

50376
1986
281

50376
1986
281

J

N° d'ordre 671

T H E S E

présentée à

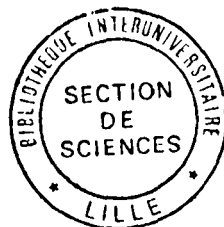
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR es SCIENCES PHYSIQUES

Par

Jean François CONSTANT



INTERACTIONS MOLECULAIRES ENTRE INTERCALANTS A NOYAU
ACRIDINE ET BASES NUCLEOTIDIQUES : SYNTHESE DE MODELES,
ETUDE SPECTROSCOPIQUE, INTERACTION AVEC L'ADN.

Soutenu le 9 Janvier 1986 devant la Commission d'Examen

Professeurs	J. REISSE	Président
	J.E. ANDERSON	Rapporteur
	J. CADET	Rapporteur
	J. LAVAL	Examineur
	J. LHOMME	Rapporteur
	H. SLIWA	Examineur
	P. VIGNY	Examineur

S O M M A I R E

INTRODUCTION :.....	1
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE.....	17
CHAPITRE 2 : ÉTUDE DES MODÈLES EN SÉRIE QUINACRINE : INTERACTIONS INTERCALANT-BASE.....	52
CHAPITRE 3 : ÉTUDE DES MODÈLES EN SÉRIE PROFLAVINE : INTERACTIONS INTERCALANT-COUPLE DE BASES.....	91
CHAPITRE 4 : INTERACTION DES MODÈLES AVEC L'ADN.....	123
CHAPITRE 5 : ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES MODÈLES EN SÉRIE QUINACRINE SUR L'ACTIVITÉ DES ENDONUCLEASES A ET B DE MICROCOCCUS LUTEUS.....	133
CONCLUSION :.....	139
PARTIE EXPERIMENTALE :.....	143
BIBLIOGRAPHIE :.....	197

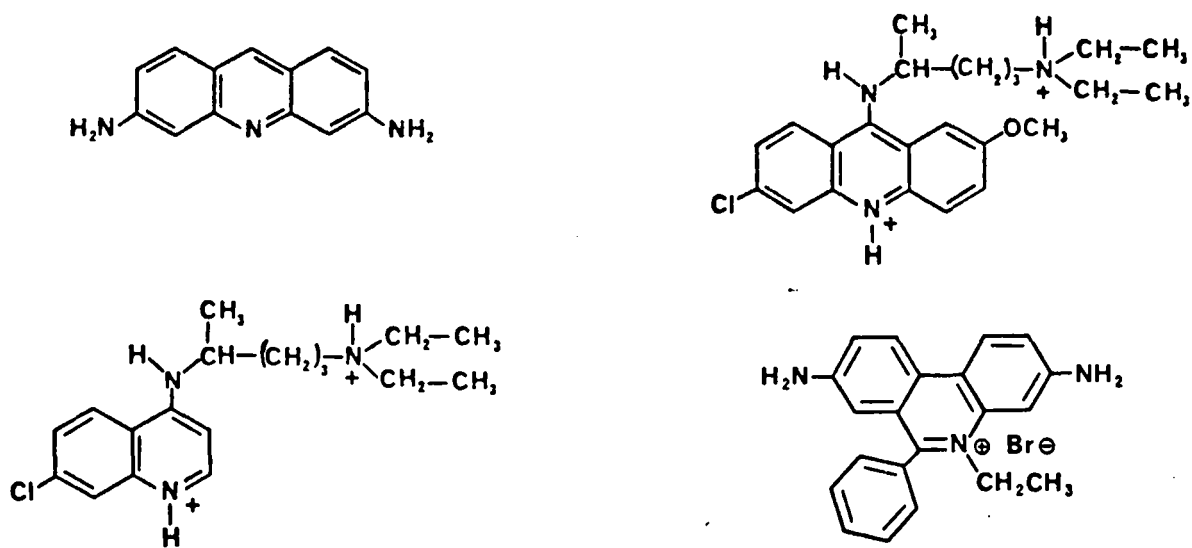
I N T R O D U C T I O N

De nombreuses molécules à activités biologiques sont connues pour interagir avec les acides nucléiques. Parmi celles-ci, on peut distinguer deux grands groupes :

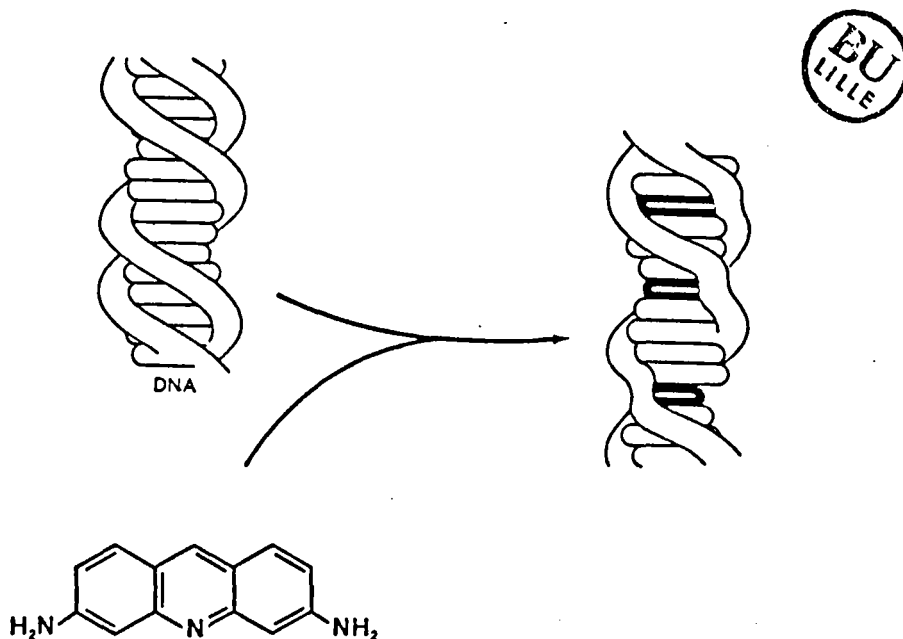
- d'une part, les molécules qui se complexent à l'extérieur de la macromolécule, comme la nétropsine et la distamycine (à activité antibiotique), par le jeu d'interactions ioniques, hydrophobes, liaisons hydrogène ("H")....
- d'autre part, les composés capables de s'insérer à l'intérieur de la macromolécule, entre les paires de bases, comme l'actinomycine, la daunomycine.... (utilisées en chimiothérapie anticancéreuse) et pour lesquelles le mode d'action par "intercalation" a été proposé - c'est à cette catégorie de substances que nous nous sommes intéressés.

I. HISTORIQUE :

La recherche de nouveaux agents antimicrobiens a montré que certains composés à structure aromatique, généralement hétérocyclique, possédaient une forte activité. Il s'agit par exemple de la quinacrine (dérivé de l'acridine) qui fut longtemps utilisée comme antimalarique (pendant la seconde guerre mondiale notamment) et de son homologue en série quinoléine : la chloroquine (encore utilisée de nos jours) (1). Des dérivés de la phénanthridine comme le bromure d'éthidium présentent des activités antitripanosomales (2). D'autres dérivés de l'acridine comme la proflavine ont été utilisés comme inhibiteurs de croissance chez les bactéries (elle est également mutagène) (3).



La découverte du code génétique (4) et l'établissement de la structure de l'ADN par J.D. WATSON et F.H. C. CRICK (5) ont conduit de nombreux auteurs à étudier les interactions de cette macromolécule avec des dérivés biologiquement actifs, à structure aromatique plane (6). A.R. PEACOCKE et J.N.H. SKERRET (7) ont montré que la proflavine se complexe fortement à l'ADN. L.S. LERMAN fut le premier à proposer l'intercalation comme mode principal de son interaction (8).



Dans ce schéma la molécule active vient s'insérer entre deux plateaux de paires de bases consécutifs. Nous avons représenté dans la Figure 1 le schéma d'intercalation proposé pour le bromure d'éthidium.

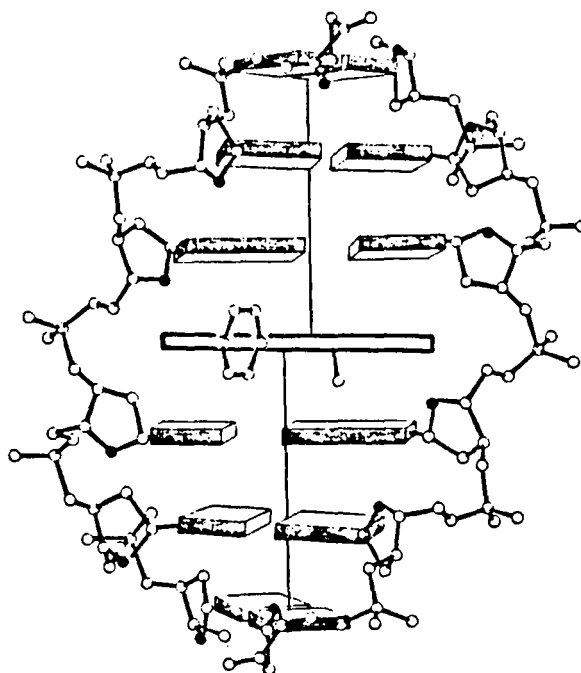


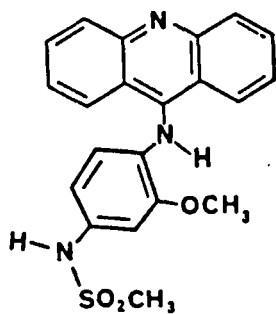
Figure 1 : Schéma d'intercalation du bromure d'éthidium

La connaissance de ce phénomène a permis le développement de nouvelles classes d'agents thérapeutiques dont la cible privilégiée est l'ADN (Figure 2).

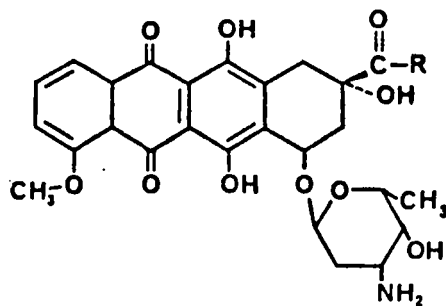
II. EXEMPLES DE STRUCTURES ET LEURS ACTIVITES :

Les intercalants peuvent agir de plusieurs façons au niveau de l'ADN :

- Dans certains cas, l'interaction se limite à la formation d'un complexe réversible avec l'ADN. La complexation met en jeu essentiellement des interactions d'empilement auxquelles s'ajoutent en général des contributions de type ionique ou liaisons "H" entre le squelette ribo-phosphate et un élément de structure du composé actif.
ex : La quinacrine, la daunomycine, le bromure d'éthidium (9).

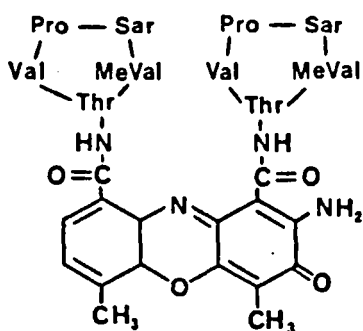


AMSA

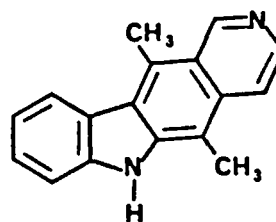


Daunomycine R = CH₂OH

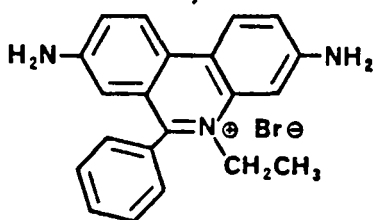
Adriamycine R = CH₃



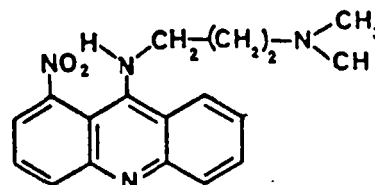
Actinomycine D



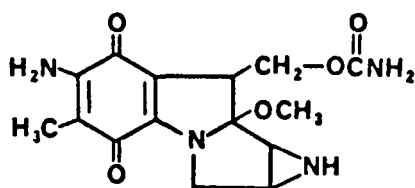
Ellipticine



Bromure d'éthidium



Ledacrine



Mitomycine

Figure 2 : Exemples d'agents intercalants possédant une activité thérapeutique.

- Dans d'autres cas, l'activation métabolique de la molécule, avant son intercalation, la transforme en une espèce réactive devenue capable de se fixer de manière covalente sur certains sites des bases nucléotidiques.

ex : La mitomycine, la daunomycine et les dérivés de l'ellipticine (10) utilisés en chimiothérapie anticancéreuse, mais aussi des cancérogènes comme l'acétylamino-fluorène (11) et le N-oxyde de nitro-4 quinoléine (12).

- Pour d'autres composés comme le psoralène (utilisé contre le psoriasis), on peut observer, après intercalation, et sous l'action du rayonnement UV, des réactions de photo-addition entre les doubles liaisons de la molécule intercalée et celles des bases nucléotidiques (principalement la thymine). On peut former ainsi des pontages intra-brin voire inter-brin dans la macromolécule (13).

Si le mécanisme physicochimique d'interaction de ces molécules avec l'ADN est relativement connu, on manque par contre d'informations sur les relations entre la nature du complexe formé et l'activité biologique. Pour qu'une molécule soit active deux phénomènes indépendants sont nécessaires :

- Complexer?
- 1°- La capacité de la molécule à se complexer avec l'ADN.
 - 2°- La reconnaissance du complexe formé par des fonctions cellulaires.

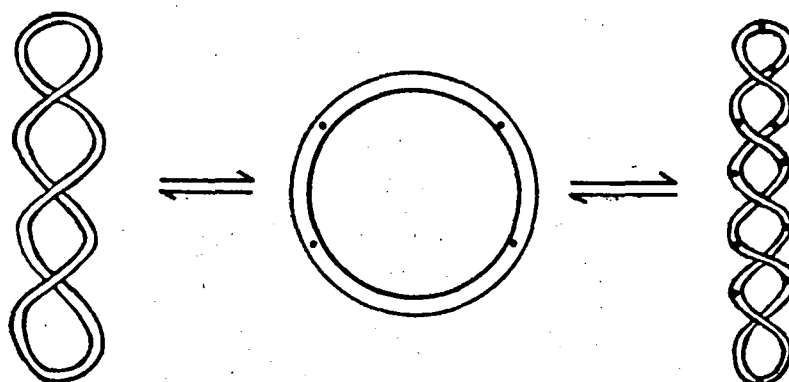
Le mécanisme d'action des intercalants est mal connu. Pour un petit nombre de structures, on a pu montrer que leur interaction avec l'ADN inhibe (ou ralentit) l'activité de l'ARN polymérase et par voie de conséquence empêche le déroulement normal de la synthèse protéique (14).

III. ETUDE DU PHENOMENE :

* Lorsqu'une molécule aromatique s'intercale dans l'ADN, elle induit des modifications structurales importantes. Les plateaux des paires de

bases nucléotidiques doivent s'écarter pour permettre l'insertion de l'intercalant ce qui conduit à une augmentation de la longueur de la macromolécule. Ceci se traduit par une modification de son coefficient de sédimentation et de sa viscosité en solution qui peuvent être mesurés (15).

* On observe également une détorsion de la structure hélicoïdale due au mouvement du squelette ribo-phosphate qui accompagne l'écartement des plateaux des bases. On peut évaluer quantitativement le phénomène en utilisant un ADN circulaire "super-enroulé" de structure bien établie : l'intercalation produit dans un premier temps une détorsion de la macromolécule qui conduit au relâchement puis à la torsion dans l'autre sens si la concentration en intercalant est augmentée (15).



Ces trois structures, en solution, présentent des propriétés de viscosité différentes qui permettent de suivre l'évolution du phénomène.

* L'intercalation stabilise la structure en double hélice de l'ADN et provoque ainsi une augmentation considérable de sa température de fusion (15).

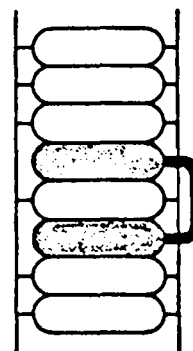
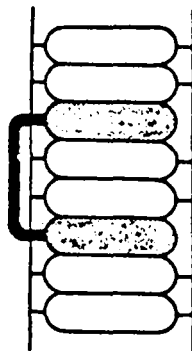
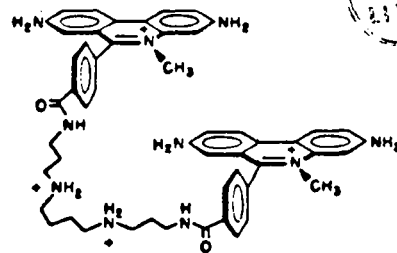
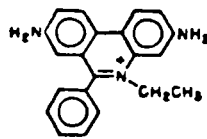
* Des méthodes spectroscopiques sont également utilisées. Ce sont par exemple la spectrophotométrie UV, la spectroscopie de fluorescence et la RMN¹H. (15).

* On peut obtenir des informations plus précises sur le plan structural en utilisant des oligo-nucléotides. Les complexes peuvent alors être étudiés par la RMN¹H, le dichroïsme circulaire, la diffraction des rayons X (15).

* L'intercalation peut être analysée de manière quantitative en déterminant la (ou les) constante(s) d'affinité(s) pour l'ADN. Ces calculs peuvent s'appuyer sur diverses techniques comme les spectroscopies UV et de fluorescence (15) ou les mesures par dialyse à l'équilibre (15)....

* L'affinité pour l'ADN présentée par les intercalants les plus puissants a été largement mise à profit par de nombreux auteurs :

- Pour tenter d'augmenter l'activité thérapeutique : des dimères d'intercalants ont été synthétisés (16) ; leur affinité pour l'ADN est considérablement augmentée. Les travaux les plus récents font état de trimères d'acridine (17,18) présentant des constantes d'affinité pour l'ADN du même ordre de grandeur que celles des protéines de régulation (18).



- Les intercalants peuvent également servir de vecteurs pour amener une structure particulière ou une activité spécifique au voisinage de sa cible : l'ADN. C'est le cas par exemple de modèles reproduisant les effets de la bléomycine (19) ou des composés porteurs de fonctions photoactivables capables de réagir avec l'ADN et des macromolécules voisines comme les protéines de la chromatine (20).

oligo - 1
- Une approche originale a également été utilisée pour étudier le phénomène de reconnaissance de séquences oligonucléotidiques complémentaires (21). Un intercalant comme l'acridine est fixé (par l'intermédiaire d'un chaîne polyméthylénique) sur la fonction 3'OH terminale d'une tétradésoxythymidine. Ceci conduit à renforcer considérablement les interactions avec la séquence complémentaire de type poly-rA.

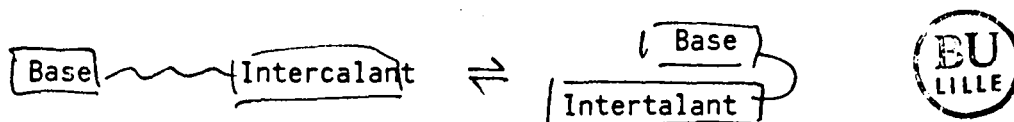
oligo -
Bien que l'intercalation soit un phénomène largement étudié et utilisé, nous ne disposons que d'informations globales quant à l'origine et la stabilité des complexes formés. Les études menées avec des macromolécules ou des oligonucléotides, ne permettent pas d'examiner spécifiquement les interactions d'empilement noyau-noyau mises en jeu. Leur étude est compliquée par la présence du squelette ribo-phosphate qui met en jeu des liaisons ioniques ou de type hydrogène avec la majorité des intercalants.

Les exigences de stabilité conformationnelle de l'ADN limitent les conditions des études : impossibilité de faire appel à des effets de température, de solvant, de pH pour préciser la force et la nature des interactions.....

/ De nombreuses questions restent posées concernant la contribution, le rôle des interactions d'empilement noyau-noyau dans l'intercalation / °

- //
- Quels sont les éléments de structure de l'intercalant qui favorisent l'interaction ?
 - Quelles est la nature et la force des interactions?
 - Existe-t-il une spécificité envers certaines bases nucléotidiques ?
 - L'orientation des chromophores influe-t-elle sur la complexation ?

Pour étudier spécifiquement les interactions Intercalant-Base nucléotidique, et tenter de répondre à ces questions, nous avons utilisé une approche basée sur la synthèse et l'étude de molécules modèles de type Base-(CH₂)_n-Intercalant. De telles molécules sont capables de se replier sous l'action d'interactions attractives intramoléculaires. La position de l'équilibre formes ouvertes \rightleftharpoons formes repliées constitue une mesure directe de l'interaction :



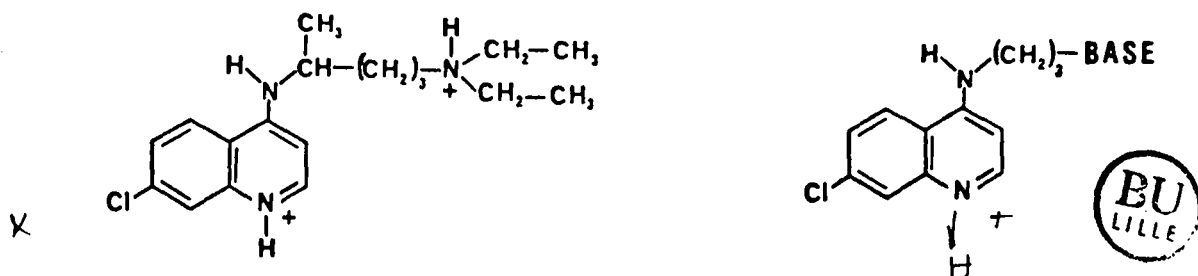
La forme repliée peut-être mise en évidence par diverses techniques spectroscopiques (UV, fluorescence, RMN¹H....).

Une telle approche "intramoléculaire" évite les écueils usuels de la démarche "intermoléculaire" où la formation d'agrégats entre molécules identiques ou différentes, limite considérablement l'interprétation des résultats.

Le choix de la chaîne reliant les deux molécules aromatiques est crucial : elle ne doit pas intervenir dans le processus d'interaction. Ceci exclut la présence d'hétéroatomes et conduit à retenir une chaîne hydrocarbonée. Sa longueur doit permettre l'empilement de deux noyaux aromatiques. La chaîne triméthylénique constitue le pont le plus court utilisable. Pour des raisons d'entropie, elle favorise mieux l'interaction que ne le font des chaînes plus longues. Par contre, elle restreint considérablement les géométries possibles du complexe.

Par ailleurs, le site de fixation de la chaîne doit être tel que les propriétés des molécules à étudier ne soient pas perturbées. En général, on choisit pour la base nucléotidique l'atome d'azote engagé dans la liaison N-glycosidique et pour l'intercalant, si possible, une position alkylée.

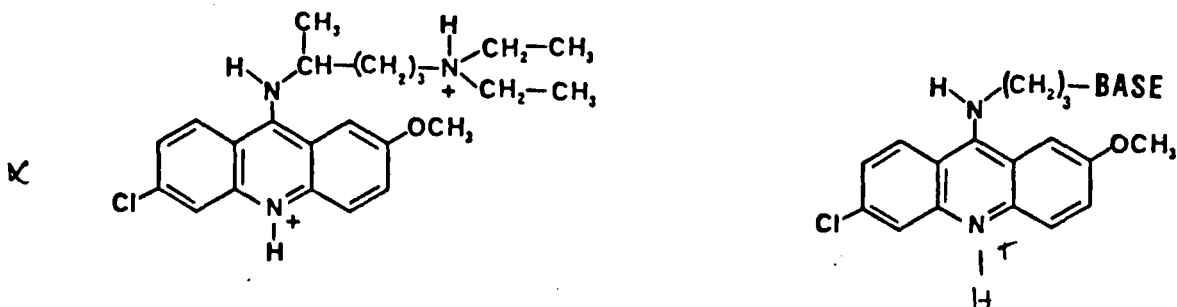
* Dans une première série d'études, J. BOLTE et C. DEMUYNCK (22) avaient utilisée cette approche pour étudier le noyau aminoquinoléine de la chloroquine.



- Les systèmes synthétisés adoptent une conformation totalement repliée à 20°C dans l'eau. Ces modèles s'ouvrent progressivement quand la température augmente.

- En milieu organique, seule la conformation ouverte est présente.

* 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 supplémentaire sur la nature et la puissance de l'interaction.



Les effets sont spectaculaires :

- Le système Ade-C₃-Acr est totalement replié dans l'eau même à 80°C.
- On observe jusqu'à 50 % de repliement dans l'éthanol pur.

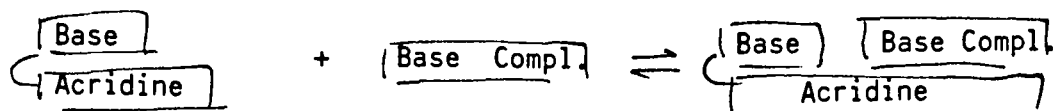
Dans ces systèmes, la chaîne de jonction est courte (n=3) et limite considérablement le nombre de géométries adoptées par la conformation repliée.

Il nous a donc semblé intéressant de poursuivre ces travaux en utilisant des chaînes plus longues (n=5,6) afin de donner plus de souplesse au système et reproduire ainsi les conformations du complexe d'intercalation.

Nous avons synthétisé une série de modèles dans lesquels la base est la thymine, l'adénine et la guanine (Chapitre 1).

L'étude des interactions intramoléculaires mises en jeu fait l'objet du Chapitre 2.

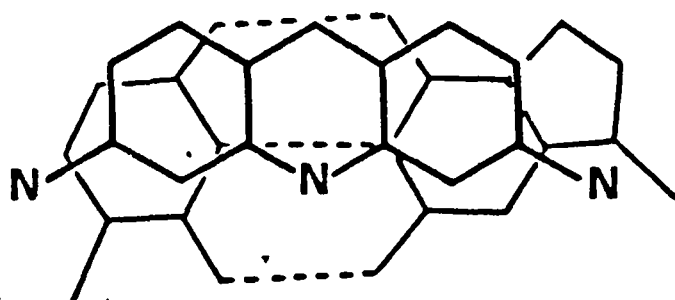
Une particularité de ces systèmes réside dans le fait que la surface du noyau acridine est comparable à celle occupée par un couple de bases complémentaires. Nous avons donc envisagé d'utiliser de tels systèmes pour étudier les interactions entre l'intercalant et un couple de bases complémentaires.



Si les modèles Base-C_n-Acr adoptent une conformation repliée dans l'eau, on conçoit que ces systèmes puissent se comporter comme des matrices susceptibles de complexer la base complémentaire. La mise en jeu d'interactions d'empilement dans cette complexation, en rapprochant les bases complémentaires, rend plus favorable la formation des liaisons de type hydrogène.

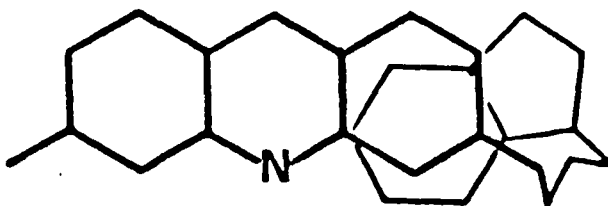
Des études préliminaires des modèles Base-C_n-Acr en présence de leur base complémentaire n'ont révélé aucune spécificité d'interaction par rapport à l'acridine utilisée comme témoin.

* Nous nous sommes donc tournés vers un intercalant jugé plus favorable : la proflavine. En effet, la géométrie du complexe d'intercalation a pu être établie à partir des données cristallographiques (24) et de la spectroscopie de RMN¹H (25).



Proflavine intercalée : géométrie proposée.

En examinant cette structure, on voit qu'une chaîne triméthylénique joignant l'azote "glycosidique" de la base nucléotidique à l'azote exocyclique de l'intercalant autorise une géométrie comparable à la précédente.



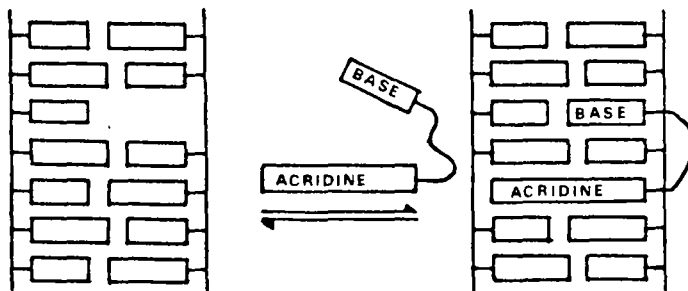
Modèle Ade-C₃-Pf : géométrie permise

Les modèles Ade-C₃-Pf et Thy-C₃-Pf ont été synthétisés et étudiés par J. FAHY dans notre laboratoire (26). Ils se comportent de manière comparable aux précédents et adoptent une conformation repliée à 25°C.

Nous avons complété ces résultats par la synthèse du modèle Cyt-C₃-Pf et par une étude fine par RMN¹H. Nous avons établi les géométries des complexes formés et étudié les interactions d'empilement proflavine-couple de bases (Chapitre 3).

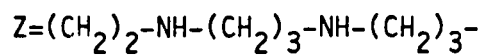
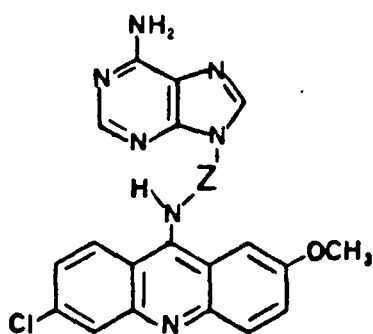
* Les différentes molécules modèles préparées sont de type hétérodimères Base-(CH₂)_n-Intercalant et peuvent être considérées comme une nouvelle classe d'intercalants. Il est donc intéressant d'étudier leur complexation avec l'ADN (Chapitre 4).

* On peut en outre supposer que de tels systèmes puissent présenter une affinité spécifique pour des ADN modifiés comportant des sites apuriniques. (ADN dont le squelette ribo-phosphate est intact, mais dont la liaison N-glycosidique avec des purines a été rompue sous l'influence d'agents extérieurs....).



✓ Ce phénomène peut être examiné en étudiant les effets de divers hétérodimères sur l'activité des systèmes enzymatiques (AP endonucléases) spécifiques d'ADN apuriniques (27). Des études ont été réalisées en série acridine avec certains modèles à longue chaîne (n=5 et 6). Il est clair que les dérivés synthétisés n'ont pas été optimisés pour interagir avec l'ADN (natif ou apurinique). Notamment, la présence d'une chaîne hydrocarbonée est peu favorable.

Pour améliorer les interactions avec l'ADN, nous avons remplacé la chaîne polyméthylénique par une jonction comportant plusieurs atomes d'azote. En série bis-intercalants, ce type de jonction est connu pour améliorer considérablement l'affinité pour l'ADN (28). Nous avons donc synthétisé et étudié l'hétérodimère Ade-Z-Acr (Chapitre 5).

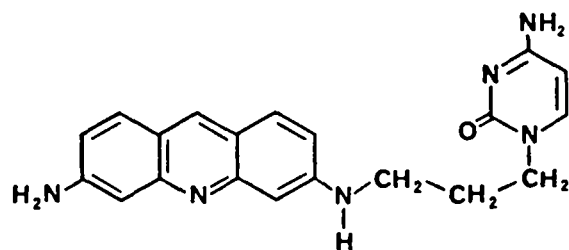
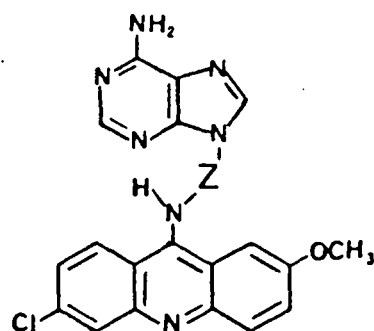
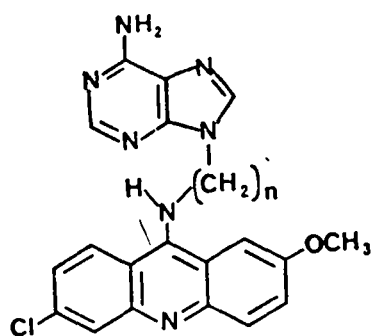
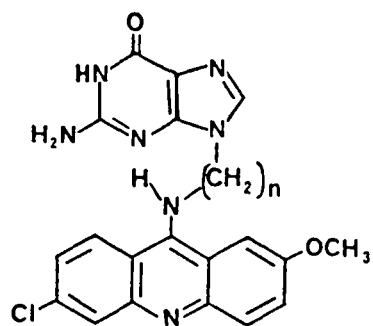
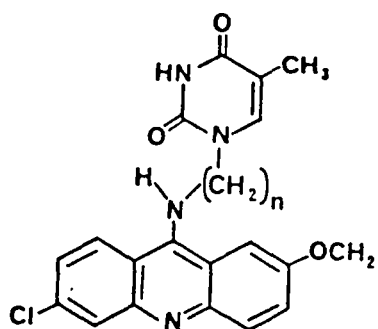


C H A P I T R E 1

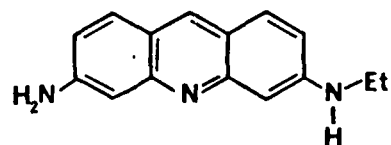
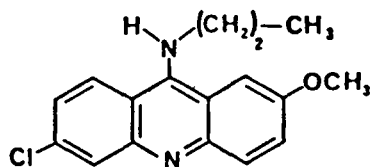
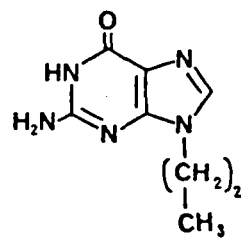
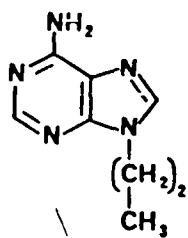
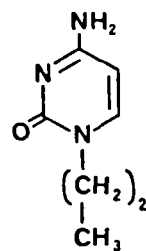
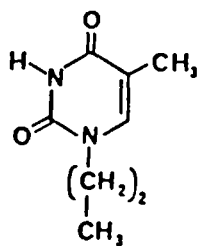
S Y N T H E S E

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

Les composés modèles :



Les composés de référence :

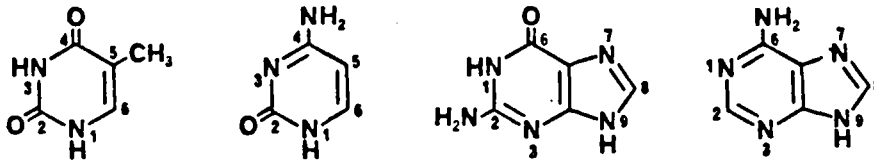


A. CHOIX DES SCHEMAS DE SYNTHÈSE :

Pour accéder aux modèles de type Base-C_n-Acr, on peut envisager deux voies de synthèse : soit au départ de l'acridine, soit au départ de la base nucléotidique. La substitution des deux chromophores dans la position désirée nécessite leur fonctionnalisation préalable.

I. FONCTIONNALISATION DES BASES NUCLEOTIDIQUES :

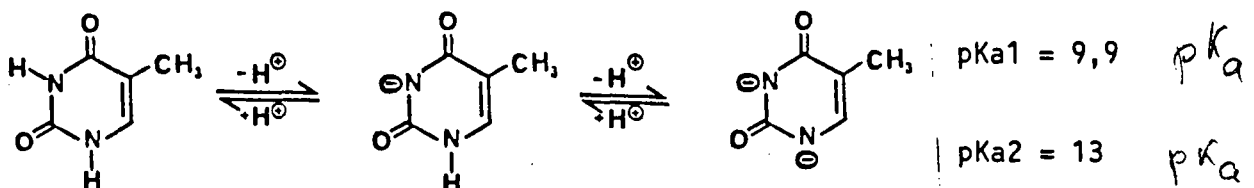
Dans l'ADN, les bases pyrimidiques et puriques sont substituées respectivement en positions 1 et 9 par le desoxyribose.



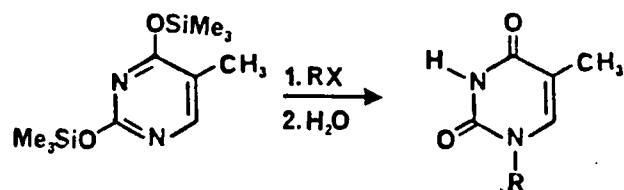
C'est sur cette position que sera fixée la chaîne carbonée liant l'intercalant à la base nucléotidique.

* Dans le cas de la thymine, la fonctionnalisation sélective semble difficile. En effet, l'atome d'hydrogène porté par l'atome d'azote en position 3 est le plus acide. Il est donc arraché le premier dans des conditions basiques (pKa=9,9).

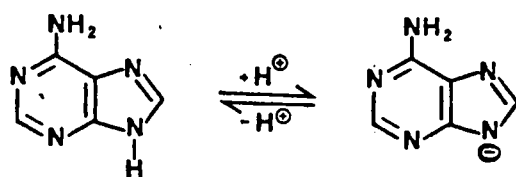
pKa =



La N-alkylation préférentielle en position 1 a pourtant été décrite et réalisée dans certains cas avec de bons rendements (29-32). Un faible pourcentage de O-alkylation a cependant été observé. Une méthode plus sélective consiste à protéger les fonctions hydroxyles par le radical triméthylsilyle (32). La substitution se fait alors sur la position 1 qui est la moins encombrée. Les groupements silyles sont éliminés par hydrolyse.

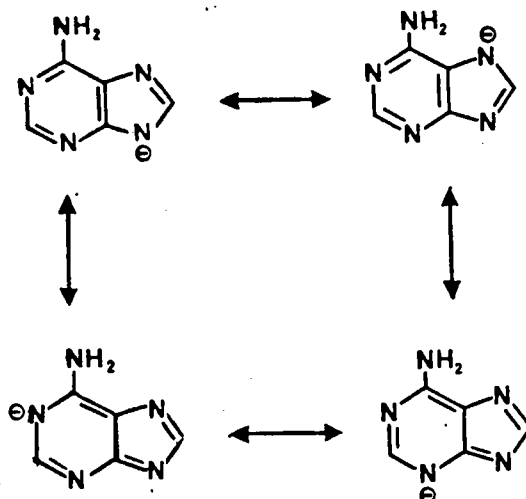


* En ce qui concerne l'adénine, le proton en position 9 peut être arraché facilement en milieu basique.



pKa = 9,8
pKa

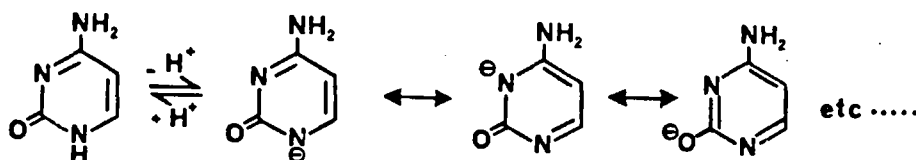
La charge négative portée par l'azote en position 9 peut cependant se délocaliser et conduire aux formes mésomères suivantes (33,34) :



L'ordre de stabilité des formes alkylées de ces anions a pu être établi : N-9 > N-7 >> N-3 > N-1. Ces résultats s'appuient sur des études d'équilibres des tautomères (35), des réactions de réarrangement (36) et des calculs d'orbitales moléculaires (37).

L'alkylation de l'anion adénylate par un dérivé halogéné dans un solvant comme la diméthylformamide (DMF) conduit à l'obtention du produit substitué en position 9 de façon majoritaire (29, 30, 32). Cette sélectivité peut s'expliquer par l'encombrement plus important de la position 7 par rapport à la position 9.

* Dans le cas de la cytosine, le comportement en milieu basique est le suivant :

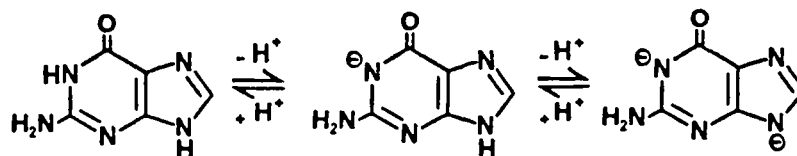


$pK_a = 12,3$

Dans ces conditions, l'alkylation sélective de la position 1 semble difficile. On peut diminuer l'alkylation en position 3 en encombrant ce site par acétylation de la fonction amine primaire portée par le carbone 4. La principale réaction parasite observée est la O-alkylation. Cette méthode a été employée par N.J. LEONARD et D.T. BROWNE (29). La sélectivité de la réaction est augmentée lorsque l'on protège la fonction hydroxyle et la fonction amide par les groupes triméthylsilyles (29).

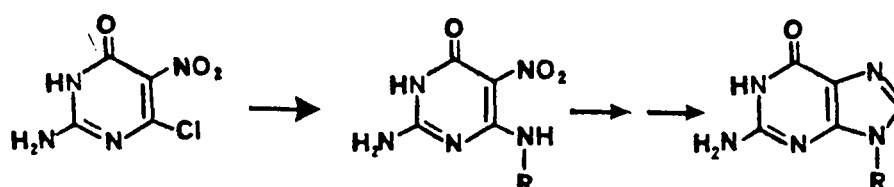
Plus récemment, K.K. OGILVIE a montré qu'il était possible d'alkyler sélectivement la position 1 de la cytosine par simple silylation, sans acétylation préalable (38).

* L'alkylation sélective en position 9 de la guanine est délicate. En milieu basique, elle peut perdre successivement deux protons. Les pK_a correspondants sont de 9,6 et 12,4.



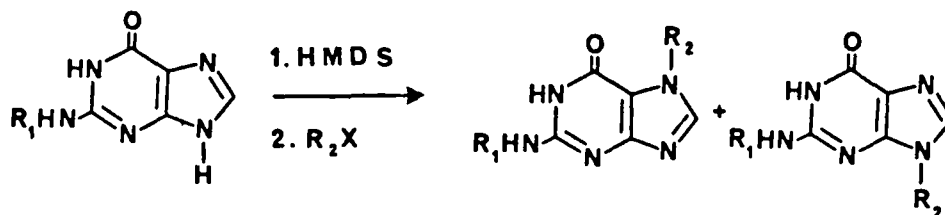
* Les nombreuses formes mésomères d'un tel système rendent possible l'alkylation sur la partie pyrimidique de la guanine. Pour alkyler le cycle imidazole, il est donc nécessaire de protéger la fonction amine primaire en position 2 (par un acétamide ou un benzamide par exemple). Cette méthode a surtout été développée pour la synthèse de nucléosides et d'oligonucléotides (39). Cependant, la réaction n'est pas sélective et on obtient un mélange de dérivés alkylés en positions 7 et 9. Les pourcentages de substitution en position 7 peuvent être importants (jusqu'à 40 %).

Une méthode très sélective consiste à réaliser l'alkylation sur un dérivé précurseur du noyau guanine (29, 39, 40). Cette voie a été développée par J. DAVOLL et D.D. EVANS (40) et N.J. LEONARD (29). Nous l'avons adaptée à la synthèse de nos modèles.



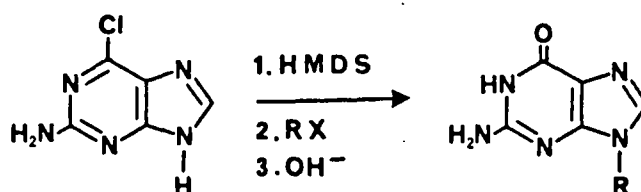
Cette méthode présente l'inconvénient d'être longue et fastidieuse et de ne permettre l'introduction du substituant "R" que par une réaction d'amination du précurseur.

Les développements les plus récents dans le domaine de la synthèse de guanines substituées font appel au blocage ou non de l'amine primaire portée par le carbone 2, suivie d'une protection par les groupes triméthylsilyles (le blocage en position 2 améliore également la solubilité dans l'agent silylant). L'alkylation se fait ensuite par action d'un dérivé halogéné (41, 42).



On obtient un mélange de dérivés alkylés en positions 7 et 9, qui sont ensuite séparés.

Une autre possibilité est d'utiliser une purine précurseur de la guanine : l'amino-2 chloro-6 purine qui peut être alkylée sélectivement en position 9, puis transformée en guanine substituée par hydrolyse en milieu basique (42).

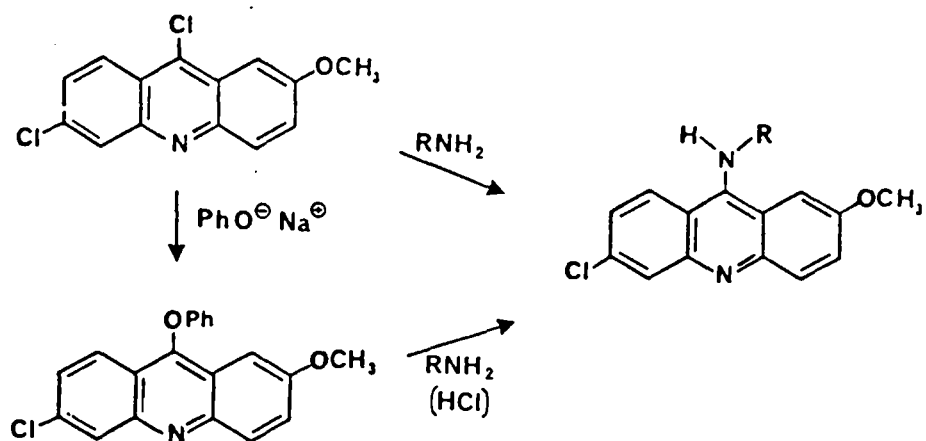


L'inconvénient majeur de cette méthode est le coût élevé du dérivé précurseur.

II. FONCTIONNALISATION DE L'ACRIDINE :

Pour respecter la position de substitution de la quinacrine, le point d'attache de la chaîne se fera en position 9 par l'intermédiaire d'un groupement amino.

Le produit de départ est la dichloro-6,9 méthoxy-2 acridine qui est un produit commercial. Elle peut être directement substituée en position 9 par attaque nucléophile d'une amine primaire (43). On peut également préparer le dérivé phénoxylé en position 9 par action du phénol en présence de soude. Ce dérivé est plus généralement employé lorsque l'amine primaire est sous forme de sel (44, 45).

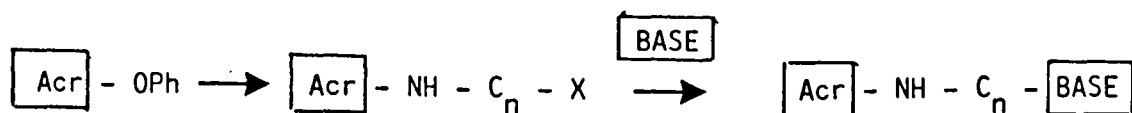


III. SYNTHESES ENVISAGEES :

Les contraintes liées aux fonctionnalisations des deux chromophores nous suggèrent les deux voies de synthèse suivantes :

VOIE 1 :

L'acridine phénoxylée en position 9 est substituée par un aminoalcool, puis sera transformée en halogénure de type Acr-C_n-X.

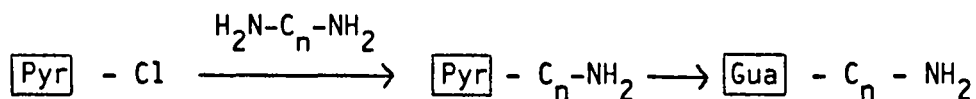


Cet halogénure est ensuite utilisé pour alkyler l'adénine et la thymine dans la position souhaitée. Il n'est cependant pas utilisable dans le cas de la guanine.

VOIE 2 :

La base nucléotidique est alkylée par une α, ω -halogénoamine pour donner le dérivé Base-C_n-NH₂.

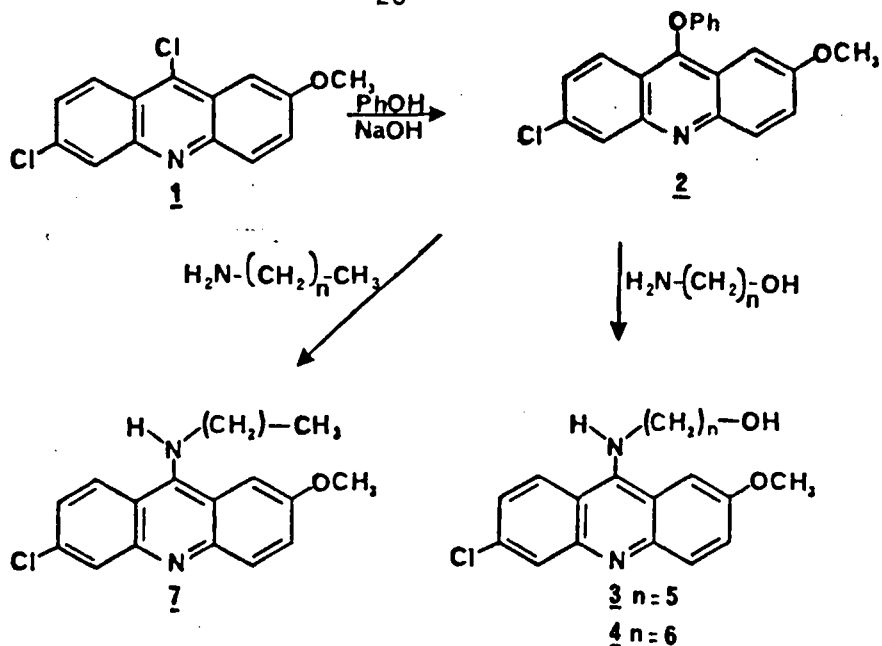
Le dérivé Base-C_n-NH₂, par attaque nucléophile sur la position 9 de l'acridine phénoxylée conduira aux modèles Base-C_n-Acr. Cette voie peut être utilisée pour la préparation des modèles en série adénine, thymine et guanine. Dans le cas de la guanine, le précurseur sera une chloropyrimidine substituée par un diamino alcane : Pyr-C_n-NH₂. Une suite de réactions conduira à la formation du cycle imidazole de la guanine. *fermeture*



B. SYNTHÈSE DES MODÈLES EN SÉRIE ADÉNINE (Ade-C_n-Acr 20 et 23) ET THYMINES (Thy-C_n-Acr 14 ET 17) - SYNTHÈSE DES COMPOSÉS DE RÉFÉRENCE Acr-C₃ 7, Ade-C₃ 8 et Thy-C₃ 9 :

I. PREMIÈRE VOIE DE SYNTHÈSE :

La dichloro-6,9 méthoxy-2 acridine 1 est transformée en chloro-6 méthoxy-2 phénoxy-9 acridine 2 par action du phénol en présence de soude. La réaction a lieu à 100°C pendant 1 heure et le produit est purifié par cristallisation dans l'acétone (le rendement est de 50 %). Le groupement phénoxy du dérivé 2 peut ensuite être substitué par un aminoalcool de type H₂N-C_n-OH (n=5 et 6). La réaction se passe à chaud dans le diméthylsulfoxyde en présence d'un excès d' aminoalcool. On obtient ainsi les dérivés Acr-C_n-OH 3 et 4 qui ont été purifiés par cristallisation dans l'éthanol. Ils sont identifiés par leurs spectres de RMN¹H qui contiennent les signaux caractéristiques de l'acridine dans la région des protons aromatiques entre 8,55 et 7,50 ppm ainsi que ceux apportés par la chaîne de l' aminoalcool dans la région des protons aliphatiques. On remarquera tout particulièrement le signal échangeable vers 4,50 ppm attribué au proton de la fonction hydroxyle.

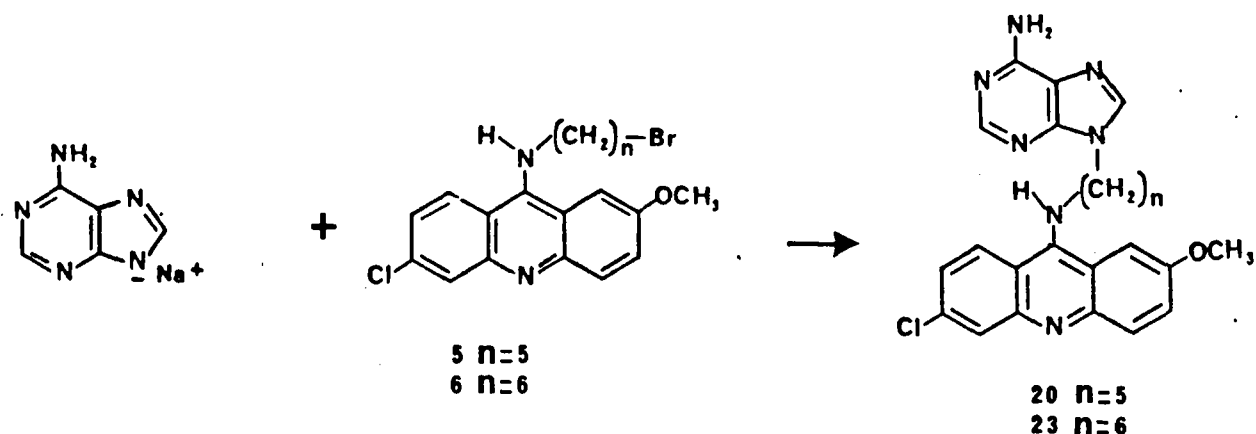


Par action de l'amino-1 propane sur le dérivé 2, nous avons préparé le composé de référence Acr-C₃ 7 avec un rendement de 48 %.

Par action de l'acide bromhydrique en présence d'acide sulfurique on transforme les alcools Acr-C_n-OH 3 et 4 en dérivés bromés correspondants Acr-C_n-Br 5 et 6. Ces produits se sont révélés instables et impossibles à obtenir rigoureusement purs. Nous les avons utilisés directement pour alkyler la thymine et l'adénine.

1. Série adénine :

L'atome de brome des dérivés Acr-C_n-Br 5 et 6 peut être substitué par le sel de sodium de l'adénine. Ce dernier a été obtenu par action de l'hydruide de sodium sur l'adénine dans la diméthylformamide à température ambiante. Ces conditions sont classiquement utilisées pour alkyler l'adénine en position 9 (1, 18, 19). L'adénylate de sodium formé réagit ensuite avec les composés Acr-C₅-Br 5 et Acr-C₆-Br 6 dans la diméthylformamide à 70°C pendant 8 heures. La réaction est incomplète et les produits secondaires sont nombreux. Les divers essais de purification (cristallisation, chromatographie sur plaque préparative ou sur colonne) ne nous ont pas permis d'isoler les produits de condensation Ade-C₅-Acr 20 et Ade-C₆-Acr 23 analytiquement purs. Ils ont été caractérisés par leurs spectres de RMN¹H dans le diméthylsulfoxyde deutérié qui montrent la présence des protons H-2 et H-8 de l'adénine vers 8 ppm. On trouve également le massif des protons de l'acridine entre 7,25 et 7,30 ppm. En spectrométrie de masse, nous observons les pics de l'ion moléculaire pour le dérivé Ade-C₅-Acr 20 (M⁺=461) et pour le dérivé Ade-C₆-Acr 23 (M⁺=475).



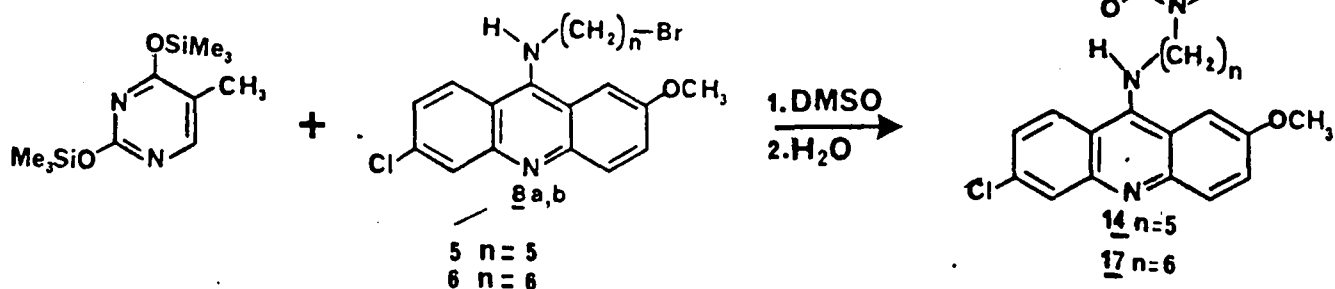
En raison : 1/ de l'instabilité des dérivés bromés intermédiaires Acr-C_n-Br 5 et 6, 2/ des problèmes rencontrés au cours des étapes de purification des produits 20 et 23, 3/ de la nécessité d'obtenir ces produits analytiquement purs pour les études physicochimiques et biologiques, nous avons été contraints d'abandonner cette voie de synthèse.

2. Série thymine :

Pour alkyler sélectivement la thymine en position 1, nous avons utilisé la protection par les groupements triméthylsilyles réalisée dans l'hexaméthylidisilazane à reflux.

La thymine silylée a été utilisée comme agent nucléophile pour déplacer le brome dans les composés Acr-C₅-Br 5 et Acr-C₆-Br 6 (diméthyl sulfoxyde à 80°C). Les groupements silylés sont hydrolysés en ajoutant un peu d'eau en fin de réaction.

Malgré divers essais de condensation, la réaction s'est toujours avérée incomplète et de nombreux produits secondaires sont formés.



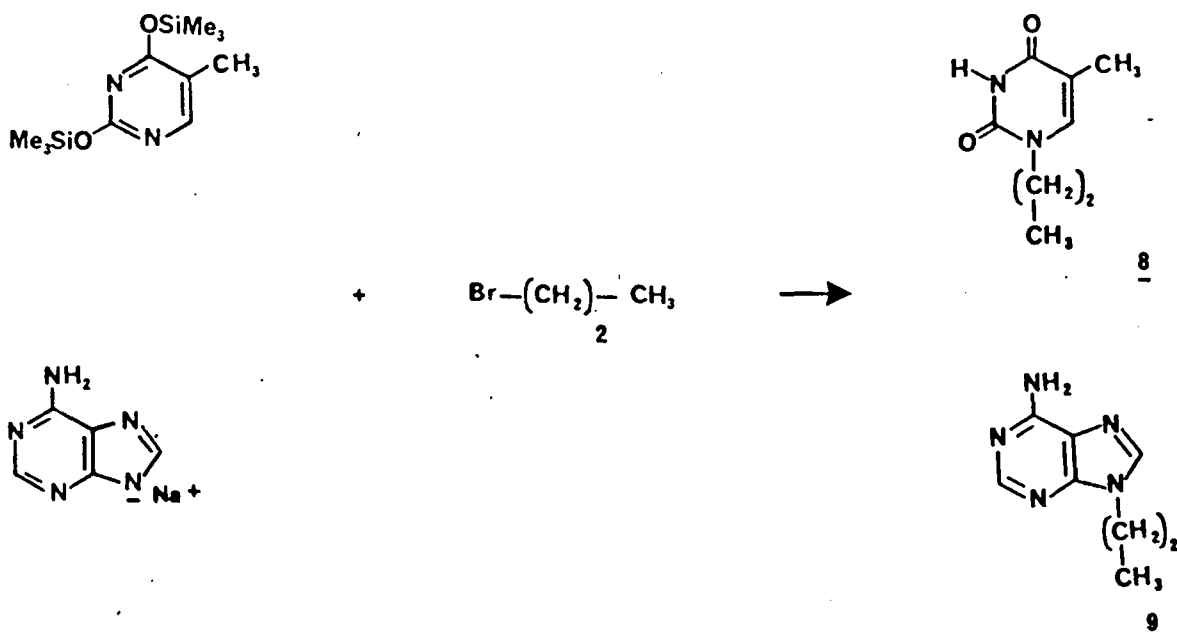
Au cours des étapes de purification, nous avons rencontré les mêmes problèmes qu'en série adénine. Nous avons cependant isolé des échantillons de produits suffisamment purs pour en établir la structure.

Les spectres de RMN¹H enregistrés dans le diméthylsulfoxyde deutérié montrent les signaux des protons de la thymine (11,10 ppm pour le proton échangeable en position 3 ; 7,5 ppm pour le proton en position 6 et 1,70 ppm pour le méthyle en position 5). Nous trouvons également les signaux correspondant à la partie "acridinique" de la molécule, le proton H-8 se présente sous la forme d'un doublet caractéristique à 8,25 ppm. Les signaux des autres protons aromatiques sont groupés entre 7,8 et 7,25 ppm.

Les difficultés rencontrées pour obtenir des échantillons analytiquement purs des dérivés Thy-C₅-Acr 14 et Thy-C₆-Acr 17 nous ont amenés à abandonner cette voie de synthèse comme précédemment en série adénine.

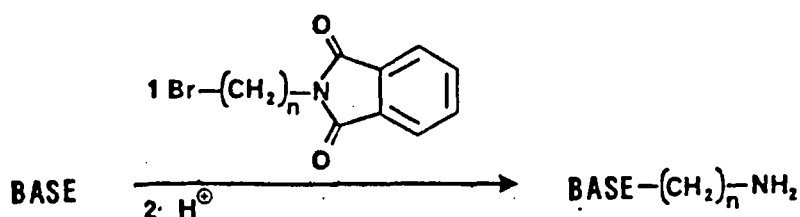
3. Préparation des composés de référence Ade-C₃ 8 et Thy-C₃ 9 :

Selon la méthode décrite par N.J. LEONARD (30), la substitution par la base activée se fait sur le bromo-1 propane dans la diméthylformamide anhydre. Les rendements sont de l'ordre de 80 % et les données spectroscopiques des produits 8 et 9 sont en accord avec celles de la littérature.

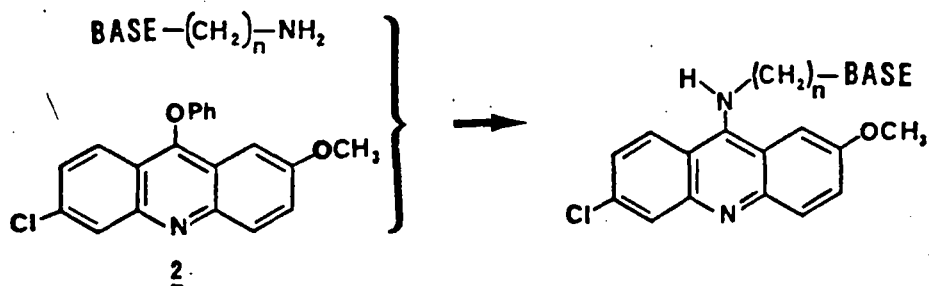


II. DEUXIEME VOIE DE SYNTHESE :

Cette voie met en jeu un intermédiaire-clé dans lequel la base nucléotidique est fonctionnalisée par une chaîne aminoalkyle. Ce dérivé de type $\text{Base-C}_n\text{-NH}_2$ est obtenu par alkylation de la base par un halogénure d'alkyle portant un groupe phalimide précurseur de la fonction amine primaire ($\text{Br-C}_n\text{-Pht}$ 10 et 11).



Dans l'étape suivante, le dérivé $\text{Base-C}_n\text{-NH}_2$ est condensé avec la phénoxy-9 acridine 2 pour conduire aux modèles de type $\text{Base-C}_n\text{-Acr}$.

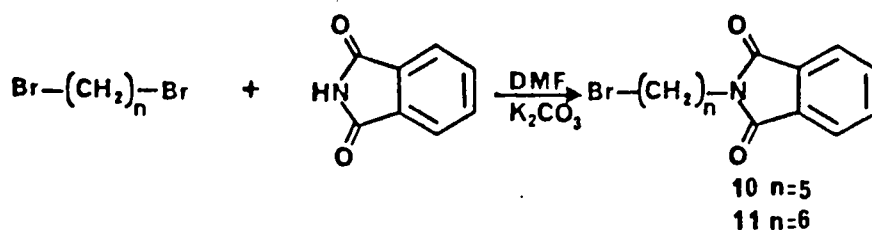


BU
LILLE

1. Synthèse des dérivés $\text{Br-C}_n\text{-Pht}$ 10 et 11 :

Le dérivé $\text{Br-C}_6\text{-Pht}$ 10 est décrit dans la littérature (30) et nous avons utilisé la même méthode qui consiste à réaliser la condensation du phthalimide avec les α,ω -dibromo alcanes $\text{Br-C}_n\text{-Br}$ ($n=5$ et 6) dans la diméthylformamide en présence de carbonate de potassium. Le dibromo alcane est utilisé en excès (cinq fois stoechiométrique) par rapport au phthalimide, pour éviter la formation de dimères.

Les produits $\text{Br-C}_n\text{-Pht}$ sont purifiés par cristallisation dans un mélange d'éther éthylique et d'éther de pétrole. Les rendements en produit pur sont de 79 % pour le dérivé $\text{Br-C}_5\text{-Pht}$ 10 et 70 % pour le dérivé $\text{Br-C}_6\text{-Pht}$ 11.



2. Alkylation des bases par le dérivé α,ω -bromoalkylphthalimide
 ($\text{Br}-\text{C}_n-\text{Pht}$) :

a. Série thymine :

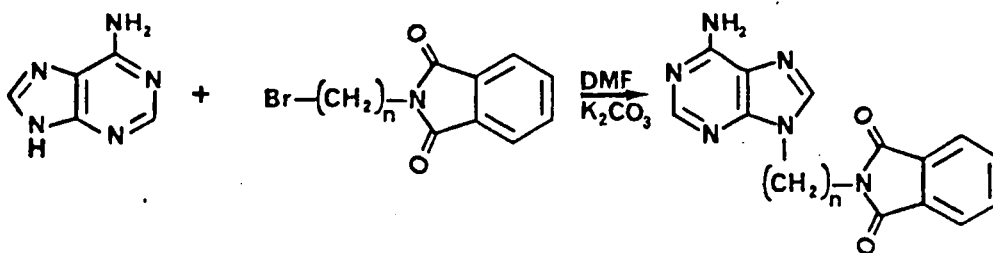
Nous avons utilisé la voie de synthèse décrite par J. BOLTE (48) pour préparer le composé Thy- C_3 - NH_2 . Les fonctions hydroxyle de la thymine sont protégées par silylation dans l'hexaméthylidisilazane. La thymine silylée est ensuite condensée avec les dérivés bromoalkyl phthalimide $\text{Br}-\text{C}_n-\text{Pht}$ 10 et 11 dans la diméthylformamide anhydre chauffée à 80°C pendant 18 heures. Après évaporation à sec et cristallisation dans un mélange éthanol-eau (4/1), on obtient les dérivés Thy- C_5 -Pht 12 et Thy- C_6 -Pht 15 avec des rendements de 71 % et 57 % respectivement.

Les produits sont caractérisés par leur spectre de RMN¹H dans le diméthylsulfoxyde. On trouve les signaux correspondant aux quatre protons aromatiques du noyau phthalimide (singulet à 7,8 ppm) ainsi que les protons de la thymine (7,50 ppm pour le proton en position 6 et 1,75 ppm pour le méthyle en position 5). En spectrométrie de masse, nous observons les signaux correspondant aux ions moléculaires pour le dérivé Thy- C_5 -Pht 12 ($M^+=341$) et pour le dérivé Thy- C_6 -Pht 15 ($M^+=355$).

b. Série Adénine :

Le dérivé Ade- C_6 -Pht 21 a été préparé par N.J. LEONARD et R.F. LAMBERT (30). Nous avons employé la méthode décrite qui consiste à alkyler l'adénine par les dérivés $\text{Br}-\text{C}_n-\text{Pht}$ 10 et 11 en présence de carbonate de potassium dans la diméthylformamide anhydre.

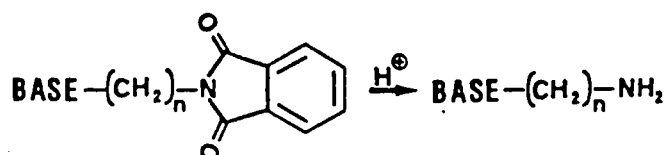
Après évaporation à sec, les dérivés Ade- C_5 -Pht 18 et Ade- C_6 -Pht 21 ont été purifiés par cristallisation dans l'éthanol absolu en présence de noir animal. Les rendements en produit pur sont de 37 % et 40 % respectivement.



L'analyse des spectres de RMN¹H de ces deux dérivés révèle la présence des signaux correspondant aux protons de l'adénine et du groupement phtalimide. Dans le cas du dérivé Ade-C₅-Pht 18, le spectre a été enregistré dans l'acide trifluoroacétique deutérié. Les signaux des protons en position 2 et 8 de l'adénine résonnent sous la forme de deux singulets à 9,40 et 8,80 ppm. Les protons aromatiques du groupement phtalimide sont sous forme d'un singulet à 7,90 ppm. Les données spectroscopiques du dérivé Ade-C₆-Pht 21 sont en accord avec celles de la littérature.

3. Libération de la fonction amine primaire :

L'ouverture du phtalimide peut se faire de deux façons : soit par l'hydrate d'hydrazine (49) soit par hydrolyse en milieu acide (49). L'hydrate d'hydrazine pouvant donner lieu à des réactions secondaires avec la thymine (50, 51), nous avons utilisé des conditions d'hydrolyse acide pour l'ensemble des dérivés Base-C_n-Pht (mélange eau - acide acétique glacial - acide chlorhydrique concentré 1/1/1, chauffé à reflux durant 48 heures). On purifie les produits Base-C_n-NH₂ par cristallisations successives dans l'éthanol absolu. Les rendements en produits purs sont de 70 % et 74 % pour les dérivés Thy-C₅-NH₂ 13 et Thy-C₆-NH₂ 16 ; ils sont de 87 % et 80 % pour les dérivés Ade-C₅-NH₂ 19 et Ade-C₆-NH₂ 22 respectivement .

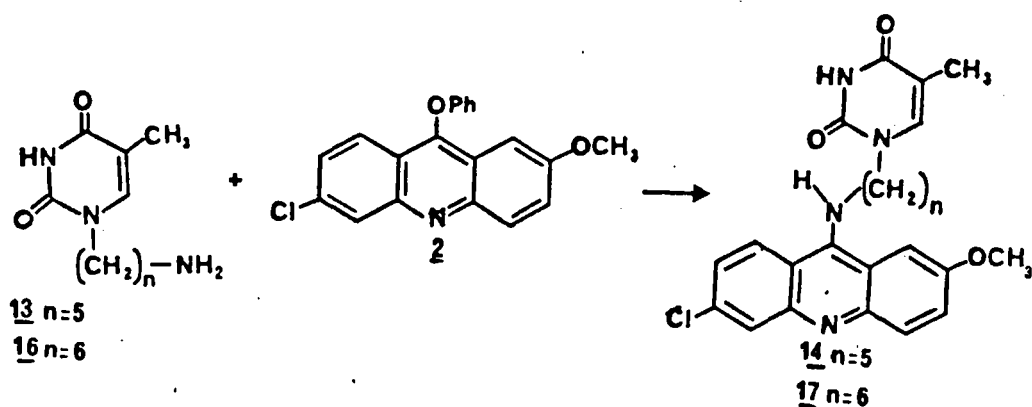


Les produits sont caractérisés par leurs spectres de RMN¹H qui montrent la disparition des signaux aromatiques du groupement phthalimide.

4. Condensation avec la chloro-6 méthoxy-2 phénoxy-9 acridine 2 :

a. Série thymine :

Les dérivés Thy-C₅-NH₂ 13 et Thy-C₆-NH₂ 16 sous forme de chlorhydrate sont très polaires et peu solubles même dans des solvants comme le diméthylsulfoxyde. La réaction de condensation avec la phénoxy-9 acridine 2 se passe à 70°C, en présence de diazabicyclooctane (DABCO). La réaction est très lente et incomplète. Après 18 heures, il reste encore des produits de départ mais la réaction n'évolue plus vers la formation du produit de condensation. Les produits secondaires formés sont nombreux. Par précipitation du brut réactionnel dans un grand volume d'eau ammoniacquée, on obtient un mélange de produits dans lequel les produits de condensation Thy-C₅-Acr 14 et Thy-C₆-Acr 17 sont majoritaires. Les rendements en produit brut sont respectivement de 92 % et 83 %. L'obtention d'échantillons analytiquement purs a nécessité plusieurs chromatographies successives sur colonnes de silice avec comme éluants des mélanges d'éthanol et de méthanol. Les échantillons purifiés sont ensuite cristallisés dans l'éthanol absolu.



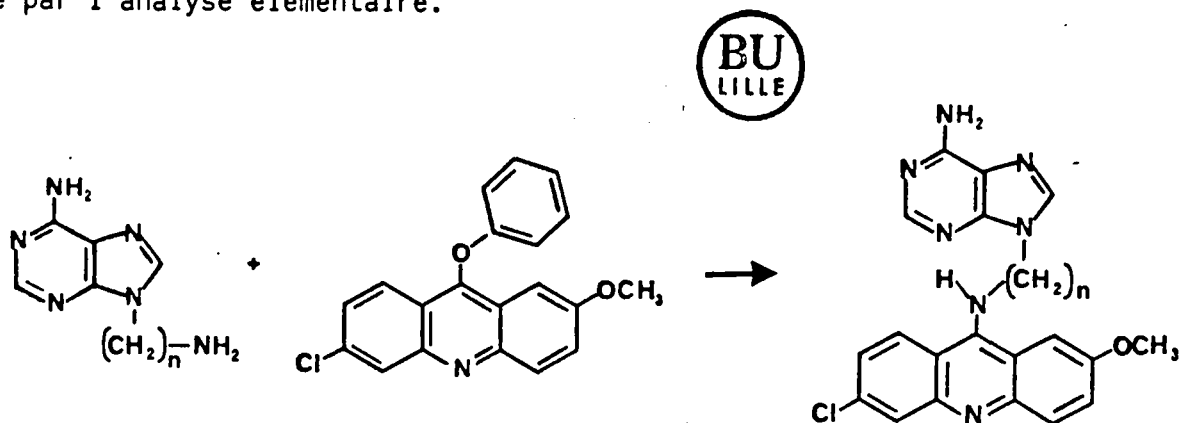
Les spectres de RMN¹H, enregistrés à 270MHz dans le diméthylsulfoxyde deutérié, montrent un signal échangeable à 11,10 ppm attribué au proton porté par l'azote en position 3 de la thymine. On retrouve

les signaux correspondant aux protons aromatiques de l'acridine entre 8,25 et 7,25 ppm. L'ensemble des protons de la chaîne polyméthylénique résonne entre 1,25 et 3,70 ppm. En spectrométrie de masse, nous pouvons observer les pics correspondant aux ions moléculaires pour le dérivé Thy-C₅-Acr 14 (M⁺=452) et pour le dérivé Thy-C₆-Acr 17 (M⁺=466).

b. Série adénine :

Diverses conditions de condensation des dérivés Ade-C_n-NH₂ 19 et 22 (sous forme de chlorhydrate) avec la phénoxy-9 acridine 2 ont été étudiées. Nous avons opéré dans des solvants tels que le diméthylsulfoxyde, la diméthylformamide ou le phénol en présence ou non de base ajoutée comme la triéthylamine ou le diazabicyclooctane. Les meilleurs résultats ont été obtenus en employant la diméthyl formamide en absence de base. La réaction est conduite à 110°C sous atmosphère d'azote. Après 10 heures, elle n'est pas totale mais des produits secondaires commencent à se former. On obtient ainsi un mélange dans lequel le produit de condensation est majoritaire. Les rendements à ce stade sont de 68 % pour le dérivé Ade-C₅-Acr 20 et de 85 % pour le dérivé Ade-C₆-Acr 23.

Le dérivé Ade-C₅-Acr 20 s'est avéré très hygroscopique. La purification des produits 20 et 23 a nécessité plusieurs chromatographies successives sur colonne de silice ; la polarité des produits nous a amenés à utiliser comme solvants d'élution l'éthanol et le méthanol contenant 1 % d'ammoniaque. La pureté des échantillons a été vérifiée par chromatographie sur couche mince et par chromatographie liquide haute performance. Elle a été confirmée par l'analyse élémentaire.

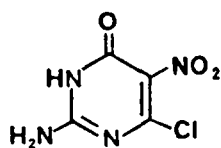


Dans l'analyse des spectres de RMN¹H enregistrés à 270MHz dans le diméthylsulfoxyde deutérié, nous trouvons les signaux correspondant à l'adénine et à l'acridine. Les deux protons de l'adénine sont confondus à 8 ppm. Le proton en position 8 de l'acridine présente un doublet à 8,3 ppm. Les autres protons aromatiques de l'acridine sont entre 7,8 et 7,3 ppm. Les protons échangeables de l'amine primaire en position 6 de l'adénine forment un signal large à 7,1 ppm. Les signaux des protons de la chaîne polyméthylénique sont observés entre 4,0 et 1,2 ppm.

La spectrométrie de masse indique la présence des pics correspondant aux ions moléculaires : M⁺=461 pour le dérivé Ade-C₅-Acr 20 et M⁺=475 pour le dérivé Ade-C₆-Acr 23.

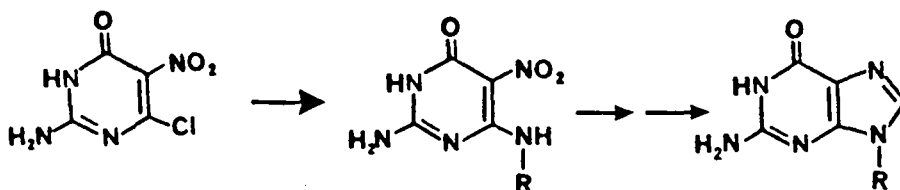
C. SYNTHÈSE DES MODELES EN SERIE GUANINE :

L'impossibilité d'alkyler sélectivement la guanine en position 9 nous a amenés à choisir la voie de synthèse passant par une pyrimidine précurseur : l'amino-2 nitro-5 chloro-6 pyrimidinone-4 (3H) 27.



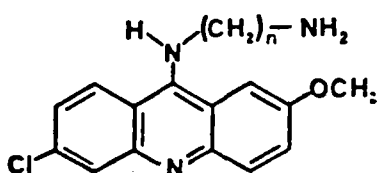
27

Une suite de réactions effectuées sur cette pyrimidine nous permet d'accéder au noyau de la guanine substituée sélectivement en position 9.



La substitution du chlore sur la pyrimidine 27 peut se faire de plusieurs manières :

- Soit à partir de la fonction amine primaire d'un dérivé du type $\text{Acr-C}_n\text{-NH}_2$

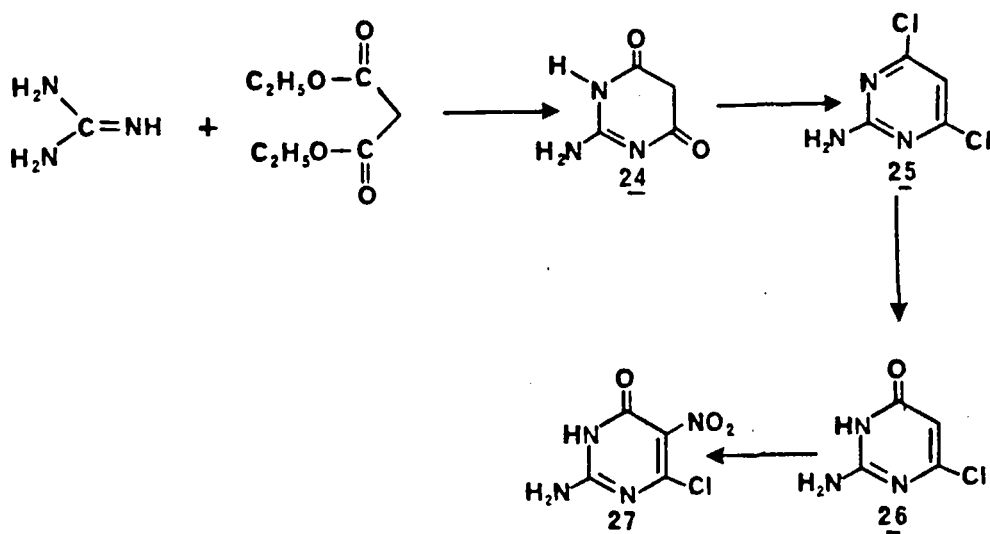


Nous avons réalisé diverses tentatives en utilisant cette voie que nous avons abandonnée pour les raisons suivantes :

- les dérivés $\text{Acr-C}_n\text{-NH}_2$ sont difficiles à purifier.
 - ils sont instables dans les conditions de réaction et conduisent notamment à des réactions de dimérisation (52).
-
- Soit en utilisant une diamine du type $\text{H}_2\text{N-C}_n\text{-NH}_2$. Cette voie nous amène à préparer les dérivés $\text{Gua-C}_5\text{-NH}_2$ 32 et $\text{Gua-C}_6\text{-NH}_2$ 33 qui seront ensuite condensés avec la chloro-6 méthoxy-2 phénoxy-9 acridine 2 pour conduire aux modèles $\text{Gua-C}_5\text{-Acr}$ 34 et $\text{Gua-C}_6\text{-Acr}$ 35.

I. SYNTHESE DE LA PYRIMIDINE 27 PRECURSEUR DE LA GUANINE :

Le composé a déjà été décrit par J. DAVOLL et D.D. EVANS (40). 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 eu besoin, nous avons été amenés à réaliser la synthèse complète selon le schéma ci-dessous décrit par J. BOLTE et al. (48).



La 1ère étape est une modification de la synthèse de W. TRAUBE (53) mise au point par H. REMBOLD et H.J. SCHRAMM (54). La guanidine est mise en réaction avec le malonate d'éthyle dans l'éthanol en présence d'éthanolate de sodium pour fournir la dihydroxy pyrimidine 24 avec un rendement de 92 %.

La 2ème étape est une chloration du composé 24. Nous avons suivi la méthode préconisée par J. BOLTE et al. (48) qui consiste à utiliser l'oxychlorure de phosphore à reflux en présence de N,N-diméthylaniline (rendement de 60 % après cristallisation).

La 3ème étape est une hydrolyse de la dichloropyrimidine 25 par la soude 1N chauffée à reflux pendant quatre heures. Le produit d'hydrolyse 26 est obtenu après acidification du mélange réactionnel par l'acide acétique. Le rendement est de 89 %. Il a été caractérisé par son spectre IR qui montre l'apparition d'une bande intense à 1670 cm^{-1} attribuée à la fonction C=O.

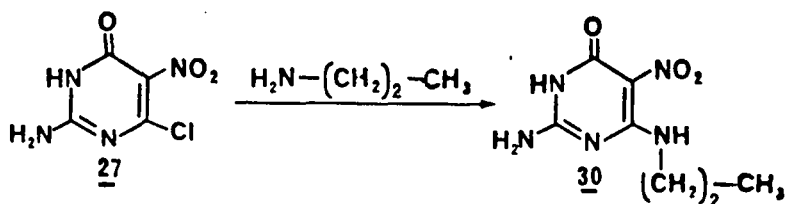
La 4ème étape est la nitration du dérivé 26 décrite par J. DAVOLL et D.D. EVANS (40). On emploie le mélange sulfonitrique comme agent nitrant. La réaction se passe sous atmosphère d'azote en maintenant la température au voisinage de 10°C . Le dérivé nitré est obtenu avec un rendement de 84 %.

II. REACTIONS D'AMINATION DU PRECURSEUR 27 :

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

1. Synthèse du dérivé Pyr-C₃ 30 :

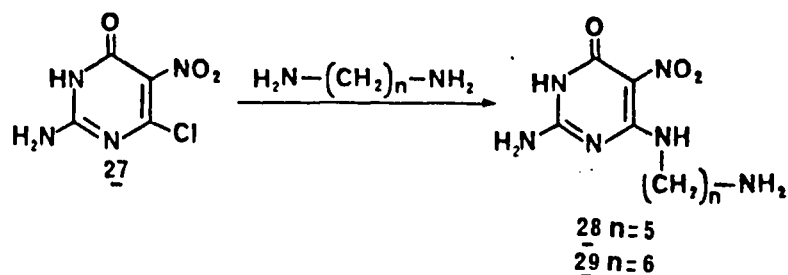
Ce composé a été décrit par N.J. LEONARD (29) ; nous avons repris ses conditions et traité le dérivé 27 par la n-propylamine utilisée comme solvant. Le produit est isolé avec un rendement de 67 % après réaction à 25°C pendant 18 heures.



Le spectre de RMN¹H dans l'acide trifluoroacétique deutérié montre les signaux attendus pour la chaîne propyle à 3,80 ppm et 1,85 ppm pour les groupements méthyléniques et à 1,0 ppm pour le groupement méthyle. Le spectre d'absorption UV enregistré dans l'éthanol présente des maxima à 330 et 237 nm.

2. Dérivés Pyr-C₅-NH₂ 28 et Pyr-C₆-NH₂ 29 :

Le réactif d'amination du précurseur 27 est un diamino alcane du type H₂N-C_n-NH₂ (n=5, 6). Pour éviter la formation de dimères, Pyr-(CH₂)_n-Pyr, il convient d'opérer en milieu suffisamment dilué et en présence d'un excès de diamine (environ 7 fois). La réaction s'effectue à température ambiante dans la diméthylformamide en présence de triéthylamine. Après 18 heures, le brut réactionnel est évaporé sous pression réduite et les produits Pyr-C₅-NH₂ 28 et Pyr-C₆-NH₂ 29 sont purifiés par cristallisation dans l'eau avec des rendements de 79 et 69 % respectivement.



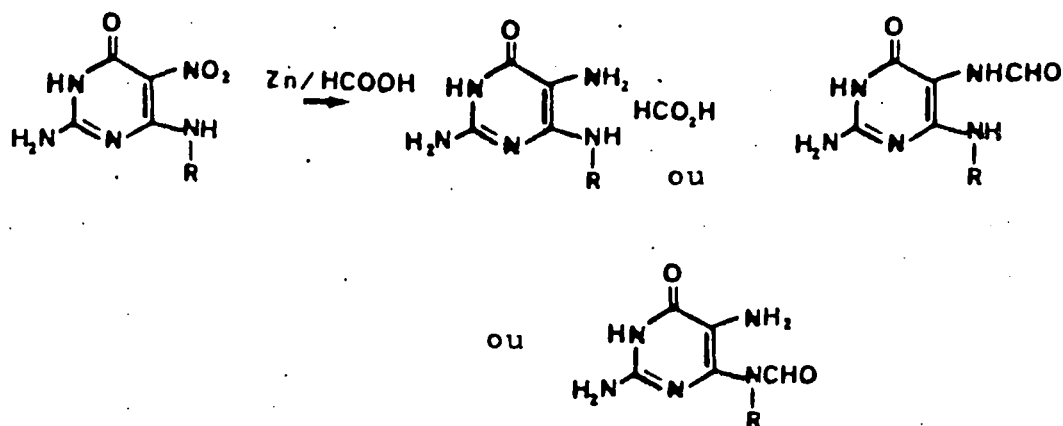
L'analyse du spectre de RMN¹H effectué dans l'acide trifluoroacétique deutérié montre la présence des signaux des protons méthyléniques de la chaîne entre 1,7 et 3,7 ppm. Les spectres d'absorption UV enregistrés dans l'éthanol présentent des maxima à 290 et 335 nm. Par spectrométrie de masse, nous avons pu observer les pics correspondant aux ions moléculaires : M⁺=256 pour le dérivé Pyr-C₅-NH₂ 28 et M⁺=270 pour le dérivé Pyr-C₆-NH₂ 29.



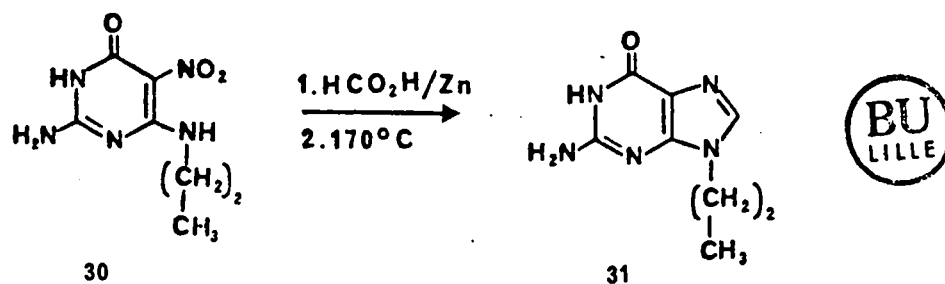
III. FORMATION DU CYCLE IMIDAZOLE :

Nous avons utilisé la méthode décrite par N.J. LEONARD (29) pour préparer le dérivé Gua-C₃ 31.

Le groupement nitro est réduit par le couple zinc - acide formique à température ambiante, sous atmosphère inerte. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie sur couche mince. Il se forme dans le milieu un formiate d'amine ou un formamide que nous n'avons pas isolé ni caractérisé.

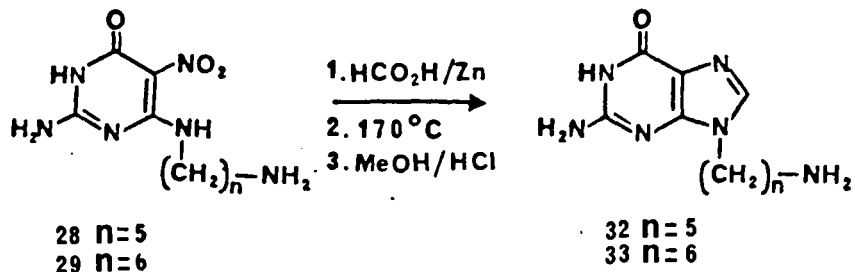


Après avoir éliminé le zinc par filtration, la cyclisation s'effectue par chauffage à 170°C sous pression pendant 3 heures. Nous avons obtenu le dérivé Gua-C₃ 31 à partir du composé nitré Pyr-C₃ 30 avec un rendement de 50 %. On le caractérise par son spectre de RMN¹H dans le diméthylsulfoxyde deutérié. On constate l'apparition d'un proton aromatique donnant un signal à 8,75 ppm attribué au proton en position 8 de la guanine prouvant que la fermeture du cycle imidazole a été réalisée. Le spectre d'absorption UV présente un maximum à 253,5 nm. Par spectrométrie de masse, on observe le pic correspondant à l'ion moléculaire M⁺=193.



Le traitement des dérivés Pyr-C₅-NH₂ 28 et Pyr-C₆-NH₂ 29 montre que la cyclisation s'accompagne d'une réaction de formylation de l'amine primaire de la chaîne : pour le composé 28 par exemple, le spectre de RMN¹H contient le singulet à 7,6 ppm caractéristique du H-8 de la guanine et deux signaux échangeables à 8,0 et 7,7 ppm provenant du groupement formamide et de la fonction amine primaire de la guanine. De plus, par spectrométrie de masse, le pic de l'ion moléculaire de Gua-C₅-NH₂ 32 (M⁺=236) est accompagné d'un pic provenant de l'ion moléculaire augmenté de 28 unités attribué au formamide correspondant. On observe également un signal à 8,6 ppm pour le proton non échangeable du formamide.

Pour obtenir le dérivé Gua-C₅-NH₂ 32, nous avons traité ce brut réactionnel dans des conditions d'hydrolyse acide : méthanol - acide chlorhydrique (9/1).

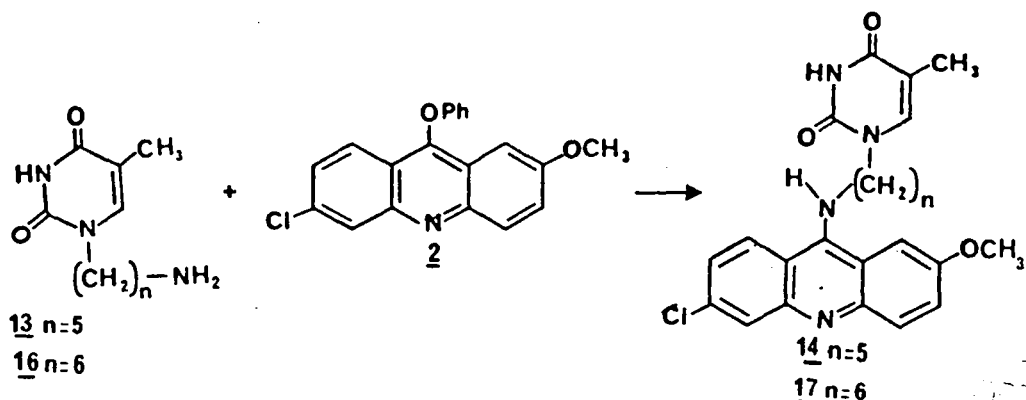


Nous avons préparé le dérivé Gua-C₆-NH₂ 33 de la même manière. La pureté des produits 32 et 33, analysés par chromatographie liquide haute performance sur phase inverse est estimée à 95 %. Ces composés sont difficiles à purifier totalement et ils ont été utilisés sans traitement supplémentaire.

IV. PRÉPARATION DES MODELES Gua-C₅-Acr 34 et Gua-C₆-Acr 35 :

Les dérivés Gua-C₅-NH₂ 32 et Gua-C₆-NH₂ 33 sont transformés en dérivés Gua-C_n-Acr 34 et 35 par une réaction de condensation avec la phénoxy-9 acridine 2 dans la diméthylformamide. La solubilité et la réactivité des intermédiaires Gua-C_n-NH₂ 32 et 33 est faible. Après 14 heures à 80°C, il reste toujours des composés de départ et des produits secondaires commencent à se former. La réaction est arrêtée à ce stade et le solvant est évaporé sous pression réduite.

L'obtention des produits analytiquement purs a nécessité plusieurs chromatographies successives sur colonnes de silice en utilisant comme éluant l'acétate d'éthyle, l'éthanol absolu et le méthanol.

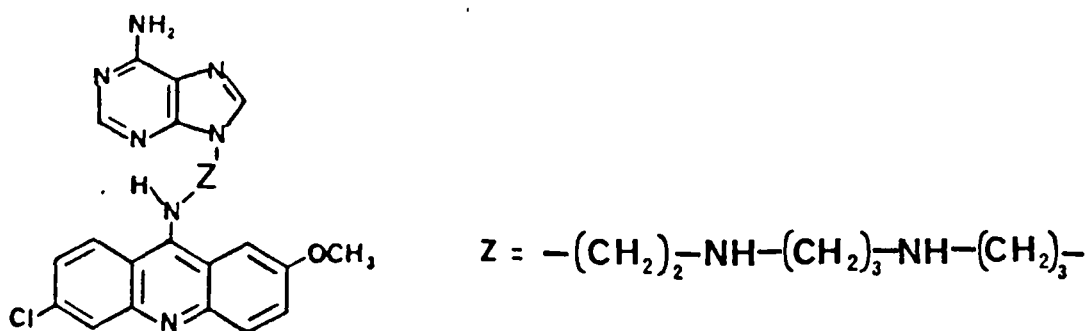


Les produits ont été identifiés par RMN¹H (diméthylsulfoxyde deutérié). On y retrouve les contributions de la guanine (par son proton en position 8 qui résonne à 7,5 ppm, confondu avec le proton en position 1 de l'acridine) et de l'acridine (par son massif de protons aromatiques entre 8,25 et 7,20 ppm). Les groupements méthyléniques directement fixés sur la guanine et sur l'acridine résonnent sous forme de multiplets à 3,80 et 3,60 ppm respectivement.

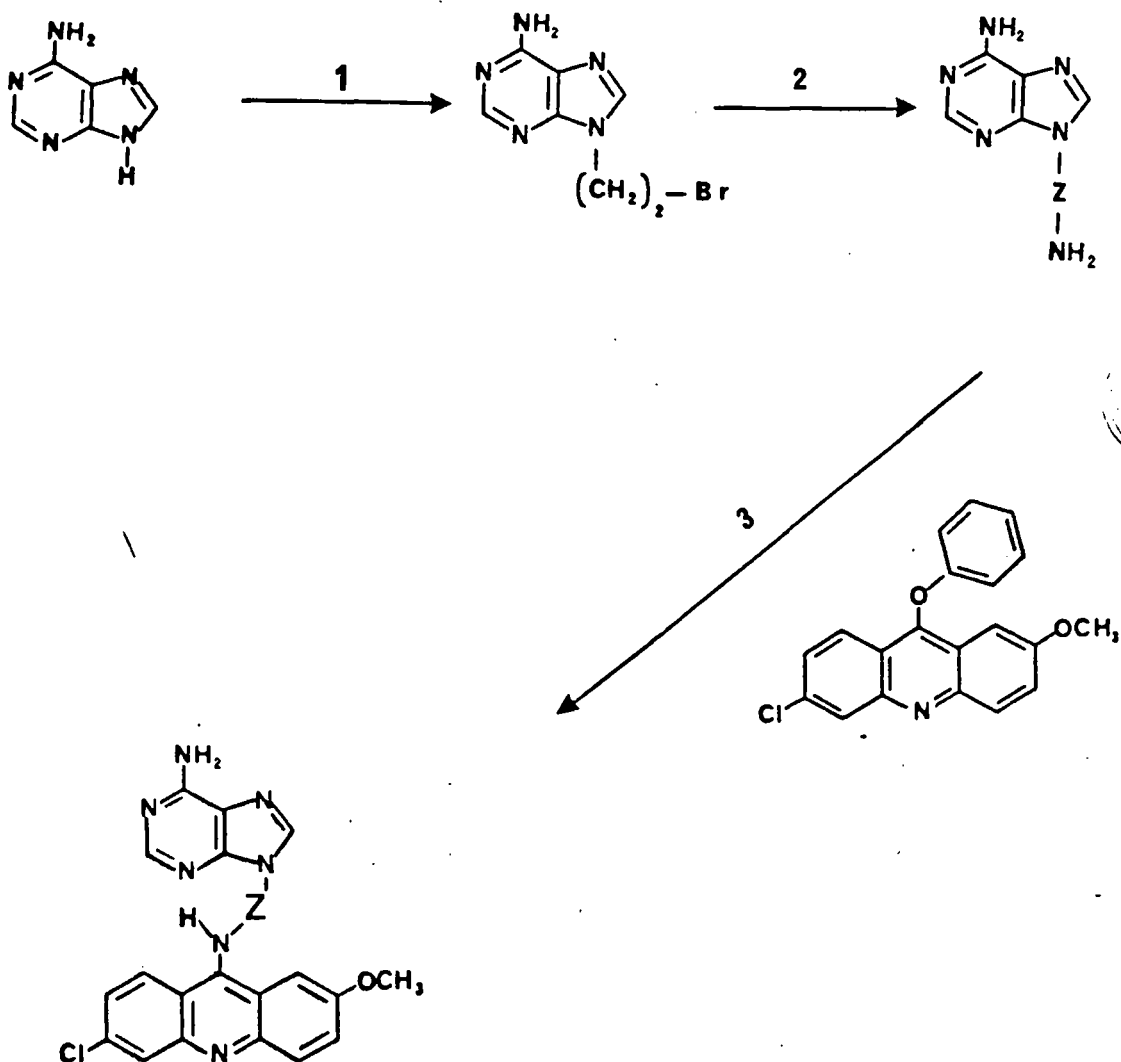
La pureté des produits Gua-C₅-Acr 34 et Gua-C₆-Acr 35 a été contrôlée par chromatographie sur couche mince, chromatographie liquide haute performance (phase inverse RP18) et par analyse élémentaire.

D. SYNTHÈSE DU MODÈLE Ade-Z-Acr 38 :

La molécule que nous nous proposons de synthétiser présente la structure suivante :



Dans ce système les deux noyaux aromatiques sont liés par une chaîne de type polyamine. De nombreux travaux sont apparus récemment dans la littérature pour synthétiser et procéder à l'allongement de polyamines comparables (55-65). Nous avons opté pour le schéma de synthèse indiqué ci-dessous qui consiste à alkyler dans un premier temps l'adénine par un dérivé dihalogéné. On peut ensuite introduire la chaîne aminée et fixer le noyau acridine. Ce schéma est assez comparable à la stratégie utilisée par B.P. ROQUES pour la synthèse de certains bisintercalants non symétriques (66).

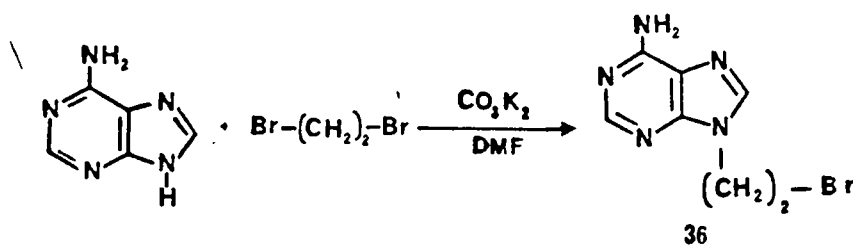


I. SYNTHÈSE DU DÉRIVÉ Ade-C₂-Br 36 :

L'étape 1 est une alkylation de l'adénine par le dibromo-1,2 éthane dans la diméthylformamide en présence de carbonate de potassium. Ces conditions dérivent de celles décrites par N.J. LEONARD (29) pour la préparation de l'homologue supérieur Ade-C₃-Br à partir de l'adénylate de sodium et du dibromo-1,3 propane. La réaction a lieu à température ambiante et dure 48 heures. On obtient le dérivé Ade-C₂-Br 36 avec un rendement de 77 %.

Dans le spectre de RMN¹H enregistré dans le diméthylsulfoxyde deutérié, nous trouvons deux signaux dans la région des protons aromatiques à 8,15 et 8,10 ppm attribués aux protons en positions 2 et 8 de l'adénine. Nous observons également un signal échangeable à 7,75 ppm pour la fonction amine primaire en position 6 de l'adénine. Les protons des groupements méthyléniques résonnent sous la forme de deux triplets à 4,50 et 3,90 ppm.

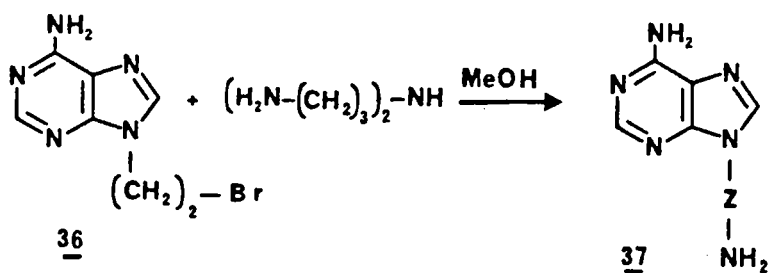
Le spectre de masse présente également les deux pics caractéristiques des dérivés bromés qui sont à (M+1)⁺=243 et (M-1)⁺=241 (liés à la présence des deux isotopes du brome : Br⁸¹ et Br⁷⁹).



II. SYNTHÈSE DU DÉRIVÉ Ade-Z-NH₂- 37 :

L'atome de brome du dérivé Ade-C₂-Br 36 peut être substitué par une fonction amine primaire de la bis-(amino-3 propyl) amine. Pour éviter la formation de dimères du type Ade-Z-NH-C₂-Ade, nous avons travaillé avec un très gros excès de triamine (30 fois) en milieu dilué. La réaction a été menée au reflux du méthanol pendant 24 heures.

L'isolement du produit s'est avéré délicat, notamment en raison de l'excès de triamine. Le point d'ébullition élevé de celle-ci (151° sous 50 mm de mercure) rend difficile l'évaporation sous pression réduite. Divers essais de précipitation et d'extraction liquide - liquide ont échoué ; la seule méthode efficace est la chromatographie liquide haute performance préparative (sur phase inverse : RP8) : la triamine en excès est éliminée avec de l'eau puis le produit de condensation 37 est élué par le méthanol. On le cristallise sous forme de chlorhydrate.

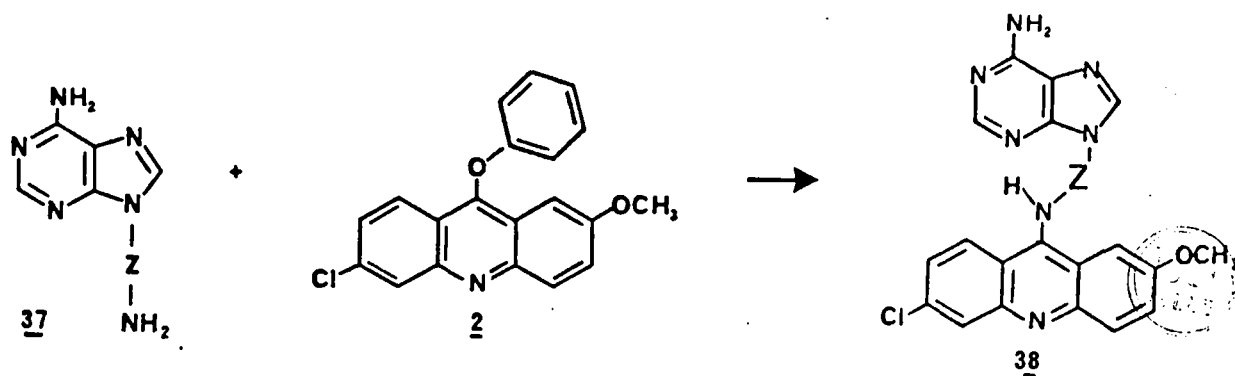


Le spectre de RMN¹H dans le diméthyl sulfoxyde deutérié est assez mal résolu. On distingue cependant un signal à 8,10 ppm correspondant aux protons en position 2 et 8 de l'adénine. La fonction amine primaire en position 6 de l'adénine résonne sous la forme d'un signal échangeable à 7,10 ppm. Les protons du groupement méthylénique adjacent à l'adénine présentent un signal à 4,20 ppm. Les autres protons aliphatiques forment un massif complexe entre 3,2 et 1,00 ppm partiellement masqué par les pics provenant de l'eau et du diméthylsulfoxyde résiduels. Le spectre de masse (ionisation chimique par le méthane) présente un pic à (M+1)⁺=293 correspondant à l'ion moléculaire du produit Ade-Z-NH₂.

III. SYNTHESE DU MODELE Ade-Z-Acr 38 :

Nous avons effectué la condensation du dérivé Ade-Z-NH₂ 37 avec la phénoxy-9 acridine 2 dans le phénol. Nous avons opéré à 50°C, car au cours d'essais préliminaires, nous avons constaté une instabilité du produit de

condensation à plus haute température. Après 5 heures de réaction, l'analyse sur couche mince de silice montre qu'il reste toujours du composé de départ - mais que des nombreux produits secondaires commencent à apparaître. La réaction est arrêtée et la solution obtenue est directement chromatographiée sur colonne de silice. La grande polarité des produits a nécessité l'emploi d'un mélange éluant méthanol-ammoniaque (98/2). La dernière étape de purification est une cristallisation dans l'éthanol absolu acidifié par l'acide chlorhydrique concentré. Le rendement en produit Ade-Z-Acr 38 obtenu sous forme heptachlorhydrate est de 36 %.



Le spectre de RMN¹H dans le diméthyl sulfoxyde deutérié correspond à la somme des spectres des deux produits condensés. On retrouve notamment les signaux caractéristiques des protons en position 2 et 8 de l'adénine confondus à 8,10 ppm. Le proton en position 8 de l'acridine résonne sous la forme d'un doublet à 8,30 ppm et les autres protons aromatiques forment un massif complexe entre 7,80 et 7,10 ppm.

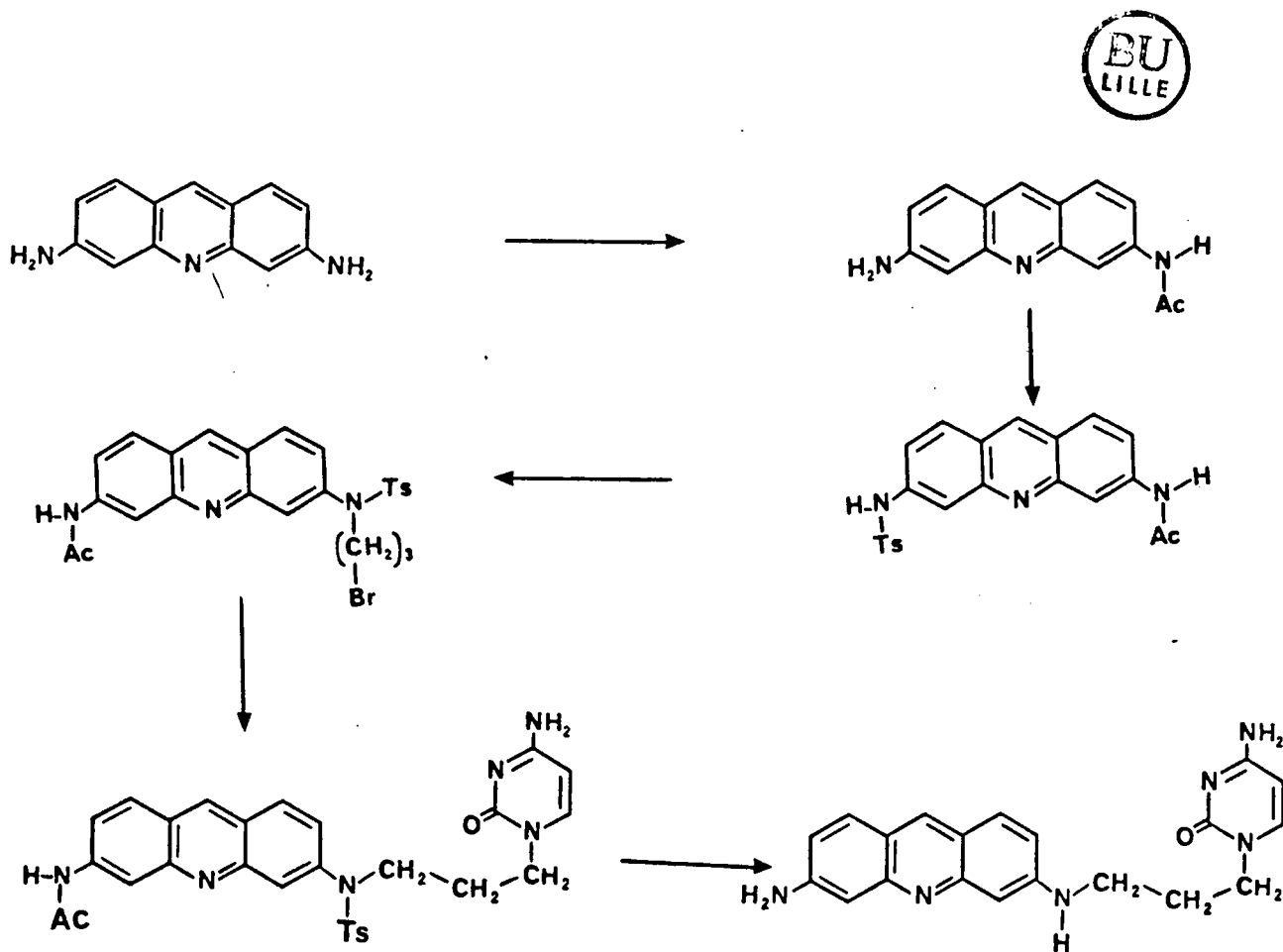
Par spectrométrie de masse (ionisation chimique par le méthane), nous avons pu observer le pic de l'ion moléculaire M⁺=534.

La pureté du produit a été contrôlé par chromatographie sur couche mince, chromatographie liquide haute performance et par l'analyse élémentaire.

E. SYNTHÈSE DU MODÈLE Cyt-C₃-Pf 44 ET DU COMPOSE DE RÉFÉRENCE Cyt-C₃ 45 :

I. SYNTHÈSE DU MODÈLE Cyt-C₃-Pf 44 :

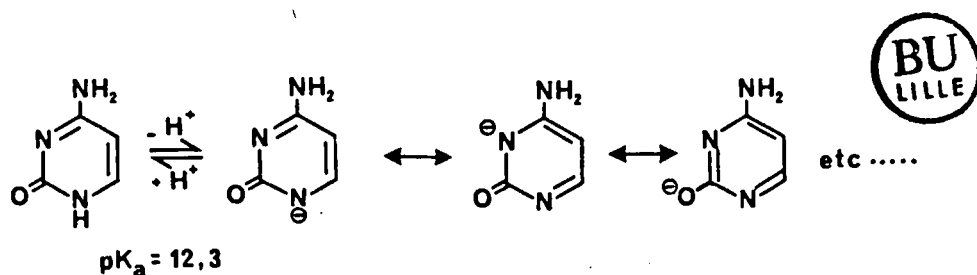
Nous avons repris le mode opératoire mis au point par A. WARDANI dans le laboratoire (dans le cadre d'un programme de synthèse de dérivés monofonctionnels de la proflavine). Il s'agit d'une protection sélective d'une des fonctions amines primaires de la proflavine par mono-acylation et activation de l'autre fonction par formation du tosylamide. Cet intermédiaire peut ensuite être aisément alkylé. Le schéma de synthèse retenu est le suivant :



L'acétylation sélective a été réalisée en traitant la proflavine avec une quantité stoechiométrique d'anhydride acétique. On utilise l'acide propionique maintenu à -18°C comme solvant. Après 48 heures, on constate un taux de transformation de 95 % et on isole la proflavine monoacétylée 40 avec un rendement de 83 %.

Par action du chlorure de tosylo dans la pyridine en présence de triéthylamine, on forme le dérivé tosylé Ac-Pf-Ts 41 avec un rendement de 85 %. Cet intermédiaire a été alkylé par le dibromo-1,3 propane en opérant dans la diméthylformamide en présence de carbonate de potassium. On obtient ainsi le dérivé 42 avec un rendement de 70 %.

Dans l'étape suivante, le dérivé halogéné 42 est utilisé pour alkyler la cytosine. Comme nous l'avons signalé au début de ce chapitre (p. 23), l'alkylation directe de la cytosine en milieu basique conduit à un mélange de produits (alkylés sur les positions 1 ou 3 ou sur l'oxygène porté par le carbone 2).



Pour obtenir une alkylation sélective en position 1 nous avons travaillé avec la cytosine protégée par des groupements silyles (38). Le composé 42 est mis en réaction dans le sulfolane à 80°C avec un excès de cytosine silylée. La condensation dure 48 heures et nous obtenons le dérivé 43 avec un rendement de 61 %.

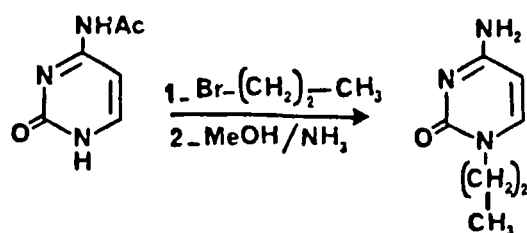
Dans l'analyse de son spectre de RMN¹H (diméthylsulfoxyde deutérié), nous retrouvons les signaux caractéristiques des demi-molécules de départ. La cytosine est identifiée par la présence d'un doublet à 5,55 ppm correspondant à l'un de ses deux protons en position 5 ou 6 (l'autre étant masqué par le massif aromatique à 8,50 - 7,20 ppm des protons de la proflavine et du groupement tosylo) ainsi que par l'apparition d'un signal échangeable à 6,95 ppm apporté par sa fonction amine primaire.

Dans la dernière étape, les groupements tosylamides et acétamides sont hydrolysés. Pour ceci nous avons utilisé la méthode largement employée

^u
e / pour les tosylamides aliphatiques (9, 56) par chauffage dans l'acide sulfurique concentré à 80°C. La réaction est extrêmement propre et quantitative. L'analyse ^{sur} en couche mince de silice montre que la totalité du produit de départ a été consommée après 15 minutes et qu'il s'est formé un produit intermédiaire que nous n'avons pas isolé mais qui est sans doute le produit de détosylation. Après 3 heures, le produit intermédiaire a été complètement transformé en dérivé Cyt-C₃-Pf 44. Le produit a été identifié par l'analyse de son spectre de RMN¹H qui montre la disparition de tous les signaux correspondant aux groupes protecteurs acétyle et tosylo. En spectrométrie de masse (ionisation chimique par l'ammoniac), nous observons le pic de l'ion moléculaire (M⁺=361). La pureté du modèle Cyt-C₃-Pf 44 a été contrôlée par chromatographie sur couche mince et chromatographie liquide haute performance sur phase inverse.

II. SYNTHESE DU COMPOSE DE REFERENCE Cyt-C₃ 45 :

Ce composé a été synthétisé selon la méthode décrite dans la littérature par N.J. LEONARD et D.T. BROWNE (29). Il s'agit d'une alkylation de la N-acétyl cytosine par le bromo-1 propane dans le diméthylsulfoxyde en présence de carbonate de potassium. La desacétylation se fait par la mise en solution du brut réactionnel dans du méthanol saturé en ammoniac. Cette réaction dure environ huit heures. Deux produits sont majoritaires : il s'agit du dérivé de N-alkylation et du produit de O-alkylation. Ils sont séparés par ^x cristallisations successives dans l'éthanol. Les données spectroscopiques du produit isolé Cyt-C₃ 45 sont en accord avec celles de la littérature.

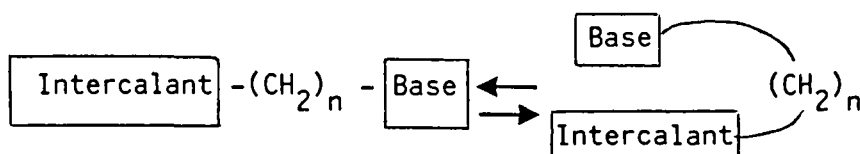


C H A P I T R E 2

ETUDE DES MODELES EN SERIE QUINACRINE :
INTERACTIONS INTERCALANT-BASE

dit - Nous avons préparé une série de modèles Base-C_n-Acr susceptibles de reproduire les interactions d'empilement observées lors de l'intercalation de la quinacrine dans l'ADN. Ces interactions avec les acides nucléiques ont été mises en évidence essentiellement par spectroscopies UV et de fluorescence (67). Des études par RMN¹H ont également été menées sur la quinacrine intercalée dans l'ADN (68) et sur des complexes entre l'amino-9 acridine et des oligonucléotides auto-complémentaires (69-71).

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



Ces complexes sont de même nature que ceux formés au cours de l'intercalation. Nous les avons donc étudiés par les mêmes techniques : Spectroscopies d'absorption UV, de RMN et de fluorescence.

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 UV (figure 3).

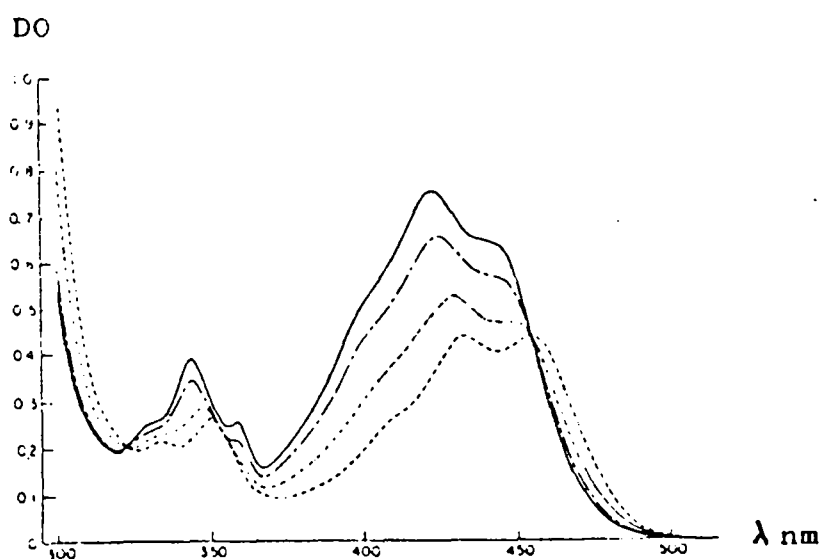


Figure 3 : Effet de l'ADN de thymus de veau sur le spectre d'absorption de la quinacrine 89 μM (-, sans ADN ; --, ADN 57 μM ; - - -, ADN 210 μM ; ---- ADN 1,6 mM).

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

L'effet hypochrome se produit lorsque des chromophores aromatiques sont empilés les uns sur les autres. 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 par rapport à l'ADN monobrin.

L'explication théorique de l'effet hypochrome est complexe. Selon I. TINOCO (72) et W. RHODES (73), les chromophores en interactions 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.

La décroissance de l'absorption lors de l'empilement des bases est décrite par le pourcentage d'effet hypochrome, %H, défini par la relation :

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

où f est la force d'oscillateur de la transition considérée (74).

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

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 (75) 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 (29). Les grandeurs %H ont été utilisées pour évaluer le degré de repliement de ces systèmes et pour les comparer les uns aux autres.

Au laboratoire, l'étude de bichromophores dans lesquels l'adénine et le psoralène sont associés par une chaîne polyméthylénique (Ade-C_n-8Pso, Figure 4) a montré que la valeur de %H diminue quand la longueur de la chaîne 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 (76).

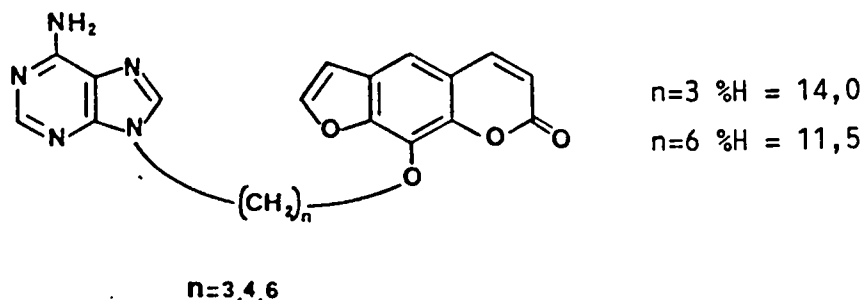


Figure 4 : Modèles Ade-C_n-8Pso : valeurs de %H mesurées dans un mélange eau-méthanol 95:5 entre 400 et 230 nm.

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 diminue lorsqu'on allonge la chaîne (Figure 5). Ce phénomène a été interprété en termes de diminution du taux de complexation par accroissement des degrés de liberté (77).

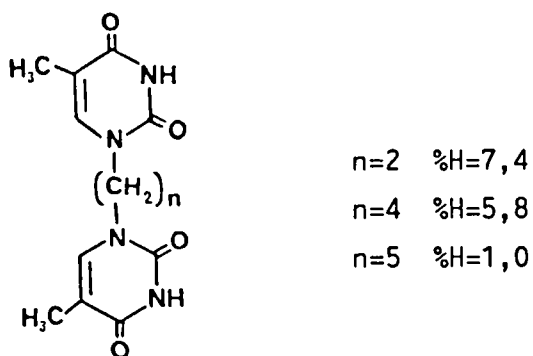
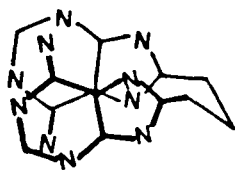


Figure 5 : Influence de la longueur de la chaîne sur la valeur %H mesurée dans l'eau pour les modèles Thy-C_n-Thy d'après K. GOLANKIEWICZ (77).

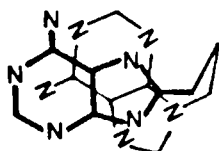
Les théories relatives à l'effet hypochrome font état de la variation de la grandeur %H en fonction des positions relatives des deux chromophores impliqués (15, 74, 78).

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 al. (47).

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 dans la conformation repliée sont différentes (Figure 6).



Jonction $C_8-C'_8$ %H = 21,2



Jonction $N_9-C'_8$ %H = 19,2

Figure 6 : Effet de la géométrie du dimère Ade-C₃-Ade sur la valeur de %H d'après N.J. LEONARD (47).

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

D'une manière générale, les auteurs s'accordent pour considérer l'effet hypochrome comme une mesure semi-quantitative du degré d'empilement de deux chromophores.

II. ETUDE DES MODELES :

Les modèles Thy-C_n-Acr 14 et 17, Ade-C_n-Acr 20 et 23 et Gua-C_n-Acr 34 et 35 ont été étudiés dans l'eau tamponnée à pH 5,5 à une concentration de $8 \cdot 10^{-5} M$: le noyau acridine est protoné alors que la base nucléotidique est inchangée. Le spectre d'absorption de l'acridine comporte deux régions distinctes : l'une entre 500 et 300 nm, l'autre entre 300 et 250 nm. Nous avons enregistré les spectres entre 500 et 300 nm car dans cette gamme de longueur d'onde, la base nucléotidique n'absorbe pas. Le seul composé de référence à considérer est donc l'acridine : Acr-C₃ 7 (Figure 7).

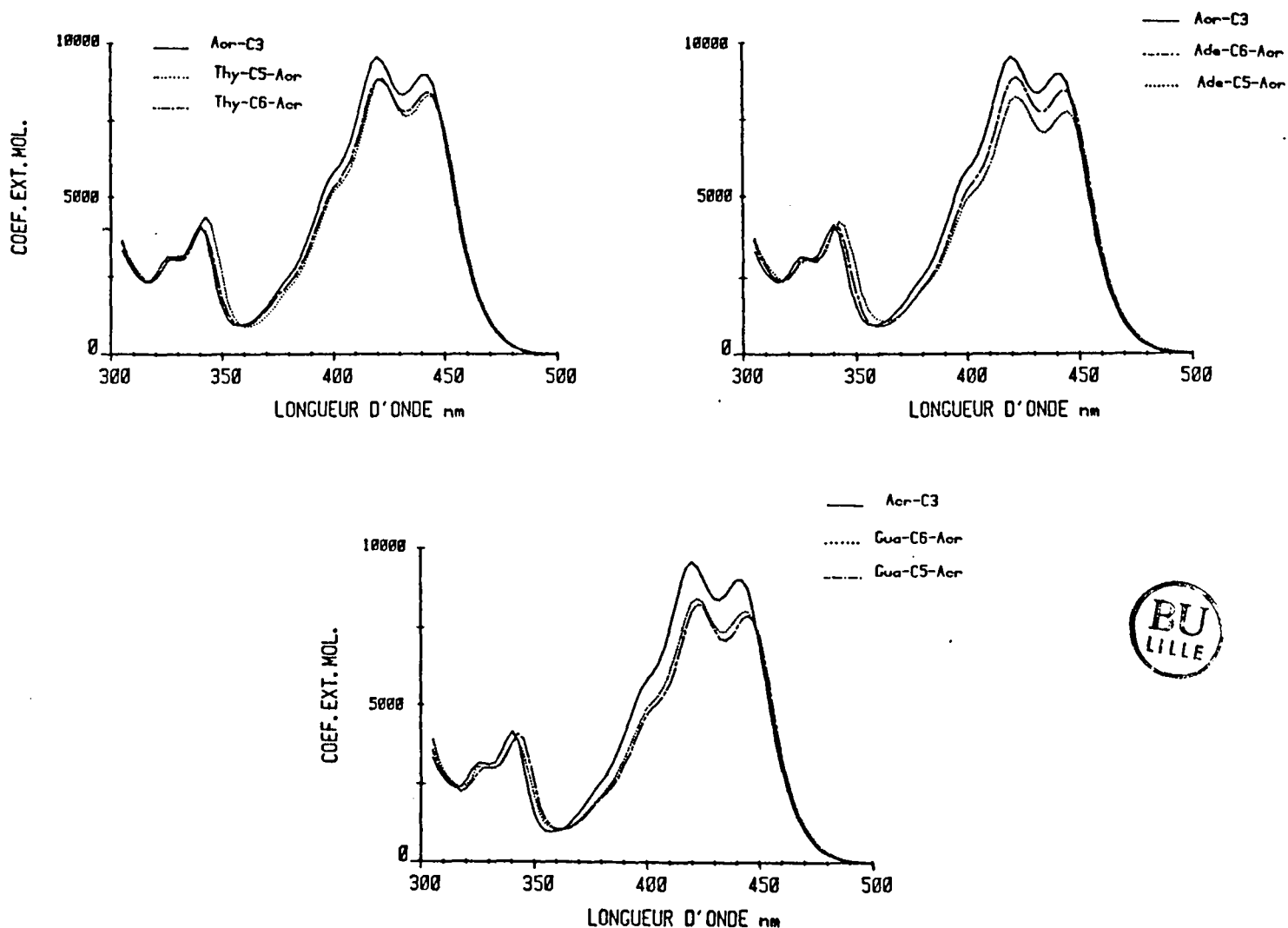


Figure 7 : Spectres d'absorption des modèles Base-C_n-Acr enregistrés entre 500 et 300 nm. Comparaison avec la référence Acr-C₃ 7 (tampon acétate pH=5,5 ; 5 % d'éthanol ; 22°C ; c=8.10⁻⁵M).

Lorsque l'on compare les spectres d'absorption des modèles Base-C_n-Acr avec celui de la référence Acr-C₃ à la même concentration, on constate une très forte diminution de l'intensité d'absorption accompagnée d'un décalage du spectre vers les grandes longueurs d'ondes (Figure 7). Ce phénomène est comparable à celui observé pour la quinacrine intercalée dans l'ADN (Figure 3).

Ces effets, visibles ^{dans} pour tous les systèmes examinés, traduisent l'existence d'interactions noyau-noyau. Nous avons par ailleurs vérifié que dans la gamme de concentration étudiée 1/ les produits suivent la loi de BEER-LAMBERT 2/ un mélange équimoléculaire des composés de référence Acr-C₃ 7 et Base-C₃ 8, 9, 31 présente une absorption égale à la somme des absorptions des deux composants.

La perturbation des spectres d'absorption traduit donc bien une interaction noyau-noyau intramoléculaire. Pour obtenir une mesure quantitative de cette perturbation nous avons calculé la valeur de l'effet hypochrome %H de la manière suivante :

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

Les valeurs calculées pour tous les modèles Base-C_n-Acr considérés sont reportées dans le Tableau 1.

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 1 : Valeurs de %H calculées pour les modèles entre 500 et 360 nm à partir de données indiquées dans la Figure 7.

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

- 1°/ La valeur calculée est significative pour tous les modèles. Ce phénomène rend compte de l'existence d'interactions d'empilement importantes. (Ces valeurs sont à comparer à celles données dans la littérature pour des dinuléosides, qui sont comprises entre 0 et 9 %).

- 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 (29) ainsi que pour des modèles, en d'autres séries, étudiés au laboratoire (22, 23, 76). Dans la plupart des cas, cette diminution de %H a été interprétée comme reflétant un degré de repliement plus faible.
- 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.55) mais à notre connaissance, des variations aussi importantes n'ont jamais été décrites.

Toutefois, ces valeurs ne peuvent pas être interprétées ni comparées directement en termes de degré de repliement des systèmes, dans la mesure où les chromophores impliqués et/ou les géométries des complexes sont différents. Pour ce faire, il serait nécessaire de connaître la valeur de l'effet hypochrome %H correspondant aux systèmes totalement repliés. Pour approcher cette valeur, une étude de l'influence de la température sur l'équilibre conformationnel des modèles a été réalisée.

III. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE :

Nous avons examiné les composés Ade-C_n-Acr 20 et 23, Thy-C₅-Acr 17 et Gua-C_n-Acr 34 et 35.

* Dans tous les cas, on constate une augmentation de l'effet hypochrome %H quand la température diminue et passe de 75°C à 2,5°C. Ceci correspond à l'effet attendu : l'abaissement de la température "gèle" progressivement le système en conformation repliée, ce qui conduit à un accroissement de la valeur de %H.

* Les effets les plus spectaculaires sont observés en série adénine : pour le modèle à chaîne courte Ade-C₃-Acr*, la valeur de %H est élevée (20 %) et reste constante sur toute la gamme de température utilisée. Par contre, pour les homologues à chaîne plus longue, Ade-C₅-Acr 20 et Ade-C₆-Acr 23, on observe une variation linéaire de 75 à 50°C, température à partir de laquelle %H atteint une valeur maximale %H_{max} de 13 % et 7 % respectivement (Figure 8). Ce phénomène est comparable à celui observé avec d'autres intercalants étudiés au laboratoire (22, 23, 76).

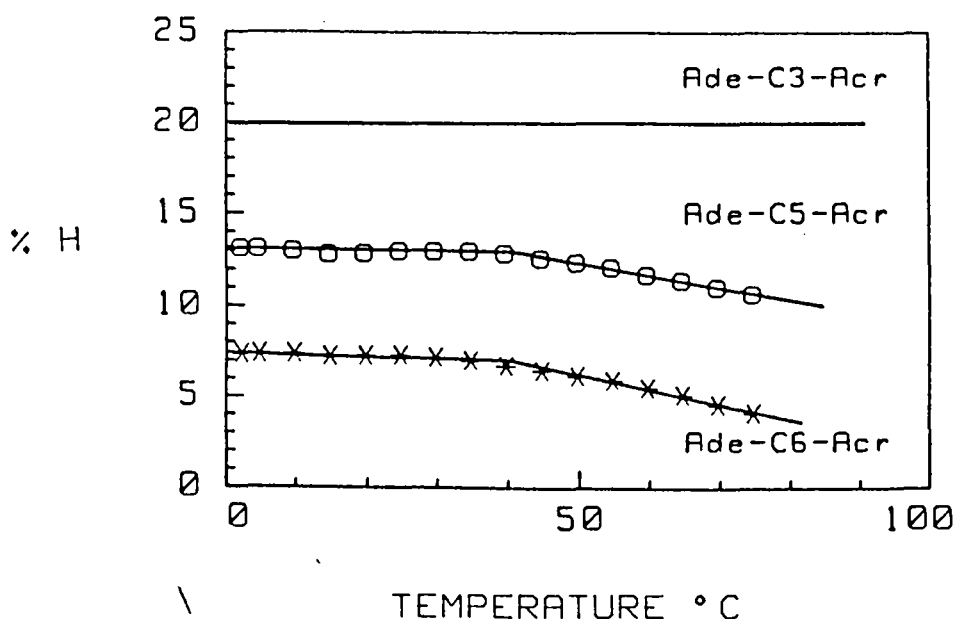


Figure 8 : Effets de la température sur la valeur de %H mesurée pour les modèles Ade-C_n-Acr (n=3,5,6).

Dans la gamme de température pour laquelle %H_{max} n'évolue pas (entre 2,5 et 40°C), le système est considéré comme replié à 100 %. Ceci nous amène à émettre l'hypothèse selon laquelle la valeur de %H_{max} mesurée pour les modèles Ade-C_n-Acr est très variable selon la longueur de la chaîne polyméthylénique (c'est à dire selon la géométrie des formes repliées comme nous le verrons plus loin).

* Ce dérivé a été préparé et étudié antérieurement par J. BOLTE et al. (23).

* Des résultats comparables sont observés en série guanine (Figure 9). La faible solubilité des produits ne nous a pas permis de travailler à basse température. Dans la gamme de température couverte (de 20 à 75°C), on observe un comportement analogue à celui des modèles Ade-C_n-Acr. Les interactions semblent cependant plus faibles, notamment le système Gua-C₆-Acr 35 n'atteint pas la valeur %H_{max} lorsque la température est abaissée de 75 à 20°C.

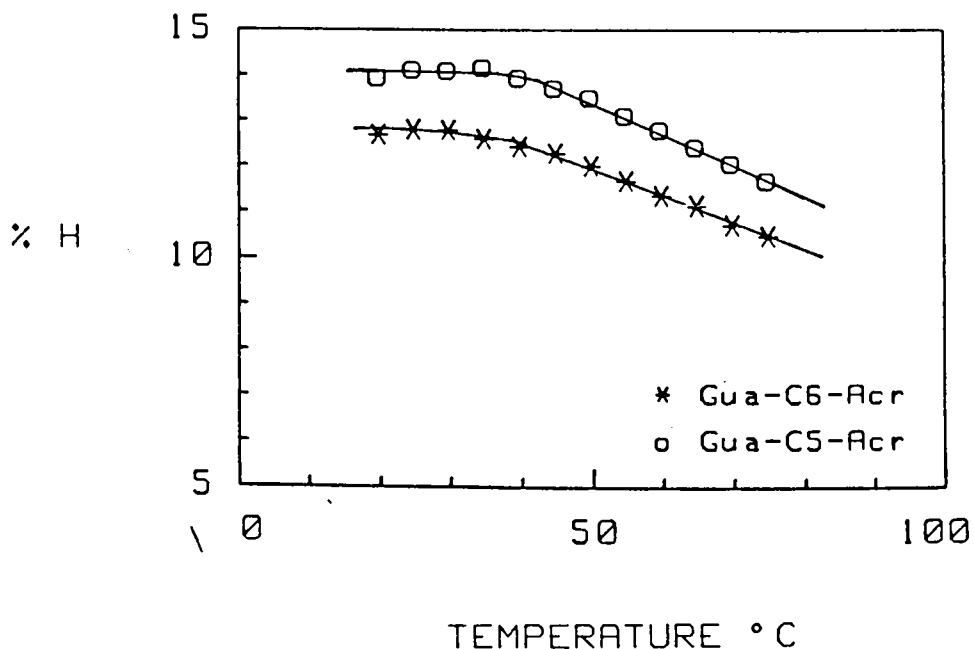


Figure 9 : Effets de la température sur la valeur de %H mesurée pour les modèles Gua-C₅-Acr 34 et Gua-C₆-Acr 35.

* En série thymine, seul le modèle Thy-C₅-Acr 17 a été étudié. Il se comporte d'une manière analogue aux autres séries. Lorsque la température est abaissée de 75°C à 2,5°C, la valeur de %H_{max} = 8 % est atteinte à partir de 30°C environ (Figure 10).

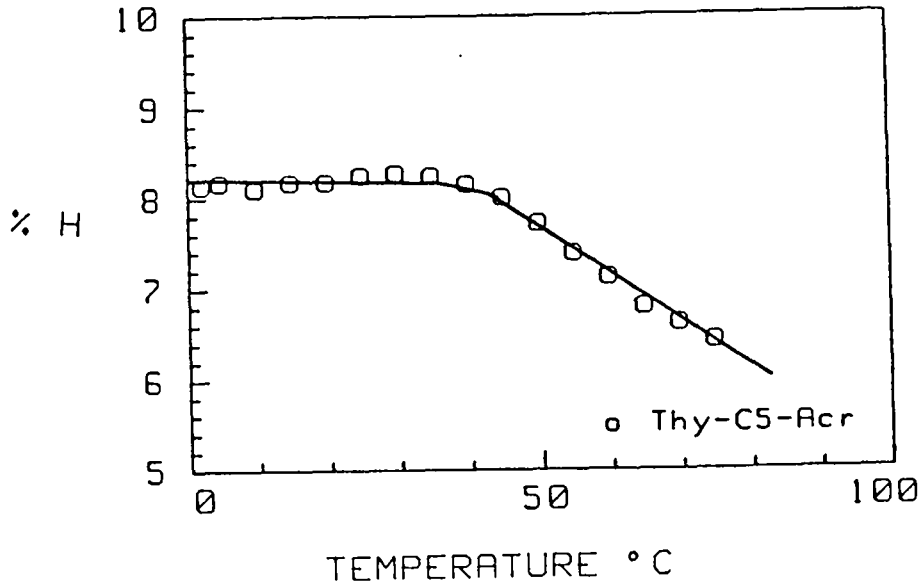


Figure 10 : Effets de la température sur la valeur de %H mesurée pour le modèle Thy-C₅-Acr 14.

L'obtention de %H_{max} nous permet de mener une analyse plus fine et d'évaluer le degré de repliement des systèmes (en décrivant l'équilibre d'une façon simplifiée, qui implique deux états limites formes ouvertes \rightleftharpoons formes repliées). On peut ainsi estimer la constante de cet équilibre K et le degré de repliement des systèmes (%R) par les équations suivantes :

$$K = \frac{(\text{forme ouverte})}{(\text{forme repliée})} = \frac{\%H}{\%H_{\max} - \%H} \quad \text{et} \quad \%R = \frac{\%H}{\%H_{\max}} \times 100$$

Les valeurs %R déterminées pour les modèles Ade-C_n-Acr sont rassemblées dans le Tableau 2. Un tel traitement nous permet d'obtenir un ordre de grandeur de l'état de complexation du système.

Modèles	Température en °C	20	40	60	75
Ade-C ₃ -Acr	%H _{max} =20	100	100	100	100
Ade-C ₅ -Acr	%H _{max} =13	100	100	90	85
Ade-C ₆ -Acr	%H _{max} =7	100	95	75	55

Tableau 2 : Degré de complexation %R des modèles Ade-C_n-Acr (n=3,5,6) à différentes températures.

Acr

La connaissance de la constante d'équilibre K à différentes températures permet de calculer les variations d'enthalpie et d'entropie d'activation du système. On utilise alors la relation :

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

En traçant les courbes de VAN'T HOFF : $\ln K = f(1/T)$, nous pouvons déterminer les valeurs de ΔH° et ΔS° (pour exemple, voir la courbe obtenue pour le modèle Ade-C₆-Acr 23, dans la Figure 11).

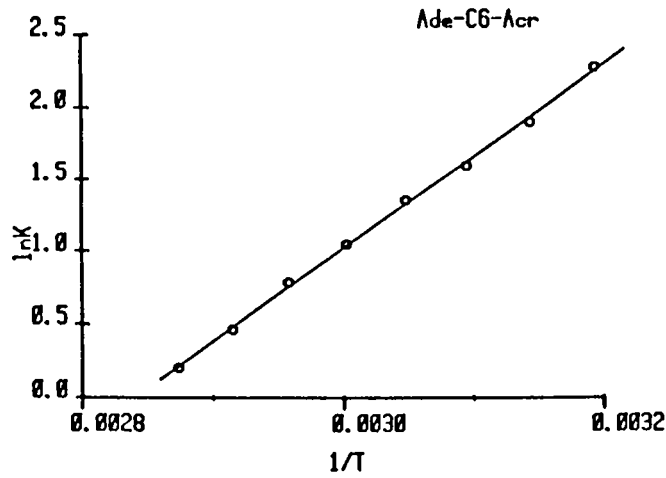


Figure 11 : Variation de $\ln K$ en fonction de $1/T$ pour le modèle Ade-C₆-Acr 23.

Nous avons rassemblé dans le Tableau 3 les caractéristiques des droites de VAN'T HOFF (déterminées par la méthode des moindres carrés) et les paramètres thermodynamiques estimés pour les modèles Ade-C₅-Acr 20 et Ade-C₆-Acr 23.

Modèle	Coefficient de corrélation	Déviations standard	ΔH° KJ. mol ⁻¹	ΔS° J. mol ⁻¹ degré ⁻¹	ΔG° KJ. mol ⁻¹
Ade-C ₅ -Acr	0,996	0,06	-52	-138	-10,9
Ade-C ₆ -Acr	0,999	0,03	-52,7	-150	-7,9

Tableau 3 : Paramètres thermodynamiques de l'équilibre "formes ouvertes \rightleftharpoons formes repliées" déterminées pour les modèles Ade-C₅-Acr 20 et Ade-C₆-Acr 23.

Ade-C₅-Acr Ade-C₆-Acr

Les valeurs de ΔH° et ΔS° mesurées pour le composé Ade-C₅-Acr 20 ($\Delta H^\circ = -52 \text{ KJ mol}^{-1}$; $\Delta S^\circ = -138 \text{ J.mol}^{-1} \text{ degré}^{-1}$) et le dérivé Ade-C₆-Acr 23 ($\Delta H^\circ = -52,7 \text{ KJ.mol}^{-1}$; $\Delta S^\circ = -150,5 \text{ J.mol}^{-1} \text{ degré}^{-1}$) sont voisines de celles déterminées pour un dinucléotide de l'adénine (ApA) : $\Delta H^\circ = -29 \text{ KJ.mol}^{-1}$; $\Delta S^\circ = -92 \text{ J.mol}^{-1} \text{ degré}^{-1}$ (79) et pour un modèle Ade-C₃-Ade étudié au laboratoire ($\Delta H^\circ = -36 \text{ KJ.mol}^{-1}$; $\Delta S^\circ = -90 \text{ J.mol}^{-1} \text{ degré}^{-1}$) (22).

D'autres intercalants étudiés au laboratoire présentent des comportements voisins :

- En série quinoléine (22) pour les modèles Ade-C₃-Qui et Gua-C₃-Qui, on mesure $\Delta H^\circ = -37,5 \text{ KJ.mol}^{-1}$ et $\Delta S^\circ = -100 \text{ J.mol}^{-1} \text{ degré}^{-1}$.
- En série psoralène (76), le composé modèle Ade-C₃-8Pso a pour paramètres thermodynamiques : $\Delta H^\circ = -37,5 \text{ KJ mol}^{-1}$ et $\Delta S^\circ = -100 \text{ J.mol}^{-1} \text{ degré}^{-1}$.

✖ Cette étude par spectroscopie UV a permis de mettre en évidence des conformations repliées pour tous les systèmes examinés, et donc la puissance des interactions mises en jeu.

Notons également les différences d'hypochromicité observées en série adénine selon la longueur de la chaîne pour un même degré de repliement. Nous reviendrons sur cette observation dans les études par RMN.

IV. 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. 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. Ces résultats sont représentés dans la Figure 12.

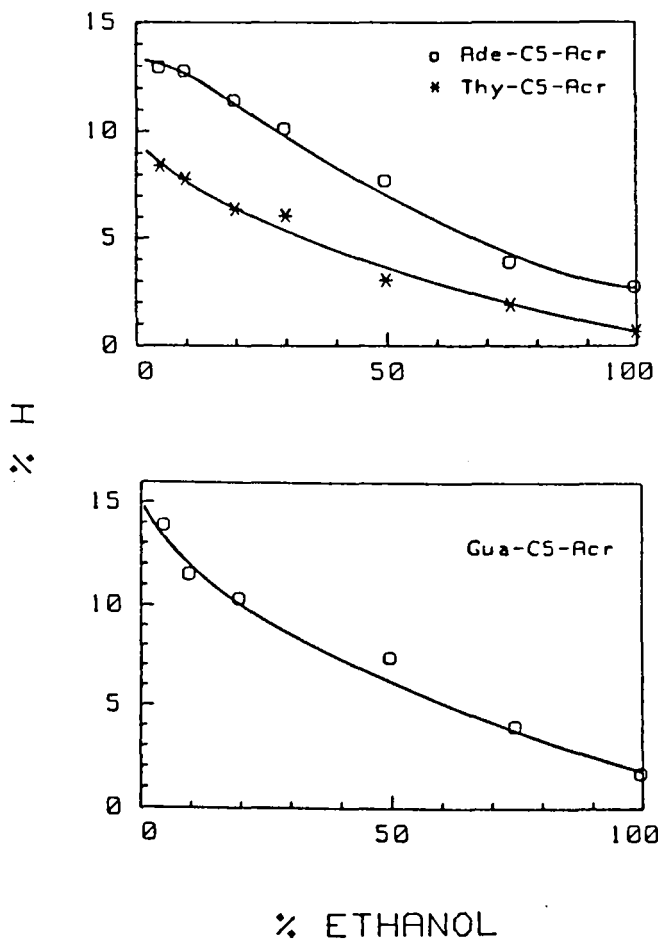


Figure 12 : Variation de l'effet hypochrome %H en fonction de la composition du solvant eau-éthanol ($8 \cdot 10^{-5} M$; $25^{\circ}C$).

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 (0,5 à 3 % selon les modèles). Dans ce solvant, les interactions d'empilement ont donc pratiquement disparu. Le modèle est essentiellement dans une conformation ouverte. Ce comportement est en faveur de la nature hydrophobe des interactions mises en jeu dans la complexation intercalant-base nucléotidique.

Le même phénomène avait été constaté pour d'autres séries d'intercalants étudiés au laboratoire comme l'amino-4 quinoléine (22), et le psoralène (76,80).

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 les conformations repliées de dinucléosides comme ApC et CpA (81). Des études en solution de dinucléotides autocomplémentaires ont permis de "mimer" l'intercalation de molécules à noyau acridine comme la proflavine (71) ou l'amino-9 acridine (70). Les études par RMN à haut champ permettent également de mettre en évidence l'intercalation dans l'ADN (68).

Dans notre cas, cette technique est tout à fait adaptée pour étudier les conformations repliées adoptées par les 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 $\Delta\delta = (\delta_{\text{référence}} - \delta_{\text{modèle}})$.

Cette valeur " $\Delta\delta$ " n'a un sens que dans des conditions où les demi-molécules de référence et les composés modèles sont libres de toute interaction noyau-noyau intermoléculaire. On peut parvenir à ces conditions en menant une étude de l'évolution des déplacements chimiques des produits en fonction de la dilution. La valeur δ_0 à dilution infinie peut-être obtenue graphiquement par extrapolation des courbes expérimentales $\delta = f(c)$. On définit alors $\Delta\delta_0 = \delta_0_{\text{référence}} - \delta_0_{\text{modèle}}$.

Remarquons que la valeur δ_0 peut permettre dans certains cas de déterminer la constante d'auto-association du produit considéré en utilisant la méthode décrite par J.L. DIMICOLI et C. HELENE (82).

II. EFFETS DE LA DILUTION :

les spectres de RMN¹H de tous les dérivés modèles et des composés de référence ont été étudiés à des concentrations variant entre $3 \cdot 10^{-3}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M. En série adénine et thymine, ce travail, complété par la prise de spectres à différentes températures a été réalisé 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 au laboratoire à l'aide d'un spectromètre BRUKER AM 400.

1/ Composés de référence :

a. Bases alkylées : Thy-C₃ 8, Ade-C₃ 9 et Gua-C₃ 31.

Pour ces trois composés, les effets de la dilution sont nuls. Le comportement rend compte d'une auto-association faible. (Les bases nucléotidiques présentent des constantes d'auto-association inférieures à 10 M^{-1} (83)). Les valeurs δ_0 déterminées sont reportées dans le Tableau 4 (p 73).

b. Acr-C₃ 7 :

On observe un effet important de la dilution qui conduit à un déblindage pour tous les protons du système (Figure 13). (Ce comportement est attendu lorsque les agrégats se dissocient). Les valeurs δ_0 obtenues pour les différents protons aromatiques sont réunies dans le Tableau 4 (p. 73). Les valeurs expérimentales sont dans le Tableau 5 (p. 189).

La faible solubilité du produit ($8 \cdot 10^{-4}$ M) ne permet pas de calculer précisément la constante d'auto-association. On peut cependant l'estimer à 400 M^{-1} par analogie avec un composé de structure voisine : la méthoxy-2 chloro-6|(diméthylamino-3 propyl)amino|-9 acridine (84)*.

* La constante d'auto-association de la quinacrine elle-même est environ 500 M^{-1} (85).

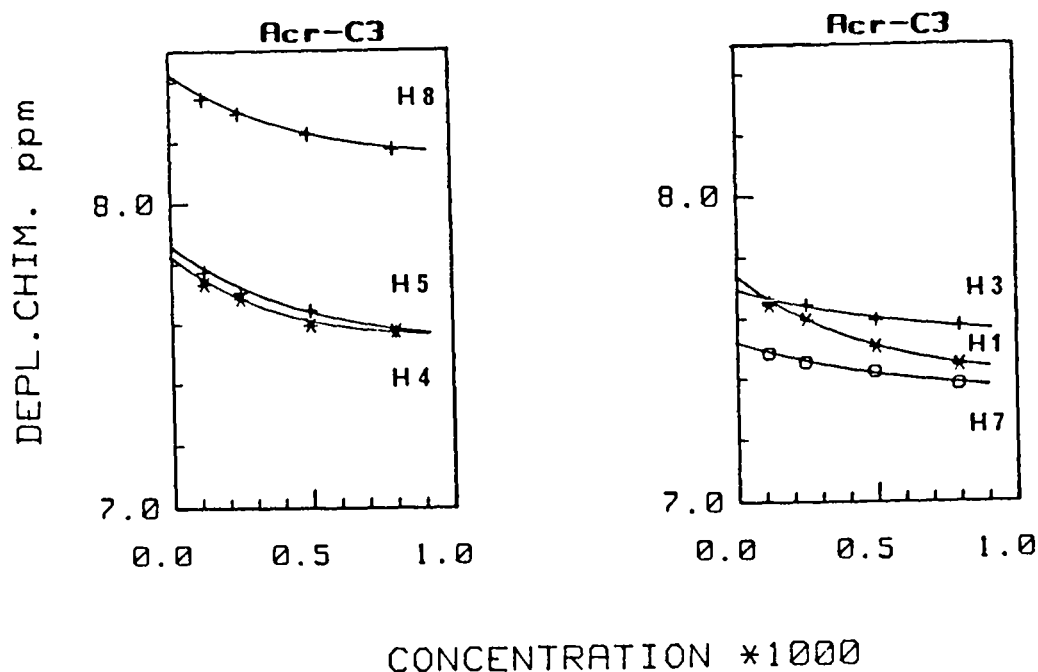


Figure 13 : Variation des déplacements chimiques des protons du composé Acr-C₃ 7 en fonction de la concentration.

2/ Modèles en série thymine (n=5 et 6) :

Les effets de la concentration sont très importants. On constate comme attendu un très net déblindage des protons de l'acridine avec la dilution. Les effets sur le proton H-6 de la thymine et sur le groupement méthyle (non représenté) sont beaucoup plus discrets mais évoluent de manière opposée* (Figure 14).

Les valeurs δ_0 déterminées pour chaque proton aromatique des modèles Thy-C_n-Acr sont rassemblées dans le Tableau 4 (p.73). Les valeurs expérimentales sont réunies dans les Tableaux 6 et 7 (p. 189 et 190).

* Cet effet n'a pas été observé sur les modèles Thy-C₃-Acr et Ade-C₃-Acr précédemment étudiés (23).

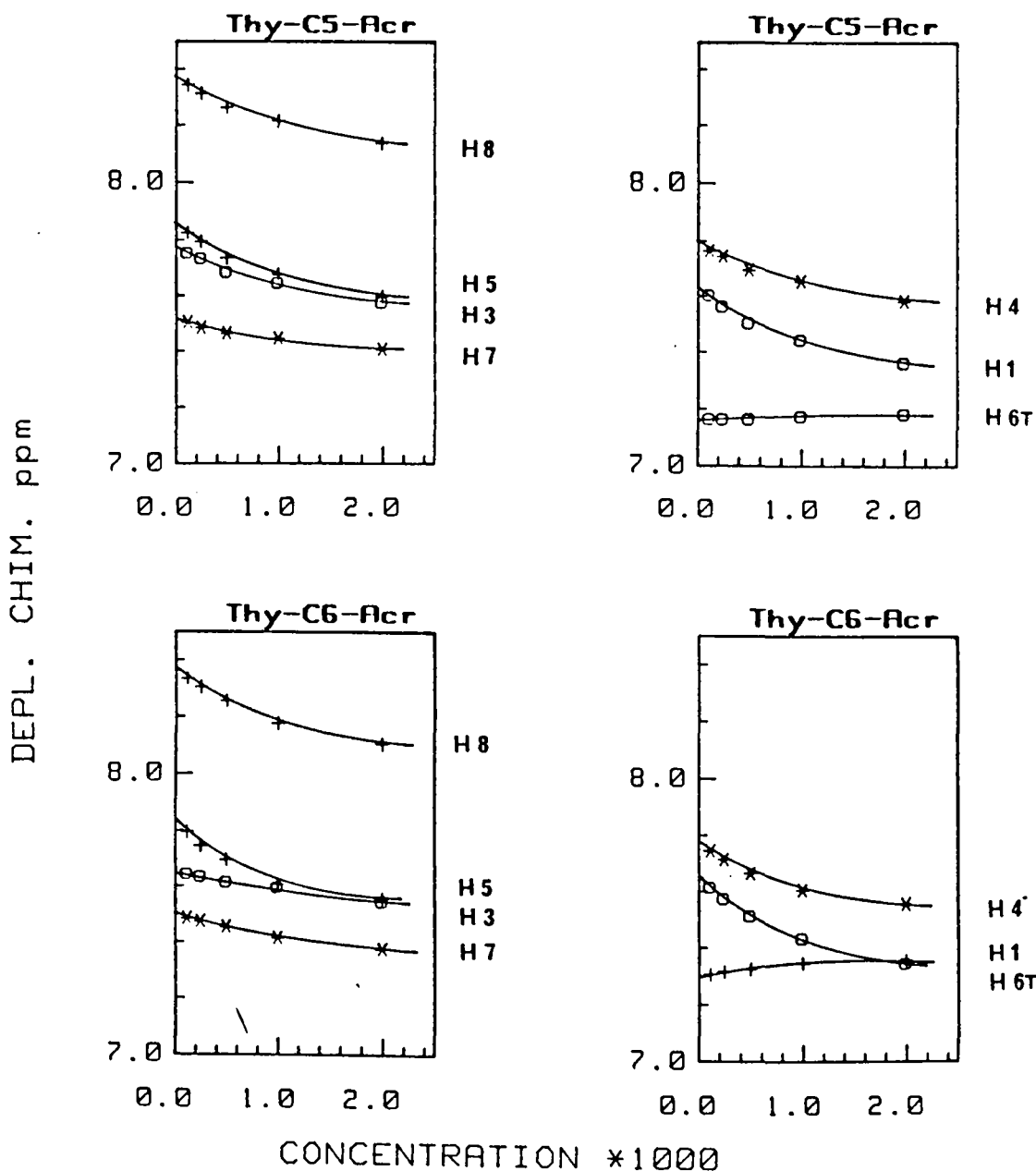


Figure 14 : Variation des déplacements chimiques des protons des composés Thy-C₅-Acr 14 et Thy-C₆-Acr 17 en fonction de la concentration.

3/ Modèles en série adénine(n=5 et 6):

Les effets de la dilution sont très marqués. Nous constatons un important déblindage pour les protons de l'acridine avec la dilution. Les protons H-2 et H-8 de l'adénine au contraire subissent un très net effet de

blindage (Figure 15). Les effets sont de plus grande amplitude sur l'adénine pour le composé à chaîne plus longue*. Les valeurs δ_0 déterminées pour chaque proton sont rassemblées dans le Tableau 4 (p 73). Les valeurs expérimentales sont reportées dans les Tableaux 8 et 9 (p 190 et 191)

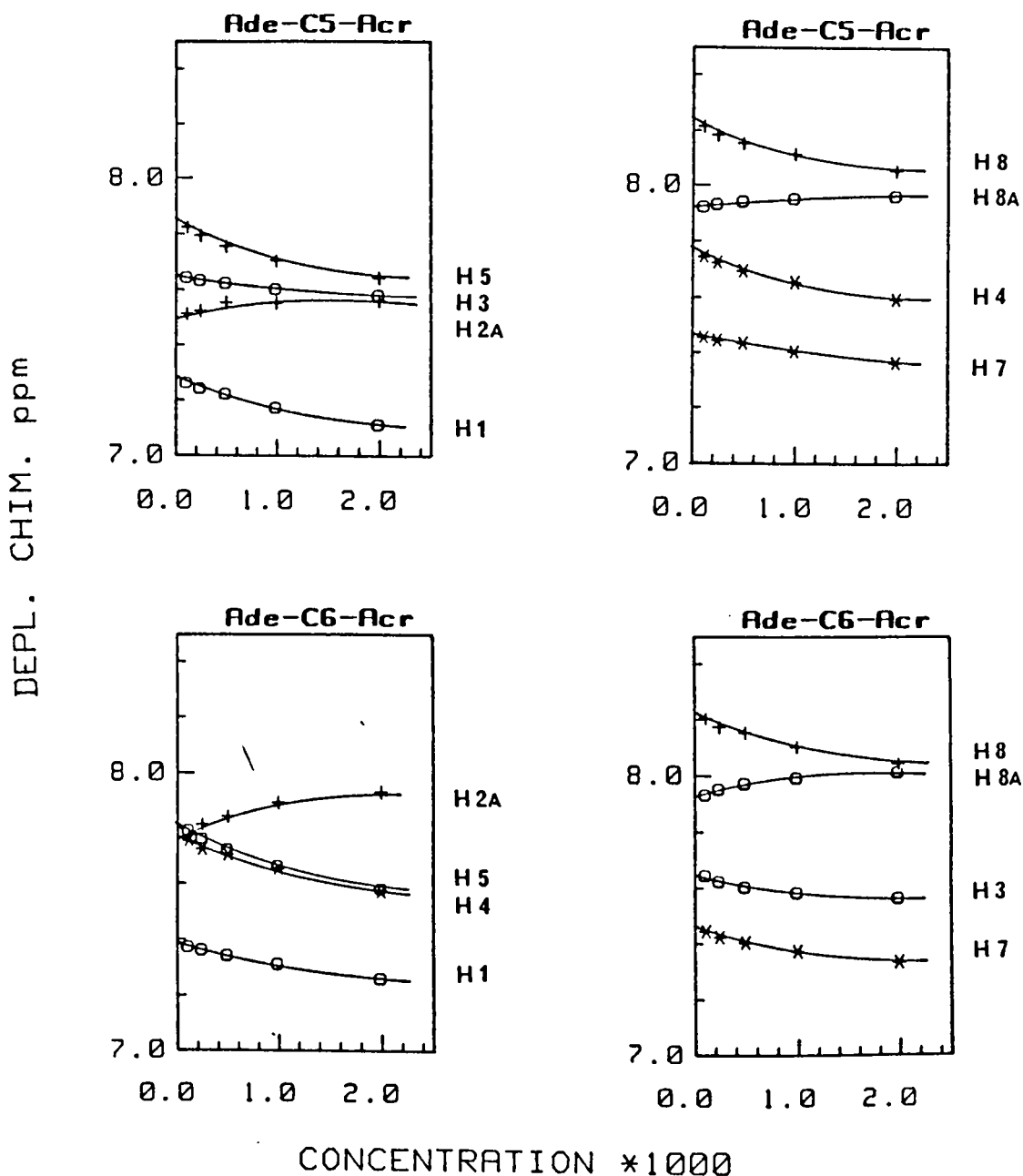


Figure 15 : Variation des déplacements chimiques des protons des composés Ade-C₅-Acr 20 et Ade-C₆-Acr 23 en fonction de la concentration.

* Cet effet n'a pas été observé sur les modèles Thy-C₃-Acr et Ade-C₃-Acr précédemment étudiés. (23)

4/ Modèles en série guanine :

La faible solubilité des produits ne nous a pas permis de travailler dans une gamme de concentration étendue. Les perturbations sont peu importantes mais on constate pour tous les protons un effet de déblindage significatif avec la dilution (Figure 16). A partir de la concentration égale à 3.10^{-6} M, on n'observe plus aucun effet. On peut raisonnablement penser que les valeurs de déplacement chimique observés à cette concentration correspondent aux valeurs δ_0 . Les valeurs de δ_0 pour tous les protons sont rassemblées dans le Tableau 4 (p. 73).

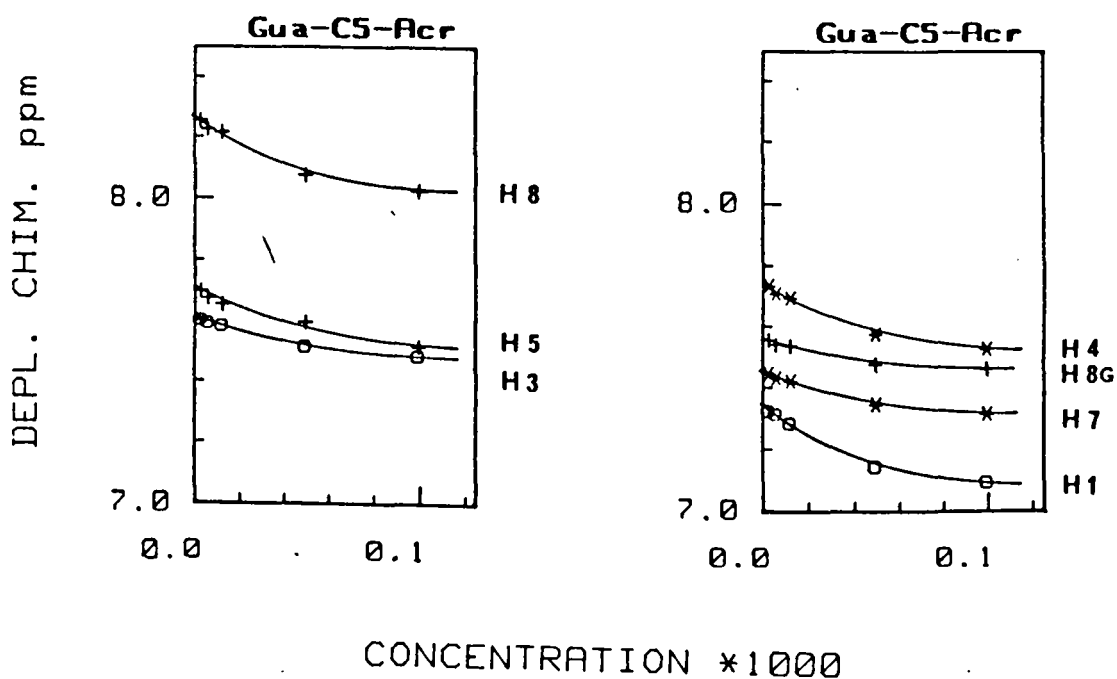


Figure 16 : Variation des déplacements chimiques des protons du composé Gua-C₅-Acr 34 en fonction de la concentration.

Composés	H-1	H-3	H-4	H-5	H-7	H-8	H-2A	H-8A	H-6T	CH ₃ T	H-8G
Ade-C ₃							8,30	8,22			
Thy-C ₃									7,51	1,90	
Gua-C ₃											7,74
Acr-C ₃	7,69	7,67	7,78	7,82	7,51	8,39					
Ade-C ₅ -Acr	7,29	7,66	7,76	7,85	7,46	8,24	7,50	7,92			
Ade-C ₆ -Acr	7,40	7,67	7,78	7,83	7,46	8,23	7,74	7,92			
Thy-C ₅ -Acr	7,65	7,66	7,79	7,86	7,52	8,37			7,16	1,60	
Thy-C ₆ -Acr	7,66	7,66	7,77	7,84	7,49	8,36			7,29	1,65	
Gua-C ₅ -Acr	7,33	7,61	7,73	7,8	7,44	8,25					7,55
Gua-C ₆ -Acr	7,44	7,72	7,71	7,79	7,42	8,23					7,49



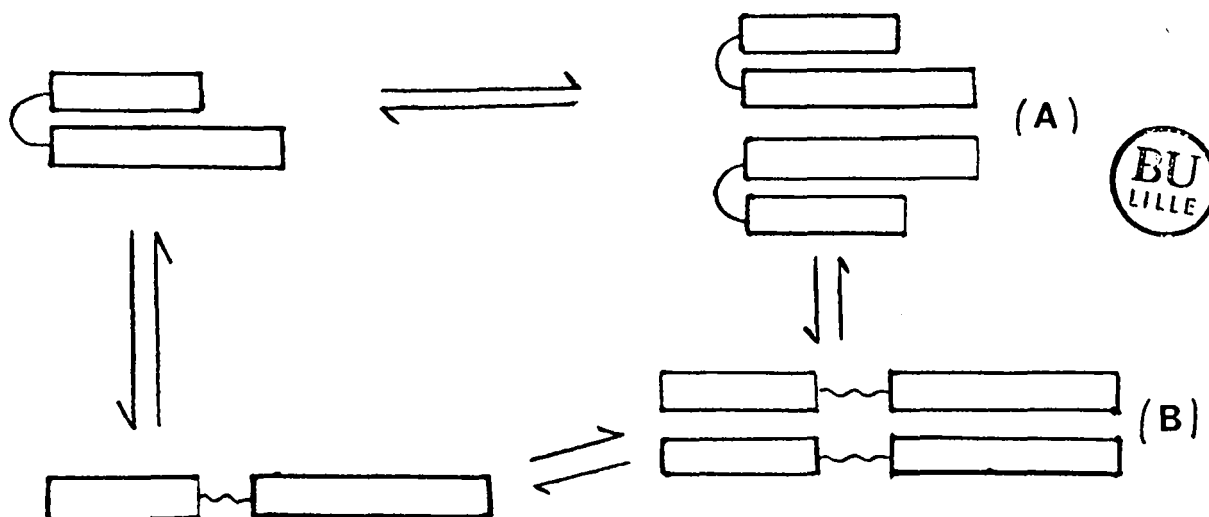
Tableau 4 : Valeurs des déplacements chimiques (en ppm) à dilution infinie (δ_0) obtenues par extrapolation des courbes $\delta=f(c)$ pour les modèles Ade-C_n-Acr, Thy-C_n-Acr et leurs composés de référence Acr-C₃, Ade-C₃, Thy-C₃ (D₂O pD=5,5 ; 270 MHz) et pour les modèles Gua-C_n-Acr et leur composé de référence Gua-C₃ (D₂O pD=5,5 ; 400 MHz).

Au cours de cette étude, il n'a pas été possible de calculer la constante d'auto-association (K_{assoc}) des composés modèles Base-C_n-Acr selon la méthode de J.L. DIMICOLI et C. HELENE (82).

Les équations ont été établies pour des composés interagissant par empilement exclusivement et formant des dimères ou des n-mères sans effet coopératif.

- En série guanine, la gamme de concentration est trop faible pour permettre tout calcul.
- En série adénine et thymine, le phénomène d'auto-association est complexe et met en jeu plusieurs types d'agrégats :

Les dimères de type "acridine-acridine" rendent compte de l'effet de déblindage observé quand on dilue le milieu. Cependant, les effets de blindage observés sur les protons des bases nucléiques nous suggèrent l'existence d'autres types de complexes qui pourraient se former au niveau de l'équilibre "formes ouvertes \rightleftharpoons formes repliées".



La forme (A) rend compte des phénomènes observés avec les systèmes à chaînes courtes. On peut concevoir que la forme (B) devienne favorisée si on dispose de chaînes longues capables de mettre en jeu elles aussi des interactions de type hydrophobe.

III. INTERACTIONS INTRAMOLECULAIRES :

Connaissant les déplacements chimiques extrapolés à dilution infinie (δ_0) pour les modèles Base-C_n-Acr et leurs composés de référence, nous pouvons calculer les effets de blindage $\Delta\delta_0 = \delta_0^{\text{référence}} - \delta_0^{\text{modèle}}$, liés au processus d'interaction intramoléculaire.

Les valeurs de δ_0 calculées sont rassemblées dans le Tableau 10.

Composé	H-1	H-3	H-4	H-5	H-7	H-8	H-2A	H-8A	H-6T	CH ₃ T	H-8G
Ade-C ₃ -Acr	0,48	0,00	0,04	-0,02	-0,01	0,22	0,75	0,21			
Ade-C ₅ -Acr	0,40	0,01	0,02	-0,03	0,05	0,15	0,80	0,30			
Ade-C ₆ -Acr	0,29	0,00	0,00	-0,01	0,05	0,16	0,56	0,30			
Thy-C ₃ -Acr	0,07	0,00	-0,01	-0,05	-0,02	0,07			0,38	0,44	
Thy-C ₅ -Acr	0,04	0,01	-0,01	-0,04	-0,01	0,02			0,35	0,30	
Thy-C ₆ -Acr	0,03	0,01	0,01	-0,02	0,02	0,03			0,22	0,25	
Gua-C ₅ -Acr	0,36	0,06	0,05	0,02	0,07	0,14					0,19
Gua-C ₆ -Acr	0,25	-0,05	0,07	-0,03	0,09	0,16					0,25



Tableau 10 : Valeurs $\Delta\delta_0 = \delta_{\text{référence}} - \delta_0$ modèle calculées pour les différents protons des modèles Base-C_n-Acr.

Un premier examen de ce tableau montre que pour tous les modèles, les effets de blindage ($\Delta\delta_0$ positif) sont très importants, ce qui démontre sans ambigüité l'existence d'interactions intramoléculaires, et confirme les conclusions de l'étude par spectrophotométrie UV.

* En série adénine et pour les trois longueurs de chaîne, on relève des valeurs de $\Delta\delta_0$ importantes pour les deux protons de l'adénine H-2 et H-8 (jusqu'à 0,8 ppm). De la même manière, on constate des perturbations importantes sur certains protons de l'acridine (jusqu'à 0,48 ppm pour H-1 et H-8 essentiellement). Il est également intéressant de remarquer que lorsque la longueur de la chaîne passe de 3 à 6 chaînons, les protons les plus perturbés n'évoluent pas tous dans le même sens. Ce comportement est à mettre en relation avec les effets de géométrie qui seront discutés plus loin.

d'eto...

* En série Thymine, les effets les plus marqués sont mesurés sur le noyau de la thymine c'est à dire sur son proton H-6 et sur le groupement méthyle en position 5 (jusqu'à 0,44 ppm). L'influence sur l'acridine est peu marquée, ceci n'a rien détonnant, compte tenu de la faiblesse du courant de cycle de la thymine. Les valeurs de blindage les plus fortes sont mesurées sur les protons H-1 et H-8. Elles ne sont cependant pas significatives pour les modèles à longue chaîne.

* En série guanine, les effets de blindage sont importants, surtout pour le proton H-8 de la guanine et sur les protons H-1 et H-8 de l'acridine. Les valeurs sont du même ordre de grandeur que celles mesurées en série adénine. *de*

1/ Effet de la température :

Comme nous l'avons vu précédemment, pour mesurer les interactions intramoléculaires avec précision, il faut s'affranchir du problème des agrégats. Dans un premier temps, nous avons donc tenté d'évaluer la contribution des agrégats dans l'évolution des déplacements chimiques du produit de référence Acr-C₃ 7 (qui a sans doute la constante d'auto-association la plus forte). Pour cela, une étude a été réalisée à deux concentrations différentes : $2 \cdot 10^{-3}$ M et $5 \cdot 10^{-4}$ M en faisant varier la température de 25 à 92°C. Pour les deux concentrations, les déplacements chimiques évoluent de la même manière : déblindage quand la température augmente.

A 92°C, on atteint dans les deux cas la valeur δ_0 extrapolée à dilution infinie à 25°C (figure 17). Ceci implique que très vraisemblablement, les agrégats sont complètement dissociés.

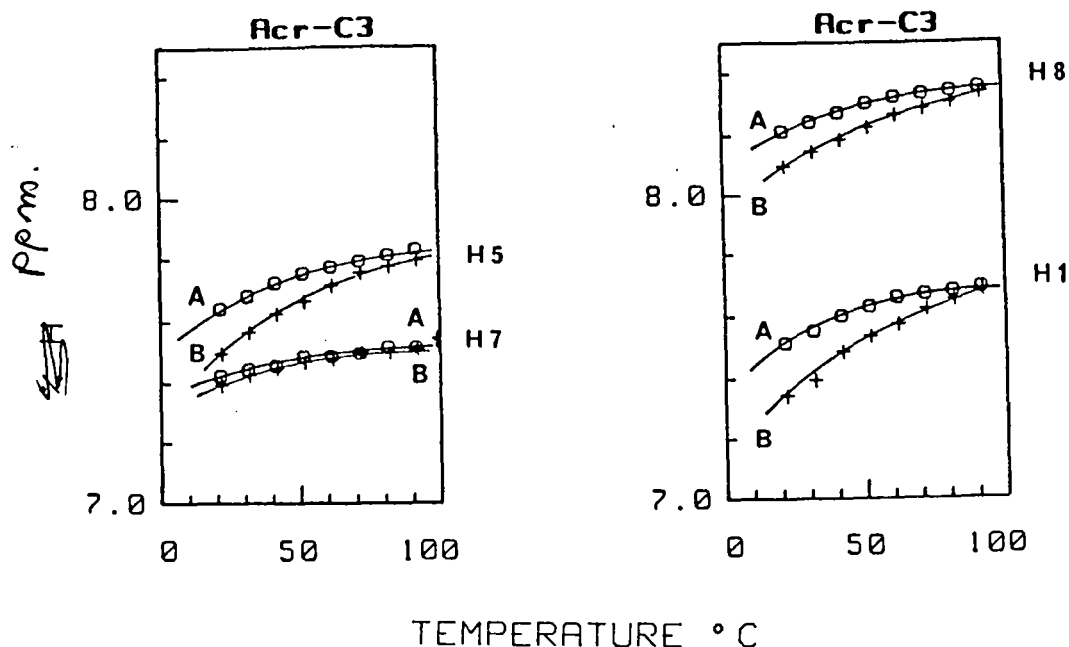


Figure 17 : Evolution des déplacements chimiques des protons du dérivé Acr-C₃ en fonction de la température (A) $c=5.10^{-4}$ M (B) $c=2.10^{-3}$ M.

Pour évaluer les effets de la température sur le repliement des composés Base-C_n-Acr, nous avons donc enregistré les spectres des modèles et des composés de référence à la concentration égale à 5.10^{-4} M, à 92°C. Les différences de déplacements chimiques entre la référence et le modèle à cette température sont reportées dans le Tableau 11 et comparées avec les effets mesurés à 25°C (à partir des valeurs de déplacements chimiques extrapolées à dilution infinie).

En premier examen du tableau 11 (p. 78), nous voyons que les effets de blindage restent très importants pour tous les systèmes considérés.

- En série adénine, pour le modèle Ade-C₃-Acr, les effets mesurés à 25 et à 92°C sur le modèle Ade-C₃-Acr sont invariants. Ils sont plus faibles à 92°C pour les deux modèles à longue chaîne.
- En série thymine, on constate une faible diminution de la valeur de blindage pour le modèle Thy-C₃-Acr. Pour les systèmes à 5 et 6 chaînons, la diminution est plus importante.

Composé	Temps °C	H-1	H-3	H-4	H-5	H-7	H-8	H-2A	H-8A	H-6T	CH ₃ T
Thy-C ₃ -Acr	25(a)	0,07	0,00	-0,01	-0,05	-0,02	0,07			0,38	0,44
	92(b)	0,08	0,00	0,01	-0,01	-0,01	0,07			0,33	0,35
Thy-C ₅ -Acr	25(a)	0,04	0,01	-0,01	-0,04	-0,01	0,02			0,35	0,30
	92(b)	0,02	-0,01	-0,03	-0,04	-0,01	0,01			0,25	0,19
Thy-C ₆ -Acr	25(a)	0,03	0,01	0,01	-0,02	0,02	0,03			0,22	0,25
	92(b)	-0,01	-0,01	-0,03	0,01	-0,01	0,00			0,16	0,12
Ade-C ₃ -Acr	25(a)	0,48	0,00	0,04	-0,02	-0,01	0,22	0,75	0,21		
	92(b)	0,44	0,04	0,07	0,05	0,07	0,29	0,64	0,28		
Ade-C ₅ -Acr	25(a)	0,40	0,01	0,02	-0,03	0,05	0,15	0,80	0,30		
	92(b)	0,25	0,01	-0,04	-0,01	0,04	0,16	0,51	0,26		
Ade-C ₆ -Acr	25(a)	0,29	0,00	0,00	-0,01	0,05	0,16	0,56	0,30		
	92(b)	0,14	0,01	0,00	0,00	0,05	0,12	0,26	0,19		



Tableau 11 : Différences de déplacement chimique $\Delta\delta$ mesurées à 25°C et à 92°C pour les modèles Ade-C_n-Acr (n=3,5,6) et Thy-C_n-Acr (n=3,5,6).

- * (a) $\Delta\delta_x = \delta_o \text{ référence} - \delta_o \text{ modèle} = \Delta\delta_o$ (valeur extrapolée à dilution infinie).
 (b) $\Delta\delta = \delta \text{ référence} - \delta \text{ modèle}$ (c=5.10⁻⁴M).

Si on admet qu'à la température de 92°C, les agrégats ont été dissociés, les valeurs $\Delta\delta$ calculées à cette température ne peuvent être que le reflet des interactions d'empilement intramoléculaires. Il devient alors possible de mener une analyse plus fine du phénomène, du moins pour les modèles de type Ade-C_n-Acr pour lesquels on dispose du maximum de données.

On peut, à l'aide d'un calcul simple, estimer le pourcentage de forme repliée (%R) à 92°C (en admettant un repliement total à 25°C) :

$$\%R = \frac{\Delta\delta \text{ à } 92^\circ\text{C}}{\Delta\delta_o \text{ à } 25^\circ\text{C}} \times 100$$

avec $\Delta\delta = \delta \text{ référence} - \delta \text{ modèle}$ (les deux composés étant étudiés à la même concentration).

et $\Delta\delta_o = \delta_o \text{ référence} - \delta_o \text{ modèle}$ (δ_o étant la valeur de déplacement chimique extrapolée à dilution infinie).

Nous avons appliqué ce calcul aux différents protons concernés (H-8, H-2A et H-8A en série adénine et H-6T, CH₃T en série thymine) et établi une valeur moyenne pour chacun des modèles. Les valeurs de %R obtenues sont rassemblées dans le Tableau 12.

Pour comparer ces résultats avec ceux de la spectrophotométrie UV, nous avons utilisé les valeurs %R obtenues à partir des courbes %H = f(T) que nous avons extrapolées à 92°C. Ces valeurs sont également rassemblées dans le Tableau 12.

	Ade-C ₃ -Acr	Ade-C ₅ -Acr	Ade-C ₆ -Acr	Thy-C ₅ -Acr
: %R (Données UV)	100	75	50	70
: %R (Données RMN ¹ H)	100	70	50	65



Tableau 12 : Pourcentages de formes repliées (%R) à 92°C, calculés pour les modèles Ade-C_n-Acr (n=3,5,6) et Thy-C₅-Acr, à partir des données des spectroscopies UV et de RMN¹H.

On constate une remarquable convergence entre les résultats obtenus à l'aide de ces deux techniques spectroscopiques. Ceci confirme notamment que les modèles considérés sont totalement repliés à 25°C.

2/ Géométrie des systèmes repliés :

Connaissant les valeurs de blindage $\Delta\delta_0$ induites par l'empilement de deux chromophores (à 25°C), nous pouvons proposer une géométrie pour le complexe intra-moléculaire formé. Nous disposons pour cela de deux outils :

- Les courbes d'iso-écran ont été calculées pour les bases nucléotidiques et l'acridine par B. PULLMANN et G. GIESSNER-PRETTRE (86). Elles indiquent les effets de blindage ($\Delta\delta$) que ces deux noyaux peuvent induire sur les protons d'un chromophore empilé (et donc situé dans un plan parallèle distant de 3,4 Å).

- Les modèles moléculaires compacts CPK donnent des renseignements sur les conformations permises par la chaîne carbonée.

a. Série adénine :

C'est le cas le plus favorable. L'adénine et l'acridine possèdent un courant de cycle important et induisent des effets de blindage très marqués comme le révèlent les courbes d'iso-écran (reproduites dans la Figure 18).

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 18 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 18) sont le résultat du meilleur ajustement des valeurs expérimentales et théoriques.

\On remarquera dans les structures proposées que le groupement amino de l'adénine et l'azote hétérocyclique de l'acridine (protoné dans ces conditions) sont superposés et que l'allongement de la chaîne polyméthylénique entraîne une rotation progressive des deux chromophores l'un par rapport à l'autre. Si on fait passer une première droite par l'atome de carbone C-8 de l'adénine et le centre de la liaison N-1, C-2 et une autre droite par les centres des liaisons C-2, C-3 et C-6, C-7 de l'acridine, on peut également définir les changements d'orientation des chromophores par la valeur de l'angle formé par l'intersection de ces deux droites. On peut illustrer cela de la manière suivante :

En d'autres termes, l'allongement de la chaîne de trois à cinq chaînons s'accompagne d'une rotation d'une vingtaine de degrés de l'axe de l'adénine vers celui de l'acridine. Quand on ajoute un autre chaînon, la rotation se poursuit dans le même sens d'un angle comparable.

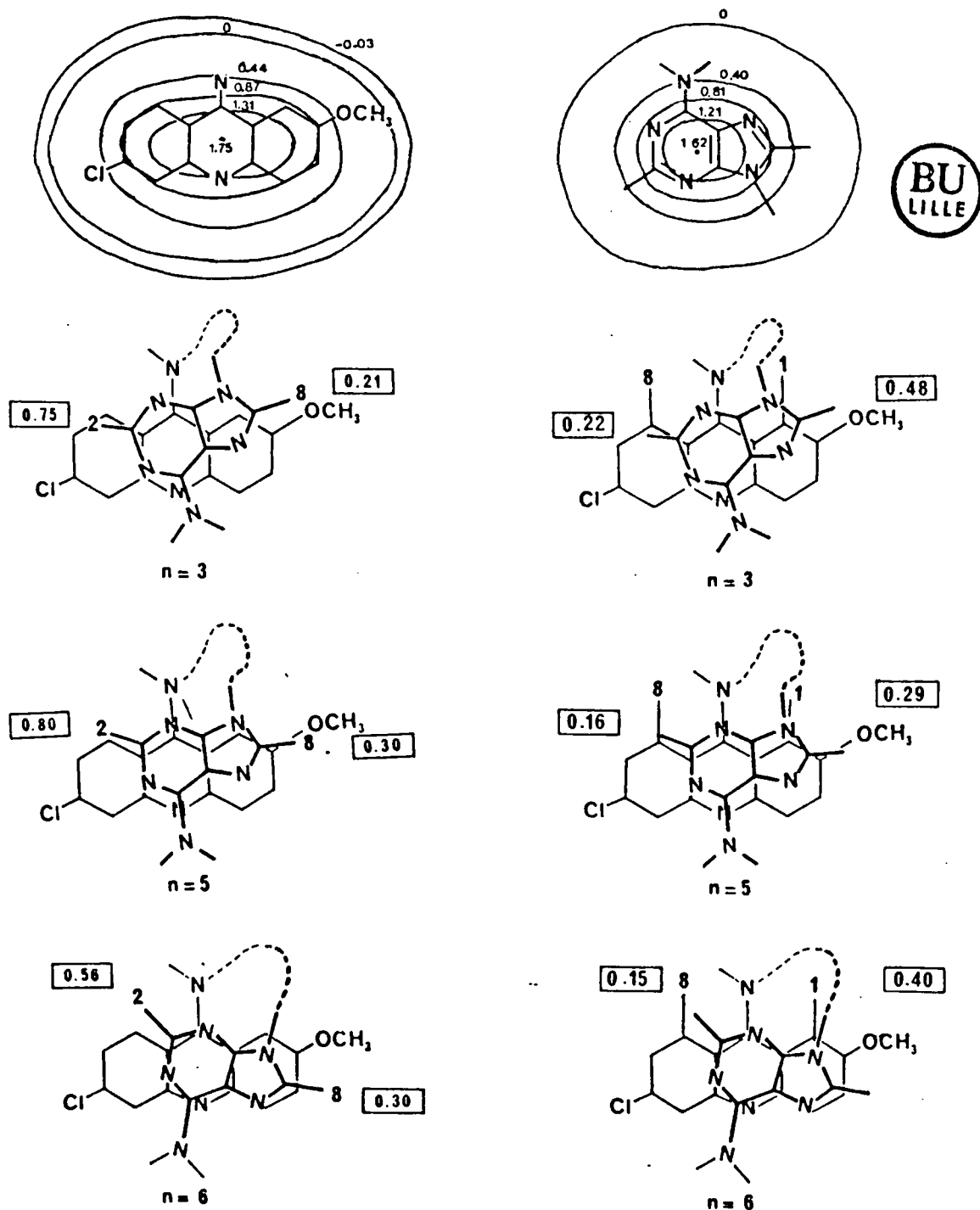


Figure 18 : Structures proposées pour les modèles Ade-C_n-Acr (n=3,5,6) par ajustement des $\Delta\delta_0$ mesurés expérimentalement avec les valeurs théoriques données par les courbes d'isoécran de B. PULLMAN et G. GIESSNER-PRETTRE (86).

Rappelons à ce propos le résultat de l'étude par spectrophotométrie UV : les effets hypochromes correspondant à des systèmes totalement repliés sont très différents selon la longueur de la chaîne.

pour $n = 3$: %H = 20

pour $n = 5$: %H = 13

pour $n = 6$: %H = 7.

Il semble donc que pour l'ensemble des modèles, la grandeur de l'effet hypochrome (%H) soit directement, et de façon spectaculaire, fonction de l'orientation relative des deux chromophores. Ce résultat est en accord avec la théorie de l'effet hypochrome. C'est à notre connaissance la première fois qu'un tel effet est mis en évidence*.

b. Série Guanine :

Là encore, les deux chromophores possèdent des courants de cycle importants mais le noyau de la guanine ne peut être "ajusté" que par l'examen d'un seul site : le proton H-8. Il s'ensuit que la détermination de la géométrie est moins précise que pour la série adénine. En outre, l'état de ce système est moins bien connu. Les études par spectrophotométrie UV ont montré que le modèle Gua-C₅-Acr est replié à 100 %, ce qui ne peut être affirmé pour le modèle Gua-C₆-Acr (les valeurs %H mesurées à 25°C sont respectivement 14 et 13 %). Néanmoins, les trois protons les plus perturbés : H-1 et H-8 de l'acridine, H-8 de la guanine nous permettent de proposer les géométries indiquées dans la Figure 19.

* Dans leur étude de purinophanes (cyclophanes mettant en jeu des purines), Y. SAKATA et al. (87) ont également observé des valeurs de %H très différentes quand deux purines sont en interaction. Cependant, dans tous les cas décrits, il s'agit de systèmes contraints où des facteurs complémentaires tels que tension, écartement inter-noyaux...interviennent.

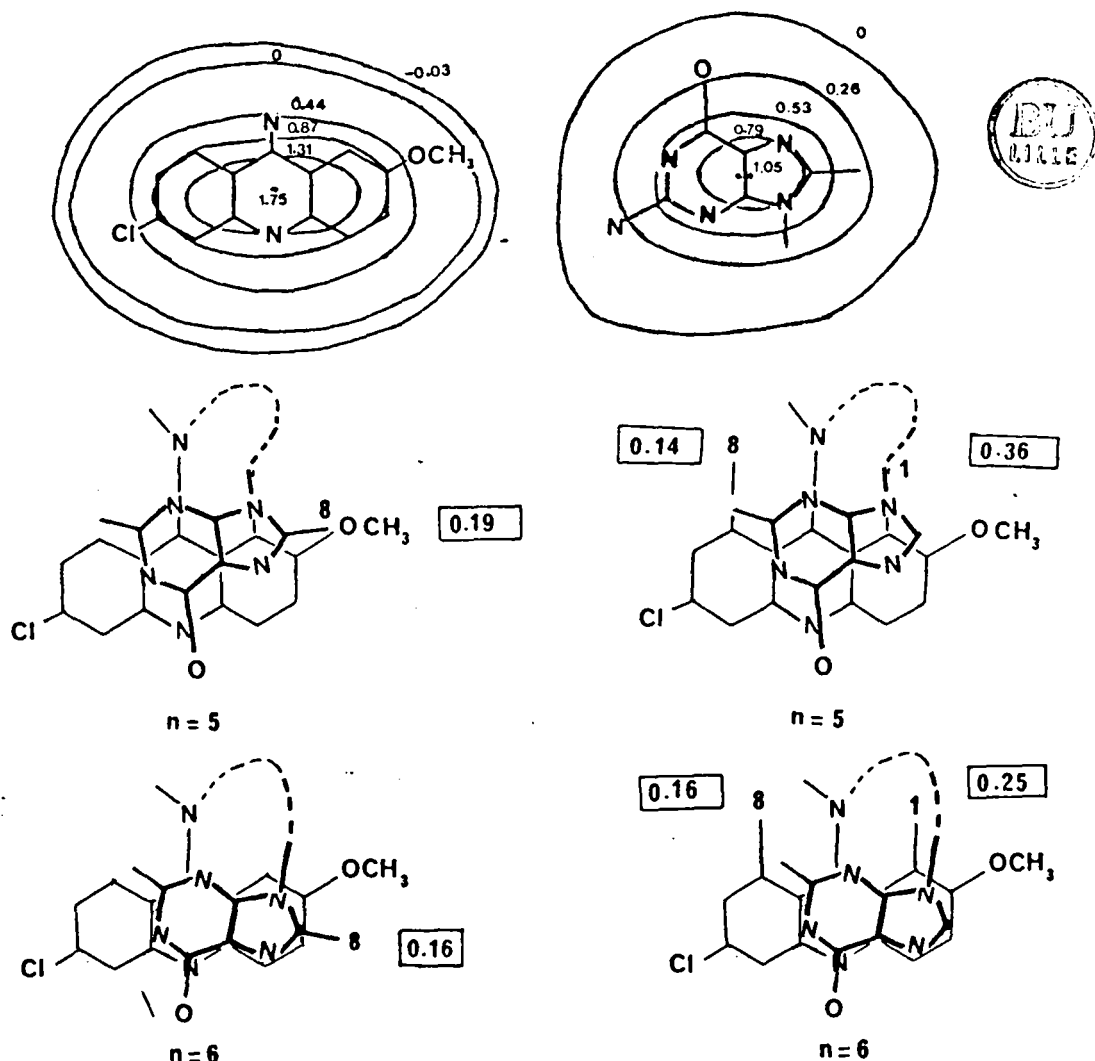


Figure 19 : Structures proposées pour les modèles Gua-C_n-Acr (n=5,6) par ajustement des $\Delta\delta_0$ mesurés expérimentalement avec les valeurs théoriques données par les courbes d'iso-écran de B. PULLMAN et G. GEISSNER-PRETTRE (86).

c. Série Thymine :

C'est le cas le plus défavorable, la thymine n'induisant aucun effet significatif sur les protons de l'acridine en raison de la faiblesse de son courant de cycle. Les effets de l'acridine sur les protons de la thymine sont importants, mais ne permettent pas de proposer une géométrie précise pour les conformations repliées des modèles Thy-C_n-Acr.

Nous avons par ailleurs mené une étude du modèle Thy-C₅-Acr dans D₂O en utilisant la technique de NOE par différence. Nous avons essayé de mettre en évidence un effet de proximité entre les protons de la thymine et un ou plusieurs protons de l'acridine. Nous avons irradié successivement les protons du groupement méthoxy porté par le C-2 de l'acridine, le proton H-8 de l'acridine et le groupement méthyle de la thymine. Dans aucun cas, nous n'avons pu observer de perturbation significative sur les protons du chromophore voisin.

3/ Etude à l'état solide :

Nous avons tenté d'examiner la conformation adoptée par les systèmes Base-C_n-Acr à l'état solide. D'une façon générale, et comme nous l'avons signalé au cours de la synthèse, ces molécules cristallisent difficilement et sont recueillies sous forme de poudres. Seul le composé Thy-C₅-Acr a pu être cristallisé dans le méthanol. On obtient des microcristaux à structure en "chevrons" dans laquelle le modèle adopte une conformation ouverte (Figure 20) (88) (travail réalisé à Bordeaux par C. COURSEILLE).

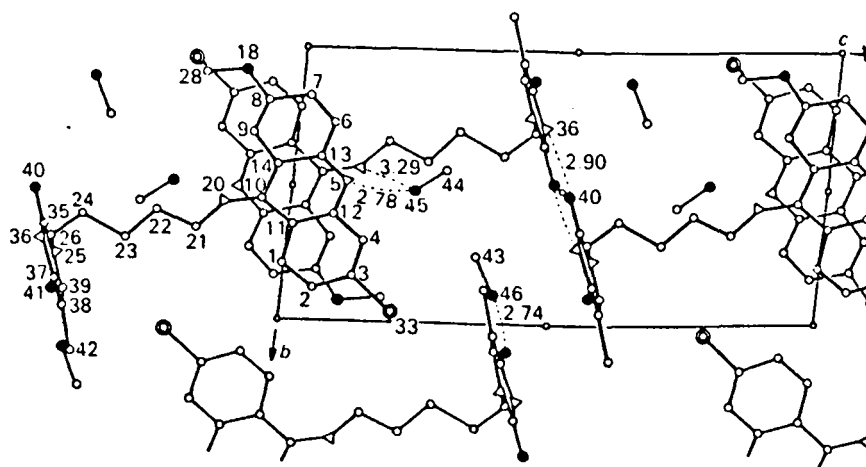


Figure 20 : Structure cristallographique du modèle Thy-C₅-Acr. Solvant : méthanol (88).

C. ETUDES PAR FLUORESCENCE :

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 (89-95).

Pour tenter d'expliquer ce phénomène, 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. Le phénomène de "quenching" (67, 96-100).

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 (49,94), (la probabilité plus faible d'observer quatre couples dA-dT consécutifs expliquant l'extinction dans l'ADN).

D'autres auteurs ont utilisé l'iodure de sodium pour inhiber la fluorescence de la quinacrine intercalée. Ils ont pu montrer que le noyau de l'acridine est moins accessible lorsqu'il est complexé avec les séquences de type dA-dT qu'avec les séquences dG-dC (99,100).

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 9-amino acridine provoquent une diminution de l'intensité de sa fluorescence (101-103). Des travaux plus récents font état d'une hétérogénéité des sites de fixation possibles de la quinacrine. La complexation serait dominée par les séquences pyr-pur et pur-pyr (104), celles-ci interagissant plus fortement avec le noyau acridine que les séquences pur-pur et pyr-pyr. De même, les séquences dG-dC, responsables de l'extinction de la fluorescence de la quinacrine, se complexeraient trois fois plus fortement avec l'intercalant que les séquences dA-dT responsables de l'exaltation de fluorescence (105). Remarquons toutefois que ces résultats sont en désaccord avec ce qui est généralement admis dans la littérature c'est à dire qu'il n'y a aucune spécificité d'interaction de la quinacrine vis-à-vis des bases nucléotidiques.

Toutes ces méthodes n'ont jamais permis d'étudier spécifiquement la fluorescence du noyau acridine en interaction avec le noyau d'une seule base nucléotidique.

Les modèles de type Base-C_n-Acr que nous avons synthétisés sont 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. L'étude par fluorescence de ces structures dans leur conformation repliée pourrait contribuer à la compréhension du phénomène observé quand la quinacrine est intercalée dans les oligo et poly-nucléotide.

ETUDES DES MODELES :

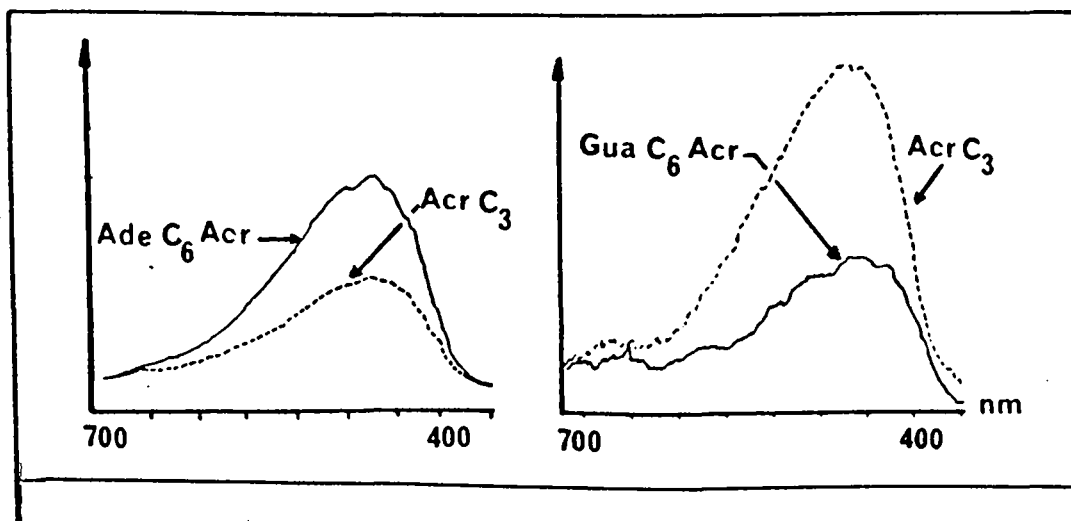
Dans cette étude préliminaire, nous avons examiné les spectres d'émission de fluorescence de l'acridine pour les composés modèles Base-C_n-Acr et leur référence Acr-C₃ 7. Nous avons utilisé les mêmes solvants que pour la spectrophotométrie UV (solvant non dégazé). La concentration du composé de référence est de l'ordre de 8.10^{-5} M. Celle des modèles varie de 2,4 à $6,3.10^{-5}$ M.

Par ailleurs, 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. Les spectres d'émission obtenus pour les modèles Thy-C₆-Acr 17, Ade-C₆-Acr 23 et Gua-C₆-Acr 35 sont rassemblés dans la figure 21.

Dans ces conditions, nous voyons que la fluorescence de l'acridine est fortement exaltée dans les modèles Ade-C₆-Acr 23 et Thy-C₆-Acr 17 alors qu'elle diminue de façon spectaculaire 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 13.

Composé	$\phi_F \cdot 10^{-2}$	λ_{max}	ϕ_F modèle	ϕ_F Acr-C ₃	Poly nucléotide	ϕ_F QAc+polynucl	ϕ_F QAc libre
Thy-C ₅ -Acr	9		3				
Thy-C ₆ -Acr	6		2		Poly dA-dT (67)	5 (a)	
Ade-C ₅ -Acr	12		4		(94)	6 (b)	
Ade-C ₆ -Acr	10,5		3,5				
Gua-C ₅ -Acr	0,7		0,25		Poly dG-dC (67)	0,2 (a)	
Gua-C ₆ -Acr	1		0,33				
Acr-C ₃	3				ADN thymus	0,7 (b)	
					de veau (69)		

Tableau 13 : Rendements quantiques de fluorescence ϕ_F des modèles Base-C_n-Acr ($\lambda_{exc}=360\pm 7,5nm$). Comparaison avec les résultats donnés par la littérature pour la quinacrine (QAc) en présence de polynucléotides. (Les rapports r=phosphate/QAc sont : (a) r=5 ; (b) r=87).



* Figure 18 : Spectres d'émission de fluorescence mesurés pour les modèles Ade-C₆-Acr, Gua-C₆-Acr et leur composé de référence Acr-C₃ (H₂O pH=5,5 ; 5 % EtOH ; $\lambda_{exc}=360\pm 7,5nm$).

En première approche, ces valeurs sont tout à fait 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.

Au cours de cette étude spectroscopique des modèles Base-C_n-Acr, nous avons pu montrer que :

- Les méthodes spectroscopiques UV et de RMN sont tout à fait complémentaires pour analyser dans le détail le comportement des bichromophores et connaître les populations en conformation repliée et leurs géométries préférentielles.

Ce phénomène observé dans les modèles (empilement des noyaux) est bien de même nature que celui qui se passe dans l'ADN quand la drogue est intercalée (comme en témoigne la similitude des spectres UV).

- Les interactions mises en jeu dans les systèmes repliés sont très puissants (notamment pour les modèles Ade-C_n-Acr, totalement repliés à 80°C quand n=3).

- Les interactions diminuent quand la longueur de la chaîne augmente.

- Les interactions disparaissent en milieu organique comme en témoigne l'absence d'effet hypochrome (%H) dans l'éthanol.

Nous avons également obtenu des informations importantes sur le plan spectroscopique :

- Pour les modèles de type Ade-C_n-Acr (n=3, 5, 6), l'orientation relative des deux chromophores empilés exerce une influence considérable sur la valeur de l'effet hypochrome (%H).

- L'intensité de la fluorescence émise par le noyau de l'acridine est directement liée à la nature de la base nucléotidique impliquée dans le complexe (exaltation par l'adénine et la thymine, extinction par la guanine).

C H A P I T R E 3

ETUDE DES MODELES EN SERIE PROFLAVINE :
INTERACTIONS INTERCALANT-COUPLE DE BASES

Cette étude a été réalisée à l'aide des systèmes modèles Base-C₃-Pf capables de reproduire les interactions d'empilement mises en jeu dans le complexe d'intercalation de la proflavine (Figure 22).

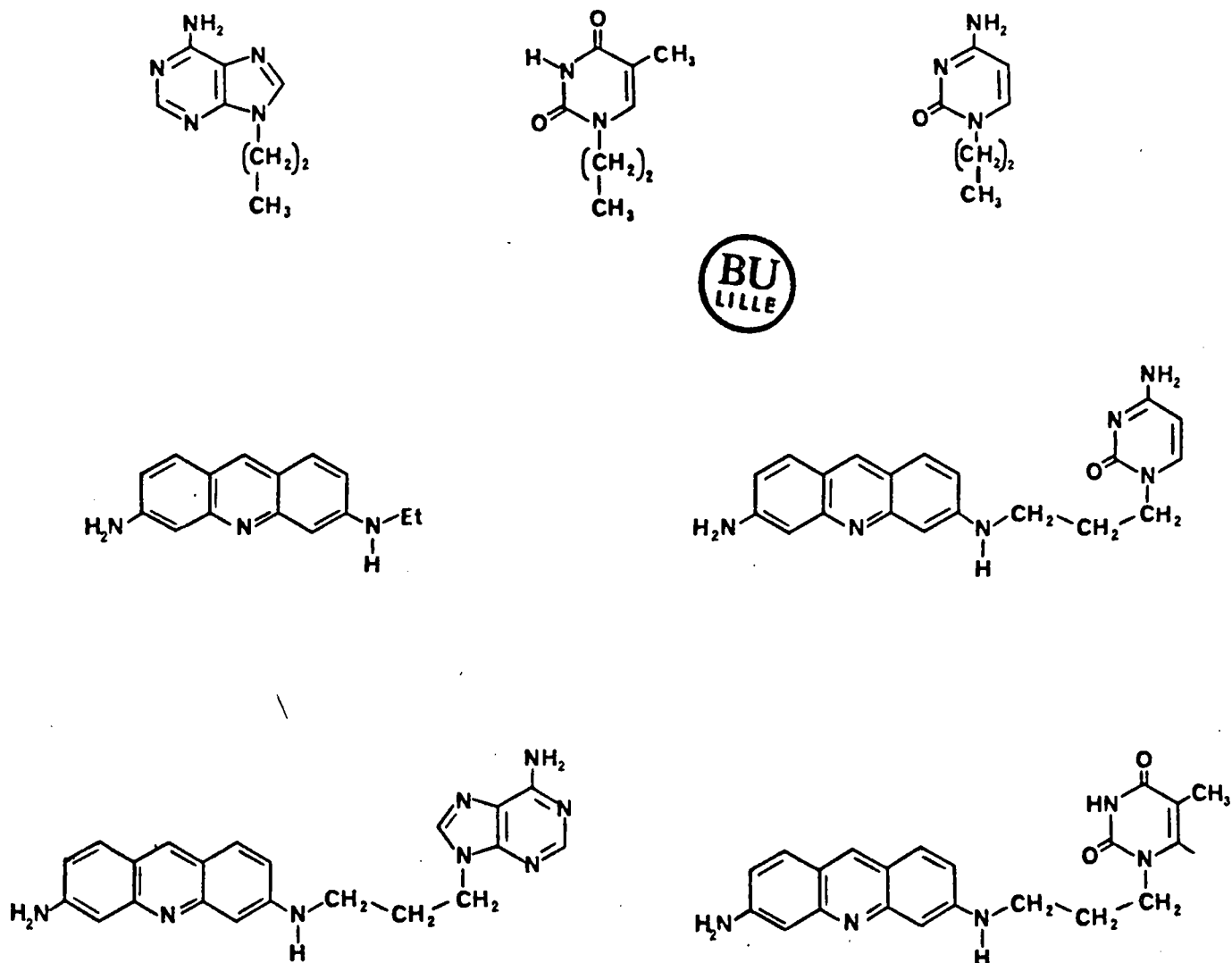


Figure 22 : Modèles Base-C₃-Pf synthétisés et leurs "demi-molécules" de référence Pf-C₂, Ade-C₃, Thy-C₃, Cyt-C₃.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'équilibre conformationnel "formes ouvertes \rightleftharpoons formes repliées" des modèles Base-C₃-Pf.

Les modèles en série adénine et thymine ont été synthétisés et étudiés par spectrophotométrie UV par J. FAHY dans le laboratoire (26). Ces mesures avaient été complétées par une étude préliminaire par RMN¹H à 80 MHz. Les effets hypochromes (%H) mesurés dans l'eau entre 520 et 320 nm sont de 12 % pour le modèle Ade-C₃-Pf et 7 % pour le modèle Thy-C₃-Pf. Ces effets ne varient pas quelle que soit la température (entre 0 et 80°C) montrant ainsi que les interactions d'empilement sont puissantes et que les modèles Ade-C₃-Pf et Thy-C₃-Pf adoptent une conformation repliée à 100 % dans l'eau. Pour mieux connaître les interactions intramoléculaires mises en jeu dans ces conformations, nous avons mené une étude complète des modèles Base-C₃-Pf et des composés de référence à 400 MHz. Nous avons étendu cette étude aux systèmes Cyt-C₃-Pf et Cyt-C₃ que nous avons préparés.

A. AUTO-ASSOCIATION :

82 Nous avons étudié les différents systèmes dans une gamme de concentration comprise entre 10⁻³ et 10⁻⁵ M. Par extrapolation des courbes $\delta = f(c)$, nous avons déterminé les déplacements chimiques à dilution infinie δ_0 . Nous avons appliqué la méthode de J.L. DIMICOLI et C. HELENE (81) pour accéder à la valeur des constantes d'auto-association.

I. COMPOSES DE REFERENCE :

1/ Cyt-C₃ :

Comme nous l'avons observé précédemment pour les autres bases alkylées, les effets de la dilution sont nuls. Bien que l'anisotropie

diamagnétique de la cytosine soit faible, il est fort probable que la constante d'auto-association soit négligeable. Les valeurs de δ_0 déterminées pour les deux protons de la cytosine sont reportées dans le Tableau 14 p.100.

2/ Pf-C₂ :

Les effets de la dilution (entre $1,4 \cdot 10^{-3}$ M et $3,55 \cdot 10^{-5}$ M) sont spectaculaires. Tous les protons sont déblindés (Figure 23). Les valeurs expérimentales sont réunies dans le Tableau 15 p.191. Les valeurs δ_0 obtenues par extrapolation de la courbe $\delta = f(c)$ sont reportées dans le Tableau 14 p.100.

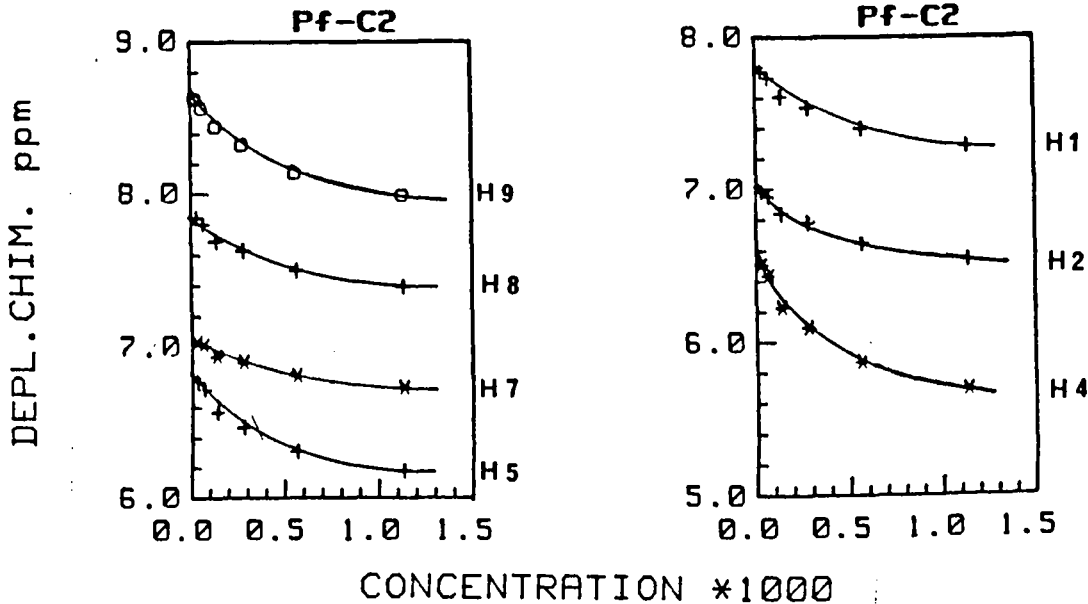


Figure 23 : Variation des déplacements chimiques (ppm) des protons du composé Pf-C₂ en fonction de la dilution (D₂O, pD=5,5 ; 400 MHz).

Nous avons appliqué la méthode de J.L. DIMICOLI et C. HELENE (82) pour calculer la constante d'auto-association K_{assoc} . Cette méthode s'applique au cas général d'un composé B capable de s'auto-associer par interaction d'empilement pour former des dimères : $B + B \rightleftharpoons B_2$. Si on note c_0 la concentration totale en dérivé B et c la concentration en B libre, on peut décrire la complexation à l'aide des deux équations suivantes :

$$\begin{aligned} \Delta\delta / c &= 2K_{\text{assoc}} (\Delta\delta B_2 - \Delta\delta) \\ (\Delta\delta / c_0)^{1/2} &= (2K_{\text{assoc}} / \Delta\delta B_2)^{1/2} (\Delta\delta B_2 - \Delta\delta) \end{aligned}$$

où K_{assoc} est la constante d'auto-association, $\Delta\delta$ représente la différence entre le déplacement chimique mesuré à dilution infinie (δ_0) et celui observé (δ) à une concentration donnée (c), $\Delta\delta B_2$ représente la valeur du blindage dans le dimère (B_2).

En traçant les droites traduisant l'évolution de la grandeur $(\Delta\delta/c)^{1/2}$ en fonction de $\Delta\delta$, nous pouvons accéder à la valeur de la constante d'auto-association (K_{assoc}) et aux valeurs de blindage induit $\Delta\delta B_2$ (Figure 24)

A partir des valeurs calculées pour chaque proton, nous avons déterminé la valeur moyenne $K_{\text{assoc}} = 1100 \text{ M}^{-1}$ pour le composé Pf-C₂. Cette valeur est beaucoup plus importante que celle déterminée pour le composé de référence Acr-C₃ 7 en série chloro-6 méthoxy-2 acridine ($K_{\text{assoc}} = 400 \text{ M}^{-1}$). Elle est comparable à celles mesurées pour les intercalants les plus puissants tels que l'ellipticine ($K_{\text{assoc}} = 1000 \text{ M}^{-1}$) (106).

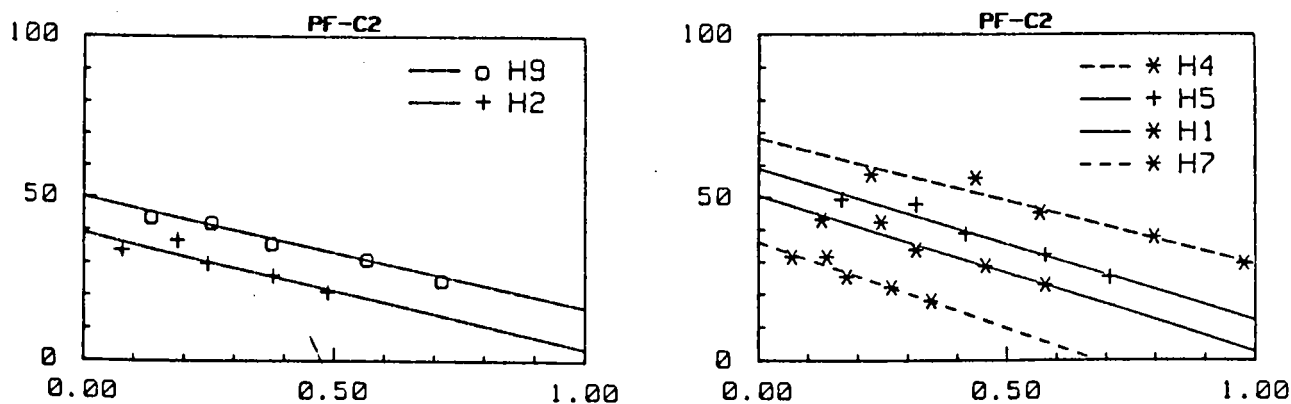


Figure 24 : Paramètres de l'auto-association du dérivé Pf-C₂ obtenus à partir des courbes $(\Delta\delta/c)^{1/2} = f(\Delta\delta)$: $\Delta\delta$ est la différence entre le déplacement chimique à dilution infinie (δ_0) et le déplacement chimique (δ) à une concentration donnée (c). La droite intercepte l'axe des x à la valeur $\Delta\delta B_2$ qui est le blindage induit dans le dimère. La constante d'auto-association K_{assoc} est déterminée à partir de la pente $(2K/\Delta\delta B_2)^{1/2}$.

II MODELES Base-C₃-Pf :

1/ Modèle Thy-C₃-Pf :

Les effets de la dilution sont très importants sur les déplacements chimiques des protons de la proflavine. Les protons de la thymine par contre ne sont pratiquement pas influencés (Figure 25). Ceci est en faveur d'agrégats de type dimérique dans lesquels on n'observe qu'un empilement entre les noyaux proflavine. Les valeurs expérimentales sont réunies dans le Tableau 16 p.192. Les valeurs δ_0 obtenues par extrapolation de la courbe $\delta = f(c)$ sont reportées dans le Tableau 14 p 100.

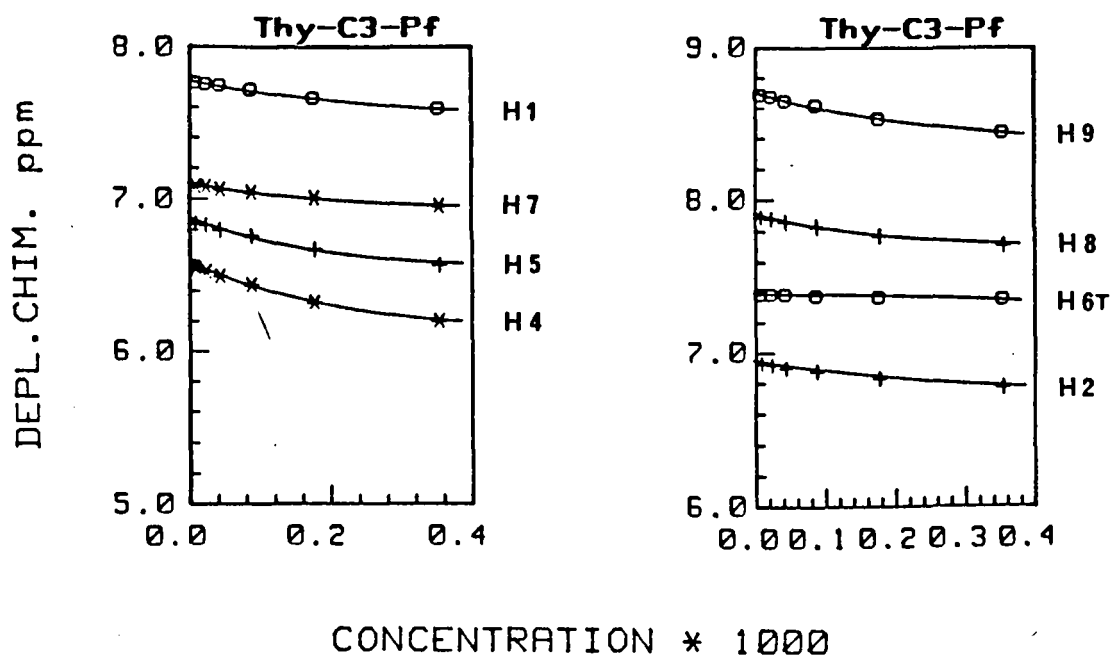


Figure 25 : Variation des déplacements chimiques (ppm) des protons du modèle Thy-C₃-Pf en fonction de la dilution (D₂O pD=5,5 ; 400 MHz).

Le traitement de ces systèmes par la méthode décrite précédemment fait apparaître une constante d'auto-association $K_{\text{assoc}} = 750 \text{ M}^{-1}$ (Figure 26).

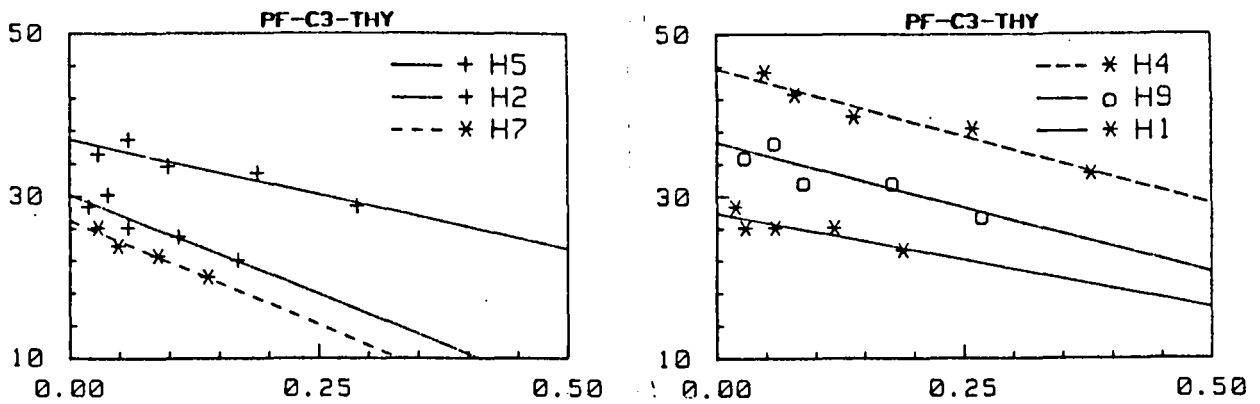


Figure 26 : Paramètres de l'auto-association du dérivé Thy-C₃-Pf obtenus à partir des courbes $(\Delta\delta/c)^{1/2}=f(\Delta\delta)$.



2/ Modèle Cyt-C₃-Pf :

Comme nous l'avons observé sur le modèle Thy-C₃-Pf, les protons les plus perturbés par la dilution sont ceux de la proflavine qui subissent un important effet de déblindage. Les variations pour les protons de la cytosine sont faibles. L'un d'eux est très légèrement déblindé, l'autre est faiblement blindé (Figure 27). Les valeurs expérimentales sont réunies dans le Tableau 17 p. 192. Les valeurs extrapolées à dilution infinie ($\Delta\delta$) figurent dans le Tableau 14 p. 100.

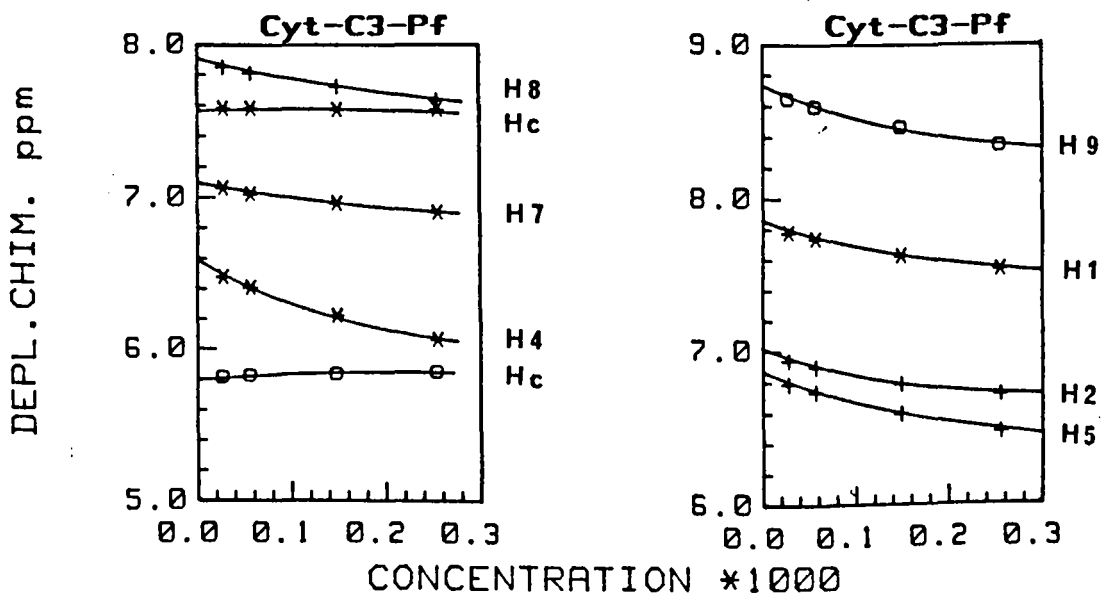


Figure 27 : Variation des déplacements chimiques (ppm) des protons du modèle Cyt-C₃-Pf en fonction de la dilution (D₂O pD=5,5 ; 400 MHz).

En procédant comme pour le modèle Thy-C₃-Pf, nous avons déterminé la constante d'auto-association $K_{\text{assoc}} = 680 \text{ M}^{-1}$.

3/ Modèle Ade-C₃-Pf :

Pour ce composé, on observe en diluant un net effet de déblindage pour les protons de la proflavine. Les protons de l'adénine sont moins perturbés (Figure 28). Pour ce modèle, toutes les mesures ont été réalisées à très haute dilution (entre $2,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ et $9,75 \cdot 10^{-6} \text{ M}$). Les données expérimentales sont reproduites dans le Tableau 18 p.193. Nous avons obtenu les valeurs extrapolées à dilution infinie (66) rassemblées dans le Tableau 14 p.100. Cependant, dans ces conditions de dilution, les effets mesurés sont trop faibles pour permettre de calculer avec précision la constante d'auto-association. Nous pouvons l'évaluer à environ 600 M^{-1} à partir des données obtenues pour le proton H-9 qui est le plus affecté et fournit la valeur la plus significative.

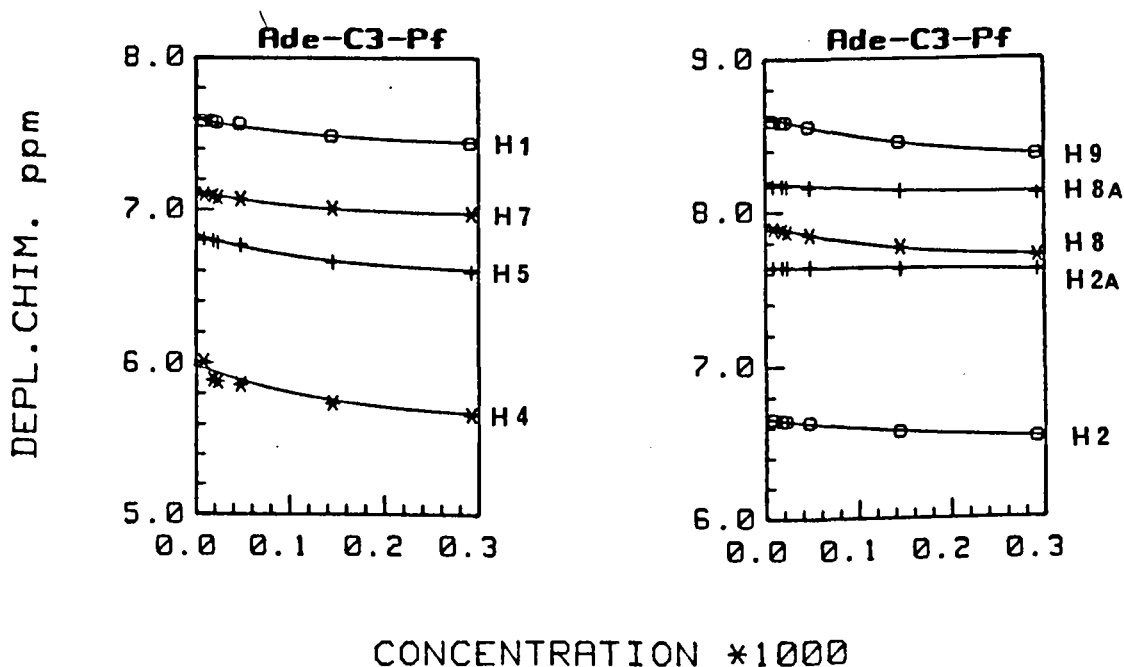


Figure 28 : Variation des déplacements chimiques (ppm) des protons du modèle Ade-C₃-Pf en fonction de la dilution (D₂O pD=5,5 ; 400 MHz).

	H-9	H-8	H-1	H-7	H-2	H-5	H-4	H-2A	H-8A	H-6T	CH ₃ T	H-C	H-C
Ade-C ₃								8,30	8,22				
Thy-C ₃										7,53	1,90		
Cyt-C												7,63	6,0
Pf-C ₂	8,72	7,91	7,85	7,07	7,02	6,88	6,66						
Ade-C ₃ -Pf	8,63	7,90	7,62	7,10	6,69	6,83	5,94	7,63	8,16				
Thy-C ₃ -Pf	8,72	7,90	7,79	7,08	6,93	6,85	6,57			7,40	1,58		
Cyt-C ₃ -Pf	8,71	7,88	7,81	7,11	6,98	6,84	6,55					7,57	5,80

Tableau 14 : Valeurs des déplacements chimiques à dilution infinie (δ_0) en ppm, obtenues par extrapolation des courbes $\delta = f(C)$ pour les modèles Base-C₃-Pf et les composés de référence Pf-C₂, Cyt-C₃ (D₂O pD=5,5 ; 400 MHz) et Ade-C₃, Thy-C₃ (D₂O pD=5,5 ; 270 MHz).


Remarque :

Les valeurs obtenues pour les constantes d'auto-association de ces trois modèles sont très comparables et près de deux fois plus faibles que celle observée pour le composé de référence Pf-C₂. Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse formulée précédemment où la dimérisation fait intervenir exclusivement des contacts proflavine-proflavine (entre systèmes repliés). L'encombrement stérique apporté par la base empilée peut rendre compte de l'auto-association plus faible.

B. INTERACTIONS INTRAMOLECULAIRES :

Dans l'étude précédente, nous avons déterminé les déplacements chimiques extrapolés à dilution infinie pour les modèles et leurs "demi-molécules" de référence. Ceci nous permet de calculer $\Delta\delta_0 = \delta_0$ référence - δ_0 modèle qui rend compte du processus d'interaction intramoléculaire (une valeur de $\Delta\delta_0$ positive correspond à un effet de blindage des protons du modèle). Ces effets peuvent être illustrés par la comparaison des spectres des modèles avec ceux des "demi-molécules" de référence correspondantes (spectres qui sont mesurés à la même concentration) (voir la Figure 29).

Nous avons rassemblé dans le Tableau 19 les valeurs $\Delta\delta_0$ déterminées pour les modèles Base-C_n-Pf.



	H-9	H-8	H-1	H-7	H-2	H-5	H-4	H-2A	H-8A	H-6T	CH ₃ T	H-5C	H-6C
Pf-C ₃ -Ade	0,09	0,01	0,23	-0,03	0,33	0,05	0,72	0,67	0,06				
Pf-C ₃ -Thy	0,00	0,01	0,06	-0,01	0,09	0,03	0,09			0,13	0,32		
Pf-C ₃ -Cyt	0,01	0,03	0,04	-0,04	0,01	0,09	0,06					0,06	0,20

↑
Tableau 19 : Valeurs $\Delta\delta_0$ (ppm) calculées pour les modèles Base-C_n-Pf à partir des valeurs de $\Delta\delta_0$ regroupées dans le Tableau 14 p.100 .

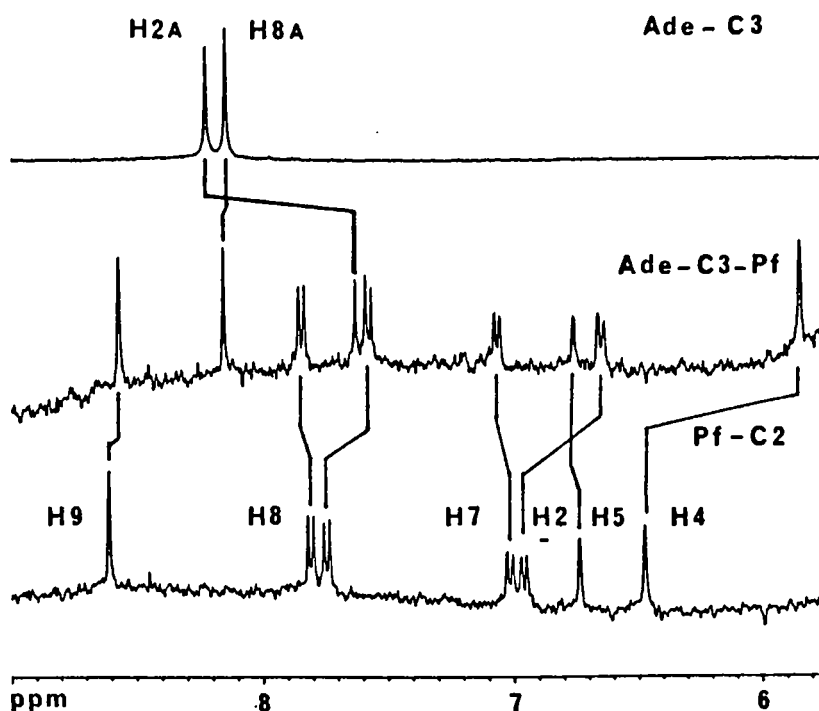


Figure 29 : Spectres du modèle Ade-C₃-Pf et des composés de référence Pf-C₂ et Ade-C₃ (D₂O pD=5,5 ; C=2,5.10⁻⁵ M ; 400 MHz).

- Les effets de blindage mesurés sont considérables (jusqu'à 0,7 ppm pour les protons H-4 et H-2A du modèle Ade-C₃-Pf). Ils démontrent l'existence de conformations repliées.

- Les valeurs mesurées sur la proflavine sont plus importantes pour le modèle Ade-C₃-Pf que pour les deux autres modèles. Ceci s'explique par le courant de cycle de l'adénine, comparable à celui de la proflavine et beaucoup plus puissant que celui des bases pyrimidiques.

Comme précédemment (p. 79), en nous appuyant sur les courbes d'isoécran établies par B. PULLMANN et G. GIESSNER-PRETTRE (86) pour la proflavine et les bases nucléotidiques, nous pouvons proposer des géométries pour les complexes intramoléculaires formés. L'examen de modèles moléculaires compacts CpK nous donne également des renseignements sur les conformations permises par la chaîne triméthylénique.

* Dans le cas du modèle Ade-C₃-Pf, nous disposons des cinq "sondes" que sont les protons H-1, H-2, H-4 de la proflavine et H-2, H-8 de l'adénine. Nous avons reproduit dans le Figure 30 la géométrie qui rend le mieux compte des déplacements chimiques expérimentaux et qui est en accord avec les conformations permises par la chaîne triméthylénique.

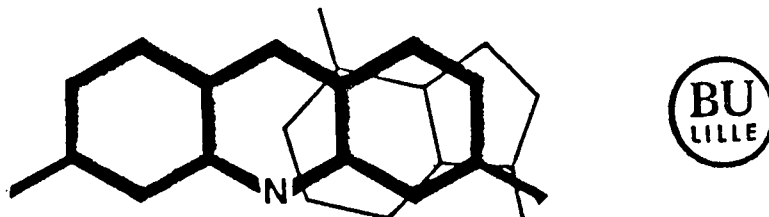


Figure 30 : Géométrie adoptée par le modèle Ade-C₃-Pf dans sa conformation repliée.

- On remarque que la concordance entre les valeurs théoriques et les valeurs expérimentales constitue une indication complémentaire du repliement à 100 % du modèle. Ceci confirme les résultats de l'étude par spectrophotométrie UV.

- En examinant la géométrie proposée pour la conformation repliée, nous remarquons que le noyau imidazole de l'adénine est rejeté vers "l'extérieur" : il ne recouvre pas parfaitement le noyau de la proflavine. Par contre, la partie pyrimidique de l'adénine est disposée de telle manière que les deux sites impliqués dans les liaisons hydrogène avec la base complémentaire sont situés vers l'intérieur. Cette géométrie est très proche de celle proposée pour la proflavine intercalée (p. 14).

* Pour le modèle Thy-C₃-Pf, l'analyse est moins nette. Le faible courant de cycle de la thymine n'induit pas de modifications notables sur les déplacements chimiques des protons de la proflavine. Seules sont vraiment

significatives les valeurs de blindage observées pour les protons de la thymine. Ces deux "sondes" ne permettent pas de proposer une géométrie précise du recouvrement des noyaux de la thymine et de la proflavine. Néanmoins, si l'on admet un repliement de 100 % tel que l'indiquent les résultats de la spectrophotométrie UV (26), on ne peut rendre compte des valeurs de $\Delta\delta_0$ mesurées que si le proton H-6 et le groupement méthyle de la thymine sont décalés vers l'extérieur par rapport à la proflavine. Dans ces conditions, les sites impliqués dans les liaisons hydrogène avec la base complémentaire sont orientés vers le centre du noyau de la proflavine (Figure 31).

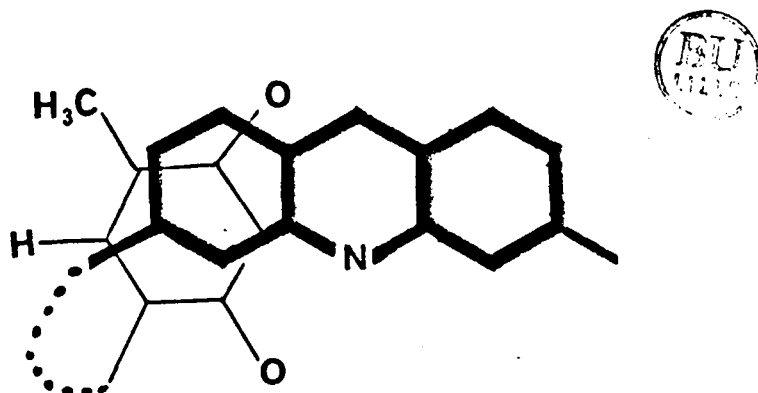


Figure 31 : Géométrie possible pour le modèle Thy-C₃-Pf dans sa conformation repliée.

* Dans le cas du modèle Cyt-C₃-Pf, les effets de blindage mesurés rendent compte de l'existence d'interactions d'empilement. Les valeurs sont faibles et ne sont pas utilisables pour déterminer la géométrie du complexe. Cependant, comme nous l'avons observé en série thymine, pour rendre compte des valeurs observées, on ne peut envisager qu'un recouvrement des noyaux qui rejette les protons de la cytosine vers l'extérieur par rapport à la proflavine. Dans ces conditions, les sites responsables de l'appariement par liaison hydrogène sont orientés vers le centre du noyau de la proflavine (Figure 32).

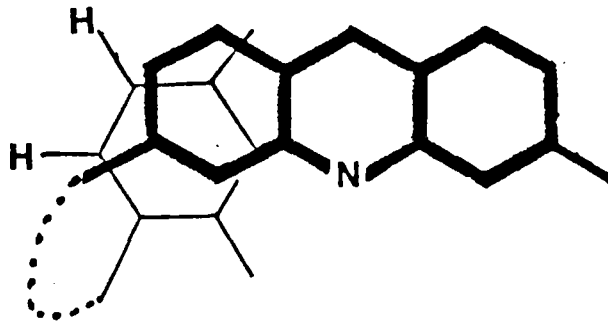
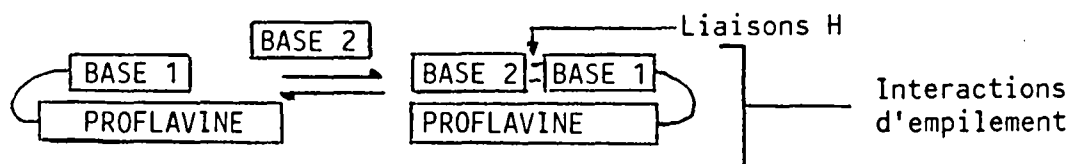


Figure 32 : Géométrie possible pour le modèle Cyt-C₃-Pf dans sa conformation repliée.

Cette étude par RMN¹H confirme les résultats de l'étude par spectrophotométrie UV : les bichromophores adoptent une conformation repliée. Dans le cas du modèle en série adénine, nous avons pu établir la géométrie de la conformation repliée. Cette géométrie est très voisine de celle postulée initialement (p. 14) et donc de celle proposée pour la proflavine intercalée dans l'ADN. Pour les modèles en série thymine et cytosine, les données sont également en accord avec cette géométrie.

C. INTERACTION DE LA PROFLAVINE AVEC LE COUPLE DE BASES COMPLEMENTAIRES :

Pour étudier les interactions mises en jeu entre la proflavine et un couple de bases complémentaires, il nous a semblé intéressant d'utiliser les modèles Base-C_n-Pf (dans leur conformation repliée) comme matrices susceptibles de complexer sélectivement la base complémentaire.

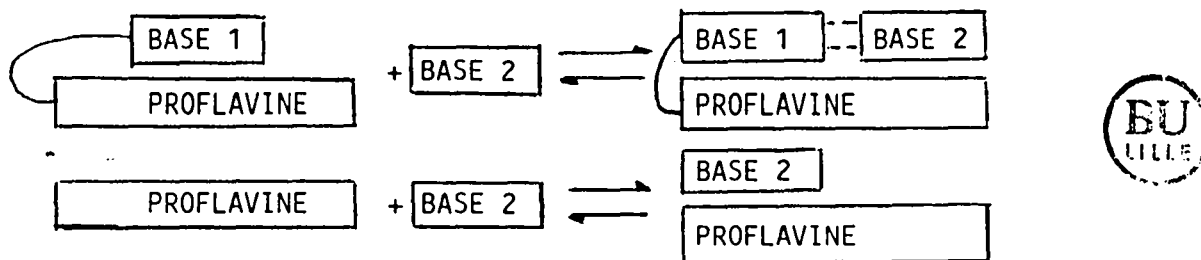


Dans le complexe "ternaire" formé, le modèle et la base complémentaire peuvent mettre en jeu des liaisons hydrogène et surtout présenter des interactions d'empilement décelables par la spectroscopie de RMN¹H*.

La méthode consistera à tenter de mettre en évidence des interactions entre le modèle Base-C₃-Pf et la base complémentaire et étudier par comparaison le comportement de la référence Pf-C₂ en présence de cette même base.

* Une étude préliminaire par spectrophotométrie UV avait été réalisée par J. FAHY dans le laboratoire qui avait examiné les spectres d'absorption UV des modèles Ade-C₃-Pf, Thy-C₃-Pf et du composé de référence Pf-C₂ en présence de quantités croissantes en dérivé Base-C₃. Des excès importants (jusqu'à 5000 fois) ont été nécessaires pour observer des modifications ce qui n'avait plus aucun sens.

observer



Pour étudier ces équilibres nous pouvons procéder de deux manières :

1°- Soit mesurer les effets de concentrations variables du modèle sur les déplacements chimiques des protons de la base complémentaire maintenue à concentration fixe. Cette solution a été éliminée. En effet, la faible solubilité des modèles ne permet pas de travailler avec de gros excès par rapport à la base complémentaire. De plus, la proflavine ayant une forte tendance à former des agrégats, nous introduisons alors une source d'erreurs difficile à contrôler.

2°- Soit opérer à concentration fixe du modèle et mesurer les effets de concentrations variables de la base complémentaire sur les déplacements chimiques des protons du modèle. Les systèmes les plus favorables pour cette étude sont les modèles de type $\text{Pyr-C}_3\text{-Pf}$. Dans ces conditions, la base complémentaire est une purine capable d'induire des effets de blindage décelables sur la proflavine au cours de sa complexation.

I. INTERACTIONS ENTRE LE MODELE $\text{Thy-C}_3\text{-Pf}$ ET LA BASE COMPLÉMENTAIRE Ade-C_3 *

Nous avons étudié le modèle $\text{Thy-C}_3\text{-Pf}$ en présence de la base complémentaire Ade-C_3 . Parallèlement, le composé de référence Pf-C_2 a été examiné dans les mêmes conditions.

* Pour cette étude, nous avons utilisé l'adénine propylée en position 9 : Ade-C_3 .

Afin de minimiser la quantité d'agrégats (qui modifient considérablement la valeur des déplacements chimiques), les études ont été réalisées à une concentration égale à $2,5 \cdot 10^{-5}$ M pour le modèle et le composé de référence. Nous avons reporté dans le Tableau 20 les valeurs des constantes d'auto-association et les pourcentages en agrégats (dimères) estimés à cette concentration.

Composés	Pf-C ₂	Thy-C ₃ -Pf
K _{assoc} (M ⁻¹)	1100	750
% dimères	2,7	1,9

Tableau 20 : Valeurs des constantes d'auto-association, pourcentages de dimères estimés à la concentration $2,5 \cdot 10^{-5}$ M pour le modèle Thy-C₃-Pf et le composé de référence Pf-C₂ (D₂O pD=5,5 ; 25°C).

Nous avons donc mesuré avec précision les valeurs des déplacements chimiques des protons de la proflavine et de la thymine des systèmes Thy-C₃-Pf et Pf-C₂ maintenus à la concentration de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M (D₂O pD=5,5 ; 25°C) et mesuré leurs variations en présence de quantités croissantes du dérivé Ade-C₃ (de $9 \cdot 10^{-4}$ M à $7,75 \cdot 10^{-3}$ M) pour le modèle Thy-C₃-Pf et pour le composé de référence Pf-C₂ (de $1,5 \cdot 10^{-3}$ M à $1,5 \cdot 10^{-2}$ M).

A titre d'exemple, nous avons représenté dans la Figure 32 ^{P. 109} le spectre du modèle Thy-C₃-Pf en présence d'un excès du composé Ade-C₃ (200 fois) et en absence de ce même composé.

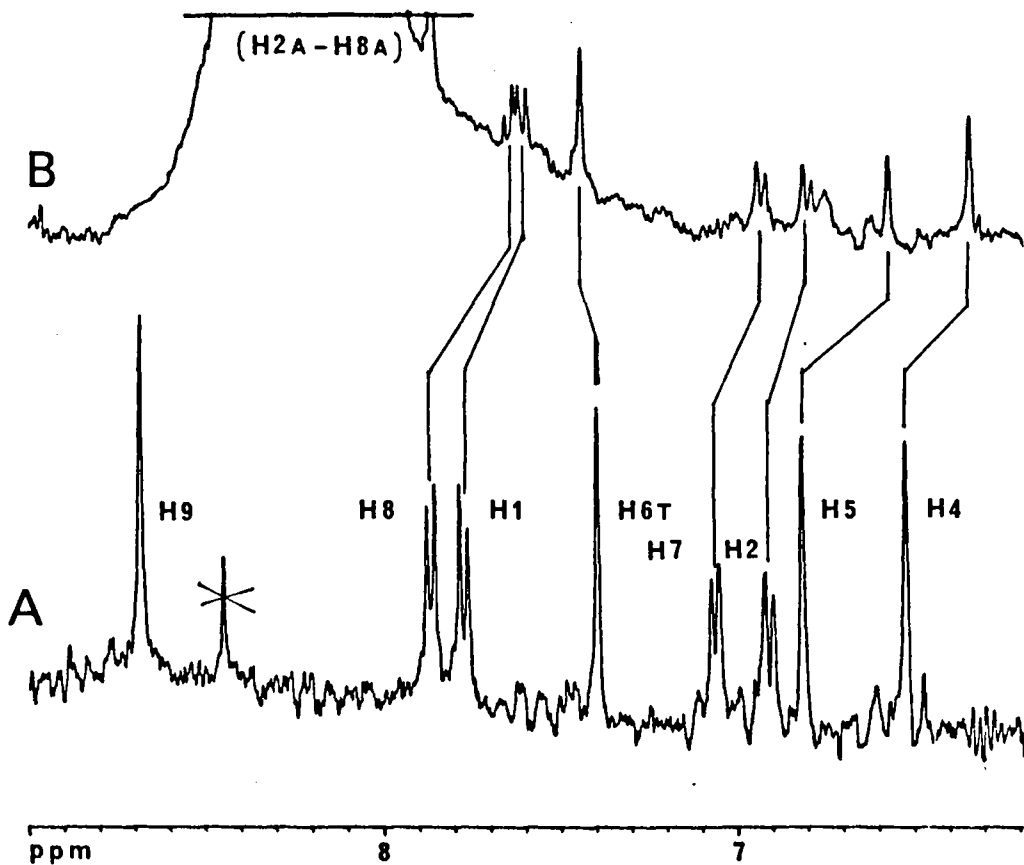


Figure 32 : Effets d'un excès du dérivé Ade-C₃ (200 fois) sur les déplacements chimiques du modèle Thy-C₃-Pf.
A. Thy-C₃-Pf seul ($c=2,5 \cdot 10^{-5}$ M)
B. Thy-C₃-Pf + Ade-C₃.

Les données expérimentales sont représentées sous la forme de courbes $\delta = f(B)$ dans la figure 33 où δ est le déplacement chimique observé en présence du dérivé Ade-C₃ et B est la concentration du dérivé Ade-C₃ ajouté.

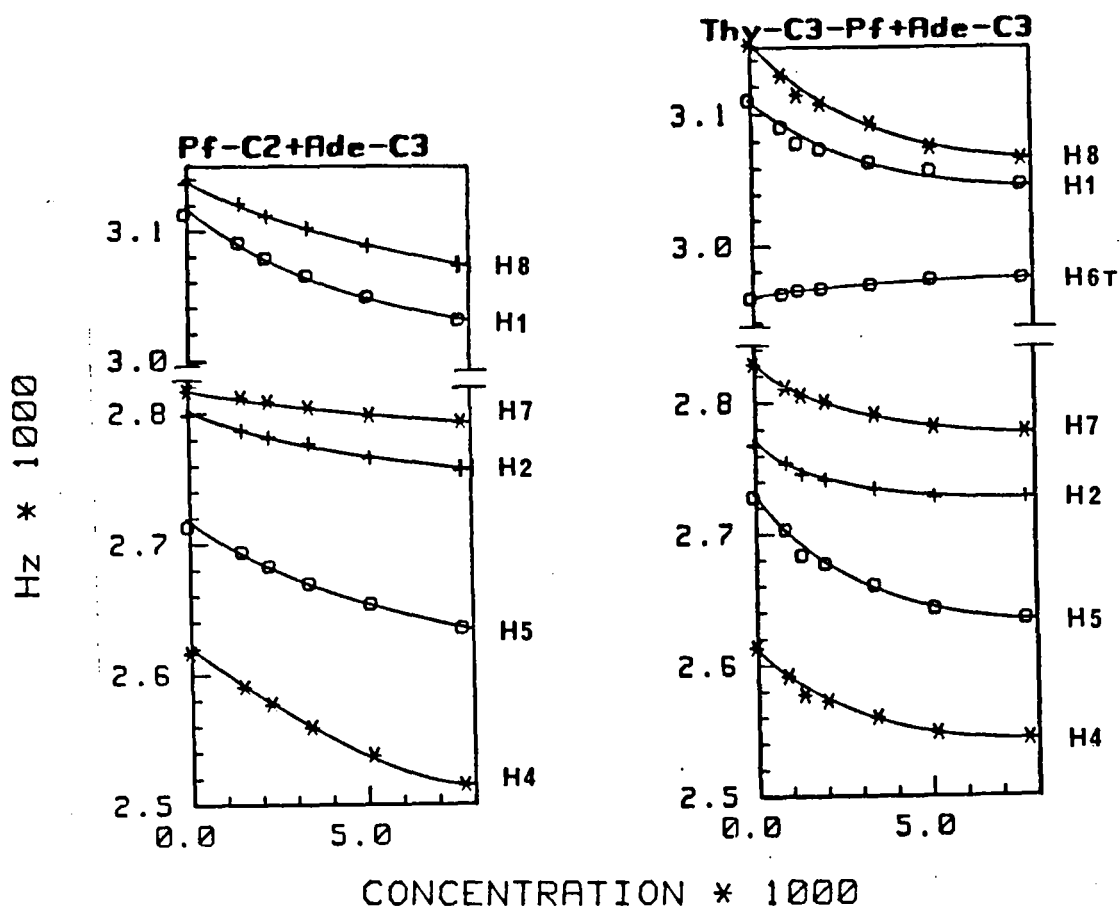


Figure 33 : Effets des variations de concentration du dérivé Ade-C₃ (B) sur les déplacements chimiques (δ) (exprimés en Hertz) des protons du modèle Thy-C₃-Pf et sur ceux des composés de référence Pf-C₂ maintenus à concentration constante ($c=2,5 \cdot 10^{-5}$ M ; pD=5,5 ; 400 MHz).

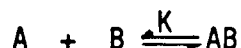
Comme nous pouvons le remarquer à la fois sur le spectre et sur les courbes :

1°- Les perturbations observées sur le composé de référence Pf-C₂ sont uniquement des effets de blindage pour tous les protons. On peut noter une dissymétrie dans ces effets qui sont de plus grande amplitude pour les protons H-1, H-4 et H-5.

2°- Dans le cas du modèle Thy-C₃-Pf, tous les protons de la proflavine subissent un net effet de blindage. Par contre, le proton H-6 et le groupement méthyle (non représenté) de la thymine subissent un léger effet de déblindage.

3°- Aux faibles concentrations du composé Ade-C₃, les effets sont plus marqués sur les protons du modèle que sur ceux du composé de référence.

Ces premières observations montrent que la base ajoutée Ade-C₃ interagit à la fois avec le composé de référence Pf-C₂ et le modèle Thy-C₃-Pf. Pour préciser et analyser de manière quantitative les interactions mises en jeu, nous avons traité les données expérimentales selon l'équation de J.L. DIMICOLI et C. HELENE (82) qui permet de calculer notamment les constantes d'association. Cette méthode s'applique au cas général de deux molécules A et B pouvant se complexer en présentant des interactions d'empilement. Le composé B est en large excès par rapport à A et les dérivés A et B ne s'auto-associent pas :



La constante d'association K est déterminée à partir de l'équation :

$$\Delta\delta/B_0 = -K (\Delta\delta - \Delta\delta AB)$$

- On note $\Delta\delta = \delta - \delta_B$ où δ est le déplacement chimique d'un proton du composé A libre et δ_B celui du même proton en présence d'un large excès du composé B.
- B_0 représente la concentration totale du composé B ajouté.
- $\Delta\delta AB$ est l'effet de blindage attendu lorsque la complexation entre les composés A et B est totale.

Dans notre cas, le dérivé noté A est le modèle ou le composé de référence, B est la base ajoutée. Expérimentalement, nous déterminons la valeur $\Delta\delta$ pour des concentrations connues (B_0) du dérivé Ade-C₃. Les valeurs \longleftrightarrow mesurées pour le modèle Thy-C₃-Pf et le composé de référence sont rassemblées dans les Tableaux 21 et 22 p. 193 et 194.

Nous avons tracé les droites représentant l'évolution de $\Delta\delta / B_0$ en fonction de $\Delta\delta$ (Figure 34) à partir desquelles on tire deux renseignements importants :

- 1/ La valeur de la constante d'association K.
- 2/ La valeur des déplacements chimiques dans le complexe.

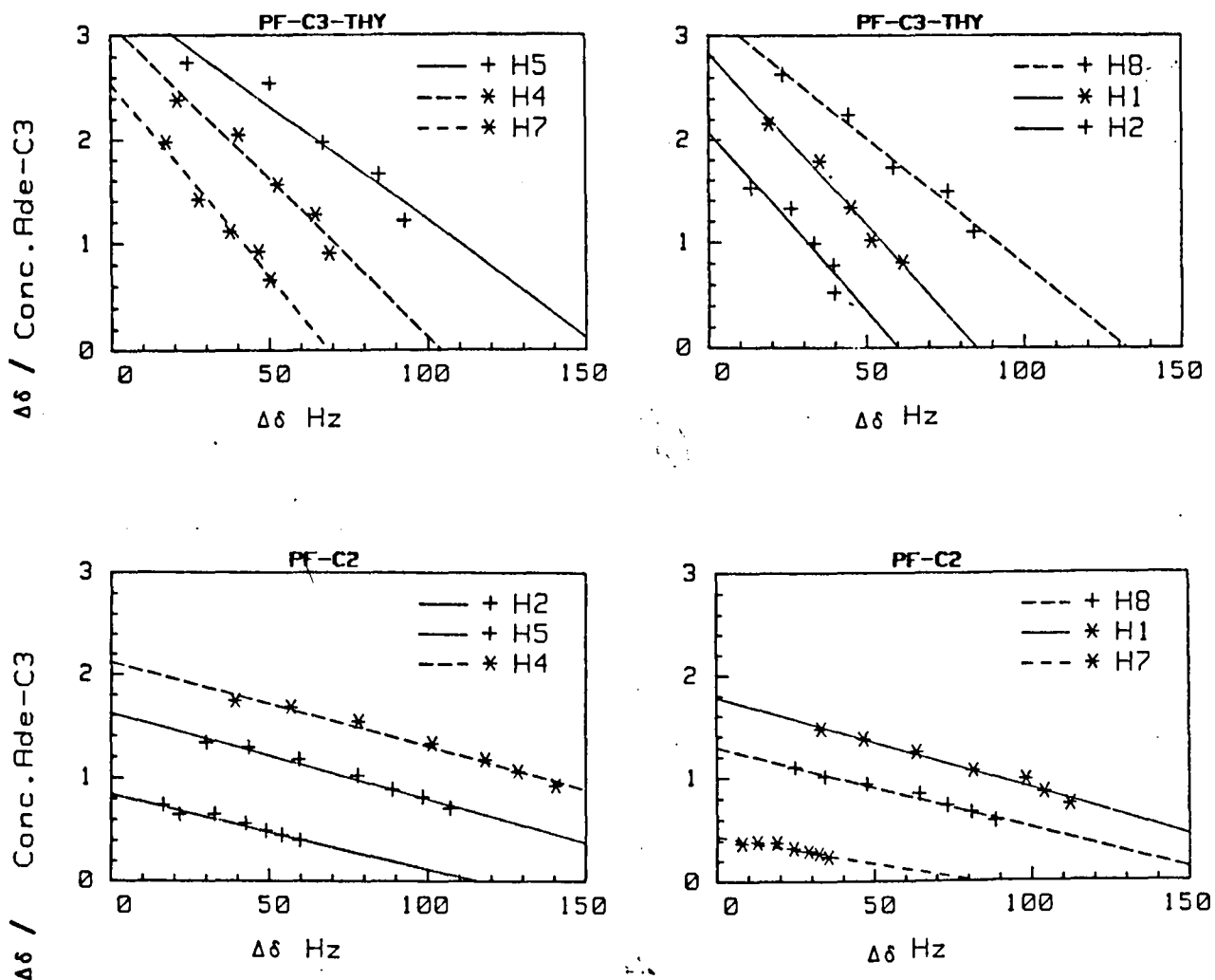


Figure 34 : Evolution de $\Delta\delta / B_0$ en fonction de $\Delta\delta$ pour le modèle Thy-C₃-Pf et pour le composé de référence Pf-C₂.

1/ Constante d'association K :

La différence de comportement entre les deux composés est spectaculaire. La pente de chacune des droites correspondant à chacun des protons fournit une valeur pour la constante d'association K. Les valeurs déterminées pour chaque proton sont rassemblées dans le Tableau 23 p.194 .

On obtient ainsi une valeur moyenne de 300 M^{-1} pour le modèle Thy-C₃-Pf et de 80 M^{-1} pour le composé Pf-C₂. L'association de la base Ade-C₃ est donc quatre fois plus forte avec le modèle Thy-C₃-Pf qu'avec le composé de référence Pf-C₂.

Un tel résultat ne peut s'expliquer que par un effet coopératif de la thymine dans la complexation du modèle Thy-C₃-Pf avec la base Ade-C₃.

2/ Etude des complexes formés :

L'extrapolation des droites $\Delta\delta/B = f(\Delta\delta)$ pour chacun des protons, jusqu'à l'axe des abscisses fournit les valeurs $\Delta\delta_{AB}$ pour les systèmes totalement complexés.

a. Complexe Pf-C₂/Ade-C₃ :

Les valeurs extrapolées pour les protons du composé Pf-C₂ engagé dans le complexe sont représentées dans la Figure 35^{p. 114}. A titre comparatif, nous avons indiqué les effets de blindage mesurés pour les protons du système Ade-C₃-Pf sous l'effet de l'interaction intramoléculaire.

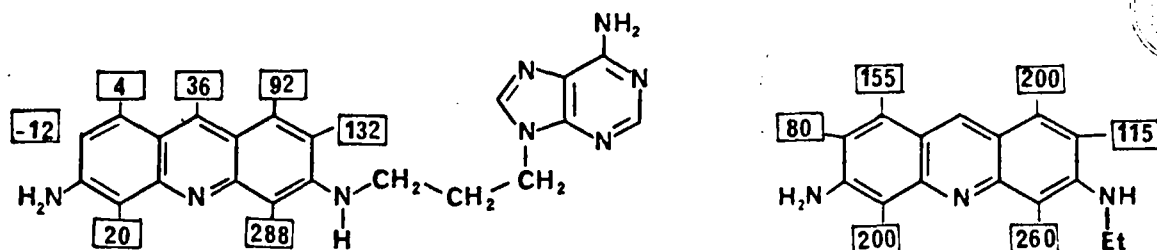


Figure 35 : Effets de blindage extrapolés $\Delta\delta$ AB (Hz) induits sur le composé de référence Pf-C₂ complexé avec la base Ade-C₃. Comparaison avec les valeurs mesurées pour le composé Ade-C₃-Pf dans sa conformation repliée (D₂O pD=5,5 ; 400 MHz).

* On constate que ces valeurs, extrapolées dans un cas, mesurées dans l'autre, sont du même ordre de grandeur, ce qui atteste la validité du traitement effectué.

* Les effets sont plus marqués du côté "droit" de la proflavine alkylée, ce qui semble indiquer une géométrie préférentielle dans le complexe. On peut imaginer une interaction de type hydrophobe entre les chaînes éthyle et propyle fixées sur les deux chromophores Ade-C₃ et Pf-C₂ qui conduit à une orientation privilégiée.

b. Complexe Thy-C₃-Pf/Ade-C₃ :

- On note des effets de blindage importants sur les protons de la proflavine, accompagnés d'un déblindage marqué pour les protons de la thymine (Figure 36).

P. 115

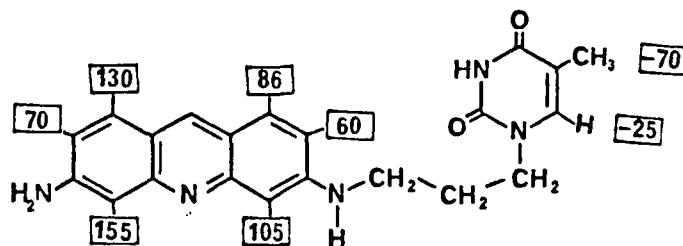


Figure 36 : Effets de blindage extrapolés $\Delta\delta_{AB}$ (en Hertz) induits sur le modèle Thy-C₃-Pf complexé avec la base Ade-C₃.

- Les protons de la partie "gauche" de la proflavine (H-5, H-7, H-8) sont les plus perturbés, ce qui est en faveur d'une interaction plus favorable de la base Ade-C₃ avec la surface de la proflavine demeurée accessible.

- On observe également des effets marqués pour les protons H-1, H-2 et H-4. Ces effets peuvent s'expliquer lorsque l'on compare la surface de la proflavine avec celle du couple de bases adénine-thymine.

Pour permettre un recouvrement maximum de la proflavine par le couple de bases, il est nécessaire de décaler le noyau de la thymine vers "l'extérieur" et l'adénine vers "l'intérieur" (Figure 37).

* Valeurs déterminées en appliquant la même méthode de calcul que pour les autres protons, en utilisant la valeur absolue de $\Delta\delta$.

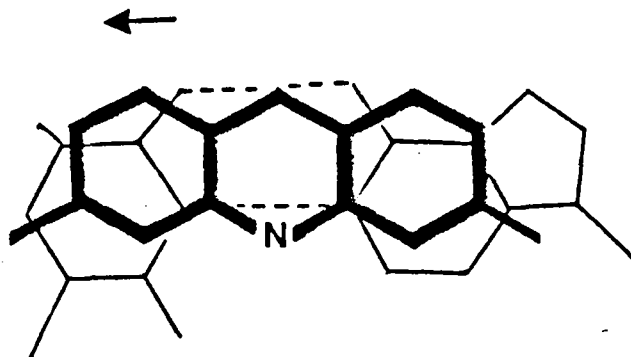


Figure 37 : Effets de l'interaction du dérivé Ade-C₃ avec le modèle Thy-C₃-Pf.

Ce mouvement écarte le proton H-6 et le groupement méthyle qui se trouvent ainsi moins perturbés par l'effet diamagnétique de la proflavine. Cela se traduit globalement par un effet de déblindage par rapport à la forme non complexée.

Ces effets sont en accord avec une complexation sélective de la base ajoutée Ade-C₃ sur la partie "gauche" de la proflavine.

II. ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LE MODELE Cyt-C₃-Pf ET LA
BASE COMPLEMENTAIRE Gua-C₃** :

Nous avons opéré comme précédemment. Nous avons mesuré les déplacements chimiques des protons de la proflavine et de la cytosine dans les systèmes Cyt-C₃-Pf et Pf-C₂ maintenus à la concentration de $2,5 \cdot 10^{-5} M^*$ dans l'eau à 25°C. Nous avons étudié leurs variations en présence de quantités croissantes du dérivé Gua-C₃ (de $1,9 \cdot 10^{-3} M$ à $9,3 \cdot 10^{-4} M$) pour le modèle Cyt-C₃-Pf et pour le composé de référence Pf-C₂ (de $1,55 \cdot 10^{-3} M$ à $4,3 \cdot 10^{-4} M$). La faible solubilité du dérivé Gua-C₃ n'a pas permis d'opérer avec de plus grands excès de base complémentaire.

Les effets mesurés sont faibles mais évoluent de la même manière qu'en série adénine.

1°- Les protons du composé de référence Pf-C₂ subissent uniquement un effet de blindage. On note une dissymétrie dans les valeurs mesurées qui sont plus importantes pour les protons H-1, H-4, H-5 et H-9.

2°- Les protons de la proflavine dans le modèle Cyt-C₃-Pf subissent un important effet de blindage. Les deux protons de la cytosine, par contre, présentent un effet de déblindage de plus faible amplitude.

* La valeur de la constante d'auto-association (K_{assoc}) du modèle Cyt-C₃-Pf est $680 M^{-1}$, celle du composé de référence Pf-C₂ $1100 M^{-1}$. Dans ces conditions, les pourcentages de dimère "proflavine-proflanine" peuvent être estimés à 2,7 % et 1,7 % respectivement.

** Nous avons utilisé pour cette étude la base nucléotidique propylée en position 9.

3°- Les effets sont plus marqués sur les protons du modèle que sur ceux du composé de référence. Les premières observations montrent que la base ajoutée Gua-C₃ interagit à la fois avec le modèle Cyt-C₃-Pf et le composé de référence Pf-C₂. Nous avons tenté d'analyser le phénomène de manière quantitative en utilisant l'équation de J.L. DIMICOLI et C. HELENE (82).

Nous avons déterminé les valeurs $\Delta\delta$ qui sont les différences entre des déplacements chimiques des protons du composé Cyt-C₃-Pf (ou Pf-C₂) en absence et en présence du dérivé Gua-C₃ (δ_B). Ces résultats sont regroupés dans les Tableaux 24 et 25 p. 195.

En raison de la faible solubilité du composé Gua-C₃, la gamme de concentration étudiée est trop étroite. Il s'en suit que les valeurs de $\Delta\delta$ sont trop faibles pour permettre de calculer les constantes d'association.

Nous pouvons cependant exploiter quelques unes de ces valeurs en les comparant avec celles obtenues précédemment pour le "couple" Thy-C₃-Pf + Ade-C₃.

1/ Complexe Pf-C₂/Gua-C₃ :

Nous avons rassemblé dans la Figure 38 ^{P119} les valeurs de blindage mesurées pour le composé de référence Pf-C₂ en présence d'un même excès (60 fois) des dérivés Gua-C₃ et Ade-C₃.

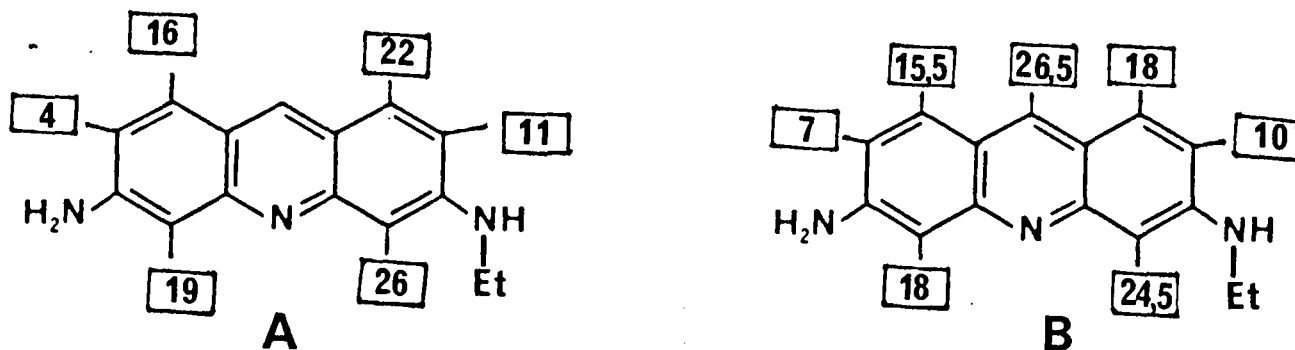


Figure 38 : Effets de blindage ($\Delta\delta_B$) induits par un excès (60 fois) des dérivés Gua-C₃ (A) et Ade-C₃ (B) sur les protons du composé Pf-C₂ ($c=2,5 \cdot 10^{-5}$ M ; pD=5,5 ; 400 MHz).

On constate une parfaite analogie des effets induits par les deux bases nucléotidiques alkylées : Ade-C₃ et Gua-C₃.

- Les effets de blindage mesurés sont du même ordre de grandeur. Compte-tenu du fait que le courant de cycle de l'adénine est plus fort que celui de la guanine, il est raisonnable de penser que la constante d'association pour le dérivé Gua-C₃ est du même ordre de grandeur voire un peu plus élevée.

- La dissymétrie des valeurs mesurées pour les différents protons suggère également une orientation préférentielle par l'intermédiaire des chaînes éthyle et propyle fixées aux dérivés Pf-C₂ et Gua-C₃.

2/ Complexe Cyt-C₃-Pf/Gua-C₃ :

Comme précédemment, nous avons comparé les deux systèmes pour un même excès du dérivé Base-C₃ (Figure 39).

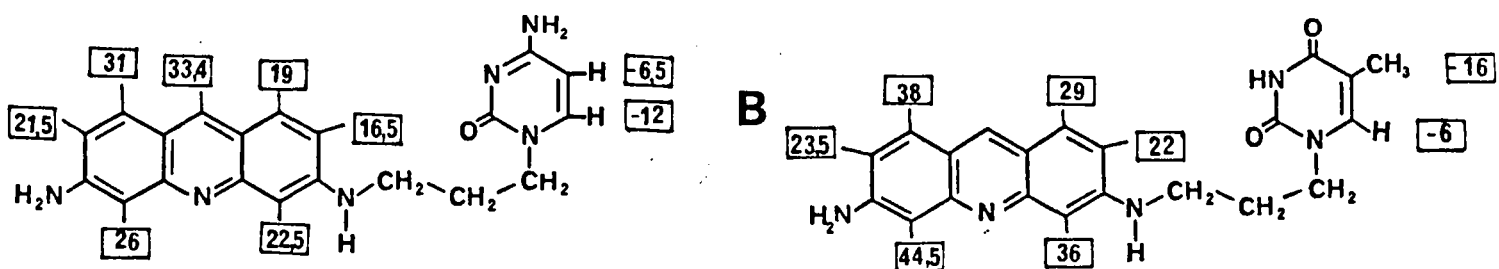


Figure 39 : Effets de blindage ($\Delta\delta_p$) induits par un excès (60 fois) des dérivés Gua-C₃ (A) et Ade-C₃ (B) sur les protons des modèles Cyt-C₃-Pf et Thy-C₃-Pf respectivement.

Là encore, les effets mesurés sont comparables :

- On constate à la fois un blindage des protons de la proflavine et un déblindage des protons des bases pyrimidiques. Les effets de la base Ade-C₃ sont plus marqués que ceux de la base Gua-C₃, ce qui est en accord avec la différence de leurs courants de cycle. Les effets sur la pyrimidine par contre sont tout à fait comparables. Il semble que la complexation avec le dérivé Gua-C₃ induise également un déplacement de la cytosine vers "l'extérieur".
- Dans les deux cas, les perturbations les plus marquées s'observent pour la partie "gauche" de la proflavine (non recouverte par la pyrimidine).

Les modèles Base-C₃-Pf utilisés semblent se comporter comme des matrices qui peuvent complexer la base complémentaire.

1/ Pour le couple "adenine-thymine", nous avons montré l'existence d'un effet coopératif de la thymine lors de la complexation du composé Ade-C₃ avec le modèle Thy-C₃-PF.

* La constante d'association mesurée est près de quatre fois supérieure à celle observée pour le composé de référence Pf-C₂.

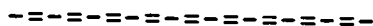
* La base ajoutée se complexe de façon sélective sur la partie "gauche" de la proflavine.

2/ Pour le couple "guanine-cytosine" qui peut mettre en jeu trois liaisons hydrogène, (contre deux dans le système précédent), on constate, du moins sur le plan qualitatif, un comportement tout à fait similaire. Une comparaison plus précise (valeur de K et de $\Delta\delta$ AB) s'est avérée impossible pour des raisons expérimentales (solubilité du dérivé Gua-C₃, auto-association du noyau proflavine.)

Bien que l'appariement par liaisons hydrogène ne puisse pas être mis en évidence par cette méthode, il est raisonnable de penser qu'il puisse intervenir dans le processus.

A notre connaissance, l'appariement par liaisons hydrogène de deux bases complémentaires (à l'état monomère) n'a jamais été mis en évidence dans l'eau. Des calculs de solvation par analyses spectrale et calorimétrique ont cependant montré que l'auto-association par liaison hydrogène de l'adénine dans l'eau est thermodynamiquement permise (107).

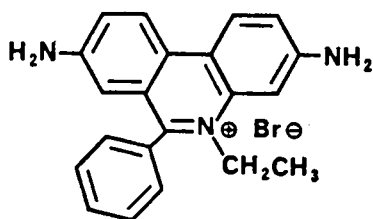
C H A P I T R E 4



INTERACTION DES MODELES AVEC L'ADN

La série de modèles Base-C_n-Intercalant que nous avons préparée est de type hétérodimère et peut constituer une nouvelle classe d'intercalants. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier leur interaction avec l'ADN et en particulier de déterminer leur constante d'affinité pour la macromolécule (K) ainsi que le nombre de sites impliqués dans la complexation (n).

Nous avons utilisé la technique mise au point et utilisée dans le laboratoire du Pr. B.P. ROQUES (Paris VI) (66). Cette méthode consiste à déterminer l'affinité d'un composé pour l'ADN par compétition avec un intercalant dont les paramètres d'intercalation sont bien connus : le bromure d'éthidium (K = 2,2.10⁵ M⁻¹ ; n=2) (108).



Bromure d'éthidium (Bet)

Nous avons procédé de la manière suivante :

Le composé intercalant à étudier est mis en solution avec de l'ADN de thymus de veau. On ajoute ensuite des quantités croissantes de bromure d'éthidium qui déplace progressivement le dérivé intercalé. Ce phénomène peut être analysé quantitativement. En effet, lorsque le Bet s'intercale, l'intensité de son spectre d'émission de fluorescence est considérablement exaltée (jusqu'à 17 fois) et la valeur mesurée rend compte directement de la quantité de Bet intercalé et donc de compétiteur déplacé.

Le cas général de plusieurs ligands (i) en compétition pour les mêmes sites d'interaction est décrit par l'équation établie par J.D. Mc GHEE et P.H. VON HIPPEL (109).

$$r_i = B \cdot K_i \frac{(1 - \sum_i n_i r_i)^n}{(1 - \sum_i (n_i - 1) r_i)^{n-1}}$$

On note K_i la constante d'affinité du composé i pour la macromolécule.

n_i le nombre de paires de bases couvertes.

B est la concentration molaire de l'ADN exprimée en paires de bases.

r_i représente le rapport de la concentration en composé i lié sur la concentration en ADN.

rf_i est le rapport de la concentration totale en composé i sur la concentration en ADN.

Dans le cas qui nous intéresse, nous nous limitons à deux ligands en compétition (les paramètres d'interaction de l'un d'eux étant parfaitement connus).

En proposant différentes valeurs pour le couple (n, K) , la courbe $r=f(rf)$ calculée à l'aide de l'équation citée plus haut peut être ajustée aux points expérimentaux.

Nous avons examiné les molécules suivantes :

- En série acridine : le composé de référence Acr-C₃ et les modèles Ade-C_n-Acr ($n=3, 5, 6$), Thy-C_n-Acr ($n= 3, 5, 6$), Gua-C_n-Acr ($n= 5, 6$) et Ade-Z-Acr.
- En série proflavine : Le composé de référence Pf-C₂ et les modèles Ade-C₃-Pf et Thy-C₃-Pf.

Les valeurs obtenues pour les paramètres K et n des composés considérés sont rassemblées dans le Tableau 26.

Pour exemple, nous avons reproduit dans la Figure 40 la courbe calculée $r=f(rf)$ et les points expérimentaux pour le dérivé Ade-C₅-Acr.

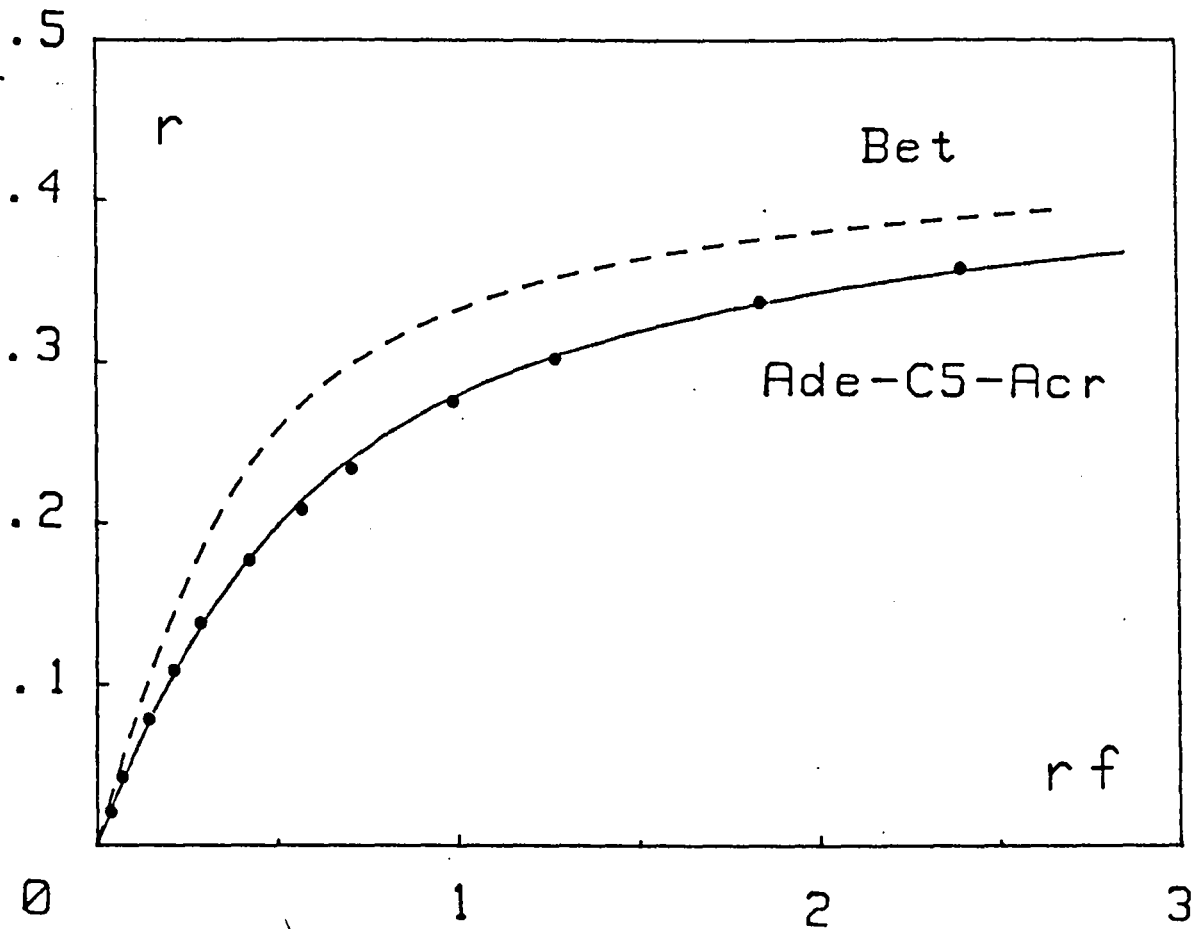


Figure 40 : Détermination des valeurs de K et n pour le dérivé Ade-C₅-Acr par ajustement de la courbe calculée $r=f(cf)$ et des points expérimentaux ($B=1,7 \cdot 10^{-5}$ M ; $c=2 \cdot 10^{-5}$ M ; Tampon Tris, HCl ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) pH=6,9 ; NaCl $1 \cdot 10^{-1}$ M ; EDTA $2 \cdot 10^{-4}$ M ; 5 % EtOH).

Composé	K x 10 ⁻⁴ M:	n
Acr-C ₃ [*]	6	1,8
Thy-C ₃ -Acr	2	2
Thy-C ₅ -Acr	4	2,5
Thy-C ₆ -Acr	6,5	2
Ade-C ₃ -Acr	0,45	2,5
Ade-C ₅ -Acr	3,4	1,9
Ade-C ₆ -Acr	6,8	1,2
Gua-C ₅ -Acr	2	2,5
Gua-C ₆ -Acr	8	0,5
Ade-Z-Acr ^{**}	60	2
Pf-C ₂	11	1,9
Thy-C ₃ -Pf	7	2
Ade-C ₃ -Pf	2	1,5

Tableau 26 : Paramètres de l'interaction avec l'ADN des dérivés Base-C_n-Acr, Ade-Z-Acr, Base-C_n-Pf et de leurs composés de référence Acr-C₃ et Pf-C₂ (tampon Tris, HCl (2,5.10⁻³ M) pH=6,9 ; NaCl 1.10⁻¹ M ; EDTA 2.10⁻⁴ M ; 5 % EtOH).

* Dans des conditions analogues, la constante d'affinité de la quinacrine estimée par une méthode spectroscopique est K=1,3.10⁻⁵ M⁻¹ (85).

** Une étude par RMN¹H a montré que ce composé ne présente aucune interaction intramoléculaire.

L'examen de ce Tableau appelle plusieurs commentaires :

1/ Constante d'affinité K :

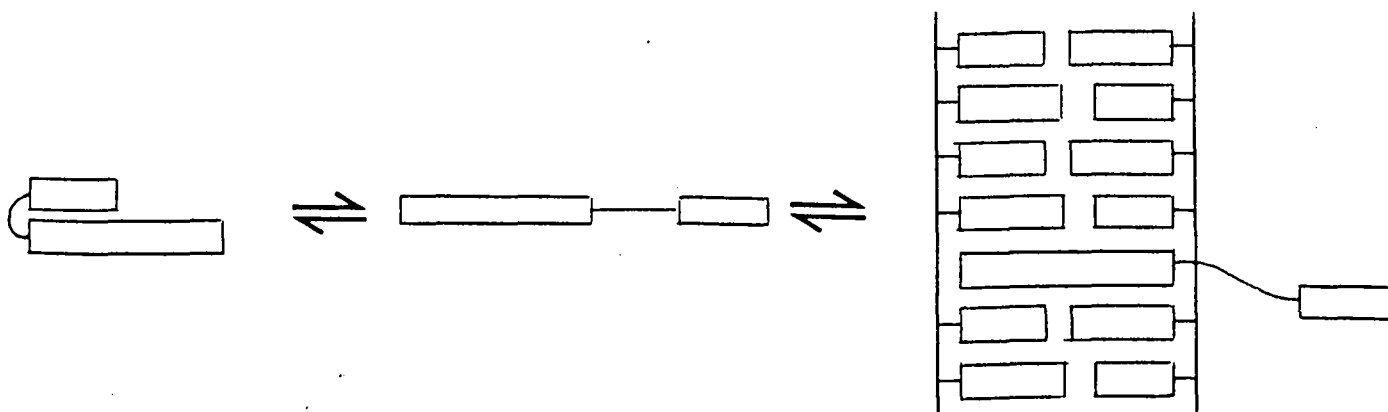
a. Comparaison des systèmes en séries acridine et proflavine :

Pour une même longueur de chaîne et pour une même base nucléotidique, l'association de la proflavine avec l'ADN est toujours plus forte que celle de l'acridine. Ce résultat va dans le même sens que les observations faites précédemment. Le noyau de la proflavine semble avoir tendance à donner des interactions d'empilement plus puissantes que le noyau de la quinacrine. On a vu que la constante d'auto-association du composé Pf-C₂ est trois fois plus élevée que celle du dérivé Acr-C₃.



b. Effets de la longueur de la chaîne :

Pour une même base nucléotidique, l'allongement de la chaîne conduit à une augmentation de la constante d'affinité. Il est intéressant de constater à ce niveau, que pour les systèmes à chaîne longue (n=6), et quelle que soit la nature de la base, on observe des constantes d'affinité comparables entre elles et du même ordre de grandeur que celle du composé de référence Acr-C₃. Ceci se conçoit fort bien si l'interaction des composés dimères avec l'ADN est régie par la suite d'équilibres :

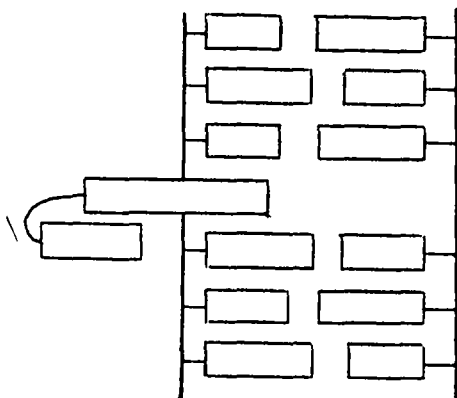


Précédemment, nous avons montré que lorsque la chaîne passe de $n=3$ à $n=5$ et 6, les interactions intramoléculaires Intercalant-Base sont plus faibles.

- En d'autres termes, l'allongement de la chaîne favorise l'ouverture du système. Ceci peut rendre son intercalation plus aisée.

c. Effets de la nature de la base :

Pour les longueurs de chaîne $n=3$ et $n=5$, l'interaction des modèles en série thymine est meilleure que celle des modèles contenant une base purique. Ceci est en accord avec une ouverture plus facile des modèles "Pyrimidine- C_n -Intercalant" ou avec une intercalation partielle de ces modèles.



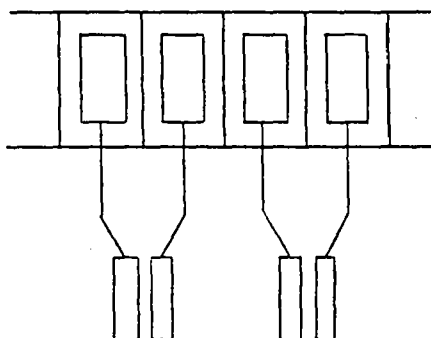
d. Effets de la nature de la chaîne :

Lorsque la chaîne hydrocarbonée est remplacée par une jonction plus longue mais comportant des hétéroatomes, on n'observe plus d'interactions d'empilement intramoléculaires et l'affinité pour l'ADN est considérablement augmentée. Ce phénomène peut être attribué aux interactions de type ionique mises en jeu entre les hétéroatomes (protonés à pH physiologique) et les groupements phosphates de la macromolécule (28).

2/ Nombre de sites couverts :

Pour pratiquement tous les composés étudiés, le nombre de sites couverts lors de l'intercalation est voisin de deux. Ce comportement vérifie le principe du "site exclus" (110) qui veut qu'un dérivé de type mono-intercalant ne puisse pas s'insérer entre deux plateaux de paires de bases consécutifs.

Ce principe est cependant violé par les modèles Ade-C₆-Acr et Gua-C₆-Acr . Ce phénomène a déjà été mis en évidence pour des composés de type bis-intercalant dont la chaîne trop courte (n=6) ne permet que la mono-intercalation. Les chromophores non intercalés pouvant cependant s'associer les uns avec les autres le long de l'ADN et favoriser l'occupation de tous les sites possibles (66, 111).



Il est possible que les modèles Pur-C_n-Acr présentent le même schéma d'interaction. Il faut cependant remarquer que l'auto-association des purines est beaucoup moins puissante que celle de molécules de type intercalant.

Ces résultats corroborent les observations faites dans les chapitres précédents (études des interactions intra-moléculaires). L'intercalation des molécules de type Base-C_n-Intercalant dans l'ADN est fortement influencée par le degré de repliement de ces systèmes. Leur affinité pour l'ADN est d'autant plus grande que les interactions intramoléculaires sont plus faibles.

C H A P I T R E 5

ETUDE DE L'INFLUENCE DES MODELES EN SERIE QUINACRINE
SUR L'ACTIVITE DES ENDONUCLEASES A ET B
DE MICROCOCCUS LUTEUS

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les composés modèles Base-C_n-Acr sont capables de s'intercaler dans l'ADN. Nous avons étendu cette étude aux ADN modifiés comportant des sites apuriniques.

Nous avons étudié les effets des modèles Thy-C_n-Acr et Ade-C_n-Acr (n=5, 6) sur l'activité hydrolytique des endonucléases A et B spécifiques des sites apuriniques et apyrimidiques de l'ADN. Ces deux enzymes, extraits de Micrococcus Luteus ont été purifiés et sont étudiés dans le laboratoire du Pr. J. LAVAL (27).

Rappel : Les ADN apuriniques 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 (Figure 41).

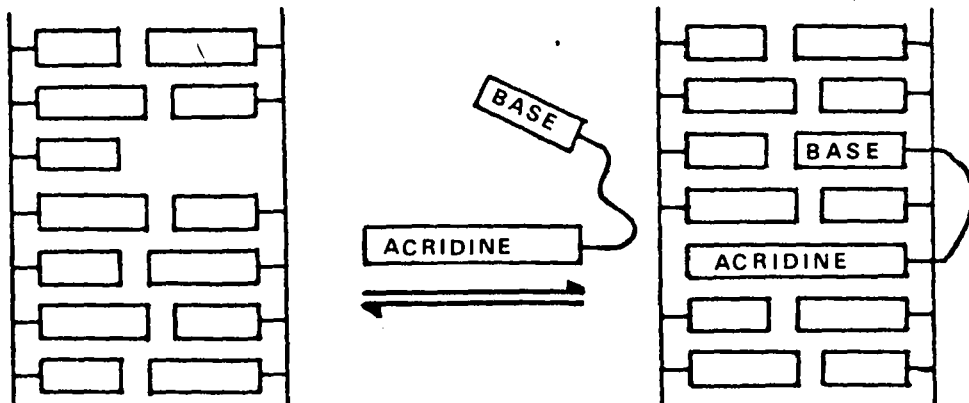


Figure 41 : Schéma d'interaction des modèles Base-C_n-Acr avec l'ADN apurinique.

PRINCIPE :

De l'ADN de phage T₅, marqué au tritium sur la thymine, est traité à l'aide de méthane sulfonate de méthyle. La méthylation des purines (en position 7) induit une fragilité au niveau de la liaison N-glycosidique. Le réactif en excès est éliminé et les bases modifiées sont excisées par simple chauffage (à 50°C pendant 6 heures environ). Cet ADN modifié est ensuite soumis à 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 est stoppée en ajoutant de l'ADN non radioactif de thymus de veau. On ajoute ensuite de l'acide perchlorique au milieu. Seuls les fragments composés de moins de 12 nucléotides seront solubles en milieu acide. Les autres sont éliminés par centrifugation. La mesure de l'évolution de la radioactivité acido-soluble au cours du temps constitue ainsi une mesure directe de l'activité enzymatique (Figure 42).

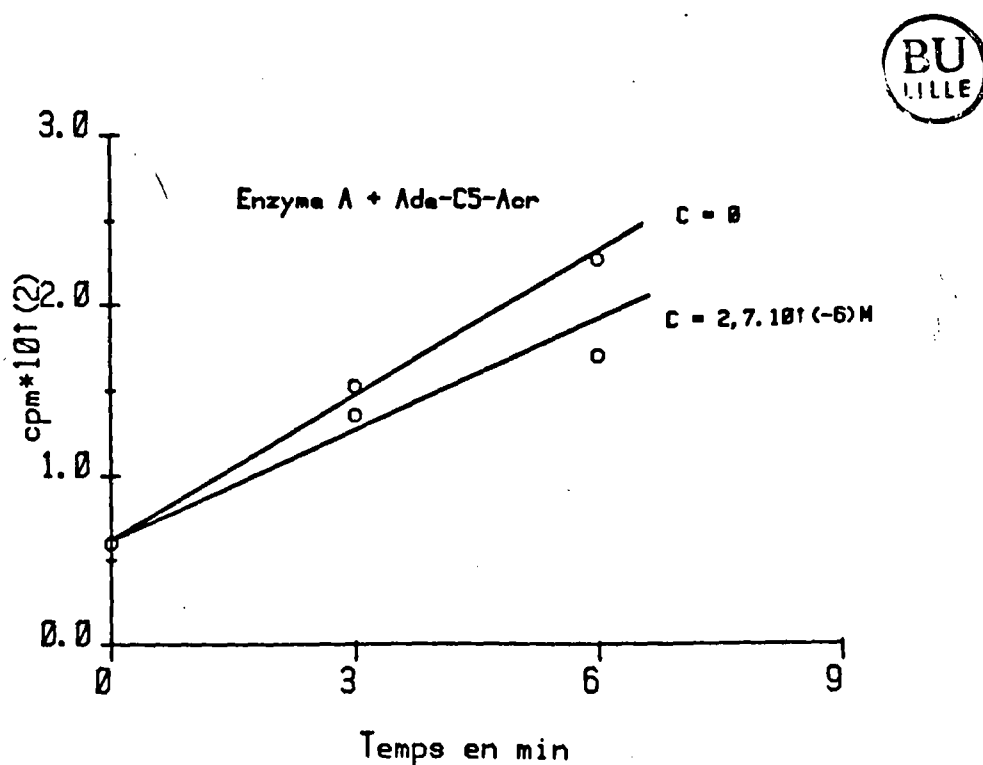


Figure 42 : Evolution de la radioactivité du surnageant (en cpm) d'ADN marqué traité par les endonucléases A et B (27).

La réaction hydrolytique évolue linéairement pendant les cinq premières minutes avant d'atteindre un maximum. L'activité des composés étudiés est évaluée en examinant la partie linéaire de cette courbe.

Nous avons donc testé les activités hydrolytiques des AP endonucléases A et B sur l'ADN apurinique marqué, préalablement incubé en présence de concentrations variables des dérivés Thy-C_n-Acr et Ade-C_n-Acr (n=5, 6) (de 5.10⁻⁷ M à 6.10⁻⁶ M).

Il est nécessaire d'opérer à forte concentration (6.10⁻⁶ M) en dérivé Base-C_n-Acr pour observer une faible diminution de l'activité enzymatique (Figure 43). Ces substances ne peuvent donc pas être considérées comme inhibiteurs des systèmes AP endonucléases.

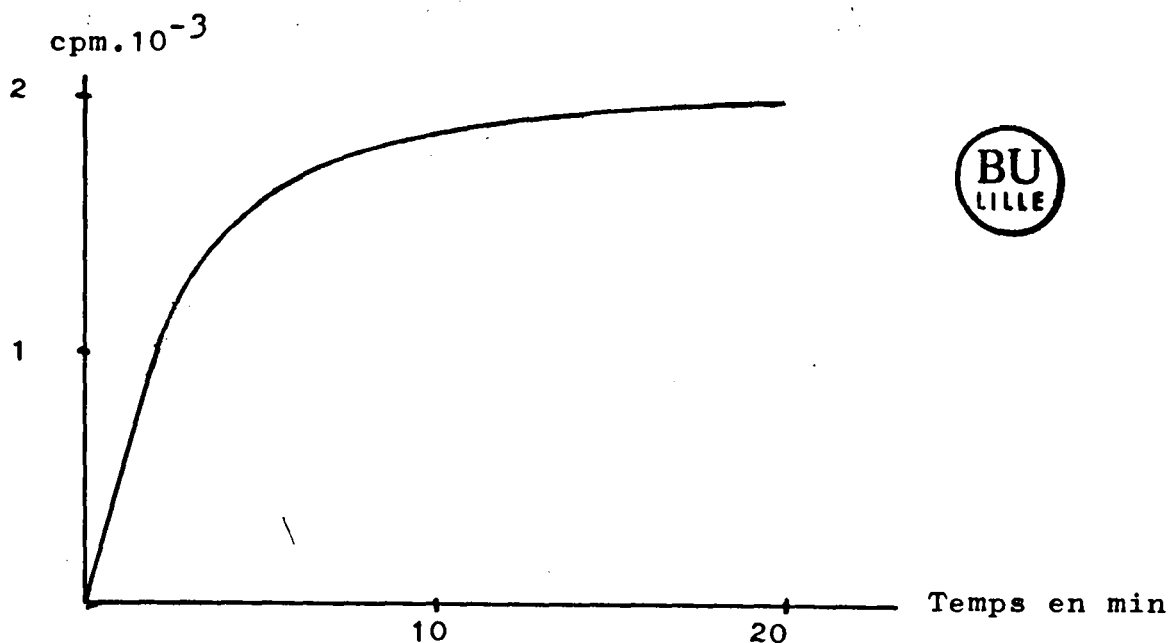


Figure 43 : Effets du modèle Ade-C₆-Acr sur l'activité phosphodiésterasique de l'AP endonucléases B.

Cette absence d'effet peut être liée à la trop faible affinité des modèles pour l'ADN mais aussi à leur structure non optimisée pour ce type d'interactions (chaîne courte hydrocarbonée, interactions intramoléculaires puissantes).

Le modèle Ade-Z-Acr est en cours d'étude. Ce composé possède une plus forte affinité pour l'ADN et dispose d'une chaîne de jonction suffisamment longue et souple pour permettre au système d'interagir avec l'ADN apurinique.

C O N C L U S I O N

L'objectif de notre travail était d'étudier les interactions moléculaires entre des intercalants typiques, tels que la quinacrine et la proflavine, et les bases nucléotidiques. Pour ce faire, nous avons choisis de préparer des hétérodimères de type Base-C_n-Intercalant.

1. L'approche intramoléculaire adoptée nous a permis de mettre en évidence la puissance et l'origine hydrophobe des interactions d'empilement noyau-noyau.

Nous avons pu montrer que les interactions entre les intercalants et les diverses bases nucléotidiques sont suffisamment puissantes pour que les modèles synthétisés adoptent tous une conformation repliée dans l'eau, alors qu'ils s'ouvrent en solvant organique.

2. Par l'artifice de la chaîne de jonction entre l'intercalant et une base nucléotidique, on montre la cohésion du système "ternaire" Intercalant - couple de base complémentaires.

On comprend donc l'effet de stabilisation de la double hélice de l'ADN apportée par l'intercalation (qui conduit en général à une élévation de la température de "fusion" de la macromolécule).

On comprend également que des hétérocycles, dont la surface est comparable à celle du couple de base, aient tendance à se complexer à l'ADN.

3. Enfin, il semble que des hétérodimères de type Base-C₃-Proflavine constituent des outils moléculaires pour étudier des effets de complexation et de reconnaissance de la base complémentaire de ces modèles. On peut également étudier et comparer les interactions de la base complémentaire avec une base non complémentaire ou une base modifiée (souvent source de mutations).

4. On peut envisager de réaliser des réactions du type biomimétique. On peut par exemple examiner la photodégradation de dérivés de la guanine, catalysée par un composé photodynamique tel que la proflavine.

Dans le système Cyt-C₃-Pf, la cytosine constitue le site de reconnaissance et de fixation de la guanosine. Le noyau proflavine, est à la fois le site récepteur et le "photocatalyseur".

5. Outre leur intérêt au niveau de la "modélisation", les systèmes synthétisés sont également des agents intercalants. Nous avons mis en évidence la possibilité de "moduler" l'affinité d'un intercalant pour l'ADN, en jouant sur la nature et la longueur de la chaîne qui le relie à la base nucléotidique. Avec le bichromophore, contenant l'adénine et l'acridine, on multiplie la constante d'association respectivement par 12 et par 120 en remplaçant la chaîne triméthylénique successivement par un pont hexaméthylénique ou une chaîne comportant des hétéroatomes.

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 0,05-0,02 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, WH 270 à transformée de FOURIER, VARIAN XL 200 et PERKIN-ELMER 90 MHz onde continue. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport à l'hexaméthylidisiloxane pris comme référence interne. Les spectres sont décrits avec des 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 Microanalyse du CNRS.

B. SYNTHÈSE DES MODÈLES ET DE LEURS RÉFÉRENCES :

CHLORO-6 METHOXY-2 PHENOXY-9 ACRIDINE 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, 1265, 1230, 1205, 1170, 1060, 1025, 920, 830, 795, 755 cm⁻¹.

RMN (90 MHz, CDCl₃) δ ppm = 8,15 et 7,80 (3H, 2m, AcrC₈H et PhC₂H - C₆H) ; 7,45-6,75 (8H, m, AcrC₁H - C₃H - C₄H - C₅H - C₇H et PhC₃H - C₄H - C₅H) ; 3,75 (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 (39, M⁺-CH₃), 285 (51, M⁺-(OCH₃+Cl)), 258 (32, M⁺-Ph).

CHLORO-6 METHOXY-2 [(HYDROXY-5 PENTYL)

AMINO]-9 ACRIDINE : Acr-C₅-OH 3 :

Un mélange du dérivé 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 l'eau froide (1000 cm^3). On laisse la solution pendant une nuit à 4°C et on filtre le précipité jaune formé. Après lavage à l'eau et séchage, on obtient le composé 3 avec un rendement brut de 75 % (9 g). Le produit est ensuite purifié par cristallisations successives dans l'éthanol.

F = $154-156^\circ\text{C}$.

IR (Nujol) : 3320, 1625, 1600, 1560, 1520, 1500, 1350, 1255, 1235, 1165, 1070, 1030, 950, 920, 825, 780, 765 cm^{-1} .

RMN (90 MHz, DMSO d_6) δ ppm = 8,55 (1H, d, AcrC₈H) ; 8,10-7,50 (5H, m, AcrC₁H - C₃H - C₄H - C₅H - C₇H) ; 7,05 (1H, s, AcrNH) ; 4,55 (1H, s, OH) ; 4,15 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,95 (2H, m, AcrNHCH₂ ou HOCH₂) ; 3,55 (2H, m, AcrNHCH₂ ou HOCH₂) ; 1,80 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₁₉H₂₁O₂N₂Cl

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

Tr. % : 65,7 6,2 8,1 10,3

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, M⁺-(CH₂)₄OH), 257 (12, M⁺-(CH₂)₅OH).

CHLORO-6 METHOXY-2 | (HYDROXY-6 HEXYL)

AMINO|-9 ACRIDINE : Acr-C₆-OH 4 :

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

F = $148-149^\circ\text{C}$.

IR (Nujol) : 3315, 1630, 1605, 1560, 1520, 1500, 1365, 1345, 1255, 1230, 1075, 1030, 925, 860, 825, 815, 790, 755 cm^{-1} .

RMN (90 MHz, DMSO d_6) δ ppm = 8,50 (1H, d, AcrC₈H) ; 8,10-7,45 (5H, m, AcrC₁H - C₃H - C₄H - C₅H - C₇H) ; 7,15 (1H, s, AcrNH) ; 4,50 (1H, s, OH) ; 4,15 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,95 (2H, t, AcrNHCH₂ ou HOCH₂) ; 3,55 (2H, t, AcrNHCH₂ ou HOCH₂) ; 2,10-1,50 (8H, m, (CH₂)₄).

Analyse : C₂₀H₂₃O₂N₂Cl

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

Tr. % : 67,0 6,5 7,7

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

SM (impact électronique) M = 358,87 ; m/e : 358 (100, M⁺), 285 (14, M⁺-(CH₂)₄OH), 271 (44, M⁺-(CH₂)₅OH).

CHLORO-6 METHOXY-2 [(BROMO-5 PENTYL)

AMINO]-9 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 cm^3) et d'acide sulfurique concentré (50 cm^3). On chauffe pendant 7 h à 70°C avec agitation et sous atmosphère d'azote. On refroidit à température ambiante et on verse par petites quantités en agitant, dans une solution de potasse 5N (1000 cm^3) 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. Ce dérivé s'est avéré trop instable pour être obtenu analytiquement pur. On le purifie avant utilisation par dissolution dans le chloroforme puis précipitation avec de l'éther de pétrole (1,8 g ; 45 %).

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.

CHLORO-6 METHOXY-2 [(BROMO-6 HEXYL)

AMINO]-9 ACRIDINE : Acr-C₆-Br 6 :

On utilise le même protocole que pour le dérivé Acr-C₅-Br 5 (p.). Le rendement brut est de 45 %. Le produit est utilisé sans autre purification dans l'étape suivante.

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 = 8,55 (1H, d, AcrC₈H) ; 8,10-7,45 (5H, m, AcrC₁H - C₃H - C₄H - C₅H - C₇H) ; 7,25 (1H, s large, AcrNH) ; 4,15 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,95-3,65 (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, (M+1)⁺Br⁸¹), 420 (34, (M-1)⁺Br⁷⁹), 271 (35, AcrCH₂⁺).

CHLORO-6 METHOXY-2 PROPYLAMINO-9 ACRIDINE :

Acr-C₃ 7 :

Une solution du composé 2 (3,05 g ; 9 mmol) dans l'amino-1 propane (60 cm³) est agité pendant 5 jours à température ambiante, sous atmosphère d'azote. On évapore à sec, on dissout le résidu obtenu dans du dichlorométhane (75 cm³) et on lave avec une solution de soude (0,1 N ; 3x75 cm³). La phase organique est ensuite séchée avec du chlorure de calcium, filtrée et évaporée à sec. Le produit désiré est purifié par cristallisation dans l'éther éthylique. Le rendement est de 48 % (1,32 g).

F = 106-108°C.

IR (Nujol) : 3230, 1630, 1560, 1255, 1235, 1030, 930, 760 cm^{-1} .

RMN (80 MHz, DMSO d_6) δ ppm = 8,30 (1H, d, AcrC₈H) ; 7,85-7,20 (6H, m, AcrC₅H - C₇H - C₁H - C₃H - C₄H et Acr NH) ; 3,90 (3H, s, AcrOCH₃) ; 1,70 (2H, m, CH₂) ; 0,90 (3H, m, CH₃).

Analyse : C₁₇H₁₇N₂O

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

Tr. % : 67,5 5,8 8,9

UV (eau pH=5,5 ; 5 % Ethanol) : λ_{max} (ϵ) : 442,5 (8900) ; 420 (9450) ; 340 (4150) nm.

SM (impact électronique) M = 300,79 ; m/e = 300 (100, M⁺), 285 (19, M⁺-CH₃), 271 (23, M⁺-C₂H₅), 242 (12, M⁺-C₃H₈N).

PROPYL-1 THYMINE : Thy-C₃ 8 :

Sous atmosphère d'azote sec, une suspension de thymine (5,0 g ; 40 mmol) dans l'hexaméthylidisilazane (HMDS ; 70 cm^3) est chauffé 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 cm^3) et du bromo-1 propane (25 cm^3). 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 cm^3). On évapore à sec sous pression réduite et on cristallise le solide obtenu dans le benzène après traitement de la solution avec du noir animal. Le rendement est de 80 % (5,3 g ; 32 mmol).

F = 135-136°C ; Litt. (29) F = 134-136°C.

IR (KBr) : 1695, 1645, 1330, 1240, 1145, 865, 760, 680 cm^{-1} .

RMN (60 MHz, CDCl_3) : δ ppm = 9,60 (1H, signal large, ThyN₃H) ; 7,0 (1H, d, ThyC₆H) ; 3,65 (2H, t, ThyCH₂) ; 1,90 (3H, d, ThyCH₃) ; 1,20 à 2,10 (2H, m, CH₂) ; 0,90 (3H, t, CH₃).

Analyse : $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$

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

Tr. % : 57,3 7,2 16,5

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

SM (impact électronique) ; M = 168,20 ; m/e : 168 (55, M⁺), 139 (15, ThyCH₂⁺), 126 (57, ThyH⁺), 96 (100), 83 (17), 55 (24).

PROPYL-9 ADENINE : Ade-C₃ 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. BROWNE (29).

F = 174,5-175°C ; Litt. (29) F = 175°C.

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

RMN (60 MHz, CDCl_3) : δ ppm = 8,35 (1H, s, AdeC₂H ou AdeC₈H) ; 7,80 (1H, s, AdeC₈H ou AdeC₂H) ; 6,25 (2H, signal large, AdeNH₂) ; 4,15 (2H, t, AdeCH₂) ; 1,90 (2H, m, CH₂) ; 1,0 (3H, t, CH₃).

Analyse : $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_5$

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

Tr. % : 54,3 6,2 39,1

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

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

N-(BROMO-5 PENTYL)-PHTALIMIDE :

Pht-C₅-Br 10 :

Un mélange de phtalimide (15,0 g ; 10 mmol), de 1,5-dibromopentane (70 cm³ ; 5 fois stoechiométrique) et de carbonate de potassium (30 g ; 210 mmol) dans la DMF anhydre (250 cm³) est agité vigoureusement sous atmosphère d'azote pendant 3 jours à température ambiante. Lorsque la réaction est terminée, on filtre puis on 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 une nouvelle fois. Le produit est recueilli sous forme d'aiguilles blanches avec un rendement de 79 % (21,7 g).

F = 59-61°C.

IR (Nujol) : 1770, 1725, 1710, 1610, 1600, 1595, 1265, 1245, 1210, 1040, 1025, 940, 880, 715 cm⁻¹.

RMN (60 MHz, TFA d) δ ppm = 7,80 (4H, m, PhtH) ; 3,65 (2H, t, PhtNCH₂) ; 3,40 (2H, t, BrCH₂) ; 1,65 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₁₃H₁₄NO₂Br

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

Tr. % : 52,9 4,7 4,7

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

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

N-(BROMO-6 HEXYL)-PHTALIMIDE :

Pht-C₆-Br 11 :

On utilise le même protocole que pour le dérivé Pht-C₅-Br 10. Le rendement est de 70 % (p.152).

F = 58-60°C.

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

RMN (60 MHz, TFA d) δ ppm = 7,85 (4H, m, Pht H) ; 3,65 (2H, t, PhtNCH₂) ; 3,40 (2H, t, BrCH₂) ; 1,45 (8H, m, (CH₂)₄).

SM (impact électronique) M = 310,19 ; m/e : 311 (29, (M+1)⁺Br⁸¹), 309 (22, (M-1)⁺Br⁷⁹), 230 (9, M⁺-Br), 160 (100, M⁺-(CH₂)₄Br).

N-(PHTALIMIDO-5 PENTYL)-1 THYMINE :

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 le dérivé Pht-C₅-Br 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 et à l'éther, le rendement en produit brut est de 71 % (5,80 g). Des cristallisations successives dans l'éthanol absolu conduisent au produit désiré sous forme de cristaux blancs.

F : 138-140°C.

IR (Nujol) : 3160, 1765, 1710, 1660, 1390, 1345, 1215, 1040, 965, 925, 895, 845, 760 cm^{-1} .

RMN (60 MHz, DMSO d_6) δ ppm = 7,85 (4H, s, PhtH) ; 7,50 (1H, s, ThyC₆H) ; 3,50 (4H, m, ThyCH₂ et PhtNCH₂) ; 1,80 (3H, s, ThyCH₃) ; 1,50 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₁₈H₁₉N₃O₄

Calc. % : C : 63,33 H : 5,61 N : 12,31

Tr. % : 62,9 5,7 12,0

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

SM (impact électronique) M = 341,37 ; m/e : 341 (95, M⁺), 216 (8, Pht(CH₂)₅⁺), 160 (100, Pht(CH₂)⁺).

CHLORHYDRATE DE N-(AMINO-5 PENTYL)-1 THYMINE :

Thy-C₅-NH₂ 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, 100 cm^3). 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 dissous 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 d_6) δ ppm = 8,95 (3H, s large, NH_3^+) ; 7,55 (1H, s, ThyC₆H) ; 3,65 (2H, t, ThyCH₂) ; 2,75 (2H, t, CH₂NH₃⁺) ; 1,75 (3H, s, ThyCH₃) ; 1,35 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₁₀H₁₆N₃O₂, HCl

Calc. % : C : 48,68 H : 6,94 N : 17,03

Tr. % : 48,6 7,2 16,7

UV (Eau pH=7) : λ_{max} (ϵ) : 261 (14300) ; 205 (21300) nm.

SM (impact électronique) M = 246,72 ; m/e : 211 (44, M⁺-HCl), 181 (100, Thy(CH₂)₄⁺), 167 (44, Thy(CH₂)₃⁺), 153 (26, Thy(CH₂)₂⁺), 126 (89, ThyH⁺).

CHLORO-6 METHOXY-2|((THYMINYL-1)-5 PENTYL)

AMINO|-9 ACRIDINE : Thy-C₅-Acr 14 :

Le dérivé Thy-C₅-NH₂, HCl 13 (1,20 g ; 4,9 mmol) est dissous 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 2 (1,77 g ; 5,3 mmol) et on chauffe la solution à 70°C sous atmosphère d'azote pendant 18 h. Par chromatographie sur couche mince, on voit 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, dans de l'ammoniaque agité vigoureusement (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 des chromatographies successives sur colonnes de silice (éluants : éthanol et 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, 1525, 1255, 1235, 1135, 1075, 1035, 925, 860, 820, 770, 755, 720 cm^{-1} .

RMN (270 MHz, DMSO d_6) δ ppm = 11,10 (1H, s, ThyN₃H) ; 8,25 (1H, d, AcrC₈H) ; 7,80 (2H, m, AcrC₄H - C₅H) ; 7,55 (1H, s, ThyC₆H) ; 7,25 (1H, d, AcrC₇H) ; 6,80 (1H, s large, AcrNH) ; 3,85 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,65 (2H, m, ThyCH₂) ; 3,50 (2H, t, AcrNHCH₂) ; 1,65 (5H, m, ThyCH₃ et CH₂) ; 1,50 (2H, m, CH₂) ; 1,25 (2H, m, CH₂).

Analyse : C₂₄H₂₅N₄O₃Cl

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

Tr. % : 63,5 5,6 12,2

UV (Eau pH=5,5, 5 % Ethanol) : λ_{max} (ϵ) : 442,5 (8200) ; 420 (8750) ; 342,5 (4400) nm.

SM (impact électronique) M = 452,95 ; m/e : 453 (8, M⁺), 417 (23, M⁺-Cl), 327 (11, M⁺-ThyH), 313 (6, Acr(CH₂)₄⁺), 285 (21, Acr(CH₂)₂⁺), 271 (51, AcrCH₂⁺), 257 (11, Acr⁺), 126 (5, ThyH⁺).

N-(PHTALIMIDO-6 HEXYL)-1 THYMINE :

Thy-C₆-Pht 15 :

On utilise le même protocole que pour le dérivé Thy-C₅-Pht 12 (p.153). Le produit est purifié par cristallisations successives dans l'isopropanol et traitement avec du noir animal. Le rendement en produit cristallisé est de 57 %.

F = 165-167°C.

IR (Nujol) : 3160, 1765, 1710, 1660, 1390, 1345, 1215, 1040, 965, 925, 895, 845, 760 cm^{-1} .

RMN (60 MHz, DMSO d_6) δ ppm = 7,85 (4H, s, PhtH) ; 7,55 (1H, s large, ThyC₆H) ; 3,55 (4H, m, ThyCH₂ et PhtNCH₂) ; 1,75 (3H, s, ThyCH₃) ; 1,40 (8H, m, (CH₂)₄).

Analyse : $C_{19}H_{21}N_3O_4$

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

Tr. % : 64,1 6,1 11,9

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

SM (impact électronique) M = 355,39 ; m/e : 355 (34, M^+), 230 (7, $Pht(CH_2)_6^+$), 216 (2, $Pht(CH_2)_5^+$), 195 (27, $Thy(CH_2)_5^+$), 181 (14, $Thy(CH_2)_4^+$), 160 (100, $PhtCH_2^+$).

CHLORHYDRATE DE N-(AMINO-6 HEXYL)-1 THYMINE :

Thy- C_6 - NH_2 , HCl 16 :

On utilise le même protocole que pour le dérivé Thy- C_5 - NH_2 , HCl 13 (p.154). Le rendement en produit cristallisé est de 74 %.

F = 235°C.

IR (Nujol) : 3115, 1765, 1255, 1210, 1100, 950, 910, 800, 730 cm^{-1} .

RMN (60 MHz, TFA d) δ ppm = 7,45 (1H, s large, $ThyC_6H$) ; 3,95 (2H, t, $ThyCH_2$) ; 3,40 (2H, t, $NH_3^+CH_2$) ; 2,05 (3H, s, $ThyCH_3$) ; 1,60 (8H, m, $(CH_2)_4$).

Analyse : $C_{11}H_{18}N_3O_2$, HCl

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

Tr. % : 50,4 7,8 15,7 13,5

UV (Eau pH=7) : λ_{\max} (ϵ) : 271 (8500), 203 (9300) nm.

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

CHLORO-6 METHOXY-2 ((THYMINYL-1)-6 HEXYL)

AMINO|-9 ACRIDINE : Thy-C₆-Acr 17 :

On utilise le même protocole que pour le dérivé Thy-C₅-Acr 14 (p.155). Le rendement brut est de 83 %. La purification s'opère de la même manière.

F = 209-211°C.

IR (Nujol) : 3370, 1675, 1635, 1605, 1560, 1520, 1500, 1335, 1255, 1235, 1122, 1075, 1040, 940, 920, 820, 800, 760, 725 cm⁻¹.

RMN (270 MHz, DMSO d₆) δ ppm = 11,10 (1H, s, ThyN₃H) ; 8,25 (1H, d, AcrC₈H) ; 7,75 (2H, m, AcrC₄H - C₅H) ; 7,55 (1H, s, ThyC₆H) ; 7,40 (1H, s, AcrC₁H) ; 7,35 (1H, d, AcrC₃H) ; 7,25 (1H, d, AcrC₇H) ; 6,95 (1H, s large, AcrNH) ; 3,85 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,65 (2H, m, ThyCH₂) ; 3,50 (2H, m, AcrNHCH₂) ; 1,65 (5H, m, ThyCH₃ et CH₂) ; 1,45 (2H, m, CH₂) ; 1,25 (4H, m, (CH₂)₂).

Analyse : C₂₅H₂₇N₄O₃Cl

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

Tr. % : 64,4 5,8 12,0

UV (Eau pH=5,5 ; 5 % Ethanol) : λ_{max} (ε) 445 (8250) ; 422,5 (8800) ; 340 (4020) nm.

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(CH₂)₂⁺), 271 (0,6 ; AcrCH₂⁺).

N-(PHTALIMIDO-5 PENTYL)-9 ADENINE :

Ade-C₅-Pht 18 :

Une suspension d'adénine (3,00 g ; 22 mmol), de carbonate de potassium anhydre (6,00 g ; 43 mmol) et de Pht-C₅-Br 10 (9,20 g ; 31 mmol),

dans la DMF (60 cm³) est agitée vigoureusement 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 % en produit pur (2,81 g).

F = 203-205°C.

IR (Nujol) : 3250, 3100, 1770, 1720, 1660, 1415, 1395, 1355, 1240, 1210, 1050, 1035, 795, 710 cm⁻¹.

RMN (60 MHz, TFA d) δ ppm = 9,40 et 8,80 (2H, 2s, AdeC₂H et C₈H) ; 7,90 (4H, s, PhtH) ; 4,85 (2H, m, AdeCH₂) ; 3,90 (2H, m, PhtNCH₂) ; 1,80 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₁₈H₁₈N₆O₂

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

Tr. % : 61,8 5,2 24,0

UV (Méthanol) : λ_{\max} (ϵ) : 283 (2700) ; 263 (14200) ; 242 (15500) ; 234 (17900) ; 219 (56600) ; 216 (53000) nm.

SM (impact électronique) M = 350,38 ; m/e : 350 (27,5 ; M⁺), 204 (3, Ade(CH₂)₆⁺), 190 (100, Ade(CH₂)₅⁺), 176 (19, Ade(CH₂)₄⁺), 135 (30, AdeH⁺).

BIS CHLORHYDRATE DE N-(AMINO-5 PENTYL)-9 ADENINE :

Ade-C₅-NH₂ 2HCl 19 :

On dissout le composé 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 et le rendement est de 87 % (4,45 g).

F = 240-258°C (Déc).

IR (Nujol) : 3250, 3100, 2640, 2030, 1690, 1630, 1600, 1520, 1415, 1220 cm⁻¹.

RMN (60 MHz, TFA d) δ ppm = 9,55 et 8,80 (2H, 2s, AdeC₂H - C₈H) ; 4,65 (2H, m, AdeCH₂) ; 3,25 (2H, m, H₃N⁺CH₂) ; 1,85 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₁₀H₁₆N₆, 2HCl

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

Tr. % : 40,8 5,7 28,2 24,0

UV (Eau pH=7) : λ_{\max} (ϵ) : 261 (14300) ; 205 (21300) nm.

SM (impact électronique) M = 293,20 ; m/e : 220 (43, M⁺-2HCl), 204 (13, Ade(CH₂)₅⁺), 190 (43, Ade(CH₂)₄⁺), 176 (25, Ade(CH₂)₃⁺), 135 (80, AdeH⁺).

CHLORO-6 METHOXY-2 |((ADENYL-9)-5 PENTYL)

AMINO|-9 ACRIDINE : Ade-C₅-Acr 20 :

Une solution du dérivé Ade-C₅-NH₂, 2HCl 19 (2,0 g ; 7 mmol) et du composé 2 (1,9 g ; 5,6 mmol) dans la DMF (25 cm³) est chauffée à 110°C pendant 10 h sous atmosphère d'azote. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi et versé lentement sous agitation dans 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 il est très hygroscopique. Le rendement brut est de 68 % (1,79 g). C'est un mélange complexe de produits. L'obtention d'échantillons de pureté analytique nécessite des chromatographies successives sur colonnes de silice (éluant : éthanol - ammoniaque 99/1).

F = 164-168°C.

IR (Nujol) : 3400, 3250, 3150, 1665, 1625, 1560, 1520, 1300, 1255, 1230, 1160, 1145, 1060, 1035, 920 cm^{-1} .

RMN¹ (270 MHz, DMSO d_6) δ ppm = 8,30 (1H, d, AcrC₈H) ; 8,05 (2H, s, AdeC₂H - C₈H) ; 7,80 à 7,30 (5H, m, AcrC₁H - C₃H - C₄H - C₅H - C₇H) ; 7,15 (2H, s, AdeNH₂) ; 4,05 (2H, t, AdeCH₂) ; 3,85 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,75 (2H, t, AcrNHCH₂) ; 1,75 (4H, m, (CH₂)₂) ; 1,25 (2H, m, CH₂).

Analyse : C₂₄H₂₄N₇OCl, H₂O

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

Tr. % : 60,5 5,9 20,0 7,5

UV (Eau pH=5,5 ; 5 % Ethanol) : λ_{max} (ϵ) : 445 (7650) ; 422,5 (8150) ; 342,5 (4230) nm.

SM (impact électronique) M = 461,96 ; m/e : 461 (16, M⁺), 426 (31, Acr(CH₂)₂⁺), 271 (47, AcrCH₂⁺), 244 (43, AcrH⁺), 135 (8, AdeH⁺).

N-(PHTALIMIDO-6 HEXYL)-9 ADENINE :

Ade-C₆-Pht 21 :

On utilise le même protocole que pour le dérivé Ade-C₅-Pht 18 (p.158). Le rendement en produit cristallisé est de 40 %.

F = 171-173°C ; Litt. (30) F = 177-180°C.

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

RMN (80 MHz, DMSO d_6) δ ppm = 8,05 (2H, s, AdeC₂H-C₈H) ; 7,80 (4H, s, PhtH) ; 7,10 (2H, s large, AdeNH₂) ; 4,05 (2H, t, AdeN₉CH₂) ; 3,50 (2H, t, PhtNCH₂) ; 2,00-1,00 (8H, m, (CH₂)₄).

Analyse : C₁₉H₂₀N₆O₂

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

Tr. % : 62,4 5,5 22,7

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

BIS-CHLORHYDRATE DE N-(AMINO-6 HEXYL)-9 ADENINE :

Ade-C₆NH₂ , 2HCl 22 :

On utilise le même protocole que pour le dérivé Ade-C₅-NH₂, 2HCl 19 (p.159). Le rendement en produit cristallisé est de 80 %.

F = 224-226°C (chlorhydrate) ; Litt. (30) F = 164-165°C (base libre).

IR (Nujol) : 1710, 1640, 1600, 1510, 1230, 1070, 750, 720 cm⁻¹.

RMN (80 MHz, DMSO d_6) δ ppm = 9,05 (3H, signal large, CH₂NH₃⁺) ; 8,50 et 8,45 (2H, 2s, AdeC₂H-C₈H) ; 7,95 (2H, s large, AdeNH₂) ; 4,20 (2H, t, AdeN₉CH₂) ; 2,65 (2H, m, CH₂ NH₃⁺) ; 2,00-1,00 (8H, m, (CH₂)₄).

SM (impact électronique) M = 307,22 ; m/e : 234 (64, M⁺-2HCl), 218 (29, Ade(CH₂)₆⁺), 190 (44, Ade(CH₂)₄⁺), 162 (80, Ade(CH₂)₂⁺), 148 (84, Ade(CH₂)⁺), 135 (24, AdeH⁺).

CHLORO-6 METHOXY-2 |((ADENYL-9)-6 HEXYL)

AMINO|-9 ACRIDINE : Ade-C₆-Acr : 23 :

Un mélange du dérivé Ade-C₆-NH₂, 2HCl 19 (2 g ; 6,8 mmol) et du composé 2 (1,9 g ; 5,6 mmol) dans la DMF (25 cm³) 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). La purification du produit nécessite plusieurs chromatographies sur colonnes de silice (élution : méthanol - ammoniaque, 99/1). Le rendement en produit analytiquement pur est très faible.

F = 177-178°C.

IR (Nujol) : 3300, 3100, 1735, 1635, 1600, 1555, 1525, 1410, 1365, 1300, 1255, 1230, 1165, 1070, 1040, 922, 825, 795, 760, 720 cm⁻¹.

RMN (270 MHz, DMSO d₆) δ ppm = 8,35 (1H, d, AcrC₈H), 8,00 (2H, s, AdeC₂H - C₈H) ; 7,25-7,75 (5H, m, AcrC₁H - C₃H - C₄H - C₅H - C₇H) ; 7,10 (2H, s large, AdeNH₂) ; 6,80 (1H, s large, AcrNH) ; 4,00 (2H, t, AdeCH₂) ; 3,80 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,65 (2H, m, AcrNHCH₂) ; 1,65 (4H, m, (CH₂)₂) ; 1,25 (4H, m, (CH₂)₂).

Analyse : C₂₅H₂₆N₇OCl, H₂O

Calc. % : C : 63,09 H : 5,50 N : 20,60

Tr. % : 62,8 5,6 20,1

UV (Eau pH=5,5 ; 5 % Ethanol) : λ_{max} (ε) : 445 (8340) ; 422,5 (8820) ; 342,5 (4080) nm.

SM (impact électronique) M = 475,99 ; m/e : 475 (18, M⁺), 440 (43, M⁺-Cl), 285 (41, Acr(CH₂)₂⁺), 271 (100, AcrCH₂⁺), 244 (47, AcrH⁺), 162 (11, Ade(CH₂)₂⁺), 148 (15, AdeCH₂⁺), 135 (13, AdeH⁺).

AMINO-2 DIHYDROXY-4,6 PYRIDINE 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 que l'on 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, à l'alcool puis à l'éther, on obtient le produit désiré sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 92 % (62 g).

F > 300°C ; Litt. (29) 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, M⁺-CO) ; 86 (37, M⁺-C₂H₀) ; 69 (30, M⁺-C₂H₄NO).

AMINO-2 DICHLORO-4,6 PYRIMIDINE 25 :

Sous azote et en refroidissant à l'aide d'un bain de glace, on ajoute lentement la dihydropyrimidine 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 après traitement avec du 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. (29) 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, $(M+1)^+$), 130 (35, M^+-Cl).

AMINO-2 CHLORO-6 PYRIMIDINONE-4 (3H) 26 :

On dissout la dichloropyrimidine 25 (10 g ; 60 mmol) dans une solution de soude (1N ; 120 cm^3). 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, à l'alcool et à l'éther. Le rendement est de 89 % (7,9 g).

F = 250-252°C ; Litt. (29) 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) \bar{M} = 145,55 ; m/e : 145 (100, M^+), 117 (43, M^+-CO), 110 (14, M^+-Cl), 68 (90, M^+-CNO_2).

AMINO-2 NITRO-5 CHLORO-6
PYRIMIDINONE-4 (3H) 27 :

A de l'acide sulfurique concentré (17,5 cm^3) refroidi dans un bain de glace, on ajoute de l'acide nitrique fumant (17,5 cm^3). On laisse agiter

jusqu'à ce que la température de la solution soit inférieure à 5°C. On ajoute alors le dérivé 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 (29) F = 275-276°C.

IR (Nujol) : 3595, 3510, 3240, 3200, 3125, 3050, 1695, 1675, 1615, 1530, 1490, 1405, 1325, 1235, 1040, 925, 850 cm^{-1} .

UV (Eau pH=7) : λ_{max} (ϵ) : 205 (5800) ; 230 (13800) ; 335 (8500) nm.

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

AMINO-2 NITRO-5 (AMINO-5 PENTYL AMINO)-6

PYRIMIDINONE-4 (3H) : Pyr-C₅-NH₂ 28 :

Dans un mélange de DMF anhydre (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 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, 1250, 950, 795, 780 cm^{-1} .

RMN (60 MHz, TFA d) δ ppm = 3,75 (2H, m, PyrCH₂) ; 3,35 (2H, m, NH₃⁺CH₂) ; 1,75 (6H, m, (CH₂)₃).

Analyse : C₉H₁₆N₆O₃

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

Tr. % : 40,8 6,4 32,0

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

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

AMINO-2 NITRO-5 (AMINO-6 HEXYL AMINO)-6

PYRIMIDINONE-4 (3H) : Pyr-C₆-NH₂ 29 :

On utilise le même protocole que pour le dérivé Pyr-C₅-NH₂ 28 (p.166). Le rendement brut est de 69 %.

F = 213-215°C.

IR (Nujol) : 3490, 3320, 3185, 1685, 1630, 1560, 1525, 1325, 1280, 1245, 795, 780 cm^{-1} .

RMN (60 MHz, TFA d) δ ppm = 3,75 (2H, m, PyrCH₂) ; 3,30 (2H, m, NH₃⁺CH₂) ; 1,65 (8H, m, (CH₂)₄).

Analyse : C₁₀H₁₈N₆O₃, H₂O

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

Tr. % : 41,9 6,8 29,4

UV (Eau pH=7) : λ_{max} (ϵ) : 215 (21300) ; 290 (6750) ; 335 (11400) nm.

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

AMINO-2 NITRO-5 (PROPYL AMINO)-6

PYRIMIDINONE-4 (3H) : 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. (29) F = 325°C.

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

RMN (90 MHz, TFA d) : δ ppm = 3,80 (2H, m, PyrCH₂) ; 1,85 (2H, m, CH₂CH₃) ; 1,00 (3H, t, CH₃).

UV (Ethanol) : $\lambda_{\max} (\epsilon)$: 330 (14200) ; 280 (5320) ; 237 (16800) ; 215 (22800) nm.

SM (impact électronique) $M = 213,2$; $m/e : 213 (70, M^+)$, 198 (16, $M^+ - CH_3$), 184 (49, $M^+ - C_2H_5$), 171 (79, $M^+ - C_3H_7$).

PROPYL-9 GUANINE : Gua-C₃ 31 :

Dans de l'acide formique desoxygéné 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 et 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 (4/1). Après une cristallisation dans l'éthanol, on obtient le produit désiré sous forme d'aiguilles blanches.

F > 300°C ; Litt. (29) F > 300°C.

IR (Nujol) : 3380, 3280, 3140, 1690, 1635, 1600, 1175, 715 cm⁻¹.

RMN (60 MHz, DMSO d₆) δ ppm = 10,45 (H, s large, GuaNH) ; 8,75 (1H, s, GuaC₈H) ; 6,35 (2H, s large, Gua NH₂) ; 4,30 (2H, t, GuaCH₂) ; 1,90 (2H, q, CH₂CH₃) ; 1,10 (3H, t, CH₂CH₃).

Analyse : C₁₈H₁₁N₅O

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

Tr. % : 49,4 5,7 36,4

UV (Ethanol) : λ_{max} (ε) : 283,5 (12400) ; 270 (9360) ; 266 (3200) ; 218 (8240) nm.

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

N-(AMINO-5 PENTYL)-9 GUANINE :

Gua-C₅-NH₂ 32 :

Dans de l'acide formique desoxygéné par barbotage d'azote sec (100 cm³), 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 cm³ 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 cm³) et d'acide chlorhydrique concentré (1 cm³). 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 cm³). 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 sans autre purification 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 sur phase inverse silice RP8. On élue le produit avec une solution tampon acétate d'ammonium pH=4,6 contenant 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 = 8,45 (1H, s, GuaC₈H) ; 3,95 (2H, m, GuaCH₂) ; 2,85 (2H, m, CH₂NH₃⁺) ; 2,00-1,00 (6H, m, (CH₂)₃).

UV (Eau pH=5,5) : λ_{\max} (ϵ) : 270 (7460) ; 253,5 (9830) ; 225 (2950) ; 212 (10800) nm.

SM (impact électronique) M = 236,27 ; m/e : 236 (31, M⁺), 206 (90, M⁺-CH₄N), 151 (100, GuaH⁺), 109 (60, C₄H₃N₃O⁺).

N-(AMINO-6 HEXYL)-9 GUANINE :

Gua-C₆-NH₂ 33 :

On utilise le même protocole que pour le dérivé Gua-C₅-NH₂ 32 (p. 170). Le rendement brut est de 80 %.

F = 198-201°C.

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

RMN (80 MHz, TFA d) δ ppm = 8,50 (1H, s, GuaC₈H) ; 3,95 (2H, m, GuaCH₂) ; 2,85 (2H, m, CH₂NH₃⁺) ; 2,0-1,0 (8H, m, (CH₂)₄).

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

SM (impact électronique) M = 250,33 ; m/e : 250 (33, M⁺), 234 (9, M⁺-NH₂), 220 (41, M⁺-CH₄N), 206 (45, M⁺-C₂H₆N), 178 (87, GuaCH₂⁺), 165 (100, GuaH⁺).

CHLORO-6 METHOXY-2 |((GUANYL-9)-5 PENTYL)

AMINO |9 ACRIDINE : Gua-C₅-Acr 34 :

Sous atmosphère d'azote, on ajoute le dérivé Gua-C₅-NH₂ 32 (0,75 g ; 3,3 mmol) à de la DMF sèche (40 cm³). On chauffe à 80°C et on laisse agiter pendant 30 mn pour solubiliser. On ajoute ensuite le dérivé 2 (0,88 g ; 3,3 mmol). Après 14 h, on laisse refroidir jusqu'à la 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 du produit 34, des composés de départ et de 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 chromatographies successives sur colonnes de silice en utilisant comme éluants : l'acétate d'éthyle et l'éthanol absolu. Une cristallisation dans un mélange éthanol absolu - acétate d'éthyle (4/1) fournit le produit sous forme de poudre jaune.

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 d_6) δ ppm = 8,25 (1H, d, AcrC₈H) ; 7,75 (1H, s, AcrC₅H) ; 7,75 (1H, d, AcrC₄H) ; 7,50 (2H, s, AcrC₁H et GuaC₈H) ; 7,30 (1H, d, AcrC₃H) ; 7,20 (1H, d, AcrC₇H) ; 6,75 (1H, s large, AcrNH) ; 6,60 (2H, s, GuaNH₂) ; 3,85 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,80 (2H, m, GuaCH₂) ; 3,60 (2H, m, AcrNHCH₂) ; 1,60 (4H, m, (CH₂)₂) ; 1,20 (4H, m, CH₂).

Analyse : C₂₄H₂₄N₇O₂Cl

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

Tr. % : 60,3 4,9 19,8

UV (Eau pH=5,5 ; 5 % Ethanol) : 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, M⁺-Cl), 285 (2, Acr(CH₂)₂⁺), 271 (6, AcrCH₂⁺), 243 (100, Acr⁺), 165 (14, GuaCH₂⁺).

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

CHLORO-6 METHOXY-2 |((GUANYL-9)-6 HEXYL)

AMINO|-9 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 anhydre (120 cm^3). On chauffe à 80°C sous agitation

jusqu'à ce que le produit soit solubilisé. On refroidit jusqu'à température ambiante et on ajoute du tamis moléculaire (4 A, 1g) 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 2 (2,18 g ; 6,5 mmol). On agite pendant 5 h. Le mélange réactionnel est évaporé à sec sous pression réduite. Après trituration du résidu huileux avec de l'éther éthylique, on obtient un solide brun jaune qui s'avère être un mélange complexe de produits parmi lesquels on retrouve les produits de départ. Le rendement en produit brut est de 80 % (2,5 g). Le produit est obtenu par chromatographies successives sur colonnes de silice (Eluants : acétate d'éthyle - éthanol absolu) suivies d'une cristallisation dans un mélange méthanol - acétate d'éthyle (4/1).

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 = 8,25 (1H, d, AcrC₈H) ; 7,75 (1H, s, AcrC₅H) ; 7,75 (1H, d, AcrC₄H) ; 7,50 (2H, s, AcrC₁H et GuaC₈H) ; 7,30 (1H, d, AcrC₃H) ; 7,20 (1H, d, AcrC₇H) ; 6,75 (1H, s large, AcrNH) ; 6,60 (2H, s, GuaNH₂) ; 3,85 (3H, s, AcrOCH₃) ; 3,80 (2H, m, GuaN₉CH₂) ; 3,60 (2H, m, AcrNHCH₂) ; 1,60 (4H, m, (CH₂)₂) ; 1,20 (4H, m, (CH₂)₂).

Analyse : C₂₅H₂₆N₇O₂Cl, ½ CH₃OH

Calc. % : C : 60,29 H : 5,56 N : 19,30

Tr. % : 60,3 5,2 19,2

UV (Eau pH=5,5 ; 5 % Ethanol) : λ_{max} (ε) : 445 (7900) ; 422,5 (8300) ; 342,5 (3860) nm.

SM (impact électronique) M = 491,99 ; m/e : 491 (2, M⁺), 285 (3, Acr(CH₂)₂⁺), 271 (19, AcrCH₂⁺), 243 (60, Acr⁺), 165 (13, GuaCH₂⁺).

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

(BROMO-2 ETHYL)-9 ADENINE : Ade-C₂-Br 36 :

A une solution d'adénine (2,5 g ; 18,52 mmol) et de dibromo-1,2 éthane (15 g ; 79,8 mmol) dans la DMF sèche (100 cm³), on ajoute du carbonate de potassium (6 g ; 43,4 mmol). On laisse la suspension sous agitation et sous atmosphère d'azote pendant 48 heures à température ambiante. Après filtration et évaporation, on recueille un solide jaune orangé contenant le produit 36 accompagné de produits minéraux. Ces derniers sont éliminés par lavage à l'eau. Après séchage, on obtient le produit pur sous forme de poudre jaune pâle avec un rendement de 77 % (3,46 g).

F = 195-200°C (décomp.).

IR (KBr) : 3300, 3100, 1655, 1585, 1475, 1415, 1360, 1320, 1300, 1225, 1065, 940, 870, 790 cm⁻¹.

RMN (200 MHz, DMSO d₆) δppm = 8,15-8,10 (2H, 2s, Ade H₂ - H₈) ; 7,25 (2H, s, Ade NH₂) ; 4,50 (2H, t, Ade CH₂ ou CH₂ Br) ; 3,90 (2H, t, Ade CH₂ ou CH₂ Br).

Analyse : C₇H₈N₅Br

Calc. % : C : 34,73 H : 3,33 N : 28,93

Tr. % : 35,1 3,2 28,8

UV (Ethanol) : λ_{max} (ε) : 259 (13850) ; 210 (14300) nm.

SM (impact électronique) M = 242 ; m/e : 243 (15, (M+1)⁺ Br⁸¹), 241 (16, (M-1)⁺ Br⁷⁹), 162 (2, M⁺-Br), 148 (1, M⁺-CH₂Br), 135 (100, Ade⁺).

CHLORHYDRATE DE (AMINO-11 DIAZA-3,7 UNDECYL)-9

ADENINE : Ade-Z-NH₂ 37 :

On ajoute le composé Ade-C₂-Br 36 (3 g ; 12 mmol) à une solution de bis-(amino-3 propyl) amine (48,8 g ; 370 mmol ; 30 fois stoechiométrique) dans le méthanol (190 cm³). Le mélange est porté à reflux pendant 24 h. Après refroidissement, on concentre sous pression réduite jusqu'à 60 cm³ et on dilue avec de l'eau distillée (180 cm³). La purification se fait par chromatographie préparative liquide haute performance : la solution aqueuse est chromatographiée par fractions de 40 cm³ sur 200 g de silice RP8 phase inverse. Une première élution avec de l'eau pure (8 l) permet d'éliminer l'excès de triamine. Le produit est élué par le méthanol (6 l). Après évaporation de la solution alcoolique, on recueille un solide brun clair très hygroscopique, que l'on dissout dans du méthanol (250 cm³) ; on acidifie par de l'acide chlorhydrique (12N ; 3 cm³). La solution est placée à -20°C pendant une nuit et le produit désiré précipite sous forme d'une poudre blanchâtre avec un rendement de 26 % (1,34 g ; calculé pour la forme tétra-chlorhydrate de 37).

F = 262-265°C (Décomp.).

IR (KBr) : 2980, 2765, 1685, 1585, 1415, 1230, 1030, 885, 770 cm⁻¹

RMN (60 MHz, DMSO d₆) δ ppm = 8,10 (2H, s large, AdeC₂H - C₈H) ; 7,10 (2H, s large, AdeNH₂) ; 4,20 (2H, t, AdeCH₂) ; 2,80 (2H, t, CH₂) ; 1,70-1,10 (4H, m, (CH₂)₂).

UV (Eau pH=5,5 ; tampon acétate) : λ_{max} (ε) : 260 (13150) nm.

SM (ionisation chimique) ; méthane ; M = 292 ; m/e : 293 (100, (M+1)⁺), 276 (10, M⁺-NH₂), 262 (14, M⁺-CH₂NH₂), 248 (15, M⁺-(CH₂)₂NH₂), 233 (4, M⁺ - (CH₂)₃ NH₂), 219 (14, M⁺ - NH(CH₂)₃ NH₂), 205 (28, M⁺ - CH₂NH(CH₂)₃ NH₂), 191 (39, M⁺-(CH₂)NH(CH₂)₃NH₂), 142 (16, M⁺ - (Ade, NH₂)), 136 (40, (Ade+H⁺)⁺).

CHLORO-6 METHOXY-2 ((ADENYL-9)-11)-4,8 DIAZADACYL)

AMINO-9 ACRIDINE : Ade-Z-Acr 38 :

Dans une solution de phénol (1 g) et du dérivé 2 (0,2 g) ; 0,59 mmol) chauffée à 50°C sous atmosphère d'azote, on ajoute le dérivé Ade-Z-NH₂ 37 (0,2 g ; 0,5 mmol). Le mélange est laissé sous agitation pendant 5 h. A ce moment, la réaction n'est pas terminée mais des produits de dégradation commencent à se former. La solution est alors versée dans le méthanol (50 cm³) et directement chromatographiée sur une colonne de silice avec comme éluant du méthanol et un mélange méthanol-ammoniaque (98/2). Après une cristallisation dans du méthanol absolu acidifié (HCl 12N) on obtient le produit 38 sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de 36 % (0,14 g). Sa pureté a été contrôlée par chromatographie liquide haute performance sur phase inverse (RP 8).

F = 203-207°C (Décomp.).

IR (KBr) : 3025, 2990, 2615, 1690, 1625, 1590, 1255, 1240, 1165, 1085, 1020, 925, 830, 755 cm⁻¹.

RMN (60 MHz, DMSO d₆) : δ ppm = 8,30 (1H, s, AcrC₈H) ; 8,10 (2H, s, AdeC₂H et C₈H) ; 7,80-7,65 (3H, m, AcrC₁H - C₄H - C₅H) ; 7,45-7,10 (4H, m, AcrC₃H - C₇H et AdeNH₂) ; 4,20 (2H, t, AdeCH₂) ; 3,90 (3H, s, OCH₃) ; 2,75 (4H, m, CH₂)).

Analyse : C₂₇H₃₂N₉OCl, 7HCl

Calc. % : C. : 41,08 H : 4,98 N : 15,97

Tr. % : 41,0 4,6 15,5

UV (Tampon Acétate pH=5,5 ; 5 % DMSO) : λ_{\max} (ϵ) : 445 (8750) ; 422 (8700) ; 345 (4450) ; 330 (3150) ; 275 (2500) nm.

SM (ionisation chimique) ; méthane ; M=533,5 ; m/e : 534 (19, M⁺) , 343 (88, M⁺ - Ade(CH₂)₂NHCH₂), 329 (100, M⁺ - Ade(CH₂)₂NH(CH₂)₂), 315 (60, M⁺ - Ade(CH₂)₂NH(CH₂)₃) , 272 (17, M⁺ - Ade(CH₂)₂NH(CH₂)₃NH(CH₂)₂), 244 (100, (AcrH+H⁺)⁺), 179 (33, (AdeC₂NH₂+H⁺)⁺), 136 (33, (Ade+H⁺)⁺).

N-(ACETYL)DIAMINO-3,6 ACRIDINE :

Ac-Pf 39 :

A une solution de proflavine (1,05 g ; 5 mmol) dans l'acide propanoïque (100 cm³) maintenue à -18°C, sous agitation, on ajoute de l'anhydride acétique (1 cm³ ; 10 mmol). La réaction est laissée 48 heures sous agitation. Le mélange obtenu est versé dans de l'éther éthylique (200 cm³). Il se forme un précipité brun orangé qui contient de façon très majoritaire le produit de monoacétylation 40 accompagné de traces de produit bisacétylé. Le solide est dissous dans de l'éthanol et la solution est rendue alcaline par addition d'ammoniaque. Après évaporation sous pression réduite, le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice en utilisant l'éthanol comme éluant. Le rendement en produit pur est de 83 % (1,04 g).

F = 285-286°C ; Litt. (112) F = 283°C.

IR (KBr) : 1600, 1530, 1490, 1450, 1270, 1200, 1130, 1000, 950, 900, 880 cm⁻¹

RMN (60 MHz, DMSO d₆) : δ ppm = 11,20 (1H, s, PfnHCOCH₃) ; 8,50 (1H, s, Pfc₉H) ; 8,30 (1H, s, Pfc₄H) ; 7,90 (1H, d, Pfc₁H) ; 7,60 (1H, d, Pfc₈H) ; 7,25 (1H, d, Pfc₂H) ; 7,00 (1H, d, Pfc₇H) ; 6,90 (1H, s, Pfc₅H) ; 5,95 (2H, s large, PfnH₂) ; 2,10 (3H, s, COCH₃).

N-(ACETYL), N'-(TOSYL) DIAMINO-3,6

ACRIDINE : Ac-Pf-Ts 40 :

Sous agitation mécanique, à température ambiante, le dérivé Pf-Ac 39 (3,11 g ; 12,4 mmol) est dissous dans de la pyridine (100 cm³). La solution est alors refroidie à 0°C et on ajoute goutte à goutte un mélange de chlorure de tosyle (7,09 g ; 37,2 mmol) dissous dans de la pyridine (15 cm³). Il se

forme un précipité que l'on solubilise en ajoutant de la triéthylamine (2 cm^3 ; 14,23 mmol). Après 2 heures de réaction, on ajoute une deuxième fraction de chlorure de tosylo ($3,03 \text{ g}$; 15,9 mmol) en solution dans de la pyridine (10 cm^3), on laisse alors agiter le mélange pendant 18 heures à 0°C . Après évaporation, le brut réactionnel est solubilisé dans de l'éthanol absolu (10 cm^3) auquel on ajoute de l'acétate d'éthyle (200 cm^3). La solution est laissée une nuit à 4°C . On filtre ensuite le chlorhydrate de triéthylamine qui a cristallisé. Le filtrat est concentré sous pression réduite puis on ajoute de l'éther éthylique. Le précipité formé est filtré, séché et solubilisé dans un mélange DMF-eau (6/1) auquel on ajoute du carbonate de potassium ($2,5 \text{ g}$; 18 mmol). La solution est chauffée à 80°C pendant 18 heures puis évaporée à sec. Le solide résiduel est alors mis en suspension dans un mélange éthanol absolu - acétate d'éthyle (1/20). Le carbonate de potassium insoluble est éliminé par filtration. Le filtrat est ensuite concentré sous pression réduite. Par addition d'éther, on fait précipiter le dérivé Ac-Pf-Ts 40 qui est filtré, lavé avec de l'éther et séché. Le rendement est de 75 % ($3,75 \text{ g}$).

F = $175-180^\circ\text{C}$ (Décomp.).

IR (Nujol) : 1685, 1635, 1610, 1570, 1540, 1490, 1445, 1390, 1360, 1300, 1245, 1150, 1120, 1070, 1010, 955, 900, 800, 730 cm^{-1} .

RMN (60 MHz, DMSO d_6) δ ppm = 10,30 (1H, s large, PfNH) ; 8,75 (1H, s, Pfc₉H) ; 8,40 (1H, s, Pfc₄H) ; 8,00-7,00 (9H, m, Pfc₁H - C₂H - C₅H - C₇H - C₈H et TsH) ; 2,20 (3H, s, TsCH₃ ou COCH₃) ; 2,10 (3H, s, TsCH₃ ou COCH₃).

N-ACETYL, N'-(BROMO-3 PROPYL), N'-(TOSYL)

DIAMINO-3,6 ACRIDINE : Ac-Pf-Ts-C₃-Br 41 :

A un mélange du dérivé 40 ($0,86 \text{ g}$; 2,12 mmol) et de 1,3-dibromopropane ($0,76 \text{ cm}^3$; $1,5 \text{ g}$; 7,4 mmol) dans la DMF anhydre (40 cm^3), on ajoute

du carbonate de potassium (1,53 g ; 11,07 mmol). La suspension est agitée 10 h à température ambiante sous atmosphère d'azote. Après filtration et évaporation sous pression réduite, on obtient un résidu jaune qui est mis en suspension dans un mélange éthanol absolu - acétate d'éthyle (1/10). Le carbonate de potassium insoluble est filtré et le filtrat est concentré sous pression réduite puis versé dans un grand volume d'éther. Le produit Ac-Pf-Ts-C₃-Br 41 précipite. On le recueille sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de 70 % (0,78 g).

F = 192-194°C.

IR (KBr) : 3380, 3295, 1680, 1620, 1560, 1535, 1445, 1335, 1285, 1245, 1220, 1150, 1080, 940, 895, 860, 800, 770, 705, 660 cm⁻¹.

RMN (60 MHz, DMSO d₆) δ ppm = 11,2 (1H, s, PfNHC₃OCH₃) ; 9,70 (1H, s, Pfc₉H) ; 8,90 (1H, s, Pfc₄H) ; 8,50-7,30 (9H, m, TsH, Pfc₁H - C₂H - C₅H - C₇H - C₈H) ; 4,25-3,00 (4H, m, PfN CH₂ et CH₂ Br) ; 2,35 (3H, s, TsCH₃) ; 2,20 (3H, s, COCH₃) ; 2,00 (2H, m, CH₂).

UV (Ethanol) : λ_{max} (ε) : 375,5 (11500) ; 274,5 (56100) ; 238 (30900) nm.

N-ACETY, N'-(CYTOSYL-1)-3 PROPYL), N'-TOSYL

DIAMINO-3,6 ACRIDINE : Ac-Pf-Ts-C₃-Cyt 42 :

Une suspension de cytosine (0,58 g ; 5,2 mmol) dans de l'hexaméthylidisilazane (HMDS ; 10 cm³) est chauffé à reflux en présence d'une quantité catalytique de sulfate d'ammonium (50 mg). Au bout d'une heure, la cytosine est entièrement solubilisée. On refroidit la solution à température ambiante et on évapore sous pression réduite. On obtient un résidu blanc huileux auquel on ajoute du sulfolane anhydre (8 cm³) puis le dérivé Ac-Pf-Ts-C₃Br 41 (1,5 g ; 2,9 mmol). La solution est chauffée à 80°C sous

atmosphère d'azote en présence de tamis moléculaire (4A). Après 48 heures, le mélange réactionnel est refroidi, dilué avec de l'éthanol (10 cm³) puis versé sous forte agitation dans un grand volume d'eau distillée. La suspension est placée une nuit à 4°C. Après filtration, lavage à l'eau puis séchage, on obtient 1,5 g de solide jaune qui est chromatographié sur colonne de silice en utilisant comme éluant un mélange éthanol - acétate d'éthyle (1/1). Le rendement en produit pur est de 61 % (0,98 g).

F = 138-142°C (décomp.).

IR (KBr) : 1645, 1570, 1485, 1450, 1335, 1190, 1160, 1085, 955, 785, 705 cm⁻¹.

RMN (60 MHz, DMSO d₆) δ ppm = 10,40 (1H, s, PfNH) ; 9,0 (1H, s, PfC₉H) ; 8,50-7,20 (11H, m, PfC₁H - C₂H - C₄H - C₅H - C₇H - C₈H + TsH + CytH) ; 6,95 (2H, signal large, CytNH₂) ; 5,55 (1H, d, CytH) ; 2,35 (3H, s, TsCH₃) ; 2,10 (3H, s, COCH₃).

Analyse : C₂₉H₂₉N₆O₄S, 3H₂O

Calc. % : C : 56,94 H : 5,76 S : 5,24

Tr % : 56,9 5,3 5,5

UV (Etahnol) : λ_{max} (ε) : 370 (11350) ; 275 (75500) ; 243 (37800) nm.

N-[(CYTOSYL-1)-3 PROPYL] DIAMINO-3,6

ACRIDINE : Pf-C₃-Cyt 43 :

On dissout le produit Ac-Pf-Ts-C₃-Cyt 42 (0,1 g ; 0,179 mmol) dans de l'acide sulfurique concentré (0,5 cm³). La solution brun rouge obtenue est chauffée à 80°C pendant 3 heures, puis refroidie à température ambiante. Le brut réactionnel est alors versé dans du méthanol (4 cm³) et il se forme un abondant précipité jaune orangé. La suspension est placée une nuit à -10°C, le

précipité est filtré et lavé abondamment avec du méthanol puis de l'éther éthylique. L'analyse sur couche mince de silice (éluant : méthanol-ammoniacque (95/5) et par chromatographie liquide haute performance sur phase inverse (RP8) révèle l'existence d'un produit unique. Le rendement est de 73 % (0,078 g).

F = 255-259 °C.

IR (KBr) : 3205, 1735, 1685, 1645, 1600, 1545, 1465, 1415, 1370, 1175, 1075, 805 cm^{-1} .

RMN (60 MHz ; DMSO d_6) : δ ppm = 8,75 (1H, s, PfC_9H) ; 8,35-7,70 (5H, m, $\text{PfC}_8\text{H} - \text{C}_1\text{H}$ et CytNH_2 et CytH) ; 7,05 - 6,65 (4H, m, $\text{PfC}_7\text{H} - \text{C}_5\text{H} - \text{C}_4\text{H} - \text{C}_2\text{H}$) ; 6,00 (1H, d, CytH) ; 3,90 (2H, m, PfCH_2 ou CytCH_2) ; 3,25 (2H, m, PfCH_2 ou CytCH_2) ; 2,00 (2H, m, CH_2).

Analyse : $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}, 2\text{H}_2\text{SO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$

Calc. % : C : 40,46 H : 4,92 N : 14,15

Tr. % : 41,0 4,5 13,7

UV (Eau pH=5,5) : λ_{max} (ϵ) : 455 (41200) ; 282 (30100) ; 259 (57300).

SM (impact électronique) M = 361 ; m/e : 209 (3, $\text{M}^+ - \text{Cyt}(\text{CH}_2)_3$) ; 111 (7, $\text{M}^+ - \text{Pf}(\text{CH}_2)_3$).

(ionisation chimique) ; ammoniac ; M = 361 ; m/e : 361 (6, M^+).

(PROPYL-1) CYTOSINE : Cyt-C_3 : 43 :

Ce composé a été synthétisé à partir de la N-acétyl cytosine et du bromo-1 propane selon la méthode décrite par N.J. LEONARD et D.T. BROWNE (29).

F = 166-170°C ; Litt. (29) F = 165-171°C.

RMN (60 MHz, DMSO d_6) δ ppm = 7,65 (1H, d, CytC₅H ou C₆H) ; 7,0 (2H, s large, CytNH₂) ; 5,65 (1H, d, CytC₆H ou C₅H) ; 3,55 (2H, t, CytCH₂) ; 1,45 (2H, m, CH₂) ; 0,75 (3H, t, CH₃).

Analyse : C₇H₉ON₃

Calc. % : C : 54,88 H : 7,23 O : 10,44

Tr. % : 55,0 7,2 10,6

C. ETUDES PHYSICOCHEMIQUES:

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

La loi de BEER-LAMBERT a été vérifiée pour chaque produit dans le solvant utilisé sur une gamme de concentration comprise entre $1 \cdot 10^{-5}$ 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 ordinateur 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) régulée par un cryostat LAUDA.

Les spectres ont été enregistrés tous les 2,5°C entre 2,5° et 25°C puis tous les 5°C entre 25 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 des spectromètres BRUKER WH 270 et AM 400 . 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 le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne.

L'attribution des déplacements chimiques a été effectuée par double irradiation et à partir des données de la littérature (113). Pour les dérivés en série adénine, les protons H₂ et H₈ sont différenciés par échange du H₈ avec le deutérium dans l'eau lourde (6h à 80°C) (114).

1/ Auto-association :

Les déplacements chimiques extrapolés à dilution infinie (δ_0) sont déterminés graphiquement à partir des courbes $\delta=f(c)$.

Ces résultats sont ensuite utilisés pour déterminer la constante d'auto-association. Pour cela, nous avons appliqué la méthode décrite par J.L. DIMICOLI et C. HELENE (82).

On détermine la différence ($\Delta\delta$) entre le déplacement chimique mesuré à "concentration nulle" (δ_0) et le déplacement chimique (δ) observé à une concentration donnée (c). Le tracé de la droite représentant l'évolution de $(\Delta\delta/c)^{1/2}$ en fonction de la valeur $\Delta\delta$ est une droite de pente "s" coupant l'axe des abscisses en " x_0 ".

Dans le cas de la formation de dimères, la valeur de x_0 représente la valeur du déplacement chimique induit par l'association ($\Delta\delta B^2$). La constante d'auto-association (K_{assoc}) est donnée par la relation :

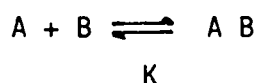
$$K_{\text{assoc}} = (x_0 \cdot s^2) / 2.$$

Pour les "n-mères", x_0 vaut $2\Delta\delta B^2$ et $K_{\text{assoc}} = x_0 \cdot s^2$.

Remarque : Ces équations peuvent également être utilisées pour obtenir une valeur plus précise pour le déplacement chimique extrapolé à dilution infinie δ_0 : Nous avons calculé les droites $(\Delta\delta/c)^{1/2} = f(\Delta\delta)$ par régression linéaire à partir des données expérimentales. Nous avons fait varier la valeur de δ_0 par pas de 0,01 ppm de façon à obtenir le meilleur coefficient de corrélation pour ces droites.

2/ Appariement avec la base complémentaire :

Cette étude a été menée dans des conditions de dilution qui nous permettent de négliger la quantité d'agrégats formés. Nous pouvons donc considérer que nous sommes proches du cas général traité par J.L. DIMICOLI et C. HELENE (82). Dans leurs expériences, ils ont considéré deux molécules en interactions A et B qui ne s'auto-associent que peu ou pas du tout. La concentration du composé B sera toujours grande devant celle de A. On pourra alors faire l'approximation que la concentration de B non complexé est peu différente de la concentration totale en B dans le milieu.



On note A_0 et B_0 les concentrations initiales des composés A et B.

δA est le déplacement chimique observé pour un proton donné de A, à la concentration A_0 , en l'absence de B.

δAB est le déplacement chimique observé pour ce même proton en présence de B.

On peut déterminer $\Delta\delta = \delta A - \delta AB$ qui est la différence de déplacement chimique induite sur un proton de A par le composé B en excès.

La constante d'association du complexe AB (K) peut alors être déterminée à partir de l'équation suivante.

$$\Delta\delta/B_0 = -K (\Delta\delta - \Delta\delta AB)$$

$\Delta\delta AB$ est l'effet de blindage induit sur les protons du composé A totalement complexé par le dérivé B.

En traçant l'évolution de la valeur de $\frac{1}{B_0}$ en fonction de , nous obtenons des droites dont la pente donne directement la valeur de la constante d'association K. Cette droite coupe l'axe des abscisses à la valeur AB.

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 (non dégazées) 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 (115). Une correction des indices de réfraction des solvants a été effectuée.

IV. MESURE DES INTERACTIONS AVEC L'ADN :

1/ Matériel :

Les mesures ont été réalisées à 25°C à l'aide d'un spectrofluorimètre PERKIN ELMER MPF 44-A.

Les données expérimentales sont traitées selon la méthode de J.D. Mc. GHEE et P.H. VON HIPPEL, programmée sur un ordinateur HEWLETT-PACKARD 85 couplé à un traceur de courbes 7225A.

2/ Méthode :

Dans un premier temps, nous avons préparé des solutions mères des produits à tester dans de l'éthanol ($c=1.10^{-4}$ M).

On en prélève 50 µl qui sont ajoutés, dans la cuve de mesure (maintenue à 25°C), à 950 µl d'une solution aqueuse d'ADN de thymus de veau ($1,78 \cdot 10^{-5}$ M en paires de bases ; Tris, HCl ($2,5 \cdot 10^{-2}$ M) pH=6,9 ; NaCl $1 \cdot 10^{-1}$ M ; EDTA $2 \cdot 10^{-4}$ M) ;. On obtient ainsi une solution contenant 5 % d'éthanol dans laquelle la concentration finale en intercalant est $2 \cdot 10^{-5}$ M et la concentration en paires de bases est $1,7 \cdot 10^{-5}$ M. Après 30 mn à 25°C, on ajoute le bromure d'éthidium (par fractions de 10 µl de solutions stock de concentrations connues : $5 \cdot 10^{-5}$ M ; $1 \cdot 10^{-4}$ M ; $2 \cdot 10^{-4}$ M ; $4 \cdot 10^{-4}$ M et $8 \cdot 10^{-4}$ M).

Après chaque addition, on mesure l'intensité de la fluorescence émise par le bromure d'éthidium à $600\text{nm} \pm 4 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \pm 8 \text{ nm}$). Sa concentration est contrôlée en relevant la densité optique de la solution à 520 nm (maximum d'absorption du bromure d'éthidium).

Les valeurs expérimentales sont traitées à l'aide des équations de J.D. Mc GHEE et P.H. VON HIPPEL (109).

$$r_i = B \cdot K_i \left(rf_i - \frac{\sum r_i}{i} \right) \frac{(1 - \frac{\sum r_i}{i} n_i r_i)^n}{(1 - \frac{\sum r_i}{i} (n_i - 1) r_i)^{n-1}}$$

On note K_i la constante d'affinité du composé i pour la macromolécule.

n_i est le nombre de paires de bases couvertes.

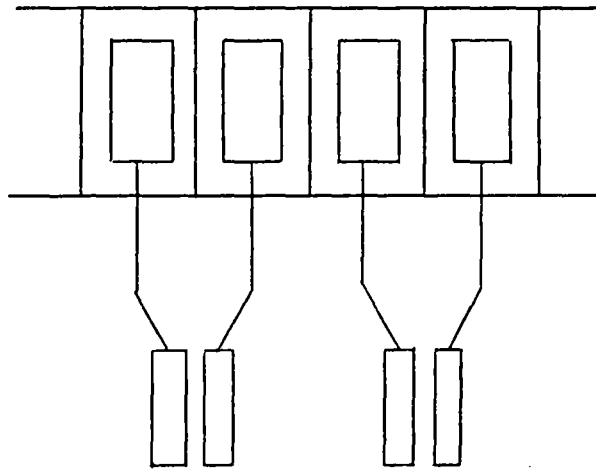
B est la concentration molaire de l'ADN exprimée en paires de bases.

r_i représente le rapport de la concentration en composé i lié sur la concentration en ADN.

rf_i est le rapport de la concentration totale en composé i sur la concentration en ADN.

Dans le cas qui nous intéresse, nous nous limitons à deux ligands en compétition (les paramètres d'interaction de l'un d'eux étant parfaitement connus).

En proposant différentes valeurs pour le couple (n, K) la courbe $r=f(rf)$ calculée à l'aide de l'équation citée plus haut peut être ajustée aux points expérimentaux .



V. ETUDES PRELIMINAIRE AVEC LES ENDONUCLASES A ET B DE MICROCOCCUS LUTEUS :

Nous avons utilisé le protocole expérimental mis au point dans le laboratoire du Pr. J. LAVAL (27). L'ADN de phage T₅ dépuriné et marqué avec le tritium (8.10^{-6} mci) est dissous dans un tampon Hepes-KOH pH=7,5 (1.10^{-1} M, 5.10^{-2} M) contenant du chlorure de sodium ($2,5.10^{-2}$ M), du chlorure de magnésium (1.10^{-2} M) du di-thiothreitol (5.10^{-3} M) et de la sérum albumine bovine (1.10^{-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. 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 mn à 37°C, à l'abri de la lumière. On prélève un peu de ce mélange ($0,1 \text{ cm}^3$) et on ajoute l'enzyme en solution ($0,002 \text{ cm}^3$ de solution d'enzyme A ou $0,005 \text{ cm}^3$ de solution d'enzyme B). On laisse incuber à 37°C. Après des temps d'incubation de 2 mn 30, 5 mn et 8 mn, on ajoute de l'ADN thymus de veau non radioactif ($0,05 \text{ cm}^3$; $1,5.10^{-5}$ g) pour stopper la réaction. Après 2 mn, on place le mélange réactionnel à 0°C et on ajoute de l'acide perchlorique 0,8 N ($0,2 \text{ cm}^3$). On maintient à 0°C pendant 10 mn puis on centrifuge pendant 15 mn à 6000 g et à 4°C. La radioactivité du surnageant ($0,3 \text{ cm}^3$) est déterminée par couplage en scintillation liquide (liquide scintillant Beckam ready solv. GP).

Conc.	H-1	H-3	H-4	H-5	H-7	H-8	OCH ₃
8.10 ⁻⁴ M	7,44	7,57	7,57	7,57	7,39	8,17	3,94
5.10 ⁻⁴ M	7,50	7,59	7,59	7,64	7,43	8,22	3,98
2,5.10 ⁻⁴ M	7,59	7,64	7,68	7,70	7,46	8,29	4,00
1,2.10 ⁻⁴ M	7,64	7,65	7,73	7,77	7,49	8,34	4,01
dil ∞	7,69	7,67	7,78	7,82	7,51	8,39	4,02

Tableau 5 : Effets de la dilution sur les déplacements chimiques (ppm) des protons du composé Acr-C₃ 7 (D₂O pD=5,5 ; 270 MHz)

Conc.	H-1	H-3	H-4	H-5	H-7	H-8	H-6T	CH ₃ T	OCH ₃
2. 10 ⁻³ M	7,37	7,58	7,58	7,59	7,40	8,13	7,19	1,62	3,90
1. 10 ⁻³ M	7,45	7,60	7,65	7,67	7,44	8,21	7,18	1,62	3,92
5. 10 ⁻⁴ M	7,51	7,62	7,69	7,73	7,46	8,26	7,17	1,61	3,93
2,5.10 ⁻⁴ M	7,57	7,64	7,74	7,79	7,48	8,31	7,17	1,61	3,93
1,2.10 ⁻⁴ M	7,61	7,65	7,76	7,82	7,50	8,34	7,17	1,61	3,93
dil ∞	7,65	7,66	7,79	7,86	7,52	8,37	7,16	1,60	3,94

Tableau 6 : Effets de la dilution sur les déplacements chimiques (ppm) des protons du composé Thy-C₅-Acr 14 (D₂O pD=5,5 ; 270 MHz).

Conc.	H-1	H-3	H-4	H-5	H-7	H-8	H-6T	CH ₃ T	OCH ₃
2. 10 ⁻³ M	7,35	7,55	7,55	7,55	7,37	8,10	7,35	1,72	3,92
1. 10 ⁻³ M	7,44	7,60	7,60	7,60	7,41	8,17	7,34	1,70	3,93
5. 10 ⁻⁴ M	7,52	7,62	7,66	7,69	7,45	8,25	7,32	1,69	3,94
2,5.10 ⁻⁴ M	7,58	7,64	7,71	7,74	7,47	8,30	7,31	1,67	3,94
1,2.10 ⁻⁴ M	7,62	7,65	7,74	7,79	7,48	8,33	7,30	1,66	3,94
dil ∞	7,66	7,66	7,77	7,84	7,49	8,36	7,29	1,65	3,95

Tableau 7 : Effets de la dilution sur les déplacements chimiques (ppm) des protons du composé Thy-C₆-Acr 17 (D₂O pD=5,5 ; 270 MHz).

Conc.	H-1	H-3	H-4	H-5	H-7	H-8	H-2A	H-8A	OCH ₃
2. 10 ⁻³ M	7,12	7,59	7,59	7,64	7,36	8,05	7,56	7,97	3,84
1. 10 ⁻³ M	7,18	7,61	7,65	7,70	7,40	8,11	7,55	7,96	3,86
5. 10 ⁻⁴ M	7,23	7,63	7,69	7,75	7,43	8,15	7,55	7,95	3,87
2,5.10 ⁻⁴ M	7,25	7,64	7,72	7,79	7,44	8,18	7,52	7,94	3,88
1,2.10 ⁻⁴ M	7,27	7,65	7,74	7,82	7,45	8,21	7,51	7,93	3,88
dil ∞	7,29	7,66	7,76	7,85	7,46	8,24	7,50	7,92	3,89

Tableau 8 : Effets de la dilution sur les déplacements chimiques (ppm) des protons du composé Ade-C₅-Acr 20 (D₂O pD=5,5 ; 270 MHz)

Conc.	H-1	H-3	H-4	H-5	H-7	H-8	H-2A	H-8A	OCH ₃
2. 10 ⁻³ M	7,27	7,57	7,57	7,59	7,33	8,04	7,93	8,02	3,88
1. 10 ⁻³ M	7,32	7,59	7,65	7,67	7,37	8,10	7,89	8,00	3,90
5. 10 ⁻⁴ M	7,35	7,61	7,70	7,73	7,40	8,15	7,84	7,98	3,91
2,5.10 ⁻⁴ M	7,37	7,63	7,72	7,77	7,42	8,17	7,81	7,96	3,92
1,2.10 ⁻⁴ M	7,38	7,65	7,75	7,80	7,44	8,20	7,77	7,94	3,93
dil ∞	7,40	7,67	7,78	7,83	7,46	8,23	7,74	7,92	3,94

Tableau 9 : Effets de la dilution sur les déplacements chimiques (ppm) des protons du composé Ade-C₆-Acr 23 (D₂O pD=5,5 ; 2,70 MHz).

Conc.	H-9	H-8	H-1	H-7	H-2	H-5	H-4
1,14.10 ⁻³ M	8,00	7,38	7,27	6,72	6,53	6,17	5,68
5,7.10 ⁻⁴ M	8,15	7,49	7,39	6,80	6,64	6,30	5,86
2,85.10 ⁻⁴ M	8,34	7,62	7,53	6,89	6,77	6,46	6,09
1,4.10 ⁻⁴ M	8,46	7,68	7,60	6,93	6,83	6,56	6,22
7,1.10 ⁻⁵ M	8,58	7,79	7,72	7,00	6,94	6,71	6,43
3,55.10 ⁻⁵ M	8,64	7,83	7,76	7,02	6,97	6,76	6,50
dil ∞	8,72	7,91	7,85	7,07	7,02	6,88	6,66

Tableau 15 : Effets de la dilution sur les déplacements chimiques (ppm) des protons du composé de référence Pf-C₂ (D₂O pD=5,5 ; 400 MHz).

Conc.	H-9	H-8	H-1	H-6T	H-7	H-2	H-5	H-4	CH ₃ T
3,55.10 ⁻⁴ M	8,45	7,70	7,60	7,37	6,94	6,76	6,56	6,19	1,60
1,8. 10 ⁻⁴ M	8,54	7,76	7,67	7,38	6,99	6,82	6,66	6,31	1,59
8,9. 10 ⁻⁵ M	8,63	7,82	7,73	7,39	7,03	6,87	6,75	6,43	1,58
4,45.10 ⁻⁵ M	8,66	7,85	7,76	7,40	7,05	6,89	6,79	6,49	1,58
2,45.10 ⁻⁵ M	8,69	7,87	7,77	7,40	7,07	6,91	6,82	6,52	1,58
9,8.10 ⁻⁶ M	8,70	7,88	7,78	7,40	7,07	6,92	6,83	6,54	1,58
dil _∞	8,72	7,90	7,79	7,40	7,08	6,93	6,85	6,57	1,58

Tableau 16 : Effets de la dilution sur les déplacements chimiques (ppm) des protons du composé modèle Thy-C₃-Pf (D₂O pD=5,5 ; 400 MHz).

Conc.	H-9	H-8	H-1	H-C	H-7	H-2	H-5	H-4	H-C
5,9. 10 ⁻³ M	8,00	7,34	7,24	7,53	6,68	6,44	6,12	5,58	5,87
2,55.10 ⁻⁴ M	8,36	7,62	7,53	7,56	6,89	6,71	6,47	6,05	5,86
1,5. 10 ⁻⁴ M	8,48	7,71	7,62	7,56	6,95	6,78	6,59	6,21	5,85
5,8. 10 ⁻⁵ M	8,61	7,80	7,73	7,57	7,01	6,89	6,73	6,40	5,84
2,9. 10 ⁻⁵ M	8,66	7,84	7,77	7,57	7,05	6,93	6,78	6,47	5,83
dil _∞	8,72	7,88	7,81	7,57	7,11	6,98	6,84	6,55	5,80

Tableau 17 : Effets de la dilution sur les déplacements chimique (ppm) des protons du composé modèle Cyt-C₃-Pf (D₂O pD=5,5 ; 400 MHz).

Conc.	H-9	H-2A	H-8A	H-8	H-1	H-7	H-2	H-5	H-4
$2,9 \cdot 10^{-4}$ M	8,39	7,61	8,11	7,70	7,45	6,96	6,55	6,58	5,65
$1,45 \cdot 10^{-4}$ M	8,47	7,62	8,13	7,76	7,50	7,00	6,59	6,65	5,73
$4,9 \cdot 10^{-5}$ M	8,57	7,63	8,15	7,84	7,58	7,06	6,65	6,76	5,85
$2,45 \cdot 10^{-5}$ M	8,60	7,63	8,16	7,86	7,59	7,07	6,66	6,78	5,87
$1,95 \cdot 10^{-5}$ M	8,60	7,63	8,16	7,87	7,60	7,08	6,66	6,79	5,88
$9,75 \cdot 10^{-6}$ M	8,61	7,63	8,16	7,88	7,60	7,09	6,67	6,80	6,00
dil ∞	8,63	7,63	8,16	7,90	7,62	7,10	6,69	6,83	5,94

Tableau 18 : Effets de la dilution sur les déplacements chimiques (ppm) des protons du composé modèle Ade-C₃-Pf (D₂O pD=5,5 ; 400 MHz).

Conc. Ade-C ₃ 5	H-8	H-1	H-6T	H-7	H-2	H-5	H-4	CH ₃ T
$7,75 \cdot 10^{-3}$ M	85	62	-16	50,5	40	93	69,5	-43
$5,15 \cdot 10^{-3}$ M	76	52	-15	47	40	85	65	-35,5
$3,45 \cdot 10^{-3}$ M	59	45,5	-11	38	33,5	67,5	53	-26
$2 \cdot 10^{-3}$ M	44,5	35,5	-8	28	26	51	41	-18
$1,35 \cdot 10^{-3}$ M	38	29	-6	23,5	22	44,5	36	-16
$9 \cdot 10^{-4}$ M	24	19	-3,5	18	14	25	21,5	

Tableau 21 : Effets de blindage (en Hertz) induits par différentes concentrations du dérivé Ade-C₃ sur les protons du composé modèle Thy-C₃-Pf (D₂O pD=5,5 ; $2,5 \cdot 10^{-5}$ M ; 400 MHz).

Conc. Ade-C ₃	H-8	H-1	H-7	H-2	H-5	H-4
1,55.10 ⁻² M	90	112,5	35,5	60	107,5	142
1,2. 10 ⁻² M	81,5	104,5	32,5	54	100	130
1. 10 ⁻² M	75	99	29	49	89	118,5
7,75.10 ⁻³ M	65	82	24,5	43	78	102
5,15.10 ⁻³ M	48	64	19	33	60	79
3,45.10 ⁻³ M	34,5	47	13,5	22	44	57
2,3. 10 ⁻³ M	25	33,5	8	17	30	40
1,5. 10 ⁻³ M	16	22	4	11	19	26

Tableau 22 : Effets de blindage $\Delta\delta$ (en Hertz) induits par différentes concentrations du composé Ade-C₃ sur les protons du composé de référence Pf-C₂ (D₂O pD=5,5 ; 2,5.10⁻⁵M ; 400 MHz).

		H-8	H-1	H-7	H-2	H-5	H-4
Pf-C ₂	K	77	89	53,5	73	82	82
	$\Delta\delta_{AB}$	167	201	82	116	196	258
Pf-C ₃ -Thy	K	245	333	370	344	221	299
	$\Delta\delta_{AB}$	132	85	69	60	155	104

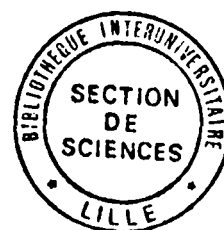
Tableau 23 : Paramètres de l'association (K, $\Delta\delta_{AB}$) de la base Ade-C₃ avec le composé modèle Pf-C₃-Thy et le composé de référence Pf-C₂ (déterminés à partir des courbes de la Figure 34 p 112).

Conc. Gua-C ₃ <u>31</u>	H-9	H-8	H-1	H-C	H-7	H-2	H-5	H-4	H-C
1,89.10 ⁻³ M	40	37	22,5	-8	25	20,5	29,5	25	-13
1,51.10 ⁻³ M	33,5	31	19	-6,5	21,5	16,5	26	22,5	-12
1,34.10 ⁻³ M	29	26,5	15	-3	18	14	22	17,5	-10
1,19.10 ⁻³ M	24		13	-4	15	12	16,5	15,5	-8
1,05.10 ⁻³ M	22		12	-5	13	10,5	15	14	-7,5
9,3. 10 ⁻⁴ M	19		10	-4,5	12,5	9	14	11	-7

Tableau 24 : Effets de blindage (en Hertz) induits par le dérivé Gua-C₃ 31 sur les protons du composé modèle Cyt-C₃-Pf (D₂O pD=5,5 ; 2,5.10⁻⁵ M ; 400 MHz).

Conc. Gua-C ₃ <u>31</u>	H-9	H-8	H-1	H-7	H-2	H-5	H-4
1,55.10 ⁻³ M	26,5	15,5	18	7	10	18	24,5
1,29.10 ⁻³ M	22,5	13	14,5	5	6	15	22
1,11.10 ⁻³ M	20,5	12	13,5	6	6,5	14	19
9,69.10 ⁻⁴ M	19	12	12,5	5	6	14	18
8,61.10 ⁻⁴ M	18	11	13	5	6	13	17
4,3 .10 ⁻⁴ M	4	2	3	1	0,5	2	1

Tableau 25 : Effets de blindage (en Hertz) induits par le dérivé Gua-C₃ sur les protons du composé de référence Pf-C₂.



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

1. E.A. STECK, "The Chemotherapy of Protozoan Diseases, V.S. Gov. Printing Off., Washington, D.C., 1972, 23.
2. T.I. WATKINS, J. Chem. Soc., 1952, 3059.
3. A. ALBERT, "Drug Design", (E.J. Ariens, ed.), Academic Press, New York, 1970, Chap. 5.
4. O. AVERY, C. Mc LEOD et M. Mc CARTY, J. Exp. Med., 1944, 79, 137.
5. J.D. WATSON et F.H.C. CRICK, Nature, 1953, 171, 737.
6. L.F. CAVALIER et J. ANGELOS, J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 4686.
7. A.R. PEACOCKE et J.N.H. SKERRETT, Trans. Faraday. Soc., 1956, 52, 261.
8. L.S. LERMAN, J. Mol. Biol., 1961, 3, 18.
9. M.S. WHITTINGHAM et A.J. JOCOBSON, "Intercalation Chemistry", (A.S. Nowick et G.G. Libowitz ed.), Academic Press, New York, 1982, Chap. 14.
10. W.A. REMERS, "Antineoplastic Agents", (J. Wiley, ed.), Wiley-Interscience, New York, 1984, Chap. 3 ; W.B. PRATT et R.W. RUDDON, "The Anticancer Drugs", Oxford University Press, 1979, Chap. 7.
11. E. KRIEK et J.G. WESTRA, "Chemical Carcinogens and DNA", (P.L. GROVER ed.), C.R.C Press, 1979, col. 2, 1.
12. Y. KAWAZOE, "Carcinogenesis : a comprehensive Survey", (T. Sugimura ed.), Raven Press, 1981, Vol 6, 1.
13. L. MUSAJO et G. RODIGHIERO, Photophysiology, 1972, 7, 115.
14. J.B. LE PECQ, "Chimiothérapie Anticancéreuse", HERMANN, 1978, Chap. 3., 67.

15. C.R. CANTOR et P.R. SCHIMMEL, "Biophysical Chemistry", (W.H. FREEMAN and Co), San francisco, 1980, Vol. 2.
16. D. PELAPRAT, R. OBERLIN, I. LE GUEN et B.P. ROQUES, J. Medicin. Chem., 1980, 23, 1330 ; P. LEON, G. GARBAY-JAURE GUIBERRY, J.B. LE PECQ et B.P. ROQUES, Tetrahedron Letters, 1985, 26, 4929 ; W.A. DENNY, G.J. ATWELL, B.C. BAGULEY et L.P.G. WAKELIN, J. Medicin. Chem., 1985, 28, 1568.
17. G.J. ATWELL, W. LEUPIN, S.J. TWIGDEN, W.A. DENNY, J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, 2913 ; J.B. HANSEN, T. THOMSEN et O. BUCHARDT, Chem. Comm., 1983, 1015.
18. P. LAUGAA, J. MARKOVITS, A. DELBARRE, J.B. LE PECQ et B.P. ROQUES, Biochemistry, 1985, 24, 5567.
19. R.P. HERTZBERG et P.B. DERVAN, Biochemistry, 1984, 23, 3934.
20. O. BUCHARDT, U. EHRBAR, C. LARSEN, J. MOLLER, P.E. NIELSEN, T. THOMSEN, F. WATTEN et J.B. HANSEN, J. Org. Chem., 1984, 49, 4123.
21. G. LANCELOT, V. ASSELINE, N.T. THUONG et C. HELENE, Biochemistry, 1985, 24, 2521.
22. J. BOLTE, C. DEMUYNCK et J. LHOMME, J. Am. Chem. Soc., 1976, 98, 613 ; J. BOLTE, C. DEMUYNCK et J. LHOMME, J. Medicin. Chem., 1977, 20, 106 ; *ibid*, J. BOLTE, C. DEMUYNCK et J. LHOMME, Bull. Soc. Chim. France, 1980, 316 ; J. BOLTE, C. DEMUYNCK, J. LHOMME, M.C. FOURNIE-ZALUSKI et B.P. ROQUES, Biochemistry, 1979, 18, 4928.
23. J. BOLTE, C. DEMUYNCK, M.F. LHOMME, J. LHOMME, J. BARBET et B.P. ROQUES, J. Am. Chem. Soc., 1982, 104, 760.
24. S. NEIDLE, A. ACHARI, G.L. TAYLOR, H.M. BERMAN, H.L. CARRELL, J.P. GLUSKER, W.C. STALLINGS, Nature, 1977, 269, 304 ; H.M. BERMAN, W. STALLINGS, H.L. CARRELL, J.P. GLUSKER, S. NEIDLE, G.L. TAYLOR, A. ACHARI, Biopolymers, 1979, 18, 2405 ; H.S. SHIEH, H.M. BERMAN, M. DABROW, S. NEIDLE, Nucleic Acid Research, 1980, 8, 85 ; E. WESTHOF, M. SUNDARALINGAM, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1980, 77, 1852 ; A. AGGARWAL, S.A. ISLAM, R. KURODA, S. NEIDLE, Biopolymers, 1984, 23, 1025 .

25. D.J. PATEL et L.L. CANUEL, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1977, 74, 2624.
26. J. FAHY, Thèse de 3^o Cycle, Lille, 1982.
27. J. PIERRE et J. LAVAL, Biochemistry, 1980, 19, 5018 ; *ibid*, 5024.
28. B. GANEN, Accounts Chem. Research, 1982, 15, 290 ; N. ASSA-MUNT, W.A. DÉNNY, W. LEUPIN, D.R. KEARNS, Biochemistry, 1985, 24, 1441.
29. D.T. BROWNE, J. EISINGER et N.J. LEONARD, J. Am. Chem. Soc., 1968, 90, 7302.
30. N.J. LEONARD et R. F. LAMBERT, J. Org. Chem., 1969, 34, 3240.
31. N.J. LEONARD, Accounts Chem. Research, 1979, 12, 423.
32. T. NISHIMURA et I. IWA, Chem. Pharm. Bull., 1964, 12, 352.
33. A.E. BEASLEY et M. RASMUSSEN, Austral. J. Chem., 1981, 34, 1107.
34. M. RASMUSSEN et J.M. HOPE, Austral. J. Chem., 1982, 35, 525 ; *ibid.*, 535.
35. M. DREYFUS, G. GODIN, O. BENSUAUDE et J.E. DUBOIS, J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 2369 ; M.T. CHENON, R.J. PUGMIRE, D.M. GRANT, R.P. PANZIA et L.B. TOWNSEND, J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 4636.
36. B. SHIMIZU et M. MIYAKI, Chem. Pharm. Bull., 1970, 10, 570 ; N NAKAZAKI, M. SEKIYA, T. YOSHINO et Y. ISHIDO, Bull. Chem. Soc. Japan., 1973, 46, 3858 ; N.J. LEONARD et T.R. HENDERSON, J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 4990.
37. N. BODOR, M.J.S. DEWAR et A.J. HARGET, J. Am. Chem. Soc., 1970, 92, 2929 ; B. PULLMAN, H. BERTHOD et M. DREYFUS, Theor. Chim. Acta, 1969, 15, 265 ; F. JORDAN et H.D. SOSTMAN, J. Am. Chem. Soc., 1972, 94, 7898.
38. K.K. OGILVIE et D.M. DIXIT, Nucleosides and Nucleotides, 1983, 2, 147.
39. M. MORR, Annalen, 1982, 4, 666 ; A. TSUNEMASA et I. KIYOSHI, Chem. Pharm. Bull., 1977, 25, 3347.

40. J. DAVOLL et D.D. EVANS, J. Chem. Soc., 1960, 5041.
41. M.C. LIU, S. KUZMICK et T.S. LIN, Tetrahedron Letters, 1984, 25, 613 ; G.E. WRIGHT et L.W. DUDYCZ, J. Medicin. Chem., 1984, 27, 175.
42. K.K. OLGIVIE, U.O. CHERIYAN, B.K. RADATUS, K.O. SMITH, K.S. GALLOWAY et W.L. KENNEL, Canad. J. Chem., 1982, 60, 3005 ; K.K. OGILVIE et H. RIŻKHANNA, Canad. J. Chem., 1984, 62, 2702.
43. A. LEDOCHOWSKI, M. BOGUĆKA, B. STEFANSKA, B. HOROWSKA, J. ZIELINSKI et C. RADZIKOWSKI, Polish pat. 60, 640.
44. J. BARBET, B.P. ROQUES et J.B. LE PECQ, Compt. rend., Ser D, 1975, 281, 851.
45. S. SKONIECZNY, Heterocycles, 1977, 6, 987.
46. K.L. GARRAWAY, P.C. HUANG et T.G. SCOTT, "Synthetic procedures in nucleic acid chemistry", Interscience, (.W. Zorbach et R.S. Tiposa, ed.) 1968.
47. N.J. LEONARD et K. ITO, J. Am. Chem. Soc., 1973, 95, 9010.
48. J. BOLTE, Thèse d'Etat, Clermont-Ferrand, 1974.
49. M.S. GIBSON et R.W. BRADSHAW, Angew. Chem. Internat. ed., 1968, 7, 919.
50. F. LINGENS et H. SCHNEIDER-BERNLOHR, Annalen., 1965, 686, 134.
51. D.H. HAYES et F. HAYES-BARO, J. Chem. Soc., (C), 1967, 1528.
52. J.B. HANSEN, E. LANGVAD, F. FRANSEN et O. BUCHARDT, J. Medicin. Chem., 1983, 26, 1510 ; J.B. HANSEN et O. BUCHARDT, Chem.Comm., 1983, 162.
53. W. TRAUBE, Chem.Ber., 1893, 26, 2553.
54. H. REMBOLD et H.J. SCHRAMM, Chem. Ber., 1963, 96, 2786.
55. J. LADURANTY, C. LION, D. MESNARD et L. MIGINIAC, Bull. Soc. Chim. Belges, 1984, 93, 903.

56. J.C. GRAMAIN, J.M. LEHN, J.F. PILICHOWSKI et J.P. SAUVAGE, résultats non publiés.
57. S.P. BRUEKELMAN, S.E. LEACH, G.D. MEAKINS et M.D. TIREL, J.C.S. Perkin I, 1984, 2801.
58. J.E. NORDLANDER, M.J. PAYNE, M.A. BALK, J.L. GRESSE, E.F.D. HARRIS, J.S. LANE, R.F. LEWE, S.E. MARSHALL, D. NAGY et D.G. RACHLIN, J. Org. Chem., 1984, 49, 133.
59. G.J. ATWELL et W.A. DENNY, Synthesis, 1984, 1032.
60. A. HUSSON, R. BESSELIEVRE et H.P. HUSSON, Tetrahedron Letters, 1983, 24, 1031.
61. J.B. HANSEN, M.C. NIELSEN, U. EHRBAR et O. BUCHARDT, Synthesis, 1982, 404.
62. R.J. BERGERON, S.J. KLINE, N.S. STOLOWICH, K.A. Mc. GOVERN et P.S. BURTON, J. Org. Chem., 1981, 46, 4524.
63. R.J. BERGERON, K.A. Mc GOVERN, M.A. CHANNING et P.S. BURTON, J. Org. Chem., 1980, 45, 1589.
64. K. CHANTRAPROMMA, J.S. Mc CANIS et B. GANEM., Tetrahedron Letters, 1980, 21, 2475.
65. R. SUNDARA MOORTHY, J.L. FOURREY et B.C. DAS, J.C.S. Perkin I, 1984, 2759.
66. B. GAUGAIN, J. BARBET, R. OBERLIN, B.P. ROQUES et J.B. LE PECQ, Biochemistry, 1978, 5071.
67. A.K. KREY et F.E. HAHN, Molecular Pharmacology, 1974, 10, 686.
68. N.W. DAVIDSON, B.G. GRIGGS, I.G. LOPP, D.W. BOYKIN et W.D. WILSON, Biochemistry, 1978, 17, 4221.
69. G.G. REINHARDT et T.G. KRUGH, Biochemistry, 1977, 13, 2890.

70. P.R. YOUNG et N.R. KALLENBACH, J. Mol. Biol., 1981, 145, 785.
71. J. REUBEN, B.M. BAKER et N.R. KALLENBACH, Biochemistry, 1978, 14, 2915.
72. I. TINOCO, Jr., J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 4785 ; *ibid*, 1961, 83, 5047.
73. W. RHODES, J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 3609.
74. H. DEVOE et I. TINOCO, Jr., J. Mol. Biol., 1962, 4, 518.
75. M.M. WARSHAW et I. TINOCO, J. Mol. Biol., 1966, 20, 29.
76. J.L. DECOUT et J. LHOMME, Photochem. and Photobiol., 1983, 2, 155.
77. K. GOLANKIEWICZ, Heterocycles, 1977, 7, 429.
78. P.O.P. Ts'0, "Basic principles in nucleic acid chemistry", Vol II, Academic Press, 1974, 305.
79. C.S.M. OLSTHOORN, C.A.G. HAASNOOT et C. ALTONA, European J. Biochem., 1980, 115, 309.
80. G. HUART, Thèse de 3e cycle, Lille, 1984.
81. W. BANGERTER, S. CHAN, J. Am. Chem. Soc., 1969, 91, 3910.
82. J.L. DIMICOLI et C. HELENE, J. Am. Chem. Soc., 1973, 95, 1036.
83. W. SAENGER, "Principles of Nucleic Acid structure", Springer advanced texts in chemistry, (C.R. Cantor ed), 1984, 116.
84. J. BARBET, Thèse d'Etat, Paris VI, 1976.
85. W.D. WILSON et I.G. LOPP, Biopolymers, 1979, 18, 3025.
86. G. GIESSNER-PRETTRE et B. PULLMAN, Biochem. Biophys. Research Comm., 1976, 70, 578 ; *ibid*, C.R. Hebd Seances Acad. Sci., Ser. D, 1976, 283, 675.

87. F. HAMA et Y. SAKATA, Tetrahedron Letters, 1982, 23, 3061 ; K. AKAHORI, F. HAMA, Y. SAKATA et S. MISUMI, Tetrahedron Letters, 1984, 25, 2379.
88. E. EL COUHEN, C. COURSEILLE, G. PRECIGOUX, J.F. CONSTANT et J. LHOMME, Acta Cryst., 1983, C 39, 246.
89. T. CASPERSSON, S. FARBER, G.F. FOLEY, J. DUDYNOWSKI, E.J. MODEST, E. SIMONSSON, U. WAGH et L. ZECH, Exp. Cell. Research, 1968, 49, 219.
90. T. CASPERSSON, J. LINDSTEN, G. LOMAKKA, A. MOLLER et L. ZECH, Internat. Rev. Exp. Path., 1972, 11, 1.
91. P. GIORDANO, G. BOTTIROLI, G. PRENNA, S. DOGLIA et G. BALDINI, J. Microsc., 1978, 112, 95.
92. T. CASPERSSON, L. ZECH et C. JOHANSSON, Exp. Cell. Research, 1970, 60, 315.
93. J. LIMON, M. BABINSKA et A. LEDOCHOWSKI, Exp. Cell. Research, 1975, 92, 299.
94. S.A. LATT et S. BRODIE , "Excited states of biological molecules", (J.B. Birks, J. Wiley and Sons ed), New York, 1976, 178.
95. J.R. ELLISON et H.J. BARR, Chromosoma, 1972, 36, 375.
96. B. WEISBLUM et P.L. DEHASET, Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1972, 69, 629.
97. U. PACHMANN et R. GIGLER, Exp. Cell. Research, 1972, 72, 602.
98. B. WEISBLUM, Nature, 1973, 246, 150.
99. M. NASTASI, R.W. YIP, V.L. SELIGY, A.G. SZABO, et R.E. WILLIAMS, "Excited states of biological molecules", (J.B. Birks, J. Wiley and Sons ed), New York, 1976, 233.
100. 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.

101. Y. KUBOTA, Chem. Letters, 1977, 311.
102. Y. KUBOTA, H. NAKAMURA, M. MORISHITA et Y. FUJISAKI, Photochem. Photobiol., 1978, 27, 479.
103. Y. KUBOTA, Y. MOTODA, Chem. Letters, 1979, 1375.
104. G. BALDINI, S. DOGLIA, S. DOLCI et G. SASSI, Biophys. J., 1981, 36, 465.
105. G. BALDINI, S. DOGLIA, G. SASSI et G. LUCCHINI, Internat. J. Biol. Macromol., 1981, 3, 248.
106. A. DELBARRE, B.P. ROQUES, J.B. LE PECQ, J.Y. LALLEMAND et NGUYEN-DAT-XUONG, Biophys. Chem., 1976, 4, 275.
107. J.N. SPENCER, S.W. BARTON, K.A. SMITH, W.S. WOLBACH, J.F. POWELL, M.R. KIRSHENBAUM, D.W. FIRTH, E.M. HARRIS et T.A. JUDGE, Canad. J. Chem., 1983, 61, 2695
108. J.B. LE PECQ et C. PAOLETTI, J. Mol. Biol., 1967, 27, 87.
109. J.D. Mc GHEE et P.H. VON HIPPEL, J. Mol. Biol., 1974, 86, 469.
110. H.M. SOBELL, B.S. REDDY, K.K. BHANDRAY, S.C. JAIN, T.D. SAKORE et T.P. SESHADRI, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1978, 42, 87.
- 111 L.P.G. WAKELIN, M. ROMANOS, T.K. CHEN, D. GLAUBIGER, E.S. CANELLAKIS, M.J. WARING, Biochemistry, 1978, 17, 5057 ; R.G. WRIGHT, L.P.G. WAKELIN, A. FIELDS, R.M. ACHESON et H.J. WARING, Biochemistry, 1980, 19, 5825.
112. A. ALBERT et W.H. LINNELL, J. Chem. Soc., 1936, 1614.
113. J. BARBET, B.P. ROQUES, S. COMBRISSEON et J.B. LE PECQ, Biochemistry, 15, 2642.
114. M.P. SCHWEIZER, S.I. CHAN et G.K. HELMKAMP, P.O.P. TS'O, J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 106.
115. J.B. BIRKS, J. Res. N.B.S. : A. Phys. Chem., 1976, 80, 389.