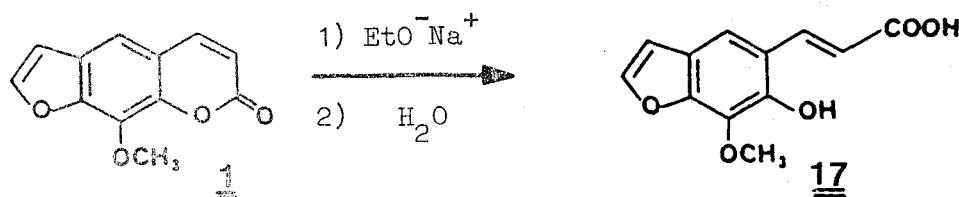
Dans le but de confirmer ces structures et de façon à disposer de quantités suffisantes de produits pour en étudier les propriétés, nous avons entrepris de les préparer par voie univoque.

6/ Préparation des composés témoins :

Tous les photoproduits mis en évidence sont des dérivés de l'acide trans (hydroxy-6, méthoxy-7) benzofuryl-5 propénoïque 8MOPCO₂H 17.

a) Préparation du composé 8MOPCO₂H 17 :

La préparation de cet acide a été décrite dans la littérature (59, 110). Elle se fait par réaction de l'éthylate de sodium sur le méthoxy-8 psoralène 1 suivie d'une hydrolyse :



Le composé 17 a été ainsi préparé avec un bon rendement (80 %).

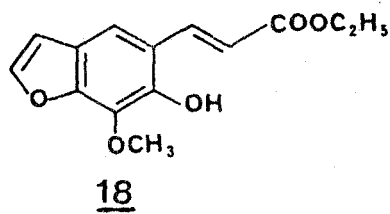
Les résultats de l'étude photochimique dans l'eau nous ont incité à étudier si ce produit 17 se formait bien lors de l'irradiation du 8MOP en milieu basique. En effet, l'ouverture chimique de la lactone par une base devrait favoriser la formation de 17. D'autre part, nous trouvons dans la littérature, un travail qui décrit l'apparition de produits fluorescents lorsque l'on irradie des solutions de coumarines ou de furocoumarines dans la soude aqueuse (111). Les produits formés n'ont pas été isolés par les auteurs qui font néanmoins l'hypothèse d'une réaction conduisant à l'ouverture de la lactone suivie d'une photoisomérisation.

Nous avons irradié à 365 nm le 8MOP 1 en solution dans un mélange eau-éthanol 90 : 10 à une concentration d'environ $2 \cdot 10^{-3}$ moles/l en présence de soude (0,05 M). Nous avons ainsi obtenu avec un bon rendement (65 %) un produit dont les caractéristiques sont identiques à celles de l'acide 8MOPCO₂H 17 préparé précédemment.

Les caractéristiques CLHP de ce composé témoin ont été comparées à celles du photoproduit formé lors de l'irradiation du 8MOP dans l'eau en milieu neutre. La similitude de ces caractéristiques permet de confirmer la structure 17 proposée.

Remarquons que ces conditions opératoires conduisant à 17 sont beaucoup plus faciles à mettre en oeuvre que la réaction du 8MOP avec l'éthylate de sodium décrite dans la littérature (59, 110).

b) Préparation du composé 8MOPCO₂Et 18 :



Ce composé a été préparé par estérification du 8MOPCO₂H 17 dans l'éthanol à reflux en milieu acide (Rendement 75 %).

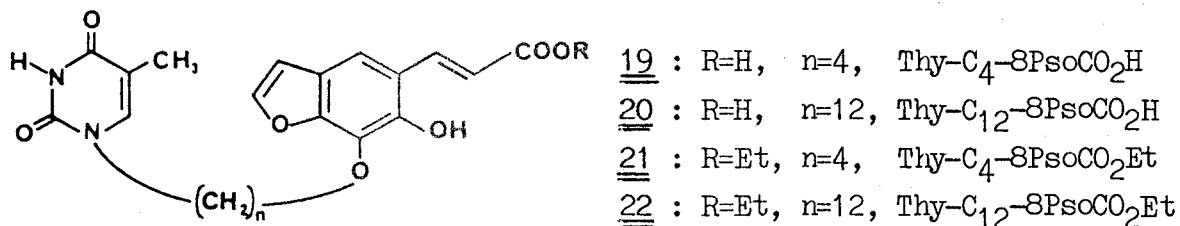
L'irradiation à 365 nm du méthoxy-8 psoralène 1 dans l'éthanol anhydre ($2 \cdot 10^{-3}$ moles/l), en présence d'un excès d'éthylate de sodium conduit également à cet ester.

La réaction est délicate à mettre en oeuvre en raison de la nécessité de travailler en l'absence d'oxygène et d'eau. La neutralisation de la base doit être soigneusement effectuée avant l'évaporation de l'éthanol de façon à éviter l'hydrolyse de l'ester. La purification de cet ester s'est avérée difficile, en raison de sa polarité sur silice proche de celle du 8MOP 1. Le rendement est d'environ 50 %.

L'ester 8MOPCO₂Et 18 ainsi préparé présente les mêmes caractéristiques CLHP que le photoproduit formé lors de l'irradiation du 8MOP 1 dans l'éthanol.

c) Préparation des composés témoins portant la thymine :

Quatre composés témoins ont été préparés :



L'ouverture contrôlée du cycle pyrone pouvant se faire aisément et avec de bons rendements par voie photochimique dans le cas du 8MOP 1, nous avons tenté d'utiliser cette méthode pour préparer les composés Thy-C_n-8PsoCO₂H 19 (n = 4) et 20 (n = 12) à partir des modèles Thy-C_n-8Pso 6d et 6l.

Préparation des acides Thy-C₄-8PsoCO₂H 19 et Thy-C₁₂-8PsoCO₂H 20 :

Les composés Thy-C₄-8Pso 6d et Thy-C₁₂-8Pso 6l ont été irradiés à 365 nm en solution dans un mélange eau-éthanol ($5 \cdot 10^{-5}$ à 10^{-4} moles/l) en présence de soude (2 à $5 \cdot 10^{-2}$ M). Dans ces conditions, la réaction est totale. Elle conduit à un produit majoritaire (> 90 %).

Les spectres de RMN et de masse des composés isolés montrent que la photoréaction a laissé la thymine inchangée. Par contre, le noyau psoralène a subi une ouverture du cycle pyrone avec addition d'eau. Le spectre de RMN de ce noyau psoralène modifié est identique au spectre de la partie aromatique du composé 8MOPCO₂H 17. Toutes les caractéristiques spectroscopiques des produits obtenus sont en accord avec les structures attendues.

Les rendements de cette réaction en produit pur sont très bons (de 60 à 80 %).

La méthode utilisée constitue une excellente voie d'accès aux composés recherchés.

Les esters éthyliques Thy-C₄-8PsoCO₂Et 21 et Thy-C₁₂-8PsoCO₂Et 22 correspondants ont été préparés en chauffant les acides à reflux de l'éthanol en milieu acide (Rendements 65 à 90 %).

7/ Conclusion - Rendements des photoréactions :

Les produits témoins préparés ont permis d'identifier de façon certaine les photoproduits formés lors de l'irradiation des composés Thy-C₁₁-8Pso 6 et du 8MOP 1 dans l'eau et dans l'éthanol.

A partir d'échantillons purs de ces composés, nous avons déterminé les rendements des principales photoréactions observées (Tableau 14). Ces rendements sont difficiles à déterminer précisément en raison de la photoréactivité des photoproduits (états photostationnaires incertains).

Ces rendements sont en général faibles. Il faut surtout remarquer, le rendement non négligeable (10 à 15 %) de la réaction de photolyse du 8MOP 1 dans l'eau qui conduit à l'acide 8MOPCO₂H 17.

A notre connaissance, cette réaction n'a jamais été décrite dans la littérature. Le composé formé 17 revêt donc une importance tout particulière : il pourrait être un intermédiaire de photolyse du 8MOP 1 in vivo.

Composés irradiés	Concentration	Composés formés	Taux de conversion ^d
8MOPa <u>1</u>	5.10 ⁻⁵ M	8MOPCO ₂ H <u>17</u>	10 à 15%
8MOPb	5.10 ⁻⁵ M	8MOPCO ₂ Et <u>18</u>	10 à 15%
Thy-C ₄ -8Psoa <u>6d</u>	2,5.10 ⁻⁵ M	Thy-C ₄ -8PsoCO ₂ H <u>19</u>	15 à 20 %
Thy-C ₄ -8Psob	2,5.10 ⁻⁵ M	Thy-C ₄ -8PsoCO ₂ Et <u>21</u>	30 à 40 %
Thy-C ₁₂ -8Pso ^c <u>61</u>	2.10 ⁻⁵ M	Thy-C ₁₂ -8PsoCO ₂ H <u>20</u>	15 à 20 %
		Thy-C ₁₂ -8PsoCO ₂ Et <u>22</u>	5 à 10 %
Thy-C ₁₂ -8Psob <u>61</u>	2.10 ⁻⁵ M	Thy-C ₁₂ -8PsoCO ₂ Et <u>22</u>	15 à 20 %

Tableau 14 : Rendements de principales photoréactions observées lors de l'irradiation du méthoxy-8 psoralène 1 et des composés Thy-C₄-8Pso 6d et Thy-C₁₂-8Pso 61. a : Irradiation dans un mélange eau-éthanol 95 : 5. b : Irradiation dans l'éthanol. c : Irradiation dans un mélange eau-éthanol 50 : 50. d : Taux de conversion déterminés en CLMP.

Dans le cas des composés Thy-C_n-8Pso 6, quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée (n = 3, 4, 5, 6, 12), dans l'eau et dans l'éthanol, nous n'observons pas de photoaddition thymine-psoralène.

Lors de l'étude des photoréactions des composés Thy-C_n-8Pso 6 dans d'autres solvants, nous n'avons pas mis en évidence d'adduits de type cyclobutane : les photoproduits observés réirradiés à 254 nm ne conduisent pas aux modèles de départ. En général, ces photoproduits n'absorbent pas la lumière à 365 nm et sont instables. Avant d'entreprendre leur isolement, il faut attendre une meilleure connaissance des photoréactions pouvant donner des produits stables et identifiables, en particulier dans la série du méthoxy-5 psoralène 5MOP 2.

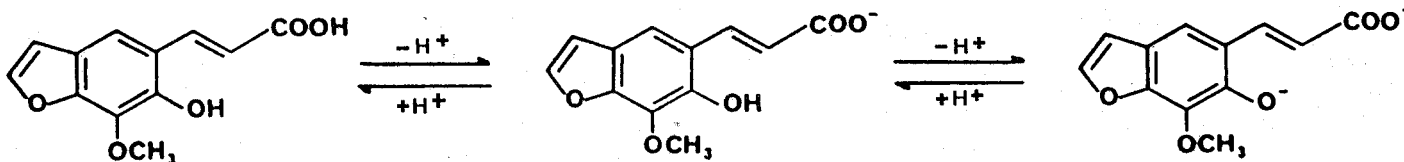
8/ Propriétés des photoproduits 17, 18, 19, 20, 21, 22 :

Il est intéressant d'étudier tout d'abord les propriétés d'absorption et de fluorescence de ces photoproduits.

Une étude plus particulière du composé 8MOPCO₂H 17 a été réalisée en raison de l'importance biologique que pourrait avoir ce composé de photolyse du méthoxy-8 psoralène dans l'eau.

a) Equilibre de dissociation du composé 8MOPCO₂H 17 :

Cet acide peut se dissocier dans l'eau suivant deux équilibres :



Nous avons déterminé les valeurs des deux pK_a tout d'abord par pHmétrie dans un mélange eau-éthanol 80 : 20 (titration par de la soude) :

$$pK_{a1} = 5 \text{ et } pK_{a2} = 9$$

mesures plus précises ont ensuite été obtenues par spectrophotométrie UV en solution dans un mélange eau-éthanol 95 : 5 à différents pH.

Les valeurs suivantes ont été trouvées :

$$pK_{a1} = 4,7 \text{ et } pK_{a2} = 9,2$$

Nous avons présenté sur la Figure 27 les spectres d'absorption des trois formes pouvant être présentes dans l'eau : l'acide, le monoanion et le dianion.

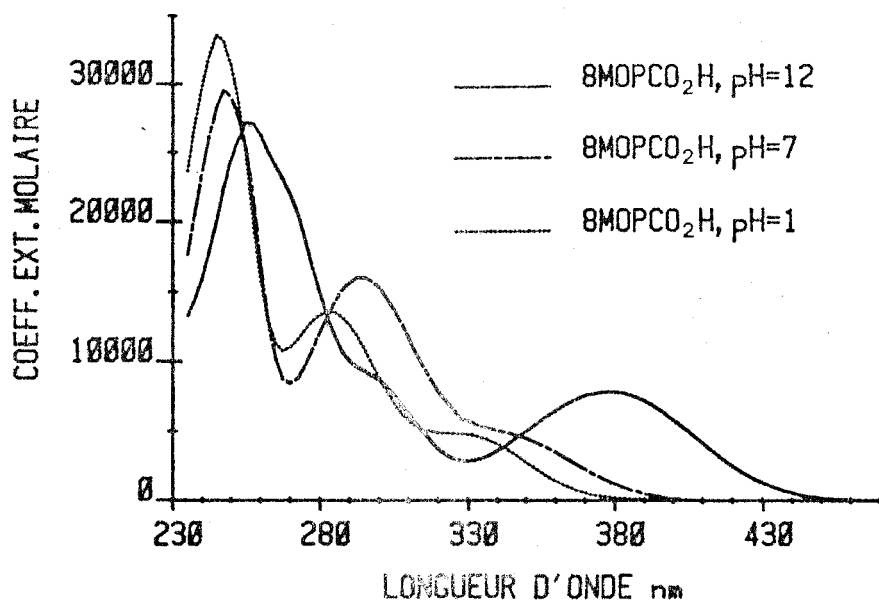
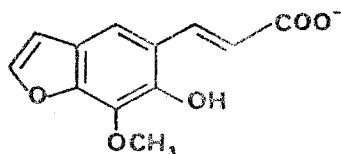


Figure 27 : Spectres d'absorption du composé 8MOPCO₂H 17 en solution dans un mélange eau-éthanol 95 : 5 à différents pH : pH = 1, acide ; pH = 7, monoanion ; pH = 12, dianion.

Dans l'eau, à pH = 7, le composé 8MOPCO₂H 17 se présente essentiellement sous la forme du monoanion:



b) Spectres d'absorption des photoproduits 17, 18, 19, 20, 21, 22:

Comme nous l'avions remarqué lors de l'étude photochimique, ces photoproduits absorbent la lumière dans l'UV proche à 365nm. Il est important de comparer cette absorption à celle du 8MOP 1.

Composé 8MOPCO₂H 17, Thy-C_n-8PsoCO₂H 19 (n = 4) et 20 (n = 12) :

Les spectres (Figure 28) montrent que, dans l'eau à pH=7, l'absorption du composé 8MOPCO₂H 17 dans l'UV proche (320-400 nm) est comparable à celle du 8MOP 1 en particulier à 365 nm :

$$\epsilon_{8MOP} = \epsilon_{8MOPCO_2H} = 1000 \text{ l/mole/cm}$$

Ceci peut expliquer la décomposition des photoproduits de type 8MOPCO₂H 17 lors d'une irradiation trop longue. D'autant plus que les chromophores impliqués sont de type cinnamique, bien connus pour leur importante photoréactivité en cycloaddition [2+2] (112).

Une photoaddition [2+2] du composé 8MOPCO₂H sur la thymine est envisageable. Il sera intéressant d'étudier cette réaction de manière intramoléculaire à l'aide des modèles Thy-C_n-8PsoCO₂H 19 et 20.

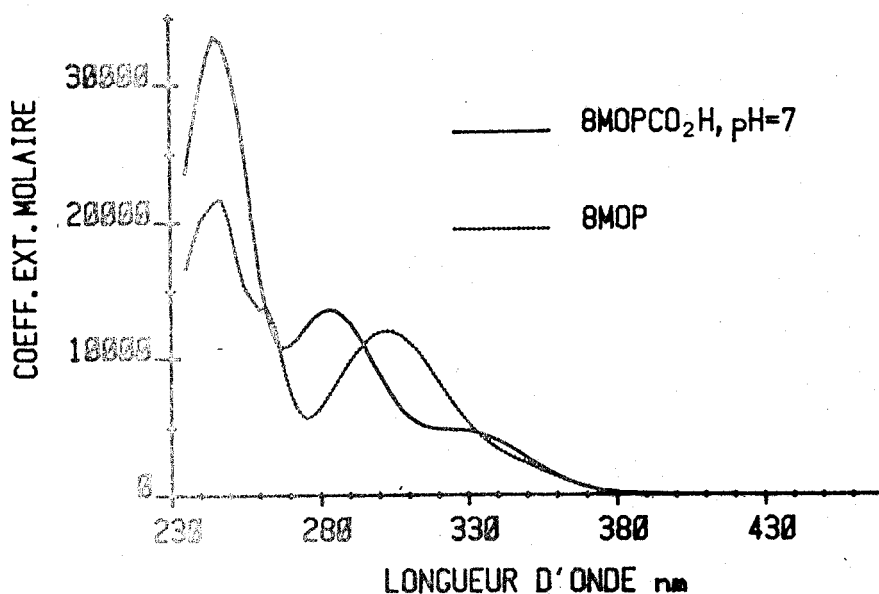


Figure 28 : Spectres d'absorption des composés 8MOP 1 et 8MOPCO₂H 17 (pH= 7), eau-éthanol 95 : 5.

Composés 8MOPCO₂Et 18, Thy-C_n-8PsoCO₂Et 21 (n = 4) et 22 (n = 12) :

L'absorption dans l'UV proche du composé 8MOPCO₂Et 18 est nettement plus importante que celle du 8MOP 1 : (Figure 29) à 365 nm, ϵ 8MOP = 1000 l/mole/cm, ϵ 8MOPCO₂Et = 4000 l/mole/cm. Il en est de même pour les composés Thy-C_n-8PsoCO₂Et 21 et 22.

Cette absorption explique les difficultés rencontrées pour obtenir les équilibres photostationnaires : ces photoproduits se photolysent à la longueur d'onde d'irradiation (365 nm).

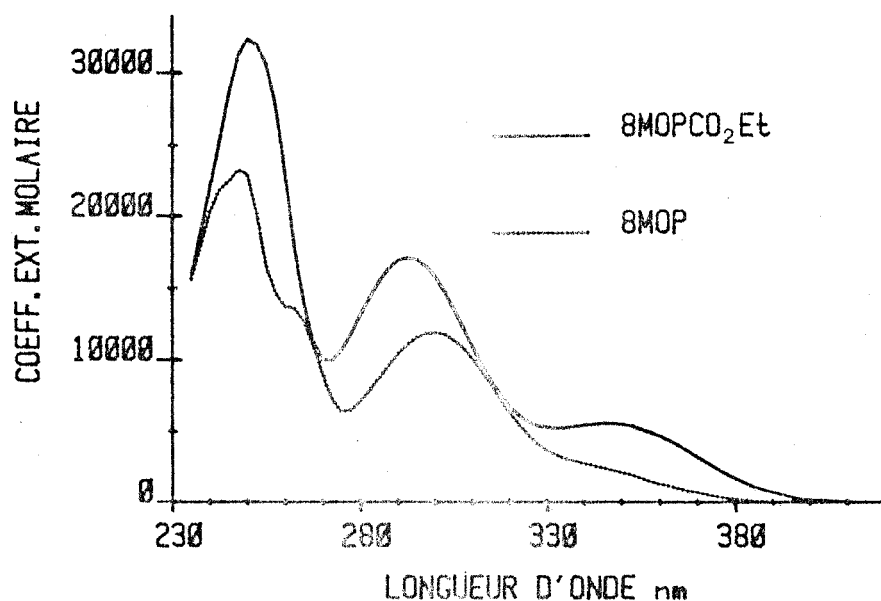
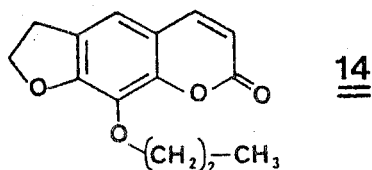


Figure 29 : Spectres d'absorption dans l'éthanol des composés 8MOP 1 et 8MOPCO₂Et 18.

c) Fluorescence des photoproduits 17, 18, 19, 20, 21, 22 :

La fluorescence de ces composés est facilement visible. Il nous a semblé intéressant de comparer cette fluorescence à celle émise par le dérivé 4',5'dh 8Pso-C₃ 14.



Ce type de composé est en effet considéré comme un bon modèle du monoadduit thymine 5,6 \diamond 4',5' psoralène (28, 52) pour l'étude des propriétés spectroscopiques. La fluorescence importante de cet adduit permet de le détecter facilement et de réaliser un certain nombre d'études cinétiques dans l'ADN (107).

Nous avons enregistré dans différentes conditions (solutions non désoxygénées) les spectres de fluorescence de tous ces produits. A partir de ces spectres, les rendements quantiques de fluorescence Φ_F ont été déterminés (Tableaux 15, 16, 17).

Composé	8MOPCO ₂ H	Thy-C ₄ -8Pso-CO ₂ H	Thy-C ₁₂ -8Pso-CO ₂ H	4',5'dh8Pso-C ₃
λ_{\max}	530	530	530	460
Φ_F	0,03	0,02	0,02	0,05

Tableau 15 : Caractéristiques de la fluorescence dans l'éthanol des composés 8MOPCO₂H 17, Thy-C₄-8PsoCO₂H 19, Thy-C₁₂-8PsoCO₂H 20 comparées à celles du composé 4',5'dh8Pso-C₃ 14.

Composé	8MOPCO ₂ Et	Thy-C ₄ -8Pso-CO ₂ Et	Thy-C ₁₂ -8Pso-CO ₂ Et	4',5'dh8Pso-C ₃
λ_{\max}	528	528	528	460
Φ_F	0,05	0,06	0,02	0,05

Tableau 16 : Caractéristiques de la fluorescence dans l'éthanol des composés 8MOPCO₂Et 18, Thy-C₄-8Pso-CO₂Et 21, Thy-C₁₂-8Pso-CO₂Et 22 comparées à celles du composé 4',5'dh8Pso-C₃ 14.

Composés	4',5'dh8Pso-C ₃	8MOPCO ₂ H					
	a	a	1 ^b	5 ^b	7	9,2 ^b	12 ^b
λ_{max} nm	480	540				585	580 à 640
Φ_F	0,05	$2 \cdot 10^{-3}$	$\ll 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}

Tableau 17 : Variation de la fluorescence du composé 8MOPCO₂H 17 avec le pH.
a : Solutions dans un mélange eau-éthanol 95 : 5. b : Même solvant mais solutions tamponnées.

Dans l'éthanol, tous les composés préparés présentent une fluorescence sensible. Les rendements quantiques de fluorescence (0,02 à 0,06) sont proches de celui du composé 4',5'dh 8Pso-C₃ 14 (0,05) (Tableaux 15 et 16).

Dans l'eau, le composé 8MOPCO₂H 17 est peu fluorescent, quel que soit le pH (Tableau 17). Parmi les trois formes susceptibles d'exister dans l'eau, c'est le monoanion, très majoritaire à pH = 7 qui semble le plus fluorescent dans les conditions utilisées * : $\Phi_F \simeq 0,05$. Son rendement quantique de fluorescence est dix fois plus faible que celui du composé 4',5'dh 8Pso-C₃ 14 (modèle du monoadduit thymine 5,6 \diamond 4',5' méthoxy-8 psoralène). Bien que plus faible, cette fluorescence n'en reste pas moins significative.

Ceci montre la nécessité d'utiliser avec prudence les mesures de fluorescence lors des études quantitatives et même qualitatives de photoréactivité des psoralènes en milieu biologique.

* Les solutions étudiées contiennent pour la plupart des tampons qui peuvent modifier les rendements quantiques de fluorescence.

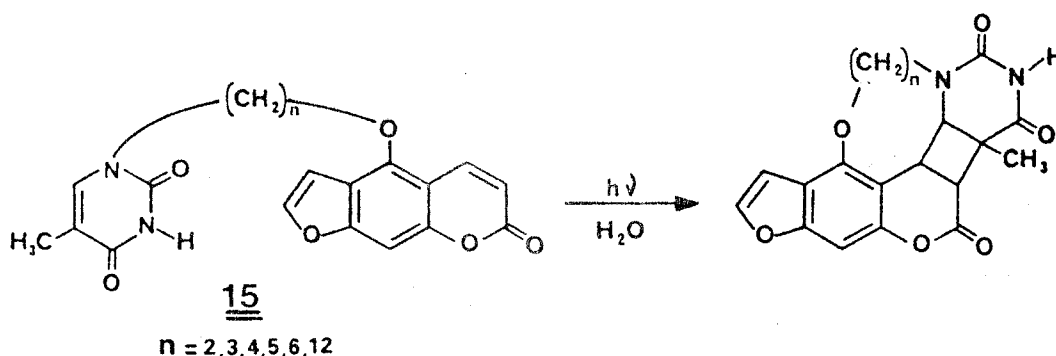
B. PHOTOREACTIVITE DES MODELES THYMINE-METHOXY-5 PSORALENE

Thy-C_n-5Pso 15 :

En collaboration avec Georges HUART, nous avons étudié la photoréactivité des composés Thy-C_n-5Pso 15 (n = 2, 3, 4, 5, 6 et 12), série de modèles complémentaire à la précédente. L'étude détaillée de tous ces composés fera l'objet de la thèse de 3ème Cycle de Georges HUART. Nous nous limiterons ici à résumer rapidement l'essentiel des résultats obtenus.

1/ Irradiation à faibles concentrations (< 2.10⁻⁵ M) :

Dans ce cas, l'irradiation de tous les composés Thy-C_n-5Pso 15 dans différents solvants (eau, acétonitrile, DMF, eau-DMF...) conduit à la formation d'adduits intramoléculaires thymine 5,6 ◊ 3,4 alcoxy-5 psoralène, quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée liant la thymine au psoralène (n = 2, 3, 4, 5, 6 et 12).



Cette réaction présente une sélectivité remarquable : dans l'eau, il se forme un seul adduit.

Les adduits obtenus pour les composés Thy-C₂-5Pso 15b et Thy-C₄-5Pso 15d ont été isolés. La structure de l'adduit issu de 15d (n = 4) a été résolue par radiocristallographie : elle est cis anti (Figure 30).

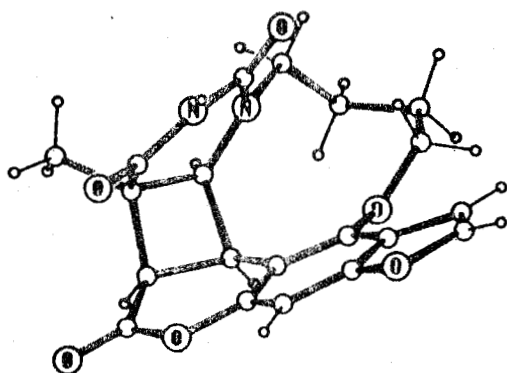


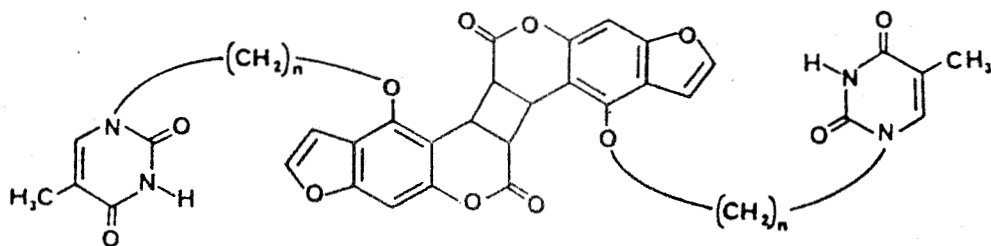
Figure 30 : Vue en perspective de l'adduit intramoléculaire thymine-psoralène préparé à partir du composé Thy-C₄-5Pso 15d.

Les adduits formés à partir des modèles possédant des longueurs de chaînes différentes présentent un comportement chromatographique (CLHP) très voisin de celui de l'adduit issu de 15d (n = 4). Leurs structures sont probablement également cis.

2/ Irradiation de solutions concentrées ($> 5 \cdot 10^{-5}$ M) :

Lorsque l'on augmente la concentration des solutions irradiées, un nouveau type de photoproduit apparaît parallèlement à l'adduit intramoléculaire ($C > 2 \cdot 10^{-5}$ M). A partir d'une concentration d'environ $5 \cdot 10^{-5}$ M, seul ce nouveau type d'adduit prédomine.

Les structures de ces adduits ne sont actuellement pas complètement résolues. En l'état actuel des choses (spectres de RMN in situ), nous pouvons penser qu'il s'agit de photodimères de ce type :



3/ Remarques :

Les mécanismes de ces photoréactions sont en cours d'étude. Nous pouvons cependant penser qu'il s'agit de réactions du psoralène à l'état triplet (inhibition de la réaction par l'oxygène) et que le repliement de la molécule n'est pas nécessaire à la photoréaction intramoléculaire (réaction en solvant organique).

C. CONCLUSION :

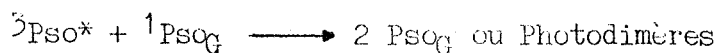
1/ Photoreactivité en série méthoxy-8 et 5 psoralène 1 et 2 :

L'étude des composés Thy-C_n-8Pso 6 et Thy-C_n-5Pso 15 a révélé une faible photoreactivité entre la thymine et le psoralène.

La photoreactivité intrinsèque des psoralènes étudiés est fortement influencée par la concentration à laquelle on opère :

- En série 8MOP 1, l'augmentation de la concentration en modèle irradié provoque surtout une diminution de la photoreactivité.
- En série 5MOP 2, elle conduit à un changement complet de la nature des photoproduits et probablement à la formation de photodimères.

Ces résultats s'expliquent par la désactivation très rapide de l'état excité du psoralène par des molécules restées à l'état fondamental, propriété qui est décrite dans la littérature (94) :

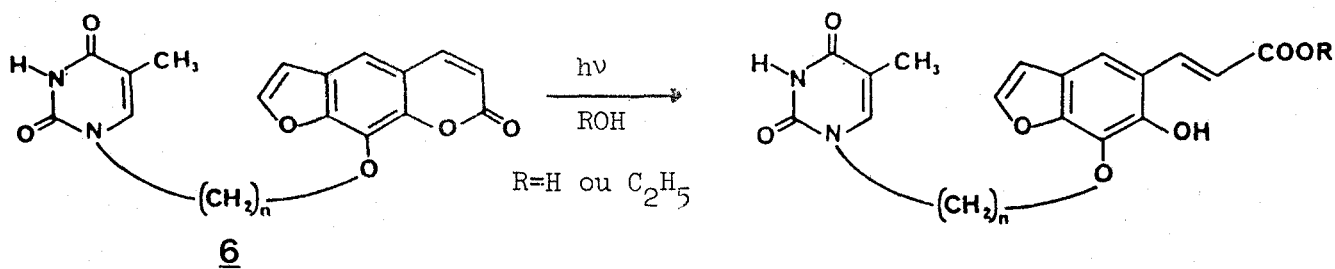


L'étude en photolyse éclair du composé Thy-C₄-8Pso 6d avait également mis en évidence le même phénomène, c'est à dire une diminution de la durée de vie de l'état triplet du noyau psoralène lorsque la concentration augmente.

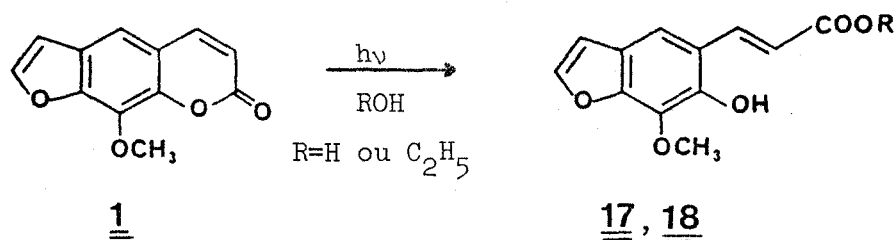
2/ Nature des photoproduits :

a) Série du 8MOP 1 :

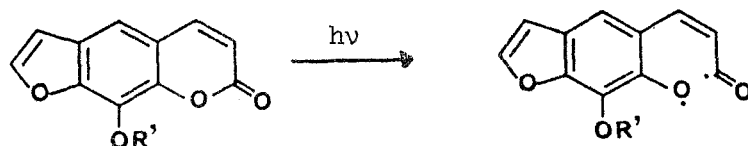
Dans cette série, nous n'avons pas isolé d'adduit entre la thymine et le psoralène. L'irradiation dans l'eau et dans l'éthanol des composés Thy-C_n-8Pso 6 conduit principalement à des produits d'ouverture du noyau psoralène et d'addition du solvant, cela quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée (n = 3, 4, 5, 6, 12) :



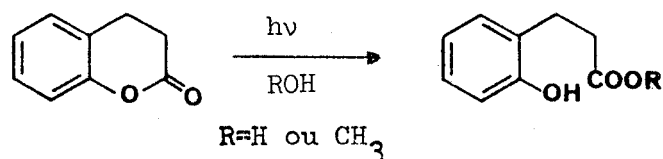
Dans les mêmes conditions, le méthoxy-8 psoralène 1 se photolyse pour donner des produits analogues :



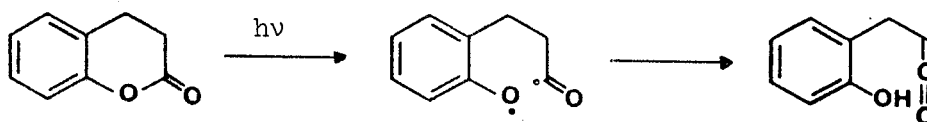
Cette réaction passe probablement par la formation d'un biradical au niveau de la lactone :



Ce biradical évolue pour fixer une molécule de solvant et conduire à l'isomérisation de la double liaison 3,4. Une photoréaction du même type est décrite dans le cas de la dihydro-3,4 coumarine (113, 114).



La formation d'un cétène intermédiaire a été mise en évidence (114).



L'acide 8MOPCO₂H 17 a été observé pour la première fois lors de l'irradiation du 8MOP 1 en solution très diluée dans l'eau. Ce composé peut avoir une grande importance biologique au niveau de l'ADN mais aussi lors de la fixation du 8MOP 1 sur les protéines (22, 23).

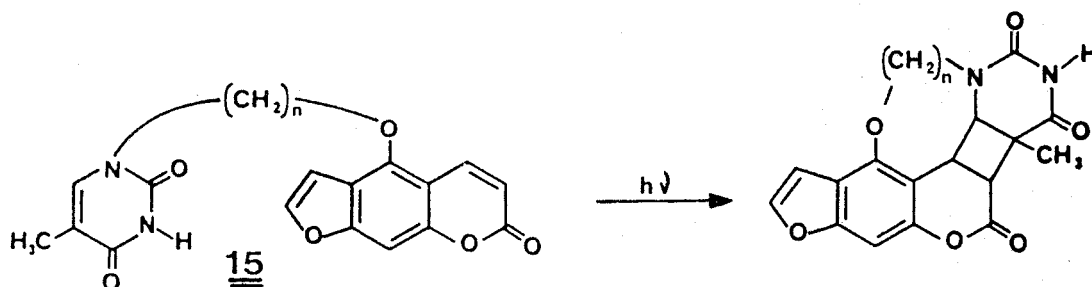
Il est intéressant d'en étudier toutes les propriétés biologiques en présence et en absence de lumière.

La réactivité de ce composé 17 avec la thymine devrait également être étudiée. Les modèles Thy-C_n-8PsoCO₂H 19 (n = 4) et 20 (n = 12) peuvent constituer de bons modèles pour mener cette étude.

b) Série du 5MOP 2 :

Nous retrouvons dans cette série une des deux photoréactions de cycloaddition mise en évidence dans l'ADN (38, 39).

L'irradiation des composés Thy-C_n-5Pso 15 en faible concentration (10⁻⁵ moles/l) dans différents solvants (eau, acétonitrile, DMF) conduit à une photoaddition thymine-psoralène remarquablement sélective :



Quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée ($n = 2, 3, 4, 5, 6$ et 12), la photoréaction a lieu sur la double liaison 3,4 du psoralène.

Ce résultat montre en première analyse que la double liaison 3,4 du psoralène serait plus réactive vis-à-vis de la thymine que la double liaison 4',5'. On peut vraisemblablement exclure tout effet conformationnel dû à la chaîne qui favoriserait la réaction sur le cycle pyrone, dans la mesure où la réaction est la même pour toutes les longueurs de chaînes utilisées.

En outre, seul l'adduit *cis* est obtenu. Cette configuration a été déterminée par une étude radiocristallographique de l'adduit isolé à partir du composé Thy-C₄-5Pso 15d. Pour la première fois, la structure RX d'un adduit thymine 5,6 \diamond 3,4 psoralène a ainsi été obtenue. Seules, les structures RX d'adduits thymine 5,6 \diamond 4',5' psoralène ont été décrites récemment (31, 115).

L'approche intramoléculaire choisie permet d'obtenir des quantités importantes d'adduit thymine 5,6 \diamond 3,4 psoralène. Elle ouvre la voie à l'étude mécanistique de la photoréaction en raison de la sélectivité observée.

Ce résultat est à replacer dans son contexte bibliographique qui est décrit en détail dans l'introduction de ce chapitre. Les différents adduits isolés jusqu'à présent ont été obtenus par irradiation de solutions de thymine et de psoralènes gelées dans des conditions expérimentales très difficiles (28 à 33). Les photoréactions ne sont pas sélectives et les rendements sont souvent très faibles. Dans ces conditions, des études mécanistiques ne sont pas possibles.

3/ Comparaison entre les deux séries de modèles :

Dans l'eau, dans la série du 5MOP 2, une photocycloaddition thymine-psoralène se produit. Elle n'est pas observée en série 8MOP 1.

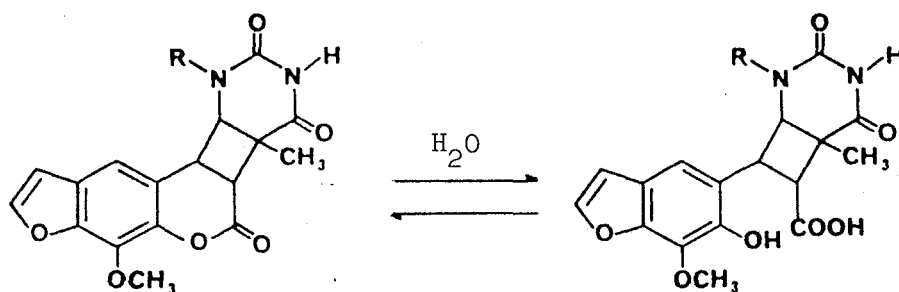
En raison du nombre de modèles étudiés présentant des longueurs de chaînes différentes ($n = 3, 4, 5, 6, 12$), il est probable que cette différence n'est pas liée à des contraintes stériques empêchant les doubles liaisons de se recouvrir.

Une différence importante entre les deux séries de modèles se trouve dans la stéréochimie des adduits pouvant se former : les composés Thy-C_n-8Pso 6 ne peuvent conduire qu'à des adduits *cis* ou *trans syn* et les composés Thy-C_n-5Pso 15 à des adduits *cis* ou *trans anti*.

Les résultats obtenus nous amènent donc à penser que les adduits syn de type méthoxy-8 psoralène sont d'obtention très difficile.

Ces adduits ont pourtant été isolés lors de la réaction intermoléculaire diméthyl-1,3 thymine-8MOP (31) et lors de la photoaddition du 8MOP 1 dans l'ADN (39).

Il faut rappeler un certain nombre de résultats de la littérature concernant les propriétés des adduits (thymine (ou diméthyl-1,3 thymine)5,6 \diamond 3,4-8MOP) cis syn isolés récemment. Ces adduits s'ouvrent dans l'eau suivant la réaction (31, 39) :



Cet équilibre avait également été décrit auparavant dans le cas de dimères de coumarine (116).

Dans nos conditions d'analyse (CLHP, phase inverse), nous devrions déceler un tel adduit ou/et le composé d'ouverture correspondant s'ils sont présents dans la solution irradiée.

Il est possible d'avancer l'hypothèse de l'instabilité des adduits thymine 5,6 \diamond 3,4-8MOP pour expliquer nos résultats.

Cette instabilité a été remarquée par J. CADET et Coll. (résultats non publiés) et provoquerait un retour aux produits de départ, la thymine et le 8MOP 1.

Des études complémentaires seront nécessaires pour interpréter clairement ces résultats. Lors de notre travail, nous avons également remarqué une certaine non-reproductibilité des essais de stabilité thermique des photoproduits obtenus en séries 8MOP 1 et 5MOP 2. Il sera important d'étudier les différents paramètres pouvant modifier cette stabilité.

III. ETUDE DES COMPOSES THYMINE-DIHYDRO-4',5' PSORALENE :

A. PHOTOREACTIVITE DES MODELES DE LA SERIE DU 8MOP 1 :

Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10 :

Comme indiqué précédemment, nous attendions une simplification de la photoréaction thymine-psoralène en étudiant les composés Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10 : seule la double liaison 3,4 du noyau dihydro psoralène pouvant photoréagir avec la thymine ou avec une autre molécule (dimérisation).

Cette étude photochimique a été réalisée à des concentrations d'environ 2.10^{-5} moles/l pour éviter les photoréactions intermoléculaires. Le composé Thy-C₃-4',5'dh 8Pso 10c n'a pas été étudié en raison de son insolubilité dans l'eau à cette concentration.

L'analyse des solutions irradiées s'est faite par CLHP comme précédemment.

1/ Influence du solvant sur la photoréactivité :

Des solutions désoxygénées des composés Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10d et 10f à 2.10^{-5} moles/l dans différents solvants organiques (éthanol, acétonitrile, acétone, DMF) ont été irradiées à 365 nm. Dans ces conditions et quel que soit le temps d'irradiation (> 10 h), l'analyse CLHP ne révèle pas de photoréaction importante.

La photoréactivité des composés Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10 est donc très faible en solvant organique, contrairement à ce qui est observé pour les composés Thy-C_n-8Pso 6.

Par contre, à la même concentration (2.10^{-5} moles/l) mais en présence d'eau, nous avons mis en évidence une photoréactivité des composés Thy-C_n-4',5'dh8Pso 10 nettement plus grande qu'en série Thy-C_n-8Pso 6 :

- La disparition du composé irradié est complète (eau-éthanol 95 : 5) ou presque complète (eau-solvant organique 50 : 50).

- Les temps d'irradiation nécessaires à l'obtention de l'équilibre photostationnaire sont plus courts (1 à 3 h au lieu de 3 à 8 h dans les mêmes conditions pour les composés Thy-C_n-8Pso 6).

2/ Etude de la photoréactivité en présence d'eau :

a) Etude dans le mélange eau-éthanol 95 : 5 :

Nous avons irradié le composé Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d à 2.10^{-5} moles/l dans ce mélange.

En 1 à 2 heures, le composé irradié disparaît complètement et il se forme rapidement un photoproduit très majoritaire qui n'absorbe pas à 365 nm (Figure 31). Ce photoproduit est instable : il se décompose en une dizaine d'heures à température ambiante et en quelques minutes à ébullition. Cette décomposition conduit à la formation de deux produits principaux dont les caractéristiques CLHP sont indiquées dans le tableau 18. L'irradiation à 254 nm de la solution de photoproduit obtenue conduit lentement (30 mn) au composé de départ Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d (CLHP).

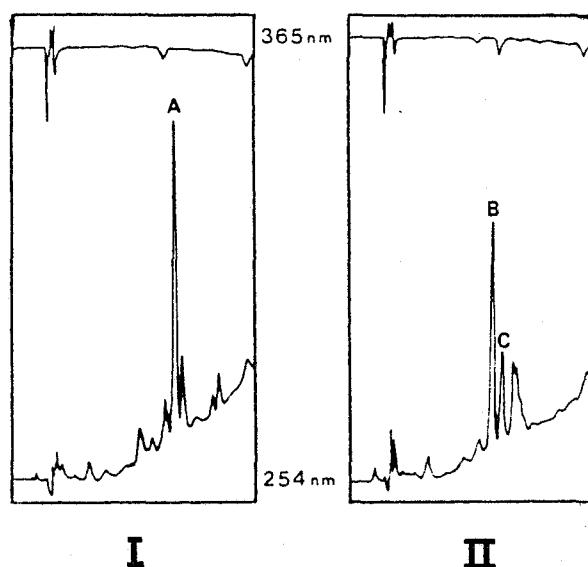


Figure 31 : Chromatogrammes (CLHP, PE 50) de solutions du composé Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d dans le mélange eau-éthanol 95 : 5 irradiées à 365 nm. I : immédiatement après 1 h d'irradiation. II : même solution chauffée 5 mn à 100°C. A : photoproduit majoritaire, B et C produits de décomposition thermique du photoproduit.

Nous avons irradié dans les mêmes conditions les modèles Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10e (n = 5) et 10f (n = 6). Là aussi, un photoproduit majoritaire instable se forme (Tableau 18).

Composés	Photo- produits		Produits de décomposition	
	t _R	t ¹ _R	t ² _R	t ³ _R
Thy-C ₄ -4',5'dh8Pso ^b	8mn00	9mn05 ^a	7mn50	8mn10
Thy-C ₅ -4',5'dh8Pso ^b	8mn40	9mn40 ^a	8mn05	9mn00
Thy-C ₆ -4',5'dh8Pso ^b	9mn40	10mn00 ^a	9mn10	
4',5'dh8Pso-C ₃ ^c	7mn50	8mn55 10mn50 ^a 11mn50 ^a	9mn25	9mn55

Tableau 18 : Caractéristiques CLHP des principaux photoproduits formés lors de l'irradiation à 365 nm des composés Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10 et 4',5'dh 8Pso-C₃ 14 dans le mélange eau-éthanol 95 : 5. Certains de ces photoproduits se décomposent dans la solution à 100°C (a) pour former principalement deux produits. Temps de rétention t_R : composés 10 et 14 ; t¹_R : Photoproduit ; t²_R et t³_R : Produits de décomposition . b : PE 50, c : PE 60.

Pour les différents modèles, les temps de rétention des photoproduits évoluent de façon similaire à ceux des composés de départ 10. Il en est de même pour leurs produits de décomposition.

La nature du photoproduit majoritaire ne dépend donc probablement pas de la longueur de la chaîne.

Nous avons également irradié le composé 4',5'dh 8Pso-C₃ 14 dans les mêmes conditions. Trois principaux photoproduits n'absorbant pas à 365 nm sont formés et au moins deux d'entre eux sont instables (Tableau 18).

A partir de ces résultats, il est difficile de tirer des conclusions quant à la nature des photoproduits formés, dimères, adduits thymine-psoralène ou produits venant de la photolyse du noyau dihydro-4',5'psoralène.

b) Etude dans des mélanges eau-solvant organique (50 : 50) :

Nous avons étudié la photoréactivité du composé Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e dans différents mélanges eau-solvant organique dans le but d'examiner l'influence de l'augmentation de la proportion de solvant organique sur la photoréactivité. Les solvants organiques utilisés ont été choisis afin d'augmenter les concentrations en produit de départ et tenter ainsi d'isoler les photoproduits (dans le cas de photoréactions suffisamment sélectives).

Le composé Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e en solution à $5 \cdot 10^{-5}$ moles/l dans le mélange eau-DMF 50 : 50 a été irradié à 365 nm. Dans ce cas, il se forme deux photoproduits principaux qui n'absorbent pas à 365 nm. L'un d'entre eux est instable lorsqu'il est chauffé à 100°C quelques minutes dans la solution. Il se décompose en deux produits principaux (Figure 32, Tableau 19).

La solution des photoproduits réirradiée à 254 nm conduit uniquement au composé de départ 10e.

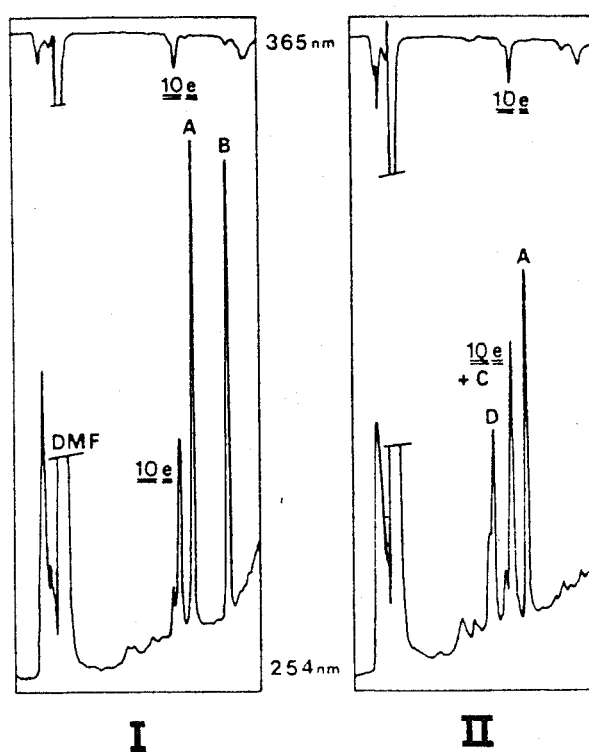


Figure 32 : Chromatogrammes (CLHP, PE 50) de solutions du composé Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e dans le mélange eau-DMF 50 : 50 irradiées à 365 nm. I : immédiatement après 3 h d'irradiation. II : même solution chauffée 15 mn à 100°C. A, B : Photoproduits ; C, D : Produits de décomposition thermique du photoproduit B.

Nous avons également irradié le composé 10e dans des mélanges eau-acétonitrile et eau-acétone (50 : 50). Il se forme également deux photoproduits principaux qui ont les mêmes caractéristiques que ceux formés dans le mélange eau-DMF (50 : 50): temps de rétention CLHP, instabilité thermique pour l'un d'eux conduisant aux mêmes produits de décomposition (CLHP, Tableau 19).

Solvant	t° _R	Photoproduits		Produits de décomposition	
		t ¹ _R	t ² _R	t ³ _R	t ⁴ _R
Eau-DMF	8mn40	9mn25	11mn20 ^a	7mn35	8mn35
Eau-acétonitrile	8mn35	9mn25	11mn10 ^a	7mn35	8mn35
Eau-acétone	8mn40	9mn30	11mn20 ^a	7mn35	8mn35

Tableau 19 : Caractéristiques CLHP des photoproduits majoritaires formés lors de l'irradiation à 365 nm du composé Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e dans différents mélanges eau-solvant organique 50 : 50. Certains de ces photoproduits (a) se décomposent à température ambiante et à chaud dans la solution pour former principalement deux produits. Temps de rétention, t°_R : 10e ; t¹_R , t²_R : photoproduits ; t³_R , t⁴_R : produits de décomposition. (PE 50, 2.10⁻⁵M).

Le solvant organique utilisé n'a pas d'influence sur la nature des photoréactions. L'augmentation de la proportion de solvant organique dans l'eau amène une plus grande complexité de la photoréactivité. Cependant les produits formés sont probablement de type adduit [2+2], dimères ou adduit thymine-dihydro-4',5' psoralène.

3/ Conclusion :

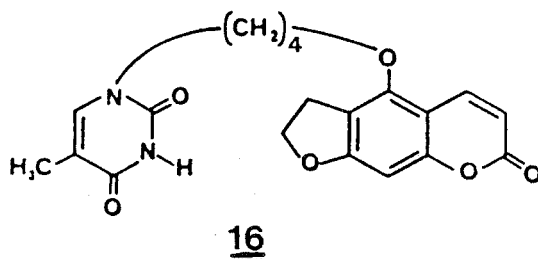
Nous n'avons pas tenté d'isoler les photoproduits formés en raison de leur instabilité et des concentrations limites utilisées (2.10⁻⁵M, solubilité maximale dans le mélange eau-éthanol 5%). Nous avons préféré attendre des résultats complémentaires dans la série du méthoxy-5 dihydro-4',5' psoralène.

Le résultat essentiel de cette étude réside dans la présence indispensable de l'eau pour induire une photoréactivité des composés Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10.

B. PHOTOREACTIVITE D'UN MODELE DE LA SERIE DU 5MOP :

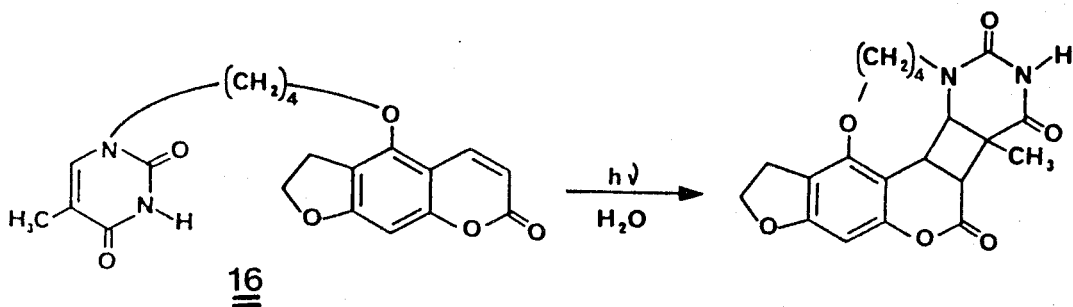
Thy-C₄-4',5'dh 5Pso 16 :

En collaboration avec Georges HUART, nous avons étudié le comportement photochimique du composé Thy-C₄-4',5'dh 5Pso 16.



Dans ce cas également, une étude préliminaire a mis en évidence l'importance de l'eau dans la photoréactivité de ce composé : celle-ci diminue nettement en solvant organique.

En solution diluée (eau-éthanol 95 : 5, $2 \cdot 10^{-5}$ moles/l), un adduit intramoléculaire thymine-dihydro-4',5' psoralène a été isolé :



La stéréochimie de cet adduit est actuellement en cours de détermination (RX). Les caractéristiques CLHP sont en faveur d'une configuration cis. La photoréaction observée est remarquablement sélective (> 95%). Elle se fait avec un rendement quantique élevé (> 0,1). Son inhibition par l'oxygène indique une réaction de l'état triplet du noyau dihydro-4',5' psoralène.

En solution plus concentrée (> $5 \cdot 10^{-5}$ moles/l) dans le mélange eau-DMF (50 : 50), il se forme sélectivement un autre photoproduit. Ce photoproduit a été isolé et sa structure est en cours de détermination.

C. CONCLUSION :

Dans les deux séries de composés Thy-C_n-4',5'dh 8Pso 10 et Thy-C₄-4',5'dh 5Pso 16, la présence d'eau s'est avérée indispensable pour observer une photoréactivité notable. En l'état actuel des choses, nous n'avons pas d'interprétation de ce phénomène.

Comme lors de l'étude des composés Thy-C_n-8Pso 6 et Thy-C_n-5Pso 15, seul le composé de la série du 5MOP conduit à la formation d'un adduit thymine 5,6 \diamond 3,4 dihydro-4',5' psoralène. Dans la série du 8MOP, la plupart des photoproduits rencontrés sont instables.

Ceci conforte l'hypothèse de l'instabilité des adduits thymine 5,6 \diamond 3,4-8MOP syn comme nous l'avions vu précédemment.

La photoaddition intramoléculaire très sélective mise en évidence pour le composé Thy-C₄-4',5'dh 5Pso 16 nous paraît d'un grand intérêt. En effet, les dihydro-4',5' psoralènes sont généralement considérés comme de bons modèles des adduits thymine 5,6 \diamond 4',5' psoralène pour l'étude de leurs propriétés photochimiques (52). Cette réaction montre tout d'abord clairement que les monoadduits 4',5' peuvent photoréagir une seconde fois. Ils peuvent donc être à l'origine de la formation des bisadduits et de la réticulation de l'ADN.

Ceci est en accord avec les résultats récents de H. RAPOPORT et Coll. qui ont montré pour la première fois que seuls les monoadduits en 4',5' conduisaient à la formation de bis adduits (40).

La photoréaction intramoléculaire observée permettra sans doute une étude du mécanisme de la photoaddition thymine-dihydro-psoralène. Il est important d'établir le rôle de l'eau dans cette réaction et également dans la photoréactivité des dihydro-4',5' psoralènes en général.

Si la solubilité du composé Thy-C₄-4',5'dh 5Pso 16 le permet, son étude en photolyse éclair sera fort intéressante. Dans ce cas, il est possible que le repliement du modèle ait une grande importance sur sa photoréactivité.

IV. PHOTOREACTIONS DANS LE CRISTAL :

L'étude radiocristallographique des modèles préparés a été réalisée dans le laboratoire de cristallographie de l'Université de Bordeaux. Elle a permis de mettre en évidence des réactions photochimiques dans le cristal.

A. PHOTOREACTION DANS LE CRISTAL DU COMPOSE Thy-C₅-8Pso 6e :

L'étude radiocristallographique d'un cristal du composé Thy-C₅-8Pso 6e préparé à la lumière du jour a été réalisée. Elle a révélé la formation d'un dimère trans (Figure 33).

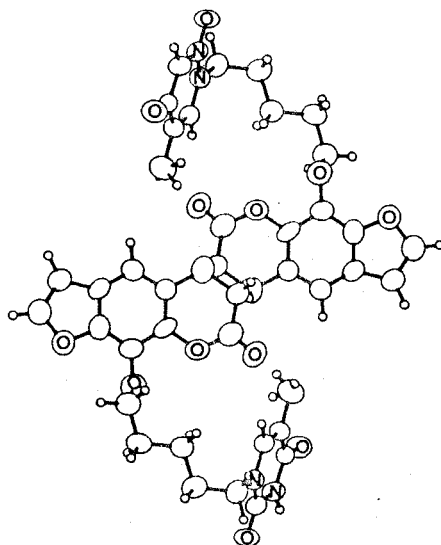
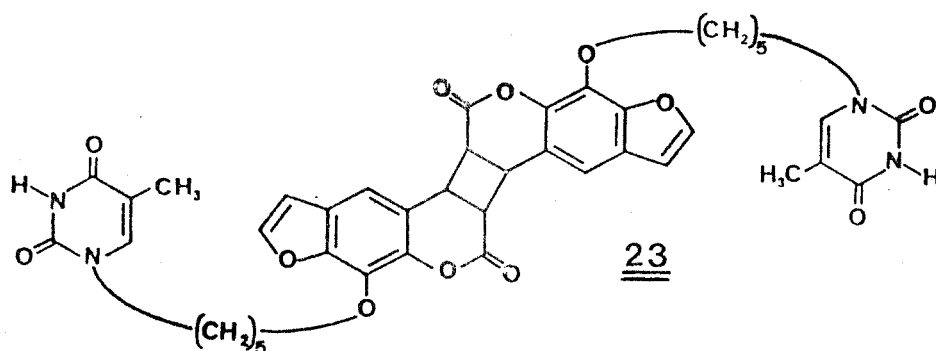


Figure 33 : Vue en perspective de la molécule de photodimère 23 .

Dans le but d'étudier les conditions de cette réaction, des cristaux du composé Thy-C₅-8Pso 6e ont été préparés dans l'obscurité et analysés par CLHP. Ces cristaux ont été exposés à la lumière du jour pendant plusieurs semaines. Après cette exposition, la formation sélective (à plus de 90 %) d'un photoproduit a été mise en évidence par CLHP.



Le composé 23 a ainsi été préparé à l'état pur, la purification se faisant par simple lavage des cristaux avec un bon solvant du composé de départ Thy-C₅-8Pso 6e. L'irradiation à 254 nm des solutions de ce composé dans le DMSO conduit au modèle de départ (CLHP ; RMN : Figure 33).

Il est à noter la grande différence de solubilité entre le produit de départ et le dimère, en particulier dans le chloroforme.

La structure cristalline du composé de départ Thy-C₅-8Pso 6e est probablement favorable à la photoréaction. Cette structure est actuellement en cours de détermination.

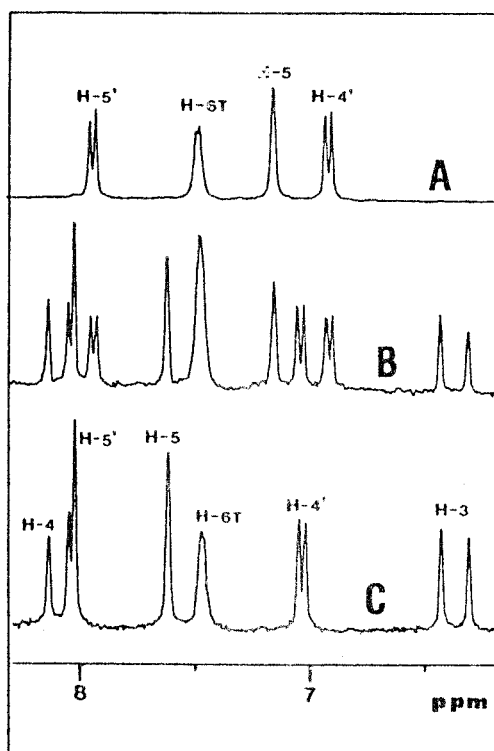


Figure 34 : Spectres de RMN ¹H 80 MHz dans le DMSO d₆ : A : Dimère 23; B: même solution irradiée à 254 nm ; C : Thy-C₅-8Pso 6e.

B. PHOTOREACTION DANS LE CRISTAL DU COMPOSE Thy-C₅-4',5'dh 8Pso

10e:

La structure d'un cristal du composé Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e préparé dans l'obscurité a été déterminée (voir p 65 Figures 21-22).

Elle révèle un recouvrement des doubles liaisons 3,4 de deux noyaux psoralènes à une distance d'environ 3,5 Å. Ce recouvrement est favorable à une photodimérisation en trans anti analogue à celle rencontrée dans le cristal du composé Thy-C₅-8Pso 6e.

Des cristaux du composé Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e ont été exposés à la lumière du jour pendant plusieurs semaines. Le lavage des cristaux avec un bon solvant du produit de départ conduit à l'obtention d'un produit pur (CLHP). Les spectres de RMN et de masse de ce composé montrent la formation d'un dimère 24 du composé 10e. L'irradiation à 254nm de ce photodimère 24 en solution dans le DMSO d₆ conduit au produit de départ Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e (CLHP, RMN : Figure 35).

La structure RX de ce composé est actuellement en cours de détermination.

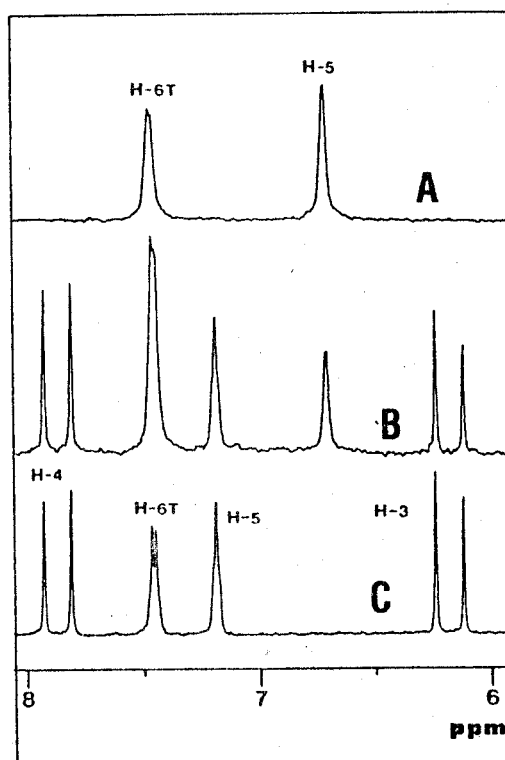


Figure 35 : Spectres de RMN ¹H 80 MHz dans le DMSO d₆. A : Dimère ; B : même solution irradiée à 254nm ; C : Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e.

C. REMARQUE :

Les deux photodimères 23 et 24 préparés sont stables dans le DMSO et dans le mélange DMSO-eau à 100°C. Les caractéristiques chromatographiques (CLHP) du dimère 23 du composé Thy-C₅-4',5'dh 8Pso ($t_R = 11\text{min}30$, PE 50) sont voisines de celles d'un photoproduit formé par irradiation du composé Thy-C₅-4',5'dh 8Pso 10e dans un mélange eau-DMF 50 : 50 ($t_R = 11\text{mn}20$, PE 50, voir tableau 19 p 116). Cependant, ce dernier photoproduit se décompose rapidement dans la solution à 100°C. Il ne s'agit probablement pas du même composé.

D. CONCLUSION :

L'étude radiocristallographique des modèles a permis de mettre en évidence des réactions photochimiques stéréosélectives dans le cristal.

Ces réactions conduisent facilement à l'obtention de dimères psoralène-psoralène trans anti qui seraient probablement plus difficiles à obtenir aussi sélectivement en solution.

Ils peuvent donner accès, après modifications chimiques, à des dimères trans anti du méthoxy-8 psoralène et du méthoxy-8 dihydro-4',5' psoralène qui ne sont pas connus.

En effet, de nombreuses études ont montré que les psoralènes photodimérisent à l'état solide (34, 35, 117, 119) en solution aqueuse gelée (118, 119) ou en solution organique (36, 37, 119, 120). Mais peu d'auteurs ont déterminé la stéréochimie des dimères obtenus. La configuration d'un seul type de dimère, principalement du 8MOP 1 a été établie par RMN. Celui-ci se forme sélectivement en solution (dioxanne, benzène, dichlorométhane) entre deux doubles liaisons 3,4 ; il présente une configuration trans syn (37, 120).

Dans le cas du méthoxy-8 dihydro-4',5' psoralène deux dimères trans syn et cis anti sont obtenus en solution dans le dichlorométhane (37).

A notre connaissance, il n'existe actuellement pas de données cristallographiques sur les différents dimères des psoralènes.

Dans le cas du composé Thy-C₅-8Pso 6e, la photodimérisation ne provoque pas la dislocation du cristal, ceci pourrait permettre de suivre l'évolution de cette photoréaction par radiocristallographie.

V . PHOTOREACTIVITE DES MODELES ADENINE-METHOXY-8 PSORALENE :

Ade-C_n-8Pso 8 :

Nous avons préparé les modèles Ade-C_n-8Pso 8 dans le but d'obtenir des informations sur les interactions d'empilement adénine-psoralène pour les comparer aux interactions thymine-psoralène.

Quelques résultats fragmentaires relevés dans la littérature semblent indiquer une photoréaction adénine-psoralène. En 1967, C.H. KRAUCH et Coll. ont remarqué une photoréaction du psoralène (¹⁴C-4) avec l'acide polyadénylique (59) et plus récemment en 1978, C.N. OU et P.S. SONG ont montré que le 8MOP 1 se fixait photochimiquement sur l'adénine du t-RNA (51). Mais l'isolement et la caractérisation des photoproduits formés n'ont pas été réalisés.

Nous décrivons ici quelques résultats préliminaires de photoreactivité des modèles Ade-C_n-8Pso 8.

Nous avons tout d'abord irradié à 365nm les composés Ade-C_n-8Pso 8 c, d, f en solution désoxygénée dans le mélange eau-éthanol 95 : 5 à une concentration de 2.10⁻⁵ moles/l. Dans ces conditions, ces composés sont sous une forme repliée pour plus de 80 % des molécules.

La photoreactivité s'est avérée très faible quel que soit le temps d'irradiation. Un produit très minoritaire, par rapport au composé de départ n'ayant pas réagi, est visible sur les chromatogrammes. Il absorbe la lumière à 365 nm. Il s'agit probablement d'un photoproduit d'ouverture du cycle psoralène comme dans le cas des composés Thy-C_n-8Pso 6.

Dans l'éthanol, un comportement voisin est mis en évidence.

Nous n'avons donc pas tenté d'isoler et de caractériser ces photoproduits très minoritaires, une photolyse du noyau psoralène étant probable.

Un résultat plus intéressant a été obtenu lors de l'irradiation du composé Ade-C₄-8Pso 8d dans l'acétonitrile à 2.10⁻⁵M. Dans ce cas, le composé

de départ photoréagit complètement et il se forme un photoproduit très majoritaire (Tableau 20). Ce produit n'absorbe pas la lumière à 365 nm. Il est stable à ébullition de la solution irradiée. L'irradiation à 254 nm de ce photoproduit ne conduit pas au composé de départ, ce qui montre qu'il ne s'agit pas d'un photodimère.

Le composé Ade-C₆-8Pso 8f irradié dans les mêmes conditions présente un comportement voisin (Tableau 20). Le photoproduit majoritaire formé est également stable à chaud et il ne conduit pas au produit de départ lorsqu'il est réirradié à 254 nm.

Cependant, nous ne pouvons pas dire si ces deux photoproduits issus des composés Ade-C₄-8Pso 8d et Ade-C₆-8Pso 8f sont de même nature (Tableau 20).

Il sera intéressant d'isoler et de caractériser ces deux photoproduits qui semblent être stables lors de l'évaporation du solvant.

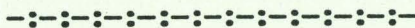
Composés	t ^o _R	t _R
Ade-C ₄ -8Pso <u>8d</u>	9mn00	9mn10
Ade-C ₆ -8Pso <u>8f</u>	11mn10	9mn10

Tableau 20 : Caractéristiques CLHP (PE 50) des photoproduits formés lors de l'irradiation à 365nm des composés Ade-C₄-8Pso 8d et Ade-C₆-8Pso 8f dans l'acétonitrile. (2.10⁻⁵ moles/l) Temps de rétention, t^o_R: 8d et 8f, t_R: Photoproduits.

INTERCALATION

DES MODELES

DANS L'ADN



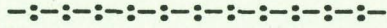
L'intercalation de deux des modèles préparés a été étudiée dans le laboratoire de Biophysique du Muséum National d'Histoire Naturelle par la technique dite d' "équilibre de dialyse" *. Les composés Thy-C₄-8Pso 6d et Ade-C₄-8Pso 8d ont été choisis pour leur meilleure solubilité dans l'eau.

Le résultat essentiel de cette étude réside dans une intercalation nettement plus faible de ces deux modèles comparée à celle du composé parent : le méthoxy-8 psoralène SMOP 1.

Le repliement intramoléculaire de ces modèles pourrait expliquer ce pouvoir intercalant plus faible.

* Le travail a été réalisé par J. R. RONFARD-HARET dans le laboratoire de R. BENSASSON.

CONCLUSION



Dans le but de préciser le mécanisme d'action des psoralènes dans l'ADN, nous avons préparé différents modèles qui associent une base nucléique à un psoralène.

Notre premier objectif était d'apporter une contribution à la connaissance des interactions mises en jeu lors de l'intercalation des psoralènes dans l'ADN, processus dont dépend toute l'action photochimique.

L'étude directe de ce phénomène dans l'ADN conduit à une vue macroscopique d'interactions très diverses : interactions noyau-noyau, liaisons hydrogène, complexation à l'extérieur de la double hélice....

Par contre l'étude de la complexation intramoléculaire des modèles donne de nombreuses informations spécifiques sur les interactions d'empilement base-psoralène : interactions avec l'adénine, la thymine, valeurs des énergies mises en jeu, influence prépondérante de l'eau, comparaison avec d'autres intercalants.

L'étude des photoréactions base-psoralène était notre deuxième objectif, en particulier l'isolement et la caractérisation des photoproduits.

L'approche intramoléculaire suivie a effectivement permis d'isoler et de caractériser des produits de photoréaction base-psoralène, en particulier un adduit thymine 5,6 \diamond 3,4 psoralène a été obtenu sélectivement.

L'étude intermoléculaire des photoadditions thymine-psoralène en solution n'est pas possible en raison des réactions très rapides de photodimérisation des psoralènes. Il en résulte que l'on est obligé de travailler avec des systèmes préalablement "bloqués" (solution gelée, poudre, ADN) qui ne présentent plus de sélectivité (28 à 33, 38 à 40).

L'étude photochimique de modèles reproduit les conditions de la photoréaction intermoléculaire thymine-psoralène en solution en évitant tous les problèmes liés à la photodimérisation :

- * Dans les deux séries de modèles préparés (celle du 8MOP 1 et celle du 5MOP 2), la thymine et le psoralène peuvent se recouvrir pour former tous les photoadduits envisageables de façon intermoléculaire (3,4 ou 4',5' ; cis ou trans ; syn ou anti).
- * La variation de la longueur de la chaîne carbonée reliant la thymine au psoralène permet de s'affranchir des contraintes stériques apportées par cette chaîne.
- * Les photoréactions intramoléculaires observées peuvent être étudiées sous des aspects quantitatifs et mécanistiques.

Rappelons l'essentiel des résultats que nous avons obtenus.

- * L'étude réalisée démontre qu'il n'existe pas de relation entre la complexation et la photoréactivité thymine-psoralène : dans l'eau, les modèles ne présentent pas un comportement photochimique particulier.
Ceci est confirmé par l'étude en photolyse éclair qui montre que les interactions thymine-psoralène ne modifient pas les caractéristiques de l'état excité triplet du noyau psoralène (de type 8MOP 1).
- * Dans la série du 5MOP 2, une photoaddition intramoléculaire de la thymine sur la double liaison 3,4 du psoralène a été mise en évidence :

Cette réaction présente une sélectivité remarquable : quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée reliant la thymine au psoralène, il ne se forme pas d'adduit en 4',5'. Dans l'ADN, on n'observe pas cette sélectivité (38-39).

L'adduit obtenu est cis bien que la formation de l'adduit trans soit possible.

L'isolement de ce photoproduit (à partir du composé Thy-C₄-5Pso 15d) a permis de déterminer pour la première fois la structure RX d'un monoadduit de type thymine 5,6 \diamond 3,4 psoralène.

L'état excité triplet du noyau psoralène est responsable de cette photoaddition sur la double liaison 3,4.

* Dans la série du 8MOP 1, on n'observe pas cette photoaddition : le noyau psoralène se photolyse pour conduire à l'ouverture du cycle pyrone.

Nous n'avons pas d'explication pour ce comportement qui peut être lié soit à la nature syn de l'adduit qui pourrait se former (stabilité, mécanisme de formation...) soit à la nature du noyau psoralène (de type 8MOP 1). Cette dernière hypothèse semble peu probable car des adduits syn du 8MOP 1 ont été mis en évidence dans l'ADN (39).

En outre, cette même photoréaction a été observée pour le 8MOP 1.

A notre connaissance, l'acide formé lors de cette réaction n'a pas été décrit comme composé de photolyse du 8MOP 1. Il pourrait être un intermédiaire dans la photoaddition thymine-psoralène.

* En ce qui concerne, les modèles de type dihydro-4',5' psoralène, des résultats assez comparables ont été obtenus. Dans la série du 5MOP 2, un photoadduit thymine 5,6 \diamond 3,4 dihydro-4',5' psoralène a été isolé. Par contre, dans la série du 8MOP 1, la plupart des photoproduits rencontrés sont instables.

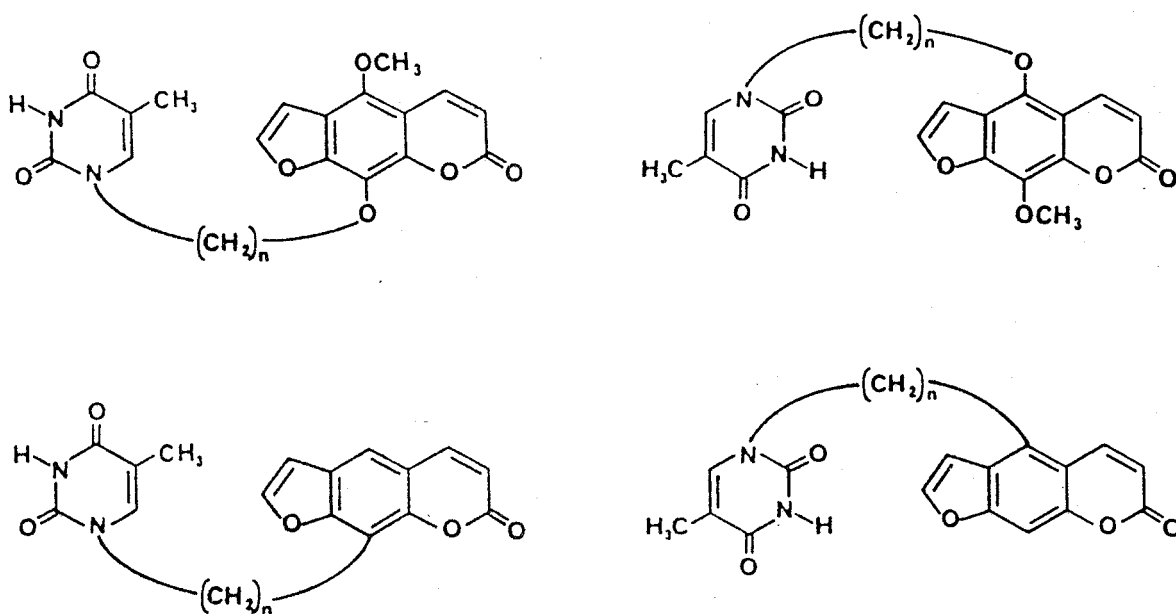
Il sera intéressant d'étudier le mécanisme de la photoaddition sélective mise en évidence, cette réaction pouvant constituer un bon modèle pour la formation des bisadduits à partir des monoadduits thymine 5,6 \diamond 4',5' psoralène (40).

* Dans certaines conditions, les modèles adénine-méthoxy-8 psoralène 8 photoréagissent de façon sélective. Les photoproduits ne sont pas des dimères et sont stables. Leur isolement et leur caractérisation révélera peut-être une réaction adénine-psoralène. Une telle réaction a déjà été mise en évidence mais la structure du (ou des) photoproduit (s) formé (s) n'a pas été déterminée (50, 51).

* Dans le cristal, des réactions de photodimérisation des modèles ont été étudiées. Elles se produisent entre les doubles liaisons 3,4 de deux noyaux psoralènes et conduisent sélectivement à des dimères trans anti.

Ces réactions ouvrent l'accès à des dimères trans anti de la série du méthoxy-8 psoralène qui ne sont pas décrits (37).

Ces résultats posent encore de nombreuses questions. Parmi celles-ci, la question qui a trait à la différence de réactivité des modèles thymine-méthoxy-5 et 8 psoralènes est importante. Pour tenter d'y apporter une réponse, il est possible d'envisager l'étude de modèles complémentaires :



Ces modèles permettront sans doute d'établir l'influence des groupements méthoxy-5 et 8 sur la photoréactivité thymine-psoralène.

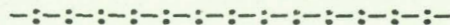
A partir des résultats obtenus, il est possible d'envisager la préparation de produits de photoréaction entre un psoralène et non plus la thymine mais le nucléoside correspondant, la thymidine. De tels adduits n'ont jamais pu être obtenus de manière préparative.

L'intérêt majeur de tels nucléosides modifiés résiderait dans la possibilité de les insérer dans une séquence d'oligonucléotides.

Il serait très intéressant d'obtenir de tels fragments d'acide nucléique dans lesquels une base est sélectivement modifiée par un agent chimique ayant une activité thérapeutique, mutagène et cancérigène comme le psoralène.

De nombreuses études seraient alors possibles, permettant peut-être d'établir un lien entre modifications structurales et conséquences biologiques.

PARTIE EXPERIMENTALE



On laisse la suspension reposer quelques heures au froid puis le précipité jaune formé est filtré. Il est lavé abondamment avec de l'eau jusqu'à pH neutre et séché. Le dérivé 3 est obtenu sous la forme de cristaux jaunes après cristallisation dans un mélange méthanol-eau ou dioxane-eau (80 : 20) (2,1 g ; 10 mmol ; 75 %).

F = 240-241 °C (sous vide, avec décomposition) ;

Litt. (61) F = 239-240 °C

RMN (acétone d_6) : δ ppm = 7,90 (d, 1H, J=10 Hz, C4H) ; 7,80 (d, 1H, J=2 Hz C5'H) ; 7,30 (s, 1H, C5H) ; 6,85 (d, 1H, J=2 Hz, C4'H) ; 6,20 (d, 1H, J=10 Hz, C3H) ; 2,3 à 3,4 (s très large, C8-OH).

Masse (impact électronique) ; m/e ; M = 202,17 : 202 (100 ; M⁺),

174 (45, M⁺-CO), 89 (33), 62 (12).

0,0'bis (trimethylsilyl) thymine : 4

A un mélange de thymine (5g ; 40 mmol) et de sulfate d'ammonium (catalyseur ; 0,1g), on ajoute de l'hexaméthyl-1,1,1,3,3,3 disilazane (HMDS ; 50 cm³). La suspension, placée à l'abri de l'humidité, est chauffée sous agitation à reflux de l'HMDS (\approx 140 °C). Après dissolution de la thymine, on maintient la solution à reflux 5 à 6 h. L'HMDS en excès est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu blanc, huileux, obtenu est utilisé sans autre purification.

(ω -bromoalkyl)-1 thymines : Thy-C_n-Br ; n=3 : 5c ; n=4 : 5d ; n=5 : 5e ; n=6 : 5f ; n=12 : 5l.

* Composés 5c, d, e, f :

Conditions de réaction :

Une solution de thymine silylée 4 (obtenue à partir de 5g de thymine soit 40 mmol) dans l' α,ω -dibromoalcane (400 mmol) est agitée à une

A. INDICATIONS GENERALES

La purification des produits a été effectuée par chromatographie sur gel de silice KIESELGEL 60 0,063-0,200 mm MERCK.

Leur pureté a été vérifiée par chromatographie sur couche mince (CCM ; gel de silice F₂₅₄ MERCK) et par chromatographie liquide à hautes performances (CLHP ; colonne de phase inverse RP 18 μ m MERCK ; appareil WATERS).

Les points de fusion (F) ont été pris à l'aide d'un appareil TOTOLI et sont donnés sans correction de colonne émergente.

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur les spectromètres BRUKER WP 60 et WP 80 à transformée de FOURIER. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport à l'hexaméthylidisiloxane pris comme référence interne. Les spectres sont décrits avec les abréviations : s : singulet, d : doublet, t : triplet, q : quadruplet, m : multiplet.

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

Les spectres d'absorption infra-rouge (IR) ont été enregistrés sur des spectromètres BECKMAN IR 18 et PERKIN-ELMER 237.

Les spectres d'absorption électronique (UV) ont été relevés sur un spectrophotomètre BECKMAN ACTA M 5270.

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

B) SYNTHESE DES MODELES ET DES COMPOSES DE REFERENCE :

Hydroxy-8 psoralène : 8HP ; 3

Un mélange de méthoxy-8 psoralène 1 (5g ; 14 mmol) et de chlorhydrate de pyridine (22,5 g ; 200 mmol) est porté à reflux (220-240°C) sous atmosphère d'azote sec pendant 15 à 30 mn. La solution chaude obtenue est versée dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N (100 cm³).

température de 50°C, sous atmosphère d'azote sec, pendant plusieurs jours. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Dans le cas du dérivé 5c, la réaction se fait à température ambiante pendant 10 jours.

Isolement et purification des produits :

Le mélange réactionnel est versé dans l'eau (100 cm³). La solution est portée à 90°C et agitée pendant quelques minutes. Un solide blanc, insoluble apparaît (résidu d'hydrolyse). Il est éliminé par filtration, séché et lavé au chloroforme. Le filtrat est décanté. La phase aqueuse est extraite au chloroforme (4 x 50 cm³). L'ensemble des phases organiques est séché sur MgSO₄. Le chloroforme est ensuite évaporé sous pression réduite.

Dans le cas du dérivé 5c, l'excès de dibromo-1,3 propane est également évaporé sous pression réduite. Le résidu jaune-orangé obtenu est lavé avec de l'hexane. Il est ensuite cristallisé dans le mélange acétate d'éthyle-hexane 1/1.

Dans le cas des dérivés 5d, e, f, l, l' α, ω -dibromoalcane est éliminé par chromatographie sur colonne de silice en éluant avec du chloroforme puis de l'acétate d'éthyle. Le résidu obtenu après évaporation des fractions d'acétate d'éthyle est cristallisé dans le mélange acétate d'éthyle-hexane 1/1.

* Composé Thy-C₁₂-Br, 5l :

Une solution de thymine silylée 4 (obtenue à partir de 5g de thymine soit 40 mmol) et de dibromo-1,12 dodécane (26g ; 80 mmol) dans la DMF (75 cm³) est chauffée à 100°C, sous atmosphère d'azote sec et sous agitation, pendant 5h. La DMF est ensuite évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est hydrolysé et traité suivant le mode opératoire utilisé lors de l'isolement et de la purification des composé 5d, e, f.

Thy-C _n -Br	n=3 ; <u>5c</u>	n=4 ; <u>5d</u>	n=5 ; <u>5e</u>	n=6 ; <u>5f</u>	n=12 ; <u>5l</u>
Masse obtenue	5,4g	8,8g	8,7g	9,2g	10,5g
mmol	22	34	32	32	28
Rendement	55%	85%	80%	80%	70%
F°C	137-138	140-141	119-120	123-124	104-106
F Litt. °C (référence)	136-138 (54)	134-135 (58)		111-113 (54)	

RMN (CDCl₃) : Thy-C_n-Br ; n=3 : 5c ; n=4 : 5d ; n=5 : 5e ; n=6 : 5f ;
n=12 : 5l.

Cycle Thymine ; 5c, d, e, f, l : δ ppm entre 8,8 et 9,8 (s large, 1H, NH) ; 7,00 (d, 1H, J < 1 Hz, C6H) ; 1,90 (d, 3H, J < 1 Hz, C5-CH₃).

Chaîne polyméthylénique :

N1-CH₂ : 5c : δ = 3,85 (t, 2H, J=6 Hz) ; 5d : 3,70 (m, 2H) ; 5e, f, l :
3,65 (t large, 2H, J=7 Hz)

CH₂-Br : 5c : δ = 3,40 (t, 2H, J=6 Hz) ; 5d : 3,40 (m, 2H) ; 5e, f, l :
3,35 (t, large, 2H, J=7 Hz)

Reste de la chaîne : 5c : δ = 2,0 à 2,5 (m, 2H, J=6 Hz) ; 5d : 1,6 à 2,1
(m, 4H) ; 5e : 1,0 à 2,0 (m, 6H) ; 5f : 1,0 à 2,0 (m, 8H) ; 5l : 1,25 (s
très large, 20H).

Masse (impact électronique) ; m/e :

Thy-C₃-Br ; 5c ; M=247,12 : 248 (14,7 ; (M+1)⁺, Br⁸¹), 246 (16,7 ; (M-1)⁺,
Br⁷⁹), 167 (35, Thy-(CH₂)₃⁺)

Thy-C₄-Br ; 5d ; M=261,15 : 262 (4,8 ; (M+1)⁺), 260 (5,3 ; (M-1)⁺), 181 (70, Thy-(CH₂)₄⁺).

Thy-C₅-Br ; 5e ; M=275,18 : 276 (3,1 ; (M+1)⁺), 274 (3,2 ; (M-1)⁺, 195 (55, Thy-(CH₂)₅⁺).

Thy-C₆-Br ; 5f ; M=289,20 ; 290 (3,5 ; (M+1)⁺), 288 (3,8 ; (M-1)⁺, 209 (100, Thy-(CH₂)₆⁺).

Thy-C₁₂-Br ; 5l ; M=373,34 : 374 (1,7 ; (M+1)⁺), 372 (1,7 ; (M-1)⁺), 293 (38,5 ; Thy-(CH₂)₁₂⁺), 126 (100 ; Thy-H⁺).

IR (KBr) :

Thy-C₃-Br ; 5c : 1705, 1660, 1360, 1270, 1225, 930, 780, 700 cm⁻¹.

Thy-C₄-Br ; 5d : 1690, 1650, 1360, 1250, 900, 770, 690 cm⁻¹.

Thy-C₅-Br ; 5e : 1670, 1650, 1350, 1280, 1240, 895, 770, 645 cm⁻¹.

Thy-C₆-Br : 5f : 1700, 1670, 1365, 1270, 1235, 910, 770, 720 cm⁻¹.

Analyse :

Thy-C _n -Br	n=3 ; <u>5c</u>		n=4 ; <u>5d</u>		n=5 ; <u>5e</u>		n=6 ; <u>5f</u>		n=12 ; <u>5l</u>	
	C ₈ H ₁₁ N ₂ O ₂ Br		C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₂ Br		C ₁₀ H ₁₅ N ₂ O ₂ Br		C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₂ Br		C ₁₇ H ₂₉ N ₂ O ₂ Br	
	247,12		261,15		275,18		289,20		373,34	
Analyse	calc.	tr.	calc.	tr.	calc.	tr.	calc.	tr.	calc.	tr.
C%	38,88	39,31	41,39	41,13	43,65	43,81	45,68	46,15	54,69	54,38
H%	4,49	4,52	5,02	4,96	5,49	5,66	5,93	5,91	7,83	7,96
N%	11,34	11,20	10,73	10,79	10,18	9,98	9,69	9,70	7,50	7,42
Br%	32,34	31,80	30,60	30,40	29,04	28,94	27,63	27,24	21,40	20,02

ω-(Thyminyl-1)alcoxy -8 psoralènes : Thy-C_n-8Pso ; n=3 : 6c ; n=4 : 6d ; n=5 : 6e ; n=6 : 6f ; n=12 : 6l.

A une solution de 8HP 3 (1g ; 5 mmol) et de (ω-bromoalkyl)-1-thymine 5 (5 mmol) dans le DMF anhydre (30 cm³) on ajoute du carbonate de

potassium sec (1,5g). Le mélange est agité, à l'abri de la lumière et sous atmosphère d'azote sec, à 70°C pendant 8 à 12 h. La réaction terminée, le carbonate de potassium est filtré et lavé avec de la DMF. La DMF est évaporée sous pression réduite et le résidu huileux obtenu est trituré avec de l'éther éthylique. Le mélange est placé au froid jusqu'à obtention d'un solide qui est filtré, lavé et séché. Le solide est à nouveau lavé avec de l'eau puis séché. Après une première cristallisation dans l'éthanol, le produit obtenu est chromatographié sur silice et élué avec de l'acétate d'éthyle chaud (en raison de la faible solubilité dans ce solvant). Une deuxième cristallisation dans l'éthanol absolu conduit aux composés attendus à l'état pur et sous la forme de solides blancs.

Thy-C _n -8Pso	n=3 ; <u>6c</u>	n=4 ; <u>6d</u>	n=5 ; <u>6e</u>	n=6 ; <u>6f</u>	n=12 ; <u>6l</u>
Masse obtenue (produit pur)	1,2g	1,4g	1,05g	1,5g	1,8g
mmol	3,3	3,7	2,7	3,7	3,7
Rdt après la 1 ^o cristallisation	70%	85%	65%	85%	80%
Rdt final	65%	75%	55%	75%	75%
F°C sous vide	220-221	202-204	182-183	167-168	109-111

RMN (CDCl₃) : Thy-C_n-8Pso ; n=3 : 6c ; n=4 : 6d ; n=5 : 6e ; n=6 : 6f ; n=12 : 6l.

Cycle furocoumarine, 6c, d, e, f, l : δ ppm = 7,75 (d, 1H, J=10 Hz, C4H) ; 7,60 (d, 1H, J=2 Hz, C5'H) ; 7,35 (s, 1H, C5H) ; 6,75 (d, 1H, J=2 Hz, C4'H) ; 6,35 (d, 1H, J=10 Hz, C3H).

Cycle thymine ; 6c, d, e, f, l : δ entre 8,1 et 8,8 (s large, 1H, N3H) ; 7,00 (d, 1H, J \leq 1 Hz, C6H) ; 1,90 (d, 3H, J \leq 1 Hz, C5-CH₃).

Chaîne polyméthylénique ; 6c, d, e, l, f : δ = 4,45 (t, 2H, J=5 à 7 Hz, O-CH₂) ; 3,70 (t, 2H, J=5 à 7 Hz, N1-CH₂). Reste de la chaîne : 6c : 1,2 à 2,1 (m, 2H) - 6d : 1,2 à 2,1 (m, 4H) - 6e : 1,3 à 2,1 (m, 6H) - 6f : 1,2 à 2,1 (m, 8H) - 6l : 1,25 (s, très large, 20H).

Masse (ionisation chimique par le méthane) ; m/e :

Thy-C₃-8Pso ; 6c ; M=368,35 : 369 (100 ; NH⁺), 202 (2 ; 8Pso OH⁺), 167 (65 ; Thy-(CH₂)₃⁺)

Thy-C₄-8Pso ; 6d ; M=382,38 : 383 (100 ; MH⁺), 202 (5 ; 8PsoOH⁺), 181 (45 ; Thy-(CH₂)₄⁺).

Thy-C₅-8Pso ; 6e ; M=396,41 : 397 (100 ; MH⁺), 202 (10 ; 8PsoOH⁺), 195 (25 ; Thy-(CH₂)₅⁺).

Thy-C₆-8Pso ; 6f ; M=410,43 : 411 (100 ; MH⁺), 209 (15 ; Thy-(CH₂)₆⁺), 202 (20 ; 8PsoOH⁺).

Thy-C₁₂-8Pso ; 6l ; M=494,59 : 495 (100 ; MH⁺), 293 (8 ; Thy-(CH₂)₁₂⁺), 202 (5 ; 8PsoOH⁺).

IR (KBr) :

Thy-C₃-8Pso ; 6c : 1700, 1670, 1650, 1590, 1340, 1160, 1095, 1030, 1005, 755 cm⁻¹

Thy-C₄-8Pso ; 6d : 1695, 1680, 1585, 1150, 1090, 1030, 1000, 875, 760 cm⁻¹.

Thy-C₅-8Pso ; 6e : 1700, 1675, 1590, 1335, 1155, 1090, 1030, 1000, 770 cm⁻¹.

Thy-C₆-8Pso ; 6l : 1700, 1645, 1585, 1330, 1150, 1090, 1030, 1000, 755 cm⁻¹.

UVmax: EtOH, Thy-C_n-8Pso, 6c, d, e, f, l : 263 (ε 21000) ; 249 nm (ε 27000). CH₂Cl₂, Thy-C₄-8Pso, 6d : 251 nm (ε 28200).

Analyse :

Thy-C _n -8Pso	n=3 ; <u>6c</u>	n=4 ; <u>6d</u>	n=5 ; <u>6e</u>	n=6 ; <u>6f</u>	n=12 ; <u>6l</u>
	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₆	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₆	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₆	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₆	C ₂₈ H ₃₄ N ₂ O ₆
M	368,35	382,38	396,41	410,43	494,59
Analyse	calc. tr.	calc. tr.	calc. tr.	calc. tr.	calc. tr.
C%	61,95 61,63	62,82 62,65	63,63 63,57	64,38 64,13	68,00 67,95
H%	4,38 4,35	4,74 4,65	5,09 5,18	5,40 5,53	6,93 7,05
N%	7,61 7,53	7,33 7,23	7,07 6,99	6,83 6,79	5,66 5,75

(ω-bromoalkyl)-8 psoralènes : 8Pso-C_n-Br ; n=3 : 7c ; n=4 : 7d ; n=6 : 7f.

A une solution de 8HP 3 (1g ; 5 mmol) et de l' α, ω-dibromoalcane (10 cm³ ; 50 à 100 mmol) dans la DMF anhydre (15 cm³), on ajoute du carbonate de potassium sec (1g). Le mélange, placé sous agitation, à l'abri de la lumière et sous atmosphère d'azote sec, est porté à 70 °C pendant 2 à 3 h. La réaction terminée le carbonate de potassium est filtré et lavé avec de la DMF. La DMF est évaporée sous pression réduite et le résidu huileux obtenu est dissous dans le chloroforme et chromatographié sur silice en éluant avec du chloroforme. Les produits attendus sont obtenus à l'état pur sous la forme de poudres blanches après cristallisation dans un mélange hexane-acétate d'éthyle (80 : 20).

8Pso-C _n -Br	n=3 ; <u>7c</u>	n=4 ; <u>7d</u>	n=6 ; <u>7f</u>
Masse obtenue avant cristallisation	1,2g	1,5g	1,35g
mmol	3,7	4,5	3,7
Rdt avant cristallisation	75%	90%	75%
F °C	105-106	70-71	41-42
F Litt. °C (référence)	102 (65)	71 (63)	

RMN (CDCl₃) : 8Pso-C_n-Br ; n=3 : 7c ; n=4 : 7d ; n=6 : 7f.

Cycle furocoumarine ; 7c, d, f : δ ppm = 7,75 (d, 1H, J=2 Hz, C5'H) ; 7,40 (s, C5'H) ; 6,80 (d, 1H, J=2 Hz, C4'H) ; 6,40 (d, 1H, J=10 Hz, C3'H).

Chaîne polyméthylénique :

O-CH₂ : 7c : δ = 4,65 ; 7d : 4,50 ; 7f : 4,45 (t, 2H, J=6 Hz).

CH₂-Br : 7c : 3,75 ; 7d : 3,55 ; 7f : 3,40 (t, 2H, J=6,5 Hz).

Reste de la chaîne : 7c : 2,4 (m, 2H, J=6,0 et 6,5 Hz) ; 7d : 1,8 à 2,5 (m, 4H) ; 7d : 1,1 à 2,2 (m, 8H).

Masse (impact électronique) ; m/e :

8Pso-C₃-Br ; 7c ; M= 323,15 : 324 (14,3 ; (M+1)⁺, Br⁸¹), 32,2 (14,9 ; (M-1)⁺, Br⁷⁹), 202 (100 ; 8Pso OH⁺).

8Pso-C₄-Br ; 7d ; M=337,18 : 338 (4,4 ; (M+1)⁺), 336 (4,7 ; (M-1)⁺), 202 (100).

8Pso-C₆-Br ; 7f ; M= 365,23 : 366 (4,4 ; (M+1)⁺), 364 (3,9 ; (M-1)⁺), 202 (100).

IR (KBr) :

8Pso-C₃-Br ; 7c : 1700, 1580, 1400, 1330, 1150, 1090, 1025, 990, 765, 645 cm⁻¹.

8Pso-C₄-Br ; 7d : 1720, 1590, 1450, 1340, 1150, 1090, 1030, 995, 770, 650 cm⁻¹.

8Pso-C₆-Br ; 7f : 1710, 1580, 1390, 1330, 1160, 1090, 1035, 1015, 750, 645 cm⁻¹.

Analyse :

8Pso-C _n -Br	n=3 ; <u>7c</u>		n=4 ; <u>7d</u>		n=6 ; <u>7f</u>	
	C ₁₄ H ₁₁ O ₄ Br		C ₁₅ H ₁₃ O ₄ Br		C ₁₇ H ₁₇ O ₄ Br	
M	323,15		337,18		365,23	
Analyse	calc.	tr.	calc.	tr.	calc.	tr.
C%	52,04	52,20	53,43	53,17	55,91	55,90
H%	3,43	3,40	3,89	3,72	4,69	4,72
Br%	24,73	24,27	23,70	23,17	21,88	22,06

ω-(adényl-9)alcoxy -8 psoralènes : Ade-C_n-8Pso ; n=3 : 8c ; n=4 : 8d ; n=6 : 8e.

A une solution d'adénine (0,5g ; 3,7 mmol) dans la DMF anhydre (25 cm³), protégée de l'humidité atmosphérique, on ajoute sous agitation de l'hydrure de sodium (dispersé dans l'huile à 50 % ; 0,18g ; 3,75 mmol).

Après environ 2 h d'agitation à température ambiante, le dégagement d'hydrogène s'arrête et on ajoute à la suspension obtenue une solution de l'(ω-bromoalkyl)-1 psoralène 7 (3,7 mmol) dans la DMF anhydre (3 cm³). L'agitation est maintenue pendant 18 à 24 h à l'abri de la lumière. La DMF est ensuite évaporée sous pression réduite. Le résidu huileux obtenu est trituré avec de l'éther éthylique. Le mélange est placé au froid jusqu'à obtention d'un solide qui est filtré, lavé et séché. Le solide est à nouveau lavé à l'eau et séché. Après une première cristallisation dans l'éthanol, le produit obtenu est chromatographié plusieurs fois sur silice en éluant avec de l'éthanol absolu. Une deuxième cristallisation dans l'éthanol absolu conduit aux produits purs sous forme de poudres blanches.

Ade-C _n -8Pso	n=3 ; <u>8c</u>	n=4 ; <u>8d</u>	n=6 ; <u>8f</u>
Masse obtenue après 1 ^{ère} Cristallisation	1,0g	0,65g	0,84g
mmol	2,7	1,7	2,0
Rdt après la 1 ^o Cristallisation	70 %	45%	55%
Rdt final		20%	
F °C	239-241 (décomposition)	191-192	197-198

RMN (CDCl₃) : Ade-C_n-8Pso ; n=3 : 8c ; n=4 : 8d ; n=6 : 8f.

Cycle furocoumarine ; 8c, d, f : δ ppm = 7,80 (d, 1H, J=10 Hz, C4H) ; 7,65 (d, 1H, J=2 Hz, C5'H) ; 7,40 (s, 1H, C5H) ; 6,80 (d, 1H, J=2 Hz, C4'H) ; 6,40 (d, 1H, J=10 Hz, C3H).

Cycle adénine ; 8c, d, f : δ ppm = 8,35 (s, 1H) ; 5,60 (s large, 2H, C6-NH₂) ; 8c: 8,1 - 8d : 8,0 - 8f : 7,9 - (s, 1H).

Chaîne polyméthylénique : 8c, d, f : δ = 3,9 à 4,8 (m, 4H, O-CH₂ et N9-CH₂). Reste de la chaîne : 8c : 2,0 à 2,8 (m, 2H) ; 8d : 1,0 à 2,7 (m, 4H) ; 8f : 1,0 à 2,3 (m, 8H).

Masse (Ionisation chimique par le méthane) ; m/e :

Ade-C₃-8Pso ; 8c ; M= 377,35 : 378 (70 ; MH⁺), 202 (10 ; 8Pso OH⁺), 176 (100 ; Ade-(CH₂)₃⁺).

Ade-C₄-8Pso ; 8d ; M=391,38 : 392 (100 ; MH⁺), 202 (25), 190 (95 ; Ade-(CH₂)₄⁺).

Ade-C₆-8Pso ; 8f ; M=419,43 : 420 (100 ; MH⁺), 218 (50 ; Ade-(CH₂)₆⁺), 202 (30).

IR (KBr) :

Ade-C₃-8Pso ; 8c : 3290, 3110, 1710, 1670, 1600, 1580, 1310, 1245, 1160, 1100, 1035, 755 cm⁻¹.

Ade-C₄-8Pso ; 8d : 3410, 3110, 1710, 1645, 1585, 1330, 1150, 1090, 1030, 990, 880, 770-760 cm⁻¹

Ade-C₆-8Pso ; 8f : 3400, 3100, 1725, 1645, 1590, 1330, 1150, 1090, 990, 760 cm⁻¹.

UVmax : EtOH, Ade-C_n-8Pso, 8c, d, f : 300 (ε 11500) ; 249,5 nm (ε 32500).
CH₂Cl₂, Ade-C₄-8Pso, 8d : 298 (ε 12000) ; 251,5nm (ε 33500).

Analyse :

Ade-C _n -8Pso	n=3 ; <u>8c</u>	n=4 ; <u>8d</u>	n=6 ; <u>8f</u>
	C ₁₉ H ₁₅ N ₅ O ₄	C ₂₀ H ₁₇ N ₅ O ₄	C ₁₁ H ₂₁ N ₅ O ₄
M	377,35	391,38	419,43
Analyse	calc. tr.	calc. tr.	calc. tr.
C%	60,47 60,71	61,37 61,61	63,00 63,29
H%	4,01 3,89	4,38 4,36	5,05 4,93
N%	18,56 18,53	17,90 17,75	16,70 16,81

Hydroxy-8, dihydro 4',5' psoralène : 4',5' dh 8HP ; 9.

A une solution d'hydroxy-8 psoralène 3 (2g ; 10 mmol) dans l'éthanol absolu (250 cm³), on ajoute du palladium sur charbon à 10% (0,4g). Le mélange est agité sous atmosphère d'hydrogène, à pression atmosphérique et à température ambiante. La réaction est suivie en mesurant le volume d'hydrogène consommé et par CCM, elle se poursuit pendant 2 à 3 h. Le mélange est ensuite filtré sur célite et la solution obtenue est évaporée à sec sous pression réduite. Le phénol 9 est obtenu pur après cristallisation dans l'eau (1,5g ; 7,5 mmol ; 75%).

F = 194,5-195,5°C ; Litt. (64) F = 195°C.

RMN (CDCl₃) : δ ppm = 7,65 (d, 1H, J=10 Hz, C4H) ; 6,90 (s large, 1H, C5H) ; 6,20 (d, 1H, J=10 Hz, C3H) ; 5,65 (s large, 1H, OH) ; 4,75 (t, 2H, J=9 Hz, C5'H₂) ; 3,25 (t, 2H, J=9 Hz, C4'H₂).

Masse (impact électronique) ; m/e : M=204,19 : 204 (100 ; M⁺), 176 (63 ; M⁺-CO), 147 (14), 91 (38).

IR (KBr) : 3350, 1700, 1575, 1420, 1305, 1270, 1145, 1060, 1000, 855, 750 cm⁻¹.

(ω -(thyminy1-1) alcoxy -8 dihydro-4',5' psoralènes : Thy-C_n-4',5dh8Pso ; n=3 : 10c ; n=4 : 10d ; n=5 : 10e ; n=6 : 10f).

Ces composés ont été préparés à partir de l'hydroxy-8 dihydro-4',5' psoralène 9 et des (ω -bromoalkyl)-1 thymines 5 correspondantes dans la DMF en présence de carbonate de potassium. Les proportions de réactifs et le mode opératoire suivi sont tout à fait analogues à ceux utilisés pour la synthèse des composés Thy-C_n-8Pso 6.

Pour 1g de 4'5'dh 8HP 9 au départ soit 4,9 mmol :

Thy-C _n -4',5'dh 8Pso	n=3 ; <u>10c</u>	n=4 ; <u>10d</u>	n=5 ; <u>10e</u>	n=6 ; <u>10f</u>
Masse obtenue (produit pur)	0,36g	1,10g	1,30g	1,45g
mmol	1,0	2,9	3,3	3,5
Rdt après la 1 ^o cristallisation	35%	85%	85%	85%
Rdt final	20%	60%	65%	70%
F °C	269-271	215-216	170-171	185-186

RMN (CDCl₃) : Thy-C_n-4',5'dh8Pso ; n=3 : 10c ; n=4 : 10d ; n=5 : 10e ; n=6 : 10f.

Cycle furocoumarine ; 10c, d, e, f : δ ppm = 7,60 (d, 1H, J=10 Hz, C4H) ; 7,00 (s, 1H, C5H) ; 6,20 (d, 1H, J=10 Hz, C3H) ; 4,70 (t, 2H, J=9 Hz, C5'H₂) ; 3,20 (t, 2H, J=9 Hz, C4'H₂).

Cycle thymine ; 10c, d, e, f : δ entre 8 et 8,5 (s large, 1H, N3H) ; 10c, d : 7,35 et 10e, f : 7,15 (d, 1H, J < 1 Hz, C6H) ; 10c, d, e, f : 1,85 (d, 1H, J < 1 Hz, C5-CH₃).

Chaîne polyméthylénique :

OCH₂ et N-CH₂ : 10c : δ = 3,8 à 4,4 (m, 4H, O-CH₂ et N₁-CH₂) ; 10d, e, f : 4,20 (t large, 2H, J=6 Hz, O-CH₂) ; 10d : 3,85 et 10e, f : 3,70 (t large, 2H, J=7 Hz, N₁-CH₂).

Reste de la chaîne : 10c : δ = 1,6 à 2,4 (m, 2H) ; 10d : 1,4 à 2,2 (m, 4H) ; 10e : 1,4 à 2,1 (m, 6H) ; 10f : 1,1 à 2,0 (m, 8H).

Masse (ionisation chimique par le méthane), m/e :

Thy-C₃-4',5'dh8Pso ; 10c ; M=370,37 : 371 (25 ; MH⁺), 205 (15 ; 4'5'dh8Pso OH⁺), 167 (100 ; Thy-(CH₂)₃⁺).

Thy-C₄-4'5'dh8Pso ; 10d ; M= 384,39 : 385 (85 ; MH⁺), 205 (15 ; 4'5'dh8Pso OH⁺), 181 (100 ; Thy-(CH₂)₄⁺).

Thy-C₅-4'5'dh8Pso ; 10e ; M=398,42 : 399 (100 ; MH⁺), 205 (25), 195 (30 ; Thy-(CH₂)₅⁺).

Thy-C₆-4'5'dh8Pso ; 10f ; M=412,45 : 413 (100 ; MH⁺), 205 (45), 209 (45 ; Thy-(CH₂)₆⁺).

IR (KBr) :

Thy-C₃-4',5'dh8Pso ; 10c : 1710, 1680, 1580, 1350, 1290, 1225, 1145, 1070, 1005, 825, 765, 755 cm⁻¹.

Thy-C₄-4',5'dh8Pso ; 10d : 1700, 1670, 1575, 1350, 1150, 1070, 1010, 825, 765 cm⁻¹.

Thy-C₅-4',5'dh8Pso ; 10e : 1730, 1680, 1580, 1355, 1300, 1160, 1290, 1080, 1015, 825, 770 cm⁻¹.

Thy-C₆-4',5'dh8Pso ; 10f : 1710, 1650, 1580, 1370, 1295, 1155, 1080, 1015, 860, 770, 770 cm⁻¹.

UVmax : EtOH, Thy-C_n-4',5'dh8Pso, 10c, d, e, f : 332,5 (ε 14500) ; 264 nm (ε 12500).

Analyse :

Thy-C _n -4',5' dhSPso	n=3 ; <u>10c</u>	n=4 ; <u>10d</u>	n=5 ; <u>10e</u>	n=6 ; <u>10f</u>
	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₆	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₆	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₆	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₆
M	370,37	384,39	398,42	412,45
Analyse	calc. tr.	calc. tr.	calc. tr.	calc. tr.
C%	61,62 61,39	62,49 62,42	63,31 63,02	64,07 64,05
H%	4,90 4,77	5,24 5,27	5,57 5,52	5,87 5,88
N%	7,56 7,53	7,29 7,37	7,03 7,32	6,79 6,69

Propyl-1 thymine : Thy-C₃ ; 11 :

Un mélange de thymine silylée 4 (préparée à partir de 5g de thymine ; 40 mmol) , de bromo-1 propane (25 cm³) et de DMF (25 cm³) est agité, sous atmosphère d'azote sec, à 60°C pendant 7 jours. Le mélange réactionnel est ensuite porté quelques minutes à 90°C avec de l'eau (20 cm³). L'ensemble du mélange est évaporé à sec sous pression réduite et lavé plusieurs fois avec de l'eau (3x20 cm³). La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée à sec sous pression réduite. Le solide obtenu est cristallisé dans le benzène après traitement au noir animal (5,3g ; 32 mmol ; 80%).

F = 135-136°C ; Litt. (54) F = 134-136°C.

RMN (CDCl₃) : δ ppm = 9,60 (s large, 1H, N3H) ; 7,00 (d, 1H, J < 1Hz, C6H) ; 3,65 (t, 2H, J=7 Hz, N1-CH₂) ; 1,90 (d, 3H, J < 1 Hz, C5-CH₃) ; 1,2 à 2,1 (m, 2H, J=7 Hz) ; 0,90 (t, 3H, J=7 Hz, CH₃).

Masse (impact électronique) ; m/e : M=168,20 ; 168 (55 ; M⁺), 139 (15 ; Thy-CH₂⁺), 126 (57 ; Thy-H⁺), 96 (100), 83 (17), 55 (24).

IR (KBr) : 1695, 1645, 1330, 1240, 1145, 865, 760, 680 cm⁻¹.

UVmax : EtOH : 271,5 nm (ε 9500). CH₂Cl₂ : 271,5 nm (ε 9850).

Analyse, $C_8H_{12}N_2O_2$:

Calc. %	C : 57,13	H : 7,19	N : 16,66
Tr. %	57,26	7,22	16,51

Propyl-9 adénine : Ade-C₃ ; 12

Ce composé a été préparé à partir de l'adénine et du bromo-1 propane selon le mode opératoire décrit par N.J. LEONARD et R.F. LAMBERT (55).

F = 174,5-175°C ; Litt. (55) F = 175°C.

RMN (CDCl₃) : δ ppm = 8,35 (s, 1H) ; 7,80 (s, 1H) ; 6,25 (s large, 2H, C6-NH₂) ; 4,15 (t, 2H, J=7 Hz, N9-CH₂) ; 1,90 (m, 2H, J=7 Hz) ; 1,00 (t, 3H, J=7 Hz, CH₃).

Masse (impact électronique) ; m/e : M=177,21 ; 177 (87 ; M⁺), 148 (81 ; Ade-CH₂⁺), 135 (100 ; Ade⁺), 108 (43), 81 (16), 67 (10).

IR (KBr) : 3280, 3100, 1670, 1600, 1415, 1310, 1245, 1210, 1070, 1015, 900, 800, 765, 660 cm⁻¹.

UVmax : EtOH : 260,5 nm (ϵ 14100). CH₂Cl₂ : 259 nm (ϵ 12600).

Analyse, $C_8H_{11}N_5$:

Calc. %	C : 54,22	H : 6,26	N : 39,52
Tr. %	54,27	6,22	39,10

Propoxy-8 psoralène : 8Pso-C₃ ; 13.

A une solution de 8 HP 3 (2g ; 10 mml) et de bromo-1 propane (10 cm³ ; 110 mmol) dans la DMF anhydre (20 cm³), on ajoute du carbonate de potassium sec (2g). Le mélange, placé sous agitation, à l'abri de la lumière et sous atmosphère d'azote sec, est porté à 70°C pendant 3 h. La réaction terminée, le carbonate de potassium est filtré et lavé avec de la DMF. La DMF est évaporée sous pression réduite et le résidu huileux obtenu est trituré

avec de l'éther de pétrole. Le mélange est placé au froid jusqu'à obtention d'un solide qui est filtré, lavé et séché. Le solide en solution dans du chloroforme est chromatographié sur silice en éluant avec du chloroforme. Le 8Pso-C₃ 11 pur est obtenu sous la forme de longs filaments blancs par cristallisation dans l'éther de pétrole (2g ; 8 mmol ; 80%).

F = 78,5-79°C ; Litt. (59) F=84-85°C.

RMN (CDCl₃) : δ ppm = 7,75 (d, 1H, J=10 Hz, C4H) ; 7,70 (d, 1H, J=2 Hz, C5'H) ; 7,35 (s, 1H, C5H) ; 6,80 (d, 1H, J=2 Hz, C4'H) ; 6,35 (d, 1H, J=10 Hz, C3H) ; 4,50 (t large, 2H, J=6 Hz et J=9 Hz ; O-CH₂) ; 1,7 à 2,2 (m, 2H) ; 1,20 (t, 3H, J=6 Hz et J=8 Hz, CH₃).

Masse (impact électronique) ; m/e : M=244,25 : 244 (10 ; M⁺), 202 (100 ; 8Pso OH⁺), 174 (28 ; 8Pso OH⁺-CO), 89 (44), 63 (29).

IR (KBr) : 1700, 1585, 1390, 1330, 1150, 1090, 985, 930, 865, 755 cm⁻¹.

UVmax : EtOH : 300 (ϵ 11900) ; 262,5 (ϵ 13600) ; 248,5 nm (ϵ 23400).
CH₂Cl₂ : 298,5 (ϵ 12300) ; 250,5 nm (ϵ 24100).

Analyse, C₁₄H₁₂O₄ :

Calc. %	C : 68,85	H : 4,95
Tr. %	69,02	5,00

Propoxy-8, dihydro 4',5' psoralène : 4',5' dh8Pso-C₃ ; 14 :

A une solution de 8Pso-C₃ 11 (1g ; 4,1 mmol) dans l'éthanol absolu (100 cm³), on ajoute du palladium sur charbon à 10% (0,1g). Le mélange est agité sous atmosphère d'hydrogène contrôlée, à pression atmosphérique et à température ambiante pendant environ 2 h. La suspension est ensuite filtrée sur celite et le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est chromatographié sur silice en éluant avec du chloroforme. Le composé 14 est obtenu pur sous la forme de longs filaments blancs après cristallisation dans un mélange hexane-acétate d'éthyle 80 : 20 (0,86 g ; 3,5 mmol ; 85%).

F = 73-73,5°C.

RMN (CDCl₃) : δ ppm = 7,60 (d, 1H, J=10 Hz, C4H) ; 7,00 (d, 1H, C5H) ; 6,20 (d, 1H, J=10 Hz, C3H) ; 4,70 (t, 2H, J=9 Hz, C5'H) ; 4,15 (t, 2H, J=7 Hz, O-CH₂) ; 3,20 (t, 2H, J=9 Hz, C4'H) ; 1,4 à 2,1 (m, 2H) ; 1,00 (t, 3H, J=7 Hz, CH₃).

Masse (impact électronique) ; m/e ; M=246,21 : 246 (17 ; M⁺), 204 (100 ; 4'5'dh8Pso OH⁺), 176¹ (44), 91 (13).

IR (KBr) : 1700, 1610, 1580, 1420, 1290, 1145, 1070, 1010, 880, 825, 770 cm⁻¹.

UVmax : EtOH : 332,5 (ε 15000) ; 261,5 nm (ε 4200).

Analyse : C₁₄H₁₄O₄ :

Calc. %	C : 68,28	H : 5,73
Tr %	68,05	5,73.

C) ETUDES PHYSICOCHIMIQUES

1) Etude en spectrophotométrie UV :

Les solvants utilisés lors de cette étude sont de l'éthanol RP pour analyse "PROLABO", de l'eau bidistillée dans un appareillage en quartz et du dichlorométhane pour spectrophotométrie "CARLO ERBA".

Des échantillons de 10 à 20 mg des composés étudiés, pesés avec une précision de ± 0,1 mg, sont dissous dans 100 cm³ d'éthanol ou de dichlorométhane de façon à obtenir des solutions mères de concentration de l'ordre de 10⁻³ moles/l (M).

La loi de BEER-LAMBERT a été vérifiée pour chaque produit dans le solvant utilisé sur une gamme de concentrations allant de 5.10⁻⁶ à 8.10⁻⁵M.

Les solutions utilisées pour la mesure de %H sont obtenues en diluant 20 fois les solutions mères avec de l'eau (5 cm³ d'éthanol dans 100 cm³ de mélange), ou de l'éthanol ou du dichlorométhane.

La mesure de %H dans l'eau a été effectuée sur au minimum 4 solutions provenant de 2 pesées différentes.

Les spectres d'absorption ont été enregistrés sur un spectrophotomètre BECKMANN Acta M 5270 Des cuves UV de 1 cm de trajet optique ont été utilisées dans la plupart des cas. Seuls les composés Thy-C_n-8Pso 6c, e, f et Thy-C₃-4'5'di8Pso 10c ont nécessité l'utilisation de cuves de 10 cm de trajet optique en raison de la très faible solubilité dans l'eau de ces produits.

Sur les spectres UV, 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 études à température variable ont été effectuées dans une cellule thermostatée par un appareil BECKMAN CTC 250, munie d'une résistance chauffante et d'une circulation froide (eau-éthylène glycol thermostatée par un cryostat LAUDA).

Les valeurs de %H en fonction du pourcentage d'éthanol dans l'eau ou de la température sont toujours déterminées à partir des spectres des composés de référence placés dans les mêmes conditions expérimentales.

L'ensemble des résultats de cette étude UV représente le traitement d'environ 40000 valeurs de densités optiques.

Analyse statistique des valeurs %H = f (température) :

L'existence de valeurs maximales de %H visibles sur les figures 4 et 5 pour les composés Ade-C₃-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d, peut être démontrée en l'analysant par régression linéaire les valeurs obtenues (Tableau 21).

Composés	Domaine de température en °C			
	-5 ou -2,5 à + 80		+ 10 à +80	
	Δ %H ^a	r ^b	Δ %H ^a	r ^b
Ade-C ₃ -8Pso <u>8c</u>	0,29	0,994	0,19	0,997
Ade-C ₄ -8Pso <u>8d</u>	0,30	0,994	0,18	0,998
Ade-C ₆ -8Pso <u>8f</u>	0,25	0,994	0,26 ^c	0,992 ^c

Tableau 21 : Résultats de l'analyse statistique par régression linéaire des valeurs %H = f(température). a : erreur standard sur %H ; b : coefficient de corrélation r ; c : pour Ade-C₆-8Pso, 8f l'incertitude sur %H est plus importante en raison de la faible solubilité de ce composé dans l'eau-éthanol (95 : 5).

Nous trouvons dans le tableau, l'erreur standard et le coefficient de corrélation calculés pour les composés Ade-C_n-8Pso 8c, d, f dans deux domaines de température :

1. pour toutes les valeurs de %H entre -5 et 80°C.
2. pour les valeurs comprises entre 10 et 80°C.

La prise en compte des valeurs de %H comprises entre -5 et 10°C pour Ade-C₃-8Pso 8c et Ade-C₄-8Pso 8d augmente l'erreur standard et diminue le coefficient de corrélation. Ce n'est pas le cas pour le composé Ade-C₆-8Pso 8f pour lequel nous n'observons pas de palier.

Il est à noter les faibles valeurs obtenues pour Δ %H (1 à 2 %) et la bonne précision de la méthode.

-) Etude en spectroscopie de RMN :

Nous avons utilisé lors de cette étude du DMSO d_6 à 100 % de pureté isotopique et de l'eau lourde (D_2O) à 99,75 %.

Des échantillons de 1 à 2 mg des composés étudiés ont été dissous dans 0,5 à 1 cm^3 de DMSO d_6 . Par dilutions successives avec D_2O , nous avons préparé des solutions à environ 10^{-4} M et $5 \cdot 10^{-5}$ M contenant 5 % de DMSO d_6 (en volume par volume de D_2O). L'hexaméthylidisiloxane (HMDS) a été utilisé comme référence interne.

Les spectres ont été enregistrés à 27°C sur un spectromètre BRUKER WP 80. Les paramètres d'acquisition sont les suivants :

Fenêtre spectrale : 2000 Hz, longueur d'impulsion : 2,5 s, délai : 0,5 s, irradiation du signal HOD à une intensité de 20 décibels/0,5 Watts, nombre d'accumulations : 10000 à 25000.

Les signaux observés dans les spectres, pour les protons aromatiques des différents composés étudiés, sont caractérisés par la position en ppm de leur maximum d'intensité.

Ces valeurs obtenues dans un mélange D_2O -DMSO d_6 (95: 5) et dans le DMSO d_6 sont reportées dans les tableaux 22, 23, 24.

Cas de protons 3,4 et 4',5' du noyau psoralène :

Les protons 3 et 4 ainsi que les protons 4' et 5' sont couplés l'un avec l'autre et sont détectés sous la forme de 4 doublets ($J_{3,4} = 10\text{Hz}$; $J_{4',5'} = 2\text{Hz}$). Dans les tableaux 22, 23, 24, nous avons indiqué la position des 2 signaux de chacun de ces doublets.

Lors du repliement des composés modèles, nous n'avons pas observé de variations notables des constantes de couplage $J_{3,4}$ et $J_{4',5'}$. Nous avons donc mesuré la variation $\Delta\sigma$ de la position de chacun des 2 signaux détectés pour les 4 doublets, lorsque l'on passe des composés de référence aux composés modèles. Pour un même proton, 2 valeurs de $\Delta\sigma$ sont obtenues. Les moyennes de celles-ci sont indiquées dans les tableaux 22, 23, 24.

Composé	moles/l	H-4 ^{a,e}	H-5 ^{1a,e}	H-5 ^{a,d}	H-4 ^{1a,e}	H-3 ^{a,e}	H-6 ^{1b,d}	CH ₃ ^{T^{b,d}}	H-2A ^{c,d}	H-8A ^{c,d}
Thy-C ₃	5.10 ⁻⁴						7,36	1,72		
	10 ⁻⁴						7,36	1,72		
Ade-C ₃	5.10 ⁻⁴								8,10	8,03
	10 ⁻⁴								8,10	8,03
8Pso-C ₃	10 ⁻⁴	8,08	7,76	7,74	6,91	6,41				
	5.10 ⁻⁵	8,08	7,77	7,74	6,92	6,41				
4',5'dh8Pso-C ₃	10 ⁻⁴	7,91	7,78		7,18	6,27				
Thy-C ₃ + 8Pso-C ₃	10 ⁻⁴	8,08	7,78	7,75	6,91	6,42	7,36	1,72		
	10 ⁻⁴	8,08	7,76	7,75	6,91	6,42	7,36	1,72		
Ade-C ₃ + 8Pso-C ₃	10 ⁻⁴	8,07	7,75	7,73	non résolu	6,41			8,10	8,03
	10 ⁻⁴	8,07	7,77	7,74	6,91	6,40			8,10	8,02

Tableau 22 : Etude en RMN ¹H des composés de référence Thy-C₃ 12, Ade-C₃ 13, 8Pso-C₃ 14, 4',5'dh8Pso-C₃ 14 et de quelques uns de leurs mélanges équimoléculaires. Spectres enregistrés dans un mélange D₂O-DMSO d₆ (95 : 5) à différentes concentrations et à 27°C.

a : Protons du noyau psoralène ; b : Protons du noyau thymine ; c : Protons du noyau adénine ; d : Déplacements chimiques en ppm des protons détectés sous la forme de singulets ; e : Position en ppm des 2 signaux obtenus pour les protons aromatiques détectés sous la forme de doublets.

Composé	moles/l	H-4 ^{a,e}	H-5 ^{a,e}	H-5 ^{a,d}	H-4 ^{a,e}	H-3 ^{a,e}	H-6 ^{a,b,d}	CH ₃ ^{a,b,d}	H-2A ^{c,d}	H-8A ^{c,d}
Try-C ₄ -8Pso	10 ⁻⁴	8,05	7,94	7,73	6,90	6,42	7,14	1,49		
	5.10 ⁻⁵	8,05	7,93	7,73	6,89	6,43	7,13	1,49		
Ade-C ₄ -8Pso	10 ⁻⁴	7,97	7,86	7,64	6,81	6,35			7,73	7,69
	5.10 ⁻⁵	7,98	7,86	7,64	6,81	6,35			7,73	7,69
Try-C ₄ -4',5'dh8Pso	10 ⁻⁴	7,89	7,77			6,26	7,24	1,59		

Tableau 23: Etude en RMN ¹H des composés modèles Try-C₄-8Pso 6d, Ade-C₄-8Pso 8d et Try-C₄-4',5'dh8Pso 10d.

Spectres enregistrés dans un mélange D₂O-DMSO d₆ (95 : 5) à différentes concentrations et à 27°C

(a, b, c, d, e : voir légende du tableau 22).





Composé	H-4 a,e	H-5' a,e	H-5 ^{a,d}	H-4' a,e	H-3 a,e	H-6T ^{b,d}	CH ₃ ^{b,d}	H 2A ^{b,d} et H-8A	NH ₂ ^{a,b}
Thy-C ₃						7,47	1,68		
Ade-C ₃								8,07	7,10
8Pso-C ₃	8,16	8,03	8,08	8,05	7,63	7,06	7,03	6,44	6,32
Thy-C ₄ -8Pso	8,16	8,03		8,05	7,63	7,06	7,03	6,44	6,32
Ade-C ₄ -8Pso	8,15	8,03		8,05	7,63	7,05	7,02	6,44	6,32
Thy-C ₄ -4',5'dh8Pso						7,48	1,68		

Tableau 24 : Etude en RMN ¹H des composés de référence Thy-C₃ 12, Ade-C₃ 13, 8Pso-C₃ 11 et des composés modèles Thy-C₄-8Pso 5d, Ade-C₄-8Pso 8d et Thy-C₄-4',5'dh 8Pso 10d.

Spectres enregistrés dans le DMSO d₆ pour des concentrations d'environ 10⁻³ moles/l à 27°C.

(a, b, c, d, e : voir légende du tableau 22).

Attribution des protons 2 et 8 du cycle adénine (H-2A et H-8A) :

Cette attribution a été réalisée en chauffant la solution du composé étudié dans le mélange D₂O-DMSO 95 : 5 à 80°C (30 mn pour Ade-C₄-8Pso 8d ; 2 h pour Ade-C₃ 13). Dans ces conditions, le proton 8 du cycle imidazole s'échange (121).

D) ETUDE PHOTOCHEMIQUE :

1) Etude de la photoreactivité des modèles préparés :

Conditions d'irradiation :

Les solvants utilisés sont de qualité dite pour "spectroscopie". L'eau a été bidistillée dans un appareillage en quartz peu avant utilisation (pH = 6). Les solutions à irradier, placées dans des récipients en pyrex sont soigneusement désoxygénées par un barbotage d'argon U. Ces récipients sont ensuite fermés hermétiquement de façon à maintenir les solutions sous atmosphère d'argon.

Les solutions refroidies par un courant d'air comprimé, sont irradiées à 365 nm par l'intermédiaire d'une lampe à mercure haute pression PHILIPS HPW 125 W. L'éclairement énergétique arrivant sur les solutions irradiées, mesuré avec une thermopile KIPP et ZONEN, est de 5 à 8 m W/cm².

Les irradiations à 254 nm sont effectuées à l'air libre dans de petits cristallisoirs, sans dégazage des solutions et par l'intermédiaire d'une lampe à mercure basse pression PHILIPS TUV 15W. L'éclairement énergétique reçu par les solutions est d'environ 0,5 m W/cm².

Les irradiations à 254 nm suivies par RMN sont réalisées dans des tubes en quartz contenant des solutions non désoxygénées.



Analyse des solutions irradiées

L'analyse des solutions se fait principalement par CLHP analytique sur un appareil WATERS : colonne de phase inverse RP18 10 μ m MERCK, programmeur de solvant 660, deux pompes M-6000, détecteur UV 440).

Conditions d'élution

Les solutions sont éluées par un gradient linéaire de deux solvants l'eau et un mélange méthanol-eau (95 : 5). La composition du mélange d'élution y (en % de méthanol) est donnée, en fonction du temps d'élution t en minutes, par l'équation :

$$y = K + (95-K).t/10$$

K étant la composition du mélange éluant en % de méthanol au temps $t=0$.

Les différents programmes d'élution utilisés (PE) seront donc caractérisés par la composition du mélange éluant au départ K :

PE 50 : eau pure/méthanol , $K=50$ % de méthanol

PE 80 : mêmes solvants , $K=80$

PE 50 pH 5 : eau tamponnée à pH = 5 par un mélange d'acétate d'ammonium 0,02 M-acide acétique/méthanol, $K=50$

PE 80 pH 5 : mêmes solvants que précédemment, $K=80$

Nous avons également analysé certaines solutions en éluant avec un mélange de composition constante en deux solvants : eau tamponnée à pH=5 (acétate d'ammonium 0,02M-Acide acétique) et méthanol contenant 5% d'eau. Ce type d'analyse en élution isocratique sera symbolisé par la notation EI suivie du pourcentage de méthanol dans le mélange éluant puis du pH de l'eau d'élution (Ex : EI 50 pH5).

Détection des produits formés

Les produits sont détectés par leur absorption dans l'UV, simultanément à 254 et 365 nm. En raison des concentrations faibles des solutions (de l'ordre de 10^{-5} M), les volumes injectés sont maximum (150 à

200 μ l) et la détection se fait dans des gammes de densités optiques très faibles de 0,02 à 0,2.

2) Obtention et caractérisation des photoproduits formés en solution :

Photoproduit obtenu lors de l'irradiation dans l'éthanol du composé Thy-C₄-8Pso 6d :

Une solution de Thy-C₄-8Pso 6d (50 mg ; 0,13 mmol) dans l'éthanol à 95° (11) est désoxygénée par barbotage d'argon (1 h). Elle est ensuite irradiée à 365 nm sous courant d'argon et sous agitation. L'évolution de la photoréaction est suivie par CLHP. Lorsque la quantité de photoproduit formé n'augmente plus, on arrête l'irradiation (15 à 20 h). La solution est alors évaporée à sec. Le résidu jaune obtenu dissous dans du chloroforme est chromatographié plusieurs fois sur plaque de silice avec du chloroforme puis avec de l'acétate d'éthyle. Une purification complète du photoproduit n'a pas été possible dans ces conditions (pureté CLHP environ 90 %). Le produit obtenu est lavé plusieurs fois avec de l'hexane, et filtré (2 à 4 mg ; 4 à $8 \cdot 10^{-6}$ mol; environ 5 %).

RMN (CDCl₃) selon la numérotation du psoralène : δ ppm = 8,20 (s large, 1H, NH Thy) ; 7,95 (d, 1H, J=16,5 Hz, C4H) ; 7,45 (d, 1H, J=2 Hz, C5'H) ; 7,30 (s, 1H, C5'H) ; 6,90 (d, 1H, J \leq 1 Hz, H6 Thy) ; 6,65 (d, 1H, J=2 Hz, C4'H) ; 6,60 (s large, OH) ; 6,55 (d, 1H, J=16,5 Hz, C3'H) ; 4,45 (m, 2H, OCH₂-CH₂) ; 4,20 (q, 2H, J=7 Hz, OCH₂-CH₃) ; 3,80 (m, 2H, N-CH₂) ; 1,85 (d, 3H, J \leq 1Hz, CH₃Thy) ; 1,30 (t, J=7 Hz, CH₂-CH₃).

Masse ; m/e :

Impact électronique : 428 (2 ; M⁺), 383 (1,4 ; M⁺-C₂H₅O), 181 (100, Thy-(CH₂)₄⁺), 139 (16).

ionisation chimique (méthane) : 428 (6 ; M⁺), 383 (87 ; M⁺-C₂H₅O).

Ionisation chimique (ammoniac) : 446 (15 ; M⁺+NH₃) ; 429 (100, MH⁺) ; 383 (13, M⁺-C₂H₅O).

Acide trans (hydroxy-6, méthoxy-7) benzofuryl-5 propénoïque : 8MOPCO₂H ; 17.

Préparation par voie chimique selon A. SCHONBERG et A. SINA (59).

Dans un appareillage muni d'un réfrigérant et protégé de l'humidité, on ajoute progressivement sous agitation du sodium fraîchement filé (2 g ; 90 mmol) à de l'éthanol anhydre (30 cm³). Après réaction complète du sodium, le mélange réactionnel est concentré fortement sous pression réduite. Le méthoxy-8 psoralène 1 (1 g ; 4,6 mmol) est alors ajouté sous forme solide. Le mélange orange obtenu est porté à reflux de l'éthanol, sous atmosphère d'azote sec, pendant 8 à 12 h. Après quelques heures, on observe la formation d'un précipité jaune. La réaction terminée, le mélange réactionnel est évaporé à sec, puis additionné d'eau (20 cm³), il est à nouveau évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu obtenu est dissous dans l'eau (20 cm³). La solution obtenue est acidifiée avec de l'acide chlorhydrique concentré. Il se forme alors un précipité jaune qui est filtré, lavé avec de l'eau et séché. Une cristallisation dans l'acétate d'éthyle conduit au composé 17 pur sous la forme de cristaux bruns à odeur caractéristique (0,86 g ; 3,7 mmol ; 80 %).

F : 216-217°C (décomposition à partir de 205°C) ; Litt. (59) F : 218°C.

RMN (DMSO-d₆), selon la numérotation du noyau psoralène : δ ppm=12,1 (s large, 1H, COOH ou OH) ; 9,5 (s large, 1H, OH ou COOH) ; 7,85 (d, 1H, J=16 Hz, C4H) ; 7,83 (d, 1H, J=2 Hz, C5'H) ; 7,55 (s, 1H, C5H) ; 6,80 (d, 1H, J=2 Hz, C4'H) ; 6,45 (d, 1H, J=16 Hz, C3H) ; 3,95 (s, 3H, O-CH₃).

Masse (impact électronique) ; m/e ; M= 234,21 : 234 (30 ; M⁺), 216 (100 ; M⁺-H₂O), 201 (49), 173 (90), 89 (52), 63 (42).

IR (KBr) : 3390 (large), 2900 (très large, 3500 à 2000), 1675, 1605, 1310, 1075, 980 cm⁻¹.

UVmax : EtOH : 336 (ϵ 5200) ; 289 (ϵ 14500) ; 250 nm (ϵ 33000).

Eau, HCl N : 294 (ϵ 16000) ; 248 nm (ϵ 29700). Eau, pH 7 (tampon NaH₂PO₄, Na₂HPO₄) : 283 (ϵ 13600) ; 246 nm (ϵ 33500). Eau, NaOH 0,01N : 378 (ϵ 7900) ; 256 nm (ϵ 27200).

Analyse, C₁₂H₁₀O₅ :

Calc. % :	C	61,54	H	4,30	O	34,16
Tr. % :		61,29		4,37		33,57

Préparation par voie photochimique :

A une solution de méthoxy-8 psoralène 8MOP 1 (0,5 g ; 2,3 mmol) dans l'éthanol (100 cm³), on ajoute une solution aqueuse de soude (2 g dans 900 cm⁻³). La solution désoxygénée par barbotage d'argon (1 h) est irradiée pendant environ 12 h à 365 nm. La solution est neutralisée avec de l'acide chlorhydrique concentré puis évaporée à sec sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris avec une solution N d'acide chlorhydrique, puis filtré, lavé avec de l'eau et séché. Il est ensuite chromatographié sur colonne de silice en éluant d'abord avec du chloroforme pour éliminer le 8MOP n'ayant pas réagi, puis avec de l'acétate d'éthyle. L'acide 17 est obtenu pur après cristallisation dans l'acétate d'éthyle (0,35 g ; 1,5 mmol ; 65 %).

Les caractéristiques physiques (F) spectroscopiques (RMN masse, IR) et chromatographiques (CCM, CLHP) de ce composé préparé par voie photochimique sont identiques à celles du composé préparé par voie chimique.

Analyse, C₁₂H₁₀O₅ :

Calc. % :	C	61,54	H	4,30	O	34,16
Tr. % :		61,60		4,19		33,52

Trans(hydroxy-6, méthoxy-7) benzofuryl-5 propénoate d'éthyle : 8MOPCO₂Et ;
18.

Préparation par voie chimique :

A une solution de 8MOPCO₂H 17 (0,2 g ; 0,85 mmol) dans l'éthanol anhydre (30 cm³), on ajoute 0,5 cm³ d'acide sulfurique concentré. La solution est portée à reflux à l'abri de l'humidité pendant 2 h. Après refroidissement, on ajoute de l'eau à la solution (10 cm³) et on neutralise avec une solution molaire d'hydrogencarbonate de sodium. La solution obtenue est ensuite extraite avec du chloroforme (3 x 10 cm³). L'ensemble des phases organiques

est séché sur sulfate de magnésium anhydre et évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice avec du chloroforme. Une cristallisation dans un mélange benzène-hexane conduit à l'ester attendu pur sous la forme d'aiguilles jaunes (0,17 g ; 0,65 mmol ; 75%).

F = 131-132°C.

RMN (CDCl_3), selon la numérotation du noyau psoralène : δ ppm = 7,95 (d, 1H, $J=16,5$ Hz, C4H) ; 7,45 (d, 1H, $J=2$ Hz, C5'H) ; 7,30 (s, 1H, C5H) ; 6,62 (d, 1H, $J=2$ Hz, C4'H) ; 6,52 (d, 1H, $J=16,5$ Hz, C3H) ; 6,10 (s, 1H, OH) ; 4,18 (q, 2H, $J=7$ Hz, CH₂-CH₃) ; 4,15 (s, 3H, OCH₃) ; 1,25 (t, 3H, $J=7$ Hz, CH₂-CH₃).

Masse (impact électronique) ; m/e : M=262,27 : 262 (25 ; M⁺), 217 (27 ; M⁺-C₂H₅O), 216 (100, M⁺-C₂H₅OH), 202 (12), 201 (28), 188 (18), 174 (17), 173 (26), 89 (12), 63 (13).

IR (KBr) : 3280 (large), 1700, 1605, 1305, 1170, 990 cm^{-1} .

UVmax : EtOH : 346 (ϵ 5550) ; 293 (ϵ 17100) ; 251 nm (ϵ 32500).

Analyse, C₁₄H₁₄O₅ :

Calc. % :	C	64,12	H	5,38
Tr. % :		63,86		5,31

Préparation par voie photochimique :

A l'abri de l'humidité, on ajoute, sous agitation, du sodium fraîchement filé (2 g ; 90 mmol) à de l'éthanol anhydre (1 l) préalablement désoxygéné par barbotage d'argon (1 h). Après disparition du sodium, du méthoxy-8 psoralène 8MOP 1 (0,5 g ; 2,3 mmol) est ajouté. La solution obtenue est irradiée à 365 nm pendant 6 à 8 h. La solution jaune obtenue est soigneusement décolorée avec de l'acide chlorhydrique concentré puis évaporée à sec sous pression réduite. Le résidu est chromatographié sur colonne de silice en éluant avec un mélange hexane-chloroforme (50 : 50). Une cristallisation dans un mélange benzène-hexane conduit à l'ester attendu (0,3 g ; 1,15 mmol ; 50 %).

Les caractéristiques physiques (F), spectroscopiques (RMN, masse, IR) et chromatographiques (CCM, CLHP) de ce composé préparé par voie photochimique sont identiques à celles du composé préparé par voie chimique.

Acide trans hydroxy-6, ((thyminy-1)-4 butoxy)-7 benzofuryl-5 propénoïque : Thy-C₄-8PsoC₂H ; 19.

A une solution de Thy-C₄-8Pso 6d (50 mg ; 0,13 mmol) dans l'éthanol (400 cm³), on ajoute une solution aqueuse de soude (2 g dans 1,6 l). La solution désoxygénée par barbotage d'argon (1 h) est irradiée 6 h à 365 nm. La réaction est suivie par CLHP, on peut ainsi observer la formation de l'acide attendu à plus de 95 %. La solution irradiée est neutralisée avec de l'acide chlorhydrique concentré puis évaporée à sec sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris à l'eau, filtré, lavé puis séché. Il est cristallisé dans un mélange eau-éthanol (80 : 20) pour donner l'acide 19 à l'état pur (40 mg ; 0,10 mmol ; 75 %).

F = 239-240°C

RMN (DMSO-d₆), selon la numérotation du noyau psoralène : δ ppm = 11,15 (s large, 1H, NH ou OH ou COOH) ; 9,3 (s large, 1H, COOH ou OH ou NH) ; 7,85 (d, 1H, J=16 Hz, C4H) ; 7,80 (d, 1H, J=2 Hz, C5'H) ; 7,55 (s, 1H, C5H) ; 7,50 (d, 1H, J<1 Hz, C6H Thy) ; 6,80 (d, 1H, J=2 Hz, C4'H) ; 6,45 (d, 1H, J=16 Hz, C3H) ; 4,15 (m, 2H, O-CH₂) ; 3,65 (m, 2H, N-CH₂) ; 1,4 à 2,0 (m, 4H, (CH₂)₂) ; 1,70 (d, 3H, J<1 Hz, CH₃ Thy).

Masse (impact électronique) ; m/e : C₂₀H₂₀N₂O₇ ; M=400,39 : 400 (9,6 ; M⁺), 382 (4,6 ; M⁺-CO₂), 202 (8), 181 (100 ; Thy(CH₂)₄⁺), 174 (16), 147 (10), 138 (12), 96 (22), 91 (25).

UVmax : EtOH : 336 (ε 5200) ; 278 (ε 20500) ; 250 nm (ε 38000).

Analyse, C₂₀H₂₀N₂O₇ :

Calc. % :	C	60,00	H	5,03	N	7,00
Tr. % :		59,88		5,09		6,74

Acide trans/hydroxy-6, ((thyminy1-1)-12 dodécanoxy)-7/benzofuryl-5 propénoïque : Thy-C₁₂-8PsoCO₂H ; 20 :

A une solution de Thy-C₁₂-8Pso 61 (100 mg ; 0,20 mmol) dans l'éthanol (500 cm³), on ajoute une solution aqueuse de soude (2 g dans 500 cm³). La photoréaction et l'isolement du composé attendu sont réalisés de la même manière que pour le composé Thy-C₄-8PsoCO₂H 19. Une cristallisation dans un mélange acétate d'éthyle-hexane conduit à l'acide 20 pur (67 mg ; 0,13 mmol ; 65 %).

F = 105-107°C.

RMN (DMSO-d₆), selon la numérotation du noyau psoralène : δ ppm = 11,1 (s large, 1H, NH ou OH ou COOH) ; 9,3 (s large, 1H, COOH ou OH ou NH) ; 7,85 (d, 1H, J=16 Hz, C4H) ; 7,80 (d, 1H, J=2 Hz, C5'H) ; 7,55 (s, 1H, C5H) ; 7,45 (d, 1H, J<1 Hz, C6H Thy) ; 6,80 (d, 1H, J=2 Hz, C4'H) ; 6,45 (d, 1H, J=16 Hz, C3H) ; 4,15 (t, 2H, J=6 Hz, O-CH₂) ; 3,55 (t, 2H, J=7 Hz, N-CH₂) ; 1,8 à 1 (m, 20H, (CH₂)₁₀) ; 1,70 (d, 3H, J<1 Hz, CH₃ Thy).

Masse ; m/e ; M=512,61 :

Impact électronique : 512 (0,3 ; M⁺), 468 (9 ; M⁺-CO₂), 293 (21 ; Thy(CH₂)₁₂⁺), 202 (23), 176 (100), 147 (29), 96 (41), 89 (8).

Ionisation chimique (isobutane) : 513 (20 ; MH⁺), 469 (100, MH⁺-CO₂).

UVmax : EtOH : 336 (ε 5000) ; 278 (ε 20500) ; 250 nm (ε 37500).

Analyse, C₂₈H₃₆N₂O₇ :

Calc. % :	C	65,61	H	7,08	N	5,46
Tr. % :		65,51		7,25		5,21

Trans/hydroxy-6 ((thyminy1-1)alkoxy)-7 benzofuryl-5 propénoate d'éthyle : 21 et 22

Le mode opératoire suivi est le même que celui utilisé pour préparer le composé 8MOPCO₂Et 17 par voie chimique. Au départ, le composé Thy-C₄-8PsoCO₂H 19 ou Thy-C₁₂-8PsoCO₂H 20 (50 mg ; 19 : 0,12 mmol ; 20 : 0,10 mmol) est dissous dans l'éthanol anhydre (30 cm³) puis on ajoute à la

solution obtenue de l'acide sulfurique concentré (0,5 cm³). La purification de l'ester se fait tout d'abord par chromatographie sur colonne de silice en éluant avec un mélange chloroforme-acétate d'éthyle (50 : 50 pour 21 et 25 : 75 pour 22 . Une cristallisation finale dans un mélange acétate d'éthyle-hexane conduit aux deux esters purs sous la forme de poudres blanches.

Avant cristallisation, on obtient :

Thy-C₄-8PsoCO₂Et ; 21 ; 47 mg ; 11 mmol ; 90 %

Thy-C₁₂-8PsoCO₂Et ; 22 ; 33 mg ; 0,6 mmol ; 65 %.

Trans/hydroxy-6((thyminy1-1)-4 butoxy)-7 benzofuryl-5 propénoate d'éthyle : Thy-C₄-8PsoCO₂Et ; 21.

F = 172-175°C (décomposition)

RMN (CDCl₃), selon la numérotation du noyau psoralène : δ ppm = 8,15 (s large, 1H, NH Thy) ; 7,95 (d, 1H, J=16,5 Hz ; C4H) ; 7,45 (d, 1H, J=2 Hz, C5'H) ; 7,30 (s, 1H, C5H) ; 6,90 (d, 1H, J<1 Hz, C6H Thy) ; 6,65 (d, 1H, J=2 Hz, C4'H) ; 6,55 (d, 1H, J=16,5 Hz, C3H) ; 6,50 (s, 1H, OH) ; 4,45 (m, 2H, O-CH₂-CH₂) ; 4,20 (q, 2H, J=7 Hz, OCH₂-CH₃) ; 3,80 (m, 2H, N-CH₂) ; 1,7 à 2,1 (m, 4H, (CH₂)₂) ; 1,85 (d, 3H, J<1 Hz, CH₃ Thy) ; 1,30 (t, 3H, J=7 Hz, CH₂-CH₃).

Masse (impact électronique) ; m/e ; M=428,45 : 428 (2,8 ; M⁺), 383 (1,6 ; M⁺-C₂H₅O), 202 (13,3), 181 (100, Thy(CH₂)₄⁺), 174 (9), 139 (14), 127 (8), 96 (18).

UVmax : EtOH : 346 (ε 5200) ; 283,5 (ε 20500) ; 250,5 nm (ε 36500).

Analyse, C₂₂H₂₄N₂O₇ :

Calc. % :	C 61,68	H 5,65	N 6,54
Tr. % :	61,52	5,80	6,15

Trans/hydroxy-6, ((thyminy1-1)-12 dodécanoxy)-7/benzofury1-5
propénoate d'éthyle : Thy-C₁₂-8PsoCO₂Et ; 22.

F = 105-106°C

RMN (CDCl₃), selon la numérotation du noyau psoralène : δ ppm = 8,70 (s large, 1H, NH Thy) ; 7,95 (d, 1H, J=16,5 Hz, C4H) ; 7,44 (d, 1H, J=2 Hz, C5'H) ; 7,30 (s, 1H, C5'H) ; 6,90 (d, 1H, J<1 Hz, C6H Thy) ; 6,62 (d, 1H, J=2 Hz, C4'H) ; 6,55 (d, 1H, J=16,5 Hz, C3H) ; 6,25 (s, 1H, OH) ; 4,40 (t, 2H, J=7 Hz, O-CH₂-CH₂) ; 4,20 (q, 2H, J=7 Hz, OCH₂-CH₃) ; 3,62 (t, 2H, J=7 Hz, N-CH₂) ; 1,0 à 2,0 (m, 20H, (CH₂)₁₀) ; 1,85 (d, 3H, J<1 Hz, CH₃ Thy) ; 1,27 (t, 3H, J=7 Hz, CH₂-CH₃).

Masse (impact électronique) ; m/e ; M=540,66 : 540 (2,4 ; M⁺), 495 (1,7 ; M⁺-C₂H₅O) ; 293 (42 ; Thy(CH₂)₁₂⁺), 202 (100), 174 (12), 127 (13).

UVmax : EtOH : 346 (ϵ 5000) ; 283,5 (ϵ 20000) ; 251 (ϵ 35000).

Analyse, C₃₀H₄₀N₂O₇ :

Calc. %	:	C	66,65	H	7,46	N	5,18
Tr. %	:		66,49		7,52		5,17

Comparaison photoproduits observés - composés témoins :

Nous avons comparé les caractéristiques CLHP, temps de rétention t_R et rapport d'absorption A (254/365 nm), mesurées pour les photoproduits formés et les composés témoins préparés, dans différentes conditions d'élution :

Photoproduits majoritaires			Composés témoins			Conditions d'élution CLHP
composé irradié	t _R	A		t _R	A	
8MOP ^a	5mn35	18,1	8MOPCO ₂ H	5mn35	18,7	PE 50 pH5
	5mn35	18,5		5mn35	18,2	EI 60 pH5
Thy-C ₄ -8Pso ^a	6mn25	20,8	Thy-C ₄ -8PsoCO ₂ H	6mn25	19,8	PE 50 pH5
	7mn50	20		7mn40	22	EI 50 pH5
Thy-C ₁₂ -8Pso ^b	6mn25	20,6	Thy-C ₁₂ -8PsoCO ₂ H	6mn25	20,1	PE 80 pH5
	6mn35	20,8		6mn40	20,8	EI 80 pH5

Tableau 25 : Caractéristiques CLHP des produits formés lors de l'irradiation des composés 8MOP 1, Thy-C₄-8Pso 6d, Thy-C₁₂-8Pso 6l comparées avec celles des composés témoins 8MOPCO₂H 17, Thy-C₄-8PsoCO₂H 19 et Thy-C₁₂-8PsoCO₂H 20. a : Irradiation dans un mélange eau-éthanol 95 : 5 . b : Irradiation dans un mélange eau-éthanol 50 : 50 .

Photoproduits majoritaires			Composés témoins			Conditions d'élution CLHP
Composés irradiés	t _R	A		t _R	A	
8MOP	10mn35	9,0	8MOPCO ₂ Et	10mn35	8,6	PE 50
Thy-C ₄ -8Pso	10mn45	10,4	Thy-C ₄ -8PsoCO ₂ Et	10mn40	10,1	PE 50
Thy-C ₁₂ -8Pso	10mn55	10,9	Thy-C ₁₂ -8PsoCO ₂ Et	11mn00	10,3	PE 80

Tableau 26 : Caractéristiques CLHP des photoproduits formés lors de l'irradiation dans l'éthanol des composés 8MOP 1, Thy-C₄-8Pso 6d, Thy-C₁₂-8Pso 6f comparées à celle des composés témoins 8MOPCO₂Et 18, Thy-C₄-8PsoCO₂Et 21, Thy-C₁₂-8PsoCO₂Et 22.

3) Etude des propriétés de quelques photoproduits :

a) Détermination des pKa du composé 8MOPCO₂H 17 :

* Détermination par spectroscopie UV :

Une solution mère à 10^{-3} moles/l du composé 17 dans l'éthanol a été diluée 20 fois de façon à obtenir 5 solutions aqueuses de pH différents contenant 5 % d'éthanol et $5 \cdot 10^{-5}$ moles/l du composé 17 :

- Une solution diluée avec de l'acide chlorhydrique N.
- Une solution tamponnée à pH = 5 avec un mélange acétate de sodium-acide acétique 0,02M.
- Une solution tamponnée à pH=7 avec un mélange monohydrogénophosphate de sodium-dihydrogénophosphate de sodium 0,02M.
- Une solution tamponnée à pH = 9,2 avec un mélange borate de soude 0,01 M-acide borique.
- Une solution diluée avec de la soude 0,01 N.

Les valeurs des pKa du composé 17 ont été déterminées à partir des spectres UV de ces 5 solutions enregistrés à 20°C.

* Détermination par pH métrie :

Le composé 8MOPCOOH 17 (20 mg ; 0,085 mmol) est dissous dans l'éthanol (20 cm³) et titrée par pH métrie avec de la soude 0,01N. (pH mètre TACUSSEL TS 70/N, électrode de verre et électrode au chlorure mercurique).

b) Etudes de fluorescence :

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés avec un spectrofluorimètre différentiel absolu FICA 55000 dans des cellules carrées de 1cm de côté. Les solutions des produits étudiés possèdent une densité optique d'environ 0,1 à la longueur d'onde d'excitation. Les largeurs de bandes passantes à l'excitation et à l'émission sont de 7,5 nm. Les rendements

quantiques ont été déterminés en utilisant le bisulfate de quinine en solution dans l'acide sulfurique N comme standard de fluorescence (122). Une correction d'indice de réfraction des solvants utilisés a été effectuée.

4) Photoréactions dans le cristal : Photodimères des composés Thy-C₅-8Pso 6e et Thy-C₅-4',5'dh8Pso 10e : 23 et 24.

Préparation des cristaux :

Le composé à cristalliser Thy-C₅-8Pso 6e ou Thy-C₅-4',5'dh8Pso 10e est dissous à chaud dans l'éthanol (50 mg dans environ 250 cm³ ; environ 2,5.10⁻⁴ moles/l). On laisse évaporer plusieurs mois la solution à température ambiante à l'abri de la lumière et de la poussière, jusqu'à obtention des cristaux. Les cristaux sont filtrés, lavés avec de l'éthanol puis séchés.

Obtention des photodimères :

Les cristaux sont étalés sur le fond d'un récipient en pyrex bouché et sont laissés à la lumière du jour pendant 4 à 8 semaines. Les cristaux irradiés sont ensuite pulvérisés en présence de chlorure de méthylène dans une cuve à ultra-sons. Le solide blanc insoluble obtenu est filtré, lavé plusieurs fois avec du dichlorométhane puis séché. Les photodimères sont ainsi obtenus à l'état pur (CLHP, analyse) sous la forme de poudres blanches insolubles dans la plupart des solvants organiques (solubilité dans l'éthanol < 5.10⁻⁶ moles/l). Leur analyse est possible dans le DMSO mais leur solubilité dans ce solvant reste faible.

Photodimère 23 .

F = 247-249°C (décomposition)

RMN (DMSO-d₆) : δ ppm = 11,1 (s large, 2H, 2NH) ; 7,94 (d, 2H, J=2 Hz, 2C5'H) ; 7,47 (d, 2H, J < 1Hz, 2C6'H Thy) ; 7,15 (s, 2H, 2C5'H) ; 6,91 (d, 2H, J=2 Hz, 2C4'H) ; 4,30 (m, 6H, 2(O-CH₂) et 2H du cyclobutane) ; 1,68 (d, 6H, J < 1 Hz, 2CH₃Thy) ; 1,2 à 2,0 (m, 12H, 2(CH₂)₃).

Masse ; m/e ; M=792,81 :

Impact électronique : 792 (4,3 ; M⁺-H) , 202 (31), 195 (100 ; Thy-(CH₂)₅).

Ionisation chimique (méthane) : 794 (100 ; MH⁺), 793 (54 ; M⁺) ; 397 (13 ; (Thy-C₅-8Pso+H)⁺).

Analyse, C₄₂H₄₀N₄O₁₂ :

Calc. % :	C	63,63	H	5,09	N	7,07
Tr. % :		63,37		5,12		7,18

Photodimère 24.

F = 239-241°C (décomposition)

RMN (DMSO-d₆) : δ ppm = 11,10 (s large), 2H, 2NH) ; 7,48 (d, 2H, J<1 Hz, 2C6H Thy) ; 6,72 (s, 2H, 2C5H) ; 4,53 (t, 4H, J=9 Hz, 2(O-CH₂)) ; 4,00 (m, 6H, 2C5'H₂ et 2H du cyclobutane) ; 3,60 (m, 6H, 2C4'H₂ et 2H du cyclobutane) ; 3,10 (t, 4H, J=9 Hz, 2(N-CH₂)) ; 1,69 (d, 6H, J < 1 Hz, 2CH₃ Thy) ; 1,00 à 2,00 (m, 12H, 2(CH₂)₃).

Masse ; m/e ; M=796,84 :

Impact électronique : 398 (11 ; (Thy-C₅-4',5'dh8Pso)⁺), 195 (100 ; Thy-(CH₂)₅⁺).

Ionisation chimique (méthane) : 798 (100 ; MH⁺), 399 (32 ; (Thy-C₅-4',5'dh 8Pso+H)⁺).

Analyse, C₄₂H₄₄N₄O₁₂ :

Calc. % :	C	63,31	H	5,57	N	7,03
Tr. % :		62,99		5,57		7,04.

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

1. A. MUSTAFA : "Furopyrans and Furopyrones" (J. WILEY Ed.), Interscience, New-York, 1967, pp. 14-90.
2. W.L. FOWIKS, J. Invest. Dermatol., 1959, 32, 249-254.
3. P.S. SONG et K.J. TAPLEY, Jr. , Photochem. Photobiol., 1979, 29, 1177-1197.
4. "Psoralens in Cosmetics and Dermatology", Proceedings of the International Symposium, Pergamon Press, 1981.
5. T.B. FITZPATRICK et M.A. PATHAK, J. Invest. Dermatol., 1965, 32, 225-238.
6. H. KUSKE, Arch. Dermatol. Syph., 1938, 178, 112-123.
7. J.A. PARRISH, T.B. FITZPATRICK, L. TANENBAUM et M.A. PATHAK, New Engl. J. Med., 1974, 291, 1207-1222.
8. A. SARASIN, La Recherche, 1982, 920-923.
9. M.J. ASHWOOD-SMITH, G.A. POULTON, M. BARKER et M. MILDENBERGER, Nature, 1980, 285, 407-409.
10. G. CAPORALE, L. MUSAJO, G. RODIGHIERO et F. BACCICHETTI, Experientia , 1967, 23, 985-986.
11. L. MUSAJO et G. RODIGHIERO, Photophysiology, 1972, 7, 115-147.
12. T.O. SOINE, J. Pharm. Sci., 1964, 53, 231-264.
13. D.D. GRUBE, R.D. LEY et R.J. FRY, Photochem. Photobiol., 1977, 25, 269-276.
14. F. ZAJDELA et E. BISAGNI, Carcinogenesis, 1981, 2, 121-127.
15. D.A. GREKIN et J.H. EPSTEIN, Photochem. Photobiol., 1981, 33, 957-960.
16. G. RODIGHIERO et F. DALL'ACQUA, Photochem. Photobiol., 1976, 24, 647-653.
17. B.J. PARSONS, Photochem. Photobiol., 1980, 32, 813-821.
18. J.E. HEARST : "Chemical and Biological Applications of Lasers" (C. BRADLEY MOORE Ed.), Academic Press, New-York, San Francisco, Londres, 1979, Vol. IV, pp. 389-403.

19. P.S. SONG et C.N. OU, *Annals New-York Academy of Sciences*, 1980, 355-367.
20. J.E. HEARST, *J. Invest. Dermatol.*, 1981, 77, 39-44.
21. L. MUSAJO et G. RODIGHIERO: "Research Progress in Organic, Biological and Medical Chemistry" (U. GALLO et L. SANTAMARIA Ed.), Elsevier Publishing Compagny Inc., New-York, 1972, Vol. 3, Part I, pp 155-182.
22. F.M. VERONESE, O. SCHIAVON, R. BEVILACQUA, F. BORDIN et G. RODIGHIERO, *Photochem. Photobiol.*, 1982, 36, 25-30.
23. M. GRANGER, F. TOULME et C. HELENE, *Photochem. Photobiol.*, 1982, 36, 175-180.
24. L. DUBERTRET, D. AVERBECK, F. ZAJDELA, E. BISAGNI, E. MOUSTACCHI, R. TOURAINÉ et R. LATARJET, *Brit. J. Dermatol.*, 1978, 101, 379-389.
25. F. GABORIAU, P. VIGNY, D. AVERBECK et E. BISAGNI, *Biochimie*, 1981, 63, 899-905.
26. J.C. RONFART-HARET, D. AVERBECK, R.V. BENSASSON, E. BISAGNI, E.J. LAND, *Photochem. Photobiol.*, 1982, 35, 479-489.
27. R. MULLER RUNCKEL et L.I. GROSSWEINER, *Photochem. Photobiol.*, 1981, 33, 399-402.
28. L. MUSAJO, F. BORDIN, G. CAPORALE, S. MARCIANI et G. RIGATTI, *Photochem. Photobiol.*, 1967, 6, 711-719.
29. L. MUSAJO, F. BORDIN et R. BEVILACQUA, *Photochem. Photobiol.*, 1967, 6, 927-931.
30. S.C. SHIM et K.H. CHAE, *Photochem. Photobiol.*, 1979, 30, 349-353.
31. B.S. HAHN, P.C. JOSHI, L.S. KAN et S.Y. WANG, *Photobiochem. Photobiophys.*, 1981, 2, 113-124.
32. E.J. LAND, F.A. RUSHTON, R.L. BEDDOES, J.M. BRUCE, R.J. CERNIK, S.C. DAWSON et O.S. MILLS, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1982, 22-23.
33. J. CADET, L. VOITURIEZ, F. GABORIAU, P. VIGNY et S. DELLA NEGRA, *Photochem. Photobiol.*, sous presse.
34. F. WESSELY et J. KOLTAN, *Monatsh. Chem.*, 1955, 86, 430-436.
35. G. RODIGHIERO et V. CAPPELLINA, 1961, *Gazz. Chim. Ital.*, 1961, 91, 103-114.
36. J. GERVAIS et F.C. DE SCHRYVER, *Photochem. Photobiol.*, 1975, 21, 71-75.
37. J. GERVAIS, N. BOENS et F.C. DESCHRYVER, *Nouv. J. Chim.*, 1979, 3, 163-169.

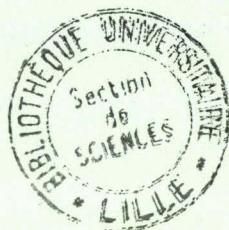
38. K. STRAUB, D. KANNE, J.E. HEARST et H. RAPOPORT, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 2347-2355.
39. D. KANNE, K. STRAUB, H. RAPOPORT et J. E. HEARST, *Biochemistry*, 1982, 21, 861-871.
40. D. KANNE, K. STRAUB, J.E. HEARST et H. RAPOPORT, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 6754-6764.
41. J. BOLTE, C. DEMUYNCK et J. LHOMME, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, 98, 613-615.
42. J. BOLTE, C. DEMUYNCK et J. LHOMME, *J. Med. Chem.*, 1977, 20, 106-113.
43. J. BOLTE, C. DEMUYNCK et J. LHOMME, *J. Med. Chem.*, 1977, 20, 1607-1611.
44. J. BOLTE, C. DEMUYNCK et J. LHOMME, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1980, 316-320.
45. J. BOLTE, C. DEMUYNCK, J. LHOMME, M.C. FOURNIE-ZALUSKI et B.P. ROQUES, *Biochemistry*, 1979, 18, 4928-4935.
46. J. BOLTE, C. DEMUYNCK, M.F. LHOMME, J. LHOMME, J. BARBET et B.P. ROQUES, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 760-765.
47. A. CASTELLAN et J.P. DESVERGNE, *Photochem. Photobiol.*, 1981, 34, 183-186.
48. G. BRAVIC, J.P. BIDEAU et C. COURSEILLE, *Acta Cryst.*, 1982, B38, 2075-2077.
49. J.P. BIDEAU, G. BRAVIC, C. COURSEILLE, A. CASTELLAN et J.P. DESVERGNE, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, 1982, 17, 95-96.
50. C.H. KRAUCH, D.M. KRAMER et A. WACKER, *Photochem. Photobiol.*, 1967, 6, 341-354.
51. C.N. OU et P.S. SONG, *Biochemistry*, 1978, 17, 1054-1059.
52. E.J. LAND et T.G. TRUSCOTT, *Photochem. Photobiol.*, 1979, 29, 861-866.
53. R.V. BENSASSON, C. SALET, E.J. LAND et F.A. RUSHTON, *Photochem. Photobiol.*, 1980, 31, 129-133.
54. D.T. BROWNE, J. EISINGER et N.J. LEONARD, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, 90, 7302-7323.
55. N.J. LEONARD et R.F. LAMBERT, *J. Org. Chem.*, 1969, 34, 3240-3248.
56. N.J. LEONARD, *Accounts Chem. Research*, 1979, 12, 423-429.
57. W. GUSCHLBAUERE : "Nucleic Acid Structure" (Heidelberg Science Library), Springer-Verlag, New-York, Heidelberg, Berlin, 1976, Vol. 21.
58. N.J. LEONARD, R.S. Mc CREEDIE, M.W. LOGUE et R.L. CUNDALL, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, 95, 2320-2324.

59. A. SCHONBERG et A. SINA, J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 4826-4828.
60. A. SCHONBERG et G. AZIZ, J. Am. chem. Soc., 1953, 75, 3265-3266.
61. M.E. BROKKE et B.E. CHRISTENSEN, J. Org. Chem., 1959, 24, 523-526.
62. G.V. PIGULEVSKII et G.A. KUZNETSOVA, Chem. Abst., 1949, 43, 3416.
63. C. ANTONELLO, S. MARCIANI-MAGNO, O. GIA, F. CARLASSARE, F. BACCICHETTI et F. BORDIN, Farmaco, 1979, 34, 139-156.
64. C. LAGERCRANTZ, Acta Chem. Scand., 1956, 10, 647-654.
65. M.E. BROKKE et B.E. CHRISTENSEN, J. Org. Chem., 1958, 23, 589-596.
66. "Handbook of Biochemistry" (H.A. SOBER Ed.), The chemical Rubber Co., Cleveland, 1968, pp G-21 et G-50.
67. C. ALLEN BUSH et P.O.P. TS'O : "Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry" (P.O.P. TS'O Ed.), Academic press, New-York, Londres, 1974, Vol. II, pp. 91-169 et pp 305-469.
68. I. TINOCO, Jr., J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 4785-4790 ; 1961, 83, 5047.
69. W. RHODES, J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 3609-3617.
70. H. DE VOE et I. TINOCO, Jr., J. Mol. Biol., 1962, 4, 518-527.
71. K.I. OKAMOTO, A. ITAYA et S. KUSABAYASHI, Chem. Letters, 1974, 1167-1172.
72. H. SIMPKINS et E.G. RICHARDS, J. Mol. Biol., 1967, 29, 349-356.
73. M.M. WARSHAW et I. TINOCO Jr., J. Mol. Biol., 1966, 19, 29-38.
74. K. MUTAI, B.A. GRUBER et N.J. LEONARD, J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 4095-4104.
75. D.O. JORDAN : "Molecular Associations in Biology" (B. PULLMAN Ed.), Academic Press, New-York, Londres, 1968, pp 221-243.
76. T. OKANO, T. HORIE, T. WATANABE, T. TAKAHASHI et A. TAKADATE, Yakugaku Zasshi, 1976, 96, 1334-1341.
77. S. TAKASHIMA, Biopolymers, 1969, 8, 199-216.
78. D. GLAUBIGER, D. A. LLOYD et I. TINOCO Jr., Biopolymers, 1968, 6, 409-414.
79. P.O.P. TS'O, N.S. KONDO, M.P. SCHWEIZER et D.P. HOLLIS, Biochemistry, 1969, 8, 997-1029.
80. N.S. KONDO, H.M. HOLMES, L.M. STEMPEL et P.O.P. TS'O, Biochemistry, 1970, 9, 3479-3498.

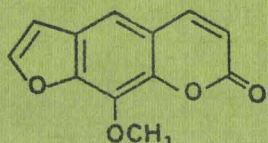
81. J. BARBET, B.P. ROQUES, S. COMBRISSEON et J.B. LE PECQ, *Biochemistry*, 1976, 12, 2642-2650.
82. B. GAUGAIN, J. BARBET, R. OBERLIN, B.P. ROQUES et J.B. LE PECQ, *Biochemistry*, 1978, 24, 5071-5078.
83. G.C. GOYAL et L.I. GROSSWEINER, *Photochem. Photobiol.*, 1979, 29, 847-850.
84. J. BRAHMS, J.C. MAURIZOT et A. MICHELSON, *J. Mol. Biol.*, 1967, 25, 481-495.
85. R.C. DAVIES et I. TINOCO, Jr., *Biopolymers*, 1968, 69, 223-242.
86. J.T. POWELL, E.G. RICHARDS et W.B. GRATZER, *Biopolymers*, 1972, 11, 235-250.
87. N.S. KONDO, K.N. FANG, P. S. MILLER et P.O.P. TS'O, *Biochemistry*, 1972, 11, 1991-2003.
88. L.B. CLARK et I. TINOCO, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, 87, 11-15.
89. T.A. MOORE, M.L. HARTEY et P.S. SONG, *J. Mol. Spectroscopy*, 1971, 40, 144-157.
90. H. MATSUMOTO et Y. OHKURA, *Chem. Pharm. Bull.*, 1978, 26, 3433-3439.
91. G. GIESSNER-PRETTRE et B. PULLMAN, *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 1976, 70, 578-581.
92. F. DALL'ACQUA, M. TERBOJEVICH, S. MARCIANI, D. VEDALDI et M. RECHER, *Chem. Biol. Interactions*, 1978, 21, 103-115.
93. C.N. OU, C.H. TSAI, K.J. TAPLEY, Jr. et P.S. SONG, *Biochemistry*, 1978, 17, 1047-1053.
94. R.V. BENSASSON, E.J. LAND et C. SALET, *Photochem. Photobiol.*, 1978, 27, 273-280.
95. M.T. SA E MELO, D. AVERBECK, R.V. BENSASSON, E.J. LAND and C. SALET, *Photochem. Photobiol.*, 1979, 30, 645-651.
96. P.C. BEAUMONT, B.J. PARSONS, S. NAVARATNAM, G.O. PHILIPS et J.C. ALLEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 608, 259-265.
97. P.C. BEAUMONT, B.J. PARSONS, G.O. PHILIPS et J.C. ALLEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 562, 214-221.
98. R.W. SLOPER, T.G. TRUSCOTT et E.J. LAND, *Photochem. Photobiol.*, 1979, 29, 1025-1029.
99. M. CRAW, R.V. BENSASSON, J.R. RONFARD-HARET, M.T. SA E MELO et T.G. TRUSCOTT, *Photochem. Photobiol.*, sous presse.

100. F. TJERNELD, B. NORDEN et B. LJUNGGREN, Photochem. Photobiol., 1979, 29, 1115-1118.
101. W.V. SHERMAN et L.I. GROSSWEINER, Photochem. Photobiol., 1981, 34, 579-582.
102. N.J. DE MOL, G.M.J. BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN et B. VAN BEELE, Photochem. Photobiol., 1981, 34, 661-666.
103. H.H. WASSERMAN et D.R. BERDAHL, Photochem. Photobiol., 1982, 35, 565-567.
104. M.K. LOGANI, W.A. AUSTIN, B. SHAH et R.E. DAVIES, Photochem. Photobiol., 1982, 35, 569-573.
105. P.S. SONG, M.L. HARTER, T.A. MOORE et W.C. HERNDON, Photochem. Photobiol., 1971, 14, 521-530.
106. S.C. SHIM, H.Y. KOH et D.Y. CHI, Photochem. Photobiol., 1981, 34, 177-182.
107. F. DALL'ACQUA, S. MARCIANI MAGNO, F. ZAMBON et G. RODIGHIERO, Photochem. Photobiol., 1979, 29, 489-495.
108. K. BOWDEN, M.J. HANSON et G.R. TAYLOR, J. Chem. Soc. (B), 1968, 174-177.
109. "Handbook of Spectroscopy" (J.W. ROBINSON Ed.), CRC Press, Cleveland, 1974, Vol II, Section F, p 370.
110. W. GRUBER, Monatsh., 1944, 75, 14-24.
111. F. FEIGL, H.E. FEIGL et D. GOLDSTEIN, J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 4162-4163.
112. "Aspects of Organic Photochemistry" (W.M. HORSPOOL Ed.), Academic Press, Londres, New-York, San Francisco, 1976, pp 221-222.
113. C.D. GUTSCHE et B.A. OUDE-ALINK, J. Am. Chem. Soc., 1968, 90, 5855-5861.
114. O.L. CHAPMAN, C.L. Mc INTOSH, J. Am. Chem. Soc., 1969, 91, 4309-4310.
115. S. PECKLER, B. GRAVES, D. KANNE, H. RAPOPORT, J. HEARST et S.H. KIM, J. Mol. Biol., 1982, 162, 157-172.
116. M. HASEGAWA, Y. SUZUKI et N. KITA, Chem. Letters, 1972, 317-320.
117. F. WESSELY et K. DINJASKI, Monatsch. Chem., 1934, 64, 131.
118. G. RODIGHIERO, F. DALL'ACQUA et G. CHIMENTI, Ann. Chim. (Italia), 1968, 58, 551-561.

119. S. MARCIANI, F. DALL'ACQUA, P. RODIGHIERO, G. CAPORALE et G. RODIGHIERO, Gazz. Chim. Ital., 1970, 100, 435-451.
120. C.H. KRAUCH et S. FARID, Chem. Ber., 1967, 100, 1685-1695.
121. M.P. SCHWEIZER, S.I. CHAN, G.K. HELMKAMP et P.O.P. TS'O, J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 106.
122. J.B. BIRKS, J. Res. N.B.S. : A. Phys. Chem., 1976, 80A, 389-399.



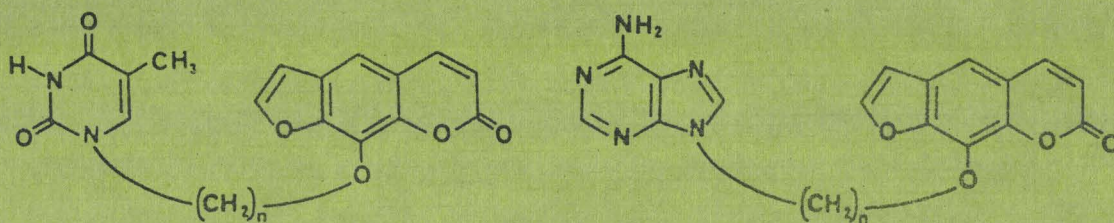
Parmi les nombreuses substances, médicaments ou composés toxiques, agissant sur les acides nucléiques, les psoralènes se distinguent par leurs nombreux effets photobiologiques : effet thérapeutique sur des maladies de peau (vitiligo, psoriasis), pigmentogène, mutagène.....



Méthoxy-8 Psoralène

Ces effets sont généralement attribués aux photoréactions des psoralènes avec les bases pyrimidiques de l'ADN. Bien que très étudié, le mécanisme de cette action photochimique n'est pas complètement élucidé.

Dans ce travail, nous présentons une contribution à l'étude du mode d'action du méthoxy-8 psoralène par une approche originale : la synthèse et l'étude de modèles qui associent psoralène et base nucléïque.



Mots-clés : HETEROCYCLE, PSORALENE, THYMINE, ADENINE, INTERACTION VAN DER WAALS, INTERCALATION MOLECULAIRE, HYPOCHROMISME, PHOTOCHEMIE.