

50376
1991
238

65461

50376
1991
238

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

Année 1991

N° d'ordre : 792

THESE de DOCTORAT D'UNIVERSITE
(nouveau régime)

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

DOCTEUR en CHIMIE

par

Bertrand PLOUVIER

**ANALOGUES THIAZOLIQUES DE LA
NETROPSINE. INTERACTION AVEC L'ADN ET
POUVOIR CYTOTOXIQUE**



présentée le 18 octobre 1991 devant la commission d'examen

JURY

Président : Pr. Jean LHOMME
Rapporteurs : Dr. Emile BISAGNI
Pr. Jean-Pierre CATTEAU
Membres : Pr. Daniel LESIEUR
Dr. Jean-Pierre HENICHART
Dr. Raymond HOUSSIN

Ce travail a été effectué sous la direction scientifique de Monsieur Jean-Pierre HENICHART, Directeur de Recherche à l'INSERM. Je tiens à lui adresser le témoignage de ma reconnaissance pour cette étude qu'il m'a confiée et pour son soutien amical.

Monsieur le Professeur Jean LHOMME me fait l'honneur de présider ce Jury. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma gratitude.

Monsieur Emile BISAGNI, Directeur de Recherche au CNRS et Monsieur Jean-Pierre CATTEAU, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille ont bien voulu juger ce travail et en être les rapporteurs. Je les en remercie très sincèrement.

Monsieur Daniel LESIEUR, Professeur à l'Université du Droit et de la Santé de Lille, me fait l'honneur de siéger à ce Jury. Je tiens à lui exprimer mes remerciements pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de l'Institut de Chimie Pharmaceutique de Lille qu'il dirige.

Je ne saurais trop faire part de ma gratitude à Monsieur Raymond HOUSSIN, pour sa disponibilité permanente et les conseils qu'il m'a prodigués. Je suis très touché par sa présence à ce Jury.

Je voudrais aussi témoigner mon amitié et toute ma reconnaissance à Christian BAILLY et Nicole HELBECQUE qui m'ont apporté aide et conseils.

J'associe également à ce travail tous mes camarades de laboratoire et toutes les personnes qui m'ont accordé leur aide et leur collaboration efficaces.

A mes parents, à ma famille, à tous mes amis

ABREVIATIONS

| | |
|----------------|--|
| ADN : | acide désoxyribonucléique |
| Nt : | nétropsine |
| Dst : | distamycine-A |
| Thia-Nt : | [2-(2'-(4-aminobutyrylamino)-thiazole-4'-carboxamido)-thiazole-4-carboxamido]propylamine, dibromhydrate |
| Methia-Nt : | [2-(2'-(4-aminobutyrylamino)-5'-méthyl-thiazole-4'-carboxamido)-5-méthyl-thiazole-4-carboxamido]propylamine, dibromhydrate |
| Isothia-Nt : | [2-(2'-(4-aminobutyrylamino)-thiazole-4'-carboxamido)-thiazole-5-carboxamido]propylamine, dibromhydrate |
| Pseudo-Nt : | [4-(4'-(4-aminobutyrylamino)-1'-méthyl-pyrrole-2'-carboxamido)-1-méthyl-pyrrole-2-carboxamido]propylamine, dibromhydrate |
| Blm : | bléomycine |
| PETT : | 2-phényl-6-[2'-(4'-(éthoxycarbonyl)thiazolyl)]thiazolo[3,2-b][1,2,4] triazole |
| PETTthia-Nt : | 2-phényl-6-[2'-[4'-[[4-(4'-(éthoxycarbonyl)thiazole-2'-aminocarbonyl)thiazole-2-amino]carbonylpropylaminocarbonyl]thiazolyl]]thiazolo [3,2-b][1,2,4]triazole |
| GA : | 4-(acridinyl-9-amino)-N-glycylaniline |
| Thia-NtGA : | 4-(acridinyl-9-amino)-N-[2-(2'-(4-aminobutyrylamino)-thiazole-4'-carboxamido)-thiazole-4-carbonyl]glycylaniline, dibromhydrate |
| SL-Thia-NtGA : | 4-(acridinyl-9-amino)-N-[2-[2'-(4-(3-(2,2',5,5'-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxamido)butyrylamino)-thiazole-4'-carboxamido)-thiazole-4-carbonyl]glycylalanine |

| | |
|-----------------------|---|
| m-AMSA : | amsacrine ou 3-méthoxy-4-(acridinyl-9-amino)-N-méthanesulfonamide |
| AMSA-C ₃ : | 3-méthoxy-4-[4-(3-aminopropylaminocarbonyl)acridinyl-9-amino]-N-méthanesulfonamide |
| Thia-NtAMSA : | 3-méthoxy-4-[4-[[2-(2'-(4-aminobutyrylamino)-thiazole-4'-carboxamido)-thiazole-4-carbonyl]aminopropylaminocarbonyl]acridinyl-9-amino]-N-méthanesulfonamide, dibromhydrate |
| RMN : | Résonance Magnétique Nucléaire |
| RPE : | Résonance Paramagnétique Electronique |
| BET : | Bromure d'éthidium |
| DAPI : | 4', 6-diamidino-2-phénylindole |

INTRODUCTION

La recherche sur le cancer mobilise actuellement de nombreux laboratoires à travers le monde. Elle constitue un enjeu considérable à l'échelle internationale, tant pour l'industrie pharmaceutique que pour la recherche fondamentale étant donné la très grande diversité des cancers.

En effet, le terme de cancer ne désigne ni une maladie ni un état. Seule est possible une définition analytique : c'est la prolifération d'une famille de cellules transformées ayant perdu entre autres la propriété d'inhibition de contact; elles forment alors un amas cellulaire : la tumeur grossit puis envahit les tissus voisins. Le cancer est alors dit invasif et il affecte les ganglions lymphatiques; des cellules se détachent, passent dans la circulation sanguine et lymphatique et vont se fixer sur d'autres tissus, c'est le stade des métastases; toute une phase du processus de tumorigénèse - dite phase occulte par opposition à la phase clinique - s'est déjà déroulée et conditionne très souvent le pronostic. Si jusqu'à présent il n'existe pas de traitement définitivement adapté à toutes les formes de cancer, on utilise en clinique des combinaisons de moyens en relation avec la chirurgie, la radiothérapie, l'immunothérapie et la chimiothérapie, cette dernière technique s'imposant dans le cas de cellules cancéreuses disséminées (leucémies, lymphomes).

La phase initiale de l'induction du cancer résulte de l'activation par des agents chimiques, physiques, viraux ou inflammatoires de protooncogènes en oncogènes qui, s'ils sont exprimés, conduiront à l'apparition de protéines anormales et à une prolifération anarchique. On voit donc que l'ADN constitue la cible principale des agents utilisés en chimiothérapie. Ainsi, depuis plus d'une décennie, la conception de molécules qui se lient à l'ADN sélectivement sur des séquences clés du complexe d'initiation de la transcription (TATA box par ex.) constitue un moyen de réprimer ces oncogènes : c'est le but poursuivi par de nombreuses équipes de recherche s'investissant dans la reconnaissance moléculaire.

L'ADN double brin dans sa forme B (Figure 1) comporte trois surfaces de reconnaissance : la chaîne des phosphates, le grand sillon et le petit sillon, et chacune

de ces surfaces est mise en oeuvre par la nature dans le processus de reconnaissance de l'ADN par les protéines (Ollis et White, 1987; Schleif, 1988; Travers, 1989).

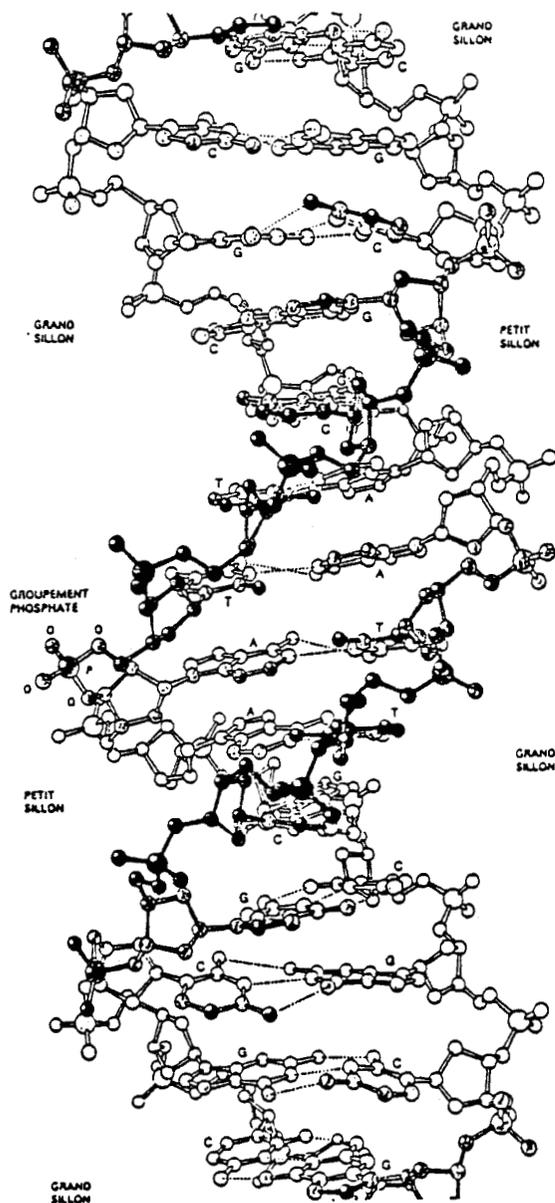


Figure 1 : ADN double brin dans sa forme B

En effet, la reconnaissance et la liaison spécifique à des séquences d'acides nucléiques par certaines protéines sont les éléments clés de la régulation de l'expression génétique. Les promoteurs et les répresseurs sont des protéines qui se lient en raison de leur taille à des séquences spécifiques en utilisant le grand sillon de la double hélice d'ADN. C'est à ce niveau que les paires de bases exposent un grand

nombre de groupes donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène, éléments majeurs de reconnaissance lors d'interactions protéines-ADN.

De même, un certain nombre de xénobiotiques de nature peptidique, d'antibiotiques, d'antitumoraux et d'antiviraux, interfèrent avec la réplication et la transcription en se liant également à des séquences nucléiques spécifiques mais, cette fois, dans le petit sillon de l'ADN en raison de leur faible taille et de leur propension à établir des liaisons salines avec les phosphates et des contacts de Van der Waals avec les bases de l'ADN.

Ainsi, la nétropsine et la distamycine doivent leur activité biologique à ce type de liaison. Ces deux molécules naturelles présentent une spécificité de séquence remarquable et dans le but d'approfondir les connaissances concernant l'interaction de telles molécules avec l'ADN, nous avons élaboré des analogues synthétiques sur le modèle de la nétropsine. L'étude de la liaison à l'ADN, élucidée au moyen de techniques physicochimiques et de "biologie moléculaire", de chacun de ces analogues synthétiques a permis de mettre en évidence une molécule à la spécificité différente de celle de la nétropsine. Cependant, si une telle molécule est capable de reconnaître une séquence oligonucléotidique donnée, encore faut-il qu'elle puisse atteindre sa cible : l'ADN. Pour ce faire, nous avons greffé au ligand du petit sillon sélectionné, différents chromophores dans le but, d'une part, d'augmenter l'affinité vis-à-vis de l'ADN et, d'autre part, de faciliter l'accès au noyau de la cellule.

L'interaction avec l'ADN de telles molécules hybrides a été étudiée en physicochimie et les activités biologiques *in vitro* et *in vivo* ont été l'objet de tests préliminaires pour l'une d'entre-elles.

**CHAPITRE I : LE CONCEPT LIGAND DU PETIT
SILLON**

I.1. LES ANTIBIOTIQUES DE TYPE PYRROLE-AMIDINE : NETROPSINE ET DISTAMYCINE.

Ce groupe d'antibiotiques interagissant avec l'ADN a pour chefs de file la nétropsine (Nt) et la distamycine-A (Dst) (Figure 2). La nétropsine a été isolée à partir de *Streptomyces netropsis* (Finlay *et al.*,1951) tandis que la distamycine-A est le produit essentiel de fermentation de *Streptomyces distallicus* (Arcamone *et al.*,1958). Ces deux antibiotiques de type pyrrole-amidine possèdent des activités antibactériennes et antivirales tout comme l'anthelvencine-A et la kikumycine.

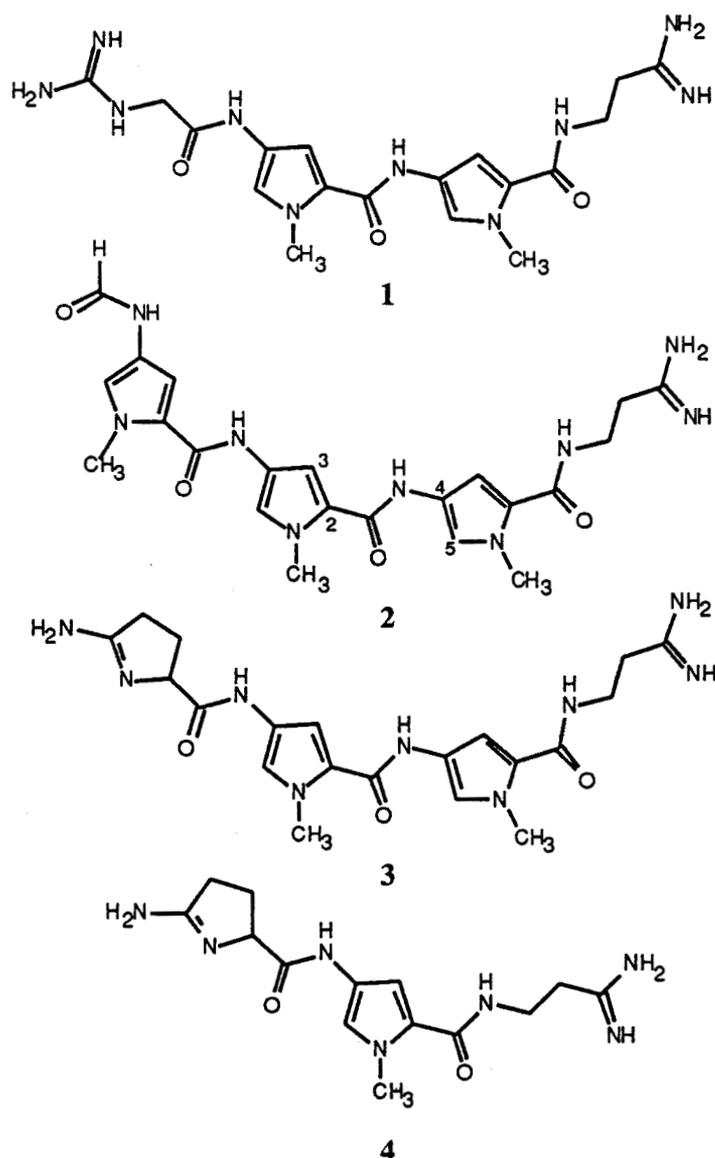


Figure 2 : Structures de la nétropsine (1), la distamycine-A (2), l'anthelvencine-A (3) et la kikumycine (4)

I.1.1. Structure et propriétés physiques :

La nétropsine présente la structure indiquée à la figure 2, définitivement confirmée par analyse chimique et synthèse totale (Nakamura *et al.*, 1964; Lown et Krowicki, 1985). La sinanomycine (Watanabe, 1956) et la congocidine (Cosar *et al.*, 1952) sont des molécules structurellement apparentées à la nétropsine puisque la seconde citée ne diffère de la Nt que par le remplacement du C=O par un C=NH au niveau du groupement acétamido en position N terminale (Julia et Préau-Joseph, 1963).

L'hydrolyse basique de la nétropsine conduit à la nétropsinine (Finlay *et al.*, 1951), dépourvue des chaînes latérales basiques.

La structure chimique de la distamycine-A a été établie par dégradation chimique (Arcamone *et al.*, 1964, 1967) puis par synthèse totale (Penco *et al.*, 1967; Grehn et Ragnarsson, 1981; Lown et Krowicki, 1985)

Du point de vue stéréochimique, une étude en RMN-¹H de la Dst (Turchin *et al.*, 1977) a permis de montrer que l'enchaînement N-méthylpyrrolocarboxamide possède une conformation trans pour les liaisons conjuguées C(3)=C(2)-C=O alors que l'ensemble CO-NH-C(4)=C(5) adopte une conformation cisoïde (voir figure 2). Il existe cependant quelques degrés de liberté rotationnelle au niveau des liaisons entre les noyaux N-méthylpyrrole qui favorisent la liaison de la molécule avec l'ADN.

Les données précises sur la géométrie de la Nt et de la Dst ont été obtenues quelque temps après par diffraction de RX (Berman *et al.*, 1979). Elles fournissent, ainsi que le dichroïsme linéaire (Forni *et al.*, 1989), d'intéressantes informations sur les facteurs nécessaires à la liaison de ces molécules à la double hélice d'ADN.

On constate en effet que les deux noyaux pyrrole de la Nt ne sont pas plans mais forment un angle dièdre de 20° (Berman *et al.*, 1979). La stéréochimie de la Nt imprime au squelette oligopeptidique une forme incurvée présentant une face concave avec les groupes amide liés à des molécules d'eau par des liaisons hydrogène et une face convexe constituée par les résidus carbonyle et méthyle (Figure 3). Cette disposition permet la formation de zones hydrophobes (groupes carbonyle et méthyle) et de zones hydrophiles (atomes d'azote des groupements amide) : une telle conformation courbe s'est avérée indispensable à la fixation de la molécule sur l'ADN (Manning et Woody, 1986).

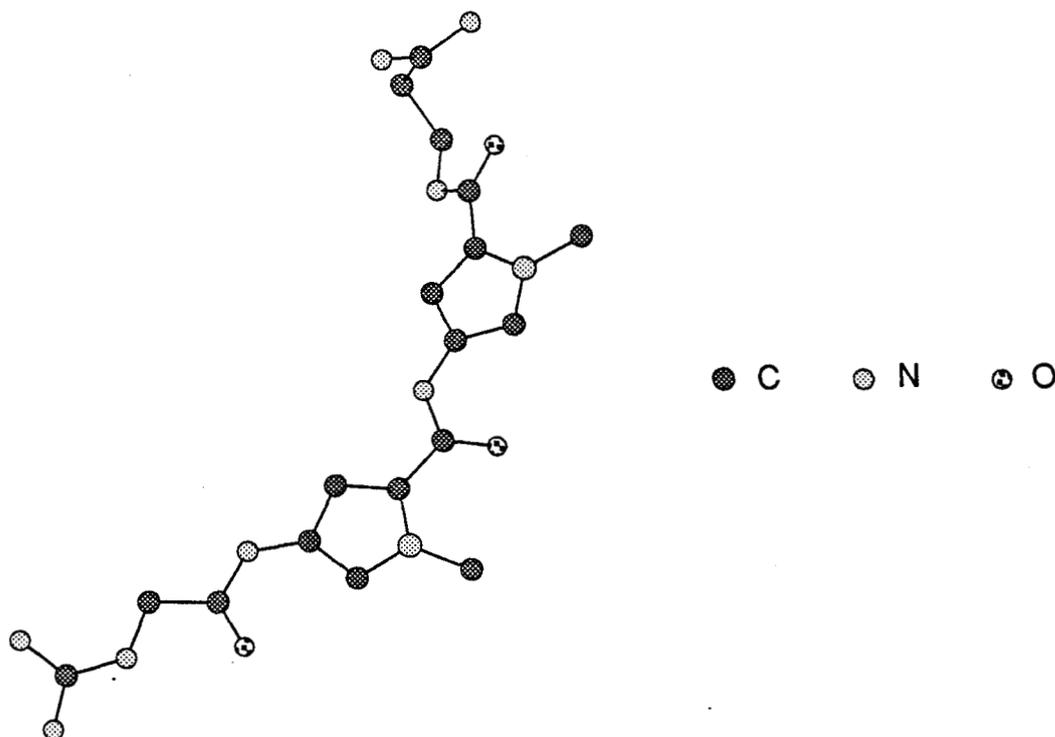


Figure 3 : Représentation spatiale de la Nt (CHEM 3D)

I.1.2. Interactions avec les acides nucléiques et les polynucléotides synthétiques :

La nétropsine et la distamycine se lient dans le petit sillon de l'ADN (Melnikova *et al.*, 1975) avec une préférence pour les régions riches en séquences Adénine-Thymine de l'ADN (Zimmer, 1975; Zimmer *et al.*, 1970, 1971, 1972; Chandra *et al.*, 1971; Luck *et al.*, 1974).

Il a été démontré par des mesures de viscosité que la Nt se lie préférentiellement sur les ADN riches en AT (Zimmer *et al.*, 1970).

L'affinité de la Dst pour les ADN riches en segments AT a également été mise en évidence lors d'une étude RMN où l'on observe un glissement vers les bas champs du massif de résonance des bases Adénine-Thymine à faible rapport Dst/paires de bases, tandis qu'un fort rapport ligand/paires de bases affecte également le massif de résonance des bases Guanine-Cytosine (Feigon *et al.*, 1984).

Il faut noter que l'interaction de la Dst avec les séquences nucléotidiques poly(dA).poly(dT) et poly(dA-dT).poly(dA-dT) se traduit par une réduction de la flexibilité conformationnelle du polymère (Grygon et Spiro, 1989).

Enfin il n'y a fixation ni sur un ADN simple brin, ni sur les ARN double brin (Zimmer et Luck, 1970).

L'étude par RMN de la liaison de la Nt et de la Dst au dodécamère autoccomplémentaire d(CGCGAATTCGCG) démontre que ces deux molécules se fixent spécifiquement au segment AATT du petit sillon du désoxyoligomère (Patel, 1982; Klevit *et al.*, 1986) (Figure 4).

De plus, une analyse radiocristallographique du complexe Nt avec le dodécamère d(CGCGAATT^{Br}CGCG)₂ a confirmé la localisation de la molécule de Nt au niveau de la séquence centrale AATT de ce miniduplex (Kopka *et al.*, 1985a,b).

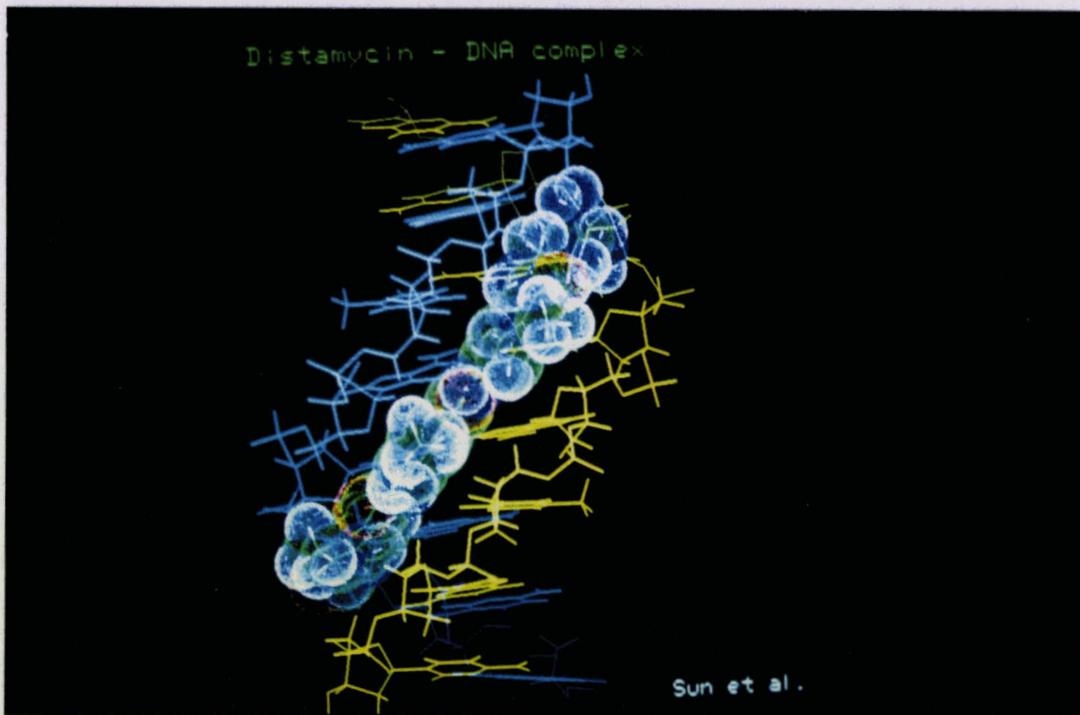


Figure 4 : Complexe Dst-ADN (J.S. Sun, Paris)

I.1.3. Spécificité de séquence et mode d'interaction :

La stabilisation du complexe Nt-ADN est assurée par des liaisons hydrogène formées entre les groupes NH des liaisons pseudopeptidiques de la molécule et les atomes O2 des résidus thymidine et N3 des résidus adénosine (Figure 5, Lown *et al.*, 1986a).

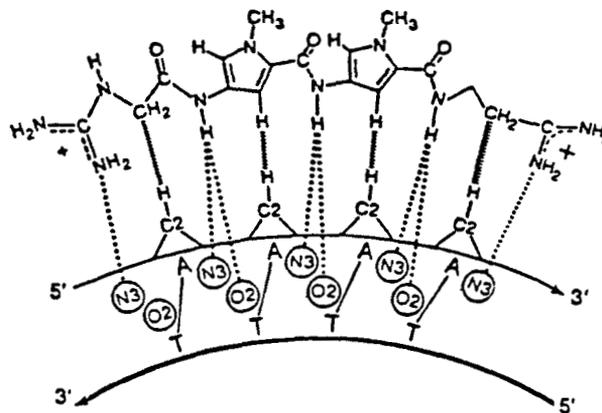


Figure 5 : Représentation des liaisons impliquées dans la reconnaissance moléculaire de la Nt vis-à-vis de la séquence 3'-AAAA-5'

(...) liaisons hydrogène
(|||||) contacts de Van der Waals

Il a été suggéré que la spécificité de liaison AT était principalement due à l'encombrement stérique du groupement amino en C2 d'une guanine qui empêche l'établissement de contacts avec l'hydrogène en C2 du pyrrole (Patel *et al.*, 1982; Kopka *et al.*, 1985a,b; Klevit *et al.*, 1986; Coll *et al.*, 1989). Cette explication a été remise en question par Dasgupta et son équipe (1990). Enfin, des études en IR à transformée de Fourier (Liquier *et al.*, 1989) et en RMN 2D (Pelton et Wemmer, 1988) du complexe Nt-polynucléotides révèlent une interaction de type stacking (empilement) entre les hétérocycles pyrrole et l'atome d'oxygène O'1 du désoxyribose de l'ADN.

Ces résultats confirment l'hypothèse d'une interaction de la Nt et de la Dst avec le petit sillon (Wartell *et al.*, 1974; Zimmer, 1975) : l'affinité de leur fixation à l'ADN n'est pas diminuée par la présence de résidus encombrants ou de substituants au niveau du grand sillon de l'ADN. D'autre part, des interactions de type

électrostatique entre les phosphates de l'ADN et les groupements amidine et guanidine chargés positivement de ces antibiotiques ont été mises en évidence (Zimmer *et al.*, 1972; Patel, 1979)

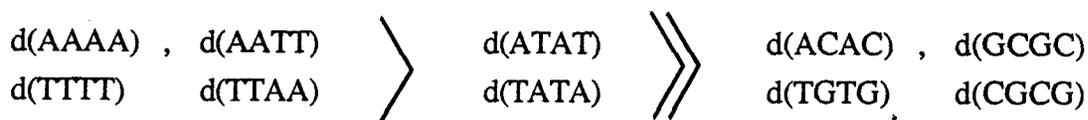
Enfin, des travaux en biologie moléculaire ont montré que des ligands intercalants ou non-intercalants se liant spécifiquement à l'ADN peuvent altérer la coupure de l'ADN par des agents de scission ou des enzymes telles la DNAase I et II (Portugal, 1989). Ainsi, la technique des empreintes (ou footprinting), dont on verra le principe plus loin, a été appliquée à la Nt (Portugal et Waring, 1987) et à la Dst (Fox et Waring, 1984; Taylor *et al.*, 1984; Churchill *et al.*, 1990) : ces antibiotiques protègent respectivement 4 et 5 paires de bases avec une spécificité pour les séquences dA-dT.

I.1.4. Constantes d'association et aspects thermodynamiques :

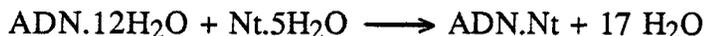
Les constantes d'association de la Nt et de la Dst dépendent fortement des conditions et des méthodes utilisées pour la mesure; les valeurs du K_a sont cependant plus élevées pour les séquences poly(dA).poly(dT) que pour les enchaînements poly(dA-dT).poly(dA-dT) (tableau 1).

| <u>Tableau 1 :</u> | ADN | K_a (M^{-1}) | Références |
|--------------------|-------------------------|--------------------|------------------------------|
| Nt | Thymus de veau | $2,9 \times 10^5$ | Luck <i>et al.</i> , 1974 |
| | Poly(dA).Poly(dT) | $4,9 \times 10^5$ | Wartell <i>et al.</i> , 1974 |
| | Poly(dA-dT).Poly(dA-dT) | $4,0 \times 10^5$ | Wartell <i>et al.</i> , 1974 |
| Dst | Thymus de veau | $1,2 \times 10^6$ | Luck <i>et al.</i> , 1974 |

Une nouvelle méthode de détermination des constantes d'équilibre par footprinting corrobore ces constantes d'affinité (Fish *et al.*, 1988). Leur sélectivité peut être schématisée de la manière suivante:



Il a été montré que la Nt se fixe sur l'ADN en conformation B en déplaçant le réseau de molécules d'eau stabilisant dans le petit sillon la séquence dA-dT selon le schéma réactionnel suivant (Kopka *et al.*, 1985a,b) :



Il en résulte que 17 molécules d'eau sont libérées par résidu nétrropsine lié, ce qui explique l'importante variation d'entropie ($\Delta S^\circ = +33,0 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$; Marky *et al.*, 1983 ; Marky et Breslauer, 1987).

I.1.5. Géométrie et dynamique :

La liaison de la Nt et de la Dst à la double hélice nécessite un ADN en conformation B (Zimmer, 1975). Il a été montré qu'à un taux relativement faible d'hydratation (23%), condition favorable à une forme A, la conformation B est stabilisée grâce à l'interaction avec la molécule de Nt ; on peut même préciser que 45 paires de bases sont maintenues en conformation B par 1 résidu Nt (Fritzsche *et al.*, 1984). La Nt induit une augmentation de la longueur apparente de la double hélice pour des courts segments d'ADN de thymus de veau (14Å/molécule de Nt liée), à faible force ionique (Hogan *et al.*, 1979a; Dattagupta *et al.*, 1980). L'interaction Nt-petit sillon de l'ADN a des effets sur l'ADN (élargissement du petit sillon de 0,5 à 2,0 Å) mais aussi sur la structure de la Nt (Kopka *et al.*, 1985a,b). En effet, l'angle entre les plans des deux noyaux pyrrole passe de 20° dans la Nt seule (Berman *et al.*, 1979) à 33° dans son complexe avec l'ADN (Kopka *et al.*, 1985a,b) : ce changement d'orientation des deux cycles plans résulte de rotations des liaisons C pyrrole -CO et C pyrrole-NH.

I.1.6. Activité biologique :

Ces deux antibiotiques de type pyrrole-amidine possèdent un large spectre d'activités antivirale, antibactérienne et antiprotozoaire . Ils exercent leurs actions biologiques par interférence avec la biosynthèse des acides nucléiques (Zimmer, 1975; Baguley, 1982). Cependant la toxicité de ces deux substances empêche leur utilisation en clinique , la Dst induisant notamment des altérations chromosomiques (Schmid *et al.*, 1980 ; Ochi *et al.*, 1988).

Il faut noter que la Nt pénètre dans la cellule, propriété mise en évidence par une étude en RPE (Bailly *et al.*, 1989a). La Nt et la Dst sont spécifiques du petit sillon alors que les protéines responsables de la biosynthèse des acides nucléiques se lient à

l'ADN au niveau du grand sillon (Takeda *et al.*, 1983 ; Ollis et White, 1987) . Ce sont donc les modifications de conformation spatiale de l'ADN induites par la fixation du non intercalant (Neidle *et al.*, 1987) qui perturbent les fonctions de régulation de la synthèse endocellulaire de l'ADN (Bruzik *et al.*, 1987; Woynarowski *et al.*, 1988 ; Käs *et al.*, 1989). Par contre, d'autres effets biologiques n'ont pas de relation avec l'affinité pour l'ADN; ainsi la Dst empêche la pénétration de constituants indispensables au métabolisme de *Bacillus subtilis* en se fixant sur la paroi au niveau de récepteurs spécifiques (Mazza *et al.*, 1973 ; Siccardi *et al.*, 1975).

La nétropsine est le prototype du non intercalant de la double hélice et l'identification des éléments de reconnaissance de l'ADN double brin par un tel ligand spécifique du petit sillon constitue une base essentielle pour l'élaboration d'analogues synthétiques directement apparentés au modèle naturel. Si les complexes formés par ces composés avec l'ADN représentent des sondes utiles pour l'étude de la structure de l'ADN dans les systèmes biochimiques complexes, ces petits ligands organiques spécifiques d'une séquence sont également de bons outils pour élucider les éléments essentiels nécessaires au processus de reconnaissance de l'ADN.

I.2. LES ANALOGUES STRICTS DE LA NETROPSINE.

Un grand nombre d'analogues de la nétropsine et de la distamycine-A ont été synthétisés dans le but d'étudier les effets de la structure sur l'activité biologique et de créer des ligands qui se fixent spécifiquement sur des séquences oligonucléotidiques déterminées. De tous ces travaux, on peut dégager cinq axes de pharmacomodulation :

I.2.1. Augmentation du nombre de résidus pyrrole-carboxamide :

En 1969, Arcamone et ses collaborateurs décrivent la synthèse de composés analogues de la distamycine-A où la chaîne de trois noyaux N-méthylpyrrole de l'antibiotique est remplacée par des chaînes de un, deux, quatre, cinq et six noyaux de même nature (Arcamone *et al.*, 1969a) (Figure 6a). L'augmentation du nombre de résidus N-méthylpyrrole carboxamide (n=1,2,4 &5) se traduit par une augmentation de l'affinité pour l'ADN (Zimmer *et al.*, 1972; Luck *et al.*, 1977). Pour le composé comprenant six résidus (n=6), il y a un déphasage entre les groupements accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène de l'ADN et du dérivé poly(N-méthylpyrrole) qui se traduit par une perte de l'affinité (Lown, 1990).

I.2.2. Augmentation du degré de liberté entre les noyaux pyrrole :

Le rôle du système conjugué des N-méthylpyrrole de la Dst dans la spécificité de liaison à l'ADN a été étudié par Parrack *et al.* (1987) : le remplacement d'un noyau N-méthylpyrrole par une β -alanine n'affecte pas la sélectivité caractéristique de la Dst pour les bases A-T (Figure 6b).

I.2.3. Modification des substituants à l'azote du noyau pyrrole :

Le remplacement du groupement méthyle par un résidu n-propyle (Figure 6c) diminue considérablement la toxicité cellulaire tout en conservant une activité significative (Khorlin *et al.*, 1980; Grehn *et al.*, 1986).

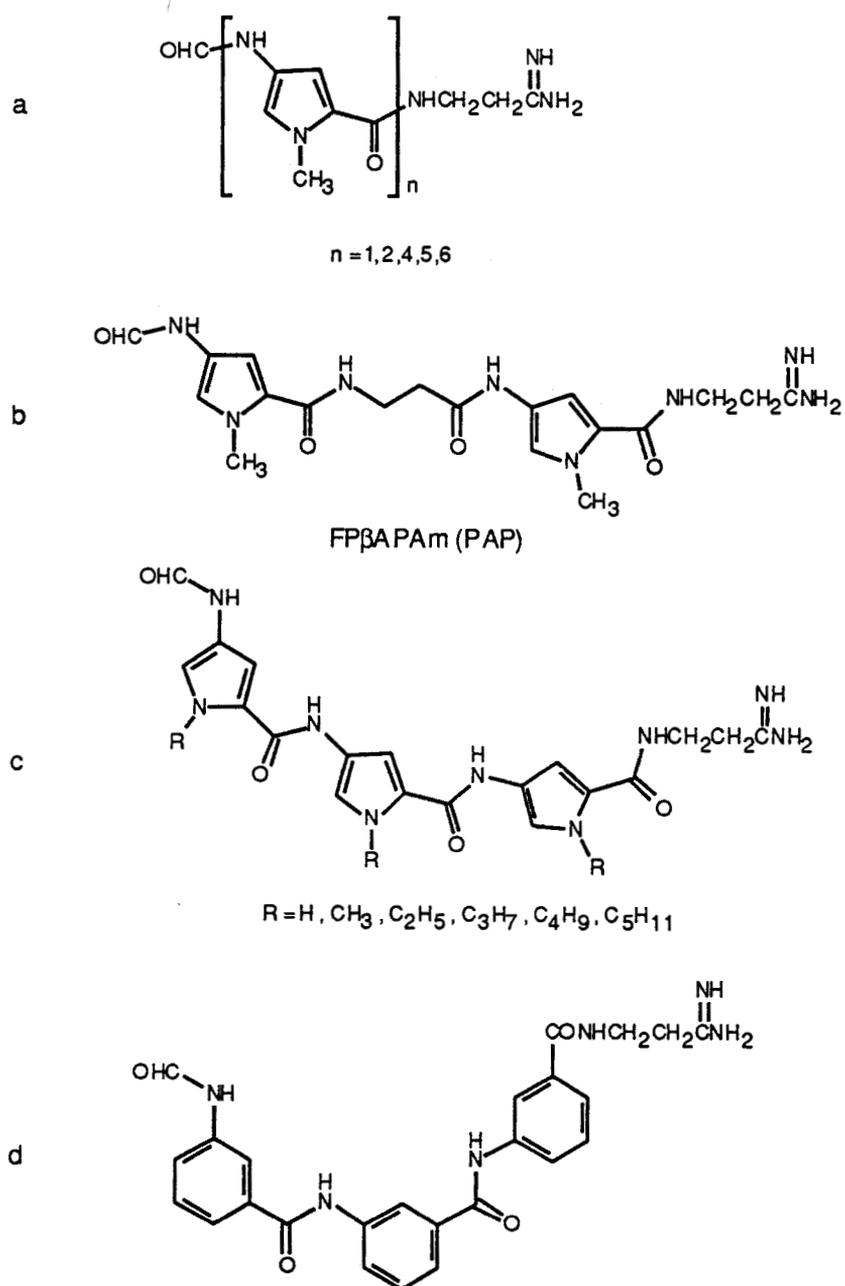


Figure 6:

- (a) modulation du nombre de noyaux N-méthylpyrrole
- (b) remplacement d'un pyrrole par une β-alanine
- (c) modulation du groupement alkyle du noyau pyrrole
- (d) structure de l'analogue tris(m-benzamido) de la Dst

1.2.4. Modification de l'hétérocycle :

Les premiers travaux réalisés à ce niveau ont consisté à remplacer le noyau N-méthylpyrrole par un motif benzamide substitué en méta afin de conserver la courbure de la molécule nécessaire à sa fixation dans le petit sillon; on observe cependant une diminution de la spécificité pour les enchaînements Adénine-Thymine (Figure 6d) (Rajagopalan *et al.*, 1985; Dasgupta *et al.*, 1986).

En 1986, Arcamone et son équipe ont synthétisé des analogues de la Dst possédant un phényle ou un hétérocycle (thiophène, thiazole, ...) additionnel : tous ces composés se lient préférentiellement au nucléotide de type poly(dA-dT) (Arcamone *et al.*, 1986). Le remplacement du groupement formyle terminal par un groupement pyridine-2-carboxamide permet de plus la formation d'une liaison hydrogène supplémentaire entre l'azote pyridinique et le NH₂ d'une guanine (Wade et Dervan, 1987).

Mais ce sont les analogues à noyau imidazole de la Nt qui se sont avérés particulièrement intéressants (Figure 7) (Lown *et al.*, 1986a,b ; Krowicki et Lown, 1987):

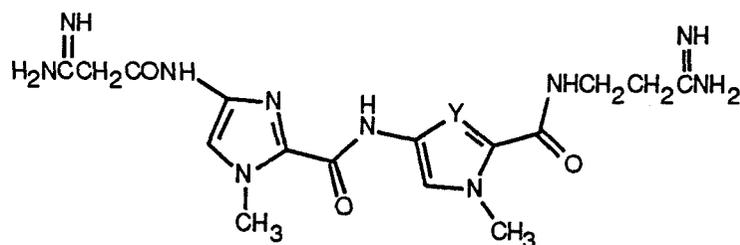


Figure 7 : Structure des dérivés mono-imidazole (Y=CH) et bis-imidazole (Y=N)

Les données de la radiocristallographie du complexe Nt-ADN montrent que la fixation de la Nt ou de la Dst dans le petit sillon est empêchée par le groupement NH₂ d'une guanine. En effet, les guanines interrompent le réseau d'hydratation de l'ADN sous forme B et tendent à déstabiliser la forme B au profit des formes A ou Z (Wartell *et al.*, 1974 ; Drew et Dickerson, 1981; Kopka *et al.*, 1983).

Le remplacement d'un ou des deux cycles pyrrole de la Nt par un hétérocycle susceptible d'engager une liaison hydrogène par l'intermédiaire de son hétéroatome avec le groupement NH₂ d'une guanine altère de ce fait la spécificité pour les enchaînements de bases A-T et permet l'évolution vers la reconnaissance de sites G-C

(Lown *et al.*, 1986a ; Lown, 1988 ; Burckhardt *et al.*, 1989). De tels composés sont appelés "lexitropsines" ou "sequences reading oligopeptides" : la nature moléculaire de l'interaction avec l'ADN est schématisée dans la figure 8 pour le dérivé bis-imidazole (Lown *et al.*, 1986a).

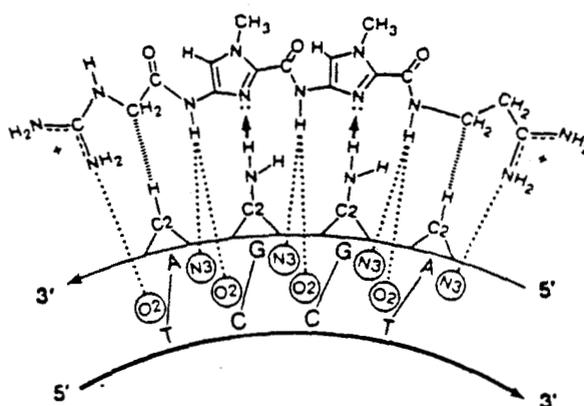


Figure 8 : Représentation des caractéristiques de la reconnaissance moléculaire du dérivé bis-imidazole vis-à-vis de la séquence 3'-AGGA-5' .

(....) liaisons hydrogène

(|||||) contacts de Van der Waals

(-->) liaison hydrogène additionnelle spécifique provenant du NH₂ d'une paire G-C.

I.2.5. Modification des chaînes latérales et conservation des noyaux pyrrole :

La pharmacomodulation sur les chaînes latérales offre de vastes possibilités dont nous ne mentionnerons que les plus significatives (Arcamone *et al.*, 1969b; Khorlin *et al.*, 1980).

Le remplacement de la chaîne propionamide de la Nt par une chaîne spermidine et par des résidus di- et trialanyle entraîne respectivement une altération de la spécificité pour les paires A-T s'accompagnant d'une meilleure affinité pour les ADN de type poly(dG-dC).poly(dG-dC) et une diminution de l'affinité pour l'ADN double brin (Debart *et al.*, 1989).

L'étude de l'influence des contacts de Van der Waals au niveau C terminal a permis de montrer que la suppression d'un méthylène au niveau de la chaîne amidine du dérivé OHC-Py-Py-Am⁺ (Py pour pyrrole et Am pour amidine) place le cation à proximité d'un résidu cytosine (Lown, 1988; Lee *et al.*, 1988a).

I.2.6. Modification simultanée des hétérocycles et des chaînes latérales :

Pour les dérivés bis-ammonium quaternaires hétérocycliques (Atwell et Cain, 1968; Rajagopalan et al., 1987), la diminution de la courbure du squelette se caractérise par une perte de la sélectivité pour les bases A-T (Luck *et al.*, 1984; Rao *et al.*, 1988).

D'autre part, le remplacement du groupe guanidinoacétyle chargé positivement du dérivé bis-imidazole (Figure 8) par un groupe formyle neutre accentue la spécificité G-C (Kissinger *et al.*, 1987; Lown, 1988; Lee *et al.*, 1988b; Randrianarivelo *et al.*, 1989).

Enfin le remplacement du noyau imidazole du dérivé OHC-Im-Im-Am⁺ (Im pour imidazole et Am pour amidine) par un furane disubstitué en 2,5 s'accompagne d'une baisse de l'affinité pour le dodécamère d(CATGGCCATG)₂ (Lee *et al.*, 1989).

I.3. LES ANALOGUES THIAZOLIQUES DE LA NETROPSINE

Sur le principe des modèles présentés précédemment, nous avons entrepris une pharmacomodulation axée principalement sur la nature de l'hétérocycle du système polyaromatique dans le but d'étudier l'influence de l'hétérocycle sur la spécificité de fixation à l'ADN. Des travaux concernant des analogues thiazoliques de la Dst et de la Nt ont été entrepris au sein de notre laboratoire et par l'équipe de J.W. Lown (Bailly *et al.*, 1988a; Rao *et al.*, 1990a). Il est remarquable de constater que cet hétérocycle se retrouve au sein de nombreuses substances naturelles d'origine marine aux propriétés cytotoxiques nettes ($DE_{50}=10^{-7}\mu\text{g/mL}$) telles que la dolastatine 3 (Bernier *et al.*, 1986a; Pettit *et al.*, 1987; Holzapfel *et al.*, 1990), l'ulithiacyclamide (Ireland *et al.*, 1982), les patellamides (Schmidt et Griesser, 1986) ainsi qu'au sein de la bléomycine (Umezawa, 1971), antibiotique utilisé en chimiothérapie du cancer depuis 1966. Par ailleurs, l'expérience du laboratoire pour la synthèse de dérivés thiazoliques (Houssin *et al.*, 1984 a,b; 1985 a,b) a conduit à l'élaboration d'un analogue de la Dst où les motifs 4-amino-2-carboxy N-méthyl pyrrole ont été remplacés par des résidus de type 2-aminométhyl-4-carboxy thiazole (Figure 9a) (Bailly *et al.*, 1988a). La liaison à l'ADN d'une telle molécule s'est avérée être discrète, mais elle n'est pas attribuable à l'hétérocycle lui-même; en effet le chaînon méthylène reliant les motifs thiazoliques permet une libre rotation de ces derniers et diminue de ce fait la rigidité de la molécule qui ne possède plus la conformation courbe nécessaire à sa fixation au niveau du petit sillon. Une diminution de l'affinité pour l'ADN a également été observée pour un analogue où les deux hétérocycles pyrrole sont reliés par un résidu β -alanine (Parrack *et al.*, 1987). Ces deux exemples montrent clairement que la rigidité du système polyaromatique est une condition indispensable à une bonne fixation au niveau du petit sillon de l'ADN. Nous avons pris en compte cet élément lors de l'élaboration du modèle Thia-Nt (Figure 9b), caractérisé par l'absence de résidu méthylène, conférant une structure plus rigide au squelette, et où l'on trouve le noyau thiazole, support potentiel d'une affinité pour la double hélice et d'une spécificité de liaison différente de celle présentée par le noyau pyrrole.

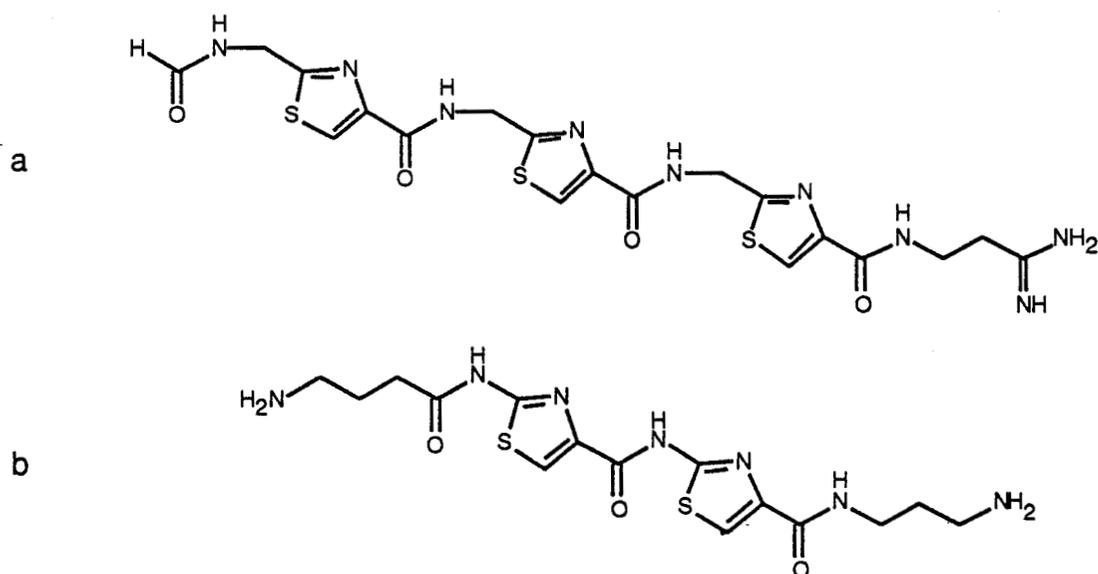


Figure 9 : Structure des dérivés poly 2-aminométhyl-4-carboxy thiazole (a) et poly 2-amino-4- carboxy thiazole (Thia-Nt) (b)

La synthèse et l'étude de la fixation à l'ADN de Thia-Nt ont fait l'objet de la publication suivante :

I.3.1. Thia-Nt :

article n°1 : Synthesis and DNA-binding study of a thiazole-containing analog of netropsin.

PLOUVIER, B., HOUSSIN, R., BAILLY, C. & HENICHART, J.P.
J. Heterocyclic Chem. (1989) 26, 1643-1647.

Synthesis and DNA-Binding Study of A Thiazole-Containing Analog of Netropsin

Bertrand Plouvier and Raymond Houssin

Laboratoire de Chimie de Synthèse des Médicaments, Faculté de Pharmacie, rue du Professeur Laguesse, 59045 Lille, France

Christian Bailly and Jean-Pierre Hénichart*

INSERM, Unité No. 16, Place de Verdun, 59045 Lille, France

Received February 22, 1989

In order to study the influence of the nature of the heterocyclic rings of Netropsin (Nt) on the binding to specific nucleotide sequences in the minor groove of DNA, a thiazole-containing analogue (Thia-Nt) was designed. Optimized syntheses of the key compound 2-aminothiazole-4-carboxylic acid and Thia-Nt were reported together with the results of a preliminary study of Thia-Nt-DNA binding.

J. Heterocyclic Chem., 26, 1643 (1989).

DNA is the support of the genetic information; of its chemical structure depend normal or anarchic cell growth or cell death. Differences between normal and tumor cells take origin at the gene level. Beyond the always increasing frequency of cancer, it seems particularly important to develop an efficient strategy for the design of chemotherapeutic drugs designed as gene control agents. In this way, minor groove binding compounds [1], typified by netropsin and distamycin, appear to be a promising source of active compounds because of their ability to bind to large DNA sequences.

Oligopeptide xenobiotics including antibiotic, antineoplastic and antiviral drugs interfere with the replication and transcription by the recognition and preferential binding to specific double-stranded DNA sequences. Such is the case of antiviral and antitumor distamycin-A (Dst) and of antibiotic netropsin (Nt) (Figure 1), two *N*-methylpyrrole drugs able to block the template function of DNA by binding to specific nucleotide sequences in the minor groove of double strand DNA [2]. On the basis of X-ray data, it was found that the adenine-thymine base-specific binding of both drugs is due to electrostatic bonds between ends of side chains of the ligands and DNA phosphates, hydrogen-bonding interactions between amide NH

and adenine N(3) and thymine O(2), and Van der Waals contacts between methylenes and heterocyclic CH of DNA bases [3,4]. In order to confirm these criteria, some structural modifications have been carried out including replacement of pyrrole ring by pyridine [5,6] and imidazole [7,8] heterocycles and/or lengthening of the chain [9,10].

In this attempt to study the influence of the nature of the heterocyclic parts and the linking groups on the curvature of the obtained compounds fitting well with DNA geometry, we proposed the design of thiazole containing Dst and Nt analogues [11]. The choice of this heterocycle was directed by chemical considerations concerning the ring size and the relative position of heterocyclic N atom in the whole peptide chain. Moreover the thiazole carboxylic acid, a cyclized cysteine, was found to play an important biological role in the cytotoxic activity of cyclopeptides isolated from marine animals [12-15] and in the DNA binding capacity of antitumor drugs such as bleomycin [16]. The chemistry of starting materials leading to the synthesis of thiazole-containing cyclopeptides [17,18] or bleomycin models [19,20] was extensively worked in our laboratory and prompted us to propose the synthesis of a new thiazole Nt analogue.

This report includes an efficient and easily reproducible synthesis of the 2-aminothiazole-4-carboxylic acid which was found to be a key compound in the strategic pathway leading to the synthesis of the Nt-analog, Thia-Nt (Figure 1), in the structure of which the pyrrole rings of Nt were replaced by thiazole heterocycles and amidine and guanidine ends simplified in primary amines. Together with details on the optimized synthesis, the results of a preliminary study of Thia-Nt-DNA binding are also reported.

Chemistry.

The synthetic method for the preparation of 2-amino-4-carboethoxythiazole **2** consists of the cyclizing condensa-

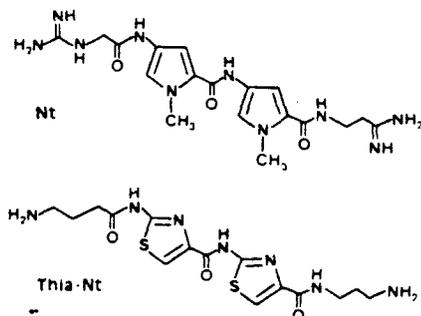


Figure 1. Structure of netropsin(A) and Thia-Nt (B).

tion of thiourea with ethyl bromopyruvate according to the Kuhn procedure [21]. Thiazole **2** was coupled with 4-*t*-butyloxycarbonylamino butyric acid [22] in the presence of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and 1*H*-hydroxy-1,2,3-benzotriazole (HOBt). After saponification of the ester group of the "dipeptide" **3**, the acid **4** was coupled with 2-amino-4-carboethoxythiazole **2** in the above conditions (DCC, HOBt) to give the thiazole-containing "tripeptide" **5** which was saponified to give the acid **6**.

The introduction of the second side chain was achieved by a last coupling, in the presence of DCC and HOBt, with the mono-protected diamine **7** [23] to give the protected diamine **8**. The desired compound Thia-Nt **9** was obtained as a dihydrobromide by cleavage of the tert-butyloxycar-

bonyl (Boc) groups by dry hydrogen bromide in acetic acid (see Figure 2).

DNA-Binding.

Binding of the synthetic ligand Thia-Nt to DNA was deduced from the hypochromic effects observed in the uv absorption spectra of this ligand when DNA was added (Figure 3). A red shift (4 nm), indicative of an increased delocalization of the π -electrons in the ligand, was noted. These spectral modifications were found upon addition of coliphage T₄ DNA in which the major groove is occluded by bulky glucose residues on the 5-(hydroxymethyl)cytidine bases [24]. The results were consistent with a binding in the minor groove as established for Nt [4]. In order to verify this result, linear electric dichroism studies have been undertaken.

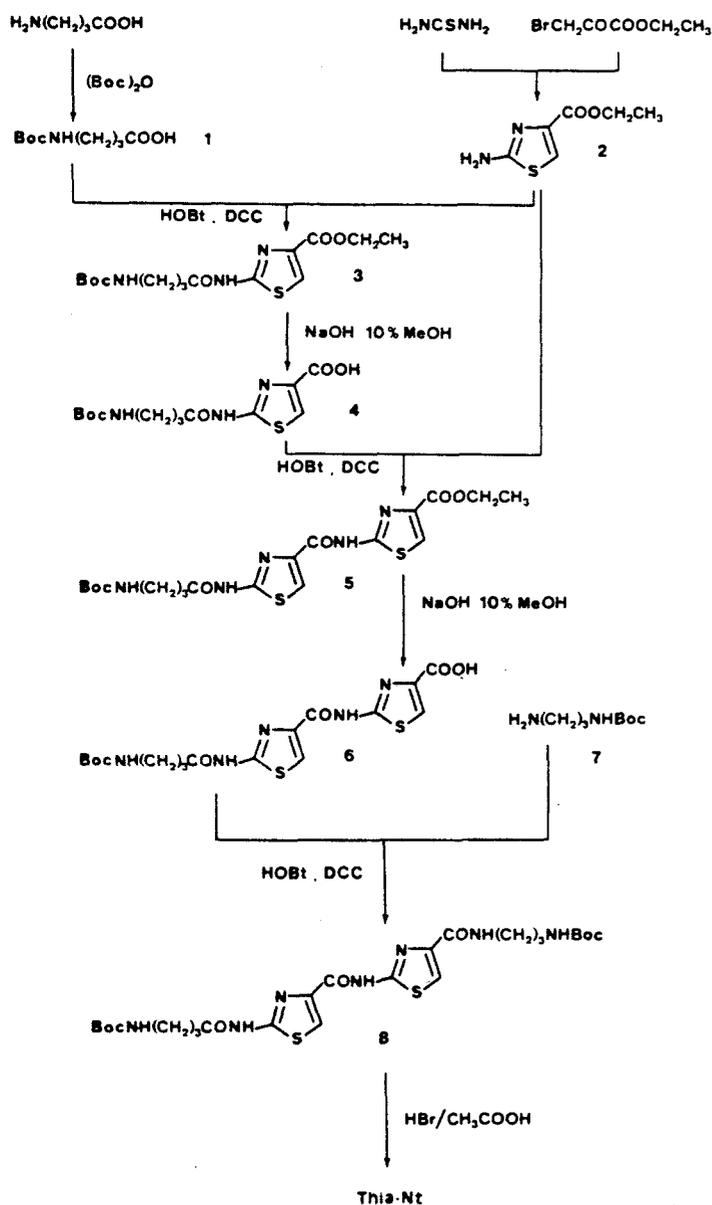


Figure 2. Synthesis of Thia-Nt.

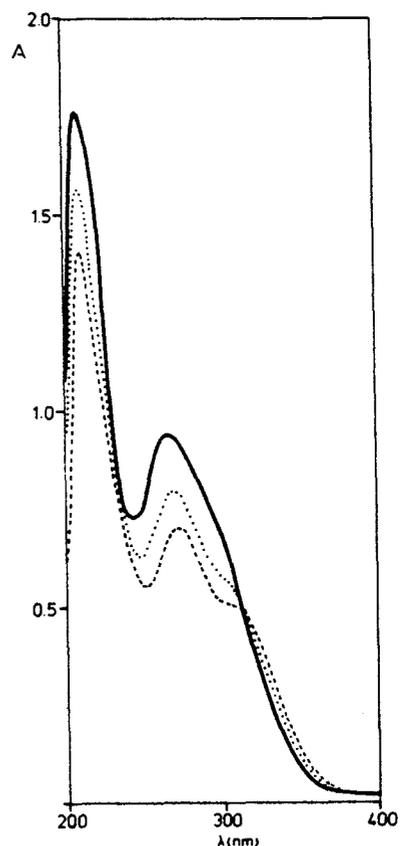


Figure 3. The uv absorption spectra of Thia-Nt at a concentration of 78 μM (—) and its complex with coliphage T₄ DNA at a DNA/Thia-Nt ratio of 0.35 (···) and 0.7 (---). The sample and reference cell contained equal concentrations of DNA [(···)27 μM and (---)55 μM].

The Thia-Nt-calf thymus DNA complex reduced linear dichroism spectrum (Figure 4) shows a positive part (295-330 nm) reflecting the position of the bis-thiazole chromophore in the DNA complex. At these wavelengths, a significant contribution from the DNA itself was observed which certainly minimizes the measured linear dichroism values for the complex.

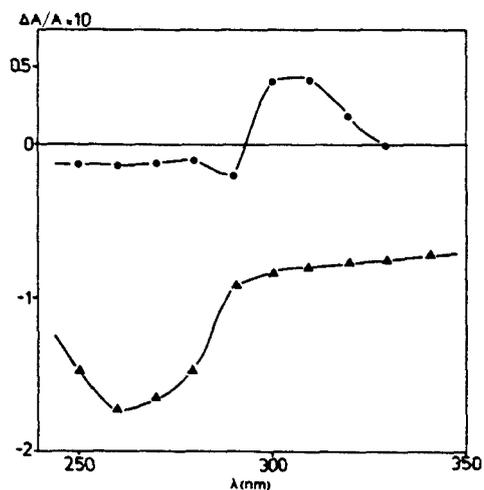


Figure 4. Reduced linear electric dichroism ($\Delta A/A$) spectra of the calf thymus DNA (\blacktriangle) and of the Thia-Nt-DNA complex (\bullet) at a ligand/DNA ratio of 0.1 and at 12.5 kV. cm^{-1} .

Nevertheless, this positive curve clearly demonstrates that the ligand is preferentially oriented parallel to the DNA axis, a geometry which excludes intercalation. Thus, replacement of the *N*-methylpyrrole heterocycle in Nt by a thiazole ring does not perturb the minor groove binding.

The binding affinities were calculated by means of Scatchard plots [25] (Figure 5) and allowed us to precise the binding parameters (Table I). The Scatchard plots were done at 265 nm, a wavelength at which a large DNA absorbance is observed and it was necessary to subtract the DNA contribution by adding an equal concentration of DNA to the reference cell. The apparent binding constant K_a , measured with two DNAs of different base composition, indicate that Thia-Nt binds DNA with a weaker affinity than Nt does [2] (Nt-calf thymus DNA, $K_a = 2.9 \times 10^5 M^{-1}$; Nt-poly[d(A.T)-d(A.T)], $K_a = 4 \times 10^5 M^{-1}$).

The ligand was found to cover 4-5 nucleotides per binding site (n) with the synthetic poly[d(A.T)-d(A.T)] DNA. This result is an argument in favor of a location of the ligand in the minor groove of DNA. The difference in the DNA binding affinity of the studied compound toward the

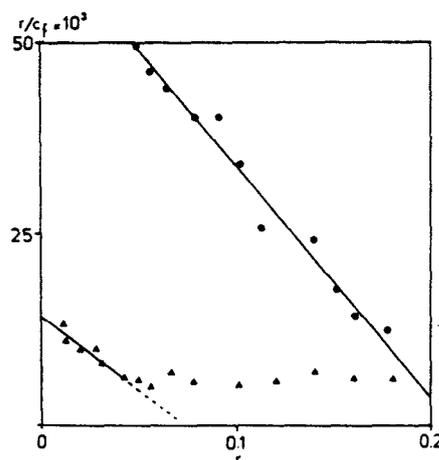


Figure 5. Representative Scatchard plot for the evaluation of the binding parameters for the interaction of Thia-Nt with calf thymus DNA (\blacktriangle) and poly[d(A.T)-d(A.T)] (\bullet).

two different DNA was also apparent considering the ΔT_m values (Table I), meaning a marked preference of this drug for A-T sites as observed for Nt [2-4].

The spectroscopic measurements have provided information concerning the mode of binding of the thiazole-containing Nt analogue to DNA. Orientation of this drug in the minor groove of DNA can readily be postulated.

EXPERIMENTAL

Melting points were taken on a Tottoli Büchi 510 apparatus and are uncorrected. The ir spectra were recorded with a Perkin Elmer 297 spectrophotometer using potassium bromide pellets. The $^1\text{H-nmr}$ spectra were recorded on a Brücker WP 80 SY spectrophotometer. Chemical shifts are reported in ppm from tetramethylsilane as an internal standard and are given in δ units. The EI mass spectra were recorded on a Ribermag, R10.10 (combined with Riber 400 data system) mass spectrophotometer at 70 eV by using direct insertion. FAB mass spectra were determined on a Kratos MS-50 RF mass spectrometer. Thin layer chromatography (tlc) was carried out using silica gel 60F-254 Merck, in system solvent A (chloroform-methanol, 80/20, v:v in a saturated ammonia atmosphere). Elemental analyses were performed by the "Service Central d'Analyses", CNRS, Vernaison, France.

Table I

DNA-Binding Parameters of Thia-Net

| | ΔT_m [a]/(D/P) [b] | λ [c] | $K_a(m^{-1})$ [d] | n [e] |
|-----------------------|-------------------------------|---------------|-------------------|---------|
| Poly[d(A.T) - d(A.T)] | 3°4 (0.1) 9°3 (0.5) 12° (1.0) | 265 | $6.4 \cdot 10^4$ | 4.8 |
| Calf thymus DNA | 0°7 (0.1) 3° (0.5) 5°7 (1.0) | 265 | $1.2 \cdot 10^4$ | — |

[a] Elevation in thermal denaturation temperature ($^{\circ}\text{C}$) [b] Drug to Phosphate DNA ratio. [c] Wavelength at which the absorbance change was measured. [d] Apparent binding constant. [e] Binding site size.

The uv absorption spectra and melting temperature studies were recorded with a Uvikon Kontron 810/820 spectrophotometer and realised in 0.1 M SSC buffer (0.15 M sodium chloride, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0) as previously described [26]. Linear dichroism experiments were made using a well-established procedure [27]. Scatchard analysis and determination of the binding parameters were realized using a described method [28].

Amino-2-ethoxycarbonyl-4-thiazole (2).

A mixture of thiourea (5 g, 65.8 mmoles) and ethyl 2-bromopyruvate (12.8 g, 65.8 mmoles) was heated gradually to 70° under stirring until the mixture became highly viscous. On cooling, the hydrobromide crystallized and was recrystallized from ethanol-petroleum ether. The recrystallized hydrobromide was solubilized in water and the base was precipitated from addition of dilute ammonia. The crude product was filtered and recrystallized from methanol to give **2** in a 57.5% yield, mp 175-177°; Rf (A) 0.8; ir: 1600 (NH), 1680 (C=O), 3100-3400 cm⁻¹ (NH), ¹H nmr (DMSO-d₆): δ 7.4 (s, 1H, CH thiazole), 7.3 (s, 2H, NH₂), 4.2 (q, 2H, CH₂), 1.2 (t, 3H, CH₃); ms: m/e (relative intensity) 172 (M⁺, 44.8), 144 (9.2), 73 (98.8).

Anal. Calcd. for C₈H₈N₂O₂S: C, 41.9; H, 4.7; N, 16.3; O, 18.6; S, 18.6. Found: C, 41.5; H, 4.7; N, 16.1; O, 19.0; S, 18.6.

Ethyl 2-[4-*t*-Butyloxycarbonylamino]butyryl]aminothiazole-4-carboxylate (3).

Cold solutions of DCC (2.64 g, 12.7 mmoles) and HOBt (1.95 g, 12.7 mmoles) in dichloromethane/dimethylformamide (1:1, 20 ml) were added to a solution of 4-*t*-butyloxycarbonylamino]butyric acid **1** [22] (2.36 g, 11.6 mmoles) in 15 ml of dichloromethane/dimethylformamide (1:1) at 0° for 1 hour under stirring. A cold solution of **2** (2 g, 11.6 mmoles) in dichloromethane/dimethylformamide (1:1, 20 ml) was added and stirring was continued for 2 hours at 0° and 12 hours at room temperature. The solvent was evaporated and the residue taken up with dichloromethane provided dicyclohexylurea (DCU) which was filtered. The organic solution was washed with 1 N hydrochloric acid, water and finally with 1 M sodium bicarbonate. After drying over anhydrous sodium sulfate, the solvent was removed *in vacuo*. The remaining DCU was discarded by precipitation with ethyl acetate, the resulting material was recrystallized from acetone giving pure **3** (2.6 g, 63% yield), mp 155-157°; Rf (A) 0.95; ir: 1720 (CO amide), 1680 cm⁻¹ (CO ester); ¹H nmr (deuteriochloroform): δ 11.6 (m, 1H, NH), 7.8 (s, 1H, CH thiazole), 4.9 (m, 1H, NHBoc), 4.4 (q, 2H, CH₂), 3.2 (m, 2H, CH₂NH), 2.6 (t, 2H, CH₂CO), 1.9 (m, 2H, CH₂), 1.4 (m, 12H, CH₃); ms: m/e (relative intensity) 357 (M⁺, 1.8).

Anal. Calcd. for C₁₅H₂₃N₃O₅S: C, 50.5; H, 6.5; N, 11.8; O, 22.4; S, 9.0. Found: C, 50.5; H, 6.6; N, 11.5; O, 22.0; S, 8.6.

2-[4-*t*-Butyloxycarbonylamino]butyryl]aminothiazole-4-carboxylic Acid (4).

A solution of **3** (2 g, 5.6 mmoles) in methanol (11 ml) and sodium hydroxide (0.9 g in 9 ml of methanol/water, 10/1) was stirred at 65°. The progress of the reaction was monitored by tlc and was thereby judged to be complete after 3 hours. The solvent was evaporated and the residue was taken up in water. Impurities were extracted with ethyl acetate (2 × 20 ml). The aqueous solution was cautiously acidified to pH 4-5 with 1 N hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate (3 × 20 ml). After drying over anhydrous sodium sulfate and evaporation of the organic layer, trituration in cyclohexane and evaporation of cyclohexane yield

1.6 g of **4**, (87% yield), mp 187-189°; Rf (A) 0.25; ir: 3000-2500 cm⁻¹ (OH dimer); ¹H nmr (deuteriochloroform): δ 12.2 (m, 1H, NH), 7.8 (s, 1H, CH thiazole), 5.2 (m, 1H, NHBoc), 3.3 (m, 2H, CH₂NHBoc), 2.6 (t, 2H, CH₂CO), 2.0 (m, 2H, CH₂), 1.4 (s, 9H, CH₃); ms: (FAB) 330 (M⁺ + 1).

Ethyl 2-[2'-[4-*t*-Butyloxycarbonylamino]butyrylamino]thiazole-4'-carboxamido]thiazole-4-carboxylate (5).

The acid **4** (2 g, 6.08 mmoles) was coupled to the amine **2** (1.045 g, 6.08 mmoles) using DCC (1.38 g, 6.66 mmoles) and HOBt (1.023 g, 6.68 mmoles) in dichloromethane/dimethylformamide (1:1) as described for the preparation of **3**. DCU was removed by precipitation with ethyl acetate and the filtrate washed with 1 N hydrochloric acid (20 ml), water (20 ml) and 1 M sodium bicarbonate (20 ml), then dried over anhydrous sodium sulfate. The solvent was removed *in vacuo* giving 1.17 g (38%) of **5** after recrystallization from a mixture of ethanol-ether, mp 131-135°; Rf (A) 0.87; ir: 1720 (CO amide), 1680 cm⁻¹ (CO ester); ¹H nmr (deuteriochloroform): δ 11.2 (m, 1H, NH), 7.9 (s, 1H, CH thiazole), 7.8 (s, 1H, CH thiazole), 5.1 (m, 1H, NHBoc), 4.4 (q, 2H, CH₂), 3.3 (m, 2H, CH₂NH), 2.7 (t, 2H, CH₂CO), 2.0 (m, 2H, CH₂), 1.4 (m, 12H, CH₃); ms: (FAB) 484 (M⁺ + 1).

Anal. Calcd. for C₁₅H₂₅N₅O₆S₂: C, 47.2; H, 5.2. Found: C, 47.4; H, 5.5.

2-[2'-[4-*t*-Butyloxycarbonylamino]butyrylamino]thiazole-4'-carboxamido]thiazole-4-carboxylic Acid (6).

The ethyl ester **5** (500 mg, 1.035 mmoles) was totally converted after 3 hours to the corresponding acid **6**, according to the method for preparation of **4**. Compound **6** was obtained pure after column chromatography with chloroform-methanol, 8/2, v/v, as eluent (410 mg, 87%), mp > 250°; Rf (A) 0.6; ir: 3000-2500 cm⁻¹ (OH dimer); ¹H nmr (DMSO-d₆): δ 15.5 (s, 1H, OH), 7.9 (s, 1H, CH thiazole), 7.5 (s, 1H, CH thiazole), 6.8 (m, 1H, NHBoc), 3.2 (m, 2H, CH₂NH), 2.7 (m, 2H, CH₂CO), 1.9 (m, 2H, CH₂), 1.4 (s, 9H, CH₃).

Anal. Calcd. for C₁₇H₂₁N₅O₆S₂: C, 44.8; H, 4.65; N, 15.4; O, 21.1; S, 14.1. Found: C, 44.6; H, 4.8; N, 15.1; O, 21.2; S, 13.8.

t-Butyl[2-[2'-[4-*t*-Butyloxycarbonylamino]butyrylamino]thiazole-4'-carboxamido]thiazole-4-carboxamido]propyl Carbamate (8).

The acid **6** (300 mg, 0.66 mmole) was coupled to 3-*t*-butyloxycarbonylamino]propylamine **7** [23] (115 mg, 0.66 mmole) using DCC (149 mg, 0.73 mmole) and HOBt (111 mg, 0.73 mmole) in a mixture of dichloromethane-dimethylformamide (1:1, 18 ml) according to the procedure described for **3**. Purification of the crude material was accomplished by column chromatography with chloroform-methanol, 8/2, v/v, as eluent. Collection and evaporation of the appropriate fractions give **8** with 52% yield, mp 58-63°; Rf (A) 0.95; ir: 1680 cm⁻¹ (CO); ¹H nmr (deuteriochloroform): δ 11.5 (m, 1H, NH), 8.3 (m, 1H, NHCO), 7.8 (d, 2H, CH thiazoles), 5.1 (m, 1H, NHBoc), 3.4 (m, 6H, CH₂NH), 2.7 (m, 2H, CH₂CO), 2.0 (m, 4H, CH₂), 1.4 (s, 18H, CH₃); ms: m/e (relative intensity): 612 (M⁺, 30.2).

Anal. Calcd. for C₂₃H₃₇N₇O₇S₂: C, 49.1; H, 6.1; N, 16.0; O, 18.3; S, 10.5. Found: C, 48.9; H, 6.0; N, 16.1; O, 18.1; S, 10.2.

(2-[2'-[4-Aminobutyrylamino]thiazole-4'-carboxamido]thiazole-4-carboxamido]propylamine Dihydrobromide (Thia-Nt) (9).

A solution of **8** (133 mg, 0.217 mmole) in acetic acid (30 ml) was flushed with dry hydrogen bromide for 10 minutes and stirring was maintained for 20 minutes. After evaporation of the solvent

under vacuum, the residue was washed with ethanol (4 × 30 ml) to remove acids, taken up with water, washed with chloroform and diethyl ether (15 ml). Lyophilisation of the aqueous layer gave **9** (90% yield), mp 197-202°; Rf (A) 0; ¹H nmr (DMSO-d₆): 400 MHz δ 12.4 (s, 2H, NHCO), 8.3 (s, 1H, CH thiazole), 8.2 (t, 1H, NH CH₂), 7.8 (s, 1H, CH thiazole), 7.75 (m, 6H, NH₃⁺), 3.3 (m, 1H, CH₂NH), 2.8 (m, 4H, CH₂NH₃⁺), 2.6 (m, 2H, CH₂CO), 1.8 (m, 4H, CH₂).

Anal. Calcd. for C₁₅H₂₃N₇O₃S₇Br₂: C, 31.4; H, 4.0; N, 17.1; O, 8.4; S, 11.2 Found: C, 31.2; H, 4.2; N, 17.5; O, 8.1; S, 10.9.

Acknowledgements.

We thank the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" and the "Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer" for the financial support.

REFERENCES AND NOTES

- * Author to whom correspondence should be addressed.
- [1] C. Zimmer, G. Luck, G. Burckhardt, K. Krowicki and J. W. Lown, in "Molecular Mechanism of Carcinogenic and Antitumor Activity", C. Chagas and B. Pullman, eds, 1986, pp 339-363.
 - [2] C. Zimmer and U. Wahnert, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **47**, 31 (1986).
 - [3] M. L. Kopka, A. V. Fratini, H. R. Drew and R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.*, **163**, 129 (1983).
 - [4] M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura and R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1372 (1985).
 - [5] W. S. Wade and P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 1574 (1987).
 - [6] D. H. Jones and R. H. Wooldridge, *J. Chem. Soc.*, 550 (1968).
 - [7] J. W. Lown, K. Krowicki, U. G. Bhat, A. Skorobogaty, B. Ward and J. C. Dabrowiak, *Biochemistry*, **25**, 7408 (1986).
 - [8] K. Kissinger, K. Krowicki, J. C. Dabrowiak and J. W. Lown, *Biochemistry*, **26**, 5590 (1987).
 - [9] D. Dasgupta, P. Parrack and V. Sasisekaran, *Biochemistry*, **26**, 6381 (1987).
 - [10] R. S. Youngquist and P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2565 (1985).
 - [11] C. Bailly, R. Houssin, J.-L. Bernier and J.-P. Hénichart, *Tetrahedron*, **44**, 5833 (1988).
 - [12] G. R. Pettit, Y. Kamano, P. Brown, D. Gust, M. Inoue and C. L. Herald, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 805 (1982).
 - [13] C. M. Ireland and P. J. Sheuer, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5688 (1980).
 - [14] C. M. Ireland, A. R. Durso Jr, R. A. Newman and M. P. Hacker, *J. Org. Chem.*, **47**, 1807 (1982).
 - [15] J. M. Wasyluk, J. E. Biskupiak, C. E. Costello and C. M. Ireland, *J. Org. Chem.*, **48**, 4445 (1983).
 - [16] J.-P. Hénichart, J.-L. Bernier, N. Helbecque and R. Houssin, *Nucl. Acids Res.*, **13**, 6703 (1985).
 - [17] R. Houssin, M. Lohez, J.-L. Bernier and J.-P. Hénichart, *J. Org. Chem.*, **50**, 2787 (1985).
 - [18] J.-L. Bernier, R. Houssin and J.-P. Hénichart, *Tetrahedron*, **42**, 2695 (1986).
 - [19] R. Houssin, J.-L. Bernier and J.-P. Hénichart, *J. Heterocyclic Chem.*, **21**, 465 (1984).
 - [20] R. Houssin, J.-L. Bernier and J.-P. Hénichart, *J. Heterocyclic Chem.*, **21**, 681 (1984).
 - [21] R. Kühn and K. Dury, *Ann. Chem.*, **571**, 44 (1951).
 - [22] L. Moroder, A. Hallett, E. Wunsch, O. Keller and G. Wersin, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 1651 (1976).
 - [23] R. Houssin, J.-L. Bernier and J.-P. Hénichart, *Synthesis*, 259 (1988).
 - [24] R. L. Erickson and W. Szybalski, *Virology*, **22**, 11 (1964).
 - [25] G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 660 (1949).
 - [26] C. Bailly, J.-L. Bernier, R. Houssin, N. Helbecque and J.-P. Hénichart, *Anti-Cancer Drug Design*, **1**, 303 (1987).
 - [27] C. Houssier and C. T. O'konski, in "Molecular Electro-Optics", series B 64, S. Krause, ed, Nato Advanced Study Institute, 1981, pp 309-339.
 - [28] K. Ekambareswara Rao, D. Dasgupta and V. Sasisekaran, *Biochemistry*, **27**, 3018 (1988).

L'étude de l'interaction du composé Thia-Nt avec l'ADN a permis de démontrer sa fixation au niveau du petit sillon (dichroïsme linéaire) avec une préférence pour les enchaînements Adénine-Thymine (dénaturation thermique et Scatchard). Dans le but de préciser ces résultats et de déterminer une spécificité de séquence éventuelle, Thia-Nt a été étudié par la technique des empreintes ou "footprinting".

Le "footprinting" est une technique très fine utilisée pour l'analyse de la spécificité de séquences de protéines et de composés qui se lient à l'ADN de façon réversible (Portugal, 1989). Actuellement, on dispose d'endonucléases de restriction et de techniques qui permettent l'isolement de fragments d'ADN; ces fragments ont un nombre suffisamment grand de paires de bases ou de combinaisons de paires de bases pour être représentatifs de tous les sites possibles de liaisons à l'ADN de petites molécules. Des techniques enzymatiques permettent de marquer (au phosphore 32 le plus souvent) l'une des extrémités de l'un des brins (en 5' par une kinase ou en 3' par la polymérase de Kleenow ou la reverse transcriptase) de fragments d'ADN. Les agents utilisés en "footprinting" sont de type enzymatique (DNAase I, DNAase II ou Nucléase Micrococcalle) ou chimique (radicaux hydroxyle générés par divers types de complexes métalliques) et coupent, dans certaines conditions opératoires, statistiquement l'ADN double brin au niveau de chacune des bases. Après incubation avec la molécule testée et coupure du fragment de restriction marqué radioactivement, l'ensemble des fragments de coupure ainsi générés, qui ne diffèrent en longueur que d'une paire de base, sont séparés en gel dénaturant de polyacrylamide (Maxam et Gilbert, 1977). Ainsi une molécule liée spécifiquement à un site défini de l'ADN protège cet ADN de la coupure en masquant les paires de bases de ce site. Ceci apparaît sur l'autoradiogramme (reflet du gel d'électrophorèse) sous forme d'un trou ou d'une empreinte (d'où le nom de cette technique) dans l'échelle des fragments d'ADN (Schéma 1). La séquence du site de protection est déterminée par référence à des marqueurs (généralement en révélant les guanines au diméthylsulfate).

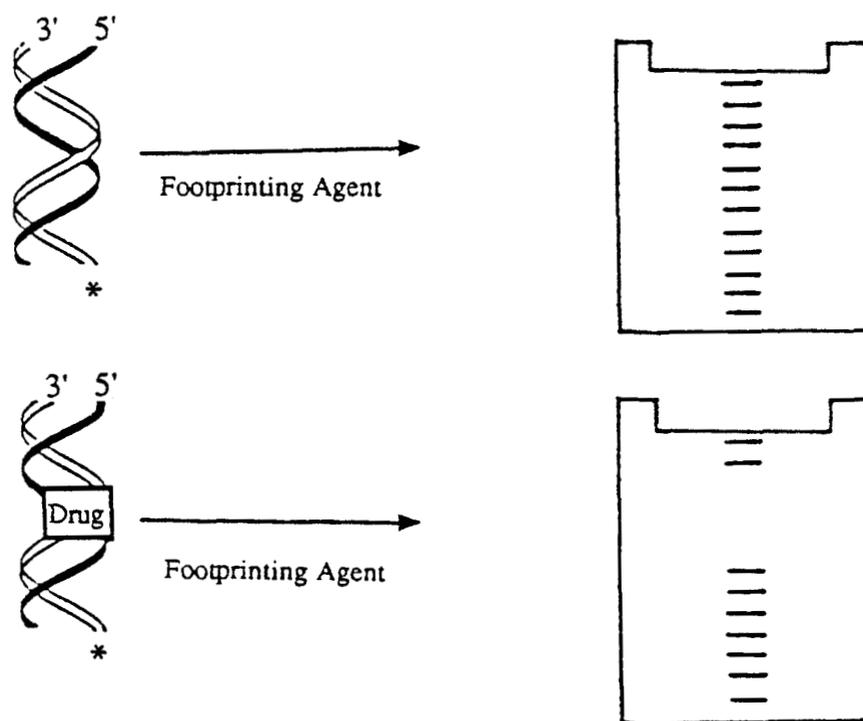


Schéma 1: Illustration d'une expérience de "footprinting"

L'étude par "footprinting" du composé Thia-Nt a été réalisée par l'intermédiaire de divers agents de coupure (enzymatiques et chimiques) ainsi que sur plusieurs fragments d'ADN de façon à obtenir le plus grand nombre d'informations possible. La spécificité de séquence de Thia-Nt a pu de cette façon être clairement établie. Ces résultats font l'objet de l'article suivant :

article n°2 : DNA-sequence specific recognition by a thiazole analogue of netropsin. A comparative footprinting study.

PLOUVIER, B., BAILLY, C., HOUSSIN, R., RAO, K.E., LOWN, J.W.,
HENICHART, J.P. & WARING, M.J.

Soumis pour publication à Nucleic Acids Research .

DNA-Sequence Specific Recognition by a Thiazole Analogue of Netropsin
A Comparative Footprinting Study

Bertrand Plouvier¹, Christian Bailly², Raymond Houssin¹, K. Ekambareswara Rao³,
William J. Lown^{3,*}, Jean-Pierre Hénichart^{2,*} and Micheal J. Waring^{4,*}

¹Institut de Chimie Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie, rue du Professeur Laguesse, 59045, Lille, France.

²INSERM unité 16, Place de Verdun, 59045, Lille, France.

³ Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, T6G 2G2, Canada.

⁴University of Cambridge, Department of Pharmacology, Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1QJ, England.

*Address correspondence to these authors.

Abstract

Four different footprinting techniques have been used to probe the DNA sequence selectivity of Thia-Net, a bis-cationic analogue of the minor groove binder netropsin in which the N-methylpyrrole moieties are replaced by thiazole groups. In Thia-Net the ring nitrogen atoms are directed into the minor groove where they could accept hydrogen bonds from the exocyclic 2-amino group of guanine. Three nucleases (DNAase I, DNAase II, and micrococcal nuclease) were employed to detect binding sites on the 160bp *tyr T* fragment obtained from plasmid pKMA-98, and further experiments were performed with 117mer and 253mer fragments cut out of the plasmid pBS. MPE·Fe(II) was used to footprint binding sites on an *EcoRI/HindIII* fragment from pBR322. Thia-Net binds to sites in the minor groove containing 4 or 5 base pairs which are predominantly composed of alternating A and T residues, but with significant acceptance of intrusive GC base pairs. Unlike the parent antibiotic netropsin, Thia-Net discriminates against homooligomeric runs of A and T. The evident preference of Thia-Net for AT-rich sites, despite its containing thiazole nitrogens capable of accepting GC sites by hydrogen bonding, supports the view that the biscationic nature of the ligand imposes a bias due to the electrostatic potential differences in the receptor which favour the ligand reading alternating AT sequences.

INTRODUCTION

Sequence-specific molecular recognition of DNA by proteins is central to the regulation of many cellular processes (1,2). Examination of the interaction between oligopeptides and DNA can be useful as a means of elucidating the structural basis for such selectivity. Moreover, studies of the interaction of oligopeptides with DNA have become increasingly important for the development of a rational approach to the design of new chemotherapeutic agents which interact at the gene level (3).

Netropsin (1) and distamycin, natural oligopeptide antibiotics (4) have proved useful as models for such sequence selectivity. They bind exclusively to AT-rich sequences in the minor groove of double stranded DNA (5-7) and interfere with replication and transcription processes. The development of lexitropsins (8), or information-reading molecules based on these oligopeptide antibiotics, revealed several factors which contribute to the molecular recognition process including (i) the ability of certain hydrogen bond-accepting heterocyclic moieties to mediate specific base pair recognition, (ii) the influence of ligand cationic charge in sequence selective binding, (iii) the role of Van der Waals contacts in 3'-terminal base pair recognition, and (iv) base site avoidance as a means of controlling sequence recognition (9-14). To explore further factor (i) above we now describe studies on Thia-Net, 2 (Fig. 1) a synthetic analogue of netropsin (1) in the structure of which the pyrrole rings of 1 are replaced by thiazole moieties and the amidine and guanidine by propanamidinium groups (15).

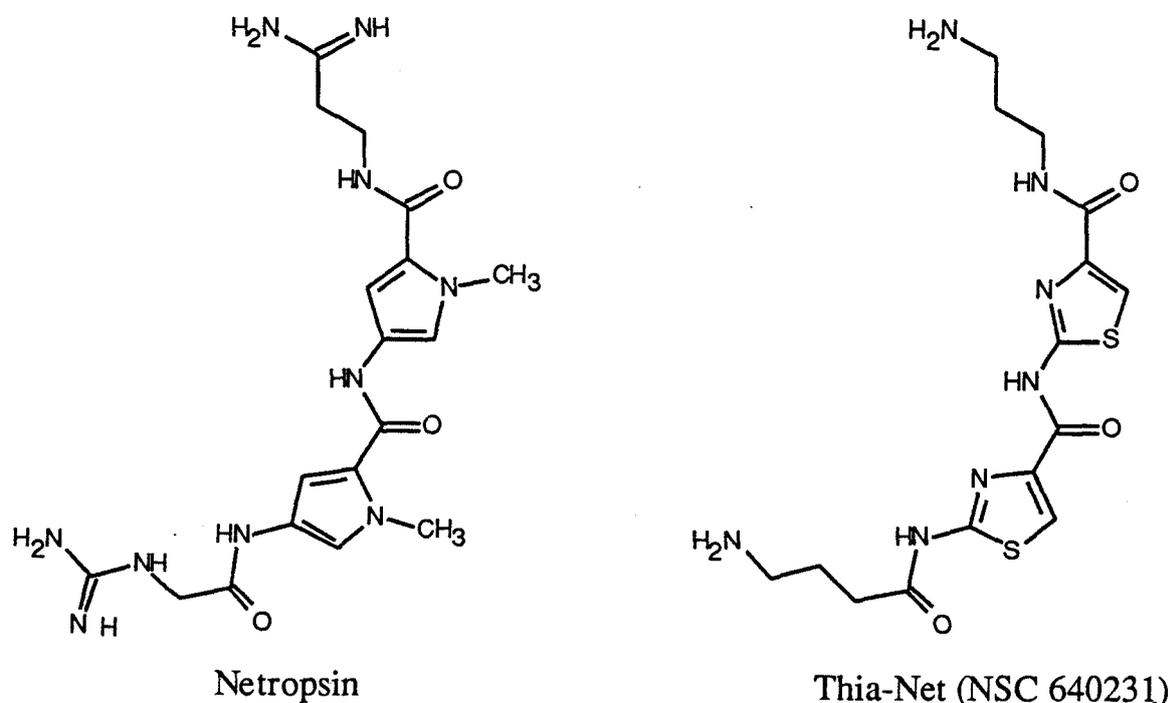


Figure 1: structure of netropsin (1) and the new thiazole-containing analogue Thia-Net (2).

Although footprinting has proved very informative concerning sequence recognition by DNA binding ligands, the results can depend on the type of cleaving agent employed. Ideally, the probe should be sensitive to DNA structure and should possess no sequence specificity. Two categories of cutting probes are commonly used, (i) enzymes, typified by DNAase I, which are very sensitive and produce easily recognisable binding sites, (ii) metal complexes, typified by EDTA-Fe, which possess very little sequence specificity and allow more accurate measurement of the drug binding site size. On the negative side, enzymatic probes exhibit a more or less pronounced sequence selectivity of cleavage and produce cleavage inhibition regions larger than the actual binding site. Metal chelates, which generate highly reactive radical species, produce extensive DNA-cleavage products leading to discrete footprints, but which may be more difficult to locate precisely (16). It is commonly believed that complete analysis of the sequence selectivity of a DNA ligand requires the use of a variety of footprinting probes. Therefore, we report a comparative study employing a number of different DNA cleaving agents (DNAase I, DNAase II, micrococcal nuclease and MPE-FeII) and using different restriction fragments.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Biochemicals

Full details of the synthesis of Thia-Net together with complete spectral and analytical characterization are reported elsewhere (15). Netropsin was a gift from Professor Federico Arcamone (Farmitalia, Milan, Italy). Stock solutions of the drugs were prepared in water.

pBR322 and sonicated calf thymus DNA, Hind III, EcoRI, DNAase II and micrococcal nuclease enzymes were obtained from Pharmacia. DNAase I was purchased from Sigma Chemical Co. The plasmid DNA pBS was from Stratagene (La Jolla, CA.). Restriction enzymes AvaI and PvuII were from New England Biolabs. T4 polynucleotide kinase, AMV reverse transcriptase and urea were from Bethesda Research Labs. Dithiothreitol and calf intestinal alkaline phosphatase were obtained from Calbiochem. Acrylamide, bromophenol blue and xylene cyanol were from Serva. Ferrous ammonium sulphate was from BDH. γ -[³²P]-ATP and α -[³²P]-dATP were purchased from New England Nuclear. Methidiumpropyl-EDTA (MPE) was a gift from Professor Peter Dervan (California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA).

Methods

DNA restriction fragments employed for enzymatic cleavage.

Three DNAs of different base composition, (i) the 160 bp *tyr* T DNA fragment, (ii) a 117 bp and (iii) a 253 bp DNA fragment from plasmid pBS were used in the nuclease cleavage studies. The *tyr* T DNA was obtained by digestion of the plasmid pKMΔ-98 with EcoR I and Ava I (17). This *tyr* T duplex has sticky ends of unique sequence. It was labelled at the EcoR I site on the lower strand (the Crick strand) with α -[³²P]-dATP and reverse transcriptase, so as to give specific 3'-end labelling. The 117 mer and 253 mer were obtained from the plasmid pBS digested with Pvu II/EcoR I and Pvu II/Ava I respectively. These digestions also yield fragments suitable for 3'-end labelling. The detailed procedures for isolation, purification and labelling of these duplex DNA fragments were described recently (18).

Enzymatic digestion conditions.

DNAase I, DNAase II and micrococcal nuclease footprinting experiments were carried out according to published procedures (19-21). Digestions were performed at 37°C in buffer with aliquots removed from the digestion mixture 1 and 5 minutes after the addition of the nuclease. DNAase I experiments included 0.02 unit/ml enzyme, 20mM NaCl, 2mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, pH 7.3. DNAase II cuts included 40 units/ml, 10 mM NH₄OAc, 1 mM EDTA, pH 5.6. Micrococcal nuclease cuts included 1 unit/ml, 50 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7.6. In each case reactions were stopped by adding 3 μ l 80% formamide containing 10 mM EDTA, 1 mM NaOH, 0.1% bromophenol blue and 0.1% xylene cyanol. Samples were heated to 90°C for 4 minutes prior to electrophoresis.

MPE footprinting procedure.

EcoR I digested pBR322 DNA was either 5'-[³²P]-labelled (using γ -[³²P]-ATP, calf alkaline phosphatase and T4 kinase) or 3'-[³²P]-labelled (using α -[³²P]-dATP and AMV reverse transcriptase) and then digested with Hind III. The resulting 4332 and 31 base pair fragments (22,23) were not separated prior to the cleavage reaction. The footprinting reactions were performed in the presence of sonicated calf thymus DNA, labelled DNA and ligand (not added to the control) in 10 mM Tris, 20 mM NaCl buffer, pH 7.4. After equilibrating the DNA-ligand mixtures for 20 min at 37°C, MPE-Fe(II) (freshly prepared) and DTT were added to each reaction tube. The final solutions contained 100 μ M DNA base pairs, 10 mM Tris, 20 mM NaCl, 10 μ M MPE-Fe(II), 2.5 mM DTT and 8, 16 or 78 μ M of ligand. Reactions were run at room temperature for 15 min and then stopped by freezing at -70°C. The solutions were then lyophilized and resuspended in formamide loading buffer (24) prior to gel electrophoresis.

The procedures used for gel electrophoresis, autoradiography, densitometry, and data processing were described recently (18). It is worth re-stating here that DNAase I products carry a 5'-phosphate and migrate in phase with guanine markers during electrophoresis. DNAase II (19) and MNase (21) products carry a 5'-hydroxyl and migrate 0.3-1.5 bonds more slowly than guanine markers, the difference in mobility being more marked with the shorter chains.

RESULTS

DNAase I footprinting experiments were carried out using all three DNAs having different arrangements of base pairs. For each DNA fragment, the products of digestion by DNAase I in the absence and presence of netropsin (**1**) and Thia-Net (**2**) were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis. Typical autoradiograms of DNAase I footprinting gels are illustrated in Figures 2 and 3 and correspond respectively to the 117 bp and 253 bp DNA fragments obtained from the pBS plasmid. Differences between the control lanes and those for the tested drugs can be clearly seen. Areas of decreased intensity (*i.e.* footprints) in ligand-containing lanes relative to ligand-free lanes reflect cleavage inhibition due to ligand bound to specific sequences of DNA. Densitometric analysis of the different patterns permits estimation of location and relative strength of binding at particular DNA sites. Figure 4 shows the differential cleavage plots obtained with the three DNA fragments in the presence of 10 μ M netropsin and 50 μ M Thia-Net. The dips in the plot (negative values) indicate sites of drug protection from DNAase I cleavage, whereas peaks (positive values) indicate regions of drug-induced enhancement of cleavage. We will consider the results obtained with each fragment in turn.

-The tyr T DNA fragment (Fig. 4, panel A). With 10 μ M netropsin five major sites of drug protection can be discerned at base positions 46, 65, 83, 110 and 128 (respectively sites 1, 2, 3, 4 and 5). These protected zones extend for 6-8 bases. As expected, all five of these netropsin-protected regions are situated in AT-rich sequences of the DNA. Adjoining these protected sites are regions where the DNAase I cutting rate has been substantially enhanced relative to the control. These regions of relatively enhanced cleavage always occur in runs of C or G, as for example at positions 72-78, 94-101 and 114-118 on this DNA. With the thiazole analogue **2**, it can be seen (i) that **2** produces weaker protection from DNAase I cutting than does **1**; and (ii) that the pattern of enhancement between nucleotide positions 80 and 135 is virtually identical for **2** and **1**. These regions include netropsin binding sites 3, 4 and 5. The binding site 1 observed for **1** (around position 46) is practically non-existent for **2**. More interesting is an

examination of the footprints at location 50-75 on this *tyr* T DNA. The site 2 of netropsin binding between position 62-68 is not recognized by compound 2, which seems in contrast to bind to two sites flanking the netropsin-binding site 2. These sites correspond to the sequences 3'-GAGTTG and 3'-AATGTC, *i.e.* to mixed sequences with a tendency to alternation of pyrimidines and purines. These sequences are weakly protected from DNAase I cleavage by compound 2 while the same sequences are overcut in the presence of 1. This first experiment suggests that 2 can accommodate AT-rich netropsin binding sites but can also accept binding sites containing GC base-pairs.

- The 117 bp DNA fragment (Fig.4, panel B) With this DNA there is practically no concentration dependence in the binding since 10 μ M and 50 μ M 2 affect the DNAase I digestion pattern more or less similarly (Fig. 2). The netropsin binding sites around positions 20 and 85 are also filled by compound 2. These sites contain alternating AT steps. With this DNA fragment, netropsin binds to two other sites around positions 43 and 62 corresponding to the sequences 3'-AAAA (42-45) and 3'-TTTT (63-66) (a 3'-shift by 1-2bp has been allowed for due to the bias introduced by the enzyme cutting). Compound 2 does not recognize these two sites and a large enhancement of DNAase I cleavage is evident around position 60. It is thus likely that 2 does not bind to runs of purely A or T. The sequences 3'-CCC (60-62), 3'-GGG (67-69), 3'-CCGC (71-74), 3'-GGG (78-80) and 3'-GCGG (89-92) on this 117 mer are not protected from cleavage but are often overcut, *i.e.* not accepted as binding sites for 2. Thus, it seems obvious that compound 2 is not a GC-specific minor groove binder. This observation is fully confirmed by the results obtained with other DNA fragments and enzymes (see below). With 2, a clear protected site is observed at position 46-50, *i.e.* at the sequence 3'-TGTTG, a sequence not particularly well recognized by netropsin. Thus, this second set of experiments confirms that compound 2 can accommodate AT-rich sites similar to those detected with netropsin as well as new sites containing G and/or C bases. Moreover it shows that runs of oligo(dA)·(dT) are not favoured.

- The 253 bp DNA fragment (Fig. 4, panel C). Illustrated in Fig. 3 are gels showing the DNAase I footprinting patterns determined with 1 and 2 on the 253 bp DNA fragment. A clear specific pattern of blockage can be discerned, chiefly centred around position 61 for compound 2. With this thiazole analogue a total of four major protected regions can be identified, located around positions 40, 61, 83 and 108 (sites 1, 2, 3 and 4 respectively). The size of these protected sites varies considerably from 6-7 bp to more than 12 bp, though the latter may well represent several overlapping binding sites. The densitometric analysis was limited to the regions of the gel where the bands are well separated. However, two additional sites can be discerned from the gaps in the gels near

positions 130 and 150 (Fig. 3). They lie beyond the range of accurate densitometric analysis but are clearly visible at the top of the autoradiograph.

Careful analysis of each lane of the gel in Fig. 3 (together with other gels) reveals that the pattern of cleavage varies with the ligand concentration at binding sites 3 (76-88) and 4 (100-113), while at binding sites 1 and 2 the changes in the pattern proved to be of the "all-or-none" variety; with little or no protection observed below 5 μ M (data not shown) and no further protection observed beyond 10 μ M. Thus the sites 1 and 2 can be considered as primary binding sites and account for the specific recognition propensity of 2. The sites 3 and 4 appear as secondary binding sites and are filled more gradually. The graded response at sites 3 and 4 may reflect a peculiarity of compound 2 to the effect that it lacks absolute sequence preference but can bind to several types of sequences with different affinities.

Regions where the cutting is enhanced in the presence of 2 compared with the control are also apparent. For example, enhanced cleavage can be detected at positions 44-46 (3'-GGG), 70-74 (3'-AACCG), 91-98 (3'-GACAAAGG) and 114-118 (3'-AGGCG), *i.e.* in regions containing mainly contiguous G or C nucleotides. Large enhancements were also detected in regions of poly(GC) with the *tyr* T DNA (see locations 72-79 and 94-102 in this DNA; Fig. 4, panel A). Thus the binding of compound 2 to pure GC sequences is clearly disfavoured.

The binding site 4 (100-113) is considered as composed of two smaller sites of sequences 3'-TTTAA and 3'-ATAGG (a 3'-shift of 1-2 bp still has to be allowed for). It is interesting to note that with 25 μ M compound 2 these two sites are filled to more or less the same extent while with 50 μ M 2 the second subsite (3'-ATAGG) is more protected, thus ostensibly preferred. Site 3 (76-88) can also be divided into two subsites of respective sequences 3'-ATTAG (a site also recognized by netropsin) and 3'-TACCAGTA (where protection occurs only with 2). Here again, raising the concentration from 25 μ M to 50 μ M results in a slightly greater preference for the second sequence 3'-TACCAGTA rather than the first one 3'-ATTAG. Binding to AT-rich sites containing G \pm C steps seems to be preferred to clusters consisting simply of alternating AT.

More interesting are the details of analysis of the primary sites 1 (37-44) and 2 (54-67) identified with compound 2. We can attribute the site 1 to the sequence 3'-AACAAGG. This site partially overlaps a netropsin binding site of sequence 3'-AAAAC. This observation supports our previous finding that 2 does not readily accept runs of A as binding sites but prefers sequences of alternating base composition. The conclusion is further confirmed by inspection of the region 47-50 (3'-AAAT) in the 253 mer which corresponds to one of the strongest binding sites for netropsin but corresponds to a region of enhanced cleavage with compound 2.

Detailed analysis of the site 2, 3'-CCCAATTAAAGCTC (55-68), is difficult because of its large size. This impressive site, which is by far the preferred binding site of

compound 2, undoubtedly corresponds to an overlap of at least two or three binding subsites. By contrast, netropsin only recognizes the central region of this sequence, *i.e.* 3'-TTAA.

Other complementary experiments were performed with DNAase II and micrococcal nuclease in order to elucidate the determinants of sequence recognition and to probe more accurately the exact nature of the various binding sites.

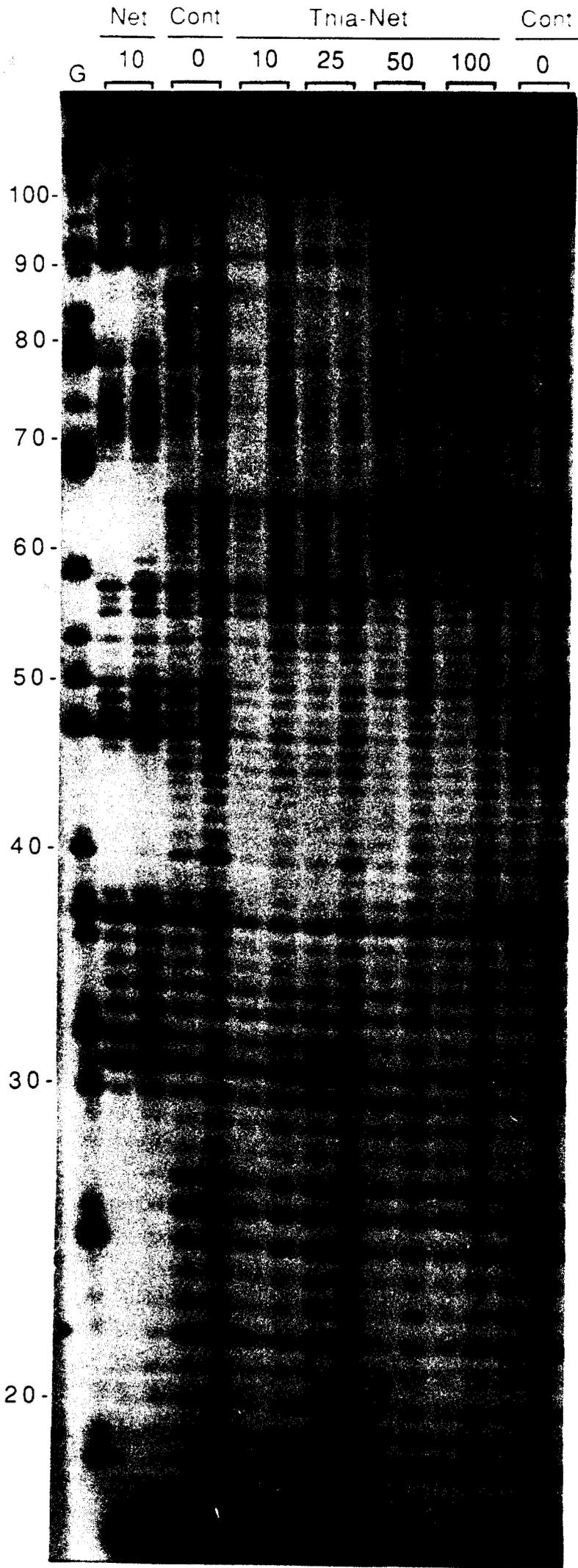


Figure 2: DNAase I footprinting with the 117-mer *PvuII-EcoRI* fragment of the plasmid pBS in the presence of different concentrations of Thia-Net (2). The concentration (μM) of the drug tested is shown at the top of the appropriate gel lanes. Each pair of lanes corresponds to digestion by the enzyme for 1 and 5 minutes. The tracks labelled "Net" contained no drug. The tracks labelled "Thia-Net" contained 10 μM netropsin (1). The track labelled "G" represents a dimethylsulphate-piperidine marker specific for guanine. Numbers at the left side of the gel refer to the sequence shown in the corresponding differential cleavage plot in Fig. 4B.

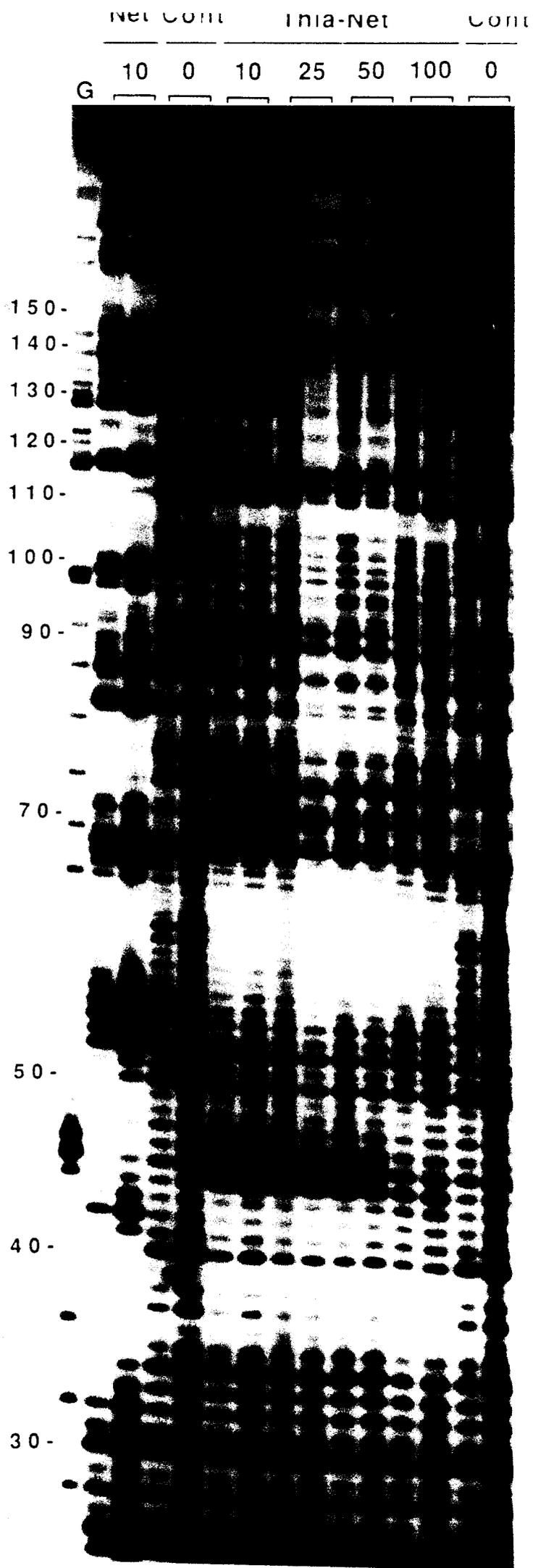


Figure 3: DNAase I reaction with the 253-mer *PvuII-AvaI* fragment of the plasmid pBS in the presence of different concentrations of ThiaNet (10 to 100 μ M). Other details as for Fig. 2.

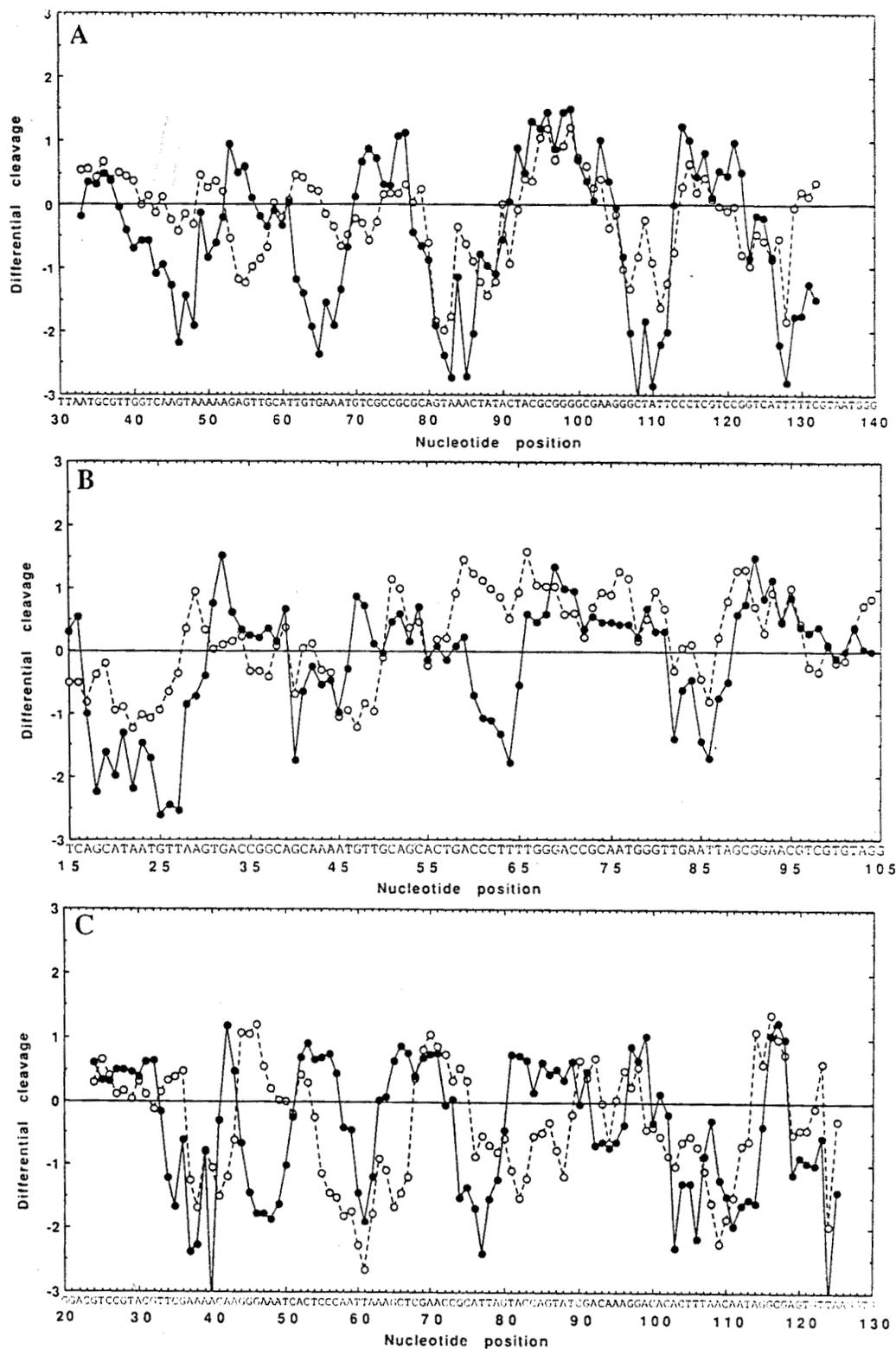


Figure 4: Differential cleavage plot showing differences in susceptibility of three DNA fragments to DNAase I cleavage in the presence of 10 μ M netropsin (●) and 50 μ M Thia-Net (○): **A** the *tyr* T DNA fragment; **B** the 117 bp fragment, and **C** the 253 bp fragment from the pBS plasmid. Vertical scales are in units of $\ln(f_a) - \ln(f_c)$, where f_a is the fractional cleavage at any bond in the presence of the drug and f_c is the fractional cleavage of the same bond in the control. Positive values indicate enhancement and negative values blockage. Deviation of experimental points toward the lettered sequence corresponds to a drug protected site and deviation away represents enhanced cleavage.

Micrococcal Nuclease Footprinting

Micrococcal nuclease (MNase) digestion patterns for the *tyr* T DNA fragment (Crick strand) measured in the presence and absence of **2** were examined and subjected to computation to produce the cleavage map presented in Fig. 5. Bands in the digests were readily assigned on the basis of the known selectivity of this enzyme for cutting pA and pT bonds (25). Netropsin binding sites on this DNA fragment have previously been located by MNase footprinting (21). The enzyme displays a notably greater activity towards alternating AT runs compared with homopolymeric runs of A or T. This property makes it a useful tool for assessing the selectivity of drugs like netropsin **1** and its thiazole analogue **2** which bind to AT-rich regions of the DNA. MNase is a smaller enzyme than DNAase I and is known to recognize single strands of the DNA double helix.

With the Crick strand of the *tyr* T fragment and DNAase I, we had observed three major sites which were recognized by both **2** and netropsin. These three sites are also detected by the use of MNase as cleaving agent. For example, a tract of cutting by MNase observed in the control lanes at positions 79-84 is not seen (or only very weakly) in the presence of compound **2**. By contrast, enhancement of MNase cutting is observed around position 89, flanking the binding site. Similar observations are made at the locations 103-104, 108-109 and 124-130 (cutting in the control, weak cutting or none detectable with **2**). Thus a good correlation can be found between DNAase I and MNase footprinting, which tends to validate both sets of observations.

DNAase II Footprinting

Patterns of DNAase II digestion of the 117 bp DNA fragment in the presence and absence of compound **2** were analysed and converted into differential cleavage plots as shown in Fig. 6 (Panel A). DNAase II does not provide a sufficiently uniform distribution of cleavage products to define accurately the limits of ligand-induced protection. However, upon careful inspection, zones of protection from DNAase II attack can be observed in many of the same places as for DNAase I (compare with the plot in Fig. 4). For example, region 53-65 appears as a major location of enhanced cleavage for both DNAase I and DNAase II treatments. In addition, the sequences 3'-TGTTG (46-50) and 3'-TTAG (86-89), revealed as binding sites for compound **2** by the use of DNAase I, are also protected from cleavage by DNAase II. DNAase I revealed the sequence 3'-TGTTG (46-50) as a specific site for binding of **2** but not for **1**. DNAase II validates this region as a zone of protected cleavage. It should also be noted that the weak protection around position 36 (3'-CGGC) detected with DNAase I also appears with DNAase II.

In order to clarify and extend the previous observations, similar DNAase II footprinting experiments were carried out with the 253 mer in which DNAase I had revealed the major binding sites of compound **2**. Fig. 7 shows the autoradiograph from

DNAase II digestion of the drug-treated 253 mer duplex. Because the enzyme cuts best in purine-rich sequences, especially at GpA and GpC steps (17), it is particularly useful for examining the ability of **2** to bind to GC-containing AT-rich sequences. A direct comparison between **1** and **2** can be made from the corresponding differential cleavage plots shown in Fig.6 (Panel B). This densitometric analysis is limited to about 130 bp; the top of the gel could not be finely scanned although some other marked differences between **1** and **2** were evident in the region of the longer DNA fragments; for example, **1** induces cutting around position 140, but not **2** (Fig.7). Strong DNAase II cleavage is evident around positions 43-50, 112-116 and 126-128 with **2** but not with **1**. The completely different patterns of DNAase II cleavage in the presence of netropsin and Thia-Net, emphasised in Fig. 6B, highlight the marked difference between their DNA sequence recognition properties. One of the most significant observations is that the sequence 3'-GAAAT (46-50), monitored by both DNAase I and DNAase II as a specific recognition site for **1**, is not recognized as a binding site by **2**. In addition, DNAase II reveals the existence of a strong binding site for compound **2** around position 30, at the sequence 3'-CGTACGT, a region of perfectly alternating pyrimidine-purine nucleotides. This site is not protected by netropsin. DNAase II also reveals other binding sites for compound **2** around positions 86 (3'-CAGTAT) and 101 (3'-CACA), still in sequences of alternating pyrimidine-purine.

We now consider the location 54-67, by far the strongest binding site of compound **2** detected with DNAase I (see Fig. 3). This site is about 14 bp in length and we originally postulated the involvement of three subsites, 3'-CCCAA, 3'-TTAA (the only one recognized by **1**) and 3'-AGCTC. With DNAase II as cleaving agent, this site is also more evidently protected by **2** than by **1**. Because of the smaller size of DNAase II compared with DNAase I, the size of this composite binding site can be more precisely defined and it seems to contain 12 bases extending from nucleotide positions 56 to 67. It appears likely, in fact, that an overlap of two sites rather than three sites occurs in this zone. The sequence 3'-TAAAG in this site is well protected by **2** but not by **1**. Interestingly, the sequence 3'-GAAAT in the same fragment (46-50) is only recognized by **1** and not by its thiazole analogue **2**.

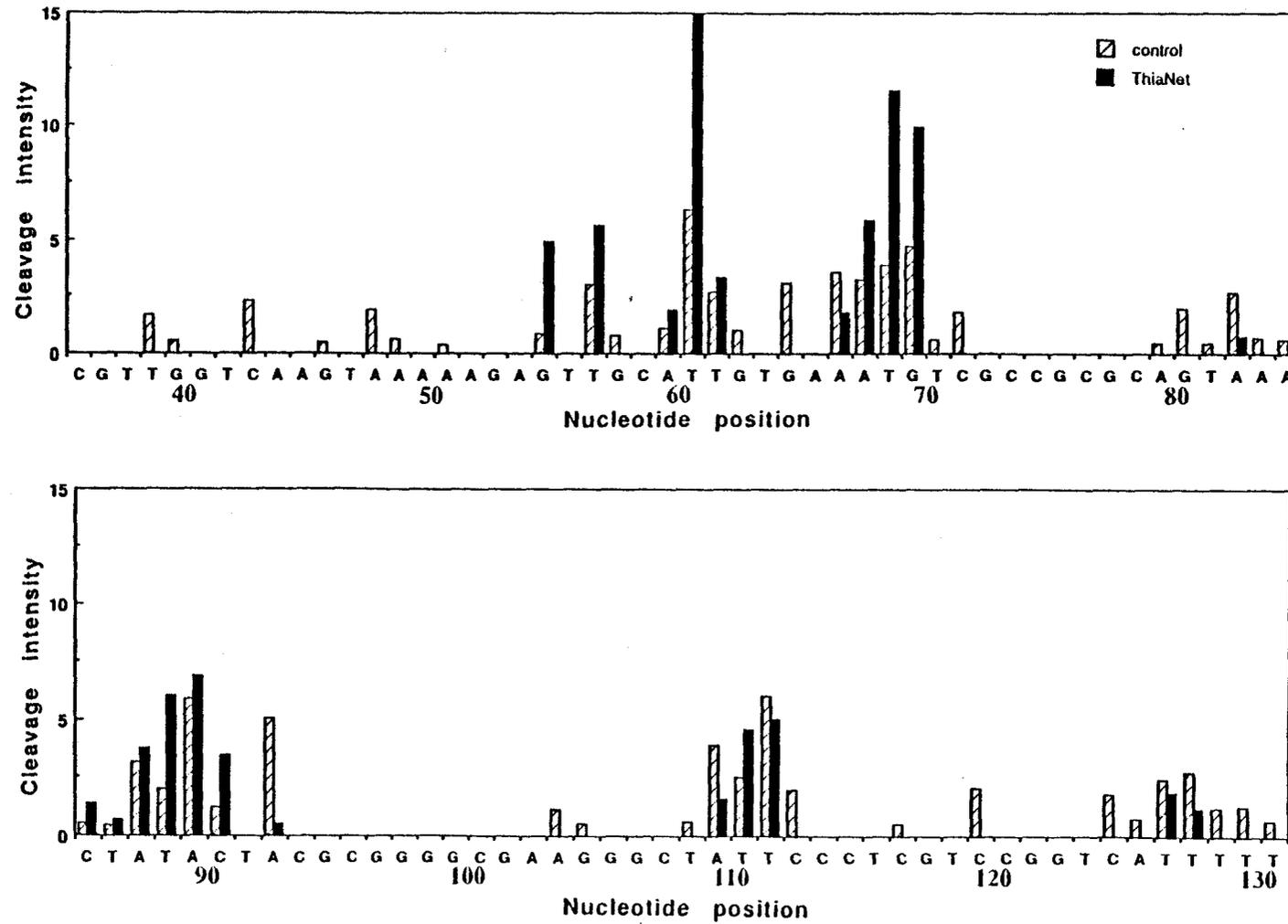


Figure 5 : Summary map of micrococcal nuclease reactive sites on the Crick strand of the *tyr T* DNA fragment in the absence and presence of 50 μ M ThiaNet. Reactive sites are represented in the form of bars, with the height proportional to the intensity of the enzyme cleavage deduced from the autoradiography film.

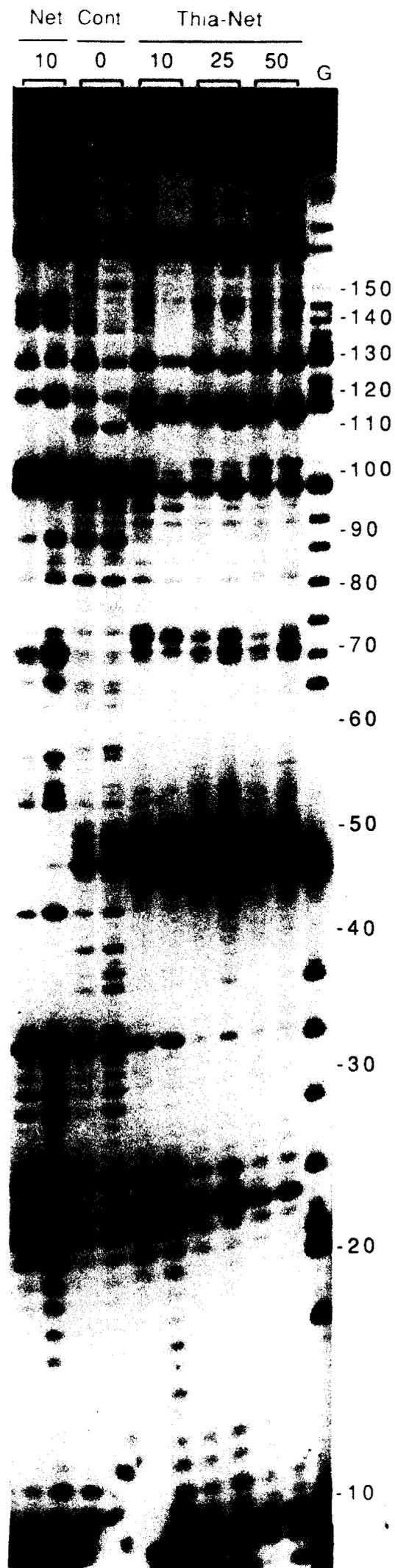


Figure 7: DNAase II digestion patterns of the 253bp DNA fragment in the absence (cont) and presence of various concentrations of netropsin or Thia-Net as specified above the relevant lanes. Other details as for Fig. 2.

MPE-Fe(II) Footprinting experiments were carried out using the *EcoRI-HindIII* DNA restriction fragment from pBR322 which has been used for many previous drug-binding studies with this reagent (10-14). The rationale behind this experiment is that the use of small DNA-cleaving radical species (*i.e.* OH \cdot generated by the metal complex) should allow a more accurate estimation of the drug binding site sizes. Moreover, DNA cleavage by MPE-Fe is by far less sequence specific than DNAase I and so should give better definition of each binding site, perhaps allowing the identification of individual closely spaced drug binding sites.

The location and size of binding sites for **1** and **2** were measured on the basis of the positions of the maxima of asymmetric inhibition patterns generated by the ligands on opposite strands (26). The relative binding site sizes may be deduced from the footprints of the ligands shown in the form of histograms in Fig. 8.; the analysis extends from nucleotide positions 4250 to 4325 of plasmid pBR322. With this DNA fragment, the thiazole ligand **2** gives weak footprints compared to netropsin. At low drug/DNA molar ratio r' (<0.16) no footprints are observed with **2** whereas **1** gives strong footprints, confirming the lower affinity of **2** for DNA compared to **1** (**1**, $K_a=2.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; **2**, $K_a=1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, for calf thymus DNA) (15). However, clear footprints were observed at higher drug/DNA ratios. These experiments confirm that **2** is broadly AT selective in sequence preference since the footprints are located in the AT-rich region (bases 4290-4320) of the DNA fragment studied. The strongest footprints seen with netropsin occur at 5'-ATTT (4264-4267), 5'-AAAA (4273-4276), 5'-GAAA (4294-4298) and 5'-ATTA (4304-4307) when $r'=0.16$. Thia-Net leaves its strongest footprints at 5'-TAAG (4292-4295), 5'-TTATT (4302-4306), 5'-TCAT (4308-4311) and 5'-ATTA (4315-4318) when $r'=0.78$. A notable feature of these footprints is that the thiazole compound does not show binding to the AT-rich clusters 5'-ATTT (4264-4267) or 5'-AAAA (4273-4276) and thus clearly differs from netropsin which leaves strong footprints at both these sequences. Enhancement of cleavage by MPE-Fe(II) is observed with the two ligands, most notably at the base pairs adjacent to the footprinted regions. With Thia-Net, six times greater cleavage enhancement is observed at guanines 4271 (CGG) and 4300 (TGG) on the 5'-labelled (lower) strand than at other bases. Although both these Gs are flanked by another G on the 3'-side and by a pyrimidine base on the 5'-side, no strict sequence preference is apparent as regards cleavage enhancement. Netropsin indicated a binding site size of 4 base pairs. The measured binding site size for **2** is 4 to 5 base pairs, as expected for a typical minor groove binding ligand.

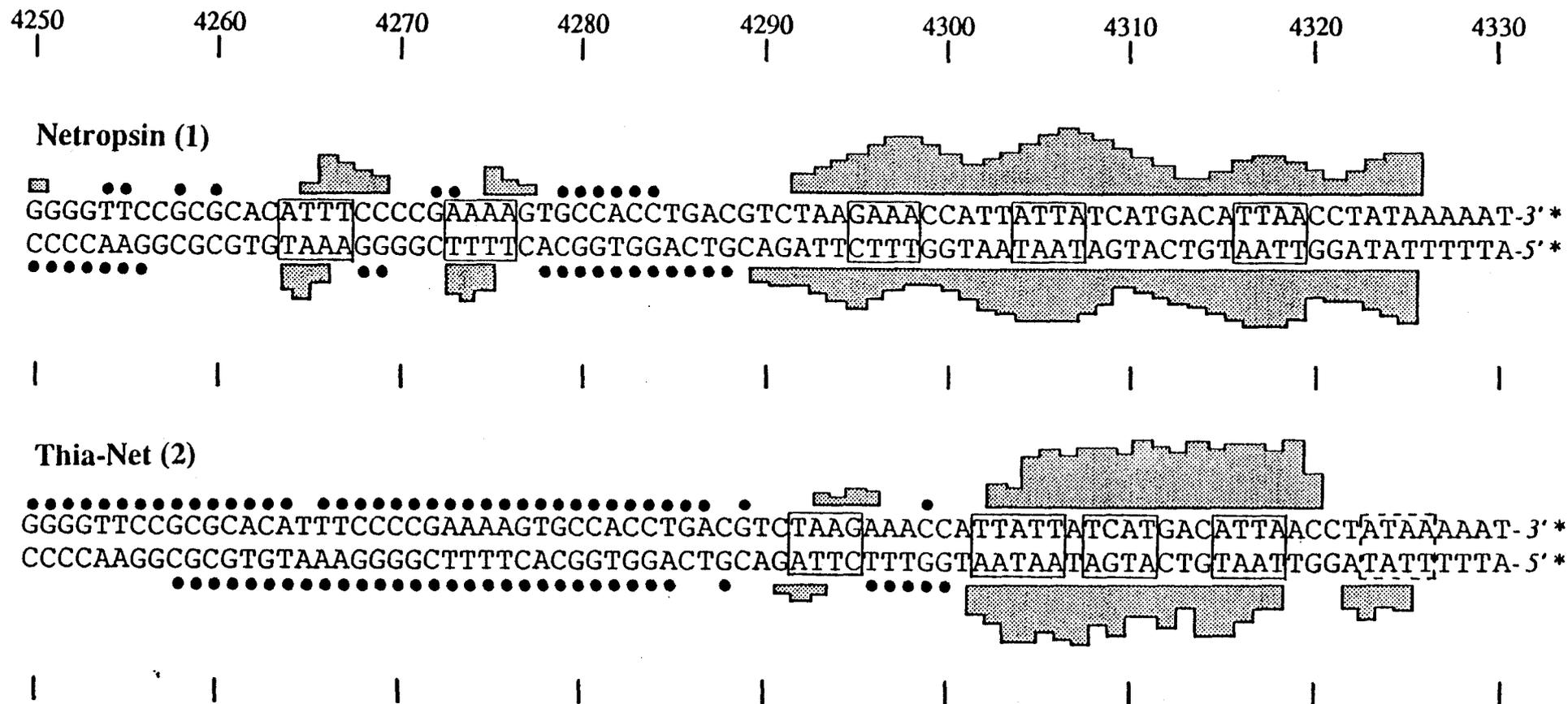


Figure 8: MPE-Fe(II) footprinting of netropsin 1 (at $r=0.16$) and Thia-Net 2 (at $r=0.78$) with the 3'- 32 P end-labelled *EcoRI/HindIII* fragment from pBR322. Histogram height is proportional to the reduction of cleavage at each base relative to the control.

* Designates the labelled end of the DNA. Boxes indicate proposed binding locations and •••• indicates cleavage enhancement at these sites.

DISCUSSION

The crystal structure of a netropsin-oligonucleotide complex (27) suggested that replacement of the 3-methine group of its pyrrole rings by a suitable heteroatom that can accept a hydrogen bond from the 2-NH₂ of guanine could lead to compounds with altered sequence preference compared to the strict AT-selectivity of netropsin. Accordingly, several lexitropsins or information reading oligopeptides have been developed having imidazole (9-14), furan (28,29), pyridine (30), thiazole (15,31-34) and triazole (35) in place of one or more of the N-methylpyrrole units in netropsin and distamycin. Most of these resulting compounds were shown to accept GC base pairs with consequent altered sequence preference. That is clearly the case with the new analogue reported here.

Moreover, the present results show that the limitations imposed by the sequence and structural specificity of a particular cleavage reagent can be eliminated, or at least diminished, by using several different cutting probes. This combined approach, using DNAase I, DNAase II, MNase and MPE-Fe(II) permits a substantially more complete and accurate comparison between netropsin (1) and its synthetic thiazole-containing derivative (2) than would be possible with any one reagent alone. In common with observations drawn from earlier studies we find that enzymatic probes are more sensitive but that MPE is more accurate in determining the actual site size (36). This is especially true for Thia-Net which exhibits clear sequence-specificity but whose overall DNA affinity is relatively poor. In this case, the extreme sensitivity of DNAase I was particularly useful compared to MPE which probably competes too successfully with the ligand, yielding less easily discernible footprints. Other useful conclusions emerge concerning the use of the endonucleases MNase and DNAase II. Because of their high sequence specificity, they are rarely used and often considered as poor footprinting reagents. They have been tested mostly against AT-specific ligands (7,21,37). We find that these enzymes can, under the right circumstances, yield extremely interesting complementary information in the case of non-strictly AT-specific ligands; in some ways they are particularly well adapted for footprinting lexitropsins.

The results obtained from footprinting with the various cleaving agents correlate well. In broad terms, Thia-Net (2) retains the preference of netropsin for binding to AT-rich regions of the DNA. However, it is obvious that there exist significant differences between their sequence-recognition properties. The two minor groove binders differ principally in two respects. Firstly, binding to homooligomeric runs of a single base (regardless of which one) is strongly disfavoured by Thia-Net but not by netropsin. Secondly, Thia-Net can accept at least one internal GC base pair in contrast to netropsin. There are clear indications that compound 2 actually binds preferentially to certain AT-rich

clusters containing a G or C nucleotide, particularly in sequences where there is an alternating pyrimidine-purine motif.

Netropsin, by virtue of its biscationic nature, binds more strongly to homopolymeric (dA) \cdot (dT) sequences than to alternating (dA-dT) sequences where higher electronegative potential exists in the minor groove of DNA. However, the new compound containing two thiazole units having N facing the floor of the minor groove (and which is also biscationic) does not show any binding to homo(dA) \cdot homo(dT) sequences but instead provokes slight enhancement of cleavage. Probably this is an indication of the ligand's requirement for GC bases or alternating AT sequences for binding. The difference in sequence selectivity of binding between netropsin and compound 2 plausibly derives from a different disposition of their respective hydrogen-bonding groups. It should be noted also that whatever the DNA-cleaving agent used (enzyme or OH \cdot radicals), numerous sites of marked enhanced cleavage are observed. These enhanced cleavages, mostly located in GC-rich regions (*i.e.* away from the binding sites), likely arise from a redistribution of the cutting agent along the DNA (38). Enhanced cleavages could also derive from drug-induced DNA structural changes, as observed with intercalating agents (18,39). But in the present case this hypothesis is unlikely because minor groove binders are known to affect the conformation of the DNA backbone only weakly (2Å reduction of the groove width and bending of the helix by about 8° per drug molecule) (27).

It has been shown by footprinting and 2D-NMR studies that a bis-imidazole lexitropsin bearing two cationic charges, otherwise structurally related to netropsin retains memory for AT sequences while the corresponding monocationic bis-imidazole lexitropsin related to distamycin has no memory for AT stretches (10,11,40). It is plausible that for similar reasons of electrostatic charge our new thiazole compound binds to AT sequences like its parent molecule, and occasionally accepts an internal GC base pair.

To sum up, the new compound that we designed to exhibit altered sequence preference with a shift from AT towards GC base pairs effectively behaves differently from netropsin. It binds to discrete sites containing 4 or 5 base pairs with occasional acceptance of an internal GC base pair, almost certainly in the minor groove of DNA. However, its biscationic nature probably imposes a bias due to the electrostatic potential properties of the receptor (41) which favour the ligand reading alternating AT sequences. Thus the present studies illustrate once more how the lexitropsin approach has been blessed with signal success since, for the first time, a rational strategy for reading DNA sequences has been elaborated, then theoretically and experimentally confirmed. However, we must admit that studies such as this also reveal where limitations are imposed. The design of pure GC-reading DNA ligands starting from AT-specific natural

drugs has still not been attained. Other parameters, other approaches, will be necessary before such an ambitious goal can be attained.

Future design of GC-reading oligopeptides will demand, among other things, a more careful consideration of the notions of geometrical fitting to DNA, hydrogen bonding capabilities and some measure of the overall electronic properties of the DNA-interacting species (42,43). New generations of lexitropsins in which the amide linkage between the N-methylpyrrole units of netropsin will be replaced by shorter linkers are currently under development. On the basis of molecular modelling studies, and taking into account the parameters cited above, two different ways of shortening the netropsin backbone have been proposed. In one the CO or NH moiety of the amide bond would be eliminated (yielding "isolexins") (44). In another the amide bond would be replaced by a C=C double bond (yielding "vinylexins") (45). The idea is that grafting one or other of these novel design features on to the lexitropsin concept (*i.e.* introducing hydrogen-bond acceptors together with modification of the interunit linkage) should allow a correct synchronous meshing with base pairs along the floor of the minor groove of DNA.

Acknowledgements

This investigation was supported by grants (to M.J.W.) from the Cancer Research Campaign, the Medical Research Council and the Royal Society, U.K., (to J.W.L.) from the Natural Science Engineering Research Council of Canada and (to J.P.H.) from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France. We thank Dean Gentle for his excellent technical assistance.

References

1. Struhl, K. (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14, 137-140.
2. Churchill, M.E.A. & Travers, A.A. (1991) *Trends Biochem. Sci.* 16, 92-97.
3. Nielsen, P.E. (1991) *Bioconjugate Chem.* 2, 1-12.
4. Zimmer, C. & Wahnert, U. (1986) 47, 31-112.
5. Van Dyke, M.W., Hertzberg, R.P. & Dervan, P.B. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5470-5474.
6. Zimmer, C., Luck, G., Burckhardt, G., Krowicki, K. & Lown, J.W. (1986) *Molecular Mechanism of Carcinogenic and Antitumor Activity*, Eds., C. Chagas, B. Pullman, Adenine Press, NY, pp.339-363.
7. Portugal, J. & Waring, M.J. (1987) *Eur. J. Biochem.* 167, 281-289.
8. Lown, J.W. (1988) *Anti-Cancer Drug Design* 3, 25-40.
9. Lown, J.W., Krowicki, K., Balzarini, J. & De Clercq, E. (1986) *J. Med. Chem.* 29, 1210-1214.
10. Lown, J.W., Krowicki, K., Bhat, U.G., Skorobogaty, A., Ward, B. & Dabrowiak, J.C. (1986) *Biochemistry* 25, 7408-7416.
11. Kissinger, K.L., Krowicki, K., Dabrowiak, J.C. & Lown, J.W. (1987) *Biochemistry* 26, 5590-5595.
12. Lee, M., Krowicki, K., Hartley, J.A., Pon, R.T. & Lown, J.W. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 3641-3649.
13. Lee, M., Chang, D.K., Hartley, J.A., Pon, R.T., Krowicki, K. & Lown, J.W. (1988) *Biochemistry* 27, 445-455.
14. Lee, M., Coulter, D.M., Pon, R.T., Krowicki, K. & Lown, J.W. (1988) *J. Biomol. Struct. Dynam.* 5, 1059-1087.
15. Plouvier, B., Houssin, R., Bailly, C. & Hénichart, J.P. (1989) *J. Heterocyclic Chem.* 26, 1643-1647.
16. Dabrowiak, J.C. & Goodisman, J. (1989) *Chemistry and Physics of DNA-ligand Interaction*, Ed. N.R. Kallenbach, Adenine Press, N.Y., pp.143-174.
17. Drew, H.R. & Travers, A.A. (1984) *Cell* 37, 491-502.
18. Bailly, C., OhUigin, C., Rivalle, C., Bisagni, E., Hénichart, J.P. & Waring, M.J. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 6283-6291.
19. Low, C.M.L., Drew, H.R. & Waring, M.J. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 4865-4879.
20. Fox, K.R. & Waring, M.J. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9271-9285.
21. Fox, K.R. & Waring, M.J. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 909, 145-155.
22. Sutcliffe, J.G. (1979) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 77-90.
23. Peden, K.W.C. (1983) *Gene* 22, 277-280.

24. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning* (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
25. Flick, J.T., Eissenberg, J.C. & Elgin, S.C.R. (1986) *J. Mol. Biol.* 190, 619-633.
26. Harshman, K.D. & Dervan, P.B. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13, 4825-4835.
27. Kopka, M.L., Yoon, C., Goodsell, D., Pjura, P. & Dickerson, R.E. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1376-1380.
28. Lee, M., Krowicki, K., Shea, R.G., Pon, R.T. & Lown, J.W. (1989) *J. Molec. Recogn.* 2, 84-93.
29. Rao, K.E., Bathini, Y. & Lown, J.W. (1990) *J. Org. Chem.* 55, 728-737.
30. Wade, W.S. & Dervan, P.B. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 1574-1575.
31. Bailly, C., Houssin, R., Bernier, J.L. & Hénichart, J.P. (1988) *Tetrahedron* 44, 5833-5843.
32. Kumar, S., Jaseja, M., Zimmermann, J., Yadagiri, B., Pon, R.T., Sapse, A.M. & Lown, J.W. (1990) *J. Biomol. Struct. Dynam.* 8, 99-121.
33. Rao, K.E., Shea, R.G., Bathini, Y. & Lown, J.W. (1990) *Anti-Cancer Drug Design* 5, 3-20.
34. Plouvier, B., Bailly, C., Houssin, R. & Hénichart, J.P. (1991) *Heterocycles* 32, 693-701.
35. Rao, K.E., Krowicki, K., Burckhardt, G., Zimmer, C. & Lown, J.W. (1991) *Chem. Res. Toxicol.*, submitted.
36. Van Dyke, M.W. & Dervan, P.B. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 5555-5567.
37. Portugal, J. & Waring, M.J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 949, 158-168.
38. Ward, B., Rehfuss, R., Goodisman, J. & Dabrowiak, J.C. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 1359-1369.
39. Huang, Y., Rehfuss, R.P., La Plante, S.R., Boudreau, E., Borer, P.N. & Lane, M.J. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 11125-11139.
40. Lee, M., Hartley, J.A., Pon, R.T., Krowicki, K. & Lown, J.W. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 665-684.
41. Lavery, R., Pullman, A. & Pullman, B. (1982) *Theor. Chim. Acta* 62, 93-106.
42. Gago, F., Reynolds, C.A. & Richards, W.G. (1989) *Mol. Pharmacol.* 35, 232-241.
43. Laughton, C.A., Jenkins, T.C., Fox, K.R. & Neidle, S. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 4479-4488.
44. Goodsell, D. & Dickerson, R.E. (1986) *J. Med. Chem.* 29, 727-733.
45. Zakrzewska, K., Randrianarivelo, M. & Pullman, B. (1988) *J. Biomol. Struct. Dynam.* 6, 331-344.

Cette étude approfondie en "footprinting" a permis de mettre en évidence plusieurs séquences spécifiquement reconnues par Thia-Nt, séquences riches en adénine et en thymine contenant des guanines et/ou des cytosines et présentant une alternance de bases puriques et pyrimidiques. Cependant la nature des liaisons mises en jeu lors de l'interaction de Thia-Nt avec l'ADN reste hypothétique; c'est la raison pour laquelle nous avons entrepris l'étude de l'interaction de Thia-Nt avec l'oligonucléotide d(CGTACG)₂ en solution par résonance magnétique nucléaire du proton, à haute résolution. Le choix de l'oligonucléotide s'est porté sur la séquence autoccomplémentaire 5'-CGTACG-3' pour deux raisons :

-la séquence CGTACG correspond à l'une des séquences protégées par Thia-Nt de la coupure par la DNAase II (Cf article n° 2).

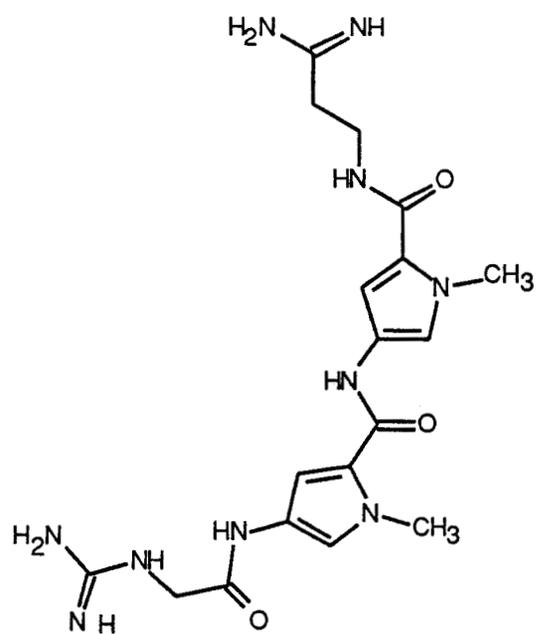
-l'oligonucléotide d(CGTACG)₂, outre son autoccomplémentarité qui facilite la synthèse, a déjà fait l'objet d'études en RMN (Clare *et al.*, 1985; Lane et Forster, 1989; Lane, 1990) et les structures cristallines de la daunomycine (Quigley *et al.*, 1980) de l'échinomycine et de la triostine A (Wang *et al.*, 1984; Ughetto *et al.*, 1985) liées à la séquence nucléotidique d(CGTACG)₂ ont été établies.

L'oligonucléotide d(CGTACG)₂ a été synthétisé en phase solide, au laboratoire avec le concours du Dr. Nicole Helbecque, selon la méthode aux phosphoramidites (Cf partie expérimentale p.129) (Beaucage et Caruthers, 1981; Matteuci et Caruthers, 1980, 1981). L'étude de l'interaction Thia-Nt/d(CGTACG)₂, en cours, est réalisée par l'équipe du Pr. J.W. Lown, dans le but de déterminer un modèle moléculaire de l'interaction Thia-Nt/d(CGTACG)₂.

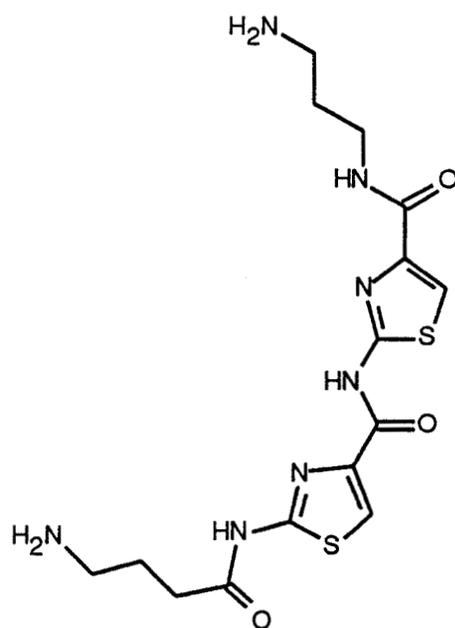
Parallèlement au travail concernant le composé Thia-Nt et simultanément aux travaux récents de Lown et collaborateurs sur les lexitropsines comprenant un hétérocycle thiazole (Rao *et al.*, 1990a,b; Kumar *et al.*, 1990), nous avons poursuivi l'élaboration d'analogues thiazoliques. Le composé Thia-Nt présente des atomes d'azote sur sa face concave susceptibles d'accepter des guanines lors de son processus de reconnaissance avec l'ADN, propriété dont est dépourvue la Nt. Cependant Thia-Nt ne possède pas les groupements méthyle que l'on trouve sur la face convexe de la Nt (Figure 10) et dont l'importance dans le processus de liaison a été démontrée par des calculs quantiques (Manning et Woody, 1986).

Il nous a alors semblé judicieux de synthétiser l'analogue Methia-Nt (Figure 10), qui se caractérise par la présence d'un groupement méthyle en position 5 du thiazole, dans une position identique à celle observée pour la Nt.

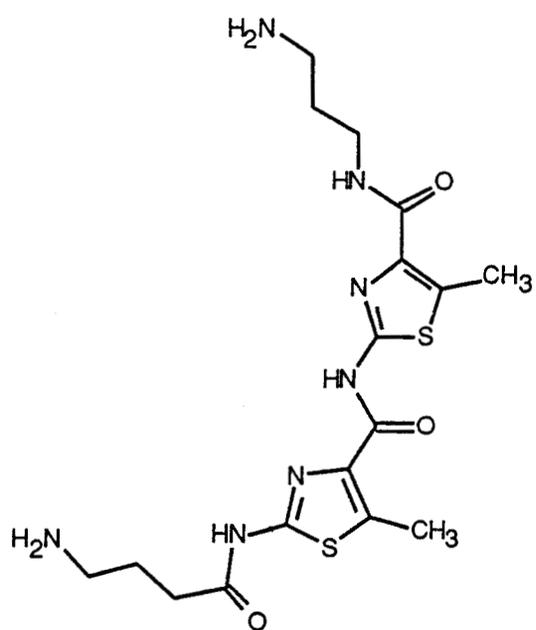
D'autre part, si les atomes d'azote hétérocycliques, orientés du côté de la face concave de la molécule, semblent permettre la reconnaissance de séquences comportant des guanines, qu'en est-il d'un atome de soufre? Pour tenter de répondre à cette question le composé Isothia-Nt a été synthétisé (Figure 10); il comporte deux hétérocycles thiazole: le thiazole en position N-terminale présente l'atome d'azote à l'intérieur de la courbure du squelette pseudopeptidique alors que celui en position C-terminale possède un atome de soufre orienté du côté concave.



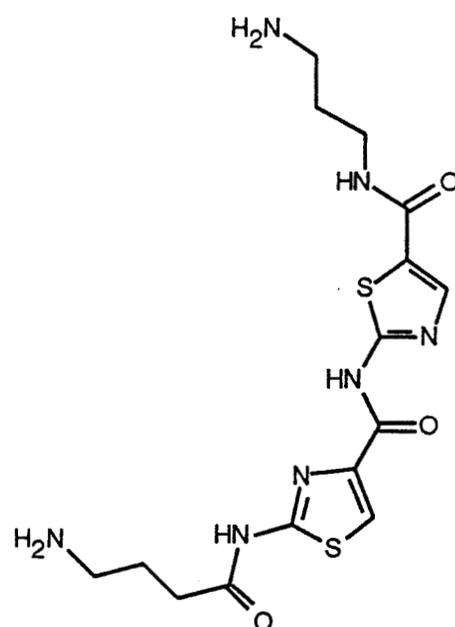
Nétropsine



Thia-Nt (NSC 640231)



Methia-Nt



Isothia-Nt

Figure 10 : Structure de la Nt et des dérivés à noyaux thiazole (Thia-Nt, Methia-Nt et Isothia-Nt)

La synthèse des analogues Methia-Nt et Isothia-Nt a fait l'objet de l'article suivant :

I.3.2. Methia-Nt et Isothia-Nt :

article n°3 : Synthesis of two new thiazole-containing oligopeptides as potential DNA minor groove binding analogs of netropsin.

PLOUVIER, B., BAILLY, C., HOUSSIN, R. & HENICHART, J.P.

Heterocycles (1991) 34, 693-701.

SYNTHESIS OF TWO NEW THIAZOLE-CONTAINING OLIGOPEPTIDES AS POTENTIAL DNA MINOR GROOVE BINDING ANALOGS OF NETROPSIN

Bertrand Plouvier[†], Christian Bailly[□], Raymond Houssin[†], and Jean-Pierre Hénichart^{□*}

[†] Institut de Chimie Pharmaceutique, Université de Lille II, rue J. Laguesse 59045 Lille, France

[□] U16 INSERM, Place de Verdun 59045 Lille, France

Abstract - On the basis of previous studies on synthetic models related to the antibiotic agents Netropsin and Distamycin-A, the design and synthesis of two potential DNA minor groove ligands are described. Methia-Nt and Isothia-Nt were prepared by liquid-phase peptidic synthesis from the key compounds ethyl 2-amino-5-methylthiazole-4-carboxylate (1) and ethyl 2-aminothiazole-5-carboxylate (8) respectively.

Most of antitumor agents used in clinic are thought to exert their cytotoxic activity by modifying the DNA metabolism.¹ Beside drugs which covalently bind DNA,² other compounds are known to induce DNA breakage or inhibit the nucleic acids synthesis by intercalative³ or non intercalative⁴ processes. Among this last class, two natural compounds, the antibiotics Netropsin (Nt) and Distamycin-A (Dst) form highly ordered complexes in the minor groove of DNA and recognize particular nucleotide sequences of double-stranded DNA^{4,5} with a high Adenine-Thymine (AT) specificity. These DNA binders could constitute adequate models for the design of synthetic pseudopeptides, referenced as sequence-reading oligopeptides,⁶ in order to modify the biological processes of replication and transcription: as such, they can constitute adequate candidates for antiviral and antineoplastic activities.

Because of current interest in the control of gene expression, increasing works aim at developing DNA sequence specific agents. For these reasons, it seems particularly interesting to apply the concept of molecules possessing at once strong affinity and specific binding properties to definite nucleotidic sequences. Such molecules would be of great utility when such a recognition is essential on predetermined oligonucleotidic sequence of oncogenes for example.

Thus, in order to delineate the structural, conformational and chemical basis of DNA binding, systematic modifications on Nt and Dst have been fulfilled, implying the different factors responsible for the processes of molecular recognition. In this context, analogs of Nt have been built via replacement of one or two pyrrole units by other heterocycles such as imidazole,^{7,8} oxazole⁹ or thiazole.¹⁰⁻¹⁴ The consequences of such substitutions in terms of AT specificity alteration and GC acceptance enhancement have been analyzed and, in addition, the influence of the nature and length of the cationic side chain on the specificity of interaction has been proposed.^{6,15}

Considering these previous works, we recently report the synthesis and preliminary results about an analog of Nt, namely Thia-Nt (Figure 1), where the implicated heterocycle is the thiazole nucleus and the side chains are simplified primary amines.¹¹

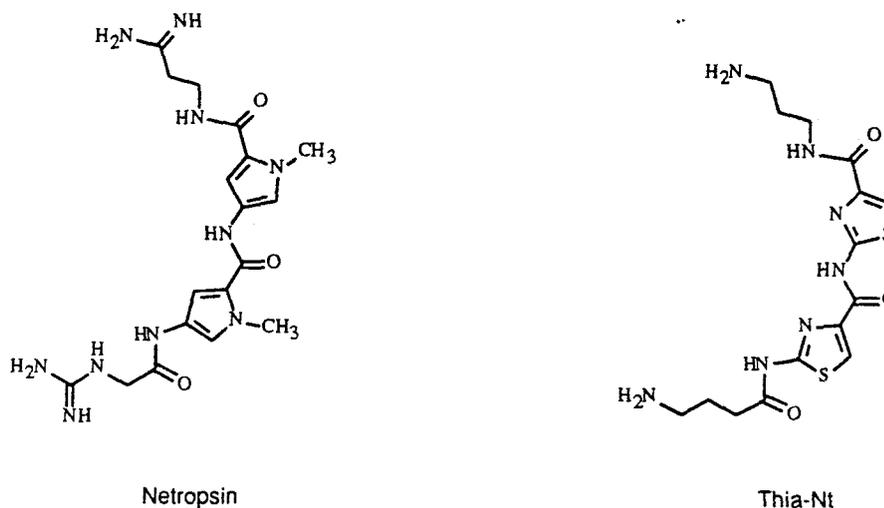


Figure 1. Structure of Netropsin and Thia-Nt

Encouraged by the previous results,¹⁴ we decided to investigate systematically the behaviour of new thiazole analogs of Nt in which the heterocyclic part is differently substituted. We report here the efficient and easily reproducible synthesis of oligopeptides Methia-Nt and Isothia-Nt (Figure 2) via a strategic pathway involving the preparation of the key compounds ethyl 2-amino-5-methylthiazole-4-carboxylate and ethyl 2-aminothiazole-5-carboxylate.

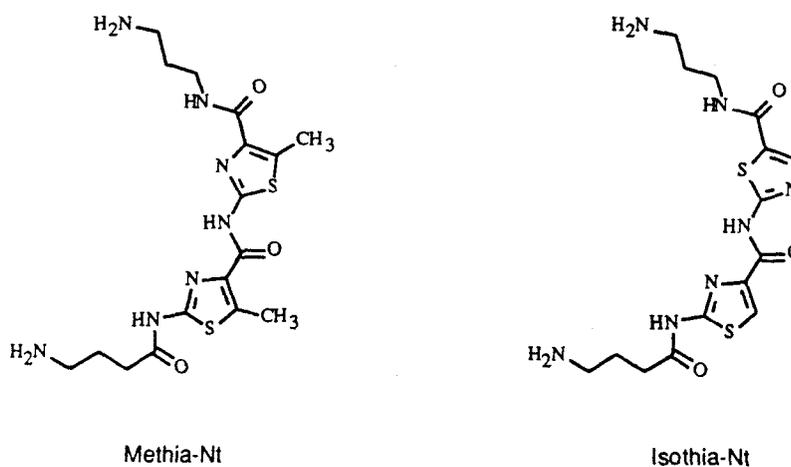
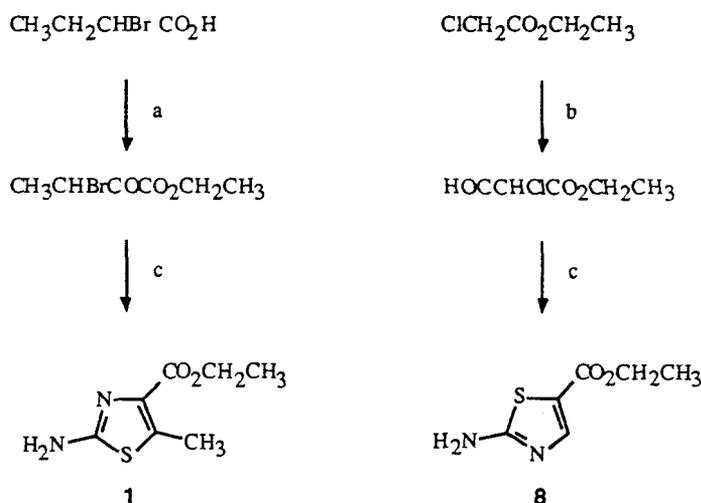


Figure 2. Structure of Methia-Nt and Isothia-Nt

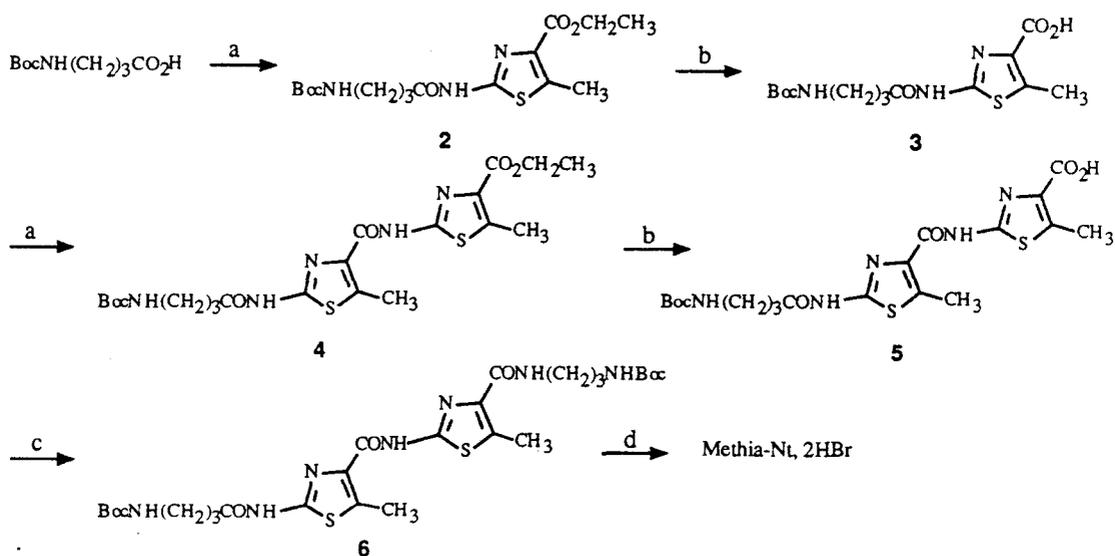
The structure of Methia-Nt favors the orientation of the sulfur atoms away from the floor of the double helix, as for Thia-Nt, whereas the methyl group is positioned as for Nt. On the other hand, Isothia-Nt exhibits its two sulfur atoms in opposite orientations, precisely away and toward the axis of DNA. Thia-Nt, Methia-Nt and Isothia-Nt have primary amino iso-length side chains instead of amidine and guanidine residues.



Scheme 1. Reagents : (a) $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{H}_2\text{O}$, $\text{HCl}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, NBS/CCl_4 (b) $\text{HCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{ONa}/(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ (c) $\text{H}_2\text{NCSNH}_2/\text{H}_2\text{O}$

The required starting material ethyl 2-amino-5-methylthiazole-4-carboxylate (**1**) was synthesized according to the procedure used for the preparation of ethyl 2-aminothiazole-5-carboxylate (**8**).¹⁶ Cyclising condensation of thiourea with ethyl di-3-bromo-2-oxobutyrate afforded the heterocycle (**1**), as ethyl formylchloroacetate reacts with thiourea, to furnish the thiazole (**8**)¹⁷ (Scheme 1). Ethyl di-3-bromo-2-oxobutyrate was prepared following a reported procedure¹⁸ by oxidation with *N*-bromosuccinimide of the intermediate α -hydroxy ester.¹⁹ A classical Claisen reaction between ethyl formate and ethyl chloroacetate allowed us to obtain ethyl formylchloroacetate in accordance with Wislicenus.²⁰

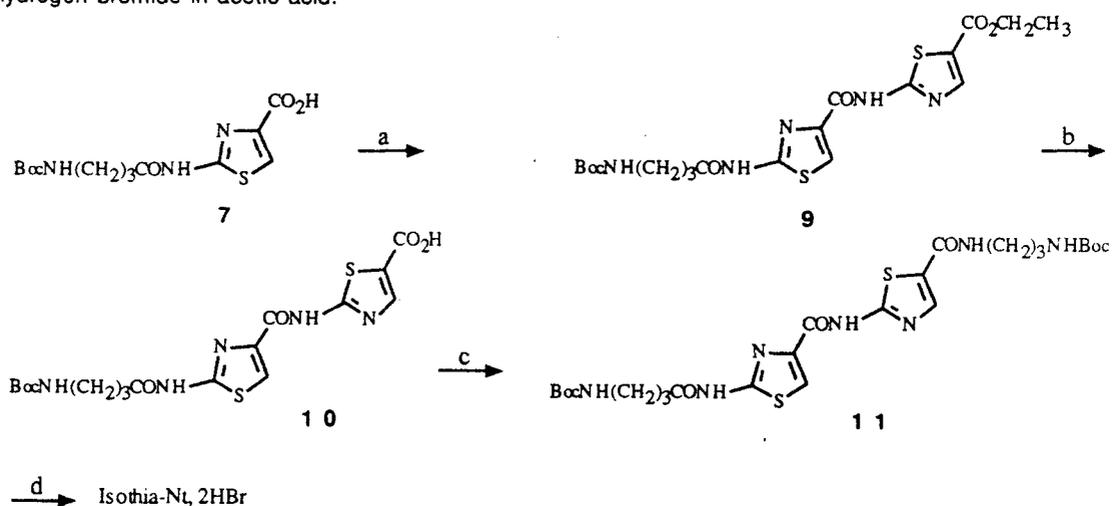
Acylation of the aminothiazole (**1**) with 4-*t*-butyloxycarbonylamino butyric acid²¹ in the presence of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and 1*H*-hydroxy-1, 2, 3-benzotriazole (HOBt) afforded **2** (Scheme 2). Alkaline hydrolysis of the ester (**2**) in aqueous methanol gave the acid (**3**). Condensation of ethyl 2-amino-5-methylthiazole-4-carboxylate (**1**) with the acid (**3**) in the above conditions (DCC, HOBt) gave the bithiazole (**4**). After saponification of the ester group of **4**, the second side chain (4-*t*-butyloxycarbonylamino propylamine ²²) was coupled, in the presence of DCC and HOBt, with the acid (**5**) to give the protected diamine (**6**). Cleavage of the *t*-butyloxycarbonyl (Boc) protecting group with hydrogen bromide in acetic acid afforded the desired compound Methia-Nt as dihydrobromide.



Scheme 2. Reagents (a) 1, HOBT, DCC (b) 4N NaOH/CH₃OH

(c) H₂N(CH₂)₃NHBoc, HOBT, DCC (d) HBr/CH₃COOH

The pseudotetrapeptide Isothia-Nt was synthesized according to Scheme 3. Treatment of ethyl 2-aminothiazole-5-carboxylate (8), described above, with acid (7)¹¹ under the conditions used for 4, afforded compound (9) which was hydrolyzed to the corresponding acid (10). Conversion of 10 into the protected pseudotetrapeptide (11) proceeded satisfactorily under the reaction conditions described for the synthesis of 6. The deprotection of compound (11) was achieved by treatment with a saturated solution of hydrogen bromide in acetic acid.



Scheme 3. Reagents (a) 8, HOBT, DCC (b) 4N NaOH /CH₃OH (c) H₂N(CH₂)₃NHBoc, HOBT, DCC

(d) HBr/CH₃COOH

EXPERIMENTAL

Melting points were taken on a Tottoli Büchi 510 apparatus and are uncorrected. The ir spectra were recorded with a Perkin Elmer 1310 spectrophotometer using potassium bromide pellets. The ^1H nmr spectra were recorded on a Bruker WP80 SY spectrometer. Chemical shifts are reported in ppm from tetramethylsilane as an internal standard and are given in δ units. The EI mass spectra were recorded on a Ribermag R10.10 (combined with Riber 400 data system) mass spectrometer at 70 eV by using direct insertion. FAB mass spectra were determined on a Kratos MS-50 RF mass spectrometer. Thin layer chromatography (tlc) was carried out using silica gel 60F-254 Merck, in system solvent chloroform-methanol (80/20, v : v). Spots were visualized by inspection under uv light at 254 nm and after exposure to vaporized I_2 and/or ninhydrin.

Ethyl 2-amino-5-methylthiazole-4-carboxylate (1)

2-Bromobutyric acid was hydrolysed to 2-hydroxybutyric acid using potassium carbonate and was esterified with absolute ethanol and dry hydrogen chloride to give ethyl 2-hydroxybutyrate. To a solution of 2.6 g (20 mmol) of the hydroxy ester in 40 ml of carbon tetrachloride were added 7.12 g (40 mmol) of *N*-bromosuccinimide. The mixture was refluxed for 5 h, cooled and the succinimide was filtered. The filtrate was dried over anhydrous sodium sulfate, concentrated and distilled *in vacuo* to yield 3.0 g (70 %) of ethyl di-3-bromo-2-oxobutyrate, bp 92-110° C (12 mm Hg).

A mixture of 1.1 g (14.3 mmol) of thiourea and 3.0 g (14.3 mmol) of ethyl di-3-bromo-2-oxobutyrate in 20 ml of water was heated gradually until boiling under stirring (15 min) and then allowed to react for 12 h at room temperature. The base was precipitated by addition of 20 % ammonia, then resolubilized in 1 N hydrochloric acid and finally reprecipitated with 20 % ammonia. The crude product was filtered and recrystallized from water-ethanol (90/10, v : v) to give **1** in a 57 % yield, mp 164-166° C; R_f 0.76; ir : 1600 (NH), 1680 (CO ester); ^1H nmr (CDCl_3) : δ 5.6 (m, 2H, NH_2), 4.3 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2), 2.6 (s, 3H, CH_3 thiazole), 1.3 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3); ms (m/z , 1 %) : 186 (M^+ , 71). Anal. Calcd for $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 45.15; H, 5.41; N, 15.04. Found : C, 45.08; H, 5.50; N, 15.12.

Ethyl 2-(4-t-butyloxycarbonylamino-5-methylthiazole-4-carboxylate (2)

Cold solutions of 906 mg (4.4 mmol) of DCC and 674 mg (4.4 mmol) of HOBt in 10 ml of a mixture of dichloromethane-dimethylformamide (1/1, v : v) was added to a solution of 812 mg (4 mmol) of 4-t-butyloxycarbonylamino-5-methylthiazole-4-carboxylic acid in 10 ml of dichloromethane-dimethylformamide (1/1, v : v) at 0° C for 1 h under stirring. A cold solution of 744 mg (4 mmol) of **1** in 5 ml of a mixture of dichloromethane-dimethylformamide (1/1, v : v) was added and stirring was continued for 2 h at 0° C and 12 h at room temperature. The solvent was evaporated and the residue was taken up with dichloromethane, providing dicyclohexylurea (DCU) which was filtered. The organic solution was washed successively with 1 N hydrochloric acid, water and 1 M sodium bicarbonate. After drying over anhydrous sodium sulfate, the solvent was removed *in vacuo*. The remaining DCU was discarded by precipitation with acetone, the resulting material was recrystallised from a mixture of ethanol-petroleum ether giving pure **2** (1.47 g, 99 % yield), mp 132-134° C; R_f 0.89; ir : 1720 (CO amide), 1680 (CO ester); ^1H nmr (CDCl_3) : δ 11.4 (m,

1H, NH), 5.0 (m, 1H, NHBoc), 4.4 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH₂), 3.2 (m, 2H, CH₂NH), 2.6 (s, 3H, CH₃ thiazole), 2.5 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH₂CO), 1.9 (m, 2H, CH₂), 1.4 (m, 12H, CH₃); ms (m/z , 1 %) : 371 (M^+ , 1.6), 228 (100). Anal. Calcd for C₁₆H₂₅N₃O₅S : C, 51.74; H, 6.78; N, 11.31. Found : C, 51.89; H, 6.89; N, 11.47.

2-(4-t-Butyloxycarbonylamino-5-methylthiazole-4-carboxylic acid (3)

A solution of 742 mg (2 mmol) of **2** and 2 ml (8 mmol) of 4N sodium hydroxide in 3 ml of methanol was stirred at room temperature. The progress of the reaction was monitored by tlc and was thereby judged to be complete after 6 h. The solvent was evaporated, the residue was taken up in water and impurities were extracted with dichloromethane (2 x 10 ml). The acid (**3**) was then precipitated by cautious acidification to pH 3-4 with cold 1N hydrochloric acid to yield 520 mg (76%) of pure **3** as ascertained by tlc, mp 186-188° C; R_f 0.52; ¹H nmr (DMSO-d₆) : δ 12.3 (m, 1H, NH), 6.8 (m, 1H, NHBoc), 3.0 (m, 2H, CH₂NH), 2.6 (s, 3H, CH₃ thiazole), 2.4 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH₂CO), 1.7 (m, 2H, CH₂), 1.4 (s, 9H, CH₃); ms (FAB⁺) : 344 (M^++1). Anal. Calcd for C₁₄H₂₁N₃O₅S : C, 48.97; H, 6.16; N, 12.24. Found : C, 49.05; H, 6.07; N, 12.33.

Ethyl 2-[2'-(4-t-butyloxycarbonylamino-5'-methylthiazole-4'-carboxamido]-5-methylthiazole-4-carboxylate (4)

The acid (**3**) (343 mg, 1 mmol) was reacted with 186 mg (1 mmol) of the amine (**1**) using 227 mg (1.1 mmol) of DCC and 168 mg (1.1 mmol) of HOBt in 10 ml of dichloromethane-dimethylformamide (1/1, v : v) as described for the preparation of **2**. DCU was removed by precipitation with ethyl acetate and the filtrate was washed with 1 N hydrochloric acid (10 ml), water (10 ml) and 1 M sodium bicarbonate (10 ml), then dried over anhydrous sodium sulfate. The solvent was removed *in vacuo* giving 452 mg (89 % yield) of **4** after recrystallization from a mixture of ethanol-petroleum ether, mp 214-216° C; R_f : 0.93; ν : 1680 (CO ester); ¹H nmr (CDCl₃) : δ 10.7 (m, 1H, NH), 10.4 (m, 1H, NH), 5.1 (m, 1H, NHBoc), 4.4 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH₂), 3.3 (m, 2H, CH₂NH), 2.75 (s, 3H, CH₃ thiazole), 2.65 (s, 3H, CH₃ thiazole), 2.6 (m, 2H, CH₂CO), 2.0 (m, 2H, CH₂), 1.4 (m, 12H, CH₃); ms (FAB⁺) : 512 (M^++1). Anal. Calcd for C₂₁H₂₉N₅O₆S₂ : C, 49.30; H, 5.71; N, 13.69. Found : C, 49.07; H, 5.85; N, 13.82.

2-[2'-(4-t-Butyloxycarbonylamino-5'-methylthiazole-4'-carboxamido]-5-methylthiazole-4-carboxylic acid (5)

The ethyl ester (**4**) (255 mg, 0.5 mmol) was totally converted after 6 h to the corresponding acid (**5**), according to the method of preparation of **3**. Compound (**5**) was obtained pure, as ascertained by chromatography, after precipitation by cautious acidification with 1N hydrochloric acid (220 mg, 91 % yield), mp 212-214° C; R_f : 0.25; ¹H nmr (DMSO-d₆) : δ 12.1 (s, 1H, NH), 11.1 (m, 1H, NH), 6.8 (m, 1H, NHBoc), 3.0 (m, 2H, CH₂NH), 2.65 (s, 3H, CH₃ thiazole), 2.55 (s, 3H, CH₃ thiazole), 2.5 (m, 2H, CH₂CO), 1.7 (m, 2H, CH₂), 1.4 (s, 9H, CH₃); ms (FAB⁺) : 484 (M^++1). Anal. Calcd for C₁₉H₂₅N₅O₆S₂ : C, 47.19; H, 5.21; N, 14.48. Found : C, 47.28; H, 5.32; N, 14.31.

t-Butyl 3-[2-[2'-(4-t-butyloxycarbonylamino)butyryl]amino-5'-methylthiazole-4'-carboxamido]-5-methylthiazole-4-carboxamido]propyl-1-carbamate (6)

The acid (5) (120 mg, 0.25 mmol) was treated with 44 mg (0.25 mmol) of 4-t-butyloxycarbonylamino-propylamine using 57 mg (0.28 mmol) of DCC and 42 mg (0.28 mmol) of HOBt in 5 ml of a mixture of dichloromethane-dimethylformamide (1/1, v : v), according to the procedure described for 2. Purification of the crude material was accomplished by recrystallization from a mixture of ethanol-petroleum ether to give 141 mg (88 % yield) of compound (6), mp 184-187° C; R_f : 0.93; ir : 1680 (CO); ^1H nmr (CDCl_3) : δ 11.3 (m, 1H, NH), 10.4 (m, 1H, NH), 8.2 (m, 1H, NHCO), 5.0 (m, 1H, NHBoc), 3.4 (m, 6H, CH_2NH), 2.8 (s, 3H, CH_3 thiazole), 2.75 (s, 3H, CH_3 thiazole), 2.7 (m, 2H, CH_2CO), 1.9 (m, 4H, CH_2), 1.4 (m, 18H, CH_3); ms (FAB+) : 640 ($\text{M}^+ + 1$). Anal. Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}_2$: C, 50.69; H, 6.46; N, 15.32. Found : 50.43; H, 6.28; N, 15.60.

3-[2-[2'-(4-Aminobutyryl)amino-5'-methylthiazole-4'-carboxamido]-5-methylthiazole 4-carboxamido]propyl-1-amine dihydrobromide (Methia-Nt)

A solution of 64 mg (0.1 mmol) of 6 in acetic acid (2 ml) was saturated with dry hydrogen bromide for 3 min and stirring was maintained for 30 min. After evaporation of the solvent under vacuum, the residue was taken up with ether, providing 52 mg (87% yield) of analytically pure Methia-Nt, mp 198-200° C; R_f : 0; ^1H nmr (D_2O) : δ 3.4 (m, 2H, CH_2NH), 3.1 (m, 4H, CH_2NH_3^+), 2.65 (m, 2H, CH_2CO), 2.55 (s, 3H, CH_3 thiazole), 2.5 (s, 3H, CH_3 thiazole), 2.0 (m, 4H, CH_2); ms (FAB+) : 440 ($\text{M}^+ + 1$). Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}_2\text{Br}_2$: C, 33.95; H, 4.52; N, 16.30. Found : C, 40.13; H, 4.53; N, 16.47.

Ethyl 2-aminothiazole-5-carboxylate (8)

Potassium (8 g, 0.20 mol) was added to 50 ml of dry ethanol under stirring and nitrogen atmosphere. After complete reaction of potassium and cooling, 100 ml of dry ether were added, then a solution of 19 ml (0.22 mol) of ethyl formate and 24 ml (0.22 mol) of ethyl chloroacetate in 100 ml of dry ether was added slowly and the mixture was stirred overnight. The potassium salt was filtered, washed carefully with ether and dissolved in water. The aqueous solution was acidified cautiously to pH 4 with 10 N hydrochloric acid in a cold bath and extracted with ether (4 x 50 ml). After drying over anhydrous sodium sulfate, the organic solution was concentrated *in vacuo* to give 7.5 g (0.05 mol) of ethyl formylchloroacetate which were treated with 3.8 g (0.05 mol) of thiourea in 50 ml of water, as described for the preparation of 1. The base was precipitated by addition of ammonia; this procedure was repeated after dissolution in 1 N hydrochloric acid and the precipitate was recrystallized from a mixture of water-ethanol (9/1, v : v) to give 8 in a 67% yield, mp 156-158° C; R_f : 0.70; ir : 1650 (NH), 1680 (CO ester); ^1H nmr (CDCl_3) : δ 7.7 (s, 1H, CH thiazole), 5.5 (s, 2H, NH_2), 4.3 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2), 1.3 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3); ms (m/z , 1 %) : 172 (M^+ , 58). Anal. Calcd for $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 41.85; H, 4.68; N, 16.27. Found : C, 41.66; H, 4.64; N, 16.39.

Ethyl 2-[2'-(4-t-butyloxycarbonylaminobutyryl)aminothiazole-4'-carboxamido]-thiazole-5-carboxylate (9)

The acid (7) (99 mg, 0.30 mmol) was allowed to react with 52 mg (0.30 mmol) of the amine (8) using 68 mg (0.33 mmol) of DCC and 50 mg (0.33 mmol) of HOBt in 10 ml of a mixture of dichloromethane-dimethylformamide (1/1, v : v) according to the procedure described for 4, giving 140 mg of 9 (96% yield) after recrystallization from ethanol, mp 224-226° C; R_f : 0.90; ir : 1720 (CO amide), 1680 (CO ester); ^1H nmr (CDCl_3) : δ 8.2 (s, 1H, CH thiazole), 8.0 (s, 1H, CH thiazole), 4.9 (m, 1H, NHBoc), 4.3 (m, 2H, CH_2), 3.3 (m, 2H, CH_2NH), 2.6 (m, 2H, CH_2CO), 1.8 (m, 2H, CH_2), 1.5 (m, 12H, CH_3); ms (FAB+) : 484 (M^++1). Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$: C, 47.19; H, 5.21; N, 14.48. Found : C, 47.44; H, 5.45; N, 14.37.

2-[2'-(4-t-Butyloxycarbonylaminobutyryl)aminothiazole-4'-carboxamido]thiazole-5-carboxylic acid (10)

The ester (9) (97 mg, 0.20 mmol) was converted to the corresponding acid (10) according to the method of preparation of 7. The yield of crude and chromatographically pure product was 66% (60 mg), mp > 250° C; R_f : 0.16; ^1H nmr (DMSO-d_6) : δ 15.5 (s, 1H, OH), 8.2 (s, 1H, CH thiazole), 8.0 (s, 1H, CH thiazole), 6.8 (m, 1H, NHBoc), 3.2 (m, 2H, CH_2NH), 2.5 (m, 2H, CH_2CO), 1.9 (m, 2H, CH_2), 1.4 (s, 9H, CH_3); ms (FAB+) : 478 (M^++Na). Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$: C, 44.83; H, 4.65; N, 15.37. Found : C, 44.78; H, 4.73; N, 15.28.

t-Butyl 3-[2-[2'-(4-t-butyloxycarbonylaminobutyryl)aminothiazole-4'-carboxamido]-thiazole-5-carboxamido]propyl-1-carbamate (11)

The procedure used for the preparation of 11 is strictly identical to that of 6 (57 % yield). An authentic sample was recrystallized from ethyl acetate, mp 177-181° C; R_f : 0.79; ir : 1680 (CO); ^1H nmr (CDCl_3) : δ 11.4 (m, 1H, NH), 8.3 (m, 1H, NHCO), 8.2 (s, 1H, CH thiazole), 7.9 (s, 1H, CH thiazole), 5.1 (m, 1H, NHBoc), 3.4 (m, 6H, CH_2NH), 2.7 (m, 2H, CH_2CO), 1.9 (m, 4H, CH_2), 1.4 (m, 18H, CH_3); ms (FAB+) : 612 (M^++1). Anal. Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}_2$: C, 49.09; H, 6.10; N, 16.03. Found : C, 48.88; H, 6.05; N, 16.20.

3-[2-[2'-(4-Aminobutyryl)aminothiazole-4'-carboxamido]thiazole-5-carboxamido]-propyl-1-amine dihydrobromide (Isothia-Nt)

The compound (11) was totally converted into the corresponding deprotected compound Isothia-Nt according to the method of preparation of Methia-Nt (87 % yield of crude and pure product), mp 196-201° C; R_f : 0; ^1H nmr (D_2O) : δ 8.1 (s, 1H, CH thiazole), 7.7 (s, 1H, CH thiazole), 3.3 (m, 2H, CH_2NH), 3.1 (m, 4H, CH_2NH_3^+), 2.5 (m, 2H, CH_2CO), 2.0 (m, 4H, CH_2); ms (FAB+) : 412 (M^++1). Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}_2\text{Br}_2$: C, 31.42; H, 4.04; N, 17.10. Found : C, 31.26; H, 4.13; N, 17.32.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" and the "Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC)" for financial support.

REFERENCES

1. E. F. Gale, E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond, and M. J. Waring, 'The Molecular Basis of Antibiotics Action', ed. by J. Wiley, 1981, p. 258.
2. M. A. Warpehoskii and L.H. Hurley, Chem. Res. Toxicol., 1988, **1**, 315.
3. S. Neidle and Z. Abraham, CRC Crit. Rev. Biochem., 1984, **17**, 73.
4. C. Zimmer and U. Wähnert, Prog. Biophys. Mol. Biol., 1986, **47**, 31.
5. C. Zimmer, G. Luck, G. Burckhardt, K. Krowicki, and J. W. Lown, 'Molecular Mechanism of Carcinogenic and Antitumor Activity', eds. by C. Chagas and B. Pullman, 1986, p. 339.
6. J. W. Lown, Anti-Cancer Drug Design, 1988, **3**, 25.
7. J. W. Lown, K. Krowicki, U. G. Bhat, A. Skorobogaty, B. Ward, and J. C. Dabrowiak, Biochemistry, 1986, **25**, 7408.
8. K. Kissinger, K. Krowicki, J. C. Dabrowiak, and J. W. Lown, Biochemistry, 1987, **26**, 5590.
9. M. Lee, R. G. Shea, J. A. Hartley, K. Kissinger, G. Vesnauer, K. J. Breslauer, R. T. Pon, J. C. Dabrowiak, and J. W. Lown, J. Mol. Recogn., 1989, **2**, 6.
10. C. Bailly, R. Houssin, J. L. Bernier, and J. P. Hénichart, Tetrahedron, 1988, **44**, 5833.
11. B. Plouvier, C. Bailly, R. Houssin, and J. P. Hénichart, J. Heterocycl. Chem., 1989, **26**, 1643.
12. K. E. Rao, Y. Bathini, and J. W. Lown, J. Org. Chem., 1990, **55**, 728.
13. K. E. Rao, R. G. Shea, B. Yadagiri, and J. W. Lown, Anti-Cancer Drug Design, 1990, **5**, 3.
14. B. Plouvier, C. Bailly, R. Houssin, K. E. Rao, J. W. Lown, M. J. Waring, and J. P. Hénichart, Nucl. Acids Res., submitted.
15. K. Zakrzewska, M. Randianarivelo, and B. Pullman, J. Biomol. Struct. Dyn., 1988, **6**, 331.
16. H. J. Becker and J. de Jonge, Rec. Trav. Chim., 1942, **61**, 463.
17. O. Dann, Ber., 1943, **76**, 419.
18. P. F. Kruse, N. Geurkink, and K. L. Grist, J. Am. Chem. Soc., 1954, **76**, 5796.
19. J. S. Pizey, 'Synthetic Reagents', Vol. II, ed. by J. Wiley, Chichester, England, 1974, p. 35.
20. W. Wislicenus, Ber., 1910, **43**, 3530.
21. L. Moroder, A. Hallett, E. Wunsch, O. Keller, and G. Wersin, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1976, **357**, 1651.
22. R. Houssin, J. L. Bernier, and J. P. Hénichart, Synthesis, 1988, 259.

Received, 5th December, 1990

L'interaction avec l'ADN de ces deux nouvelles molécules a été étudiée par diverses techniques physicochimiques (spectroscopie d'absorption, quenching de fluorescence, dénaturation thermique, dichroïsme linéaire, viscosimétrie).

□ Interaction Isothia-Nt/ADN :

La molécule Isothia-Nt, étudiée par dénaturation thermique, quenching de fluorescence et dichroïsme linéaire, ne présente pas d'affinité pour l'ADN. Sur la base d'études très récentes en modélisation moléculaire (Kumar *et al.*, 1990; Lown, 1990) on peut avancer l'explication suivante : Isothia-Nt (Figure 10) présente deux hétérocycles thiazole isomères de position (Cf article n°3); des calculs théoriques (Kumar *et al.*, 1990) ont montré que lorsque $X = S$ et $Y = N$, la distance d séparant les protons amide (Figure 11) est approximativement de $0,9\text{\AA}$ supérieure à celle observée dans le cas du pyrrole ou du thiazole isomère ($X = N$; $Y = S$).

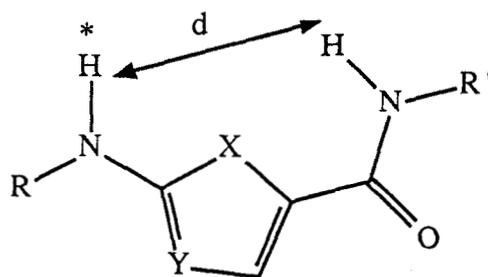


Figure 11 : Distance entre les protons amide au niveau des "lexitropsines"

En conséquence, le proton amide (marqué par une étoile dans la figure 11) du thiazole est déplacé et ne peut participer à une liaison hydrogène avec l'azote N3 d'une adénine ou l'oxygène O2 d'une thymine adjacente. De plus l'atome de soufre, de par son encombrement stérique (rayon de Van der Waals de $1,90\text{\AA}$), exclut la présence de guanine (Lown, 1990). Ces deux caractéristiques de la molécule Isothia-Nt sont vraisemblablement les causes de l'absence d'affinité vis-à-vis de l'ADN malgré la présence de l'hétérocycle thiazolique dont l'atome d'azote - orienté vers le petit sillon - est susceptible d'engager une liaison hydrogène avec le groupement amine d'une guanine. La synthèse de la molécule analogue à Isothia-Nt, présentant deux thiazoles pour lesquels $X = S$ et $Y = N$, n'a pas été envisagée puisque le but recherché ici est d'augmenter la spécificité pour les bases G-C dont est dépourvue la molécule naturelle, la Nt.

□ Interaction Methia-Nt/ADN :

1°) Affinité et sélectivité :

La liaison du ligand Methia-Nt à l'ADN est évidente d'après les changements observés au niveau du spectre d'absorption UV (Figure 12) du ligand par addition d'ADN de thymus de veau. La diminution du maximum d'absorption du ligand est indicative de la formation du complexe Methia-Nt/ADN.

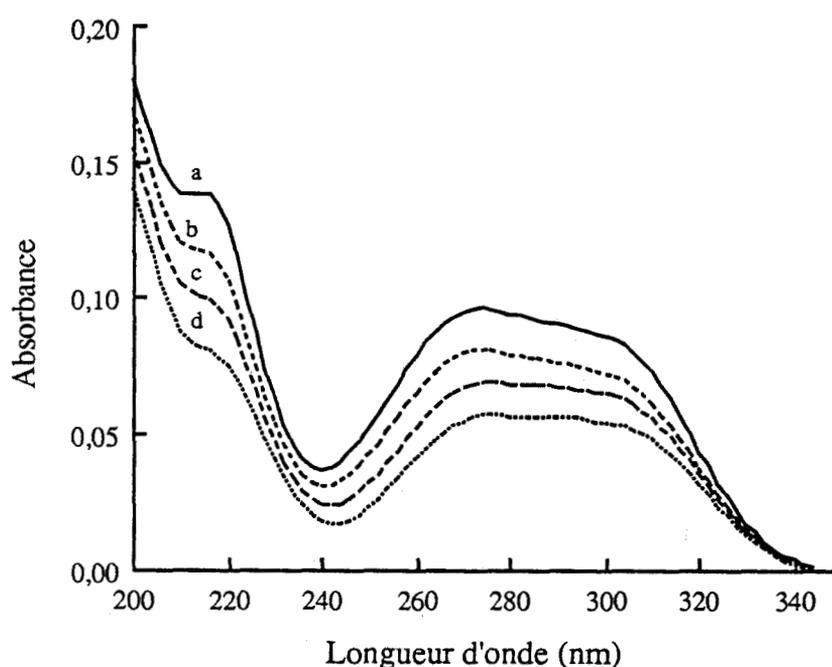


Figure 12 : Spectre d'absorption UV du ligand Methia-Nt et de son complexe avec l'ADN: ligand seul (a); [Methia-Nt]/[ADN] = 4 (b), 2 (c) et 1 (d)

L'étude du composé Methia-Nt par dénaturation thermique, quenching de fluorescence et Scatchard (constante d'affinité) pour différents ADN est présentée dans le tableau 2, la nétropsine étant prise en référence.

La molécule Methia-Nt stabilise la double hélice d'ADN ($\Delta T_m = 5^\circ\text{C}$) et déplace le bromure d'éthidium ($Q =$ concentration de produit nécessaire pour diminuer de 50% la fluorescence du bromure d'éthidium lié à l'ADN) dans des proportions moins importantes que ne le fait la nétropsine. On observe cependant une constante d'affinité $K_a = 1,68 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ supérieure à celle obtenue avec la Nt ($K_a = 2,75 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) pour l'ADN de thymus de veau. L'étude du déplacement du bromure d'éthidium par Methia-Nt avec l'ADN synthétique poly[(dG).(dC)] met en évidence une valeur $Q = 13 \mu\text{M}$ inférieure à celle observée pour la nétropsine ($Q = 37 \mu\text{M}$), qui laisse présager

d'une préférence pour les enchaînements cytosine-guanine. Une telle préférence pouvait être envisagée à la lecture de la valeur de Q pour les ADN de thymus de veau et poly[(dAT).(dAT)] qui passe de 22 μ M à 10 μ M lorsque le pourcentage en GC passe de 0 à 42%.

Ces études préliminaires mettent en évidence une bonne affinité pour l'ADN ($K_a = 1,68 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) et une sélectivité préférentielle pour les enchaînements Guanine-Cytosine mais ne permettent pas bien sûr d'analyser le mode de liaison à l'ADN.

| | ADN natif ou synthétique | | | | | |
|------------|--------------------------|-------|-------------------|-------------------|-----|-----------------|
| | Thymus de veau | | | Poly[(dAT).(dAT)] | | Poly[(dG).(dC)] |
| | ΔT_m^a | Q^b | K_a^c | ΔT_m | Q | Q |
| Methia-Nt | 5 | 10 | $1,68 \cdot 10^6$ | 5 | 22 | 13 |
| Nétropsine | 16 | 3,5 | $2,75 \cdot 10^5$ | 31 | 1,2 | 37 |

Tableau 2 : Comparaison des paramètres de liaison à l'ADN de Methia-Nt et de la Nt
 a : élévation de la température de dénaturation thermique de l'ADN pour un rapport [produit]/[ADN] = 0,5 (voir partie expérimentale p.132); b : concentration (μ M) de produit nécessaire pour diminuer de 50% la fluorescence du bromure d'éthidium (BET) lié à l'ADN pour un rapport [BET]/[ADN] = 0,1 (voir partie expérimentale p.132); c : constante d'association (M^{-1}) mesurée avec un tampon (10mM Tris, 10mM NaCl, pH 7) (voir partie expérimentale p.135)

Afin de déterminer plus précisément la nature de l'interaction Methia-Nt/ADN, des études en dichroïsme linéaire et en viscosimétrie ont été effectuées.

2°) Mode d'interaction à l'ADN :

- Dichroïsme linéaire électrique : (voir partie expérimentale p.134)

A 310 nm, le spectre de DL (Dichroïsme Linéaire) présente un dichroïsme réduit négatif alors que la Nt se caractérise par un dichroïsme positif net (Figure 13) : Methia-Nt ne doit vraisemblablement pas se lier au niveau du petit sillon. L'étude du dichroïsme réduit en fonction du champ électrique (Figure 14) permet d'avancer l'hypothèse d'un "processus d'intercalation". En effet le dichroïsme réduit de Methia-Nt est négatif comme l'est celui de l'ADN lui-même. Ainsi Methia-Nt adopte une

orientation proche de celle des bases de l'ADN (perpendiculaire au champ électrique appliqué).

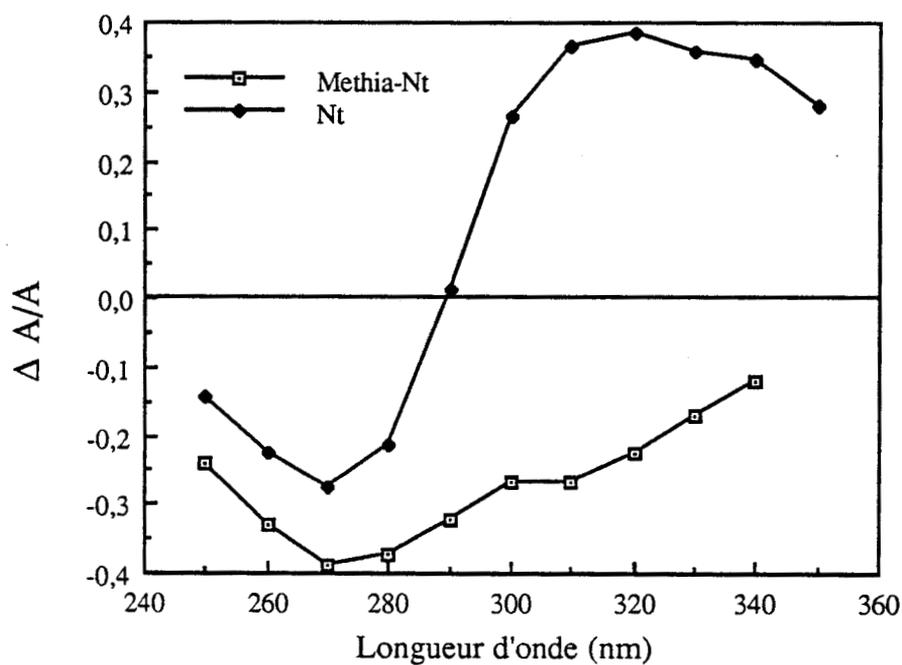


Figure 13 : Dichroïsme linéaire réduit $\Delta A/A$ en fonction de la longueur d'onde (nm) pour Methia-Nt et Nt à 12,5 kV/cm

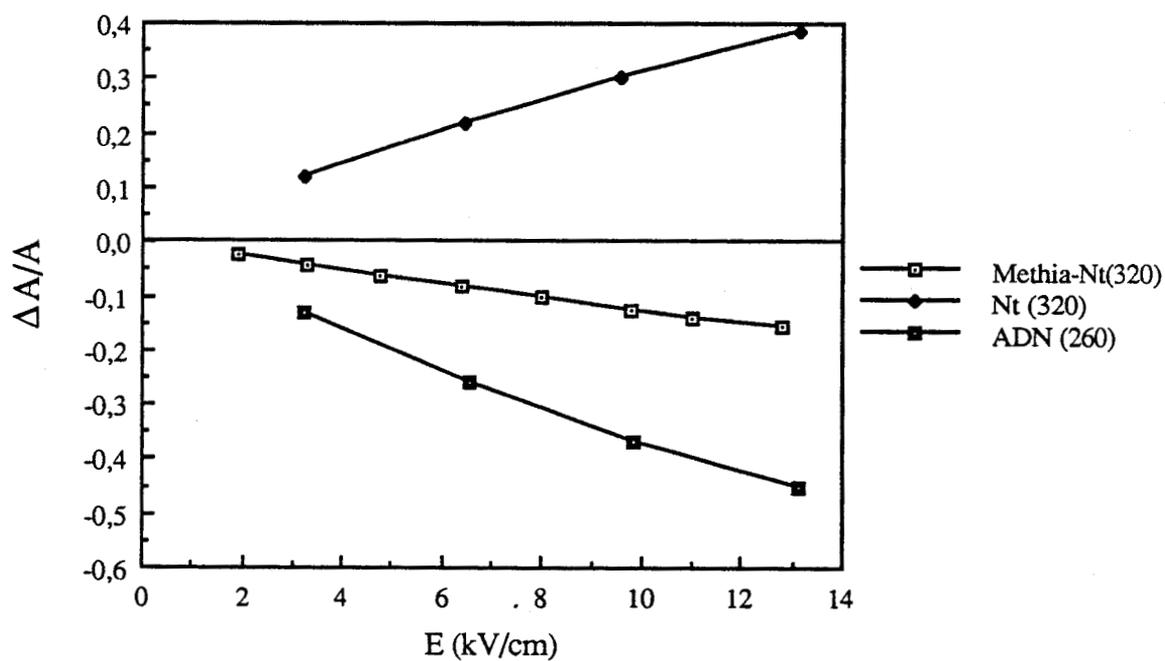


Figure 14 : $\Delta A/A = f(E)$ pour Methia-Nt (320 nm), Nt (320 nm) et l'ADN (260 nm)

Cependant si le dichroïsme linéaire suggère un "processus d'intercalation", des études complémentaires en viscosimétrie (élongation et détorsion) s'imposent pour corroborer une telle hypothèse.

- Viscosimétrie : (voir partie expérimentale p.133)

Le changement dans la superhélicité de l'ADN circulaire, conséquence logique de l'intercalation, est suivi par la variation de la viscosité du complexe Methia-Nt/ADN pour des quantités croissantes de ligand ajoutées. L'angle de détorsion, mesuré à partir de l'inversion du sens de détorsion d'un ADN circulaire double brin superenroulé droit, est calculé par convention à partir de l'angle de 26° créé par l'éthidium (Wang, 1974). La courbe de la figure 15 reflète les changements du superenroulement qui résultent de la détorsion subie par la double hélice et causée par la liaison de Methia-Nt.

Par addition de Methia-Nt, l'hélice superenroulée droite se détord jusqu'à ce que l'ADN soit totalement relâché. Si l'on continue à ajouter Methia-Nt, il y a inévitablement inversion du superenroulement, indicatif de l'intercalation, avec formation d'une hélice superenroulée gauche. Methia-Nt entraîne une détorsion de $12,1^\circ$ (Figure 15), valeur qui est similaire à la détorsion observée avec des intercalants classiques tels que la daunomycine (Jain *et al.*, 1977) ou quelques dérivés de la 9-aminoacridine (Braithwaite et Baguley, 1980), mais qui reste plus faible que la détorsion créée par l'éthidium ou par certaines phénanthridines (Wang, 1974), 26° , valeur maximum trouvée pour un ligand monointercalant. Il a été suggéré que la détorsion optimale intrinsèque de l'ADN est approximativement de 18° en l'absence d'autres facteurs capables de changer l'interaction entre le ligand intercalant et les deux paires de bases adjacentes. Cette valeur est observée dans le cas de nombreux dérivés acridiniques (Jones *et al.*, 1980; Wilson et Jones, 1981). Les phénanthridines, qui se lient à l'ADN par l'intermédiaire de liaisons hydrogène spécifiques (Jain *et al.*, 1977; Tsai *et al.*, 1977), détordent d'un angle supérieur de 8° à la valeur optimale de 18° . Par contre les anthracyclines mettent en jeu des liaisons hydrogène spécifiques lors de l'interaction avec l'ADN (Pigram *et al.*, 1972; Quigley *et al.*, 1980), et créent une détorsion de 8° seulement.

Il est tentant de postuler ici que Methia-Nt se lie à l'ADN par un processus intercalatif mais d'autres interactions de nature électrostatique ou des liaisons hydrogène sont susceptibles d'intervenir dans le processus de liaison à l'ADN. Parallèlement à l'étude de la détorsion de l'ADN, la modification de son élongation a été évaluée.

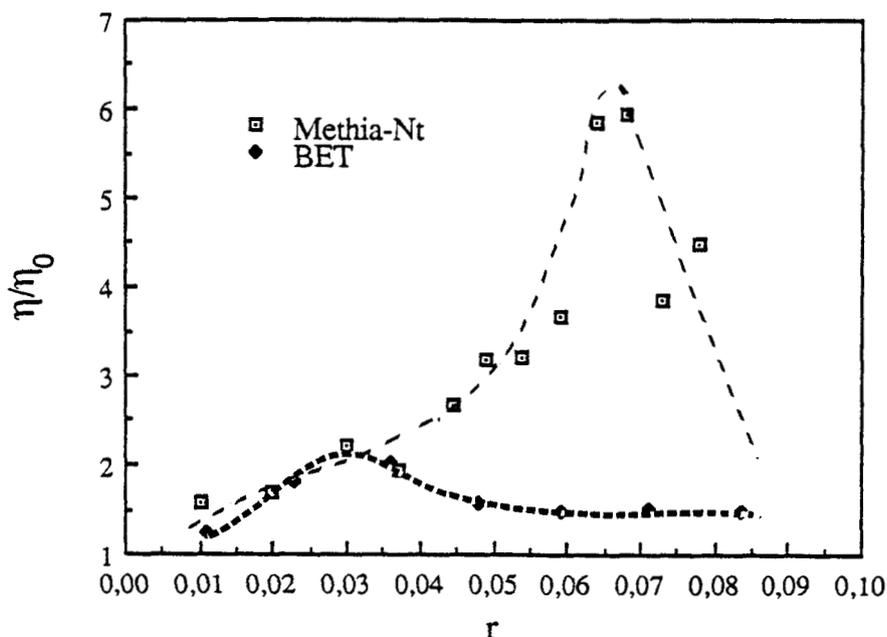


Figure 15: Courbes de titration de la viscosité de l'ADN circulaire superenroulé avec Methia-Nt (200 μ M) et BET (440 μ M). La concentration en ADN est de 110 μ M. Toutes les expériences sont réalisées à 27°C dans le tampon SHE 0,01M.

L'élongation de l'hélice d'ADN due à la liaison de molécules intercalantes entraîne une augmentation de la viscosité. Le changement de la longueur apparente (de L_0 à L) est relié au changement des viscosités intrinsèques (de $[\eta_0]$ à $[\eta]$) de l'ADN libre et complexé (Cohen et Eisenberg, 1969; Cf partie expérimentale p.134). Un graphe représentant L/L_0 en fonction du nombre de moles de ligands liées par moles de paires de bases de l'ADN (r) donne une pente de 1,0 pour un intercalant et une élongation théorique de 3,4Å par molécule liée, alors que la pente est de 2,0 pour un bis-intercalant. Des intercalants classiques tels que l'adriamycine ou la 9-méthoxyellipticine provoquent l'augmentation de viscosité attendue tandis que la proflavine et le bromure d'éthidium donnent des pentes respectives de 0,80 et 0,73 (Cohen et Eisenberg, 1969; Saucier *et al.*, 1971). Ces résultats et des expériences similaires avec d'autres ligands (Saucier *et al.*, 1971; Jones *et al.*, 1980) indiquent que l'augmentation de la longueur apparente produite par l'intercalation varie de façon significative avec la structure du ligand et est généralement inférieure à la valeur prévue de 1,0 pour des raisons non établies.

- L'augmentation de la longueur apparente produite par Methia-Nt (Figure 16) se caractérise, quant à elle, par une pente de 1,028 très proche de la valeur théorique d'un monointercalant (pente de 1,0) et de ce fait compatible avec une intercalation.

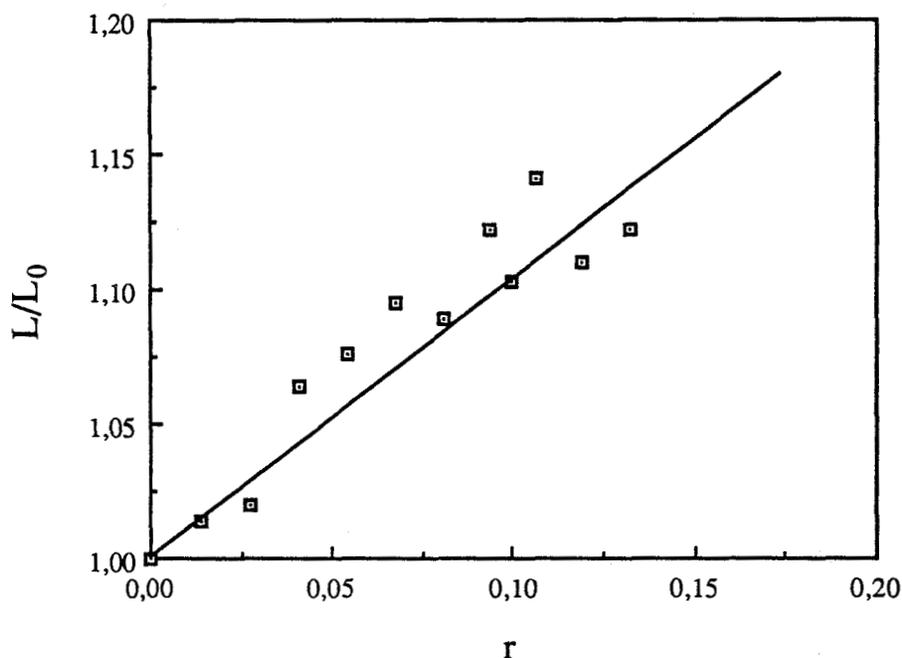


Figure 16 : Elongation de l'ADN de thymus de veau en présence de Methia-Nt ; l'expérience a été réalisée à 27°C dans un tampon SHE 0,01M. La concentration, exprimée en phosphate est de 902 μ M. Methia-Nt est ajouté par incréments à partir d'une solution mère de concentration $c = 2,5$ mM

En conclusion, les résultats présentés ici nous laissent penser que l'hypothèse d'un processus d'intercalation pour Methia-Nt peut être envisagée. Dans le but de valider une telle hypothèse, un travail en modélisation moléculaire afin de déterminer un modèle de l'interaction Methia-Nt/ADN est actuellement réalisé par l'équipe du Prof. J.W. Lown.

De tous les analogues thiazoliques synthétisés, Thia-Nt est le plus intéressant, notamment par sa spécificité différente de celle observée pour la Nt (Cf article n°2). Cependant Thia-Nt comporte des chaînes latérales aminopropyle en lieu et place des chaînes à groupes guanidine et amidine de la Nt dont on sait l'importance considérable (Zimmer *et al.*, 1972) notamment en ce qui concerne l'affinité vis-à-vis de l'ADN. Dans le but d'évaluer le rôle des chaînes latérales aminées primaires par rapport aux groupements terminaux guanidine et amidine, un analogue de la Nt possédant les chaînes latérales des analogues thiazoliques (Pseudo-Nt, Figure 17) a été synthétisé. Nous disposons ainsi d'une référence qui permettra de déterminer de façon rigoureuse l'influence de l'hétérocycle sur la nature de l'interaction avec l'ADN.

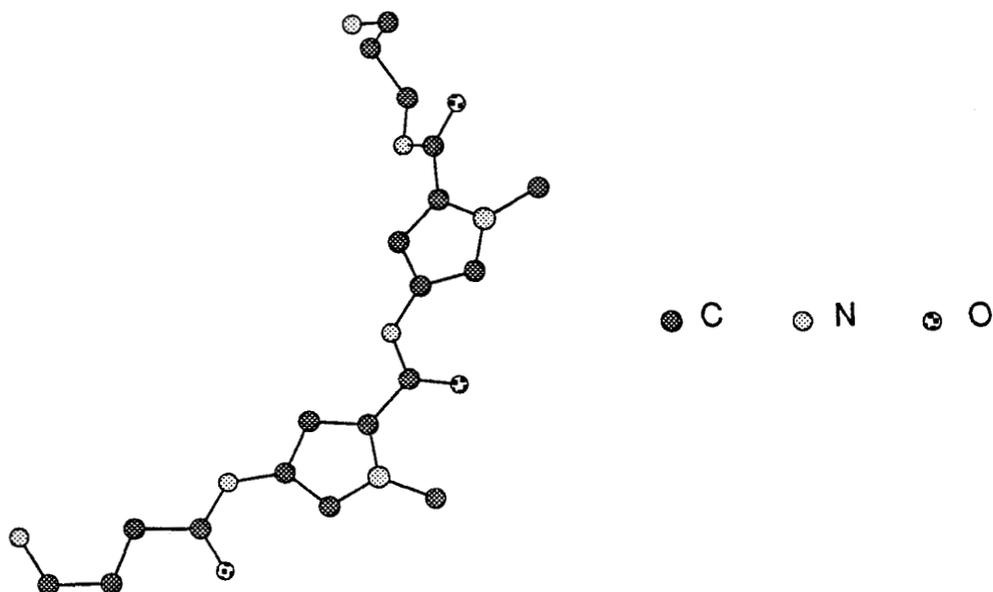


Figure 17 : Structure de Pseudo-Nt (CHEM 3D)

I.3.3. Pseudo-Nt :

□ Synthèse de Pseudo-Nt (Schéma 2) :

La molécule pivot est le trifluoroacétate de 4-(4'-amino-1'-méthyl-pyrrole-2'-carboxamido)-1-méthyl-pyrrole-2-carboxylate de méthyle **10** (Bailly *et al.*, 1989b). L'amine salifiée **10** est couplée en présence de triéthylamine avec l'acide 4-(tert-butyloxycarbonylamino)butyrique en présence de DCC et HOBt. L'ester **11** ainsi obtenu est saponifié en présence de soude aqueuse pour fournir l'acide **12**. Après couplage de l'acide **12** et de l'amine **13** (Houssin *et al.*, 1988), dans des conditions identiques à celles décrites pour l'obtention de **11**, l'hydrolyse des groupements carbamate du composé **14** par l'acide bromhydrique permet l'obtention du bis-pyrrole **15** (Pseudo-Nt).

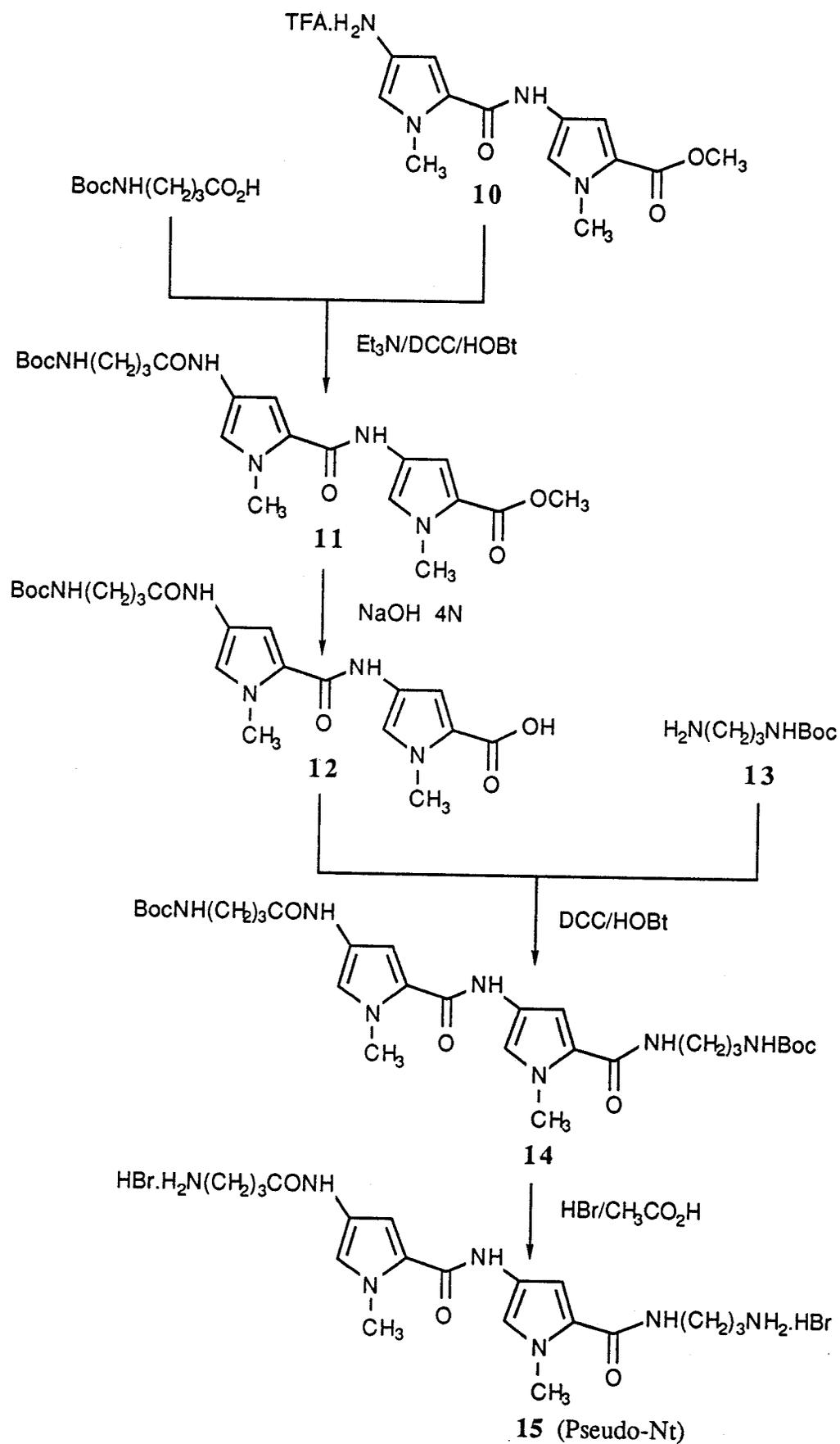


Schéma 2 : Synthèse de Pseudo-Nt

□ Etude comparative des composés Thia-Nt , Pseudo-Nt et Nt :

Le tableau 3 montre les effets des ligands Thia-Nt et Pseudo-Nt sur le ΔT_m et sur la constante d'affinité pour l'ADN de thymus de veau et sur les valeurs Q pour les deux ADN synthétiques poly[(dAT).(dAT)] et poly[(dA).(dT)] :

| | ADN natif ou synthétique | | | | | | | |
|------------|----------------------------------|----------|-----------|----------------------|---|---------|------|---------------------|
| | Thymus de veau | | | | Q ^c Poly[(dAT)] ₂ | | | Poly[(dA).(dT)] |
| | ΔT_m^a ([produit]/[ADN]) | | | Ka ^b | BET | Hoechst | DAPI | Q ^c DAPI |
| Thia-Nt | 0,7(0,1) | 3(0,5) | 5,7(1,0) | 9,24 10 ⁴ | 27 | 8,0 | 4,5 | 7,0 |
| Pseudo-Nt | 5,5(0,1) | 8,5(0,5) | 10,5(1,0) | 1,17 10 ⁵ | 12 | ---- | ---- | ---- |
| Nétropsine | ---- | 16(0,5) | ---- | 2,75 10 ⁵ | 1,2 | 1,3 | 1,7 | 1,3 |

Tableau 3 : Comparaison des paramètres de liaison à l'ADN de Thia-Nt, Pseudo-Nt et Nt. a : élévation de la température de dénaturation thermique de l'ADN (°C); b : constante d'association (M⁻¹) mesurée avec le tampon (10mM Tris, 10mM NaCl, pH7); c : concentration (μM) de produit nécessaire pour diminuer de 50% la fluorescence du fluorophore lié à l'ADN pour un rapport [chromophore]/[ADN]=0,1

1°) Influence des chaînes latérales sur l'affinité :

La stabilisation de la double hélice d'ADN induite par Thia-Nt est cinq fois plus faible, pour un rapport [Thia-Nt]/[ADN] = 0,5, que celle observée pour la Nt. Cependant le ΔT_m provoqué par Pseudo-Nt, pour le même rapport de 0,5, est deux fois plus faible que celui de la Nt.

De même la concentration de Pseudo-Nt nécessaire pour diminuer de 50% la fluorescence du bromure d'éthidium lié à l'ADN synthétique poly[(dAT).(dAT)] est dix fois supérieure à celle enregistrée pour la Nt.

Ces premiers résultats permettent de mettre en lumière l'importance des groupements terminaux guanidine et amidine en ce qui concerne l'affinité vis-à-vis de l'ADN. Le remplacement de ces groupements fortement basiques par des groupes amine primaire entraîne une baisse sensible de la constante d'association apparente Ka (Ka = 1,17 10⁵ M⁻¹) pour Pseudo-Nt par rapport à la Nt (Ka = 2,75 10⁵ M⁻¹).

Le spectre de dichroïsme linéaire électrique obtenu pour Pseudo-Nt (Figure 18) indique à 310 nm un dichroïsme positif intermédiaire entre celui de la Nt et de Thia-Nt.

De même l'évolution du dichroïsme réduit en fonction du champ électrique (Figure 19) révèle que l'orientation de Pseudo-Nt est légèrement différente de celle de la Nt.

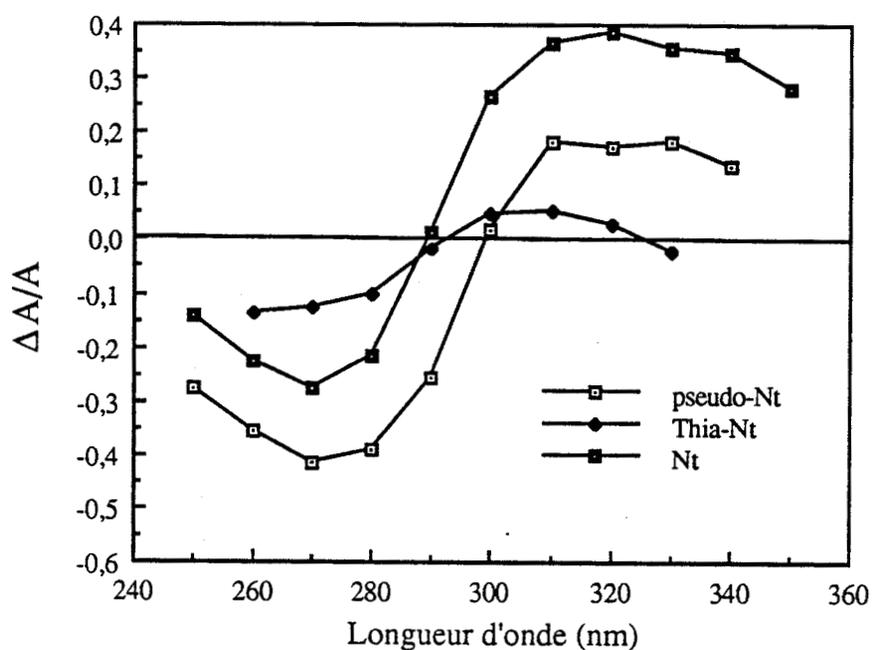


Figure 18 : Dichroïsme linéaire réduit $\Delta A/A$ des molécules Pseudo-Nt, Thia-Nt et Nt en fonction de la longueur d'onde (nm) à 12,5kV/cm

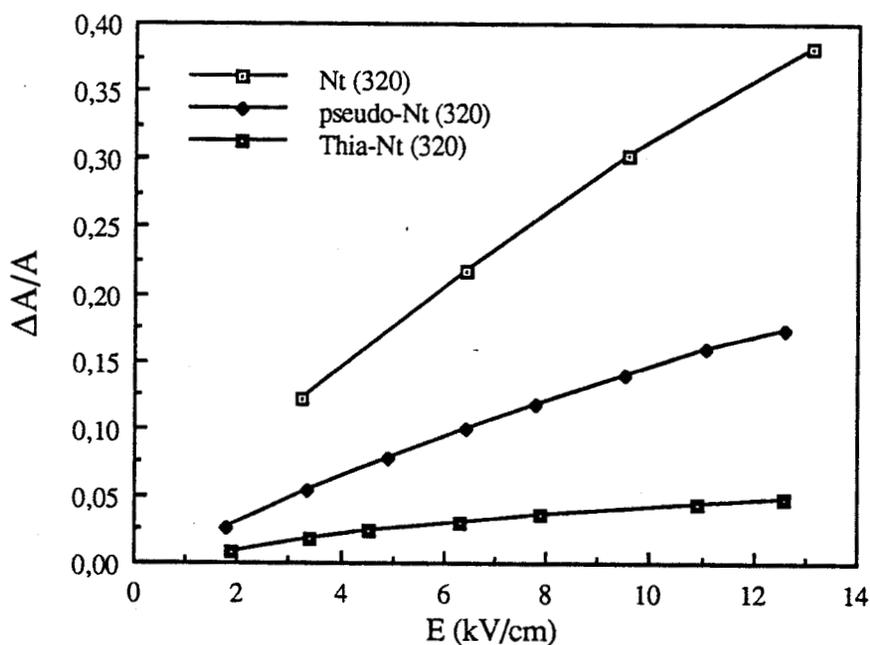


Figure 19 : Dichroïsme réduit $\Delta A/A$ en fonction du champ électrique E pour Pseudo-Nt, Thia-Nt et Nt (à 320 nm)

En effet le potentiel électrostatique moléculaire du petit sillon de l'ADN permet la liaison de molécules électrophiles telles que la Nt (Pullman et Pullman, 1981; Zakrewska et Pullman, 1983). Le remplacement des groupements amidine et guanidine par des amines primaires moins électrophiles dans Pseudo-Nt diminue de façon considérable ce facteur d'interaction électrostatique : ceci se traduit par une diminution de l'affinité pour le petit sillon que laissait présager l'étude en dichroïsme.

2°) Spécificité de liaison à l'ADN :

- Des études en fluorescence (Tableau 3) confirment que Thia-Nt possède une sélectivité préférentielle pour les enchaînements alternés de bases puriques et pyrimidiques (Cf article n°2) : la concentration nécessaire pour diminuer de 50% la fluorescence du complexe DAPI/poly[(dA).(dT)] est de $7\mu\text{M}$ pour Thia-Nt et de $1,3\mu\text{M}$ pour la Nt alors que pour l'ADN poly[(dAT).(dAT)], elle est respectivement de $4,5\mu\text{M}$ et $1,7\mu\text{M}$.

- Une étude comparative en "footprinting" (ADN *tyr T*, DNAase I, Cf article n°2, p.30) des composés Nt, Pseudo-Nt et Thia-Nt révèle des sites de fixation identiques pour Pseudo-Nt et Nt. L'analyse densitométrique (Figure 20) indique que la molécule Pseudo-Nt présente des empreintes identiques à celles de la Nt (sites 1, 2, 3, 4 et 5, Cf article n°2, p.31 et fig.4)

On peut en conclure que le remplacement des groupements amidine et guanidine des chaînes latérales de la Nt par des amines aliphatiques primaires dans Pseudo-Nt n'altère pas la spécificité mais diminue l'affinité de la molécule pour le petit sillon.

A la suite des résultats obtenus en "footprinting" (article n°2) et en fonction de l'affinité vis-à-vis de l'ADN que possède le composé Thia-Nt (article n°1), des tests *in vitro* anti-HIV ont été réalisés par le "National Cancer Institute of Bethesda" et ont démontré l'inactivité de la molécule Thia-Nt (NSC 640231).

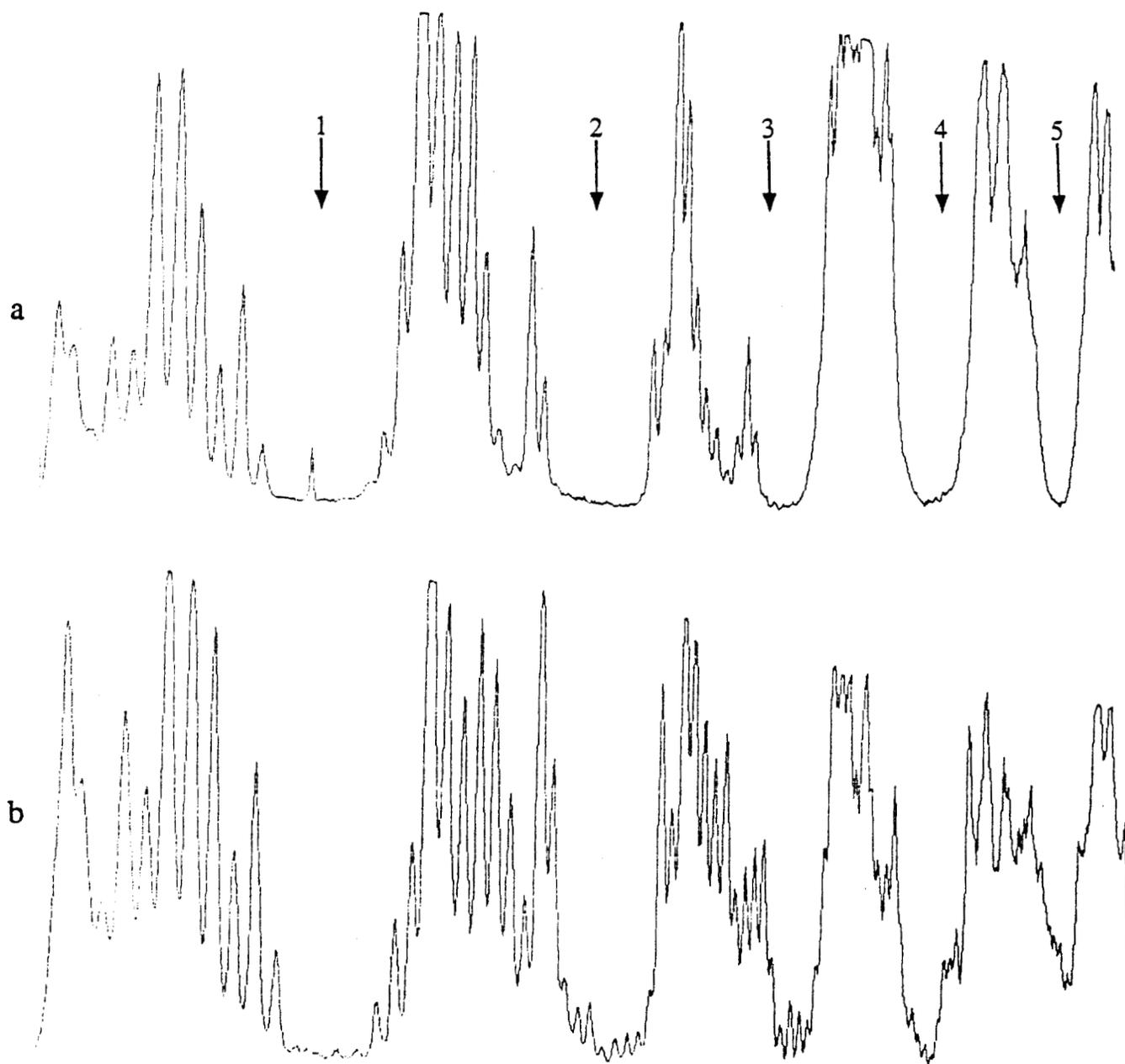


Figure 20 : Analyse densitométrique (Absorbance=f(longueur du fragment)) de l'ADN Tyr T coupé par la DNAase I (Cf article n°2, p.30) en présence de Nt (a) et de Pseudo-Nt (b) à une concentration de 25μM

Dans le but de conférer à Thia-Nt une meilleure affinité vis-à-vis de l'ADN ou une éventuelle activité biologique, des molécules hybrides reliant Thia-Nt à des intercalants ont été alors conçues. Ceci se justifie d'autant plus que de telles molécules hybrides se retrouvent au sein de nombreuses substances naturelles antibiotiques et antitumorales.

**CHAPITRE II : LE CONCEPT LIGAND DU PETIT
SILLON-INTERCALANT**

II.1. GENERALITES.

Si les ligands du petit sillon sont l'objet de nombreux travaux (Zimmer et Wahnert, 1986; Lown, 1990), un second mode de liaison bien défini est assuré par des molécules qui possèdent un système électronique Π conjugué et qui se lient par intercalation entre les plateaux de paires de bases de l'ADN double brin (Waring, 1976; Wright *et al.*, 1980; Denny *et al.*, 1983a; Wilson *et al.*, 1989; Baguley, 1991). Un tel mode d'interaction avec l'ADN est caractéristique de nombreuses substances antitumorales.

II.1.1. Molécules intercalantes :

Les chefs de file sont les acridines et le bromure d'éthidium (Figure 21); l'écartement entre deux plateaux de paires de bases passe de 0.34 nm à 0.68 nm pour permettre le positionnement de la molécule plane à égale distance de ces deux plans (Sakore *et al.*, 1979). Il faut noter que ces structures hétérocycliques ont une sélectivité préférentielle pour les paires de bases Guanine-Cytosine (Feigon *et al.*, 1984; Fox et Waring, 1987).

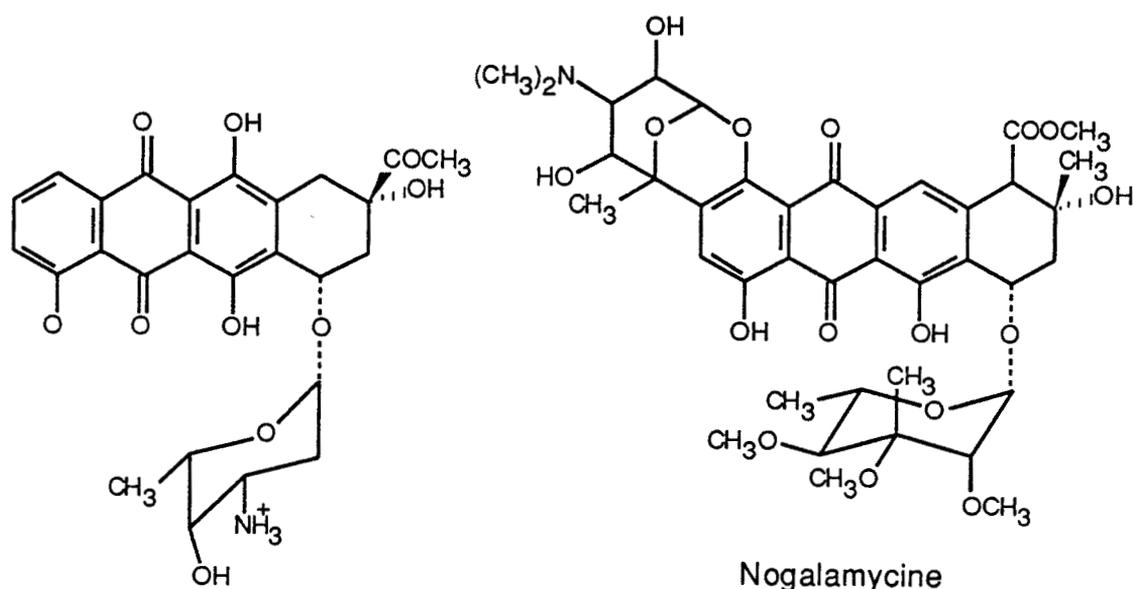
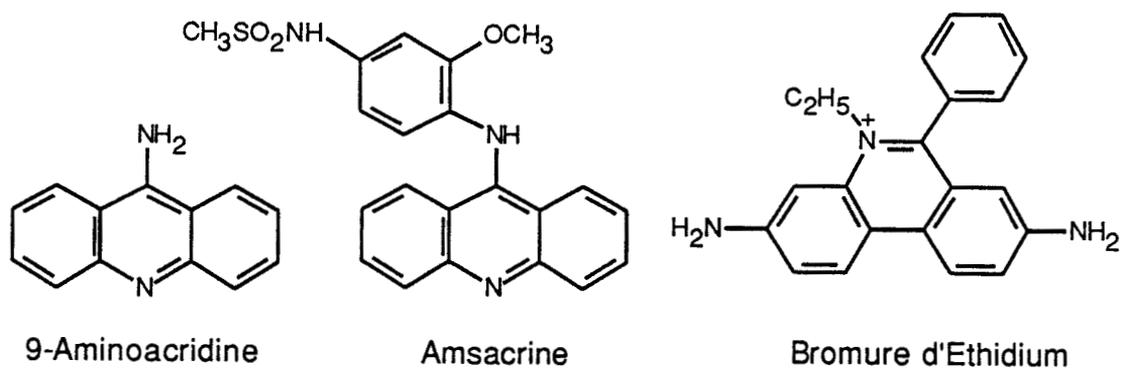
Si le phénomène d'intercalation est le principal facteur de liaison à l'ADN, d'autres éléments interviennent notamment dans des molécules plus complexes (Neidle *et al.*, 1987).

□ La daunomycine et la nogalamycine (Figure 21) appartiennent à la famille des anthracyclines. Les études de l'interaction de la daunomycine avec l'ADN ont permis de montrer que la molécule reconnaissait préférentiellement les séquences 5'-ACG et 5'-TCG, avec le chromophore intercalé entre la paire CG et la partie glycanne liée dans le petit sillon par des liaisons hydrogène avec une Adénine ou une Thymine (Quigley *et al.*, 1980; Wang *et al.*, 1987; Chaires *et al.*, 1987, 1990; Gresh *et al.*, 1985, 1989). La nogalamycine se caractérise par la présence de deux groupements glycanne attachés au chromophore. L'interaction avec l'ADN est assurée par l'intercalation de la partie tétracyclique alors que les glycannes se lient, l'un au niveau du petit sillon, et l'autre dans le grand sillon (Searle *et al.*, 1988; Liaw *et al.*, 1989; Gao *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990).

□ L'actinomycine D (Figure 21) est constituée d'un noyau phénoxazone disubstitué par des pentapeptides cycliques. Le noyau phénoxazone s'intercale (Takusagawa *et al.*, 1982; Brown *et al.*, 1984) tandis que les peptides cycliques se placent dans le petit sillon de part et d'autre du noyau intercalant, recouvrant chacun 3 paires de bases (Van Dyke *et al.*, 1982; Lane *et al.*, 1983; Fox et Waring 1984).

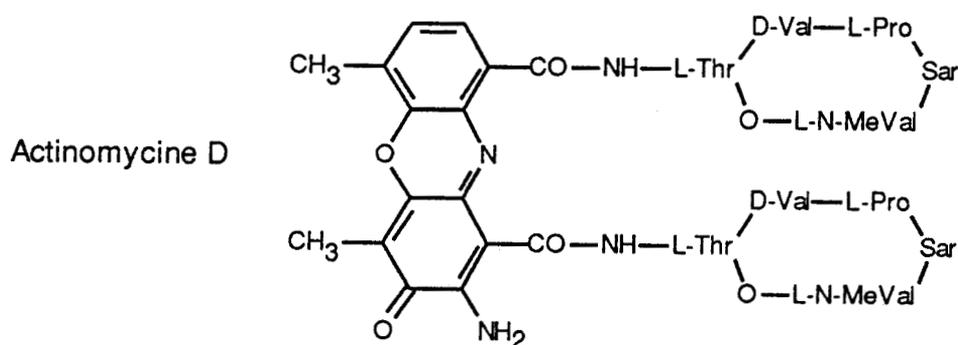
□ L'échinomycine est un antibiotique qui comprend deux noyaux quinoxaline reliés à un octapeptide cyclique présentant un pont disulfure (Figure 21). La triostine (Figure 22) (Wang *et al.*, 1984; Ughetto *et al.*, 1985; Quigley *et al.*, 1986) et ses analogues synthétiques (Bernier *et al.*, 1981; Viswamitra *et al.*, 1981; Helbecque *et al.*, 1985; Wakelin, 1986) se lient à l'ADN par un processus de bisintercalation, le cyclopeptide médian se fixant dans le petit sillon grâce à des ponts hydrogène.

De nombreuses substances naturelles possèdent donc une dualité de fixation à l'ADN : intercalation d'une partie hétérocyclique plane et fixation dans le petit sillon d'un fragment glycanique ou peptidique capable de former des liaisons hydrogène avec les bases nucléiques (Gao et Patel, 1989; Wakelin, 1986; Waring, 1986,1990).

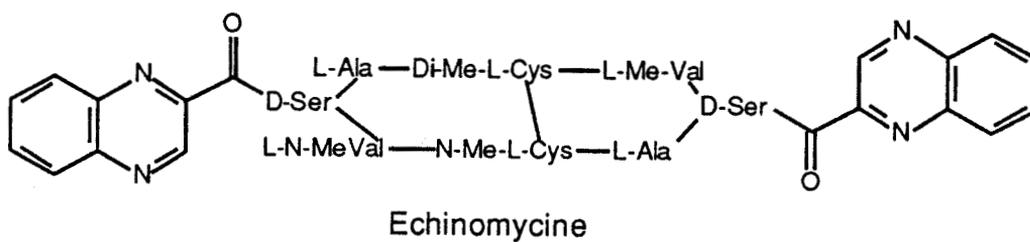


Daunomycine

Nogalamycine



Actinomycine D



Echinomycine

Figure 21: Structure de différentes molécules intercalantes

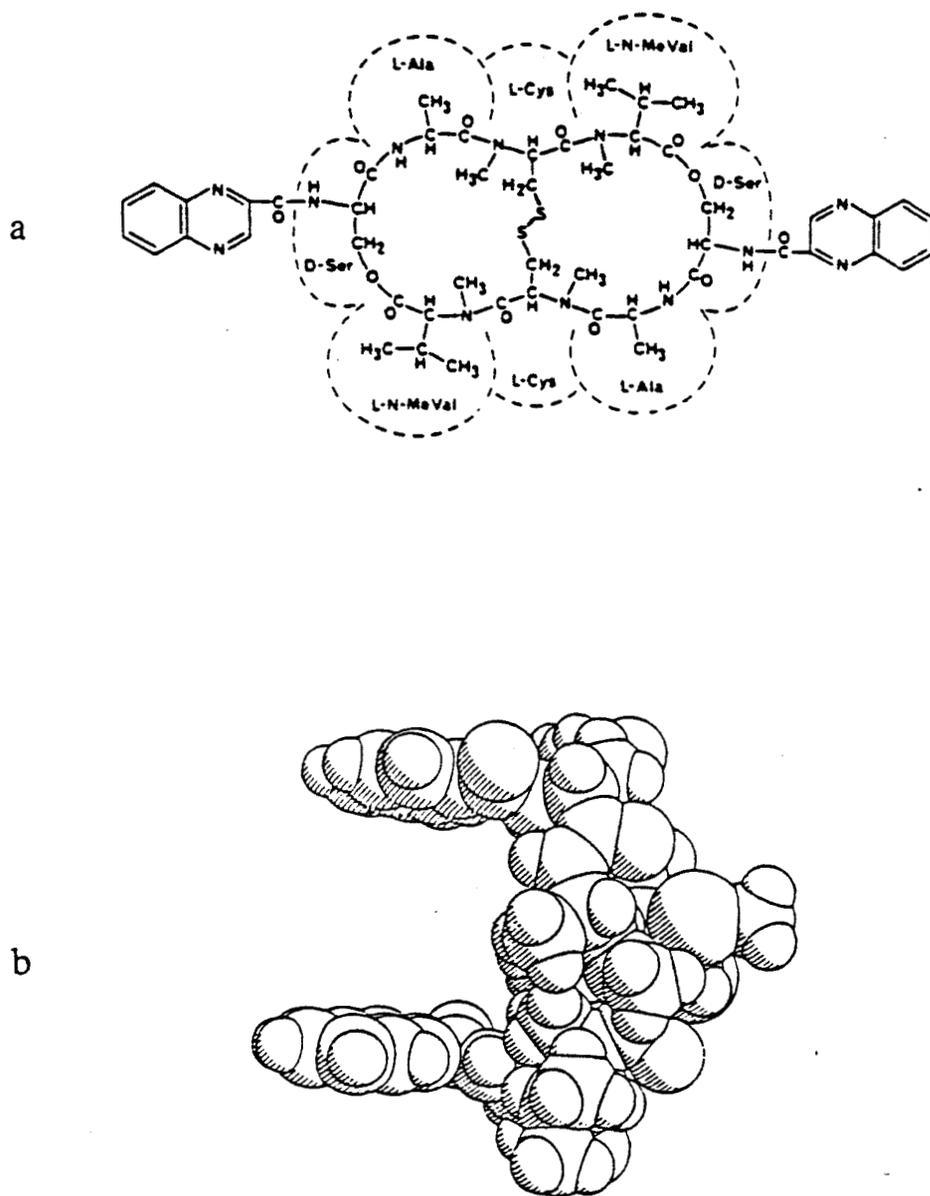


Figure 22 : Structure (a) et représentation moléculaire (b) de la triostine A

II.1.2. Hybrides ligands du petit sillon - intercalants de synthèse :

Des études antérieures sur le mode d'interaction simultané de l'actinomycine et de la nétrropsine à l'ADN (Lane *et al.*, 1983; Wartell *et al.*, 1975; Patel *et al.*, 1981, 1982) avaient permis de montrer que l'ADN peut accepter deux types de liaison relativement proches l'un de l'autre, malgré les différences de modification de la conformation de l'ADN observées pour les intercalants et pour les ligands du petit sillon (Neidle *et al.*, 1987).

Si de nombreux ligands du petit sillon (nétrropsine, distamycine, DAPI, bérénil, Hoechst 33258) se fixent, par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, avec une très forte spécificité pour les enchaînements Adénine-Thymine (Lane *et al.*, 1983; Van Dyke et Dervan, 1983; Van Dyke *et al.*, 1982; Harshman et Dervan, 1985; Portugal et Waring, 1987, 1988; Laughton *et al.*, 1990), des intercalants tels que les acridines, l'éthidium ou les ellipticines sont plutôt GC spécifiques (Feigon *et al.*, 1984; Fox et Waring, 1987, Bailly *et al.*, 1990a, 1991a).

Dans le but d'obtenir des molécules hybrides susceptibles de se lier à des séquences nucléotidiques comprenant des enchaînements Adénine-Thymine et Cytosine-Guanine, il a été envisagé d'associer une molécule hétéropolyaromatique condensée potentiellement intercalante à une entité peptidique ou pseudopeptidique capable de se fixer dans le petit sillon de l'ADN (Dervan, 1986).

Les premiers travaux réalisés selon cette stratégie sont dus à Krivtsora *et al.* (1984) et Dervan (1986). Les deux cyclopentapeptides de l'actinomycine (Figure 21) ont été remplacés par la fraction pseudopeptidique de la distamycine sur laquelle a été attaché l'agent de coupure EDTA-Fe(II) (Figure 23). Cet ensemble Dst-phénoxazone-Dst recouvre la séquence 5'-TATAGGTTAA-3'. Le fait qu'il existe deux autres sites où l'on observe une seule coupure signifie qu'un seul des deux résidus Dst s'est fixé au niveau du petit sillon. On suppose qu'au niveau de ces sites il y a intercalation du chromophore phénoxazone avec distorsion de part et d'autre du site d'intercalation, processus qui entraîne une incompatibilité de séquences entre l'ADN et le résidu Dst, empêchant sa fixation dans le petit sillon.

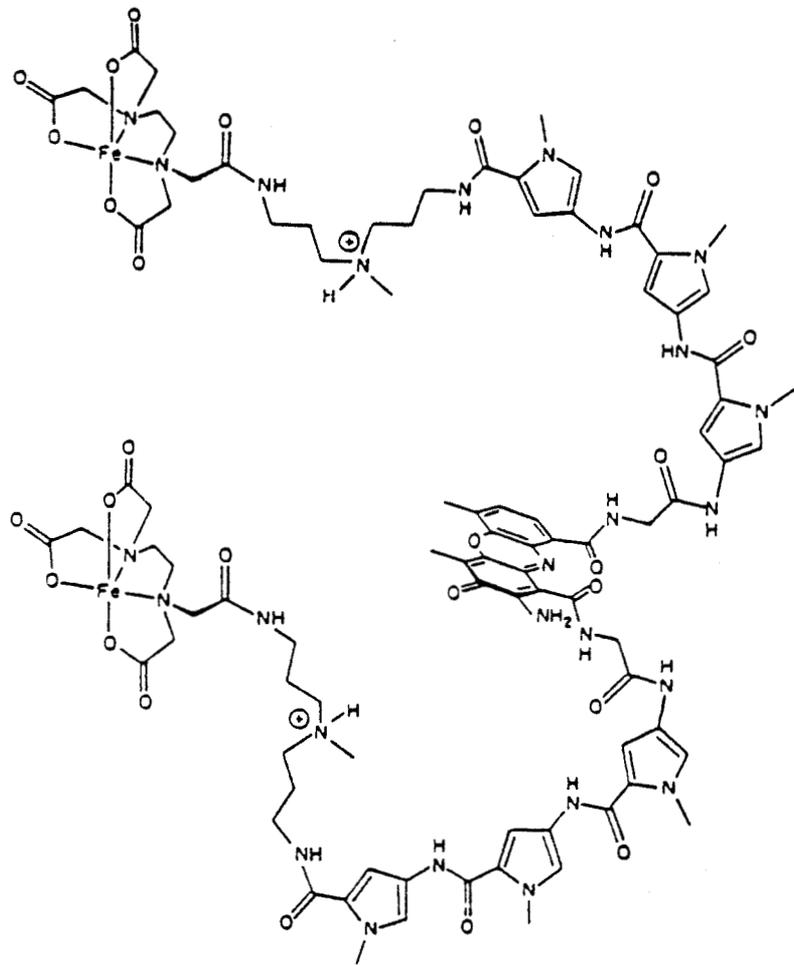


Figure 23: Structure de la bis[Fe(II).EDTA-distamycine]phénoxazone [BEDP.Fe(II)]

Compte tenu des observations relatives à la dualité de fixation des hybrides ligands du petit sillon - intercalants faites précédemment, de tels hybrides reliant le pseudopeptide de type poly(N-méthylpyrrolocarboxamide) à différents intercalants ont été élaborés entre autres au sein de notre laboratoire (Bailly et Hénichart, 1991).

II.1.3. Dérivés acridiniques de la nétropsine et de la distamycine :

Les premiers hybrides synthétisés (Eliadis *et al.*, 1988; Bailly *et al.*, 1989b) relient le chromophore 9-aminoacridine à la nétropsine et à la distamycine par l'intermédiaire de bras espaceurs de nature et de longueur variables.

Pour l'hybride NETGA (Figure 24), le choix de l'intercalant s'est porté sur le 9-anilinoaminoacridine. Le chromophore anilinoaminoacridine GC spécifique (Feigon *et al.*, 1984) se caractérise par l'intercalation du noyau acridine alors que le cycle aniline adjacent se loge dans le petit sillon (Denny *et al.*, 1983b; Chen *et al.*, 1988). Les modèles CPK (Corey-Pauling-Koltun) ont mis en évidence de plus la nécessité d'un bras espaceur; en effet une étude antérieure de Krivtsora *et al.* (1984) a montré que la fixation directe des résidus distamycine sur le chromophore phénoxazone entraînait une fixation à l'extérieur de la double hélice pour les fragments pseudopeptidiques, l'intercalation du noyau phénoxazone n'ayant pas lieu. Le choix du bras espaceur s'est donc porté sur le même résidu glycine adopté par Dervan en 1986 pour son dérivé Dst-phénoxazone-Dst (Figure 23).

L'étude de l'interaction NETGA/ADN révèle une intercalation partielle du noyau acridinique (Bailly *et al.*, 1990c) : une telle orientation traduit l'influence de la partie nétropsine sur la liaison de l'acridine à l'ADN. De plus la partie anilinoaminoacridine semble nécessaire à l'induction de propriétés antitumorales *in vivo* (Bailly *et al.*, 1991b). De telles propriétés ont déjà été observées *in vitro* avec d'autres dérivés de la glycy lanilinoaminoacridine (Collyn-d'Hooghe *et al.*, 1987; Bailly *et al.*, 1988b).

Enfin la pénétration cellulaire du composé NETGA, étudiée en résonance paramagnétique électronique en utilisant l'analogue porteur d'un marqueur de spin comme traceur, révèle un tropisme nucléaire intermédiaire (Bailly et Hénichart, 1990) comparativement à ceux observés pour l'aminoacridine (Lemay *et al.*, 1983) et la nétropsine (Bailly *et al.*, 1989a).

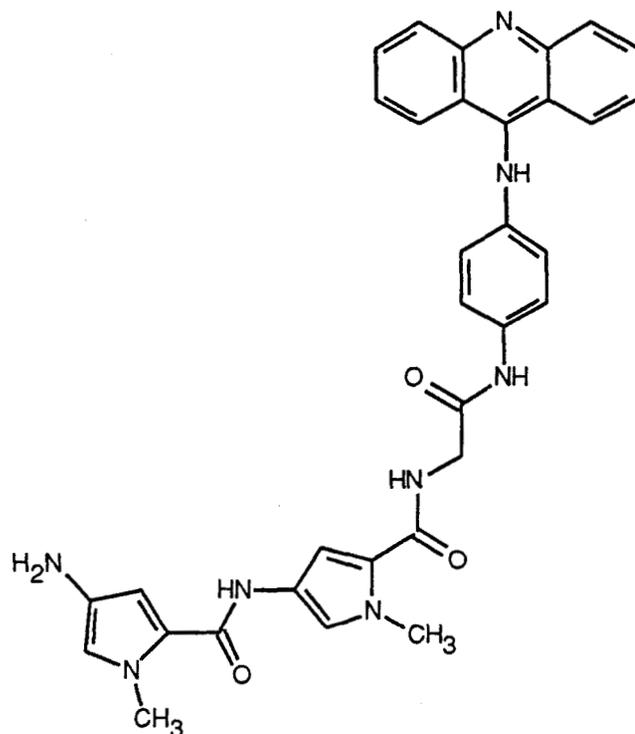


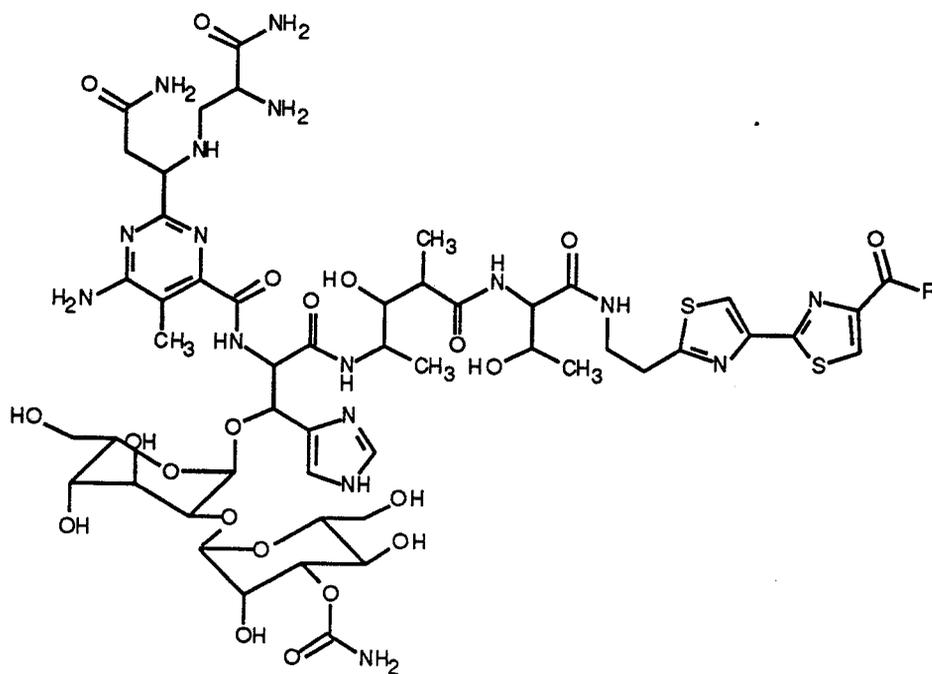
Figure 24 : Structure de NETGA

II.1.4. Hybrides nétropsine-bithiazole :

Avant de décrire les résultats déjà obtenus avec ces hybrides et l'évolution de la stratégie suscitée pour la présente étude, nous rappellerons brièvement certaines caractéristiques essentielles de la bléomycine qui a inspiré les travaux antérieurs et les nôtres.

II.1.4.1. La bléomycine

Le terme bléomycine (Blm) correspond à un groupe d'antibiotiques glycopeptidiques extraits de *Streptomyces verticillus* qui répondent à une structure commune, l'acide bléomycinique (Figure 25) (Crooke, 1978; Carter, 1978; Umezawa, 1979). Ils présentent une activité antitumorale dont l'intensité et la durée varient selon la nature de la fraction amine terminale qu'ils possèdent, la Blm-A₂ révélant l'activité la plus importante.



| R | BIm |
|---|---------------------|
| OH | acide bléomycinique |
| $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{S}^+(\text{CH}_3)_2$ | A ₂ |
| $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ | A ₅ |
| $\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ | A ₆ |
| NH_2 | B ₁ |
| $\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ | B ₂ |
| $\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ | B ₄ |

Figure 25 : Structure des bléomycines

La bléomycine (Blm) est utilisée en clinique depuis 1966 dans le traitement des lymphomes de Hodgkin, des carcinomes de la sphère bucco-pharyngée, des tumeurs de la peau et des organes génitaux.

La structure moléculaire de la bléomycine n'a été déterminée qu'en 1971 par l'équipe de Umezawa (Umezawa, 1971); elle comporte deux fragments principaux :

□ un fragment pseudopeptidique, β -amino-alanine-pyrimidine- β -hydroxy-histidine, capable de complexer les métaux. En particulier, le complexe Blm-Cu est la forme de transport dans le sang et de transit intracytoplasmique, cette complexation du cuivre protégeant la Blm de l'attaque enzymatique (Sugiura *et al.*, 1979). La Blm lie également le fer et c'est le complexe Blm-Fe(II)-O₂ qui induit la formation de radicaux libres oxygénés responsables de la coupure d'ADN (Oberley et Buettner, 1979; Burger *et al.*, 1981; Kénani *et al.*, 1988a,b).

La recherche d'analogues synthétiques simplifiés fonctionnant selon le même processus que le modèle naturel a amené à concevoir un composé structuralement comparable nommé AMPHIS (Hénichart *et al.*, 1982a, 1985a).

□ un noyau bithiazolique : l'interaction de la Blm à l'ADN est assurée par l'ensemble hétérocyclique (figure 26) (Chien *et al.*, 1977).

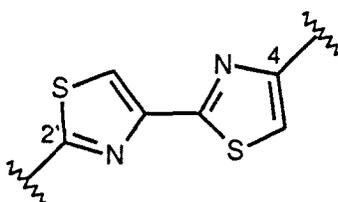


Figure 26 : Partie bithiazolique de la bléomycine

Le mode de liaison du bithiazole reste controversé: un processus d'intercalation a été proposé (Povirk *et al.*, 1979; Fisher *et al.*, 1985), une fixation au niveau du petit sillon a été également avancée (Kuwahara et Sugiura, 1988). Cependant l'hypothèse d'une intercalation partielle d'un seul thiazole (Booth *et al.*, 1983) a été démontrée au sein de notre laboratoire (Hénichart *et al.*, 1985b) et confirmée récemment par une étude en RMN (Gamcsik *et al.*, 1990).

La liaison et la coupure de l'ADN constituent les deux étapes essentielles du processus cytotoxique de la Blm.

II.1.4.2. Hybrides bithiazoliques de la nétrropsine

Le processus de liaison à l'ADN du bithiazole semble dépendre de la nature plus ou moins encombrante de la chaîne peptidique à laquelle il est lié. Etant donné qu'aucun site préférentiel de liaison n'est connu pour le seul noyau bithiazole, des hybrides reliant la Nt, molécule connue pour se lier sur une séquence nucléotidique donnée de l'ADN double brin, à la partie bithiazolique de la Blm ont été élaborés (Mrani *et al.*, 1991).

L'interaction avec l'ADN de ces dérivés révèle que le phénomène d'intercalation ou de pseudo-intercalation de leur partie bithiazole n'existe pas. Par contre, la liaison de chacune de ces deux molécules au niveau du petit sillon s'effectue apparemment par leur partie nétrropsine. Ainsi de tels composés nétrropsine-bithiazole ne doivent probablement pas être considérés comme des modèles hybrides du type ligands du petit sillon-intercalants, mais plutôt comme des "lexitropsines".

II.1.4.3. Analogues synthétiques de la partie bithiazolique

Dans le but d'améliorer les propriétés intercalantes du noyau bithiazole de la bléomycine, des analogues synthétiques ont montré que des composés plans permettent une augmentation de la densité électronique comme pour l'analogue trithiazolique (Figure 27b) (Sakai *et al.*, 1982) ou le dérivé de structure triazolothiazolythiazole (Houssin *et al.*, 1986). Le dérivé phényltriazolothiazolique, PETT, (Figure 27c) se caractérise par l'adjonction au motif bithiazole (Figure 27a), présent dans la bléomycine, d'un ensemble phényltriazolique.

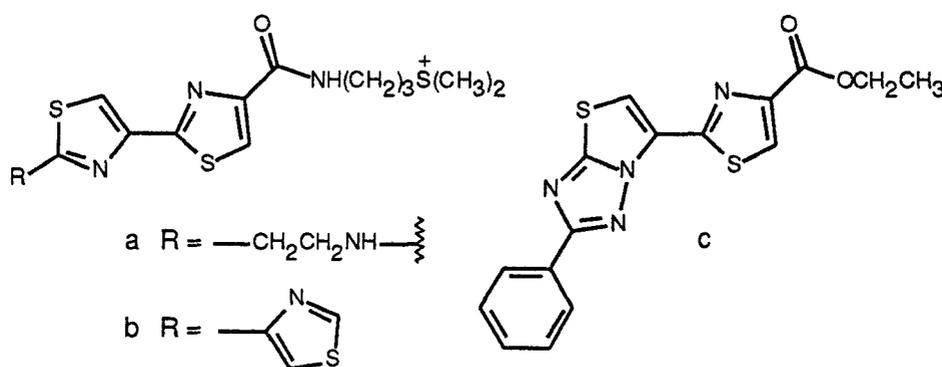


Figure 27: Structure de la partie bithiazolique de la bléomycine (a), du dérivé trithiazolique (b) et du 2-phényl-6-[2'-(4'-(éthoxycarbonyl)thiazolyl)]thiazolo [3,2-b][1,2,4]triazole (PETT) (c)

Cette molécule polycyclique condensée a de ce fait la particularité d'étendre le nuage électronique Π et de favoriser le "stacking" (empilement) avec les plateaux des paires de bases voisins. Les études de sa structure spatiale par cristallographie et de ses propriétés intercalantes, comparées à celles observées pour la partie bithiazolique de la bléomycine, permettent de considérer ce nouveau dérivé comme un intercalant vrai (Houssin *et al.*, 1986).

II.2. HYBRIDES Thia-Nt - INTERCALANTS.

II.2.1. Hybride phényltriazolothiazolythiazole de Thia-Nt :

Le remplacement du bithiazole de la Blm (Figure 27a) par l'ensemble phényltriazolothiazolythiazole (PETT) (Figure 27c), dont il avait été mis en évidence le caractère intercalant (Houssin *et al.*, 1986), pourrait aboutir à un hybride intercalant-ligand du petit sillon.

Nous avons alors envisagé un tel hybride comprenant la structure triazolothiazolythiazole sur laquelle est fixée non pas la Nt mais Thia-Nt (Cf article n°1). Cette molécule (PETTthia-Nt, Figure 28) qui combine la spécificité de fixation dans le petit sillon de Thia-Nt (Cf article n°2) à l'affinité du PETT pour les paires de bases GC (Houssin *et al.*, 1986), via un bras espaceur souple n-propyle (Dervan, 1986; Eliadis *et al.*, 1988) devrait permettre la reconnaissance d'une séquence nucléotidique longue de 5 à 6 paires de bases.

II.2.1.1. Synthèse de PETTthia-Nt

La synthèse du thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazole (PETT) consiste en une réaction de Hantzsch entre la triazoline-5-thione **2** et la cétone bromée **3** (Schéma 3). Le benzoylthiosemicarbazide **1** est obtenu par condensation du chlorure de benzoyle avec le thiosemicarbazide, dans la pyridine (Fox, 1952). La cyclisation du produit de condensation **1** en présence de soude fournit d'une part la triazoline-5-thione **2** (Yale et Piala, 1966) alors que le 2-bromoacétyl-4-méthoxycarbonyl thiazole **3** est synthétisé selon le procédé de Sakai (Sakai *et al.*, 1981) modifié au laboratoire (Houssin *et al.*, 1984a). De nombreux travaux relatent la synthèse de systèmes thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazole (Potts et Husain, 1971; Dhaka *et al.*, 1974; Mignot *et al.*, 1979; Hénichart *et al.*, 1986). La préparation de PETT **5** a nécessité dans un premier temps l'isolement du composé **4** résultant de la condensation entre le thioamide **2** et la cétone α -halogénée **3**, réaction effectuée dans l'éthanol à température ambiante, puis, dans un second temps, la réaction de cyclisation du composé **4** à reflux dans l'éthanol. Il faut noter qu'il y a transestérification de la fonction ester méthylique en **4** du thiazole, ce qui s'explique par la libération d'acide bromhydrique qui catalyse la réaction de cyclisation de **4** avant d'accélérer le processus de transestérification justifié par la présence d'éthanol comme solvant.

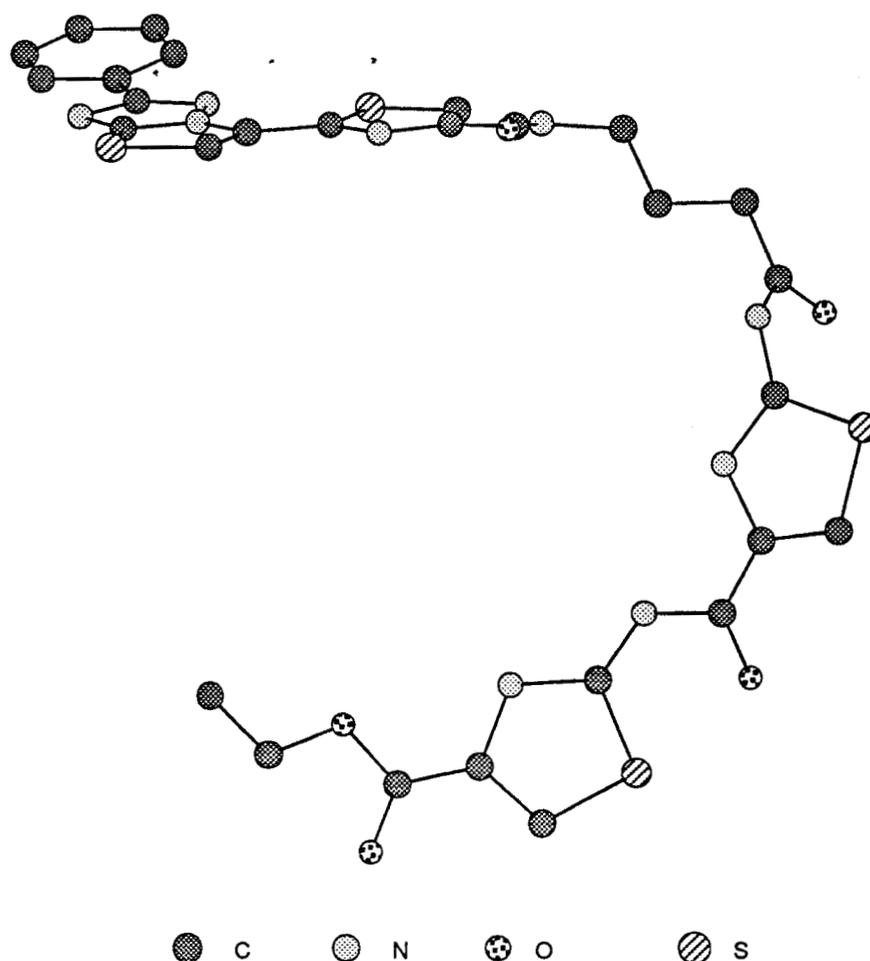


Figure 28: Représentation spatiale hypothétique de PETTthia-Nt (CHEM 3D)

L'hybride intercalant-ligand du petit sillon PETTthia-Nt **9** est synthétisé à partir de deux composés: le thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazole (PETT) **5** et le pseudotripeptide **7** (Cf article n°1) (Schéma 4). Après saponification de l'ester **5** et coupure du groupement carbamate du pseudopeptide **7** par l'acide trifluoroacétique, les deux molécules **6** et **8** sont couplées classiquement en présence de triéthylamine, de dicyclohexylcarbodiimide et de 4-diméthylaminopyridine (Grehn *et al.*, 1986; Hassner et Alexanian, 1978): on obtient la molécule attendue **9** (PETTthia-Nt).

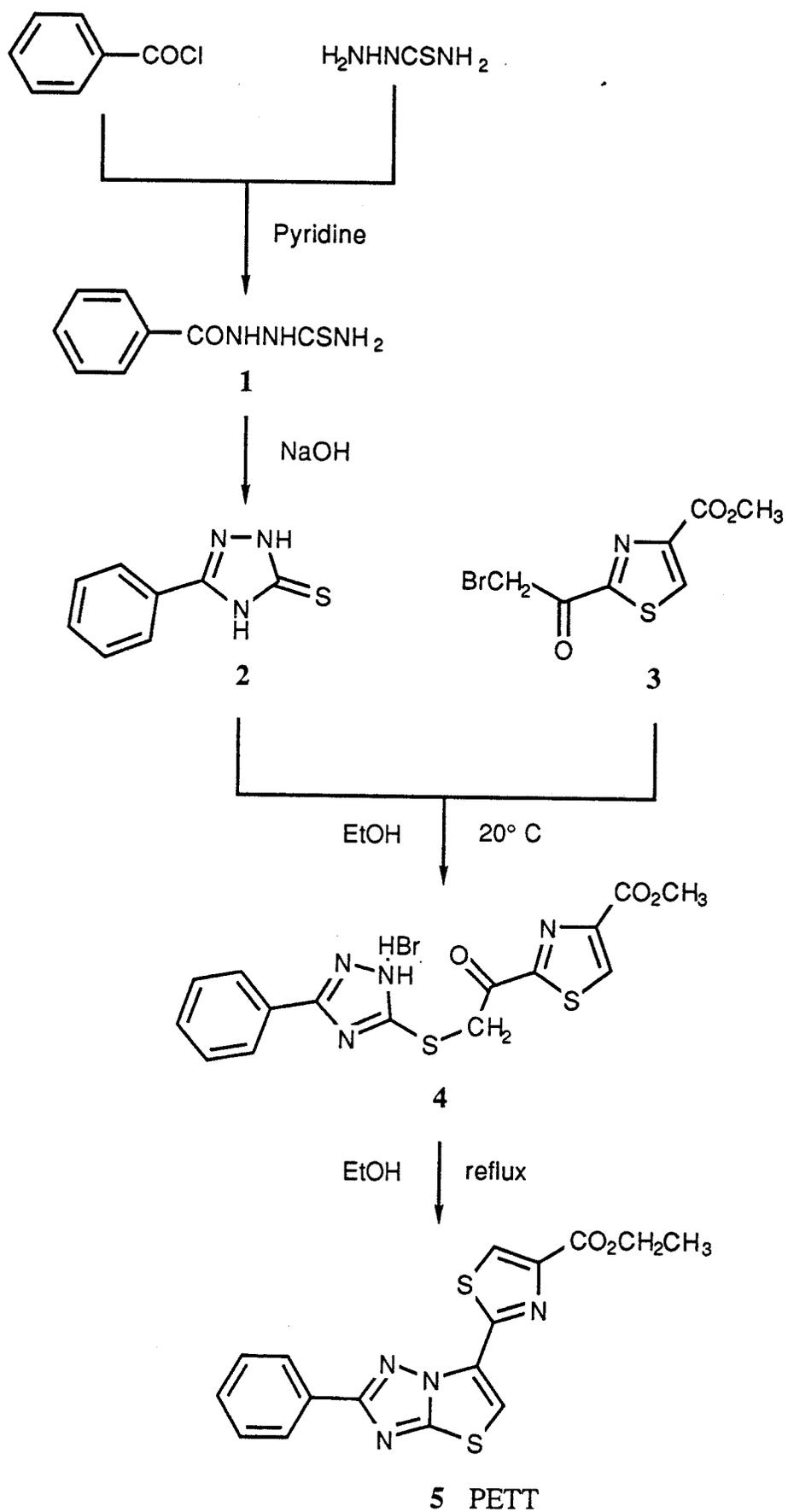


Schéma 3: Synthèse de PETT

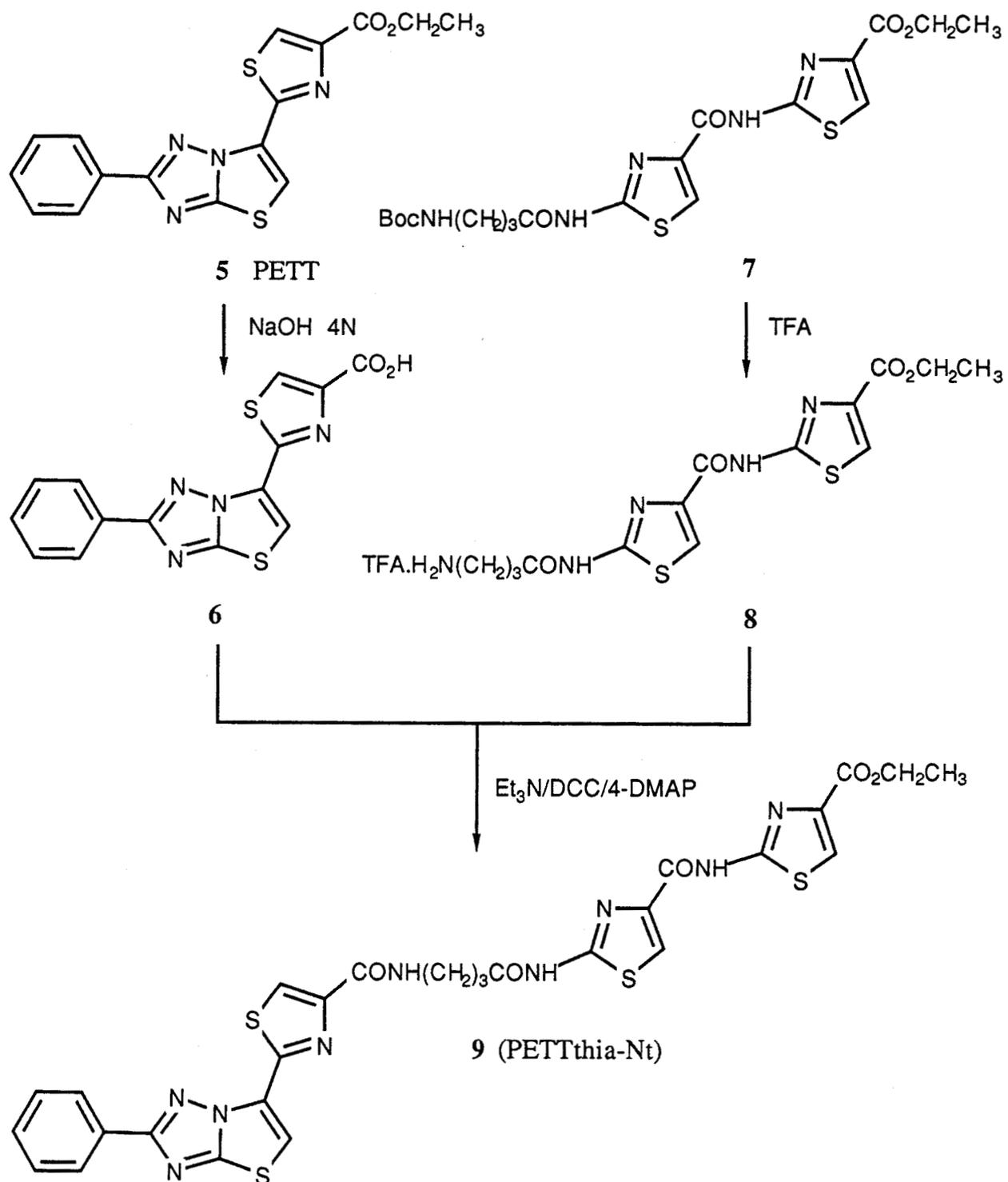


Schéma 4 : Synthèse de PETTthia-Nt 9

II.2.1.2. Interaction PETTthia-Nt/ADN

L'étude en spectroscopie UV a permis de mettre en évidence une faible affinité de la molécule PETTthia-Nt pour l'ADN.

Dans le but de préciser le mode d'interaction de PETTthia-Nt, la molécule a été étudiée en viscosimétrie : la mesure de l'augmentation de la longueur apparente de l'ADN produite pour des concentrations croissantes de PETTthia-Nt se traduit par une droite de pente 0,899 proche de la pente théorique (1,0) d'un monointercalant. Il faut noter que l'adjonction du motif bithiazole de Thia-Nt à l'ensemble hétérocyclique phényltriazolothiazolylthiazole (PETT) se caractérise par une augmentation de la longueur apparente (pente de 0,899) moins importante que celle créée par PETT (pente de 1,22 ; Houssin *et al.*, 1986), expression de l'influence du motif bithiazolique sur le processus de liaison à l'ADN. Cependant ce premier résultat n'a pu être confirmé, que ce soit par la mesure de l'angle de détorsion ou par les techniques physicochimiques usuelles (dénaturation thermique, fluorescence, dichroïsme linéaire électrique) en raison des problèmes de solubilité rencontrés avec cette molécule. De plus la fonctionnalisation en para du groupement phényle de PETT (Plouvier, 1989) n'a pas permis d'améliorer la solubilité de l'ensemble hétérocyclique.

Si la molécule PETTthia-Nt constitue un exemple intéressant pour étudier l'interaction avec l'ADN d'un hybride intercalant-ligand du petit sillon, celle-ci ne peut atteindre sa cible, l'ADN. En effet l'ensemble bithiazolique de la Blm, pourvu d'un nitroxyde marqueur, n'est pas capable de pénétrer dans la cellule et *a fortiori* d'atteindre sa cible, l'ADN (Hénichart *et al.*, 1984). Nous avons de ce fait remplacé l'ensemble phényltriazolique par des chromophores acridiniques dont le tropisme cellulaire est remarquable (Hénichart *et al.*, 1982b; Lemay *et al.*, 1983).

II.2.2. Dérivés acridiniques de Thia-Nt :

Etant donné l'intérêt de NETGA au regard de ses propriétés de liaison à l'ADN (intercalation partielle et fixation dans le petit sillon, Bailly *et al.*, 1990b) et de son activité biologique (Bailly *et al.*, 1991b), nous avons réalisé la synthèse d'un hybride (Thia-NtGA) (Figure 29) combinant le noyau acridinique de NETGA au pseudopeptide thiazolique Thia-Nt (Cf articles n°1&2) dans le but de renforcer l'affinité de cette portion pseudopeptidique pour l'ADN.

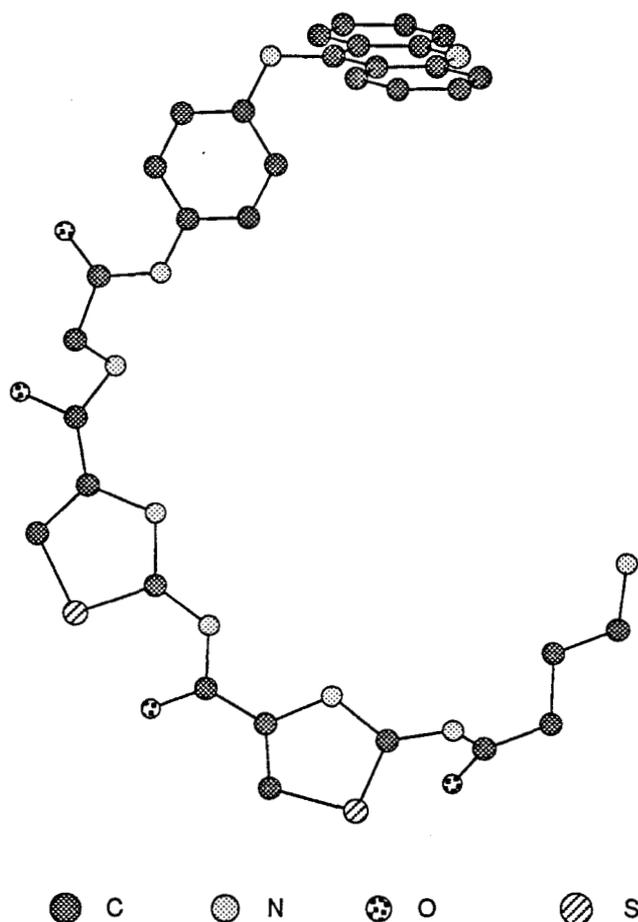


Figure 29 : Représentation spatiale hypothétique de Thia-NtGA (CHEM 3D)

II.2.2.1. Synthèse de Thia-NtGA et de SL-Thia-NtGA (SL pour Spin Label) :

Le couplage de l'acide 2-[2'-(4-(tert-butyloxycarbonylamino)butyrylamino)thiazole-4'-carboxamido]thiazole-4-carboxylique **20** (Cf article n°1) avec la glycydanilinoaminoacridine **21** (Hénichart *et al.*, 1982b) en présence de DCC et de 4-

DMAP (Grehn *et al.*, 1986; Hassner et Alexenian, 1978) permet d'obtenir le composé **22**. La coupure du groupement carbamate de **22** par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique fournit la molécule **23** (Thia-NtGA) (Schéma 5).

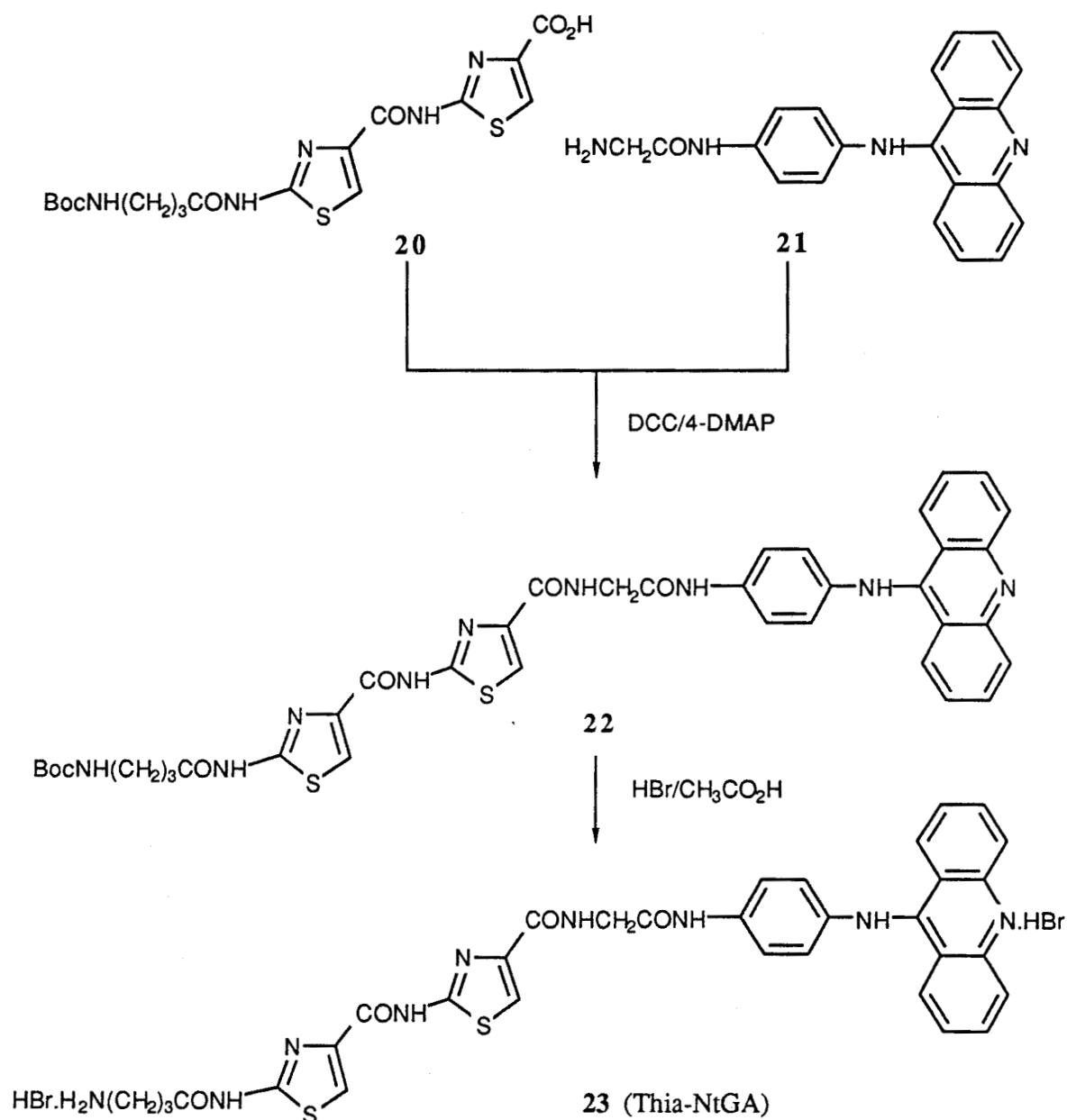


Schéma 5 : Synthèse de Thia-NtGA

Afin de suivre le cheminement de cet hybride **23** au sein de la cellule, un marqueur de spin a été greffé sur l'extrémité N-terminale de Thia-NtGA comme cela a été réalisé pour le composé NETGA (Bâilly et Hénichart, 1990). Le principe consiste à identifier qualitativement et quantitativement la présence d'une molécule "marquée" par un groupement détectable en Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) aussi bien

au niveau de la membrane, du cytoplasme que du noyau. Les "marqueurs de spin" sont bien adaptés à cette analyse : ce sont des radicaux libres stables qui possèdent un spectre de RPE variant en fonction de l'orientation du radical dans son environnement. L'évolution du spectre d'un marqueur de spin lié à une molécule reflète certaines de ses caractéristiques: sa position, son environnement, son mouvement. L'acide 2,2,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3 carboxylique (ou 3-carboxy-proxyl) a été couplé avec la base salifiée **23** en présence de triéthylamine, de DCC et de HOBT pour fournir le composé marqué **24** (SL (pour Spin Label) Thia-NtGA) (Schéma 6).

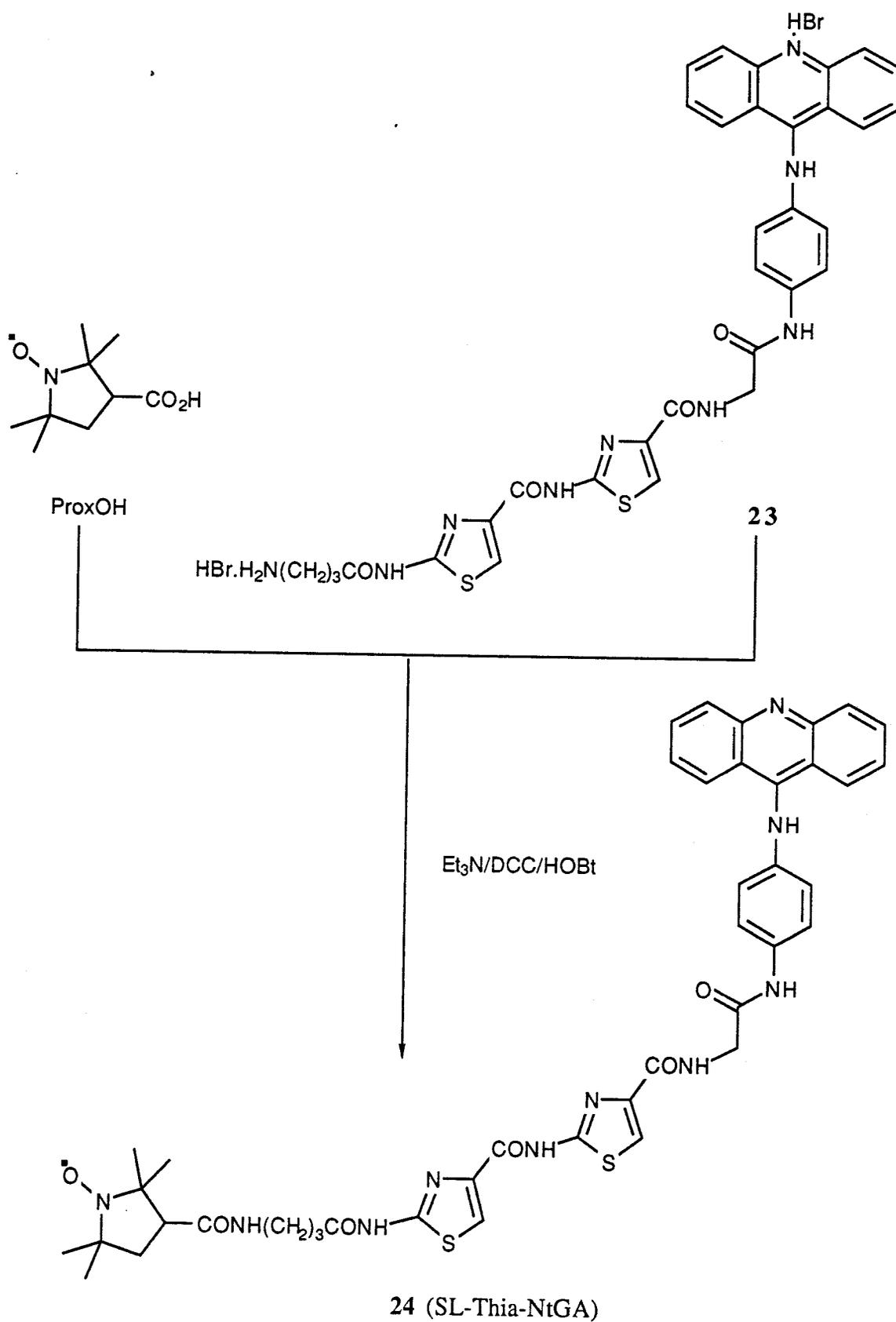


Schéma 6 : Synthèse de SL-Thia-NtGA

Les composés **23** (Thia-NtGA) et **24** (SL-Thia-NtGA) ont été étudiés tant pour leur interaction avec l'ADN que pour leur activité biologique.

II.2.2.2. Interaction Thia-NtGA/ADN :

1°) Affinité et sélectivité de Thia-NtGA :

De même que pour le composé NETGA (Bailly *et al.*, 1989b), la liaison de Thia-NtGA à l'ADN se caractérise en UV par une diminution du maximum d'absorption du ligand indicative de la formation du complexe Thia-NtGA/ADN (Figure 30).

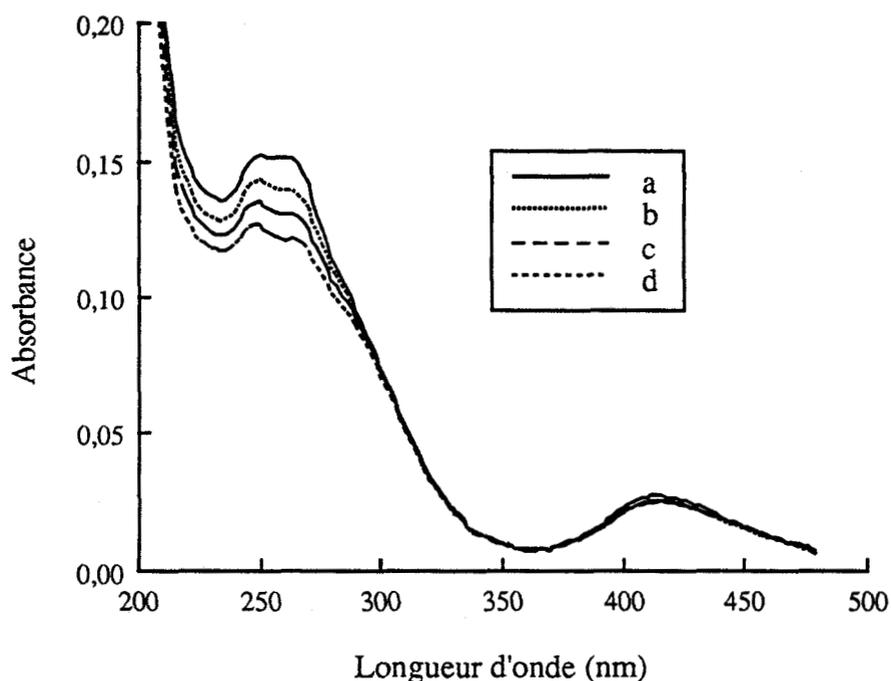


Figure 30 : Spectre d'absorption du ligand Thia-NtGA (a) et de son complexe avec l'ADN de thymus de veau pour des rapports $[Thia-NtGA]/[ADN]$ respectifs de 4 (b), 2 (c) et 1 (d)

Dans le but de comparer l'affinité de la molécule hybride **23** (Thia-NtGA) à celle des molécules parentes (la glycylnilinoaminoacridine **21** et Thia-Nt), et de déterminer une éventuelle sélectivité, nous avons étudié le déplacement du bromure d'éthidium, lié à des ADN de compositions différentes, par ces trois molécules. Les résultats sont regroupés dans le tableau 4 :

| | Q ^a ADN natif ou synthétique | | | |
|--------------|---|-------------------|---------------------|-----------------|
| | Thymus de veau | Poly[(dAT).(dAT)] | Micro Lysodeikticus | Poly[(dG).(dC)] |
| Thia-Nt | 13,5 | 27 | 36 | 72 |
| GA 21 | 2,6 | 2,8 | 9 | 9 |
| Thia-NtGA 23 | 17 | 20 | 24 | 24 |

Tableau 4 : Comparaison des valeurs Q des molécules Thia-Nt, GA 21 et Thia-NtGA 23 pour des ADN de compositions différentes (a : concentration (μM) de produit nécessaire pour diminuer de 50% la fluorescence du bromure d'éthidium lié à l'ADN pour un rapport $[\text{BET}]/[\text{ADN}] = 0,1$)

Les valeurs Q pour le composé Thia-NtGA sont du même ordre de grandeur quel que soit l'ADN utilisé. Si l'adjonction du noyau acridinique à la molécule Thia-Nt entraîne une baisse de la sélectivité, on observe par contre une augmentation sensible de l'affinité (qui se traduit par une diminution des valeurs Q de Thia-NtGA par rapport à Thia-Nt). Ceci avait déjà été observé pour des molécules hybrides où le noyau acridinique était relié à des résidus de la Dst (Bailly *et al.*, 1989b).



2°) Mode d'interaction de Thia-NtGA :

Des mesures de viscosimétrie ont été réalisées dans le but d'avancer une hypothèse concernant le mode de liaison de Thia-NtGA à l'ADN.

- Viscosimétrie :

L'addition d'aliqouts du composé Thia-NtGA à une solution d'ADN se traduit par une augmentation de la longueur apparente de l'ADN très proche de la valeur théorique de $3,4\text{\AA}$ correspondant à un monointercalant. De plus la détorsion des paires de bases au niveau et de part et d'autre du site de liaison est une conséquence de l'intercalation. Lorsque des molécules intercalantes sont ajoutées à un ADN circulaire superenroulé, la double hélice se déroule, et la superhélice droite initiale devient totalement relâchée: la viscosité est maximale. L'addition ultérieure de ligand intercalant amène la double hélice à un superenroulement gauche. La valeur de détorsion trouvée pour Thia-NtGA est de $11,3^\circ$ (elle est de 18° pour un monointercalant). On peut donc avancer l'hypothèse d'une intercalation partielle de Thia-NtGA entre les plateaux de paires de bases de l'ADN vraisemblablement par l'intermédiaire du noyau acridinique

mais on ne dispose d'aucun renseignement concernant la position de la partie bithiazolique par rapport à l'ADN.

De façon à aller plus avant dans notre hypothèse, et à préciser l'orientation de la molécule Thia-NtGA par rapport à l'ADN, une étude en dichroïsme linéaire électrique a été réalisée.

- Dichroïsme linéaire :

Le spectre de dichroïsme linéaire du complexe Thia-NtGA/ADN (Figure 31) montre une région négative (340-460 nm), reflétant la position du chromophore acridinique dans le complexe avec l'ADN, dans une zone d'absorption où il n'y a pas contribution de la partie bithiazolique. Le dichroïsme positif dans la région 300-340 nm est attribué à la partie bithiazolique. Ainsi pour Thia-NtGA, il existe deux longueurs d'onde bien distinctes (310 nm et 440 nm) qui permettent de distinguer les modes de liaison adoptés par les deux parties de la molécule, la partie bithiazolique (potentiellement ligand du petit sillon) et le chromophore anilinoacridine (potentiellement intercalant).

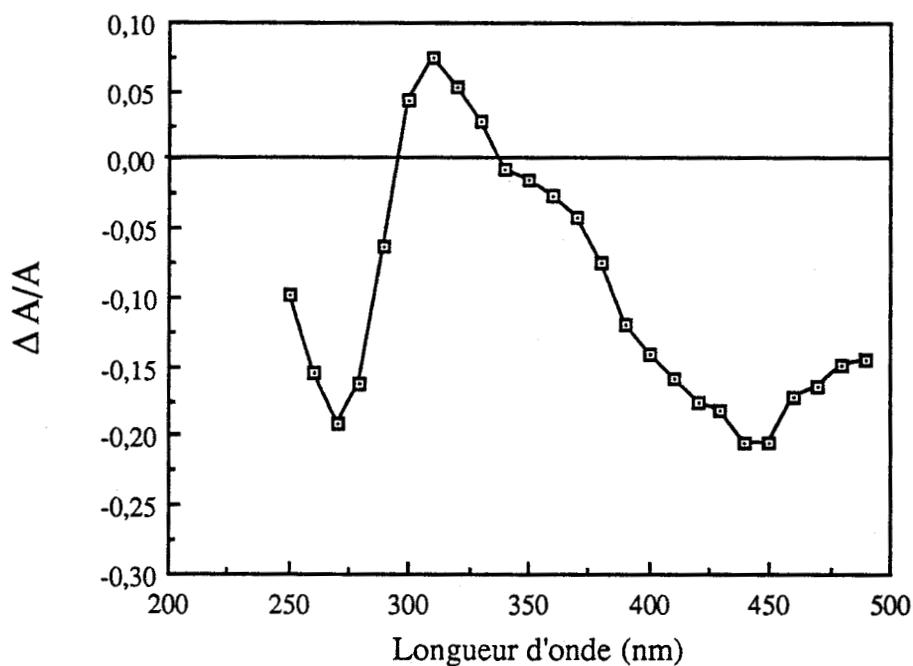


Figure 31 : Dichroïsme réduit $\Delta A/A$ de Thia-NtGA en fonction de la longueur d'onde (nm) à 12,5kV/cm

Le spectre de DL induit par Thia-NtGA (Figure 32) indique que deux processus de liaison sont mis en jeu dans la liaison de Thia-NtGA à l'ADN.

A 440 nm, les mesures de DL révèlent l'orientation du chromophore acridinique. La partie glycyanilinoaminoacridine de Thia-NtGA, étudiée seule, se caractérise par un DL négatif proche de celui des bases de l'ADN (Figure 32), favorisant un mode de liaison dans lequel l'acridine est empilée parallèlement aux bases, ce qui correspond à une intercalation classique. Mais lorsque cette partie intercalante est reliée au bithiazole non intercalant, l'intensité du dichroïsme réduit à 440 nm chute de façon significative, ce qui traduit une rupture du parallélisme entre l'acridine et les bases (Figure 32). Dans ces conditions le recouvrement des paires de bases n'est pas total et on peut conclure à une intercalation partielle comme cela a été observé pour le composé NETGA (Bailly *et al.*, 1990b). Cependant le dichroïsme moins négatif de Thia-NtGA comparativement à GA pourrait également traduire un phénomène de courbure locale induit par la liaison du ligand à l'ADN.

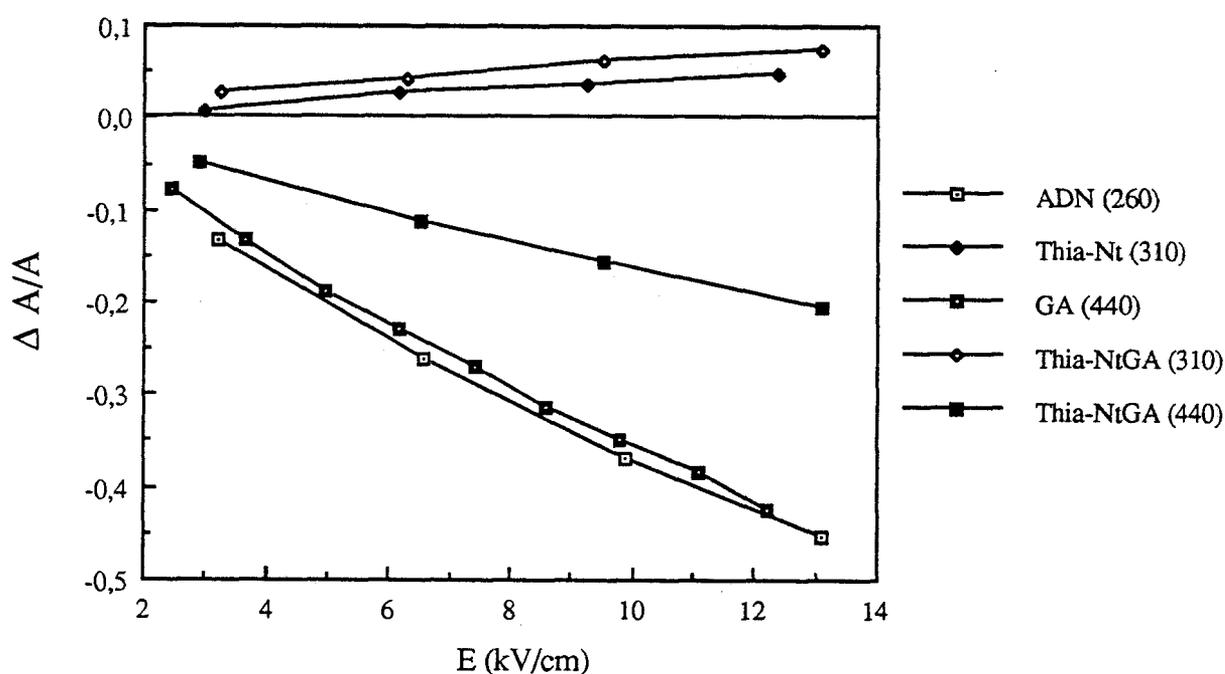


Figure 32 : Dichroïsme réduit $\Delta A/A$ de Thia-NtGA 23, Thia-Nt, GA 21 et de l'ADN en fonction du champ électrique E

II.2.2.3. Etude du composé SL-Thia-NtGA en RPE :

□ Interaction SL-Thia-NtGA/ADN :

Le composé SL-Thia-NtGA se caractérise en RPE par un spectre isotrope (Figure 33, spectre n°1), expression de la libre rotation totale du radical nitroxyde. L'incubation du marqueur de spin SL-Thia-NtGA en présence d'ADN de thymus de veau suivie de dialyse (contre un tampon 10mM Tris, 10mM NaCl, pH 7 pendant 12h) révèle en RPE un spectre isotrope qui présente cependant des raies élargies et d'intensité plus faible pour les raies extrêmes (Figure 33, spectre n°2). Ceci permet de postuler pour une interaction du composé SL-Thia-NtGA avec l'ADN, interaction qui perturbe légèrement la libre rotation du nitroxyde. La présence d'une chaîne γ -aminobutyrique entre le marqueur de spin et le pseudopeptide thiazolique (Figure 34) confère au nitroxyde une libre rotation plus importante lors de l'interaction avec l'ADN, comparée à celle observée pour le composé SL-NETGA (Figure 34), où le nitroxyde est greffé directement sur le noyau pyrrole (Bailly et Hénichart, 1990).

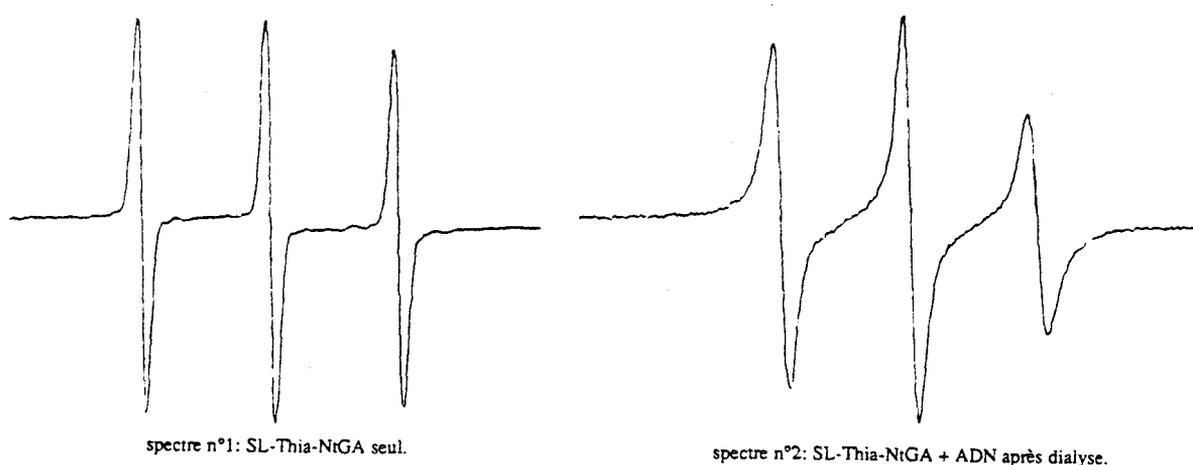


Figure 33 : Spectres de RPE du composé SL-Thia-NtGA seul et de son complexe avec l'ADN après dialyse

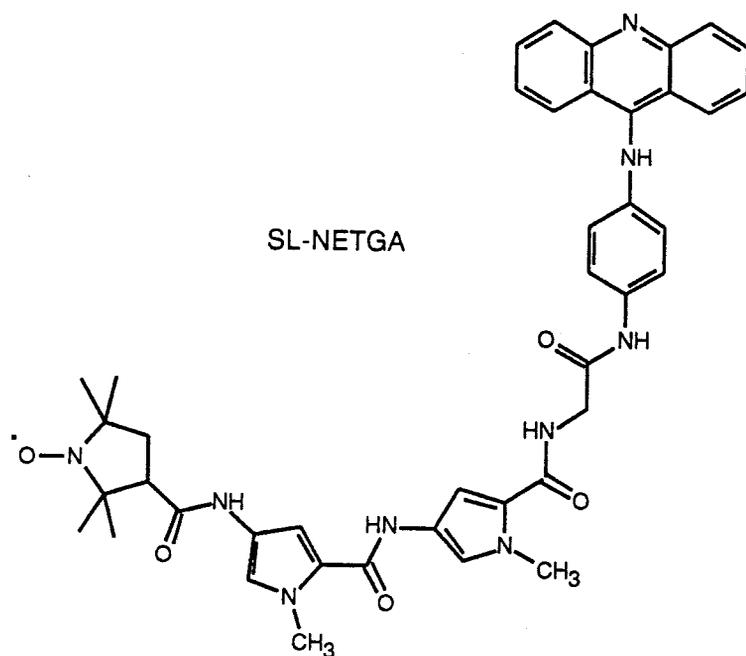
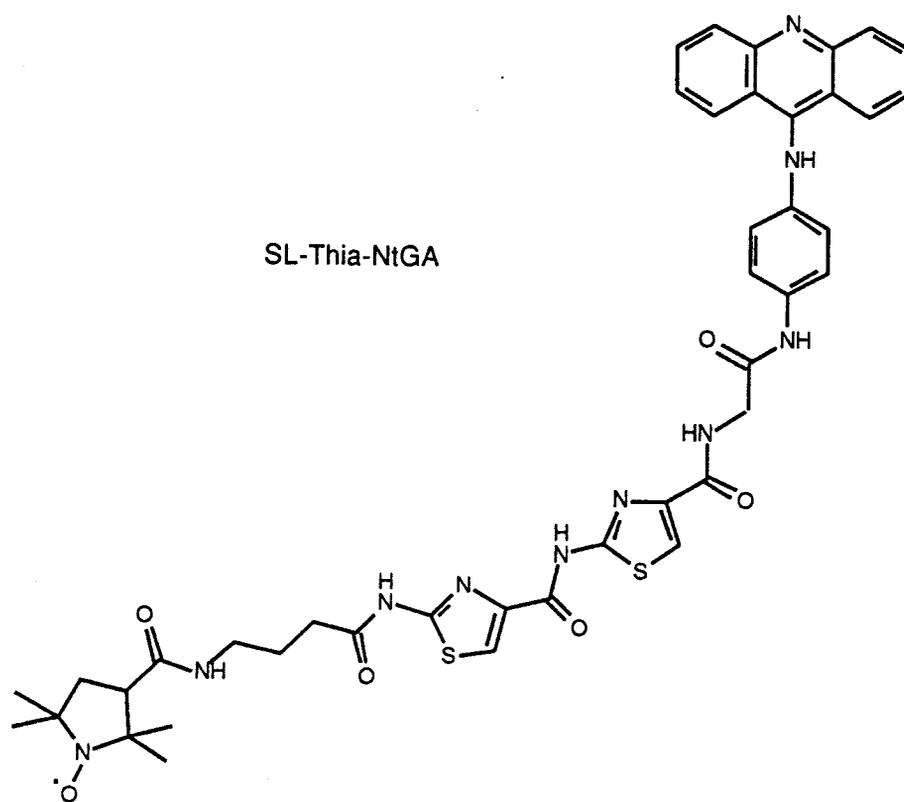


Figure 34 : Structure des composés SL-Thia-NtGA et SL-NETGA

□ Pénétration cellulaire de SL-Thia-NtGA :

Le composé SL-Thia-NtGA est mis en présence de cellules leucémiques L1210 de souris à différentes concentrations finales (10 μ M, 30 μ M, 50 μ M). Le fractionnement cellulaire est réalisé selon un protocole bien établi (Lemay *et al.*, 1983; Hénichart *et al.*, 1984). Les spectres de RPE des fractions cytoplasmique et nucléaire sont enregistrés aux trois concentrations citées précédemment pour un temps d'incubation déterminé.

- Fraction cytoplasmique : nous observons un signal isotrope, caractéristique d'un nitroxyde libre, et de faible intensité quelle que soit la concentration finale en marqueur de spin (Figure 35, spectres n° 3, 4 et 5). De plus, nous pouvons remarquer une légère dérive de la ligne de base qui peut être attribuée à l'amorce d'un spectre dit de "poudre" (interaction entre marqueurs de spin) : SL-Thia-NtGA semble présenter un tropisme pour des sites de fixation qui sont très proches les uns des autres d'où ce phénomène d'interaction spin-spin. Cependant la faible intensité des signaux observés, que ce soit à 10 μ M ou 50 μ M, laisse présager une faible fixation et une saturation très rapide au niveau du cytoplasme.

- Fraction nucléaire : pour une concentration finale de 10 μ M en SL-Thia-NtGA, nous observons un signal libre très faible (Figure 35, spectre n°6) indiquant que très peu de produit atteint le noyau, la majorité du marqueur de spin devant se fixer au niveau du cytoplasme. A une concentration finale de 30 μ M, le signal de RPE présente l'aspect d'un spectre de poudre auquel se superpose un signal libre de faible intensité (Figure 35, spectre n°7). Enfin pour une concentration finale de 50 μ M, le spectre n°8 (Figure 35) se caractérise également par une seule raie large (spectre de poudre) mais le signal d'un nitroxyde libre présente une intensité plus grande.

Ceci peut s'expliquer par la saturation dans un premier temps des sites de fixation responsables du phénomène d'interaction spin-spin (spectre de poudre) puis dans un second temps par la fixation de l'excès du marqueur SL-Thia-NtGA sur l'ADN nucléaire (Cf figure 33, spectre n°2),.

Il est important de noter qu'à une concentration de 50 μ M en marqueur de spin, les cellules en culture se sont agrégées, ce qui a perturbé le fractionnement cellulaire. Il n'est donc pas impossible, pour cette concentration, que la fraction nucléaire renferme également des membranes cytoplasmiques. Ceci permettrait d'expliquer notamment le fait qu'à cette concentration en SL-Thia-NtGA, la fraction cytoplasmique (Figure 35, spectre n°5) se caractérise par une dérive de la ligne de base moins prononcée que pour des concentrations plus faibles (Figure 35, spectres n°3 et 4) où le fractionnement subcellulaire est complet.

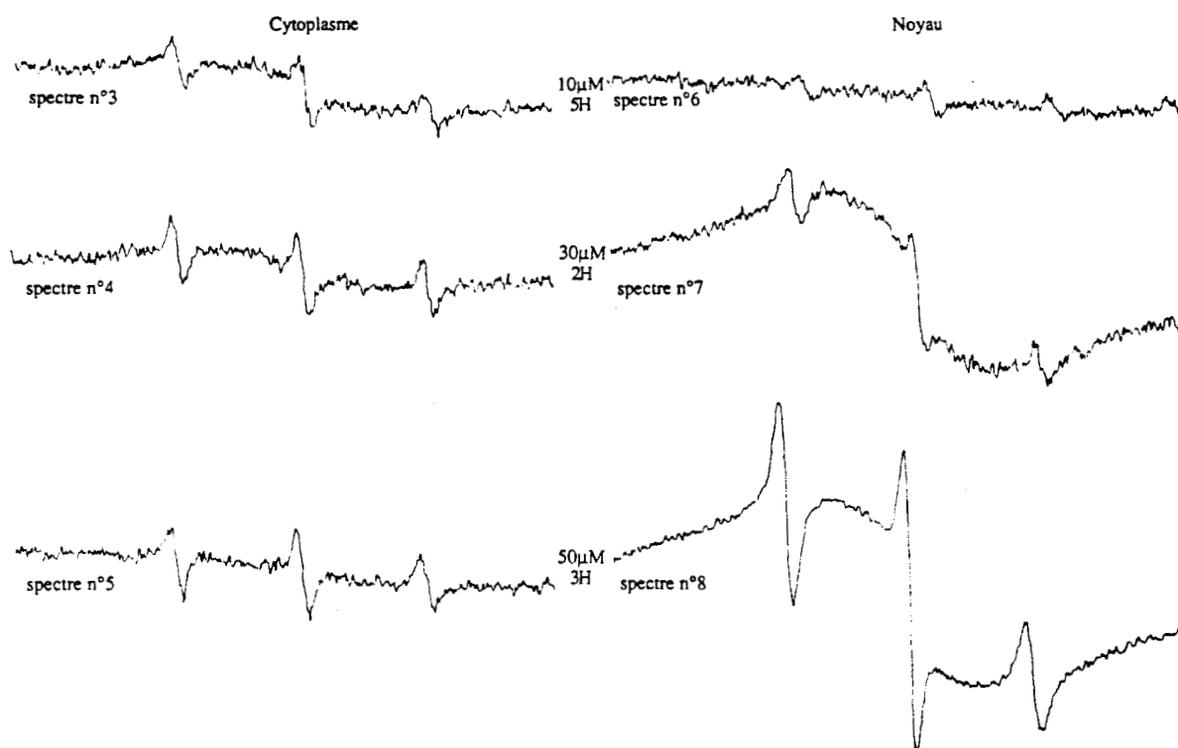
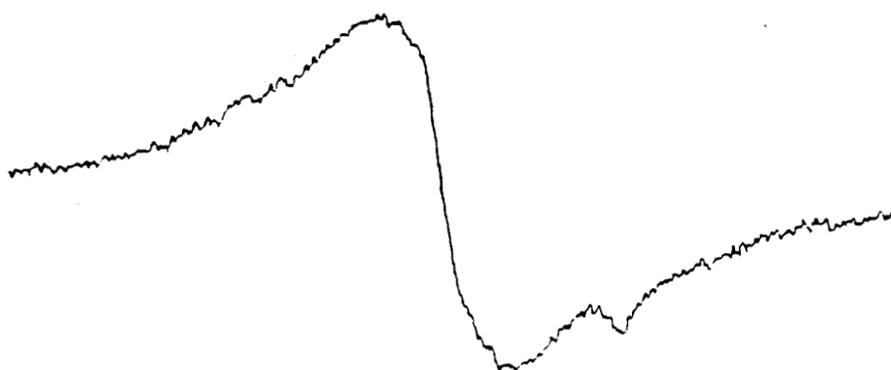


Figure 35 : Spectres de RPE des fractions cytoplasmique et nucléaire pour des concentrations finales en SL-Thia-NtGA et des temps d'incubation respectifs de 10 μ M, 5h; 30 μ M, 2h et 50 μ M, 3h

D'autre part, l'utilisation d'un marqueur de membrane (l'acide 5-doxylstéarique) en excès et après incubation avec des cellules L1210 selon un protocole déjà décrit (Bailly *et al.*, 1990c) révèle un spectre de poudre (une seule raie large, figure 36, spectre n°9). L'acide 5-doxylstéarique possède un tropisme pour la bicouche lipidique et son utilisation en excès entraîne de ce fait des interactions de type spin-spin entre les différentes molécules marquées, interactions qui se traduisent par le spectre de poudre observé. Nous pouvons rapprocher ce phénomène de celui constaté

pour le composé SL-Thia-NtGA au niveau du cytoplasme (Figure 35, spectres n°3 et 4) et au niveau du noyau (Figure 35, spectres n° 7 et 8). Le composé SL-Thia-NtGA semble donc posséder un tropisme non négligeable pour la bicouche lipidique et la formation d'un tapis cellulaire, en présence de cellules L1210 et à forte concentration du composé Thia-NtGA, que nous observons lors de tests d'activité biologique (voir l'étude *in vitro* ci-dessous), corrobore cette hypothèse.



spectre n°9: cellules L1210 marquées par l'acide 5-doxylostéarique.

Figure 36 : Spectre de RPE en présence d'un excès d'acide 5-doxylostéarique

II.2.2.4. Activité biologique de Thia-NtGA :

□ Etude *in vitro* :

Les propriétés cytotoxiques et d'inhibition de croissance de la molécule Thia-NtGA ont été déterminées sur des cellules leucémiques L1210 de souris par le Dr. N. Pommery.

Une concentration de 50 μ M en Thia-NtGA est nécessaire pour inhiber toute croissance cellulaire (Figure 37). De plus on observe une diminution de 50% de la viabilité après 96h d'incubation pour une concentration finale en Thia-NtGA égale à 50 μ M (Figure 38).

Il faut noter que pour de telles concentrations, les cellules forment un tapis, phénomène également observé précédemment lors de l'étude de la pénétration cellulaire de la molécule SL-Thia-NtGA. Cependant ce phénomène de "différenciation cellulaire" devra être confirmé par d'autres tests pour être validé.

Nombre total de cellules / ml

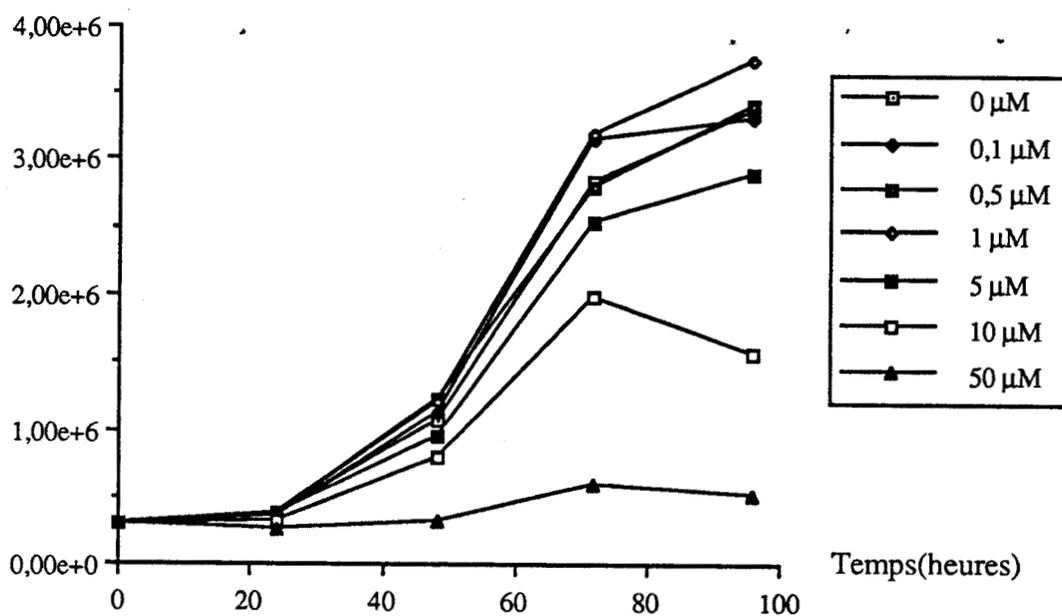


Figure 37 : Courbes d'inhibition de croissance des cellules L1210 en présence de concentrations variables de Thia-NtGA

Viabilité (%)

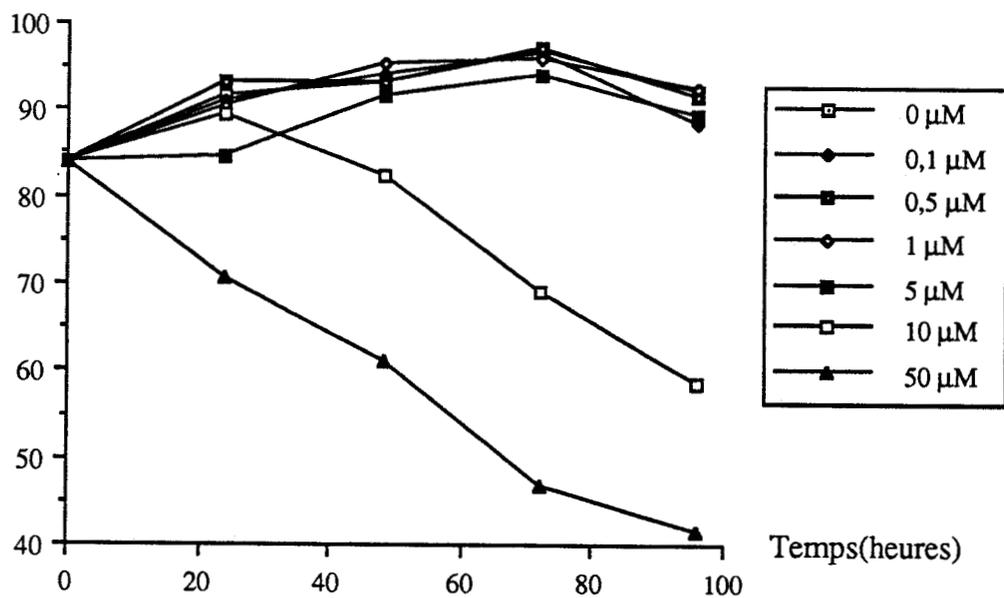


Figure 38 : Courbes dose-survie des cellules L1210 traitées par des concentrations variables du composé Thia-NtGA

□ Etude *in vivo* :

Cette étude a été réalisée par Ch. Fournier et le Dr. B. Hecquet au centre anticancéreux O. Lambret de Lille. Pour tester l'activité anticancéreuse potentielle de Thia-NtGA, des cellules leucémiques P388 ont été inoculées *i. p.* à des souris DBA2. La leucémie P388, de par sa sensibilité à de nombreuses classes de molécules étudiées en phase clinique, constitue un test significatif pour le NCI (National Cancer Institute). Les souris de contrôle sont toutes mortes après dix jours. La sensibilité de P388 à Thia-NtGA est illustrée sur la figure 39 et est comparée aux résultats obtenus pour le 5-fluorouracile, une des molécules les plus utilisées en chimiothérapie anticancéreuse.

A 25mg/kg/jour de Thia-NtGA (dose administrée quotidiennement par injection pour les jours 1 à 5), une augmentation notable de la durée de vie est observée (Figure 39), exprimée par un T/C de 140% (l'activité antitumorale est évaluée en calculant le $T/C\% = (\text{temps de survie médian du groupe testé} / \text{temps de survie médian du groupe de contrôle})$). Avec le 5-fluorouracile, utilisé comme référence, un T/C de 170% a été mesuré et valide l'essai. L'amsacrine n'a pas été testée ici mais la littérature rapporte une augmentation de la durée de vie de 60% et 78% (i.e. T/C de 160% et 178%) à des doses respectives de 5,9mg/kg (Finlay *et al.*, 1989) et 8,9mg/kg (Baguley *et al.*, 1990), dans des conditions comparables (mais pas strictement identiques) pour les cultures de souches P388.

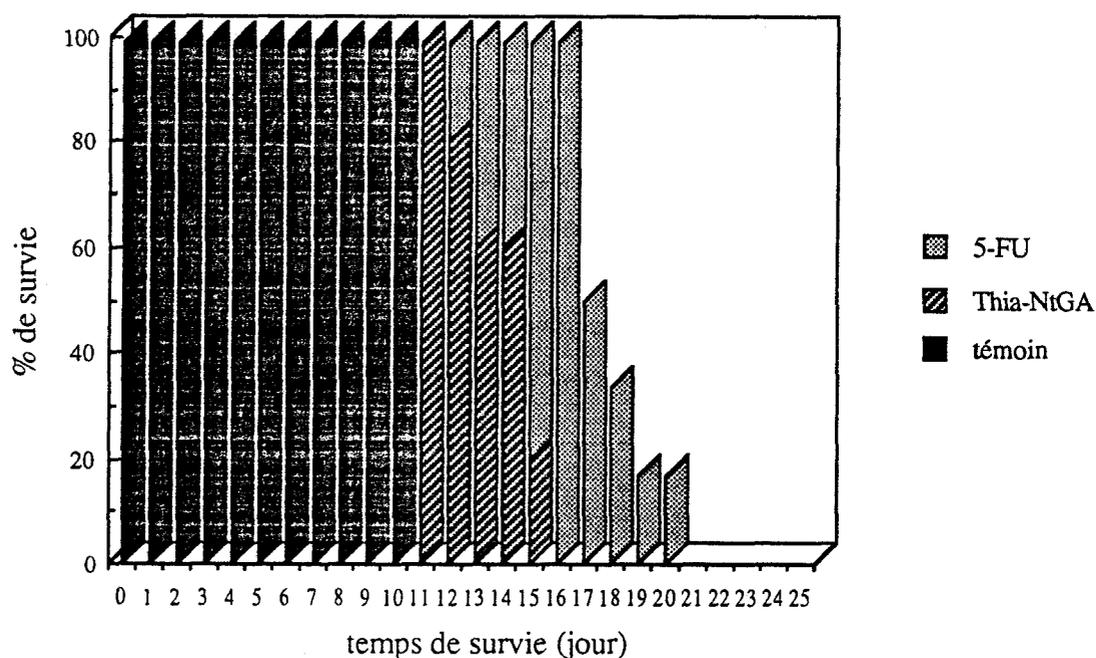


Figure 39: Activité anticancéreuse *in vivo* de Thia-NtGA comparée à celle du 5-fluorouracile; l'administration s'effectue pendant les cinq premiers jours suivant l'inoculation de la tumeur sur les souris

En conclusion, Thia-NtGA semble se lier à l'ADN par un processus identique à celui observé pour NETGA (i.e. intercalation partielle du noyau acridinique et fixation dans le petit sillon de la partie bithiazolique de Thia-Nt). Le remplacement de la partie nétropsine de NETGA (Bailly *et al.*, 1991b) par Thia-Nt diminue légèrement l'activité anticancéreuse *in vivo*, mais des tests *in vitro* supplémentaires seront nécessaires pour préciser le mécanisme d'action d'une telle molécule.

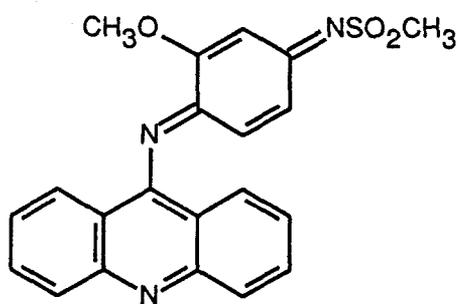


Figure 41 : Forme quinonimine de la m-AMSA (AQDI)

Cependant ce mécanisme d'oxydoréduction ne peut expliquer la dégradation de l'ADN observée à faible concentration. Le mécanisme principal de la cytotoxicité de l'amsacrine et de certaines anthracyclines et ellipticines consiste en une stabilisation du complexe ADN-topoisomérase II (Drlica et Franco, 1988). Enfin la lipophilie des molécules est un facteur essentiel pour leur distribution au sein de l'organisme, notamment dans le cas de tumeurs invasives; ceci a conduit à la conception de dérivés de l'amsacrine substitués en 4 par une chaîne basique (Cain *et al.*, 1977; Denny *et al.*, 1982; Baguley *et al.*, 1984) (Figure 42).

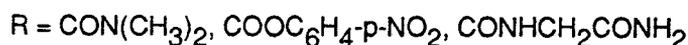
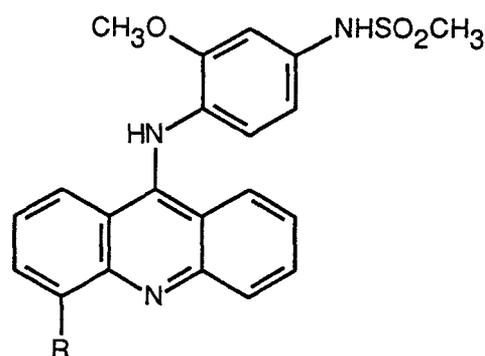


Figure 42 : Structure de quelques dérivés 4-carboxamido-amsacrine

Ces dérivés 4-carboxamido-amsacrine se lient à l'ADN dans une orientation bien définie, l'acridine se trouvant dans une position de recouvrement maximum avec les paires de bases de l'ADN, la chaîne carboxamido dans le petit sillon, et le groupement encombrant anilino dans le grand sillon. Après une fixation rapide de la molécule au niveau du grand sillon, il y a dans un second temps insertion de la chaîne

carboxamido à travers une ouverture transitoire de la double hélice, avant intercalation du chromophore acridinique entre les plateaux de paires de bases de la double hélice et localisation de la chaîne carboxamido dans le petit sillon (Wakelin *et al.*, 1990).

Disposant de ces différentes informations et compte tenu des résultats obtenus avec le composé Thia-NtGA, nous avons synthétisé un analogue où le groupement glycyilanilinoaminoacridine de Thia-NtGA est remplacé par un dérivé de l'amsacrine substitué en 4 par une chaîne carboxamidopropylamine. Cette molécule, nommée Thia-NtAMSA (Figure 43), devrait bénéficier d'une activité biologique accrue comparée à celle observée pour Thia-NtGA.

II.2.2.5. Synthèse de Thia-NtAMSA :

La méthode utilisée pour l'élaboration de Thia-Nt-AMSA est identique à celle adoptée pour le composé Thia-NtGA. L'acide 2-[2'-(4-(tert-butyloxycarbonylamino)butyrylamino) thiazole-4'-carboxamido] thiazole-4-carboxylique **20** (Cf article n°1) est couplé avec le dichlorhydrate de 3-méthoxy-4-[4-(3-aminopropylaminocarbonyl)acridinyl-9-amino]-N-méthanesulfonamide **25** (Cain *et al.*, 1974, 1977; Hénichart *et al.*, 1982b; Atwell *et al.*, 1984) en présence de DCC-DMAP (Grehn *et al.*, 1986; Hassner et Alexenian, 1978). Le composé **26** ainsi obtenu est traité par une solution d'acide acétique saturée en acide bromhydrique pour fournir Thia-NtAMSA **27** (Schéma 7).

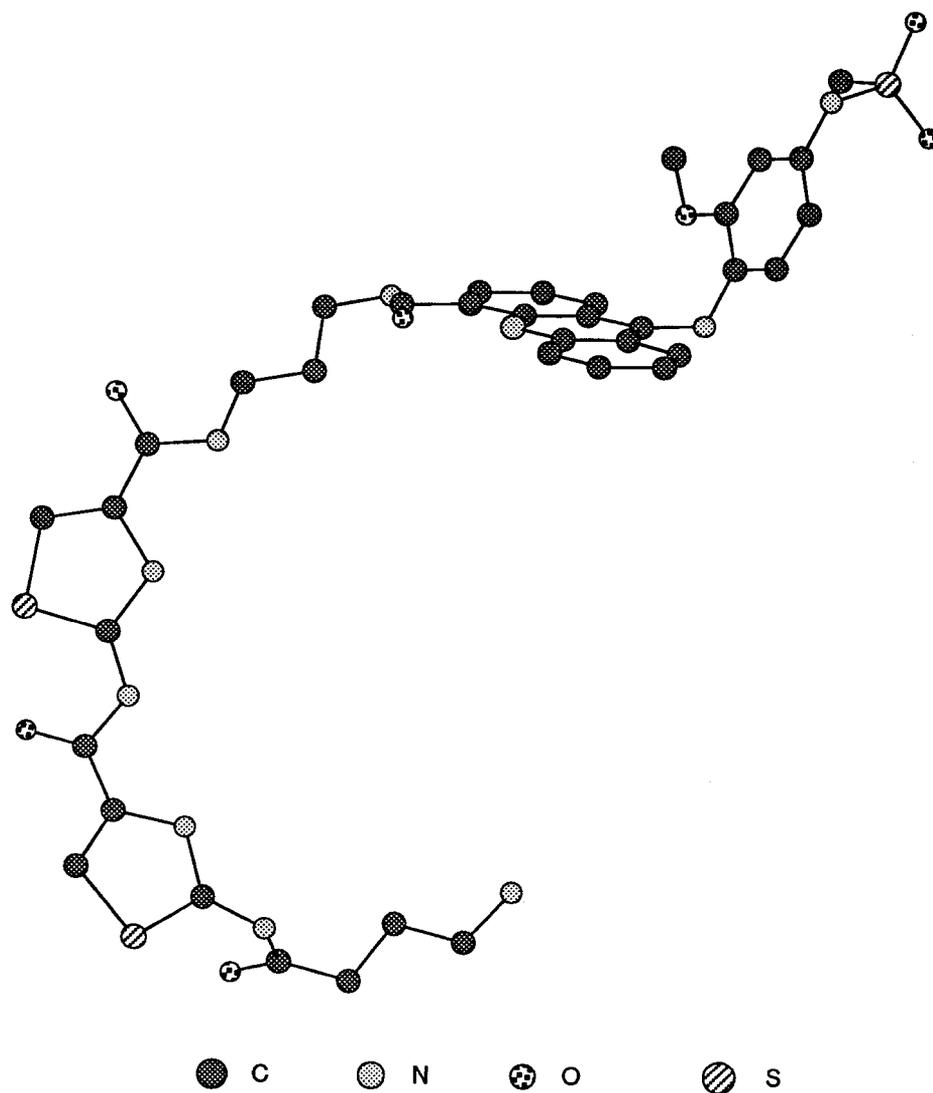


Figure 43 : Représentation spatiale hypothétique de Thia-NtAMSA (CHEM3D)

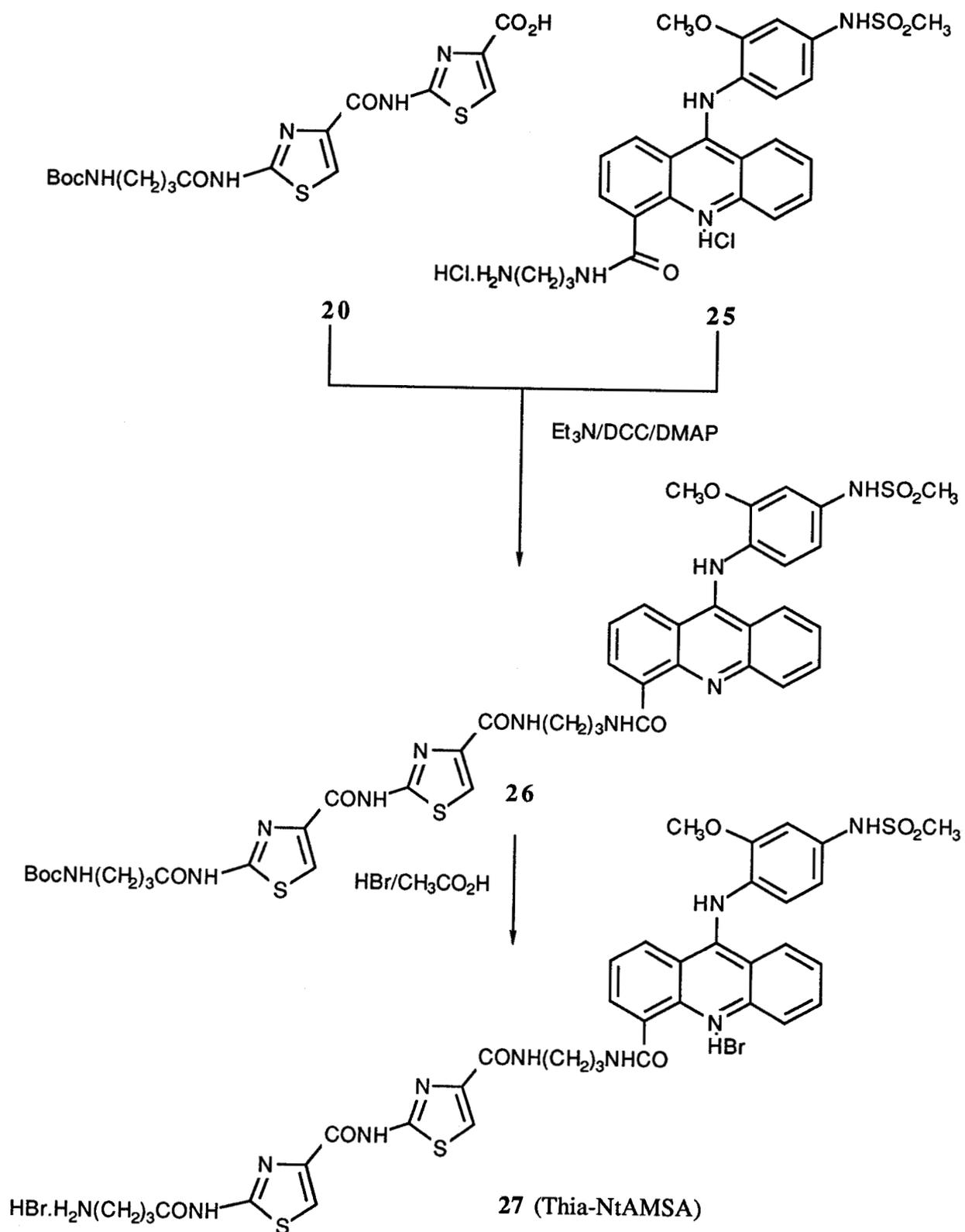


Schéma 7 : Synthèse de Thia-NtAMSA

L'interaction avec l'ADN et l'activité biologique de la molécule Thia-NtAMSA ont été étudiées et comparées à celles obtenues avec Thia-NtGA.

II.2.2.6. Interaction Thia-NtAMSA/ADN :

□ Affinité et sélectivité de Thia-NtAMSA :

La diminution du maximum d'absorption du ligand observée sur la figure 44 traduit la formation d'un complexe Thia-NtAMSA/ADN.

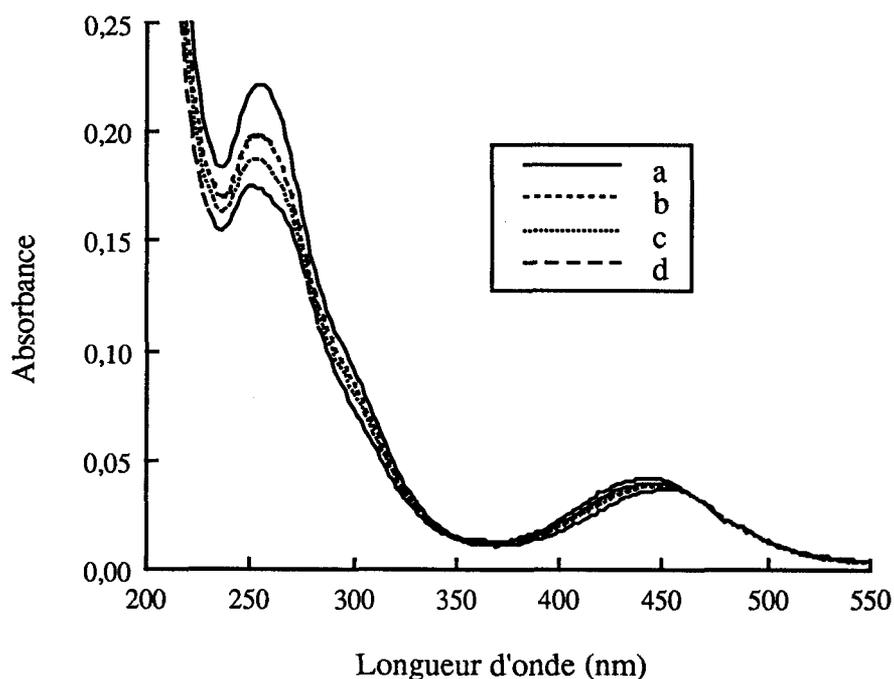


Figure 44 : Spectre d'absorption UV du ligand Thia-NtAMSA et de son complexe avec l'ADN de thymus de veau: ligand seul (a); $[Thia-NtAMSA]/[ADN] = 4$ (b), 2 (c), 1 (d)

La comparaison des ΔT_m de Thia-NtAMSA **27** avec Thia-Nt et AMSA-C₃ **25** pour différents rapports $[produit]/[ADN]$ (Figure 45) permet de conclure que l'adjonction de l'amsacrine au résidu bithiazole entraîne une stabilisation plus importante de l'ADN double brin que celle obtenue pour Thia-Nt, notamment pour les faibles rapports $[produit]/[ADN]$. La diminution du ΔT_m enregistrée pour Thia-NtAMSA par rapport à l'AMSA-C₃ **25** traduit l'influence du pseudopeptide thiazolique sur la stabilisation du complexe Thia-NtAMSA/ADN.

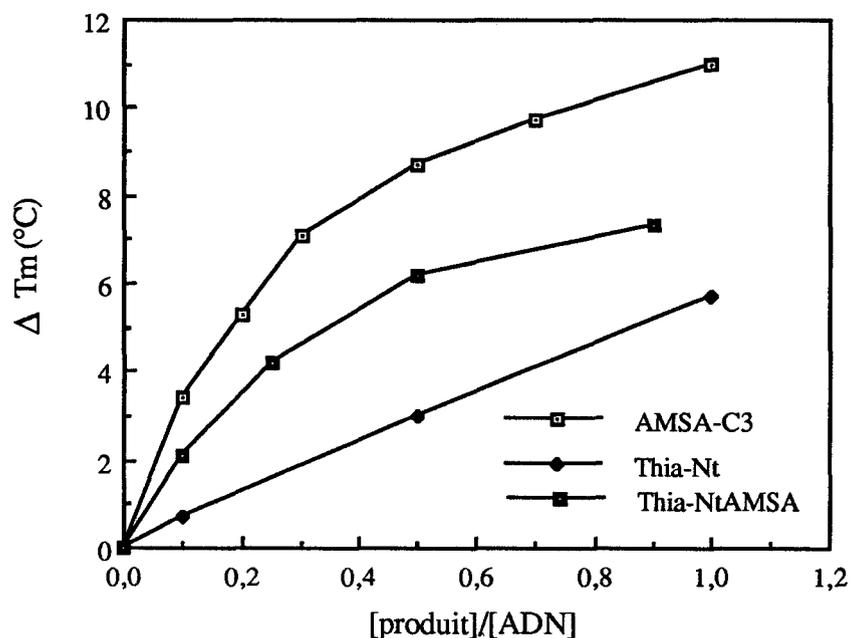


Figure 45 : Variation du ΔT_m en fonction du rapport $[\text{produit}]/[\text{ADN}]$ pour les molécules Thia-NtAMSA 27, Thia-Nt et AMSA-C₃ 25

Le tableau 5 regroupe les valeurs Q relatives au déplacement du bromure d'éthidium lié à différents ADN par la molécule hybride Thia-NtAMSA et les molécules de référence (Thia-Nt et AMSA-C₃ 25) :

| | Q ^a ADN natif ou synthétique | | | |
|------------------------|---|-------------------|---------------------|-----------------|
| | Thymus de veau | Poly[(dAT).(dAT)] | Micro Lysodeikticus | Poly[(dG).(dC)] |
| Thia-Nt | 13,5 | 27 | 36 | 72 |
| AMSA-C ₃ 25 | 1,3 | 0,8 | 1,8 | 1,3 |
| Thia-NtAMSA 27 | 4,5 | 4,8 | 8,2 | 17,5 |
| Thia-NtGA 23 | 17 | 20 | 24 | 24 |

Tableau 5 : Valeurs de Q des molécules Thia-Nt, AMSA-C₃ 25, Thia-NtAMSA 27 et Thia-NtGA 23 pour des ADN de compositions différentes (a : concentration (μM) de produit nécessaire pour diminuer de 50% la fluorescence du bromure d'éthidium lié à l'ADN pour un rapport $[\text{BET}]/[\text{ADN}] = 0,1$)

Le composé Thia-NtAMSA diminue de 50% la fluorescence du complexe BET-ADN à des concentrations quatre fois inférieures à celles requises pour Thia-Nt quelle que soit la composition de l'ADN. La présence de l'amsacrine confère donc à la molécule hybride une affinité supérieure à Thia-Nt et Thia-NtGA. Ainsi pour le poly[(dAT).(dAT)], la valeur Q pour le composé Thia-NtAMSA (4,8 μ M) est quatre fois plus faible que celle de Thia-NtGA (20 μ M).

Mais qu'en est-il du mode d'interaction de cette molécule par rapport à Thia-NtGA?

□ Mode d'interaction avec l'ADN :

Les mesures d'élongation en fonction de r ($r = [\text{produit}]/[\text{ADN}]$) donnent une pente de 0,823 proche de la valeur de 0,800 obtenue pour la proflavine (Saucier *et al.*, 1971). L'angle de détorsion de 12,0° est comparable à celui observé pour Thia-NtGA.

L'hybride Thia-NtAMSA doit se lier à l'ADN de la même façon que Thia-NtGA mais seule une étude en dichroïsme linéaire va nous permettre de définir avec précision l'orientation de la molécule Thia-NtAMSA par rapport à la double hélice d'ADN et de la comparer à la position de Thia-NtGA.

L'analyse du spectre de dichroïsme linéaire en fonction de la longueur d'onde (Figure 46) révèle un dichroïsme positif pour la partie bithiazolique aux alentours de 310 nm et un dichroïsme négatif relatif au chromophore acridinique de 400 à 500 nm. Ceci indique une très grande similitude entre l'orientation des molécules Thia-NtAMSA et Thia-NtGA (Figure 31) par rapport à l'ADN, mais les dichroïsmes réduits des parties bithiazolique et acridinique de Thia-NtAMSA sont deux fois plus importants que ceux observés pour Thia-NtGA. Ainsi nous pouvons envisager un renforcement des deux processus de liaison (intercalation et fixation dans le petit sillon) mis en jeu lors de l'interaction Thia-NtAMSA/ADN par rapport au complexe Thia-NtGA/ADN. Une telle observation pouvait être déduite des faibles valeurs Q du composé Thia-NtAMSA comparées à celles de Thia-NtGA (Tableau 5).

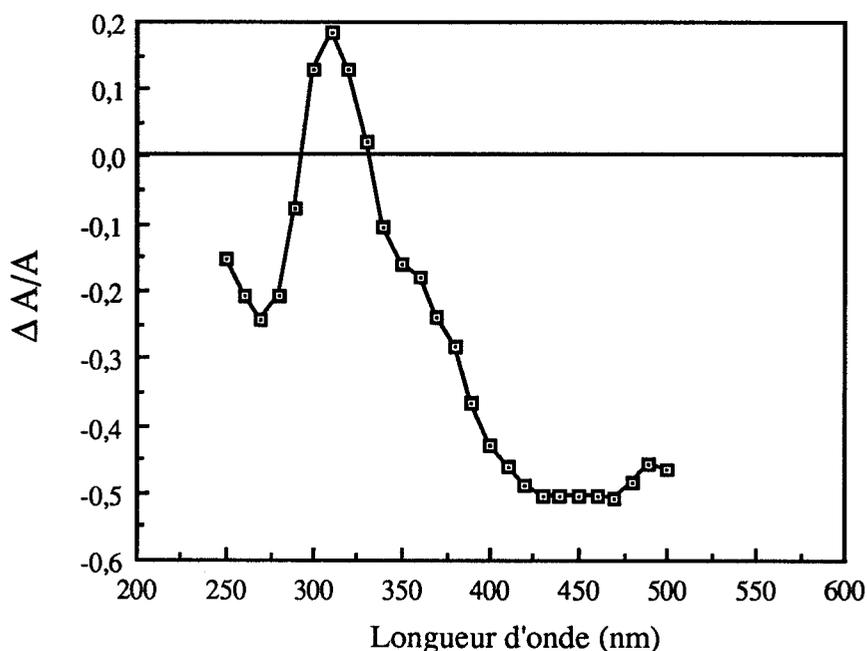


Figure 46 : Spectre du dichroïsme linéaire réduit ($\Delta A/A$) du complexe Thia-NtAMSA/ADN ($[Thia-NtAMSA]/[ADN] = 0,1$) à 12,5 kV/cm

Les mesures du dichroïsme réduit en fonction du champ électrique (Figure 47) permettent de justifier une telle amélioration dans les processus de liaison.

A 460 nm, l'orientation du moment de transition (dirigé selon l'axe de l'acridine) est semblable pour le composé AMSA-C₃ **25** et la molécule hybride Thia-NtAMSA **27**: le chromophore acridinique est parallèle au plan des paires de bases de l'ADN (Figure 47). Contrairement à Thia-NtGA, pour lequel une intercalation partielle de la partie acridinique est envisagée, Thia-NtAMSA semble s'intercaler totalement.

De plus, à 310 nm, le dichroïsme réduit de la partie bithiazolique est plus important que celui observé pour Thia-Nt : le squelette bithiazole de Thia-NtAMSA paraît se loger plus aisément dans le petit sillon que Thia-Nt.

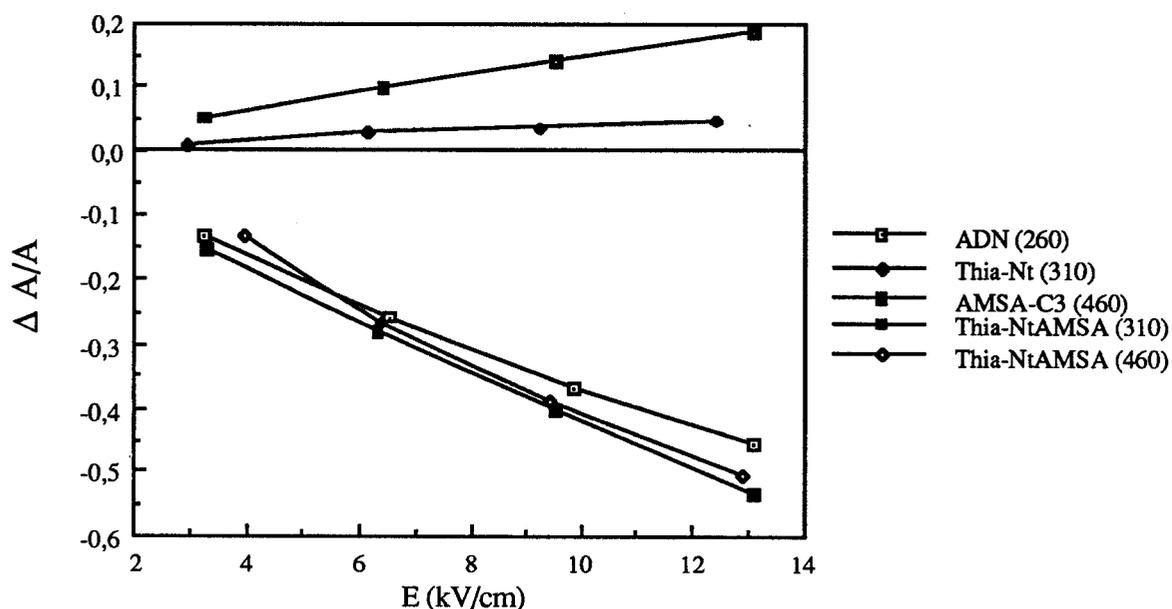


Figure 47 : Dépendance du dichroïsme linéaire électrique en fonction de la force du champ électrique appliqué pour l'ADN, Thia-Nt, AMSA-C₃ 25 et Thia-NtAMSA 27

II.2.2.7. Activité biologique de Thia-NtAMSA :

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'amsacrine s'oxyde en une forme quinonimine en présence d'ions cuivriques (Figure 41) (Wong *et al.*, 1984a,b) pour former des radicaux libres oxygénés capables de couper l'ADN. Nous avons donc entrepris d'étudier ces propriétés pour la molécule hybride Thia-NtAMSA.

□ Oxydation de Thia-NtAMSA en présence de Cu (II) :

La cinétique est suivie par absorption spectrophotométrique dans un tampon borate à pH 9,4 pour lequel on observe les changements les plus importants au niveau du spectre (Wong *et al.*, 1984a,b). Le spectre d'absorption de Thia-NtAMSA présente un maximum à 450 nm (Figure 48). Quand Thia-NtAMSA est oxydé en forme quinonimine, le maximum observé initialement à 450 nm disparaît et on observe simultanément l'apparition d'un épaulement à 400 nm correspondant à la forme quinonimine ainsi que d'un point isobestique obtenu à approximativement 430 nm (Figure 48).

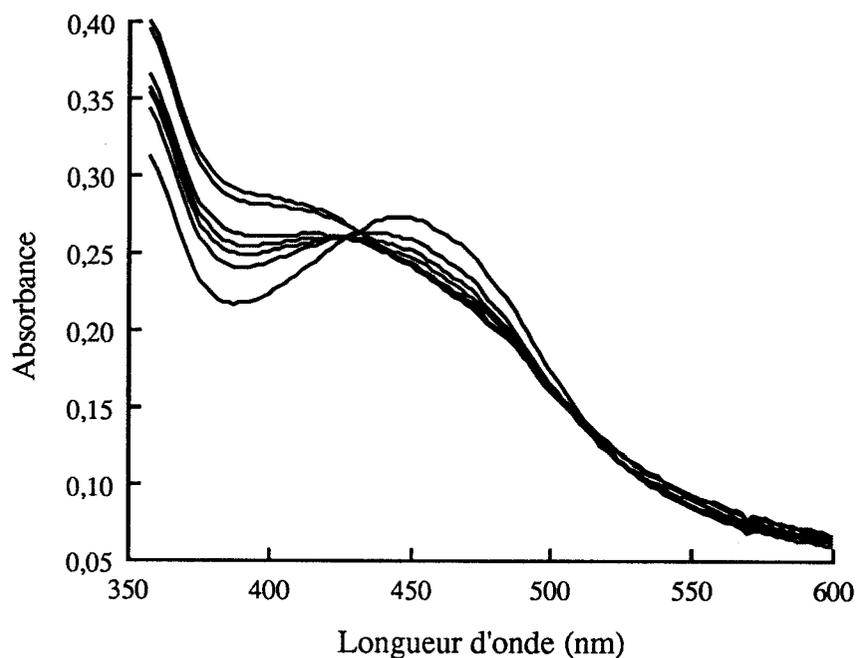


Figure 48 : Changements en fonction du temps du spectre d'absorption de Thia-NtAMSA induits par l'addition de Cu (II). Les concentrations de Thia-NtAMSA et de Cu (II) sont respectivement de $50\mu\text{M}$ et $150\mu\text{M}$ dans 3ml de tampon borate 50mM, pH 9,4. Ces spectres d'absorption sont enregistrés après addition de Cu (II) à des intervalles de 30mn

Le remplacement de la glycyanilinoaminoacridine **21** par le dérivé de l'amsacrine **25** a permis de renforcer l'affinité de Thia-NtAMSA pour l'ADN par rapport à Thia-NtGA (fluorescence, DL) et devrait conférer à Thia-NtAMSA des propriétés cytotoxiques (coupure de l'ADN) dont est dépourvu Thia-NtGA.

CONCLUSION

La création de molécules analogues à la nétrropsine a permis de montrer que les modifications structurales apportées à ce composé pouvaient entraîner une modification plus ou moins importante de la nature de leur interaction avec l'ADN.

Ainsi les facteurs stéréochimique, conformationnel, électrostatique, de structure et de phase contribuent aux processus de reconnaissance moléculaire de tels ligands. Sur la base de calculs théoriques (Zakrzewska *et al.*, 1988), la conception d'analogues non peptidiques constitue une nouvelle approche du concept "ligand du petit sillon".

Mais si de telles molécules sont dépourvues d'activité, l'adjonction d'un chromophore a pu leur conférer des propriétés antitumorales. Ces molécules hybrides se lient à l'ADN par un mécanisme prévisible. L'intercalation imposée par le chromophore synthétique est cependant perturbée par le ligand du petit sillon.

Si ces molécules de synthèse se caractérisent par des propriétés de liaison à l'ADN et par une activité biologique amoindries par rapport aux molécules modèles, elles n'en constituent pas moins une démarche intéressante permettant d'accumuler de nombreuses informations sur les critères de la reconnaissance moléculaire. L'étape ultérieure consisterait à remplacer le chromophore intercalant par une molécule "alkylante" de manière à réaliser une liaison irréversible à l'ADN. L'activité cytotoxique d'un tel hybride pourrait être obtenue par adjonction d'un complexe métallique capable de couper sélectivement l'ADN : on déboucherait ainsi sur le concept d'enzyme artificiel. La poursuite de tels travaux entrepris par de nombreuses équipes risque d'aboutir à la création de composés originaux, agissant selon un mécanisme original et que l'on peut espérer très efficaces.

De plus, ce pourrait être une avancée vers la conception de molécules relativement simples se liant avec une grande affinité et une haute spécificité sur des séquences oligonucléotidiques du génôme, permettant alors d'envisager une régulation du processus de réplication.

PARTIE EXPERIMENTALE

MODES OPERATOIRES

Les points de fusion sont déterminés à l'aide d'un appareil de Tottoli (Büchi 510), ne sont pas corrigés et sont exprimés en °C (F=fusion).

La pureté des produits est vérifiée systématiquement par chromatographie sur couche mince dans les conditions suivantes :

- .support : gel de silice 60 F 254 d'épaisseur 0,25 mm, référence 5735 Merck.
- .solvants de migration (sauf indication contraire) : chloroforme-méthanol : 4:1 (v/v) dans une atmosphère saturée en ammoniac.
- .révélation : UV (254 et 366 nm), iode et ninhydrine.

Les spectres IR sont réalisés sur un spectrographe Perkin-Elmer 1310, sous forme de film pour les liquides, ou en dispersion dans le KBr pour les solides; les fréquences d'absorption sont exprimées en nombre d'onde (cm^{-1}).

Les spectres de RMN ^1H sont enregistrés sur un appareil Brücker WP 80 SY (à 80 MHz) ou Brücker 400 (à 400 MHz), avec le TMS pour référence interne; chaque signal est repéré par son déplacement chimique δ (exprimé en ppm), sa morphologie (s : singulet; d : doublet; t : triplet; q : quadruplet; m : massif), son éventuelle constante de couplage (Hz) et son intensité.

Les spectres de masse sont réalisés sur un spectromètre quadrupolaire Ribermag R10-10 (couplé à un système informatique Riber 400) fonctionnant à 70 eV (introduction directe) par impact électronique (ie) ou sur un spectromètre Kratos MS 50 RF (FAB, Fast Atom Bombardment). L'intensité des fragments principaux est éventuellement indiquée à la suite de leur position.

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées selon le protocole établi par Still *et al.* (1978) avec le gel de silice 60 de granulométrie 0,040-0,063 mm (230-400 mesh ASTM), référence 9385 Merck.

Abréviations utilisées : Boc : tert-butyloxy-carbonyle; DCC : dicyclohexylcarbodiimide; 4-DMAP : 4-diméthylaminopyridine; HOBt : 1-hydroxybenzotriazole (hydrate); DCU : dicyclohexylurée; DMF : diméthylformamide; DMSO : diméthylsulfoxyde; Et_2O : éther éthylique; AcOEt : acétate d'éthyle; CHCl_3 : chloroforme; CH_2Cl_2 : dichlorométhane; MeOH : méthanol; EtOH : éthanol; Py : pyrrole; Thz : thiazole; Trz : triazole; Ar : aromatique.

Benzoylthiosemicarbazide 1

A une solution de thiosemicarbazide (15,5 g; 0,17 mole) dans 135 ml de pyridine anhydre est ajoutée par un goutte à goutte rapide une solution de chlorure de benzoyle (24 g; 0,17 mole) dans 165 ml de pyridine anhydre. La solution réactionnelle est alors portée à reflux pendant 1h30 puis laissée 12h à 20°C. Le précipité formé est filtré et lavé par H₂O et Et₂O (100 ml); le filtrat après concentration et addition de 250 ml d'eau fournit une seconde fraction qui, après filtration et lavage par H₂O et Et₂O (100 ml), est jointe à la première. Après deux recristallisations successives dans l'eau, on obtient 14 g du composé **1** (Rdt=42%). Rf(A) : 0,74; F : 185-187; IR : 1670 (CO amide); RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ 10,4 (s, 1H, NHCO); 9,3 (s, 1H, NHCS); 7,9 (m, 2H, CHAr); 7,5 (m, 2H, NH₂); 7,4 (m, 2H, CHAr); SM (ie) : 195 (M⁺; 8,36), 162 (M⁺-33; 13,63), 105 (M⁺-90; 92,48), 77 (M⁺-118; 100,00).

5-phényl triazoline-3-thione 2

Une solution de benzoylthiosemicarbazide **1** (4,9 g; 25 mmoles) dans 25 ml de soude aqueuse à 5% est portée à reflux pendant 4h. Après refroidissement et acidification du milieu réactionnel par CH₃COOH jusqu'à pH 4, le précipité formé est filtré, lavé par H₂O et Et₂O (30ml) puis recristallisé dans H₂O. On obtient 2,3g du produit **2** (Rdt=57%). Rf(A) : 0,87; F : 251-253; RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ 13,8 (d, 2H, NHTrz); 7,9 (m, 2H, CHAr); 7,5 (m, 3H, CHAr); SM (ie) : 177 (M⁺; 100,00), 145 (M⁺-32; 5,12), 77 (M⁺-100; 67,90).

2-(5-phényl-s-triazolyl-3-mercaptoacétyl) 4-méthoxycarbonyl thiazole (bromhydrate) 4

Une solution de la triazoline-3-thione **2** (1,77 g; 10 mmoles) et de 2-bromoacétyl-4-méthoxycarbonyl thiazole **3** (Sakai *et al.*, 1981; Houssin *et al.*, 1984 a) (2,64 g; 10 mmoles) dans 15 ml d'éthanol est agitée à 20°C pendant 48h. Le précipité formé est filtré et lavé par Et₂O (20 ml), on obtient 2.38g du produit de condensation **3** (Rdt=66%). Rf(A) : 0,89; F : 102-105; RMN ¹H (CDCl₃) : δ 10,0 (m, 1H, NHTrz); 8,5 (s, 1H, CHThz); 8,3 (m, 2H, CHAr); 7,5 (m, 3H, CHAr); 5,0 (s, 1H, CH₂); 3,9 (s, 3H, CH₃); SM (ie): 360 (M⁺; 13,08), 177 (M⁺-183; 100,00).

2-phényl-6-[2'-(4'-(éthoxycarbonyl)thiazoly)]thiazolo[3.2-b][1.2.4] triazole (PETT)

5

Une solution du produit de condensation 4 (1,08 g; 3 mmoles) dans 2 ml d'éthanol est portée à reflux pendant 120 h. Après stockage au réfrigérateur plusieurs jours, le composé 5 cristallise de la solution réactionnelle; on obtient 120 mg du produit cyclisé PETT (Rdt=11%). Un échantillon est recristallisé dans l'éthanol pour la détermination des caractéristiques spectroscopiques. Rf(A) : 0,93; F:192-194; IR: 1720 (CO ester); RMN ¹H (CDCl₃): δ 8,4 (s, 1H, CHThz); 8,3 (m, 2H, CHAr); 8,0 (s, 1H, CHThz); 7,5 (m, 3H, CHAr); 4,5 (q, 2H, CH₂); 1,4 (t, 3H, CH₃); SM (ie) : 356 (M⁺; 100,00), 284 (M⁺-72; 67,18), 244 (M⁺-112; 76,16).

2-phényl-6-[2'-(4'-(carboxy)thiazoly)]thiazolo[3.2-b][1.2.4] triazole 6

Une solution aqueuse de soude 4N (200 µl; 0,8 mmole) est ajoutée à une solution de l'ester 5 (71 mg; 0,2 mmole) dans 10 ml de méthanol. Après 5h d'agitation à reflux du méthanol, le mélange est amené à pH 3-4 par une solution HCl 10N. Les solvants sont évaporés sous vide et l'acide 6 est extrait par l'éthanol bouillant. Après filtration du chlorure de sodium et évaporation de l'éthanol, on obtient 53 mg (80%) de l'acide 6 suffisamment pur pour être utilisé dans l'étape suivante. Rf(A) : 0,13; F : 238-240; RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ 8,75 et 8,30 (2s, 2H, 2CHThz); 8,15 et 7,55 (2m, 5H, CHAr); 5,50 (m, 1H, CO₂H); SM (ie) : 328 (M⁺; 28,90), 284 (M⁺-44; 52,54), 244 (M⁺-84; 15,24).

2-phényl-6-[2'-[4'-[[4-(4'-(éthoxycarbonyl)-thiazole-2'-aminocarbonyl)-thiazole-2-amino]carbonylpropylaminocarbonyl]thiazoly]]thiazolo[3.2-b][1.2.4]triazole (PETThia-Nt) 9

Une solution de l'ester 7 (Cf article n°1) (97 mg; 0,2 mmole) dans 2 ml d'acide trifluoroacétique (TFA) est agitée 1h puis l'excès de TFA est éliminé sous vide. Par addition d'éther, le composé 8, qui précipite sous forme d'une poudre blanche, est filtré et lavé par Et₂O (3x40 ml).

Au composé 8 (99 mg; 0,2 mmole) sont ajoutés 28 µl (0,2 mmole) de triéthylamine, 49 mg (0,24 mmole) de DCC, 5 mg (0,04 mmole) de 4-DMAP et 66 mg (0,2 mmole) de l'acide 6 dans 5 ml de DMF anhydre. Après 24 h d'agitation de la solution réactionnelle, le DMF est éliminé sous vide. Le résidu après lavage par MeOH bouillant (2x10 ml) laisse un insoluble constitué de 73 mg (Rdt=53%) du

composé **9** chromatographiquement pur. Rf(A) : 0,89; F : 209-211; RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) : δ 12,40 (s, 1H, CONH); 8,59 (m, 1H, CONH); 8,48; 8,25; 8,20 et 8,08 (4s, 4H, 4CHThz); 8,15 et 7,53 (2m, 5H, CHAr); 4,28 (q, 2H, OCH₂); 3,39 (m, 2H, CH₂NH); 2,66 (t, 2H, CH₂CO); 1,92 (m, 2H, CH₂); 1,35 (t, 3H, CH₃); SM (FAB+) : 694 (M⁺)

4-[[4'-[4-(tert-butyloxycarbonylamino)butyrylamino]-1'-méthyl-pyrrole-2'-carboxamido]-1-méthyl-pyrrole-2-carboxylate de méthyle **11**

A une solution d'acide 4-(tert-butyloxycarbonylamino)butyrique (102 mg; 0,5 mmole)(Cf Article n°1) dans un mélange CH₂Cl₂-DMF (1:1, v/v, 5 ml) est ajoutée à 0°C une solution de DCC (113 mg; 0,55 mmole) et de HOBT (84 mg; 0,55 mmole) dans 10 ml du mélange CH₂Cl₂-DMF (1:1, v/v). Après 1h30 à 0°C, une solution de trifluoroacétate de l'amine **10** (195 mg; 0,5 mmole) et de triéthylamine (70 µl; 0,5 mmole) est ajoutée. L'agitation est maintenue 2h à 0°C puis 12h à température ambiante. Après évaporation des solvants sous vide, le résidu est repris par CH₂Cl₂, lavé par HCl 1N (10 ml), H₂O (10 ml), NaHCO₃ 5% aq. (10 ml) puis séché sur Na₂SO₄. Après précipitation de l'excès de DCU par l'acétone, le produit brut est purifié par "flash chromatography" (Still *et al.*, 1978) sur colonne de silice dans un mélange d'élution MeOH-CHCl₃ (2:8, v/v). On obtient 221 mg (Rdt=96%) du composé **11**. Rf(A) : 0,87; SM (FAB+) : 462 (M⁺+1).

Acide 4-[[4'-[4-(tert-butyloxycarbonylamino)butyrylamino]-1'-méthyl-pyrrole-2'-carboxamido]-1-méthyl-pyrrole-2-carboxylique **12**

Une solution de l'ester **11** (115 mg; 0,25 mmole) et de soude aqueuse 4N (250 µl; 1 mmole) dans 5 ml de méthanol est portée à reflux 5h. Les solvants sont évaporés puis le résidu est repris par H₂O et lavé par AcOEt (2x10 ml). Après acidification de la phase aqueuse par HCl 1N jusque pH 3-4, l'extraction par l'éthanol à chaud fournit 95 mg (Rdt=85%) de l'acide **12** suffisamment pur pour être utilisé immédiatement dans l'étape suivante. Rf(A) : 0,40; SM (FAB+) : 448 (M⁺+1).

[4-[4'-[4-(tert-butyloxycarbonylamino)butyrylamino]-1'-méthyl-pyrrole-2'-carboxamido]-1-méthyl-pyrrole-2-carboxamido]propyl carbamate de tert-butyle 14

L'acide **12** (112 mg; 0,25 mmole) est couplé à l'amine **13** (Houssin *et al.*, 1988) (44 mg; 0,25 mmole) en présence de DCC-HOBt selon le même procédé que celui utilisé pour la synthèse de **11**. La purification du composé **14** est effectuée de façon identique à celle employée pour **11**; on obtient 141 mg (Rdt=94%) du composé **14** chromatographiquement pur. Rf(A) : 0,77; SM (FAB+) : 603 (M⁺).

[4-(4'-(4-aminobutyrylamino)-1'-méthyl-pyrrole-2'-carboxamido)-1-méthyl-pyrrole-2-carboxamido]propylamine, dibromhydrate (Pseudo-Nt) 15

La coupure des groupements carbamate de **14** (60 mg; 0,1mmole) est effectuée dans une solution d'acide acétique (10 ml) saturée en acide bromhydrique pendant 1h. Après élimination du solvant, le résidu repris par Et₂O fournit un insoluble qui est filtré et lavé par Et₂O; on obtient 52 mg (Rdt=92%) du composé pur **15** (Pseudo-Nt). Rf(A) : 0; RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) : δ 9,92 (s, 1H, CONH); 9,31 (s, 1H, CONH); 8,24 (m, 1H, NHCH₂); 7,77 (m, 6H, NH₃⁺); 7,27-6,86 (m, 4H, CHPyr); 3,81 et 3,78 (2s, 6H, 2NCH₃); 3,24 (m, 2H, CH₂NH); 2,81 (m, 4H, CH₂NH₃⁺); 2,35 (m, 2H, CH₂CO); 1,85 et 1,80 (2m, 4H, 2CH₂); SM (FAB+) : 404 (M⁺+1).

4-(acridinyl-9-amino)-N-[2-(2'-(4-(tert-butyloxycarbonylamino)butyrylamino)-thiazole-4'-carboxamido)-thiazole-4-carbonyl]glycyaniline 22

Après dissolution dans l'eau du chlorhydrate, trifluoroacétate de 4-(acridinyl-9-amino)-N-glycyaniline (Hénichart *et al.*, 1982b), la solution aqueuse est amenée à pH 8-8,5 par addition de NaHCO₃ 5%aq. avant extraction par AcOEt. Le séchage sur Na₂SO₄ et l'évaporation du solvant fournit la base correspondante **21** (Morier-Teissier *et al.*, 1989)

Une solution de l'acide 2-[2'-(4-(tert-butyloxycarbonylamino)butyrylamino)-thiazole-4'-carboxamido]thiazole-4-carboxylique **20** (Cf article n°1) (137 mg; 0,3 mmole), de DCC (75 mg; 0,036 mmole) et de 4-DMAP (8 mg; 0,06 mmole) dans 5 ml de DMF anhydre est ajoutée à une solution de l'amine **21** (103 mg; 0,3 mmole) dans 5 ml de DMF anhydre. La solution est agitée 24h à température ambiante puis le solvant

est évaporé sous vide. Le résidu, repris par le méthanol (25 ml), laisse un insoluble correspondant au produit de couplage **22** (80 mg, 34%) chromatographiquement pur. Un échantillon a été recristallisé par un mélange méthanol/éther de pétrole. Rf(A) : 0,55; F : 208-210; RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ 12,41 (s, 1H, CONH); 11,92 (s, 1H, CONH); 10,20 (s, 1H, CONH); 8,30 (s, 1H, NH); 8,28 (s, 1H, CHThz); 8,18 (m, 1H, NHCH₂); 8,03 (s, 1H, CHThz); 7,62 (m, 8H, CHAr); 7,15 et 6,99 (2m, 4H, CHAr); 6,81 (m, 1H, BocNH); 4,15 (m, 2H, CH₂); 2,95 (m, 2H, CH₂NH); 2,48 (m, 2H, CH₂CO); 1,71 (m, 2H, CH₂); 1,52 (s, 9H, (CH₃)₃); SM (FAB+) : 780 (M⁺+1).

4-(acridinyl-9-amino)-N-[2-(2'-(4-aminobutrylamino)-thiazole-4'-carboxamido)-thiazole-4-carbonyl]glycyaniline, dibromhydrate (Thia-NtGA) **23**

Une solution de l'amine protégée **22** (78 mg; 0,1 mmole) dans l'acide acétique (10 ml) est soumise à l'action de l'acide bromhydrique gazeux pendant 5 mn ; l'agitation est maintenue pendant 45 mn. La solution acide est mise à sec et le résidu lavé par Et₂O (3x10 ml) correspond au composé **23** pur (75 mg, 90%). Rf(A) : 0; F : 211-213; RMN ¹H (DMSO-d₆) : δ 14,02 (s, 1H, NH⁺); 12,51 (s, 1H, CONH); 12,00 (s, 1H, CONH); 10,45 (s, 1H, CONH); 8,31 et 7,92 (2s, 2H, 2CHThz); 8,21 (m, 2H, NH); 8,00-7,45 (m, 15H, 12CHAR, NH₃⁺); 4,19 (m, 2H, CH₂); 2,84 (m, 2H, CH₂NH₃⁺); 2,35 (m, 2H, CH₂CO); 1,73 (m, 2H, CH₂); SM (FAB+) : 680 (M⁺+1)

4-(acridinyl-9-amino)-N-[2-[2'-(4-(3-(2,2',5,5'-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxamido)butrylamino)-thiazole-4'-carboxamido]-thiazole-4-carbonyl]glycylalanine (SL-Thia-NtGA) **24**

A une solution de l'acide 2,2,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxylique (ou 3-carboxy-proxyl, Aldrich) (10 mg; 0,054 mmole) dans le DMF (5ml) à 0°C est ajoutée une solution de DCC (12mg; 0,058 mmole) et de HOBt (9mg; 0,058 mmole) dans un mélange CH₂Cl₂:DMF (1 : 1, v/v, 5 ml). Après 1h30 à 0°C, sont ajoutés le dibromhydrate **23** (45 mg; 0,054 mmole) et la triéthylamine (15 µl; 0,108 mmole) dissous dans un mélange CH₂Cl₂:DMF (1 : 1, v/v, 5 ml); l'agitation à 0°C est maintenue pendant 2h puis 12h à température ambiante. Après élimination des solvants, le composé **23** est purifié par "flash chromatography" (Still *et al.*, 1978) avec le solvant d'élution MeOH-CHCl₃ (2 : 8, v/v). On obtient 30 mg (Rdt=65%) de SL-Thia-NtGA. Rf(A) : 0,41; F>250; SM(FAB+) : 849 (M⁺+2).

3-méthoxy-4-[4-[[2-(2'-(4-(tert-butyloxycarbonylamino)butyrylamino)-thiazole-4'-carboxamido)-thiazole-4-carbonyl]aminopropylaminocarbonyl]acridinyl-9-amino]-N-méthanesulfonanilide 26

Le dibromhydrate de 3-méthoxy-4-[4-(3-aminopropylaminocarbonyl)acridinyl-9-amino]-N-méthanesulfonanilide **25** est obtenu selon les protocoles de Cain *et al.* (1977) et de Hénichart *et al.* (1982b).

Le composé **26** est préparé par couplage de l'acide **20** (Cf article n°1) (91 mg; 0,2 mmole) avec l'amine **25** (114 mg; 0,2 mmole) en présence de triéthylamine (56 µl; 0,4 mmole) et de DCC-DMAP selon un protocole identique à celui utilisé pour la préparation de **22**. Après élimination du DMF, le composé **26** est purifié par "flash chromatography" (Still *et al.*, 1978) avec le solvant d'élution MeOH-CHCl₃ (1 : 9, v/v); Rf(MeOH-CHCl₃, 1 : 9, v/v) : 0,44. On obtient 115 mg (Rdt=62%) du produit **26** après recristallisation dans un mélange isopropanol-éther de pétrole. Rf(A) : 0,75; F : 180-184; RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) : δ 12,35; 11,98; 11,64; 9,60; 9,42 et 8,87 (6m, 6H, 6NH); 8,25 et 7,85 (2s, 2H, 2CHThz); 8,61-6,67 (m, 10H, CHAr); 5,54 (m, 1H, BocNH); 3,54 (s, 3H, OCH₃); 3,39 (m, 4H, CH₂NH); 2,96 (m, 5H, SO₂CH₃, CH₂NH₃⁺); 2,44 (m, 2H, CH₂CO); 1,70 (m, 4H, CH₂); 1,35 (s, 9H, (CH₃)₃); SM (FAB+) : 931 (M⁺).

3-méthoxy-4-[4-[[2-(2'-(4-aminobutyrylamino)-thiazole-4'-carboxamido)-thiazole-4-carbonyl]aminopropylaminocarbonyl]acridinyl-9-amino]-N-méthanesulfonanilide, dibromhydrate (Thia-NtAMSA) 27

La déprotection de l'amine **26** (93 mg; 0,1 mmole) est accomplie dans des conditions identiques à celles utilisées pour la préparation de **23**. On obtient 90 mg (Rdt = 91%) du dibromhydrate **27** (Thia-NtAMSA) après précipitation par un mélange MeOH-Et₂O. Rf(A) : 0; F : 176-178; RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) : δ 14,20 (s, 1H, NH⁺); 12,46 (s, 1H, NH); 11,67 (m, 1H, NH); 11,38 (m, 1H, NH); 10,10 (s, 1H, NH); 9,33 (m, 1H, NH); 8,29 et 7,89 (2s, 2H, 2CHThz); 8,48-7,01 (m, 11H, 10 CHAr, NH); 4,47 (m, 3H, NH₃⁺); 3,53 (s, 3H, OCH₃); 3,49-3,43 (m, 4H, CH₂NH); 3,12 (s, 3H, SO₂CH₃); 2,85 (m, 2H, CH₂NH₃⁺); 2,53 (m, 2H, CH₂CO); 1,89 (m, 2H, CH₂); 1,70 (m, 2H, CH₂); SM (FAB+) : 831 (M⁺).

Séquence oligonucléotidique autocomplémentaire 5'-CGTACG-3'

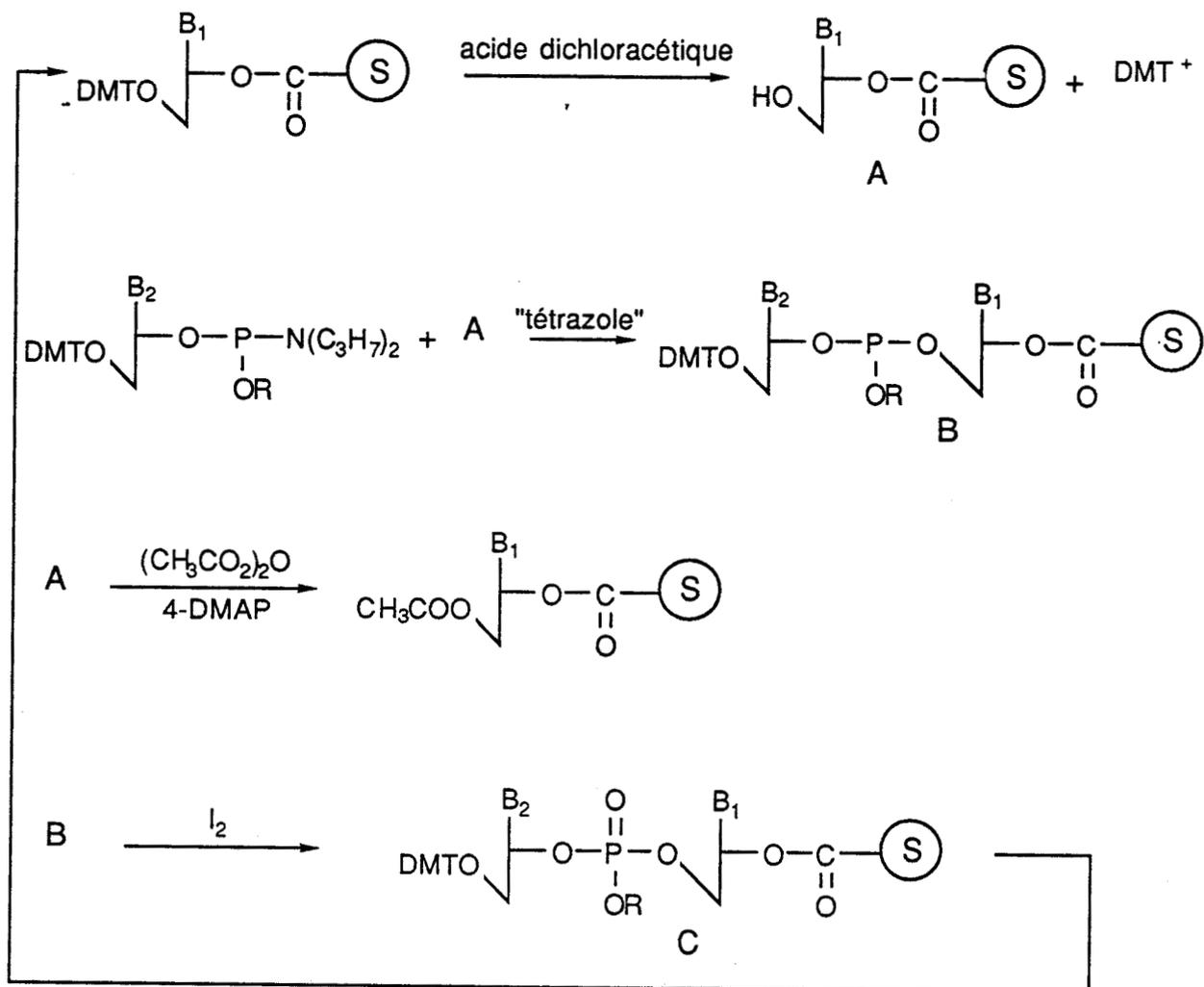
L'oligonucléotide 5'-CGTACG-3' a été synthétisé de manière automatique sur un synthétiseur d'oligonucléotides Applied Biosystems modèle 381-A en utilisant la technique des phosphoramidites (Schéma page suivante). La colonne utilisée est un support de billes de verre sur lesquelles est fixée la première base protégée en 5' par le diméthoxytrityle; cette colonne est commerciale et porte 1 μ mole de guanosine.

Après la synthèse, le rendement peut être déterminé par dosage colorimétrique des groupes diméthoxytrityle à 498 nm. Le rendement global est de 95,1% soit 98,3% par étape. Après séparation de la colonne et coupure des groupements protecteurs, l'oligonucléotide est purifié par HPLC sur colonne C8 aquapore (300Å) en utilisant un gradient acétate de triéthylammonium/acétonitrile.

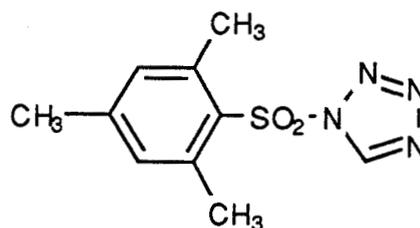
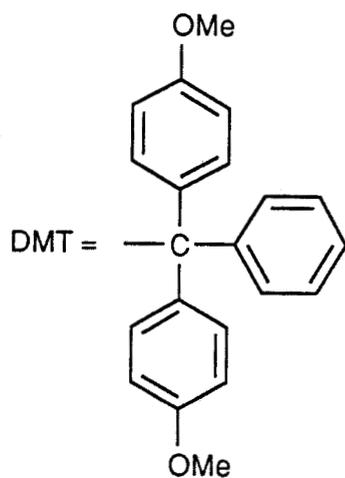
A : acétate de triéthylammonium pH 7, 50 mM

B : 20% acétate de triéthylammonium pH 7, 35 mM/80% acétonitrile

La détection se fait à 254 nm. Le débit est de 0,7 ml/mn.



- Elimination du groupe R protecteur : R = CH₂CH₂CN triéthylamine/pyridine
- Séparation du support solide : action de l'ammoniaque concentrée à 20°C, 3x30mn
- Elimination des groupements protecteurs des bases : NH₄OH, 55°C, 8h
- Purification par HPLC



"tétrazole" = mésitylènesulfonyltétrazolidé

Schéma de synthèse aux phosphoramidites

INTERACTION AVEC L'ADN ET ACTIVITE BIOLOGIQUE

Les différents ADN et polynucléotides synthétiques sont obtenus auprès de la société Sigma (Sigma Chemical Co.) et sont utilisés sans purification. Les concentrations des ADN sont déterminées spectroscopiquement à partir de leurs coefficients d'extinction molaire (en $M^{-1} \cdot cm^{-1}$) (Mahler *et al.*, 1964) respectifs présentés dans le tableau ci-dessous:

| | $\epsilon_{260}(M^{-1} \cdot cm^{-1})$ | % GC |
|---------------------|--|------|
| Poly [d(AT).d(AT)] | 6650 | 0 |
| Poly [d(A).d(T)] | 6650 | 0 |
| Calf Thymus | 6600 | 42 |
| Micro Lysodeikticus | 6300 | 72 |
| Poly [d(G).d(C)] | 6500 | 100 |

Pour les études de viscosimétrie et de dichroïsme électrique, l'ADN de thymus de veau (calf thymus) a été coupé en courts bâtonnets selon le protocole établi par Wakelin et Waring (1976). L'ADN produit par ce procédé comprend 300-450 paires de bases, comme le confirme la calibration sur gels avec comme référence l'ADN plasmidique pBR322 digéré par l'enzyme de restriction HaeIII.

□ Spectres d'absorption UV

Les spectres d'absorption (balayage spectral) des différentes molécules et de leur complexe avec l'ADN sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Kontron Uvikon 930 couplé à une imprimante Epson LX-800. La cuve de mesure en quartz de 3ml et de trajet optique de 10mm contient la molécule à tester à une concentration de $10\mu M$ dans le tampon Tris 10mM, NaCl 10mM, pH 7,0. L'ADN de thymus de veau est ajouté par incréments de $15\mu l$ à partir d'une solution mère à $500\mu M$.

L'oxydation de la molécule Thia-NtAMSA ($50\mu M$) en présence de $CuSO_4$ ($150\mu M$) dans le tampon borate 50mM pH 9,4 est suivie par un balayage spectral toutes les 30mn.

□ Dénaturation thermique

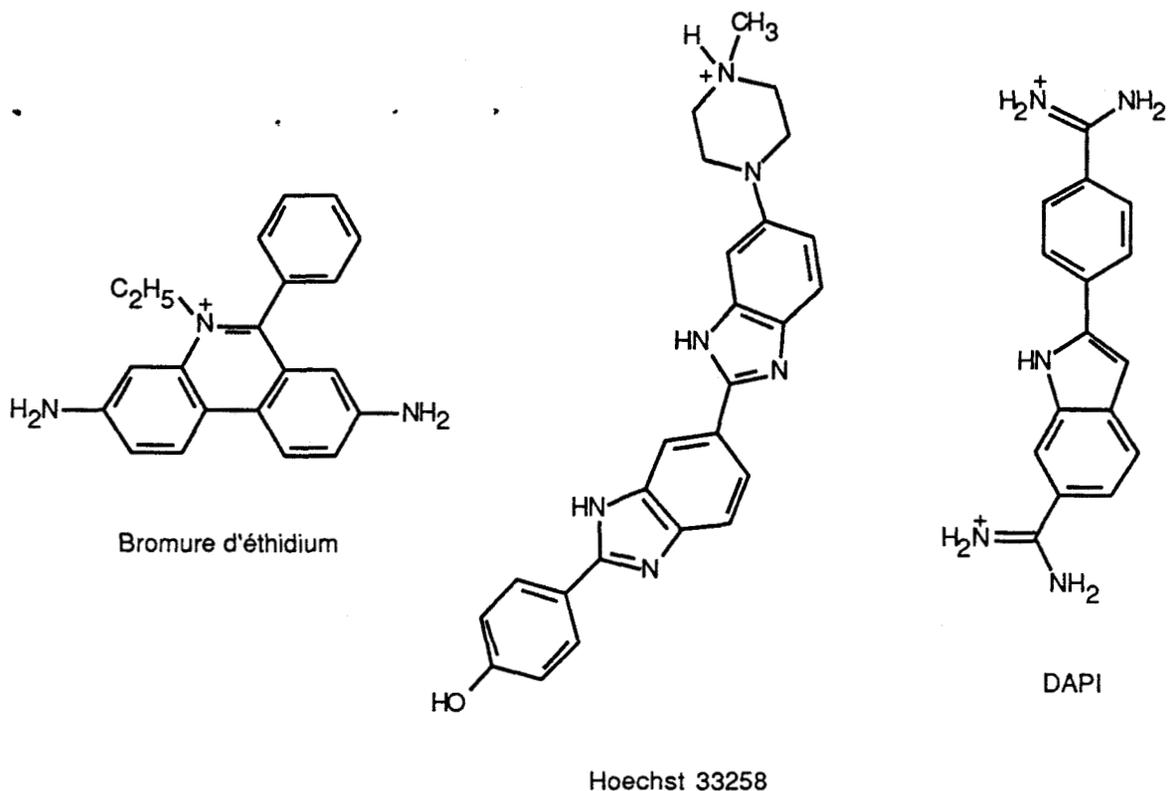
A une solution 28 μ M d'ADN dans 3ml de tampon SSC 0.1M (NaCl 15mM, citrate trisodique 1,5mM, pH7), on ajoute 9, 21, 42, 63 et 84 μ l d'une solution aqueuse 1mM du produit à tester (cuves en quartz, trajet optique 10mm). L'absorbance est enregistrée, pour ces différents rapports [produit]/[ADN], toutes les minutes entre 45° et 95° (l'augmentation de température est de 1°C/mn). La température de dénaturation thermique de l'ADN (T_m) de chaque échantillon correspond au point d'inflexion de la sigmoïde de transition hyperchrome.

Les mesures des coefficients d'absorption et des courbes de fusion sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Kontron Uvikon 810/820 couplé à un enregistreur Uvikon 21 et une imprimante Uvikon 48. Les échantillons sont chauffés par une unité programmable Haake P 620 et l'absorbance à 260 nm est enregistrée en continu et corrigée des effets dus au solvants grâce à une cuve de référence compensatrice.

□ Fluorescence

Les valeurs "Q" du quenching sont déterminées à partir de solutions d'ADN 20 μ M dans un tampon de force ionique 0.01M (10mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 7) contenant un composé fluorescent (BET, DAPI, Hoechst 33258) à 2 μ M (Baguley et al., 1981). Toutes les mesures sont effectuées dans des cuves de quartz de 4ml et de 10mm de trajet optique, à température ambiante, à l'aide d'un spectrofluorimètre Kontron SFM 25 équipé d'un enregistreur Plotter 800. Le tableau ci-dessous précise les différentes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des composés fluorescents utilisés :

| | λ excitation | λ émission |
|---------------|----------------------|--------------------|
| BET | 546 nm | 595 nm |
| DAPI | 360 nm | 450 nm |
| Hoechst 33258 | 353 nm | 465 nm |



Les valeurs Q_{50} correspondent à la concentration finale du produit testé nécessaire pour réduire de 50% la fluorescence initiale du complexe ADN-fluorophore (fixée initialement à 100%).

□ Viscosimétrie

Les mesures d'élongation ont été réalisées à l'aide d'un viscosimètre Ubbelohde semi-microdilution. La température est maintenue constante à 27°C ($\Delta T = 0,1^{\circ}\text{C}$) à l'aide d'un bain-marie thermostaté. Les temps d'écoulement sont mesurés grâce à un détecteur électronique Schott type ABS/G avec une précision de 0,1s. L'ADN de thymus de veau est préparé selon le procédé de Wakelin et Waring (1976) dans un tampon SHE 0,01M (9,4mM NaCl, 2mM HEPES (acide(N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-2-éthanesulfonique)/ 10 μM EDTA (acide éthylènediamine tétraacétique), pH7) Les solutions sont filtrées préalablement à l'aide d'un filtre millipore 0,45 μM .

Les études de détorsion utilisent de l'ADN circulaire et sont réalisées selon les protocoles établis par Saucier *et al.* (1971) et Revet *et al.* (1971) sur l'appareil décrit précédemment. Le viscosimètre contient 2ml d'une solution d'ADN 150 μM . Les produits à tester sont ajoutés par incréments de 5-10 μl d'une solution 150 μM . Le

bromure d'éthidium utilisé comme référence induit un angle de détorsion de 26° conformément à Wang (1974).

Les calculs d'élongation utilisent l'équation théorique de Cohen et Eisenberg (1966,1969) en faisant l'approximation suivante: la viscosité intrinsèque est identique à la viscosité réduite. Les données de temps d'écoulement sont directement transformées en longueur apparente selon l'expression:

$$\frac{L}{L_0} = \left[\frac{t_C - t_0}{t_D - t_0} \right]^{1/3} = 1 + nr$$

L : longueur de l'ADN en présence du produit

L₀ : longueur de l'ADN libre

t_C : temps d'écoulement de l'ADN en présence du produit

t_D : temps d'écoulement de l'ADN libre

t₀ : temps d'écoulement du tampon SHE

r : nombre de moles de ligand liées par moles de paires de bases de l'ADN

□ Dichroïsme linéaire électrique

Les mesures de dichroïsme électrique sont effectuées avec une instrumentation informatisée utilisant le procédé décrit par Houssier et O'Konski (1981). La cellule de mesure, équipée d'un polariseur Glan, est utilisée dans les conditions suivantes : largeur de bande 3nm, limite de sensibilité 0,001 pour ΔA/A, temps de réponse 3μs. Les impulsions électriques rectangulaires appliquées aux électrodes verticales de platine, distantes de 1,5mm, sont délivrées par un générateur Cober 606P. La gamme de champs balayée s'étend de 1 à 14kV/cm; la durée d'impulsion est soigneusement ajustée de façon à atteindre le régime permanent d'orientation de la molécule (50-100ms suivant la force du champ électrique). Les résultats de dichroïsme sont exprimés sous la forme du dichroïsme réduit ΔA/A=(A// - A⊥)/A (ΔA est obtenu à partir des mesures de ΔA// = A// - A en utilisant la relation ΔA=1,5 (A// - A)), où A est l'absorbance en l'absence de champ, mesurée dans la même cellule (10mm), avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 5. Les valeurs de dichroïsme réduit (ΔA/A) pour l'ADN de thymus de veau et pour le ligand à un rapport D/P de 0,1 (concentration molaire du ligand sur concentration molaire de mononucléotide) dans le tampon (1mM cacodylate de sodium, pH 6,5) sont reliées à l'orientation de l'ADN et du ligand par les relations suivantes :

$$(\Delta A/A)_{\text{ADN}} = 3/2\Phi(3\cos^2\alpha-1)$$

$$(\Delta A/A)_{\text{ligand}} = 3/2\Phi(3\cos^2\beta-1)$$

où α et β sont les angles entre les moments de transition des bases et du ligand respectivement, et la direction du champ électrique. Φ est égal au rapport $(\Delta A/A)/(\Delta A/A)_{(1/E) \rightarrow 0}$ du dichroïsme mesuré sur le dichroïsme obtenu à champ infini (O'Konski, 1968).

L'angle β entre le plan du ligand et l'axe de l'hélice est déterminé suivant un procédé déjà décrit (Houssier, 1981), basé sur la comparaison du dichroïsme réduit à un champ donné pour les bases et pour le ligand dans leur bande d'absorption respective et en utilisant les rapports de deux dichroïsmes réduits suivants :

$$\frac{(\Delta A/A)_{\text{ligand}}}{(\Delta A/A)_{\text{ADN}}} = \frac{3\cos^2\beta-1}{3\cos^2\alpha-1}$$

Ceci suggère que le degré d'orientation dans le champ électrique et la structure de la macromolécule ne sont pas affectés par la liaison (approximation raisonnable pour des faibles rapports de liaison).

□ Constante d'association

La constante d'affinité apparente (K_a) est évaluée à partir des mesures d'absorbance dans la bande d'absorption du ligand, en présence de concentrations variables d'ADN. Selon la représentation de Scatchard (Scatchard, 1949), le rapport r/C_f est proportionnel à r en accord avec la relation suivante : $r/C_f = K_0(n-r)$, où $r = C_b/C_p$, C_b est la concentration du ligand lié à l'ADN, C_f est la concentration du ligand libre, C_p est la concentration molaire en résidu mononucléotidique de l'ADN, K_0 est la constante intrinsèque de liaison, et n la stoechiométrie de la liaison. La valeur de K_a peut être déterminée à partir de celles de K_0 et n ($K_a = K_0 \times n$) et correspond, en représentation de Scatchard, à l'intersection de la courbe avec l'axe des ordonnées.

La concentration en ligand lié, C_b , est déterminée à partir d'une solution d'ADN de forte concentration (100-200 μM) à laquelle on ajoute une solution de ligand plus faiblement concentrée (5-10 μM). De cette façon, le ligand peut être considéré comme totalement fixé à l'ADN qui se trouve en large excès. Lors de la titration, qui le plus souvent se fait dans une zone d'absorption proche sinon identique à celle de l'ADN, la cellule de référence contient elle aussi de l'ADN de façon à atténuer

l'influence de l'absorption intrinsèque du polynucléotide. Cette procédure permet de minimiser au maximum l'influence de l'ADN. La longueur d'onde à laquelle la titration est effectuée correspond au maximum d'absorption du ligand libre, région où l'hypochromisme est le plus important.

Pour chaque rapport ADN/ligand, C_b est mesurée par l'équation suivante: $C_b = (A_f - A_b) / (\epsilon_f - \epsilon_b)$, où A_f est l'absorbance du ligand libre, A_b est l'absorbance du ligand à la même concentration en présence de polynucléotide, ϵ_f est le coefficient d'extinction molaire du ligand libre, et ϵ_b est le coefficient d'extinction molaire du ligand lié à l'ADN. ϵ_b est déterminé en présence d'une solution contenant le ligand testé à faible concentration (5-10 μ M) et l'ADN en large excès (100-150 μ M).

□ Résonance paramagnétique électronique

Les mesures de RPE sont enregistrées sur un spectrophotomètre Varian E 109 X-band équipé d'une cavité E 238 opérant à 9,5 GHz avec une modulation haute fréquence de 100 KHz. Les échantillons de solution sont examinés dans une cellule plate en quartz à température ambiante dans les conditions opératoires suivantes : puissance microonde, 10 mW; amplitude de modulation, 100G; constante de temps, 0,25 sec.; temps d'enregistrement, 4 mn; gain modulable.

□ Activité biologique

- Culture cellulaire : Des cellules leucémiques L1210 de souris sont maintenues en croissance logarithmique en suspension dans le milieu RPMI-1640 (GIBCO) contenant 10% de sérum fœtal de veau. Les cellules sont cultivées dans des flacons de 25 cm² (Corning) sous une atmosphère saturée en H₂O et contenant 5% de CO₂ à 37°C.

- Essais de croissance et de viabilité : Les cellules (300000 cellules/ml) sont traitées avec l'hybride dilué dans de l'eau stérile et passées sur filtre 0,2 μ m immédiatement avant usage. Les échantillons de cellules sont prélevés après une période d'incubation de 24 à 96 heures. La croissance cellulaire et la viabilité sont estimées par numération des cellules après dilution avec une solution de bleu Trypan. Les effets de la toxicité sur la croissance cellulaire sont exprimés en fonction de la concentration du produit testé.

- Activité antitumorale *in vivo* : Elle a été évaluée chez la souris femelle DBA/2 à laquelle on a inoculé la tumeur leucémique P388 (Charles River, France). Les souris sont au nombre de 6 par cage, avec un libre accès à la nourriture et à l'eau. L'inoculum consiste en 0,1ml de fluide ascitique dilué contenant 10⁶ cellules leucémiques

provenant d'une souris leucémique. Le jour de l'inoculation de la tumeur par voie *i. p.* est désigné comme jour 0. Thia-NtGA est administré *i. p.* (25mg/kg/jour) dans 0,2ml de sérum physiologique du jour 1 au jour 5. Les contrôles non traités et les contrôles positifs sont réalisés par administration *i. p.* respective de sérum physiologique (0,2ml, du jour 1 au jour 5) et de 5-fluorouracile (20mg/kg/jour) dans 0,4ml, du jour 1 au jour 5. L'activité antitumorale est évaluée à partir du T/C exprimé en % ($T/C = (\text{temps de survie médian du groupe testé}/\text{contrôle médian}) \times 100$).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ARCAMONE F., BIZIOLI F., CANEVAZZI G., GREIN A. (1958) Distamycin and distacin. German Pat. 1, 027, 667 (Chem. Abstr. (1961) **55**, 2012).

ARCAMONE F., PENCO S., OREZZI P., NICOLELLA V., PIRELLI A. (1964) Structure and synthesis of distamycin A. *Nature* **203**, 1064-1065.

ARCAMONE F., OREZZI P.G., BARBIERI W., NICOLELLA V., PENCO S. (1967) Distamicina A. Nota I. Isolamento e struttura dell'agente antivirale distamicina A. *Gazz. Chim. Italiana* **97**, 1097-1109.

ARCAMONE F., NICOLELLA V., PENCO S., REDAELLI S. (1969a) Distamicina A. Nota IV. Sintesi di analoghi con diverso numero di resti dell'acido 1-metil-4-amminopirrolo-2-carbossilico. *Gazz. Chim. Italiana* **99**, 632-640.

ARCAMONE F., PENCO S., DELLE MONACHE F. (1969b) Distamicina A. Nota III. Sintesi di analoghi contenenti modificazioni nelle catene laterali. *Gazz. Chim. Italiana* **99**, 620-631.

ARCAMONE F. (1972) On distamycin A and related compounds, selective antiviral agents. In "*Medicinal Chemistry*" (P. PRATESI ed.), pp. 29-45. Butterworths, London.

ARCAMONE F., LAZZARI E., MENEZZI M., SORANZO C., VERINI M.A. (1986) Synthesis, DNA binding and antiviral activity of distamycin analogues containing different heterocyclic moieties. *Anti-Cancer Drug Design* **1**, 235-244.

ARLIN Z. (1983) Current status of amsacrine combination chemotherapy programs in acute leukemia. *Cancer Treat. Rep.* **67**, 967-970.

ATWELL G.J., CAIN B.F. (1968) Potential antitumor agents. VI. Bisquaternary salts. *J. Med. Chem.* **11**, 295-300.

ATWELL G.J., CAIN B.F., BAGULEY B.C., FINLAY G.J., DENNY W.A. (1984) Potential antitumor agents. 43. Synthesis and biological activity of dibasic 9-aminoacridine-4-carboxamides, a new class of antitumor agent. *J. Med. Chem.* **27**, 1481-1485.

AUCLAIR C., SCHWALLER M.A., RENE B., BANOUN H., SAUCIER J.M., LARSEN A.K. (1988) Relationships between physicochemical and biological properties in a series of oxazolopyrido-carbazole derivatives (OPC): a comparison with related anti-tumour agents. *Anti-Cancer Drug Design* **3**, 133-144.

BAGULEY B.C., DENNY W.A., ATWELL G.J., CAIN B.F. (1981) Potential antitumor agents. 34. Quantitative relationships between DNA binding and molecular structure for 9-anilinoacridines substituted in the anilino ring. *J.Med.Chem.* **24**, 170-177.

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

BAGULEY B.C., DENNY W.A., ATWELL G.J., FINLAY G.J., REWCASTLE G.W., TWIGDEN S.J., WILSON W.R. (1984) Synthesis, antitumour activity and DNA binding properties of a new derivative of amsacrine, N-5-dimethyl-9-[(2-methoxy-4-methylsulfonylamino-)phenylamino]-4-acridine carboxamide. *Cancer Res.* **44**, 3245-3251.

BAGULEY B.C., HOLDAWAY K.M., FRAY L.M. (1990) Design of DNA intercalators to overcome topoisomerase II-mediated multidrug resistance. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 398-402.

BAGULEY B.C. (1991) DNA intercalating anti-tumor agents. *Anti-Cancer Drug Design* **6**, 1-35.

BAILLY C., HOUSSIN R., BERNIER J.L., HENICHART J.P. (1988a) Depsipeptide analogs of the antitumor drug distamycin containing thiazole amino acids residues. *Tetrahedron* **44**, 5833-5843.

BAILLY C., POMMERY N., HENICHART J.P. (1988b) DNA-synthesis and tumor growth inhibitions by AGGA, a bleomycin-amsacrine hybrid derivative. *Cancer Lett.* **38**, 321-328.

BAILLY C., CATTEAU J.P., HENICHART J.P., RESZKA K., SHEA R.G., KROWICKI K., LOWN J.W. (1989a) Subcellular distribution of a nitroxide spin labeled netropsin in living KB cells. Electron Paramagnetic Resonance and sequence specificity studies. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 1625-1630.

BAILLY C., POMMERY N., HOUSSIN R., HENICHART J.P. (1989b) Design, synthesis, DNA binding and biological activity of a series of DNA minor-groove-binding intercalating drugs. *J. Pharm. Sci.* **78**, 910-917.

BAILLY C., HENICHART J.P. (1990) Subcellular distribution of a nitroxide spin-labeled netropsin-acridine hybrid in living KB cells. Electron spin resonance study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167**, 798-806.

BAILLY C., OHUIGIN C., RIVALLE C., BISAGNI E., HENICHART J.P., WARING M.J. (1990a) Sequence-selective binding of an ellipticine derivative to DNA. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6283-6291.

BAILLY C., HELBECQUE N., HENICHART J.P., COLSON P., HOUSSIER C., RAO K.E., SHEA R.G., LOWN J.W. (1990b) Molecular recognition between oligopeptides and nucleic acids. DNA sequence specificity and binding properties of an acridine-linked netropsin hybrid ligand. *J. Molec. Recognition* **3**, 26-35.

BAILLY C., BEAUVILLAIN J.C., BERNIER J.L., HENICHART J.P. (1990c) Plasma membrane perturbations of KB₃ cells induced by the bleomycin-iron complex. *Cancer Res.* **50**, 385-392.

BAILLY C., HENICHART J.P. (1991) The rational design of intercalator-minor groove binder hybrid molecules. *Acceptée pour publication dans Bioconjugate Chemistry.*

BAILLY C., DENNY W.A., MELLOR M.E., WARING M.J. (1991a) Footprinting studies on amsacrine-4-carboxamides. *Soumis pour publication à Biochemistry.*

BAILLY C., COLLYN-D'HOOGHE M., LANTOINE D., FOURNIER C., HECQUET B., FOSSE P., SAUCIER J.M., COLSON P., HOUSSIER C., HENICHART J.P. (1991b) Biological activity and molecular interaction of a netropsin-acridine hybrid ligand with chromatin and topoisomerase II. *Soumis pour publication à Biochem. Pharmacol.*

BEAUCAGE S.L., CARUTHERS M.H. (1981) A new class of key intermediates for deoxyribonucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1859-1862.

BERMAN H.M., NEIDLE S., ZIMMER C., THRUM H. (1979) Netropsin, a DNA-binding oligopeptide. Structural and binding studies. *Biochim. Biophys. Acta* **561**, 124-131.

BERNIER J.L., HENICHART J.P., CATTEAU J.P. (1981) Design, synthesis and DNA-binding capacity of a new peptidic bifunctional intercalating agent. *Biochem. J.* **199**, 479-484.

BERNIER J.L., HOUSSIN R., HENICHART J.P. (1986a) Analog of dolastatin 3. Synthesis, ¹H-NMR studies and spatial conformation. *Tetrahedron* **42**, 2695-2702.

BERNIER J.L., KENANI A., HOUSSIN R., HELBECQUE N., LOHEZ M., HECQUET B., HENICHART J.P. (1986b) Molecular interaction between bleomycin and amsacrine in the presence of cupric ions. *J. Inorg. Biochem.* **27**, 271-285.

BERNIER J.L., LOHEZ M., HELBECQUE N., HENICHART J.P. (1989) Effect of combination of m-AMSA and doxorubicin on their redox properties and on DNA cleavage. *Chem.-Biol. Interactions* **70**, 103-115.

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

BRAITHWAITE A.W., BAGULEY B.C. (1980) Existence of an extended series of antitumor compounds which bind to deoxyribonucleic acid by nonintercalative means. *Biochemistry* **19**, 1101-1106.

BROWN S.C., MULLIS K., LEVENSON C., SHAFER R.H. (1984) Aqueous solution structure of an intercalated actinomycin D-dATGCAT complex by two-dimensional and one-dimensional proton NMR. *Biochemistry* **23**, 403-408.

BRUZIK J.P., AUBLE D.T., DE HASETH P.L. (1987) Specific activation of transcription initiation by the sequence-specific DNA-binding agents distamycin A and netropsin. *Biochemistry* **26**, 950-956.

BURCKHARDT G., LUCK G., ZIMMER C., STORL J., KROWICKI K., LOWN J.W. (1989) Variation of the DNA sequence specificity of DNA-oligopeptide binding ligands related to netropsin: imidazole-containing lexitropsins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1009**, 11-18.

BURGER R.M., PEISACH J., HORWITZ S.B. (1981) Activated bleomycin : a transient complex of drug, iron and oxygen that degrades DNA. *J. Biol. Chem.* **256**, 11636-11644.

BURR-FURLONG N., SATO J., BROWN T., CHAVEZ F., HURLBERT R.B. (1978) Induction of limited DNA damage by the antitumor agent Cain's acridine. *Cancer Res.* **38**, 1329-1335.

CAIN B.F., SEELYE R.N., ATWELL G.J. (1974) Potential antitumor agents. 14. Acridinylmethane sulfonanilides. *J. Med. Chem.* **17**, 922-930.

CAIN B.F., ATWELL G.J., DENNY, W.A. (1977) Potential antitumor agents. 23. 4'-(9-acridinylamino)alkanesulfonanilide congeners bearing hydrophilic functionality. *J. Med. Chem.* **20**, 987-996.

CARTER S.K. (1978) In "*Bleomycin : current status and new developments*" (S.K. CARTER, S.T. CROOKE, H. UMEZAWA eds)pp.9-14, Academic Press, New York.

CASSILETH P.A., GALE R.P. (1986) Amsacrine: a review. *Leukemia Res.* **10**, 1257-1265.

CHAIRES J.B., FOX K.R., HERRERA J.E., BRITT M., WARING M.J. (1987) Site and sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction. *Biochemistry* **26**, 8227-8236.

CHAIRES J.B., HERRERA J.E., WARING M.J. (1990) Preferential binding of daunomycin to 5'A/TCG and 5'A/TGC sequences revealed by footprinting titration experiments. *Biochemistry* **29**, 6145-6153.

CHANDRA P., GOTZ A., WACKLER A., VERINI M.A., CASAZZA A.M., FIORETTI A., ARCAMONE F., GHIONE M. (1971) Some structural requirements for the antibiotic action of distamycins. *FEBS Lett.* **16**, 249-252.

CHEN K.X., GRESH N., PULLMAN B. (1988) Energetics and stereochemistry of DNA complexation with the antitumor AT specific intercalators tilorone and m-AMSA. *Nucl. Acids Res.* **16**, 3061-3073.

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

CHURCHILL M.E.A., HAYES J.J., TULLIUS T.D. (1990) Detection of drug binding to DNA by hydroxyl radical footprinting. Relationship of distamycin binding sites to DNA structure and positioned nucleosomes on 5S RNA genes of *Xenopus*. *Biochemistry* **29**, 6043-6050.

CLORE G.M., GRONENBORN A.M., MOSS D.S., TICKLE I.J. (1985) Refinement of the solution structure of the B DNA hexamer 5'd(C-G-T-A-C-G)₂ on the basis of inter-proton distance data. *J. Mol. Biol.* **185**, 219-226.

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

COHEN G., EISENBERG H. (1969) Viscosity and sedimentation study of sonicated DNA-proflavine complexes. *Biopolymers* **8**, 45-55.

COLL M., AYMAMI J., VAN DER MAREL G.A., VAN BOOM J.H., RICH A., WANG A.H.J. (1989) Molecular structure of the netropsin-d(CGCGATATCGCG) complex: DNA conformation in an alternating AT segment. *Biochemistry* **28**, 310-320.

COLLYN-D'HOOGHE M., BERNIER J.L., HENICHART J.P. (1987) Cytotoxic action and cell cycle effects of ALGA, a peptidic derivative of the antileukemic drug amsacrine. *Cancer Biochem. Biophys.* **9**, 257-264.

COSAR C., NINET L., PINNET-SINDICO S., PREUD'HOMME J. (1952) Activité trypanocide d'un antibiotique produit par un Streptomyces. *C. R. Acad. Sci.* **234**, 1498-1499.

CROOKE S.T. (1978) In "*Bleomycin: current status and new developments*" (S.K. CARTER, S.T. CROOKE, H. UMEZAWA eds) pp.1-8, Academic Press, New York.

DASGUPTA D., RAJAGOPALAN M., SASISEKHARAN V. (1986) DNA-binding characteristics of a synthetic analogue of distamycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**, 626-631.

DASGUPTA D., HOWARD F.B., SASISEKHARAN V., MILES H.T. (1990) Drug-DNA binding specificity: binding of netropsin and distamycin to poly(d2NH₂A-dT). *Biopolymers* **30**, 223-227.

DATTAGUPTA N., HOGAN M., CROTHERS D.M. (1980) Interaction of netropsin and distamycin with DNA: Electric dichroism study. *Biochemistry* **19**, 5998-6005.

DEBART F., PERIGAUD C., GOSSELIN G., MRANI D., RAYNER B., LEBER P., AUCLAIR C., BALZARINI J., DE CLERCQ E., PAOLETTI C., IMBACH J.L. (1989) Synthesis, DNA-binding, and biological evaluation of synthetic precursors and novel analogues of netropsin. *J. Med. Chem.* **32**, 1074-1083.

DENNY W.A., CAIN B.F., ATWELL G.J., HANSCH C., PANTHANANICKAL A., LEO A.J. (1982) Potential antitumor agents. 36. Quantitative relationships between experimental antitumor activity, toxicity, and structure for the general class of 9-anilinoacridine antitumor agents. *J. Med. Chem.* **25**, 276-315.

DENNY W.A., BAGULEY B.C., CAIN B.F., WARING M.J. (1983a) Antitumour acridines. In "*Molecular aspects of anti-cancer drug action*" (S. NEIDLE, M.J. WARING eds) pp.1-34, Verlag Chemie, England.

DENNY W.A., ATWELL G.J., BAGULEY B.C. (1983b) Potential antitumor agents. 39. Anilino ring geometry of amsacrine and derivatives : relationship to DNA binding and antitumor activity. *J. Med. Chem.* **26**, 1625-1630.

DENNY, W.A. (1989) DNA-intercalating ligands as anti-cancer drugs: prospects for future design. *Anti-Cancer Drug Design* **4**, 241-263.

DERVAN P.B. (1986) Design of sequence-specific DNA-binding molecules. *Science* **232**, 464-471.

DHAKA K.S., MOHAN J.A.G., CHADHA V.K., PUJARI H.K. (1974) Heterocyclic system containing bridgehead nitrogen atom: Part XVIII - Reaction of 3-mercapto-5-triazoles with α -haloketones and with alkyl halides. *Indian J. Chem.* **12**, 485-489.

DREW, H.R., DICKERSON R.E. (1981) Structure of a B-DNA dodecamer. III. Geometry of the hydration. *J. Mol. Biol.* **151**, 535-556.

DRLICA K., FRANCO R.J. (1988) Inhibitors of DNA topoisomerases. *Biochemistry* **27**, 2253-2259.

ELIADIS A., PHILLIPS D.R., REISS J.A., SKOROBOGATY A. (1988) The synthesis and DNA footprinting of acridine-linked netropsin and distamycin bifunctional mixed ligands. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1049-1052.

FEIGON J., DENNY W.A., LEUPIN W., KEARNS D.R. (1984) Interactions of antitumor drugs with natural DNA : ^1H NMR study of binding mode and kinetics. *J. Med. Chem.* **27**, 450-465.

FINLAY A.C., HOCHSTEIN F.A., SOBIN B.A., MURPHY F.X. (1951) Netropsin, a new antibiotic produced by a Streptomyces. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 341-343.

FINLAY G.J., WILSON W.R., BAGULEY B.C. (1989) Chemoprotection by 9-aminoacridine derivatives against the cytotoxicity of topoisomerase II-directed drugs. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **25**, 1695-1701.

FISH E.L., LANE M.J., VOURNAKIS J.N. (1988) Determination of equilibrium binding affinity of distamycin and netropsin to the synthetic deoxyoligonucleotide sequence d(GGTATACC)₂ by quantitative DNAase I footprinting. *Biochemistry* **27**, 6026-6032.

FISHER L.M., KURODA R., SAKAI T.T. (1985). Interaction of bleomycin A₂ with deoxyribonucleic acid : DNA unwinding and inhibition of bleomycin-induced DNA breakage by cationic thiazole amides related to bleomycin A₂. *Biochemistry* **24**, 3199-3207.

FORNI A., MORETTI I., MARCONI G., MONGELLI N., SAMORI B. (1989) Linear dichroism studies of the complexes between CT-DNA and distamycins. *Biopolymers* **28**, 2177-2194.

FOX H.H. (1952) Synthetic tuberculostats. III. Isonicotinaldehyde thiosemicarbazone and some related compounds. *J. Org. Chem.* **17**, 555-562.

FOX K.R., WARING M.J. (1984) DNA structural variations produced by actinomycin and distamycin as revealed by DNAase I footprinting. *Nucl. Acids Res.* **12**, 9271-9287.

FOX K.R., WARING M.J. (1987) Footprinting at low temperature: evidence that ethidium and other simple intercalators can discriminate between different nucleotide sequences. *Nucl. Acids Res.* **15**, 491-507.

FRITZSCHE H., RICHTER M., RUPRECHT A. (1984) Infrared linear dichroism of oriented DNA and DNA-ligand complexes prepared with the wet spinning method. *Nucl. Acid Res.* **12**, 9165-9177.

GAMCSIK M.P., GLICKSON J.D., ZON G. (1990) NMR studies of the interaction of bleomycin with (dC-dG)₃. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **7**, 1117-1133.

GAO X., PATEL D.J. (1989) Antitumour drug-DNA interactions: NMR studies of echinomycin and chromomycin complexes. *Quart. Rev. Biophys.* **22**, 93-138.

GAO Y.G., LIAW Y.C., ROBINSON H., WANG A.H.J. (1990) Binding of the antitumor drug nogalamycin and its derivatives to DNA: structural comparison. *Biochemistry* **29**, 10307-10316.

GREHN L., RAGNARSSON U. (1981) Novel efficient total synthesis of antiviral antibiotic distamycin A. *J. Org. Chem.* **46**, 3492-3497.

GREHN L., RAGNARSSON U., DATEMA, R. (1986) Structure-activity relationships in distamycin A analogues: effect of alkyl groups on the pyrrole nitrogen at the non-amidine end of the molecule combined with methyl elimination in the following ring. *Acta Chem. Scand.* **B40**, 145-151.

GRESH N., PULLMAN B., ARCAMONE F. (1985) A theoretical investigation on the sequence selective binding of daunomycin to double-stranded polynucleotides. *J. Biomol. Struct. Dynam.* **3**, 445-466.

GRESH N., PULLMAN B., ARCAMONE F., MENOZZI M., TONANI R. (1989) Joint experimental and theoretical investigation of the comparative DNA binding affinities of intercalating anthracycline derivatives. *Mol. Pharmacol.* **35**, 251-256.

GRYGON G.A., SPIRO T.G. (1989) Ultraviolet Resonance Raman spectroscopy of distamycin complexes with poly(dA)-poly(dT) and poly(dA-dT): role of H-bonding. *Biochemistry* **28**, 4397-4402.

HARDY J.R., HARVEY V.J., PAXTON J.W., EVANS P., SMITH S., GROVE W., GRILLO-LOPEZ A.J., BAGULEY B.C. (1988) A phase I trial of the amsacrine analog 9-[[2-methoxy-4-[(methylsulfonyl)amino]phenyl]amino]-N,5-dimethyl-4-acridinecarboxamide (CI-921). *Cancer Res.* **48**, 6593-6596.

HARSHMAN K.D., DERVAN P.B. (1985) Molecular recognition of B-DNA by Hoescht 33258. *Nucl. Acids Res.* **13**, 4825-4835.

HASSNER A., ALEXANIAN V. (1978) Direct room temperature esterification of carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.* **46**, 4475-4478.

HELBECQUE N., BERNIER J.L., HENICHART J.P. (1985) Design of a new DNA-polyintercalating drug, a bisacridinyl peptidic analogue of Triostin A. *Biochem. J.* **225**, 829-832.

HENICHART J.P., HOUSSIN R., BERNIER J.L., CATTEAU J.P. (1982a) Synthetic model of a bleomycin metal complex. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1295-1297.

HENICHART J.P., BERNIER J.L., CATTEAU J.P. (1982b) Interaction of 4-(9-acridinylamino)-aniline and derivatives with DNA. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem.* **363**, 835-841.

HENICHART J.P., BERNIER J.L., LEMAY P., HOUSSIN R., CATTEAU J.P. (1984) Subcellular distribution of spin-labeled bithiazoles and bleomycin in living KB cells: an ESR study. *Cancer Biochem. Biophys.* **7**, 239-244.

HENICHART J.P., BERNIER J.L., HOUSSIN R., LOHEZ M., KENANI A., CATTEAU J.P. (1985a) 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. An ESR investigation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 1036-1041.

HENICHART J.P., BERNIER J.L., HELBECQUE N., HOUSSIN R. (1985b) Is the bithiazole moiety of bleomycin a classical intercalator ? *Nucl. Acids Res.* **13**, 6703-6717.

HENICHART J.P., HOUSSIN R., BERNIER J.L. (1986) Synthesis of 6-phenyl and 6-styrylthiazolo-[3,2-b][1,2,4]triazoles. *J. Heterocyclic Chem.* **23**, 1531-1533.

HOGAN M., DATTAGUPTA N., CROTHERS M. (1979a) Transmission of allosteric effects in DNA. *Nature* **278**, 521-524.

HOGAN M., DATTAGUPTA N., CROTHERS D.M. (1979b) Transient electric dichroism studies of the structure of the DNA complex with intercalated drugs. *Biochemistry* **18**, 280-288.

HOLZAPFEL C.W., VAN ZYL W.J., ROOS M. (1990) The synthesis and conformation in solution of cyclo[1-Pro-l-Leu-l-(Gln)thz-(Gly)thz-l-Val] (Dolastatin 3). *Tetrahedron* **46**, 649-660.

HOUSIER C., O'KONSKI C.T. (1981) Electro-optical instrumentation systems with their data acquisition and treatment. In "*Molecular Electro-optics*" (S. KRAUSE ed.), Series B64, pp. 309-339. Nato Advanced Study Institute.

HOUSIER C. (1981) In "*Molecular Electro-optics*" (S.KRAUSE ed.), Series B64, pp. 363-398. Nato Advanced Study Institute.

HOUSSIN R., BERNIER J.L., HENICHART J.P. (1984a) Synthesis of spin-labelled bithiazoles, useful probes for studying bleomycin-DNA binding. *J. Heterocyclic Chem.* **21**, 465-469.

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

HOUSSIN R., LOHEZ M., BERNIER J.L., HENICHART J.P. (1985a) A convenient method for the preparation of 2-(1-aminoalkyl)thiazole-4-carboxylic acids, key intermediates in the total synthesis of naturally occurring antitumor cyclopeptides. *J. Org. Chem.* **50**, 2787-2788.

HOUSSIN R., BERNIER J.L., HENICHART J.P. (1985b) Synthesis of 2-isopropylidenehydrazinylthiazole and its subsequent annelation to the corresponding thiazolo[3,2-c]-s-triazole. *J. Heterocyclic Chem.* **22**, 1185-1187.

HOUSSIN R., HELBECQUE N., BERNIER J.L., HENICHART J.P. (1986) A new bithiazole derivative with intercalative properties. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **4**, 219-229.

HOUSSIN R., BERNIER J.L., HENICHART J.P. (1988) A convenient and general method for the preparation of tert-butoxycarbonylaminoalkanenitriles and their conversion to mono-tert-butoxycarbonylalkanediamines. *Synthesis*, 259-261.

IRELAND C.M., DURSO A.R., NEWMAN R.A., HACKER M.P. (1982) Antineoplastic cyclic peptides from the marine tunicate *Lissoclinum patella*. *J. Org. Chem.* **47**, 1807-1811.

JAIN S.C., TSAI C., SOBELL H.M. (1977) Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. II. Structure of an ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complex, ethidium: 5-iodocytidylyl(3'-5')guanosine. *J. Mol. Biol.* **114**, 317-331.

JONES R.L., LANIER A.C., KEEL R.A., WILSON W.D. (1980) The effect of ionic strength on DNA-ligand unwinding angles for acridine and quinoline derivatives. *Nucl. Acids Res.* **8**, 1613-1624.

JULIA M., PREAU-JOSEPH N. (1963) Structure et synthèse de la congocidine. *C. R. Acad. Sci.* **257**, 1115-1118.

KÄS E., IZAURRALDE E., LAEMMLI U.K. (1989) Specific inhibition of DNA binding to nuclear scaffolds and histone H1 by distamycin. *J. Mol. Biol.* **210**, 587-599.

KENANI A., LAMBLIN G., HENICHART J.P. (1988a) A convenient method for the cleavage of the D-mannosyl-L-gulose disaccharide from bleomycin-A₂. *Carbohydr. Res.* **177**, 81-89.

KENANI A., BAILLY C., HELBECQUE N., CATTEAU J.P., HOUSSIN R., BERNIER J.L., HENICHART J.P. (1988b) The role of the gulose-mannose part of bleomycin in activation of iron-molecular oxygen complexes. *Biochem. J.* **253**, 497-504.

KHORLIN A.A., KRYLOV A.S., GROKHOVSKY S.L., ZHUZE A.L., ZASEDATELEV A.S., GURSKY G.V., GOTTIKH B.P. (1980) A new type of AT-specific ligand constructed of two netropsin-like molecules. *FEBS Lett.* **118**, 311-314.

KISSINGER K., KROWICKI K., DABROWIAK J.C., LOWN J.W. (1987) Molecular recognition between oligopeptides and nucleic acids : monocationic lexitropsins that display enhanced GC sequence dependent DNA binding. *Biochemistry* **26**, 5590-5595.

KLEVIT R.E., WEMMER D.E., REID B.R. (1986) ¹H-NMR studies on the interaction between distamycin A and a symmetrical DNA dodecamer. *Biochemistry* **25**, 3296-3303.

KOPKA M.L., FRATINI A.V., DREW H.R., DICKERSON R.E. (1983) Ordered water structure around a B-DNA dodecamer. A quantitative study. *J. Mol. Biol.* **163**, 129-146.

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

KOPKA M.L., YOON C., GOODSELL D., PJURA P., DICKERSON R.E. (1985b) Binding of an antitumor drug to DNA : Netropsin and CGCGAATT^{Br}CGCG. *J. Mol. Biol.* **183**, 553-563.

KRIVTSORA M.A., MOROSHKINA E.B., GLIBIN E. (1984) DNA interaction with low molecular weight ligands with different structures. III. Complexes of DNA with distactins. *Mol. Biol.* **18**, 950-956.

KROWICKI K. , LOWN J.W. (1987) Synthesis of novel imidazole-containing DNA minor groove oligopeptides related to the antiviral antibiotic netropsin. *J. Org. Chem.* **52**, 3493-3501.

KUMAR S., JASEJA M., ZIMMERMANN J., YADAGIRI B., PON R.T., SAPSE A.M., LOWN J.W. (1990) Molecular recognition and binding of a GC site-avoiding thiazole-lexitropsin to the decadeoxyribonucleotide d-(CGCAATTGCG)₂: ¹H-NMR evidence for thiazole intercalation. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **8**, 99-121.

KUWAHARA J., SUGIURA Y. (1988) Sequence-specific recognition and cleavage of DNA by metallobleomycin: minor groove binding and possible interaction mode. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2459-2463.

LANE M.J., DABROWIAK J.C., VOURNAKIS J.N. (1983) Sequence specificity of actinomycin D and netropsin binding to pBR322 DNA analyzed by protection from DNase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3260-3264.

LANE A.N., FORSTER M.J. (1989) Determination of internal dynamics of deoxyriboses in the DNA hexamer d(CGTACG)₂ by ¹H NMR. *Eur. Biophys. J.* **17**, 221-232.

LANE A.N. (1990) Solution conformations of d(CGTACG)₂ determined from NMR experiments. *Biochim. Biophys. Acta* **1049**, 205-212.

LAUGHTON C.A., JENKINS T.C., FOX K.R., NEIDLE S. (1990) Interaction of berenil with the tyrT DNA sequence studied by footprinting and molecular modelling. Implications for the design of sequence-specific DNA recognition agents. *Nucl. Acids Res.* **18**, 4479-4488.

- LEE M., KROWICKI K., HARTLEY J.A., PON R.T., LOWN J.W. (1988a). Molecular recognition between oligopeptides and nucleic acids: influence of Van der Waals contacts in determining the 3'-terminus of DNA sequences read by monocationic lexitropsins. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3641-3649.
- LEE M., HARTLEY J.A., PON R.T., KROWICKI K., LOWN J.W. (1988b) Sequence specific molecular recognition by a monocationic lexitropsin of the decadeoxyribonucleotide d(CATGGCCATG)₂ : structural and dynamic aspects deduced from high field ¹H-NMR studies. *Nucl. Acids Res.* **16**, 665-684.
- LEE M., KROWICKI K., SHEA, R.G., LOWN J.W., PON R.T. (1989) Molecular recognition between oligopeptides and nucleic acids. Specificity of binding of a monocationic bis-furan lexitropsin to DNA deduced from footprinting and ¹H-NMR studies. *J. Molec. Recogn.* **2**, 84-93.
- LEMAY P., BERNIER J.L., HENICHART J.P., CATTEAU J.P. (1983) Subcellular distribution of nitroxide spin-labelled 9-aminoacridine in living KB cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**, 1074-1081.
- LEOPOLD III W.R., CORBETT T.H., GRISWOLD D.P., PLOWMAN J., BAGULEY B.C. (1987) Experimental antitumor activity of the amsacrine analogue CI-921. *J. Natl. Cancer. Inst.* **79**, 343-349.
- LIAW Y.C., GAO Y.G., ROBINSON H., VAN DER MAREL G.A., VAN BOOM J.H., WANG A.H.J. (1989) Antitumor drug nogalamycin binds DNA in both grooves simultaneously: molecular structure of nogalamycin-DNA complex. *Biochemistry* **28**, 9913-9918.
- LIQUIER J., McHAMI A., TAILLANDIER E. (1989) FITR study of netropsin binding to poly d(A-T) and polydA-polydT. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **7**, 119-126.
- LOUIE A.C., ISSELL B.F. (1985) Amsacrine (AMSA) - a clinical review. *J. Clin. Oncol.* **3**, 562-592.
- LOWN J.W., KROWICKI K. (1985) Efficient total synthesis of the oligopeptide antibiotics netropsin and distamycin. *J. Org. Chem.* **50**, 3774-3779.

LOWN J.W., KROWICKI K., BHAT U.G., SKOROBOGATY A., WARD B., DABROWIAK J.C. (1986a) Molecular recognition between oligopeptides and nucleic acids : novel imidazole-containing oligopeptides related to netropsin that exhibit altered DNA sequence specificity. *Biochemistry* **25**, 7408-7416.

LOWN J.W., KROWICKI K., BALZARINI J., DE CLERCQ E. (1986b) Structure activity relationship of novel oligopeptide antiviral and antitumor agents related to netropsin and distamycin. *J. Med. Chem.* **29**, 1210-1214.

LOWN J.W. (1988) Lexitropsins: rational design of DNA sequence reading agents as novel anti-cancer agents and potential cellular probes. *Anti-Cancer Drug Design* **3**, 25-40.

LOWN J.W. (1990) Molecular mechanisms of DNA sequence recognition by groove binding ligands: biochemical and biological consequences. In "*Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interactions*" (B. PULLMAN and J. JORTNER eds), pp.103-122. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

LUCK G., TRIEBEL H., WARING M.J., ZIMMER C. (1974) Conformational dependent binding of netropsin and distamycin to DNA and DNA model polymers. *Nucl. Acids Res.* **1**, 503-530.

LUCK G., ZIMMER C., REINERT K.E., ARCAMONE F. (1977) Specific interaction of distamycin A and its analogs with (A-T) rich and (G-C) rich duplex regions of DNA and deoxypolynucleotides. *Nucl. Acids Res.* **4**, 2655-2670.

LUCK G., ZIMMER C., BAGULEY B.C. (1984) Interaction of nucleic acids with a non intercalative antileukemic compound containing bisquaternary heterocycles. *Biochim. Biophys. Acta* **782**, 41-48.

MAHLER H.R., KLINE B., MEHROTRA B.D. (1964) Some observations on the hypochromism of DNA. *J. Mol. Biol.* **9**, 801-811.

MANNING M.C., WOODY R.W. (1986) Molecular orbital calculations on the oligopeptides netropsin, distamycin and related compounds. *Biopolymers* **25**, 2065-2082.

MARKY L.A., BLUMENFELD K.S., BRESLAUER K.J. (1983) Calorimetric and spectroscopic investigation of drug-DNA interactions. I. The binding of netropsin to poly-d(AT). *Nucl. Acids Res.* **11**, 2857-2870.

MARKY L.A., BRESLAUER K.J. (1987) Origins of netropsin binding affinity and specificity: correlations of thermodynamic and structural data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4359-4363.

MATTEUCI M.D., CARUTHERS M.H. (1980) The synthesis of oligodeoxypyrimidines on a polymer support. *Tetrahedron Lett.* **21**, 719-722.

MATTEUCI M.D., CARUTHERS M.H. (1981) Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3185-3191.

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

MAZZA G., GALIZZI A., MINGHETTI A., SICCRADI A. (1973) Interaction between DNA and distamycin A studied by transformation in *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **3**, 384-391.

MELNIKOVA A.F., ZAZEDATELEV A.S., KOLCHINSKY A.M., GURSKY G.V., ZHUZI A.L., GROKHOVSKY S.L., MIRZABEKOV A.D. (1975) Accessibility of the minor groove of DNA in chromatin to the binding of antibiotics netropsin and distamycin A. *Molec. Biol. Rep.* **2**, 135-142.

MIGNOT A., MOSKOWITZ H., MIOCQUE M. (1979) Synthesis of [1,3]-thiazolo-[3,2-b]-s-triazoles and [1,3]-thiazolo-[2,3-c]-s-triazoles. *Synthesis*, 52-53.

MORIER-TEISSIER E., BAILLY C., BERNIER J.L., HOUSSIN R., HELBECQUE N., CATTEAU J.P., COLSON P., HOUSSIER C., HENICHART J.P. (1989) Synthesis, biological activity and DNA interaction of anilinoacridine and bithiazole peptide derivatives related to the antitumor drugs m-AMSA and bleomycin. *Anti-Cancer Drug Design* **4**, 37-52.

MRANI D., GOSSELIN G., BAILLY C., HOUSSIN R., RAO K.E., ZIMMERMANN J., BALZARINI J., DE CLERCQ E., HENICHART J.P., IMBACH J.L., LOWN J.W. (1991) Synthesis and determination of sequence selective DNA minor groove binding of bithiazole-linked netropsin derivatives. *Soumis pour publication à J. Org. Chem.*

NAKAMURA S., YONEHARA H., UMEZAWA H. (1964) On the structure of netropsin. *J. Antibiotics Ser. A* **17**, 220-221.

NEIDLE S., PEARL L.H., SKELLY J.V. (1987) DNA structure and perturbation by drug binding. *Biochem. J.* **243**, 1-13.

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

OCHI H., WATANABE S., YAMAMOTO H. (1988) New heritable fragile site on chromosome 8 induced by distamycin A. *Gann* **79**, 145-147.

O'KONSKI C.T. (1968) Optical properties (Kerr effect in polymers). *Encycl. Polym. Sci. Technol.* **9**, 555-590.

OLLIS D.L., WHITE S.W. (1987) Structural basis of protein-nucleic acid interactions. *Chem. Rev.* **87**, 981-995.

PARRACK P., DASGUPTA D., AYYER J., SASISEKHARAN V. (1987) Interaction of the conjugated N-methylpyrrole system in specificity of binding. *FEBS Lett.* **212**, 297-301.

PATEL D.J. (1979) Netropsin-dGdGdAdAdTdTdCdC complex. Antibiotic binding at adenine-thymine base pairs in the minor groove of self-complementary octanucleotide duplex. *Eur. J. Biochem.* **99**, 369-378.

PATEL D.J., KOZLOWSKI S.A., RICE J.A., BROKA C., ITAKURA K. (1981) Mutual interaction between adjacent dG.dC actinomycin binding sites and dA.dT netropsin binding sites on the self-complementary d(CGCGAATTCGCG) duplex in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7281-7284.

PATEL D.J., PARDI A., ITAKURA K. (1982) DNA conformation, dynamics, and interactions in solution. *Science* **216**, 581-590.

PELTON J.G., WEMMER D.E. (1988) Structural modeling of the distamycin A-d(CGCGAATTCGCG)₂ complex using 2D NMR and molecular mechanics. *Biochemistry* **27**, 8088-8096.

PENCO S., REDAELLI S., ARCAMONE F. (1967) Distamycin A. II. Total synthesis. *Gazz. Chim. Italiana* **97**, 1110-1115.

PETTIT G.R., KAMANO Y., HOLZAPFEL C.W., VAN ZYL W.J., TUINMAN A.A., HERALD C.L., BACZYNSKYJ L., SCHMIDT J.M. (1987) The structure and synthesis of Dolastatin 3. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 7581-7582.

PIGRAM W.J., FULLER W., HAMILTON L.D. (1972) Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nature New Biol.* **235**, 17-19.

PLOUVIER B. (1989) Thiazolylaminoacide et thiazole condensé, éléments clés pour la conception d'analogues de la nétoposine et de la bléomycine. Mastère en Drug Design, Institut de Chimie Pharmaceutique de Lille.

PORTUGAL J., WARING M.J. (1987) Comparison of binding sites in DNA for berenil, netropsin and distamycin. A footprinting study. *Eur. J. Biochem.* **167**, 281-289.

PORTUGAL J., WARING M.J. (1988) Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. *Biochim. Biophys. Acta* **949**, 158-168.

PORTUGAL J. (1989) Footprinting analysis of sequence-specific DNA-drug interactions. *Chem. Biol. Interactions* **71**, 311-324.

POTTS K.T., HUSAIN S. (1971) 1,2,4-Triazoles. XXVII. Synthesis of the thiazolo[2,3-c]-s-triazole and the thiazolo[3,2-b]-s-triazole systems. *J. Org. Chem.* **36**, 10-13.

POVIRK L.F., HOGAN M., DATTA GUPTA N. (1979) Binding of bleomycin to DNA : intercalation of the bithiazole rings. *Biochemistry* **18**, 96-101.

PULLMAN A., PULLMAN B. (1981) Molecular electrostatic potential of the nucleic acids. *Quart. Rev. Biophys.* **14**, 289-380.

QUIGLEY G.J., WANG A.H.J., UGHETTO G., VAN DER MAREL G.A., VAN BOOM J.H., RICH A. (1980) Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: Daunomycin plus d(CpGpTpApCpG). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7204-7208.

QUIGLEY G.J., UGHETTO G., VAN DER MAREL G.A., VAN BOOM J.H., WANG A.H.J., RICH A. (1986) Non-Watson-Crick G·C and A·T base pairs in a DNA-antibiotic complex. *Science* **232**, 1255-1258.

RAJAGOPALAN M., AYYER J., SASISEKHARAN V. (1985) Interaction on the non-intercalative drugs with DNA: distamycin analogues. *J. Biosci.* **7**, 27-32.

RAJAGOPALAN M., RAO K.E., AYYER J., SASISEKHARAN V. (1987) Synthesis of a distamycin analog: tris (m-benzamido) compound. *Indian J. Chem. Sect B* **26B**, 1021-1024.

RANDRIANARIVELO M., ZAKRZEWSKA K., PULLMAN B. (1989) Theoretical modeling of DNA-monocationic lexitropsin complexation: influence of ligand binding on DNA curvature. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **6**, 769-779.

RAO K.E., DASGUPTA D., SASISEKHARAN V. (1988) Interaction of synthetic analogues of distamycin and netropsin with nucleic acids. Does curvature of ligand play a role in distamycin-DNA interactions? *Biochemistry* **27**, 3018-3024.

RAO K.E., BATHINI Y., LOWN J.W. (1990a) Synthesis of novel thiazole containing DNA minor groove binding oligopeptides related to the antibiotic distamycin. *J. Org. Chem.* **55**, 728-737.

RAO K.E., SHEA R.G., YADAGIRI B., LOWN J.W. (1990b) Molecular recognition between oligopeptides and nucleic acids: DNA sequence specificity and binding properties of thiazole-lexitropsins incorporating the concepts of base site acceptance and avoidance. *Anti-Cancer Drug Design* **5**, 3-20.

RAO K.E., SHEA R.G., YADAGIRI B., LOWN J.W. (1990b) Molecular recognition between oligopeptides and nucleic acids: DNA sequence specificity and binding properties of thiazole-lexitropsins incorporating the concepts of base site acceptance and avoidance. *Anti-Cancer Drug Design* **5**, 3-20.

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

SAKAI T.T., RIORDAN J.M., BOOTH T.E., GLICKSON J.D. (1981) Synthesis and DNA binding of [3-[2'-(2-acetamidoethyl)-2,4'-bithiazole-4-carboxamido]propyl] dimethylsulfonium chloride, a fragment of Bleomycin A₂. *J. Med. Chem.* **24**, 279-285.

SAKAI T.T., RIORDAN J.M., GLICKSON J.D. (1982) Models of bleomycin interactions with poly(deoxyadenylylthymidilic acid). Fluorescence and proton nuclear magnetic resonance studies of cationic thiazole amides related to bleomycin A₂. *Biochemistry* **21**, 805-816.

SAKORE T.D., REDDY B.S., SOBELL H.M. (1979) Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution. IV. Structure of an amino-acridine-dinucleoside monophosphate crystalline complex, 9-aminoacridine-5-iodocytidylyl(3',5')guanosine. *J. Mol. Biol.* **135**, 763-785.

SAUCIER J.M., FESTY B., LE PECQ J.B. (1971) The change of the torsion of the DNA helix caused by intercalation. II. Measurement of the relative change of torsion induced by various intercalating drugs. *Biochimie* **53**, 973-980.

SCATCHARD G. (1949) The attractions of proteins for small molecule and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660-663.

SCHLEIF R. (1988) DNA binding by proteins. *Science* **241**, 1182-1187.

SCHMID M., KLETT C., NEIDERHOFER A. (1980) Demonstration of a heritable fragile site in human chromosome 16 with distamycin A. *Cytogenet. Cell Genet.* **28**, 87-94.

SCHMIDT U., GRIESSER H. (1986) Total synthesis and structure determination of patellamide B. *Tetrahedron Lett.* **27**, 163-166.

SEARLE M.S., HALL J.G., DENNY W.A., WAKELIN L.P.G. (1988) NMR studies of the interactions of the antibiotic nogalamycin with the hexadeoxyribonucleotide duplex d(5'-GCATGC)₂. *Biochemistry* **27**, 4340-4349.

SHOEMAKER D.D., CYSYK R.L., PADMANABHAN S., BHAT H.B., MALSPEIS L. (1982) Identification of the principal biliary metabolite of 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide in rats. *Drug Metabolism and Disposition* **10**, 35-39.

SICCARDI A.G., LANZA E., NIELSON E., GALLIZZI A., MAZZA G. (1975) Genetic and physiological studies on the site of action of distamycin A. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **8**, 370-376.

STILL W.C., KHAN M., MITRA A. (1978) Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* **43**, 2923-2925.

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. *J. Antibiotics* **32**, 756-758.

TAKEDA Y., OHLENDORF D. H., ANDERSON W. F., MATTHEWS B. W. (1983) DNA-binding proteins. *Science* **221**, 1020-1026.

TAKUSAGAWA F., DABROW M., NEIDLE S., BERMAN H.M. (1982) The structure of a pseudo intercalated complex between actinomycin and the DNA binding sequence d(GpC). *Nature* **296**, 466-469.

TAYLOR J.S., SCHULTZ P.G., DERVAN P.B. (1984) DNA affinity cleaving. Sequence specific cleavage of DNA by distamycin-EDTA.Fe(II) and EDTA-distamycin.Fe(II). *Tetrahedron* **40**, 457-465.

TRAVERS A.A. (1989) DNA conformation and protein binding. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 427-452.

TSAI C., JAIN S.C., SOBELL H.M. (1977) Visualization of drug-nucleic acid interaction at atomic resolution. I. Structure of an ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complex, ethidium: 5-iodouridylyl(3'-5')adenosine. *J. Mol. Biol.* **114**, 301-315.

TURCHIN K.F., GROKHOVSKY S.L., ZHUZE A.L., GOTTIKH B.P. (1977) DNA base pair specific ligands. II. Studies of distamycin A chromophore stereochemistry by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. *Bioorgan. Khim.* **4**, 1065-1077(Chem. Abstr.(1978) **89**, 179107c).

UGHETTO G., WANG A.H.J., QUIGLEY G.J., VAN DER MAREL G.A., VAN BOOM J.H., RICH A. (1985) A comparison of the structure of echinomycin and triostin A complexed to a DNA fragment. *Nucl. Acids Res.* **13**, 2305-2323.

UMEZAWA H. (1971) Natural and artificial bleomycins: chemistry and antitumor activities. *Pure Appl. Chem.* **28**, 665-677.

UMEZAWA H. (1979) Advances in bleomycin studies. In " *Bleomycin, chemical, biochemical and biological aspects* " (S.M. HECHT ed.) pp.24-36 Springer-Verlag, New York .

VAN DYKE M.W., HERTZBERG R.P., DERVAN P.B. (1982) Map of distamycin, netropsin, and actinomycin binding sites on heterogeneous DNA: DNA cleavage-inhibition patterns with methidiumpropyl-EDTA·Fe(II). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5470-5474.

VAN DYKE M.W., DERVAN P.B. (1983) Methidiumpropyl-EDTA·Fe(II) and DNAase I footprinting report different small molecule binding site sizes on DNA. *Nucl. Acids Res.* **11**, 5555-5567.

VISWAMITRA M.A., KENNARD O., CRUSE W.B.T., EGERT E., SHELDRIK G.M., JONES P.G., WARING M.J., WAKELIN L.P.G., OLSEN R.K. (1981) Structure of TANDEM and its implication for bifunctional intercalation into DNA. *Nature* **289**, 817-819.

WADE W.S., DERVAN P.B. (1987) Alteration of the sequence specificity of distamycin on DNA by replacement of an N-methylpyrrole carboxamide with pyridine-2-carboxamide. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 1574-1575.

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

WAKELIN L.P.G. (1986) Polyfunctional DNA intercalating agents. *Med. Res. Rev.* **6**, 275-340.

WAKELIN L.P.G., CHETCUTI P., DENNY W.A. (1990) Kinetic and equilibrium binding studies of amsacrine-4-carboxamides: a class of asymmetrical DNA-intercalating agents which bind by threading through the DNA helix. *J. Med. Chem.* **33**, 2039-2044.

WANG J.C. (1974) The degree of unwinding of the DNA helix by ethidium. I. Titration of twisted PM2 DNA molecules in alkaline cesium chloride density gradients. *J. Mol. Biol.* **89**, 783-801.

WANG A.H.J., UGHETTO G., QUIGLEY G.J., HAKOSHIMA T., VAN DER MAREL G.A., VAN BOOM J.H., RICH A. (1984) The molecular structure of a DNA-Triostin A complex. *Science* **225**, 1115-1121.

WANG A.H.J., UGHETTO G., QUIGLEY G.J., RICH A. (1987) Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2-Å resolution. *Biochemistry* **26**, 1152-1163.

WARING M.J. (1970) Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs: evidence for molecular models involving intercalation. *J. Mol. Biol.* **3**, 18-30.

WARING M.J. (1976) DNA-binding characteristics of acridinylmethanesulphonamide drugs: comparison with antitumor properties. *Eur. J. Cancer* **12**, 995-1001.

WARING M.J. (1986) Recognition of DNA by quinoxaline antibiotics. In "Molecular mechanisms of carcinogenic and antitumor activity" (C. CHAGAS and B. PULLMAN eds) pp.317-337, Adenine Press, New York.

WARING M.J. (1990) The molecular basis of specific recognition between echinomycin and DNA. In "*Molecular basis of specificity in nucleic acid-drug interactions*" (B. PULLMAN and J. JORTNER eds) pp.225-245, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

WARTELL R.M., LARSON J.E., WELLS R.D. (1974) Netropsin : a specific probe for A-T regions of duplex deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **249**, 6719-6731.

WARTELL R.M., LARSON J.E., WELLS R.D. (1975) The compatibility of netropsin and actinomycin binding to natural deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **250**, 2698-2702.

WATANABE K. (1956) Sinanomycin produced by *Streptomyces*. *J. Antibiotics Ser. A* **9**, 102-107.

WILLIAMS L.D., EGLI M., GAO Q., BASH P., VAN DER MAREL G.A., VAN BOOM J.H., RICH A., FREDERICK C.A. (1990) Structure of nogalamycin bound to a DNA hexamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2225-2229.

WILSON W.D., JONES R.L. (1981) Intercalating drugs: DNA binding and molecular pharmacology. *Adv. Pharmacol. Chemother.* **18**, 177-221.

WILSON W.D., TANIOUS F.A., WATSON R.A., BARTON H.J., STREKOWSKA A., HARDEN D.B., STREKOWSKI L. (1989) Interaction of unfused tricyclic aromatic cations with DNA: a new class of intercalators. *Biochemistry* **28**, 1984-1992.

WIRTH M., BUCKHARDT O., KOCH T., NIELSEN P.E., NORDEN B. (1988) Interactions between DNA and mono-, bis, tris, tetrakis and hexakis(aminoacridines). A linear and circular dichroism, electric orientation relaxation viscosimetry equilibrium study. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 932-939.

WONG A., HUANG C.H., CROOKE S.T. (1984a) Deoxyribonucleic acid breaks produced by 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide and copper. *Biochemistry* **23**, 2939-2945.

WONG A., HUANG C.H., CROOKE S.T. (1984b) Mechanism of deoxyribonucleic acid breakage induced by 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide and copper: role for cuprous ion and oxygen free radicals. *Biochemistry* **23**, 2946-2952.

WOYNAROWSKI J.M., McHUGH M., SIGMUND R.D., BEERMAN T.A. (1988) Modulation of topoisomerase II catalytic activity by DNA minor groove binding agents distamycin, Hoechst 33258, and 4',6-diamidine-2-phenylindole. *Mol. Pharmacol.* **35**, 177-182.

WRIGHT R.G. McR., WAKELIN L.P.G., FIELDS A., ACHESON R.M. (1980) Effects of ring substituents and linker chains on bifunctional intercalation of diacridines into deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **19**, 5825-5836.

YALE H.L., PIALA J.J. (1966) Substituted 5-triazoles and related compounds. *J. Med. Chem.* **9**, 42-46.

ZAKRZEWSKA K., PULLMAN B. (1983) A theoretical evaluation of the effect of netropsin binding on the reactivity of DNA towards alkylating agents. *Nucl. Acids Res.* **11**, 8841-8845.

ZAKRZEWSKA K., RANDRIANARIVELO M., PULLMAN B. (1988) Drug recognition of DNA. Proposal for GC minor groove specific ligands : vinylexins. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **6**, 331-344.

ZIMMER C., LUCK G. (1970) Optical rotatory dispersion properties of nucleic acid complexes with the oligopeptides antibiotics distamycin A and netropsin. *FEBS Lett.* **10**, 339-342.

ZIMMER C., LUCK G., THRUM H. (1970) Changes in the DNA secondary structure by interaction with oligopeptide antibiotics : thermal melting, ORD and CD of DNA complexes with netropsin and distamycin A derivatives. *Studia Biophys.* **24-25**, 311-317.

ZIMMER C., REINERT K.E., LUCK G., WAHNERT U., LOBER G., THRUM H. (1971) Interaction of the oligopeptide antibiotics netropsin and distamycin A with nucleic acids. *J. Mol. Biol.* **58**, 329-348.

ZIMMER C., LUCK G., THRUM H., PITRA C. (1972) Binding of analogues of the antibiotics distamycin A and netropsin to native DNA. Effect of chromophore systems and basic residues of the oligopeptides on thermal stability, conformation and template activity of the DNA complexes. *Eur. J. Biochem.* **26**, 81-89.

ZIMMER C. (1975) Effects of the antibiotics netropsin and distamycin A on the structure and function of nucleic acids. *Prog. Nucleic Acid Res. Molec. Biol.* **15**, 285-318.

ZIMMER C., WAHNERT U. (1986) Non intercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in Biophysical, Biochemical and Biological investigations of the genetic material. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **47**, 31-112.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

CHAPITRE I : LE CONCEPT LIGAND DU PETIT SILLON

I.1. LES ANTIBIOTIQUES DE TYPE PYRROLE-AMIDINE: NETROPSINE ET DISTAMYCINE

page 4

I.1.1. Structure et propriétés physiques

I.1.2. Interactions avec les acides nucléiques et les polynucléotides
synthétiques

I.1.3. Spécificité de séquence et mode d'interaction

I.1.4. Constantes d'association et aspects thermodynamiques

I.1.5. Géométrie et dynamique

I.1.6. Activité biologique

I.2. LES ANALOGUES STRICTS DE LA NETROPSINE

page 12

I.2.1. Augmentation du nombre de résidus pyrrole-carboxamide

I.2.2. Augmentation du degré de liberté entre les noyaux pyrrole

I.2.3. Modification des substituants à l'azote du noyau pyrrole

I.2.4. Modification de l'hétérocycle

I.2.5. Modification des chaînes latérales et conservation des noyaux pyrrole

I.2.6. Modification simultanée des hétérocycles et des chaînes latérales

I.3. LES ANALOGUES THIAZOLIQUES DE LA NETROPSINE

page 17

I.3.1. Thia-Nt

page 18

I.3.2. Methia-Nt et Isothia-Nt

page 53

I.3.3. Pseudo-Nt

page 70



CHAPITRE II : LE CONCEPT LIGAND DU PETIT SILLON-INTERCALANT

II.1. GENERALITES

page 77

II.1.1. Molécules intercalantes

II.1.2. Hybrides ligands du petit sillon-intercalants de synthèse

II.1.3. Dérivés acridiniques de la nétropsine et de la distamycine

II.1.4. Hybrides nétropsine-bithiazole

II.1.4.1. La bléomycine

II.1.4.2. Hybrides bithiazoliques de la nétropsine

II.1.4.3. Analogues synthétiques de la partie bithiazolique

II.2. HYBRIDES Thia-Nt-INTERCALANTS

page 89

II.2.1. Hybride phényltriazolothiazolylthiazole de Thia-Nt

page 89

II.2.1.1. Synthèse de PETTthia-Nt

II.2.1.2. Interaction PETTthia-Nt/ADN

II.2.2. Dérivés acridiniques de Thia-Nt

page 94

II.2.2.1. Synthèse de Thia-NtGA et de SL-Thia-NtGA

II.2.2.2. Interaction Thia-NtGA/ADN

II.2.2.3. Etude du composé SL-Thia-NtGA en RPE

II.2.2.4. Activité biologique de Thia-NtGA

II.2.2.5. Synthèse de Thia-NtAMSA

II.2.2.6. Interaction Thia-NtAMSA/ADN

II.2.2.7. Activité biologique de Thia-NtAMSA

CONCLUSION

page 121

PARTIE EXPERIMENTALE

page 122

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

page 138