

50376
1983
63

N° d'ordre : 1096

50376
1983
63

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

par

Jean-François CONSTANT



MODELES DU COMPLEXE D'INTERCALATION ADN-ACRIDINE : SYNTHÈSE ET ETUDES SPECTROSCOPIQUES

Soutenue le 18 Octobre 1983 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

MM.

B.P.

ROQUES
L'HOMME

J.

PETIT

F.

PONSINET

G.

Président
Rapporteur
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. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
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. BEUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
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. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
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. 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. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
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. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
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. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques

Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertziennne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
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
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 MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
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. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
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
M. WARTEL Michel
M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN Justin Nicole

Spectrochimie Infrarouge et Raman
Chimie Inorganique
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 J. LHOMME.

Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour les enseignements et les conseils qu'il m'a prodigués et pour la disponibilité dont il a su faire preuve tout au long de mon travail.

J'exprime ma reconnaissance à Mrs J.E. ANDERSON, Professeur à l'University Collège de LONDRES ainsi qu'à Mr. J. MELLOR, Professeur à l'Université de SOUTHAMPTON pour les discussions fructueuses que nous avons eues lors de leurs séjours au laboratoire.

Je remercie Mr. J. NICOLE, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie et Mr. A. DELANNOY de son laboratoire, pour la part qu'ils ont prise dans ce travail en effectuant les dosages acido-basiques indispensables pour certaines études.

J'exprime mes vifs remerciements à Mrs. B.P. ROQUES, F. PETIT et G. PONSINET qui ont accepté de constituer le Jury de cette thèse.

Je tiens également à remercier J. BARBET qui a mené toutes les études de nos molécules par RMN du proton à 270 MHz au laboratoire du Professeur B.P. ROQUES.

Je remercie le Professeur J. LAVAL de l'Institut Gustave Roussy de VILLEJUIF ainsi que son équipe pour l'accueil qu'ils m'ont réservé lors de mon séjour dans leur laboratoire.

Je remercie chaleureusement mes camarades de laboratoire pour leur aide et leur amitié et tout particulièrement B.M. CARDEN qui a guidé mes premiers pas dans ce travail.

Je tiens également à remercier tous ceux qui ont permis la réalisation de ce mémoire.

Mrs. B. MOUCHEL et P. WATKIN du service de RMN pour leurs conseils et leur aide technique.

Mr. G. RICART responsable du spectromètre de masse.

Mme J. RICART qui a réalisé avec beaucoup de mérite la dactylographie de ce mémoire.

Mme L. SAINLEGER qui en a réalisé l'impression.

Mme R. DRUON et Mr. F. DUPLATEAU qui ont participé activement et avec beaucoup de gentillesse à la réalisation de ce manuscrit.

S O M M A I R E

=====
=====

INTRODUCTION	1
SYNTHESE	16
A. Préparation des modèles en série adénine et thymine.....	19
I. 1ère voie de synthèse.....	19
1. Série adénine.....	20
2. Série thymine.....	21
3. Préparation des composés de référence Ade-C ₃ ; 8 et Thy-C ₃ ; 9.....	22
II. 2ème voie de synthèse.....	22
B. Préparation des modèles en série guanine.....	26
I. Synthèse du précurseur : pyr ; 24.....	29
II. Réactions d'amination du précurseur.....	32
1. Dérive pyr-C ₃ ; 30.....	32
2. Dérivé pyr-C _n -NH ₂ ; 28 et 29.....	32
III. Réaction de cyclisation.....	
IV. Préparation des modèles Gua-C _n -Acr : 34 et 35.....	37
ETUDES PHYSICOCHIMIQUES	39
A. Spectrophotométrie UV.....	40
I. Principe de la méthode.....	40
II. Etude des modèles.....	45
1. Enregistrement des spectres.....	45
2. Calcul de %H.....	47
3. Effet de la température : force des interactions.....	51
a. Série adenine.....	51
b. Série thymine.....	54
c. Série guanine.....	56

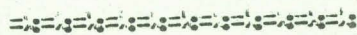
B. Etude par RMN.....	57
I. Principe de la méthode.....	57
II. Auto-association (interactions intermoléculaires)....	60
1. Méthode de calcul des constantes d'auto-association.....	61
2. Effets de la dilution sur les modèles et leurs références.....	61
a. Composés de référence.....	61
b. Effets de la dilution sur les modèles Base-C _n -Acr.....	64
1 ^o) Modèles en série thymine.....	64
2 ^o) Modèles en série adénine.....	68
3 ^o) Modèles en série guanine.....	70
III. Interactions intramoléculaires.....	72
1. Série adénine.....	72
2. Série thymine.....	76
3. Série guanine.....	79
IV. Effet de la température.....	80
C. Nature des interactions - Influence du solvant.....	88
I. Effet du solvant sur le composé de référence Acr-C ₃ ; 7.....	88
II. Etude des modèles.....	89
D. Etudes par fluorescence.....	92
I. Principe de la méthode.....	92
II. Etude des modèles.....	94

**ETUDES PRELIMINAIRES DES MODELES EN PRESENCE DES BASES
COMPLEMENTAIRES.....** 97

A. Etude par spectrophotométrie UV.....	99
B. Etude par fluorescence.....	101

<u>ETUDE DE L'INFLUENCE DES MODELES Ade-C_n-Acr ET Thy-C_n-Acr SUR L'ACTIVITE</u>	
<u>DES ENDONUCLEASES A ET B DE MICROCOCCUS LUTEUS.....</u>	103
<u>ACTIVITES BIOLOGIQUES.....</u>	108
A. Tests antimalariques.....	109
I. Principe.....	109
II. Résultats.....	109
B. Effets sur les promastigotes.....	110
I. Principe.....	110
II. Résultats.....	111
<u>CONCLUSION.....</u>	112
<u>PARTIE EXPERIMENTALE.....</u>	117
A. Indications générales.....	118
B. Synthèse des modèles et de leurs références.....	119
C. Etudes physicochimiques.....	145
I. Etude par spectrophotométrie UV.....	145
II. Etudes par spectroscopie de RMN.....	146
III. Etudes par fluorescence.....	149
IV. Etudes préliminaires avec les endonucléases A et B	
de Micrococcus Luteus.....	149
<u>LEXIQUE DES STRUCTURES.....</u>	150 à 152
<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	153

INTRODUCTION



Parmi les nombreuses macromolécules impliquées dans les processus vitaux de la cellule, les acides nucléiques, en particulier l'ADN, jouent un rôle fondamental.

Depuis 1953, grâce aux travaux de WATSON et CRICK (1), on connaît la structure de cette macromolécule. Elle est constituée de deux chaînes polynucléotidiques qui s'apparient l'une à l'autre de façon antiparallèle et forment une double hélice (Figure 1).

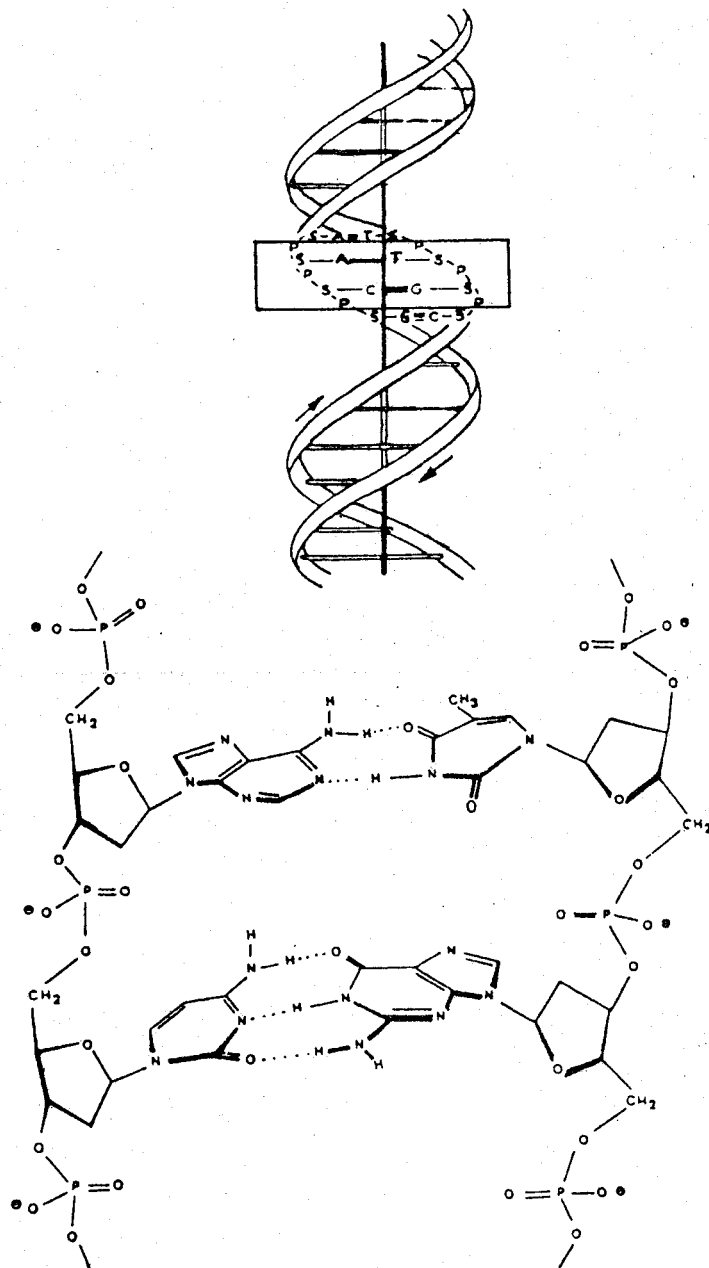


Figure 1 : Schéma de la double hélice de l'ADN (d'après J.D. WATSON et F.H.C. CRICK.

La cohésion de la macromolécule est assurée par les interactions d'empilement (stacking) mises en jeu entre les bases d'un même brin et par les liaisons de type hydrogène entre bases complémentaires.

Dans tout ce qui suit, nous limiterons la discussion à la structure B de l'ADN, bien que de toute évidence, les travaux récents montrent qu'il s'agisse d'une extrême simplification. Le polymère existe également sous une forme dynamique Z (2) (Figures 2 et 3). L'information génétique contenue dans l'ADN est codée par la séquence de ses bases nucléotidiques. La protection du code génétique passe donc par la sauvegarde de ses constituants les plus importants : les bases nucléotidiques.

La structure de l'ADN constitue en elle-même une protection efficace. En effet, l'enroulement en double spirale et les interactions mises en jeu entre les noyaux des bases nucléotidiques rejettent ces derniers vers l'intérieur de la macromolécule. Dans cette position, ils deviennent plus difficilement accessibles aux agents extérieurs (3) (Figure 2).

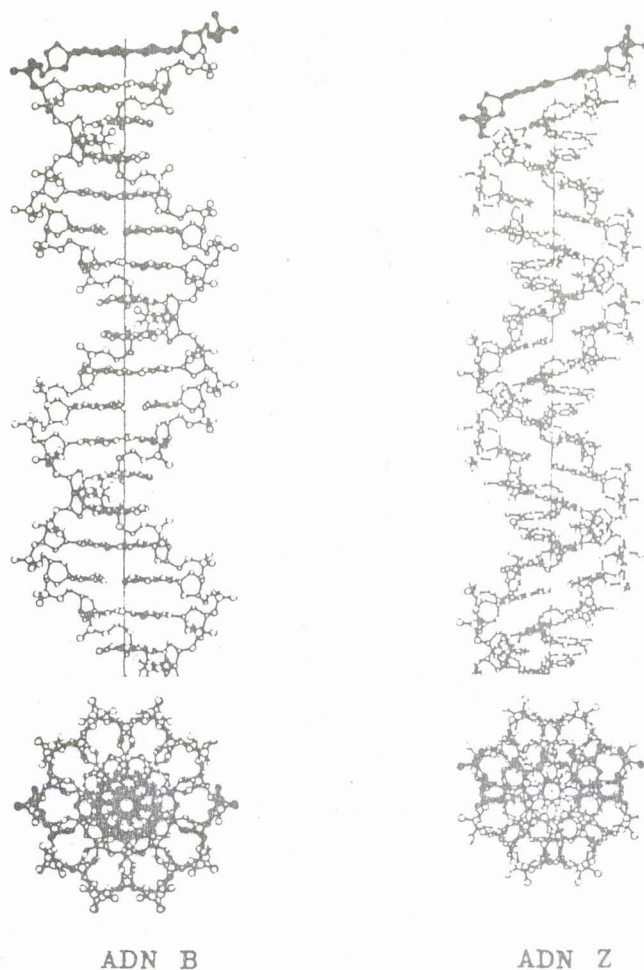


Figure 2 : Formes B et Z de l'ADN.

De plus, les plateaux des bases sont distants d'environ 3,4 Å ce qui correspond à l'épaisseur des noyaux aromatiques qui sont en contact (Figure 3).

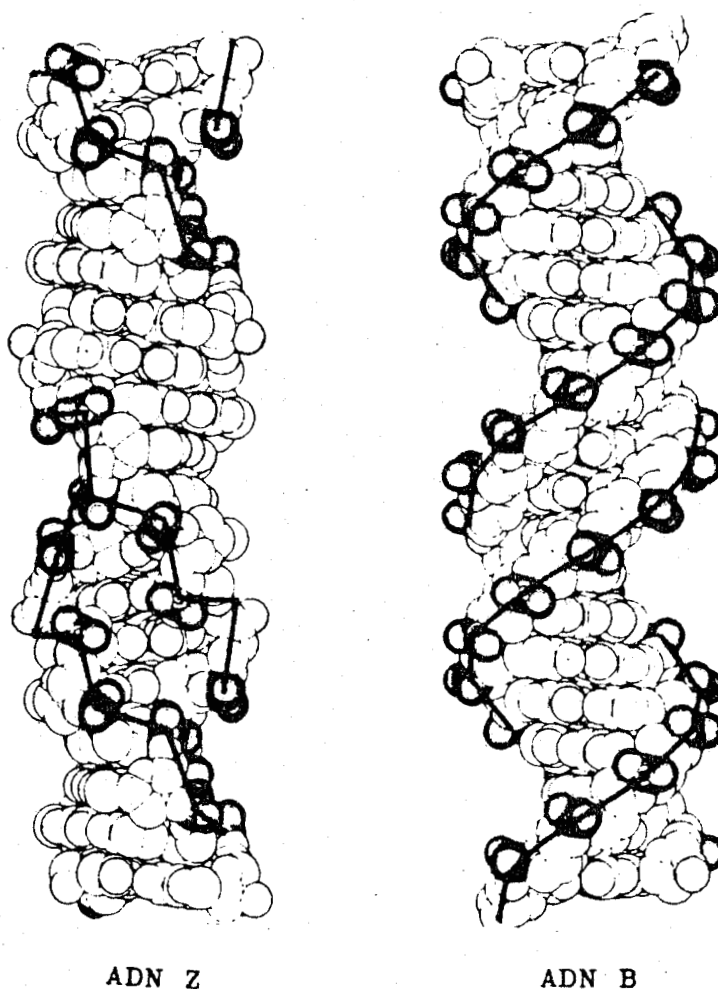


Figure 3 : Formes B et Z de l'ADN : représentation à l'aide de modèles moléculaires compacts

Cependant, des études récentes ont montré que l'ADN n'est pas aussi rigide que l'on pensait. Le squelette ribose-phosphate peut se déformer, l'empilement des bases peut disparaître momentanément. Dans certains cas, on pourrait même assister à un bref désappariement des bases nucléotidiques.

Cette flexibilité de l'ADN a été mise en évidence par des mesures de fluorescence (4) et des études de relaxation en RMN ^1H , ^{13}C ou ^{31}P (5-7).

Ce sont sans doute ces déformations qui rendent compte de la facilité avec laquelle certaines molécules à noyau aromatique plan peuvent se complexer à l'ADN en venant s'insérer entre deux plateaux de bases. Ce phénomène : L'INTERCALATION à fait l'objet de nombreux travaux.

Il a été postulé par PEACOCKE en 1956 (8) pour des composés aromatiques à noyau acridine. LERMAN l'a démontré pour la proflavine en 1961 (9) et l' amino-9 acridine (10).

Ce type d'études a été étendu à d'autres familles de dérivés aromatiques. De nombreux composés ont montré cette aptitude à l'intercalation (Figure 4). Ils peuvent présenter des propriétés biologiques diverses.

Certains comme l'actinomycine D, la daunorubicine et l'adriamycine, appartiennent à la classe des antibiotiques et sont utilisés dans la chimiothérapie anticancéreuse (11).

D'autres, comme les dérivés du psoralène (12), peuvent, après intercalation, réagir photochimiquement. Ils sont utilisés dans le traitement de maladies de la peau (psoriasis).

D'autres enfin, comme la chloroquine et la quinacrine ont été utilisés comme antimalariques (13). Le mécanisme d'action de cette dernière classe de médicaments n'est pas encore bien connu. Il semble cependant que l'interaction avec les acides nucléiques ne soit pas la seule explication à leur activité thérapeutique. Par contre, la quinacrine présente des effets mutagènes (14) qui sont sans doute le résultat de son intercalation dans l'ADN.

Les intercalants peuvent agir principalement de deux façons au niveau de l'ADN.

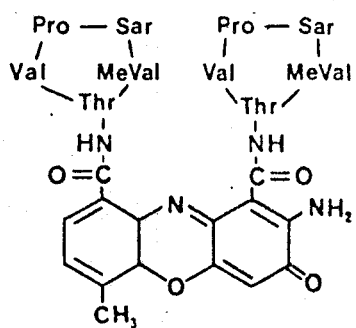
* Soit par simple insertion entre les plateaux de bases : la perturbation induite est alors plus ou moins grave selon la durée de vie du complexe ADN - Intercalant.

Ex : proflavine, quinacrine, bromure d'éthidium.

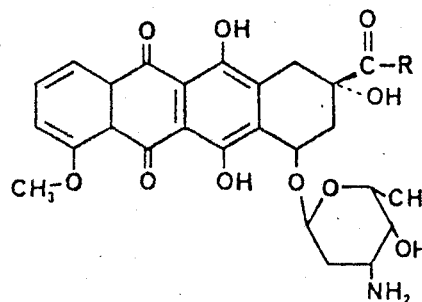
* Soit par fixation covalente : l'activation métabolique de la molécule avant intercalation la transforme en une espèce réactive capable de se fixer sur certaines bases nucléotidiques. Selon la nature de la lésion et les possibilités de réparation, les désordres causés peuvent être plus ou moins graves.

Ex : des cancérogènes comme l'acetylaminofluorène et le 4-nitroquinoléine-1 oxyde mais aussi des anticancéreux comme les dérivés de l'hydroxy-9 ellipticine (en cours de commercialisation en France) (15).

Au laboratoire, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au problème de l'intercalation de la quinacrine.

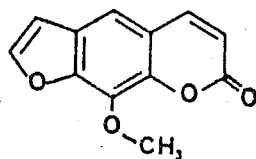


Actinomycine D

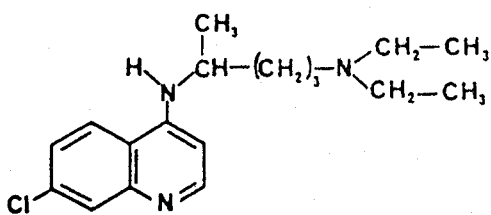


R = CH₂OH : Daunomycine

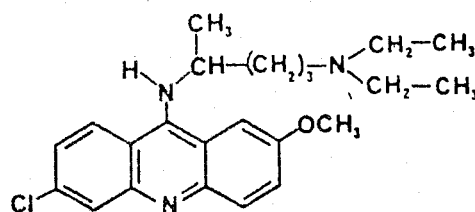
R = CH₃ : Adriamycine



Méthoxy-8 psoralène



Chloroquine



Quinacrine

Figure 4 : Structures de quelques composés à propriétés intercalantes.



Bien que la géométrie de l'ADN au site d'intercalation soit encore très discutée (16, 17), les acridines avec des dinucléosides ou des polynucléotides ont nettement montré l'existence d'interactions d'empilement entre les noyaux aromatiques des bases nucléotidiques et le noyau de l'intercalant. Ces études font appel à des techniques comme la RMN du proton (18), la RMN du phosphore (19), la cristallographie (20, 21).

Les géométries proposées par certains auteurs sont représentées dans la figure 5.

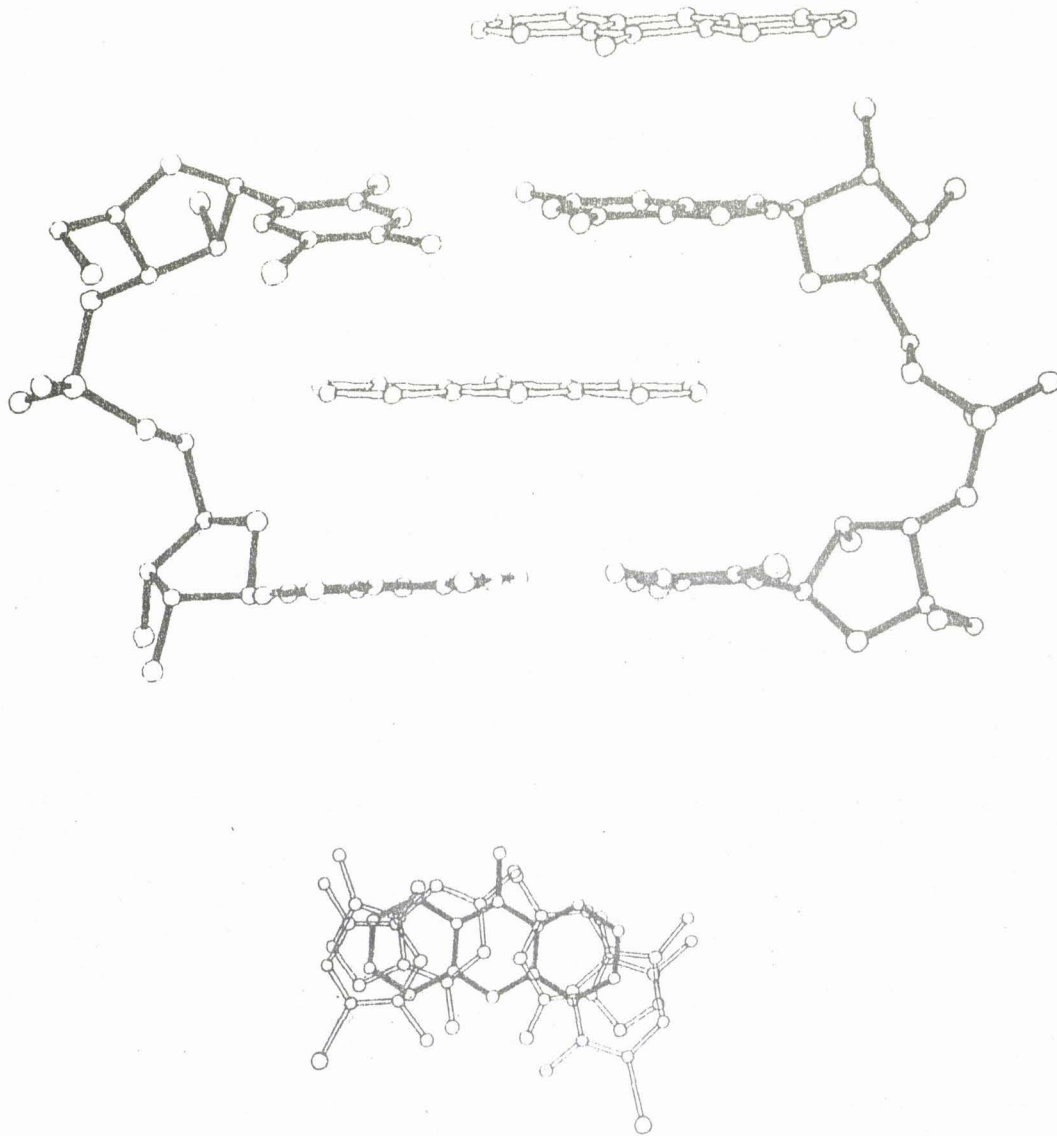
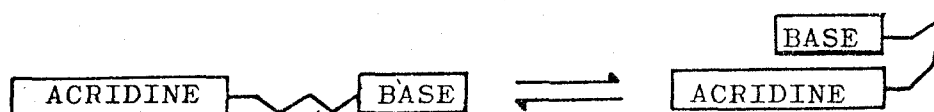


Figure 5 : Structure cristalline du complexe amino-9 acridine; iodo-5 cytidilyl(3'-5') guanosine (20).

Ces résultats posent à leur tour un certain nombre de questions intéressantes :

- * Quelle est l'importance des interactions d'empilement dans le processus d'intercalation ?
- * Quelle est la nature et la force des interactions mises en jeu ?
- * Existe-t-il une spécificité d'interaction avec une base nucléotidique particulière ?
- * Quelle est l'influence de la géométrie du complexe sur la puissance des forces mises en jeu ?

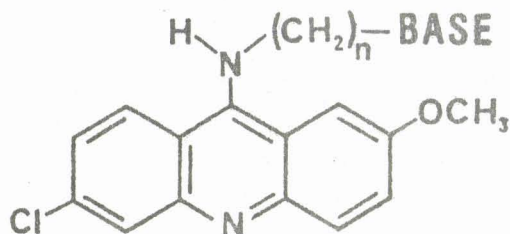
Nous avons essayé de répondre à ces questions en utilisant une approche originale basée sur la synthèse et l'étude physicochimique de modèles dans lesquels l'intercalant est relié à la base nucléotidique par une chaîne polyméthylénique souple. Si des interactions attractives intramoléculaires sont mises en jeu, de tels modèles sont susceptibles d'adopter une conformation repliée.



La mise en évidence des complexes intramoléculaires ainsi que la détermination des paramètres thermodynamiques de l'équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée" constituent une mesure qualitative et quantitative de l'interaction Intercalant-Base.

Ce type d'approche présente en outre un net avantage : il fait abstraction de toutes les interactions parasites qui peuvent se produire dans l'ADN (interactions ioniques avec les groupements phosphates, liaisons hydrogène avec les fonctions hydroxylées du ribose).

Les modèles que nous avons synthétisés pour une telle étude sont du type Base-C_n-Acr :

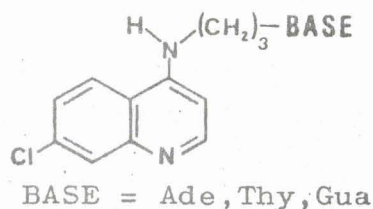
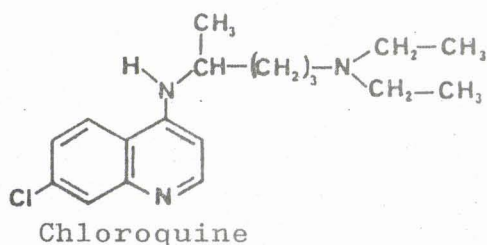


BASE = Adénine,
Thymine, Guanine.
n = 3, 5 et 6

Dans l'élaboration de ces systèmes, nous avons respecté les substitutions des deux chromophores : le point d'attache sur l'acridine se fait à la position occupée par la chaîne latérale dans la quinacrine ; la base est reliée à l'intercalant par l'intermédiaire du site occupé par la liaison N-glycosidique dans l'ADN.

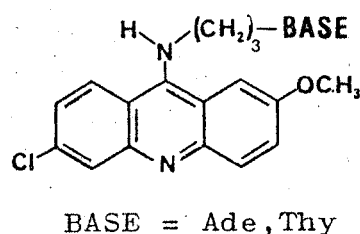
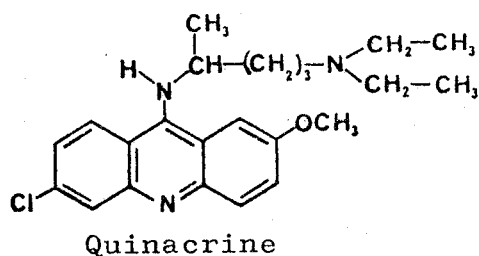
Les raisons majeures qui nous ont amérés à examiner spécifiquement ces modèles Base-C_n-Acr, dans lesquels Base = adénine, thymine, guanine et n=5 et 6, sont les suivantes :

- * Dans une première série d'études, J. BOLTE et C. DEMUYNCK avaient utilisé cette approche pour étudier les interactions "d'empilement" entre le noyau aminoquinoléine de la chloroquine et diverses bases nucléotidiques (22) (en les reliant par un chaîne triméthylénique. n = 3).



Ils avaient pu montrer notamment que les systèmes incluant une purine (adénine ou guanine) existaient sous forme totalement repliée à 20°C dans l'eau. Au delà de cette température, on voyait apparaître la conformation "ouverte". Par contre en solvant organique, et quelle que soit la température, les modèles existaient totalement sous la conformation "ouverte".

- * Des études préliminaires ont ensuite été réalisées en remplaçant le noyau quinoléine par le noyau acridine (23) dans le but d'évaluer l'influence d'un cycle aromatique complémentaire sur la nature et la puissance de l'interaction.



Les résultats sont spectaculaires : le modèle incluant l'adénine : Ade-C₃-Acr, existe sous forme totalement repliée dans l'eau, quelle que soit la température (température maximale mesurée : 80°C). En outre les interactions sont suffisamment puissantes pour ne pas disparaître totalement en présence de solvant organique (50 % de repliement observé dans l'éthanol pur).

Il nous a paru alors judicieux de poursuivre ces travaux en employant des chaînes polyméthyléniques plus longues (n = 5 et 6) susceptibles de donner au système une plus grande souplesse, notre but principal étant d'observer l'appariement dans l'eau de deux bases complémentaires.

En effet, si les interactions d'empilement base-acridine sont tellement puissantes et si elles ne disparaissent pas totalement en milieu organique, on peut espérer observer les interactions entre l'intercalant et un couple de bases complémentaires selon le schéma suivant : (Figure 6).

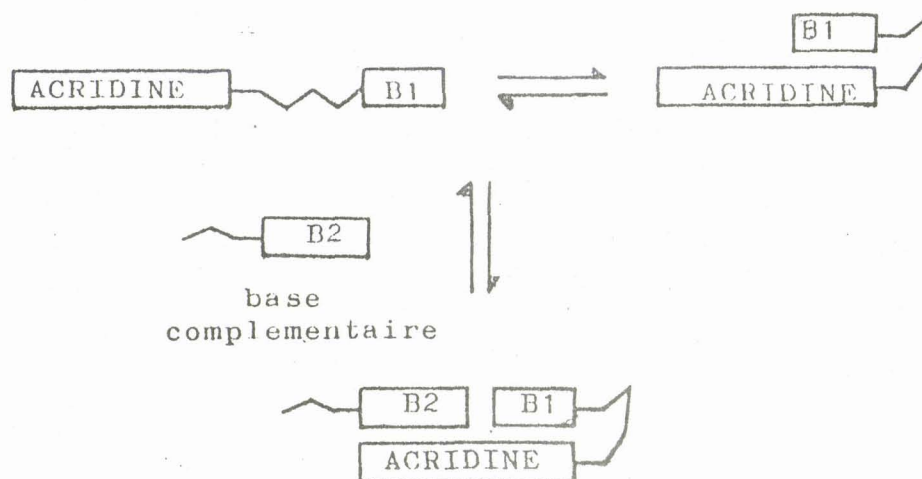


Figure 6 : Interaction de l'acridine avec un couple de bases complémentaires.

Dans un solvant judicieusement choisi, eau ou solvant mixte, eau-DMSO, la base complémentaire ajoutée au modèle correspondant, pourrait se fixer sur la partie restée disponible de la quinacrine (liaison de "stacking") tout en s'appariant de façon sélective à la base du modèle (liaison H). De tels complexes ternaires n'ont, à notre connaissance, jamais été observés.

L'examen des modèles moléculaires montre bien la très grande similitude entre la surface de la quinacrine et la surface du couple de bases. On en déduit en outre que le complexe désiré n'est réalisable qu'avec une chaîne suffisamment longue : $n > 5$. Le couple de bases le plus favorable pour observer ce phénomène est le couple guanine-cytosine qui met en jeu trois liaisons de type hydrogène. Le couple adénine-thymine n'en présente que deux.

En conséquence, nous avons préparé dans un premier temps les modèles de la série la plus simple (adénine-thymine) en accroissant la longueur de la chaîne de $n = 3$ à $n = 5$ et 6 pour voir si l'interaction demeurerait encore suffisante avec les longues chaînes.

Dans une seconde phase, nous avons préparé les modèles d'accès plus difficile en série guanine.

Nos modèles à plus longues chaînes pourraient également constituer des outils intéressants pour la compréhension de certains processus biologiques. C'est dans cette optique que nous avons abordé l'étude de systèmes comme les ADN apuriques, en collaboration avec le Pr. J. LAVAL.

La dépurination de l'ADN peut se produire spontanément à un très faible taux. L'action de certains agents mutagènes peut en augmenter considérablement la fréquence. Récemment, J. LAVAL et Coll. ont isolé et caractérisé chez *Micrococcus Luteus* et *Escherichia Coli*, une activité enzymatique de type glycosylase capable de reconnaître et d'éliminer sélectivement la méthyl7 guanine (24). Chaque purine excisée fait apparaître un "trou" dans l'enchaînement des bases nucléotidiques.

De nombreux travaux ont été menés pour préciser les processus de réparation qui peuvent être impliqués contre ce type de lésion.

Nous avons résumé dans la figure 7 les principaux mécanismes invoqués (25).

Le bon fonctionnement des systèmes de réparation est vital pour la cellule. L'apparition du cancer semble directement liée à la persistance de bases modifiées ou de lésions au niveau de l'ADN. D'où l'hypothèse selon laquelle la cancérogénèse chimique pourrait être le résultat de réparations défectueuses.

Dans le cas de lésions du type "dépurination", il semble que le système enzymatique qui déclenche le processus de réparation soit une endonucléase spécifique. Ce type d'enzyme isolé chez des souches bactériennes (29) est capable de reconnaître les sites apuriques et de couper la liaison phosphodiester 3',5' adjacente (30). On connaît peu de chose de ces systèmes enzymatiques.

Pour obtenir des précisions sur les structures nécessaires à la reconnaissance de la lésion et à l'activité de ces enzymes, il serait intéressant de disposer d'inhibiteurs capables d'agir directement au niveau du site apurique. Aussi nous avons voulu mettre à profit la structure particulière de nos modèles qui devrait permettre l'observation d'interactions privilégiées avec les ADN apuriques (Figure 8). Les arguments en faveur de cette hypothèse sont la grande affinité du noyau acridine pour l'ADN et la possibilité d'interaction spécifique entre la purine du modèle et le site apurique.

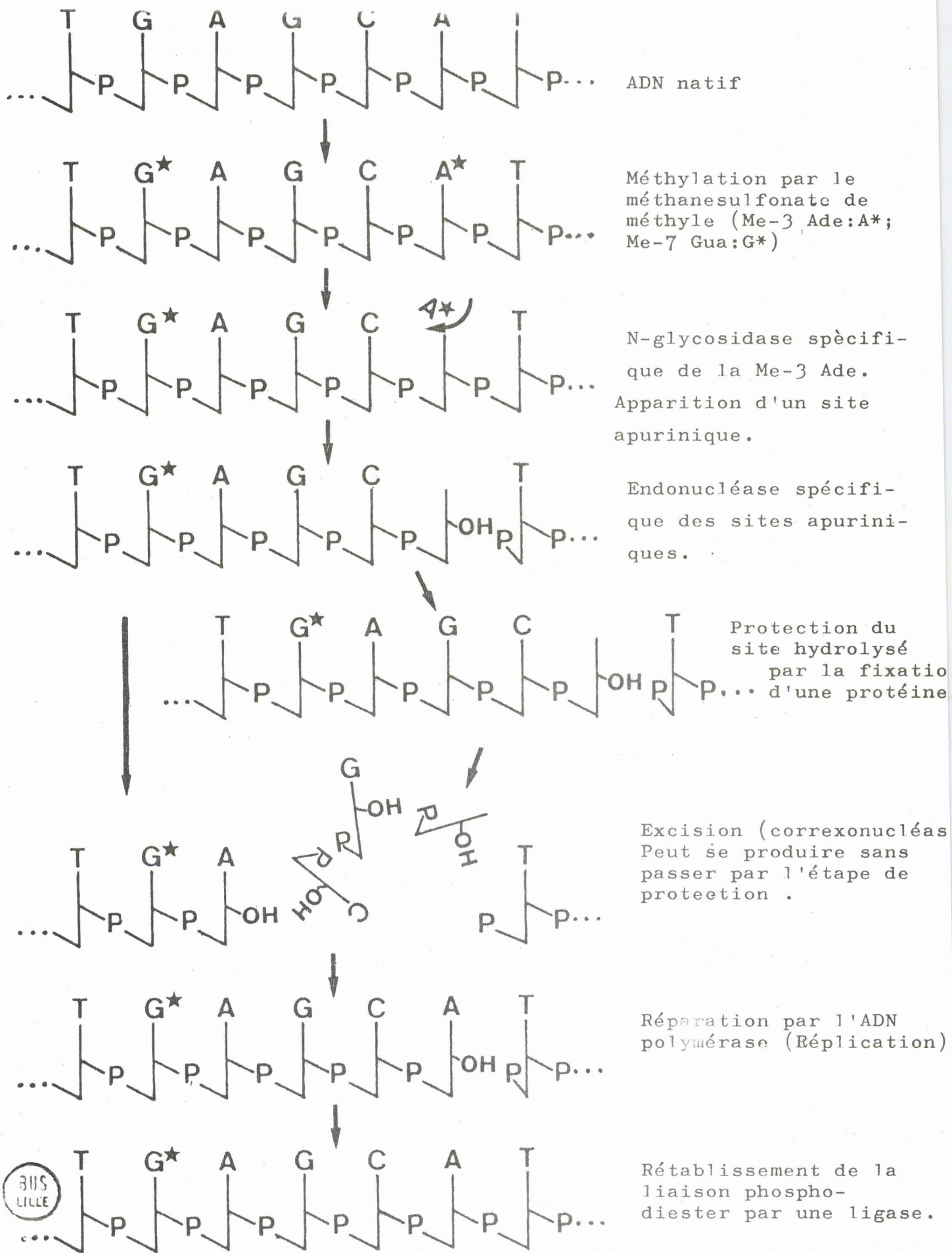


Figure 7 : Principaux systèmes enzymatiques impliqués dans la réparation des ADN apuriniques.

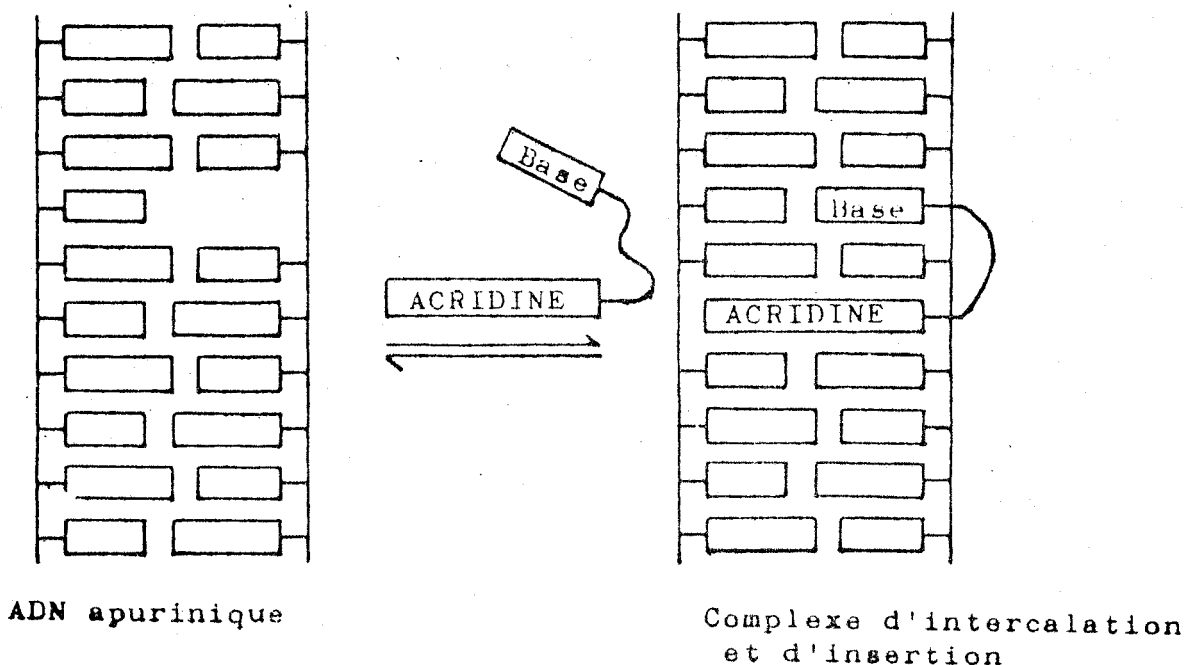


Figure 8 : Possibilités de complexation entre modèles Base-C_n-Acr et ADN apurinique.

L'interaction d'une purine avec les ADN apuriniques n'a jamais été mise en évidence mais depuis une dizaine d'années, on sait que les petites molécules comme les résidus d'acides aminés aromatiques sont aussi capables de se complexer à l'ADN par intercalation (31).

Cette propriété a incité de nombreux auteurs à penser que la reconnaissance des acides nucléiques (modifiés ou non) par les systèmes enzymatiques peut mettre en jeu des complexes d'intercalation du type "résidu d'acide aminé aromatique - ADN".

En utilisant comme modèle d'étude des tripeptides comme Lys-Tyr-Lys et Lys-Trp-Lys (Lys = lysine ; Tyr = tyrosine ; Trp = tryptophane), C. HELENE a apporté des arguments très favorables à cette hypothèse.

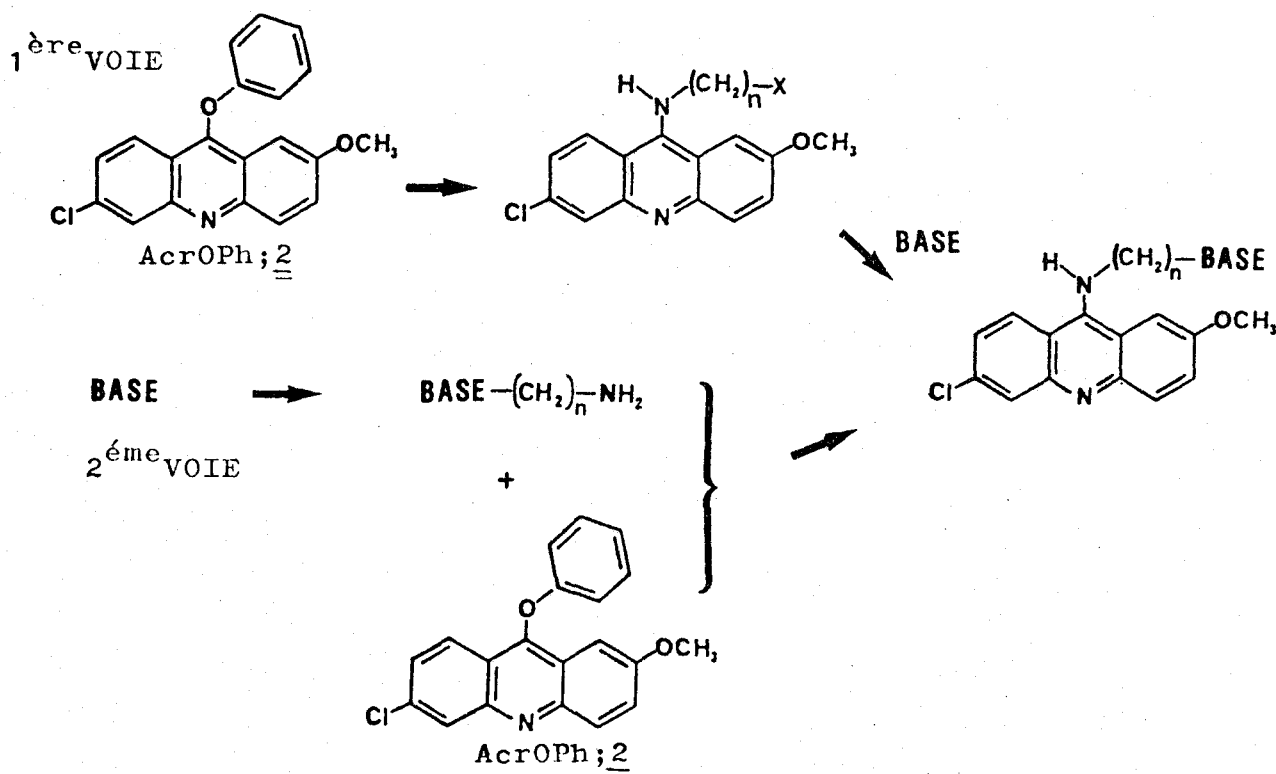
A l'aide de différentes techniques comme la RMN ¹H, la fluorescence, le dichroïsme circulaire, il a montré que de tels tripeptides sont capables d'interactions avec les acides nucléiques (32). La complexation est meilleure avec des systèmes monocaténaires (33) ou destabilisés : soit par dénaturation thermique (33), soit par action de cancérogènes comme l'acétylaminofluorène (34) ou d'agents alkylants (35). La plus grande affinité a été mise en évidence pour les ADN apuriniques (35).

Tous ces résultats montrent que le développement de molécules capables d'interagir spécifiquement avec les ADN apuriniques constitue un moyen d'étude original des systèmes enzymatiques de réparation associés à ce type de lésion.

S C H E M A G E N E R A L

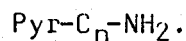
* Pour accéder aux modèles Base-C_n-Acr (n = 5 et 6 ; Base = Ade, Thy) 2voies de synthèse sont envisageables.

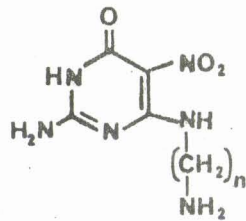
- Dans la première, le composé de départ sera l'acridine fonctionnalisée en position 9 : AcrOPh ; 2.
- Dans la seconde, la suite réactionnelle aura pour point de départ la base nucléotidique (adénine ou thymine).



* Le cas des modèles de la série guanine est particulier. En effet, l'alkylation sélective de la position 9 est impossible. Il est donc nécessaire de "reconstruire" entièrement le noyau purine pour l'obtenir avec la substitution désirée.

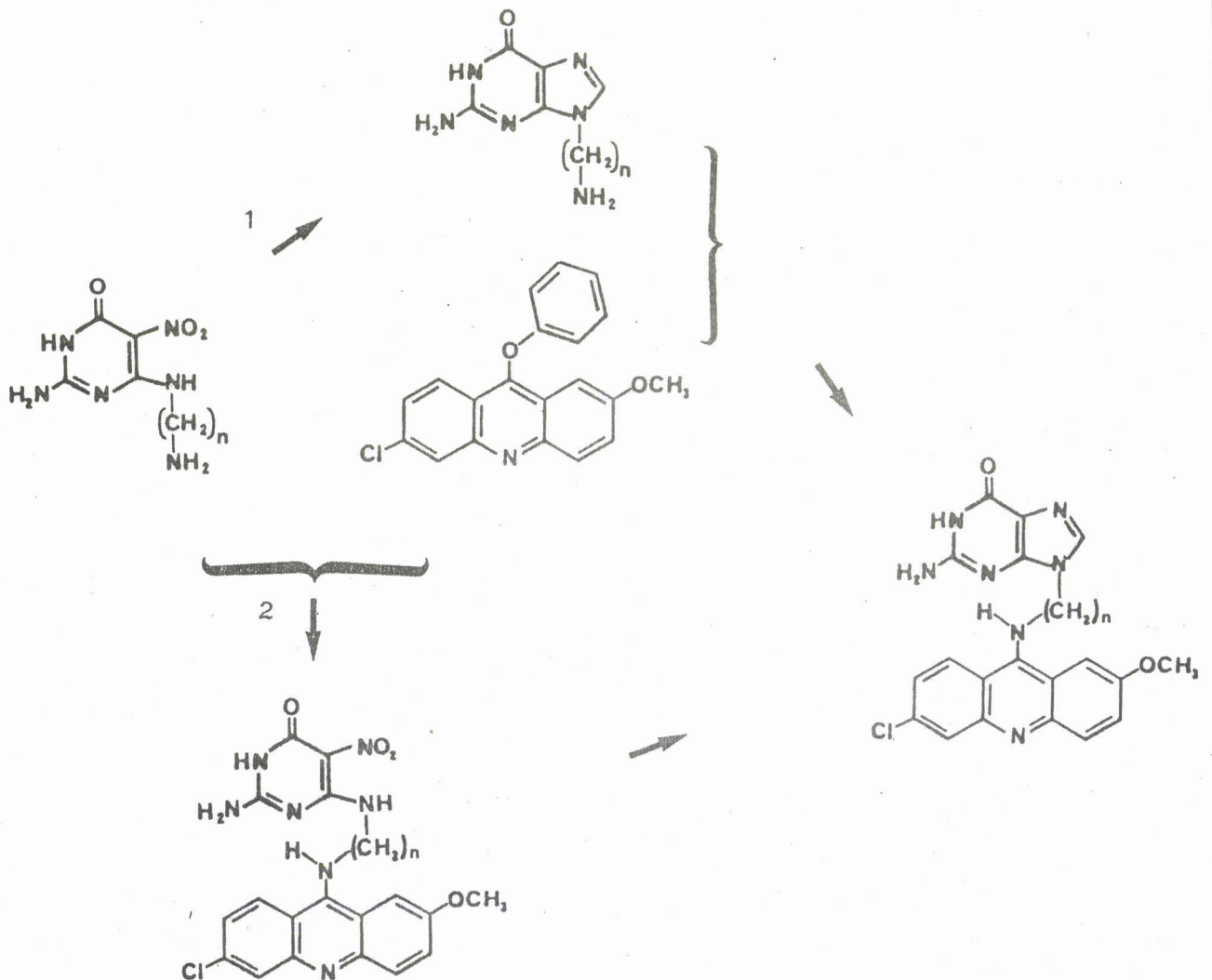
Une suite de réaction nous conduit à l'intermédiaire clé :





pyr-C_n-NH₂

A partir de cet intermédiaire, deux chemins réactionnels sont possibles :



BUS
LILLE

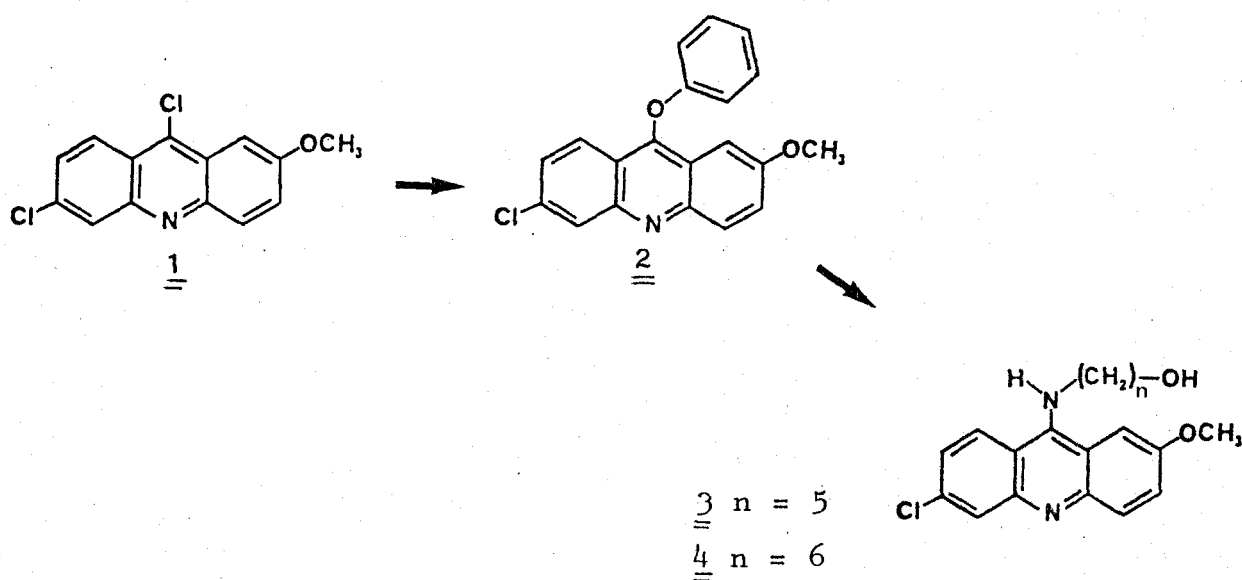
A. PREPARATION DES MODELES EN SERIE ADENINE ET THYMINE.

I. PREMIERE VOIE DE SYNTHESE :

Le produit de départ est la chloro-9 acridine; 1. On améliore sensiblement les possibilités de substitution nucléophile en position 9 en utilisant le dérivé phénoxylé ; 2. Ce dernier est obtenu par action du phénol en présence de soude sur la chloro-9 acridine ; 1.

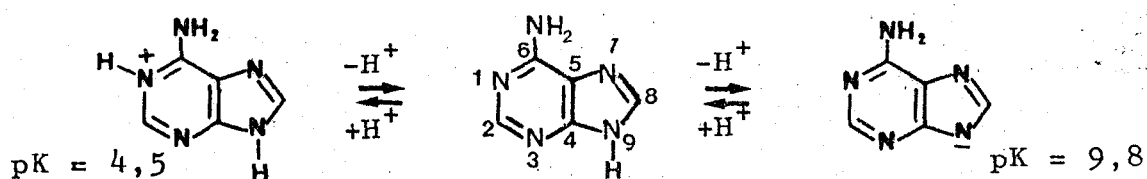
La substitution par l'aminoolcool approprié conduit aux dérivés du type Acr-C_n-OH ; 3 et 4 correspondants.

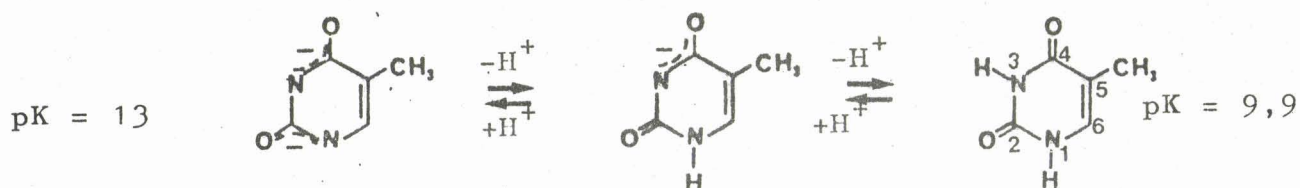
La substitution par l'aminopropane fournit le composé de référence Acr-C₃ ; 7.



Par action de HBr en présence d'acide sulfurique, on transforme les composés Acr-C_n-OH ; 3 et 4 en Acr-C_n-Br ; 5 et 6 qui seront utilisés pour alkyler les bases nucléotidiques (dans la mesure où celles-ci peuvent être rendues nucléophiles au site d'alkylation souhaité).

Equilibres de protonation-déprotonation des bases nucléotidiques :





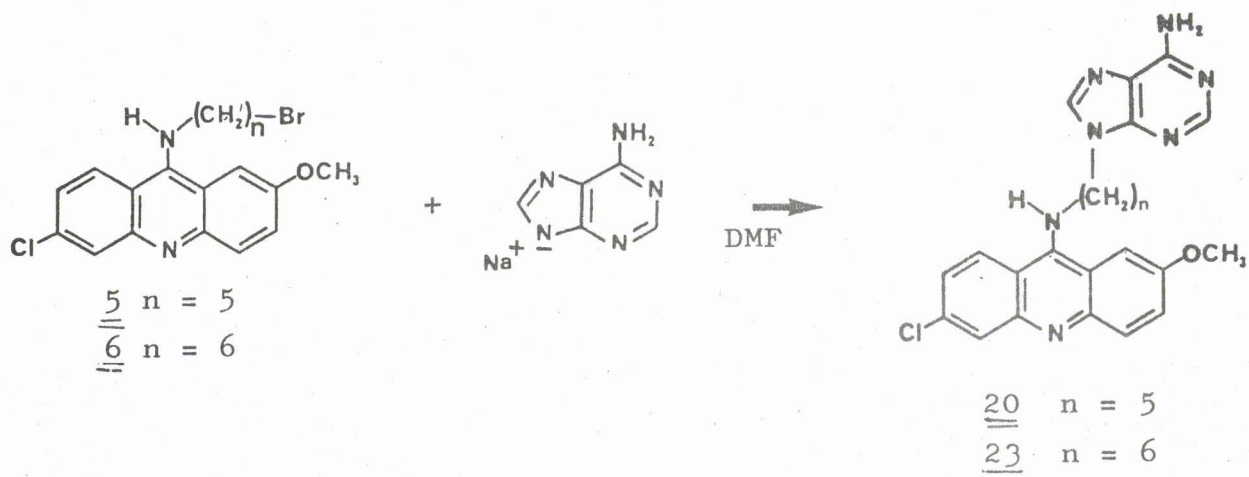
Cette série d'équilibres nous montre que l'alkylation directe de l'anion sera facile dans le cas de l'adénine. Pour la thymine, il existe des possibilités d'alkylation en position 3 et même de 0 alkylation (36) qui nécessiteront certaines précautions.

1/ Série adénine :

L'atome de brome du dérivé $Acr-C_n-Br$ est facilement substitué par l'adénylate de sodium ou de potassium. Ce dernier est obtenu par arrachement du proton en position 9 de l'adénine à l'aide d'une base comme l'hydrure de sodium (NaH) (36) ou même le carbonate de potassium (K_2CO_3) dans la diméthylformamide (DMF) (37).

Pour cette synthèse, nous avons utilisé l'hydrure de sodium. Nous l'avons fait réagir sur des dérivés $Acr-C_n-Br$ incomplètement purifiés. En effet, au cours de la purification de ces composés, nous nous sommes rendu compte qu'ils sont très instables.

Quelle que soit la méthode employée (cristallisation, chromatographie sur plaque préparative ou sur colonne) nous n'avons jamais pu isoler un échantillon de pureté satisfaisante.

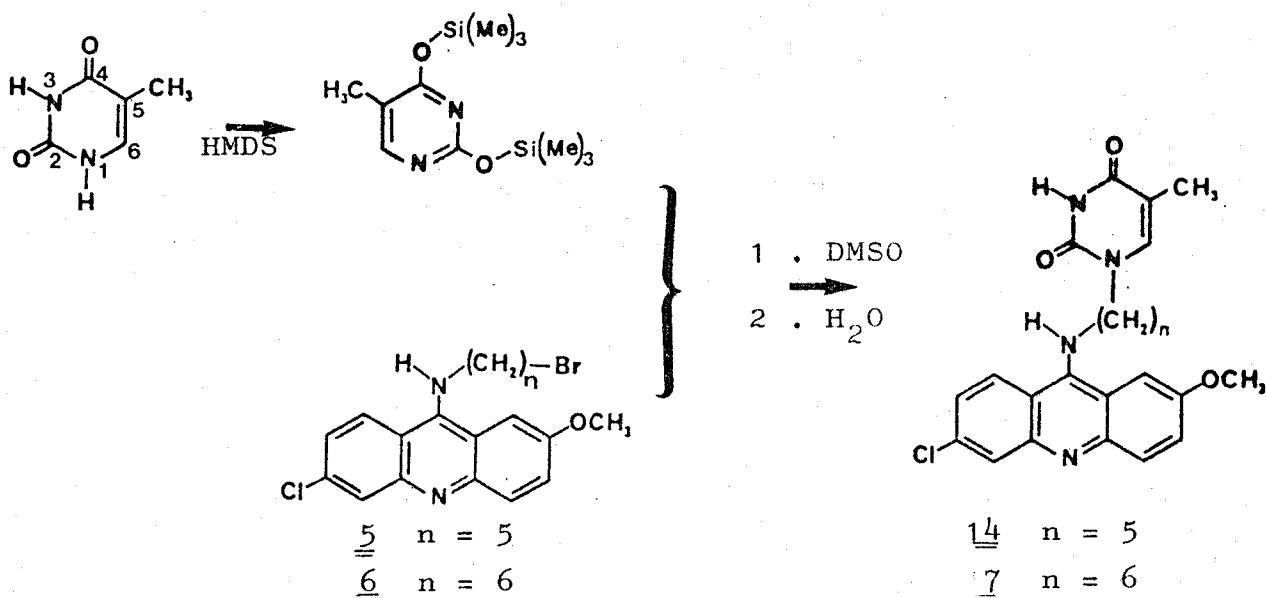


Les produits secondaires formés au cours de la condensation sont nombreux et nous n'avons jamais pu les éliminer complètement. Après plusieurs séparations sur colonnes de chromatographie, les meilleurs échantillons contiennent toujours une impureté polaire. Devant les difficultés de purifications que nous avons attribuées à l'instabilité des dérivés bromés, nous avons préféré abandonner cette voie de synthèse.

2/ Série thymine :

Pour alkyler sélectivement la thymine en position 1, il est nécessaire de défavoriser l'alkylation en position 3 ainsi que la O alkylation. La meilleure méthode semble être la silylation de la thymine par l'hexaméthyl disilazane en milieu anhydre (la déprotection est presque immédiate en présence de traces d'eau).

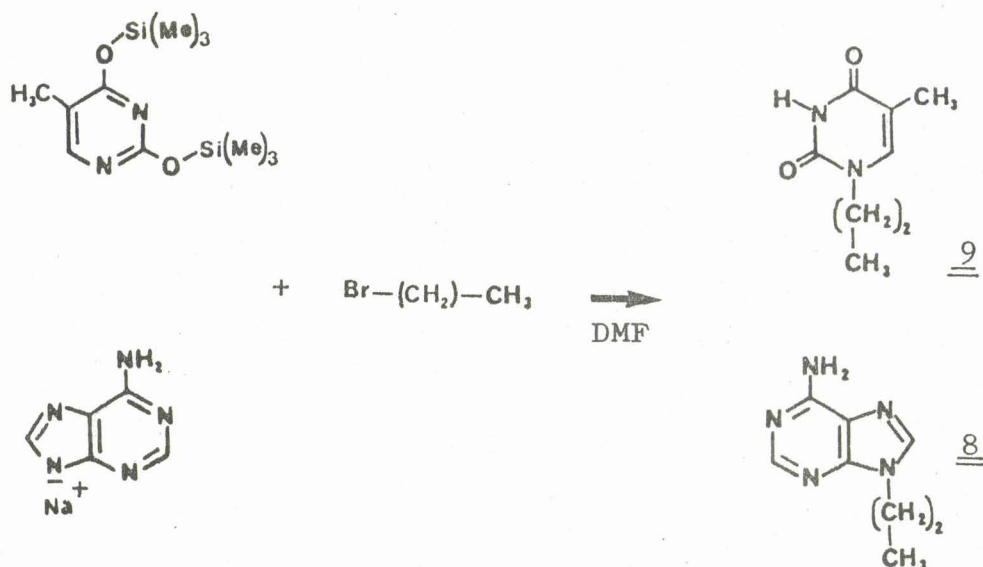
La thymine silylée est suffisamment nucléophile pour substituer l'atome de brome des composés intermédiaires Acr-C_n-Br ; 5 et 6.



Cette fois encore, il se forme un grand nombre de produits secondaires au cours de la condensation et la purification s'avère aussi difficile qu'en série adénine. Pour les mêmes raisons, nous avons préféré abandonner cette voie de synthèse.

3/ Préparation des composés de référence : Ade-C₃ ; 8 et Thy-C₃ ; 9:

La substitution par la base activée se fait sur le bromopropane. Pour le composé Ade-C₃ ; 8, nous avons employé la méthode décrite par N.J. LEONARD (38).

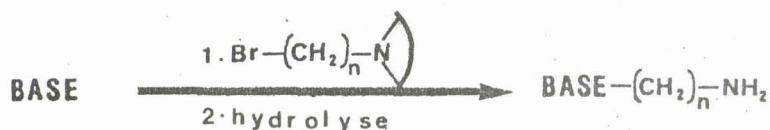


Dans ce cas la réaction se fait avec un rendement satisfaisant.

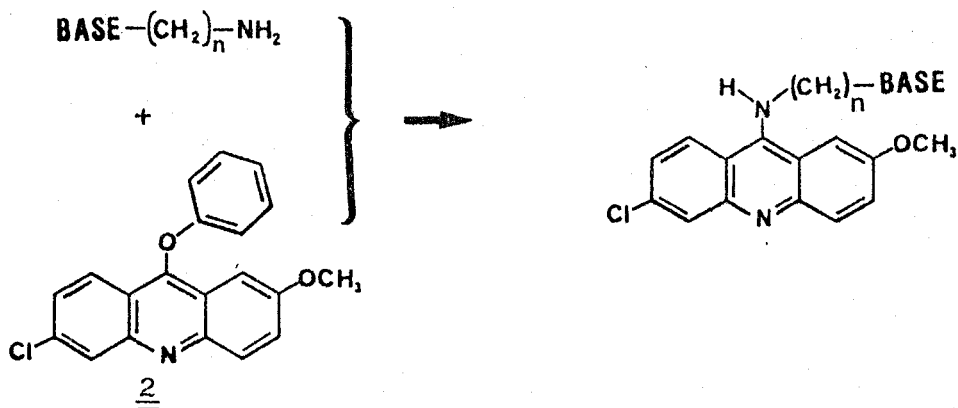
II. DEUXIEME VOIE DE SYNTHESE :

Dans le composé intermédiaire clé, la base nucléotidique est fonctionnalisée par une chaîne aminoalkyl : le dérivé Base-C_n-NH₂ s'obtient par alkylation de la base à l'aide d'un halogénure du type Br-C_n-N (dans lequel la fonction amine primaire est introduite sous forme masquée (phtalimide) (38, 39).

La base est rendue nucléophile de la même manière que dans la première voie.

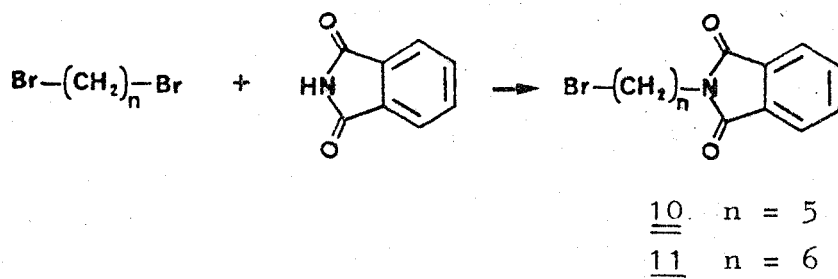


Dans l'étape suivante, la base fonctionnalisée est condensée avec la phénoxy-9 acridine ; 2 pour conduire au modèle désiré.



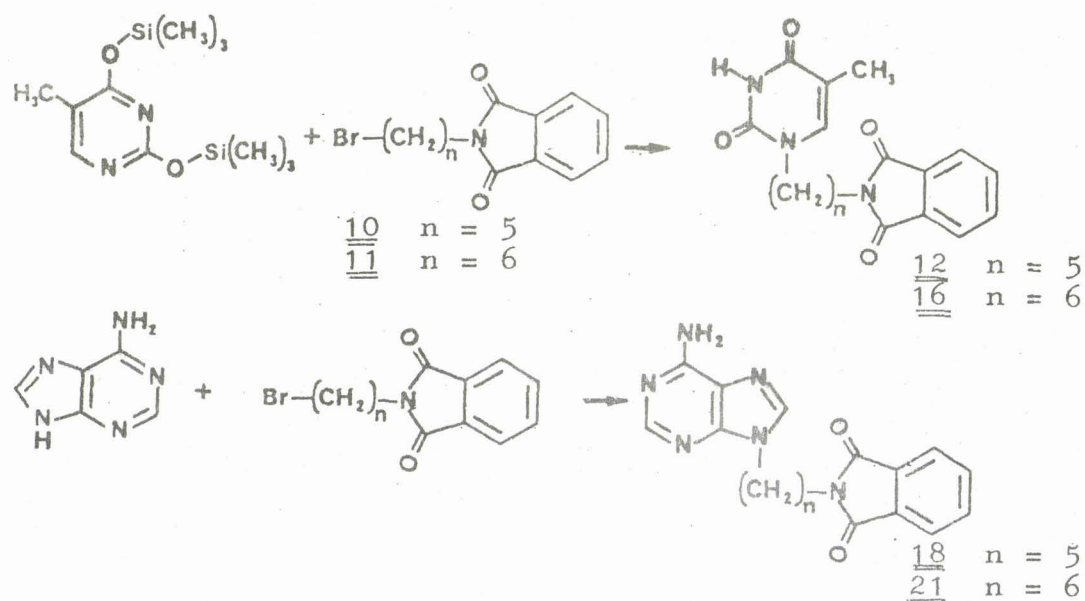
1ère ETAPE : Synthèse du dérivé $\text{Br}-\text{C}_n-\text{N}$ ou $\text{Br}-\text{C}_n-\text{Pht}$

C'est une condensation du phthalimide avec les dibromo alcanes $\text{Br}-\text{C}_n-\text{Br}$ ($n = 5, 6$). Pour conférer un caractère nucléophile à l'atome d'azote du phthalimide, il est nécessaire d'arracher le proton à caractère acide $\text{N}-\text{H}$. Son pK_a est de l'ordre de 8,3. Nous avons utilisé le système K_2CO_3 dans la DMF. Ce procédé avait déjà été utilisé dans des réactions d'alkylation d'esters maloniques (40). Les rendements sont meilleurs qu'avec le phthalate de potassium qui nécessite de travailler en milieu acétone anhydre (39). Pour éviter la formation de dimères, le dibromoalcane est en large excès (cinq fois) par rapport au phthalimide. Le produit désiré est obtenu après évaporation à sec et cristallisation.



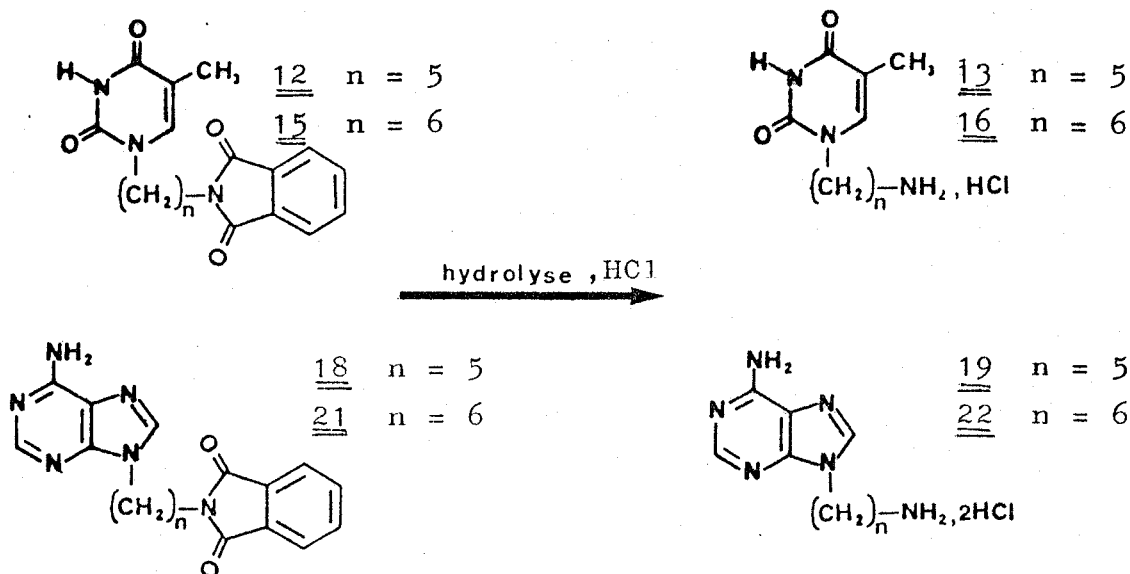
2^{ème} ETAPE : La base est alkylée par le dérivé bromophtalimide (Br-C_nPht).

En série thymine, la réaction de condensation se fait sur la base silylée comme dans la première voie. Pour arracher le proton en 9 de l'adénine, nous avons utilisé K₂CO₃ : la réaction est lente, mais facile à mettre en oeuvre, puisqu'il suffit de mélanger tous les réactifs dans de la DMF sèche et de laisser agiter sous atmosphère d'azote pendant 2 jours à température ambiante.

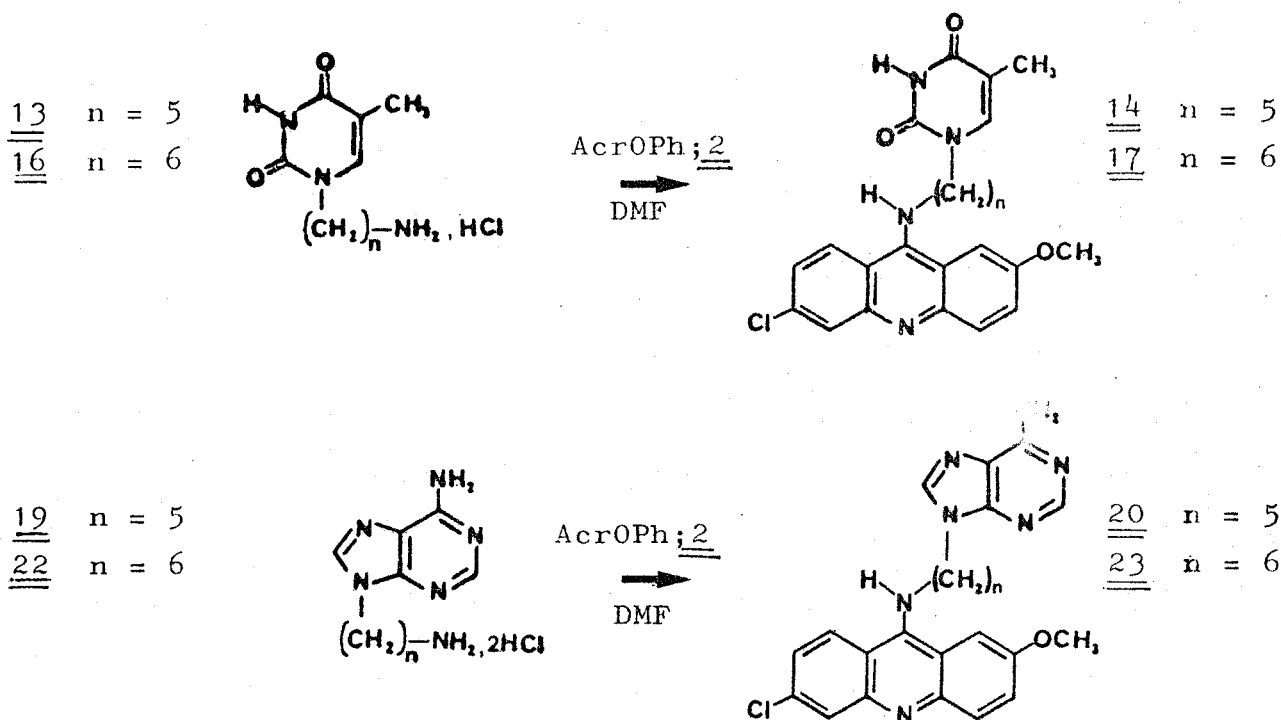


La purification des dérivés Base-C_n-Pht se fait par simples cristallisations, dans les deux séries, adénine et thymine, et pour les deux longueurs de chaîne, n = 5 et n = 6.

Dans la 3^{ème} ETAPE, la fonction amine est démasquée par hydrolyse du phtalimide en milieu acide : eau/acide acétique glacial/acide chlorhydrique concentré (1/1/1) chauffé 48 h à reflux. Cette réaction se fait avec un rendement de 80 % en moyenne dans les 2 séries.



La 4^{ème} ETAPE conduit aux modèles Base-C_n-Acr. C'est une substitution nucléophile du groupement phenoxy du dérivé 2 par l'amine primaire du dérivé intermédiaire Base-C_n-NH₂. On peut faire réagir ce dernier sous forme de base libre en opérant en présence de DABCO ou l'utiliser sous forme chlorhydrate. Dans tous les cas, il est nécessaire de chauffer (70 à 110°C) et les temps de réaction sont compris entre 12 et 18 h.

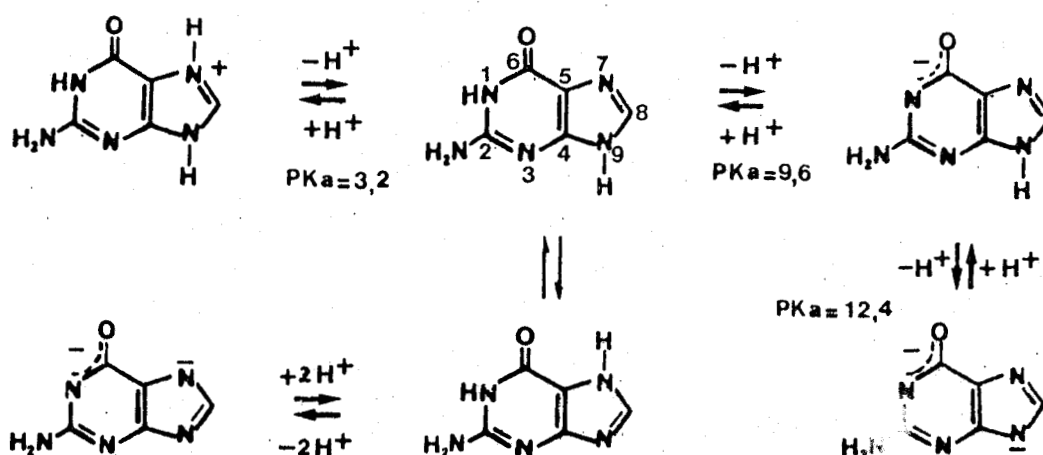


Les produits secondaires formés sont nombreux et la purification des modèles est longue et fastidieuse. Elle a nécessité plusieurs séparations successives sur colonnes de silice avec des mélanges éluants à base de méthanol et d'éthanol. Les plus grosses difficultés ont été rencontrées en série adénine. En effet, ces modèles sont plus polaires et nous avons été obligés d'utiliser un éluant contenant 1 % d'ammoniaque.

Les rendements de purification sont très faibles et pour obtenir 200 mg de produit analytiquement pur, il a fallu répéter plusieurs fois cette synthèse.

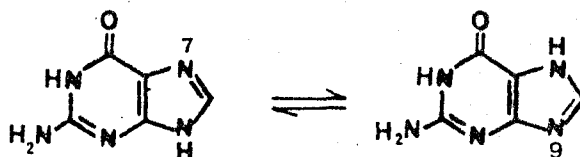
B. PREPARATION DES MODELES EN SERIE GUANINE

En ce qui concerne la guanine, l'alkylation directe en position 9 est rendue impossible par les nombreux équilibres de protonation-déprotonation.



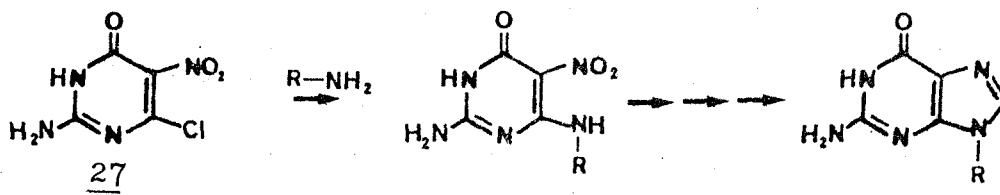
Il apparaît donc qu'en milieu basique, l'alkylation sur la partie pyrimidine est également possible.

Le cycle imidazole est le siège d'un équilibre de protonation-déprotonation entre les azotes N₇ et N₉.



A l'état solide, les cristallographies ont montré que le proton se trouvait en 9 (41). Mais en solution, on obtient un mélange des deux formes (42).

Ainsi, même si on parvient à s'affranchir des possibilités d'alkylation en position 1, par acétylation ou silylation par exemple, on ne pourra pas éviter la substitution "indésirable" en position 7 (43). Il est donc nécessaire de reconstruire entièrement le cycle purine de la guanine. L'introduction du substituant R se fera par amination d'un dérivé précurseur de type chloropyrimidine 27 (36, 44, 45).



Il suffit alors de cycliser en ajoutant un atome de carbone pour aboutir à la guanine fonctionnalisée en position 9.

Le précurseur 27 utilisé est l'2-amino-5-chloro-6-nitro-4-pyrimidinone préparé selon une adaptation des méthodes de DAVOLL et EVANS (45) et LEONARD (36). Par cette voie, nous avons synthétisé les composés intermédiaires Gua-C_nNH₂ ; 32 et 33 ainsi que le composé de référence Gua-C₃ ; 31. Pour la suite du schéma réactionnel nous rejoignons à ce niveau la 2^{ème} voie de synthèse qui fait intervenir les dérivés du type Base-C_n-NH₂.

Deux autres séquences réactionnelles ont été envisagées et essayées, mais elles ne nous ont pas permis d'aller jusqu'au bout, c'est à dire jusqu'aux modèles Gua-C_n-Acr ; 34 et 35.

Toutes les voies envisageables pour cette synthèse sont représentées dans la figure suivante (Figure 9).

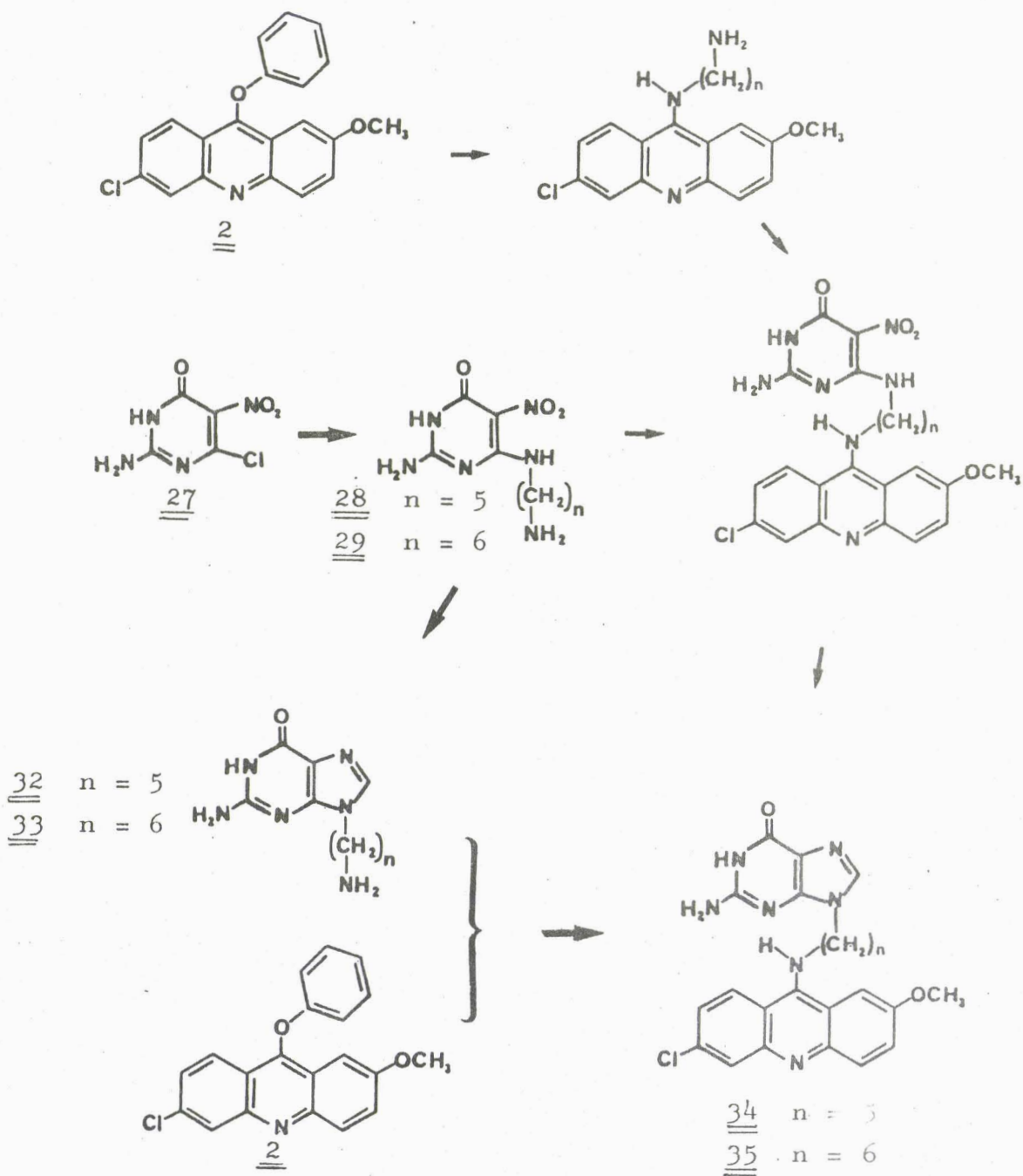


Figure 9 : Voies de synthèse des modèles Gua-C_n-Acr ; 34 et 35.

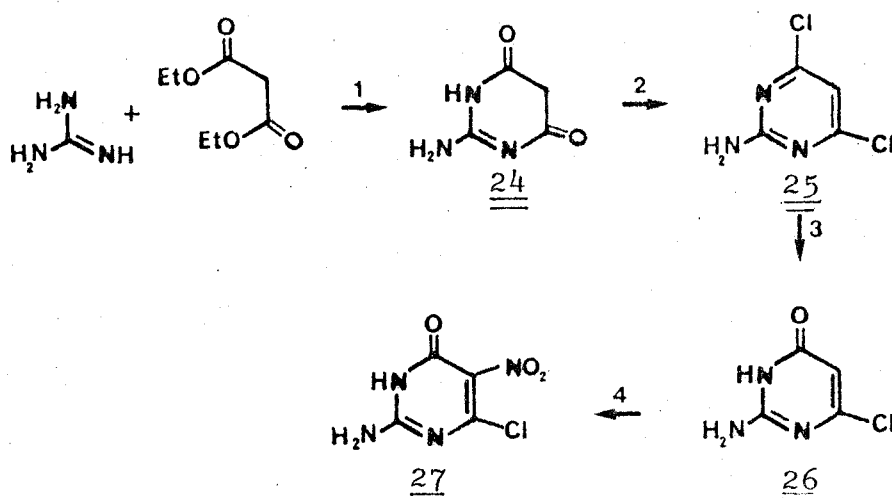
BUS
LILLE

Pour accéder aux modèles Gua-C_n-Acr ; 34 et 35, nous avons utilisé la voie qui passe par les dérivés Gua-C_n-NH₂ ; 32 et 33. Lors d'essais préliminaires dans les autres schémas réactionnels, nous n'avons pas pu mener la synthèse jusqu'aux composés modèles. Nous ne décrivons pas la synthèse et les caractéristiques spectroscopiques des produits intermédiaires de ces autres voies.

I. SYNTHÈSE DU PRECURSEUR : Pyr ; 27 :

Ce composé, décrit par DAVOLL et EVANS (44) a été préparé par J. BOLTE et Coll. (22) dans le cadre de leurs travaux en série quinoléine.

Il peut-être synthétisé à partir de l'amino-2 dichloro-4,6 pyrimidine ; 25 qui est un produit commercial. Etant donné son prix et les quantités importantes dont nous avons besoin, nous avons été amenés à en réaliser la synthèse complète selon le schéma ci-dessous.



La 1^{ère} ETAPE est une modification de la synthèse de W. TRAUBE (46), mise au point par REMBOLD et SCHARAMM (47). Cette réaction se fait dans l'éthanol anhydre. Par action du sodium, on obtient l'éthanolate de sodium qui est une base suffisamment forte pour former l'anion de la guanidine. Ce dernier se condense avec le malonate d'éthyle et conduit au produit attendu 24 avec un excellent rendement (98 %).

La 2^{ème} ETAPE est une chloration du composé 24 par l'oxychlorure de phosphore à reflux en présence de N,N-diméthylaniline comme capteur de l'acide chlorhydrique libéré. Une réaction similaire avait été décrite, utilisant le trichlorure de phosphore et la N,N-diméthylaniline (48), le meilleur rendement observé étant de 25 % (obtenu avec le trichlorure de phosphore seul). La purification se faisait par cristallisation dans le benzène suivie d'une sublimation à 210°C sous pression réduite.

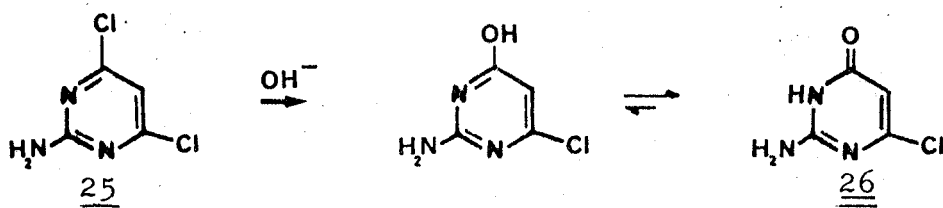
De par son rendement et la technique de purification employée, cette étape risquait d'être très couteuse en produit et en temps. Nous avons pu améliorer sensiblement le rendement en employant le couple oxychlorure de phosphore, N,N-diméthylaniline et en prenant quelques précautions. Les réactifs sont mélangés sous atmosphère inerte et sèche. L'évolution de la réaction est suivie par analyse sur couche mince. La réaction est arrêtée par refroidissement et hydrolyse du POCl₃ restant (en versant lentement le mélange réactionnel sur de la glace pilée). Le produit qui précipite alors dans le milieu est recueilli par filtration.

L'analyse des eaux mères, très acides (pH = 1) a révélé qu'elles contiennent le produit recherché en quantité non négligeable. Il est possible d'améliorer le rendement en neutralisant les eaux mères à l'aide de potasse en pastilles. Cependant, il ne faut pas dépasser la valeur de pH = 5 qui conduit à la libération de la N,N-diméthylaniline jusqu'alors protonée).

Nous avons purifié le produit par traitement au noir animal et cristallisation dans le benzène. Par cette méthode, nous avons atteint une pureté analogue à celle des échantillons de sublimation. Le rendement en produit pur est de 45 %.

La 3^{ème} ETAPE est une hydrolyse du dérivé 25 par la soude 1N chauffée à reflux pendant 4 heures. Elle aboutit à la substitution sélective d'un seul atome de chlore.

En effet, dans la molécule de départ 25, la symétrie rend les deux atomes de chlore équivalents. Ils sont tous deux situés en méta l'un par rapport à l'autre, en ortho et para des atomes d'azote de l'hétérocycle. Ils sont activés de la même manière vis-à-vis des nucléophiles. Lorsque l'un d'eux est substitué par un groupe hydroxyle, l'activation par les atomes d'azote hétérocycliques est supprimée de par l'existence de la tautomérie lactame lactime.



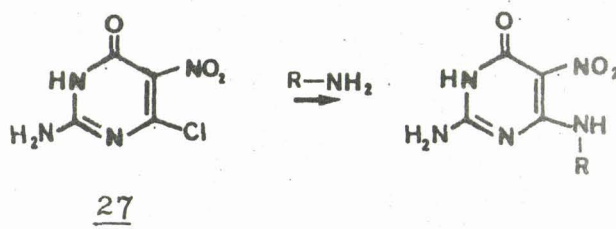
Le dérivé monohydroxylé 26 est obtenu pur avec un excellent rendement de 98 % par simple précipitation en milieu légèrement acide (pH = 6). On peut l'utiliser sans autre traitement.

La 4^{ème} ETAPE est une nitration du dérivé 26 par un mélange sulfonitrique. Nous avons préféré cette méthode à celle décrite par LEONARD (36) qui est plus compliquée et plus longue (formation et isolement du nitrate, puis réaction avec l'acide sulfurique concentré). Les résultats ne sont pas reproductibles et le meilleur rendement observé est de 69 %.

En utilisant le mélange sulfonitrique sous atmosphère d'azote et en contrôlant la température de la réaction (10°C maximum) nous avons pu obtenir le produit désiré en une seule étape avec un rendement de 84 %. Il se forme un produit unique dont le spectre infra-rouge comporte les bandes caractéristiques du groupement nitro en série aromatique : 1540 et 1340 cm^{-1} . On l'utilise sans traitement complémentaire.

II. REACTIONS D'AMINATION DU PRECURSEUR

Dans cette réaction, une amine primaire aliphatique est utilisée comme nucléophile. L'atome de chlore en position 6, activé par le groupement nitro en ortho, est facilement substitué.



1/ Dérivé Pyr-C₃ ; 30 :

Ce composé a été synthétisé selon la méthode décrite par LEONARD (36), on fait réagir la N-propylamine utilisée comme solvant sur le dérivé 27. Dans ces conditions, l'acide chlorhydrique libéré est "piégé" par la N-propylamine en excès. Le chlorhydrate formé est facilement éliminé par lavage à l'eau. Nous obtenons un produit unique dont les caractéristiques spectroscopiques sont identiques à celles données par la littérature.

2/ Dérivé Pyr-C₃-NH₂ ; 28 et 29 :

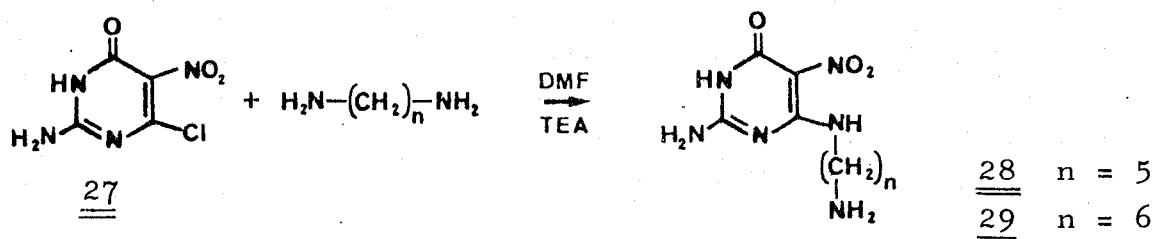
Le principe de la réaction est le même, mais cette fois le nucléophile est une diamine. Pour éviter la formation de dimères du type Pyr-C_n-Pyr, il convient d'opérer en milieu suffisamment dilué et en présence d'un excès de diamine (environ 7 fois stoechiométrique). Nous opérons dans un solvant aprotique dipolaire comme la DMF. Pour piéger l'acide chlorhydrique libéré lors de la condensation, nous avons ajouté de la triéthylamine dans le milieu.

Nous n'avons pas employé la diamine comme solvant pour deux raisons:

1°/ Le diamino-1,6 hexane est solide en dessous de 40°C et son point d'ébullition élevé le rend difficile à éliminer même par distillation sous vide.

2°/ Le diamino-1,5 pentane est liquide à température ambiante mais son coût est trop élevé pour qu'on puisse envisager son utilisation en grosses quantités.

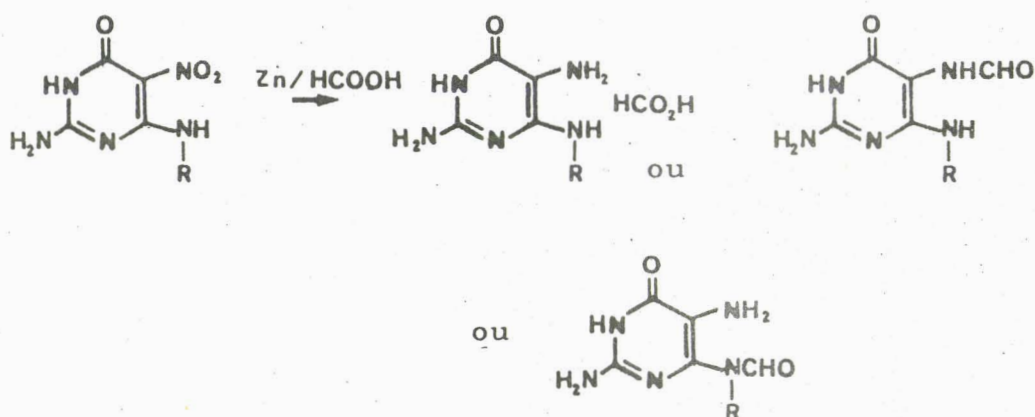
Les produits désirés sont isolés après évaporation à sec du mélange réactionnel et cristallisation dans l'eau.



III. REACTION DE CYCLISATION

Dans cette étape, le groupe nitro doit être réduit en amine primaire. Le carbone supplémentaire qui permet de fermer le cycle imidazole est apporté par l'acide formique (36).

Pour cette raison, on emploie le couple zinc/acide formique comme réducteur. La réaction se fait à température ambiante, sous atmosphère inerte et sèche. Il se forme dans le milieu un formiate d'amine ou un formamide que nous n'isolons pas mais dont nous pouvons suivre l'évolution par chromatographie sur couche mince.



Pour réaliser la fermeture du cycle imidazole, deux méthodes sont envisageables (36).

1^o Méthode : Après avoir éliminé le zinc, on évapore l'acide formique à sec. Le solide blanc résiduel est remis en solution dans la DMF puis chauffé à reflux en présence de carbonate de potassium.

2^o Méthode : L'acide formique n'est pas éliminé entièrement. La solution concentrée obtenue est placée dans une bombe en verre et chauffée pendant quatre heures à 175°C.

Nous avons fait les essais préliminaires en utilisant la première voie.

L'obtention et la caractérisation de Gua-C₃ ; 31 a été relativement facile. Notamment, le spectre de RMN dans le TFA deutérié montre l'apparition du singulet caractéristique du proton porté par le carbone C₈ de la guanine à 8,75 ppm.

Les dérivés que nous attendions après cyclisation de Pyr-C_n-NH₂ ; 28 et 29, nous ont posé des problèmes et nous n'avons pas réussi à les purifier. Les échantillons contenant un produit majoritaire ont un spectre de RMN mal résolu dans le TFA deutérié. Nous retrouvons cependant le signal à 8,9ppm attribuable à l'hydrogène porté par l'atome de carbone C₈ de la guanine (36) prouvant ainsi que la cyclisation a bien marché.

D'autre part, nous avons fait un essai de condensation de "Gua-C₅-NH₂ ; 32" avec le dérivé Acr-O-Ph ; 2. Mais quelles que soient les

conditions (température et durée), nous n'avons observé aucune réaction entre les produits de départ. Ces premiers résultats, peu engageants, concordent cependant avec l'absence de réactivité constatée par N.J. LEONARD pour le dérivé Gua-C₃-NH₂ (36). Nous nous expliquons mal ce phénomène étant donné les résultats obtenus avec les dérivés Ade-C_n-NH₂ ; 19, 22 et Thy-C_n-NH₂ ; 13, 16 dans les mêmes conditions de condensation.

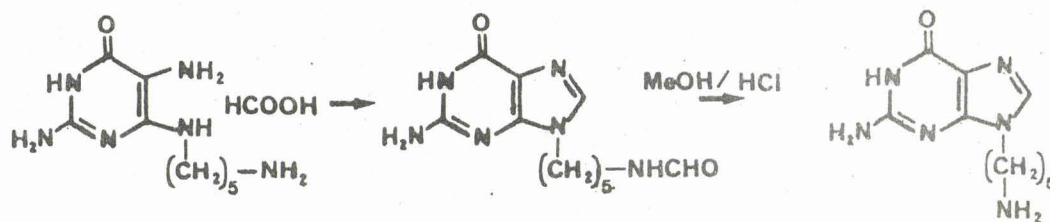
L'obtention d'un échantillon de pureté satisfaisante de 'Gua-C₅-NH₂ ; 32' nous a permis d'en mesurer un spectre de RMN et un spectre de masse convenables.

Dans le spectre de masse, on retrouve bien le pic de l'ion moléculaire : M⁺ = 236 ainsi qu'un pic à M = M⁺ + 28. Cette masse supplémentaire peut très bien provenir d'un groupe "-C-H" remplaçant un hydrogène. Ceci nous amène à supposer que l'amine primaire en bout de chaîne est "bloquée" sous forme de formamide (d'où son absence de réactivité). Cette hypothèse est confirmée par le spectre de RMN mesuré dans le DMSO deutérié. Nous observons le singulet attendu pour le H₈ de la guanine à 7,6 ppm ainsi qu'un signal à 6,4ppm attribuable au proton porté par l'azote de cette même fonction.

Enfin, le spectre infra-rouge présente un signal large à 1650cm⁻¹ caractéristique d'un carbonyle de formamide.

Lorsqu'on place le formamide de 32 dans des conditions d'hydrolyse acide : méthanol/HCl concentré (9/1), le produit formé présente les caractéristiques spectroscopiques du produit désiré 32 sans doute sous forme de chlorhydrate :

- Disparition de la bande à 1650 cm⁻¹ en infra rouge.
- Disparition des signaux à 7,9 et 6,4ppm, remplacés par un signal large mal résolu à 6,86 ppm, ce signal (qui disparaît dans l'eau lourde) correspond à la fonction amine primaire libérée.
- Signal à 7,6ppm caractéristique du proton porté par le C₈ de la guanine.



A titre comparatif, nous avons utilisé également la deuxième voie qui consiste à réaliser la cyclisation en milieu acide formique dans un bombe chauffée à 170°C. Les bruts réactionnels sont analysés en chromatographie liquide haute performance (CLHP) et comparés au brut de l'hydrolyse du formamide (Figure 10).

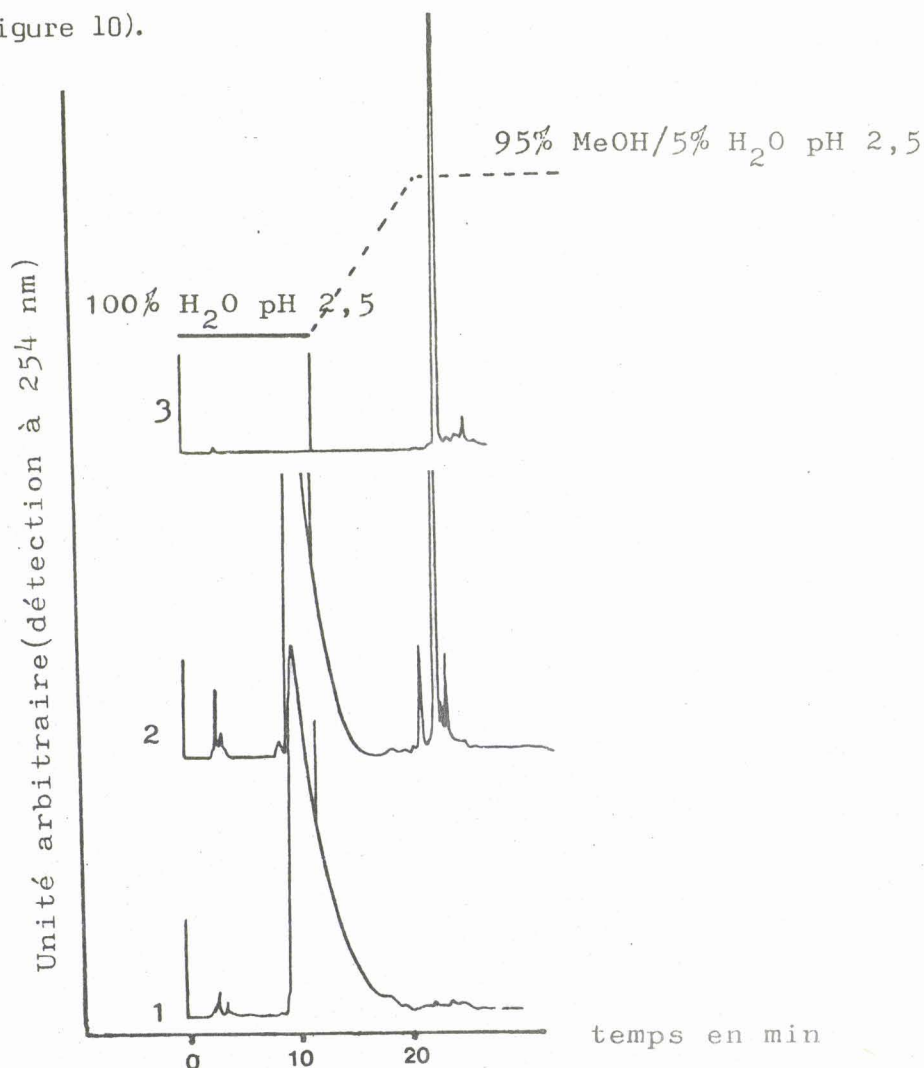


Figure 10 : Analyse par CLHP des échantillons de cyclisation :

1. DMF à reflux
2. HCO₂H à 170 °C (bombe)
3. Traitement des échantillons 1 ou 2 avec le mélange d'hydrolyse:méthanol/HCl concentré.

Cet ensemble de résultats nous a incité à abandonner la première voie pour n'utiliser que la cyclisation dans l'acide formique. Cette méthode, nécessite quand même un traitement par le mélange méthanol/acide chlorhydrique concentré pour hydrolyser le formamide résiduel.

Un autre problème s'est posé lorsque nous avons voulu éliminer les traces d'acide chlorhydrique persistant dans le brut réactionnel, après évaporation à sec du mélange d'hydrolyse.

En effet, les dérivés Gua-C_n-NH₂ ; 32 et 33 sont très polaires et très solubles en milieu aqueux. L'emploi de bases fortes comme la potasse, la soude ou l'ammoniaque pour neutraliser le milieu conduit à la formation de sels inorganiques difficiles à éliminer par simples lavages. Nous avons donc cherché à utiliser une base organique dont le chlorhydrate aurait des propriétés de solubilité très différentes de celles du produit désiré. Celle qui s'y prête le mieux est la diéthylamine : son point d'ébullition est assez bas (55,5°C), son pKa est de 11 et enfin son chlorhydrate est très soluble dans le chloroforme.

Nous avons donc agité le brut d'hydrolyse dans la diéthylamine. Après évaporation à sec et lavage au chloroforme, il ne reste plus que les dérivés Gua-C_n-NH₂ ; 32 et 33 (sans doute sous forme de chlorhydrate). Par analyse en CLHP, on peut estimer la pureté du brut obtenu à au moins 95 %.

Nous avons essayé d'obtenir un échantillon de meilleure qualité par CLHP à l'échelle préparative. L'éluant employé est constitué d'un mélange : méthanol/tampon acétate d'ammonium 0,1M ; pH 5,5 (1/9). L'avantage de celui-ci est qu'il peut-être éliminé par lyophilisation. Cette méthode est assez longue et les pertes relativement importantes aussi avons nous préféré utiliser le brut réactionnel tel quel pour la dernière étape.

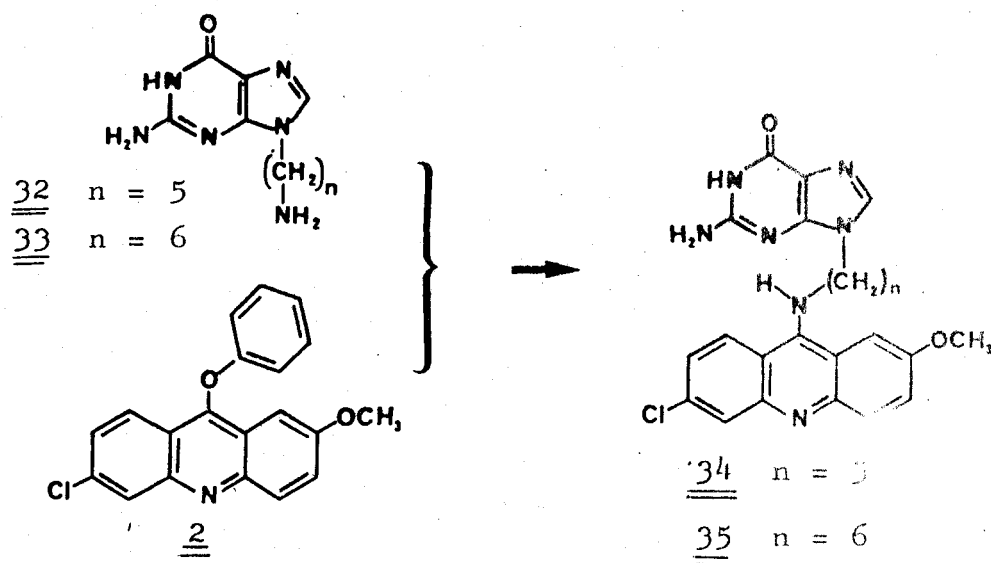
IV. PREPARATION DES MODELES Gua-C_n-Acr ; 34 et 35 :

Le principe de la synthèse est le même. Les dérivés Gua-C_n-NH₂ ; 32 et 33 sont condensés avec le précurseur Acr-O-Ph ; 2 dans un solvant aprotique dipolaire comme la DMF.

La solubilité et la réactivité des intermédiaires $\text{Gua-C}_n\text{-NH}_2$; 32 et 33 est faible (ils cristallisent dans le DMSO). Il est nécessaire de chauffer à 80°C au moins. Nous avons arrêté la réaction après 14 h bien qu'elle ne soit pas terminée. Des produits secondaires commencent à se former.

De ce fait, les composés modèles $\text{Gua-C}_n\text{-Acr}$; 34 et 35 sont en faible quantité dans le brut réactionnel. La grande polarité et la faible solubilité des produits formés ont rendu leur purification longue et fastidieuse : passages successifs sur des colonnes de silice avec comme éluants l'acétate d'éthyle et l'éthanol absolu suivis d'une cristallisation dans un mélange éthanol absolu/acétate d'éthyle.

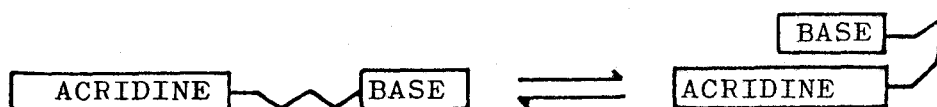
Par ces méthodes, nous n'avons pu obtenir que quelques dizaines de milligrammes de modèles rigoureusement purs.



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

Nous avons préparé une série de modèles Thy-C_n-Acr ; 14 et 17, Ade-C_n-Acr ; 20 et 23, Gua-C_n-Acr ; 34 et 35 susceptibles de reproduire les interactions d'empilement observées lors de l'intercalation de la quinacrine dans l'ADN. Classiquement, ces interactions avec les acides nucléiques, ont été mises en évidence par spectroscopies UV et de fluorescence (49). Des études par RMN ¹H ont également été menées (50, 51) sur des complexes entre l' amino-9 acridine et des oligonucléotides auto-complémentaires de faibles longueurs (2 à 6 résidus).

Dans l'eau, nos modèles Base-C_n-Acr sont le siège d'un équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée".



Pour étudier cet équilibre et caractériser les interactions qui le régissent nous avons fait appel aux mêmes techniques d'investigation.

A. SPECTROPHOTOMETRIE UV.

I. PRINCIPE DE LA METHODE :

Lorsque la quinacrine est complexée avec l'ADN, on note des changements importants dans son spectre d'absorption (figure 11).

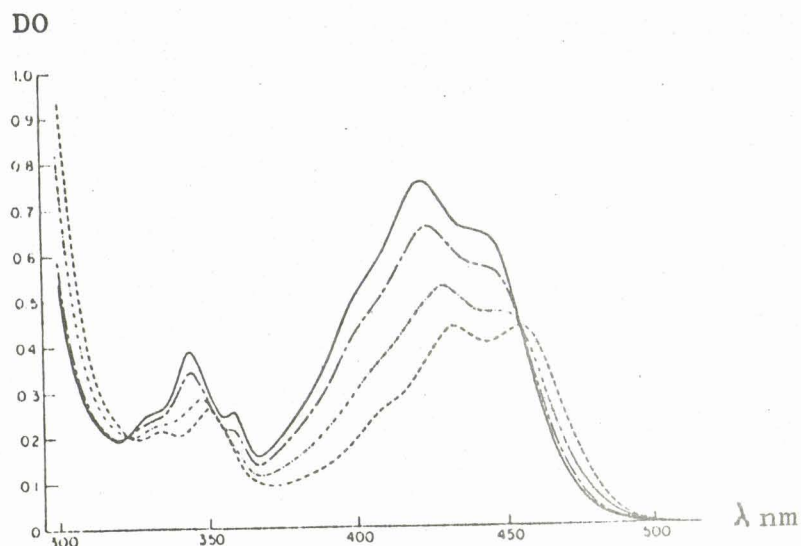


Figure 11 : Effet de l'ADN de thymus de veau sur le spectre d'absorption de la quinacrine $89 \mu\text{M}$ (-, sans ADN ; - - -, ADN $57 \mu\text{M}$; - · - · -, ADN $210 \mu\text{M}$; · · · · ADN $1,6 \text{ mM}$).

On constate une diminution marquée de l'intensité d'absorption : c'est l'effet hypochrome, accompagné d'un déplacement des maxima d'absorption vers les plus grandes longueurs d'onde : effet bathochrome.

L'effet hypochrome se produit lorsque des chromophores aromatiques sont empilés les uns sur les autres. Dans le cas de chromophores coplanaires, c'est à dire situés au voisinage l'un de l'autre, mais dans un même plan, on observe au contraire un effet hyperchrome (52).

La structure ordonnée en double hélice de l'ADN, constituée d'un empilement de nucléotides appariés, est responsable de l'effet hypochrome observé par rapport aux mononucléosides et même par rapport à l'ADN monobrin.

L'explication théorique de l'effet hypochrome est complexe. Selon TINOCO et RHODES (53, 54), les chromophores en interaction ne présentent pas de recouvrement des orbitales ni d'échanges électroniques. Seul le moment de transition électronique d'un chromophore subit l'influence du champ électrique créé par les électrons du chromophore voisin.

Le pourcentage d'effet hypochrome, %H, est défini par la relation :

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

où f est la force d'oscillateur de la transition considérée :

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

Pratiquement, on obtient f entre deux longueurs d'onde en mesurant l'aire sous la courbe $\epsilon = f(1/\lambda)$ entre ces deux longueurs d'onde.

Tous les auteurs qui ont étudié l'effet hypochrome des acides nucléiques s'accordent pour dire que la grandeur %H reflète le degré d'empilement des bases. Elle est également utilisée comme une mesure caractéristique de la structuration du polynucléotide.

D'autres mesures effectuées dans l'eau sur des dinucléosides monophosphates (55) ou leurs analogues (dans lesquels deux bases nucléotidiques sont reliées entre elles par des chaînes triméthyléniques) ont montré l'existence d'un effet hypochrome attribué à l'interaction base-base résultant de l'existence d'une forme repliée (36) (Tableau 1).

Les grandeurs %H ont été utilisées pour évaluer le degré de repliement de ces systèmes et pour les comparer les uns aux autres. Les auteurs ont ainsi classé les diverses bases selon leur aptitude à se complexer :

purine-purine > purine-pyrimidine >> pyrimidine-pyrimidine

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

Tableau 1 : Valeurs de %H mesurées dans l'eau à 20°C pour les dinucléotides (55) et leurs analogues synthétiques (36).

L'étude des modèles Ade-C_n-8Pso (Figure 12) a montré que %H diminue quand la longueur de la chaîne polyméthylénique augmente. Ce phénomène a été attribué à l'accroissement des degrés de liberté dans la molécule, provoquant une diminution de la proportion en complexe intramoléculaire (56).

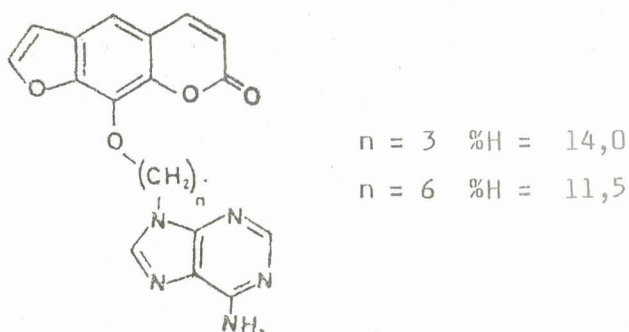


Figure 12 : Modèles Ade-C_n-8Pso : valeurs de %H mesurées dans un mélange eau-éthanol 95:5 entre 400 et 230 nm.

Des résultats comparables ont été décrits par K. GOLANKIEWICZ qui s'est intéressé à la photodimérisation de modèles du type Thy-C_n-Thy. Dans cette série également, l'effet hypochrome diminuait lorsqu'on allongeait la chaîne (figure 13). Ce phénomène a été interprété en termes de diminution du taux de complexation par accroissement des degrés de liberté (57).

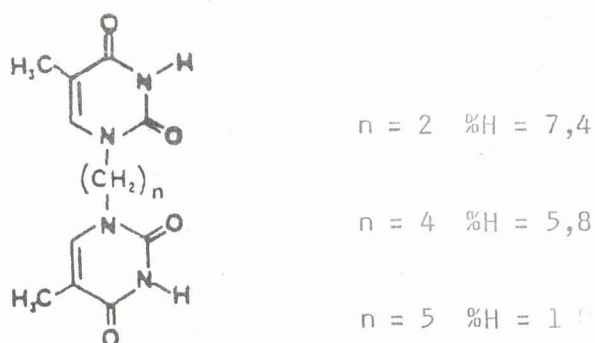


Figure 13 : Influence de la longueur de la chaîne sur la valeur %H mesurée dans l'eau pour les modèles Thy-C_n-Thy d'après K. GOLANKIEWICZ.

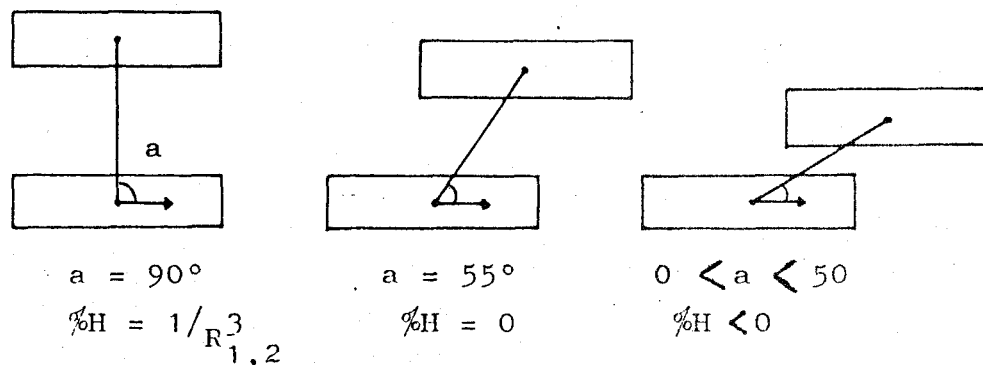
Les théories relatives à l'effet hypochrome font état de la variation de la grandeur %H en fonction des positions relatives des deux

chromophores impliqués : On a mesuré le déplacement latéral d'un chromophore par rapport à l'autre (les deux chromophores étant identiques) en considérant la variation de l'angle (a) formé par la droite joignant les centres des deux chromophores ($R_{1,2}$) et le moment de transition de l'un d'eux (52, 58, 59).

%H est alors donné par la relation :

$$\%H = \frac{1}{R_{1,2}^3} (1 - 3 \cos^2 a)$$

que l'on peut illustrer ainsi :



A notre connaissance, le seul travail expérimental réalisé dans le but d'étudier l'influence de la géométrie du complexe sur la valeur de %H est rapporté par N.J. LEONARD et Coll. (60).

Dans les composés synthétisés, deux molécules d'adénine sont reliées l'une à l'autre par une chaîne triméthylénique (Ade-C₃-Ade). En faisant varier les sites de fixation de la chaîne sur les bases, on obtient des systèmes dans lesquels les orientations relatives des deux chromophores sont différentes dans la conformation repliée (Figure 14).

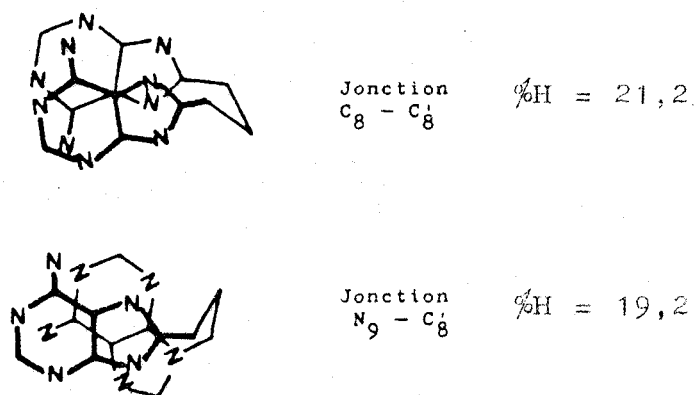


Figure 14 : Effet de la géométrie du dimère Ade-C₃-Ade sur la valeur de %H d'après N.J. LEONARD (60).

Dans ce cas (où les deux chromophores sont identiques), on ne constate pas d'effet notable de l'orientation sur la valeur de %H.

Ces résultats expérimentaux et les études théoriques d'un certain nombre de modèles simples ont conduit les auteurs à considérer l'effet hypochrome comme une mesure semiquantitative du degré d'empilement et sans doute de l'affinité de deux chromophores.

II. ETUDE DES MODELES :

1/ Enregistrement des spectres :

Les modèles ont été étudiés dans l'eau tamponnée à pH 5,5 de façon à nous rapprocher le plus possible des conditions biologiques : le noyau acridine se trouve dans la forme protonée alors que la base nucléotidique est inchangée. Le spectre d'absorption de l'acridine comporte deux régions bien distinctes : l'une entre 500 et 300 nm, l'autre entre 300 et 250 nm.

Nous avons choisi d'enregistrer les spectres entre 500 et 300 nm car dans cette gamme de longueur d'onde, la composante "base nucléotidique" des modèles n'absorbe pas. Le seul composé de référence à considérer est donc le monomère Acr-C₃ ; 7 (Figure 15).

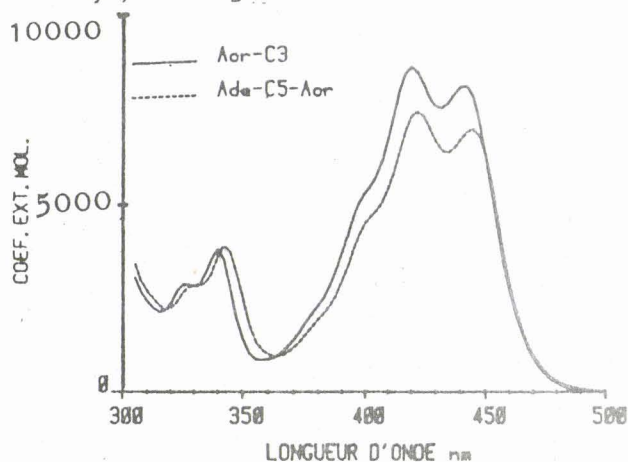


Figure 15 : Comparaison des spectres d'absorption UV du modèle Ade-C₅-Acr; 20 et de la référence Acr-C₃ ; 7 pris à la même concentration (tampon acétate de sodium 0,05 M ; pH 5,5 ; 5% d'éthanol).

Lorsque l'on compare l'allure des spectres d'absorption des modèles Base-C_n-Acr avec celui de la référence Acr-C₃ ; 7, à la même concentration, on constate une très forte diminution de l'intensité d'absorption des modèles : c'est l'effet HYPOCHROME %H, accompagné d'un léger décalage des maxima d'absorption vers les plus grandes longueurs d'ondes : c'est l'effet BATHOCHROME.

Ce phénomène est tout à fait comparable à celui que l'on peut observer pour la quinacrine intercalée dans l'ADN (voir page 2). Ces effets, sensibles pour tous les modèles examinés, traduisent l'existence d'interactions noyau-noyau. Notre but étant d'étudier de manière quantitative les forces d'empilement intramoléculaires, nous avons vérifié que les produits suivent bien la loi de BEER-LAMBERT dans la gamme de concentration envisagée. En effet, les composés de type acridine ont tendance à s'auto-associer dans l'eau et la présence d'aggrégats est gênante lorsque l'on veut mesurer une complexation intramoléculaire.

Nous avons également contrôlé, qu'à la concentration pour laquelle les acridines ne s'auto-associent pas, un mélange équimolaire des composés de référence Acr-C₃ ; 7 et Base-C₃ ; 8, 9, 31 présente une absorption en UV qui est égale à la somme des absorptions des deux composants pris indépendamment. Aux dilutions auxquelles nous sommes obligés de travailler, il n'est donc pas possible d'observer selectivement des interactions "base nucléotidique-acridine" lorsque ces deux composés sont en simple mélange équimoléculaire en solution.

Ainsi, nous avons montré que la perturbation induite dans le spectre UV est le reflet des interactions noyau-noyau mises en jeu. Pour obtenir une mesure qualitative et quantitative de ces interactions, nous avons calculé la valeur de l'effet hypochrome (%H) observé.

Remarque : Etant donné le caractère hygroscopique des produits, leur quantité limitée et la grande précision nécessaire à ce type d'études, les solutions mères des solutions utilisées pour la spectrophotométrie UV ont été dosées par M. DELANNOY dans le laboratoire du Pr. J. NICOLE : dosage acido-basique (Figure 16).

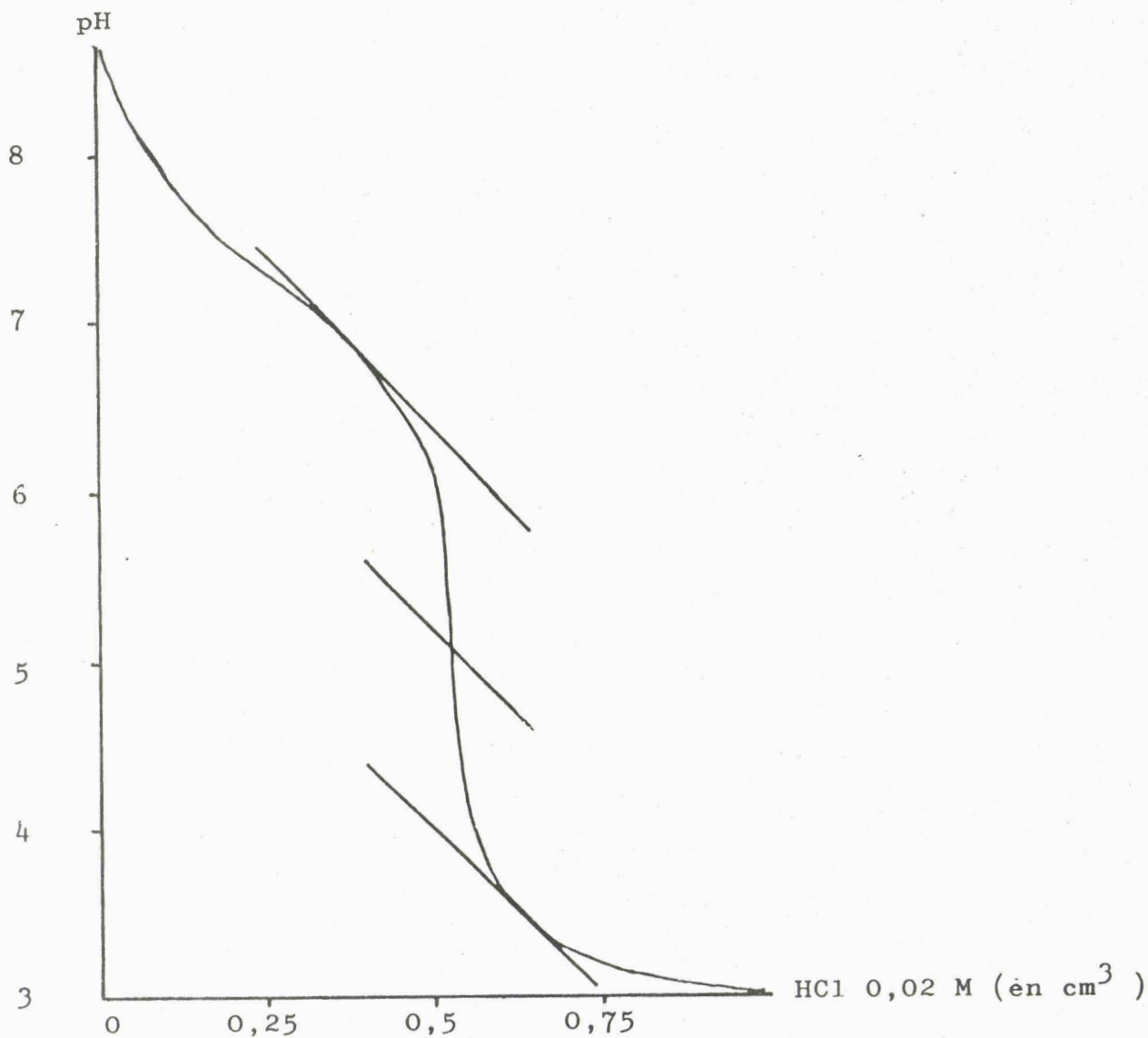


Figure 16 : Dosage acido-basique du modèle Gua-C₅-Acr ; 34
 Solvant : éthanol ; $c = 4,2 \cdot 10^{-4}$ M.

2/ Calcul de %H :

Dans le cas d'un hétérodimère, %H est donnée par la relation :

$$\%H = \left(1 - \frac{f_{AB}}{f_A + f_B} \right) \cdot 100$$



A et B désignant les deux chromophores constitutifs de l'hétérodimère.

Dans notre cas, cette relation peut se simplifier. En effet, nous avons enregistré les spectres de nos modèles entre 500 et 300 nm. Dans cette gamme de longueurs d'onde, les bases nucléotidiques n'absorbent pas. Le seul composé de référence intervenant dans le calcul est donc "la composante" acridine du dimère : Acr-C₃ ; 7.

La relation simplifiée est devenue :

$$\%H = \left(1 - \frac{f_{\text{modèle}}}{f_{\text{Acr-C}_3}} \right) \cdot 100$$

Les spectres des modèles enregistrés entre 500 et 300 nm, à la même concentration, sont représentés ci-après (Figure 16 bis). Les valeurs correspondantes calculées pour %H ont été regroupées dans le tableau 2.

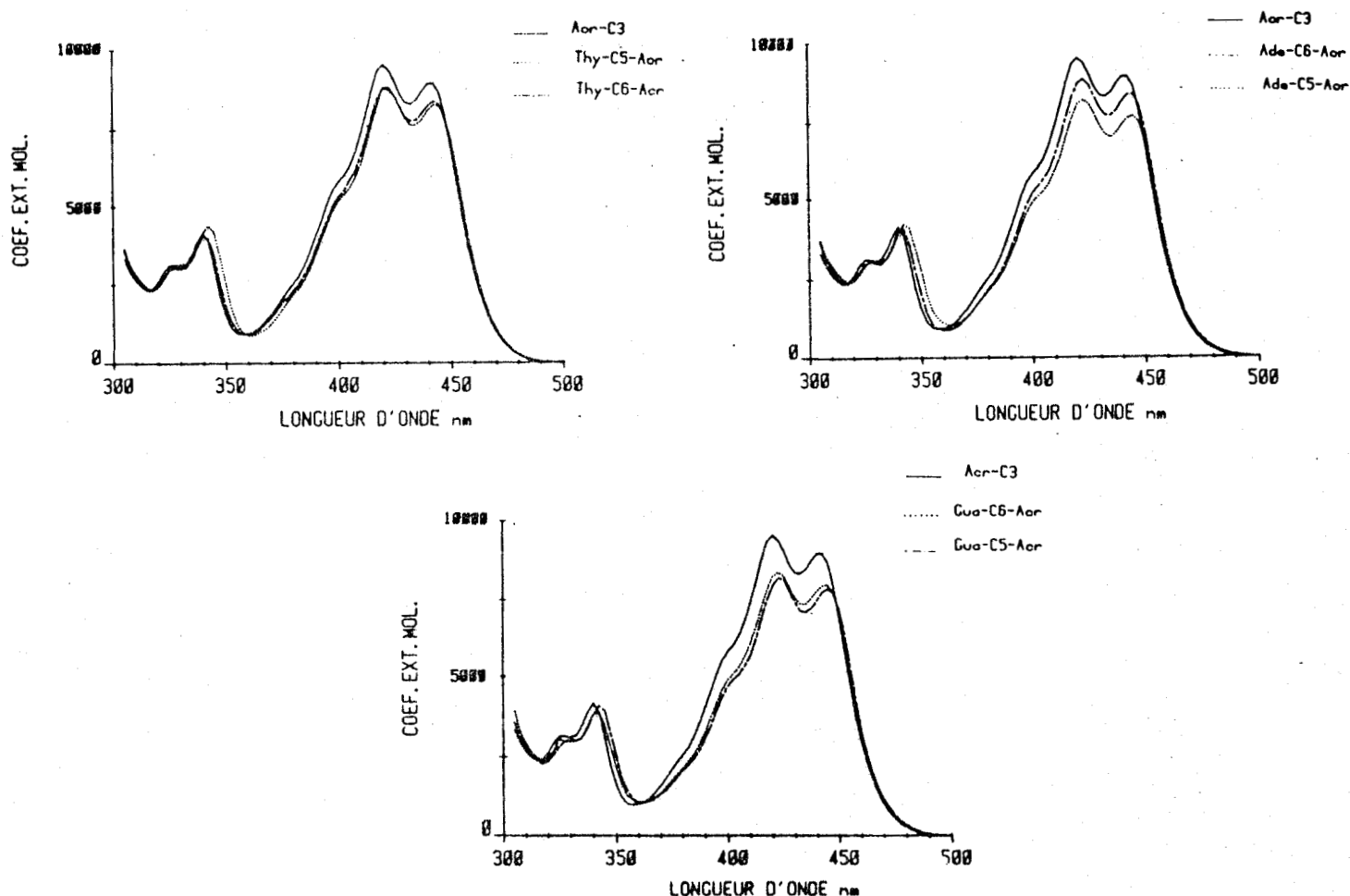


Figure 16 bis : Spectres des modèles Base-C_n-Acr enregistrés entre 500 et 300 nm. Comparaison avec la référence Acr-C₃ ; 7 (tampon acétate 0,05 M ; pH 5,5 ; 5 % d'éthanol ; 22°C ; c = 10⁻⁴ M).

Modèle	%H	Modèle	%H	Modèle	%H
Ade-C ₃ -Acr	20	Thy-C ₃ -Acr	14		
Ade-C ₅ -Acr	13	Thy-C ₅ -Acr	8	Gua-C ₅ -Acr	14
Ade-C ₆ -Acr	7	Thy-C ₆ -Acr	6	Gua-C ₆ -Acr	13

Tableau 2 : Valeurs de %H calculées pour les différents modèles entre 500 et 360 nm.

En premier examen, ce tableau de valeurs suggère plusieurs remarques:

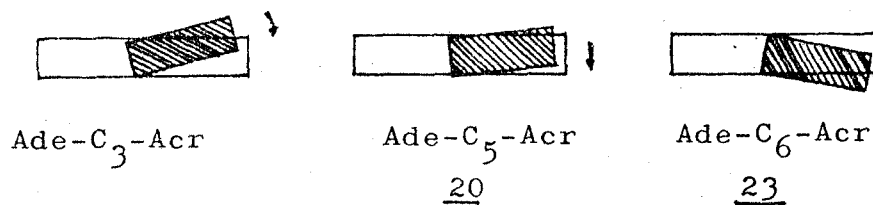
- 1° La valeur calculée est significative pour tous les modèles. Ce phénomène rend compte de l'existence d'interactions d'empilement importantes.
- 2° Pour une même longueur de chaîne, les valeurs mesurées pour la thymine sont plus faibles que celles mesurées pour les purines (Ade, Gua). Cette différence est en accord avec ce qui a été observé pour les analogues des dinucléosides (36) ainsi que pour des modèles, en d'autres séries, étudiés au laboratoire (22). Dans la plupart des cas, cette diminution a été interprétée en terme d'un degré de repliement plus faible des modèles en série thymine.
- 3° On note également une très forte influence de la longueur de la chaîne polyméthylénique reliant les deux chromophores. Notamment une diminution importante de la valeur de %H quand la longueur augmente (très spectaculaire en série adénine). Une diminution de %H avec le nombre des groupements méthyléniques de la chaîne avait déjà été observée sur d'autres modèles (voir p. 43) mais à notre connaissance, des variations aussi importantes n'ont jamais été décrites.

Quelle peut être la signification de ce phénomène ?

Deux explications sont possibles :

* La diminution de la valeur de %H reflète une diminution du pourcentage de forme repliée due à l'augmentation des degrés de liberté par allongement de la chaîne. Mais il paraît difficile de retenir cette interprétation pour rendre compte d'une diminution aussi considérable de %H.

* Nous sommes en présence d'un phénomène spectroscopique. On peut penser, qu'en fonction de la longueur de la chaîne, les deux chromophores s'empilent l'un sur l'autre selon des géométries différentes. A chacune de ces géométries correspond une valeur de %H très différente (pour un même degré d'empilement).



Cette interprétation ne paraît pas à priori déraisonnable quand on considère les modèles moléculaires (voir schéma).

Face à ces résultats, la première démarche a été de tenter de relier la valeur de %H au degré de repliement.

Pour déterminer le pourcentage de complexation associé au %H mesuré à température ambiante et pour accéder aux paramètres thermodynamiques de l'équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée", nous avons étudié les variations de %H pour chaque modèle avec la température (dans la gamme permise par le milieu aqueux, c'est à dire de 2,5 à 75°C).

En abaissant la température, on peut espérer favoriser la forme repliée, voire même n'observer que cette conformation. L'augmentation de la température, au contraire, devrait diminuer le degré de complexation. En situant la position de l'équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée", nous pourrions préciser la force des interactions mises en jeu entre l'acridine et les différents types de bases nucléotidiques.

3/ Effet de la température : force des interactions.

Nous avons étudié l'influence de la température sur %H mesuré entre 500 et 360 nm, pour les modèles Thy-C₅-Acr ; 14, Ade-C_n-Acr ; 20 et 23 , Gua-C_n-Acr ; 34 et 35.

En raison de leur faible solubilité, les modèles en série guanine n'ont pu être étudiés à basse température (à 20°C, ils précipitent même à $3 \cdot 10^{-5}$ M).

a. Série adénine :

Nous avons représenté sur la figure 17 la variation de la valeur %H avec la température pour les modèles Ade-C₅-Acr ; 20 et Ade-C₆-Acr ; 23 (nous rappelons les résultats obtenus pour Ade-C₃-Acr, modèle étudié par J. BOLTE et Coll. (23).

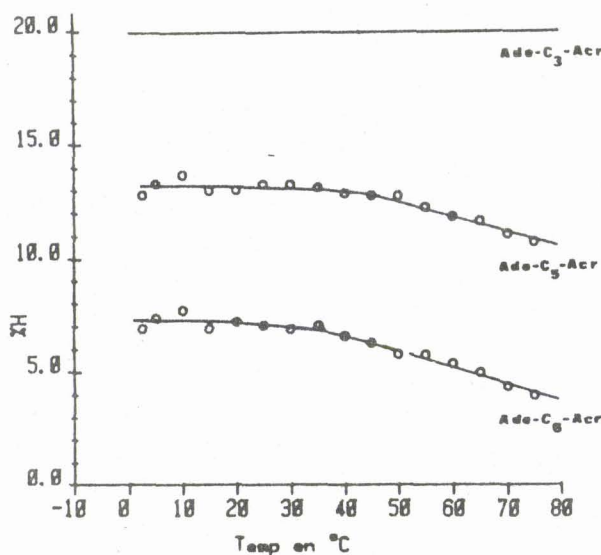


Figure 17 : Effet de la température sur la valeur %H des modèles Ade-C_n-Acr (n = 3, 5, 6).

* On constate que l'effet hypochrome du modèle Ade-C₃-Acr est très important (20 %) et qu'il reste absolument constant dans la gamme de température de 0 à 80 °C.

* Pour les modèles à plus longues chaînes, on constate un comportement différent : %H pour Ade-C₅-Acr ; 20 et pour Ade-C₆-Acr ; 23 reste pratiquement constant entre 2,5 et 40°C avant de décroître régulièrement jusqu'à 11 % et 4% respectivement à 75°C.

Ce phénomène est comparable à celui observé dans d'autres séries étudiées au laboratoire avec comme intercalant la quinoléine (22) et le psoralène (56). Dans ces séries, l'existence du palier avait été interprétée comme étant caractéristique de l'existence de la conformation repliée à 100%. Dans certains cas, ces hypothèses ont pu être vérifiées par des études par RMN du proton.

Si nous interprétons nos résultats en faisant appel au même type de raisonnement, nous pouvons dire que :

- pour n = 3, on observe 100 % de repliement sur toute la gamme de température.
- pour n = 5 et 6, la complexation totale se produit entre 2,5 et 45°C. Aux températures plus élevées, la décroissance de %H rend compte du déplacement de l'équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée" vers la forme ouverte.

Ces interprétations nous amènent à faire l'hypothèse suivante :

- quand n = 3, 100 % de forme complexée conduisent à %H = 20.
- quand n = 5, l'empilement maximum correspond à %H = 13.
- quand n = 6, l'empilement maximum induit un %H = 7.

Dans ces trois cas, les chromophores mis en jeu sont les mêmes et pour chacun de ces modèles, seule la conformation repliée existe à température ambiante.

Ces résultats ne sont compréhensibles que si l'influence de l'orientation des chromophores sur la valeur de %H est grande. Cette variation dans l'orientation relative, selon la longueur de chaîne devra être confirmée par des études en RMN ^1H .

A partir des courbes $\%H = f(T)$, nous pouvons accéder aux paramètres thermodynamiques de l'équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée" et notamment à la valeur de la constante K de cet équilibre.



La valeur de K est donnée par la relation :

$$K = \frac{[\text{forme ouverte}]}{[\text{forme repliée}]} = \frac{\%H}{\%H_{\text{max}} - \%H}$$

$\%H_{\text{max}}$ étant la valeur sur le palier et %H la valeur à une température donnée.

Une autre grandeur significative est également le pourcentage de molécules adoptant la conformation repliée à une température donnée.

$$\% \text{ forme repliée} = \frac{\%H}{\%H_{\text{max}}} \times 100$$

Les valeurs obtenues pour ces deux paramètres sont réunies dans le tableau 3.

Modèle	Température °C	20	40	60	75
Ade-C ₃ -Acr	K	—	—	—	—
%H _{max} =20	% forme repliée	100	100	100	100
Ade-C ₅ -Acr	K	—	—	11	5
%H _{max} =13	% forme repliée	100	100	90	85
Ade-C ₆ -Acr	K	—	18	3,4	2,3
%H _{max} =7	% forme repliée	100	95	75	55

Tableau 3 : Influence de la température sur l'interaction adénine-acridine dans les modèles Ade-C_n-Acr (n = 3, 5, 6).

b. Série thymine:

Nous avons représenté dans la figure 18 les effets de la température sur %H mesuré pour le modèle Thy-C₅-Acr ; 14 et sur %H du modèle Thy-C₃-Acr étudié précédemment par J. BOLTE (23).

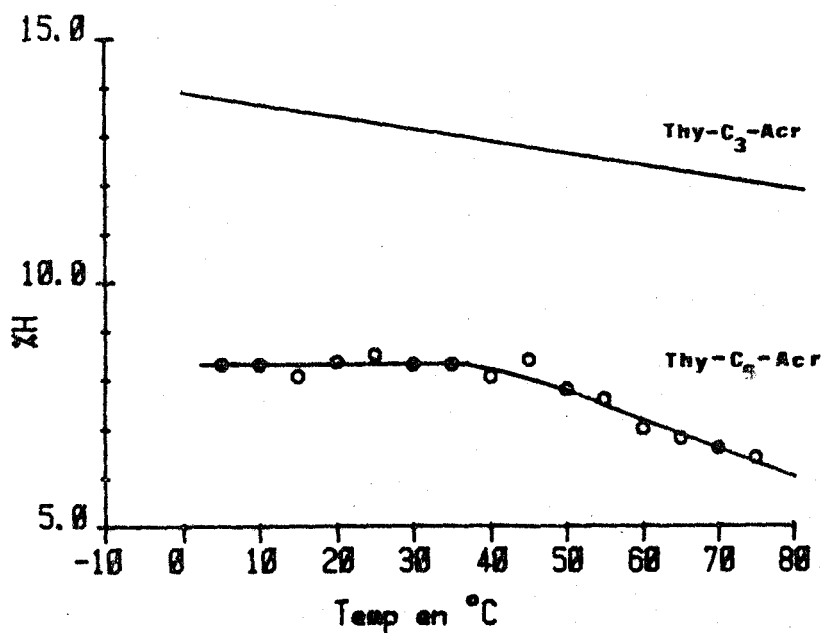


Figure 18 : Variation de %H pour les modèles Thy-C₅-Acr et 14 ; Thy-C₃-Acr avec la température.

Si nous traitons ces résultats de la même manière qu'en série adénine, nous pouvons dire que :

- * La décroissance faible mais régulière de %H pour le modèle Thy-C₃-Acr (14,6 % à 0°C ; 12 % à 75°C) laisse à penser que la conformation du système est peu sensible à la température et que le pourcentage de complexation est sans doute proche de 100 % à température ambiante (23). Ceci avait été confirmé par l'étude par RMN ¹H.
- * L'existence d'un plateau plus net dans le cas du dérivé Thy-C₅-Acr ; 14 rend compte de l'existence de la forme repliée à 100 % entre 2,5 et 40°C. Le pourcentage en forme complexée diminuant au delà de 40°C.

Cette différence de comportement pour les deux longueurs de chaîne n'est pas usuelle et il est difficile de l'expliquer de façon non ambiguë. Il semble en effet que l'allongement de la chaîne favorise les interactions d'empilement noyau-noyau mises en jeu entre l'acridine et la thymine.

Ce problème devra être discuté avec l'appui de techniques permettant d'accéder à la géométrie du complexe.

En utilisant la même démarche que dans la série adénine, nous pouvons également déterminer la constante d'équilibre K et le pourcentage de forme repliée observés à différentes températures pour le modèle Thy-C₅-Acr ; 14 (Tableau 4).

Température °C		20	40	60	75
Thy-C ₅ -Acr	K	—	21	5	3,2
%H _{max} = 8,4	% forme repliée	100	95	85	75

Tableau 4 : Détermination de la constante d'équilibre K et du pourcentage en forme repliée à différentes températures pour le modèle Thy-C₅-Acr ; 14.

c. Série guanine :

Nous avons représenté dans la figure 19, les effets de la température sur %H des modèles Gua-C_n-Acr ; 34 et 35. Les spectres ont été mesurés dans l'eau à des concentrations voisines de 10⁻⁵M. La faible solubilité des produits ne nous a pas permis d'obtenir les valeurs de %H entre 2,5 et 20°C, températures auxquelles les produits précipitent dans la gamme de concentration utilisée.

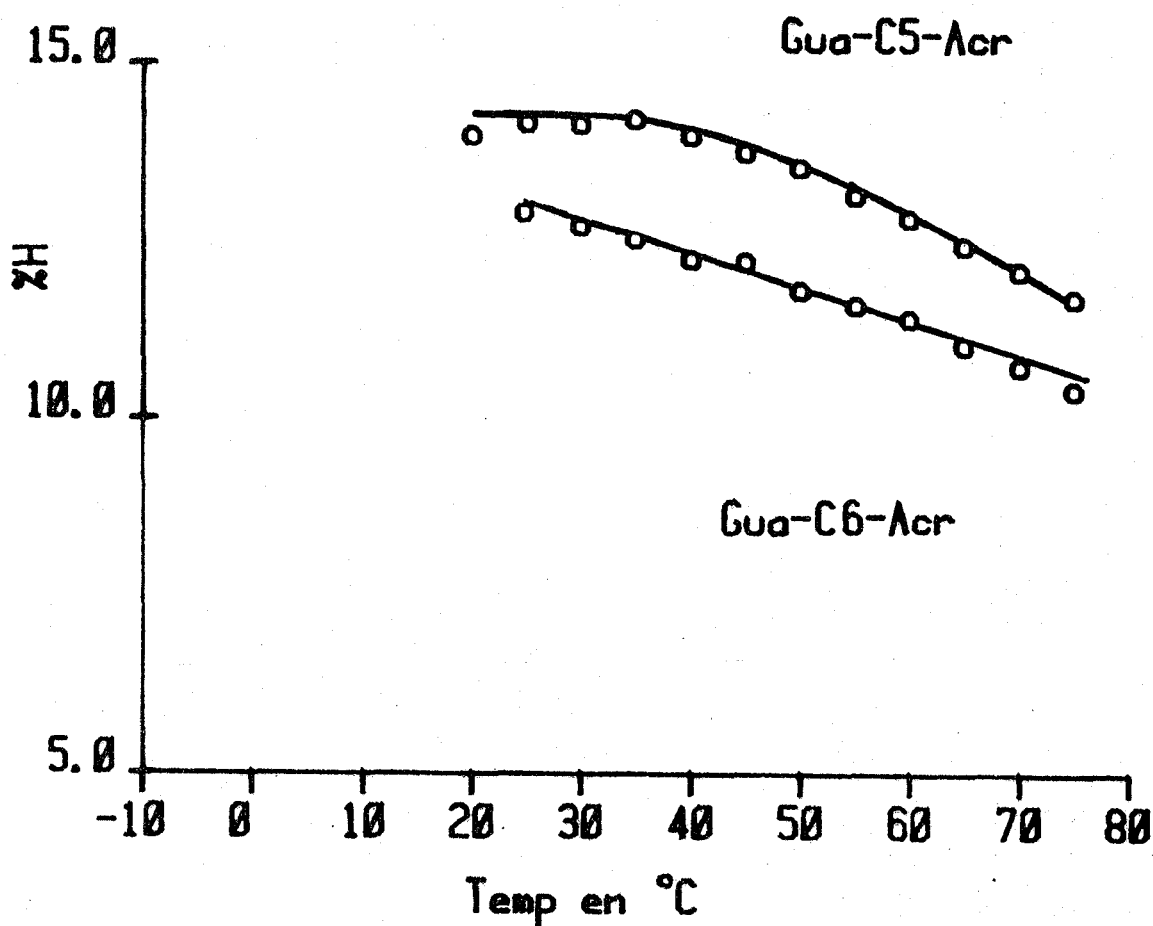


Figure 19 : Variation de %H de Gua-C_n-Acr ; 34 et 35 avec la température.

Pour le produit Gua-C₅-Acr ; 34, on constate une décroissance régulière de %H entre 35 et 75°C. Le non alignement de tous les points laisse à penser que nous sommes proches de la complexation totale à 25°C.

Pour le composé Gua-C₆-Acr ; 35, la décroissance de %H est régulière et tous les points de la courbe s'alignent parfaitement. Nous ne pouvons donc pas être sûrs d'observer un taux de complexation proche des 100 %. Quoiqu'il en soit, le nombre de points expérimentaux dans la zone susceptible de comporter un plateau est trop réduit pour qu'on puisse affirmer son existence pour ces 2 modèles.

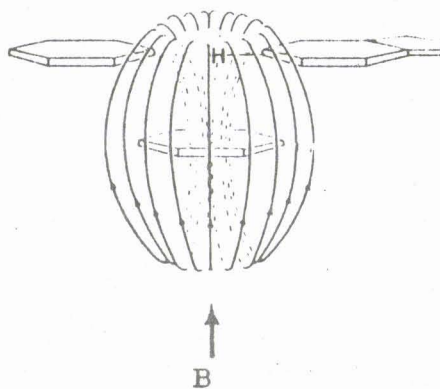
Par conséquent, il est difficile d'accéder aux paramètres thermodynamiques de l'équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée".

Cependant, on peut essayer d'encadrer ces paramètres en faisant varier la valeur de %H_{max} entre 20 % (valeur maximum, observée pour Ade-C₃-Acr) et la valeur mesurée à 20°C pour ces modèles (voir p.85 et 86).

B. ETUDE PAR RMN.

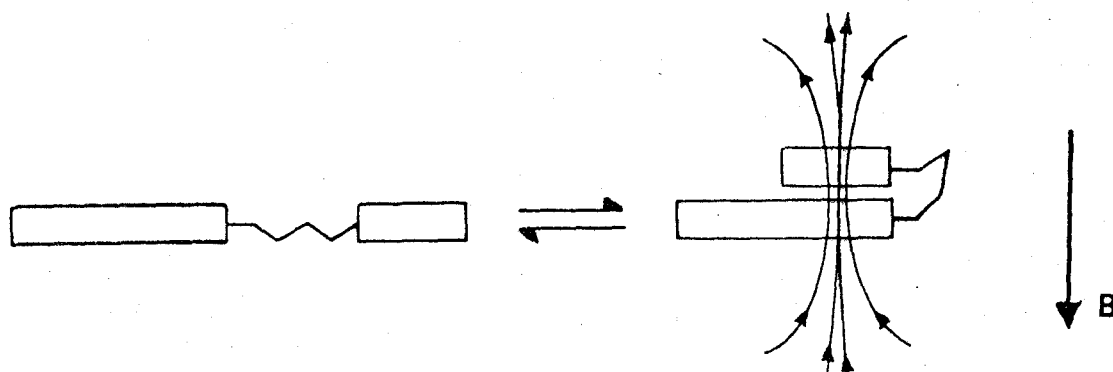
I. PRINCIPE DE LA METHODE :

Lorsque l'on compare par RMN les protons de cycles aromatiques présentant des interactions d'empilement avec ceux des chromophores libres, on constate un décalage des déplacements chimiques vers les champs forts. Ce phénomène est lié à l'anisotropie diamagnétique du cycle aromatique qui provoque un blindage des protons d'une autre molécule se trouvant à proximité.



Cette propriété est particulièrement intéressante pour étudier la géométrie de molécules susceptibles de présenter des interactions verticales. Elle a été mise à profit pour mettre en évidence la structure de la conformation repliée de dinucléosides comme ApC et CpA (61). Des études en solution de dinucléotides autocomplémentaires ont permis de "mimer" l'intercalation de molécules à noyau acridine comme la proflavine (51) ou l' amino-9 acridine (50).

Dans notre cas, cette technique est tout à fait adaptée pour mettre en évidence l'existence de la conformation repliée adoptée par nos modèles.



La comparaison des déplacements chimiques des modèles Base-C_n-Acr avec les déplacements chimiques des "demi-molécules" de référence Base-C₃ et Acr-C₃ ; 7 permet de déceler les interactions d'empilement. La grandeur utilisée pour rendre compte de cette complexation est $\Delta\delta = (\delta \text{ référence} - \delta \text{ modèle})$. Une valeur de $\Delta\delta$ positive qui correspond à un blindage des protons du modèle par rapport à ceux de la référence est donc le signe d'interactions noyau-noyau.

Enregistrement des spectres :

Dans un premier temps, les spectres de RMN des modèles Base-C_n-Acr (Base = Ade, Thy ; n = 3,5 et 6) ont été enregistrés dans l'eau lourde tamponnée à pD 5,6 par un mélange d'acide acétique et de soude deutériés.

Nous avons représenté sur la figure 20 les spectres mesurés à 5 10⁻⁴M pour le modèle Ade-C₃-Acr et les composés de référence Ade-C₃ ; 9 et Acr-C₃ ; 7.

En l'absence d'interactions d'empilement, nous nous attendons à ce que le spectre du modèle soit superposable à la somme des spectres des demi-molécules correspondantes.

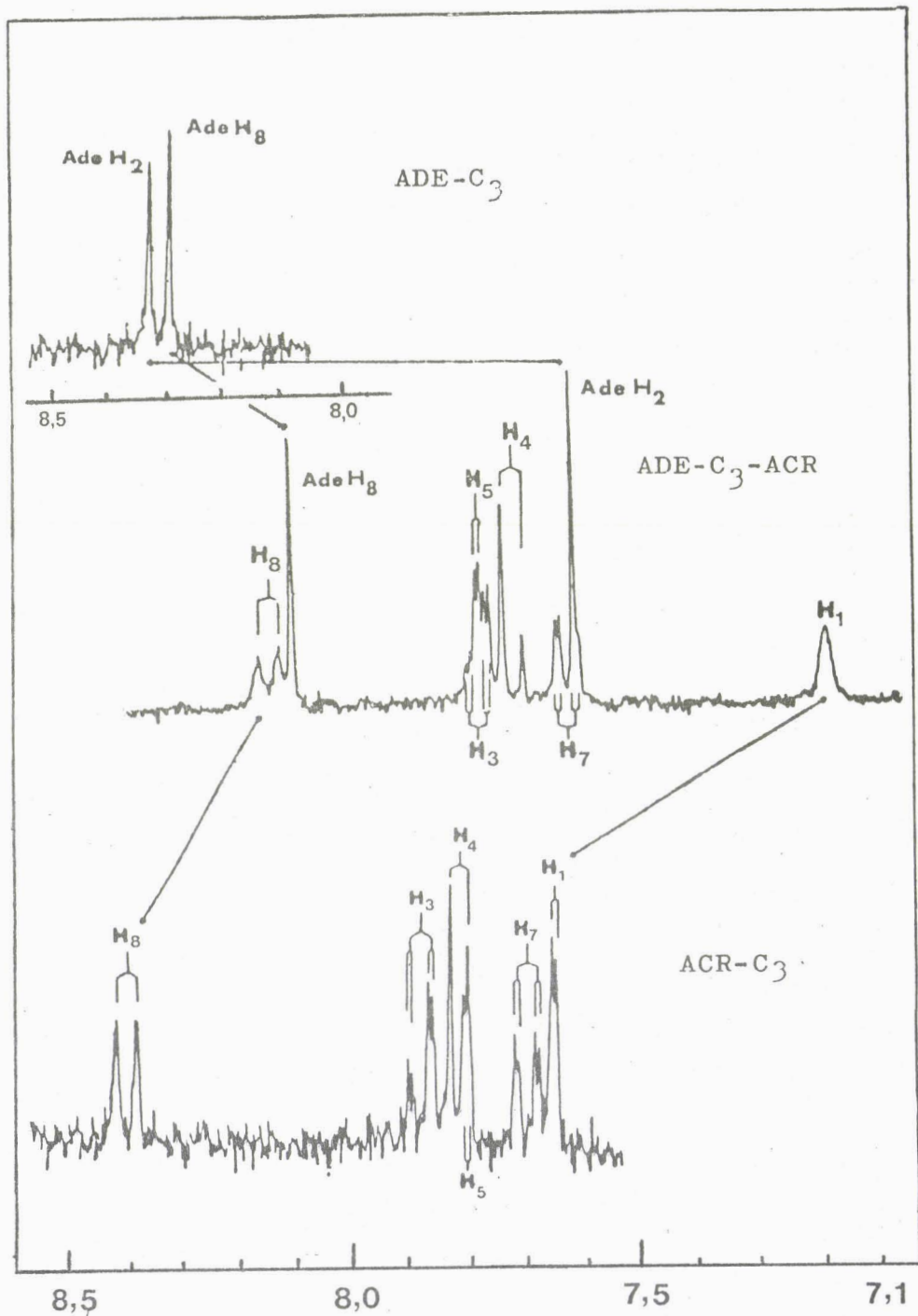


Figure 20 : Spectres du modèle Ade-C₃-Acr et de ses composés de référence Acr-C₃ ; 7 et Ade-C₃ ; 9
 $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ tampon deutéroacétate pD = 5,6.

Nous constatons qu'il n'en est rien. Les protons des deux composés de référence, en particulier le H₂ et le H₈ de l'adénine, ainsi que le H₁ et le H₈ de l'acridine subissent un blindage très important dans le modèle Ade-C₃-Acr. Ce phénomène est le résultat d'interactions d'empilement intra ou intermoléculaires. Pour pouvoir quantifier les interactions noyau-noyau intramoléculaires, il est nécessaire de s'affranchir des interactions intermoléculaires possibles.

En effet, les constantes d'auto-association des acridines sont relativement fortes. Aussi, pour que les valeurs des déplacements chimiques observées puissent être comparées entre elles, il est nécessaire de mener une étude en fonction de la concentration et d'extrapoler les valeurs de δ pour chaque proton, à dilution infinie.

En série adénine et thymine, ces travaux, complétés par l'étude des spectres à température variable ont été réalisés par J. BARBET dans le laboratoire du Pr. B.P. ROQUES (Paris VI), sur un spectromètre BRUKER WH 270.

Nous avons étudié les modèles en série guanine, dans le laboratoire à l'aide d'un spectromètre BRUKER WP 80.

II. AUTOASSOCIATION (INTERACTIONS INTERMOLECULAIRES) :

Pour nous affranchir des effets de l'auto-association des acridines et n'avoir à considérer que les interactions intramoléculaires, nous avons étudié chaque produit dans une gamme de concentration ($C = 3 \cdot 10^{-3}$ à $5 \cdot 10^{-4}$). D'après J.L. DIMICOLI et C. HELENE (62), par extrapolation à $C=0$ (dilution infinie) de la courbe $\delta = f(C)$, on obtient les δ_0 des protons en absence d'aggrégats. Ces courbes permettent également de calculer les constantes d'auto-association, si on fait l'hypothèse que la complexation intermoléculaire est limitée à la formation de dimères ou de polymères à constantes d'autoassociation successives identiques.

1/ Méthode de calcul des constantes d'auto-association :

On détermine dans un premier temps le déplacement chimique à dilution infinie (δ_0) puis la différence ($\Delta\delta$) entre δ_0 et le déplacement chimique (δ_i) observé à chaque concentration (C_i). Le tracé de $(\Delta\delta/C_i)^{1/2} = f(\Delta\delta)$ est une droite de pente "s" interceptant l'axe des x en " x_0 ". Dans le cas de la formation de dimères, x_0 représente la valeur du déplacement chimique induit ($\Delta\delta C_i$). La constante d'affinité (K) est donnée par la relation $K = \frac{x_0 \cdot s^2}{2}$

. Pour les polymères : x_0 vaut $2\Delta\delta C_i$ et $K = x_0 s^2$.

2/ Effets de la dilution sur les modèles et leurs références :

Pour chaque produit nous avons reporté sur un graphique les courbes $\delta = f(c)$; nous avons indiqué sur la formule développée les déplacements chimiques déterminés à dilution infinie pour chaque proton.

a. Composés de référence :

Thy-C₃ ; 8 (Figure 21)

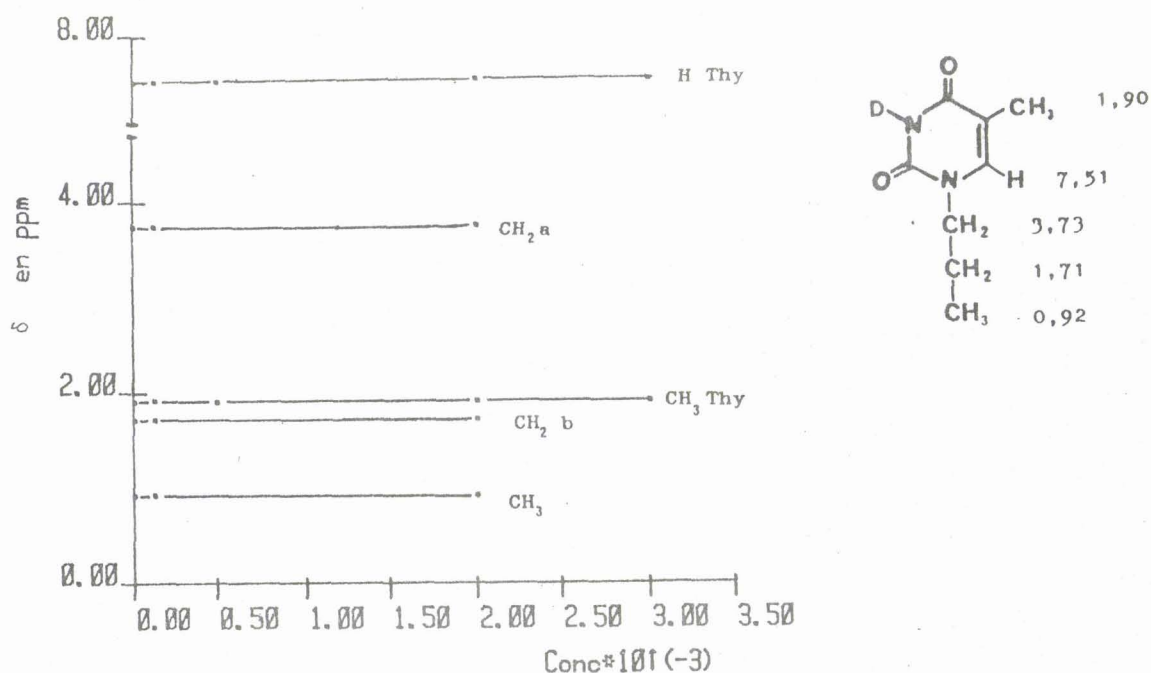


Figure 21 : Effets de la dilution, δ à dilution infinie pour Thy-C₃ ; 8.

Les effets de la dilution sont nuls : bien que l'anisotropie diamagnétique de la thymine soit peu marquée, il est fort probable que la constante d'autoassociation soit très faible.

Ade-C₃ ; 9 (Figure 22)

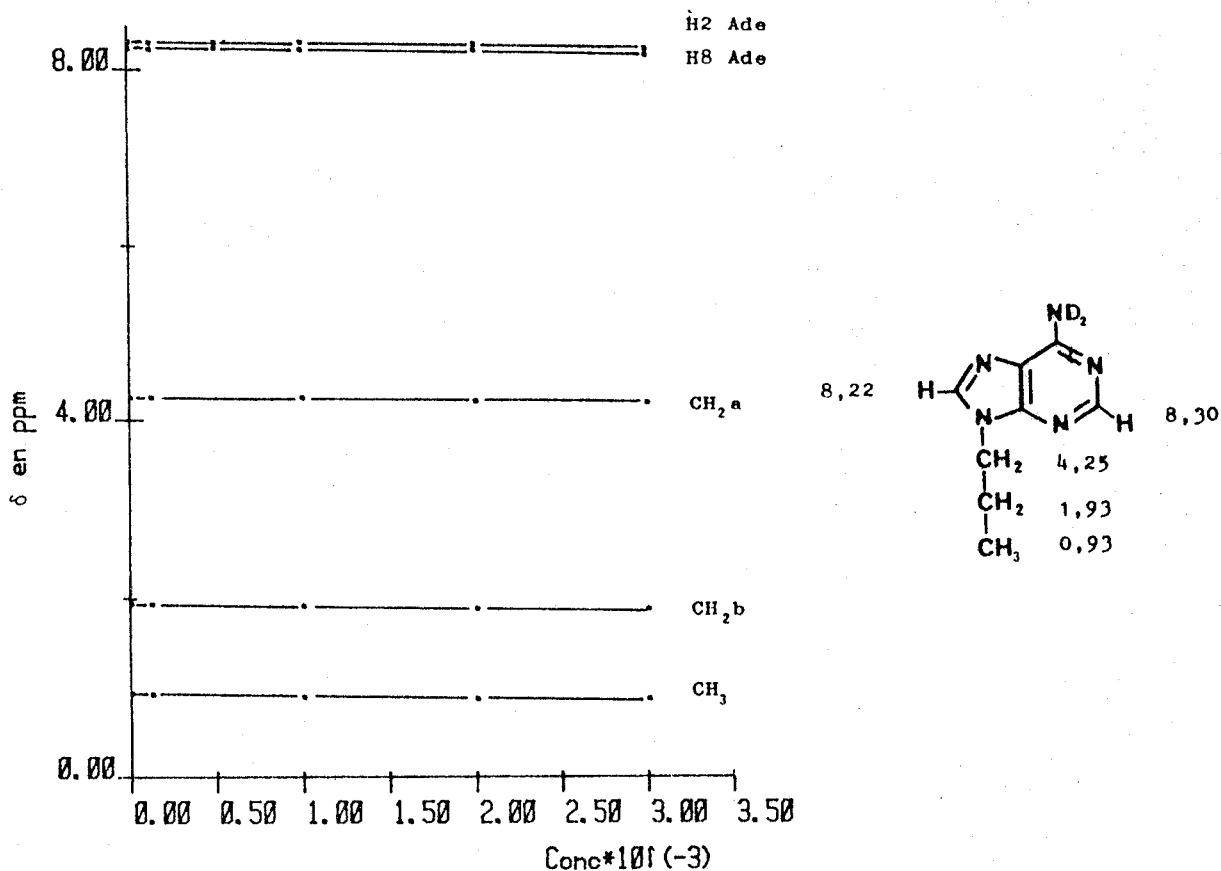


Figure 22 : Effets de la dilution pour Ade-C₃ ; 9.

Les effets de la dilution sont trop peu sensibles pour permettre le calcul de la constante d'auto-association. Etant donnée la forte anisotropie diamagnétique de l'adénine, des effets aussi faibles ne peuvent s'expliquer que par une constante d'auto-association faible.

Gua-C₃ ; 31 (Figure 23)

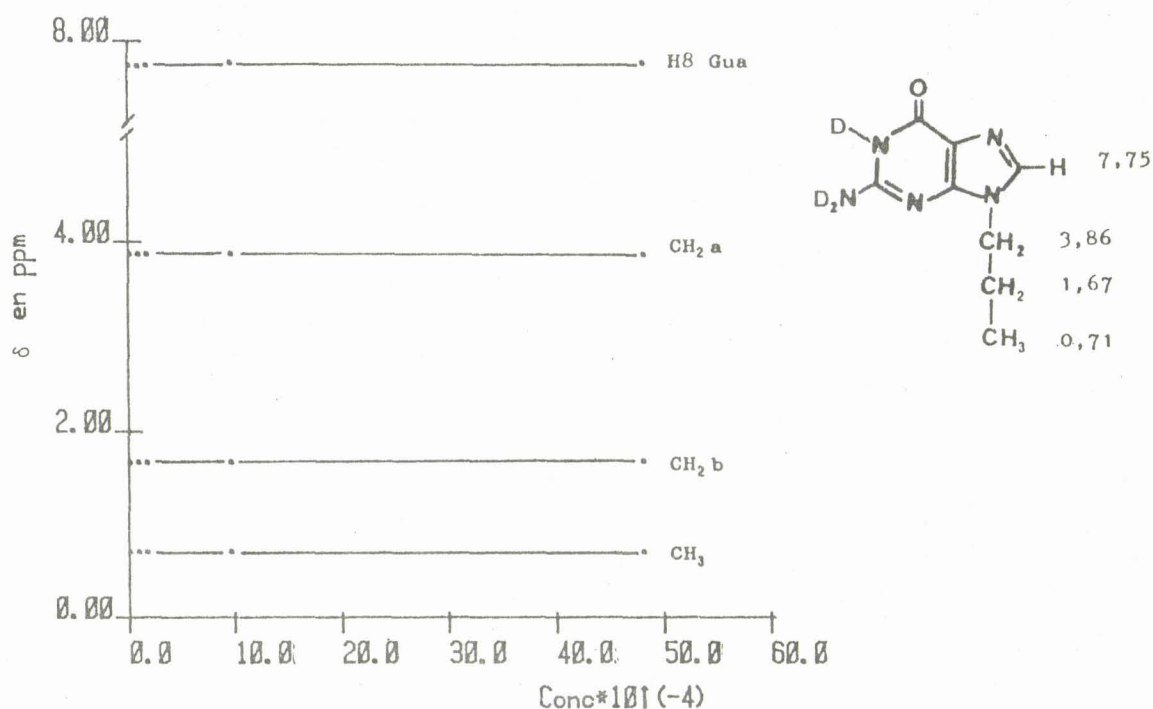


Figure 23 : Effets de la dilution pour Gua-C₃ ; 31.

La solubilité dans l'eau de ce composé est trop faible (saturation à $8 \cdot 10^{-4} \text{M}$) pour nous permettre de calculer sa constante d'auto-association. Cependant, on connaît un produit de structure voisine : le méthoxy-2 chloro-6 (N-((diméthylamino)-3 propyl)-1) amino)-9 acridine dont la constante d'auto-association est d'environ $400 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ (63). Malgré les faibles concentrations, les effets de la dilution sont très importants, ce qui est en faveur d'une auto-association forte.

Acr-C₃ ; 7 (Figure 24)

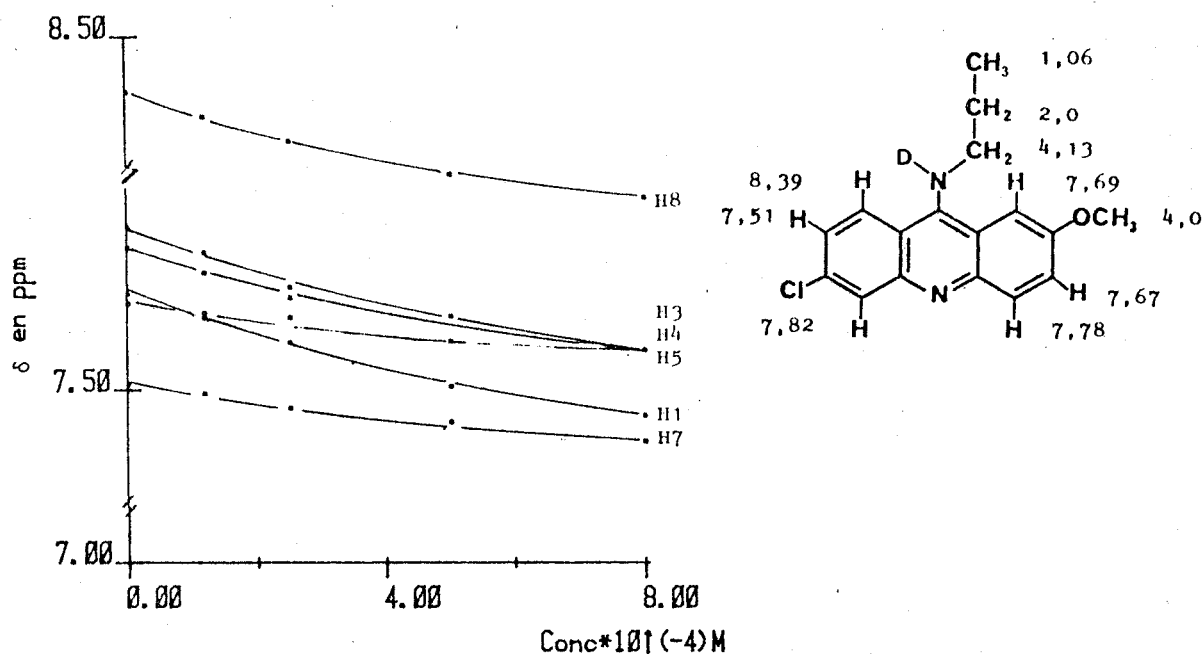
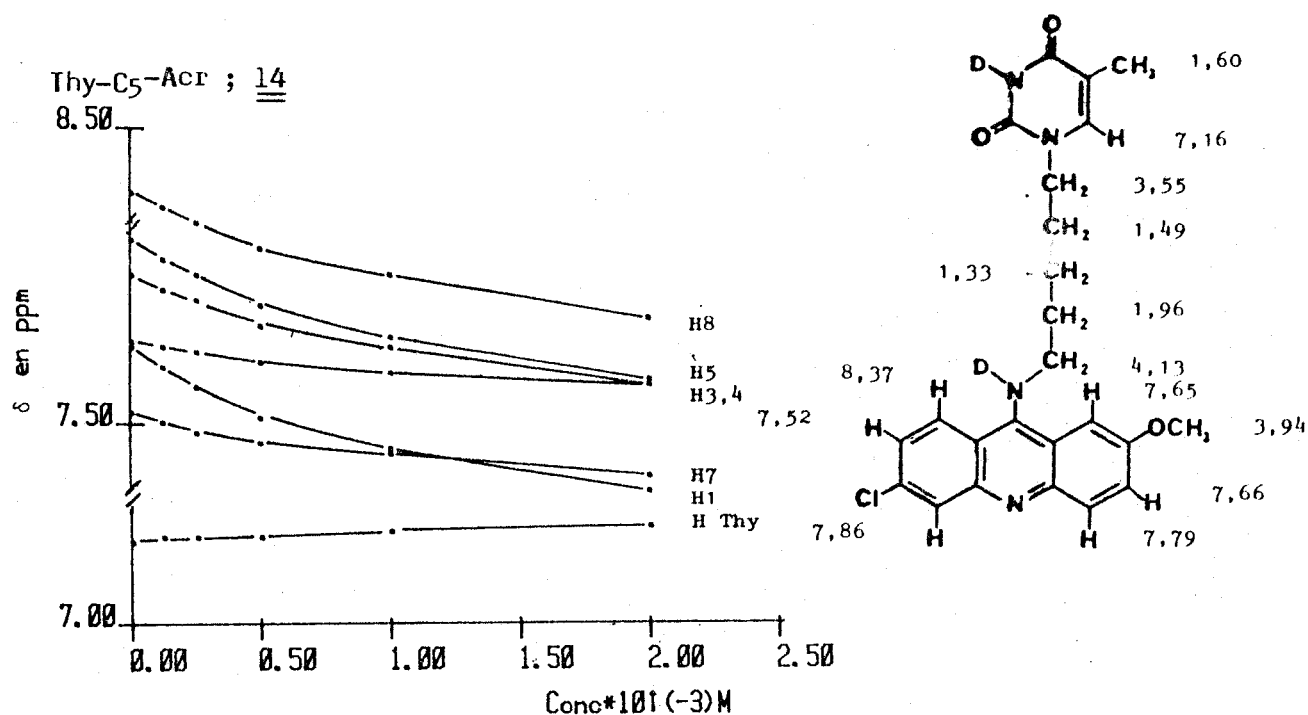


Figure 24 / Effets de la dilution pour Acr-C₃ ; 7.

Les effets de la dilution sont pratiquement nuls. La constante d'auto-association est trop faible pour être mesurée selon cette méthode.

b. Effets de la dilution sur les modèles Base-C_n-Acr :

1°/ Modèles en série thymine (Figure 25) :



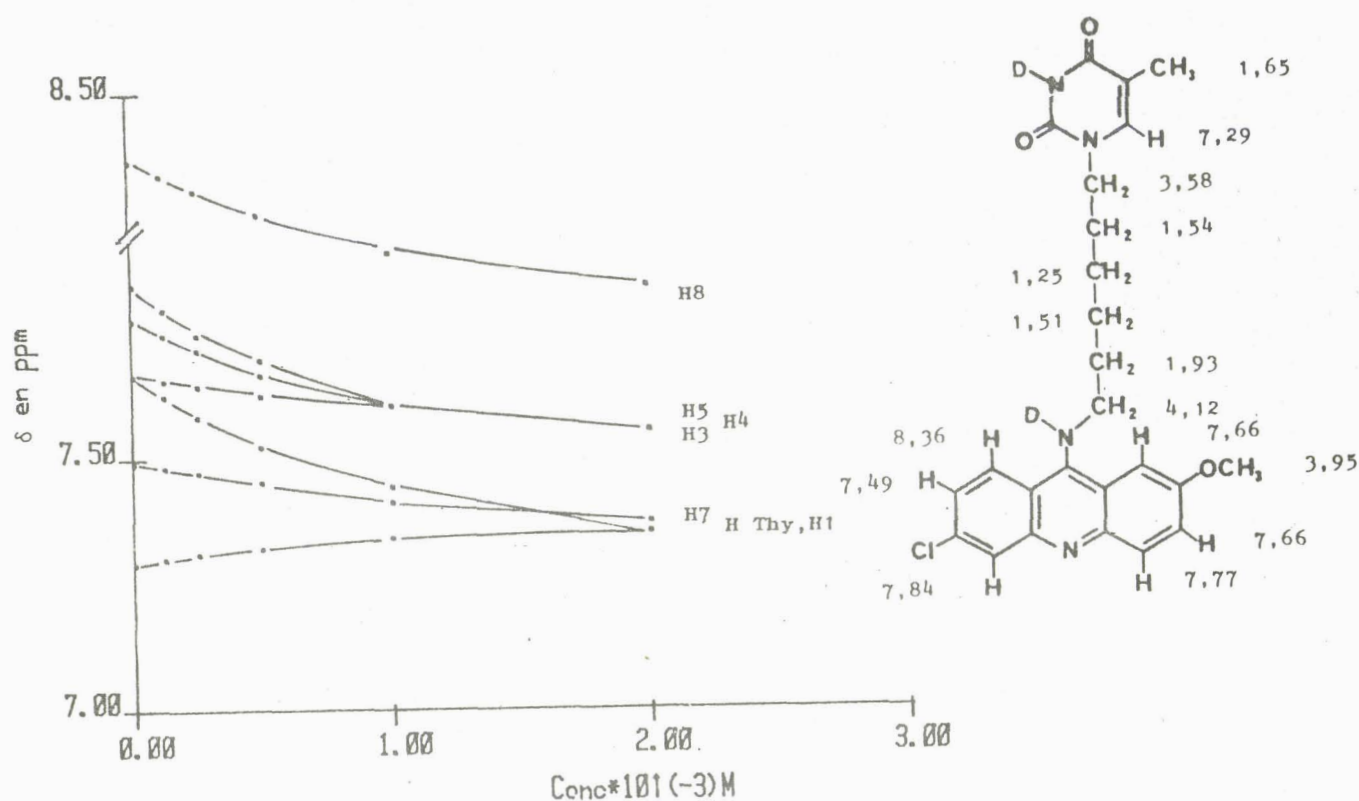
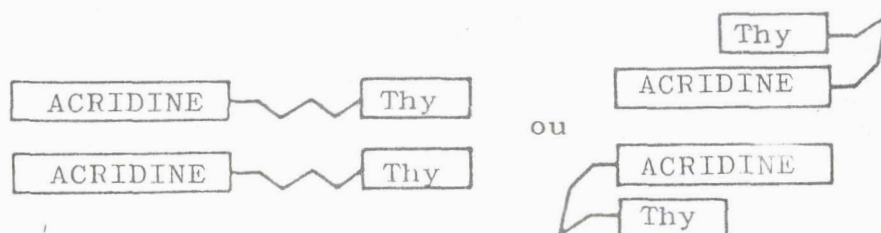


Figure 25 : Effets de la dilution pour les modèles Thy-C_n-Acr ; 14 et 17.

Les effets de la concentration sont très importants sur les protons de l'acridine. Ils sont négligeables sur ceux de la thymine. Ceci est en faveur d'aggrégats de type dimérique dans lesquels on observe un empilement de deux noyaux acridines.



Le traitement de ces systèmes par la méthode de J.L. DIMICOLI et C. HELENE fait apparaître une constante d'auto-association de $280 \pm 25 \text{ M. l}^{-1}$ pour

le modèle Thy-C₅-Acr ; 14 (valeur moyenne calculée pour les quatre protons concernés : H₁, H₄, H₅ et H₈ de l'acridine). Elle est de $260 \pm 25 \text{ M.l}^{-1}$ pour le modèle Thy-C₆-Acr ; 17 (Figure 26).

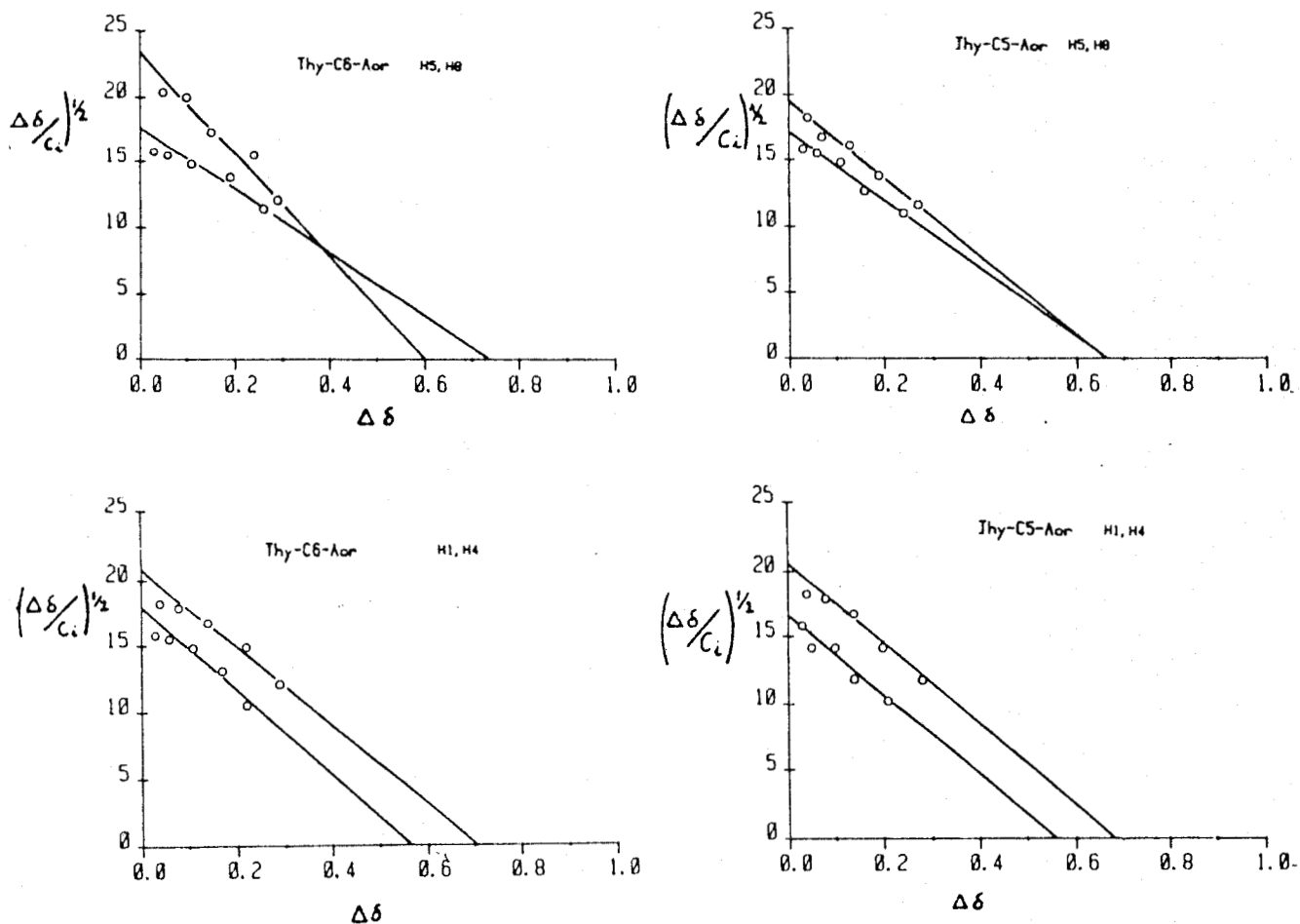


Figure 26 : Courbes $(\Delta\epsilon/C_i)^{1/2} = f(\Delta\delta)$ pour les modèles Thy-C₅-Acr ; 14 et Thy-C₆-Acr ; 17.

Ces valeurs sont presque deux fois plus élevées que celles obtenues pour le modèle Thy-C₃-Acr ($145 \pm 25 \text{ M.l}^{-1}$).

Thy-C₃-Acr (Figure 27)

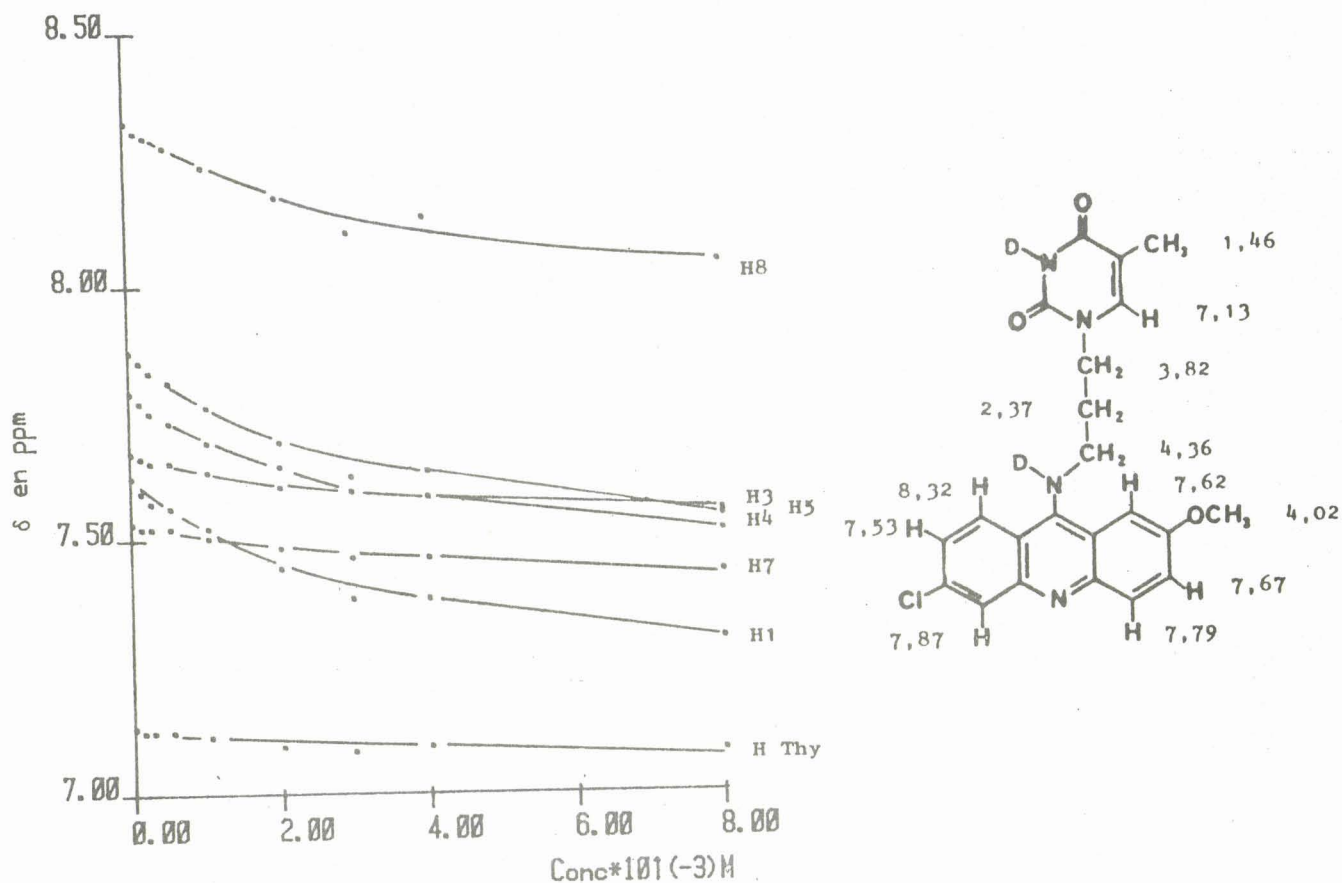


Figure 27 : Effets de la dilution pour le modèle Thy-C₃-Acr.

L'augmentation des constantes d'auto-association que nous avons observée pour les plus longues chaînes constitue un résultat surprenant.

Ceci peut s'expliquer si on admet la présence d'aggrégats de type dimérique dans lesquels l'empilement de deux noyaux acridine s'accompagne d'un empilement des deux noyaux thymine qui leur sont liés.

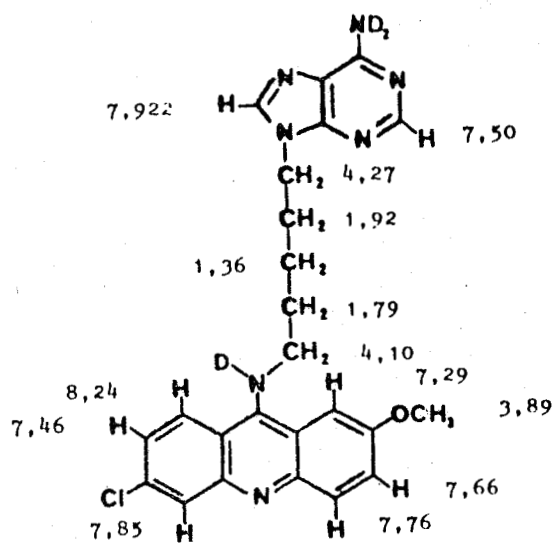
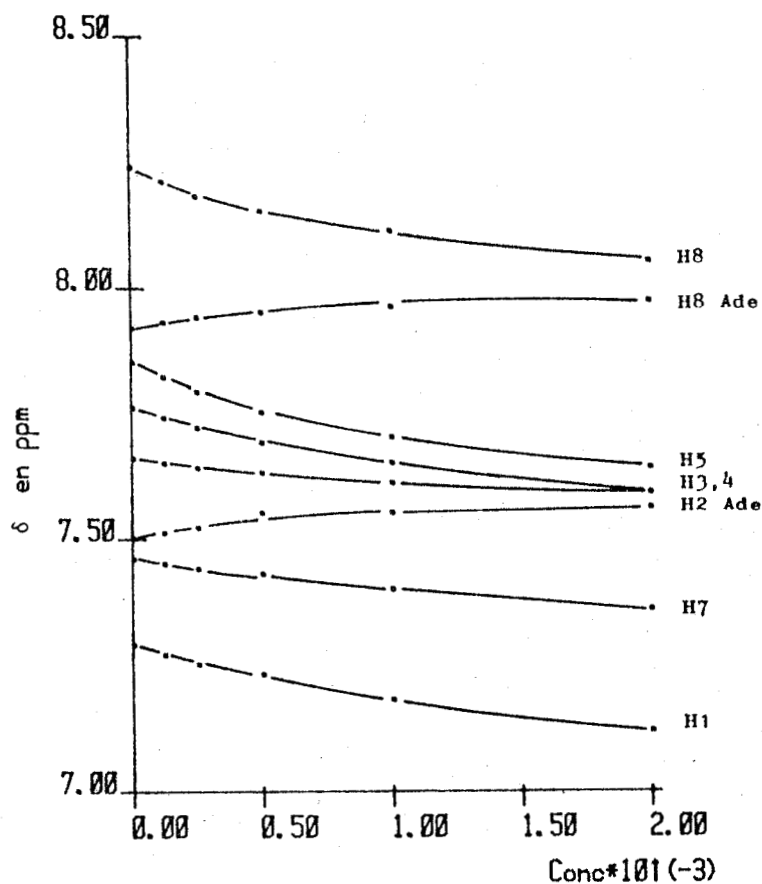


Dans ce type de complexes, l'interaction thymine-thymine n'est pas détectable par RMN à cause du faible courant de cycle de ce noyau. L'augmentation de la longueur de la chaîne pourrait donner lieu à des interactions plus importantes entre les deux chaînes carbonées (effet hydrophobe comparable à celui des détergents). Ceci pourrait alors expliquer l'autoassociation plus importante mise en évidence pour les composés

Thy-C₅-Acr ; 14 et Thy-C₆-acr ; 17 par rapport à Thy-C₃-Acr.

2°/ Modèles en série adénine (Figure 28)

Ade-C₅-Acr ; 20



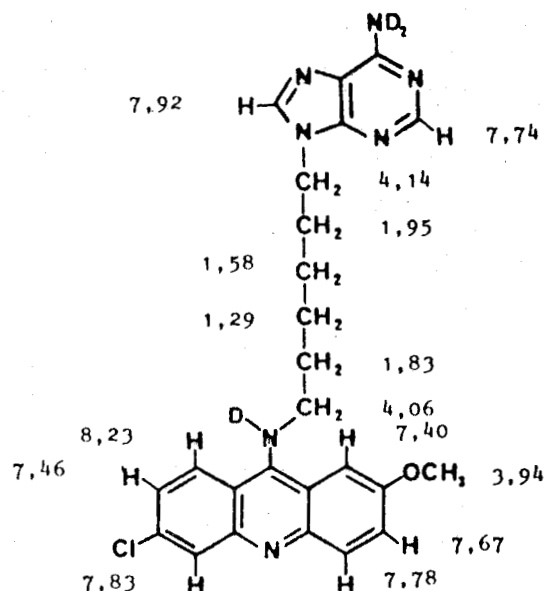
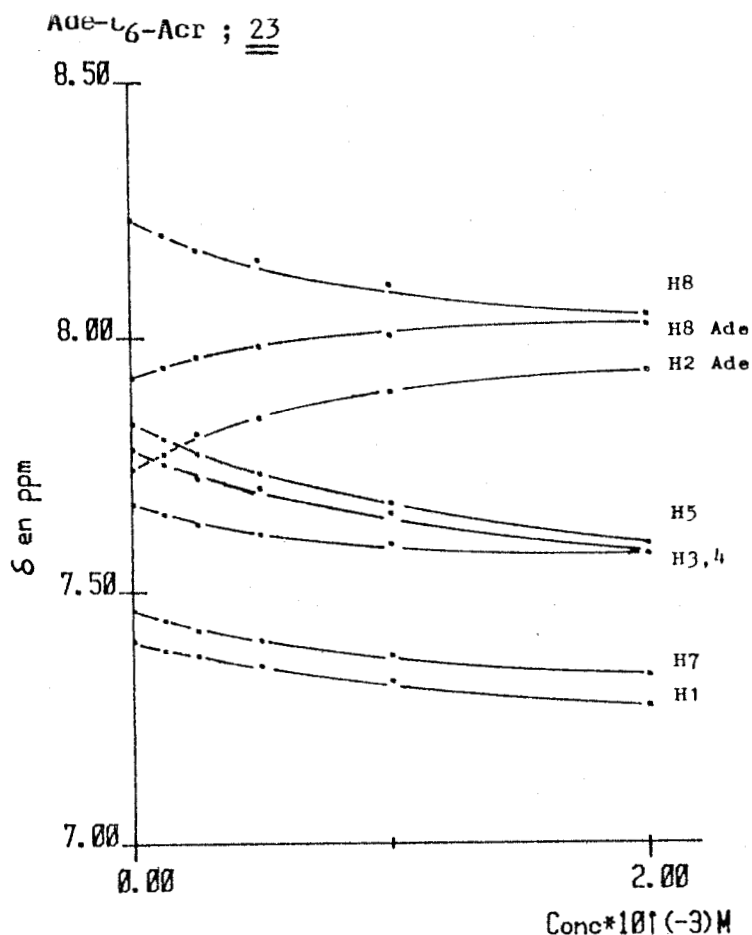


Figure 28 : Effets de la dilution pour les modèles Ade-C_n-Acr ; 20 et 23.

Pour ces modèles, la dilution influence à la fois les protons de l'acridine et ceux de l'adénine. Ceci implique qu'il se forme des agrégats dans lesquels on peut observer non seulement des empilements acridine-acridine, mais également des empilements acridine-adenine ou adénine-adénine. La différence de comportement avec les modèles Thy-C_n-Acr se comprend aisément quand on sait que les purines ont davantage tendance à donner des associations moléculaires que les pyrimidines.

Il en est de même pour le composé Ade-C₃-Acr (Figure 29).

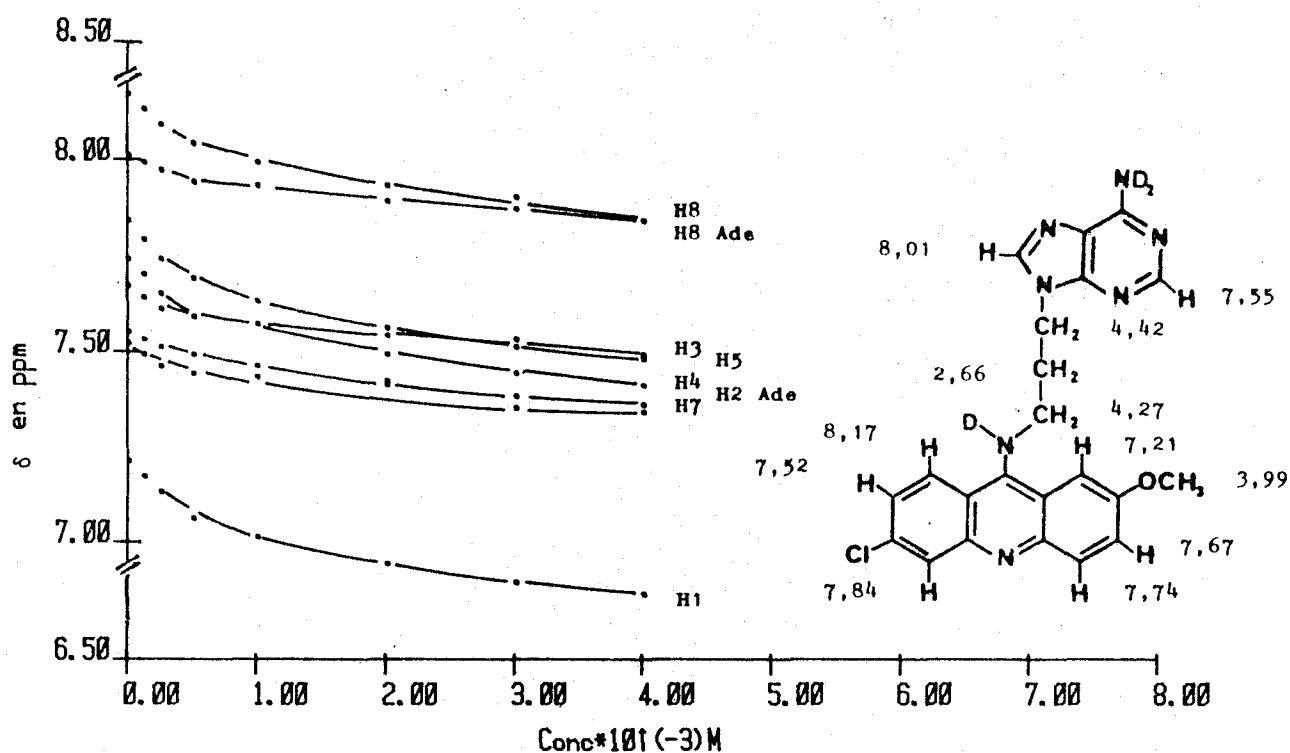


Figure 29 : Effets de la dilution pour le modèle Ade-C₃-Acr.

En raison de la complexité des interactions possibles, nous ne pouvons donc pas appliquer la méthode de J.L. DIMICOLI et C. HELENE pour calculer les constantes d'auto-association.

3°/ Modèles en série guanine :

Cette étude a été réalisée à l'aide d'un appareil BRUKER WP 80. La moins bonne sensibilité de cet appareil ne nous a pas permis d'obtenir des courbes d'extrapolation à dilution infinie aussi précises que sur le WH 270.

Les études à plus haut champ avaient montré que les effets de la dilution étaient encore très importants au delà de $1.10^{-4}M$. Pour obtenir un spectre à $5.10^{-4}M$. sur le WP 80, il est nécessaire d'accumuler les spectres pendant au moins 20 heures. Il n'était donc pas envisageable d'aller aussi loin dans la courbe de dilution.

Dans les spectres enregistrés à 80 MHz, nous avons rencontré des difficultés pour attribuer les déplacements chimiques observés. En effet, les protons de l'acridine et de la base nucléotidique se retrouvent dans un intervalle inférieur à 1 ppm. La fréquence d'irradiation du découpleur étant mobilisée pour supprimer le pic de l'eau résiduelle, nous n'avons pas pu l'utiliser pour identifier les protons 3 et 4 de l'acridine. Ceux-ci sortent

sous forme de deux doublets imbriqués. Il subsiste également une ambiguïté au niveau du proton 5 de l'acridine et du proton 8 de la guanine, deux singulets contigus évoluant de la même manière au cours de la dilution.

Pour que ces résultats soient comparables entre-eux, nous avons également réalisé l'étude de la référence Acr-C₃ ; 7 en fonction de la concentration à 80 MHz.

Résultats : Figure 30

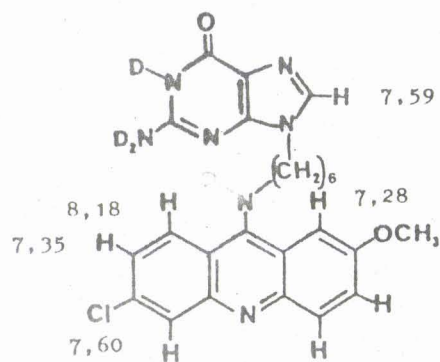
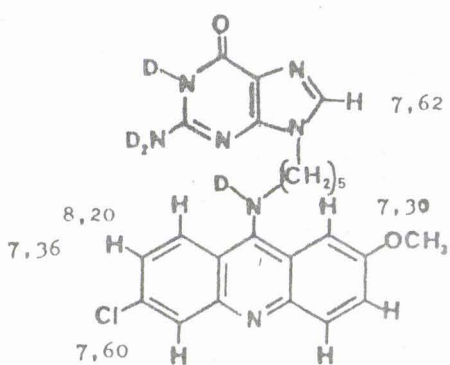
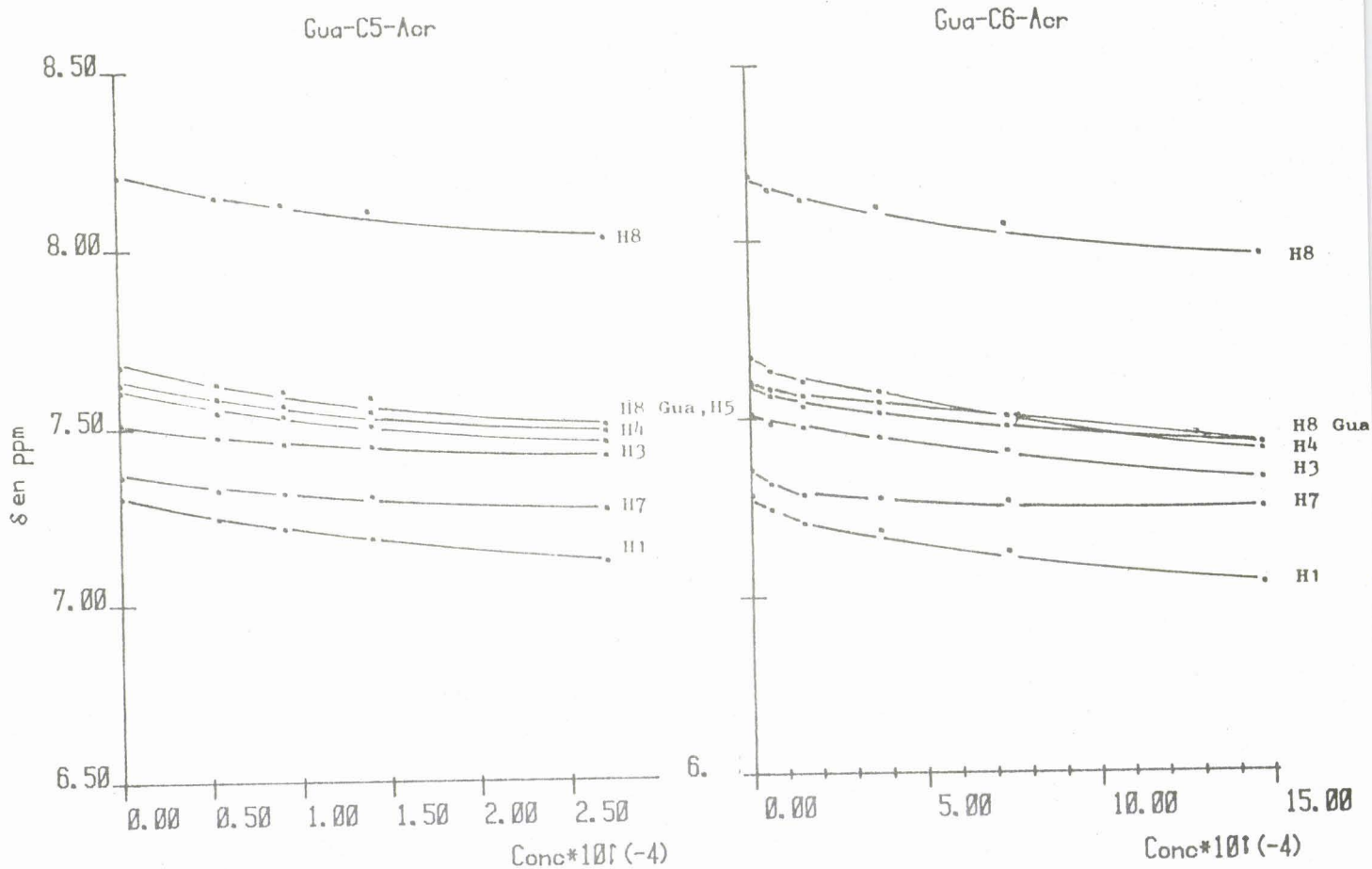


Figure 30 : Effets de la dilution pour les modèles Gua-C_n-Acr ; 34 et 35.

Pour les modèles Gua-C_n-Acr ; 34 et 35 ; les protons de l'acridine et ceux de la guanine sont fortement influencés par la dilution. Il n'est pas possible de déterminer la constante d'auto-association de ces deux composés.

III. INTERACTIONS INTRAMOLECULAIRES :

Connaissant les déplacements chimiques extrapolés à dilution infinie pour les modèles et leurs composés de référence, nous avons un accès direct aux déplacements chimiques $\Delta\delta = \delta \text{ modèle} - \delta \text{ référence}$, liés au processus d'interaction intramoléculaire.

1/ Série adénine :

les valeurs de $\Delta\delta$ pour les protons les plus perturbés sont regroupées dans le tableau 5.

Modèle	Acridine		Adénine	
	H ₁	H ₈	H ₂	H ₈
Ade-C ₃ -Acr	0,48	0,22	0,75	0,21
Ade-C ₅ -Acr ; <u>20</u>	0,40	0,15	0,80	0,30
Ade-C ₆ -acr ; <u>23</u>	0,29	0,16	0,56	0,30

Tableau 5 : $\Delta\delta$ en ppm des protons les plus affectés dans les modèles Ade-C_n-Acr.

- * On constate des déplacements considérables pour un certain nombre de protons. L'importance du blindage observé est en accord avec les interactions d'empilement mesurées par spectrophotométrie UV.
- * Si on examine les déplacements chimiques des groupes méthyléniques de la chaîne, directement branchés sur les chromophores, les valeurs mesurées pour le modèle à chaîne courte sont très différentes de celles des composés à plus longue chaîne.

Ces valeurs sont comparées dans le tableau 6 :

Composé	Acr-NH-CH ₂	Ade-CH ₂
Acr-C ₃ ; <u>7</u>	4,13	
Ade-C ₃ ; <u>9</u>		4,25
Ade-C ₃ -Acr	4,27	4,42
Ade-C ₅ -Acr ; <u>20</u>	4,10	4,27
Ade-C ₆ -Acr ; <u>23</u>	4,14	4,06

Tableau 6 : Déplacements chimiques en ppm des protons des groupements méthyléniques liés à l'acridine et l'adénine pour les modèles Ade-C_n-Acr ; 20, 23 et leurs références Acr-C₃ ; 7 et Ade-C₃ ; 9.

Pour le CH₂ lié à l'acridine, les valeurs mesurées dans les modèles Ade-C₅-Acr ; 20 et Ade-C₆-Acr ; 23 sont proches de celle de la référence Acr-C₃ ; 7. Le composé à courte chaîne se comporte de façon très différente (déblindage).

Le CH₂ lié directement à l'adénine semble peu perturbé dans le modèle Ade-C₅-Acr ; 20. Il subit un blindage dans Ade-C₆-Acr ; 23 mais un déblindage dans Ade-C₃-Acr.

Les changements observés pour les protons aromatiques et ceux de la chaîne, leur variation avec la longueur de cette chaîne sont difficiles à expliquer. Ils sont cependant en faveur de l'existence de conformations repliées de géométries différentes.

Connaissant les déplacements chimiques des protons aromatiques, nous avons examiné le système en vue de proposer une géométrie pour le complexe intramoléculaire formé.

Nous disposons pour cela de deux outils :

- * Les courbes d'iso-écran calculées par B. PULLMANN et G. GIESSNER-PRETTRE (64) qui indiquent les $\Delta\delta$ attendus pour les protons des chromophores lorsqu'ils sont empilés les uns sur les autres (dans des plans parallèles distants de 3,4 Å).
- * Les modèles moléculaires compacts CpK qui donnent des renseignements sur les conformations permises par la chaîne carbonée et sur les phénomènes d'encombrement stérique possibles.

Pour le composé Ade-C₃-Acr : la chaîne est très courte et les modèles moléculaires montrent que les conformations permises sont peu nombreuses. La géométrie indiquée dans la figure 31 rend compte des déplacements chimiques observés.

Pour les modèles Ade-C₅-Acr ; 20 et Ade-C₆-Acr ; 23 , la chaîne plus longue autorise un plus grand nombre de conformations : elle permet d'obtenir des systèmes dans lesquels les deux noyaux se recouvrent davantage (surface de superposition plus grande). Là encore, les géométries indiquées figure 31 conduisent à des $\Delta\delta$ théoriques très voisins des valeurs expérimentales.

On remarquera dans les structures proposées que l'allongement de la chaîne polyméthylénique entraîne une rotation progressive des deux chromophores l'un par rapport à l'autre. Les changements dans les orientations relatives sont importants.

Si on fait passer une première droite par le C₈ de l'adénine et le centre de la liaison N₁-C₆ et une autre droite par les centres des liaisons C₂-C₃ et C₆-C₇ de l'acridine, on peut également définir les changements d'orientation des chromophores par la valeur de l'angle (α) formé par l'intersection de ces deux droites.

Pour le modèle Ade-C₃-Acr : $\alpha = 15^\circ$.

Pour le modèle Ade-C₅-Acr ; 20 : $\alpha = 5^\circ$

Pour le modèle Ade-C₆-Acr ; 23 : $\alpha = 10^\circ$

L'allongement de la chaîne de 3 à 5 carbones s'accompagne d'une rotation de 10° de l'axe de l'adénine vers celui de l'acridine. Quand on ajoute un chaînon méthylénique, l'axe de l'adénine "croise" celui de l'acridine et l'amplitude de la rotation est de 15° .

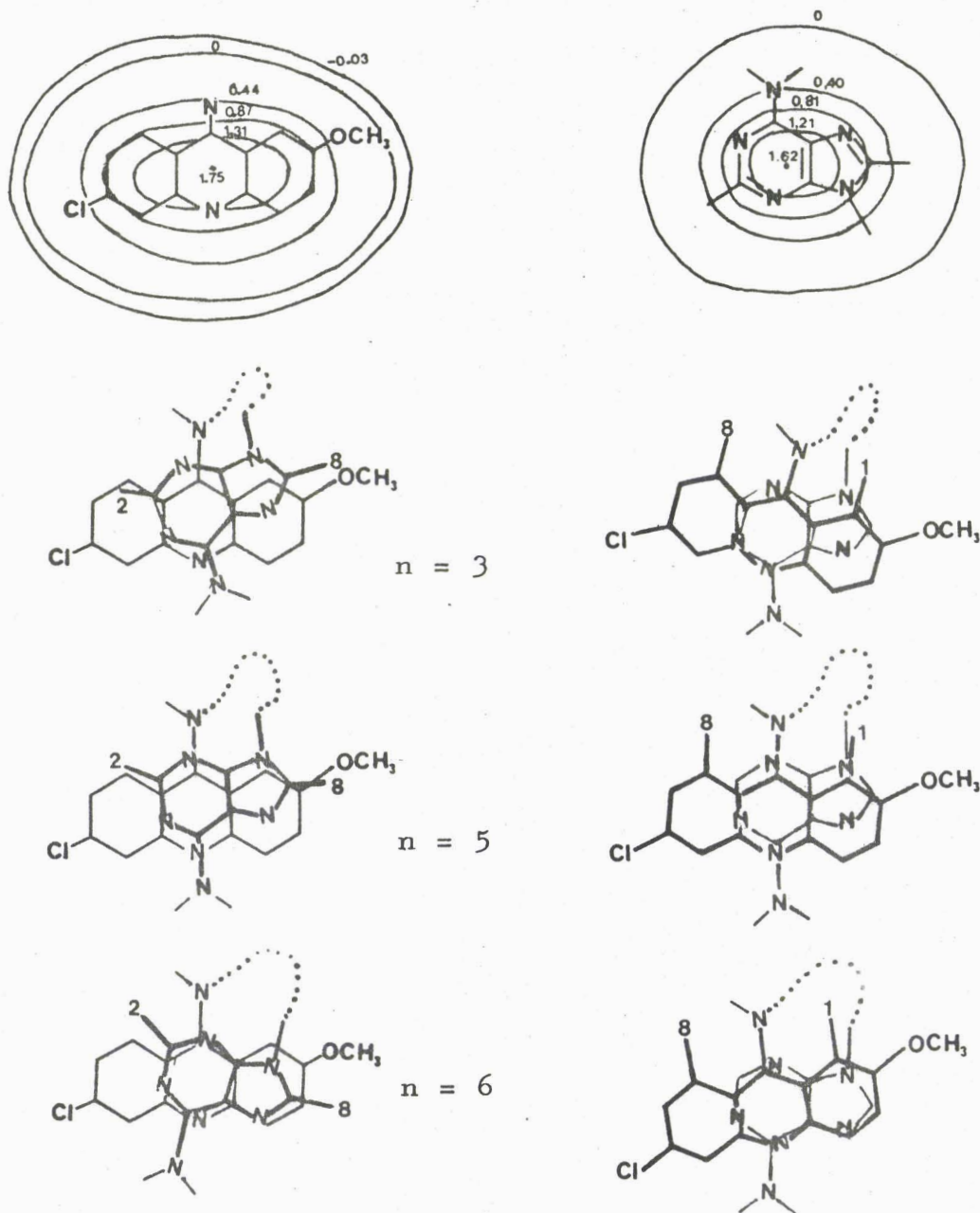


Figure 31 : Structures proposées pour les modèles Ade-C_n-Acr ; 20 et 23 d'après les courbes d'isocrons des deux chromophores et les $\Delta\delta$ mesurés expérimentalement.

On constate en outre que les géométries proposées, correspondent aux théoriques (calculés pour des molécules superposées dans des plans parallèles distants de 3,4Å). Sans constituer une preuve, cette constatation est un argument supplémentaire en faveur d'un degré de repliement des modèles de 100%.

De plus, la corrélation de ces géométries avec les valeurs d'effet hypochrome mesurées par spectrophotométrie UV montre que la diminution de %H quand la longueur de la chaîne augmente est associée à une variation marquée de l'orientation relative des deux chromophores.

A notre connaissance, c'est la première fois que l'on met en évidence de tels effets d'orientation sur la valeur absolue de %H. C'est également la première fois que ce genre d'étude est menée avec deux chromophores aussi différents que l'adénine et l'acridine.

2/ Série thymine :

Si on considère les effets de blindage produits dans les trois modèles, on constate que les protons les plus affectés sont le CH₃ en 5 et le proton en 6 de la thymine. L'influence sur l'acridine est très faible (on sait que le courant de cycle de la thymine est négligeable) mais significative, notamment sur les protons en 1 et 8. Les valeurs de Δδ pour ces différents protons sont rassemblées dans le tableau 7.

Modèle	Acridine		Thymine	
	H ₁	H ₈	H _T	CH _{3T}
Thy-C ₃ -Acr	0,07	0,07	0,38	0,44
Thy-C ₅ -Acr ; <u>14</u>	0,04	0,02	0,35	0,30
Thy-C ₆ -Acr ; <u>17</u>	0,03	0,03	0,22	0,25

Tableau 7 : Valeurs de Δδ en ppm pour les protons les plus influencés dans les modèles Thy-C_n-Acr.

Lorsque l'on compare le modèle à 3 chaînons méthyléniques avec son homologue à 5 chaînons, on constate que le groupement méthyle en position 5 de la thymine devient beaucoup moins blindé (de 0,14 ppm) alors que le proton en position 6 bouge très peu, mais dans le même sens (de 0,03 ppm).

La comparaison des deux modèles à 5 et 6 chaînons montre que l'allongement de la chaîne diminue l'effet de blindage, mais cette fois-ci de manière encore plus significative sur le proton en 6 (0,13 ppm) que sur le méthyle en 5 (0,05 ppm).

Au niveau de la chaîne polyméthylénique, nous pouvons également constater des changements intéressants. Si nous considérons le groupement CH₂ lié à l'acridine, nous n'observons pas de différences significatives entre la référence Acr-C₃ ; 7 ($\delta = 4,13$ ppm) et les modèles à longues chaînes Thy-C₅-Acr ; 14 ($\delta = 4,13$ ppm) et Thy-C₆-Acr ; 17 ($\delta = 4,36$ ppm).

Si nous considérons le CH₂ lié à la thymine, par comparaison à la référence Thy-C₃ ; 8 ($\delta = 3,73$ ppm), le modèle Thy-C₃-Acr ($\delta = 3,82$ ppm) présente une variation plus faible que celles observées pour les composés Thy-C₅-Acr : 14 ($\delta = 3,55$ ppm) et Thy-C₆-Acr ; 17 ($\delta = 3,58$ ppm).

Dans les composés à longue chaîne, il semble qu'il y ait peu de contraintes stériques à proximité de l'acridine. Les valeurs plus faibles observées pour les CH₂ liés à la thymine proviennent sans doute du fait que ces derniers se trouvent plus près de la zone d'anisotropie diamagnétique de l'acridine.

Dans le modèle Thy-C₃-Acr, les protons de la chaîne sont perturbés d'une façon toute différente. Nous ne pouvons pas expliquer ce comportement pour l'instant.

Cet ensemble de résultats confirme les interactions d'empilement mises en évidence par spectrophotométrie UV, la variabilité observée pour les différentes chaînes laisse supposer que les géométries des complexes sont différentes.

Malheureusement, le courant de cycle de la thymine est négligeable, aussi, les effets sur les protons de l'acridine sont très faibles et les courbes d'isoécran établies par B. PULLMANN et G. GIESSNER-PRETTRE (64) ne

sont pas utilisables pour déterminer ces géométries. Cependant, lorsque nous construisons les molécules Thy-C_n-Acr (n = 3, 5, 6) à l'aide de modèles moléculaires compacts, nous constatons qu'avec une chaîne à trois carbones (n = 3), les deux chromophores sont parfaitement superposés. On remarque également que le groupement méthyle de la thymine, par son encombrement est susceptible de défavoriser l'empilement maximum. Le peu de liberté accordée par une chaîne aussi courte ne permet pas de supprimer cette "gène stérique".

Lorsqu'on passe aux homologues supérieurs, par contre, la superposition des chromophores est encore parfaite mais l'orientation différente. L'empilement des chromophores semble être moins gêné par l'encombrement du méthyle qui se trouve un peu décalé vers l'extérieur par rapport au noyau acridine.

Ces observations sont en accord avec les résultats de la RMN, mais l'examen de modèles moléculaires ne constitue pas une preuve suffisante. Il serait nécessaire de confirmer ces résultats à l'aide de techniques pouvant donner accès à la géométrie des complexes : la RMN à haut champ (utilisant l'effet nucléaire OVERHAUSER par exemple) ou la cristallographie pour l'état solide. Les essais de cristallisation de nos produits dans l'éthanol n'ont donné de résultats que pour le modèle Thy-C₅-Acr ; 17. Ils ont abouti à des microcristaux à structure dite en "chevrons" dans laquelle le modèle se trouve dans une conformation ouverte (Figure 32) (65).

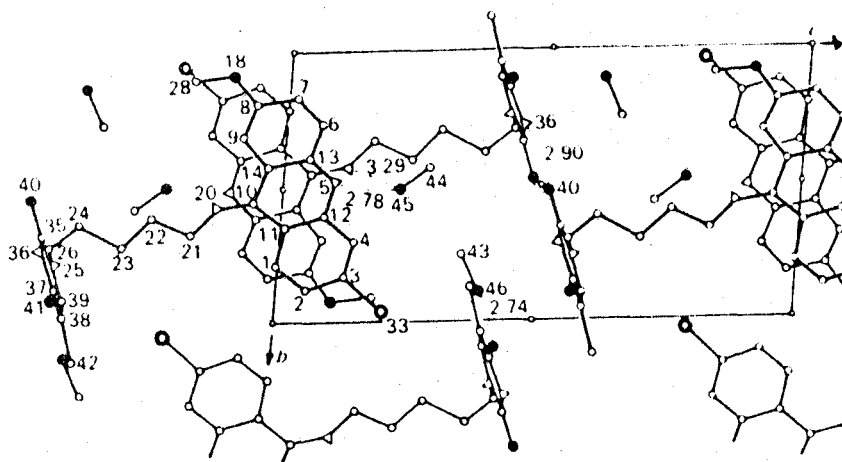


Figure 32 : Structure cristallographique du modèle Thy-C₅-Acr ; 17
Solvant : méthanol (65).

3/ Série guanine :

Les valeurs de $\Delta\delta$ pour les protons les plus perturbés sont regroupées dans le tableau 8.

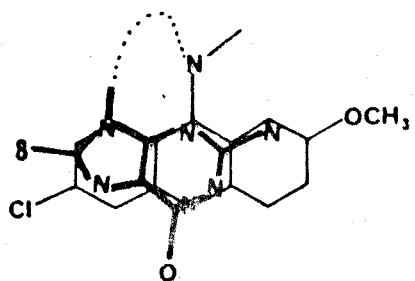
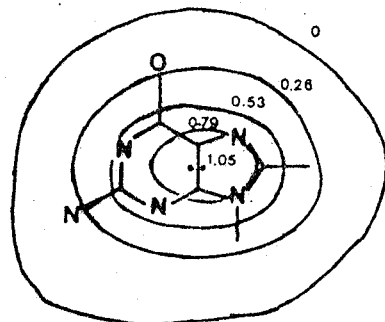
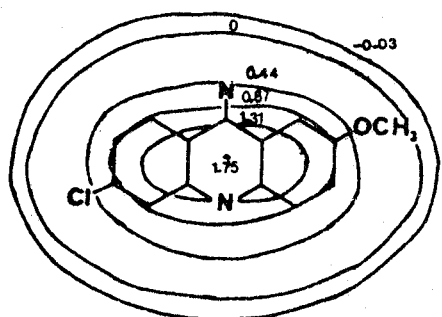
Modèle	Acridine		Guanine
	H ₁	H ₈	H ₈
Gua-C ₅ -Acr ; <u>34</u>	0,06	0,30	0,13
Gua-C ₆ -Acr ; <u>35</u>	0,06	0,32	0,15

Tableau 8 : $\Delta\delta$ en ppm observés pour les protons les plus perturbés dans les modèles Gua-C_n-Acr ; 34 et 35.

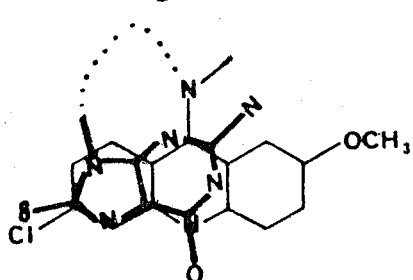
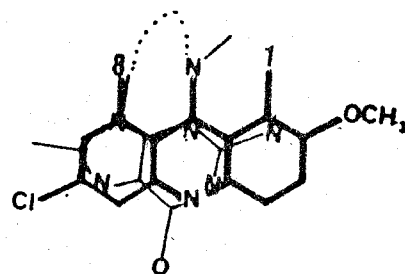
L'importance du blindage observé confirme l'existence des interactions d'empilement détectées par spectrophotométrie UV. Les valeurs de $\Delta\delta$ pour les protons de l'acridine plus faibles qu'en série adénine, s'expliquent par la moins forte anisotropie diamagnétique du cycle guanine. Comme dans le cas des modèles de la série adénine, nous pouvons proposer une géométrie du complexe en nous appuyant sur les cartes d'isoécran de B. PULLMAN (65) et sur les géométries permises par les modèles moléculaires compacts du type CpK (Figure 33).

Remarquons que la géométrie indiquée qui rend compte des valeurs expérimentales, correspond à un système replié à 100 %.

Le proton 8 de l'acridine est le plus perturbé. Les géométries qui permettent de concilier les valeurs théoriques et les valeurs expérimentales impliquent un empilement du cycle de la guanine sur la moitié de l'acridine qui porte l'atome de chlore. Dans le cas des modèles Ade-C_n-Acr ; 20 et 23 ce phénomène intéresse la moitié de l'acridine portant le groupement méthoxy (Figure 31).



n = 5



n = 6

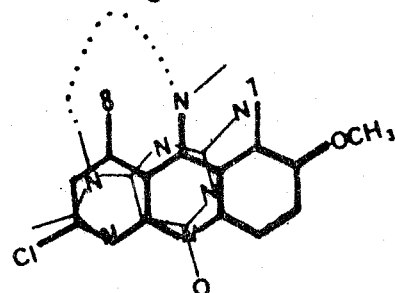


Figure 33 : Géométrie proposée pour les modèles Gua-C_n-Acr ; 34 et 35 à partir des $\Delta \delta$ expérimentaux et des courbes d'isoécran de B. PULLMANN (65).

IV. EFFET DE LA TEMPERATURE :

Les études de l'équilibre conformationnel "formes ouvertes \rightleftharpoons formes repliées" en fonction de la température, doivent se faire en milieu suffisamment dilué (à cause des agrégats). Les temps d'accumulation doivent être aussi courts que possible (surtout à haute température) en raison des échanges dans l'eau lourde, des protons situés en position 8 de l'adénine et de la guanine (23).

Pour ces raisons, nous n'avons pas pu examiner les modèles Gua-C_n-Acr ; 34 et 35. Les temps d'accumulation avec l'appareil WP 80 sont très longs pour les solutions diluées. L'échange du proton 8 de la guanine à haute température, nous prive d'une sonde indispensable à l'étude des interactions d'empilement.

A 270 MHz, les spectres des références Acr-C₃ ; 7, Thy-C₃ ; 8, Ade-C₃; 9 et les spectres des modèles Ade-C_n-Acr ; 20, 23 et Thy-C_n-Acr ; 14, 17 ont été enregistrés tous les 10°C entre 22 et 92°C à une concentration de 5. 10⁻⁴M.

La grandeur qui rend le mieux compte de la variation des interactions est $\Delta\delta$: la différence entre les déplacements chimiques mesurés dans les composés de référence et ceux des modèles Base-C_n-Acr ($\delta_{Acr-3} - \delta_{Base-C_n-Acr}$ et $\delta_{Base-C_3} - \delta_{Base-C_n-Acr}$).

Une telle étude avait été menée au laboratoire en série quinoléine (22). La corrélation entre les variations observées par spectrophotométrie UV et celles mesurées par RMN ¹H en fonction de la température était parfaite (Figure 34).

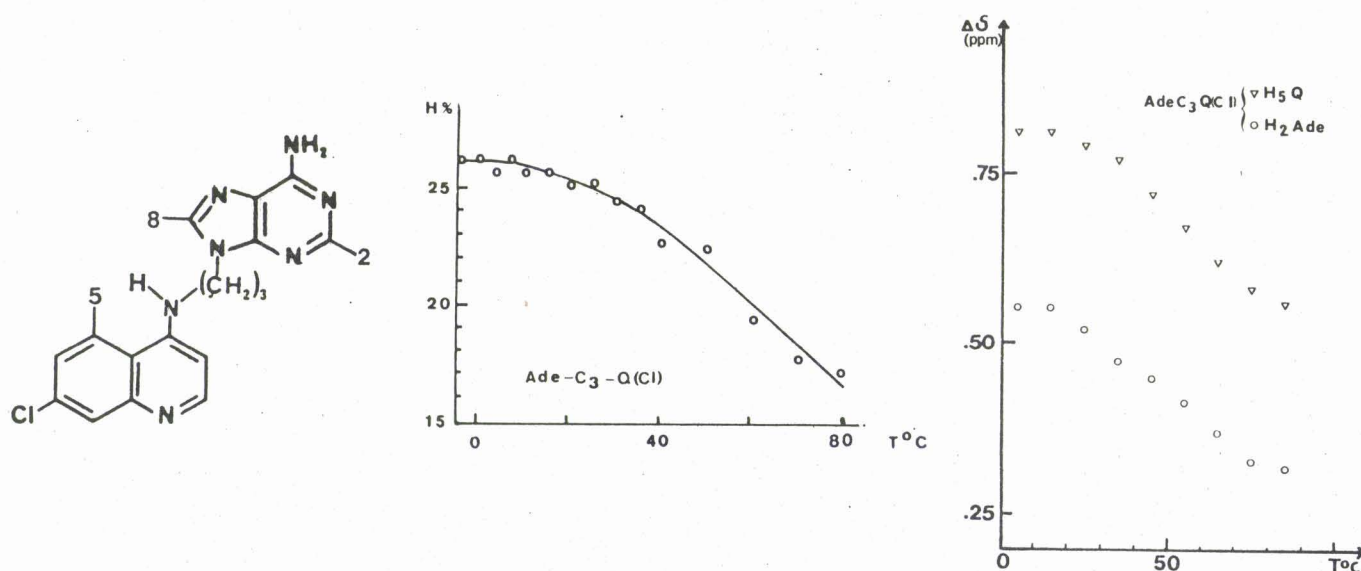


Figure 34 : Evolutions comparées des %H et des $\Delta\delta$ en fonction de la température pour le modèle Ade-C₃-Qui.

Dans ce type de composés, la constante d'auto-association était faible (pas d'aggrégats entre 2.10⁻³ M et 1.10⁻⁴ M) aussi les perturbations observées à 5.10⁻⁴ M rendaient-elles compte des seuls changements dans les conformations repliées.

Nous n'avons pas pu exploiter de la même manière les résultats que nous avons obtenus pour les modèles Ade-C_n-Acr ; 20, 23 et Thy-C_n-Acr ; 14, 17 à 5.10⁻⁴ M. Sans doute à cause des fortes constantes d'autoassociation des acridines, il est impossible de corrélérer l'évolution des Δδ en fonction de la température avec celle de %H en fonction de la température.

Par exemple, pour les modèles en série thymine, une constante d'auto-association de 280 l.mol⁻¹ implique l'existence de 15 % de dimères intermoléculaires à 20°C, si la concentration en modèle est de 5.10⁻⁴ M.

Par spectrophotométrie UV, nous avons montré que les variations apportées par la température sont relativement faibles (à 75°C, la conformation repliée est encore présente à près de 50 % dans le modèle étudié qui "s'ouvre" le plus facilement : Ade-C₆-Acr ; 23). Il est fort probable, que le phénomène d'ouverture des modèles mesuré par RMN¹H soit précédé et en partie masqué par la destruction des agrégats intermoléculaires. A 92°C, ces agrégats ont sans doute complètement disparu pour la référence Acr-C₃ ; 7 puisque les valeurs des déplacements chimiques sont devenues pratiquement identiques à celles extrapolées à dilution infinie à 22°C. Pour les modèles Thy-C_n-Acr ; 14 et 17 à 92°C, on observe la même évolution pour les protons du noyau acridine ainsi qu'un déblindage significatif des protons de la thymine.

Ce comportement est en faveur de la destruction des agrégats accompagnée à haute température d'une ouverture des modèles.

Dans le cas des modèles Ade-C_n-Acr ; 20 et 23, le phénomène d'aggrégation est plus complexe. Il conduit à un blindage des protons de l'acridine et à un déblindage des protons de l'adénine. L'augmentation de température par contre provoque un déblindage de tous les protons. Les déplacements chimiques des protons de l'acridine sont devenus proches de ceux extrapolés à dilution infinie, sauf pour le proton 1 qui présente un déblindage important par rapport à sa valeur déterminée "concentration nulle".

Dans ces conditions, il est difficile de faire la part des effets de la complexation intramoléculaire et de ceux provenant des agrégats. Il est cependant fort probable qu'à 92°C, la proportion de complexes intermoléculaires soit négligeable.

Nous avons rassemblé dans le tableau 9 l'ensemble des valeurs de mesurées pour les modèles Thy-C_n-Acr ; 14, 17 et Ade-C_n-Acr ; 20, 23 à 22°C (valeurs extrapolées à dilution infinie) et à 92°C (valeurs mesurées à la concentration de 5.10⁻⁴M).

Composé	Température °C	H ₁	H ₈	H _{8A}	H _{2A}	H _T	CH _{3T}
Thy-C ₅ -Acr	22	0,04	0,02			0,35	0,30
	92	0,02	0,01			0,25	0,19
Thy-C ₆ -Acr	22	0,03	0,02			0,22	0,25
	92	-0,01	-0,01			0,16	0,12
Ade-C ₅ -Acr	22	0,40	0,15	0,80	0,30		
	92	0,25	0,16	0,51	0,26		
Ade-C ₆ -Acr	22	0,29	0,16	0,56	0,30		
	92	0,14	0,12	0,26	0,19		

Tableau 9 : Δδ en ppm à 22 et 92°C pour les modèles Thy-C_n-Acr ; 14, 17 et Ade-C_n-Acr ; 20, 23.

Puisqu'il est très probable que les agrégats aient pratiquement disparu à 92°C, on peut, à l'aide d'un calcul simple, estimer le pourcentage de forme repliée à 92°C (en faisant l'hypothèse d'un repliement total à 22°C).

En appliquant la formule :

$$\% \text{ forme repliée} = \frac{\Delta \delta \text{ à } 92^\circ\text{C}}{\Delta \delta \text{ à } 22^\circ\text{C}} \cdot 100$$

aux différents protons concernés et en établissant une moyenne pour chaque produit Base-C_n-Acr, nous obtenons une série de valeurs que nous avons rassemblées dans le tableau 10.

Pour comparer les résultats avec les observations faites par spectrophotométrie UV, nous avons utilisé les valeurs de pourcentage de forme

repliée obtenues à partir des courbes %H = f(T) que nous avons extrapolées à 92°C. Ces valeurs sont également rassemblées dans le tableau 10.

	Ade-C ₃ -Acr	Ade-C ₅ -Acr; <u>20</u>	Ade-C ₆ -Acr; <u>23</u>	Thy-C ₅ -Acr ; <u>14</u>
% forme repliée (Données UV)	100	75	50	70
% forme repliée (Données RMN)	100	70	50	65

Tableau 10 : Pourcentages moyens de forme repliée à 92°C calculés pour différents modèles Base-C_n-Acr à partir des données de la spectrophotométrie UV et de la RMN ¹H.

La similitude des valeurs de pourcentage de forme repliée, déterminées à la fois par spectrophotométrie UV et par RMN ¹H, montre que la concordance des résultats obtenus par ces deux techniques est parfaite.

Les deux techniques sont donc tout à fait complémentaires pour observer les interactions noyau-noyau mises en jeu dans les complexes intramoléculaires : base-acridine.

La confirmation des mesures en UV par les études par RMN nous autorise à traiter la variation %H = f(T) comme le reflet de l'évolution de l'équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée".

Par spectrophotométrie UV, dans la zone de température où %H varie, nous avons vu qu'il est possible de déterminer la constante K de l'équilibre ainsi que le pourcentage de forme repliée. Nous pouvons aller un peu plus loin dans le traitement mathématique et accéder aux paramètres thermodynamiques de l'équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée". Connaissant la constante d'équilibre K à différentes températures, il est possible de calculer les variations d'enthalpie et d'entropie d'activation données par la relation :

$$\Delta G = - RT \log K = \Delta H - T\Delta S$$

Nous avons donc tracé les courbes $\log K = f(1/T)$. (Pour exemple voir figure 26). Les caractéristiques de la droite joignant les points ont été déterminés par la méthode des moindres carrés. Les coefficients de corrélation varient de 0,976 à 0,9994 et la déviation standard varie de 0,03 à 0,07. Nous avons réuni dans le tableau 12 l'ensemble des paramètres thermodynamiques pour les modèles Ade-C₅-Acr ; 20 ; Ade-C₆-Acr ; 23 et Thy-C₅-Acr ; 14.

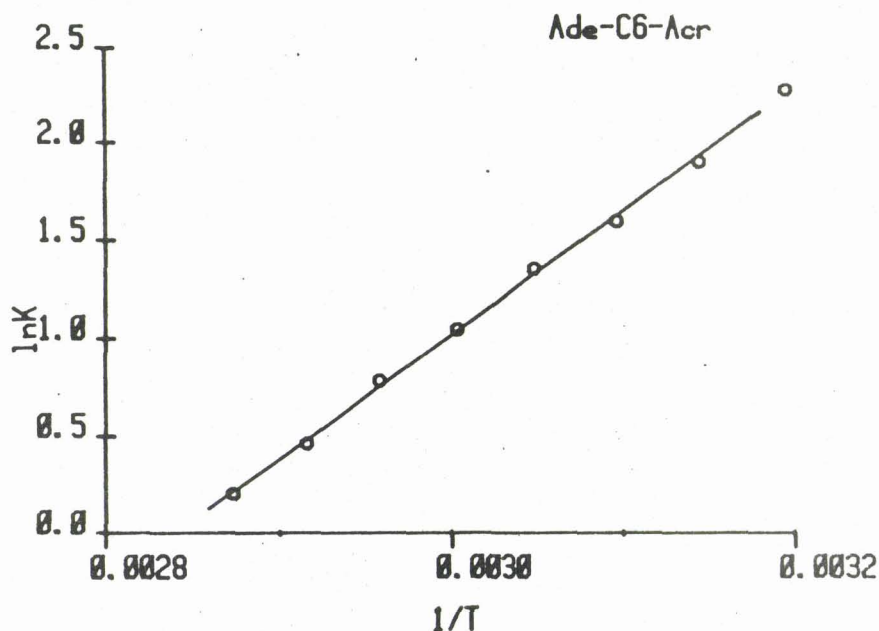


Figure 35 : Courbe $\log K = f(1/T)$ pour le modèle Ade-C₆-Acr ; 23.

Modèle	Coefficient de corrélation	Déviaton standard	ΔH° Kcal/mol	ΔS° u.e	ΔG° kcal/mol
Ade-C ₅ -Acr	0,9962	0,06	-12,5	-33	-2,6
Ade-C ₆ -Acr	0,9994	0,03	-12,6	-36	-1,9
Thy-C ₅ -Acr	0,9757	0,07	- 9,8	-26	-2,1

Tableau 10 : Paramètres thermodynamiques de l'équilibre "forme ouverte \rightleftharpoons forme repliée" calculés pour les modèles Ade-C_n-Acr ; 20, 23 et Thy-C₅-Acr ; 14.

Dans le cas des modèles Gua-C_n-Acr, nous avons essayé d'encadrer la valeur des paramètres thermodynamiques en faisant varier la valeur de %H_{max} entre 20 % (valeur maximum observée, pour Ade-C₃-Acr) et la valeur la plus élevée observée pour ces modèles. Nous avons pris en compte tous les points expérimentaux et examiné les coefficients de corrélation obtenus pour la droite $\log K = f(1/T)$ ainsi que les valeurs correspondantes calculées pour ΔH° et ΔS° . Plus la valeur que nous avons choisie pour %H_{max} est proche de la valeur la plus probable, meilleur doit être le coefficient de corrélation. Nous avons réuni ces résultats dans les tableaux 11 et 12.

%H Choisi	N de points traités	Coefficient de corrélation	Erreur standard	ΔH° kcal/mol	ΔS° u.e.
16,5	11	0,9852	0,06	-3,8	-9,3
16,1	11	0,9868	0,06	-4,1	-10,2
16,0	11	0,9872	0,06	-4,2	-10,5
15,7	11	0,9885	0,06	-4,6	-11,4
15,3	11	0,9904	0,07	-5,2	-13,0
14,9	11	0,9918	0,07	-6,1	-15,4
14,5	11	0,9898	0,10	-7,6	-19,7
14,2	11	0,9738	0,21	-10,0	-27,0
14,2	10	0,9896	0,09	-8,4	-21,7

Tableau 11: Recherche de %H_{max} pour le modèle Gua-C₅-Acr ; 34.

%H choisi	N de points traités	coefficient de corrélation	Erreur standard	ΔH° kcal/mol	ΔS° u.e.
18	10	0,9912	0,03	-2,6	-6,8
17	10	0,9922	0,03	-2,7	-7,4
16	10	0,9934	0,03	-3,4	-8,4
15	10	0,9951	0,03	-4,2	-10,3
14	10	0,9966	0,04	-5,1	-14,2
13,5	10	0,9960	0,05	-7,2	-18,3
13	10	0,9854	0,14	-10,7	-28,2

Tableau 12 : Recherche de %H_{max} pour le modèle Gua-C₆-Acr ; 35.

De cette étude, nous avons déduit les valeurs les plus probables pour les paramètres thermodynamiques de l'interaction guanine-acridine dans les modèles Gua-C_n-Acr.

Pour Gua-C₅-Acr, nous trouvons $\Delta H^{\circ} > -8,5$ Kcal/mol et $\Delta S^{\circ} > -22$ u.e.

En prenant pour ΔH° et ΔS° les valeurs minima que nous avons calculées et en appliquant la formule $\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \Delta S^{\circ}$, nous obtenons une énergie libre de formation $\Delta G^{\circ} > -1,8$ Kcal/mol.

Pour Gua-C₆-Acr, nous avons estimé $\Delta H^{\circ} > -7$ Kcal/mol et $\Delta S^{\circ} > -18$ u.e. ; de la même manière que pour le modèle précédent, nous obtenons $\Delta G^{\circ} > -1,7$ Kcal/mol.

Les paramètres thermodynamiques ainsi calculés montrent que les interactions semblent peu différentes pour les deux longueurs de chaîne (légèrement plus favorables pour le modèle à chaîne plus courte Gua-C₅-Acr).

Les valeurs calculées pour tous les modèles étudiés sont rassemblées dans le tableau 13.

Modèle	ΔH° Kcal/mol	ΔS° u.e.	ΔG° Kcal/mol
Ade-C ₅ -Acr	-12,5	-33	-2,6
Ade-C ₆ -Acr	-12,5	-36	-1,9
Thy-C ₅ -Acr	-10	-26	-2,1
Gua-C ₅ -Acr	<-8,5	<-22	<-1,8
Gua-C ₆ -Acr	<-7	<-18	<-1,7

Tableau 13 : Paramètres thermodynamiques calculés pour différents modèles Base-C_n-Acr.

En nous inspirant des valeurs de ΔG° calculées nous pouvons classer les modèles par forces d'interactions intramoléculaires : Ade-C₅-Acr > Ade-C₆-Acr \simeq Thy-C₅-Acr \simeq Gua-C₅-Acr \simeq Gua-C₆-Acr.

Ces valeurs, bien qu'approchées, sont tout à fait cohérentes avec celles observées dans d'autres séries.

Par exemple :

- modèles en série quinoléine : Ade-C₃-Qui et Gua-C₃-Qui (22)
on a mesuré pour ces deux modèles $\Delta H^{\circ} = -9$ Kcal/mol et
 $\Delta S^{\circ} = -24$ u.e. (soit $\Delta G^{\circ} = -1,8$ Kcal/mol.).
- Dinucléoside ApA : empilement adénine-adénine (66) $\Delta H^{\circ} = -10$ Kcal/mol
- Modèles en série psoralène (56) Ade-C₃-8Pso $\Delta H^{\circ} = -9$ Kcal/mol
 $\Delta S^{\circ} = -24$ u.e. (soit $\Delta G^{\circ} = -1,8$ Kcal/mol.).

Pour l'ADN les valeurs sont compatibles avec les affinités déterminées pour ces chromophores c'est à dire acridine \succ quinoléine \simeq psoralène. Elles expliquent également pourquoi l'intercalation est un phénomène thermodynamiquement favorisé.

C. NATURE DES INTERACTIONS - INFLUENCE DU SOLVANT.

Pour préciser la nature des interactions mises en jeu dans la forme repliée, nous avons mesuré les effets d'un solvant organique comme l'éthanol sur la valeur de %H. Ce type de solvant est connu pour ses propriétés "dénaturantes" vis-à-vis des acides nucléiques, c'est à dire son aptitude à désorganiser leur structure en détruisant les interactions d'empilement entre les bases nucléotidiques. Nous avons étudié les modèles Thy-C₅-Acr ; 14, Ade-C₅-Acr ; 20, Gua-C₅-Acr ; 34. Nous avons mesuré la valeur de %H dans des mélanges eau-éthanol à teneur de plus en plus forte en éthanol (jusqu'à 100%).

I. EFFET DU SOLVANT SUR LE COMPOSE DE REFERENCE Acr-C₃ ; 7 :

Dans la figure 36 , nous montrons les spectres du composé de référence Acr-C₃ ; 7 obtenus dans l'eau tamponnée à pH 5,5 contenant 5 % d'éthanol et dans l'éthanol pur auquel on a ajouté de l'acide acétique (0,1N).

Les effets de solvant sont très importants : augmentation du coefficient d'extinction moléculaire maximum (à 420nm) qui passe de 9000 à 9450 l.mole⁻¹. cm⁻¹ ; effet bathochrome de 2,5 nm. Il conviendra donc, dans notre étude, de placer les modèles et la référence dans les mêmes conditions et de comparer leurs forces d'oscillateurs dans des solvants de compositions identiques.

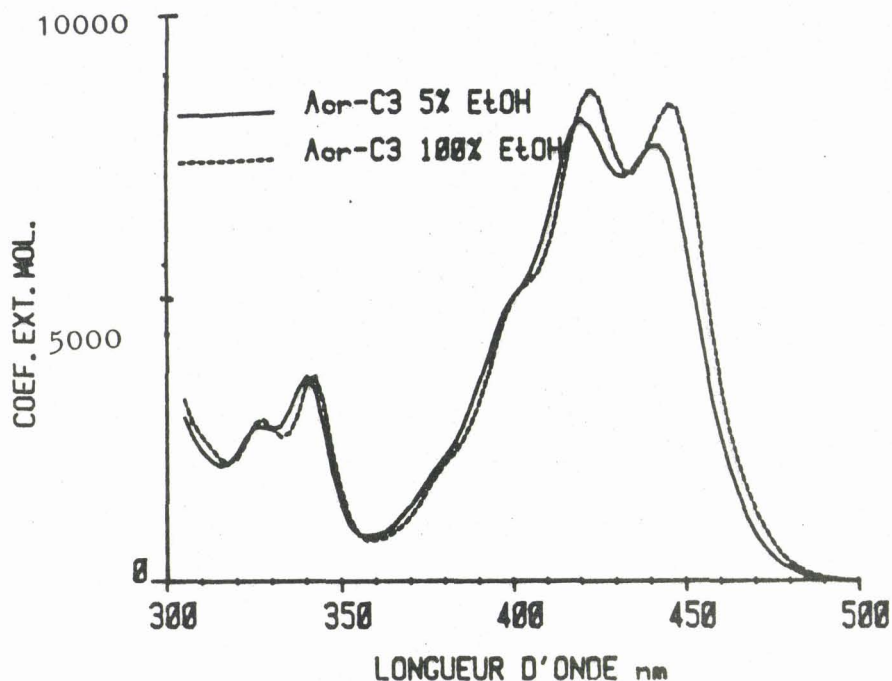


Figure 36 : Spectre UV de Acr-C₃ ; 7 dans l'eau à 5 % EtOH tamponnée à pH 5,5 et dans l'éthanol pur (acide acétique 0,1N) c = 8.10⁻⁵M.

II. ETUDE DES MODELES :

Dans la figure 37, nous avons représenté les variations des forces d'oscillateur et de l'effet hypochrome %H mesuré pour les 3 modèles étudiés en fonction du pourcentage d'éthanol dans l'eau.

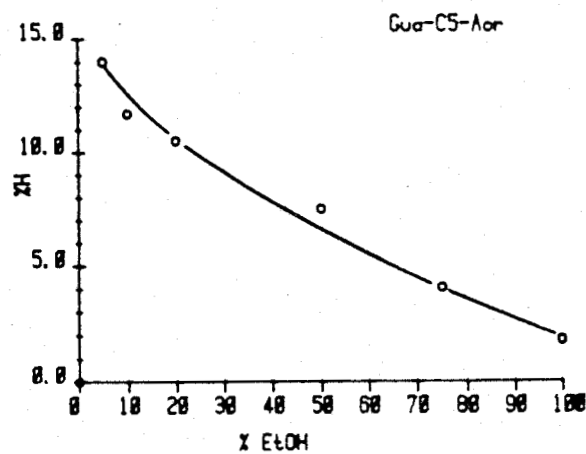
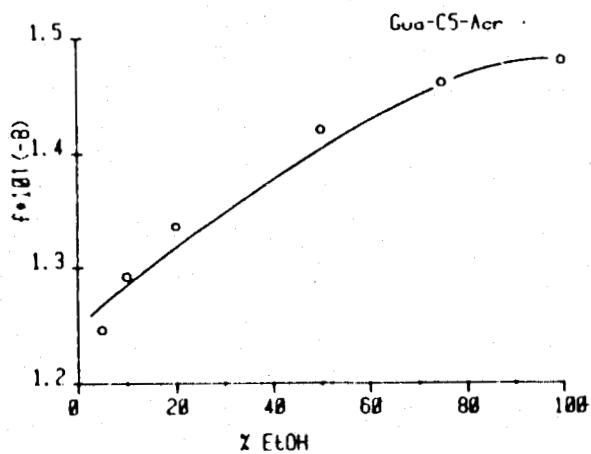
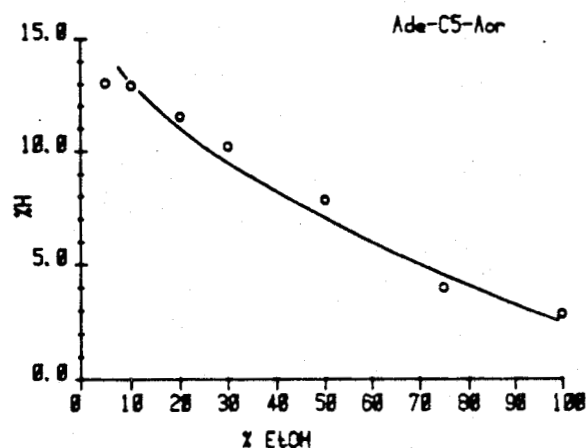
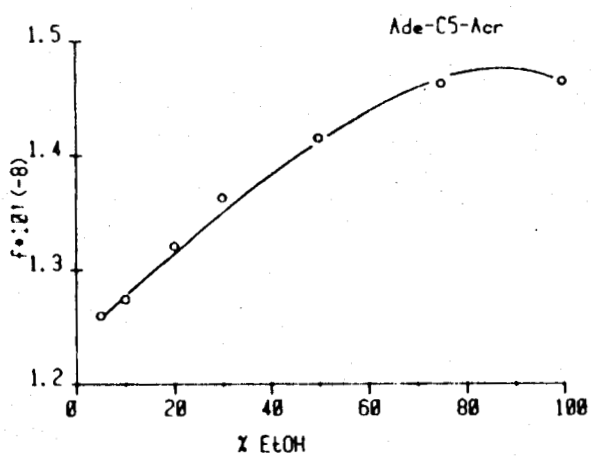
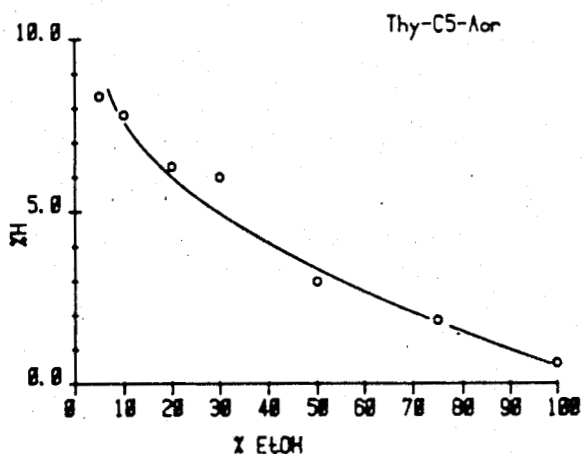
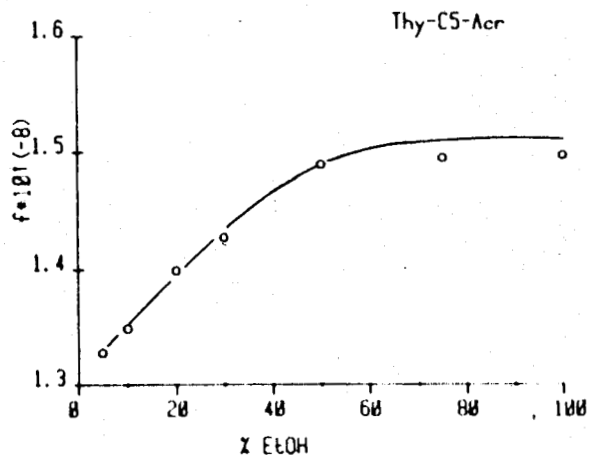
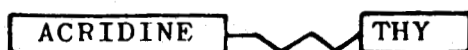


Figure 37 : Effet de pourcentages croissants en éthanol % (EtOH) dans l'eau sur les forces d'oscillateur et l'effet hypochrome des modèles :

a) Thy-C₅-Acr ; 14 b) Ade-C₅-Acr ; 20 c) Gua-C₅-Acr ; 34.



Pour chaque modèle, nous observons une décroissance rapide de l'effet hypochrome lorsque la teneur en éthanol augmente. Dans l'éthanol pur, l'effet hypochrome est faible (0,6 à 2,8 % selon les modèles). Dans ce solvant, les interactions d'empilement ont donc pratiquement disparu. Le modèle est essentiellement dans une conformation ouverte.



Les spectres de différence de coefficient d'extinction molaire entre le produit de référence et les modèles ($\Delta\epsilon = \epsilon$ de Acr-C₃ - ϵ de Base-C₅-Acr) en fonction de la longueur d'ondes illustrent bien ce changement de conformation (Figure 38).

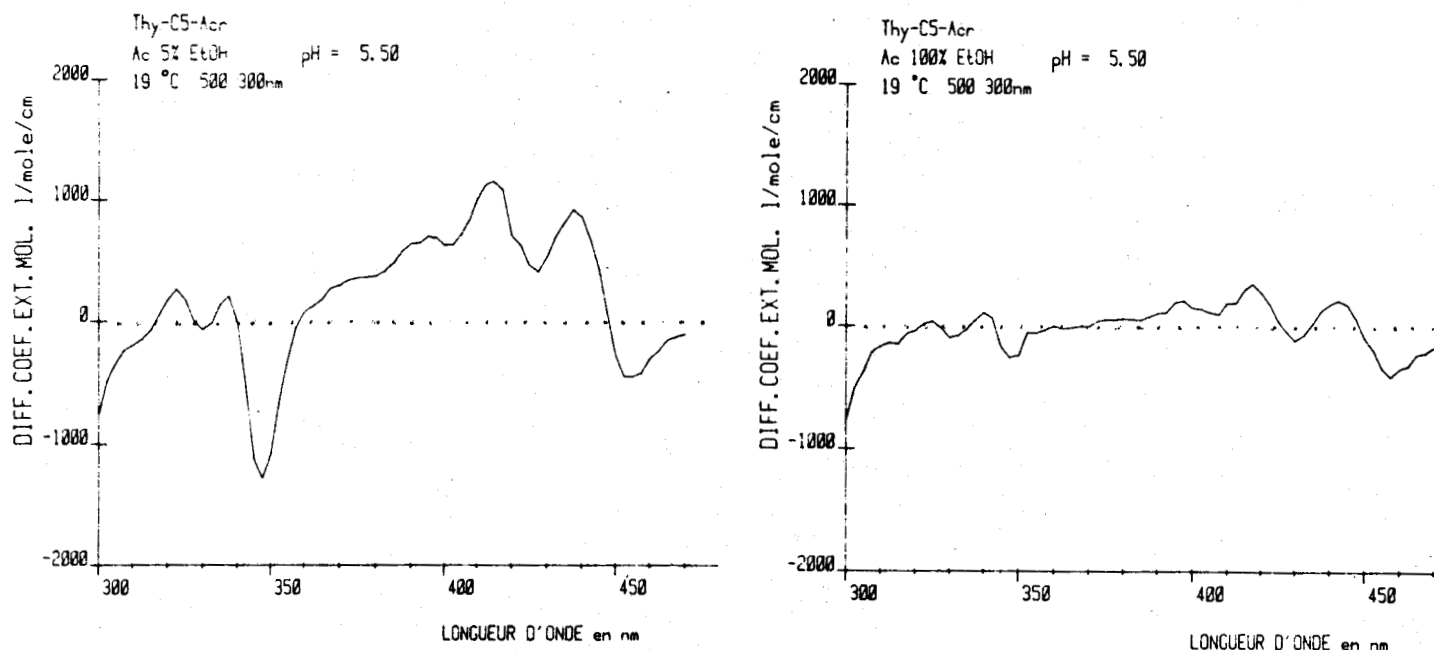


Figure 38 : Spectres de différence $\Delta\epsilon = f(\lambda)$ pour les modèles Base-C₅-Acr (Base = Thy).

Dans l'eau à 5 % d'éthanol, le spectre de différence indique que les espèces comparées sont dissemblables. Par contre dans l'éthanol pur les différences entre les modèles et la "référence" s'estompent. Cela ne peut s'expliquer que si le modèle est dans une conformation ouverte dans laquelle le noyau acridine n'est plus perturbé par le noyau de la base nucléotidique.

La décroissance, voire la disparition, de l'effet hypochrome en milieu organique est en faveur de la nature hydrophobe des interactions mises en jeu dans la complexation acridine-base nucléotidique.

Des résultats préliminaires en série acridine avaient montré un comportement similaire du dérivé Thy-C₃-Acr. Par contre, le modèle Ade-C₃-Acr était encore replié à 50 % dans l'éthanol pur (23). Ce comportement a confirmé la puissance étonnante des interactions qui avait été mise en évidence pour ce composé. Les modèles à plus longue chaîne que nous avons préparé se comportent de la même manière que d'autres composés étudiés au laboratoire dans des séries d'intercalants comme l' amino-4 quinoléine (22), la proflavine (60) et le psoralène (56).

D. ETUDES PAR FLUORESCENCE.

I. PRINCIPE DE LA METHODE :

La quinacrine a longtemps été utilisée comme sonde fluorescente dans l'investigation topographique des chromosomes et l'étude des cariotypes : selon l'état et la nature des chromosomes, on peut distinguer des zones de fluorescence bien délimitées et ce, de manière reproductible (67 - 73). Ce phénomène a été très étudié pour tenter d'expliquer cette apparente sélectivité et mettre en évidence une affinité particulière pour certaines séquences de polynucléotides.

De nombreuses études de fluorescence ont été menées avec des polynucléotides de synthèse du type poly (dA-dT), poly (dG-dC) ainsi qu'avec des acides nucléiques d'origine animale ou bactérienne de compositions connues. Les premières constatations ont été que les couples de bases dA-dT exaltaient la fluorescence émise par la quinacrine intercalée, alors que les couples dG-dC et l'ADN, au contraire l'inhibaient : phénomène de "quenching" (51, 74-78).

Certains auteurs ont pensé qu'il était nécessaire d'avoir une séquence d'au moins quatre couples dA-dT pour observer l'exaltation de la fluorescence alors que la proximité d'un seul couple dG-dC suffisait à éteindre la fluorescence (51), (la probabilité plus faible d'observer quatre couples dA-dT consécutifs expliquant l'extinction dans l'ADN).

D'autres auteurs ont utilisé des iodures pour inhiber la fluorescence de la quinacrine complexée. Par cette méthode, ils ont mis en évidence une plus forte interaction de la quinacrine avec les séquences dA-dT qu'avec les séquences dG-dC (77-78).

Pour tenter de simplifier le phénomène, des études ont été menées avec des nucléotides monophosphates comme l'AMP et le GMP. Ces deux nucléosides, mis en solution avec la quinacrine provoquent une diminution de sa fluorescence (79-81). Ces résultats, mal expliqués, sont en contradiction avec ceux obtenus avec la proflavine dont la fluorescence est exaltée par l'AMP, inhibée par le GMP (82).

Les travaux les plus récents ont montré que l'exaltation de fluorescence de la quinacrine, se produit lorsque celle-ci est intercalée dans une séquence contenant au moins 3 couples dA-dT successifs. La complexation est dominée par les séquences pyr-pur et pur-pyr (83), celles-ci interagissant plus fortement avec le noyau acridine que les séquences pur-pur et pyr-pyr. Les séquences (dG-dC, dG-dC), responsables de l'inhibition de fluorescence, se complexeraient 3 fois plus facilement avec l'intercalant que les séquences (dA-dT, dA-dT) responsables de l'exaltation de fluorescence (84).

Nous remarquons que toutes les méthodes employées n'ont jamais permis d'étudier spécifiquement la fluorescence du noyau acridine en interaction avec le noyau d'une seule base nucléotidique.

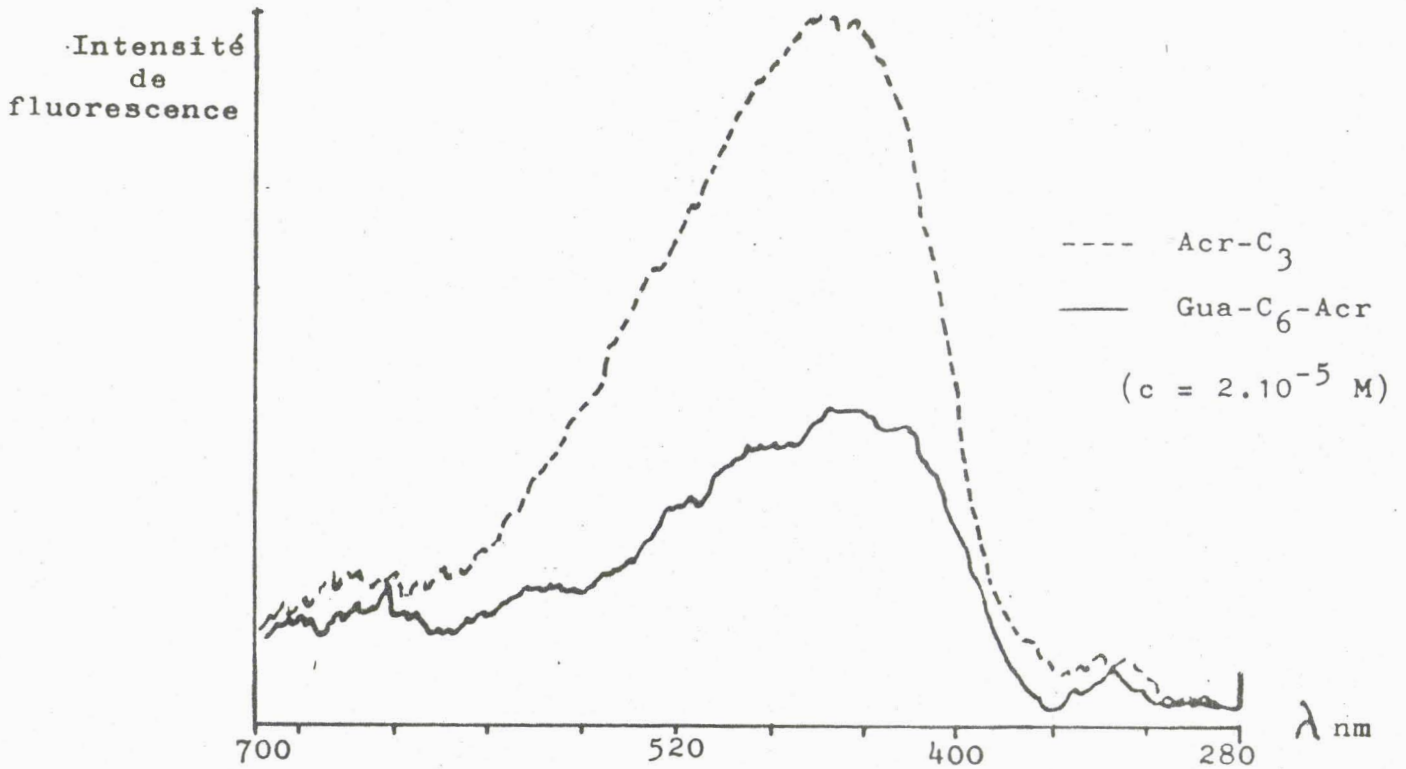
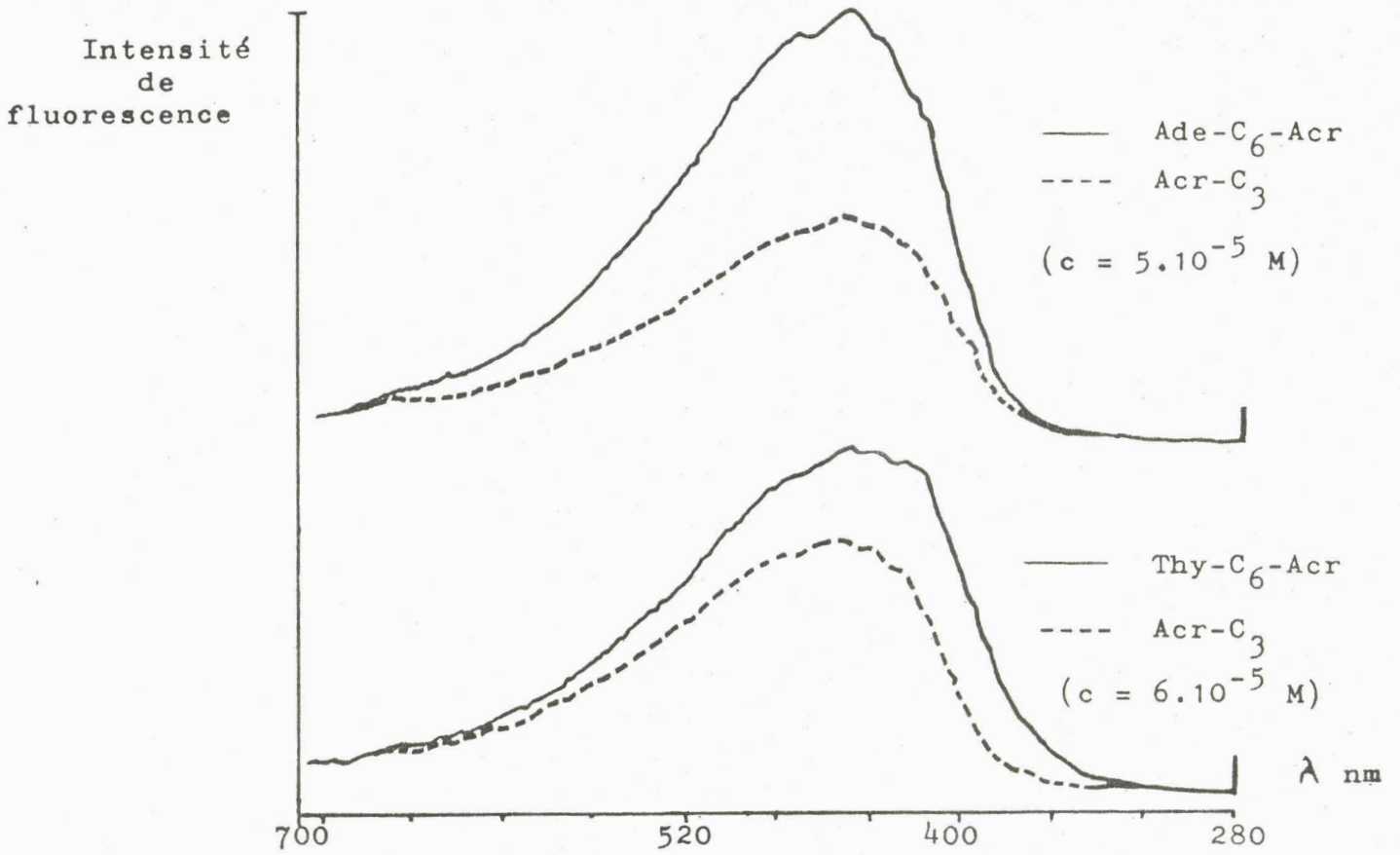
Les modèles du type Base-C_n-Acr que nous avons synthétisés semblent tout à fait adaptés pour résoudre ce genre de problème. Ils présentent l'avantage de ne mettre en interaction que deux chromophores : la base nucléotidique et l'intercalant. Si nos modèles peuvent adopter une conformation repliée dans l'eau, l'étude par fluorescence de ces structures doit contribuer à la compréhension du phénomène observé avec la quinacrine intercalée dans différents types d'oligonucléotides.

II. ETUDES DES MODELES :

Dans cette étude préliminaire nous avons examiné les spectres d'émission de fluorescence de l'acridine dans les composés modèles Base-C_n-Acr et leur référence Acr-C₃ ; 7. Nous avons utilisé les mêmes solvants que pour la spectrophotométrie UV (tampon acétate de sodium-acide acétique ; pH 5,5 ; 5 % d'éthanol; solvant non dégazé). La concentration de la référence est de l'ordre de $8,4 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Elle des modèles varie de 2,4 à $6,3 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Pour pouvoir visualiser les effets des bases nucléotidiques sur l'intensité du spectre d'émission de fluorescence de l'acridine, nous avons comparé des solutions contenant le modèle avec des solutions contenant les références Acr-C₃ ; 7 et Base-C₃ ; 8, 9, 31 à la même concentration que le modèle correspondant.

Les spectres d'émission obtenus sont rassemblés dans la figure 39. Nous avons vérifié qu'à ces concentrations la Base-C₃ en rapport équimolaire n'a pas d'influence sur le spectre d'émission de fluorescence de la référence Acr-C₃ ; 7.

Dans ces conditions, nous voyons que la fluorescence de l'acridine est sensiblement exaltée dans les modèles Ade-C₆-Acr ; 23 et Thy-C₆-Acr ; 17 alors qu'elle diminue dans le modèle Gua-C₆-Acr ; 35. Nous avons déterminé de manière quantitative ces effets en calculant les rendements quantiques de fluorescence de tous les modèles et de leur référence. Les valeurs sont rassemblées dans le tableau 14.



Spectres d'émission de fluorescence. $\lambda_{exc} = 360 \pm 7,5$ nm.
 Tampon acétate de sodium 0,05 M ; pH = 5,5 ; 5% d'éthanol.

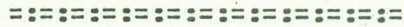
Composé	$\phi_F \cdot 10^{-2}$ $\lambda_{exc} = 360 \pm 7,5 \text{ nm}$	ϕ_F modèle $\phi_F \text{ Acr-C}_3$	Polymère	$\frac{\phi_F \text{ quinacrine+polymère}}{\phi_F \text{ quinacrine libre}}$ $\lambda_{exc} = 322 \text{ nm}$
Thy-C ₅ -Acr	9,2	3		
Thy-C ₆ -Acr	5,9	2	Poly dA-dT (49,72)	5
Ade-C ₅ -Acr	12,1	4		
Ade-C ₆ -Acr	10,4	3,5		
Gua-C ₅ -Acr	0,7	0,25	Poly dG-dC (49)	0,2
Gua-C ₆ -Acr	1,1	0,4		
Acr-C ₃	2,9		ADN thymus de veau (72)	0,7

Tableau 14 : Rendements quantiques de fluorescence ϕ_F des modèles Base-C_n-Acr. Comparaison avec les résultats donnés par la littérature pour la quinacrine en présence de polynucléotides.

En première approche, ces valeurs semblent cohérentes avec les résultats de la littérature. L'adénine et la thymine provoquent une exaltation significative de la fluorescence alors que la guanine induit une extinction de celle-ci. La proximité d'une seule base nucléotidique semble donc suffisante pour modifier les propriétés de fluorescence de l'acridine.

Ces premières mesures demandent à être confirmées. Elles justifient cependant pleinement la conduite d'études plus approfondies avec des méthodes plus sophistiquées.

ETUDES PRELIMINAIRES DES MODELES EN
PRESENCE DES BASES COMPLEMENTAIRES



Notre premier objectif dans cette étude est de mettre en évidence le complexe "ternaire" d'interaction entre le couple de bases et l'intercalant. L'appariement par liaisons hydrogène de deux bases nucléotidiques complémentaires n'a jamais pu être observé dans l'eau.

On a pu en mesurer les effets dans des milieux organiques comme le chloroforme, par infra-rouge (85) ou dans le DMSO par RMN du carbone-13 (86). Les seuls appariements observés en milieu aqueux l'ont été sur des petits polynucléotides, par RMN du proton à haut champ, avec des techniques sophistiquées (87, 88).

Nous avons pensé pouvoir faciliter un phénomène défavorisé par le solvant en jouant sur la contribution hydrophobe du modèle Base-C_n-Acr. En effet, nous avons montré qu'en milieu aqueux ces molécules adoptent une conformation repliée à 100 %. Il est alors possible que cette forme puisse jouer le rôle d'une matrice sur laquelle la base complémentaire pourra venir se fixer à la fois par l'intermédiaire de liaisons hydrogène et en mettant en jeu des interactions d'empilement (figure 40).

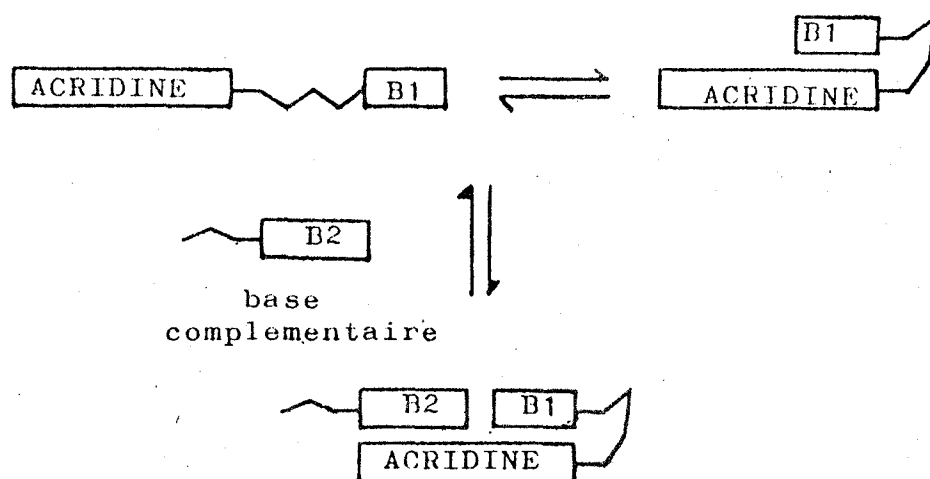


Figure 40 : Interactions possibles entre les modèles Base-C_n-Acr et la base complémentaire Base-C₃.

La perturbation produite sur l'acridine, si elle est importante, devrait donc être mesurable par les mêmes techniques que celles qui nous ont permis de détecter les conformations repliées de nos modèles. C'est à dire la spectrophotométrie UV, la RMN du proton, la spectrofluorimétrie.

A. ETUDE PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV :

Nous avons réalisé une étude préliminaire dans le tampon acétate de sodium à pH 5,5 contenant 5 % d'éthanol. Nous avons examiné les modèles Thy-C₅-Acr; 14, Ade-C₅-Acr; 20 et Gua-C₆-Acr; 35 et la référence Acr-C₃; 7 à des concentrations comprises entre 10⁻⁴ M et 5 10⁻⁵ M, en présence des bases complémentaires alkylées : Ade-C₃; 9, Thy-C₃; 8 et Cyt-C₃ respectivement. Les solutions de chaque composé ont été mélangées avec des solutions à différentes concentrations de la Base-C₃ correspondante. Ces spectres ont été enregistrés entre 500 et 310 nm. Dans cette gamme de longueurs d'onde, les Base-C₃ n'absorbent pas. Dans tous les cas, les concentrations croissantes de Base-C₃ provoquent une diminution de l'absorption à la fois des modèles mais aussi de la référence Acr-C₃; 7 (Figure 41).

Les rapports $r = \frac{\text{Base C}_3}{\text{modèle}}$ variant de 40 à 1100 il est probable qu'à valeur de r importante, on observe également des agrégats qui expliquent cette perturbation de l'absorption. L'appariement par liaison hydrogène n'est pas exclu mais il semble que le changement induit sur l'absorption UV du modèle ne soit pas suffisant.

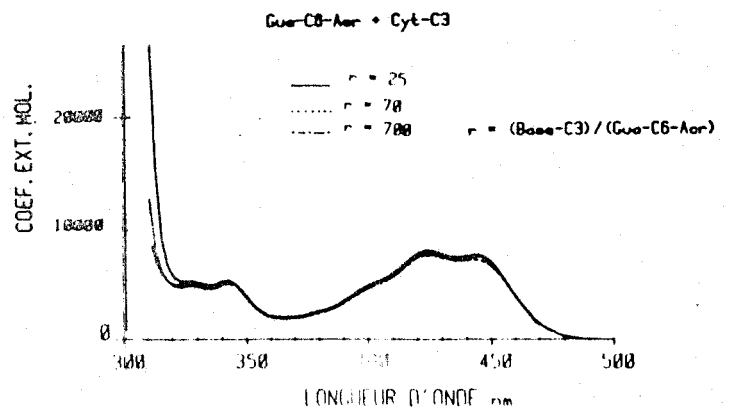
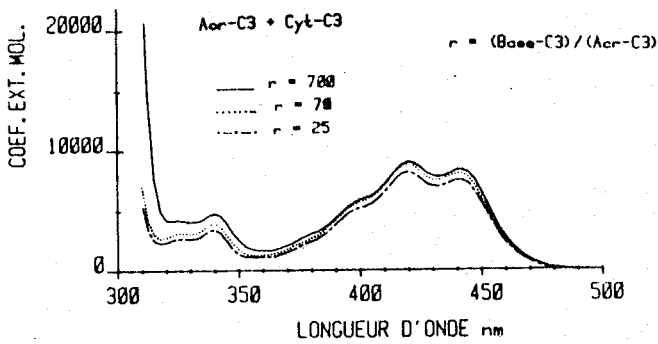
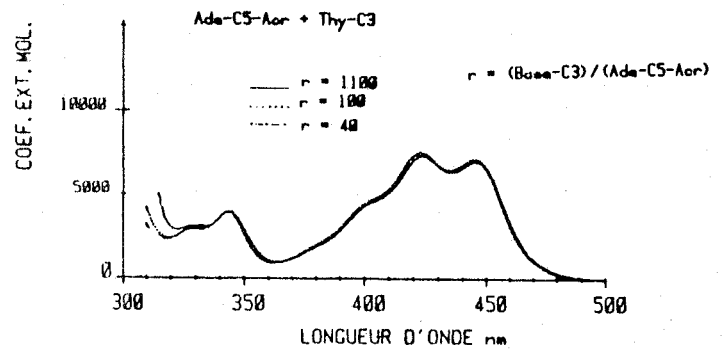
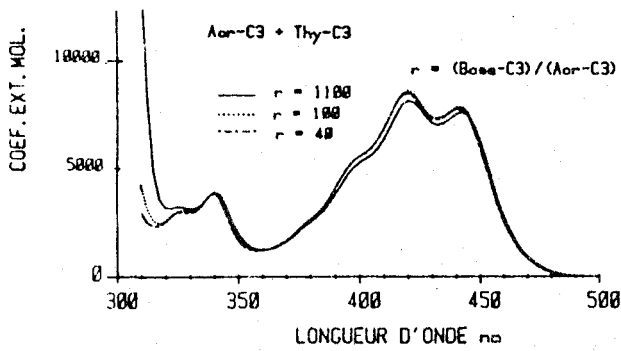
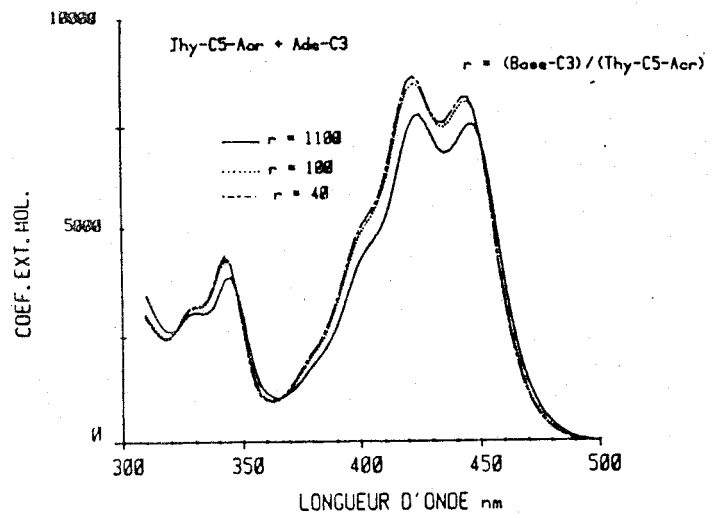
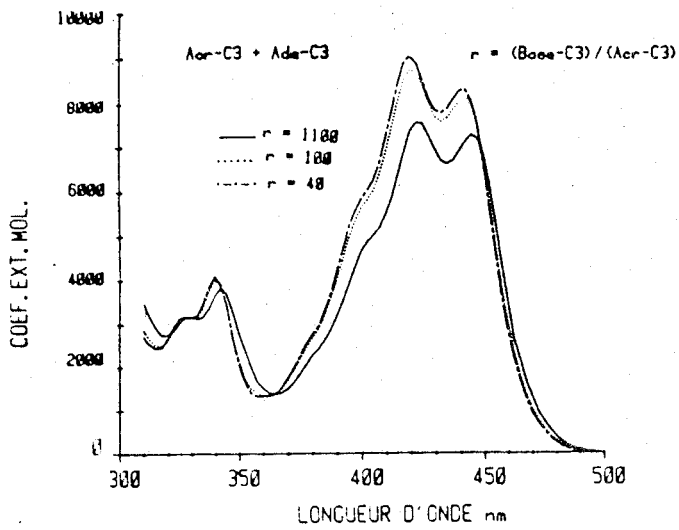


Figure 41 : Effets de la base complémentaire Base-C₃ sur les spectres d'absorption UV des modèles Base-C_n-Acr et la référence Acr-C₃ ; 7.



Il est également possible que l'équilibre



soit fortement déplacé vers la dissociation.

Il conviendra donc de mener une étude plus complète en utilisant d'autres solvants ou mélanges de solvants permettant à la fois les interactions d'empilement et les liaisons hydrogènes. Le choix de solvants organiques devrait aussi permettre de travailler à des températures plus basses, ce qui peut favoriser la complexation.

B. ETUDE PAR FLUORESCENCE :

Nous avons réalisé cette étude dans un tampon acétate à pH 5,5 contenant 5 % d'éthanol. Nous avons examiné les modèles Gua-C₅-Acr ; 34, Gua-C₆-Acr ; 35 et Thy-C₆-Acr ; 17 en présence ou non de leur base complémentaire Cyt-C₃ et Ade-C₃ ; 8 respectivement. Nous avons enregistré les spectres d'émission ($\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$) et calculé les rendements quantiques de fluorescence selon la méthode déjà décrite (p.94). Nous avons rassemblé dans le tableau 15 les valeurs des rendements quantiques calculés pour différents rapports $r = \frac{\text{Base-C}_3}{\text{modèle}}$. Nous avons également vérifié qu'aux mêmes rapports de concentration, les bases-C₃ n'ont pas d'influence sur la fluorescence de la référence Acr-C₃ ; 7.

Gua-C ₅ -Acr ; <u>34</u> 0,78	Gua-C ₅ -Acr + Cyt-C ₃ $r=100$ 0,79
Gua-C ₆ -Acr ; <u>35</u> 1,17	Gua-C ₆ -Acr + Cyt-C ₃ $r=100$ 1,19
Thy-C ₆ -Acr ; <u>17</u> 7,17	Thy-C ₆ -Acr + Ade-C ₃ $r = 10$ $r = 500$ 6,64 7,99

Tableau 15 : Rendements quantiques ($\phi \times 10^{-2}$) des modèles en présence de la base-C₃ complémentaire.

S'il y a appariement des bases complémentaires, nous attendons également des interactions de stacking qui devraient modifier la fluorescence du modèle. Les variations constatées pour les valeurs des rendements quantiques sont négligeables. Comme pour les études par spectrophotométrie UV, il nous faudra sans doute nous orienter vers l'emploi de solvants plus favorables que l'eau.

Il conviendrait peut-être également de choisir un autre système tampon que le couple acide acétique-acétate de sodium. en effet, il a été montré que les acides aminés sont capables de former des liaisons de type hydrogène avec la guanine (89) (Figure 42).

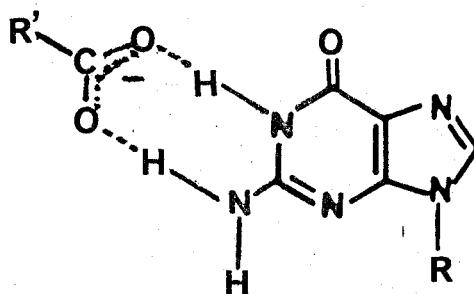


Figure 42 : Liaisons hydrogène entre la guanosine et un acide aminé.

ETUDE DE L'INFLUENCE DES MODELES Ade-C_n-Acr ; 20 ET 23
ET Thy-C_n-Acr ; 14 ET 17 SUR L'ACTIVITE DES ENDONUCLEASES
A ET B DE MICROCOCCUS LUTEUS

Dans le chapitre précédent, nous avons essayé de mettre en évidence l'appariement par liaisons hydrogène de deux bases complémentaires. Dans l'étude qui suit, nous avons voulu mettre à profit cette propriété pour étudier les effets des modèles Thy-C_n-Acr ; 14, 17 et Ade-C_n-Acr ; 20, 23 sur l'activité hydrolytique des endonucléases A et B spécifiques des sites apuriques et apyrimidiniques de l'ADN. Ces deux enzymes, extraits de Micrococcus Luteus ont été purifiés et sont étudiés dans le laboratoire du Pr. J. LAVAL (29).

Rappel : Les ADN apuriques sont des ADN qui ont perdu une base purique après rupture d'une liaison N-glycosidique. Les modèles Base-C_n-Acr que nous avons synthétisés sont susceptibles de présenter des interactions spécifiques avec ce type de structure (voir introduction et Figure 43).

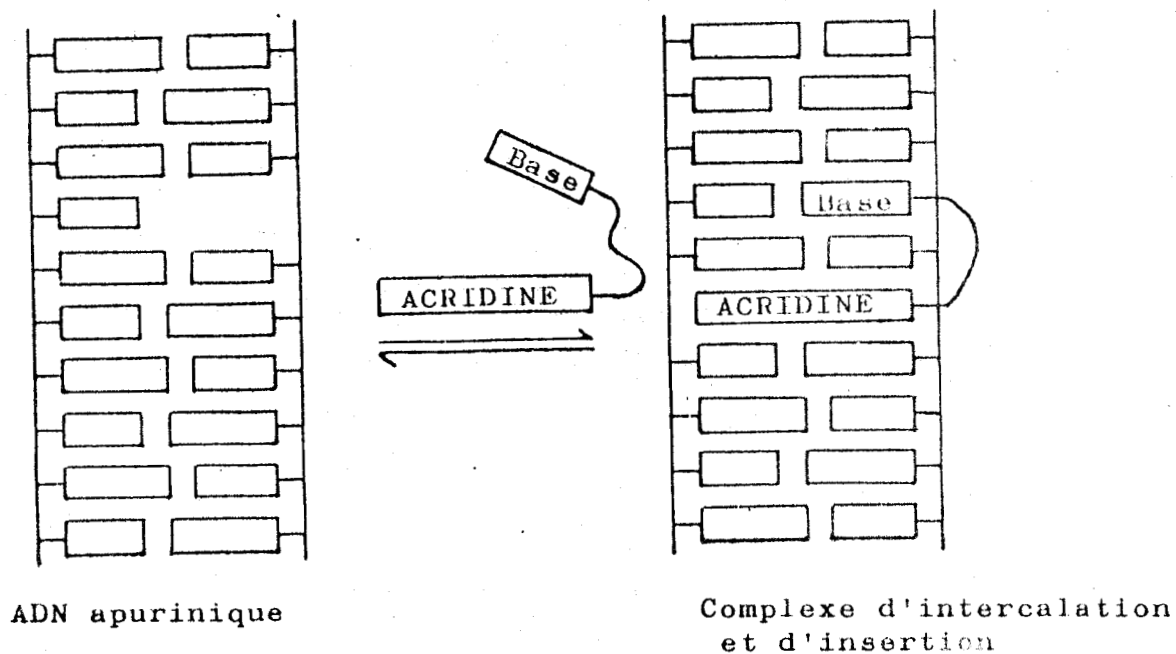


Figure 43 : Schéma d'interaction des modèles Base-C_n-Acr avec l'ADN apurinique.

PRINCIPE :

De l'ADN de phase T₅, marqué au tritium sur la thymine, est méthylé (sur les bases nucléotidiques) à l'aide de méthane sulfonate de méthyle. L'attaque sur les purines se fait surtout en position 7 ce qui induit une fragilité au niveau de la liaison N-glycosidique (Figure 44).

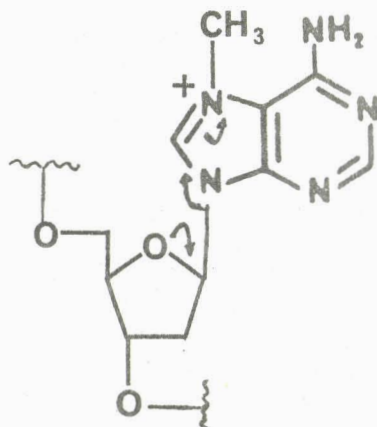


Figure 44 : Elimination de l'adénine méthylée en 7.

Le réactif éliminé, les bases modifiées sont excisées par simple chauffage à 50°C pendant 6h environ. Cet ADN est ensuite utilisé pour tester l'activité des endonucléases A et B. Ces enzymes sont capables de reconnaître les sites apuriniques et d'hydrolyser la liaison phosphodiester adjacente (côté 5'). Si la fréquence de tels sites est grande (ce qui est le cas après action d'agents méthylants), le nombre de coupures induites conduira à une fragmentation de l'ADN. La réaction peut alors être stoppée en ajoutant de l'ADN froid de thymus de veau.

On ajoute ensuite de l'acide perchlorique au milieu. Seuls les fragments composés de moins de 12 nucléosides seront solubles en milieu acide. Les autres sont éliminés par centrifugation. La mesure de l'augmentation de la radioactivité acido soluble au cours du temps constitue ainsi une mesure de l'activité enzymatique (Figure 45).

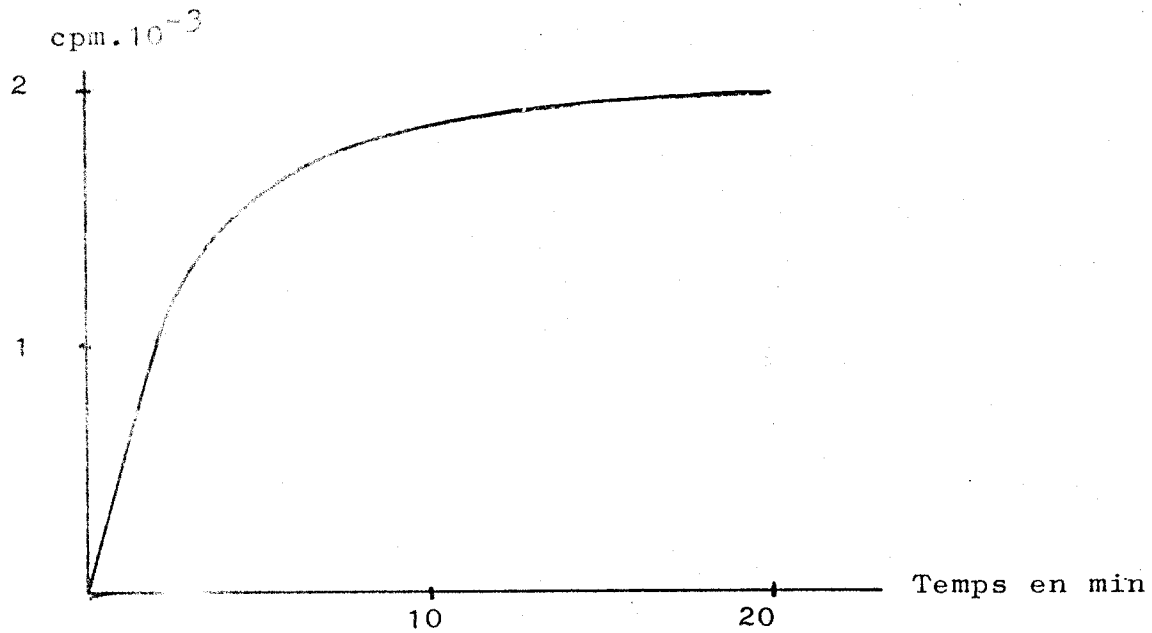


Figure 45 : Augmentation de la radioactivité du surnageant d'ADN marqué traité par l'endonucléase A et B.

Nous voyons que la réaction hydrolytique s'accélère linéairement pendant les 15 premières minutes avant d'atteindre un maximum.

Sous l'action de substances inhibitrices ou activatrices, le maximum d'activité doit rester inchangé. Il est atteint plus ou moins rapidement comme l'indique la variation de pente constatée dans la première partie de la courbe (Figure 46).

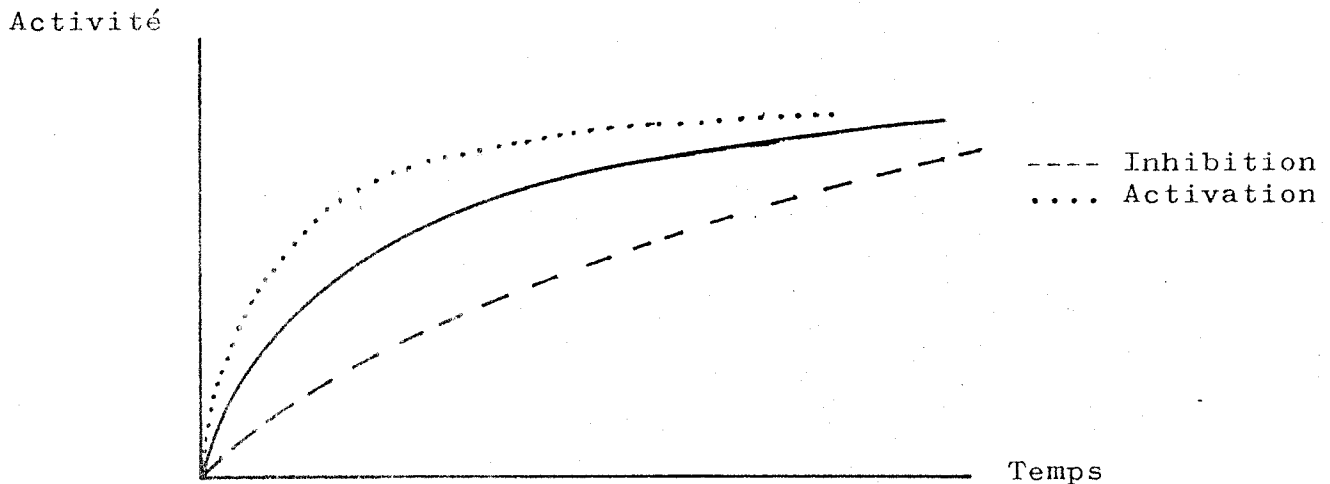


Figure 46 : Effets de substances activatrices ou inhibitrices.

Pour qu'une substance soit jugée activatrice ou inhibitrice, ses effets doivent être importants. Nous avons testé les activités hydrolytiques des AP endonucléases A et B sur l'ADN apurinique marqué, préalablement incubé

en présence de nos modèles Thy-C_n-Acr ; 14, 17 et Ade-C_n-Acr ; 20, 23 à des concentrations variables : $5 \cdot 10^{-7}M$; $10^{-7}M$ puis selon les modèles, de $10^{-6}M$ à $6 \cdot 10^{-6}M$. Les courbes de quelques modèles sont représentées dans la Figure 47.

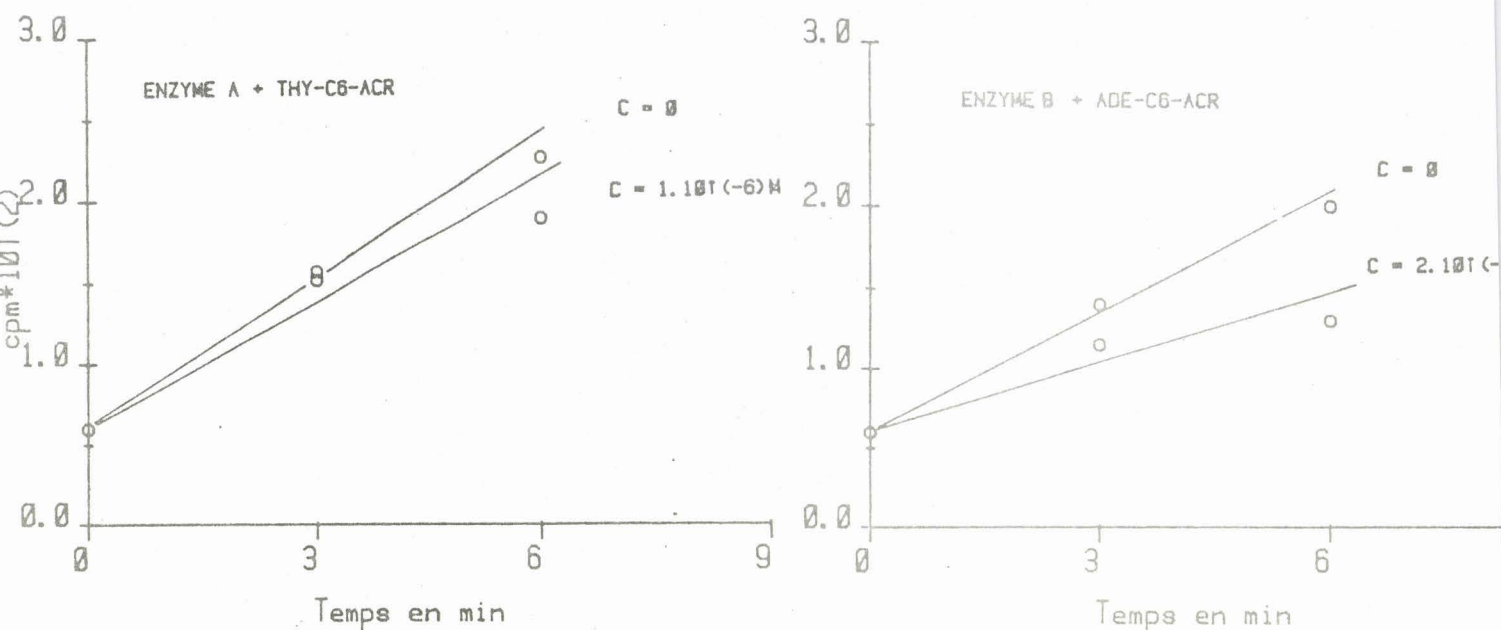


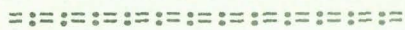
Figure 47 : Effets de quelques modèles Base-C_n-Acr sur l'activité phosphodiésterasique des AP endonucléases A et B.

On peut constater une très faible diminution d'activité enzymatique aux fortes concentrations en modèles. Elle n'est cependant pas assez significative pour être interprétée comme une inhibition de l'activité enzymatique. Plusieurs interprétations peuvent être avancées pour rendre compte de cette absence d'inhibition. L'une d'elle peut être la conformation adoptée par nos modèles dans l'eau. Les études par spectrophotométrie UV et par RMN ont montré qu'ils sont repliés à 100 % dans ce milieu. Ce type de conformation peut défavoriser à la fois l'intercalation de l'acridine et l'insertion de la base nucléotidique dans le site apurinique.

les composés Gua-C_n-Acr qui semblent présenter les interactions intramoléculaires moins puissantes sont sûrement plus aptes à se complexer avec les ADN apuriniques. Nous envisageons de les étudier de la même manière ultérieurement.

Il conviendra également de vérifier que nos modèles Base-C_n-Acr sont capables d'interactions spécifiques avec les ADN apuriniques. En comparant par exemple les équilibres de dialyse de ces composés en présence d'ADN normal, d'ADN dépuriné ou de polynucléotides de synthèse.

ACTIVITES BIOLOGIQUES



Les activités pharmacologiques de certains modèles Base-C_n-Acr ont été étudiées.

Les tests envisagés sont de deux types :

1. Tests antimalariques réalisés sur des souris Swiss parasitées avec *P. Yoeli higeriensis*.

(Etudes réalisées par l'équipe du Dr. S. MOREAU - INSERM U 42 Villeneuve d'Ascq).

2. Effets sur la multiplication et sur la morphologie des promastigotes de *Leishmania donovani*.

(études réalisées par Mme GERO - Institut de Chimie des substances naturelles de Gif-sur-Yvette).

A. TESTS ANTIMALARIQUES :

Les modèles étudiés sont :

Ade-C₃-Acr ; Thy-C₅-Acr ; 14 et Thy-C₆-Acr ; 17

I. PRINCIPE :

Des souris de type Swiss sont parasitées au jour J1. On injecte la drogue en solution aqueuse à raison de 2,5mg/Kg/Jour, soit 0,05mg par souris et par jour. Ce traitement est poursuivi pendant 5 jours sur cinq souris différentes. Le cinquième jour, on évalue la parasitémie chez chaque animal.

II. RESULTATS :

Les résultats pour chaque substance étudiée sont comparés à un lot traité à la chloroquine (tableau 16) et à un lot témoin d'animaux non traités.

Souris N°	1	2	3	4	5	Moyenne
Parasitémie témoin	31	26	19	18	31	25
Chloroquine	6	6	10	13	15	10
Thy-C ₅ -Acr ; <u>14</u>	25	21	18	31	18	23
Thy-C ₆ -Acr ; <u>17</u>	26	20	22	25	16	22
Ade-C ₃ -Acr	15	22	24	17	20	20

Tableau 16 : Résultats parasimétriques pour les modèles Thy-C_n-Acr ; 14, 17 et Ade-C₃-Acr. Comparaison avec la chloroquine.

Cette série de valeurs montre clairement que les modèles Base-C_n-Acr étudiés ne possèdent pas une activité antimalarique meilleure que la chloroquine, composé utilisé encore très largement à titre préventif.

B. EFFETS SUR LES PROMASTIGOTES :

Les deux modèles étudiés sont :

Ade-C₃-Acr et Thy-C₆-Acr ; 17.

I. PRINCIPE :

Les promastigotes sontensemencés au temps 0 dans des flacons contenant du milieu nutritif. Après 24h, on compte les parasites à l'aide d'un hemacymètre. On ajoute ensuite la solution contenant la substance à tester et laisse incuber à 26°C. Le nombre de parasites est compté chaque jour pendant 3 jours. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport au témoin non traité. La morphologie des promastigotes est contrôlée au microscope optique.

II. RESULTATS :

La substance active qui sert de référence est la sinefungine.
Les résultats sont regroupés dans le tableau 17.

Composé	% Inhibition			Morphologie		
	1e jour	2e jour	3e jour	1e jour	2e jour	3e jour
Ade-C ₃ -Acr	28	10	10	pas d'effet notable		
Thy-C ₆ -Acr	40	10	5			
Sinefungine	32	77	88,5	78	97	97

Tableau 17 : Activités antiparasitaires des composés Ade-C₃-Acr et Thy-C₆-Acr; 17 comparées à celles de la sinefungine.

les modèles Base-C_n-Acr ne présentent pas d'activité antiparasitaire très marquée. Ils n'ont aucun effet sur la morphologie des parasites.



CONCLUSION

=====
=====

* Nous avons mis au point la synthèse et nous avons étudié sur le plan conformationnel plusieurs modèles du type Base-C_n-Acr susceptibles de reproduire les interactions d'empilement observées pour la quinacrine intercalée dans l'ADN.

* La spectrophotométrie UV s'est avérée être un outil précieux et sensible pour mettre en évidence l'existence de complexes intramoléculaires (par la mesure d'effets hypochromes). Ces résultats sont confirmés par la RMN qui en plus nous donne accès à la géométrie de la forme repliée.

A ce niveau, ces deux techniques sont tout à fait complémentaires pour la mise en évidence et l'étude d'interactions d'empilement noyau-noyau.

* La méthodologie que nous avons utilisée, c'est à dire l'approche de type intermoléculaire à l'aide de modèles nous a permis d'étudier spécifiquement les interactions intramoléculaires d'empilement mises en jeu entre un intercalant comme la quinacrine et les bases nucléotidiques. Un autre intérêt dans ce type d'approche réside dans la possibilité de faire varier à volonté certains paramètres comme la température, le solvant, la force ionique, le pH.... Ce type d'expérimentation est difficilement envisageable avec l'ADN.

* Les résultats obtenus nous permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Les forces mises en jeu dans les interactions d'empilement sont étonnamment puissantes. Le modèle qui semble s'ouvrir le plus facilement, Ade-C₆-Acr ;23 présente encore 50 % de forme repliée à 90°C (le modèle Ade-C₃-Acr est totalement replié à cette température). Ceci constitue un résultat original dans la mesure où ce type d'interactions est généralement classé dans la catégorie des "liaisons de faible énergie".
- Les perturbations induites dans les spectres d'absorption UV et les spectres de RMN sont comparables à celle que l'on mesure pour la quinacrine intercalée dans l'ADN ou dans un polynucléotide de synthèse.

- Les interactions "Acridine-base" diminuent fortement, voire même, disparaissent dans des solvants organiques comme l'éthanol ou le DMSO. Elles sont donc de nature hydrophobe.
- Lorsqu'on augmente la température, le pourcentage de la forme repliée pour les modèles Ade-C_n-Acr est plus important que pour le modèle Ade-C₃-Ade (22). Ce comportement est en faveur d'une interaction "acridine-adénine" plus puissante que l'interaction "adénine-adénine". On comprend pourquoi l'intercalation est un phénomène favorisé d'un point de vue thermodynamique : les interactions "quinacrine-base" mises en jeu sont plus fortes que les interactions "base-base" initiales.

* En nous appuyant sur deux techniques complémentaires comme la spectrophotométrie UV et la RMN du proton, nous avons mis en évidence un effet spectaculaire de l'orientation relative des deux chromophores acridine et adénine sur la valeur de l'effet hypochrome mesuré lorsqu'ils sont empilés. A notre connaissance, c'est la première fois que de tels effets sont décrits. C'est aussi la première fois qu'une étude de ce genre est menée avec des chromophores aussi différents.

* Des études préliminaires de nos modèles Base-C_n-Acr par spectroscopie de fluorescence dans l'eau, ont montré que le spectre d'absorption de l'acridine est perturbé par la proximité de la base nucléotidique. Les effets observés vont dans le même sens que ceux provoqués par l'interaction avec des polynucléotides de synthèse. Jusqu'à présent, pour la quinacrine intercalée, dans l'ADN, on admet qu'il est nécessaire que la complexation ait lieu dans une séquence d'au moins quatre couples (dA-dT) pour provoquer une augmentation notable de l'intensité de fluorescence du noyau acridine, alors qu'un seul couple (dG-dC) est capable d'éteindre cette fluorescence. Nos modèles semblent montrer que l'interaction avec une seule base nucléotidique est suffisante pour modifier de façon sensible l'intensité du spectre d'émission de fluorescence de l'acridine.

Ces résultats préliminaires justifient une étude plus approfondie avec des techniques et des appareillages plus sophistiqués.

* En utilisant la spectrophotométrie UV et la spectroscopie de fluorescence, nous n'avons pas pu mettre en évidence la formation de liaisons hydrogène entre un modèle Base-C_n-Acr et sa base complémentaire dans l'eau.

Les études de variation de %H en fonction du pourcentage en éthanol dans l'eau ont montré que jusqu'à 50 % de solvant organique, on peut encore détecter la forme repliée du modèle. Il est probable qu'en utilisant des couples de solvants appropriés, nous pourrions permettre l'appariement par liaison hydrogène sans supprimer la composante "stacking" du complexe ternaire. Composante indispensable à la détection du couple de bases complémentaires par des méthodes spectroscopiques.

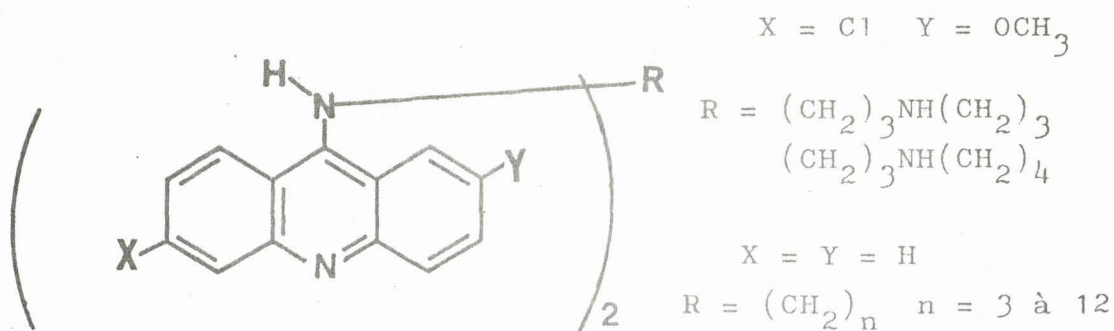
Nous pouvons envisager également l'emploi de techniques plus élaborées comme la RMN du proton à haut champ. D.J. PLATEL a réussi à observer les protons échangeables impliqués dans les liaisons de type hydrogène de polynucléotides synthétiques dans un mélange H₂O/D₂O (4/1). Le signal de l'eau "résiduelle" a été supprimé par une séquence d'impulsions appropriée.

* Les premières études d'activités biologiques ont été effectuées sur les systèmes enzymatiques de type AP endonucléases spécifiques des ADN dépurinés. Nous n'avons pas observé d'effet notable des modèles Ade-C_n-Acr ; 20, 23 et Thy-C_n-Acr ; 14, 17 lorsque ceux-ci sont incubés avec l'ADN apurinique. Deux raisons peuvent être invoquées pour expliquer ces résultats :

Les modèles interagissent sélectivement avec l'ADN dépuriné, le site apurinique est "masqué", mais cette complexation ne perturbe pas l'activité phosphodiésterasique de l'endonucléase.

Les modèles ne présentent pas d'interaction sélective avec l'ADN dépuriné, les sites nécessaires à la reconnaissance par l'enzyme ne sont pas modifiés et l'activité hydrolytique est inchangée.

Nous envisageons dans un premier temps des études d'équilibre de dialyse de nos modèles en présence d'ADN normal et d'ADN dépuriné pour mettre en évidence ou non des interactions spécifiques avec les sites apuriniques. Ce type d'interactions nécessite qu'il y ait à la fois intercalation et insertion. Ce comportement est proche de celui des bis-intercalants du type Acr-R-Acr qui font l'objet de nombreux travaux (90-92).



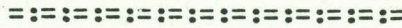
Ces composés, par leur double aptitude à l'intercalation, présentent des interactions plus durables avec l'ADN. Cette propriété leur confère une activité biologique marquée. En particulier, ils sont capables d'inhiber in vitro la synthèse d'ARN nucléolaire (93-95).

Dans le cas de bis intercalants à chaîne souple, pour que l'interaction avec l'ADN se fasse par bis intercalation, les plans des deux noyaux acridines doivent être distants de 8,8 Å au moins (96). Cette distance minimum correspond à la "chaîne-(CH₂)" que nous avons utilisée dans la construction de certains de nos modèles. Il faut également tenir compte du facteur "interaction intramoléculaire". En effet, si les interactions d'empilement sont trop puissantes dans le modèle lui-même, les deux noyaux aromatiques qui le constituent pourront difficilement se complexer avec les acides nucléiques par intercalation.

Pour pallier à ces inconvénients, certains auteurs ont essayé de rigidifier la chaîne de liaison en introduisant des liaisons amides (97). Dans ce type de dérivés par contre, une distance inter-noyau de 8,8 Å ne suffit pas à la bis intercalation. La plus longue chaîne envisagée provoque un espacement de 21,6 Å qui permet aux deux acridines de prendre en "sandwich" 5 plateaux de bases complémentaires.

En utilisant des chaînes de couplage plus rigides, moins hydrophobes, nous pourrions envisager la mise au point de molécules capables de reconnaître et d'interagir spécifiquement avec les régions dépurinées de l'ADN. La méthodologie que nous avons développée lors de la synthèse et l'étude des modèle Base-C_n-Acr constitue également un bon moyen de sélection des structures les plus aptes à l'intercalation, présentant les interactions les plus fortes. De telles molécules pourraient alors servir de vecteurs chargés d'amener au voisinage de l'ADN une structure possédant une activité spécifique pour cette macromolécule.

PARTIE EXPERIMENTALE



A. INDICATIONS GENERALES :

La purification des produits a été effectuée par chromatographie sur gel de silice KIESELGEL 60 ; 0,063-0,200 mm MERCK et sur phase inverse ; LICHROPREP RP8 0,005-0,02 mm MERCK à l'aide d'un appareil de chromatographie liquide à hautes performances (CLHP) CHROMATOSPAC PREP JOBIN YVON.

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 MERCK ; appareil WATERS).

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

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur les spectromètres BRUKER WP 60, WP 80 et WH 270 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 (SM) ont été réalisés sur un spectromètre RIBER MAG 10-10.

Les spectres d'absorption infra-rouge (IR) ont été enregistrés sur des spectrophotomètres 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 DE LEURS REFERENCES :

Chloro-6 méthoxy-2 phénoxy-9 acridine : Acr-O-Ph ; 2

A une solution de soude en pastilles (1,6 g ; 41 mmol) dans du phénol fraîchement distillé (30 g ; 320 mmol) on ajoute de la dichloro-6,9 méthoxy-2 acridine ; 1 (5,6 g ; 20 mmol). On chauffe le mélange à 100°C avec agitation et sous atmosphère d'azote pendant 1h30. Le mélange réactionnel est alors refroidi et versé dans une solution de soude 2N (200 cm³). On laisse agiter une nuit et on filtre le précipité formé. Après lavage à l'eau et séchage suivis d'une cristallisation dans l'acétone, on obtient le produit désiré avec un rendement de 50 % (3,36 g).

F = 154°C.

IR (Nujol) : 1630, 1585, 1550, 1420, 1350, 1267, 1230, 1205, 1170, 1060, 1025, 920, 830, 797, 757 cm⁻¹.

RMN (90 MHz ; CDCl₃) δ ppm = 8,16 et 7,18 (3H, 2 m, AcrC₈H et PhC₂H, C₆H); 7,45-6,73 (8H, m, AcrC₁H, C₃H, C₄H, C₅H, C₇H et PhC₃H, C₄H, C₅H); 3,74 (3H, s, AcrOCH₃).

UV (Ethanol) : λ_{\max} (ϵ) : 262 (110 000) ; 400 (6600) nm.

SM (impact électronique) M = 335,79 ; m/e : 335 (100 ; M⁺), 320 (38,9 ; M⁺-(CH₃), 285 (51,1 ; M⁺-(OCH₃+Cl), 258 (31,7 ; M⁺-(Ph).

N (hydroxy-5 pentyl)-1 amino-9 chloro-6 méthoxy-2 acridine :

Acr-C₅-OH ; 3

Un mélange de Acr-O-Ph ; 2 (11,7 g ; 35 mmol) et d' amino-5 pentanol (11,1 g ; 108 mmol) dans le DMSO (250 cm³) est chauffé à 110°C avec agitation et sous atmosphère d'azote pendant 12 h. Le mélange réactionnel est alors refroidi à température ambiante et versé dans de l'eau froide (1000 cm³). On laisse la solution pendant une nuit à 4°C et on filtre le précipité jaune

forme. Apres lavage a l'eau et séchage, le rendement brut est de 75 % (9 g). Le produit est ensuite purifié par cristallisations successives dans l'éthanol.

F = 154-156°C.

IR (Nujol) : 3320, 1627, 1600, 1560, 1520, 1500, 1350, 1255, 1235, 1167, 1070, 1030, 952, 920, 827, 780, 765 cm^{-1} .

RMN (90 MHz ; DMSO d_6) δ ppm = 8,55 (1H, d, AcrC₈H); 8,10-7,48 (5H, m, AcrC₁H, C₃H, C₄H, C₅H, C₇H); 7,05 (1H, s, AcrNH); 4,54 (1H, s, -OH); 4,15 (3H, s, AcrOCH₃); 3,95 (2H, m, AcrNHCH₂- ou HOCH₂-); 3,55 (2H, m, AcrNHCH₂- ou HO-CH₂); 1,80 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₁₉H₂₁O₂N₂Cl

Calc. % : C : 66,17 H : 6,13 N : 8,12 Cl : 10,28

Tr. % : 65,45 6,19 8,09 10,32

UV (Ethanol) : λ_{max} (ϵ) : 267 (58200) ; 278 (51400) ; 410 (8600) nm.

SM (impact électronique) M = 344,85 ; m/e : 344 (100, M⁺), 271 (24,2 ; M⁺-((CH₂)₄OH), 257 (12,1 ; M⁺-((CH₂)₅OH).

N (hydroxy-6 hexyl)-1 amino-9 chloro-6 methoxy-2 acridine :

Acr-C₆-OH ; 4

On utilise le même protocole que pour le dérivé Acr-C₅-OH ; 3 (p. 119). Le rendement brut est de 80 %. Le produit est purifié par cristallisations successives dans l'éthanol.

F = 148-149°C.

IR (Nujol) : 3315, 1628, 1605, 1560, 1520, 1500, 1365, 1345, 1255, 1230, 1075, 1030, 925, 862, 827, 817, 792, 755 cm^{-1} .

RMN (90 MHz ; DMSO d_6) δ ppm = 8,50 (1H, d, AcrC₈H); 8,09-7,45 (5H, m,

ACrC₁H, C₃H, C₄H, C₅H, C₇H) ; 7,15 (1H, s, AcrNH) ; 4,5 (1H, s, -OH) ; 4,14 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,93 (2H, t, AcrNHCH₂- ou HO-CH₂-) ; 3,55 (2H, t, AcrNHCH₂- ou HOCH₂) ; 2,1-1,5 (8H, m, -(CH₂)₃).

Analyse : C₂₀H₂₃O₂N₂Cl

Calc. % : C : 66,93 H : 6,46 N : 7,80

Tr. % : 66,95 6,53 7,70

UV (Ethanol) : λ_{\max} (ϵ) : 269 (55500) ; 280 (48700) ; 412 (7300) nm.

SM (impact électronique) M = 358,87 ; m/e : 358 (100 ; M⁺), 285 (13,6 ; M⁺-((CH₂)₄OH), 271 (44,2 ; M⁺-((CH₂)₅OH).

N (bromo-6 hexyl)-1 amino-9 chloro-6 méthoxy-2 acridine :

Acr-C₅-Br ; 5

On dissout le dérivé hydroxylé Acr-C₅-OH ; 3 (3,5 g ; 102 mmol) dans un mélange d'acide bromhydrique à 47 % dans l'eau (200 cm³) et d'acide sulfurique concentré (50 cm³). On chauffe pendant 7 h à 70°C avec agitation et sous atmosphère d'azote. On refroidit à température ambiante et verse par petites quantités en agitant, dans un solution de potasse 5N (1000 cm³) maintenue à 4°C dans un bain de glace. Il se forme un précipité jaune orangé qui est filtré, lavé à l'eau et séché. Le rendement brut est de 45 % (1,8 g).

Ce dérivé s'est avéré trop instable pour être obtenu analytiquement pur. On le purifie grossièrement avant utilisation par dissolution dans le chloroforme puis précipitation à l'éther de pétrole.

F = 110°C (déc.)

IR (Nujol) : 3500, 3000, 1620, 1590, 1250, 1090, 755 cm⁻¹.

UV (Ethanol) : λ_{\max} (ϵ) : 267 (46000) ; 280 (40400) ; 410 (5900) nm.

N (bromo-6 hexyl)-1 amino-9 chloro-6 méthoxy-2 acridine :

Acr-C₆-Br ; 6

On utilise le même protocole que pour le dérivé Acr-C₅-Br . 5 (p. 121)
Le rendement brut est de 45 %.

F = 90°C (déc.).

IR (Nujol) : 3500, 3000, 1625, 1590, 1560, 1500, 1270, 1245, 1090, 840, 760 cm⁻¹.

RMN (90 MHz ; DMSO d₆) δ ppm = 8,53 (1H, d, AcrC₈H) ; 8,1-7,46 (5H, m, AcrC₁H, C₃H, C₄H, C₅H, C₇H) ; 7,25 (1H, s large, AcrNH-) ; 4,17 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,67-3,96 (4H, m, (CH₂)₂) ; 1,6-2,2 (8H, m, (CH₂)₄).

UV (Ethanol) λ_{max} (ε) : 268 (53500) ; 280 (46200) ; 412 (7700) nm.

SM (impact électronique) M = 421,25 ; m/e : 422 (44,3 ; (M+1)⁺ Br⁸¹), 420 (33,9 ; (M-1)⁺, Br), 271 (35,4, Acr(CH₂)₁⁺).

N(propyl-1)amino-9 chloro-6 méthoxy-2 acridine : Acr-C₃ ; 7

Une solution de Acr-O-Ph ; 2 (3,05 g ; 9 mmol) dans l'aminopropane (60 cm³) est agitée pendant 5 jours à température ambiante, sous atmosphère d'azote.

on évapore à sec, on dissout dans du dichlorométhane (75 cm³) et on lave avec une solution de soude (0,1N ; 3x75 cm³). La phase organique est ensuite séchée sur chlorure de calcium, filtrée et évaporée à sec.

Le produit désiré est purifié par cristallisation dans l'éther éthylique. Le rendement est de 48,4 % (1,32 g).

F = 106-108°C.

IR (Nujol) : 3230, 1630, 1560, 1255, 1235, 1030, 930, 760 cm⁻¹.

RMN (80 MHz ; D₂O-CD₃CO₂Na pD = 5) δ ppm = 7,89 (1H, d, AcrC₈H) ;

7,34 (1H, s, AcrC₅H) ; 7,35-7,2 (3H, m, AcrC₃H, C₄H, C₇H) ; 7,14 (1H,

s, AcrC₁H) ; 3,75 (3H, s, AcrOCH₃) ; 1,72 (2H, q, AcrCH₂-CH₂-CH₃) ; 0,86 (3H, t, Acr-CH₂-CH₂-CH₃).

Analyse : C₁₇H₁₇N₂ClO

Calc. % : C : 67,88 H : 5,69 N : 9,31 Cl : 11,78

Tr. % : 67,49 5,8 8,75 12,14

UV (H₂O pH 5,5 ; 5 % EtOH) λ_{max} (ε) : 442,5 (8890) ; 420 (9450) ; 340 (4140) nm.

SM (impact électronique) M = 300,79 ; m/e = 300 (100 ; M⁺), 285 (18,6 ; M⁺-CH₃), 271 (22,9 ; M⁺-C₂H₅), 242 (11,6 ; M⁺-C₃H₈N).

N(propyl-1)-1 thymine : Thy-C₃ ; 8

Sous atmosphère d'azote sec, une suspension de thymine (5,0 g ; 40 mml) dans l'hexaméthylidisilazane (HMDS ; 70 cm³) est chauffée à reflux en présence d'une quantité catalytique de sulfate d'ammonium (0,1 g). Après 18 h, le HMDS est évaporé sous pression réduite laissant un résidu huileux blanchâtre auquel on ajoute de la DMF anhydre (25 cm³) et du bromo-1 propane (25 cm³). Le mélange est agité sous atmosphère d'azote sec à 60°C pendant 7 jours. Le mélange réactionnel est ensuite porté quelques minutes à 90°C en présence d'eau (20 cm³). On évapore à sec sous pression réduite et on cristallise le solide obtenu dans le benzène après traitement de la solution au noir animal. Le rendement est de 80 % (5,3 g ; 32 mmol).

F = 135-136°C ; Litt. (36) F = 134-136°C.

IR (KBr) : 1695, 1645, 1330, 1240, 1145, 865, 760, 680 cm⁻¹.

RMN (60 MHz ; CDCl₃) : δ ppm = 9,60 (1H, signal large, ThyN₃H) ; 7,0 (1H, s, ThyC₆H) ; 3,65 (2H, t, ThyN₁CH₂) ; 1,90 (3H, d, ThyC₅CH₃) ; 1,2 à 2,1 (2H, m, CH₂) ; 0,90 (3H, t, CH₃).

Analyse : $C_8H_{12}N_2O_2$

Calc. % : C : 57,13 H : 7,19 N : 16,66

Tr. % : 57,26 7,22 16,51

UV (EtOH) λ_{max} (ϵ) : 271,5 (9500) nm.

SM (impact électronique) ; M = 168,20 ; m/e : 168 (55 ; M⁺), 139 (15 ; Thy-CH₂⁺), 126 (57 ; Thy-H⁺), 96 (100), 83 (17), 55 (24).

N(propyl-1)-9 adénine ; Ade-C₃ i 9

Ce composé a été synthétisé à partir de l'adénine et du bromo-1 propane selon le mode opératoire décrit par N.J. LEONARD et D.T. BROWNET (36).

F = 174,5-175°C ; Litt. (36) F = 175°C.

IR (KBr) : 3280, 3100, 1670, 1600, 1415, 1310, 1245, 1210, 1070, 1015, 900, 800, 765, 660 cm⁻¹.

RMN (60 MHz ; CDCl₃) : δ ppm = 8,35 (1H, s, AdeC₂H ou AdeC₈H) ; 7,80 (1H, s, AdeC₂H ou AdeC₈H) ; 6,25 (2H, signal large, AdeC₆NH₂) ; 4,15 (2H, t, AdeN₉CH₂) ; 1,90 (2H, m, CH₂) ; 1,0 (3H, t, CH₃).

Analyse : $C_8H_{11}N_5$

Calc. % : C : 54,22 H : 6,26 N : 39,52

Tr. % : 54,27 6,22 39,10

UV (EtOH) λ_{max} (ϵ) : 260,5 (14100) nm.

SM (impact électronique) ; M = 177,21 ; m/e : 177 (87 ; M⁺), 148 (81 ; AdeCH₂⁺), 135 (100 ; Ade⁺), 108 (43), 81 (16), 67 (10).

N- (bromo-5 pentyl)-1 phtalimide : pht-C₅-Br ; 10

Un mélange de phtalimide (15,0 g ; 10 mmol), de 1,5-dibromopropane (70 cm³ ; 5 fois stoechiométrique) et de carbonate de potassium (30 g ; 210 mmol) dans la DMF anhydre (250 cm³) est vigoureusement agité sous atmosphère d'azote pendant 3 jours à température ambiante. Lorsque la réaction est terminée, on filtre puis évapore la DMF sous pression réduite. On obtient une huile blanchâtre que l'on dissout dans un mélange éther de pétrole/éther éthylique (60/40). Après une nuit à -10°C, les cristaux blancs formés sont filtrés, lavés avec de l'éther de pétrole froid et cristallisés à nouveau. Le produit est recueilli sous forme d'aiguilles blanches avec un rendement de 79% (21,7g).

F = 59-61°C

IR (Nujol) : 1770, 1727, 1712, 1610, 1600, 1595, 1267, 1245, 1210, 1040, 1025, 942, 882, 715 cm⁻¹.

RMN (60 MHz ; TFA d) δ ppm = 7,80 (4H, m, pht-H) ; 3,67 (2H, t, pht-NCH₂-) ; 3,40 (2H, t, BrCH₂-) ; 1,63 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₁₃H₁₄NO₂Br

Calc. % : C : 52,72 H : 4,76 N : 4,73

Tr. % : 53,42 4,78 4,84

UV (Ethanol) λ_{\max} (ϵ) : 295 (2400) ; 242 (12200) ; 233 (19200) ; 221 (39400) nm.

SM (impact électronique) M = 296,17 ; m/e : 297 (7,1 ; (M+1)+Br⁸¹), 295 (6,5 ; (M-1)+Br⁷⁹), 216 (14,0 ; M⁺-Br), 188 (2,3 ; M⁺ -((CH₂)₂Br)), 160 (100 ; M⁺ -((CH₂)₄Br)).

N- (bromo-6 hexyl)-1 phtalimide : pht-C₆-Br ; 11

On utilise le même protocole que pour le dérivé pht-C₅-Br. Le rendement est de 70 % (p. 125).

F = 58-60°C.

IR (Nujol) : 1770, 1720, 1610, 1600, 1595 cm⁻¹.

RMN (TFA d) δ ppm = 7,85 (4H, m, pht-H) ; 3,67 (2H, t, phtNCH₂-) ; 3,4 (2H, t, Br-CH₂-) ; 1,47 (8H, m, -(CH₂)₄).

SM (impact électronique) M = 310,19 ; m/e : 311 (28,9 ; (M+1)⁺ Br⁸¹), 309 (22,2 ; (M-1)⁺ Br⁷⁹), 230 (8,9 ; M⁺-Br), 160 (100 ; M⁺-((CH₂)₄Br)).

N- (thyminy-1)-5 hexyl-1 phtalimide : Thy-C₅-pht : 12

Sous atmosphère d'azote, une suspension de thymine (3,0 g ; 24 mmol) dans l'hexamethyldisilazane (HMDS ; 30 cm³) est chauffée à reflux en présence d'une quantité catalytique de sulfate d'ammonium (0,1 g). Bien que toute la thymine soit dissoute après 2 h, la réaction de silylation est poursuivie pendant 18 h. Le HMDS est alors évaporé sous pression réduite laissant un résidu huileux blanchâtre auquel on ajoute de la DMF anhydre (30 cm³) et du phtC₅Br ; 10 (8,15 g ; 28 mmol). Le mélange est agité à 80°C sous atmosphère d'azote pendant 18 h ; la solution brune obtenue est évaporée sous pression réduite. Il se forme un résidu huileux que l'on dissout à chaud dans un mélange éthanol/eau (80/20). La solution est filtrée et on laisse cristalliser à 4°C pendant une nuit. Après filtration, lavage à l'alcool, à l'éther, le rendement en produit brut est de 71 % (5,80 g). Des cristallisations successives dans l'éthanol absolu nous fournissent le produit désiré sous forme de cristaux blancs.

F = 138-140°C.

IR (Nujol) : 3160, 1767, 1712, 1660, 1392, 1345, 1217, 1042, 967, 925, 895, 845, 760 cm⁻¹.

RMN (60 MHz ; DMSO d₆) δ ppm = 7,83 (4H, s, pht-H) ; 7,52 (1H, s, ThyC₆H) ; 3,52 (4H, m, ThyNCH₂- et phtNCH₂-) ; 1,80 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₁₈H₁₉N₃O₄

Calc. % : C : 62,33 H : 5,61 N : 12,31
Tr. % : 62,94 5,71 11,96

UV (MeOH) : λ_{\max} (ϵ) : 275 (15600) ; 220 (77200) ; 205 (86700) nm.

SM (impact électronique) M = 341,37 ; m/e : 341 (94,9 ; M⁺), 216 (8,2 ; pht(CH₂)₅⁺), 160 (100 ; pht(CH₂)⁺).

Chlorhydrate de N₁- (amino-5 pentyl)-1 thymine : Thy-C₅-NH₂, HCl ; 13

On dissout le dérivé Thy-C₅-pht ; 12 (5,42 g ; 18 mmol) dans un mélange eau/acide acétique glacial/acide chlorhydrique concentré (1/1/1 ; 100cm³). On chauffe à reflux pendant 36 h puis on concentre le solvant par évaporation sous pression réduite. L'acide benzoïque qui précipite est filtré. Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu huileux formé est dissout à chaud dans un faible volume d'alcool absolu. La solution est placée une nuit à 4°C. On obtient le produit désiré sous forme de cristaux blancs avec un rendement de 69 % (3,07 g).

F = 228-230°C.

IR (Nujol) : 3175, 2760, 2075, 1695, 1585, 1415, 1335, 1050, 865 cm⁻¹.

RMN (60 MHz ; DMSO d₆) δ ppm = 8,93 (3H, s large, -NH₃⁺) ; 7,55 (1H, s, ThyC₆H) ; 3,63 (2H, t, ThyN-CH₂-) ; 2,74 (2H, t, -CH₂-NH₃⁺) ; 1,73 (3H, s, ThyCH₃) ; 1,35 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₁₀H₁₇N₃O₂Cl

Calc. % : C : 48,49 H : 7,32 N : 16,96 Cl : 14,31
Tr. % : 48,87 7,37 16,75 13,51

UV (H₂O) : λ_{\max} (ϵ) : 261 (14300) ; 205 (21300) nm.

SM (impact électronique) M = 246,72 ; m/e : 211 (44,1 ; M⁺-HCl), 181 (100 ; Thy(CH₂)₄⁺), 167 (44,3 ; Thy(CH₂)₃⁺), 153 (25,8 ; Thy(CH₂)₂⁺), 126 (88,6 ; ThyH⁺).

N-((thyminy-1)-5 pentyl)-1 amino-9 chloro-6 méthoxy-2 acridine :

Thy-C₅-Acr ; 14

La Thy-C₅-NH₂, HCl ; 13 (1,20 g ; 4,9 mmol) est dissoute dans un mélange de DABCO (2,75 g ; 25 mmol) et de DMSO (35 cm³) par agitation sous atmosphère d'azote pendant 15 mn à température ambiante. On ajoute ensuite le dérivé Acr-O-Ph ; 2 (1,77 g ; 5,3 mmol) et chauffe la solution à 70°C sous atmosphère d'azote pendant 18 h. Par chromatographie sur couche mince, on peut voir que la réaction n'est pas terminée mais qu'elle n'évolue plus vers la formation du produit désiré. Le mélange réactionnel est alors refroidi et versé par petites quantités, sous agitation vigoureuse dans de l'ammoniaque (pH 13 ; 100 cm³).

Le précipité formé est filtré, lavé à l'eau puis séché. Le rendement brut de la réaction est de 92 % (2,12 g). La purification du produit nécessite plusieurs séparations successives sur colonne de silice (élution : étanol/méthanol) suivies d'une cristallisation dans l'éthanol absolu. Le produit est recueilli sous forme de poudre jaune orangée.

F = 221-223°C.

IR (Nujol) : 3440, 3160, 1695, 1650, 1527, 1255, 1235, 1135, 1075, 1035, 927, 860, 820, 770, 755, 720 cm⁻¹.

RMN (270 MHz ; DMSO d₆) δ ppm = 11,10 (1H, s, ThyN₃H) ; 8,25 (1H, d, AcrC₈H) ; 7,78 (2H, m, AcrC₄H, C₅H) ; 7,53 (1H, s, ThyC₄H) ; 7,24 (1H, d, AcrC₇H) ; 6,81 (1H, s large, AcrNH) ; 3,86 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,67 (2H, m, ThyNCH₂-) ; 3,49 (2H, t, AcrNHCH₂-) ; 1,67 (5H, m, ThyCH₃ et CH₂) ; 1,50 (2H, m, CH₂) ; 1,27 (2H, m, CH₂).

Analyse : C₂₄H₂₅N₄O₃Cl

Calc. % : C : 63,64 H : 5,56 N : 12,37

Tr. % : 63,46 5,62 12,19

UV (H₂O pH 5,5 ; 5 % EtOH) λ_{max} (ε) : 442,5 (8210) ; 420 (8740) ; 342,5 (4390) nm.

SM (impact électronique) M = 452,95 ; m/e : 453 (8,2 ; M⁺), 417 (23,2 ;

M⁺-C1), 327 (11,3 ; M⁺-ThyH), 313 (5,6 ; Acr(CH₂)₄⁺), 285 (20,9 ; Acr(CH₂)₂⁺), 271 (51,2 ; Acr(CH₂)⁺), 257 (10,7 ; Acr⁺), 243 (11,1 ; M⁺-(Thy(CH₂)₅N), 126 (5,3 ; ThyH⁺).

N- ((thymynyl-1)-6 hexyl)-1 phtalimide : Thy-C₆-pht ; 15

On utilise le même protocole que pour le dérivé Thy-C₅pht ; 12 (p.126).
Le produit est purifié par cristallisations successives dans l'isopropanol et traitement au noir animal. Le rendement en produit cristallisé est de 57 %.

F = 165-167°C.

IR (Nujol) : 3160, 1767, 1712, 1660, 1392, 1345, 1217, 1042, 967, 925, 895, 845, 760 cm⁻¹.

RMN (60 MHz ; DMSO d₆) δ ppm = 7,83 (4H, s, pht-H) ; 7,53 (1H, s large, ThyC₆H) ; 3,56 (4H, m, ThyNCH₂- et pht-CH₂-) ; 1,75 (3H, s, ThyCH₃) ; 1,4 (8H, m, (CH₂)₄).

Analyse : C₁₉H₂₁N₃O₄

Calc. % : C : 64,21 H : 5,96 N : 11,82

Tr. % : 64,10 6,12 11,91

UV (éthanol absolu) : λ_{max} (ε) : 273 (11000) ; 241 (14800) ; 234 (19600) ; 221 (49200) nm.

SM (impact électronique) M = 355,39 ; m/e : 355 (34,4 ; M⁺), 230 (7,1 ; pht(CH₂)₆⁺), 216 (2,3 ; pht(CH₂)₅⁺), 195 (27,1 ; Thy(CH₂)₅⁺), 181 (14,5 ; Thy(CH₂)₄⁺), 160 (100 ; phtCH₂⁺).

Chlorhydrate de N₁ (amino-6 hexyl)-1 thymine : Thy-C₆-NH₂· HCl ; 16

On utilise le même protocole que pour le dérivé Thy-C₅-NH₂, HCl ; 13 (p.127). Le rendement en produit cristallisé est de 74 %.

F = 253°C.

IR (Nujol) : 3115, 1767, 1257, 1212, 1100, 950, 910, 800, 730cm⁻¹.

RMN (60 MHz ; TFA d) δ ppm = 7,46 (1H, s large, ThyC₆H) ; 3,93 (2H, t, ThyNCH₂) ; 3,38 (2H, t, NH₃⁺-CH₂-) ; 2,06 (3H, s, ThyCH₃) ; 1,62 (8H, m, (CH₂)₄).

Analyse : C₁₁H₁₉N₃O₂Cl

Calc. % : C : 50,48 H : 7,72 N : 16,05 Cl : 13,54

Tr. % : 50,39 7,78 15,68 13,49

SM (impact électronique) M = 260,74 ; m/e : 225 (23 ; M⁺-HCl).

N-((thyminy-1)-6 hexyl)-1 amino-9 chloro-6 méthoxy-2 acridine :

Thy-C₆-Acr ; 17

On utilise le même protocole que pour le dérivé Thy-C₅-Acr ; 14 (p.128).
Le rendement brut est de 83 %. La purification s'opère de la même manière.

F = 209-211°C.

IR (Nujol) : 3370, 1675, 1637, 1605, 1560, 1520, 1500, 1335, 1255, 1235, 1122, 1075, 1040, 940, 920, 822, 800, 760, 725cm⁻¹.

RMN (270MHz ; DMSO d₆) δ ppm = 11,10 (1H, s, ThyN₃H) ; 8,25 (1H, d, AcrC₈H) ; 7,76 (2H, m, AcrC₄H, C₅H) ; 7,56 (1H, s, ThyC₆H) ; 7,40 (1H, s, AcrC₁H) ; 7,34 (1H, d, AcrC₃H) ; 7,24 (1H, d, AcrC₇H) ; 6,96 (1H, s large, AcrNH) ; 3,84 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,67 (2H, m, ThyNCH₂-) ; 3,49 (2H, m, AcrNHCH₂-) ; 1,67 (5H, m, ThyCH₃ et CH₂) ; 1,46 (2H, m, CH₂) ; 1,24 (4H, m, (CH₂)₂).

Analyse : C₂₅H₂₇N₄O₃Cl

Calc. % : C : 64,30 H : 5,83 N : 12,00

Tr. % : 64,42 5,78 12,02

UV (H₂O pH 5,5 ; 5 % EtOH) λ_{\max} (ϵ) : 445 (8250) ; 422,5 (8770) ; 340 (4020).

SM (impact électronique) $M = 466,97$; $m/e : 466 (0,2 ; M^+), 431 (0,2 ; M^+-Cl), 327 (0,1 ; M^+-ThyH) ; 285 (0,1 ; Acr(CH_2)_2^+), 271 (0,6 ; Acr(CH_2)^+).$

N- ((adényl-1)-5 pentyl)-1 phtalimide : Ade-C₅-pht ; 18

Une suspension d'adénine (3,00 g ; 22 mmol), de carbonate de potasse anhydre (6,00 g ; 43 mmol) et de pht-C₅-Br ; 10 (9,20 g ; 31 mmol), dans la DMF (60 cm³) est vigoureusement agitée sous atmosphère d'azote, à température ambiante. Après 48 h, le mélange est filtré et le solide résiduel lavé trois fois avec 10 cm³ de DMF. Les fractions organiques sont réunies et évaporées à sec sous pression réduite. Le résidu huileux jaune pâle est trituré dans de l'éther éthylique pour éliminer la DMF résiduelle. On obtient alors un solide jaune pâle. Le rendement brut est de 41 % (3,12 g). On purifie le produit par cristallisations successives dans l'éthanol absolu après traitement avec du noir animal. Le rendement est de 37 % (2,81 g) en produit pur.

F = 203-205°C.

IR (Nujol) : 3250, 3100, 1770, 1722, 1667, 1600, 1415, 1395, 1357, 1240, 1210, 1050, 1035, 795, 712 cm⁻¹.

RMN (60 MHz ; TFAd) δ ppm = 9,39 et 8,79 (2H, 2s, AdeC₂H, C₈H) ; 7,89 (4H, s, pht-H) ; 4,84 (2H, m, AdeN₉CH₂-) ; 3,88 (2H, m, phtNCH₂-) ; 1,78 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₁₈H₁₈N₆O₂

Calc. % : C : 61,71 H : 5,18 N : 23,99

Tr. % : 61,76 5,22 23,95

UV (MeOH) : $\lambda_{max} (\epsilon) : 283 (2700) ; 263 (14200) ; 242 (15500) ; 234 (17900) ; 219 (56600) ; 216 (53000) \text{ nm}.$

SM (impact électronique) $M = 350,38$; $m/e : 350 (27,5 ; M^+), 204 (3,3 ; Ade-(CH_2)_6^+), 190 (100 ; Ade(CH_2)_5^+), 176 (18,8 ; Ade(CH_2)_4^+), 135 (29,6 ; AdeH^+).$

Bis chlorhydrate de N₁(amino-5 pentyl)-1 adénine : Ade-C₅-NH₂,
2HCl ; 19

On dissout un échantillon de Ade-C₅-pht ; 18 (7,0 g ; 20 mmol) dans un mélange d'acide acétique glacial, d'eau et d'acide chlorhydrique concentré (1/1/1 ; 70 cm³). On chauffe la solution pendant 10 h à 100°C sous atmosphère d'azote puis on refroidit et on concentre à mi-volume sous pression réduite : l'acide phtalique qui précipite est filtré. On évapore ensuite le filtrat à sec et on cristallise le solide blanc dans de l'alcool absolu. Le produit est recueilli sous forme de cristaux blancs avec un rendement de 87 % (4,45 g).

F = 240-258°C.

IR (Nujol) : 3250, 3100, 2640, 2030, 1692, 1630, 1600, 1520, 1415, 1220cm⁻¹.

RMN (60 MHz ; TFAc) δ ppm = 9,54 et 8,81 (2H, 2s, AdeC₂H, C₈H) ; 6,88 (2H, s large, AdeNH₂) ; 4,66 (2H, m, AdeN₉CH₂-) ; 3,24 (2H, m, NH₃⁺-CH₂-) ; 1,84 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₁₀H₁₈N₆Cl₂ (bis chlorhydrate)

Calc. % : C : 40,96 H : 6,19 N : 28,66 Cl : 24,18

Tr. % : 40,78 5,73 28,21 23,96

UV (H₂O) : λ_{max} (ε) : 261 (14300) ; 205 (21300) nm.

SM (impact électronique) M = 293,20 ; m/e : 220 (42,9 ; M⁺-2HCl), 204 (12,6 ; Ade(CH₂)₅⁺), 190 (43,2 ; Ade(CH₂)₄⁺), 176 (24,5 ; Ade(CH₂)₃⁺), 135 (80,1 ; AdeH⁺).

N-((adenyl-9)-5 pentyl)-1 amino-9 chloro-6 methoxy-2 acridine :

Ade-C₅-Acr ; 20

Une solution de Ade-C₅-NH₂, 2HCl ; 19 (2,0 g ; 7 mmol) et de Acr-O-Ph ; 2 (1,9 g ; 5,6 mmol) dans la DMF (25 cm³) est chauffée à 110°C pendant 10 h sous atmosphère d'azote puis refroidie et versée lentement avec agitation dans de l'ammoniaque (pH 13 ; 300 cm³). Le précipité jaune brun qui se forme est filtré et séché sous vide puis conservé en atmosphère sèche car très hygroscopique. Le rendement brut est de 68 % (1,79 g). C'est un mélange complexe de produits. La purification du produit désiré nécessite plusieurs séparations successives sur colonne de silice (élution : méthanol/éthanol avec 1 % d'ammoniaque). Le rendement après purification est très faible.

F = 164-168°C

IR (Nujol) : 3400, 3250, 3150, 1665, 1625, 1560, 1520, 1300, 1255, 1232, 1160, 1147, 1060, 1035, 920 cm⁻¹.

RMN (270 MHz ; DMSO d₆) δ ppm = 8,29 (1H, d, AcrC₈H) ; 8,06 (2H, s, AdeC₂H, C₈H) ; 7,78 à 7,29 (5H, m, AcrC₁H, C₃H, C₄H, C₅H, C₇H) ; 7,13 (2H, s, AdeNH₂) ; 4,06 (2H, t, AdeN₉CH₂-) ; 3,86 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,75 (2H, t, AcrNHCH₂-) ; 1,75 (4H, m, (CH₂)₂) ; 1,23 (2H, m, CH₂).

Analyse : C₂₄H₂₆N₇O₂Cl (monohydrate)

Calc. % : C : 60,05 H : 5,46 N : 20,43 Cl : 7,39

Tr. % : 60,52 5,93 20,03 7,48

UV (H₂O pH 5,5 ; 5 % EtOH) : λ_{max} (ε) : 445 (7650) ; 422,5 (8140) ; 342,5 (4230) nm.

SM (impact électronique) M = 461,96 ; m/e : 461 (15,7 ; M⁺), 426 (31,5 ; Acr(CH₂)₂⁺), 271 (47 ; Acr(CH₂)⁺), 244 (43 ; AcrH⁺), 135 (7,8 ; AdeH⁺).

N-((adenyl-1)-6 hexyl)-1 phtalimide : Ade-C₆-pht ; 21

On utilise le même protocole que pour le dérivé Ade-C₅-pht ; 18 (p.131). Le rendement en produit cristallisé est de 40 %.

$F = 171-173^{\circ}\text{C}$; Litt. (38) $F = 177-180^{\circ}\text{C}$.

IR (Nujol) : 3290, 1770, 1720, 1600, 1310, 1250, 1220, 1055, 1010, 800, 730 cm^{-1} .

RMN (80 MHz ; DMSO d_6) δ ppm = 8,06 et 8,03 (2H, 2 s, AdeC₂H, C₈H) ; 7,78 (4H, s, pht-H) ; 7,10 (2H, s large, AdeNH₂) ; 4,05 (2H, t, AdeN₉CH₂) ; 3,48 (2H, t, phtNCH₂-) ; 2,0 à 1,0 (8H, m, (CH₂)₄).

Analyse : C₁₉H₂₀N₆O₂

Calc. % : C : 62,62 H : 5,53 N : 23,06

Tr. % : 62,43 5,54 22,71

SM (impact électronique) M = 364,40 ; m/e : 364 (32,0 ; M⁺), 204 (100 ; Ade(CH₂)₅⁺), 190 (71,1 ; Ade(CH₂)₄⁺), 135 (33,5 ; AdeH⁺).

Bis-chlorhydrate de N₁ (amino-6 hexyl)-1 adenine : Ade-C₆NH₂, 2HCl ; 22

On utilise le même protocole que pour le dérivé Ade-C₅NH₂, 2HCl ; 19 (p.132). Le rendement en produit cristallisé est de 80 %.

$F = 224-226^{\circ}\text{C}$ (chlorhydrate) ; Litt. (38) : $F = 164-165^{\circ}\text{C}$ (base libre).

IR (Nujol) : 1710, 1640, 1600, 1510, 1230, 1070, 750, 720 cm^{-1} .

RMN (80 MHz ; DMSO d_6) δ ppm = 9,03 (3H, s large, CH₂-NH₃⁺) ; 8,50 et 8,44 (2H, 2s, AdeC₂H, C₈H) ; 7,95 (3H, s large, AdeNH₃⁺) ; 4,19 (2H, t, AdeN₉CH₂) ; 2,64 (2H, m), CH₂-NH₃⁺) ; 2,0-1,0 (8H, m, (CH₂)₄).

SM (impact électronique) M = 307,22 ; m/e : 234 (64,3 ; M⁺- 2HCl), 218 (28,8 ; Ade(CH₂)₆⁺), 190 (43,9 ; Ade(CH₂)₄⁺), 162 (79,6 ; Ade(CH₂)₂⁺), 148 (84 ; Ade(CH₂)⁺), 135 (23,7 ; AdeH⁺).

N- ((adényl-9)-6 hexyl)-1 amino-9 chloro-6 méthoxy-2 acridine :

Ade-C₆-Acr : 23

Un mélange de Ade-C₆-NH₂, 2HCl ; 19 (2 g ; 6,8 mmol) et de Acr-O-Ph; 2 (1,9 g ; 5,6 mmol) dans la DMF (25 ml) est chauffé sous agitation et atmosphère d'azote pendant 12 h à 110°C. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi et versé lentement dans de l'ammoniaque, sous agitation (300 cm³ ; pH 13). Il se forme un précipité jaune brun que l'on filtre et sèche. Le rendement en produit brut est de 85 % (2,3 g) mais les produits secondaires de réaction sont nombreux. La purification du produit désiré nécessite plusieurs séparations successives sur colonne de silice (élution : méthanol/éthanol/ammoniaque 1 %). Le rendement en produit pur est très faible.

F = 177-178°C.

IR (Nujol) : 3300, 3100, 1735, 1635, 1600, 1557, 1525, 1412, 1365, 1300, 1255, 1232, 1165, 1072, 1040, 922, 825, 795, 760, 720 cm⁻¹.

RMN (270 MHz ; DMSO d₆) δ ppm = 8,33 (1H, d, ACrC₈H), 8,00 (2H, s, AdeC₂H; C₈H) ; 7,23-7,74 (5H, m, AcrC₁H, C₃H, C₄H, C₅H, C₇H) ; 7,09 (2H, s, AdeNH₂) ; 6,79 (1H, m, AcrNH) ; 4,00 (2H, t, AdeN₉CH₂) ; 3,82 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,63 (2H, s large, AcrNHCH₂-) ; 1,64 (4H, m, (CH₂)₂) ; 1,23 (4H, m, (CH₂)₂).

Analyse : C₂₅H₂₈N₇O₂Cl (monohydrate)

Calc. % : C : 63,09 H : 5,51 N : 20,60 Cl : 7,45

Tr. % : 63,87 5,28 20,16 7,64

UV (H₂O pH 5.5 ; 5 % EtOH) λ_{max} (ε) : 445 (8340) ; 422,5 (8820) ; 342,5 (4080) nm.

SM (impact électronique) M = 475,99 ; m/e : 475 (18,1 ; M⁺), 440 (43,3 ; M⁺-Cl), 285 (40,9 ; Acr(CH₂)₂⁺), 271 (100 ; Acr(CH₂)⁺), 244 (47 ; AcrH⁺), 162 (11,4 ; Ade(CH₂)₂⁺), 148 (15 ; Ade(CH₂)⁺), 135 (12,8 ; AdeH⁺).

Amino-2 dihydroxy-4,6 pyrimidine : dihydroxypyrimidine ; 24

Sous azote et avec une forte agitation, on dissout du sodium (23 g ; 1000 mmol) dans de l'éthanol anhydre (600 cm³). On ajoute par petites quantités le chlorhydrate de guanidine (48,5 g ; 500 mmol) et on chauffe à reflux pendant 15 mn. On verse goutte à goutte du malonate de méthyle (58 cm³; 56 g ; 500 mmol) et on chauffe à reflux pendant 1 h. Il se forme un précipité blanc que l'on filtre et dissout dans 750 cm³ d'eau. On neutralise ensuite par de l'acide acétique jusqu'à pH=6 environ. Après filtration, lavage à l'eau, alcool, éther on obtient le produit désiré sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 92 % (62 g).

F > 300°C ; Litt. (36) : F > 300°C.

IR (Nujol) : 3340, 3150, 1700 cm⁻¹.

UV (eau ; pH = 7) : λ_{\max} (ϵ) : 260 (17800) nm.

SM (impact électronique) M = 127,10 ; m/e : 127 (100 ; M⁺), 99 (40,2 ; M⁺-CO) ; 86 (36,8 ; M⁺-C₂HO) ; 69 (30,2 ; M⁺-C₂H₄NO).

Amino-2 dichloro-4,6 pyrimidine : dichloropyrimidine ; 25

Sous azote et en refroidissant à l'aide d'un bain de glace, on ajoute lentement la dihydroxypyrimidine ; 24 (23 g ; 180 mmol) à un mélange de N,N-diméthylaniline (83 cm³) et d'oxychlorure de phosphore (POCl₃ ; 156 cm³). On chauffe 10 mn au reflux de POCl₃ puis on refroidit et on verse lentement sur de la glace pilée (900 g). On filtre, lave à l'eau et sèche le solide marron clair formé. Le rendement brut est de 55 % (16,2 g). Le produit est purifié par cristallisation dans le benzène avec traitement au noir animal. Il se présente alors sous la forme de petites plaquettes blanc nacré. Le rendement est de 43 % (12,7 g).

F = 220-224°C ; Litt. (36) : F = 210-214°C.

IR (Nujol) : 3180, 3110, 1665, 1560, 1520 cm⁻¹.

UV (eau ; pH=7) : λ_{\max} (ϵ) : 298 (5620) ; 235 (18000) nm.

SM (impact électronique) M=163,99 ; m/e : 165 (26,4 ; M⁺+1), 130 (35,5 ; M⁺-Cl).

Amino-2 chloro-6 pyrimidinone-4 : hydroxychloropyrimidine ; 26

On dissout la dichloropyrimidine ; 25 (10 g ; 60 mmol) dans une solution de soude (1N ; 120 cm³). Le mélange est chauffé à reflux pendant 4 h, puis refroidi et neutralisé jusqu'à pH=6 par de l'acide acétique. On filtre le précipité blanc formé et on le lave à l'eau, l'alcool et l'éther. Le rendement est de 89 % (7,9 g).

F = 250-252°C ; Litt. (45) : F = 252°C.

IR (Nujol) : 3270, 3130, 1690, 1670, 1610 cm⁻¹.

UV (eau ; pH=7) : λ_{\max} (ϵ) : 285 (9300) ; 230 (7600) nm.

SM (impact électronique) M = 145,55 ; m/e : 145 (100 ; M⁺), 117 (42,9 ; M⁺-CO), 110 (13,9 ; M⁺-Cl), 68 (90,1 ; M⁺-CNO₂).

Amino-2 nitro-5 chloro-6 pyrimidinone-4 : nitropyrimidine ; 27

A de l'acide sulfurique concentré (17,5 cm³) refroidi dans un bain de glace, on ajoute de l'acide nitrique fumant (17,5 cm³). On laisse agiter jusqu'à ce que la température de la solution soit inférieure à 5°C. On ajoute alors le dérivé hydroxychloropyrimidine ; 26 (3,25 g ; 25 mmol). L'addition se fait lentement en veillant à ce que la température du mélange réactionnel ne dépasse pas 10°C. La suspension jaune résultant est alors agitée sous atmosphère d'azote pendant 3 h à 10°C (maximum). A la fin de cette période, la dissolution est complète. On arrête la réaction en versant le mélange réactionnel sur de la glace pilée (130 g). Après une nuit à 4°C, on filtre le précipité jaune qui s'est formé et on le lave abondamment à l'eau. Après

séchage, on obtient le produit sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de 84 % (4,00 g). Il sera utilisé sans autre purification.

F = 278°C ; Litt. (36) : F = 275-276°C.

IR (Nujol) : 3595, 3510, 3240, 3200, 3125, 3050, 1695, 1675, 1615, 1532, 1490, 1405, 1317, 1235, 1040, 925, 850 cm^{-1} .

UV (H_2O) : λ_{max} (ϵ) : 205 (5800) ; 230 (13800) ; 335 (8500) nm.

SM (impact électronique) M = 190,54 ; m/e : 190 (100 ; M^+), 160 (43,3 ; $\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{O}$), 69 (36,2 ; $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}_3^+$).

Amino-2 nitro-5 (amino-5 pentyl)-1 amino-6 pyrimidinone-4 :

Pyr-C5-NH₂ : 28

Dans un mélange de DMF sèche (80 cm^3), de triéthylamine (25 cm^3) et de 1,5 diaminopentane (8,0 g ; 78 mmol), on ajoute la nitropyrimidine ; 27 finement broyée (2,0 g ; 10,6 mmol). On agite sous atmosphère d'azote pendant 18 h à température ambiante puis on évapore à sec sous pression réduite. Le résidu jaune huileux est alors dissout à chaud dans de l'eau (70 cm^3). La solution aqueuse est placée une nuit à 4°C. On filtre le précipité jaune formé qui, après séchage, fournit une poudre jaune. Le rendement brut est de 79 % (2,14 g). Le produit est purifié par cristallisation dans l'eau.

F = 218-225°C (Déc.).

IR (Nujol) : 3455, 3390, 3300, 1675, 1640, 1620, 1570, 1530, 1330, 1250, 950, 795, 780 cm^{-1} .

RMN (60 MHz ; TFA d) δ ppm = 3,73 (2H, m, PyrNCH_2-) ; 3,33 (2H, m, $\text{NH}_3^+\text{CH}_2-$) ; 1,76 (6H, m, $(\text{CH}_2)_3$).

Analyse : $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_3$

Calc. % : C : 40,75 H : 6,50 N : 31,68

Tr. % : 40,79 6,37 31,96

UV (H₂O ; Ph=7) : λ_{\max} (ϵ) : 210 (15300) ; 290 (3480) ; 335 (9200) nm.

SM (impact électronique) M = 256,27 ; m/e : 256 (1,2 ; M⁺), 240 (1,2 ; M⁺-NH₂).

Amino-2 nitro-5 (amino-6 hexyl-1) amino-6 pyrimidinone-4 :

Pyr-C₆-NH₂ : 29

On utilise le même protocole que pour le dérivé Pyr-C₅-NH₂; 28 (p.138). Le rendement brut est de 69 %.

F = 213-215°C.

IR (Nujol) : 3490, 3320, 3185, 1685, 1630, 1560, 1527, 1325, 1280, 1245, 795, 780 cm⁻¹.

RMN (60 MHz ; TFA d) δ ppm = 3,76 (2H, m, Pyr-NCH₂) ; 3,31 (2H, m, NH₃⁺CH₂-) ; 1,66 (8H, m, (CH₂)₄).

Analyse : C₁₀H₂₀N₆O₄ (monohydrate)

Calc. % : C : 41,66 H : 6,99 N : 29,15

Tr. % : 41,90 6,80 29,45

UV (H₂O ; pH=7) : λ_{\max} (ϵ) : 215 (21300) ; 290 (6750) ; 335 (11350) nm.

SM (ionisation chimique) ; ammoniac ; M = 270,29 ; m/e : 270 (4,4 ; M⁺).

Amino-2 nitro-5 (propyl-1) amino-6 pyrimidinone-4 : Pyr-C₃ : 30

Sous agitation et atmosphère d'azote, on ajoute par petites quantités la nitropyrimidine ; 27 (5 g ; 2,8 mmol) à de la N-propylamine (100

cm³) maintenue à 4°C lorsque l'addition est terminée, on laisse la température remonter jusqu'à température ambiante et on continue d'agiter pendant 18 h. On évapore à sec sous pression réduite. Le solide jaune pâle résiduel est lavé abondamment à l'eau puis séché. Le rendement brut est de 57 % (3,4 g). On peut améliorer ce rendement en acidifiant les phases aqueuses de lavage jusqu'à pH=5 avec de l'acide acétique. On récupère 0,6 g d'un échantillon de pureté analogue au précédent. Le rendement brut global est alors de 67 %.

F > 300°C ; Litt. (36) : F = 325°C.

IR (Nujol) : 3460, 3380, 3200, 1520, 1340 cm⁻¹.

RMN (90 MHz ; TFA d) : δ ppm = 3,78 (2H, m, Pyr-CH₂) ; 1,85 (2H, m, -CH₂-CH₃) ; 0,98 (3H, t, CH₃).

UV (éthanol) : λ_{\max} (ϵ) : 330 (14200) ; 280 (5320) ; 237 (16800) ; 215 (22800) nm.

SM (impact électronique) M = 213,2 ; m/e : 213 (69,5 ; M⁺), 198 (15,7 ; M⁺-CH₃), 184 (48,7 ; M⁺-CH₂CH₃), 171 (78,8 ; M⁺-CHCH₂CH₃).

Propyl-9 guanine : Gua-C₃ : 31

Dans de l'acide formique dégazé par barbotage d'azote sec (250 cm³), on dissout le dérivé Pyr-C₃ ; 30 (3 g ; 14,1 mmol) sous atmosphère d'azote. On ajoute du zinc en poudre (15 g ; 230 mmol) et on laisse agiter pendant 2 h à température ambiante. Après filtration sous atmosphère d'azote, on réduit le volume à 5 cm³ par évaporation sous pression réduite. Cette solution est alors placée dans une bombe en verre et chauffée à 170°C pendant 3 h. La solution d'acide formique une fois évaporée laisse un résidu huileux brun orangé. Celui-ci est traité par le bicarbonate de soude en solution saturée (10 cm³). Il se forme un précipité que l'on filtre et lave à l'eau, à l'éthanol, à l'éther. Le rendement en produit brut est de 56 % (1,52 g). La purification se fait par passage sur colonne de chromatographie liquide haute performance : Silice RP8 phase inverse ; élution par un mélange méthanol/eau (80/20). Après une cristallisation dans l'éthanol, on obtient le produit désiré sous forme d'aiguilles blanches.

$F > 300^{\circ}\text{C}$; Litt. (36) $F > 300^{\circ}\text{C}$.

IR (Nujol) : 3380, 3280, 3140, 1690, 1635, 1600, 1177, 715 cm^{-1} .

RMN (60 MHz ; DMSO d_6) δ ppm = 8,75 (1H, s, GuaCgH) ; 4,3 (2H, t, GuaNgCH₂) ; 1,9 (2H, q, CH₂-CH₃) ; 1,1 (3H, t, CH₂-CH₃).

Analyse : C₁₈H₁₁N₅O

Calc. % : C : 49,73 H : 5,74 N : 36,25

Tr. % : 49,40 5,69 36,36

UV (Ethanol) : λ_{max} (ϵ) : 253,3 (12400) ; 270 (9360) ; 266 (3200) ; 218 (8240) nm.

SM (impact électronique) M = 193,20 ; m/e : 193 (100 ; M⁺), 151 (40,5 ; GuaH⁺) ; 134 (14,5 ; C₅H₂N₄O⁺), 109 (44,5 ; C₄H₃N₃O⁺), 81 (4,6 ; C₃HN₂O⁺).

(Amino-5 pentyl)-1 -9 guanine : Gua-C₅-NH₂ ; 32

Dans de l'acide formique dégazé par barbotage d'azote sec (100 cm^3), on dissout le dérivé Pyr-C₅-NH₂ ; 28(1 g ; 3,9 mmol). Sous atmosphère d'azote, on ajoute du zinc en poudre (10 g ; 150 mmol) et on laisse agiter pendant 3 h à température ambiante. On filtre sous atmosphère d'azote et le filtrat est concentré jusqu'à 5 cm^3 par évaporation sous pression réduite puis transféré dans une bombe en verre que l'on chauffe à 170°C pendant 3 h. On obtient une solution jaune orangée que l'on évapore à sec sous pression réduite. Le résidu huileux formé est dissout dans un mélange de méthanol (10 cm^3) et d'acide chlorhydrique concentré (1 cm^3). On chauffe cette solution à reflux du méthanol pendant 3 h puis on l'évapore à sec. On obtient un solide brunâtre qui contient le produit sous forme de chlorhydrate ainsi que des traces d'acide chlorhydrique. On élimine ce dernier en mettant le brut réactionnel en suspension dans de la diéthylamine (30 cm^3). On agite pendant 30 mn puis on évapore à sec. Le solide est alors lavé au chloroforme. Le rendement brut est de 92 % (0,85 g). Le produit sera utilisé sous cette forme dans l'étape suivante. Sa pureté est estimée à 90 % par chromatographie liquide haute performance.

Des échantillons de plus grande pureté peuvent être obtenus par

chromatographie liquide haute performance silice RP8 phase inverse ; élution par un tampon acétate d'ammonium pH=4,6 à 10 % de méthanol). Le tampon est éliminé par lyophilisation.

F = 227-230°C.

IR (Nujol) : 3200, 1710, 1625, 1300, 1180, 1010, 915, 775 cm⁻¹.

RMN (80 MHz ; TFA d) δ ppm = 8,46 (1H, s, GuaC₈H) ; 3,96 (2H, m, GuaN₉CH₂) ; 2,84 (2H, m, CH₂-NH₃⁺) ; 2,0-1,0 (6H, m, (CH₂)₃).

UV (H₂O pH=5,5) : λ_{\max} (ϵ) : 270 (7460) ; 253,3 (9830) ; 25 (2950) ; 212 (10800) nm.

SM (impact électronique) M = 236,27 ; m/e : 236 (30,6 ; M⁺), 206 (90,3 ; M⁺-CH₂NH₂), 151 (100 ; GuaH⁺), 109 (59,6 ; C₄H₃N₃⁰⁺).

(Amino-6 hexyl-1)-9 guanine : Gua-C₆-NH₂ ; 33

On utilise le même protocole que pour le dérivé Gua-C₅-NH₂ ; 32 (p. 141). Le rendement brut est de 80 %.

F = 198-201°C.

IR (Nujol) : 3230, 1690, 1625, 1565, 1340, 1280, 950, 780, 730, 715cm⁻¹.

RMN (80 MHz ; TFA d) δ ppm = 8,48 (1H, s, GuaC₈H) ; 3,97 (2H, m, GuaN₉CH₂) ; 2,84 (2H, m, CH₂-NH₃⁺) ; 2,0-1,0 (8H, m, (CH₂)₄).

UV (H₂O pH=5,5) λ_{\max} (ϵ) : 270 (6400) ; 253,3 (8240) ; 225 (2380) ; 212 (8650) nm.

SM (impact électronique) M = 250,33 ; m/e : 250 (32,6 ; M⁺), 234 (8,8 ; M⁺-NH₂), 220 (41,2 ; M⁺-CH₂-NH₂), 206 (45,5 ; M⁺-CH₂CH₂NH₂), 178 (86,4 ; GuaCH₂⁺) ; 165 (100 ; GuaH⁺).

N-((guaninyl-9)-5 pentyl)-1 amino-9 chloro-6 methoxy-2 acridine :

Gua-C₅-Acr : 34

Sous atmosphère d'azote, on ajoute le dérivé Gua-C₅-NH₂ ; 32 (0,75g; 3,3 mmol) à de la DMF sèche (40 cm³). On chauffe à 80°C et laisse agiter pendant 30 mn pour solubiliser. On ajoute ensuite le dérivé Acr-O-Ph ; 2 (0,88 g ; 3,3 mmol). Après 14 h, on laisse refroidir à température ambiante et on filtre le précipité qui s'est formé. Après lavage avec de l'éther éthylique, on obtient 0,4 g de poudre jaune qui s'avère être un mélange complexe de produits où on retrouve les produits de départ ainsi que des produits de dégradation. Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu brun huileux, trituré avec de l'éther éthylique, fournit 0,65 g d'un solide brun orangé de composition analogue à la fraction précédente. Le rendement brut global est de 66 % (1,05 g). Le produit désiré est obtenu par purifications successives sur colonne de chromatographie liquide (Silicagel 60; acétate d'éthyle, éthanol absolu) suivies d'une cristallisation dans un mélange d'éthanol absolu/acétate d'éthyle (80/20). Le rendement en produit pur est très faible.

F = 258-258,5°C.

IR (KBr) : 3470, 3200, 1715, 1680, 1630, 1565, 1460, 1225, 1180, 1020, 920, 835, 760 cm⁻¹.

RMN (270 MHz ; DMSO d₆) δ ppm = 8,23 (1H, d, AcrC₈H) ; 7,75 (1H, s, AcrC₅H) ; 7,73 (1H, d, AcrC₄H) ; 7,50 (2H, s, AcrC₁H et GuaC₈H) ; 7,31 (1H, d, AcrC₃H) ; 7,22 (1H, d, AcrC₇H) ; 6,77 (1H, s large, AcrNHCH₂-) ; 6,59 (2H, s, GuaNH₂) ; 3,83 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,79 (2H, m, GuaN₉CH₂) ; 3,61 (2H, m, AcrNHCH₂) ; 1,60 (4H, m, (CH₂)₂) ; 1,21 (4H, m, (CH₂)₂).

Analyse : C₂₄H₂₄N₇O₂Cl

Calc. % : C : 60,31 H : 5,06 N : 20,51

Tr. % : 59,69 5,01 19,88

UV (H₂O pH=5,5 ; 5 % EtOH) λ_{max} (ε) : 445 (7750) ; 422,5 (8120) ; 342,5 (4070) nm.

SM (impact électronique) M = 477,96 ; m/e : 477 (0,5 ; M⁺), 442 (1,3 ; M⁺-Cl), 285 (2,3 ; Acr(CH₂)₂⁺), 271 (5,7 ; Acr(CH₂)⁺), 243 (100 ; Acr⁺),

165 (13,5 ; Gua(CH₂)⁺).

(FAB ; Glycerol) M = 477,96 ; m/e = 478 (40 ; (M+H)⁺).

N-((guaninyl-9)-6 hexyl)-1 amino-9 chloro-6 méthoxy-2 acridine :

Gua-C₆-Acr ; 35

Sous atmosphère d'azote, on ajoute le dérivé Gua-C₆-NH₂ ; 33 (1,63 g ; 6,5 mmol) à de la DMF sèche (120 cm³). On chauffe à 80°C sous agitation jusqu'à ce que le produit soit solubilisé. On refroidit alors à température ambiante et on ajoute du tamis moléculaire 4A (1 g) qu'on laisse agir sous agitation et atmosphère d'azote pendant 1 h de façon à éliminer l'eau apportée par la Gua-C₆-NH₂ très hygroscopique. On filtre et on chauffe à 80°C. A la solution brun orangé, on ajoute le dérivé Acr-O-Ph ; 2 (2,18 g ; 6,5 mmol). On laisse agiter pendant 5 h. Le mélange réactionnel est alors évaporé à sec sous pression réduite. Après trituration avec de l'éther éthylique du résidu huileux, on obtient un solide brun jaune qui s'avère être un mélange complexe de produits dans lequel on retrouve les produits de départ. Le rendement en produit brut est de 80 % (2,5 g). Le produit désiré est obtenu par purifications successives sur colonne de silice (élution : acétate d'éthyle, éthanol absolu) suivies d'une cristallisation dans un mélange d'éthanol absolu/acétate d'éthyle (80/20). Le rendement en produit pur est très faible.

F = 249-250°C.

IR (KBr) : 3490, 1675, 1635, 1595, 1470, 1350, 1240, 1175, 1080, 930, 840, 760 cm⁻¹.

RMN (270 MHz ; DMSO d₆) δ ppm = 8,23 (1H, d, AcrC₈H) ; 7,75 (1H, s, AcrC₅H) ; 7,73 (1H, d, AcrC₄H) ; 7,50 (2H, s, AcrC₁H et GuaC₈H) ; 7,31 (1H, d, AcrC₃H) ; 7,22 (1H, d, AcrC₇H) ; 6,77 (1H, s large, AcrNH) ; 6,59 (2H, s, GuaNH₂) ; 3,83 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,79 (2H, m, GuaN₉CH₂-) ; 3,61 (2H, m, AcrNHCH₂-) ; 1,60 (4H, m, (CH₂)₂) ; 1,21 (4H, m, (CH₂)₂).

Analyse : C₂₅H₂₆N₇O₂Cl

Calc. % : C : 61,03 H : 5,33 N : 19,93

Tr. % : 60,42 5,26 19,04

UV (H₂O pH=5,5 ; 5 % EtOH) λ_{\max} (ϵ) : 445 (7890) ; 422,5 (8290) ; 342,5 (3860)nm.

SM (impact électronique) M = 491,99 ; m/e : 491 (1,7 ; M⁺), 285 (2,6 ; Acr(CH₂)₂⁺), 271 (19,1 ; Acr(CH₂)⁺), 243 (79,7 ; Acr⁺), 165 (12,7 ; Gua(CH₂)⁺).

(FAB ; Glycérol) M = 491,99 ; m/e : 492 (25 ; (M+H)⁺).

C. ETUDES PHYSICOCHIMIQUES

I. ETUDE PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV :

Les solvants utilisés lors de cette étude sont de l'éthanol RP pour analyse PROLABO, de l'eau bidistillée à l'aide d'un appareillage en quartz.

Les tampons sont préparés avec de l'acétate de sodium anhydre RPE-ACS CARLO ERBA et de l'acide acétique glacial pour analyse MERCK.

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

Les échantillons, de 2 à 25 mg, pesés avec une précision de $\pm 0,001$ mg sont dissous dans 10 à 50 cm³ d'éthanol de façon à obtenir des solutions mères de concentration $2 \cdot 10^{-4}$ mole.l⁻¹ environ.

les dosages acido-basiques ont été réalisés sur 25 cm³ de ces solutions à l'aide d'acide chlorhydrique 0,01M.

Les solutions mères dans l'éthanol ont été diluées 20 fois dans un tampon acide acétique-acétate de sodium 0,05M à pH=5,5. La densité optique maximale de ces solutions à 5 % d'éthanol est de 0,8 à 0,3.

La loi de BEER-LAMBERT a été vérifiée pour chaque produit dans le solvant utilisé sur une gamme de concentration comprise entre $2 \cdot 10^{-5}$ M et $2 \cdot 10^{-4}$ M.

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

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

fonction de la température ont été effectuées dans une cellule thermostatée par un appareil BECKMANN CTC 250, munie d'une résistance chauffante et d'une circulation froide (eau-éthylène glycol) réglée par un cryostat LAUDA.

Les spectres ont été enregistrés de 2,5 en 2,5°C entre 2,5 et 25°C ; de 5 en 5°C entre 30 et 80°C.

Les valeurs de %H en fonction du pourcentage d'éthanol dans l'eau ou de la température sont toujours déterminés à partir des spectres des composés de référence placés dans les mêmes conditions expérimentales.

II. ETUDE PAR SPECTROSCOPIE DE RMN :

Les études par RMN ont été effectuées sur un spectromètre BRUKER WH 270 (en série adénine et thymine) et sur un spectromètre BRUKER WP 80 (en série guanine). Les échantillons sont dissous dans l'eau lourde (C.E.A. pureté isotopique 99,85 %) contenant 0,5 % (v/v) d'acide acétique deutérié (C.E.A. pureté isotopique 98,5 %). Le pH est ajusté à 5,6 (indication du pH mètre) à l'aide de soude deutériée 9 à 12 N (C.E.A. pureté isotopique 99,5 %). Les concentrations des solutions sont contrôlées par spectrophotométrie UV. Nous avons utilisé l'hexaméthylsiloxane comme référence interne.

A 270 MHz, l'attribution des déplacements chimiques a été effectuée par double irradiation à partir des données de la littérature (91). Pour les dérivés en série adénine, les protons H₂ et H₈ dans l'eau lourde (6h à 80°C).

A 80 MHz, les paramètres d'acquisition sont les suivants : Fenêtre spectrale : 200 OHZ ; longueur d'impulsion : 2,5 μs ; délai : 0,5 s ; irradiation du signal HOD à une intensité de 20 décibels /0,5 watts ; nombre d'accumulations : 1000 à 35 000.

L'extrapolation des déplacements chimiques à dilution infinie a été obtenue graphiquement. Nous avons reporté l'évolution des déplacements chimiques en fonction de la dilution pour quelques produits dans les tableaux suivants :

Acr-C₃; 7

Conc.	H ₁	H ₃	H ₄	H ₅	H ₇	H ₈			OCH ₃	CH _{2a}	CH _{2b}		CH ₃		
8 10 ⁻⁴ M	7.44	7.57	7.57	7.57	7.39	8.17			3.94	3.96	1.90		1.02		
5 10 ⁻⁴ M	7.50	7.59	7.59	7.64	7.43	8.22			3.98	3.99	1.94		1.04		
2.5 10 ⁻⁴ M	7.59	7.64	7.68	7.70	7.46	8.29			4.00	4.05	1.96		1.05		
1.2 10 ⁻⁴ M	7.64	7.65	7.73	7.77	7.49	8.34			4.01	4.09	1.98		1.05		
dil ∞	7.69	7.67	7.78	7.82	7.51	8.39			4.02	4.13	2.60		1.06		

Thy-C₆-Acr; 17

Conc.	H ₁	H ₃	H ₄	H ₅	H ₇	H ₈	H _T	CH _{3T}	OCH ₃	(CH ₂) _a	(CH ₂) _f	(CH ₂) _b	(CH ₂) _e	(CH ₂) _c	(CH ₂) _d
2. 10 ⁻³ M	7.35	7.55	7.55	7.55	7.37	8.10	7.35	1.72	3.92	3.95	3.65	1.88	1.60	1.47	1.28
10 ⁻³ M	7.44	7.60	7.60	7.60	7.41	8.17	7.34	1.70	3.93	4.00	3.64	1.90	1.58	1.47	1.27
5. 10 ⁻⁴ M	7.52	7.62	7.66	7.69	7.45	8.25	7.32	1.69	3.94	4.04	3.62	1.92	1.58	1.48	1.27
2.5 10 ⁻⁴ M	7.58	7.64	7.71	7.74	7.47	8.30	7.31	1.67	3.94	4.08	3.61	1.92	1.56	1.49	1.26
1.2 10 ⁻⁴ M	7.62	7.65	7.74	7.79	7.48	8.33	7.30	1.66	3.94	4.10	3.58	1.92	1.55	1.50	1.26
dil ∞	7.66	7.66	7.77	7.84	7.49	8.36	7.29	1.65	3.95	4.12	3.58	1.93	1.54	1.51	1.25

Ade-C₆-Acr ; 23

Conc.	H ₁	H ₃	H ₄	H ₅	H ₇	H ₈	H _{2A}	H _{8A}	OCH ₃	(CH ₂) _a	(CH ₂) _f	(CH ₂) _b	(CH ₂) _e	(CH ₂) _c	(CH ₂) _d
2. 10 ⁻³ M	7.27	7.57	7.57	7.59	7.33	8.04	7.93	8.02	3.88	4.10	3.91	1.87	1.82	1.49	1.27
10 ⁻³ M	7.32	7.59	7.65	7.67	7.37	8.10	7.89	8.00	3.90	4.11	3.95	1.89	1.82	1.51	1.28
5. 10 ⁻⁴ M	7.35	7.61	7.70	7.73	7.40	8.15	7.84	7.98	3.91	4.12	3.97	1.92	1.81	1.52	1.28
2.5 10 ⁻⁴ M	7.37	7.63	7.72	7.77	7.42	8.17	7.81	7.96	3.92	4.18	4.00	1.92	1.82	1.54	1.27
1.2 10 ⁻⁴ M	7.38	7.65	7.75	7.80	7.44	8.20	7.77	7.94	3.93	4.13	4.03	1.95	1.83	1.56	1.29
dil ∞	7.40	7.67	7.78	7.83	7.46	8.23	7.74	7.92	3.94	4.14	4.06	1.95	1.83	1.58	1.29

Gua-C₆-Acr ; 35

Conc.	H ₁	H ₃	H ₅	H ₇	H ₈	H _{8G}	OCH ₃
1,5 10 ⁻³ M	7,03	7,32	7,42	7,24	7,95	7,42	3,63
7,4 10 ⁻⁴ M	7,12	7,40	7,47	7,26	8,04	7,5	3,69
3,7 10 ⁻⁴ M	7,18	7,44	7,51	7,27	8,09	7,54	3,7
1,5 10 ⁻⁴ M	7,20	7,47	7,53	7,28	8,11	7,56	3,68
5,4 10 ⁻⁵ M	7,24	7,48	7,56	7,31	8,14	7,58	3,7
dil ∞	7,28	7,51	7,59	7,35	8,18	7,6	3,7

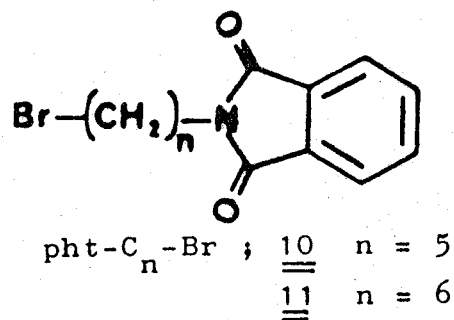
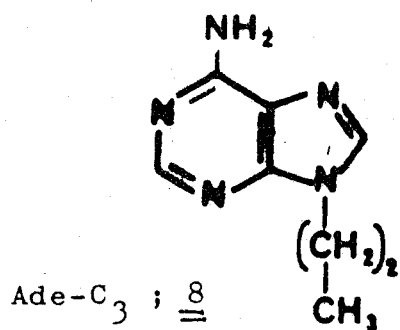
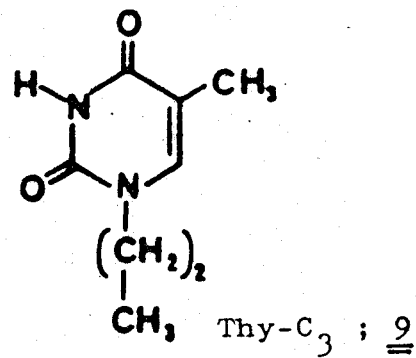
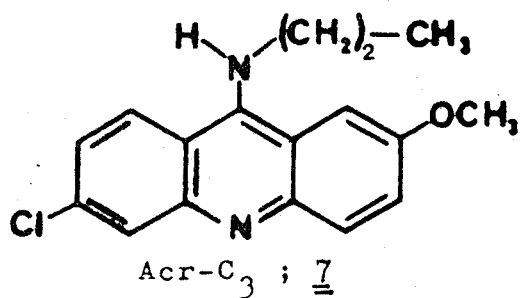
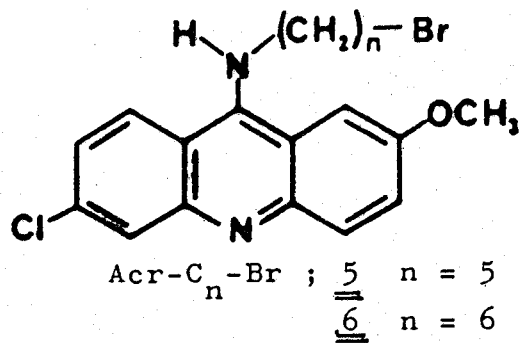
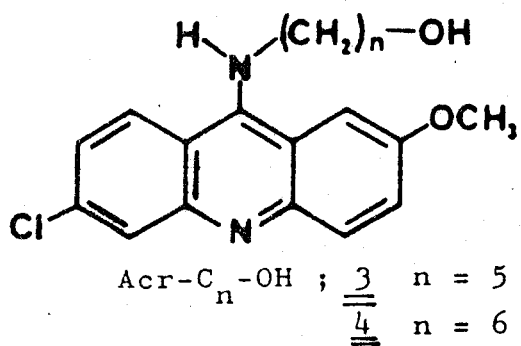
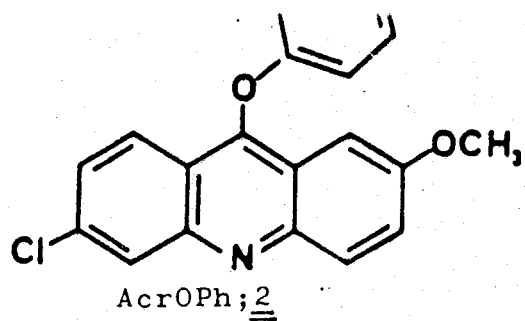
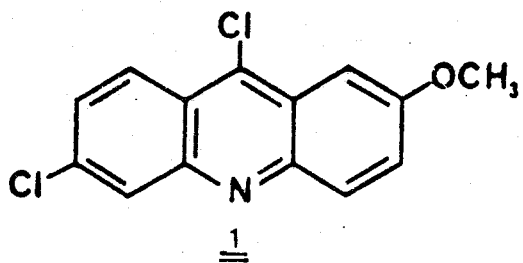


III. ETUDES PAR FLUORESCENCE :

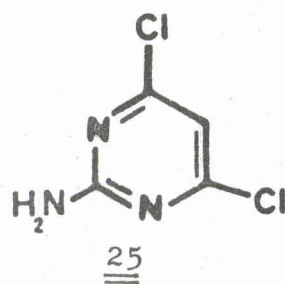
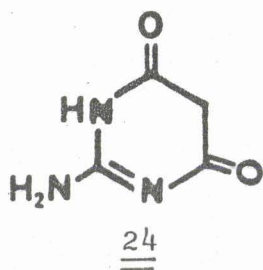
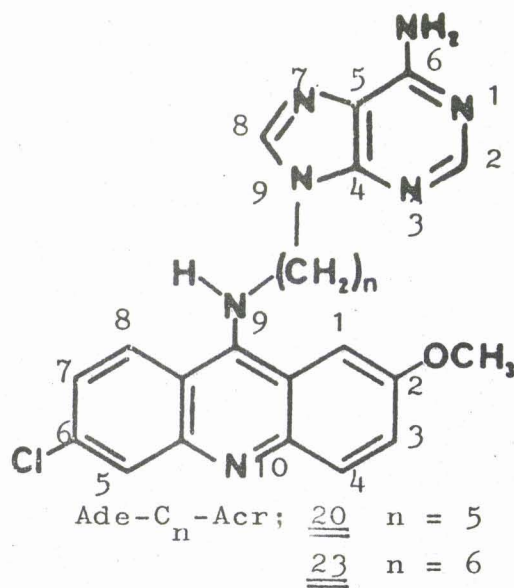
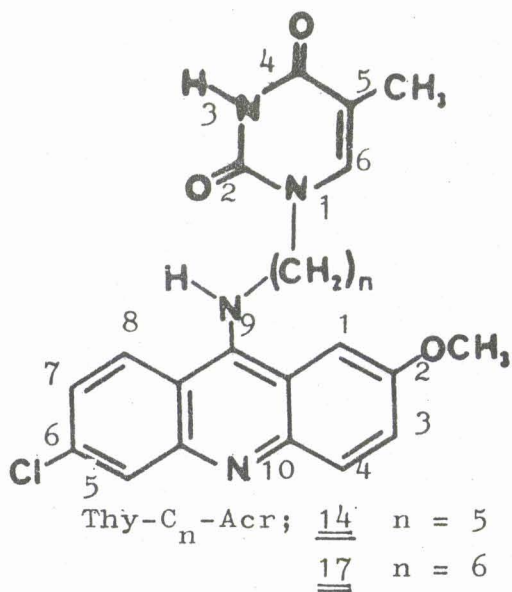
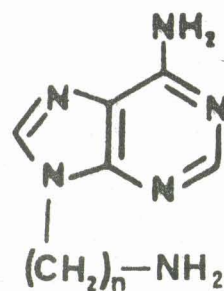
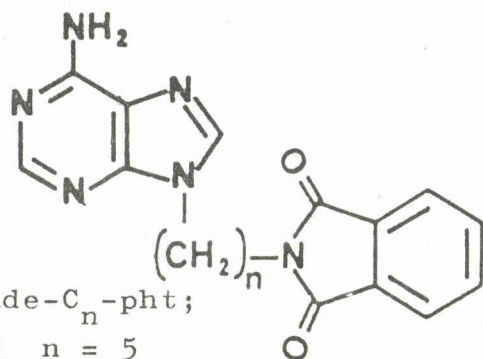
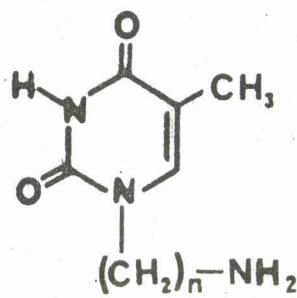
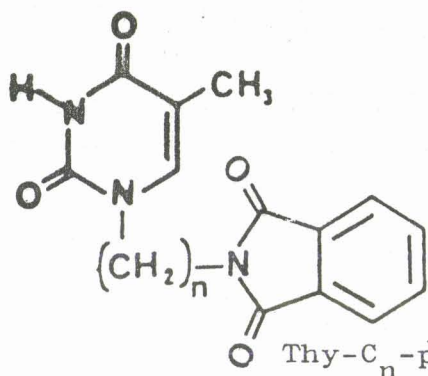
Les spectres de fluorescence ont été enregistrés avec un spectrofluorimètre différentiel absolu FICA 55 000 dans des cellules carrées de 1cm de côté. Les solutions des produits étudiés présentent une densité optique d'environ 0,04 à la longueur d'onde d'excitation (360 nm). Les largeurs de bande passante 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 1N comme standard de fluorescence (98). Une correction des indices de réfraction des solvants a été effectuée.

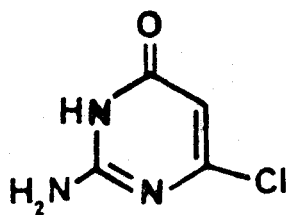
IV. ETUDES PRELIMINAIRES AVEC LES ENDONUCLEAIRES A ET B DE MICROCOCCUS LUTEUS :

Nous avons utilisé le protocole expérimental mis au point dans le laboratoire du Pr. J. LAVAL (29). L'ADN de phase T₅ dépuriné et marqué avec le tritium ($8 \cdot 10^{-6}$ mmol) est dissous dans un tampon Hepes-KOH pH 7,5 (0,1mmol;50mM) contenant du NaCl (25 mM), du MgCl₂ (10 mM) du thiothreitol (5mM) et de la sérum albumine bovine ($1 \cdot 10^{-5}$ g). On prépare ensuite les solutions mères des modèles Base-C_n-Acr (n = 5 et 6 ; Base = Ade ; Thy). dans le même tampon (solutions saturées). La concentration de ces solutions est déterminée par spectrophotométrie UV. Dans un premier temps, on laisse incuber l'ADN dépuriné en présence de quantités connues des composés Base-C_n-Acr pendant 20 min à 37°C, à l'abri de la lumière. On prélève un peu de ce mélange (0,1 ml) et on ajoute l'enzyme en solution (0,002 ml de solution d'enzyme A ; 0,005 ml de solution d'enzyme B). On laisse incuber à 37°C. Après des temps d'incubation de 2 min 30, 5 min et 8 min, on ajoute de l'ADN froid de thymus de veau (0,05 ml; $2,5 \cdot 10^{-5}$ g) pour stopper la réaction. Après 2 min, on place le mélange réactionnel à 0°C et on ajoute de l'acide perchlorique 0,8 N (0,2ml). On maintient à 0°C pendant 10 min puis on centrifuge pendant 15 min à 6000 g et à 4°C. La radioactivité du surnageant (0,3 ml) est déterminée par couplage en scintillation liquide (liquide scintillant Beckman ready solv. GP).

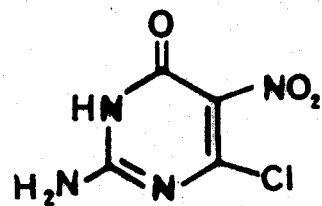


RHS
LILLE

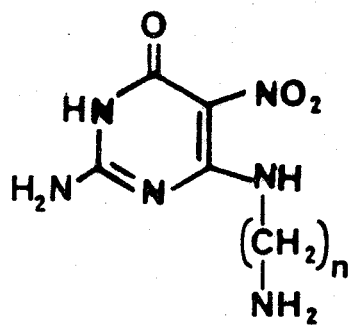




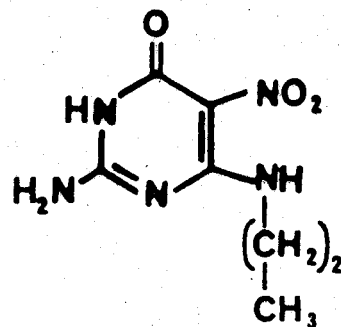
26



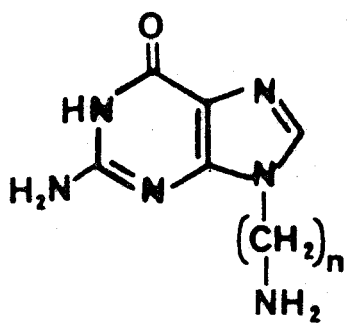
pyr ; 27



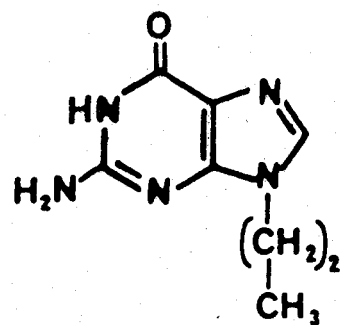
pyr-C_n-NH₂ ; 28 n = 5
29 n = 6



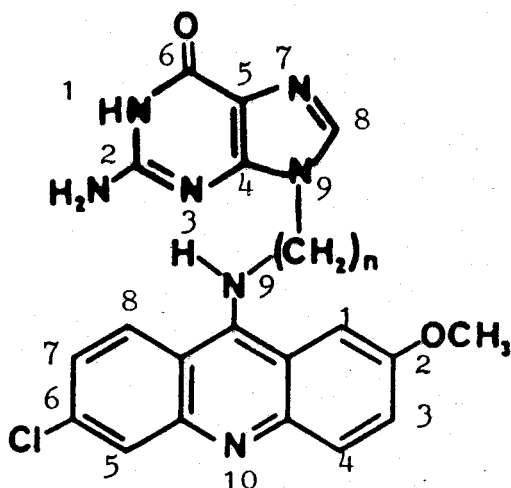
pyr-C₃ ; 30



Gua-C_n-NH₂ ; 32 n = 5
33 n = 6



Gua-C₃ ; 31



Gua-C_n-Acr ; 34 n = 5
35 n = 6

BUS
LILLE

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

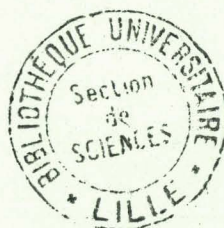
1. J.D. WATSON et F.H.C. CRICK, Cold. spr. Marb. Symp. Quant. Biol., 1953, 18, 123.
2. A.H.J. WANG, G.J. QUIGLEY, F.J. KOLPAK, J.L. CRAWFORD, J.H. VAN BOOM, G. VAN DER MAREL et A. RICH, Nature, 1979, 282, 680-686.
3. C.R. CANTOR et P.R. SCHIMMEL, "Biophysical Chemistry" I, W.H. FREEMAN and Compagny, San Francisco, 1980, chap. 3, 178.
4. M.S. BARKLEY et B.H. ZIMM, J. Chem. Phys., 1979, 70, 2991.
5. J.A. EARLY et D.R. KEARNS, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4165.
6. P.H. BOLTON et T.L. JAMES, Biochemistry, 1980, 19, 1388.
7. M. HOGAN et O. JARDETZKY, Biochemistry, 1980, 19, 2079-2085 et 3460-3468.
8. A.R. PEACOCKE et J.N.H. SKERRETT, Trans. Faraday. Soc., 1956, 52, 261.
9. L.S. LERMAN, J. Mol. Biol., 1961, 10, 367.
10. L.S. LERMAN, J. Mol. Biol., 1961, 3, 18.
11. J.B. LE PECQ, "Chimiothérapie anticancéreuse", Ed. Hermann, 1978.
12. P.S. SONG, K.J. TAPLEY, Jr, Photochem. Photobiol., 1979, 29, 1177.
13. P.E. THOMPSON, L.M. WERBEL, "Medicinal Chemistry", Vol 12 : Antimalarial agents, Ed. G. Destevens, Academic Press, N.Y. London, 1972.
14. J.W. CORCORAN et F.E. HAHN, "Antibiotics" III, Springer-Verlag, Berlin, Hidelberg, New-York, 1975.
15. a. C. PAOLETTI, J.B. LE PECQ, N. DAT-XUONG, P. JURET, H. GARNIER, J.L. AMIEL et J. ROUESSE, Recent results in Cancer research, 1980, 74, 107.
b. P. JURET, J.E. COUETTE, T. DELOZIER et J.Y. LETALAER, Bull. Cancer. (Paris), 1981, 68, 224.
16. M.M. SOBELL et S.C. STAIN, J. Mol. Biol., 1972, 68, 21-34.
17. M. HOGAN, N. DATAGUPTA et D.M. CROTHERS, Biochemistry, 2, 280-288.
18. P.R. YOUNG et N.R. KALLENBACH, J. Mol. Biol., 1981, 145, 785-813.
19. G.G. REINHARDT et T.G. KRUGH, Biochemistry, 1977, 13, 2890-2895.

20. a. T.D. SAKORE, S.C. JAIN, C.C. TSAI et H.M. SOBELL, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, 188-192.
b. T.D. SAKORE, B.S. REDDY et H.M. SOBELL, J. Mol. Biol., 1979, 135, 763-785.
21. N.C. SEEMAN, R.O. DAY et A. RICH, Nature, 1975, 253, 324-326.
22. a. J. BOLTE, C. DEMUYNCK et J. LHOMME, J. Am. Chem. Soc., 1976, 98, 613-615.
b. J. BOLTE, C. DEMUYNCK et J. LHOMME, J. Med. Chem., 1977, 20, 106-113 et 1607-1611.
c. J. BOLTE, C. DEMUYNCK et J. LHOMME, Bull. Soc. Chim. Fr., 1980, 316-320.
d. J. BOLTE, C. DEMUYNCK, J. LHOMME, M.C. FOURNIE-ZALUSKI et B.P. ROQUES, Biochemistry, 1979, 18, 4928-4935.
23. J. BOLTE, C. DEMUYNCK, M.F. LHOMME, J. LHOMME, J. BARBET et B.P. ROQUES, J. Am. Chem. Soc., 1982, 104, 760.
24. J. LAVAL, J. PIERRE et F. LAVAL, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, 2, 852-855.
25. J. LAVAL, Biochimie, 1978, 60, 1123-1134.
26. W.A. DEUTSCH et S. LINN, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, 1, 141-144.
27. Z. LIVNEH, D. ELAD et J. SPERLING, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 36, 1089-1093.
28. W.G. VERLY et E. RASSART, J. Biol. Chem., 1975, 20, 8214-8219.
29. J. PIERRE et J. LAVAL, Biochemistry, 1980, 19, 5018-5023.
30. J. PIERRE et J. LAVAL, Biochemistry, 1980, 19, 5024-5029.
31. E.J. GABBAY, K. SANFORD, C.S. BAXTER et L. KAPICAK, Biochemistry, 1973, 21, 4021-4029.
32. J.L. DIMICOLI et C. HELENE, Biochemistry, 1974, 4, 714-723 et 724-730.
33. a. J.J. TOULME, M. CHARLIER et C. HELENE, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, 8, 3185-3188.
b. J.J. TOULME et C. HELENE, J. Biol. Chem., 1977, 1, 244-249.
c. F. BRUN, J.J. TOULME et C. HELENE, Biochemistry, 1975, 3, 558-570.
34. F. TOULME, C. HELENE, R.P.P. FUCHS et M. DAUNE, Biochemistry, 1980, 19, 870-875.
35. T. BEMMOARRAS, J.J. TOULME et C. HELENE, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, 2, 626-930.
36. D.J. BROWN, J.E. ELSINGER et N.J. LEONARD, J. Am. Chem. Soc., 1968, 90, 7302.
37. M.F. DAEL, A.S. JONES et N. TAYLOR, Tet. Lett., 1969, 2285.

38. N.J. LEONARD et R.F. LAMBERT, *J. Org. Chem.*, 1969, 34, 3240-3248.
39. M.S. GIBSON et R.W. BRADSHAW, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1968, 12, 919.
40. D.A. WRITE, *Synthetic Communications*, 1977, vol.7, 8, 559.
41. C.E. BRUGG, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1968, 33, 436.
42. R. SHAPIRO, *prog. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol.*, 1968, 8, 73.
43. a. J.R. JENKINS, F.W. HOLLEY et E. WALTON, *J. Org. Chem.*, 1965, 30, 2581.
b. J. ELGERO, C. MARZIN, A.R. KATRITZKY et P. LINDA, "The tautomerism of Heterocycles", Academic Press, 1976, 253.
44. H.C. KOPPEL, D.E. O'BRIEN et R.F. ROBINS, *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, 81, 3046.
45. J. DAVOLL et D.D. EVANS, *J. Chem. Soc.*, 1960, 504.
46. W. TRAUBE, *Ber.*, 1893, 26, 2553.
47. H. REMBOLD et H.J. SCHRAMM, *Ber.*, 1963, 96, 2786.
48. D.J. BROWN, J.F. MASON, "The pyrimidines", Interscience, J. Wiley and Sons, New-York, Londres, 1962, 165.
49. A.K. KREY et F.E. HAHN, *Molecular Pharmacology*, 1974, 10, 686-695.
50. P.R. YOUNG et N.R. KALLENBACH, *J. Mol. Biol.*, 1981, 145, 785-813.
51. J. REUBEN, B.M. BAKER et N.R. KALLENBACH, *Biochemistry*, 1978, 14, 2915-2919.
52. C.R. CANTOR et P.R. SCHIMMEL, "Biophysical Chemistry" II, W.H. Freeman and Compagny, San Francisco, 1980, Chap. 7, 349-408.
53. I. TINOCO, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 4785 et *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 83, 5047.
54. W. RHODES, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 83, 3609.
55. M.M. WARSHAW et I. TINOCO, *J. Mol. Biol.*, 1966, 20, 29.
56. J.L. DECOUT et J. LHOMME, *Photochem. Photobiol.*, 1983, 2, 155-161.
57. K. GOLANKIEWICZ, *Heterocycles*, 1977, 7, 429-452.
58. H. DEVOE et I. TINOCO, Jr., *J. Mol. Biol.*, 1962, 4, 510.
59. P.O.P. TS'0, "Basic principles in nucleic acid chemistry", vol. II, Academic Press, 1974, 305.
60. N.J. LEONARD et K. ITO, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, 95, 4010.

61. W. BANGERTER et S. CHAN, J. Am. Chem. Soc., 1969, 91, 3910.
62. J.L. DIMICOLI et C. HELENE, J. Am. Chem. Soc., 1973, 95, 1036.
63. J. BARBET, Thèse d'Etat, Paris VI, 1976.
64. C. GIESSNER-PRETTRE et B. POLLMAN, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, 70, 578.
65. R. EL COUHEN, C. COUSEILLE, G. PRECIGOUX, J.F. CONSTANT et J. LHOMME, Acta. Cryst., 1983, C39, 246-248.
66. R.C. DAVIS et I. TINOCO, Biopolymers, 1968, 6, 223.
67. T. CASPERSSON, S. FARBER, G.F. FOLEY, J. DUDYNOWSKI, E.J. MODEST, E. SIMONSSON, U. WAGH et L. ZECH, Exp. Cell. Res., 1968, 49, 219-222.
68. T. CASPERSSON, J. LINDSTEN, G. LOMAKKA, A. MOLLER et L. ZECH, Int. Rev. Exp. Path., 1972, 11, 1-72.
69. P. GIORDANO, G. BOTTIROLI, G. PRENNA, S. DOGLIA et G. BALDINI, J. Microsc., 1978, 112, 95.
70. T. CASPERSSON, L. ZECH et C. JOHANSSON, Exp. Cell. Res., 1970, 60, 315-319.
71. J. LIMON, M. BABINSKA et A. LEDOCHOWSKI, Exp. Cell. Res., 1975, 92, 299-306.
72. S.A. LATT et S. BRODIE, "Excited states of biological molecules", Ed. J.B. Birks, J. Wiley and sons, New-York, 1976, 178-189.
73. J.R. ELLISON et H.J. BARR, Chromosoma, 1972, 36, 375-390.
74. B. WEISBLUM et P.L. DEHASET, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, 629.
75. U. PACHMANN et R. GIGLER, Exp. Cell. Res., 1972, 72, 602.
76. B. WEISBLUM, Nature, 1973, 246, 150.
77. M. NASTASI, R.W. YIP, V.L. SELIGY, A.G. SZABO et R.E. WILLIAMS, "Excited states of biological molecules", Ed. J.B. Birks, J. Wiley and sons, New-York, 1976, 233-242.
78. M. NASTASI, J.M. MORRIS, D.M. RAYNER, V.L. SELIGY, A.G. SZABO, D.F. WILLIAMS, R.E. WILLIAMS et R.W. YIP, J. Am. Chem. Soc., 1976, 98, 3979-3986.
79. Y. KUBOTA, Chem. Lett., 1977, 311-316.
80. Y. KUBOTA, H. NAKAMURA, M. MORISHITA et Y. FUJISAKI, Photochem. Photobiol., 1978, 27, 479-481.
81. Y. KUBOTA, Y. MOTODA, Chem. Lett., 1979, 1375-1378.

82. a. S. GEORGHIOU, Photochem. Photobiol., 1975, 22, 103-109.
b. M.G. BADEA, S. GEORGHIOU, Photochem. Photobiol., 1976, 24, 417-423.
83. G. BALDINI, S. DOGLIA, S. DOLCI et G. SASSI, Biophys. J., 1981, 36, 465-477.
84. G. BALDINI, S. DOGLIA, G. SASSI et G. LUCCHINI, Int. J. Biol., Macromol., 1981, 3, 248-252.
85. Y. KYOGOKU, R.C. LORD et A. RICH, Biochimica et Biophysica Acta, 1969, 179, 10-17.
86. S.P. PETERSEN et J.J. LED, J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 5308-5313.
87. a. M.A. YOUNG et T.R. KRUGH, Biochemistry, 1975, 14, 4841-4847.
b. P.N. BORER, L.S. KAN et P.O.P. TS'U, Biochemistry, 1975, 14, 4847-4863 et 4864-4869.
88. D.J. PATEL, S.A. KOZLOWSKI, L.A. MARLY, C. BROKA, J.A. RICE, K. IJAKURA et K.J. BRESLAUER, Biochemistry, 1982, 21, 428-436.
89. C.R. CANTOR et P.R. SCHIMMEL, "Biophysical chemistry" I, W.H. Freeman and Compagny, San Francisco, 1980, Chap. 4, 222.
90. J.B. LE PECQ, M. LE BRET, J. BARBET et B.P. ROQUES, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, 8, 2915-2919.
91. J. BARBET, B.P. ROQUES, S. COMBRISSEON et J. B. LE PECQ, Biochemistry, 1976, 15, 2642-2650.
92. R.G. Mc R. WRIGHT, L.P.G. WAKELIN, A. FIELDS, R.M. ACHESON et M. J. WARING, Biochemistry, 1980, 19, 5825-5836.
93. E.S. CANELLAKIS, R.M. FICO, A.H. SARRIS et Y. H. SHAW, Biochemical Pharmacology, 1976, 25, 231-236.
94. R.M. FICO et E.S. CANELLAKIS, Biochemical pharmacology, 1977, 26, 269-273 et 275-278.
95. E.S. CANELLAKIS, V. BONO, R.A. BELLANTONE, J.S. KRANKOW, R.M. FICO et R.A. SCHULZ, Biochimica et Biophysica Acta, 1976, 418, 300-314.
96. L.P.G. WAKELIN, M. ROMANOS, T.K. CHEN, D. GLAUBIGER, E.S. CANELLAKIS et M.J. WARING, Biochemistry, 1978, 23, 5057-5063.
97. a. H.D. KING, W.D. WILSON, E.J. GABBAY, Biochemistry, 1982, 21, 4982-4989.
b. G.J. ATWELL, W. LEUPIN, S.J. TWIGDEN et W.A. DENNY, J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, 2913-2914.
98. J.B. BIRKS, J. Res. N.B.S.A. Phys. Chem., 1976, 80, 389-399.

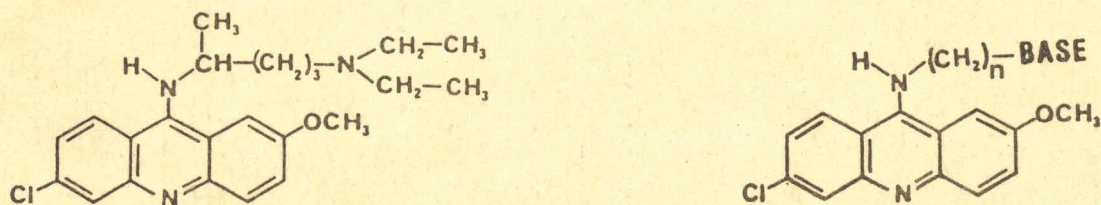


La quinacrine est un dérivé de la série amino-acridine qui a été longtemps utilisée comme substance anti-malarique.

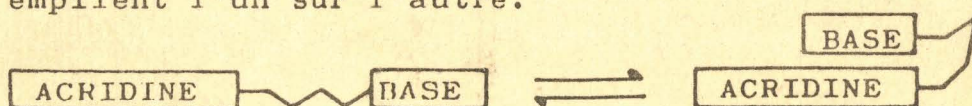
Son mode d'action est mal connu mais on sait depuis longtemps que sa structure aromatique plane lui permet de se complexer très fortement avec les acides nucléiques (en particulier l'ADN) "in vivo" et "in vitro".

Ce phénomène d'intercalation de la quinacrine a fait l'objet de nombreuses études.

Dans ce travail, nous avons étudié les interactions d'empilement (stacking) mises en jeu dans ce type de complexe. Pour cela, nous avons synthétisé une série de modèles dans lesquels les bases nucléotidiques et le noyau acridine sont reliés par une chaîne polyméthylénique souple.



En milieu aqueux, ces molécules peuvent adopter une conformation repliée dans laquelle les deux noyaux aromatiques plans s'empilent l'un sur l'autre.



Notre objectif est de mettre à profit ces interactions pour visualiser le complexe ternaire acridine-couple de bases complémentaires.

Cette méthodologie a également été développée pour accéder à des molécules capables d'interactions spécifiques avec des ADN modifiés comme les ADN apuriniques. Nous avons testé nos modèles sur les systèmes enzymatiques de réparation spécifiques de ces lésions.

MOTS-CLEFS : QUINACRINE, INTERCALATION MOLECULAIRE, INTERACTION VAN DER WAALS, HYPOCHROMISME, LIAISON HYDROGENE, ENZYME, REPARATION