

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE

LILLE FLANDRES-ARTOIS



Année 1987

Nº d'ordre : 153

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

présentée à l'Université de Lille I pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN BIOCHIMIE

par

Abderraouf KENANI

ROLE DES PARTIES BITHIAZOLIQUE, PEPTIDIQUE ET GLYCANNIQUE DE LA BLEOMYCINE DANS SON ACTION SUR L'ADN

ETUDE PAR MODELISATION ET PAR METHODES PHYSICO-CHIMIQUES DES INTERACTIONS MOLECULAIRES



présentée le 16 Septembre 1987 devant la Commission d'Examen

JURY

Président : André VERBERT Rapporteurs : Bernard HECQUET Gérard STRECKER

Membres : Alain GOUYETTE Philippe ROUSSEL Jean-Pierre HENICHART

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, COR-DONNIER, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

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

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

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

.../...

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

Μ.	CONSTANT Eugène	Electronique
Μ.	FOURET René	Physique du Solide
Μ.	GABILLARD Robert	Electronique
Μ.	MONTREUIL Jean	Biochimie
М.	PARREAU Michel	Analyse
Μ.	TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
Μ.	VIVIER Emile	Biologie cellulaire
Μ.	WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - lère CLASSE

Μ.	BACCHUS Pierre	Astronomie
Μ.	BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
Μ.	BIAYS Pierre	Géographie
Μ.	BILLARD Jean	Physique du solide
Μ.	BOILLY Bénoni	Biologie

M. BRUYELLE Pierre M. CAPURON Alfred M. CARREZ Christian M. CAYATTE Jean-Louis M. CHAPOTON Alain M. COQUERY Jean-Marie Mme CORSIN Paule M. CORTOIS Jean M. COUTURIER Daniel M. CROSNIER Yves M. CURGY Jean-Jacques Mle DACHARRY Monique M. DAUCHET Max M. DEBRABANT Pierre M. DEGAUQUE Pierre M. DELORME Pierre M. DELORME Robert M. DE MASSON D'AUTUME Antoine M. DEMUNTER Paul M. DENEL Jacques M. DE PARIS Jean-Claude Mlle DESSAUX Odile M. DEVRAINNE Pierre M. DHAINAUT André Mme DHAINAUT Nicole M. DORMARD Serge M. DOUKHAN Jean-Claude M. DUBOIS Henri M. DUBRULLE Alain M. DUBUS Jean-Paul M. DUPONT Christophe M. FAKIR Sabah M. FONTAINE Hubert M. FOUQUART Yves M. FRONTIER Serge M. GAMBLIN André M. GLORIEUX Pierre M. GOBLOT Rémi M. GOSSELIN Gabriel M. GOUDMAND Pierre M. GREGORY Pierre M. GREMY Jean-Paul M. GREVET Patrick M. GUILBAULT Pierre M. HENRY Jean-Pierre M. HERMAN Maurice M. JACOB Gérard M. JACOB Pierre M. JACQUILLAT Bertrand M. JEAN Raymond M. JOFFRE Patrick M. JOURNEL Gérard

Géographie Biologie animale Informatique Sciences économiques Electronique Psychophysiologie Paléontologie Physique nucléaire et corpusculaire Chimie organique Electronique Biologie Géographie Informatique Géologie appliquée Electronique Physiologie animale Sciences économiques Sciences économiques Sociologie Informatique Analyse Spectroscopie de la réactivité chimique Chimie minérale Biologie animale Biologie animale Sciences économiques Physique du solide Spectroscopie hertzienne Spectroscopie hertzienne Spectrométrie des solides Vie de la firme (I.P.A.) Algèbre Dynamique des cristaux Optique atmosphérique Ecologie numérique Géographie urbaine, industrielle et démograph Physique moléculaire et rayonnements atmosphé riques Algèbre Sociologie Chimie physique I.P.A. Sociologie Sciences économiques Physiologie animale Génie mécanique Physique spatiale Informatique Probabilités et statistiques Gestion Biologie des populations végétales Vie de la firme (I.P.A.) Spectroscopie hertzienne

.../...

M. KREMBEL Jean M. LANGRAND Claude M. LATTEUX Michel Mme LECLERCQ Ginette M. LEFEVRE Christian Mlle LEGRAND Denise Mlle LEGRAND Solange Mme LEHMANN Josiane M. LEMAIRE Jean M. LE MAROIS Henri M. LHENAFF René M. LOCQUENEUX Robert M. LOSFELD Joseph M. LOUAGE Francis M. MACKE Bruno M. MAIZIERES Christian M. MESSELYN Jean M. MESSERLIN Patrick M. MONTEL Marc Mme MOUNIER Yvonne Mme N'GUYEN VAN CHI Régine M. PARSY Fernand M. PASZKOWSKI Stéphan Mlle PAUPARDIN Colette M. PERROT Pierre M. PERTUZON Emile M. PONSOLLE Louis M. PORCHET Maurice M. POVY Lucien M. RACZY Ladislas M. RAOULT Jean-François M. RICHARD Alain M. RIETSCH François M. ROBINET Jean-Claude M. ROGALSKI Marc M. ROY Jean-Claude M. SCHAMPS Joël Mme SCHWARZBACH Yvette M. SLIWA Henri M. SOMME Jean Mlle SPIK Geneviève M. STAROSWIECKI Marcel M. STERBOUL François M. TAILLIEZ Roger Mme TJOTTA Jacqueline M. TOULOTTE Jean-Marc M. TURREL Georges M. VANDORPE Bernard M. VAST Pierre M. VERBERT André M. VERNET Philippe M. WALLART Francis M. WARTEL Michel M. WATERLOT Michel Mme ZINN Justin Nicole

Biochimie Probabilités et statistiques Informatique Catalyse Pétrologie Algèbre Algèbre Analyse Spectroscopie hertzienne Vie de la firme (I.P.A.) Géographie Physique théorique Informatique Electronique Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques Automatique Physique atomique et moléculaire Sciences économiques Physique du solide Physiologie des structures contractiles Géographie Mécanique Analyse numérique Biologie physiologie végétales Chimie appliquée Physiologie animale Chimie physique Biologie animale Automatique Electronique Géologie structurale Biologie animale Physique des polymères E.U.D.I.L. Analyse Psychophysiologie Spectroscopie moléculaire Géométrie Chimie organique Géographie Biochimie Informatique Informatique Génie alimentaire Mathématiques Automatique Spectrochimie infrarouge et Raman Chimie minérale Chimie inorganique Biochimie Génétique Spectrochimie infrarouge et Raman Chimie inorganique Géologie générale Algèbre

A mes parents

à ma soeur, à mes frères

à tous mes amis

Ce travail a été réalisé à l'Unité 16 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

Je remercie Monsieur le Professeur Philippe ROUSSEL, Directeur de l'Unité INSERM N°16, pour l'accueil qu'il m'a réservé et le soutien qu'il m'a prodigué. Je lui fais part de ma profonde reconnaissance d'avoir accepté de faire partie de ce Jury.

Ma gratitude va également à Monsieur Jean-Pierre HENICHART, Directeur de Recherches à l'INSERM, de m'avoir confié cette étude et pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de son équipe. Il a inspiré et guidé ce travail, avec beaucoup de compétence et une disponibilité constante. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Professeur André VERBERT me fait l'honneur de présider ce Jury. Qu'il veuille trouver ici l'expression de mes remerciements.

Monsieur Bernard HECQUET, Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie Clinique du Centre Oscar Lambret, Monsieur Gérard STRECKER, Directeur de Recherches CNRS au laboratoire de chimie biologique (LA 217 CNRS) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, ont bien voulu accepter, malgré leurs nombreuses charges, d'être Rapporteurs de ce travail. Qu'ils veuillent accepter ma déférente gratitude.

Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur Alain GOUYETTE, Directeur de Recherches CNRS à l'Institut Gustave Roussy à Villejuif (LA 147 CNRS, U 140 INSERM), d'avoir bien voulu juger cette thèse. Je voudrais témoigner enfin ma profonde amitié et toute ma reconnaissance à tous les membres de notre équipe, qui m'ont apporté aide et conseils :

> Jean-Luc BERNIER Raymond HOUSSIN Nicole HELBECQUE Michèle LOHEZ Christian BAILLY

J'associe à ce travail Jean-Pierre CATTEAU, Professeur à l'ENSCL, et Pierre LEMAY, Chargé de Recherches CNRS, pour leur collaboration efficace.

Que tous ceux qui m'ont accordé leur aide, membres de l'Unité 16 et des Unités voisines, 233 et 156, trouvent l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie vivement le Secrétariat de l'Unité INSERM N°16, qui a assuré avec compétence et beaucoup de patience la dactylographie de ce mémoire. Nos recherches ont fait l'objet des publications suivantes :

PUBLICATIONS

HENICHART J.P., BERNIER J.L., HOUSSIN R., LOHEZ M., KENANI A., CATTEAU J.P.

Copper II and Iron II complexes of methyl-2-(2-aminoethyl)-aminomethyl-pyridine-6-carboxyl-histidinate (AMPHIS), a peptide mimicking the metal-chelating moiety of bleomycin. A ESR investigation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1985, 126, 1036-1041.

BERNIER J.L., <u>KENANI A.</u>, HOUSSIN R., HELBECQUE N., LOHEZ M., HECQUET B., HENICHART J.P.

Molecular interaction between bleomycin and amsacrine in the presence of cupric ions.

J. Inorg. Biochem., 1986, 27, 271-285.

<u>KENANI A</u>., LOHEZ M., HOUSSIN R., HELBECQUE N., BERNIER J.L., LEMAY P., HENICHART J.P.

Chelating, DNA-binding and DNA-cleaving properties of a Bleomycin synthetic model.

Anticancer Drug Design, 1987, 2, 47-59.

KENANI A., LAMBLIN G., HENICHART J.P.

A convenient method for the cleavage of the D-mannose-L-gulose disaccharide from Bleomycin- A_2 .

Carbohydr. Res., 1987, (sous presse).

COMMUNICATIONS

HOUSSIN R., LOHEZ M., <u>KENANI A.</u>, BERNIER J.L., HENICHART J.P.

Modélisation pour l'étude du mode d'action de la bléomycine. XXème rencontres internationales de Chimie Thérapeutique, Chatenay-Malabry, 10-12 juillet 1984. HELBECQUE N., BERNIER J.L., HOUSSIN R., LOHEZ M., <u>KENANI A.</u>, HENICHART J.P. Association Bléomycine-Amsacrine-Cuivre (II) : mise en évidence d'une interaction moléculaire. XXIèmes Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique, Reims, 11-13 septembre 1985.

<u>KENANI A.</u>, HOUSSIN R., BERNIER J.L., HELBECQUE N., LOHEZ M., CATTEAU J.P., HENICHART J.P.

Modélisation dans la série de la Bléomycine.

Journées de la Société Chimique de France, Lille 20 mars 1986.

CONFERENCE

KENANI A.

Complexes métalliques de la Bléomycine et de la déglyco-Bléomycine. GECOM XV, 7-10 avril 1987 (Bouvines).

RESUME

La Bléomycine, antibiotique antitumoral actuellement utilisé en clinique pour le traitement d'un certain nombre de carcinomes, possède une structure de nature glycopeptidique présentant trois parties essentielles. Le rôle particulier de chacune de ces parties complémentaires pour l'activité biologique a été mis en évidence.

Pour la partie complexante, la nature des ligands du cuivre et du fer a pu être déterminée grâce à l'élaboration d'un modèle simplifié AMPHIS. Au cours de la même étude, les conditions optimales de production de radicaux libres, responsables de la coupure d'ADN, ont été définies.

La synthèse d'un certain nombre de dérivés du bithiazole a permis de montrer que la Bléomycine se liait à l'ADN par un processus différent de l'intercalation. Mais c'est l'élaboration d'un modèle AMBI-A₂ comportant à la fois la fraction AMPHIS et l'hétérocycle bithiazole qui a permis d'établir - résultat capital - que les deux fractions devaient être portées sur la même structure et séparées par un bras espaceur court pour que la molécule soit biologiquement active.

Le rôle de la partie glycannique enfin a été clairement défini pour la stabilisation du complexe et son activation. Un modèle prenant en compte toutes ces observations, AMBIGLU, a été synthétisé et devrait être le point de départ d'une nouvelle famille de composés simples répondant au concept intercalant – peptide chélateur dans l'espoir de mettre à jour des molécules actives contre le cancer.

MOTS-CLES :

BLEOMYCINE (BLM) LIAISON A L'ADN PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES VISCOSIMETRIE MODELISATION COMPLEXATION (Cu, Fe) COUPURE D'ADN (ELECTROPHORESE) ETUDES SPECTROSCOPIQUES

ABREVIATIONS

AMBI-A2	-	2-(2-aminoéthyl)-aminométhyl-pyridine-6-carboxy- histidyl-3-aminobutyryl-glycyl-2-aminoéthyl- bithiazole-4'-(3-diméthyl sulfonium) carboxamido- propyl
AMBIGLU	=	2-(2-aminoéthyl)-aminométhyl-pyridine-6-carboxy- histidyl(yglucosamido)-glutamyl-2-aminoéthyl- bithiazole-4'-carboxylate de méthyle
AMPHIS	=	2-(2-aminoéthyl)-aminométhyl-pyridine-6-carboxy- histidinate de méthyle
BLM	=	bléomycine
BLM-ase	=	"bléomycine-hydrolase"
BOC	2	tertiobutyloxycarbonyle
ССМ	.=	chromatographie couche mince
CLHP	Ξ	chromatographie liquide haute performance
DCC	=	dicyclohexylcarbodiimide
DCM	=	dichlorométhane
DCU	=	dicyclohexylurée
Déglyco-BLM	=	déglycobléomycine
DMPO	=	diméthyl-5,5-pyrrolidine-1-N-oxyde
DMSO-d ₆	=	diméthylsulfoxyde hexadeutérié
FAB	=	"fast atom bombardment"

GABA	=	acide ɣ-aminobutyrique
Glc-NH2	z	glucosamine
Glu	=	acide glutamique
Gly	H	glycocolle
His	=	histidine
HOBt	=	hydroxybenzotriazole
IE	=	impact électronique
Im		imidazole
IR	Ξ	spectroscopie infra-rouge
N-Leu	=	norleucine
PBN	=	phényl-N-tert-butyl-nitrone
Pyr	=	pyridine
RMN	2	résonance magnétique nucléaire
RPE	=	résonance paramagnétique électronique
SIMS	-	"secondary ion mass spectroscopy"
SM	=	spectrométrie de masse
TEA	=	triéthylamine
TFA	Ξ	acide trifluoroacétique
Z	=	benzyloxycarbonyle

INTRODUCTION

"Un habitant sur trois est atteint d'un cancer à un moment ou à un autre de sa vie, un sur cinq en meurt". Ces chiffres expliquent à eux seuls pourquoi la recherche sur le cancer mobilise de plus en plus d'équipes et de moyens à travers le monde.

Ceci ne doit cependant pas occulter les progrès considérables déjà réalisés, bien que beaucoup reste à faire à différents niveaux.

- Pour celui de la cancérogénèse d'abord, on peut se demander ce qui fait qu'une cellule puisse s'affranchir des règles strictes de la croissance et de la différenciation cellulaire ? Quels sont les déréglements fonctionnels fondamentaux qui provoquent la transformation cellulaire ? Certains éléments de réponse sont proposés avec la théorie des proto-oncogènes et leur activation possible par différents mécanismes comme la mutation, l'amplification et la translocation chromosomique.

Un intérêt particulier est aussi porté aux protéines oncogéniques et à leurs rôles éventuels dans le mécanisme de l'oncogénèse.

- Pour les métastases et leur localisation non aléatoire, ensuite, on s'oriente de plus en plus vers une approche immunologique pour tenter d'expliquer cette caractéristique spécifique des cellules cancéreuses qu'est leur capacité d'essaimer à partir de la tumeur primitive vers un lieu préférentiel.

En attendant les réponses à ces questions et à bien d'autres encore, il s'agit de faire face le mieux possible à ce fléau.

Il est bien évident que l'idéal réside dans la prévention. En effet, grâce notamment aux connaissances acquises par l'épidémiologie (particulièrement en ce qui concerne les corrélations entre la fréquence de certains cancers et des facteurs de risque comme le tabac, l'alcool et certaines habitudes alimentaires), il est possible, en adoptant une certaine hygiène de vie, de diminuer le risque de développer un jour un cancer.

Malheureusement, ce risque, bien que pouvant être diminué, existe toujours. C'est pourquoi une recherche à visées plus cliniques est menée dans deux directions : d'une part pour le dépistage précoce, d'autre part pour développer et améliorer l'arsenal thérapeutique (ainsi l'hyperthermie et l'immunothérapie sont en cours d'évaluation).

Actuellement, le traitement du cancer repose essentiellement sur la chirurgie (efficace dans le cas de tumeurs localisées, c'est-à-dire limitées dans leur extension anatomique), la radiothérapie et la chimiothérapie.

La validité clinique de la chimiothérapie n'est plus contestée, surtout dans le cas des cancers diffus et des métastases.

La maladie de Hodgkin, par exemple, était jadis systématiquement mortelle, mais la plupart des patients en guérissent aujourd'hui. Les résultats sont aussi spectaculaires pour les leucémies infantiles et les lymphomes.

On dispose actuellement d'une quarantaine de médicaments. Certains sont synthétiques (comme le cyclophosphamide et le cis-platine) ; d'autres, la majorité, sont des toxines naturelles (alcaloïdes végétaux et toxines fongiques comme les actinomycines).

Bien qu'il soit généralement admis que leur cible moléculaire est l'ADN, le mécanisme d'action exact de ces médicaments demeure encore mal connu, sauf rares exceptions.

Il est donc important d'essayer d'élucider le mode d'action de ces oncostatiques et d'établir une relation structure-activité, et ceci pour plusieurs raisons :

- utiliser plus efficacement les drogues disponibles (pharmacocinétique, chronobiologie, associations et vectorisation);
- élargir, si possible, leur spectre d'action ;
- élaborer de nouvelles molécules, analogues d'indice thérapeutique plus élevé.

On peut espérer que la multiplication des analogues répondra du même coup au problème de chimiorésistance. En effet, les tumeurs insensibles par nature ou par résistance acquise à un médicament peuvent être sensibles à d'autres médicaments analogues.

L'absence de résistance croisée est d'ailleurs une des raisons majeures de l'utilisation de drogues antitumorales en association.

Dans le travail présenté, nous avons essayé d'élucider le mode d'action de la bléomycine ; une pharmacomodulation assez complète a été réalisée, essentiellement par modélisation.

GENERALITES

* *

* *

INTRODUCTION

La bléomycine (BLM) est un antibiotique antitumoral de nature glycopeptidique, isolé du filtrat de culture de <u>Streptomyces verticillus</u> par Umezawa sous forme de complexe cuivrique bleu, équimoléculaire (Umezawa <u>et al</u>, 1966). L'équipe d'Umezawa était alors à la recherche d'antibiotiques hydrosolubles. La BLM répondait à ce critère : c'est une poudre blanche, soluble dans l'eau et le méthanol, insoluble dans les solvants organiques.

En fait, la bléomycine est le nom générique d'une série de composés de structure de base commune, l'acide bléomycinique, et qui ne diffèrent que par leur amine terminale (Figure 1) (Fujii <u>et al</u>, 1973).

Il est important de noter que la production de métabolites secondaires doués de propriétés antitumorales est spécifique à certaines souches bactériennes, mais pas à une espèce donnée. Ceci suggère que la biosynthèse de tels antibiotiques impliquerait un matériel génétique extrachromosomique : les plasmides. Ceci expliquerait du même coup l'hétérogénéité de structures parfois observée.

La détermination de la structure de base de la BLM date de 1972 (Takita <u>et al</u>, 1972). Elle a été rectifiée depuis. C'est en 1978 que la structure définitive a été établie (ouverture du cycle β -lactame) (Takita et al, 1978).



(A) R = OH(B) $R = NH(CH_2)_3 S^+(CH_3)_2$ (C) $R = NH_2 NH_1$ (D) $R = NH(CH_2)_4 NH-C-NH_2$



Fig. 1 - Structure de l'acide bléomycinique (A), de la BLM-A₂ (B), de la BLM-B<mark>1</mark> (C) et de la BLM-B₂ (D)

Les premiers essais sur les lymphomes et les carcinomes de cellules épidermiques ayant été concluants (lchikawa <u>et al</u>, 1967), son utilisation en clinique débuta en 1966.

Elle fut administrée initialement sous forme complexée au cuivre, par voie intra-veineuse. Depuis la constatation de lésions vasculaires au niveau du lieu d'injection, on ne l'utilise plus que décomplexée, sous forme de chlorhydrate ou de sulfate (Umezawa, 1979).

Le mélange utilisé en clinique doit répondre aux concentrations suivantes : 60 à 70 % de $BLM-A_2$, 25 à 30 % de $BLM-B_2$ et moins de 10 % des autres bléomycines, comme la $BLM-A_5$, la $BLM-B_4$ et la $BLM-B_6$ qui possèdent une forte toxicité rénale. Il est important de remarquer que, comme pour la phléomycine, cette toxicité serait due à la présence de deux fonctions guanidine au moins.

Pour des raisons encore inexpliquées, l'effet thérapeutique de chaque BLM est inférieur à celui observé lors de leur association : il y a synergie (Umezawa et al, 1968).

Le mélange induit dans certains cas une hépato-toxicité réversible, sans provoquer de toxicité rénale. La seule limite à son utilisation thérapeutique est, dans certains cas, l'induction de fibrose pulmonaire.

ACTIVITE BIOLOGIQUE

* In vivo

La BLM s'est très rapidement révélée active, seule ou en association essentiellement avec la vinblastine et le cis-platine, dans le traitement des carcinomes de testicules et quel qu'en soit le type histologique. C'est une des causes majeures, sinon la cause majeure, des succès observés. Elle est également utilisée dans le traitement de la plupart des lymphomes de Hodgkin, souvent en association dans des protocoles évitant la résistance croisée.

Dans le cas de carcinomes de cellules épithéliales comme, par exemple, le cancer du poumon, l'efficacité est discutée par certains.

Cependant, le peu d'effets secondaires de la BLM fait qu'il n'est guère de tumeurs que l'on ne soumette aujourd'hui à la BLM. En effet, la BLM est le premier cytostatique antitumoral dépourvu de toxicité sanguine, immunosuppressive ou mutagène. Elle est à ce titre utilisée en association dans des protocoles myélosuppresseurs et chez les patients dont les fonctions hématopoïetiques sont déjà atteintes (pour une revue beaucoup plus détaillée : Sikic et al, 1985).

Outre les propriétés antinéoplasiques que nous venons de mentionner, la BLM est douée d'activités antimicrobiennes (Ishizuka <u>et al</u>, 1967), antivirales (Takeshita <u>et al</u>, 1974 ; Umezawa <u>et al</u>, 1973a) et antifongiques (Iqbal <u>et al</u>, 1976). La BLM est aussi employée à l'occasion de nombreuses maladies dermatologiques comme le psoriasis et les verrues (en usage externe, sous forme de pastilles).

* In vitro

Il a été démontré que la BLM inhibe la croissance des bactéries comme <u>E. Coli</u> (Onishi <u>et al</u>, 1973) et d'un grand nombre de cellules en culture (Saito et Andoh, 1973 ; Suzuki <u>et al</u>, 1968). Elle présente également une activité antitumorale sur les tumeurs d'Ehrlich (Nagatsu <u>et al</u>, 1972 ; Suzuki <u>et al</u>, 1968).

Plusieurs auteurs, utilisant différentes souches cellulaires, ont constaté une sensibilité accrue à la BLM des cellules en mitose, notamment en phase G₂ (Barranco et Humphrey, 1971 ; Nagatsu <u>et al</u>, 1972 ; Twentyman, 1984 ; Watanabe <u>et al</u>, 1974). La BLM inhiberait aussi l'ADN-polymérase ADN-dépendante, l'ARN-polymérase ADNdépendante, ainsi que l'ADN-ligase (Yamaki <u>et al</u>, 1971). Par contre, la synthèse des protéines n'est que légèrement affectée (Müller et Zahn, 1977). La BLM agirait vraisemblablement plutôt au niveau de l'ADN qu'au niveau de l'enzyme lui-même (Müller et Zahn, 1977).

PHARMACOLOGIE CLINIQUE

L'étude pharmacocinétique de la BLM est liée au développement de méthodes de dosage assez sensibles. Au départ, le dosage microbiologique (Fujita, 1971 ; Ohnuma <u>et al</u>, 1974) ne permettait pas une étude précise et fiable. Ce n'est plus le cas avec la mise au point de dosages radioimmunologiques employant comme radioélément l'iode (^{125}I) (Broughton et Strong, 1976) ou le cobalt (^{57}Co) (Elson <u>et al</u>, 1977) et qui reposent sur le pouvoir chélatant de la BLM.

Les anticorps utilisés sont souvent ceux de lapin ou de chèvre qui donnent, et c'est important, des réactions croisées avec les différentes BLM du mélange utilisé en clinique (Strong et al, 1977). Quelle que soit la voie d'administration utilisée (sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse), l'absorption est en général très rapide. Le pic plasmatique est néanmoins plus élevé pour l'injection intraveineuse. L'évaluation comparative des différentes voies d'injection n'est pas encore réalisée. Toutefois, l'injection intraveineuse en perfusion semble la mieux indiquée ; mais se pose alors le problème de l'hospitalisation des malades.

La BLM est largement distribuée dans l'organisme avec une accumulation importante au niveau de la peau et de la rate. Les concentrations tissulaires au niveau des reins et des poumons sont, également, élevées. Par contre, très peu de BLM est retrouvée au niveau du cerveau et dans le liquide céphalo-rachidien. Enfin, aucune liaison aux protéines plasmatiques n'est observée. L'élimination est rénale rapide. Le demi-vie et très temps de augmente exponentiellement avec la diminution de la clairance de la créatinine, ce qui est en faveur d'une élimination par filtration glomérulaire (Crooke et al, 1977).

Indépendamment de la voie d'injection, pour des patients aux fonctions rénales normales (clairance de la créatinine = 120 ml/min), environ 40 % de la dose présente dans le sérum est excrétée au bout de 4 heures, et 60 % au bout de 24 heures. La BLM, intacte et toujours active, est retrouvée dans les urines sous forme de complexe cuivrique.

A l'heure actuelle, il y a peu d'information concernant un métabolisme ou des métabolites. Bien que l'élimination rénale soit le principal mécanisme de détoxification de la BLM, la présence dans certains tissus d'un enzyme inactivant la BLM a été avancée en premier par Umezawa (Umezawa <u>et al</u>, 1972), enzyme qu'il dénomma "BLM-hydrolase" (BLM-ase) (Umezawa <u>et al</u>, 1974).

Cet enzyme, présent dans l'homogénat tissulaire de plusieurs organes, mais non isolé, a été classé au départ comme une "peptidase B-like" (Umezawa <u>et al</u>, 1974) qui hydrolyse la liaison carboxamide au niveau de la β -amino-alaninamide de la BLM. Il en résulte la formation de la déamido-BLM (Figure 2), cent fois moins cytotoxique, mais aussi qui n'entraîne pas d'effets secondaires pulmonaires.





Fig. 2 - Action de la BLM-hydrolase

L'accumulation au niveau des tumeurs de la BLM serait inversement proportionnelle à la BLM-ase. Il semble même que le spectre d'action de la BLM soit relié au taux de la BLM-ase, bien que

la relation entre l'activité de la BLM et la concentration en BLM-ase ne soit pas toujours vérifiée (Lazo et al, 1982).

Ce n'est que très récemment que la BLM-ase a été séparée et simultanément identifiée par deux équipes différentes (Nishimura <u>et</u> <u>al</u>, 1987 ; Sebti et Lazo, 1987). La BLM-ase purifiée à partir de tissus pulmonaires de lapin se distingue des autres aminopeptidases B par son poids moléculaire plus élevé, son point isoélectrique, sa stabilité et sa sensibilité aux différents inhibiteurs et activateurs classiques des aminopeptidases B, comme la bestatine et la leupeptine. Elle est cependant active sur les mêmes substrats (Sebti et Lazo, 1987). Pour la BLM-ase isolée du foie de lapin, les auteurs pensent même qu'il pourrait s'agir d'un enzyme à thiol (Nishimura <u>et al</u>, 1987).

EFFETS SECONDAIRES : FIBROSE PULMONAIRE

* Chez l'homme

En dehors des effets secondaires néfastes assez communs aux médicaments utilisés en chimiothérapie du cancer, comme l'anorexie, la perte de poids, les nausées, les vomissements, l'alopécie et la fièvre, la BLM provoque chez certains malades des complications pulmonaires qui constituent le seul facteur limitant à son utilisation thérapeutique (Blum <u>et al</u>, 1973). En effet, il apparaît chez environ 10 % des patients traités à la BLM des pneumonies interstitielles qui, dans 1 % des cas "évoluent" en fibroses interstitielles diffuses, irréversibles et fatales (Comis et al, 1979 ; Muggia et al, 1983). Ce pourcentage varie

avec l'âge et dépend essentiellement de la dose totale administrée : il augmente sensiblement chez les sujets âgés de plus de 70 ans (15 %) et pour des doses supérieures à 400 unités (l'unité d'activité étant définie par un test antibactérien et correspondant à 0,6 à 0,7 mg de BLM). La pré-existence de maladies pulmonaires (notion de "terrain favorable"), ainsi que de problèmes rénaux (diminution de la clairance rénale de la BLM), augmente le risque de fibrose pulmonaire.

La voie d'administration n'est pas déterminante. Toutefois, la BLM en perfusion semble avoir moins d'incidence négative sur le poumon (Cooper et Hong, 1981 ; Sikic et al, 1978b).

Souvent, les premiers symptômes apparaissent 4 à 10 semaines après le début du traitement et se caractérisent par une toux sèche et une dyspnée. Un examen plus poussé indique souvent une altération des fonctions respiratoires : une hypoxémie artérielle, une réduction de la capacité vitale et de la capacité totale du poumon. Ceci s'observe d'ailleurs dans d'autres pathologies pulmonaires. La diminution de la capacité de diffusion du CO serait un bon indicateur d'une fibrose infra-clinique contrairement aux modifications radiologiques seulement visibles lorsque que le patient présente d'autres symptômes respiratoires (Comis et al, 1979).

Les examens histologiques post-mortem indiquent des lésions diffuses au niveau des alvéoles, préférentiellement situées dans les lobes inférieurs et les régions sous-pleurales (Daskal <u>et al</u>, 1976 ; De Lena <u>et al</u>, 1972). Ces mêmes examens, après biopsie au niveau des lésions pulmonaires, montrent généralement une hyperplasie des

cellules alvéolaires avec une augmentation relative du nombre de pneumocytes II, le nombre de cellules épithéliales de type I diminuant.

Enfin, en microscopie électronique, on observe une altération de l'ultrastructure nucléaire, avec une fragmentation du noyau et la formation de centres fibrillaires denses aux électrons. Ceci d'ailleurs s'observe pour les cellules tumorales mises en présence de BLM (Daskal et al, 1975, 1976).

* Toxicité pulmonaire chez l'animal

L'induction de fibroses pulmonaires par la BLM chez un grand nombre d'animaux est actuellement bien établie (Muggia <u>et al</u>, 1983 ; Sikic <u>et al</u>, 1978a ; Snider <u>et al</u>, 1978). La BLM a même remplacé le paraquat dans l'induction de fibroses expérimentales au laboratoire. Ceci a permis de nombreux travaux, à la fois sur la caractérisation biochimique de la maladie, sur la pathogénèse et sur l'essai d'identification d'un ou de plusieurs "marqueurs précoces". Toutefois, une transposition directe de ces résultats sur l'homme serait abusive, d'autant plus que d'une espèce animale à l'autre, et parfois même d'une souche à l'autre, les constatations peuvent varier : les variations génétiques peuvent influencer l'induction de fibrose (Schrier et al, 1983).

Cependant, des indications ou des hypothèses de travail peuvent être retenues. Du point de vue biochimique, l'augmentation globale du taux de collagène et, dans des proportions moindres, d'élastine constitue la caractéristique dominante de la fibrose (Clark et al, 1980 ; Goldstein <u>et al</u>, 1979 ; Hesterberg <u>et al</u>, 1981 ; Starcher <u>et al</u>, 1978). Ceci est en accord avec le durcissement du parenchyme observé en histologie et avec l'altération de ses propriétés élastiques. C'est la raison pour laquelle a été suggérée l'utilisation d'analogues de la proline (la dehydroproline) dans le traitement de ces fibroses : les études préliminaires correspondantes chez le rat semblent être concluantes (Kelley et al, 1980).

Chez l'animal, le premier "site" de lésion serait l'endothélium capillaire. Il s'ensuit chez pratiquement tous les animaux testés une réponse de type inflammatoire avec invasion et infiltration par des cellules "marqueurs de l'inflammation". Dans un premier temps, juste après administration de la BLM, il y a augmentation du nombre de leucocytes polynucléaires et diminution de celui des macrophages. Quelques jours après, le nombre de macrophages augmente : on parle même d'amas de macrophages (Marom et al, 1980 ; Snider et al, 1978).

Ces observations ont suscité plusieurs travaux d'où il découlerait que :

- l'augmentation du nombre de leucocytes polynucléaires dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire permettrait un diagnostic précoce de la toxicité pulmonaire de la BLM (Fahey et al, 1982) ;

- les macrophages joueraient un rôle important :

. par la sécrétion de protéases (collagènases et élastases) (Marom et al, 1980),

. par la sécrétion de substances chimiotactiques pour les lymphocytes et les leucocytes polynucléaires (Hunninghake <u>et al</u>, 1981 ; Kaelin <u>et al</u>, 1983 ; Wesselius <u>et al</u>, 1984),

. et enfin, en stimulant la prolifération des fibroblastes et leur synthèse du collagène (en tous cas <u>in vitro</u>) (Leibovich et Ross, 1976 ; Moseley <u>et al</u>, 1986).

- les corticostéroïdes et les immunosuppresseurs peuvent être utilisés chez l'homme dans le traitement des fibroses. Ceci a d'ailleurs déjà été réalisé (White et Stover, 1984 ; Winterbauer <u>et al</u>, 1978), mais est controversé, d'autant plus que les souris "Nude" athymiques développent de la même manière et avec la même sévérité des fibroses interstitielles (Szapiel et al, 1979).

Malgré tout, deux questions, et non des moindres, restent posées : Comment se déclenche la maladie ? Pourquoi se localise-t-elle au niveau du poumon ?

Au niveau de la pathogénèse, plusieurs hypothèses sont avancées (Cooper Jr <u>et al</u>, 1986). Celle qui est la plus retenue fait intervenir les radicaux libres oxygénés qui seraient produits par la BLM en présence d'oxygène moléculaire et de fer ferreux. La BLM stimulerait aussi la production $d'O_2^{-1}$ par les macrophages (Conley <u>et al</u>, 1986). Plusieurs mécanismes sont proposés : soit une action directe des anions superoxyde et des radicaux hydroxyle sur l'endothélium et les cellules alvéolaires, soit l'oxydation de la méthionine du site actif de certains enzymes de la balance protéases-antiprotéases régulant le taux de collagène et d'élastine (Dooley et Pryor, 1982).

Il reste à savoir aussi pourquoi une telle perturbation des métabolismes de ces protéines du tissu conjonctif, dont la distribution est très large, se manifeste surtout au niveau pulmonaire. Aucune réponse définitive à cette question fondamentale n'a été apportée jusqu'à présent. Toutefois, la teneur très faible en BLM-ase du tissu l'accumulation de la BLM dans pulmonaire pourrait expliquer l'interstitium pulmonaire (Lazo et Humphreys, 1983 ; Ohnuma et al, 1974). Une autre explication pourrait être fournie par le fait qu'une grande concentration d'oxygène est présente au niveau du poumon. La potentialisation des effets toxiques de la BLM par l'oxygène a d'ailleurs été démontrée pour des modèles animaux (Hay et al, 1987 ; Toledo et al, 1982). L'hypoxie, au contraire, a un effet protecteur (Berend, 1984). Goldiner et al ont même signalé comme facteur de risque pour le développement de fibrose, une concentration élevée d'oxygène inspiré lors de l'anesthésie (Goldiner et al, 1978).

STRUCTURE

La détermination d'une structure aussi complexe pour une molécule de masse d'environ 1500 a demandé plusieurs années et la conjonction d'efforts de nombreuses équipes. La structure proposée a été vérifiée par synthèse chimique (Saito <u>et al</u>, 1982 ; Takita <u>et al</u>, 1981).

Schématiquement la structure de la BLM présente quatre grandes parties.

- Une partie pseudopeptidique (Figure 3) (hormis la L-thréonine, tous les autres acides aminés sont inédits) impliquée dans la

complexation des métaux, mais où la nature des ligands n'est pas établie avec précision. Grâce à un analogue de synthèse, notre équipe a pu déterminer les ligands ainsi que la géométrie du complexe. Ceci sera détaillé dans le chapitre 11.



Fig. 3 - Partie pseudo peptidique

- Un noyau bithiazolique (Figure 4) impliqué dans la liaison à l'ADN : par synthèse chimique et par utilisation de techniques physicochimiques appropriées, comme la mesure de la détorsion et de l'élongation de l'ADN par viscosimétrie, la résonance paramagnétique électronique (RPE), la température de demi-transition, notre équipe a pu proposer un modèle original de liaison à l'ADN qui sera exposé plus loin (Chapitre I).



Fig. 4 - Partie bithiazolique

- Une partie glycannique ((O-carbamoyl-3- α -D-mannopyrannosyl)-O-2L-gulopyrannose) (Figure 5) liée à l'hydroxyhistidine par une liaison α dont le rôle est très mal connu (Takita et al, 1969).



Après avoir mis au point une méthode de déglycosylation sélective, une étude comparative entre la BLM-A₂ et la BLM-A₂ déglycosylée nous a permis de cerner beaucoup mieux le rôle de cette fraction osidique. Il en sera fait mention longuement dans la suite de l'exposé.

- Une "amine terminale" (Figure 6) : C'est là l'unique élément de variabilité entre les différentes BLM. Elle est cependant indispensable à l'activité biologique ; en effet, l'acide bléomycinique est inactif <u>in</u> vivo comme in vitro.

L'alkylamine terminale interviendrait dans la liaison à l'ADN. Elle permettrait l'ancrage de la molécule de BLM à sa cible moléculaire par l'établissement d'une liaison électrostatique avec les groupements phosphate (Kasai et al, 1978). Le plus souvent, ces chaînes latérales sont des polyamines bien connues pour leur affinité et leur liaison à l'ADN : c'est le cas, par exemple, de la spermine (dans la BLM-A₆), de la spermidine (dans la BLM-A₅) et de la putrescine (dans la BLM-A'₂-a).

(A)
$$R = NH(CH_2)_4 NH_2$$

(B) $R = NH(CH_2)_3 NH(CH_2)_4 NH_2$
(C) $R = NH(CH_2)_3 NH(CH_2)_4 NH(CH_2)_3 NH_2$
(D) $R = NH(CH_2)_3 NH-CH-C_6 H_5$
 I_{CH_3}

Fig. 6 – Amines terminales correspondant à $BLM-A_2^{I}-a(A)$, $BLM-A_5(B)$, $BLM-A_6$ (C) et à la Pépléomycine (D)

Ce n'est peut-être pas là l'unique rôle de la chaîne latérale puisque les différentes BLM n'ont pas la même activité biologique, ni surtout le même "indice de fibrose pulmonaire" (Raisfeld, 1981).

Il pourrait y avoir désordre du tissu pulmonaire par un mécanisme qui n'est peut-être pas celui de la BLM. Toutefois, si on teste l'activité fibrogénique de ces polycations, on ne constate pas de durcissement du parenchyme pulmonaire (Newman et al, 1983).

Ces différences d'incide thérapeutique ont amené le développement de nouveaux analogues biosynthétiques (analogues dits de deuxième génération par rapport aux composés "naturels" isolés en premier). Leur production induite rajoutant l'amine est en correspondante, précurseur, dans le milieu de fermentation (Fujii et

<u>al</u>, 1974). C'est ainsi qu'a été produite la pépléomycine (Figure 6), qui présente une moindre toxicité pulmonaire (Sikic <u>et al</u>, 1980 ; Takahashi <u>et al</u>, 1979).

La recherche d'analogues se fait aussi par hémi-synthèse à partir de l'acide bléomycinique obtenu soit par coupure chimique (Takita <u>et</u> <u>al</u>, 1973), soit par l'action d'un enzyme isolé de <u>Fusarium anguioides</u> sur la BLM-B₂ (Figure 1) (Umezawa <u>et al</u>, 1973b). On couple alors une amine donnée sur le dérivé obtenu.

Actuellement, on assiste au développement d'analogues dits de troisième génération, où les modifications structurales touchent, cette fois, l'acide bléomycinique.

MECANISME D'ACTION

Que bon nombre d'effets dus à la BLM soient reliés à son aptitude à dégrader l'ADN est maintenant bien établi. La BLM dégrade l'ADN intracellulaire à des concentrations et dans des temps compatibles avec une activité antitumorale liée à la dégradation de l'ADN.

Le mécanisme d'action est original et unique. En effet, la BLM présente la double propriété de se lier à l'ADN et de complexer les métaux de transition comme le fer et le cuivre.

* Interaction BLM-ADN

La BLM, avec un poids moléculaire de seulement 1500, présente une grande spécificité de substrat. Elle se lie tous les cinq à six plateaux de bases, à différents types d'ADN (différents par l'origine ou la topologie), ainsi qu'à des polydésoxyribonucléotides, ceci avec une nette préférence pour les enchaînements 5'--->3' G-C, G-T (D'Andrea et Haseltine, 1978 ; Takeshita et al, 1978). Elle est par contre sans action sur l'ARN : l'ARN_m de globine mis en présence de BLM est récupéré intact et encore fonctionnel après dialyse (Kuo et al, 1977). Ceci pourrait s'expliquer par un facteur de conformation, à savoir la nécessité d'une double hélice. Néanmoins, Haidle et Bearden ont montré que sur un hybride de ARN/ADN, la BLM dégradait le brin d'ADN, laissant intact celui d'ARN (Haidle et Bearden, 1975). Une autre explication possible réside dans la différence de nature des bases pyrimidiques entre l'ADN et l'ARN. Ce n'est pas le cas, car la BLM dégrade l'ADN de bactériophage PBS, qui comporte l'uridine à la place de la thymidine. Reste alors comme explication la nature du sucre (Haidle et al, 1972a). Le désoxyribose serait le site d'attaque de la BLM.

* Formation du complexe métal-BLM

Du point de vue de l'activité, et notamment de la coupure d'ADN, les différences de comportement des divers complexes métalliques sont nettes. A la suite de plusieurs travaux et notamment ceux de Sausville (Sausville <u>et al</u>, 1978a), il a toutefois été admis que seul le complexe ferreux, en présence d'oxygène moléculaire, est capable de dégrader l'ADN. Le complexe cuivrique, qui est la forme de transit au niveau du flux sanguin et de résistance aux enzymes de dégradation, est inactif (Sugiura et al, 1979).
Ceci est actuellement remis en cause par l'équipe de Hecht, pour qui le complexe cuivrique dégraderait aussi l'ADN (Ehrenfeld <u>et al</u>, 1985, 1987).

Bien que l'espèce réactive reste encore mal définie (on reviendra aussi là-dessus lors de la discussion sur le rôle de la fraction glycannique), le mécanisme de dégradation proposé en premier par Giloni (Figure 7), sur la base des produits de dégradation, semble acquis (Giloni et al, 1981).



Fig. 7 - Mécanisme de dégradation du désoxyribose par la BLM

L'attaque se ferait au niveau du carbone C'_{4} du désoxyribose par arrachement d'un hydrogène. Il s'ensuit une ouverture du cycle et libération entre autres de "bases-propenal" qui sont à la base d'une méthode colorimétrique de détection et de dosage de la dégradation de l'ADN, spécifique de la BLM (Burger <u>et al</u>, 1980 ; Sausville et al, 1978b).

L'action de la BLM entraîne à basse concentration la libération sélective de la thymine alors qu'à forte concentration les quatre bases sont libérées (Haidle <u>et al</u>, 1972b ; Müller <u>et al</u>, 1972 ; Sausville <u>et</u> <u>al</u>, 1978b ; Takeshita <u>et al</u>, 1978 ; Wu <u>et al</u>,1983) ; il y a ainsi formation de "sites" alcali-labiles, thermo-sensibles. La BLM "produit" aussi des coupures mono- et double-brins : l'apparition à partir de plasmides superenroulés (forme I) d'ADN relâché (Forme III) (voir appendice technique), ne peut pas être le résultat unique de l'accumulation statistique de coupures simple brin (Povirk <u>et al</u>, 1977 ; Strong et Crooke, 1978).

CHAPITRE I

LIAISON A L'ADN

* *

INTRODUCTION

La propriété de la BLM de dégrader l'ADN lui a valu d'être classée comme radiomimétique (Dresp <u>et al</u>, 1978). Toutefois, et contrairement aux rayonnements ionisants, la BLM dégrade l'ADN en des sites privilégiés. L'interaction spécifique de la BLM avec sa cible moléculaire l'ADN a été décrite, sans que le mode de liaison ne soit parfaitement défini (D'Andréa et Haseltine, 1978 ; Lin et Grollman, 1981).

Par la suite, plusieurs travaux utilisant différentes techniques ont permis d'approcher le phénomène. Certains auteurs ont même proposé des modèles qui seront exposés et discutés plus loin (Sakai <u>et</u> <u>al</u>, 1983 ; Takeshita et <u>al</u>, 1978).

Avant d'exposer nos propres résultats et de proposer notre modèle, qui nous paraît être le plus en accord avec les résultats expérimentaux, un rappel sur "l'état de la question" s'impose.

Comme l'activité de la BLM semble liée à sa capacité à se lier à l'ADN, la compréhension du mécanisme d'interaction BLM-ADN est primordiale. Au départ, en raison de la coplanéité des deux cycles thiazoles (Koyama <u>et al</u>, 1968) et sur la base d'études théoriques, Murakami proposa l'intercalation du bithiazole entre deux plateaux de paires de bases comme mode de liaison (Murakami <u>et al</u>, 1976). Les résultats expérimentaux n'étaient cependant pas tout à fait conformes à cette hypothèse. Chien (Chien <u>et al</u>, 1977) a montré en comparant la BLM au tripeptide "S" (fragment obtenu après hydrolyse acide ménagée, dénué d'activité biologique) (Figure 8) (Umezawa, 1973) et à la partie complexante, que c'est le bithiazole qui se lie à l'ADN de thymus de veau : "le quenching" de fluorescence émise à 353 nm,

ainsi que l'élargissement des pics de résonance des protons de la fraction bithiazolique (à l'exclusion de ceux de l'ensemble histidinique), le démontrent.



Fig. 8 - Tripeptide "S"

Néanmoins, des études RMN du complexe binaire en poly(dA-dT).poly(dA-dT) - BLM ne sont pas en faveur de l'intercalation. Les signaux des protons non échangeables du bithiazole s'élargissent mais ne se déplacent pratiquement pas après liaison à l'ADN (Chen et al, 1980 ; Glickson et al, 1981).

Auparavant, la possibilité d'une liaison par empilement ("stacking") avait été émise par Povirk (Povirk et al, 1979) : il démontre, pour le tripeptide "S", une capacité à relâcher les superhélices d'un ADN superenroulé, allant même, et c'est important, jusqu'à provoquer, à concentrations élevées, un superenroulement dans le sens opposé. Ces variations topologiques sont reliées à la vitesse de sédimentation de l'ADN dans un gradient de sucrose. Dans les mêmes conditions, la BLM provoque un relâchement, mais jamais de superenroulement dans le sens opposé. Povirk explique ces différences de comportement par le fait que, contrairement au tripeptide "S", la BLM provoquerait des coupures au niveau des brins d'ADN.

S'appuyant sur ces résultats, et ayant déterminé par la technique de séquençage de Maxam et Gilbert (Maxam et Gilbert, 1977), des sites préférentiels de liaison et de coupure, Takeshita proposa un mode de liaison de la BLM mettant en jeu l'intercalation du bithiazole (Takeshita et al, 1978) (Figure 9).



Fig. 9 - Modèle de liaison de la BLM à l'ADN selon Takeshita

L'ambiguïté n'étant pas levée, d'autres travaux ont été réalisés par différentes équipes. Ainsi, Kross a montré que des analogues de la partie bithiazolique, de structures proches mais différentes du tripeptide "S", inhibent la dégradation de l'ADN par la BLM. II en a conclu que l'affinité de la BLM pour l'ADN est due au tripeptide "S". Ce résultat explique les conclusions précédemment tirées par Chien (Chien <u>et al</u>, 1977), indiquant que la BLM et le tripeptide "S" ont des constantes d'affinité proches pour l'ADN, à condition de supposer que tous les sites de liaison sont équivalents. Cependant, aucun modèle d'interaction de la BLM avec l'ADN n'a été proposé (Kross <u>et al</u>, 1982a).

Cette même étude confirme l'importance déjà observée par d'autres, de la charge et de la longueur de "l'amine terminale" (Huang <u>et al</u>, 1980 ; Kasai <u>et al</u>, 1978). L'importance du substituant N-terminal du bithiazole a été confirmée ultérieurement par Sakai (Sakai <u>et al</u>, 1983).

Ces travaux indiquent surtout, grâce à l'emploi d'analogues de synthèse, que le recouvrement des deux bases appariées nécessite l'adjonction d'un troisième cycle thiazole en 2'. En ce qui concerne la BLM, on parle plutôt d'intercalation partielle d'un seul thiazole (Booth <u>et al</u>, 1983 ; Sakai <u>et al</u>, 1983). A côté de l'intercalation ou de l'empilement, une troisième possibilité d'interaction BLM-ADN est évoquée : la BLM se logerait dans le petit sillon (Kross <u>et al</u>, 1982b) par un processus proche de celui décrit dans le cas de la nétropsine (Baguley, 1982 ; Kopka et al, 1985).

Cette hypothèse repose sur trois constatations :

- La liaison de la BLM nécessite la configuration en double hélice.

- L'intercalation n'est pas indispensable à l'activité biologique (Povirk et al, 1981).

- La phléomycine qui diffère de la BLM par la réduction d'une double liaison au niveau d'un cycle thiazole et qui ne possède donc plus de conformation plane nécessaire à une bonne intercalation, agit néanmoins de la même manière que la BLM (Kross <u>et al</u>, 1982b ; Stern <u>et al</u>, 1974). Elle provoque comme la BLM la libération sélective de la thymine (Povirk et al, 1981).

Les différences dans le mode de liaison, proposées par différentes équipes, nous ont incité à réexaminer le problème dans le but d'obtenir plus d'informations sur le mode précis de liaison de ce médicament anticancéreux à sa cible, et de définir les paramètres structuraux responsables de la liaison de la BLM à l'ADN.

Différents analogues du tripeptide "S" ont été synthétisés au laboratoire (Houssin <u>et al</u>, 1984a). Dans nos modèles, on retrouve toujours l'élément de base indispensable à tout processus de liaison à l'ADN, et sur lequel il y a consensus : le bithiazole. Différentes chaînes aliphatiques ont été greffées en 2' et 4 (Figure 10).

R _ 1

 CH_3 $(CH_2)_2 \dot{N}H_3$ $(CH_2)_2 \dot{N}H_3$ NH(CH₂)₂№H₃ ОСН₃ NH(CH₂)₃№H₃

R 2

1

2

3

Fig. 10 - Dérivés bithiazoliques

Disposant de ces modèles, nous avons étudié directement leur interaction avec l'ADN de thymus de veau, par viscosimétrie, spectroscopie d'absorption (détermination de la température de demitransition de l'ADN, Tm), fluorescence, résonance paramagnétique électronique et en polarisation de fluorescence.

Pour l'étude en résonance paramagnétique électronique, le couplage sur ces analogues bithiazoliques de marqueurs de spin a été réalisé au laboratoire (Houssin et al, 1984b) (Figure 11).









8

9



Fig. 11 - Analogues bithiazoliques marqueurs de spin

Afin de tester l'influence prépondérante éventuelle de l'un des deux thiazoles dans l'interaction avec l'ADN, le groupement nitroxyde est porté par le cycle A, dans les modèles <u>8</u>, <u>9</u> et par le noyau B dans les modèles <u>6</u> et <u>7</u> (Figure 11).

De la même manière, pour l'étude en polarisation de fluorescence, il a fallu coupler un fluorophore en utilisant le procédé décrit par Weigele (Weigele <u>et al</u>, 1972) (Figure 12).

 R_{1} R_{2} CH_{3} $NH(CH_{2})_{2}-N$ OH CH_{3} OCH_{3} 5

BU



RESULTATS ET DISCUSSION

 $1/\underline{4}$ Tm : La BLM provoque une légère augmentation du Tm comparable à celles observées pour les analogues <u>1</u>, <u>2</u> et <u>3</u> (Figure 10, p. 32).

	Blm	1	2	3
Tm	+4°	+4.5°	+5°	+7°

Ceci correspond à une légère stabilisation de la double hélice. Toutefois, les valeurs observées sont beaucoup plus petites que celles observées pour la nétropsine (4Tm = 15°C) (Zimmer et al, 1972).

C'est, par contre, la possibilité d'établir une liaison saline qu'a le composé <u>3</u>, qui expliquerait son **d**Tm relativement élevé.

2/ Les résultats de "quenching" de fluorescence sont en accord avec ceux de Chien (Chien <u>et al</u>, 1977). L'addition d'ADN (type I de thymus de veau) à une solution de BLM, entraîne une diminution de la fluorescence émise à 355 nm, liée à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ du bithiazole, de 50 % au maximum, mais aucun déplacement du λ max d'émission de la BLM n'est observé (Figure 13, A).

Pour <u>1</u> et <u>2</u> (λ max d'excitation = 297 nm, λ max d'émission = 363 nm), la même diminution, pouvant aller jusqu'à 50 % de l'intensité émise, est enregistrée une fois que l'on rajoute l'ADN (Figure 13, B,C). Ceci indique et confirme bien l'existence d'une liaison du bithiazole à l'ADN.



Fig. 13 - Fluorescence émise par la BLM (A) et les dérivés <u>1</u> (B) et <u>2</u> (C) en présence de quantités croissantes d'ADN

3/ L'application de la polarisation de fluorescence est d'un grand apport pour l'étude d'interaction petite molécule-macromolécule, comme par exemple l'interaction drogue-cible (ADN ou membrane) ou l'interaction antigènes-anticorps (Dandliker et Feigen, 1961 ; Richardson et Schulman, 1981). Le taux de polarisation P (voir appendice), des adduits <u>1</u> et <u>2</u> fluorescamine (<u>4</u>, <u>5</u>), contrairement à ce qu'on pouvait attendre, ne varie pratiquement pas quelle que soit la concentration en ADN. Ceci peut s'expliquer par l'encombrement stérique du fluorophore, qui empêcherait l'accès du bithiazole à l'ADN.

рия им	0	25	50	75	100	125	150 ·	175	200
r <u>4</u>	0.036	0.036	0.036	0.036	0.038	0.037	0.038	0.037	0.038
r <u>5</u>	ð.021	0.022	0.020	0.021	0.024	0.024	0.023	0.022	0.020

Une autre raison pour laquelle ce taux de polarisation reste constant est liée à l'importance de la charge portée par la chaîne latérale dans la liaison à l'ADN, <u>4</u> et <u>5</u> ne pouvant établir de liaisons électrostatiques avec les groupements phosphates de l'ADN.

4/ Les résultats apportés par la RPE sont plus intéressants. L'avantage de la technique de "marqueur de spin" dans le cas d'interaction entre une petite molécule et l'ADN a d'ailleurs déjà été signalé (Bernier <u>et al</u>, 1981a ; 1981b ; Hénichart <u>et al</u>, 1982a ; Piette et Hsia, 1979).

En effet, le signal émis par le nitroxyde (espèce paramagnétique stable) est sensible à la polarité, à l'encombrement stérique, et à toute gêne à sa libre rotation. Cette technique permet donc d'une part, l'étude d'une intercalation (Hong et Piette, 1976) ou d'un "stacking", et d'autre part, en jouant sur la longueur de la chaîne aliphatique entre le nitroxyde et le bithiazole, d'apprécier la position du bithiazole dans le site de liaison. En présence d'ADN, les composés 6 (le groupement nitroxyde est porté, par l'intermédiaire d'une liaison amide par le cycle B), 7 (une chaîne aliphatique est présente entre le cycle B et le nitroxyde) et 8 (le nitroxyde est un substituant du cycle A, porté par une chaîne aliphatique) (Figure 11), présentent le même spectre (Figure 14, A) qu'au départ avec 3 bandes séparées de 17 Gauss (G), caractéristiques du spectre isotrope observé pour les nitroxydes en libre rotation. Seul le composé 9 (le groupement nitroxyde est un substituant direct du noyau A) provoque un élargissement, ainsi qu'une diminution d'intensité des bandes, caractéristiques d'une anisotropie liée à un empêchement stérique de libre rotation (Figure 14, B).



Fig. 14 - Spectre de RPE des nitroxydes 6, 7, 8 (A) et 9 (B)

Ceci traduit une liaison à l'ADN qui pourrait être une intercalation du cycle A, avec rejet du noyau B (Figure 15). Cette interprétation rejoindrait celle proposée pour la BLM par Sakai (Sakai <u>et al</u>, 1983) et par Booth (Booth <u>et al</u>, 1983).



Fig. 15 - Modèle de recouvrement des plans de base de l'ADN par le bithiazole Ces résultats étant acquis, il nous a semblé déterminant d'utiliser la viscosimétrie, la technique de choix pour établir l'intercalation sans ambiguité. En effet, une substance est dite intercalante s'il y a d'une part élongation de la double hélice de 3,4 Å et d'autre part, soit détorsion d'un ADN superenroulé, soit recouvrement ("stacking") entre le chromophore et les paires de bases entre lesquelles il est intercalé.

L'étude des composés <u>1</u> et <u>2</u> en détorsion (unwinding) en présence d'ADN superenroulé (pBR 322 avec un insert d'ADN viral de SV40) a été réalisé.

La mesure de la détorsion de l'ADN superenroulé, en présence des composés 1 et 2, calculée par rapport à celle du bromure d'éthidium dont l'angle de détorsion est de 26° (Wang, 1974), indique un angle de 16° et 17°+1, respectivement. Ces valeurs sont proches de 18°, angle que l'on retrouve lors d'une intercalation (Wilson et Jones, 1982). Elles sont malgré tout supérieures à celles de la BLM (12° à pH 5,5) et celle du tripeptide "S" (12° à pH 8,0) (Povirk et al, 1979). Néanmoins, l'élongation de l'ADN de thymus de veau en bâtonnets (rod-like) a été mesurée selon la méthode de Cohen et Eisenberg (Cohen et Eisenberg, 1966 ; 1969). On observe, et le fait est capital, une légère diminution de la longueur de l'ADN, pour 1 comme pour 2. Ceci exclut indubitablement une liaison dans le petit sillon et un phénomène d'intercalation. Le raccourcissement pourrait être interprété comme le résultat d'une insertion dans une "cassure" de l'ADN, ainsi qu'il a été observé pour des peptides amides (Sheardy et Gabbay, 1983). En effet, Gabbay et al pensent que certains composés (des peptides contenant de petits hétérocycles), peuvent

provoquer un "plissement", une "pliure" au niveau de la double hélice, ce qui expliquerait la diminution de la longueur des bâtonnets d'ADN que l'on observe (Gabbay <u>et al</u>, 1976a ; 1976b).

Cette hypothèse et ce mécanisme d'insertion d'un des noyaux du bithiazole, en l'occurence le cycle A (Figure 16), dans un "kink", sont en accord avec nos résultats.



Fig. 16 - Mode d'insertion du bithiazole dans un "kink" de l'ADN

Le modèle de liaison à l'ADN que nous proposons, permet aussi d'expliquer la similitude de comportement de la BLM et de la phléomycine, malgré une structure différente au niveau du bithiazole. Il expliquerait aussi le fait que la $BLM-B_1'$ où $R = NH_2$ soit active. L'insertion dans un "kink" positionnerait le reste de la molécule de telle manière que le desoxyribose soit plus accessible à l'attaque des radicaux oxygénés formés, ceci sans même que l'établissement d'une liaison électrostatique entre l'amine terminale et le groupement phosphate de l'ADN ne soit nécessaire.

L'insertion dans un "kink" est bien sûr plus facile dans le cas d'un ADN superenroulé, que dans celui d'un ADN circulaire fermé, relâché. Là aussi, notre modèle est en accord avec les différences de dégradation observées entre l'ADN en super hélice et l'ADN circulaire (Povirk et al, 1979).

CHAPITRE II

COMPLEXATION DES METAUX

* *

INTRODUCTION

L'aptitude de la BLM à former des complexes avec différents métaux est bien établie. La BLM est d'ailleurs complexée au cuivre lorsqu'elle est isolée du filtrat de culture. Le taux même de production de la BLM chute considérablement si on ne rajoute pas un sel cuivrique dans le milieu de fermentation.

Une fois injectée aux patients, la BLM se lierait aussitôt au cuivre, soit libre dans le sang (Umezawa, 1979), soit déplacé de certains transporteurs sériques. En effet, la constante de dissociation BLM-Cu(II) est supérieure à celle de certains complexes amino acides-Cu(II) tel que (His)₂-Cu(II) ou même à celle de peptides sériques chélateurs du cuivre Cu(II)-Gly-His-Lys (Freedman <u>et al</u>, 1982).

La propension de la BLM à complexer les métaux (le complexe BLM-Co par exemple, s'est avéré plus stable que celui de EDTA-Co (Eckelman <u>et al</u>, 1975)), ajoutée à son tropisme marqué pour les tumeurs, ont fait que le complexe $BLM-^{57}Co$, par exemple, a été utilisé en radiodiagnostic (Grove <u>et al</u>, 1973 ; Nouel, 1972), pour la localisation des tumeurs.

L'importance de l'étude de la coordination des métaux de transition (cuivre : forme de transport ; fer : forme biologiquement active) par la BLM apparaît donc clairement.

Plusieurs études ont porté sur la complexation du cuivre par la BLM, pour essayer de déterminer la nature des ligands impliqués, ainsi que la géométrie du complexe.

Les premières études réalisées sur la BLM intacte donnèrent lieu à des éléments de réponse, sans que cela ne soit jamais tout à fait concluant. Selon la technique utilisée, on pouvait supposer l'implication de tel ou tel atome.

> * L'azote de l'amine (αNH_2) : son implication a été proposée à la suite essentiellement d'études potentiométriques (Dabrowiak <u>et al</u>, 1979a) ; le point d'inflexion de la courbe de titration (DV/DpH en fonction du pH) de la BLM seule, correspondant au pKa de la fonction αNH_2 , et qui traduit le relâchement d'un proton $(-NH_3^+ --> -NH_2 + H^+)$, disparaît au niveau de la forme complexée au cuivre.

> D'autres travaux ultérieurs, comparant les complexes cuivriques de la BLM à ceux de la dep-bléomycine, sont venus confirmer cette hypothèse (Sugiura, 1979).

> * L'azote N_1 de l'imidazole (N_{π}) : là aussi, l'étude potentiométrique fut déterminante, d'autant plus que les résultats en RMN-¹H allaient dans le même sens (Dabrowiak <u>et al</u>, 1979a). Les protons portés par le C₂ du noyau imidazole se déplaçaient sensiblement (7.8 ppm --> 8.11 ppm) et surtout, différemment de ceux de C₄ (7.32 --> 7.42 ppm) ; ce qui exclut l'azote N₂.

> La preuve en fut apportée par l'équipe de Burger (Burger et al, 1981b).

* L'azote N₁ de la pyrimidine : c'est sur la base de résultats en absorption électronique qu'il fut impliqué pour la première fois (Dabrowiak et al, 1978b). En effet, on

observe, lors de la complexation du cuivre, un léger glissement de la bande à 287 nm, attribuée aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ du bithiazole et n --> π^* de la pyrimidine, vers 292 nm. Plus encore, il y a apparition d'une nouvelle bande à 250 nm qui correspondrait à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de la pyrimidine.

L'étude en RMN-¹H semble aller dans le même sens puisque le CH_3 en position β du N_1 porté par le noyau pyrimidine subit un déplacement après coordination du cuivre.

* Autres ligands éventuels proposés : l'azote ou l'oxygène du carbamate. Ceci, après que Umezawa (Umezawa, 1974) ait observé qu'il n'y avait plus passage possible de la BLM complexée au cuivre vers l'iso-BLM (le groupement carbamate en C_3' du mannose chez la BLM qui migre vers le C_2' chez l'iso-BLM).

D'autres, (Dabrowiak <u>et al</u>, 1978a) en RMN-¹³C, ayant constaté essentiellement une diminution d'intensité du signal correspondant au C_{26} , ont eux aussi postulé le carbamate comme ligand.

Il convient toutefois de rester prudent quant à l'utilisation de la RMN du proton, comme de celle du carbone, pour l'étude de la complexation. Si l'interaction directe entre le métal et certains atomes provoque un déplacement et/ou un élargissement des raies, ceux-ci peuvent parfois ne traduire qu'un changement de conformation de l'ensemble de la molécule suite à la complexation.

En même temps que la recherche de la nature des ligands, il était important de déterminer, si possible, la géométrie du complexe.

Au départ, les premières études de spectroscopie d'absorption (RPE et absorption visible) étaient en faveur d'un plan carré où l'atome de Cu(II) occuperait le centre (Dabrowiak <u>et al</u>, 1978b), et dont les quatre sommets seraient soit 4N soit 3N + O (Bereman et Winkler, 1980). Par la suite, l'étude en cristallographie d'un intermédiaire putatif de biosynthèse de la BLM, P-3A, dont le complexe cuivrique a pu être cristallisé (litaka <u>et al</u>, 1978), montre, dans ce cas-là, un complexe pyramidal à base carrée (N₅) où interviennent entre autres les ligands déjà proposés.

Ce modèle attrayant, P-3A-Cu(II) souffrait cependant d'une critique sérieuse : c'est un complexe "solide" de structure figée, qui pourrait ne pas correspondre à celui obtenu dans le cas où la BLM est en solution (milieu biologique). Il est en effet raisonnable de penser que, thermodynamiquement, la cristallisation pourrait modifier le mode de coordination.

Pour essayer d'aller plus loin dans la détermination exacte de la nature des ligands et de la conformation du complexe, nous avons choisi dans notre laboratoire le même mode d'approche que celui utilisé pour l'étude de la partie responsable de la liaison à l'ADN (Chapitre I), à savoir la synthèse d'un analogue simplifié de la partie dite complexante de la BLM. En effet, toutes les études antérieures, sauf pour le complexe de Mn²⁺ (Sheridan et Gupta, 1981) qui n'est d'ailleurs pas actif biologiquement, excluaient de la sphère de coordination le bithiazole, ainsi que l'amine terminale.

Synthèse du modèle

Cet analogue AMPHIS (pour 2-(2-AMinoéthyl)-aminométhyl-Pyridine-6-carboxyl-HIStidinate de méthyle) a été synthétisé au laboratoire (Hénichart <u>et al</u>, 1982b). La stratégie de synthèse est rappelée sur la figure 17. Dans ce modèle, on retrouve les cinq atomes d'azote qui interviendraient dans la complexation. Des simplifications ont néanmoins été introduites : afin d'être sûr que ce sont bien les ligands du métal, tout autre azote a été éliminé du modèle. C'est ainsi que le noyau pyrimidinique a été remplacé par un noyau pyridinique, substitué par un aminométhyle à la place du β -aminopropionamide de la molécule parente. Toujours dans la même optique, le groupement alaninamide terminal, a été remplacé par un aminoéthyle.

Enfin, le disaccharide a été omis, et la β -hydroxyhistidine remplacée par une histidine.

D'autres soucis majeurs nous ont guidé dans le choix d'AMPHIS ; il était important d'une part que notre modèle simplifié, qui comporte les ligands potentiels, mime la géométrie de la partie dite complexante de la BLM ; d'autre part, il fallait que notre analogue renferme peu ou pas de carbone asymétrique, ceci pour éviter au maximum, lors de la synthèse, les problèmes de racémisation.

Etude de la complexation du cuivre par RPE

AMPHIS, n'exhibant aucun signal en dichroïsme circulaire, l'étude a été réalisée par résonance paramagnétique électronique



(RPE). Cette technique permet de mettre en évidence l'existence et la structure des complexes de métaux paramagnétiques. Elle présente l'avantage de n'être sensible qu'aux atomes possédant un électron célibataire en donnant des indications aussi bien sur leur état d'oxydation que sur leur environnement.

RESULTATS ET DISCUSSION

En présence de Cu(II) et pour un pH égal ou supérieur à 7, AMPHIS forme un complexe bleu. Pour un rapport molaire de 1, ou dans le cas d'un léger excès d'AMPHIS, on obtient un spectre (B) de même allure que celui (A) de la BLM-Cu(II). Mieux encore, le spectre de RPE des complexes cuivriques de la BLM et d'AMPHIS présentent les mêmes paramètres caractéristiques (Figure 18).



Fig. 18 - Spectres de RPE des complexes cuivriques de BLM (A) et AMPHIS (B)

On retrouve pratiquement les mêmes valeurs pour le facteur g, caractérisé par ses deux valeurs principales g_{\perp} et g//. La constante de couplage hyperfine A// (ou $_{\Delta}$ H) est du même ordre pour le complexe BLM-Cu(II) que pour AMPHIS-Cu(II). A pH élevé (pH 9), on a un meilleur spectre où l'on distingue au niveau du g_{\perp} uniquement la présence de raies superhyperfines, mal résolues.

Il est à remarquer que dans le cas où l'on a un léger excès de cuivre dans le milieu, il y a en plus du spectre caractéristique d'un complexe BLM-Cu(11), superposition d'un spectre classique de $\left[Cu(11) (H_2O)_6\right]^{2+}$.

Les valeurs de g// et A// obtenues s'inscrivent tout à fait dans le diagramme de Peisach et Blumberg (Peisach et Blumberg, 1974) correspondant à un complexe Cu(II)-4N. Il est vraisemblable donc que les quatre ligands équatoriaux soient quatre atomes d'azote.

Si on compare nos valeurs de A// et g// à celles obtenues pour des macrocycles saturés qui complexent le Cu(II) (Miyoshi <u>et al</u>, 1983), on peut préciser encore la géométrie du complexe : AMPHIS complexe le cuivre dans une structure pyramidale à base carrée où l'on retrouve comme ligands équatoriaux : N_{π} de l'imidazole, l'azote de l'amide déprotonée, l'azote du cycle pyridine, et l'azote de l'amine secondaire. L'amine primaire intervenant comme cinquième ligand apical (Figure 19).

Les résultats trouvés pour AMPHIS, identiques à ceux trouvés pour la BLM, confirment les sites de complexation proposés par litaka (litaka <u>et al</u>, 1978) et Dabrowiak (Dabrowiak <u>et al</u>, 1978b) pour le

complexe BLM-Cu(II). Il écarte par contre l'hypothèse de l'implication du carbamate par son oxygène ou son azote, comme cela a été proposé (Bereman et Winkler, 1980 ; Umezawa, 1974).



AMPHIS-Cu(11)



Fig 19 - Géométrie des complexes BLM-Cu(II) et AMPHIS-Cu(II)

Complexation du fer et production de radicaux libres

Le complexe AMPHIS-Cu(II) ayant la même structure que celle du complexe BLM-Cu(II), il était intéressant de voir si notre modèle était susceptible de complexer le fer ferreux en présence d'oxygène moléculaire, avec production de radicaux libres, comme signalé pour la BLM (Oberley et Buettner, 1979 ; Sugiura et Kikuchi, 1978).

Les complexes ferreux en général et le complexe binaire BLM-Fe(II) en particulier sont silencieux en RPE. Ceci s'explique essentiellement par le fait que le fer ferreux a deux états de spin : i) l'état S = 0 pour lequel le fer ne possède pas d'électron célibataire et ii) l'état S = 2 pour lequel le temps de relaxation, très court, explique l'absence de signal.

Les cas où S = 1 sont très rares et donneraient un signal en RPE.

Toutefois, l'amplitude des déplacements chimiques des protons, lors de l'étude du complexe BLM-Fe(II) en RMN du proton, serait en faveur de Fe(II) à haut spin (S = 2) (Otsuka <u>et al</u>, 1981). La BLM, en présence de Fe(II) et en conditions anaérobies strictes, forme un complexe binaire BLM-Fe(II) stable (Sausville <u>et al</u>, 1976 ; 1978b). Ceci se manifeste, au niveau du spectre d'absorption électronique, par une augmentation de l'intensité des bandes à 282 nm, 268 nm et par un épaulement à 356 nm, dans l'UV et par λ max à 476 nm dans le visible.

En présence d'oxygène moléculaire, il y a production de radicaux libres oxygénés, anions superoxyde $(O_2^{\overline{1}})$ et radicaux hydroxyle (OH^{*}) , et évolution vers un complexe BLM-Fe(III) stable, dont le spectre d'absorption UV-visible présente deux λ max caractéristiques à 365 nm et 384 nm (Figure 20, B).



Fig. 20 - Spectre d'absorption de BLM (A) et BLM-Fe(III) (B)

La détection de la production de radicaux libres, espèces très réactives et de durée de vie très brève, se fait en RPE par la technique de "spin-trapping" (captage de radicaux libres) (Janzen et Blackburn, 1968), qui consiste à capter les radicaux libres par un composé diamagnétique ("spin-trap") pour former un composé paramagnétique stable (spin-adduit) facilement observable en RPE. Pour détecter les radicaux, anions superoxyde O_2^{τ} et hydroxyle OH⁺, espèces particulièrement peu stables, nous avons utilisé comme "spin-trap" successivement deux nitrones, le phényl-N-tert-butyl nitrone (PBN) et le diméthyl-5,5-pyrrolidine-1-N-oxyde (DMPO) dont les spin-adduits donnent des spectres très caractéristiques (pour les détails techniques voir appendice).

Avant chaque expérience, des tests témoins doivent être réalisés. Il est vérifié notamment que les solutions de "spin-trap" utilisées ne fournissent pas de signaux parasites et qu'en présence de Fe(11) seul ou de la molécule seule, aucun radical ne se forme et aucun signal n'apparaît.

En présence de PBN, comme la BLM, notre peptide de synthèse AMPHIS à une concentration de 10 mM, forme un complexe avec Fe(II) et l'oxygène moléculaire et donne un signal tout à fait caractéristique de la production de radicaux hydroxyle OH[•] (Figure 21,A). Le spectre du spin-adduit (PBN-OH[•]) obtenu est caractéristique du radical OH[•] : c'est un triplet de doublets avec comme valeur 2.0057 pour g et 15.3 G pour a^N (Harbour <u>et al</u>, 1974). Pour une solution d'AMPHIS moins concentrée (0,5 mM), le spectre de l'adduit est caractéristique des anions superoxyde avec comme paramètres : g = 2.0057, a^N = 14.8 G et a $\frac{H}{B}$ = 2.75 G (Figure 21,B).





Fig. 21 - Spectres de RPE des spins adduits de BPN-OH[•](A), BPN- $0_2^{-}(B)$ et DMPO-OH[•](C)

La production d'OH[•] est mise en évidence également par l'emploi du DMPO comme "spin-trap". Dans ce cas, on obtient un quadruplet 1:2:2:1, comme allure du spectre de l'adduit DMPO-OH[•], avec comme valeurs caractéristiques g = 2.0060, a^N = a $\frac{H}{\beta}$ = 15.3 G (Figure 21, C).

AMPHIS, en plus des ligands du cuivre, présenterait donc tout ou partie des ligands du fer de la BLM. Il mime tout à fait la complexation et la réduction de l'oxygène de la BLM.

Dégradation de l'ADN

L'implication des anions superoxyde, mais surtout des radicaux hydroxyle dans la coupure d'ADN a été bien établie. Ceux-ci sont le plus souvent générés par réduction de l'oxygène moléculaire, lors d'un processus d'oxydo-réduction où l'on retrouve fréquemment impliqués des complexes métalliques et notamment des complexes de fer (Brawn et Fridovich, 1981 ; Lesko et al, 1980).

Notre analogue de synthèse, AMPHIS, modèle simplifié de la partie complexante de la BLM, qui se comporte de la même manière que la molécule parente au niveau de la complexation du Cu(II) et du Fe(II), et qui produit des radicaux libres O_2^{\cdot} et OH[•], allait-il jusqu'à dégrader l'ADN comme le fait la BLM (Kuo, 1981 ; Miyaki <u>et al</u>, 1974 ; Murray et Martin, 1985), ou est-ce que le reste de la molécule et notamment la partie bithiazolique et l'"amine terminale" interviendrait ?

Deux techniques complémentaires pour l'étude de la coupure d'ADN ont été utilisées :

> * la première utilise l'ADN de cellules KB marquées au ¹⁴C, la dégradation étant visualisée par autoradiographie (appendice technique)

* la seconde utilise des plasmides superenroulés. Elle permet de voir s'il y a dégradation de l'ADN, mais surtout, si celle-ci se fait par coupure monobrin ou double brin (appendice technique).

Contrairement à la BLM, et quelle que soit la technique utilisée, AMPHIS ne dégrade pas l'ADN en présence de fer et d'oxygène (Kenani, 1984), même lorsqu'on rajoute dans le milieu réactionnel un modèle de la partie bithiazolique utilisé dans le chapitre précédent lors de l'étude de la liaison à l'ADN (Photos des gels dans le chapitre suivant, Figures 25, 26, p. 65,66).

Ceci semble prouver que les deux fractions, nécessaires à l'activité, n'agissent pas suivant un processus coopératif, mais que la partie C-terminale bithiazole-chaîne latérale jouerait le rôle de vecteur, positionnant la fraction complexante à proximité de son site de coupure.

Nos résultats ont été confirmés par l'équipe de Hecht, aux USA, qui a repris notre modèle (Kilkuskie et al, 1985).

CHAPITRE III

MODELE "COMPLET" : AMBI - A2

* *

INTRODUCTION

La BLM est souvent décrite comme une molécule bifonctionnelle, avec une partie complexante et une partie responsable de la liaison à l'ADN qui porterait la spécificité du site de liaison. Les résultats du chapitre précédent vont dans ce sens. Pour déterminer si, pour l'activité biologique, il est nécessaire que les deux fractions soient présentes sur la même structure et qu'elles soient reliées par un bras "espaceur" suffisamment court pour permettre à la molécule, après reconnaissance et liaison à la cible, de positionner le complexe à proximité du désoxyribose, site de dégradation, la synthèse d'un modèle dit "complet" a été entreprise.

Synthèse chimique

A la partie complexante AMPHIS (Hénichart <u>et al</u>, 1982b) déjà fonctionnalisée sur sa partie C-terminale, a été rajouté un bras espaceur GABA-Gly, de même longueur que celui de la BLM, mais où sont absentes les fonctions latérales ; l'ensemble étant couplé à la partie intercalante (Houssin <u>et al</u>, 1984a). Pour se rapprocher le plus de la molécule parente, et surtout pour ramener une charge positive permettant l'établissement d'une liaison électrostatique avec les groupements phosphates de l'enchaînement phosphate-sucre de l'ADN, une amine terminale a été rajoutée. Notre choix s'est porté sur l'amine terminale de la BLM-A₂, composé majeur ($\simeq 65$ %) du mélange utilisé en clinique. La figure 22 présente la stratégie de synthèse. Comme pour les autres modèles, les différentes étapes de synthèse ont été suivies par CCM, IR, RMN et SM. Plus de détails sur la synthèse sont donnés dans l'appendice technique.



Fig. 22 - Schéma de synthèse d'AMBI-A2

La molécule finale, iodure de[[[(amino-2éthyl)aminométhyl-2pyridine (carboxyl-6-histidyl-amino-3) butyryl-glycyl-2'] 4-bithiazole-2',4] carboxamido-4]-propyl-3]-diméthylsulfonium a été purifiée par flash-chromatographie.

Dans la suite de l'exposé, le modèle "complet" sera désigné par AMBI-A₂ : AM pour AMPHIS, BI pour BIthiazole et A₂ pour l'amine terminale correspondante à celle de la BLM-A₂.

RESULTATS ET DISCUSSION

Liaison à l'ADN

Comme lors de l'étude du mode de liaison de la BLM à sa cible moléculaire, la liaison d'AMBI-A₂ à l'ADN a été étudiée en dénaturation thermique et en viscosimétrie.

1/ **∆tm**

AMBI-A₂ provoque une légère augmentation de la température de dénaturation thermique de l'ADN de thymus de veau. La valeur du Δ tm (4,5°C) est comparable à celle de la BLM-A₂ (4°C).

Ces valeurs n'apportent pas de réponse quant au processus de liaison lui-même. Elles indiquent toutefois que la force de liaison à l'ADN, de la BLM-A₂ et d'AMBI-A₂ sont du même ordre.

2/ Elongation

Là aussi, comme la $BLM-A_2$ (voir chapitre l page 39), $AMBI-A_2$ provoque une légère diminution de la longueur de l'ADN en bâtonnets.
3/ Détorsion

Les changements de la superhélicité de l'ADN plasmidique ont été suivis par viscosimétrie (appendice technique).

L'augmentation progressive de la concentration en $AMBI-A_2$ provoque dans un premier temps le relâchement de la superhélice droite de l'ADN. Hydrodynamiquement, le plasmide se comporte comme un ADN circulaire fermé. Toute augmentation supplémentaire d'AMBI- A_2 provoquerait un superenroulement du plasmide et la formation d'une superhélice gauche.

Le calcul relatif à un angle de 26° pour le bromure d'éthidium (Wang, 1974) indique un angle de détorsion de 12° pour AMBI-A₂. On retrouve ainsi le même angle de détorsion que pour la BLM ou le tripeptide "S" (voir chapitre I). Ceci n'est pas étonnant, sachant que AMBI-A₂ renferme dans sa structure la partie bithiazolique ainsi que l'amine terminale.

Complexation du cuivre

 $AMBI-A_2$, en plus de la partie responsable de la liaison à l'ADN, comporte dans sa structure moléculaire AMPHIS qui s'est révélé être un bon modèle complexant. Il était donc tout naturel de voir si le modèle "complet" gardait la propriété de coordiner le Cu(II), ou si le rajout du bras espaceur GABA-Gly et du reste bithiazolique pouvait entraîner des modifications sur son aptitude à complexer le cuivre, ou éventuellement, sur sa façon de complexer le cuivre.

La complexation du cuivre a été réalisée à la fois par RPE et par dichroïsme circulaire profitant du fait que AMBI-A₂ donne un signal dichroïque.

1/ **RPE**

Le spectre de résonance paramagnétique électronique du complexe équimoléculaire AMBI-A₂-Cu(II) à pH 9, est tout à fait caractéristique d'un complexe Cu(II). Il présente la même allure que ceux de la BLM et d'AMPHIS, mais surtout les mêmes paramètres caractéristiques à savoir $g_{//} = 2.20$; $g_{\perp} = 2.05$ et $A_{//} = 177.5$ G.

Aucune structure superhyperfine n'est observable au niveau du $g_{//}$. Les raies superhyperfines, au niveau de g_{\perp} , sont mal résolues pour être identifiées avec certitude. Cependant, les valeurs de $g_{//}$ et $A_{//}$ s'inscrivent parfaitement dans le diagramme de Peisach et Blumberg (Peisach et Blumberg, 1974) correspondant à un complexe où les quatre ligands équatoriaux sont des atomes d'azote. Ces valeurs, similaires à celles de BLM-Cu(11) et AMPHIS-Cu(11), correspondent à une structure pyramidale à base carrée, où l'azote N_{π} de l'imidazole, l'azote N_{α} déprotoné de l'histidine, l'azote pyridinique et l'azote de l'amine secondaire occuperaient les sommets de la base carrée. L'azote de l'amine primaire interviendrait comme cinquième ligand apical.

2/ Dichroisme circulaire

Pour s'assurer de la propension d'AMBI-A₂ à complexer le cuivre, de la même manière que le fait la BLM-A₂, une étude du complexe cuivrique d'AMBI-A₂ a été conduite. Albertini avait déjà montré qu'à pH 5.4, la BLM-A₂ complexait le cuivre de la même manière que l'intermédiaire biosynthétique P-3A (voir chapitre II) (Albertini, 1984). On s'est donc placé dans les mêmes conditions de pH, à savoir 5.4.

Dans ces conditions, le spectre dichroïque d' $AMBI-A_2$ -Cu(II) obtenu ressemble à celui exhibé par BLM-A₂-Cu(II) (Figure 23).



Fig. 23 - Spectre dichroïque du complexe AMBI-A2-Cu(II)

Toutefois, on note une ellipticité moins importante dans le cas d'AMBI-A₂. Ceci n'est nullement surprenant car il est bien établi que le dichroïsme circulaire est très sensible aux contraintes stériques. Ces contraintes, vu les différences entre la structure moléculaire de BLM-A₂ et d'AMBI-A₂, sont évidemment différentes.

Complexation du fer et production de radicaux libres

Le complexe ferreux et son activation en présence d'oxygène moléculaire étant responsables, in vivo comme in vitro, de la dégradation de l'ADN par la BLM, il était important de voir si AMBI-A₂ en présence de Fe(II) et d'oxygène était toujours capable de complexer le fer et de générer des radicaux libres. Toujours par la technique de "spin-trapping" en RPE, l'oxydation à l'air du complexe AMBI-A₂-Fe(II) en présence du "spin-trap" PBN donne lieu à un spectre tout à fait caractéristique du spin-adduit PBN-OH[•] (Figure 24).



Fig. 24 - Spectre de RPE du spin adduit BPN-OH[•] en présence de BLM (A) et AMBI-A₂ (B)

Ce spectre (triplet de doublets) présente comme valeur pour le facteur g : 2.006, a^N étant égale à 15.3 G. Une différence importante, par rapport à la BLM, est à noter : la densité de radicaux libres formés est moins importante (Figure 24).

Coupure d'ADN

AMBI-A₂ se lie à l'ADN de la même manière que la BLM. Il complexe le fer et produit des radicaux libres oxygénés. Il semble donc réunir les conditions requises pour dégrader l'ADN. Une étude similaire à celle entreprise pour AMPHIS (chapitre II) a été réalisée.

En présence de Fe(II) et d'oxygène, AMBI-A₂ provoque la dégradation de l'ADN de cellules KB marqué au 14 C (Figure 25).



Fig. 25 - Autoradiographie après électrophorèse en gel de polyacrylamide de ${}^{14}C$: A- ADN + AMBI-A₂ $10^{-4}M$ B- ADN + AMPHIS $10^{-3}M$ C- ADN + BLM $2x10^{-4}M$ D- ADN + BLM $10^{-4}M$ E- ADN Cette dégradation est beaucoup moins importante que celle de la BLM, et a lieu pour des concentrations plus élevées.

L'utilisation de l'ADN plasmidique, enrichi à plus de 90 % en forme superenroulée (forme l) confirme la coupure monobrin et double brin par la BLM (Haidle, 1971).



Fig. 26 -	Elect	trophorèse en gel	d'aga-
	rose	(0.8 %) du :	
	1- P	lasmide	
	2-	+ BLM-A ₂ -Fe(11) 23	к10 ⁻⁶ М
	3-	+ BLM-A ₂ -Fe(11)	10 ⁻⁶ M
	4-	+ AMBI-A ₂ -Fe(II)	10 ⁻⁴ M
	5~	+ AMPHIS-Fe(II)	10 ⁻⁴ M

La figure 26 montre le même profil électrophorétique pour BLM-A₂ et AMBI-A₂. Dans les deux cas, il y a apparition de la forme circulaire fermée, relâchée (forme II) et d'ADN linéaire (forme III). Il semble néanmoins que AMBI-A₂ agit essentiellement par coupure monobrin. En effet, on observe peu de formes linéaires relâchées. Celles-ci pourraient n'être que le résultat statistique de deux coupures monobrin faisant face l'une à l'autre.

Il n'en reste pas moins important que AMBI- A_2 dégrade l'ADN et ceci dans le cas d'ADN ¹⁴C, comme dans celui de la technique plus

sensible utilisant l'ADN plasmidique superenroulé. Cette dernière méthode permet une meilleure approche du mécanisme par lequel la drogue agit sur l'ADN pour le dégrader.

En conclusion, notre analogue de synthèse, qui possède dans sa structure à la fois une partie complexante simplifiée et une partie responsable de la liaison à l'ADN, présente les mêmes propriétés de complexation vis à vis du cuivre et du fer.

La capacité d'AMBI-A₂, comme celle d'AMPHIS, à coordiner, de la même manière que la BLM, le Cu et le Fe, indique bien que le groupement carbamate de la partie glycannique de la BLM n'intervient pas comme ligand, comme cela a été proposé par Umezawa (Umezawa, 1974). Les résultats de dénaturation thermique ainsi que ceux de viscosimétrie semblent confirmer notre proposition d'insertion partielle du bithiazole dans un "kink".

Comme la BLM, le complexe ferreux d'AMBI-A₂ réduit l'oxygène moléculaire, et produit des radicaux libres. Il dégrade l'ADN.

La comparaison d'AMPHIS et d'AMBI-A₂, vis à vis de la dégradation d'ADN, permet de délimiter les rôles respectifs de la partie complexante et de la partie pseudo-intercalative de la BLM. AMPHIS à lui seul est incapable de dégrader l'ADN, alors que lié par un bras espaceur au bithiazole, il est actif.

Il est donc nécessaire que les deux fractions soient présentes sur la même structure et qu'elles soient reliées par un bras

suffisamment court pour permettre à la molécule, après reconnaissance et liaison à la cible, de positionner le complexe à proximité d'un désoxyribose. Les anions superoxyde et les radicaux hydroxyle, de durée de vie très courte, ont alors la possibilité de couper l'ADN avec une grande spécificité. La nécessité des deux parties (partie complexante et partie pseudo-intercalante) sur une même structure moléculaire apparaît aussi, même si, comme le proposent Rodriguez et Hecht (Rodriguez et Hecht, 1982), l'agent responsable de la dégradation de l'ADN n'est pas le radical hydroxyle, mais un complexe "activé" (Burger et al, 1981a ; Hecht, 1986). En effet, contrairement à plusieurs auteurs (Cunningham et al, 1984 ; Galvan et al, 1981 ; Lown et Sim, 1977 ; Oberley et Buettner, 1979 ; Sausville et al, 1978a ; Sugiura et Kikuchi, 1978 ; Sugiura et al, 1983), l'équipe de Hecht, sans exclure totalement l'intervention des radicaux hydroxyle, pense que l'espèce réactive serait le complexe "activé" dont la structure n'a jamais été précisée. Dans ce cas-là aussi, il est important que l'espèce réactive soit à proximité de son site de coupure.

Pour toutes ces raisons, et malgré une dégradation moindre de l'ADN que celle provoquée par la BLM, notre modèle "complet" AMBI-A₂ semble beaucoup plus efficace et beaucoup plus judicieux que tous ceux déjà proposés, y compris AMPHIS (Kross <u>et al</u>, 1982a ; Otsuka et al, 1981).

CHAPITRE IV

ROLE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE

*_

INTRODUCTION

La BLM antibiotique antitumoral est un de nature glycopeptidique. Seule jusqu'à présent la partie pseudopeptidique a suscité l'intérêt des chercheurs, alors que le rôle de la fraction glycannique demeure obscur. Notre modèle "complet" AMBI-A2, s'il présente les mêmes propriétés physico-chimiques que la BLM, dégrade néanmoins l'ADN à des concentrations 10 à 100 fois plus élevées que ne le fait la BLM. En plus des autres simplifications mineures, la grande différence entre l'analogue de synthèse et la molécule parente est l'absence du disaccharide gulose-mannose. Il y a là peut-être l'explication de cette différence de comportement.

Pour essayer de cerner d'un peu plus près le rôle de la partie glycannique, une étude comparative entre BLM-A₂ et déglyco-BLM-A₂ a été entreprise. Pour cela, il nous a fallu, dans un premier temps, mettre au point une méthode de déglycosylation sélective laissant le reste de la molécule intact.

Déglycosylation sélective

C'est lors d'études préliminaires sur la biosynthèse de la BLM que fut isolée, en petites quantités, à partir de filtrats de culture de <u>streptomyces verticillus</u>, la déglyco-BLM (Figure 27), l'aglycone du glycopeptide qu'est la BLM. Par la suite, la méthode jusque-là décrite pour l'obtention de la déglyco-BLM faisait intervenir une hydrolyse acide douce (Muraoka <u>et al</u>, 1981). Cette méthode présentait deux inconvénients majeurs : d'une part elle produisait plusieurs sous-produits, d'autre part le rendement restait faible. D'autres

auteurs ont choisi la voie de la synthèse chimique totale (Aoyagi <u>et al</u>, 1982 ; Takita <u>et al</u>, 1981), méthode très fastidieuse au rendement peu encourageant.



Fig. 27 - Déglyco-BLM-A,

Pour pallier ces problèmes, on a mis au point une nouvelle méthode de déglycosylation sélective, relativement facile à réaliser, reproductible et d'un bon rendement.

Les méthodes de déglycosylation jusque-là employées, dans le cas des O-glycoprotéines, comme par exemple les mucines, sont essentiellement au nombre de trois :

- * la β -élimination en milieu alcalin,
- * la solvolyse par l'acide fluorhydrique (HF),
- * l'hydrolyse à l'acide trifluorométhane sulfonique (TFMS).

La libération de la fraction glycannique, après β -élimination en milieu alcalin, présente dans le cas de la BLM un inconvénient : on obtient la formation de la déhydrohistidine, et non pas de l'hydroxyhistidine (Muraoka <u>et al</u>, 1981).

L'emploi de conditions acides drastiques provoque la rupture des liaisons peptidiques, en même temps que la déglycosylation. L'acide fluorhydrique fréquemment employé pour la O-déglycosylation (Mort et Lamport, 1977) est aussi utilisé actuellement, en fin de synthèse peptidique en phase solide, pour libérer le peptide synthétisé de la résine, sans toucher aux liaisons amides. Il était tentant pour nous d'utiliser la solvolyse par HF dans ces conditions.

SOLVOLYSE ET VERIFICATION DE LA STRUCTURE

* <u>Méthode de coupure : solvolyse par HF</u> (voir appendice technique)

Une "chaîne HF" classique, conçue pour la libération des peptides de leur résine en fin de synthèse, a été utilisée. La BLM-A₂ a été déglycosylée par HF en présence d'anisole comme "scavenger". Le produit de déglycosylation est récupéré en fin de parcours sous forme de précipité blanc.

* Méthodes analytiques (voir appendice technique)

Pour s'assurer de la structure et de la pureté du produit, plusieurs méthodes ont été mises en oeuvre pour lesquelles le précipité obtenu est comparé au produit de départ : la BLM-A₂.

1/ Analyses de sucres

Pour la BLM-A₂ utilisée comme témoin, mannose et gulose sont détectés après dérivation et chromatographie en phase gazeuse dans un rapport molaire de 1. Dans les mêmes conditions, pour le précipité recueilli après solvolyse par HF, seul le pic du standard interne, le myo-inositol apparaît. Aucun pic au niveau du mannose, ni du gulose n'est décelable. Ceci indique bien l'absence du disaccharide, mais ne nous renseigne pas sur l'intégrité de la partie pseudopeptidique.

2/ Composition en acides aminés

Le produit de solvolyse par HF donne en analyse d'acides aminés exactement les mêmes composés que la BLM-A₂ (Figure 28). Dans les deux cas on retrouve dans l'ordre d'élution :





(1) la L-thréonine, (11) l'acide amino-2 (carboxy-4méthyl-5-amino-6 pyrimidinyl-2)-2-propionique, (111) l'acide méthyl-2-hydroxy-3-amino-4 pentanoīque, (1V) la L-érytho- β -hydroxyhistidine, (V) la β -aminoalanine.

L'identification des pics a été réalisée conformément à la littérature (ordre d'élution) et par l'emploi de témoins commerciaux pour la L-thréonine et la β -aminoalanine et de synthèse pour la L-érythro- β -hydroxyhistidine.

Tous les produits de coupure par HCI 6N n'apparaissent pas lors de l'étude de la composition en acides aminés. Pour s'assurer de la structure de ce qui paraît être la déglyco-BLM-A₂, une technique performante et fiable a été aussi utilisée : la RMN à haut champ.

3/ Etude en résonance magnétique nucléaire

La structure de la BLM- A_2 et du produit de déglycosylation par HF a été étudiée à la fois par RMN du proton et du carbone 13. La BLM et son dérivé étant tous deux hydrosolubles, les spectres ont été réalisés dans D_2O . L'attribution des pics de résonance a été faite conformément à la littérature (Chen <u>et al</u>, 1977 ; Naganawa <u>et al</u>, 1977).

L'analyse des deux spectres de RMN du proton, de la $BLM-A_2$ et de la déglyco- $BLM-A_2$ indique clairement que la déglycosylation a bien eu lieu laissant intact le reste de la molécule (Figure 29).



Fig. 29 - Spectre de RMN-¹H de BLM-A₂ (A) et déglyco-BLM-A₂

En effet, le pic de résonance à 5.25 ppm attribué au proton anomérique du gulose disparaît aussi bien que celui à 5.02 ppm correspondant au proton anomérique du mannose. La région entre 4.0 et 4.7 ppm, où il y a superposition de pics correspondant à la partie peptidique comme à la fraction glycannique, est beaucoup mieux résolue après clivage du disaccharide. L'étude en RMN du carbone ¹³C confirme les changements de structure après rupture par HF de la fraction osidique (Figure 30). Les deux pics à 98.1 ppm et 98.7 ppm attribués aux carbones anomériques du gulose et mannose respectivement sont absents. Le signal à 158.5 ppm du carbone du groupement carbamate disparaît aussi. De plus, tous les signaux entre 60.9 ppm et 75.0 ppm attribués aux autres carbones du disaccharide disparaissent (table 1).



Table I

N° Carbone $BLM-A_2$ $deglyco-BLM-A_2$ 1171.6171.6260.360.9347.648.4453.054.0540.740.56176.7176.17165.8165.48165.1164.29112.9115.310152.7152.41111.511.612168.3169.21357.558.01468.467.415134.9132.416-118.3118.917137.3135.218169.5170.21948.249.52012.714.02175.075.42243.345.92315.315.324178.0178.02559.859.92667.767.92719.620.628172.5173.62939.739.53032.733.631163.3162.832125.7126.233147.5147.634164.0163.935119.7121.136149.4149.537171.2170.23841.542.13924.324.84038.338.44125.325.94298.143 <th>N° Carbone$BLM-A_2$$deglyco-Bl$1171.6171.6260.360.9347.648.4453.054.0540.740.86176.7176.17165.8165.48165.1164.29112.9115.310152.7152.41111.511.612168.3169.21357.558.01468.467.415134.9132.416-118.3118.917137.3135.218169.5170.21948.249.52012.714.02175.075.42243.345.92315.315.324178.0178.02559.859.92667.767.9</th> <th></th> <th colspan="2">Attributions (ppm)</th>	N° Carbone $BLM-A_2$ $deglyco-Bl$ 1171.6171.6260.360.9347.648.4453.054.0540.740.86176.7176.17165.8165.48165.1164.29112.9115.310152.7152.41111.511.612168.3169.21357.558.01468.467.415134.9132.416-118.3118.917137.3135.218169.5170.21948.249.52012.714.02175.075.42243.345.92315.315.324178.0178.02559.859.92667.767.9		Attributions (ppm)	
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	N° Carbone	BLM-A2	déglyco-BLM-A2
49 68.9 50 75.0 51 158.5 52 64.2	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	N° Carbone 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16- 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53	BLM-A $_2$ 171.6 60.3 47.6 53.0 40.7 176.7 165.8 165.1 112.9 152.7 11.5 168.3 57.5 68.4 134.9 118.3 137.3 169.5 48.2 12.7 75.0 43.3 15.3 178.0 59.8 67.7 19.6 172.5 39.7 163.3 125.7 147.5 164.0 119.7 149.4 171.2 41.5 38.3 25.3 98.1 74.2 75.0 158.5 64.3 73.5 158.5	171.6 171.6 60.9 48.4 54.0 40.5 176.1 165.4 164.2 115.3 152.4 11.6 169.2 58.0 67.4 132.4 118.9 135.2 170.2 49.5 14.0 75.4 45.9 15.3 178.0 59.9 67.9 20.6 173.6 39.5 33.6 162.8 126.2 147.6 163.9 121.1 149.5 170.2 42.1 24.8 38.4 25.9

BU

4/ Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

L'étude en CLHP des complexes cuivriques du produit de solvolyse par HF, avec utilisation d'un contre-ion (voir appendice technique) et l'analyse des diagrammes permettent d'estimer le haut rendement de notre méthode : plus de 85 % du matériel de départ (1) est déglycosylé (2) (Figure 31).



Fig. 31 - Chromatogrammes CLHP de BLM-A₂(A) et déglyco-BLM-A₂(B)

On possédait donc là une méthode de déglycosylation sélective, facile à réaliser, d'un bon rendement et qui surtout a l'avantage, par rapport à la β -élimination, de ne pas entraîner la formation de déhydroaminoacide, comme la formation de la déhydrohistidine. On peut même envisager son extension à d'autres oncostatiques de nature glycopeptidique.

Il est bien évident que cette méthode ne permet pas d'isoler le disaccharide. Lorsqu'on cherche, mais là n'est pas notre but, à étudier la composition osidique, la méthanolyse est la méthode appropriée. Pour la suite de notre travail, et avant toute étude physico-chimique et biochimique comparée de la $BLM-A_2$ et de la déglyco- $BLM-A_2$, nous avons décidé de purifier la déglyco- $BLM-A_2$ par CLHP, en récupérant le pic correspondant. Après quoi, et pour s'assurer de la pureté de notre produit, l'analyse de la déglyco- $BLM-A_2$ a été réalisée par spectroscopie de masse FAB (Fast atom bombardment).

5/ Spectroscopie de masse FAB

Les spectres de masse FAB obtenus sur un appareil Kratos MS-50 RF indiquent bien l'absence de la partie glycannique, mais aussi de toute contamination par le produit de départ. La différence entre les pics moléculaires de la $BLM-A_2$ (1414) et celui de la déglyco-BLM-A₂ (1047) correspond bien à la fraction glycannique. Aucun pic, même mineur, n'est observé au-delà de 1047 pour la déglyco-BLM-A₂ après purification (Figure 32).

Toutes les précautions pour s'assurer de la structure moléculaire comme de la pureté de notre produit étant prises, l'étude du ou des rôles de la fraction glycannique est maintenant possible.



ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOCHIMIQUE

1/ Complexation du Cuivre

Nos deux modèles de synthèse AMBI-A₂ et AMPHIS nous ont permis de préciser la nature des ligands du cuivre et la géométrie du complexe BLM-Cu(II). On a pu ainsi conclure que le groupement carbamate n'intervenait pas comme ligand. Disposant de la déglyco-BLM-A₂ où seule la partie glycannique est absente et où aucune autre simplification n'est introduite sur le reste de la molécule, il nous fallait confirmer ce résultat.

L'étude du complexe déglyco-BLM-A₂-Cu(II) a été réalisée par RPE et en dichroïsme circulaire (voir appendice technique).

* RPE

A pH neutre (6.9), le mélange équimoléculaire de la déglyco-BLM-A₂ et du perchlorate cuivrique donne un spectre caractéristique d'un complexe cuivrique (Figure 33).



Fig. 33 - Spectre de RPE du complexe déglyco-BLM-A₂-Cu(II)

Cependant, les valeurs des paramètres caractéristiques ($g_{//}$ = 2.210 et $A_{//}$ = 163,2 G) sont légèrement différentes de celles de BLM-Cu(II) ou d'AMPHIS-Cu(II) (voir chapitre II). Ceci s'expliquerait plus en terme de déformation de la géométrie de coordination que par la perte d'un ligand (le carbamate éventuellement). En effet, une augmentation de $g_{//}$, accompagnée d'une diminution de $A_{//}$, est souvent associée à une distorsion du complexe pyramidal avec un déplacement du métal hors du plan de la base carrée. La perte d'un ligand apical ferait qu'au contraire $A_{//}$ augmente (Miyoshi <u>et al</u>, 1983).

* Dichroisme circulaire

Comme la BLM-A₂ (Albertini, 1984), la déglyco-BLM-A₂ en solution dans l'eau donne en dichroïsme circulaire différents spectres en fonction du pH. L'étude de la complexation du cuivre a été donc, pour plus de précision, conduite en faisant varier le pH. D'une manière générale et quel que soit le pH, les complexes cuivriques de la BLM-A₂ et ceux de la déglyco-BLM-A₂ sont similaires dans la région visible du spectre, alors que dans la région UV, des différences existent. De plus, on observe pour l'ensemble du spectre une diminution d'ellipticité ($[\theta]$) dans le cas de la BLM-A₂ déglycosylée (Figure 34).



Fig. 34 - Spectres dichroïques de déglyco-BLM-A₂-Cu(11)

Exception faite du spectre enregistré à pH 1.5, on retrouve dans la région d'absorption du cuivre (visible) deux bandes correspondant à deux transitions d-d. La plus intense, aux alentours de 550 nm, correspond à la transition dxz, dyz->dx²-y² (Sugiura <u>et al</u>, 1983). A pH très acide (pH = 1.5), seule une large bande, à effet Cotton positif ($\begin{bmatrix} \theta \end{bmatrix}$ = + 280 deg. cm². dmole⁻¹), centrée à 630 nm est observée (comme pour le complexe BLM-A₂-Cu(II) : (λ max = 680 nm, $\begin{bmatrix} \theta \end{bmatrix}$ = + 360 deg. cm². dmole⁻¹).

Cette absorption d'énergie est attribuée à une transition dxy->dx²-y² et correspondrait à un complexe impliquant les mêmes chromophores que pour la BLM-A₂ à savoir l'azote pyrimidinique et l'azote peptidique de N_{α} de l'histidine (Garnier <u>et al</u>, 1980).

A pH 3.1, le spectre évolue : la bande correspondant à la transition dxz,dyz-->dx²-y² est plus intense { $\lambda = 540$ nm, [θ] = + 420 deg. cm². dmole⁻¹). Une nouvelle bande de faible intensité et d'effet Cotton négatif apparaît (λ max = 700 nm, [θ] = -100 deg. cm². dmole⁻¹}. Elle correspond à une transition dxy-->dx²-y². Ceci impliquerait l'intervention d'un nouveau chromophore comme ligand. Il s'agirait comme pour la BLM-A₂ de l'azote N_π du noyau imidazole. En effet, il est bien établi que la transition dxz, dyz-->dx²-y² reflète l'intensité du champ des ligands autour de l'atome de cuivre, alors que la planéité du complexe influe sur la transition dxy-->dx²-y² (Schlafer et Gliemann, 1969).

A pH plus élevé (5.7) la bande positive à 540 nm subit un léger déplacement vers 560 nm, en même temps qu'elle augmente d'intensité. Par contre, celle qui est située vers 700 nm ne varie pratiquement pas. Lorsque l'interaction axiale s'établit, le champ de ligands dans le carré de coordination faiblit. La conséquence est la diminution en énergie de la bande d'absorption observée (λ max plus élevé). Les changements sont beaucoup plus importants dans la région UV du spectre.

Deux intenses bandes apparaissent l'une à 285 nm ($[\theta] = 8.200$ deg. cm². dmole⁻¹), l'autre à 237 nm ($[\theta] = -13,800$ deg. cm². dmole⁻¹). Elles indiquent l'intervention d'un autre ligand, l'azote du αNH_2 de la β -aminoalanine. La bande d'effet Cotton négatif à 237 nm n'apparaît pas dans le cas de la BLM-A₂-Cu(II). Ceci, ajouté au fait que les bandes ont une plus grande intensité, indique une géométrie légèrement différente avec des contraintes stériques plus importantes (Bereman et Winkler, 1980).

L'étude en dichroïsme circulaire, comme celle en RPE, indique donc que les mêmes ligands sont impliqués dans les complexes $BLM-A_2-Cu(11)$ et déglyco- $BLM-A_2-Cu(11)$. Néanmoins, une rigidité moins importante en absence de la fraction glycannique est observée pour le complexe déglyco- $BLM-A_2-Cu(11)$.

2/ Complexation du Fer

Contrairement aux complexes du cuivre, la nature des complexes ferriques et surtout ferreux de la BLM est toujours discutée. L'implication ou non du carbamate, comme ligand, n'est toujours pas établie. Dabrowiak, par exemple, suggère son implication dans le complexe ferrique mais l'exclut du complexe ferreux (Dabrowiak <u>et al</u>, 1979b). Par contre, Oppenheimer, en étudiant par RMN du proton, le complexe ternaire BLM-Fe(II)-CO, est plutôt en faveur du carbamate comme ligand (Oppenheimer <u>et al</u>, 1980).

La complexation du fer et son activation en présence d'oxygène moléculaire est capitale pour l'activité biologique de la BLM. Approcher le mécanisme d'activation du médicament est primordial pour toute pharmacomodulation. L'évolution du spectre en RPE du complexe $BLM-A_2-Fe(11)$ en présence d'oxygène a été comparée à celle du complexe déglyco-BLM- A_2 -Fe(11). L'étude a été menée aussi en dichroïsme circulaire.

* RPE

Le complexe BLM-A₂-Fe(11), en anaérobie, est silencieux en RPE. Par contre, le mélange à l'air libre et à pH neutre d'un sel

ferreux et de BLM-A₂ immédiatement (20 sec) congelé dans l'azote liquide afin de ralentir ou de stopper toute évolution donne un spectre en RPE ($g_z = 2.26$; $g_y = 2.17$; $g_x = 1.94$) (Figure 35).

Ce spectre dit de "BLM-activée" (Burger <u>et al</u>, 1981a ; Sugiura, 1980) correspond à un spectre ferrique de bas-spin (S = 1/2). Ce complexe est très instable et évolue en quelques minutes vers un spectre lui aussi ferrique de bas-spin, très stable. Ce dernier spectre est en tout point identique à celui obtenu au même pH en rajoutant à la BLM-A₂ une solution de sel ferrique ($g_z = 2.43$; $g_y =$ 2.18 ; $g_x = 1.89$) (Figure 36). Il correspond à un complexe BLM-A₂-Fe(111) rhombique de bas-spin, stable pendant plusieurs jours (Albertini, 1984 ; Burger <u>et al</u>, 1979 ; Sugiura, 1980). L'évolution du spectre de "BLM-activée" vers un spectre BLM-Fe(111) dépend du pH. Elle est ralentie en présence d'ADN.

Le pH du milieu influe aussi sur l'état de spin du fer. Ainsi, à pH 4.0 dans un tampon acétate, le mélange $BLM-A_2$ -Fe(III), donne un spectre à une seule raie (g = 4.3) correspondant à un complexe ferrique de haut spin (S = 5/2) (Figure 37).



Cette différence de spectre (Figure 36 B et Figure 37) correspond en fait à l'intervention ou non de αNH_2 comme ligand axial (Albertini, 1984). A pH 4.0 (inférieur au pKa de αNH_2) l'azote de l'amine primaire n'intervient pas comme ligand. Le champ de ligand n'est pas intense et le fer se trouve à son état le plus stable, de haut-spin. L'élévation du pH et l'intervention de αNH_2 comme cinquième ligand apical, augmente l'intensité du champ de ligand. Cette énergie supplémentaire compense l'énergie perdue par le fer, qui passe à l'état de bas-spin.

Pour la déglyco-BLM- A_2 , le complexe de haut-spin (à pH 4.0) n'est jamais observé. Seul un spectre correspondant à la "BLM-activée" a été enregistré à pH 7.0, et ceci avec une très faible intensité : seulement 5 % comparé à celui, aux mêmes concentrations, obtenu pour la BLM- A_2 . De plus, dans le cas de la déglyco-BLM- A_2 , ce spectre n'évolue jamais vers un complexe stable, déglyco-BLM-Fe(111).

L'absence du complexe ferrique de haut-spin et l'instabilité du complexe "activé", malgré la présence de toute la partie dite complexante, y compris l' α NH₂, montre que la présence de la partie glycannique joue un rôle important au niveau de la complexation du fer, et de son activation en présence d'oxygène moléculaire.

* Dichroïsme circulaire

Par cette technique, aucun complexe de haut-spin déglyco-BLM-Fe(III) n'est mis en évidence, alors que le complexe déglyco-BLM-Fe(III) de bas spin à pH physiologique est observé (Figure 38).



Fig. 38 - Spectre dichroïque du complexe déglyco-BLM-A₂-Fe(III)

La table 11 présente une comparaison des valeurs caractéristiques des spectres dichroïques de la BLM-Fe(III) et de la déglyco-BLM-Fe(III). A noter, l'ellipticité plus faible, dans le cas de la BLM-A $_2$ déglycosylée, avec un léger déplacement des λ max vers des valeurs d'énergie plus élevées. Ceci correspondrait à un environnement moins polaire, les ligands étant par ailleurs identiques. Il est important aussi de noter que l'étude de la coordination du Fe(III) à pH acide de 4.1 pour la déglyco-BLM-A2 donne un spectre qui ressemble à celui de la $BLM-A_2$ -Fe(II) (Albertini, 1984), toujours avec une ellipticité moindre.

TABL	Ε Ι.	I
------	------	---

Complexe	λ(nm)	<pre>[θ](deg.cm².dmole⁻¹)</pre>
BLM-A ₂ -Fe(III)	410	+ 10,560
рН_4.0	340	- 5,940
	275	- 7,590
	240	+ 13,200
BLM-A ₂ -Fe(III)	620	- 1,980
pH 7.4	515	+ 5,940
	390	+ 8,250
~	350	+ 9,240
	325	+ 5,280
	295	- 10,560
	275	- 15,180
	235	+ 14,850
Déglyco-BLM-A ₂ -Fe(III)	420	- 300
pH 4.1	360	+ 350
	315	- 3,100
	265	- 3,500
	240	- 3,100
Déglyco-BLM-A ₂ -Fe(III)	595	- 400
pH 7.5	500	+ 1,350
	400	+ 1,375
	360	+ 2,000
	310	- 1,800
	290	- 2,300
	255	- 1,600
	235	+ 2,600



De l'étude en dichroïsme circulaire, on peut donc conclure que quel que soit le pH, le complexe déglyco-BLM-Fe(III) est moins stable que celui de la BLM-A₂. Le déplacement des maxima d'absorption confirme que la fraction osidique jouerait un rôle dans l'effet de stabilisation.

On est en droit de se demander si cet état de fait a des conséquences sur l'activité biologique. En particulier l'instabilité des complexes de fer, et leurs évolutions différentes en présence d'oxygène, influence-t-elle la production de radicaux libres par le complexe ternaire BLM-Fe(II)- O_2 et la dégradation de l'ADN ?

* Production de radicaux libres

L'oxydation à l'air du complexe déglyco-BLM-A₂-Fe(II) en présence du PBN comme "spin-trap", donne comme pour la BLM un spectre tout à fait caractéristique du spin-adduit PBN-OH^{*}. Comme dans les précédents chapitres, des expériences de contrôle sont réalisées avec le PBN seul ou en présence du fer uniquement ou en présence du produit testé.

Sur la figure 39, on a reporté le spectre produit par la BLM (A) et dans les mêmes conditions de concentrations et de pH celui de la déglyco-BLM-A₂ (B). La concentration en spin-adduit et donc en radicaux hydroxyle est de 35 % pour la BLM traitée par HF, les radicaux produits par la BLM étant pris pour 100 %.



Fig. 39 - Spectres de RPE des spin-adduits de BPN-OH[•] produits par BLM-A₂(A) et déglyco-BLM-A₂(B)

* Dégradation de l'ADN

Deux méthodes pour l'étude de la dégradation de l'ADN ont été mises en jeu. L'une précédemment décrite pour nos modèles de synthèse utilise l'ADN superenroulé, la seconde met à profit la propriété qu'a la BLM de libérer des bases-propenal après dégradation de l'ADN. C'est une méthode de dosage colorimétrique, à l'acide thiobarbiturique, la lecture se faisant à 532 nm. Elle permet une meilleure quantification de la dégradation, par simple lecture de l'absorbance.

La déglyco-BLM- A_2 dégrade l'ADN et ceci par coupure mono- et double-brin (apparition des formes II et III) (Figure 40). Cependant, cette dégradation est moins importante que celle observée pour la BLM- A_2 . La méthode de dosage à l'acide thiobarbiturique permet d'estimer cette coupure. Elle est de 50 à 40 % moins importante que celle produite dans les mêmes conditions par la BLM.



Fig. 40 - Electrophorèse en gel d'agarose (0.8 %) de : A- ADN témoin B- ADN + BLM-Fe(II) 5×10^{-6} M C- ADN + déglycoBLM-A₂-Fe(II) 10^{-5} M D- ADN + déglycoBLM-A₂-Fe(II) 5×10^{-5} M E- ADN témoin

L'étude comparée de la BLM avec ou sans fractions glycanniques nous a permis de préciser et de confirmer dans un premier temps les résultats obtenus pour la complexation du cuivre : les résultats de dichroïsme circulaire et de RPE des complexes $BLM-A_2-Cu(11)$ et déglyco- $BLM-A_2-Cu(11)$ indiquent que, dans les deux cas, les mêmes ligands sont impliqués avec toutefois une rigidité moins importante pour la déglyco- $BLM-A_2([\theta]]$ faible).

La RPE tout particulièrement montre une géométrie de coordination différente. Pour le complexe pyramidal à base carrée de la BLM-A₂, les cinq ligands définis précédemment (α NH₂, NH, N pyridinique, N_{π} imidazole et N peptidique) ainsi que la fraction glycannique imposent au cuivre le centre du plan carré. En absence du disaccharide et du fait de l'effet Jahn-Teller, une distorsion du complexe apparaît avec déplacement du cuivre hors du plan de coordination en direction du cinquième ligand apical.

Contrairement à ce qui est proposé par d'autres auteurs (Bereman et Winkler, 1980), le groupement carbamate n'intervient pas en tant que ligand.

En ce qui concerne la complexation du fer par la BLM-A₂, en aérobie, nos résultats confirment ceux des autres équipes : la BLM-A₂ complexe le fer et, en présence d'oxygène, il y a oxydation et dégradation de l'ADN concomitamment.

Le suivi de cette réaction d'oxydo-réduction en RPE indique plusieurs étapes. Après la formation du complexe $BLM-A_2-Fe(11)$ (observable en UV), en présence d'oxygène, il y a formation d'un complexe ternaire $BLM-A_2-Fe(11)-O_2$ toujours silencieux en RPE et de durée de vie très brève.

L'existence et la formation de ce complexe ferreux a été établie par "stopped-flow" (Burger <u>et al</u>, 1979). Ce complexe ternaire lui aussi est instable et en quelques secondes un spectre en RPE apparaît, correspondant à un fer ferrique de bas spin. Le degré d'oxydation du fer a été démontré en analysant l'influence du ⁵⁷Fe sur le spectre (Burger <u>et al</u>, 1981a). Lors de la même étude, grâce à l'utilisation de ¹⁷O₂, il a été prouvé que l'oxygène était bien lié au Fe(111). Autre point important, la cinétique d'évolution du spectre de la "BLM-activée" correspond à celle de la dégradation de l'ADN (libération de bases-propenal). Cette observation est à l'origine de l'hypothèse du complexe "activé" comme espèce réactive responsable de la coupure d'ADN.

Cependant, la production de radicaux libres est réelle. De plus, les radicaux hydroxylés sont connus pour leur pouvoir de dégradation de l'ADN. Ils entraînent, comme observé pour la BLM-A2, la libération des bases nucléiques et des sucres portant des fonctions aldéhydes (Dizdaroglu et al, 1975). L'action de "scavengers", comme la superoxyde dismutase et la catalase (Lown et Sim, 1977), est aussi en faveur de l'implication de radicaux libres oxygénés. Un processus de type "Fenton" peut être envisagé avec la cascade d'oxydo-réduction qui s'ensuit. Seulement, l'étude des potentiels d'oxydo-réduction des couples O_2^{-}/O_2 (E^o - 0,35 V ; Wood, 1974) et BLM-Fe(11)/BLM-Fe(111) $(E^{\circ}_{=} + 0,129 \text{ V}; \text{ Melnyk et al}, 1981)$ montre bien que les anions superoxyde sont au contraire de bon réducteurs pour BLM-Fe(III) et ne pourraient donc pas être formés par l'oxydation du BLM-Fe(II) (Favaudon, 1982). Ceci conforte les observations de Rodriguez et Hecht tendant à prouver que la quantité de radicaux détectée par "spin-trapping" est faible comparée à la concentration de BLM-A, utilisée (Rodriguez et Hecht, 1982).
D'autre part, les radicaux libres dégradent l'ADN de manière tout à fait aléatoire, sans sites privilégiés. Or la BLM libère préférentiellement les bases pyrimidiniques et notamment la thymine (Takeshita <u>et al</u>, 1978).

On peut cependant penser que la spécificité de liaison du bithiazole aux séquences GC et/ou GT (Müller and Zahn, 1977) est en fait responsable de la spécificité de coupure. Ceci semble être confirmé par notre modèle AMPHIS qui, n'ayant pas de bithiazole, produit des radicaux libres mais ne coupe pas l'ADN.

Néanmoins, entre ces deux hypothèses sur la nature de l'espèce réactive responsable de la dégradation de l'ADN, intervention des radicaux libres oxygénés - "BLM-activée", sans exclure l'intervention des OH[•], la seconde hypothèse est plus plausible. Dans un récent article, Mc Gall semble confirmer par l'emploi d'¹⁸O cette hypothèse (Mc Gall <u>et al</u>, 1987). Il est même tout à fait envisageable que ces deux phénomènes soient liés.

Quelle que soit l'hypothèse retenue, nos résultats concernant le rôle de la fraction glycannique sont très importants. Si la déglyco-BLM-A₂ est capable de former le complexe "activé" $BLM-A_2$ -Fe(111)-O₂, celui-ci est très peu stable. D'un autre côté la production de radicaux libres, en présence de fer ferreux et d'oxygène par la déglyco-BLM-A₂ n'est que de 35 % par rapport à celle obtenue pour la BLM-A₂.

Il est donc évident que le disaccharide, gulose-mannose, joue un rôle important à la fois dans la stabilité du complexe activé et dans celui de la production de radicaux libres.

De plus, à cette instabilité du complexe "activé" comme à la diminution de production des radicaux libres, correspond une baisse de la coupure d'ADN. Ce résultat est d'ailleurs conforme aux observations d'Oppenheimer, qui constate une chute d'environ 50 % de thymine tritiée libérée dans le cas de la déglyco-BLM (Oppenheimer <u>et</u> <u>al</u>, 1982).

Il est donc tout à fait envisageable que la fraction osidique contribue à une meilleure activation par l'oxygène du complexe BLM-A₂-Fe(II). Cette activation trouverait son expression dans la formation de radicaux libres, les deux phénomènes étant ainsi liés.

Afin de mieux délimiter le rôle joué par la fraction osidique dans l'activation de la BLM un mécanisme conforme à nos résultats expérimentaux, proche de celui proposé pour le cytochrome P-450 (White et Coon, 1980) est avancé (Figure 41). Dans ce mécanisme que nous proposons, la BLM complexerait dans un premier temps le fer ferreux (A). En présence d'oxygène moléculaire il y a formation d'un complexe fugace BLM-Fe(11)-O₂ (B). Celui-ci évolue vers un complexe ferrique BLM-A₂-Fe(111)-O₂, où le fer serait lié à l'oxygène sous forme d'hydroperoxyde (C). Ceci se ferait après rupture homolytique de la liaison peroxyde O-O, par voie radicalaire de type Fenton comparable à celle proposée par White et Coon pour l'hydroxylation du cytochrome P.450. A partir de là, une "acylation" de l'hydroperoxyde par le carbamate est tout à fait possible (D).

On sait que la dégradation de l'ADN commence par élimination d'un hydrogène C'_{μ} du désoxyribose (Giloni <u>et al</u>, 1981 ; Takeshita <u>et al</u>, 1978). La suite du mécanisme que nous proposons consisterait





alors en une rupture du peroxyde, entraînant la formation d'un ion perferryle (E) qui arracherait le proton du désoxyribose et provoquerait ainsi la suite de réactions conduisant à la dégradation de l'ADN. L'électron supplémentaire nécessaire pour équilibrer les charges de cette rupture homolytique pourrait provenir du recyclage de l'hydroperoxyde formé par une autre voie secondaire, impliquant l'oxygène moléculaire et conduisant à la production d'OH', détecté en "spin-trapping". L'ion (F) pourrait être ensuite converti en un complexe ternaire $BLM-A_2$ -Fe(III) de bas spin stable (G). En présence d'agents réducteurs comme le _β-mercaptoéthanol in vitro ou la NADPH-cytochrome P.450 réductase in vivo (Kilkuskie et al, 1984 ; Scheulen et Kappus, 1984), le complexe BLM-A2-Fe(III) sera réduit en BLM-A2-Fe(II). Ce complexe est capable de réamorcer en présence d'oxygène un second cycle. On retrouve ainsi le caractère catalytique, déjà observé, de l'activité de la BLM. Notre mécanisme explique bien la chute de production des radicaux libres. Il met en évidence le rôle du carbamate dans l'activation de l'oxygène sans pour autant être un ligand direct.

D'autre part, alors que le complexe déglyco-BLM-A₂-Fe(111) de haut spin (pH 4.0) n'a jamais pu être observé, celui de bas spin a été mis en évidence par dichroïsme circulaire à pH physiologique. De plus, la déglyco-BLM-A₂ donne en RPE au même pH en présence de fer et d'azide (N₃) un complexe ternaire de bas spin ($g_x = 1.82$; g_y = 2.22; $g_z = 2.55$) similaire à celui obtenu pour la BLM-A₂ (BLM-A₂-Fe(111)-N₃; $g_x = 1.83$; $g_y = 2.23$; $g_z = 2.55$) (Sugiura et al, 1982).

L'absence de complexe de haut spin pourrait s'expliquer par un rayon ionique du fer plus important empêchant celui-ci de s'insérer dans le centre de coordination, en l'absence de la fraction glycannique.

Il est tout à fait justifié de penser que la fraction osidique agit comme un facteur de stabilisation, une poche protectrice à la manière de celle, jouée par les porphyrines au niveau des hémoprotéines (Collmann <u>et al</u>, 1983). Ceci expliquerait à la fois l'instabilité du complexe "activé" et la réelle diminution de production de radicaux libres. Les deux phénomènes étant visiblement liés : la production de radicaux libres ferait suite à la formation du complexe "activé".

D'un autre côté, la liaison de l'oxygène moléculaire à un métal de transition s'accompagne souvent d'un transfert de charges. L'oxygène acquiert ainsi un caractère légèrement basique, nucléophile. Or, il est bien établi que, dans ces conditions, l'oxygène moléculaire lié au métal a une structure superoxo (η_1 dans la classification de Vaska (1976)) qui lui permettrait éventuellement d'établir des liaisons hydrogène. Ceci a d'ailleurs été déjà proposé dans le cas de transporteurs d'oxygène (Shaanan, 1982 ; Jameson et Drago, 1985).



A



Fig. 42 - Complexe $BLM-A_2$ -Fe(111)-O₂ sous forme superoxo (A) et peroxo (B)

B

Ainsi, dans le complexe $BLM-A_2$ -Fe(III)- O_2 , l'oxygène ayant une structure superoxo (A) établirait des liaisons hydrogène avec la fraction glycannique, le complexe se trouvant ainsi stabilisé (Figure 42,A). Ceci est tout à fait en accord avec notre mécanisme proposé. Mieux encore, la structure superoxo induirait des réactions de transfert d'électron (Welborn <u>et al</u>, 1981) qui sont en faveur de notre modèle d'action.

En absence du disaccharide et n'ayant plus la possibilité d'établir des liaisons hydrogène, l'oxygène aurait plutôt une structure peroxo (η_2 dans la classification de Vaska), au niveau du complexe déglyco-BLM-A₂-Fe(11)-O₂ (Figure 42,B).

Bien que l'oxygène lié au fer avec une structure peroxo se comporte dans la majorité des cas comme nucléophile, sa structure électronique ne présente pas les mêmes délocalisations que celles observées au niveau des complexes à structure superoxo. Dans ce cas (peroxo) l'activation de l'oxygène est défavorisée.

Ainsi, la fraction glycannique jouerait à la fois i) un rôle stérique procurant un environnement favorable à la stabilisation du complexe "activé", ii) un rôle direct dans l'activation de l'oxygène en permettant la rupture homolytique de l'oxygène, étape indispensable à l'attaque du désoxyribose et à l'élimination de l'hydrogène en C'_{4} .

CHAPITRE V

103

VERS LA CONCEPTION D'UN MODELE IDEAL ?

_

INTRODUCTION

La modélisation, comme l'étude de la déglyco-BLM, nous ont permis l'étude précise des relations entre la structure et l'activité des différentes parties de la molécule de BLM. Ainsi, le rôle respectif des différentes parties a pu être dégagé :

> - <u>la partie pseudopeptidique</u> : c'est la partie complexante de la molécule. Grâce à notre modèle AMPHIS, la nature des ligands, comme la géométrie du complexe métallique ont été déterminées. Son rôle au niveau du mécanisme d'action du médicament est primordial : le complexe cuivrique est la forme de transport sérique, mais surtout de résistance aux enzymes de dégradation. Alors que le complexe ferreux, en présence d'oxygène, est la forme biologiquement active, responsable de la dégradation de l'ADN.

> - <u>la partie bithiazolique</u> : c'est la partie hétérocyclique responsable de la fixation à l'ADN, cible moléculaire de la BLM. Grâce à nos analogues de synthèse, on a pu préciser le mode de liaison à l'ADN : c'est une pseudo-intercalation, où seul un thiazole s'insère dans une cassure de l'ADN. Sa présence sur la même structure que la partie complexante est indispensable à toute dégradation de l'ADN.

> - <u>une fraction glycannique</u> : le disaccharide (gulosemannose) jouerait un rôle stérique très important : il procure au reste de la molécule un environnement favorable, permettant la stabilisation du complexe et son activation en présence d'oxygène moléculaire.

Toutes ces observations ont été prises en compte pour la conception d'un modèle encore plus élaboré que AMB1-A₂. Ce modèle (Figure 43) a été conçu afin de vérifier les résultats décrits précédemment et peut-être de jeter les bases définitives d'une pharmacomodulation ayant pour but de synthétiser des molécules d'indice thérapeutique plus élevé que la BLM (augmentation de l'activité principale recherchée, diminution des propriétés secondaires néfastes).



Fig. 43 - Structure de AMBIGLU

Synthèse (les détails de la synthèse figurent dans l'appendice technique)

Le schéma réactionnel (Figure 44) consiste à coupler d'abord la glucosamine à l'acide glutamique sur la fonction acide en . Après couplage à l'histidine, l'ensemble est lié au reste de la molécule d'AMPHIS. Il reste pour compléter le modèle à ramener en dernier lieu la partie bithiazolique.





Fig. 44



Fig. 44 - Schéma de syntèse d'AMBIGLU

Dans ce dernier modèle on retrouve sur la même structure les trois fractions dont le rôle vient d'être précisé dans les chapitres précédents.

Comme AMBI-A₂, la molécule comprend AMPHIS, mais cette fois-ci avec comme bras espaceur l'acide glutamique (Glu). Ceci permet à la fois de lier la partie bithiazolique à la partie complexante, mais aussi de fixer la glucosamine (GlcNH₂).

Ceci présente l'avantage d'amener un nombre important de substituants hydroxylés (remplaçant les mêmes fonctions de l'hydroxyhistidine, de l'acide 2-méthyl-3-hydroxy-4-amino valérique et de la thréonine) sur un bras espaceur court. Un plus grand nombre de liaisons hydrogène sont alors susceptibles de se former avec les groupements accepteurs de protons de l'ADN et ainsi la fraction active de la molécule devrait se trouver dans une position plus rapprochée de sa cible.

Contrairement à $AMBI-A_2$, l'amine terminale de la $BLM-A_2$ non indispensable à l'activité biologique ($BLM-B'_1$ où $R = NH_2$ est active), bien qu'elle semble avoir un rôle (les différentes BLM n'ont pas toutes la même activité), a été supprimée.

RESULTATS ET DISCUSSION

Liaison à l'ADN

Le mode de liaison à l'ADN de notre modèle AMBIGLU comportant une glucosamine a été étudié en viscosimétrie.

* Elongation

L'étude de l'élongation de l'ADN en présence d'AMBIGLU montre interaction **I'ADN.** ambiguité avec Cependant sans une et contrairement à la BLM et à AMBI-A2, on observe une légère augmentation de la longueur de l'ADN. La valeur retrouvée 0.28Å est très différente de ce que l'on trouve habituellement pour une intercalation, c'est-à-dire 3.4 Å. Cette augmentation, bien que légère, ne peut s'expliquer que par la structure de notre modèle. Dans le cas présent, et par opposition à la BLM et AMBI-A, il y a l'absence de toute amine terminale qui, en établissant une liaison électrostatique avec le groupement phosphate, provoquerait une gêne stérique à la pseudo-intercalation du bithiazole.

* Détorsion

Le calcul en viscosimétrie de l'angle de détorsion du plasmide pll 1A, en présence d'AMBIGLU, indique un angle de 12,7°, ce qui est proche des valeurs retrouvées pour AMBI-A₂ et la BLM (12°). L'augmentation de l'angle de 0,7° serait due à une meilleure liaison à l'ADN qui s'est déjà traduite par une légère élongation.

Complexation du cuivre

L'étude en RPE de la coordination du Cu(II) par notre modèle comme attendu donne un spectre caractéristique d'un complexe cuivrique similaire à ceux déjà obtenus pour la BLM et les différents analogues déjà étudiés (AMPHIS, AMBI-A₂, déglyco-BLM).

Complexation du fer et production de radicaux libres

Se distinguant d'AMBI-A₂ par la présence dans sa structure d'un résidu de glucosamine, il était intéressant d'étudier le comportement de notre modèle en présence de Fe(II) et d'oxygène moléculaire.

L'étude en "spin-trapping", avec le PBN comme "spin-trap" montre une production de radicaux hydroxyle, nettement supérieure à celle observée pour AMBI-A₂. La quantité de radicaux libres est cependant inférieure à celle observée pour la BLM. Il semble donc que le fait de rajouter un monosaccharide améliore l'activation du modèle. Il serait cependant risqué d'affirmer que c'est là le seul facteur qui influe sur l'activation en présence d'oxygène et de là sur la production de radicaux libres oxygénés.

Coupure d'ADN

Pour comparer le pouvoir de coupure de l'ADN par AMBIGLU à celui d'AMBI-A₂ et de la déglyco-BLM, la méthode choisie est celle qui utilise comme cible l'ADN superenroulé. Il s'agit du plasmide pBR 322 (Boehringer) utilisé tel quel sans purification supplémentaire de la forme I.

L'examen du gel d'agarose en lumière UV à 254 nm montre (Figure 45), par rapport à l'ADN seul utilisé comme témoin, la présence, lorsque AMBIGLU est rajouté dans le milieu réactionnel en même temps que le fer, d'ADN circulaire, relâché (forme 11), et d'ADN linéaire (forme 111). Cette dégradation de l'ADN a lieu pour des concentrations bien plus faibles que celles utilisées pour AMB1-A₂.



Fig. 45 - Electrophorèse en gel d'agarose (0.8 %) 1- Plasmide (pBR 322) seul $2 - + BLM - A_2 - Fe(II) 10^{-6}M$ $3 - + BLM - A_{2} - Fe(II) 2 \times 10^{-6} M$ 4- + AMBIGLU-Fe(II) 10^{-6} M 10^{-5} M 5- + AMBIGLU-Fe(II) $6- + AMBIGLU-Fe(II) 2x10^{-5}M$

La propriété qu'a notre modèle de dégrader l'ADN est cependant inférieure à celle de la BLM.

Au vu de ces résultats, on peut donc conclure que AMBIGLU mime encore mieux les propriétés qu'a la BLM de "chelater" des métaux de transition et de dégrader l'ADN. On a là en présence sur la même structure les éléments de base qui permettent dans un premier temps une liaison à la cible moléculaire suivie, dans un deuxième temps, de sa dégradation. Le résidu glucosamine semble intervenir essentiellement dans la deuxième phase, l'activation en présence d'oxygène du complexe ferrique. En effet, la production de radicaux libres est plus importante, à des concentrations identiques, pour le modèle à glucosamine, que pour AMBI-A₂. La dégradation de l'ADN est obtenue pour des concentrations plus faibles.

Ces résultats, ajoutés à ceux de l'étude comparée de la BLM et de son aglycone, montrent bien l'importance de la fraction glycannique. Celle-ci, bien que de nature différente, est d'ailleurs retrouvée dans d'autres antibiotiques antitumoraux d'origine naturelle comme l'adriamycine. La fraction glycannique interviendrait donc dans la stabilisation des complexes métalliques de ces antitumoraux. Elle serait indispensable aux réactions d'oxydo-réduction, qui accompagnent souvent l'attaque de la cible moléculaire.



Les études particulières menées sur chacune des trois parties de la structure qui apparaissent essentielles pour l'activité de la BLM ont permis notamment par modélisation de définir avec précision le rôle des principaux groupes fonctionnels.

En particulier, a pu être déterminée la nature des ligands du cuivre et du fer dans la partie complexante (cuivre et fer, deux oligoéléments largement distribués dans l'organisme, souvent associés aux mécanismes d'action des antitumoraux, et qui voient d'ailleurs souvent leurs concentrations tumorale et sérique uniquement pour le cuivre, augmenter chez les patients atteints d'un cancer). On a pu, au cours de la même étude, préciser les conditions optimales de production de radicaux libres oxygénés.

Il a été montré, et ceci nous semble capital, que cette fraction ne pouvait être efficace que si elle se trouve dans une situation suffisamment proche de la cible désoxyribose. C'est la partie bithiazolique qui joue le rôle de "tête chercheuse". C'est le bras espaceur, riche en groupements donneurs de protons qui joue le rôle de "verrou".

Enfin, la partie glycannique favorise la stabilisation du complexe et l'active. Ces considérations sont rassemblées sur la figure 46.

Les enseignements découlant de ces études nous ont amené à la notion de concept intercalant-peptide chélateur actuellement largement étudié au laboratoire. Le modèle AMBIGLU tient compte, dans une large mesure, de ces considérations : les éléments de base pour la

AMBIGLU-ADN



N۲

он

NH₂CO

NH₂ O CH₃

юн

ÖН

HN 2 0

NH₂CÓ

OH

O OH

U٢



Fig. 46 - Complexes binaires AMBIGLU-ADN et BLM-ADN

(Structures proposées)



complexation et la production de radicaux libres sont présents et un groupement riche en fonctions hydroxyle se trouve en bonne position pour satisfaire aux critères définis plus haut.

Néanmoins, ce modèle qui possède un hétérocycle bithiazole, comme la BLM, permettant la liaison à l'ADN est encore perfectible. En effet, nous avons montré le peu d'affinité de ce noyau pour les plans de base de l'ADN, cet état de fait étant dû en grande partie au faible pouvoir de recouvrement des deux thiazoles.

Il est donc clair qu'en remplaçant cet hétérocycle par un noyau susceptible de se placer entre les plans de base de l'ADN avec une grande affinité par un processus d'intercalation vrai, on peut espérer une meilleure réponse pour l'activité biologique. De telles tentatives sont actuellement en chantier au laboratoire, tentatives qui consistent notamment à substituer au noyau bithiazole un ensemble amino-9 acridine ou anilino-9 acridine.

Ajoutons que le rôle de la fraction osidique mis en évidence n'est peut-être qu'un aspect de son intervention dans l'activité biologique. Elle pourrait intervenir également dans le transit membranaire, passage obligé à la BLM pour atteindre le noyau et l'ADN, cible considérée comme privilégiée jusqu'à présent de l'ensemble des agents anticancéreux. Une étude comparée entre la BLM marquée au ¹⁴C et la déglyco-bléomycine, elle aussi radioactive, est en cours de réalisation.

Ceci est important car la membrane pourrait bien être une cible des agents antitumoraux. En effet, certains oncostatiques, et ceci a déjà été démontré, perturbent les propriétés dynamiques de la membrane plasmique, notamment sa fluidité.

Il est donc intéressant, en plus des interactions BLM-ADN, d'étudier les interactions BLM-membrane, ce qui débouchera peut-être sur la conception d'un pharmacoguidage, particulièrement bien adapté.

APPENDICE TECHNIQUE

* *

APPENDICE TECHNIQUE

SYNTHESE CHIMIQUE

- * Synthèse d'AMBI-A,
- * Synthèse d'AMBIGLU
- * Solvolyse par HF

METHODES ANALYTIQUES

- * Dénaturation thermique
- * Fluorescence
- * Polarisation de fluorescence
- * Résonance paramagnétique électronique
 - a) Complexation du Cu et du Fe
 - b) Production de radicaux libres
- * Dichroisme circulaire
- * Viscosimétrie
 - a) Elongation de l'ADN
 - b) Détorsion de l'ADN
- * Coupure d'ADN
 - a) Dégradation de l'ADN-¹⁴C
 - b) Coupure mono-brin et double-brin
 - c) Dosage à l'acide thiobarbiturique des "bases-propenal" libérées
- * Chromatographie liquide à haute performance
- * Résonance magnétique nucléaire
- * Spectrométrie de masse
 - a) impact électronique
 - b) FAB
- * Analyse d'acides aminés
- * Composition chimique en sucres

SYNTHESE CHIMIQUE

* Synthèse d'AMBI-A2

Notre stratégie a consisté dans un premier temps à synthétiser séparément les quatre grandes parties constituant la molécule (Figure 22) : AMPHIS (A), BOC-GABA-GIy (B), l'acide (amino-2-éthyl)-2' carboxyl-4 bithiazole (C), l'iodure d'amino-3 propyl diméthyl sulfonium (D).

AMPHIS a été synthétisé conformément à Hénichart <u>et al</u>, (1982b), alors que la synthèse de C a été mise au point au laboratoire par Houssin et al (1984a).

B a été préparé par couplage de l'acide γ amino butyrique protégé sur fonction amine sa par groupement un tertiobutyloxycarbonyle (BOC-GABA) (4.06 g, 20 mmole), et du chlorhydrate de glycinate d'éthyle (2.8 g, 20 mmole) en présence de triéthylamine (TEA) (2.82 ml, 20 mmole), de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (4.6 g, 22 mmole) et d'hydroxybenzotriazole (HOBt) (3 g, 20 mmole). Le mélange réactionnel en solution dans le dichlorométhane (DCM) est agité à 0°C pendant 2 h puis à température ambiante pendant 12 h.

Le précipité de dicyclohexylurée (DCU) est éliminé par filtration et les réactifs initiaux n'ayant pas réagi, par des lavages successifs à l'acide chlorhydrique (HCI, 1N) et au bicarbonate de sodium (NaHCO₃, 1M). La phase organique est ensuite séchée sur du sulfate de sodium (Na₂SO₄). Après évaporation à sec du solvant, le produit de couplage est recristallisé dans de l'éther de pétrole (5.07 g, 88 % ; F : 72-74°C ; IR : 1745 cm⁻¹ (ν C=O ester), 1690cm⁻¹ (ν C=O de BOC)).

Avant de coupler B à C, il a fallu déprotéger la fonction acide de Gly : la saponification de l'ester éthylique s'est faite à température ambiante en présence de soude (NaOH 1N) à pH 9-10. Le produit est récupéré après acidification par HCI 1N, évaporation à sec, et élimination du chlorure de sodium (NaCI) par précipitation dans l'alcool absolu à chaud (F : 154°C ; IR : 1760 cm⁻¹ (\vee COOH), 1700cm⁻¹ (\vee C=O de BOC).

Le couplage de B (2.6 g, 10 mmole) et de C protégé sur sa fonction acide par un ester méthylique (2.83 g, 10 mmole) est réalisé dans le dichlorométhane en présence de DCC (2.3 g, 11 mmole) et de HOBt (1.5 g, 10 mmole) à 0°C pendant 3 h, puis à température ambiante pendant 12 h.

Après élimination de la DCU et différents lavages à l'HCI N, au $NaHCO_3(1M)$ et à l'eau, le solvant organique est évaporé à sec et le produit est récupéré sous forme d'une huile. (74 %, IR : 1770 cm⁻¹ (vC=O ester), 1690 cm⁻¹(vC=O de BOC). La structure a été vérifiée par RMN du proton (DMSO-d₆) à p.p.m. = 1.15 (CH₃-BOC), 1.70 (OCH₃), 3.0-3.6 (CH₂), 7.90 et 8.15 (CH-thiazole).

Après déprotection de la fonction amine du BOC-GABA par action de l'acide trifluoroacétique (TFA) pendant 15 min, l'amine libre obtenue (0.85 g, 2 mmole) est couplée dans du diméthylformamide (DMF) à la fonction acide d'AMPHIS (A) en présence d'un léger excès de DCC (0.45 g, 2.2 mmole) et d'HOBt (0.3 g, 2 mmole). Les conditions expérimentales sont les mêmes que dans le couplage précédent. Une fois la DCU éliminée et les différents lavages réalisés, le produit est obtenu avec un rendement de 60 %. (F = 165-170°C ; IR = 1750 cm⁻¹ (ν C=O ester), 1700 cm⁻¹ (ν C=O de BOC). RMN-¹H (DMSO-d₆) δ p.p.m. : 1.25 (CH₃-BOC), 3.05 - 3.70 (CH₂), 5.20

 $(CH_3$ -His), 5.40 $(CH_2$ -benzyl), 7.45 (CH-aromatiques du groupement protecteur benzyloxycarbonyle (Z)), 7.50-8.0 (CH-Pyr), 7.40-7.95 (CH-Im), 8.25-8.50 (CH-thiazole).

La saponification de ce composé conduit à un analogue simplifié de l'acide bléomycinique, qui est couplé (1.08 g, 1 mmole) à l'iodure d'amino-3-propylméthylsulfide (0.1 g, 1 mmole) dans du DMF selon le même procédé expérimental que précédemment.

Le produit de couplage est isolé sous forme d'une huile : 69 % ; IR : 1720 cm⁻¹ (v C=O), 1690 cm⁻¹ (v C=O de BOC), 1620 cm⁻¹ (v C=O amide) ; RMN-¹H (CDCl₃) δ p.p.m. 1.20 (CH₃-BOC), 2.15 (CH₃), 2.90-3.70 (CH₂), 4.90 (CH₂-His), 5.15 (CH₂-benzyl), 7.30 (CH-Aromatique), 7.20-7.60 (CH-Pyr), 7.35-8.10 (CH-Im), 8.0-8.20 (CH-thiazole).

Il ne reste qu'à introduire le second méthyle sur l'atome de soufre par action de l'iodure de méthyle.

La dernière étape consiste à éliminer tous les groupements protecteurs BOC et Z par l'acide bromhydrique (HBr) dilué dans l'acide acétique (30 %).

Le produit final obtenu est ensuite purifié par "flash chromatography" sur gel de silice, avec comme phase mobile le mélange $CH_2Cl_2/méthanol 9/1$. F = 210°C ; IR : 1630 cm⁻¹ (v C=O amide). 400 MHz RMN-¹H (DMSO-d₆) δ p.p.m. : 2.05 (CH₃), 3.10-3.65 (CH₂), 4.90 (α CH₂-His), 5.20 (β CH₂-His), 7.40-8.05 (CH-Pyr), 7.30-8.35 (CH-Im), 8.30-8.45 (CH-thiazole). Spectrométrie de masse (SM) (SIMS ionisation) = 853 (M⁺).

* Synthèse d'AMBIGLU

La même stratégie que pour AMBI-A₂ a été utilisée, à savoir la synthèse de trois grandes fractions qui seront réunies par la suite. Ces trois parties consistent en : N-BOC-N'(Z)-N'(méthylène-2-carboxyl-6 pyridyl) éthylène diamine (A), N_{π} (1m)-Z-His-(γ (tétra OAc)-GlcNH₂)-Glu-(α OBzl) et la partie (C) d'AMBI-A₂ sous forme d'ester méthylique.

La synthèse de A, produit intermédiaire dans la synthèse d'AMPHIS est décrite (Hénichart <u>et al</u>, 1982b), ainsi que la partie (C) d'AMBI-A₂ (Houssin <u>et al</u>, 1984a).

Pour la préparation de B, le chlorhydrate de glucosamine d(+) (Aldrich) est protégé sur sa fonction amine par un groupement BOC : à l'amine (6.04 g, 0.028 mmole) dissoute dans un mélange dioxane/eau 2:1, on rajoute l'anhydride de BOC (6.54 g, 0.03 mmole). Le pH est maintenu constant à 10 avec de la soude pendant les 3 h que dure la réaction. Après réaction, on évapore à sec. Le résidu obtenu est repris dans l'eau et le pH est abaissé à 3. Le produit est extrait par l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec : 46 % ; IR : 1690 cm⁻¹ (vC=0), 3375 cm⁻¹ (vNH).

Le produit obtenu (3.6 g, 0.013 mole) est dissous dans la pyridine, on rajoute ensuite goutte à goutte l'anhydride acétique en large excès. Après 12 h à température ambiante, on évapore à sec, le produit est repris dans l'acétate d'éthyle. Après lavage à l'eau la phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et évaporée à sec. On obtient une huile jaune, 55 % ; IR : 1735 cm⁻¹ et 1760 cm⁻¹ (ν C=O), 3375 cm⁻¹ (ν NH), 1690 cm⁻¹ (ν C=O de BOC).

Avant le couplage à l'acide glutamique, il faut libérer la fonction amine en faisant barboter de l'HCl gazeux jusqu'à saturation dans la solution de dioxane contenant le produit (BOC-NH glucosamine tétra-O-acétylée). On obtient un précipité blanc, 70 % ; IR : 1740 cm⁻¹ et 1760 cm⁻¹ (\vee C=O), 2600-2800 cm⁻¹ (\vee NH₃⁺) ; SM (IE) : 348 (M⁺) ; 400 MHz RMN-¹H (DMSO-d₆) δ p.p.m. 1.99, 2.01, 2.05, 2.19 (CH₃), 3.87 (H₅), 4.00 (H₂), 4.15 (H₆) 5.00 (H₃), 5.25 (H₄), 6.22 (H₁), 8.77 (NH₂).

Le couplage de l'ester α benzylique de l'acide L-BOC-glutamique (SERVA) (0.5 g, 0.0015 mole) avec le chlorhydrate de glucosamine tétra-O-acétylée (0.575 g, 0.0015 mole) se fait dans un mélange DCM/DMF en présence de DCC (0.33 g, 0.0016 mole), de HOBt (0.25 g, 0.0016 mole) et de TEA (0.225 ml, 0.0015 mole), dans les mêmes conditions que les couplages précédents.

Après élimination de la DCU et les différents lavages, la phase organique est évaporée à sec. Le produit est recristallisé dans l'éther, 43 % ; lR : 1740 cm⁻¹, 1760 cm⁻¹, 1700 cm⁻¹ (v C=O) ; 400 MHz RMN-¹H (DMSO-d₆) δ p.p.m. 1.38 (CH₃-BOC), 1.91, 1.97, 2.01, 2.15 (CH₃-acétyle), 3.97 (H₅), 3.98 (H₂), 4.15 (H₆), 4.25 (α CH-Glu), 4.98 (H₃), 5.12 (CH₂-benzyl), 5.15 (H₄), 5.93 (H₁), 7.25 (NH-BOC), 7.34 (Arom), 7.98 (NH-GlcNH₂).

L'élimination du groupement protecteur BOC se fait en rajoutant 20 ml d'acide trifluoroacétique (TFA). Après 45 min sous agitation, le TFA est évaporé et le produit est lavé à l'éthanol, avant d'être recristallisé dans l'éther.

Le couplage du produit ainsi obtenu, sous forme de sel de TFA (0.4 g, 0.0006 mole) avec le BOC-L-histidine (Z) (0.0233 g, 0.0006

mole) est réalisé par la méthode à la DCC en présence de HOBt et de TEA. 45 % ; IR : 1740 cm⁻¹, 1760 cm⁻¹ (vC=O ester) 3340 cm⁻¹ (vNH-BOC) ; SM (FAB) = 938 (M⁺).

La dernière étape pour l'obtention du "bloc" B consiste à déprotéger sélectivement l'histidine sur sa fonction α NH₂ par le TFA. 90 % ; SM (FAB) = 838 (M⁺).

Le couplage de A (0.130 g, 0.0003 mole) avec B (0.285 g, 0.0003 mole) se fait dans du DCM, en présence, comme pour les précédents couplages, de la TEA (0.0003 mole) et d'un léger excès de DCC (0.00033 mole) et de HOBt (0.00033 mole). La purification du produit se fait toujours de la même manière : 48 % ; SM (FAB) = 1108 (M^+Z).

Avant d'introduire la dernière partie C de la molécule, une saponification par la soude en présence de méthanol de la fonction ester benzylique de l'acide glutamique (0.17 g, 0.00014 mole) est réalisée. Après élimination du NaCl à l'alcool absolu à chaud, le produit est recristallisé dans un mélange éther/éther de pétrole. 78 % ; SM (FAB) = 993 (M^+ +1).

AMBIGLU est obtenu après un dernier couplage classique à la DCC en présence de HOBt, du produit précédemment obtenu (0.12 g, 0.00011 mole) avec C (0.040 g, 0.00011 mole). Le produit est récupéré après l'élimination de la DCU, et les différents lavages. Le résidu est obtenu après recristallisation dans l'éther, 38 % ; SM (FAB) = 1242 (M^+ +1).

Après une déprotection totale par l'acide bromhydrique (HBr) en milieu acétique selon le protocole habituel, on obtient par précipitation dans l'éther, le dérivé (AMBIGLU) attendu, 90 % ; SM (FAB) = 908 (M^++1) .

* Solvolyse par HF

Une "chaîne HF" classique a été utilisée. A 40 mg de BLM-A₂, soigneusement séchée (48 h au lyophilisateur, une nuit au dessicateur), on a ajouté 1.5 ml d'anisole. L'ensemble étant dans un réacteur en Kel-F maintenu à 0°C, dans un bain de glace. 15 ml d'HF anhydre sont alors ajoutés. Après une heure de réaction à 0°C, sous agitation, HF est éliminé complètement. L'échantillon est repris dans de l'éther anhydre, pour éliminer l'anisole. Le précipité blanc formé est alors collecté pour être analysé.

METHODES ANALYTIQUES

* Dénaturation thermique

La mesure du Tm (température de fusion de l'ADN) a été faite spectrophotomètre Uvikon-Kontron 810/820 couplé à sur un enregistreur Uvikon 21 pour le tracé des courbes et à une imprimante Uvikon 48. Les cuves en quartz contenant les échantillons sont placées dans un porte-cuve thermostaté par une circulation d'eau, provenant d'un thermostat Haake. La température de l'échantillon est contrôlée à l'aide d'un thermocouple directement en contact avec la solution. L'absorbance à 260 nm est enregistrée toutes les minutes entre 30 et 95°C (l'augmentation de température est de 1°C/min). La concentration d'ADN dissous dans du Tampon SSC 0.1 M (NaCl 0.015 M, Citrate trisodique 0.0015 M, pH 7) est estimée en prenant, pour l'ADN de thymus de veau, 6600 M^{-1} cm⁻¹ comme coefficient d'extinction molaire.

* Fluorescence

Les spectres d'émission de fluorescence sont enregistrés à température ambiante sur un spectrofluorimètre Jobin-Yvon J-Y-3 équipé d'un enregistreur X-Y.

Les échantillons sont préparés dans du Tampon phosphate 0.05 M à pH 6-9.

* Polarisation de fluorescence

La mesure à température ambiante du taux de polarisation P a été réalisée sur un spectrofluopolarimètre SLM 4048. L'échantillon (le fluorophore bithiazole-fluorescamine libre ou lié à l'ADN) est excité à 365 nm. Le rapport des intensités de la lumière polarisée émise verticalement ($I_{//}$) et horizontalement (I_{\perp}) est mesurée après passage par un filtre qui coupe à 480 nm. Le facteur d'anisotropie de fluorescence est calculé suivant l'équation :

$$P = \frac{I_{//} / I_{\perp} + 1}{I_{//} / I_{\perp} + 2}$$

Le trajet optique de toutes les cuves utilisées est de 1 cm.

* Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

L'étude de la complexation et de la production des radicaux libres, en résonance paramagnétique électronique (RPE) a été réalisée sur un spectrophotomètre Varian E 109 travaillant dans la bande X. Une modulation de fréquence de 100 KHz est utilisée avec une microonde de puissance 20 mW. Les solutions sont introduites dans des cellules plates en quartz ("spin-trapping") ou dans des tubes en quartz (complexes métalliques), disposés ensuite dans une cavité E238 opérant dans le mode TM₁₁₀.

a) Complexation du Cu et du Fe

Pour l'étude de la complexation, un mélange équimoléculaire d'une solution aqueuse de perchlorate de cuivre à 10^{-3} M et du produit testé solubilisé dans du Tampon phosphate 0.05 M, pH 6.9 est réalisé. A cela est rajouté 20 % de glycérol (V/V) afin d'obtenir un glacis régulier. Le tube de quartz est alors plongé dans de l'azote liquide.

b) Production de radicaux libres

Le PBN (phényl-N-tert-butyl nitrone) et le DMPO (diméthyl-5,5pyrrolidine-1N-oxyde) (Aldrich), ont été employés comme capteurs de radicaux ("spin-traps") pour la détection des radicaux hydroxyle (OH') et des anions superoxyde (O_2^{-1}) .

Au produit à tester (0.2 ml d'une solution à 10^{-2} M dans du Tampon phosphate à pH 7.4) est rajouté 0.2 ml de fer ferreux (Fe(SO₄)₂ (NH₄)₂, 6H₂O) à la même concentration. Ce mélange équimoléculaire est mis en présence de 0.2 ml soit d'une solution tamponnée à pH 7.4 de DMPO (10 mM) fraîchement préparée, soit d'une solution alcoolique de PBN (80 mM). Des témoins ("spin-trap" seul, "spin-trap" en présence de fer uniquement) sont réalisés avant toute étude.

* Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un dichrographe Jobin-Yvon RJ Mark III. Les solutions sont introduites dans des cellules en quartz. La longueur de la cellule utilisée est choisie de manière à avoir une absorbance inférieure à 1.5. La mesure de l'absorbance est effectuée dans le domaine de λ = 200 à λ = 800 nm.

Les complexes cuivriques peuvent également être mis en évidence par dichroïsme circulaire. Le complexe est préparé extemporanément. Par addition de soude ou d'acide chlorhydrique, les solutions sont ajustées au pH souhaité. Les spectres de dichroïsme circulaire sont enregistrés entre 200 et 800 nm.

* Viscosimétrie

L'interaction d'une substance avec la double hélice d'ADN s'accompagne souvent de changements de conformation. Ces variations topologiques influent sur le comportement hydrodynamique de l'ADN en solution. La mesure de la viscosité d'une solution d'ADN en présence d'un produit à tester, permet donc d'approcher le mécanisme de l'interaction drogue-ADN. Les mesures d'élongation et de détorsion ont été réalisées à l'aide d'un viscosimètre Ubbelohde semi-microdilution couplé à un détecteur électronique Schott type ABS/G avec une précison de 0.1 s. Au cours de ces expérimentations, la température est maintenue rigoureusement fixe (25° + 0.01°C) à l'aide d'un bain d'eau thermostaté. Les solutions d'ADN employées sont préalablement filtrées à travers une membrane Millipore 0.45 µm et le volume utilisé est de 2 ml pour chaque expérimentation.

a) Elongation de l'ADN

Afin de pouvoir apprécier des variations d'élongation, seuls les fragments d'ADN de poids moléculaire inférieur à 500 000 sont utilisables car ils possèdent une structure en bâtonnets rigides (Rod-like). Une solution d'ADN de thymus de veau (1.5 mg/ml en solution dans le tampon SHE 0.01 M pH 7) est soumise à l'action de la presse de French. La taille des fragments est contrôlée par viscosimétrie et l'homogénéité de la préparation visualisée par électrophorèse en gel d'agarose. Les temps d'écoulement fournis par l'enregistreur sont convertis en une mesure d'élongation en utilisant l'équation de Cohen et Eisenberg (1966, 1969)

> $[\eta]$ = viscosité de la solution ADN + drogue $[\eta_{\circ}]$ = viscosité de l'ADN seul

$$\frac{L}{Lo} = \left(\frac{t_c - t_o}{t_D - t_o}\right)^{1/3} = \left(\frac{[\eta]}{[\eta]}\right)^{1/3}$$

- L_o = longueur de l'ADN libre
 L = longueur de l'ADN + drogue
 t_o = temps d'écoulement du tampon
 SHE
 t_c = temps d'écoulement de l'ADN
- libre t_n = temps d'écoulement de l'ADN

La mesure d'élongation consiste à étudier la variation du rapport L/L_ en fonction de r, variation donnée par la relation suivante :

$$\frac{L}{L_{o}} = \frac{1 + nr}{r} = \frac{drogue}{ajoutée}$$

$$[ADN] exprimée en phosphate$$

On obtient une droite, n étant la pente.

Pour un monointercalant n est égal à 1, alors que pour un bis-intercalant n est égal à 2.



L'élongation est égale à 3.4 Å x n.

(Tampon SHE 0.01 M : NaCl 9.4 mM. Hepes (N-(2-hydroxy-ethyl)pipérazine-N'-éthane sulfonique 2 mM). EDTA 10 μ M, pH 7 (Wakelin et Waring, 1976)).

b) Détorsion de l'ADN

La détorsion de l'ADN au niveau même et autour des sites d'intégration de la drogue est une conséquence nécessaire d'une intercalation vraie comme d'une insertion. La mesure de détorsion nécessite l'emploi d'un ADN plasmidique circulaire fermé superenroulé (forme I) (aimablement fourni par le Laboratoire de Virologie, U.233).

Le protocole expérimental correspond à la méthode décrite par Saucier <u>et al</u>, 1971 et Revet <u>et al</u>, 1971. Des mesures successives de la viscosité d'une solution d'ADN 150 μ M (en phosphate) contenant des quantités croissantes de substance à tester (solution mère 150 μ M) sont effectuées. On mesure le rapport $[\eta]_{ADN} + drogue/[\eta]_{ADN}$ seul. On calcule, d'autre part, la valeur du rapport r = [drogue]/[phosphate]. La mesure de la concentration en phosphate se fait par lecture d'absorbance à 260 nm en utilisant le coefficient $\varepsilon_{260} =$ $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Le graphe $\frac{[\eta] ADN + drogue}{[\eta] ADN} = f(r) \text{ ci-dessous se décompose en trois}$

zones correspondant à des structures différentes de l'ADN plasmidique. La valeur r_{eq} (r équivalent) permet de calculer l'angle de détorsion par la relation suivante :

On étalonne le plasmide utilisé avec un intercalant bien connu, le bromure d'éthidium dont l'angle de détorsion est $Q' = 26^{\circ}$ (Wang, 1974).


* Coupure d'ADN

a) <u>Dégradation de l'ADN-¹⁴C</u> :

- Préparation de l'ADN de cellules KB_3 , marqué au ¹⁴C : Les cellules KB_3 , en suspension dans le milieu MEM-Joklik modifié pour suspension contenant 5 % de sérum de cheval, sont maintenues en culture pendant 24 h en présence de formiate de sodium (HCOO⁻Na⁺, 1 µCi/ml, 58 mCi/mmol). Les cellules sont récupérées par centrifugation (2000 tpm -10 mn). L'ADN radioactif est extrait du culot et purifié selon la technique de Maniatis <u>et al</u>, 1982. Le protocole est le suivant :

- centrifugation (2000 tpm - 10 mn) - élimination

Culot de cellules resuspendu dans un tampon Tris 10 mM-EDTA 1 mM (10⁸ cellules/ml) - choc hypotonique et lyse des cellules

Digestion protéasique 1 vol du mélange EDTA 0.1 M Protéinase K (100 µg/ml) Sarcosyl 5 %

Extrait brut d'acides nucléiques

purification : 1 vol de la phase inférieure
 du mélange : phénol/chloroforme/alcool
 isoamylique (24/24/1) saturé au
 Tris-EDTA

- agitation manuelle

- centrifugation (2000 tpm - 10 mn)

Prélèvement de la phase aqueuse

- dialyse à 4°C pendant 1 nuit contre 2 l

d'une solution : Tris-HCl 50 mM-EDTA 5 mM

- NaCl 10 mM

Contenu du boudin de dialyse : ADN et ARN totaux

- digestion des ARN 3 h à 37°C par une RNase-DNase free (100 μg/ml)

- élimination par 2 extractions au phénol

Prélèvement de la phase aqueuse (ADN)

- concentration de l'ADN : précipitation à l'éthanol

élimination de l'éthanol : centrifugation
(10 000 tpm - 10 mn)

- Culot séché sous vide (1 - 2 mn)

Culot d'ADN repris dans le tampon SSC 0.1 M

La concentration en ADN de la solution est mesurée par lecture de l'absorbance à 260 nm en utilisant le coefficient d'extinction molaire $\varepsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Un échantillon de la solution est utilisé pour le comptage de la radioactivité associée à l'ADN afin de vérifier la bonne réalisation du marquage.

- Le mélange réactionnel : Celui-ci contient :

- 30 µl d'ADN ¹⁴C (3000 cpm/µg)

- 3 μl de β-mercaptoéthanol 10 mM

- la substance à tester

- le fer $(Fe(SO_4)_2(NH_4)_2, 6H_2O)$ en quantité équimolaire à la drogue

- le tampon Tris-HCI 50 mM, pH 8.0 (qsp 50 µl).

Après 30 mn d'incubation à température ambiante, la réaction est arrêtée par l'addition de 5 µl d'EDTA (0.1 M, pH 8.3).

- <u>Electrophorèse en gel de polyacrylamide</u> : Pour alourdir les dépôts et pouvoir suivre la migration, 5 μl d'un mélange saccharose 50 %-bleu de bromophénol 0.02 % sont ajoutés au mélange réactionnel avant le dépôt sur un gel d'acrylamide à 10 %. L'électrophorèse est réalisée dans le tampon TBE (90 mM Tris/90 mM acide borique/25 mM EDTA pH 8.3) pendant 16 h à 200 V. Le gel est séché sur papier Whatman et mis en impression à -70°C pendant 8 semaines contre un film Kodak XS-5. L'action des produits testés sur l'ADN est visualisée après révélation de l'autoradiogramme.

b) Coupure mono-brin et double-brin

méthode : Electrophorèse en gel d'agarose du - Principe de la incubation plasmide après avec les composés à différentes concentrations. différentes visualisées Les formes sont après migration.



- Le plasmide pVM 216, fourni par l'Unité 233, a été "enrichi" en forme superenroulée (1) avant utilisation. Pour ce faire, le plasmide (mélange des trois formes) a été déposé sur un gradient de sucrose 5-20 %. Après ultracentrifugation une nuit à 15°C à 35000 tpm, la bande correspondant à la forme en superhélice est récupérée. L'ADN est précipité à l'éthanol (1V/2V) en présence de NaCl (60 mM). Le plasmide est ensuite resolubilisé dans le tampon voulu.

- <u>Mélange réactionnel</u> : identique au précédent. Pour une bonne "lecture" à 254 nm, on dépose 5 µg d'ADN. Le mélange est déposé

ensuite sur un gel d'agarose à 0.8 % (0.8 g pour 100 ml TBE : Tris 90 mM. Acide borique 50 mM. EDTA (acide éthylène diaminetétraacétique) 25 mM, pH 8.3).

c) <u>Dosage à l'acide thiobarbiturique des "bases-propenal</u>" libérées

A 0.2 ml de ADN_{CT} en présence d'un mélange équimoléculaire Fe(II)-BLM-A₂ ou Fe(II)-déglyco-BLM-A₂, on rajoute 0.8 ml d'acide thiobarbiturique (35 mM).

Le mélange est chauffé à 92°C pendant 20 min. On laisse refroidir et la lecture est faite à 532 nm.

* Chromatographie liquide à haute performance

La CLHP, à phase inverse, avec l'acide pentane sulfonique comme contre-ion a été réalisée sur un système Kratos. L'ensemble est constitué par deux pompes (Spectroflow 400), un injecteur (Spectroflow 480) et un détecteur d'absorption, avec un formeur de gradient, programmable (Spectroflow 783).

Le mélange est élué par un gradient linéaire 30-50 % de méthanol dans l'eau (le méthanol et l'eau contenant chacun 50 mM de contre-ion, 0.5 % (V/V) d'acide acétique glacial. Le pH de la solution aqueuse est ajusté à 4.3 avec de l'ammoniaque concentrée), pendant 25 min à un débit de 0.8 ml/min, à travers une colonne ultrasphère ODS (Altex) : 150X4.6 mm. Le diamètre des particules est de 5 μ m. La détection se fait à 292 nm. La BLM-A₂ et la déglyco-BLM-A₂ sont injectées sous forme de complexe cuivrique. * Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur un Brücker WP 80 SY, pour les produits intermédiaires de synthèse.

L'analyse structurale en ¹³C et ¹H, de la BLM et la déglyco-BLM a été réalisée sur un Brücker 400.

Le TMS (tétraméthylsilane) est utilisé comme référence interne pour les spectres RMN-¹H.

* Spectrométrie de masse

a) Impact électronique

Les spectres de masse en impact électronique ont été enregistrés sur un spectromètre de masse quadripolaire à introduction directe : Ribermag R 10-10.

L'appareil est connecté à un système de collection de données Riber 400.

Les échantillons sont chauffés à 200°C pour obtenir une pression de vapeur suffisante.

b) Fast Atom Bombardment (FAB)

L'analyse en spectrométrie de masse a été effectuée avec le spectromètre de masse Kratos MS 50 RF. Le canon à atomes rapides (lontech B11N) est monté sur une source Kratos FAB standard (Centre Commun des Mesures, Université de Lille Flandres-Artois). Les échantillons sont bombardés par un faisceau de Xénon à 99.995 % (Proder) avec une énergie cinétique de 7 keV. Le spectromètre de masse fonctionne avec un voltage de 8 kV et une résolution de masse de 3000 (10 % en vallée). Un système avec une dynode de conversion polarisée à 8 kV constitue le détecteur. Pour nos échantillons, l'analyse en FAB est réalisée en utilisant du glycérol ou thioglycérol comme matrice. 1 μ l de la solution est déposé sur l'extrémité en cuivre de la canne d'insertion FAB.

* <u>Analyse d'acides aminés</u> : Chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

L'hydrolyse des peptides (500 μ g) a été effectuée en tube scellé sous azote par l'acide chlorhydrique 5.6 N pendant 24 heures dans une étuve à 110°C.

L'hydrolysat est finalement évaporé sous vide à basse température.

La composition en acides aminés est réalisée sur autoanalyseur Beckman de type 119 CL.

La Nor-leucine (N-Leu) est utilisée comme standard interne.

* Composition chimique en sucres

La composition en oses neutres est déterminée par la méthode de Lamblin et al, 1984.

L'échantillon additionné de 50 μ g de myo-inositol (standard interne) et traité par du méthanol/HCl 1.5 M à 85°C pendant 24 h. La triméthylsilylation des produits est obtenue par addition de Sylon HTP (Supelco, Bellafonte, Pa).

L'analyse des méthyl-O-glycosides triméthylsilylés est réalisée par chromatographie en phase gazeuse sur un appareil Hewlett-Packard (modèle 5840), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

La colonne (180X0.3 cm) est en verre et contient de l'OV-17 à 3 % sur chromosorb W-HP, 80-100 mesh (Supelco).

Une programmation de température est mise en oeuvre : la température initiale est de 120°C et augmente selon un gradient de 8°C/mn jusqu'à la température finale de 200°C.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALBERTINI J.P. (1984). Rôle des ions de métaux de transition dans l'activité antitumorale de la bléomycine : étude spectroscopique. <u>Thèse</u> de Doctorat ès-Sciences (Paris).

AOYAGI Y., SUGUNA H., MURUGESAN N., EHRENFELD G.M., CHANG L.H., OHGI T., SHEKHANI M.S., KIRKUP M.P., HECHT S.M. (1982). Deglycobleomycin : total synthesis and oxygen transfer properties of an active bleomycin analogue. <u>J. Am. Chem. Soc.</u> <u>104</u>, 5237-5239.

BAGULEY B.C. (1982). Non intercalative DNA-binding antitumour compounds. Mol. Cell. Biochem. 43, 167-181.

BARRANCO S.C., HUMPHREY R.M. (1971). The effects of bleomycin on survival and cell progression in chinese Hamster cells <u>in vitro</u>. Cancer Res. 31, 1218-1233.

BEREMAN R.D., WINKLER M.E. (1980). A spectral investigation of the copper(II) complex of the antitumor compound bleomycin. <u>J.</u> Inorg. Biochem. 13, 95-104.

BEREND N. (1984). Protective effect of hypoxia on bleomycin lung toxicity in the rat. Am. Rev. Respir. Dis. 130, 307-308.

BERNIER J.L., HENICHART J.P., CATTEAU J.P. (1981a). ESR study of intercalation : quantitative evaluation of drug-DNA-binding through competition with spin-labeled 9-aminoacridine. <u>Anal. Biochem. 117</u>, 12-17. BERNIER J.L., HENICHART J.P., CATTEAU J.P. (1981b). Design, synthesis and DNA-binding capacity of a new peptidic bifunctional intercalating agent. Biochem. J. 199, 479–484.

BLUM R.H., CARTER S.K., AGRE K.A. (1973). A clinical review of bleomycin : A new antineoplastic agent. Cancer 31, 903-914.

BOOTH T.E., SAKAI T.T., GLICKSON J.D. (1983). Interaction of bleomycin A₂ with poly(deoxyadenylylthymidylic acid). A proton nuclear magnetic resonance study of the influence of temperature, pH and ionic strength. <u>Biochemistry 22</u>, 4211-4217.

BRAWN K., FRIDOVICH I. (1981). DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. <u>Arch. Biochem. Biophys.</u> 206, 414-419.

BROUGHTON A., STRONG J.E. (1976). Radioimmunoassay of bleomycin. Cancer Res. 36, 1418-1421.

BURGER R.M., HORWITZ S.B., PEISACH J., WITTENBERG J.B. (1979). Oxygenated iron bleomycin. J. Biol. Chem. 254, 12299-12302.

BURGER R.M., BERKOWITZ A.R., PEISACH J., HORWITZ S.B. (1980). Origin of malondialdehyde from DNA degraded by Fe(II)-bleomycin. J. Biol. Chem. 255, 11832-11838.

BURGER R.M., PEISACH J., HORWITZ S.B. (1981a). Activated bleomycin : a transient complex of drug, iron and oxygen that degrades DNA. J. Biol. Chem. 256, 11636-11644. BURGER R.M., ADLER A.D., HORWITZ S.B., MIMS W.B., PEISACH J. (1981b). Demonstration of nitrogen coordination in metal-bleomycin complexes by electron spin-echo-envelope spectroscopy. <u>Biochemistry</u> 20, 1701-1704.

CHEN D.M., HAWKINS B.L., GLICKSON J.D. (1977). Proton nuclear magnetic resonance study of bleomycin in aqueous solution. Assignment of resonances. Biochemistry 16, 2731-2738.

CHEN D.M., SAKAI T.T., GLICKSON J.D., PATEL D.J. (1980). Bleomycin-A₂ complexes with poly (dA-dT) : A proton nuclear magnetic resonance study of the nonexchangeable hydrogens. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 197-205.

CHIEN M., GROLLMAN A.P., HORWITZ S.B. (1977). Bleomycin-DNA interactions : Fluorescence and proton magnetic resonance studies. Biochemistry 16, 3641-3647.

CLARK J.G., OVERTON J.E., MARINO B.A., UITTO J., STARCHER B.C. (1980). Collagen biosynthesis in bleomycin induced pulmonary fibrosis in hamsters. J. Lab. Clin. Med. 96, 943-953.

COHEN G., EISENBERG H. (1966). Conformation studies on the sodium and cesium salts of calf thymus deoxyribonucleic acid (DNA). Biopolymers 4, 429-440.

COHEN G., EISENBERG H. (1969). Viscosity and sedimentation study of sonicated DNA-proflavine complexes. Biopolymers 8, 45-55. COLLMAN J.P., BRAUMAN J.I., IVERSON B.L., SESSLER J.L., MORRIS R.M., GIBSON Q.H. (1983). O₂ and CO binding to iron(11) porphyrins : A comparison of the "Picket Fence" and "Pocket" porphyrins. J. Am. Chem. Soc. 105, 3052-3064.

COMIS R.L., KUPPINGER M.S., GINSBERG S.J., CROOKE S.T., GILBERT R., AUCHINCLOSS J.H., PRESTAYKO A.W. (1979). Role of single-breath carbon monoxide-diffusing capacity in monitoring the pulmonary effects of bleomycin in germ cell tumor patients. Cancer Res. 39, 5076-5080.

CONLEY N.S., YARBRO J.W., FERRARI H.A., ZEIDLER R.B. (1986). Bleomycin increases superoxide anion generation by pig peripheral alveolar macrophages. Mol. Pharmacol. 30, 48-52.

COOPER K.R., HONG W.K. (1981). Prospective study of the pulmonary toxicity of continuously infused bleomycin. <u>Cancer Treat.</u> <u>Rep. 65</u>, 419-425.

COOPER Jr J.A.D., WHITE D.A., MATTHAY R.A. (1986). Drug-induced pulmonary disease. <u>Am. Rev. Respir. Dis.</u> <u>133</u>, 321-340.

CROOKE S.T., COMIS R.L., EINHORN L.H., STRONG J.E., BROUGHTON A., PRESTAYKO A.W. (1977). The effects of variations in renal function on the clinical pharmacology of bleomycin administered as an intravenous bolus. <u>Cancer Treat. Rep.</u> <u>61</u>, 1631–1636.

CUNNINGHAM M.L., RINGROSE P.S., LOKESH B.R. (1984). Inhibition of the genotoxicity of bleomycin by superoxide dismutase. Mut. Res. 135, 199-202.

DABROWIAK J.C., GREENAWAY F.T., GRULICH R. (1978a). Transitionmetal binding site of bleomycin A₂. A carbon 13 nuclear magnetic resonance study of the zinc(II) and copper(II) derivatives. Biochemistry 17, 4090-4096.

DABROWIAK J.C., GREENAWAY F.T., LONGO W.E., VAN HUSEN M., CROOKE S.T. (1978b) A spectroscopic investigation of the metal binding site of bleomycin A_2 . The copper (11) and Zn (11) derivatives. <u>Biochim. Biophys. Acta 517</u>, 517–526.

DABROWIAK J.C., GREENAWAY F.T., SANTILLO F.S. (1979a). The metallobleomycins. In : "Bleomycin : chemical, biochemical and biological aspects". Hecht S.M. (Eds) pp. 137-155, Springer-Verlag.

DABROWIAK J.C., GREENAWAY F.T., SANTILLO F.S., CROOKE S.T. (1979b). The iron complexes of bleomycin and tallysomycin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 721-729.

DANDLIKER W.B., FEIGEN G.A. (1961). Quantification of the antigen-antibody reaction by the polarization of fluorescence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 299-304.

D'ANDREA A.D., HASELTINE W.A. (1978). Sequence specific cleavage of DNA by the antitumor antibiotics neocarzinostatin and bleomycin. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 3608-3612. DASKAL Y., CROOKE S.T., SMETANA K., BUSCH H. (1975). The effects of bleomycin A₂ on the nucleolus and its possibly related structures in Novikoff hepatoma ascites cells. <u>Cancer Res.</u> <u>35</u>, 374-381.

DASKAL Y., GYORKEY F., GYORKEY P., BUSCH H. (1976). Ultrastructural study of pulmonary bleomycin toxicity. <u>Cancer Res.</u> <u>36</u>, 1267-1272.

DE LENA M., GUZZON A., MONFARDINI S., BONADONNA G. (1972). Clinical radiological and histopathological studies on pulmonary toxicity induced by treatment with bleomycin (NSC-125066). <u>Cancer Treat.</u> <u>Rep. 56</u>, 343-356.

DIZDAROGLU M., VON SONNTAG C., SCHULTE-FROHLINDE D. (1975). Strand breaks and sugar release by γ -irradiation of DNA in aqueous solution. J. Am. Chem. Soc. 97, 2277-2278.

DOOLEY M.M., PRYOR W.A. (1982). Free radical pathology : inactivation of human α -1 proteinase inhibitor by products from the reaction of nitrogen dioxide with hydrogen peroxide and the etiology of emphysema. Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 981-987.

DRESP J., SCHMID E., BAUCHINGER M. (1987). The cytogenetic effect of bleomycin on human peripheral lymphocytes in vitro and in vivo. Mutat. Res. 56, 341-353.

ECKELMAN W.C., RZESZOTARSKI W.J., SIEGEL B.A., KUBOTA H., CHELLIAH M., STEVENSON J., REBA R.C. (1975). Chemical and biological properties of isolated radiolabelled bleomycin preparations. J. Nucl. Med. 16, 1033-1037.

EHRENFELD G.M., RODRIGUEZ L.O., HECHT S.M. (1985). Copper(1)-bleomycin : structurally unique complex that mediates oxidative DNA strand scission. Biochemistry 24, 81-92.

EHRENFELD G.M., SHIPLEY J.B., HEIMBROOK D.C., SUGIYAMA H., LONG E.C., VAN BOOM J.H., VAN DER MAREL G.A., OPPENHEIMER N.J., HECHT S.M. (1987). Copper-dependent cleavage of DNA by bleomycin. Biochemistry 26, 931-942.

ELSON M.K., OKEN M.M., SHAFER R.B. (1977). A radioimmunoassay for bleomycin. J. Nucl. Med. 18, 296-299.

FAHEY P.J., UTELL M.J., MAYEWSKI R.J., WANDTKE J.D., HYDE R.W. (1982) Early diagnosis of bleomycin pulmonary toxicity using bronchoalveolar lavage in dogs. <u>Am. Rev. Respir. Dis.</u> 126, 126-130.

FAVAUDON V. (1982). On the mechanism of reductive activation in the mode of action of some anticancer drugs. Biochimie 64, 457-475.

FREEDMAN J.H., HORWITZ S.B., PEISACH J. (1982). Reduction of Copper(II)-Bleomycin : a model for in vivo drug activity. Biochemistry 21, 2203-2210.

FUJII A., TAKITA T., MAEDA K., UMEZAWA H. (1973). New components of bleomycin. J. Antibiot. 26, 396-397.

FUJII A., TAKITA T., SHIMADA N., UMEZAWA H. (1974). Biosyntheses of new bleomycins. J. Antibiot. 27, 73-77. FUJITA H. (1971). Comparative studies on the blood level, tissue distribution, excretion and inactivation of anticancer drugs. Jpn J. Clin. Oncol. 12, 151–162.

GABBAY E.J., ADAWADKAN P.D., WILSON W.D. (1976a). Stereospecific binding of diastereomeric peptides to salmon sperm DNA. Biochemistry 15, 146-151.

GABBAY E.J., ADAWADKAN P.D., KAPICAK L., PEARCE S., WILSON W.D. (1976b). The interaction specificity of peptides with DNA. Evidence for peptide beta-sheet-DNA binding. <u>Biochemistry 15</u>, 152-157.

GALVAN L., HUANG C.H., PRESTAYKO A.W., STOUT J.T., EVANS J.E., CROOKE S.T. (1981). Inhibition of bleomycin-induced DNA breakage by superoxide dismutase. <u>Cancer Res. 41</u>, 5103-5106.

GARNIER A., MUSONI L., TOSI L. (1980). Cu(II)-(L Asp)_n system. Spectroscopic evidence of hexaatomic chelate ring formation. <u>J.</u> Inorg. Biochem. 13, 23-33.

GILONI L., TAKESHITA M., JOHNSON F., IDEN C., GROLLMAN A.P. (1981). Bleomycin-induced strand-scission of DNA (mechanism of deoxyribose cleavage). J. Biol. Chem. 256, 8608-8615.

GLICKSON J.D, PILLAI R.P., SAKAI T.T. (1981). Proton NMR studies of the Zn(II)-bleomycin-A₂-poly (dA-dT) ternary complex. Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 2967-2971. GOLDINER P.L., CARLON G.C., CVITKOVIC E., SCHWEIZER O., HOWLAND W.S. (1978). Factors influencing postoperative morbidity and mortality in patients treated with bleomycin. <u>Br. Med. J. 1</u>, 1664-1667.

GOLDSTEIN R.H., LUCEY E.C., FRANZBLAU C., SNIDER G.L. (1979). Failure of mechanical properties to parallel changes in lung connective tissue composition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in Hamsters. Am. Rev. Respir. Dis. 120, 67-73.

GROVE R.B., ECKELMAN W.C., REBA R.C. (1973). Tumor imaging properties of 111 In, 57 Co, 67 Ga and 57 Fe labeled bleomycin. <u>J. Nucl.</u> <u>Med.</u> <u>14</u>, 627-630.

HAIDLE C.W. (1971). Fragmentation of deoxyribonucleic acid by bleomycin. Mol. Pharmacol. 7, 645-652.

HAIDLE C.W., KUO M.T., WEISS K.K. (1972a). Nucleic acid specificity of bleomycin. Biochem. Pharmacol. 21, 3308-3312.

HAIDLE C.W., WEISS K.K., KUO M.T. (1972b). Release of free bases from deoxyribonucleic acid after the reaction with bleomycin. <u>Mol.</u> Pharmacol. 8, 531-537.

HAIDLE C.W., BEARDEN J. Jr (1975). Effect of bleomycin on an RNA-DNA hybrid. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 815-821.

HARBOUR J.R., CHOW V., BOLTON J.R. (1974). An electron spin resonance study of the spin adducts of OH[•] and $HO_2^{•}$ radicals with nitrones in the ultraviolet photolysis of aqueous hydrogen peroxide solutions. Can. J. Chem. 52, 3549-3553.

HAY J.G., HASLAM P.L., DEWAR A., ADDIS B., TURNER-WARWICK M., LAURENT G.J. (1987). Development of acute lung injury after the combination of intravenous bleomycin and exposure to hyperoxia in rats. Thorax 42, 374-382.

HECHT S.M. (1986). The chemistry of activated bleomycin. Acc. Chem. Res. 19, 383-391.

HENICHART J.P., BERNIER J.L., CATTEAU J.P. (1982a). Interaction of 4-(9-acridinylamino)aniline and derivatives with DNA. Influence of a lysylglycyl side chain on the binding parameters. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 835-841.

HENICHART J.P., HOUSSIN R., BERNIER J.L., CATTEAU J.P. (1982b). Synthetic model of a bleomycin metal complex. <u>J. Chem.</u> Soc., Chem. Commun. 1295–1297.

HESTERBERG T.W., GERRIETS J.E., REISER K.M., JACKSON A.C., CROSS C.E., LAST J.A. (1981). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis : correlation of biochemical, physiological and histological changes. <u>Toxicol. Appl. Pharmacol.</u> 60, 360-367.

HONG S.J., PIETTE L.H. (1976). Electron spin resonance spin-label studies of intercalation of ethidium bromide and aromatic amine carcinogens in DNA. Cancer Res. 36, 1159-1171.

HOUSSIN R., BERNIER J.L., HENICHART J.P. (1984a). Aminoalkyl derivatives of 2,4'-bithiazole-4-carboxylic acid, the intercalating part of bleomycin. J. Het. Chem. 21, 681-683.

HOUSSIN R., BERNIER J.L., HENICHART J.P. (1984b). Synthesis of some spin-labeled bithiazoles, useful probes for studying bleomycin-DNA binding. J. Het. Chem. 21, 465-469.

HUANG C.H., GALVAN L., CROOKE S.T. (1980). Interactions of bleomycin analogues with deoxyribonucleic acid and metal ions studied by fluorescence quenching. <u>Biochemistry 19</u>, 1761–1767.

HUNNINGHAKE G.W., GADEK J.E., LAWLEY T.J., CRYSTAL R.G. (1981). Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. J. Clin. Invest. 68, 259-269.

ICHIKAWA T., MATSUDA A., YAMAMOTO K., TSUBOSAKI M., KAIHARA T., SAKAMOTO K., UMEZAWA H. (1967). Biological studies on bleomycin-A. J. Antibiot. Ser.A. 20, 149-155.

IITAKA Y., NAKAMURA H., NAKATANI T., MURAOKA Y., FUJII A., TAKITA T., UMEZAWA H. (1978). Chemistry of Bleomycin. XX. The X-Ray structure determination of P-3A Cu(II)-complex, a biosynthetic intermediate of bleomycin. J. Antibiot. 31, 1070-1072.

IQBAL Z.M., KOHN K.W., EWIG R.A.G., FORNACE A.J. (1976). Single strand scission and repair of DNA in mammalian cells by bleomycin. Cancer Res. 36, 3834-3838. ISHIZUKA M., TAKAYAMA H., TAKEUCHI T., UMEZAWA H. (1967). Activity and toxicity of bleomycin. J. Antibiot. Ser.A. 20, 15-24.

JAMESON G.B., DRAGO R.S. (1985). Role of weak hydrogen bonding in the coordination of dioxygen to hemoproteins and their models. J. Am. Chem. Soc. 107, 3017-3020.

JANZEN E.G., BLACKBURN B.J. (1968). Detection and identification of short-lived free radicals by an electron spin resonance trapping technique. J. Am. Chem. Soc. 90, 5909-5910.

KAELIN R.M., CENTER D.M., BERNARDO J., GRANT M., SNIDER G.L. (1983). The role of macrophage-derived chemoattractant activities in the early inflammatory events of bleomycin-induced pulmonary injury. Am. Rev. Respir. Dis. 128, 132-137.

KASAI H., NAGANAWA H., TAKITA T., UMEZAWA H. (1978). Interaction of bleomycin with nucleic acids, preferential binding to guanine base and electrostatic effect of the terminal amine. <u>J.</u> Antibiot. 31, 1316-1320.

KELLEY J., NEWMAN R.A., EVANS J.N. (1980). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. Prevention with an inhibitor of collagen synthesis. J. Lab. Clin. Med. 96, 954–964.

KENANI A. (1984). Bléomycine et analogues synthétiques. Relations entre structure moléculaire et toxicité pulmonaire. <u>Diplôme d'Etudes</u> Approfondies, Lille (France). KILKUSKIE R.E., MACDONALD T.L., HECHT S.M. (1984). Bleomycin may be activated for DNA cleavage by NADPH-cytochrome P-450 reductase. Biochemistry 23, 6165-6171.

KILKUSKIE R.E., SUGUNA H., YELLIN B., MURUGESAN N., HECHT S.M. (1985). Oxygen transfer by bleomycin analogues dysfunctional in DNA cleavage. J. Am. Chem. Soc. 107, 260-261.

KOPKA M.L., YOON C., GOODSELL D., PJURA P., DICKERSON R.E. (1985). The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 1376-1380.

KOYAMA G., NAKAMURA H., MUROAKA Y., TAKITA T., MAEDA K., UMEZAWA H., IITAKA Y. (1968). Chemistry of bleomycin II. The molecular and crystal structure of a sulfur-containing chromophoric amino acid. Tetrahedron Lett. 4635-4638.

KROSS J., HENNER W.D., HASELTINE W.A., RODRIGUEZ L., LEVIN M.D., HECHT S.M. (1982a). Structural basis of the deoxyribonucleic acid affinity of bleomycins. Biochemistry 21, 3711-3721.

KROSS J., HENNER W.D., HECHT S.M., HASELTINE W.A. (1982b). Specificity of deoxyribonucleic acid cleavage by bleomycin, phleomycin and tallysomycin. <u>Biochemistry 21</u>, 4310-4318.

KUO M.T., AUGER L.T., SAUNDERS G.F., HAIDLE C.W. (1977). Effect of bleomycin on the synthesis and function of RNA. <u>Cancer</u> Res. 37, 1345-1348. KUO M.T. (1981). Preferential damage of active chromatin by bleomycin. Cancer Res. 41, 2439-2443.

LAMBLIN G., BOERSMA A., KLEIN A., ROUSSEL P., VAN HALBEEK H., VLIEGENTHART J.F.G. (1984). Primary structure determination of five sialylated oligosaccharides derived from bronchial mucus glycoproteins of patients suffering from cystic fibrosis. <u>J. Biol.</u> Chem. 259, 9051-9058.

LAZO J.S., BOLAND C.J., SCHWARTZ P.E. (1982). Bleomycin hydrolase activity and cytotoxicity in human tumors. <u>Cancer Res.</u> 42, 4026-4031.

LAZO J.S., HUMPHREYS C.J. (1983). Lack of metabolism as the biochemical basis of bleomycin-induced pulmonary toxicity. <u>Proc. Natl.</u> Acad. Sci. 80, 3064-3068.

LEIBOVICH S.J., ROSS R.A. (1976). A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. Am. J. Pathol. 84, 501-514.

LESKO S.A., LORENTZEN R.J., TS'O P.O.P. (1980). Role of superoxyde in deoxyribonucleic acid strand scission. <u>Biochemistry 19</u>, 3023-3028.

LIN S.Y., GROLLMAN A.P. (1981). Interactions of a fragment of bleomycin with deoxyribodinucleotides : nuclear magnetic resonance studies. Biochemistry 20, 7589-7598.

LLOYD R.S., HAIDLE C.W., HEWITT R.R. (1978). Bleomycin-induced alkaline-labile and direct strand breakage of PM₂ DNA. <u>Cancer Res.</u> 38, 3191-3195.

LOWN J.W., SIM S. (1977). The mechanism of the bleomycin-induced cleavage of DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 1150-1157.

MANIATIS T., FRITSCH E.F., SAMBROOK J. (1982). Isolation of high molecular-weight, eukaryotic DNA from cells grown in tissue culture. In : <u>Molecular cloning : a Laboratory manual</u>. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., Eds, pp. 280-281, Cold-Spring Harbor.

MAROM Z., WEINBERG K.S., FANBURG B.L. (1980). Effect of bleomycin on collagenolytic activity of the rat alveolar macrophage. Am. Rev. Respir. Dis. 121, 859-867.

MAXAM A.M., GILBERT W. (1977). A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 560-564.

Mc GALL G.H., RABOW L.E., STUBBE J. (1987). Incorporation of ¹⁸O into glycolic acid obtained from the bleomycin-mediated degradation of DNA : Evidence for 4'-radical trapping by ${}^{18}O_2$. J. Am. Chem. Soc. 109, 2836-2837.

MELNYK D.L., HORWITZ S.B., PEISACH J. (1981). Redox potential of iron-bleomycin. Biochemistry 20, 5327-5331.

MIYAKI M., KITAYAMA T., ONO T. (1974). Breakage of DNA-membrane complex by bleomycin. J. Antibiot. 27, 647-655.

MIYOSHI K., TANAKA H., KIMURA E., TSUBOYAMA S., MURATA S., SHIMIZU H., ISHIZU K. (1983). Electrochemical and spectroscopic studies on copper (11) complexes of macrocyclic ligands as models for square-pyramidal metal active sites of copper (11) complexes of bleomycin and glutathione. Inorg. Chim. Acta 78, 23-30.

MORT A.J., LAMPORT D.T.A. (1977). Anhydrous hydrogen fluoride deglycosylates glycoproteins. Anal. Biochem. 82, 289-309.

MOSELEY P.L., HEMKEN C., HUNNINGHAKE G.W. (1986). Augmentation of fibroblast proliferation by bleomycin. <u>J. Clin.</u> Invest. 78, 1150-1154.

MUGGIA F.M., LOUIE A.C., SIKIC B.I. (1983). Pulmonary toxicity of antitumor agents. Cancer Treat. Rev. 10, 221-243.

MÜLLER W.E.G., YAMAZAKI Z., BRETER H.J., ZAHN R.K. (1972). Action of bleomycin on DNA and RNA. Eur. J. Biochem. 31, 518-525.

MÜLLER W.E.G., ZAHN R.K. (1977). Bleomycin, an antibiotic that removes thymine from double-stranded DNA. <u>Prog. Nucleic Acids Res.</u> Mol. Biol. 40, 21-57.

MURAKAMI H., MORI H., TAIRA S. (1976). Molecular embrace of bleomycin with helical DNA. J. Theor. Biol. 59, 1-23.

MURAOKA Y., SUZUKI M., FUJII A., UMEZAWA Y., NAGANAWA H., TAKITA T., UMEZAWA H. (1981). Chemistry of bleomycin. XXVIII. Preparation of deglyco-bleomycin by mild acid hydrolysis of bleomycin. J. Antibiot. 34, 353-357. MURRAY V., MARTIN R.F. (1985). Comparison of the sequence specificity of bleomycin cleavage in two slightly different DNA sequences. Nucleic Acids Res. 13, 1467–1481.

NAGANAWA H., MURAOKA Y., TAKITA T., UMEZAWA H. (1977). Chemistry of bleomycin. XVIII. Carbon-13 NMR studies. J. Antibiot. 30, 388-396.

NAGATSU M., RICHART R.M., LAMBERT A. (1972). Effects of bleomycin on the cell cycle of Ehrlich ascites carcinoma. <u>Cancer Res.</u> <u>32</u>, 1966–1970.

NEWMAN R.A., HACKER M.P., SAKAI T.T. (1983). Fibrogenic structureactivity study of the bleomycin molecule. <u>Tox. Appl. Pharmacol.</u> <u>70</u>, 373-381.

NISHIMURA C., TANAKA N., SUZUKI H., TANAKA N. (1987). Purification of bleomycin hydrolase with monoclonal antibody and its characterization. Biochemistry 26, 1574–1578.

NOUEL J.P. (1972). Radioactive metal-bleomycin complex for the diagnostic of cancer. Gann. Monogr. Cancer Res. 19, 301-316.

OBERLEY L.W., BUETTNER G.R. (1979). The production of hydroxyl radical by bleomycin and iron(11). FEBS Lett. 97, 47-49.

OHNUMA T., HOLLAND J.F., MUSUDA H., WALIGUNDA J.A., GOLDBERG G.A. (1974). Microbiological assay of bleomycin : inactivation tissue distribution and clearance. Cancer 33, 1230-1238. ONISHI T., SHIMADA K., TAKAGI Y. (1973). Effects of bleomycin on E. Coli strains with various sensitivities to radiations. <u>Biochim.</u> Biophys. Acta 312, 248-258.

OPPENHEIMER N.J., RODRIGUEZ L.O., HECHT S.M. (1980). Metal binding to modified bleomycins. Zinc and Ferrous complexes with an acetylated bleomycin. <u>Biochemistry 19</u>, 4096-4103.

OPPENHEIMER N.J., CHANG C., CHANG L.H., EHRENFELD G., RODRIGUEZ L.O., HECHT S.M. (1982). Deglyco-bleomycin : degradation of DNA and formation of a structurally unique Fe(11)-CO complex. J. Biol. Chem. 257, 1606-1609.

OTSUKA M., MAKOTO Y., KOBAYASHI S., OHNO M. (1981). Transition-metal binding site of bleomycin. A synthetic analogue capable of binding Fe(II) to yield an oxygen-sensitive complex. J. Am. Chem. Soc. 103 6986-6988.

PEISACH J., BLUMBERG W.E. (1974). Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. <u>Arch. Biochem. Biophys.</u> <u>165</u>, 691-708.

PIETTE L.H., HSIA J.C. (1979). Spin-labeling in Biomedicine. In : Spin-labeling II. Theory and applications. Berliner L.J. Ed., pp. 247-290, Academic Press, New-York.

POVIRK L.F., WÜBKER W., KÖHNLEIN W., HUTCHINSON F. (1977). DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin. Nucleic Acids Res. 4, 3573-3580.

POVIRK L.F., HOGAN M., DATTAGUPTA N. (1979). Binding of bleomycin to DNA : intercalation of the bithiazole rings. <u>Biochemistry</u> 18, 96-101.

POVIRK L.F., HOGAN M., DATTAGUPTA N., BUECHNER M. (1981). Copper(II)-Bleomycin, Iron(III)-Bleomycin and Copper(II)-Phleomycin : comparative study of deoxyribonucleic acid binding. Biochemistry 20, 665-670.

RAISFELD I.H. (1981). Role of terminal substituents in the pulmonary toxicity of bleomycins. Tox. Appl. Pharmacol. 57, 355-366.

REINERT K.E. (1978). Interaction of the oligopeptides with distamycin A and actinomycin D : viscosimetric criteria for binding and bending. Studia Biophys. 67, 49-50.

REVET B.M.J., SCHMIR M., VINOGRAD J. (1971). Direct determination of the superhelix density of closed circular DNA by viscometric titration. Nature New Biology 229, 10-13.

RICHARDSON C.L., SCHULMAN G.E. (1981). Competitive binding studies of compounds that interact with DNA utilizing fluorescence polarisation. Biochim. Biophys. Acta 652, 55-63.

RODRIGUEZ L.O., HECHT S.M. (1982). Iron(11)-bleomycin. Biochemical and spectral properties in the presence of radical scavengers. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, 1470-1476.

SAITO M., ANDOH T. (1973). Breakage of a DNA-protein complex induced by bleomycin and their repair in cultured mouse fibroblasts. Cancer Res. 33, 1696-1700.

SAITO S., UMEZAWA Y., YOSHIOKA T., MURAOKA Y., TAKITA T., UMEZAWA H. (1982). An improved total synthesis of bleomycin. In : <u>Peptide Chemistry</u>, 1982, Sakakibara S. ed., pp 133-138. Protein Research Foundation, Osaka.

SAKAI T.T., RIORDAN J.M., KUMAR N.G., HABERLE F.J., ELGAVISH G.A., GLICKSON J.D., LEVY A. (1983). Studies on bleomycin-DNA and bleomycin-Iron interactions. <u>J. Biomolec. Struct.</u> <u>Dyn. 1</u>, 809-827.

SAUCIER J.M., FESTY B., LE PECQ J.B. (1971). The change of the torsion of the DNA helix caused by intercalation. <u>Biochimie</u> 53, 973-980.

SAUSVILLE E.A., PEISACH J., HORWITZ S.B. (1976). A role for ferrous ion and oxygen in the degradation of DNA by bleomycin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 814-822.

SAUSVILLE E.A., PEISACH J., HORWITZ S.B. (1978a). Effect of chelating agents and metal ions on the degradation of DNA by bleomycin. Biochemistry 17, 2740-2746.

SAUSVILLE E.A., STEIN R.W., PEISACH J., HORWITZ S.B. (1978b). Properties and products of the degradation of DNA by bleomycin and Iron(II). <u>Biochemistry</u> 17, 2746-2754.

SCHEULEN M.E., KAPPUS H. (1984). The activation of oxygen by bleomycin is catalyzed by NADPH-Cyt P450 reductase, in the presence of iron ions and NADPH. In : <u>Oxygen Radicals in Chemistry and</u> <u>Biology</u>, Bors W., Saran M., Tait D. eds, Walter de Gruyter and Co. Berlin, N.Y.

SCHLAFER H.L., GLIEMANN G. (1969). In "Basic Principles of ligand field theory", pp. 1-117, Wiley, London.

SCHRIER D.J., KUNKEL R.G., PHAN S.H. (1983). The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. <u>Am. Rev.</u> Respir. Dis. 127, 63-66.

SEBTI S.M., LAZO J.S. (1987). Separation of the protective enzyme bleomycin hydrolase from rabbit pulmonary aminopeptidases. <u>Biochemistry 26</u>, 432-437.

SHAANAN B. (1982). The iron-oxygen bond in human oxyhaemoglobin. <u>Nature 296</u>, 683-684.

SHEARDY R.D., GABBAY E.J. (1983). Stereospecific binding of diastereomeric peptides to salmon sperm deoxyribonucleic acid. Further evidence for partial intercalation. Biochemistry 22, 2061–2067.

SHERIDAN R.P., GUPTA R.K. (1981). A ¹H nuclear relaxation study of the Mn²⁺ bleomycin complex. <u>J. Biol. Chem.</u> <u>256</u>, 1242-1247.

SIKIC B.I., YOUNG D.M., MIMNAUGH E.G., GRAM T.E. (1978a). Quantification of bleomycin pulmonary toxicity in mice by changes in lung hydroxyproline content and morphometric histopathology. <u>Cancer</u> Res. 38, 787-792.

SIKIC B.I., COLLINS J.M., MIMNAUGH E.G., GRAM T.E. (1978b). Improved therapeutic index of bleomycin when administered by continuous infusion in mice. Cancer Treat. Rep. 62, 2011–2017. SIKIC B.I., SIDDIK Z.H., GRAM T.E. (1980). Relative pulmonary toxicity and antitumor effects of 2 new bleomycins analogs. Pepleomycin and tallysomycin A. Cancer Treat. Rep. 64, 659-668.

SIKIC B.I., ROZENCWEIG M., CARTER S.K. (1985). In : <u>Bleomycin</u> <u>Chemotherapy</u>, (SIKIC B.I., ROZENCWEIG M., CARTER S.K. eds) Academic Press, Inc, New York.

SNIDER G.L., HAYES J.A., KORTHY A.L. (1978). Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in Hamsters by endotracheal bleomycin. Am. Rev. Respir. Dis. 117, 1099–1108.

STARCHER B.C., KUHN C., OVERTON J.E. (1978). Increased elastin and collagen content in the lungs of Hamsters receiving an intratracheal injection of bleomycin. <u>Am. Rev. Respir. Dis</u>. <u>117</u>, 299-305.

STERN R., ROSE J.A., FRIEDMAN R.M. (1974). Phleomycin-induced cleavage of deoxyribonucleic acid. Biochemistry 13, 307-312.

STRONG J.E., BROUGHTON A., CROOKE S.T. (1977). Specificity of antiserum produced against bleomycin. <u>Cancer Treat. Rep. 61</u>, 1509–1512.

STRONG J.E., CROOKE S.T. (1978). DNA breakage by tallysomycin. Cancer Res. 38, 3322-3326.

SUGIURA Y., KIKUCHI T. (1978). Formation of superoxide and hydroxy radicals in iron(11)-bleomycin-oxygen system : electron spin resonance detection by spin trapping. J. Antibiot. 31, 1310-1312.

SUGIURA Y., MURAOKA Y., FUJII A., TAKITA T., UMEZAWA H. (1979). Chemistry of bleomycin. XXIV. Deamido bleomycin from viewpoint of metal coordination and oxygen activation. <u>J. Antibiot.</u> 32, 756-758.

SUGIURA Y. (1979). Comparison of metal complexes between depyruvamide bleomycin and bleomycin : an important effect of axial donor on metal coordination and oxygen activation. <u>Biochem. Biophys.</u> Res. Commun. 88, 913-918.

SUGIURA Y. (1980). Bleomycin-Iron complexes. Electron spin resonance study, ligand effect, and implication for action mechanism. J. Am. Chem. Soc. 102, 5208-5215.

SUGIURA Y., SUZUKI T., KAWABE H., TANAKA H., WATANABE K. (1982). Spectroscopic studies on bleomycin-Iron complexes with carbon monoxide, nitric oxide, isocyanide, azide and cyanide and comparison with iron-phorphyrin complexes. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> 716, 38-44.

SUGIURA Y., SUZUKI T., OTSUKA M., KOBAYASHI S., OHNO M., TAKITA T., UMEZAWA H. (1983). Synthetic analogues and biosynthetic intermediates of bleomycin. <u>J. Biol. Chem.</u> <u>258</u>, 1328-1336.

SUZUKI H., NAGAI K., YAMAKI H., TANAKA N., UMEZAWA H. (1968). Mechanism of action of bleomycin. Studies with growing cultures of bacterial and tumor cells. J. Antibiot. 21, 379-386. SZAPIEL S.V., ELSON N.A., FULMER J.D., HUNNINGHAKE G.W., CRYSTAL R.G. (1979). Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse. <u>Am. Rev. Respir. Dis.</u> <u>120</u>, 893-899.

TAKAHASHI K., EKIMOTO H., AOYAGI S., KOYU A., KURAMOCHI H., YOSHIOKA O., MATSUDA A., FUJII A., UMEZAWA H. (1979). Biological studies on the degradation products of 3-((S)-1'-phenylethylamino propylamino) bleomycin : a novel analog (pepleomycin). J. Antibiot. 32, 36-42.

TAKESHITA M., HORWITZ S.B., GROLLMAN A.P. (1974). Bleomycin, an inhibitor of vaccinia virus replication. Virology 60, 455-465.

TAKESHITA M., GROLLMAN A.P., OHTSUBO E., OHTSUBO H. (1978). Interaction of bleomycin with DNA. <u>Proc. Natl. Acad. Sci.</u> <u>75</u>, 5983–5987.

TAKITA T., MAEDA K., UMEZAWA H., OMOTO S., UMEZAWA S. (1969) Chemistry of bleomycin. III. The sugar moieties of bleomycin A_2 . J. Antibiot. 22, 237-239.

TAKITA T., MURAOKA Y., YOSHIOKA T., FUJII A., MAEDA K., UMEZAWA H. (1972). The chemistry of bleomycin. IX. The structures of bleomycin and phleomycin. J. Antibiot. 25, 755-758.

TAKITA T., FUJII A., FUKUOKA T., UMEZAWA H. (1973). Chemical cleavage of bleomycin to bleomycinic acid and synthesis of new bleomycins. J. Antibiot. 26, 252-254.

TAKITA T., MURAOKA Y., NAKATANI T., FUJII A., UMEZAWA Y., NAGANAWA H., UMEZAWA H. (1978).Chemistry of bleomycin XIX. Revised structures of bleomycin and phleomycin. <u>J. Antibiot</u>. <u>31</u>, 801-804.

TAKITA T., UMEZAWA Y., SAITO S., MORISHIMA H., UMEZAWA H., MURAOKA Y., SUZUKI M., OTSUKA M., KOBAYASHI S., OHNO M., TSUCHIYA T., MIYAKE T., UMEZAWA S. (1981). Total synthesis of bleomycin. In : <u>Peptides : Synthesis, structure, function</u>, Rich D.H. et Gross E. eds., pp. 29-39, Pierce Chemical Company, Illinois.

TOLEDO C.H., ROSS W.E., HOOD C.I., BLOCK E.R. (1982). Potentiation of bleomycin toxicity by oxygen. <u>Cancer Treat. Rep.</u> <u>66</u>, 359-362.

TWENTYMAN P.R. (1984). Bleomycin-mode of action with particular reference to the cell cycle. Pharmacol. Ther. 23, 417-441.

UMEZAWA H., MAEDA K., TAKEUCHI T., OKAMI Y. (1966). New antibiotics, bleomycin A and B. J. Antibiot. 19, 200-209.

UMEZAWA H., ISHIZUKA M., KIMURA K., IWANAGA J., TAKEUCHI T. (1968). Biological studies on individual bleomycins. <u>J. Antibiot.</u> 21, 592-602.

UMEZAWA H., TAKEUCHI T., HORI S., SAWA T., ISHIZUKA M., ICHIKAWA T., KOMAI T. (1972). Studies on the mechanism of antitumor effect of bleomycin on squamous cell carcinoma. <u>J. Antibiot.</u> 25, 405-420. UMEZAWA H. (1973). Studies on bleomycin : chemistry and the biological action. Biomedicine 18, 459-475.

UMEZAWA H., ASAKURA H., ODA K., HORI S. (1973a). Effect of bleomycin on SV40 DNA characteristics of bleomycin action which produces a single scission in superhelical form of SV40 DNA. <u>J.</u> Antibiot. 26, 521–527.

UMEZAWA H., TAKAHASHI Y., FUJII A., SAINO T., SHIRAI T., TAKITA T. (1973b). Preparation of bleomycinic acid : hydrolysis of bleomycin B_2 by a fusarium acylagmatine amino hydrolase. <u>J.</u> Antibiot. 26, 117-119.

UMEZAWA H. (1974). Chemistry and mechanism of action of bleomycin. Fed. Proc. 33, 2296-2302.

UMEZAWA H., HORI S., SAWA T., YOSHIOKA T., TAKEUCHI T. (1974). A bleomycin-inactivating enzyme in mouse liver. J. Antibiot. 27, 419-424.

UMEZAWA H. (1979). Advances in bleomycin studies. In : <u>Bleomycin</u>, <u>chemical</u>, <u>biochemical</u> and <u>biological</u> aspects, Hecht S.M. ed, pp. 24-36, Springer-Verlag. N.Y.

VASKA L. (1976). Dioxygen-metal complexes : toward a unified view. Acc. Chem. Res. 9, 175-183.

WAKELIN L.P.G., WARING M.J. (1976). The binding of echinomycin to DNA. Biochem. J. 157, 721-740.

WANG J.C. (1974). The degree of unwinding of the DNA helix by ethidium. J. Mol. Biol. 89, 783-801.

WATANABE M., TAKABE Y., KATSUMATA T., TERASIMA T. (1974). Effects of bleomycin on progression through the cell cycle of mouse L-cells. Cancer Res. 34, 878-881.

WEIGELE M., DE BERNARDO S.L., TENGI J.P., LEIMBRUGER W. (1972). A novel reagent for the fluorometric assay of primary amines. J. Am. Chem. Soc. 94, 5927-5928.

WELBORN C.H., DOLPHIN D., JAMES B.R. (1981). One-electron electrochemical reduction of a ferrous prophyrin dioxygen complex. J. Am. Chem. Soc. 103, 2869-2871.

WESSELIUS L.J., CATANZARO A., WASSERMAN S.I. (1984). Neutrophil chemotactic activity generation by alveolar macrophages after bleomycin injury. Am. Rev. Respir. Dis. 129, 485-490.

WHITE D.A., STOVER D.E. (1984). Severe bleomycin-induced pneumonitis : clinical features and response to corticosteroids. <u>Chest</u> 86, 723-728.

WHITE R.E., COON M.J. (1980). Oxygen activation by cytochrome P-450. Ann. Rev. Biochem. 49, 315-356.

WILSON W.D., JONES R.L. (1982). Superhelical DNA : the intercalation unwinding angle. In : Intercalation Chemistry, Whittingham M.S., Jacobson A.J. eds, pp.452-458, Academic Press, New-York.
WINTERBAUER R.H., HANIMAR S.P., HALLMAN K.O., HAYS J.E., PARDEE N.E., MORGAN E.H., ALLEN J.D., MOORES K.D., BUSH W., WALKER J.H. (1978). Diffuse interstitial pneumonitis. Clinicopathologic correlations in 20 patients treated with prednisone/ azathioprine. Am. J. Med. 65, 661-665.

WOOD P.M. (1974). The redox potential of the system oxygen-superoxide. FEBS Lett. 44, 22-24.

WU J.C., KOZARICH J.W., STUBBE J. (1983). The mechanism of free base formation from DNA by bleomycin. <u>J. Biol. Chem.</u> <u>258</u>, 4694-4697.

YAMAKI H., SUZUKI H., NAGAI K., TANAKA N., UMEZAWA H. (1971). Effect of bleomycin A₂ on deoxyribonucleases, DNA polymerase and ligase reaction. J. Antibiot. <u>24</u>, 178–184.

ZIMMER Ch., LUCK G., THRUM H., PITRA C. (1972). Binding of analogues of the antibiotics distamycin A and netropsin to native DNA. Eur. J. Biochem. 26, 81-89.

TABLE DES MATIERES

* *

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	
INTRODUCTION	1
GENERALITES	6
Introduction	1
Activité biologique	10
Pharmacologie clinique	11
Effets secondaires : fibrose pulmonaire	14
Structure	19
Mécanisme d'action	23
CHAPITRE I : LIAISON & L'ADN	27
Introduction	28
Résultats et discussion	35
CHAPITRE II : COMPLEXATION DES METAUX	42
Introduction	43
Résultats et discussion	49
CHAPITRE III : MODELE "COMPLET" : AMBI-A,	57
Introduction	58
Résultats et discussion	60
CHAPITRE IV : ROLE DE LA FRACTION GLYCANNIQUE	69
Introduction	70
Solvolyse et vérification de la structure	72
Etude physico-chimique et biochimique	82
CHAPITRE V : VERS LA CONCEPTION D'UN MODELE IDEAL ?	103
Introduction	104
Résultats et discussion	108
CONCLUSION	113

APPENDICE TECHNIQUE	118
Synthèse chimique	120
Synthèse d'AMBI-A ₂	120
Synthèse d'AMBIGLU	123
Solvolyse par HF	126
Méthodes analytiques	126
Dénaturation thermique	126
Fluorescence	127
Polarisation de fluorescence	127
Résonance paramagnétique électronique (RPE)	127
Dichroïsme circulaire	129
Viscosimétrie	129
Coupure d'ADN	133
Chromatographie Liquide à haute performance (CLHP)	134
Résonance magnétique nucléaire (RMN)	138
Spectrométrie de masse	138
Analyse d'acides aminés	139
. Composition chimique en sucres	139
REFERENCES BIBITOGRAPHIOUES	141

•

.



LISTE DES FIGURES

- Fig. 1 Structure de l'acide bléomycinique (A), de la BLM-A₂ (B), de la BLM-B₁ (C) et de la BLM-B₂ (D)
- Fig. 2 Action de la BLM-hydrolase
- Fig. 3 Partie pseudo peptidique
- Fig. 4 Partie bithiazolique
- Fig. 5 Fraction osidique
- Fig. 6 Amines terminales correspondant à $BLM-A'_2-a(A)$, BLM-A₅(B), BLM-A₆(C) et à la Pépléomycine (D)
- Fig. 7 Mécanisme de dégradation du désoxyribose par la BLM
- Fig. 8 Tripeptide "S"
- Fig. 9 Modèle de liaison de la BLM à l'ADN selon Takeshita
- Fig. 10 Dérivés bithiazoliques
- Fig. 11 Analogues bithiazoliques marqueurs de spin
- Fig. 12 Analogues bithiazoliques marqueurs de fluorescence
- Fig. 13 Fluorescence émise par la BLM (A) et les dérivés $\underline{1}$ (B) et $\underline{2}$ (C) en présence de quantités croissantes d'ADN
- Fig. 14 Spectre de RPE des nitroxydes 6, 7, 9 (A) et 8 (B)
- Fig. 15 Modèle de recouvrement des plans de base de l'ADN par le bithiazole

Fig. 16 - Mode d'insertion du bithiazole dans un "kink" de l'ADN

Fig. 17 - Schéma de synthèse d'AMPHIS

- Fig. 18 Spectres de RPE des complexes cuivriques de BLM (A) et AMPHIS (B)
- Fig. 19 Géométrie des complexes BLM-Cu(II) et AMPHIS-Cu(II)
- Fig. 20 Spectre d'absorption de BLM (A) et BLM-Fe(III) (B)

Fig. 21 - Spectres de RPE des spins adduits de BPN-OH·(A), BPN-0°(B) et DPMO-OH·(C)

Fig. 22 - Schéma de synthèse d'AMBI-A,

- Fig. 23 Spectre dichroique du complexe AMBI-A₂-Cu(II)
- Fig. 24 Spectre de RPE du spin adduit BPN-OH $^{\circ}$ en présence de BLM (A) et AMBI-A $_{2}$ (B)
- Fig. 25 Autoradiographie après électrophorèse en gel de polyacrylamide

Fig. 26 - Electrophorèse en gel d'agarose (0.8 %)

- Fig. 27 Déglyco-BLM-A,
- Fig. 28 Chromatogramme d'analyse d'acides aminés de BLM-A₂ ou de déglyco-BLM-A₂

Fig. 29 - Spectre de RMN-¹H de BLM- A_2 (A) et déglyco-BLM- A_2 (B)

Fig. 30 - Spectres de RMN - ${}^{13}C$ de BLM-A₂ (A) et déglyco-BLM-A₂ (B)

Fig. 31 - Chromatogrammes CLHP de BLM-A, (A) et déglyco-BLM-A, (B)

Fig. 32 - Spectres de masse FAB de BLM-A₂ (A) et déglyco-BLM-A₂ (B)

- Fig. 33 Spectre de RPE du complexe déglyco-BLM-A₂-Cu(II)
- Fig. 34 Spectre dichroïque de déglyco-BLM-A₂-cu(II)

Fig. 35 - Spectre de RPE de $BLM-A_{g}-Fe(III)-O_{g}$

- Fig. 36 Spectre de RPE de BLM-A₂-Fe(III)-Bas spin
- Fig. 37 Spectre de RPE de BLM-A₀-Fe(III)-Haut spin
- Fig. 38 Spectre dichroïque du complexe déglyco-BLM-A₂-Fe(III)
- Fig. 39 Spectres de RPE des spin-adduits de BPN-OH[•] produits par BLM-A₂(A) et déglyco-BLM-A₂(B)
- Fig. 40 Electrophorèse en gel d'agarose (0.8 %)
- Fig. 41 Intervention de la fraction glycannique dans l'activation de la BLM
- Fig. 42 Complexe BLM-A₂-Fe(III)-O₂ sous forme superoxo (A) et peroxo (B)
- Fig. 43 Structure de AMBIGLU
- Fig. 44 Schéma de syntèse d'AMBIGLU
- Fig. 45 Electrophorèse en gel d'agarose (0.8 %)
- Fig. 46 Complexes binaires AMBIGLU-ADN (A) et BLM-ADN (B) (Structures proposées)



RESUME

La Bléomycine, antibiotique antitumoral actuellement utilisé en clinique pour le traitement d'un certain nombre de carcinomes, possède une structure de nature glycopeptidique présentant trois parties essentielles. Le rôle particulier de chacune de ces parties complémentaires pour l'activité biologique a été mis en évidence.

Pour la partie complexante, la nature des ligands du cuivre et du fer a pu être déterminée grâce à l'élaboration d'un modèle simplifié AMPHIS. Au cours de la même étude, les conditions optimales de production de radicaux libres, responsables de la coupure d'ADN, ont été définies.

La synthèse d'un certain nombre de dérivés du bithiazole a permis de montrer que la Bléomycine se liait à l'ADN par un processus différent de l'intercalation. Mais c'est l'élaboration d'un modèle AMBI-A₂ comportant à la fois la fraction AMPHIS et l'hétérocycle bithiazole qui a permis d'établir – résultat capital – que les deux fractions devaient être portées sur la même structure et séparées par un bras espaceur court pour que la molécule soit biologiquement active.

Le rôle de la partie glycannique enfin a été clairement défini pour la stabilisation du complexe et son activation. Un modèle prenant en compte toutes ces observations, AMBIGLU, a été synthétisé et devrait être le point de départ d'une nouvelle famille de composés simples répondant au concept intercalant – peptide chélateur dans l'espoir de mettre à jour des molécules actives contre le cancer.

MOTS-CLES :

BLEOMYCINE (BLM) LIAISON A L'ADN PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES VISCOSIMETRIE MODELISATION COMPLEXATION (Cu, Fe) COUPURE D'ADN (ELECTROPHORESE) ETUDES SPECTROSCOPIQUES