

50376  
1992,  
230

50376  
1992  
230

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

Année 1992

N° d'ordre : 985

THESE de DOCTORAT D'UNIVERSITE

(nouveau régime)

présentée à l'Université de Lille I

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR en CHIMIE**

par

**Fabrice BAILLY**

**LE MOTIF DE RECONNAISSANCE SPECIFIQUE DE L'ADN,  
SPKK ET SON UTILISATION POUR L'ELABORATION  
D'HYBRIDES PEPTIDE-INTERCALANT**



présentée le 29 Septembre 1992 devant la commission d'examen

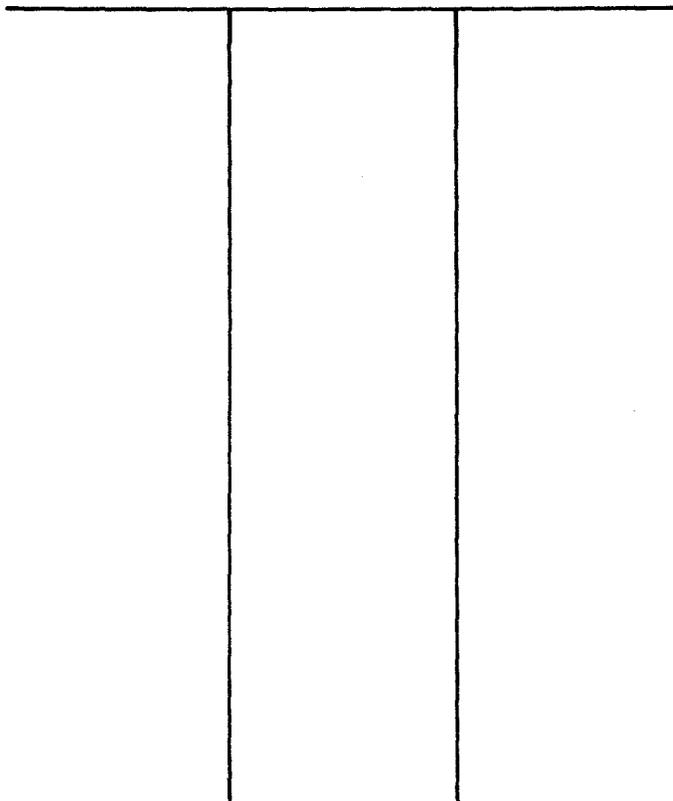
JURY

Président : Pr. Jean-Pierre CATTEAU  
Rapporteurs : Pr. Pierre FORMSTECHE  
Pr. Sylviane GIORGI-RENAULT  
Membres : Dr. Jean-Pierre HENICHART  
Dr. Jean-Luc BERNIER



50376  
1992  
230

A RETOURNER LE



076 100007

50376  
1992  
230

65 104

50376  
1992  
230

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

Année 1992

N° d'ordre : 985

THESE de DOCTORAT D'UNIVERSITE

(nouveau régime)

présentée à l'Université de Lille I

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR en CHIMIE**

par

**Fabrice BAILLY**

**LE MOTIF DE RECONNAISSANCE SPECIFIQUE DE L'ADN,  
SPKK ET SON UTILISATION POUR L'ELABORATION  
D'HYBRIDES PEPTIDE-INTERCALANT**



présentée le 29 Septembre 1992 devant la commission d'examen

JURY

Président : Pr. Jean-Pierre CATTEAU

Rapporteurs : Pr. Pierre FORMSTECHER

Pr. Sylviane GIORGI-RENAULT

Membres : Dr. Jean-Pierre HENICHART

Dr. Jean-Luc BERNIER

Ce travail a été effectué sous la direction scientifique de Monsieur Jean-Pierre HENICHART, Directeur de Recherches à l'INSERM. Vous m'avez initié avec passion à la Chimie Organique Biologique et au Drug Design. Je tiens à vous exprimer de tout coeur mes remerciements pour cette étude que vous m'avez confiée et pour votre soutien amical.

Monsieur Jean-Pierre CATTEAU, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, me fait l'honneur de présider ce jury. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma gratitude.

Monsieur Pierre FORMSTECHE, Professeur à la Faculté de Médecine de Lille et Madame Sylviane GIORGI-RENAULT, Professeur à l'Université de Picardie ont bien voulu juger ce travail et en être les rapporteurs. Je les en remercie très sincèrement.

Monsieur Jean-Luc BERNIER, Directeur de Recherches à l'INSERM, me fait l'honneur de siéger à ce jury. Je suis très touché par sa présence et le remercie pour sa disponibilité permanente et les conseils qu'ils m'a prodigués.

Je ne saurais trop faire part de ma gratitude toute particulière à Christian BAILLY. Qu'il me soit permis de t'adresser mes respectueux remerciements pour l'attention constante, la patience et la disponibilité totale dont tu as fait preuve à mon égard tout au long de ce travail.

Je remercie également Nicole HELBECQUE, Philippe et Nicole COTELLE, Raymond HOUSSIN, Jean-François GOOSSENS et Nicole POMMERY qui m'ont fait part de leur amicale contribution et de leur précieuse expérience.

Enfin, un grand merci à Marie-Jeanne FREYMONT et à Françoise ROUSSEZ pour l'excellente dactylographie de cette thèse.

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

# TABLE DES MATIERES

## INTRODUCTION

## CHAPITRE I : LE CONCEPT LIGAND DU PETIT SILLON

### I - NETROPSINE ET DISTAMYCINE. MODELES DE REFERENCE

1) Structures chimique et tridimensionnelle.....	5
2) Interaction avec l'ADN.....	6
2-1) Modalités d'interaction.....	6
2-2) Spécificité de liaison .....	8
3) Activité biologique.....	10
4) Autres structures de ligands AT spécifiques du petit sillon .....	11

### II - LE MOTIF SPKK, ANALOGUE PEPTIDIQUE DE LA NETROPSINE

1) Le peptide SPKK, motif de reconnaissance AT-spécifique de l'ADN.....	13
2) Interaction du motif SPKK avec l'ADN .....	15
2-1) Modalités d'interaction.....	15
2-2) Analogie SPKKSPKK / Nt.....	15
3) Rôles physiologiques potentiels du motif SPKK et de ses variantes .....	19
3-1) Le motif SPKK et la condensation chromatinienne .....	19
3-2) Le motif SPKK, régulateur de la transcription.....	21
3-3) La phosphorylation étape-clé de l'activation physiologique du motif SPKK ? .....	24

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

### I - GENERALITES

1) Modèles naturels .....	27
2) Design de modèles hybrides "ligands du petit sillon-intercalants".....	29
3) Dérivés acridiniques de la nétropsine et de la distamycine .....	30
3-1) Hybrides NetGA de première génération.....	30
3-2) Hybrides NetAMSA de seconde génération.....	32

### II- HYBRIDES (SPKK)<sub>N</sub>-INTERCALANTS

1) Le modèle (SPKK) <sub>n</sub> GA.....	33
1-1) Structure et synthèse .....	33
1-2) Interaction avec l'ADN.....	36
1-2-1) Mise en évidence de l'interaction (SPKK) <sub>n</sub> GA/ polynucléotides .....	36
1-2-2) Mode d'interaction avec l'ADN et aspects conformationnels.....	42
1-2-3) Sélectivité de liaison.....	55
1-3) Interaction avec la chromatine.....	67
1-4) Activité biologique .....	71
1-4-1) Pénétration cellulaire.....	71
1-4-2) Tests <i>in vitro</i> .....	76
Conclusion.....	80
2) Le modèle (SPKK) <sub>n</sub> AMSA	
2-1) Elaboration du modèle .....	81
2-2) Synthèse.....	83

2-3) Interaction avec l'ADN .....	85
2-3-1) Affinité et sélectivité de liaison .....	85
2-3-2) Mode d'interaction avec l'ADN .....	92
2-4) Interaction avec la chromatine.....	97
2-5) Oxydation et activité biologique .....	99
2-5-1) Mesure de l'oxydation en présence de cuivre.....	100
2-5-2) Mise en évidence de la production de radicaux libres par chimioluminescence...	104
2-5-3) Coupure d'ADN .....	107
2-5-4) Etude <i>in vitro</i> du pouvoir cytotoxique.....	107
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>111</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>114</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>142</b>
<b>PUBLICATIONS</b> .....	<b>160</b>

## ABREVIATIONS

ADN :	acide désoxyribonucléique
Dst :	distamycine A
Nt :	nétropsine
Ser :	sérine
Pro :	proline
Lys :	lysine
SPKK :	seryl-prolyl-lysyl-lysine
AA :	9-aminoacridine
GA :	4-(acridinyl-9-amino)-N-glycylaniline
NetGA :	4-(acridinyl-9-amino)-N[4-(4-amino-1-méthyl-pyrrole-2-carboxamido)-pyrrole-1-méthyl-2-carbonyl]glycylaniline
AMSA :	amsacrine ou 3-méthoxy-4-(acridinyl-9-amino)-N-méthanesulfonilide
AMSAC <sub>3</sub> :	3-méthoxy-4-[4-(3-aminopropylaminocarbonyl)acridinyl-9-Amino]-N-méthanesulfonilide
NetAMSA :	3-méthoxy-4-[4-[[4-(4-aminobutylamino)-1-méthyl-pyrrole-2-carboxamido)-pyrrole-1-méthyl-2-carbonyl]aminopropylaminocarbonyl]acridinyl-9-amino]-N-méthanesulfonilide
FAB :	Fast Atom Bombardment
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE :	Résonance Paramagnétique Electronique

# INTRODUCTION

Le cancer est une altération de la cellule résultant d'une dérégulation des mécanismes de contrôle de la prolifération et de la différenciation. Les nombreuses formes de cancers répondent ainsi à une caractéristique commune: la croissance incontrôlée de cellules anormales (dites tumorales ou malignes). Celles-ci peuvent non seulement se diviser et proliférer rapidement de façon locorégionale, mais également, et ceci est plus grave, se propager dans l'organisme entier par voies sanguine et lymphatique pour former à distance de nombreuses colonies (phénomène métastatique).

Cette affection demeure en France la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires. Des rémissions totales sont obtenues dans un cas sur deux grâce à une approche pluridisciplinaire du traitement combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. A ces trois thérapies classiques s'ajoute l'immunothérapie qui a fait ces dernières années des progrès spectaculaires, notamment parce que le génie génétique fournit désormais des outils d'intervention nombreux et fiables. Néanmoins il ne faut pas oublier que les techniques classiques de traitement qui ont fait leurs preuves n'ont cessé de progresser pas à pas bien que le public ne s'en soit pas toujours rendu compte. Ainsi la radiothérapie est en pleine expansion: la révolution de l'imagerie médicale liée à celle perpétuelle de l'informatique, l'arrivée des machines de "haute énergie" (utilisatrices de neutrons et de protons) et la connaissance de plus en plus pointue des tumeurs malignes la rendent plus précise et capable d'offrir un traitement local au locorégional "sur mesure" (adapté non seulement au type de cancer mais aussi à la tumeur précise présentée par le patient). La chirurgie est à présent beaucoup plus délicate et tend à conserver au maximum l'organe atteint ; elle s'applique aussi, lorsque l'amputation est inévitable, à reconstruire, à réparer les dégâts. Enfin la chimiothérapie dispose d'un arsenal thérapeutique fort d'une cinquantaine de médicaments, ce qui permet au médecin de constituer des combinaisons plus efficaces. Les progrès réalisés en 20 ans sont nombreux et notables: le taux de guérison de certains cancers a spectaculairement augmenté (aujourd'hui 90% pour la maladie de Hodgkin, 80% pour les ostéosarcomes) et de nombreux cancers (du côlon, des bronches, les tumeurs des seins métastasées...) qui semblaient à l'origine insensibles aux traitements médicamenteux sont désormais curables. La chimiothérapie administrée avant la radiothérapie ou la chirurgie (chimiothérapie adjuvante ou de première intention) permet de réduire considérablement le volume de la tumeur et a révolutionné le traitement des cancers du sein; elle peut également être utilisée de façon postopératoire pour supprimer les redoutables métastases résiduelles (avantage indéniable de la chimiothérapie qui représente la seule thérapie possible des tumeurs

déjà métastasées). Le développement de l'arsenal thérapeutique et les meilleures conditions de vie des patients (mise au point notamment de médicaments antiémétiques) font que les médicaments antitumoraux sont aujourd'hui plus largement utilisés qu'il y a 20 ans. Et de nouvelles molécules prometteuses dont le taxotère et la vinorelbine font leur apparition sur le marché.

Actuellement le chercheur dispose d'informations de plus en plus nombreuses et précises pour concevoir de nouvelles substances antitumorales. D'une part, la connaissance du mode d'action des agents chimiques utilisés en cancérologie clinique révèle que la plupart de ces médicaments se lient de façon affine à l'ADN. D'autre part, les progrès les plus récents en matière de biologie moléculaire ont permis de montrer clairement l'origine génétique du cancer. Il s'agit d'une pathologie de l'ADN impliquant des séquences oligonucléotidiques: les oncogènes et les antioncogènes. Ainsi une prolifération cellulaire anarchique peut résulter d'une activation de protooncogènes en oncogènes par 3 processus majeurs (la translocation, l'amplification ou la mutation génétique) ainsi que de la perte de gènes appelés antioncogènes situés dans des positions chromosomales bien déterminées (Bishop, 1987; Rey *et al.*, 1990). Il est donc évident que l'ADN constitue la cible privilégiée parmi d'autres de toute intervention thérapeutique à visée antitumorale.

Le design de modèles susceptibles de se lier à l'ADN avec une forte affinité et une haute spécificité permettrait de réprimer ces oncogènes (en agissant dans le meilleur cas à la source même du phénomène de cancérisation à savoir, dans la mesure du possible, dès la première mutation génétique) et aussi d'intervenir sur la pharmacologie de la régulation génétique en induisant des liaisons spécifiques sur des séquences clés régulatrices. Par ailleurs une telle démarche conduirait sur le plan théorique à l'obtention d'une toxicité sélective qui est indispensable à l'efficacité de la chimiothérapie antitumorale quand on constate l'importance actuelle de ses effets secondaires.

Les modèles de ligands séquence-spécifiques de l'ADN se répartissent en trois classes.

(i) Les protéines responsables de la régulation de l'expression génétique (facteurs de transcription, promoteurs, répresseurs...) se lient de manière hautement spécifique à des séquences de l'ADN par le biais essentiellement de quatre motifs structuraux distincts (hélice-tour-hélice, doigts de zinc (deux types) et leucine zipper); leurs interactions ont lieu au niveau du grand sillon de la double hélice où les paires de

bases exposent un grand nombre de groupes donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène, éléments majeurs de reconnaissance entre les protéines et l'ADN (Berg et Von Hippel, 1988; Frederick *et al.*, 1984; Takeda *et al.*, 1983),

(ii) Le ciblage de séquences déterminées d'ADN par des oligonucléotides de séquence complémentaire via la formation de triples hélices, bien qu'étant attrayant d'un point de vue théorique, se heurte à des difficultés encore non résolues à l'heure actuelle telles que la faible pénétration cellulaire, la sensibilité aux nucléases et le degré de spécificité peu élevé (les séquences reconnues ne peuvent être que du type homopurique ou homopyrimidinique) (François *et al.*, 1988; Lyamichev *et al.*, 1988; Pilch *et al.*, 1991),

(iii) Enfin un certain nombre d'antibiotiques, d'antitumoraux et d'antiviraux interfèrent avec la réplication et la transcription en se liant également à des séquences nucléiques spécifiques. Il s'agit :

- des agents alkylants, dont l'antramycine et la néocarzinostatine représentent les membres les plus performants pour la reconnaissance spécifique (Hertzberg *et al.*, 1986; Dasgupta et Goldberg, 1986; Lee et Goldberg, 1989),

- des agents intercalants (amsacrine, ellipticine, daunomycine ...) qui présentent, pour la grande majorité d'entre eux, une spécificité plus ou moins marquée pour les résidus Guanine et Cytosine (Fox et Waring, 1987; Schwaller *et al.*, 1989; Bailly *et al.*, 1990c; Bailly *et al.*, 1992a),

- des ligands du petit sillon, nétropsine et distamycine sont les composés de référence de cette famille; ce sont des entités pseudopeptidiques qui, de par la courbure particulière de leur structure, reconnaissent de manière hautement spécifique le petit sillon des séquences riches en résidus Adénine et Thymines de l'ADN, notamment par l'établissement de contacts de Van der Waals et de liaisons hydrogène avec les bases ainsi que de liaisons salines avec les phosphates (Zimmer et Wähnert, 1986; Kopka *et al.*, 1985).

Le concept de modèles hybrides du type "ligand spécifique du petit sillon de l'ADN-intercalant" a été développé ces dernières années (Bailly et Hénichart, 1991). Celui-ci consiste à lier chimiquement entre elles deux entités: une fraction susceptible de s'intercaler entre les paires de bases de l'ADN et une autre capable de se lier de manière hautement spécifique dans le petit sillon. On peut ainsi espérer obtenir des composés performants du point de vue de la liaison de l'ADN (affinité et spécificité de reconnaissance) voire de l'activité antitumorale. Il est à noter que l'addition d'un

chromophore intercalant tel que l'acridine est un principe déjà utilisé pour renforcer l'affinité pour l'ADN d'un oligonucléotide (Sun *et al.*, 1989) ou d'agents antitumoraux comme les dérivés du platine et les moutardes à l'azote (Bowler *et al.*, 1989; Gourdie *et al.*, 1990; Palmer *et al.*, 1990).

Dans le cadre de cette étude, les choix de la partie ligand du petit sillon et de la fraction intercalante se sont portés respectivement sur le motif peptidique SPKK (Ser-Pro-Lys-Lys) et l'amsacrine (sous sa forme propre et sous une forme chimique dérivée simplifiée anilinoamino-9 acridine). Le peptide SPKK a été utilisé pour sa sélectivité de reconnaissance et son analogie conformationnelle avec la nétrropsine. L'amsacrine, quant à elle, a été choisie pour son activité antitumorale reconnue dans le traitement de certaines leucémies (Zittoun, 1985; Cassileth et Gale, 1986) et pour le rôle potentiel de l'acridine dans la vectorisation nucléaire des molécules hybrides. Ce dernier point est indispensable et déterminera la réalité de l'effet sélectif recherché: si de telles molécules sont susceptibles de reconnaître une séquence oligonucléotidique donnée, encore faut-il qu'elles puissent atteindre leur(s) cible(s) potentielle(s) nucléaire(s).

Les modèles hybrides conçus ont été étudiés tant du point de vue de leur interaction avec l'ADN par des techniques physicochimiques et biochimiques variées que de leur activité biologique *in vitro*. De plus, pour se rapprocher autant que possible des conditions rencontrées *in vivo*, le processus de fixation à la chromatine a de même été appréhendé. Toutes les données recueillies pour ces ligands ont par ailleurs été comparées à celles disponibles de leurs homologues pseudopeptidiques en série nétrropsine précédemment élaborés au laboratoire.



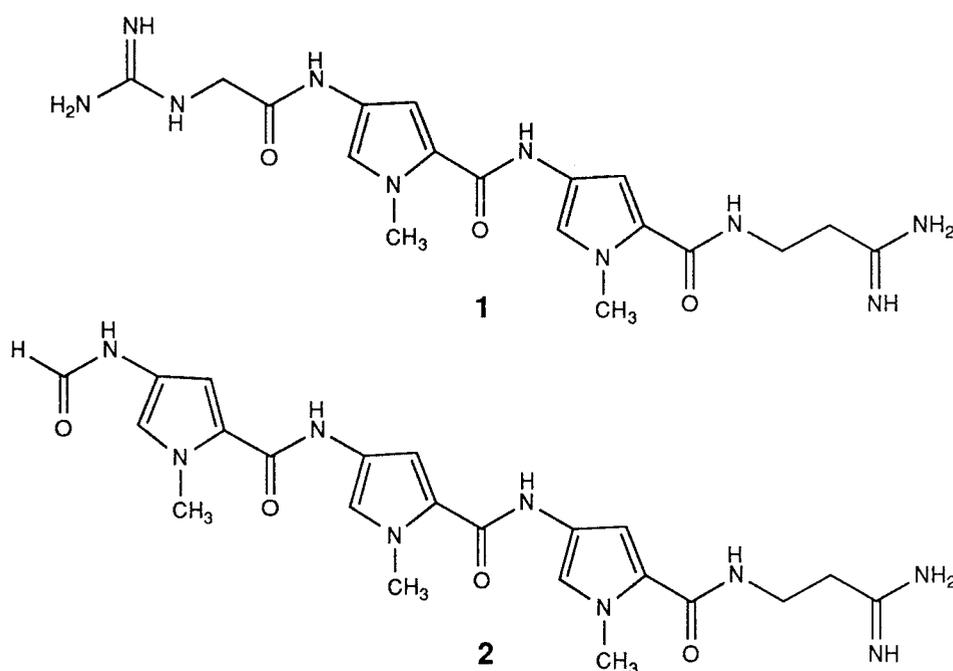
## **CHAPITRE I :**

# **LE CONCEPT LIGAND DU PETIT SILLON**

## I - NETROPSINE ET DISTAMYCINE, MODELES DE REFERENCE

### 1) STRUCTURES CHIMIQUE ET TRIDIMENSIONNELLE

La nétropsine (Nt) et la distamycine-A (Dst) (**Figure 1**) sont les chefs de file de la famille des antibiotiques de type pyrrole-amidine. La nétropsine a été isolée à partir d'une culture de *Streptomyces netropsis* (Finlay *et al.*, 1951) tandis que la distamycine A est le produit essentiel de fermentation de *Streptomyces distallicus* (Arcamone *et al.*, 1964).



**Figure 1:** Structures de la nétropsine (1) et de la distamycine-A (2).

Ces molécules sont constituées par des hétérocycles N-méthylpyrrole plans reliés par des liaisons pseudopeptidiques qui réduisent les degrés de liberté rotationnelle.

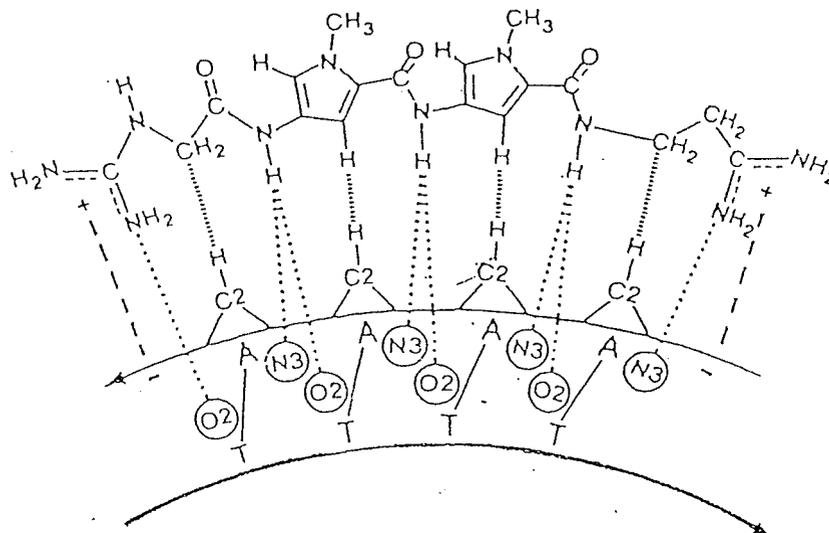
Des études de RMN-<sup>1</sup>H et de diffraction de RX ont fourni des données précises sur la stéréochimie de Nt et Dst. Ainsi l'enchaînement N-méthylpyrrolocarboxamide possède une conformation trans pour les liaisons conjuguées C(3)=C(2)-C=O alors que l'ensemble CO-NH-C(4)=C(5) adopte une conformation cisoïde (Turchin *et al.*, 1977). L'ensemble "bis-pyrrolocarboxamide" n'est pas plan, les deux noyaux pyrrole

formant un angle dièdre de  $20^\circ$  (Berman *et al.*, 1979). Globalement Nt et Dst présentent une courbure particulière de leur squelette oligopeptidique (**Figures 2 et 3**). Celle-ci résulte de la répulsion stérique entre le groupement méthyle des pyrroles et les carbonyles des liaisons pseudopeptidiques adjacentes et s'est révélée indispensable à la fixation de la molécule sur l'ADN (Manning et Woody, 1986).

## 2) INTERACTION AVEC L'ADN

### 2-1) Modalités d'interaction

La géométrie propre des pseudopeptides Nt et Dst s'adapte parfaitement bien à celle du petit sillon de l'ADN double brin en conformation B. La très faible fixation sur le conformère A s'accompagne d'une réversion de la forme A vers B (Luck et Zimmer, 1973 ; Michenkova et Zimmer, 1980 ; Zimmer *et al.*, 1982). La fixation de Nt (ou Dst) à un ADN-B a de plus toujours lieu au niveau du **petit sillon** et de façon préférentielle sur des **séquences riches en résidus AT** (Feigon *et al.*, 1984; Zimmer *et al.*, 1972; Luck *et al.*, 1974). L'utilisation d'oligonucléotides de synthèse ou de restriction a notamment permis de déterminer de façon très précise les modalités d'interaction sur le plan moléculaire et le rôle exact joué par les différents groupements chimiques (Patel, 1982; Klevit *et al.*, 1986; Kopka *et al.*, 1985a,b) (**Figure 2**).



**Figure 2:** Représentation des liaisons impliquées dans la reconnaissance moléculaire de Nt vis-à-vis de la séquence 3'-AAAA-5': (.....) liaisons hydrogène, (- - -) liaisons ioniques, (—) contacts de Van der Waals.

---> Intervention de **liaisons électrostatiques**: des interactions ioniques se créent entre un résidu phosphate de l'ADN et un groupement amidine ou guanidine de Nt (ou Dst). Mais la nétropsinine c'est-à-dire le fragment bispyrrolique de Nt dépourvu des chaînes latérales cationiques est également capable de se lier à l'ADN avec toutefois une affinité moindre (Zimmer *et al.*, 1972). Les chaînes latérales ne sont donc pas indispensables à la fixation mais permettent de consolider celle-ci.

---> Intervention de **liaisons hydrogène**: les liaisons hydrogène sont d'une grande importance pour la stabilisation des complexes Nt-ADN et Dst-ADN (Luck *et al.*, 1974; Zasedatelev *et al.*, 1978). Elles s'établissent entre les atomes d'azote des liaisons pseudopeptidiques et des fonctions cationiques de l'antibiotique et les hétéroatomes des bases (l'azote N<sub>3</sub> de l'adénine ou l'oxygène O<sub>2</sub> de la thymine). Outre leur rôle de stabilisation énergétique, elles permettraient dans une certaine mesure le bon positionnement de Nt et Dst vis-à-vis du petit sillon (Kopka *et al.*, 1985a,b; Coll *et al.*, 1987). Il est intéressant de remarquer à ce sujet que Nt et Dst se fixent aux séquences riches en résidus AT en mimant le réseau de molécules d'eau du petit sillon: les NH amidiques, en pontant les bases adjacentes par des liens H à trois centres, jouent ainsi le rôle des molécules d'eau de la première couche d'hydratation tandis que le squelette pyrrolique, en connectant ces fonctions amide, simule le rôle de la seconde couche d'hydratation (Kopka *et al.*, 1983; Marky *et al.*, 1983). Ce réseau est important pour la stabilisation de la double hélice d'ADN en conformation B, particulièrement au niveau des séquences riches en AT (Subramanian *et al.*, 1988).

---> Intervention de **contacts de Van der Waals**: ces contacts s'engagent par l'intermédiaire des protons hétérocycliques ou des résidus méthylène terminaux de l'antibiotique et les protons hétérocycliques des bases (le C<sub>2</sub>H de l'adénine).

Du point de vue géométrique, l'interaction Nt-ADN provoque un changement de conformation des deux espèces (Martin *et al.*, 1978; Reinert et Thrum, 1970). Il y a adaptation de la conformation de l'une pour l'autre. Après la liaison, la courbure intrinsèque de Nt est accentuée: l'angle formé par les deux noyaux pyrroles passe de 20° à 33°. Nt ne provoque ni élongation, ni détorsion de l'ADN, mais force l'ouverture du petit sillon et impose une courbure de l'axe de l'hélice de 8° dans la région de fixation (Kopka *et al.*, 1985a,b). Ces résultats proviennent d'analyses par RX du complexe Nt-d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> et ne tiennent pas compte de l'aspect dynamique de l'interaction. Des études en solution ont révélé que Nt ne provoque pas de

modifications conformationnelles importantes au niveau de la zone de fixation centrale AATT mais induit des altérations de la conformation des bases adjacentes (Patel, 1981; Patel *et al.*, 1983).

Du point de vue stoechiométrique, Nt et Dst couvrent respectivement quatre et cinq paires de bases soit une paire de bases de plus qu'il n'y a de liaisons pseudopeptidiques dans l'antibiotique. Par ailleurs certaines expériences prouvent qu'une stoechiométrie ligand/ADN de 2/1 est possible, deux molécules étant susceptibles d'interagir au niveau d'un même site en se plaçant de façon "tête-bêche" (Pelton et Wemmer, 1989; Fagan et Wemmer, 1992; Dwyer *et al.*, 1992).

## 2-2) Spécificité de liaison

### 2-2-1) Bases moléculaires de la spécificité AT

Quatre facteurs favorisent la fixation de Nt et Dst au niveau des séquences AT:

- la taille du petit sillon de ces séquences (3,2 à 4 Å) beaucoup plus petite que celle des séquences riches en GC (4,6 à 7 Å) (Fratini *et al.*, 1982); or "l'épaisseur" des cycles pyrrole de Nt et Dst (diamètre des surfaces de Van der Waals) est de 3,4 Å (Pelton et Wemmer, 1989), ce qui permet leur meilleure adaptation au petit sillon des séquences riches en AT.

- les potentiels électrostatiques y sont fortement négatifs (Pullman et Pullman, 1981; Lavery et Pullman, 1985), ce qui favorise l'établissement de liaisons électrostatiques. Leur rôle dans la spécificité de liaison de Nt et Dst a d'ailleurs été parfaitement établi (Kissinger *et al.*, 1987; Lown, 1988).

- la présence dans le petit sillon des séquences riches en GC de groupements amino-2 exocycliques de guanines encombrants stériquement qui empêcherait une insertion correcte des cycles pyrrole (Kopka *et al.*, 1985a; Coll *et al.*, 1989). Ce fait avancé pour justifier la spécificité AT prononcée de la plupart des ligands du petit sillon a été néanmoins remis en question récemment (Dasgupta *et al.*, 1990).

- la disposition des donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène le long des parois du petit sillon (Grygon et Spiro, 1989) qui permet un premier bon positionnement de Nt et Dst vis-à-vis de celui-ci.

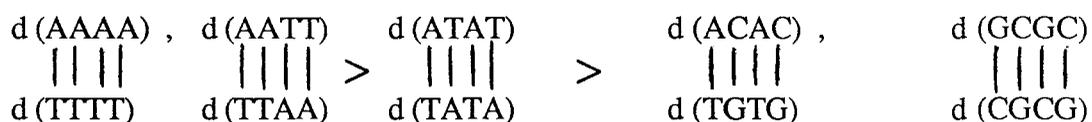
Si tous ces facteurs favorisent la fixation de Nt et Dst au niveau des séquences riches en AT, ce sont avant tout les contacts de Van der Waals qui sont considérés comme les éléments gouvernant leur spécificité de liaison (Lee *et al.*, 1988a,b).

La spécificité AT n'est pas absolue, une fixation sur les régions GC peut être observée à forte concentration. D'une manière générale, plus la portion dAdT est longue, plus la fixation est intense. L'affinité maximale est obtenue avec un polymère poly(dA).poly (dT) (Tableau I).

**Tableau I**

Ligand	ADN	Ka (M <sup>-1</sup> )	Références
Nt	Thymus de veau	2,9 x 10 <sup>5</sup>	Luck <i>et al.</i> , 1974
	poly(dA).poly (dT)	4,9 x 10 <sup>5</sup>	Wartell <i>et al.</i> , 1974
	poly(dA-dT).poly(dA-dT)	4,0 x 10 <sup>5</sup>	Wartell <i>et al.</i> , 1974
Dst	Thymus de veau	1,2 x 10 <sup>6</sup>	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). La sélectivité peut être schématisée de la manière suivante:



### *2-2-2) Vers le design de nouveaux ligands séquence-spécifiques*

Les modalités d'interaction de Nt et Dst responsables de leur haute reconnaissance spécifique de l'ADN ont constitué des bases solides pour la conception de nouvelles molécules séquence-spécifiques. Parmi les nombreux travaux effectués, nous ne citerons que les plus significatifs.

Une certaine spécificité GC a été recherchée en modifiant les structures de Nt et Dst. A ce propos on peut citer les travaux remarquables de l'équipe de Lown qui ont mené à l'élaboration de "lexitropsines" ou "sequence reading oligopeptides". Ces

molécules différent du modèle naturel Nt par le remplacement d'un ou deux pyrroles par des imidazoles (susceptibles par leur doublet libre d'établir des liaisons hydrogène avec le groupement NH<sub>2</sub> d'une guanine) (Lown, 1988; Lown *et al.*, 1986; Herfeld *et al.*, 1992), par la suppression du guanidinium N-terminal (Kissinger *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1988a) ou par la suppression d'un méthylène à proximité de l'amidinium C-terminal (Lee *et al.*, 1988b). Les trois classes de lexitropsines ont révélé une spécificité de liaison altérée comparativement à celle de Nt. Une évolution vers la reconnaissance de sites GC a été observée; néanmoins leur liaison a lieu en de très nombreux sites de séquences variables sans mettre en évidence aucun site de fixation largement préférentiel. Ainsi l'approche "lexitropsine" s'avère limitée. A ce jour aucun ligand analogue de Nt ou Dst purement GC sélectif n'a pu être obtenu. Par ailleurs les modifications apportées aux cycles pyrrole de Nt ont parfois conduit à des composés présentant un mode de liaison différent. Par exemple la substitution des pyrroles par des thiazoles a conduit dans certains cas à des composés intercalants (Plouvier, 1991). C'est en partie pourquoi nous avons conçu des composés hybrides du type "ligands du petit sillon-intercalants" encore appelés "combilexines" par analogie avec les "lexitropsines" (Bailly et Hénichart, 1991) (cf Chapitre II).

De même des analogues du modèle Nt ont été synthétisés pour augmenter la taille des sites de fixation. Le nombre de motifs N-méthylpyrrolocarboxamide (le plus petit élément de reconnaissance AT spécifique) a été augmenté; il a ainsi été montré qu'un nombre de six motifs est la limite supérieure à ne pas dépasser pour conserver une structure adaptée à la géométrie du petit sillon (Youngquist et Dervan, 1985a). De ce fait il s'est avéré nécessaire de garder la structure de Nt (ou Dst) intacte et de coupler plusieurs motifs Nt (ou Dst) par des bras espaceurs (ou "linkers") adéquats. Ainsi un linker hydrocarboné en C8 favorise la liaison simultanée de deux motifs Nt adjacents et l'acide fumarique (sous forme de diamide) celle de deux motifs Dst (Youngquist et Dervan, 1985b).

### 3) ACTIVITE BIOLOGIQUE

De par leur très haute intensité de liaison à l'ADN, Nt et Dst exercent leurs effets *in vivo* en interférant avec les fonctions de régulation de l'ADN et le mécanisme de synthèse endocellulaire de l'ADN (Hahn, 1977; Kuroyedov *et al.*, 1977; Bruzik *et al.*, 1987; Zimmer, 1975; Baguley, 1982). Nt et Dst ont un spectre d'activité large: propriétés antivirales (Fournel *et al.*, 1965), antibactériennes (Haupt et Thrum, 1971),

antimitotiques et antitumorales (Dimarco *et al.*, 1964). Cependant la toxicité de ces deux substances n'a jamais permis leur utilisation clinique; Dst induit notamment des altérations chromosomiques (Schmid *et al.*, 1980; Ochi *et al.*, 1988).

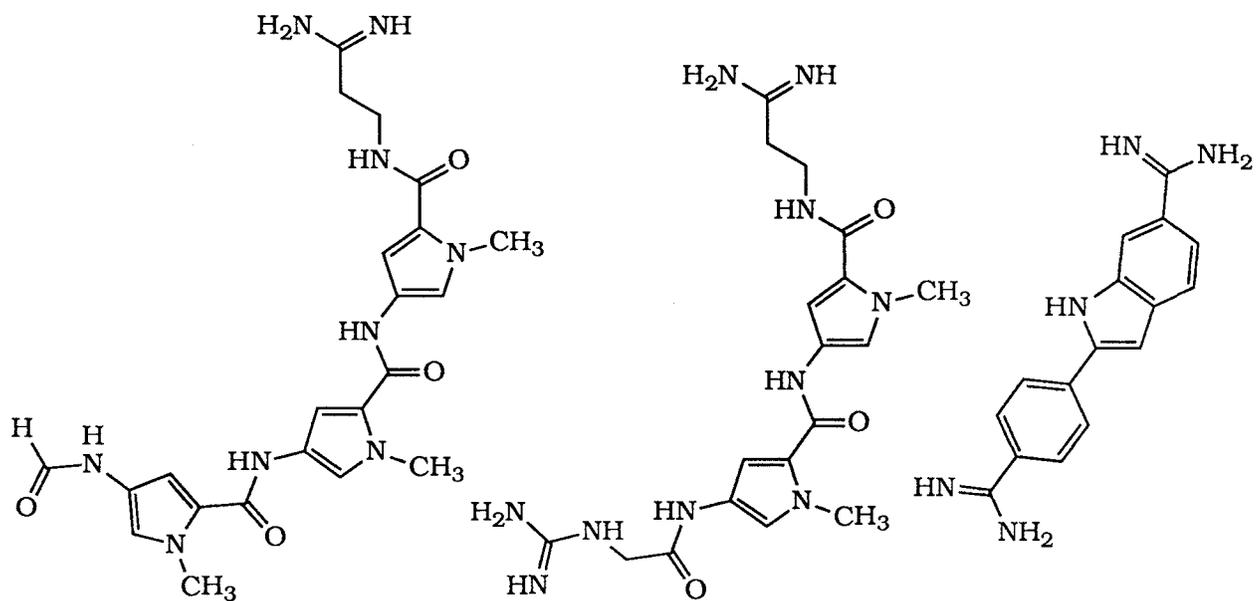
Par ailleurs il est indispensable de rappeler que Nt et Dst sont des ligands spécifiques du petit sillon de l'ADN alors que les protéines impliquées dans la régulation génétique se fixent et reconnaissent leur site de liaison au niveau du grand sillon (Takeda *et al.*, 1983; Ollis et White, 1987). La perturbation de certaines fonctions génomiques par Nt et Dst ne peut donc résulter d'une compétition directe avec les sites de fixation des facteurs protéiques régulateurs mis en jeu mais plutôt de modifications conformationnelles de l'ADN induites par leur liaison (Neidle *et al.*, 1987). Ainsi il a été montré que la fixation de Dst peut empêcher celle d'un facteur de transcription dans le grand sillon (Dorn *et al.*, 1992).

#### 4) AUTRES STRUCTURES DE LIGANDS AT SPECIFIQUES DU PETIT SILLON

Une pharmacomodulation importante a été réalisée à partir de Nt et Dst, ce qui a permis de définir des règles à respecter pour la conception de molécules capables de se loger dans le petit sillon de manière sélective. Les principaux paramètres intervenants sont :

- la nécessité d'un système polyaromatique
- l'importance des chaînes latérales cationiques
- l'importance de la courbure de la molécule
- les possibilités d'établissement de liaisons ioniques, hydrogène et Van der Waals.

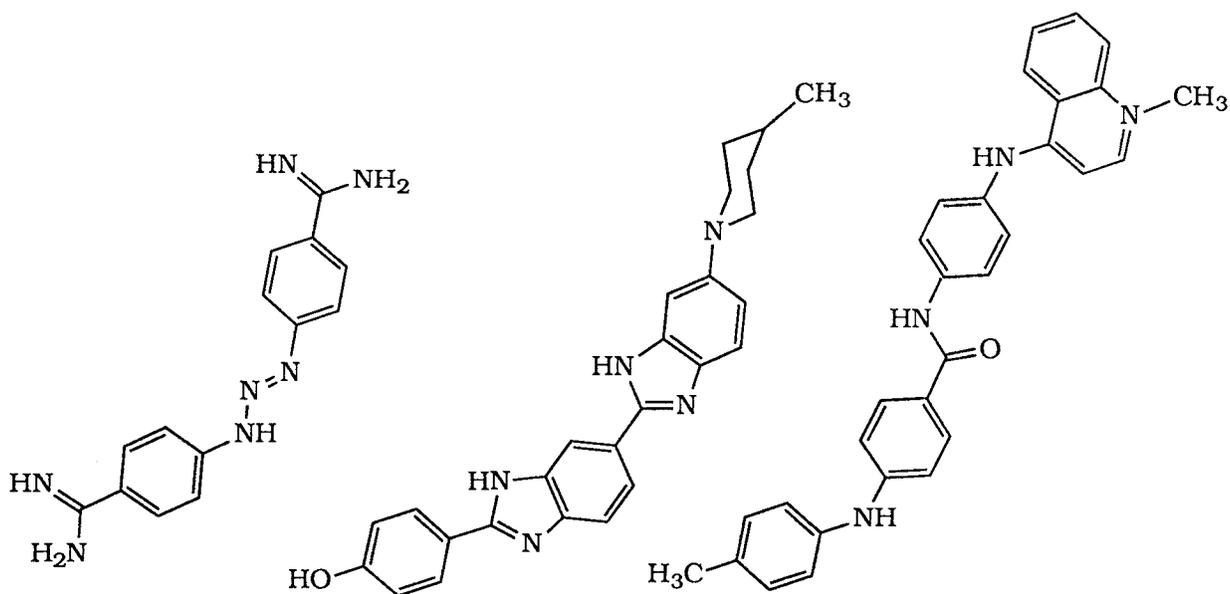
Un certain nombre de composés présente ces caractéristiques et, par là même, révèle une spécificité de reconnaissance des séquences riches en AT. Il s'agit du colorant Hoechst 33258 (Harshman et Dervan, 1985; Portugal et Waring, 1988), du composé DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) (Wilson *et al.*, 1990; Portugal et Waring, 1988), du berenil (Portugal et Waring, 1987; Laughton *et al.*, 1990), de la pentamidine (Fox *et al.*, 1990) et du composé SN6999 (Chen *et al.*, 1992) (**Figure 3**).



Distamycine

Nétropsine

DAPI



Berenil

Hoechst 33258

SN6999

**Figure 3:** Modèles de ligands AT spécifiques du petit sillon de l'ADN.

## II - LE MOTIF SPKK, ANALOGUE PEPTIDIQUE DE LA NETROPSINE

### 1) LE PEPTIDE SPKK, MOTIF DE RECONNAISSANCE AT-SPECIFIQUE DE L'ADN

Si les protéines régulatrices de l'expression génétique atteignent un haut degré de spécificité notamment par une reconnaissance du **grand sillon** de l'ADN, elles n'en excluent pas pour autant des interactions au niveau du **petit sillon**. A ce titre on peut citer les cas de la protéine Hin recombinase (Sluka *et al.*, 1990), de la protéine IHF (Yang et Nash, 1989; Friedman, 1988; Bonnefoy et Rouvière-Yaniv, 1991; Craig et Nash, 1984), de la DNase I (Suck *et al.*, 1988) et du répresseur du phage 434 (Aggarwal *et al.*, 1988) pour lesquels une interaction au niveau du petit sillon de l'ADN a été clairement mise en évidence (par footprint et diffraction de RX). De plus cette interaction a lieu au niveau de séquences riches en résidus AT de l'ADN et fait intervenir des motifs peptidiques où les acides aminés glycine (Gly, G), proline (Pro, P), lysine (Lys, K) et arginine (Arg, R) sont prépondérants (**Tableau II**).

De tels motifs peptidiques basiques ont de même été identifiés comme étant responsables de la liaison AT-préférentielle d'un certain nombre d'autres protéines comme les histones H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub>B (Suzuki, 1989a; Churchill et Suzuki, 1989; Erard *et al.*, 1990; Mannermaa et Oikarinen, 1991), les protéines non-histone HMG I (Lund *et al.*, 1987; Solomon *et al.*, 1986; Reeves et Nissen, 1990), la datine (protéine isolée de *S. Cerevisiae*; Winter et Varsharsky, 1989), la protéine D<sub>1</sub> de drosophile (Ashley *et al.*, 1989) et la nucléoline (Erard *et al.*, 1990; Kharrat *et al.*, 1991), ce qui a permis d'inclure dans les acides aminés hautement conservés de ces motifs la sérine (Ser, S), la thréonine (Thr, T) ainsi que l'alanine (Ala, A) (**Tableau II**).

Plus particulièrement, dans le cas des histones H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub>B du sperme d'oursin de mer, M.Suzuki a proposé un motif consensus térapeptidique Ser-Pro-Lys(Arg)-Lys(Arg) [SPK(R)K(R)] en comparant les séquences des extrémités de plusieurs variantes d'histones (Suzuki, 1989a).

Tableau II

Protéine	Motif de reconnaissance	Liaison à l'ADN	Références
Hin-recombinase	GRPR	Petit sillon séquence 5'-AAA-3'	Sluka <i>et al.</i> , 1990
Répresseur du phage 434	KRPP	Petit sillon séquence 5'-AAA-3'	Aggarwal <i>et al.</i> , 1988
IHF	Séquence basique	Petit sillon séquence 5'-TPy AA... PuTTGAT-3'	Craig et Nash, 1984
HMG I	TPKRPRGRPCK	Petit sillon séquence riche en AT $\geq$ 6 paires de bases	Lund <i>et al.</i> , 1987 Reeves et Nissen, 1990
Datine	GRKPG ou GRKPGSGR	Séquence riche en AT $\geq$ 8 paires de bases	Winter et Varshavsky, 1989
Drosophila D <sub>1</sub>	(KKR)GRP(KK)	Séquence riche en AT	Ashley <i>et al.</i> , 1989
Nucléoline	ATPAKKAA	Séquence riche en AT	Erard <i>et al.</i> , 1990 Kharrat <i>et al.</i> , 1991
Histone H <sub>1</sub>	KS(T)PKKAKKP	Séquence riche en AT	Erard <i>et al.</i> , 1990 Kharrat <i>et al.</i> , 1991
Sperme d'oursin de mer Histones H <sub>1</sub> et H <sub>2</sub> B	S(T)PK(R)K(R)	Séquence riche en AT	Suzuki, 1989a Churchill et Suzuki, 1989

## 2) INTERACTION DU MOTIF SPKK AVEC L'ADN

### 2-1) Modalités d'interaction

L'interaction du motif SPKK au niveau du **petit sillon** de l'ADN a été démontrée par une compétition réalisée entre un fragment comprenant six motifs appelé S<sub>6</sub> (fragment protéolytique de l'extrémité N-terminale de l'histone H<sub>1</sub> du sperme d'oursin de mer) et le colorant Hoechst 33258 (cf Chapitre I- I-4-) (Suzuki, 1989a). D'autres résultats sont en faveur d'une telle reconnaissance à savoir les "shifts" en RMN<sup>1</sup>H des protons 1' de désoxyriboses situés dans le petit sillon (shifts observés lors de l'interaction entre l'oligonucléotide CGCCATGCG et le peptide synthétique SPRKSPRK ou S<sub>2</sub>) ainsi que la protection d'adénines contre la méthylation par ce même peptide S<sub>2</sub> (Suzuki, 1989a).

Comme le motif SPKK est un bon compétiteur de Hoechst 33258, ligand AT-spécifique du petit sillon tout comme la nétoprsine, on peut en déduire qu'il possède une **reconnaissance préférentielle des résidus AT** comparable. Ceci a été prouvé expérimentalement par une expérience de footprint utilisant les radicaux hydroxyle. Ainsi les peptides S<sub>2</sub> et S<sub>6</sub> se lient à des sites riches en résidus AT identiques à ceux reconnus par Hoechst 33258. Néanmoins il faut souligner que ces sites ne représentent qu'une partie de l'ensemble des séquences protégées par Hoechst 33258; de plus les footprints induits par les peptides sur ces sites sont beaucoup moins marqués que ceux de Hoechst 33258 et d'autres sites non spécifiques sont observés sur l'ensemble du fragment d'ADN étudié (Churchill et Suzuki, 1989). Il est donc clair que la spécificité de reconnaissance par le motif SPKK des séquences riches en AT est moindre que celle de Hoechst 33258; une **sélectivité AT** (plutôt qu'une spécificité) caractérise ce peptide.

### 2-2) Analogie SPKKSPKK / Nt

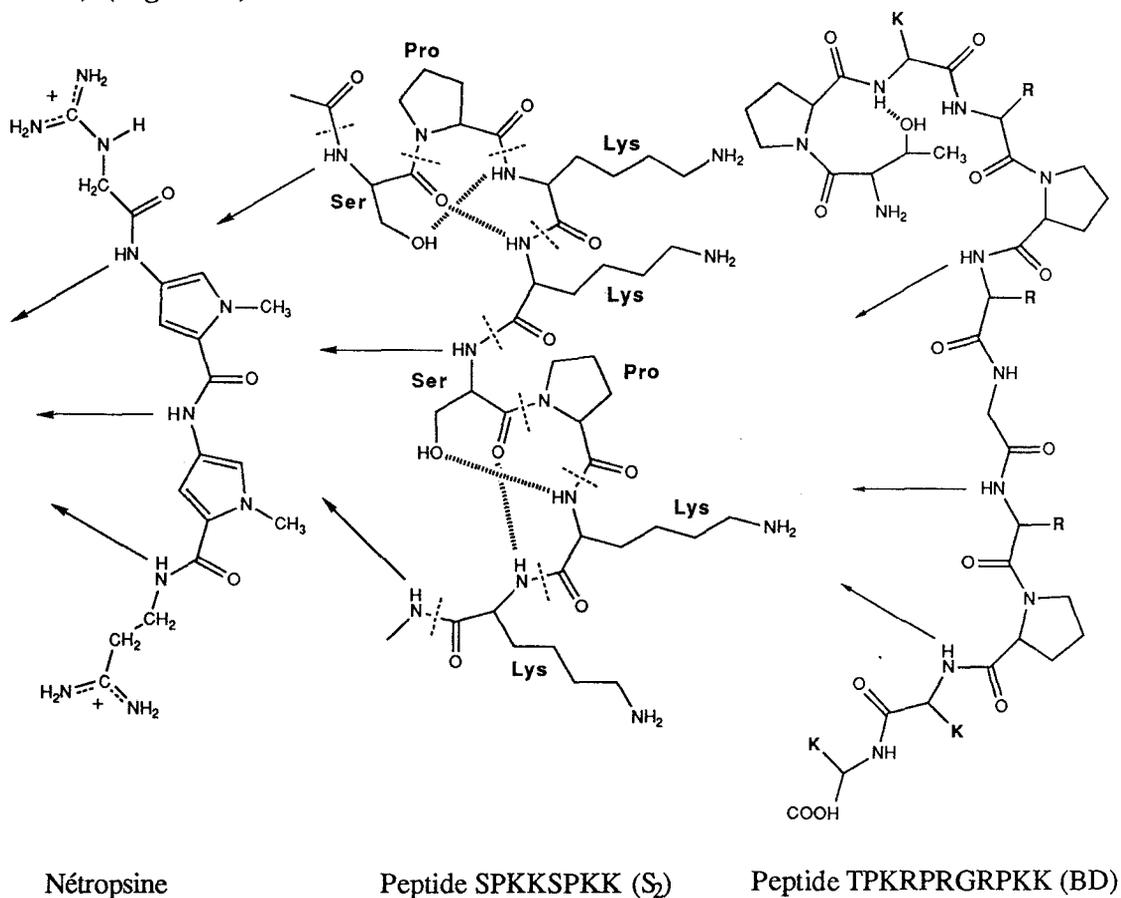
#### *2-2-1) Proposition d'une structure ordonnée pour le motif SPKK*

Une similitude conformationnelle pourrait expliquer les sites de liaison comparables présentés par le motif SPKK et le composé Hoechst 33258.

Dans ce contexte, sur la base de considérations statistiques, M.Suzuki a proposé une structure ordonnée pour le motif SPKK (Suzuki, 1989a). Celui-ci

adopterait une conformation en  $\beta$  turn traditionnelle (présence d'une liaison hydrogène entre le  $-\text{CO}$  de  $\text{Ser}_1$  et le  $-\text{NH}$  amidique de  $\text{Lys}_4$ ) stabilisée par un lien H supplémentaire entre le groupement  $-\text{OH}$  de la chaîne latérale de  $\text{Ser}_1$  et le  $-\text{NH}$  amidique de  $\text{Lys}_3$ . Ce type de lien H entre une chaîne latérale d'acide aminé et un NH peptidique avait déjà été rencontré (Rees *et al.*, 1983; Alber *et al.*, 1987) et peut être responsable à lui seul de la formation d'une structure caractéristique dite en Asx turn.

La conformation du térapeptide résulterait donc d'une combinaison mixte du type  $\beta$  turn / Asx turn encore appelée  $\beta\sigma$  turn (Suzuki, 1991). Selon ce modèle, une succession de tels motifs (au moins deux) adopterait ainsi une conformation en arc comparable à celle de la nétropsine et pourrait placer les  $-\text{NH}$  amidiques des sérines de façon optimale par rapport aux sites accepteurs de liens H du petit sillon (une superposition des  $-\text{NH}$  amidiques de la nétropsine et de ceux des sérines de l'octapeptide  $\text{SPRKSPRK}$  étant possible par modélisation moléculaire) (Suzuki, 1989a) (Figure 4).



**Figure 4:** Structures de la nétropsine et des peptides SPKKSPKK et TPKRPRGRPKK. K et R schématisent les chaînes latérales des lysines et arginines.

D'autres modélisations de structures peptidiques proches ont été effectuées. L'undécapeptide consensus des protéines HMG I (TPKRPRGRPCK; encore appelé peptide BD) (Figure 4), les pentapeptides KTPKK et ATPAK présenteraient respectivement une structure en Asx turn (Reeves et Nissen, 1990), en  $\beta$  turn (Kharrat *et al.*, 1991) et en  $\beta$  turn / Asx turn (Kharrat *et al.*, 1991). Par ailleurs les preuves expérimentales sont peu nombreuses. Les spectres de tels peptides en dichroïsme circulaire sont caractéristiques selon Suzuki d'une conformation non ordonnée (c'est-à-dire ni en hélice  $\alpha$ , ni en feuillet  $\beta$ ) (Suzuki, 1989a) alors que ceux-ci n'excluent pas la formation de  $\beta$  turns selon Erard *et al.* (1990). Néanmoins des expériences d'infrarouge à transformée de Fourier (Erard *et al.*, 1990) et de RMN<sup>1</sup>H (Suzuki, 1991) sont en faveur d'une telle conformation. Enfin une étude statistique plus générale de la structure du motif S(T)PXX (X pour acide aminé quelconque), par l'utilisation d'une banque de données, a révélé que le motif S(T)PXX est susceptible d'adopter une structure en  $\beta$  ou Asx turn dans 45% des cas et une structure mixte  $\beta$  turn / Asx turn dans 10 % des cas (Suzuki et Yagi, 1991).

Selon les critères exposés précédemment, il est clair que la présence d'une structure ordonnée dans le motif SPKK revêt toujours un caractère putatif. Il n'est pas exclu que ce peptide n'adopte cette structure qu'au moment de sa fixation à l'ADN; la seule étude réalisée à ce jour d'une interaction entre le motif SPKK et un oligonucléotide (CGCGAATTCGCG) par RMN<sup>1</sup>H à haut champ n'a pas pu confirmer cette hypothèse (Hill *et al.*, 1991).

### 2-2-2) Bases moléculaires de l'interaction SPKK / ADN

Les modalités très précises de l'interaction SPKK / ADN n'ont pas été résolues à ce jour. Néanmoins ce peptide basique présente un certain nombre de similitudes avec le modèle nétrropsine :

(i) une **courbure du squelette** (Figure 4): celle-ci est induite pour Nt et Hoechst 33258 par la présence de cycles aromatiques pyrrole ou benzimidazole et pour les motifs basiques par celle de prolines. De plus, dans ce dernier cas, l'intervention éventuelle de liens H (inducteurs d'une structure en  $\beta$  et/ou Asx turn) est susceptible d'accentuer cette courbure et voire même de gouverner la liaison du peptide. Ainsi il est suggéré pour le peptide BD (domaine de liaison des protéines HMG I) que la structure N-terminale en Asx turn soit responsable d'un premier

ancrage de la molécule sur l'ADN, celle-ci se repositionnant ensuite de manière beaucoup plus affine dans le petit sillon (Reeves et Nissen, 1990).

(ii) la présence de **-NH amidiques (Figure 4)** régulièrement répartis sur la face concave des molécules et disponibles pour l'établissement de liaisons hydrogène avec les paires de bases de l'ADN.

(iii) des **sites cationiques** susceptibles de neutraliser des phosphates de l'ADN. A ce propos il est clair que les motifs basiques possèdent une charge positive nettement supérieure à celles de Nt et Hoechst 33258, de par la présence répétée des chaînes latérales de lysine et/ou arginine (**Figure 4**). Une certaine relation a été observée entre le nombre de résidus basiques et l'affinité des peptides (Reeves et Nissen, 1990; Churchill et Travers, 1991), ce qui laisse penser que la composante électrostatique est l'élément principal de la reconnaissance peptide basique / séquences AT. Selon les modèles élaborés, les chaînes latérales des résidus basiques situées sur la face convexe des peptides sont d'ailleurs en position favorable pour engager des liaisons salines avec les phosphates des deux brins antiparallèles délimitant le petit sillon (Reeves et Nissen, 1990; Churchill et Travers, 1991; Suzuki, 1991).

Cependant il est aussi plausible que ces chaînes latérales (notamment celles des résidus arginine) engagent des liaisons hydrogène directes ou via des molécules d'eau avec le squelette phosphate/sucre et/ou les paires de bases de l'ADN (Aggarwal *et al.*, 1988; Churchill et Travers, 1991; Sluka *et al.*, 1990; Kissinger *et al.*, 1990; Suck *et al.*, 1988).

(iv) la possibilité d'établissement de **contacts de Van der Waals**: pour le modèle nétrropsine, ceux-ci font intervenir les -CH pyrroliques et les méthylènes terminaux tandis que, pour les motifs basiques, les candidats potentiels sont les méthylènes des prolines et ceux des chaînes latérales basiques.

L'ensemble de ces similitudes implique que le motif SPK(R)K(R), tout comme la nétrropsine, se lie de manière sélective dans le petit sillon des séquences riches en AT, en raison de caractéristiques intrinsèques à ces séquences: étroitesse du petit sillon, potentiel électrostatique fortement négatif, distribution des sites accepteurs de liaisons hydrogène (Churchill et Travers, 1991).

Cependant, dans le cas du motif SPKK, la **composante électrostatique** apparaît être un paramètre dominant de la liaison. De plus, les sites du squelette peptidique susceptibles d'intervenir dans l'établissement de contacts de Van der Waals semblent être répartis de manière beaucoup moins régulière dans ces structures que dans le modèle nétopsine (**Figure 4**); ceci pourrait expliquer le degré de spécificité AT moindre observé pour de tels motifs.

### 3) ROLES PHYSIOLOGIQUES POTENTIELS DU MOTIF SPKK ET DE SES VARIANTES

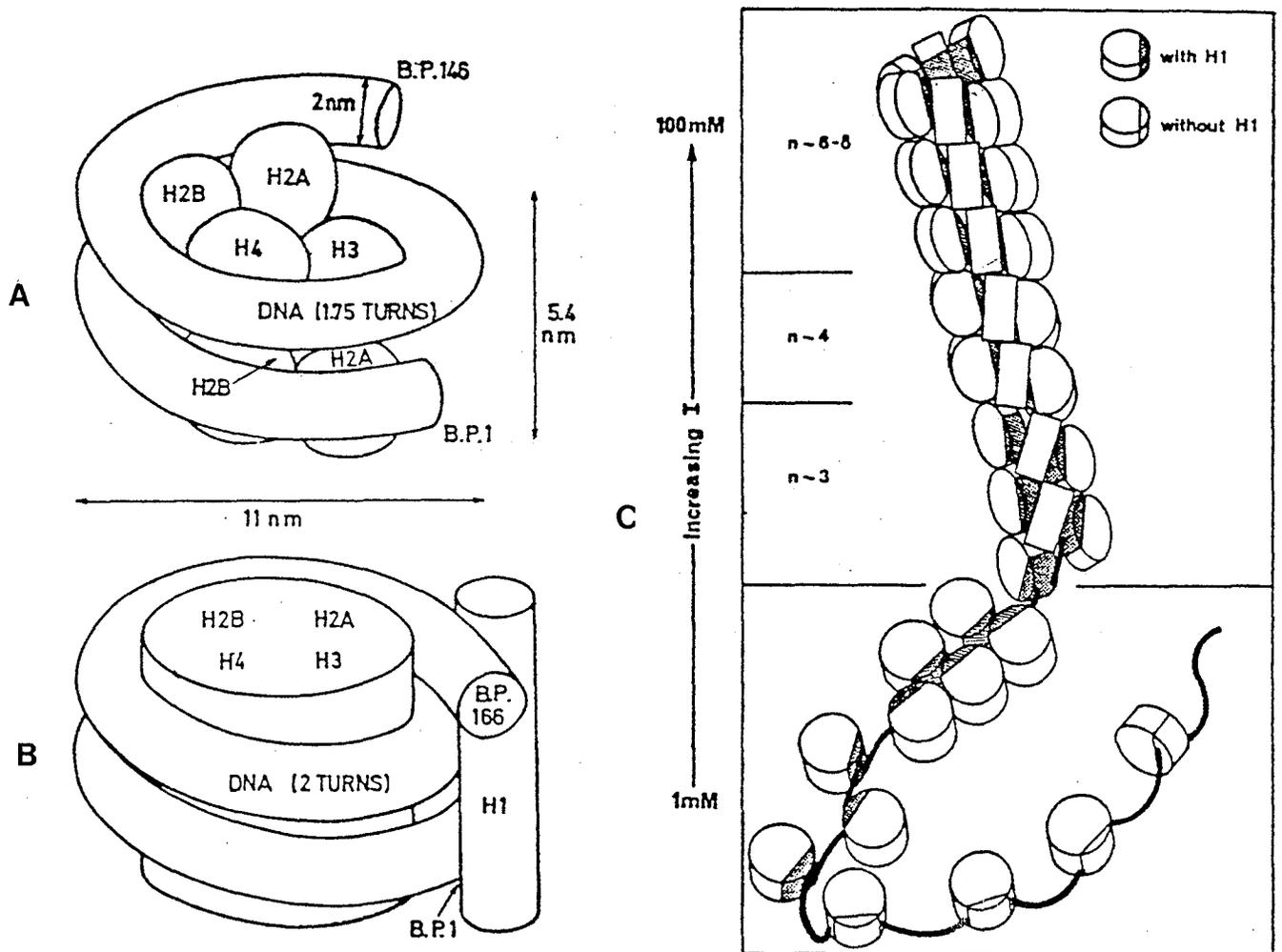
#### 3-1) Le motif SPKK et la condensation chromatinienne

L'histone H<sub>1</sub> est la protéine majeure régulatrice de la compaction chromatinienne (Allan *et al.*, 1980; Staynov *et al.*, 1988; Hansen et Ausio, 1992). Elle assure la stabilité:

(i) de la structure nucléosomale en scellant entre elles les deux extrémités de l'ADN enroulé autour de l'octamère d'histones [(H<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-(H<sub>2</sub>A-H<sub>2</sub>B)<sub>2</sub>] (fibre de 10 nm) (**Figure 5**)

(ii) du superenroulement solénoïdal caractéristique de la fibre de 30 nm en permettant l'établissement de liaisons internucléosomales (**Figure 5**).

Plus particulièrement c'est l'extrémité C-terminale de H<sub>1</sub> contenant de manière répétée le motif S(T)PKKAKKP, qui régule la conformation (et le "folding") de l'ADN internucléosomal (encore appelé ADN linker) et, par conséquent, la condensation de la chromatine (Erard *et al.*, 1990; Kharrat *et al.*, 1991). De ce fait, toute autre protéine susceptible d'entrer en compétition avec l'histone H<sub>1</sub> vis-à-vis de séquences de l'ADN linker possèdera des propriétés analogues. C'est le cas de la nucléoline, protéine nucléolaire pouvant inhiber ou potentialiser l'activité condensatrice de H<sub>1</sub> (Erard *et al.*, 1988; Kharrat *et al.*, 1991) et des protéines non-histone HMG I (Czupryn *et al.*, 1985; Lund *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 1989); or ces deux protéines ont des domaines de liaison à l'ADN parfaitement reconnus (cf II-1); **Tableau II** qui sont les peptides ATPAKKAA et TPKRPRGRPCK pour la nucléoline et HMG I respectivement.



**Figure 5:** A) coeur nucléosomal, B) chromatosome (contenant en plus par rapport au coeur nucléosomal 20 paires de nucléotides ainsi que l'histone H<sub>1</sub>), C) évolution de la condensation de la chromatine en fonction de la force ionique I du milieu; n représente le nombre de nucléosomes par tour.

Il résulte donc de ces considérations que les protéines régulatrices de la condensation chromatinienne assurent leur fonction par la reconnaissance sélective de séquences riches en AT de l'ADN linker à l'aide de motifs basiques incluant des térapeptides S(T)PK(R)K(R). Par ailleurs ces séquences AT pourraient être des fragments d'ADN appelés SAR (pour "Scaffold Associated Regions"); ceux-ci, en liant à la fois l'histone H<sub>1</sub> et le "Scaffold" (équivalent nucléaire du cytosquelette), imposeraient la conformation de longs domaines chromatiniens et formeraient la base des boucles chromatiniennes des noyaux eucaryotes et des chromosomes métaphasiques (Gasser et Laemmli, 1986; Käs *et al.*, 1989).

### 3-2) Le motif SPKK, régulateur de la transcription

L'histone H<sub>1</sub>, de par sa fonction essentielle dans la formation de structures chromatiniennes d'ordre supérieur, a été impliquée dans la régulation de la transcription. Elle interviendrait en tant que répresseur de larges fragments de chromatine (Zlatanova, 1990; Jackson, 1991). Cependant de nombreuses études récentes suggèrent qu'elle pourrait jouer un rôle répresseur beaucoup plus fin de gènes individuels (Zlatanova, 1990) et dans ce cas la régulation transcriptionnelle serait basée sur une **compétition de liaison à l'ADN linker entre l'histone H<sub>1</sub> et les facteurs de transcription (FT)** (Felsenfeld, 1992). Différents résultats étayent cette hypothèse: des compétitions histone H<sub>1</sub> / facteurs de transcription ont déjà été observées expérimentalement (Rhodes, 1985; Beardsley, 1991) ou sont fortement probables (Oikarinen, 1991; Mannermaa et Oikarinen, 1991); des protéines de structures voisines dont les protéines HMG I possèdent une activité de régulation de la transcription tout comme l'histone H<sub>1</sub> (Reeves et Nissen, 1990).

M.Suzuki a élaboré un modèle de régulation. Il a tout d'abord proposé le térapeptide S(T)PXX (X pour acide aminé quelconque) comme étant un nouveau motif de régulation génétique. Ce motif, présent beaucoup plus fréquemment (trois fois) dans les protéines directement impliquées dans la régulation génétique que dans les autres types, est notamment retrouvé dans les facteurs de transcription à proximité de doigts de zinc ou de motifs hélice-tour-hélice (autres motifs de reconnaissance classiquement admis) (Suzuki, 1989b). Cette similitude séquentielle établie entre les facteurs de transcription (motifs S(T))PXX et les extrémités de l'histone H<sub>1</sub> (motifs S(T)PKK) est à la base du modèle de compétition H<sub>1</sub> / FT de Suzuki. Les étapes-clés en sont les suivantes :

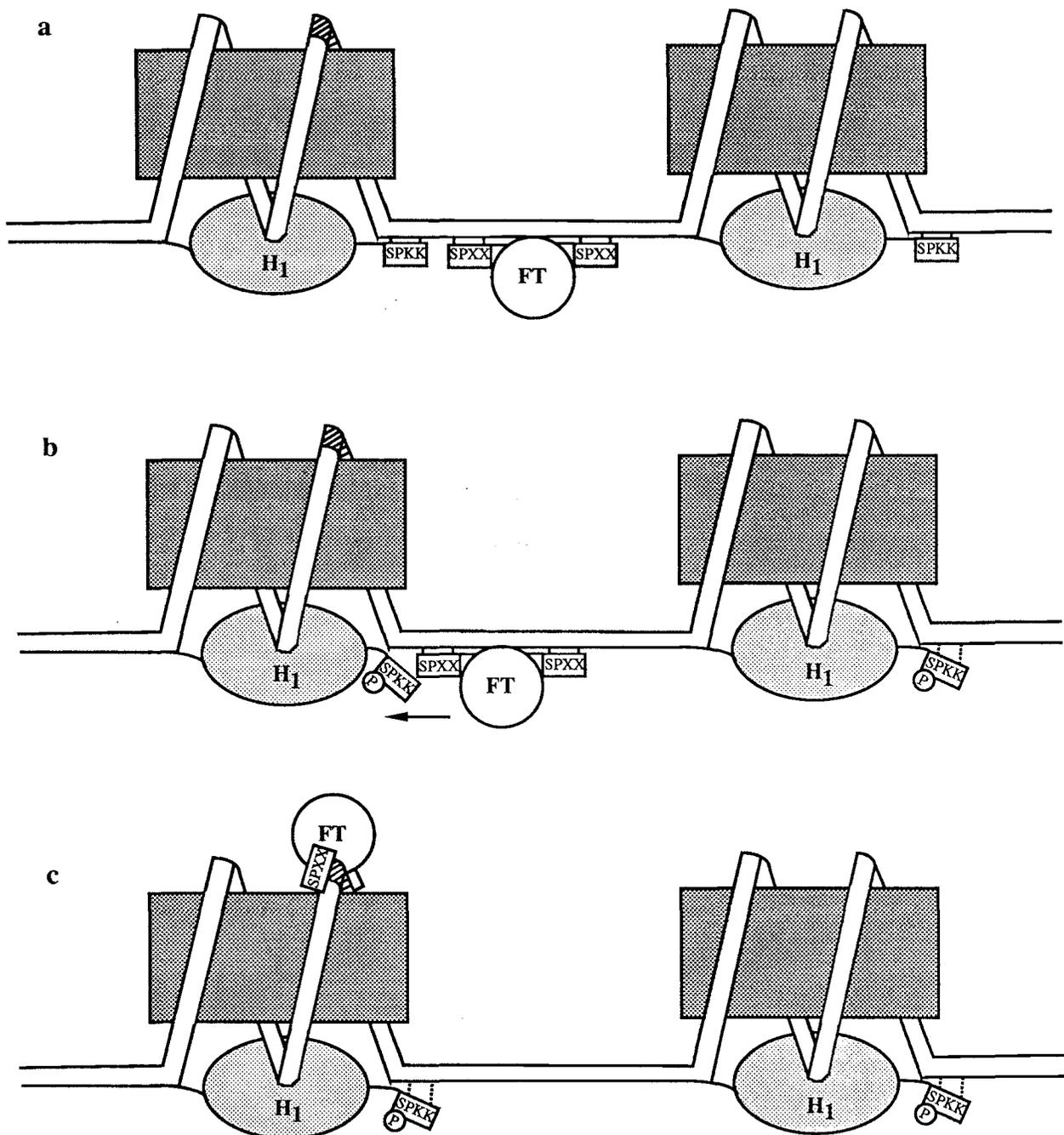
(i) la succession de motifs SPKK de l'histone H<sub>1</sub> possède une constante d'affinité importante pour des séquences riches en AT de l'ADN linker. Néanmoins une phosphorylation de ces motifs pourrait affaiblir notablement leur liaison au linker et écarter de l'ADN le bras C-terminal de H<sub>1</sub> (**Figure 6 a,b**).

(ii) les séquences essentielles riches en AT désormais rendues accessibles par l'écartement de H<sub>1</sub> seraient alors reconnues par les motifs S(T)PXX des FT avec toutefois une affinité moindre (conservation d'une conformation adéquate mais remplacement des résidus basiques par les résidus hydrophiles). Ces motifs pourraient ainsi jouer un rôle de "palpeurs" dans une première étape de liaison non spécifique des FT jusqu'à ce que des structures adjacentes de haute reconnaissance spécifique (doigts de zinc...) soient positionnées correctement vis-à-vis de leurs séquences consensus (**Figure 6c**).

(iii) dès lors, la RNA polymérase peut entrer dans la structure nucléosomale, se fixer sur sa séquence-cible (éventuellement par un déplacement plus ou moins important du FT) et provoquer la synthèse de RNA. Par ailleurs la fixation de la RNA polymérase pourrait dépendre fortement de celle de motifs SPXX. En effet une séquence peptidique SPTSPSY est présente de manière répétitive (26 fois chez la levure et 52 fois chez les mammifères) dans l'extrémité C-terminale de la plus grande sous-unité de la RNA polymérase II. Ces séquences sont primordiales pour le fonctionnement de cette enzyme et leurs rôles dans la fixation de la RNA polymérase II ou l'hybridation DNA-RNA restent à être confirmés (Suzuki, 1990; Suzuki, 1991; Corden, 1990).

Ce modèle ne repose certes que sur une considération statistique. Néanmoins des résultats expérimentaux le rendent fortement probable: d'une part, il a été établi que, dans un certain nombre d'organismes, des séquences riches en AT se situent à proximité d'unités de transcription voire à l'intérieur de régions promotrices de gènes (Moreau *et al.*, 1982; Reeves *et al.*, 1987; Yang-Yen *et al.*, 1988; Eckner et Birnstiel, 1989; Struhl, 1985; Chen *et al.*, 1987); d'autre part, des protéines riches en motifs basiques (notamment les protéines HMG I) possèdent une activité régulatrice de la transcription de tels gènes (Reeves *et al.*, 1987; Yang-Yen *et al.*, 1988; Eckner et Birnstiel, 1989).

Cette fonction régulatrice de la transcription pourrait résulter d'une liaison directe et spécifique des protéines à motif basiques sur des sites promoteurs (Yang-Yen



**Figure 6:** Modèle de régulation de la transcription selon M. Suzuki (1989).

**a:** les motifs SPKK de l'extrémité C-terminale de l'histone H<sub>1</sub> empêchent l'entrée dans le nucléosome des facteurs de transcription (FT) dont les motifs SPXX ont une constante d'affinité plus faible

**b:** la phosphorylation affaiblit la liaison à l'ADN linker des motifs SPKK, laissant la voie libre au FT

**c:** le FT entre dans le nucléosome en glissant le long de la séquence d'ADN au moyen des motifs "palpeurs" SPXX jusqu'à ce que la reconnaissance du site promoteur par des structures doigt de zinc ou hélice-tour-hélice ait lieu.

*et al.*, 1988; Eckner et Birnstiel, 1989; Suzuki, 1991), ce qui paraît peu probable étant donnée la sélectivité de reconnaissance caractéristique de ces motifs. Il semble plus plausible que ces protéines, en se liant sur des séquences riches en AT situées à proximité de promoteurs, induisent des perturbations conformationnelles locales dans l'arrangement nucléosomal qui influencent l'assemblage adjacent des complexes de transcription (Johnson *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1987; Struhl, 1985). Il n'est pas exclu non plus que ces deux mécanismes de régulation aient lieu simultanément. Enfin il faut souligner que l'induction d'une altération conformationnelle de séquences AT est en accord avec la flexibilité intrinsèque marquée de ces séquences (Drew et Travers, 1984).

### 3-3) La phosphorylation : étape-clé de l'activation physiologique du motif SPKK ?

#### 3-3-1) Les motifs S(T)PKK, substrats de protéines kinases

Les données expérimentales montrent clairement que les protéines à motifs basiques sont phosphorylées *in vitro* et *in vivo* de manière préférentielle au niveau de sérines et de thréonines de motifs S(T)PKK (ou de séquences peptidiques voisines).

Protéine	Séquence phosphorylée	Protéine kinase	Références
Histone H <sub>1</sub> (mammifère)	S/T-P-X-K	Growth-associated H <sub>1</sub> histone kinase	Langan <i>et al.</i> , 1989
Histones H <sub>1</sub> et H <sub>2</sub> B (sperme d'oursin de mer)	SPKK	SP kinase	Suzuki <i>et al.</i> , 1990
Protéines HMG I	PTPKR, TPGRK	Growth-associated H <sub>1</sub> histone kinase	Lund et Laland, 1990
Nucléoline	XTPXK	p34 cdc2 kinase	Kharrat <i>et al.</i> , 1991

**Tableau III** : Expériences de phosphorylations de protéines à motifs basiques.

Comme les phosphorylations concernent les domaines de liaison à l'ADN de ces protéines, il est évident que leurs interactions doivent s'en trouver dans une certaine mesure affectées. Une diminution de leur affinité pour l'ADN a en effet été constatée (Hill *et al.*, 1990; Hill *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1990). L'explication la plus probable est que la phosphorylation diminue la charge positive nette du motif peptidique et, par là même, le nombre de liaisons ioniques possibles avec des phosphates de l'ADN. Or la composante électrostatique est le facteur prépondérant dans l'interaction de ces peptides avec l'ADN (Churchill et Travers, 1991). La phosphorylation est susceptible aussi de déstabiliser la structure putative en  $\beta$  et/ou  $\alpha$  turn (Churchill et Travers, 1991; Reeves *et al.*, 1991); cependant l'induction d'une stabilisation a été au contraire reportée (Kharrat *et al.*, 1991).

### 3-3-2) *Implications physiologiques*

D'un point de vue physiologique, la phosphorylation de ces protéines est dépendante du cycle cellulaire et se produit de manière extensive au moment de la mitose. Ainsi les protéines HMG I sont hyperphosphorylées à la métaphase pour donner une autre forme, HMG M (Lund *et al.*, 1983; Lund *et al.*, 1985; Lund et Laland, 1990); la nucléoline est un substrat de la p34 *cdc2* kinase lors de la mitose (Belenguer *et al.*, 1990; Peter *et al.*, 1990) et l'histone H<sub>1</sub> est aussi fortement phosphorylée avant et pendant la métaphase (Roth et Allis, 1992). Dans le cas plus particulier de la spermatogenèse chez l'oursin de mer, la phosphorylation des histones H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub>B se produit lors de la transformation des spermatogonies en spermatides ainsi que pendant l'étape de fertilisation (Roth et allis, 1992).

De plus, parmi les protéines kinases connues à ce jour, l'une d'entre elles, la p34 *cdc2* kinase a une fonction primordiale pendant la mitose et plus particulièrement lors de son initiation (Moreno et Nurse, 1990; Draetta, 1990). Celle-ci provoquerait le désassemblage des lamines nucléaires et du nucléole, des réarrangements du cytosquelette et l'inhibition de la transcription (Moreno et Nurse, 1990). La séquence consensus phosphorylée par cette enzyme, S(T)PXX(R), est aussi un motif proche de S(T)PKK. En résumé, il semble donc que la phosphorylation de motifs S(T)PKK (et dans une plus large mesure de motifs S(T)PXX) soit à la base de la **régulation** d'un certain nombre de processus physiologiques nécessaires à l'**activation de la mitose** et à son bon déroulement.

Parmi ces processus, deux doivent être contrôlés particulièrement tout au long de la mitose:

(i) la compaction chromatinienne: elle est avant tout assurée par une hyperphosphorylation de H<sub>1</sub> selon le premier modèle de Bradbury. Néanmoins un autre modèle a été élaboré selon lequel la phosphorylation de H<sub>1</sub> induit une décondensation transitoire qui permet à d'autres facteurs de régulation de la condensation d'intervenir (Roth et Allis, 1992). Globalement la compaction résulte donc de l'intervention de protéines phosphorylables histone et non-histone (protéines HMG, nucléoline...) pouvant agir de manière compétitive voire même synergique (Kharrat *et al.*, 1991).

(ii) la transcription : celle-ci doit être inhibée tout au long de la mitose et pourrait l'être par la phosphorylation du motif répétitif SPTSPSY de la RNA polymérase II (Corden, 1990; Cisek et Corden, 1989; Moreno et Nurse, 1990).

Une régulation semblable pendant toute l'interphase apparaît beaucoup plus hypothétique. Elle pourrait être effectuée par l'action de protéines kinases AMPc-dépendantes. Ainsi certaines histones H<sub>1</sub> contiennent des sites reconnus par la PKA (Hohmann, 1983) et des inhibiteurs de PKA peuvent induire une condensation de la chromatine, quelle que soit la phase du cycle (Lamb *et al.*, 1991). Suzuki a isolé une protéine kinase AMPc dépendante appelée SP kinase dans le cas très spécifique du sperme d'oursin de mer (Suzuki *et al.*, 1990). De même ces protéines kinases peuvent contribuer dans certains cas à la régulation de la transcription (Goldberg *et al.*, 1998; Montminy et Bilezikjian, 1987; Russell Grove *et al.*, 1987). Néanmoins leurs motifs préférentiels de phosphorylation sont du type RRXSX (Kemp et Pearson, 1990), motifs qui sont parfois présents dans les séquences de facteurs de transcription (Goldberg *et al.*, 1988) mais quasiment absents dans celles des histones H<sub>1</sub>. Il semble donc peu probable que les histones H<sub>1</sub> (et plus particulièrement leurs motifs SPKK) soient des substrats de ces protéines kinases. La régulation de la transcription et de la condensation chromatinienne pendant l'interphase doit faire entrer en ligne de compte d'autres facteurs à savoir l'acétylation des histones du coeur nucléosomal (Roth et Allis, 1992; Hansen et Ausio, 1992), la distribution des variantes de l'histone H<sub>1</sub> dans la chromatine (Hansen et Ausio, 1992; Zlatanova, 1990), les interactions entre nucléosomes (Hansen et Ausio, 1992) et l'intervention de protéines non-histone.



**CHAPITRE II :**

**LE CONCEPT**

**LIGAND DU PETIT SILLON-INTERCALANT**

## I - GENERALITES

### 1) MODELES NATURELS

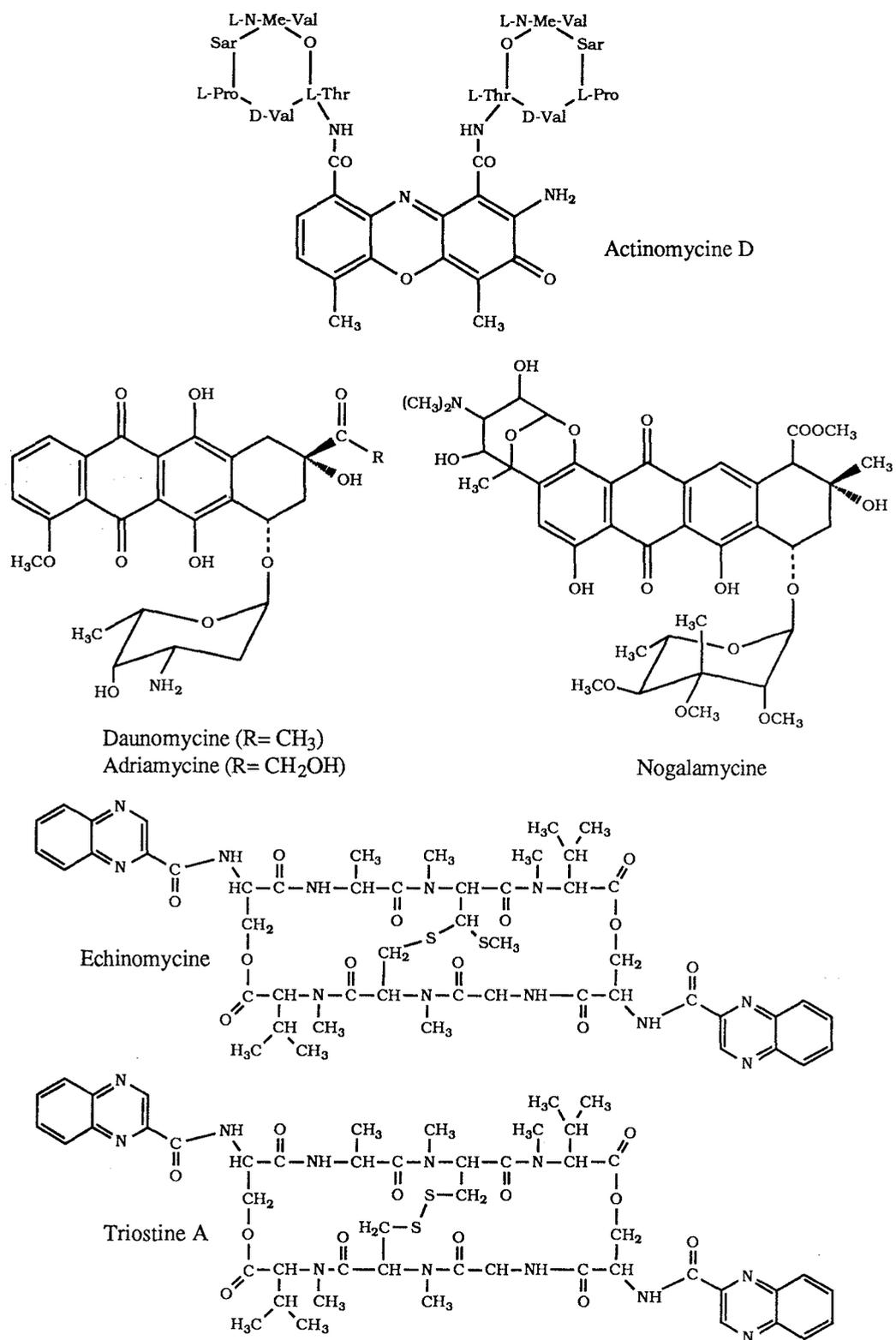
Un certain nombre de substances naturelles répondent au concept "ligand du petit sillon-intercalant".

(i) L'actinomycine D est un agent antitumoral constitué d'un noyau phénoxazone disubstitué par des pentapeptides cycliques (**Figure 7**). L'intercalation de la phénoxazone se produit de façon préférentielle au niveau de séquences 5'-GC (Takusagawa *et al.*, 1982; Brown *et al.*, 1984; Van Dyke *et al.*, 1983) tandis que les deux peptides cycliques se logent dans le petit sillon de part et d'autre du noyau intercalant, recouvrant chacun trois paires de bases (Van Dyke *et al.*, 1983; Scott *et al.*, 1988 a,b). Ces peptides concourent à la reconnaissance spécifique par le biais de liaisons hydrogène entre les fonctions amide de leurs résidus thréonine et les atomes N<sub>3</sub> ainsi que les groupements amino de guanines (Scott *et al.*, 1988 a,b).

(ii) La daunomycine (**Figure 7**), médicament antitumoral membre de la famille des anthracyclines tout comme l'adriamycine, reconnaît de façon préférentielle les séquences 5'-ACG et 5'-TCG (Quigley *et al.*, 1980; Wang *et al.*, 1987) par l'intercalation du chromophore aromatique entre les paires de bases CG et l'interaction au niveau du petit sillon de la partie glycanique par des liaisons hydrogène avec une adénine ou une thymine (Chaires, 1990).

Une autre anthracycline naturelle, la nogalamycine (**Figure 7**), interagit de même avec l'ADN par l'intercalation du noyau anthracycline tandis que les parties glycaniques nogalose et aminoglucose se logent dans le petit et le grand sillon respectivement (Searle *et al.*, 1988; Liaw *et al.*, 1989; Zhang et Patel, 1990; Egli *et al.*, 1991).

(iii) L'échinomycine, antibiotique antitumoral de la famille des quinomycines (**Figure 7**), est capable de se lier à l'ADN à la fois par l'intercalation de ses deux chromophores quinoxaline et par la fixation dans le petit sillon de sa fraction cyclodepsipeptidique rigide au moyen de liaisons hydrogène et de contacts de Van der Waals (Wakelin, 1986; Waring, 1986; Waring, 1990). Il en est de même pour la triostine A, autre antibiotique à quinoxaline, dont la structure diffère de celle de



**Figure 7:** Substances naturelles répondant au concept "ligand du petit sillon-intercalant".

l'échinomycine par la présence d'un pont disulfure (au lieu d'un thioacétal) (Ughetto *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1984). De cette manière, l'échinomycine et la triostine A prennent préférentiellement en "sandwich" deux plateaux de bases GC. La spécificité GC résulte de liaisons hydrogène entre les groupements NH et CO des alanines et les azotes N<sub>3</sub> et N<sub>2</sub> des guanines respectivement (Lee et Waring, 1978; Ughetto *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1984).

## 2) DESIGN DE MODELES HYBRIDES "LIGANDS DU PETIT SILLON-INTERCALANTS".

Les modèles naturels décrits précédemment ainsi que des études menées (Wartell *et al.*, 1975; Patel, 1981; Pardi *et al.*, 1983) ont montré que la liaison d'une molécule intercalante et d'une molécule ligand du petit sillon peut avoir lieu simultanément sur des sites nucléiques proches malgré les changements différents de conformation de l'ADN induits par ces deux types de ligands, à savoir respectivement un écartement des plateaux de paires de bases (Neidle *et al.*, 1987) et un élargissement du petit sillon (Klevit *et al.*, 1986; Carrondo *et al.*, 1989).

Il semble dès lors intéressant pour le design de ligands séquence-spécifiques de lier de façon covalente deux entités de ce type:

(i) les hybrides obtenus devraient posséder une affinité pour l'ADN supérieure à celles des deux substances modèles;

(ii) la présence d'intercalants pourrait apporter une contribution GC (Schwaller *et al.*, 1989; Bailly *et al.*, 1990c; Bailly *et al.*, 1992a; Wilson *et al.*, 1985a) à la spécificité AT caractéristique des ligands du petit sillon (Van Dyke *et al.*, 1983; Portugal et Waring, 1987; Portugal et Waring, 1988);

(iii) selon ces deux critères de liaison, on est en droit de s'attendre à une activité biologique plus marquée des molécules hybrides.

L'un des premiers modèles hybrides conçus a été celui de Dervan (1986) où deux distamycines ont été liées de façon covalente au chromophore phénoxazone de l'actinomycine par deux bras espaceurs glycylics (Figure 8). Cet hybride peut se lier sur la séquence 5'-TATAGGTTAA-3', ce qui témoigne d'une fixation de l'ensemble de la molécule avec conservation de la spécificité propre à chaque fragment. Mais la fixation principale a lieu sur des sites plus courts de quatre à six paires de bases en

accord avec une intercalation de la phénoxazone et/ou la liaison d'un seul résidu distamycine. L'hybride analogue dépourvu de bras espaceurs glycyle ne présente par contre aucune propriété d'intercalation (Krivtsora *et al.*, 1984). Ceci montre l'importance de ces connecteurs reliant les fractions d'une molécule hybride; leur rôle critique pour la conformation de l'ensemble de la molécule implique qu'ils doivent être judicieusement choisis pour permettre la fixation simultanée des différents fragments.

### 3) DERIVES ACRIDINIQUES DE LA NETROPSINE ET DE LA DISTAMYCINE

#### 3-1) Hybrides NetGA de première génération

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

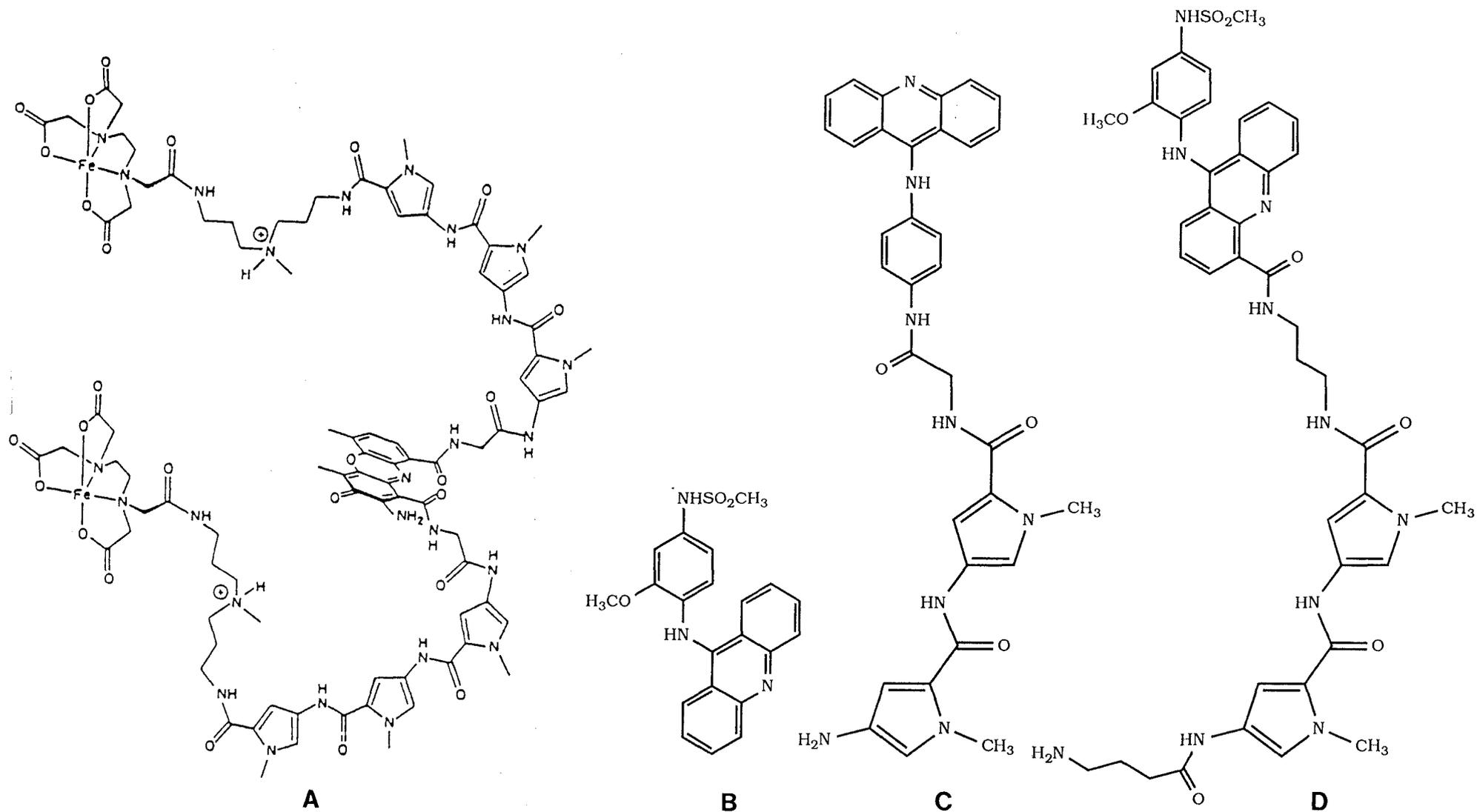
Pour l'hybride NetGA (**Figure 8**), le choix de l'intercalant s'est porté sur le chromophore anilinoamino-9 acridine pour plusieurs raisons :

- (i) il est décrit comme GC spécifique (Feigon *et al.*, 1984);
- (ii) l'aniline adjacente à l'acridine intercalante est susceptible de se loger dans le petit sillon de l'ADN (Denny *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1988) bien que, dans certains cas, sa fixation dans le grand sillon ne soit pas exclue (Denny et Wakelin, 1986; Wakelin *et al.*, 1990);
- (iii) il est structuralement proche de l'amsacrine (**Figure 8**), médicament anticancéreux largement utilisé dans le traitement de certaines leucémies (Zittoun, 1985; Cassileth et Gale, 1990);
- (iv) il est capable de pénétrer rapidement dans la cellule et de se concentrer au niveau nucléaire (Lemay *et al.*, 1983).

Par ailleurs le connecteur glycyle a été choisi selon les observations de Krivtsora *et al.* (1984).

Les deux modes de liaison à l'ADN caractérisent bien l'hybride NetGA selon l'hypothèse de départ. NetGA se lie de façon préférentielle aux sites 5'-AAAT-3' (Bailly *et al.*, 1990a) avec une affinité nettement supérieure à celle de la nétropsine (Bailly et Hénichart, 1991). Néanmoins le squelette de la nétropsine influe de façon notable sur le degré d'intercalation de l'acridine (Bailly *et al.*, 1989b; Bailly *et al.*, 1990a).

L'interaction de NetGA avec la chromatine révèle des modalités de liaison similaires (Bailly *et al.*, 1992b).



**Figure 8:** Structures de la bis[Fe(II).EDTA-distamycine]phénoxazone (A), de l'amsacrine (B), de l'hybride nétropsine-acridine NetGA (C) et de l'hybride nétropsine-amsacrine NetAMSA (D).

D'un point de vue biologique, le composé NetGA possède un tropisme nucléaire et une cinétique de pénétration cellulaire (Bailly et Hénichart, 1990b) intermédiaires entre ceux de l' amino-9 acridine (pénétration rapide; Lemay *et al.*, 1983) et de la nétropsine (processus lentement évolutif; Bailly *et al.*, 1989a). Son activité inhibitrice de la topoisomérase II, enzyme impliquée dans la formation de structures chromatiniennes d'ordre supérieur, est voisine de celle de l'amsacrine et tributaire de la fraction nétropsine (Bailly *et al.*, 1992b). Enfin ce composé présente un bon pouvoir inhibiteur de croissance de cellules leucémiques *in vitro* tandis que son activité *in vivo* reste modérée (Bailly *et al.*, 1992b).

### 3-2) Hybrides NetAMSA de seconde génération

Pour améliorer le modèle NetGA, des hybrides dits de seconde génération ont été conçus et étudiés au laboratoire. Les différences majeures par rapport à NetGA résident dans le choix d'un bras espaceur aliphatique plus long et plus flexible que le résidu glycyle original et le remplacement de l'anilinoamino-9 acridine par l'amsacrine elle-même (**Figure 8**). L'amsacrine, selon ce nouveau modèle, est intégralement conservée. Notamment la présence des substituants méthoxy (-OCH<sub>3</sub>) et méthanesulfonamide (NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) de l'aniline devrait inculquer à ces hybrides les fonctions oxydatives caractéristiques de l'amsacrine, responsables d'une capacité de coupure de l'ADN par le biais de radicaux libres oxygénés produits en présence de cuivre (Wong *et al.*, 1984 a,b). Il faut enfin souligner que l'ancrage de la fraction oligopyrrolique est effectué en position 4 sur le noyau acridine et non plus sur le groupement amino de l'aniline (**Figure 8**).

Parmi les différentes molécules étudiées, le composé NetAMSA (**Figure 8**) a montré les meilleures propriétés de liaison à l'ADN. Le caractère bimodal de l'interaction est encore retrouvé mais avec une nette amélioration par rapport à NetGA puisque le processus d'intercalation est quasiment parfait. Le bras espaceur court de type propyle permet une interaction optimale avec l'ADN (comparativement au bras espaceur plus long de type hexyle). Les résultats de footprinting montrent une rétention de la spécificité AT encore plus marquée que celle présentée par NetGA.

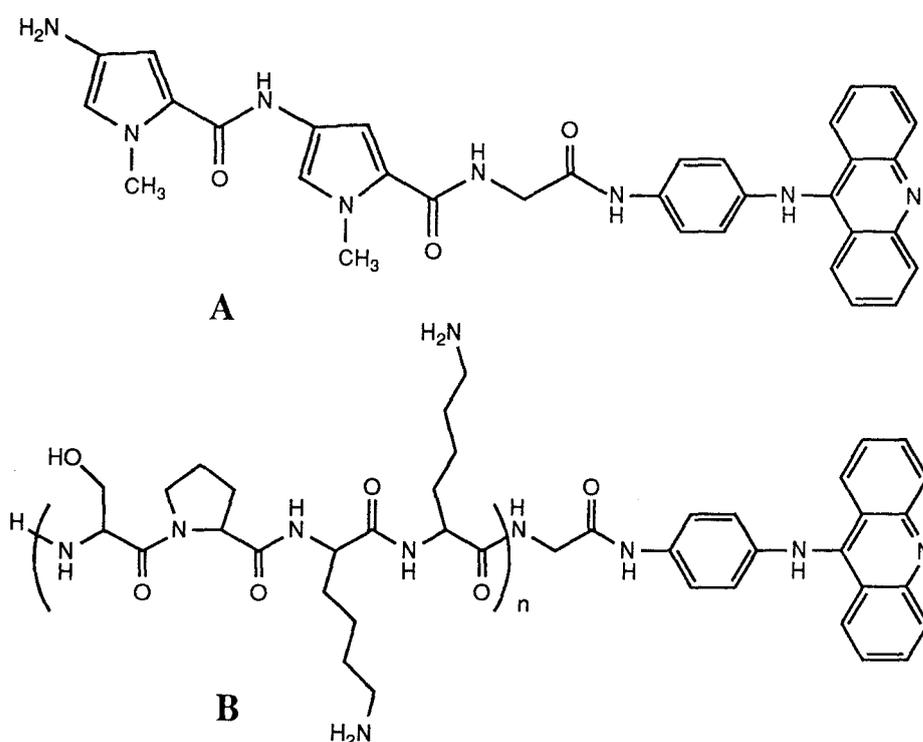
L'oxydation de l'amsacrine en présence de cuivre a été confirmée expérimentalement chez l'hybride NetAMSA et reliée à un pouvoir de coupure de l'ADN. Enfin, sur le plan pharmacologique, le dérivé NetAMSA selon des tests préliminaires est pratiquement inactif vis-à-vis des cellules leucémiques L1210 (Klupsch, 1991).

## II- HYBRIDES (SPKK)<sub>n</sub>-INTERCALANTS

### 1) LE MODELE (SPKK)<sub>n</sub>GA

#### 1-1) Structure et synthèse

Sur la base de l'analogie proposée entre la nétropsine et l'octapeptide SPKKSPKK (cf Chapitre I; II), nous avons élaboré une nouvelle série de ligands hybrides comportant un ou deux motifs SPKK reliés au chromophore anilinoamino-9 acridine par un résidu glycyle tout comme dans NetGA (**Figure 9**). Les objectifs d'un tel design sont de comparer les deux modèles hybrides pseudopeptidique et peptidique ainsi que d'améliorer les propriétés de liaison du motif SPKK par l'adjonction d'un intercalant.



**Figure 9:** Structures du ligand hybride NetGA (A) et des analogues peptidiques (1) ( $n=1$ ) et (2) ( $n=2$ ) (B).

La synthèse des composés hybrides (1) et (2) ainsi que des peptides SPKK et SPKKSPKK utilisés comme références a été réalisée suivant le schéma I. Les

deux peptides (8) et (16) obtenus à partir d'acides aminés commerciaux selon des méthodes de couplage peptidique diverses ont été greffés à la glycyanilinoamino-9 acridine (préparée selon Hénichart *et al.*, 1982; Morier-Teissier *et al.*, 1989) par la méthode DCC/HOBt. Les ligands hybrides totalement protégés (9) et (17) sont alors soumis à une acidolyse (HBr/AcOH et HCl/AcOH respectivement) pour donner les composés hybrides (1) et (2). De même l'acidolyse des peptides (8) et (16) a fourni SPKK, (19) et SPKKSPKK, (18) respectivement.

Nous rappellerons ici brièvement les trois méthodes de couplage peptidique utilisées durant cette synthèse:

(i) méthode dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole ou DCC/HOBt,

(ii) méthode aux anhydrides mixtes utilisant le chloroformiate d'isobutyle ClCO<sub>2</sub>iBu en présence de N-Méthyl morpholine,

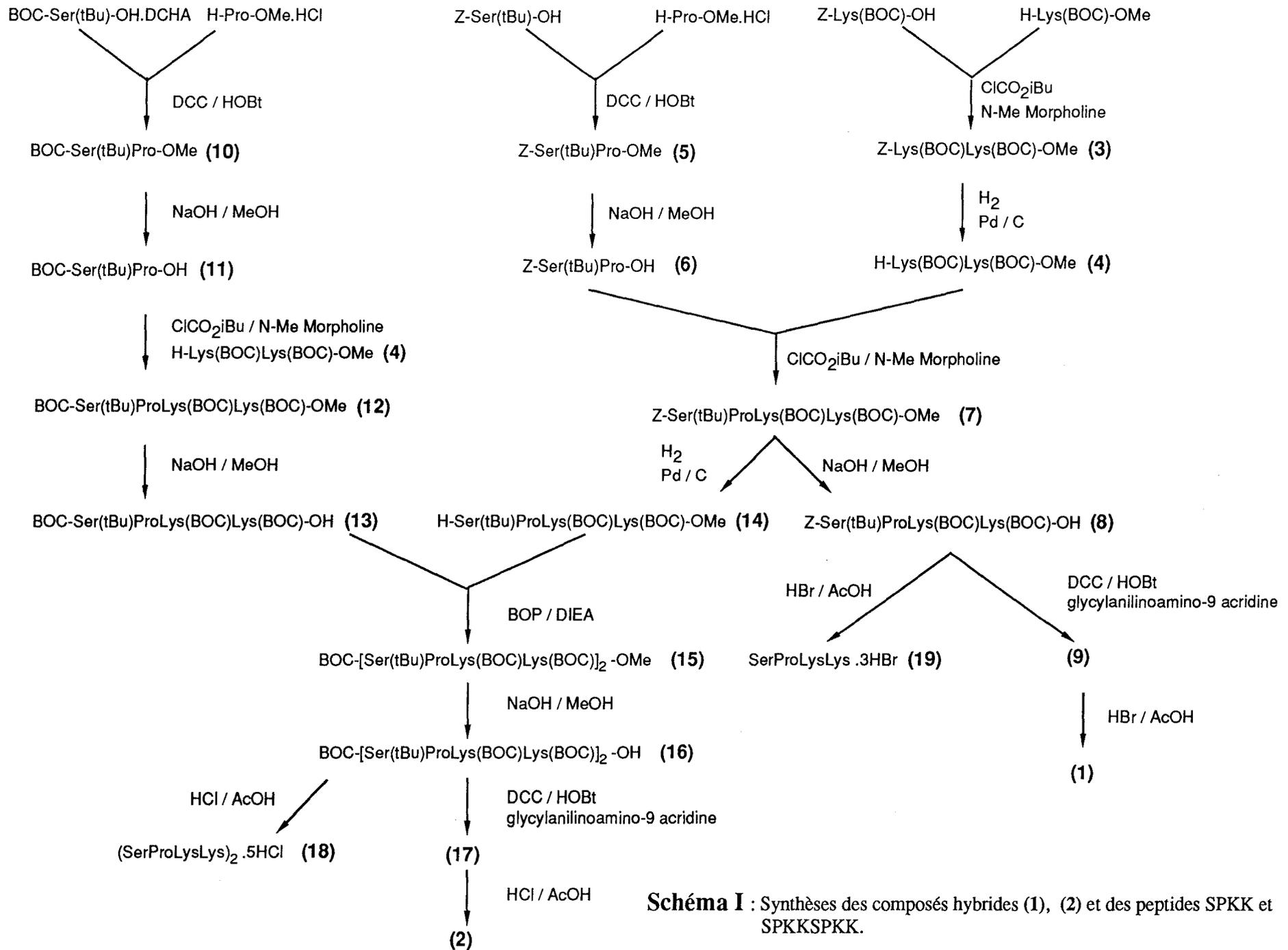
(iii) utilisation du réactif BOP/DIEA ou hexafluorophosphate de Benzotriazolyl N-OxytrisdiméthylaminoPhosphonium en présence de diisopropyléthylamine

ainsi que les méthodes de déprotection sélective des peptides :

(i) déprotection du côté C-terminal: saponification en milieu méthanolique,

(ii) déprotection du côté N-terminal: hydrogénation sur charbon palladié.

(cf Article n°1)



**Schéma I** : Synthèses des composés hybrides (1), (2) et des peptides SPKK et SPKKSPKK.

## 1-2) Interaction avec l'ADN

### *1-2-1) Mise en évidence de l'interaction (SPKK)<sub>n</sub>GA/ polynucléotides (voir p.127)*

L'interaction des ligands hybrides (1) et (2) avec l'ADN a été mise en évidence dans un premier temps par spectroscopie d'absorption UV. Un effet hypochrome est induit en présence de concentrations croissantes d'ADN (thymus de veau; 42%GC). L'utilisation des techniques de dénaturation thermique d'ADN et de quenching de fluorescence d'une part, et la quantification des paramètres de liaison selon la représentation de Scatchard d'autre part, ont permis de déterminer avec plus de précision les modalités de cette interaction.

**\* Dénaturation thermique de polynucléotides** (voir partie expérimentale, p.128)

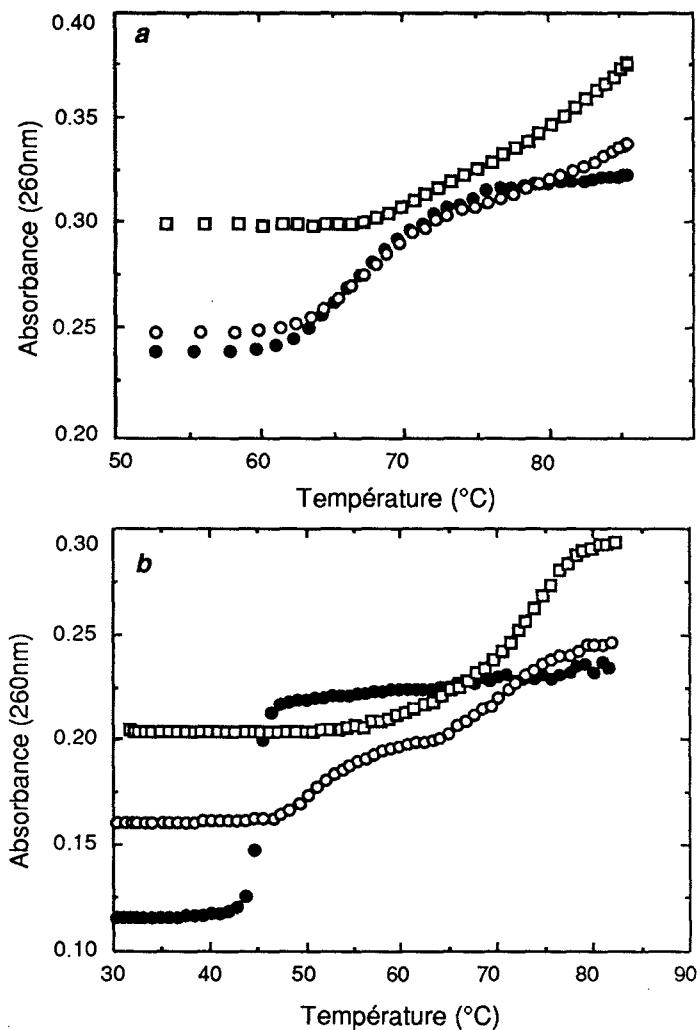
Le **tableau IV** montre que (1) est le composé qui stabilise le mieux la double hélice d'ADN (thymus de veau; 42%GC) avec des valeurs de  $\Delta T_m$  légèrement inférieures à celles de Nt. Les deux ligands hybrides (1) et (2) se fixent mieux à l'ADN que NetGA et leur affinité est nettement supérieure à celle des fractions peptidique et intercalante prises séparément.

Par contre, en présence du polynucléotide poly[d(AT)-d(AT)], (1) et (2) induisent des  $\Delta T_m$  beaucoup plus importants, voisins de ceux de la nétopisine à partir du rapport ligand/ADN (ou D/P) égal à 0,2. (2) devient même plus affine que (1) pour les valeurs élevées de D/P.

De plus il est à noter que dans certaines conditions les courbes de dénaturation ont jusqu'à deux points d'inflexion, ce qui signifie la présence de plusieurs transitions induites par des modes différents de liaison à l'ADN des hybrides (**Figure 10**).

De telles courbes polyphasiques sont observées de manière beaucoup plus évidente en présence de poly[d(AT)-d(AT)] et pourraient être le reflet d'une liaison coopérative des composés hybrides. En effet, l'extrémité C-terminale de l'histone H<sub>1</sub> (contenant aussi des motifs SPKK) est à l'origine d'un phénomène semblable (Renz et Day, 1976; Rodriguez *et al.*, 1988; Rodriguez *et al.*, 1991) et cette coopérativité de

liaison est à mettre en relation avec la richesse en résidus AT de l'ADN (Renz et Day, 1976).



**Figure 10:** Evolution de l'absorbance à 260 nm en fonction de la température (°C). Courbes obtenues pour le composé hybride (1) en présence d'ADN de thymus de veau (a) et de poly[d(AT)-d(AT)] (b) à différents rapports ligand/ADN: (a) 0 (●), 0,025 (○), 0,1 (□); (b) 0 (●), 0,1 (○), 0,2 (□).

**Tableau IV** : Valeurs  $\Delta T_m$  (élévation de la température de fusion des ADN de thymus de veau et poly[d(AT)-d(AT)] en °C) des composés hybrides (1) et (2) et de composés témoins pour différents rapports ligand/ADN (D/P= Drug/Phosphate-DNA); \* (a): valeurs  $\Delta T_m$  de la première transition; (b): valeurs  $\Delta T_m$  de la seconde transition; (c): valeurs sous-estimées (pour des transitions partielles dues aux limites expérimentales); /: valeurs non mesurables

D/P	$\Delta T_m$ , poly[d(AT)-d(AT)]					$\Delta T_m$ , thymus de veau (42% GC)				
	0.05	0.1	0.25	0.5	1	0.05	0.1	0.25	0.5	1
(1)*	(a) 2.8	(a) 5.1 (b) 26	(a) 20.4 (b) 30.3	(c) 33.5	/	4	8	(c) 21	/	/
(2)*	(a) 1.6 (b) 20	(a) 4.3 (b) 25.5	(c) 33	(c) 39	/	1.5	3	8	13	/
SPKK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SPKKSPKK	0	0	0	0.3	1	0	0	0	0	0
Glycyanilino amino-9 acridine	4.8	5.7	9	13.8	19	0.7	2	4.7	5.6	8.5
Nétropsine	21.5	29	31	/	/	10.5	12	15	18	22
NetGA	2	5	10	18	19	1	3	5	7	8

\* **Quenching de fluorescence** (voir p.129)

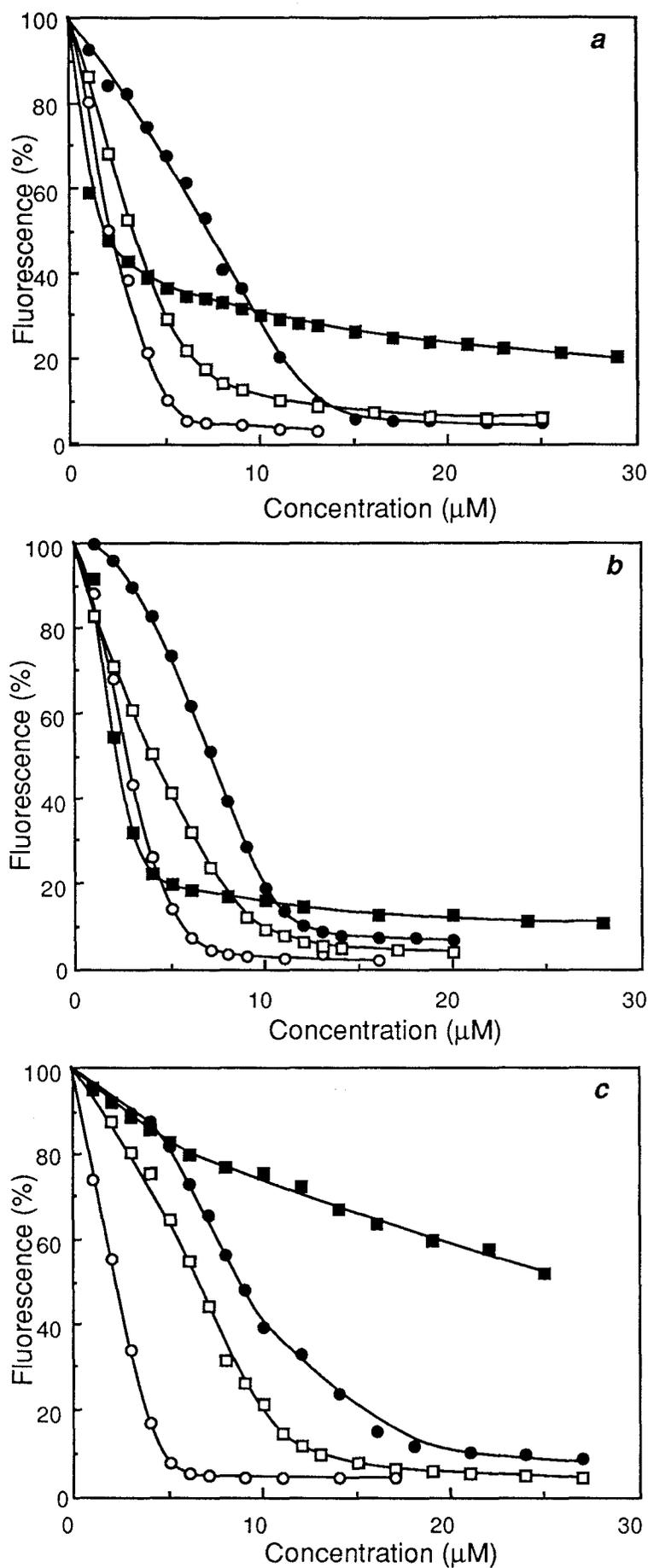
L'extinction (ou quenching) de la fluorescence de complexes éthidium-ADN induite par l'addition de ligands compétiteurs hybrides est observée, quelle que soit la composition de l'ADN utilisé (**Figure 11**). Dans tous les cas, (1) induit un meilleur quenching, comparativement à (2) et au composé glycyanilinoamino-9 acridine. Ainsi, par exemple, les valeurs  $Q_{50}$  (c'est-à-dire les concentrations en ligands nécessaires pour obtenir un quenching de 50%) dans le cas du complexe éthidium-poly [d(AT)-d(AT)] sont de 3, 4 et  $7\mu\text{M}$  pour (1), la glycyanilinoamino-9 acridine et (2) respectivement. Le quenching induit par les deux hybrides est supérieur à ceux de Nt (notamment aux fortes concentrations en ligands) et des deux peptides SPKK et SPKKSPKK (qui ne donnent pas de quenchings significatifs).

Une situation analogue se produit en présence des complexes Hoechst 33258-ADN; le ligand (1) montre des propriétés de compétition comparables à celles de la nétropsine et nettement supérieures à celles de (2) et des peptides (**Tableau V**).

ADN	(1)	(2)	Glycyanilinoamino-9 acridine	Nétropsine
Thymus de veau	0,8	2,8	2,4	0,9
poly[d(AT)-d(AT)]	0,7	2,6	1,6	0,9

**Tableau V** : Concentrations en ligands nécessaires pour réduire la fluorescence de 50% (valeurs  $Q_{50}$ ) de complexes Hoechst/polynucléotides ( $2\mu\text{M}$  en fluorophore pour  $20\mu\text{M}$  d'ADN).

Remarques : Les peptides SPKK et SPKKSPKK n'ont pas induit de quenchings notables. Les mêmes expériences en présence de poly[d(GC)-d(GC)] n'ont pu être effectuées à cause d'une instabilité trop importante de la fluorescence (due certainement à une dissociation rapide du complexe Hoechst 33258-ADN).



**Figure 11:** Quenching de fluorescence des complexes éthidium-ADN en présence de concentrations croissantes en (1) (○), (2) (●), glycyanilinoamino-9 acridine (□) et nétropsine (■). (a) thymus de veau; (b) poly[d(AT)-d(AT)]; (c) poly[d(GC)-d(GC)].

**\* Constantes d'affinité (voir p.128)**

Une analyse par Scatchard a montré que (1) ( $K_a(1) = 4.10^7 \text{ M}^{-1}$ ;  $n(1) = 0,1$ ) est environ 4 fois plus affine que (2) ( $K_a(2) = 9,4.10^6 \text{ M}^{-1}$ ;  $n(2) = 0,025$ ) pour l'ADN de thymus de veau. Par ailleurs les deux composés présentent une affinité bien supérieure à celles de NetGA ( $K_a = 10^6 \text{ M}^{-1}$ ; Bailly *et al.*, 1990a) et de la nétropsine ( $K_a = 2,9.10^{10} \text{ M}^{-1}$ ; Luck *et al.*, 1977). Les tailles relatives des sites de liaison sont en accord avec la structure plus ou moins importante des ligands. Elles apparaissent néanmoins problématiques de par leur ordre de grandeur (10 et 40 nucléotides occupés par (1) et (2) respectivement) mais pourraient résulter de larges déformations conformationnelles induites par la fixation des deux ligands.

## Discussion

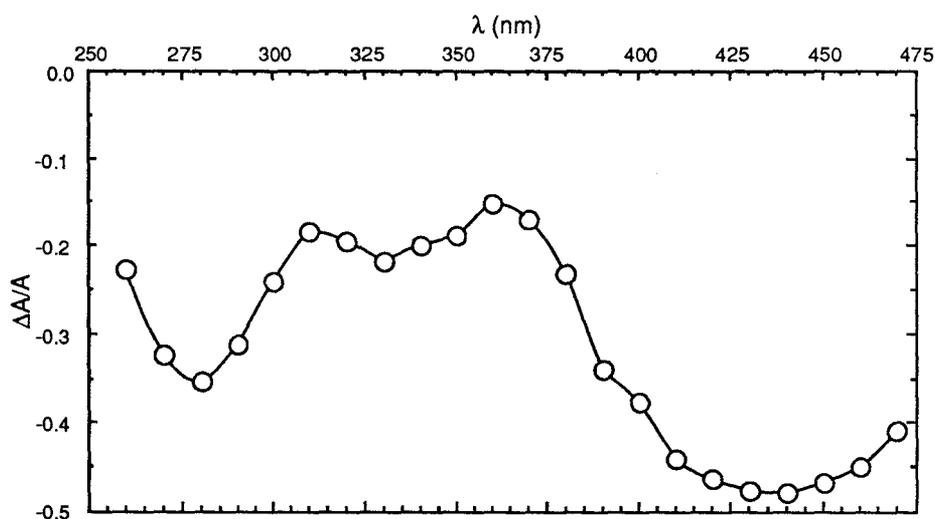
Ces études préliminaires mettent en évidence que le concept de ligand hybride s'est révélé fructueux de par l'importance des constantes d'affinité obtenues pour chaque composé, comparativement aux fragments peptidique et aromatique seuls. L'absence d'affinité notoire constatée pour les deux peptides SPKK et SPKKSPKK suggère qu'un enchaînement successif plus important de motifs SPKK est nécessaire pour qu'une liaison notable puisse avoir lieu ou que ces motifs doivent être inclus dans une séquence plus large (possédant d'autres résidus basiques ou des régions en hélice  $\alpha$ ) susceptible d'aider leur liaison à l'ADN, comme c'est probablement le cas dans l'extrémité C-terminale de l'histone H<sub>1</sub>. Les expériences de dénaturation thermique montrent clairement une sélectivité préférentielle par les enchaînements Adénine-Thymine bien que le quenching de fluorescence ne permette pas de conclure à ce sujet. Les valeurs des constantes d'affinité et les pouvoirs compétiteurs de fluorophores intercalants (bromure d'éthidium) et ligand du petit sillon (Hoechst 33258) laissent penser que les deux ligands hybrides interagissent bien avec l'ADN par un processus bifonctionnel. Ceci a été confirmé par l'utilisation d'autres techniques physicochimiques plus appropriées.

### 1-2-2) Mode d'interaction avec l'ADN et aspects conformationnels

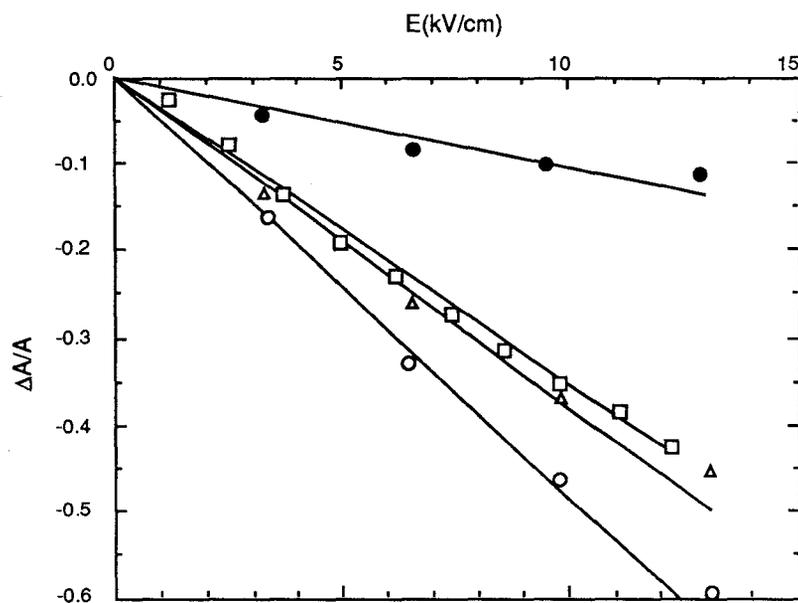
Pour appréhender de manière précise la nature de l'interaction (SPKK)<sub>n</sub>GA / ADN, quatre techniques différentes ont été utilisées à savoir le dichroïsme linéaire électrique, la viscosimétrie, le transfert d'énergie de fluorescence de chélates de terbium exalté par la diffusion et la modification conformationnelle induite par l'agent chimique tétraoxide d'osmium / pyridine.

#### \* Dichroïsme linéaire électrique (voir p.132)

Le spectre de dichroïsme linéaire électrique (DLE) du complexe (1) / ADN (**Figure 12**) présente un dichroïsme réduit négatif dans la région 375-475 nm, bande d'absorption du chromophore acridine. Par ailleurs l'étude du dichroïsme à 440 nm en fonction du champ électrique (**Figure 13**) montre que: (i) les valeurs DLE de la glycyanilinoamino-9 acridine sont voisines de celles de l'ADN à 260 nm; (ii) comparativement à ces valeurs, (1) se caractérise par un dichroïsme légèrement plus négatif et (2) par un dichroïsme nettement moins négatif.



**Figure 12:** Spectre de dichroïsme linéaire électrique du complexe (1)-ADN à un rapport ligand/ADN de 0,1 et à 12,5 kV/cm.



**Figure 13:** Dichroïsme réduit  $\Delta A/A$  en fonction du champ électrique  $E$  pour l'ADN à 260 nm ( $\Delta$ ) et les complexes (1)-ADN ( $\circ$ ), (2)-ADN ( $\bullet$ ) et glycylnilinoamino-9 acridine-ADN ( $\square$ ) à 440 nm.

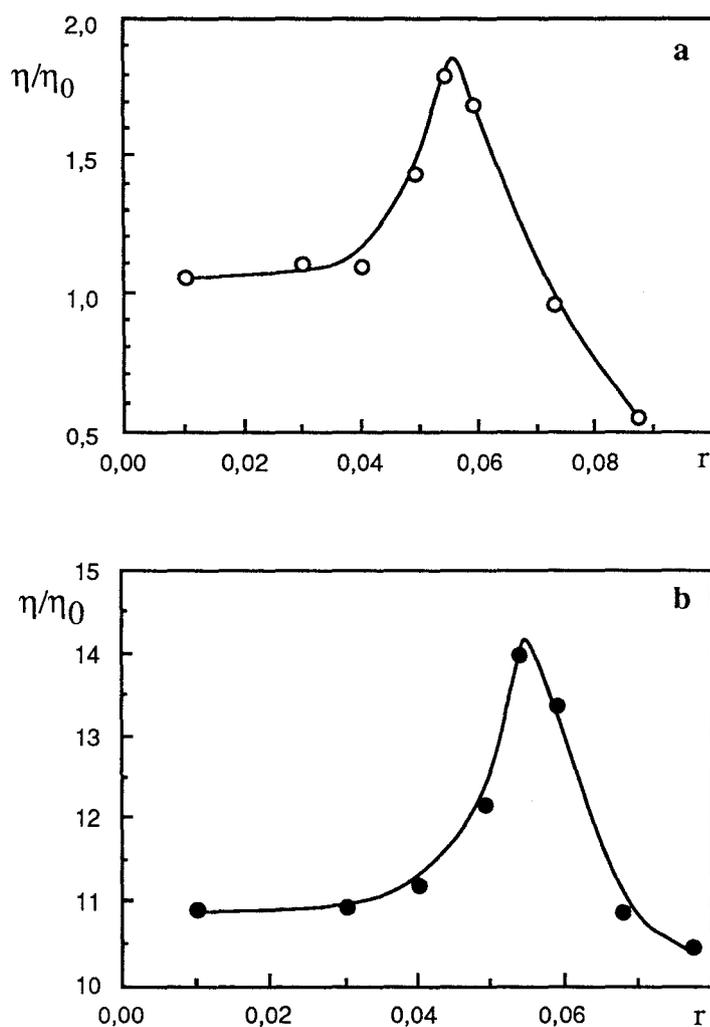
Il ressort donc de ces études que les chromophores acridines de la glycylnilino amino-9 acridine et de (1) sont orientés parallèlement au plan des plateaux de paires de bases en accord avec un processus intercalatif tandis que, pour (2), ce parallélisme n'est plus respecté, preuve très probable d'une intercalation partielle tout comme cela a été proposé pour NetGA (Bailly *et al.*, 1990a). Néanmoins une intercalation totale de l'acridine de (2) ne peut pas être exclue à ce stade de l'étude. En effet il est possible que le chromophore acridine soit bien parallèle au plan des paires de bases de l'ADN mais que celles-ci soient inclinées par rapport à l'axe de la double hélice.

#### \* Viscosimétrie (voir p.135)

La **figure 14** montre les changements dans la superhélicité d'un ADN circulaire induits par l'addition de concentrations croissantes des ligands hybrides (1) et (2).

Les deux composés entraînent une détorsion de l'ADN de  $14$  à  $15^\circ$ , valeur qui est faible comparativement à la détorsion créée par l'éthidium ou par certaines phénanthridines (Wang, 1974),  $26^\circ$ , valeur maximale trouvée pour un ligand

monointercalant. Néanmoins il a été suggéré que la détorsion optimale intrinsèque de l'ADN est approximativement de  $18^\circ$  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; Jones et Wilson, 1981). La valeur de  $14-15^\circ$  observée pour (1) et (2) légèrement inférieure à celle d'une intercalation optimale laisse donc suggérer un pouvoir intercalant correct de ces deux hybrides, comparable à celui de la daunomycine (détorsion de  $15,4^\circ$ ; Fritzsche *et al.*, 1982). Cette technique de viscosimétrie n'apporte pas d'informations complémentaires quant à la différence des processus d'intercalation observée en dichroïsme linéaire.



**Figure 14:** Courbes de titration de la viscosité de l'ADN circulaire superenroulé avec (1) (a) et (2) (b). La concentration en ADN est de  $120 \mu\text{M}$ . Les expériences sont réalisées à  $27^\circ\text{C}$  dans le tampon SHE  $0,01\text{M}$ .

**\* Transfert d'énergie de fluorescence de chélates de terbium exalté par la diffusion (voir p.130)**

Le transfert d'énergie de fluorescence est une méthode physicochimique qui apporte des informations quant au mécanisme de liaison à l'ADN de molécules (Wensel *et al.*, 1983; Wensel *et al.*, 1985; Lerho *et al.*, 1990). En mesurant les constantes de vitesse de transfert d'énergie entre un chélate de terbium fluorescent (le donneur) et un composé (l'accepteur) seul d'une part, et lié à l'ADN d'autre part, on définit un paramètre  $a$  appelé facteur d'accessibilité du ligand qui est à mettre en relation avec le mécanisme de liaison impliqué.

Dans le cas plus précis de notre étude, cette méthode nous a permis d'appréhender la position du chromophore acridine des composés (1) et (2) relativement aux paires de bases de l'ADN autrement dit le processus d'intercalation de cet aromatique.

Les différents paramètres calculés pour les composés hybrides (1) et (2) ainsi que pour la glycyanilinamino-9 acridine ont été comparés à ceux de ligands de référence aux modes de liaison à l'ADN bien connus à savoir l'éthidium, le rouge neutre, l'actinomycine D (intercalants), le vert de méthyle (ligand du petit sillon) et les formes orange et verte du complexe bléomycine A<sub>2</sub>-Co (III) (fixation externe non spécifique) (Tableau VI).

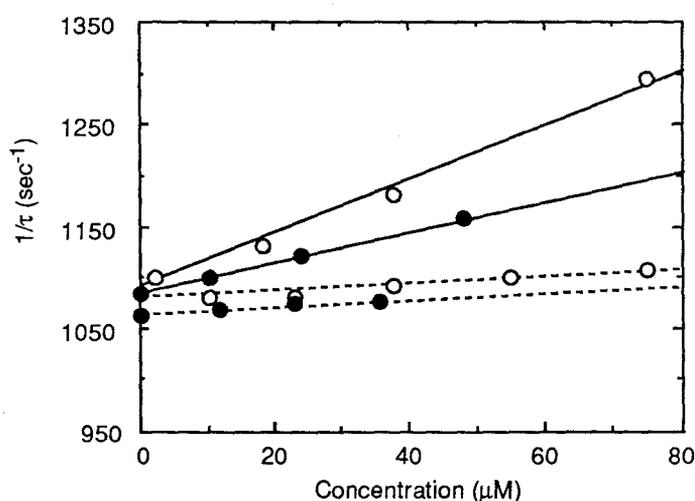
Dans le cadre du modèle limité par la diffusion rapide, la décroissance de la fluorescence du chélate de terbium est décrite par la relation suivante:

$$d[\text{Tb}^*]/dt = -[\text{Tb}^*]/\tau = -(1/\tau_0 + k_2 [A]) [\text{Tb}^*]$$

où  $[\text{Tb}^*]$  est la concentration molaire en donneurs excités (chélates de terbium),  $[A]$  est la concentration en accepteurs (ligands de l'ADN étudiés),  $k_2$  ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) est la constante de transfert d'énergie et  $\tau$  et  $\tau_0$  sont les temps de vie de fluorescence des chélates de terbium en absence et en présence d'accepteurs respectivement (Wensel et Meares, 1983; Wensel *et al.*, 1985).

Cette relation linéaire a été observée pour les ligands (1) et (2), que ce soit en présence ou en absence d'ADN (Figure 15).

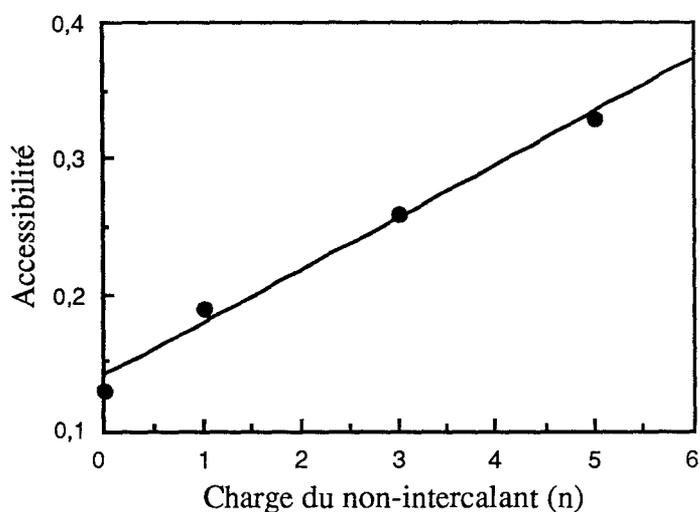
Le facteur d'accessibilité  $a'$  obtenu pour la glycyilanilinoamino-9 acridine (0,19) est proche des valeurs caractéristiques des molécules intercalantes (0,15 pour l'éthidium; 0,16 pour le rouge neutre et 0,13 pour l'actinomycine D), ce qui montre une intercalation parfaite de ce composé. En outre les ligands hybrides (1) et (2) donnent des valeurs plus élevées, soit 0,26 et 0,33 respectivement. Ainsi l'accessibilité de chromophore aromatique de (1) (0,26) semble aussi importante que celle d'un ligand du petit sillon comme le vert de méthyle (0,25). Le phénomène est même accentué pour (2) dont l'accessibilité (0,33) reste néanmoins inférieure à celles de ligands externes (0,44 et 0,77 pour les formes verte et orange du complexe bléomycine A<sub>2</sub>-Co (III)). Plus la taille de la chaîne peptidique est importante, plus grande est l'accessibilité de l'aromatique à la sonde de terbium (**Figure 16**). Ceci reflète de manière indubitable l'influence conformationnelle de la fixation du motif peptidique sur la position du chromophore aromatique dans son site d'intercalation.



**Figure 15:** Evolution du transfert d'énergie de fluorescence du chélate TbHED3A° en fonction de la concentration en composés hybrides (1) (○) et (2) (●) seuls (—) et liés à l'ADN (---).

ACCEPTEUR	$k_b^{\circ}$ ( $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_f^{\circ}$ ( $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$J_f$ $J_b$ ( $10^{-14} \text{ M.cm}^{-3}$ )		$J_f / J_b$	$a'$	
Ethidium	(a)	6.3	23.0	1.12	2.01	0.557	0.15
	(b)	7.2	26.7	1.20	2.10	0.571	0.15
Glycyanilino- amino-9-acridine		0.58	3.30	0.210	0.197	1.065	0.19
Actinomycine D	(b)	2.9	10.0	0.62	1.40	0.443	0.13
Vert de méthyle (b)		291.4	152.5	15.20	115	0.132	0.25
Bléomycine $A_2$ -Co(III): forme verte	(a)	0.25	0.52	0.0784	0.0865	0.906	0.44
	(a)	0.65	0.91	0.0596	0.0596	1	0.71
Rouge neutre	(b)	47.1	188.9	12.60	18.80	0.670	0.17
(1)	(b)	0.56	2.79	0.157	0.121	1.297	0.26
(2)	(b)	0.44	1.54	0.0742	0.0651	1.139	0.33

**Tableau VI** : Paramètres caractérisant le transfert d'énergie de fluorescence entre le chélate TbHED3A° et les ligands (1) et (2) ainsi que des composés témoins; (a) : données de Wensel *et al.* (1985); (b): nos mesures.



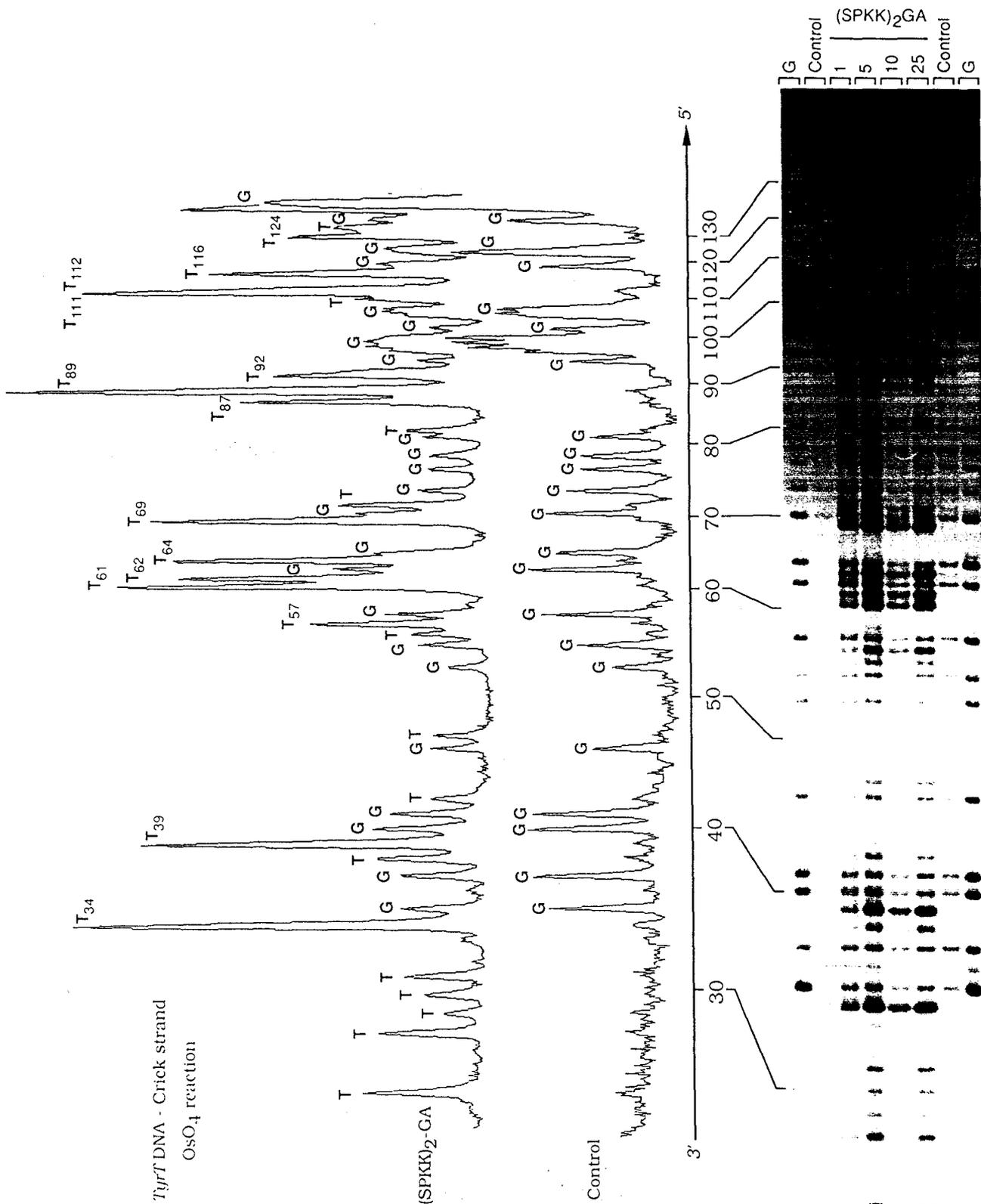
**Figure 16:** Augmentation du facteur d'accessibilité  $a'$  de l'acridine en fonction de la charge ( $n$ ) du fragment non-intercalant;  $n=0$  pour l'acridine,  $n=1$  pour la glycyanilinoacridine,  $n=3$  pour (1) et  $n=5$  pour (2).

**\* Utilisation du réactif tétraoxyde d'osmium/pyridine comme sonde chimique des modifications conformationnelles de l'ADN (voir p.136)**

L'agent chimique  $OsO_4$ /pyridine réagit de manière préférentielle sur les bases thymine de l'ADN (Johnston et Rich, 1985; Palecek, 1991). En présence de ligands, l'hyperréactivité de certaines de ces bases reflète l'induction d'altérations conformationnelles de l'ADN et plus particulièrement des modifications dans le "stacking" (empilement) des bases.

La **figure 17** montre une analyse densitométrique de l'hyperréactivité des thymines du brin Crick du fragment d'ADN *tyr T* en présence du ligand hydride (2) (idem pour (1) qui présente les mêmes sites hyperréactifs).

On constate que les thymines suivies d'une guanine en 5' (dinucléotides 3'-TG aux positions 34-35, 39-40, 57-58, 62-63, 64-65 et 69-70) sont plus réactives que celles qui sont précédées d'une guanine en 3' (dinucléotides 3'-GT aux positions 37-38, 41-42, 46-47, 55-56, 70-71 et 81-82). Par ailleurs ces bases hyperréactives sont



**Figure 17** : Coupure des bases du fragment *tyr T* modifiées par l'agent OsO<sub>4</sub>/pyridine induite par la pipéridine en absence (control) et en présence de concentrations croissantes (μM) du composé (2) (ou (SPKK)<sub>2</sub>GA). Le témoin "G" correspond à un marquage spécifique des guanines par le diméthylsulfate.

fréquemment situées à l'intérieur ou à proximité des sites de liaison de la molécule (identifiés par deux méthodes de foot-printing ; cf 1-2-3)). Cet agent chimique réagissant sur la double liaison 5,6 des thymines située dans le grand sillon de l'ADN, une meilleure accessibilité de ces bases traduit très certainement un élargissement du grand sillon résultant de l'intercalation du chromophore acridine. De plus ceci est en accord avec le fait que la réactivité de l'ADN au diméthylsulfate et au bleu de méthylène est inchangée en présence du ligand qui, de façon sous-jacente, se fixe donc dans le petit sillon de l'ADN.

**\* Etude par dichroïsme circulaire de l'interaction SPKKSPKK/  
polynucléotides (voir p.133)**

Les résultats précédents ont montré l'influence de la liaison de la fraction peptidique des hybrides (notamment du peptide SPKKSPKK) sur l'intercalation voisine de l'acridine qui ne peut résulter que de l'induction de déformations conformationnelles. Dès lors il nous a semblé judicieux d'étudier par dichroïsme circulaire l'interaction entre différents polynucléotides et l'octapeptide SPKKSPKK (S<sub>2</sub>).

Aucun effet Cotton significatif n'est observé lors des interactions S<sub>2</sub>/polydG-polydC et S<sub>2</sub>/poly(dGC)-poly(dGC). La situation est différente avec l'ADN de thymus de veau (**Figure 18b**) et le polynucléotide alterné poly(dAT)-poly(dAT) (**Figures 18d-f**).

En présence de S<sub>2</sub>, les maxima des deux bandes dichroïques caractéristiques de l'ADN de thymus de veau (à 245 et 278nm) subissent un "shift" vers les longueurs d'onde supérieures tandis que les intensités de ces deux bandes varient fortement (**Figure 18b**). Ceci a lieu jusqu'à un rapport peptide/polynucléotide (ou D/P) de 0,4 et reflète une altération conformationnelle de l'ADN, le peptide seul ne présentant pas de bandes dichroïques à ces longueurs d'onde (**Figure 18a**). Pour des valeurs plus élevées de D/P, ces deux bandes disparaissent totalement et le spectre présente alors une allure similaire à celle de S<sub>2</sub> seul.

L'interaction de S<sub>2</sub> avec poly(dAT)-poly(dAT) induit des transformations beaucoup plus marquées du spectre dichroïque de cet ADN. Ainsi, à un D/P de 0,2, la bande caractéristique à 262 nm disparaît totalement et une autre apparaît à 290 nm

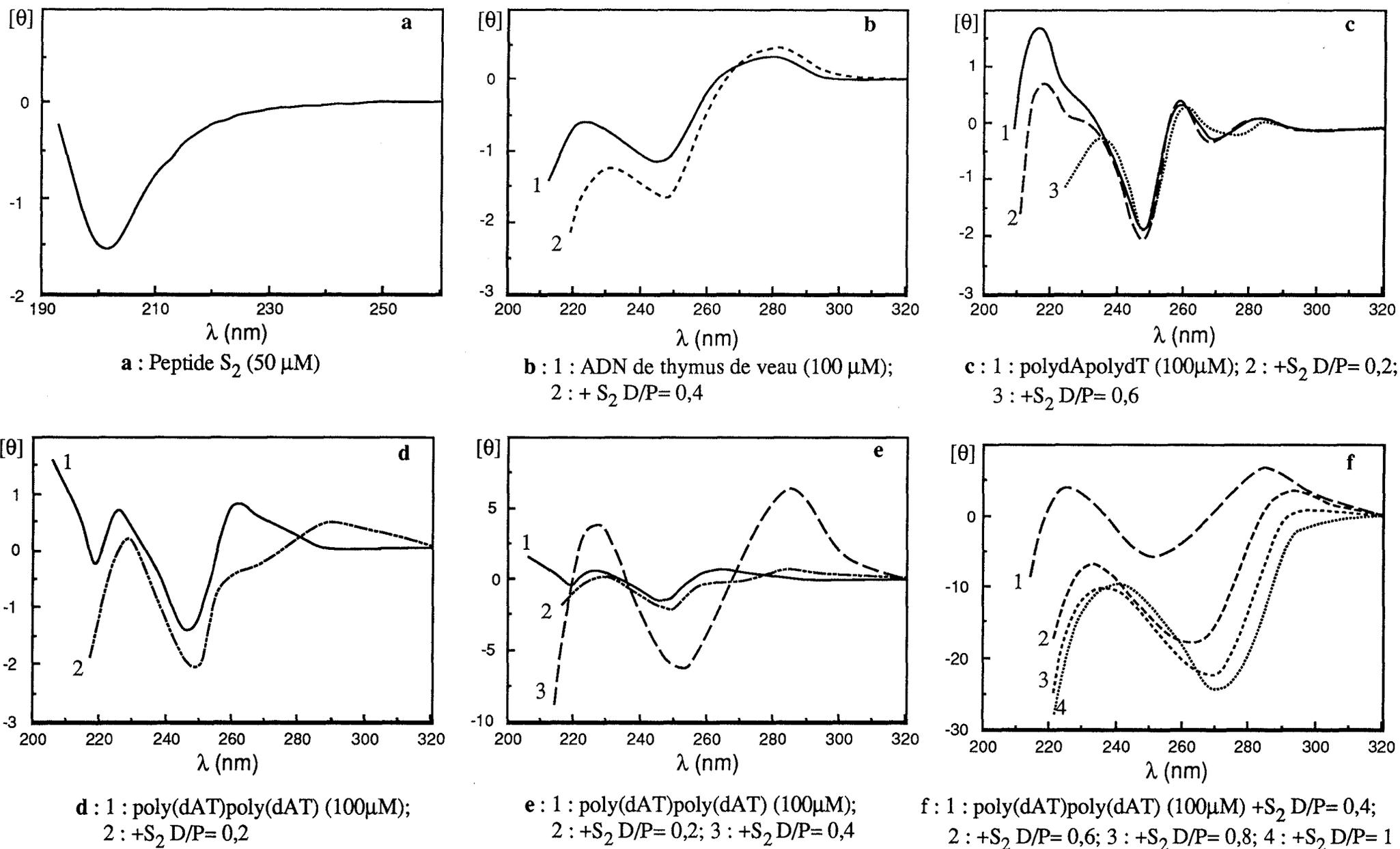
(**Figure 18d**). A 0,4, un changement profond se produit dans les intensités des bandes (multiplication par un facteur 3 à 10) (**Figure 18e**). Pour des D/P encore plus élevées, les spectres se caractérisent par une bande négative dont l'intensité croît en fonction de la concentration en peptide et dont le maximum subit un effet bathochrome (passage de 260 à 270 nm) (**Figure 18f**). Au-delà d'un D/P de 1, une précipitation des complexes S<sub>2</sub>/ADN est observée.

Ces spectres traduisent la formation de structures superenroulées d'ADN appelées structures  $\psi$  dont deux types,  $\psi(+)$  et  $\psi(-)$ , ont été mis en évidence. De telles transitions sont notamment induites lors de l'interaction de polypeptides (poly(Lys) et poly(Lys<sub>m</sub>Ala<sub>n</sub>)) avec des polynucléotides de compositions variées (Gupta *et al.*, 1984; Shin et Eichhorn, 1984; Chaires, 1989).  $\psi(-)$  et  $\psi(+)$  reflètent la formation de superenroulements gauche et droite respectivement. Plus précisément la bande négative très intense dans la région 260-280 nm est caractéristique de structures  $\psi(-)$ .

Par contre le spectre obtenu pour un D/P de 0,4 avec ses deux maxima positifs à 225 et 280 nm se rapproche plus de celui de structures  $\psi(+)$  (Chaires, 1989). Il semble donc que des concentrations croissantes en peptide provoquent tout d'abord l'organisation de structures  $\psi(+)$  puis celle de  $\psi(-)$ . Ceci est possible puisqu'il a été montré que des conversions entre ces deux formes peuvent se produire et que les formes  $\psi(-)$  sont très favorisées en présence du polynucléotide poly(dAT)-poly(dAT) (Shin et Eichhorn, 1984).

Par ailleurs, il est remarquable que le peptide S<sub>2</sub> n'induit pas la formation de structures  $\psi$  en présence d'ADN de thymus de veau (**Figure 18b**) et de l'homopolymère polydA-polydT (**Figure 18c**) alors que l'interaction du peptide (KTPKKAKKP)<sub>2</sub> avec l'ADN de sperme de saumon et polydA-polydT révèle des condensations en phases  $\psi(-)$  et  $\psi(+)$ , respectivement (Erard *et al.*, 1990; Kharrat *et al.*, 1991). Ceci est imputable à la taille et à la densité de charges positives plus importantes de ce dernier peptide. Néanmoins, cette étude prouve qu'un peptide plus petit (8 acides aminés au lieu de 18) est suffisant pour provoquer une condensation de l'ADN.

Le mécanisme à la base de ce phénomène fait très certainement intervenir les groupements  $\epsilon$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> des lysines qui sont susceptibles de neutraliser des phosphates de la séquence de liaison reconnue par le peptide ou d'autres molécules d'ADN adjacentes (réalisation de pontages non covalents entre des molécules voisines). Ces motifs basiques peuvent aussi provoquer des courbures ou "bendings" dans les séquences AT reconnues, à la manière de la spermine (Marquet et Houssier, 1988) et



**Figure 18** : Spectres de dichroïsme circulaire du peptide SPKKSPKK ( $S_2$ ) seul (a) et de ses complexes avec l'ADN de thymus de veau (b) et les polynucléotides polydApolydT (c) et poly(dAT)poly(dAT) (d-f). L'ellipticité  $[\theta]$  ( $\times 10^{-4}$ ) est exprimée en  $\text{deg.cm}^2.\text{dmole}^{-1}$  par rapport à la concentration d'ADN.

de la protéine IHF (White *et al.*, 1989) qui contribuent à la compaction, notamment en particules toroïdales (Marquet et Houssier, 1988; Marquet *et al.*, 1985).

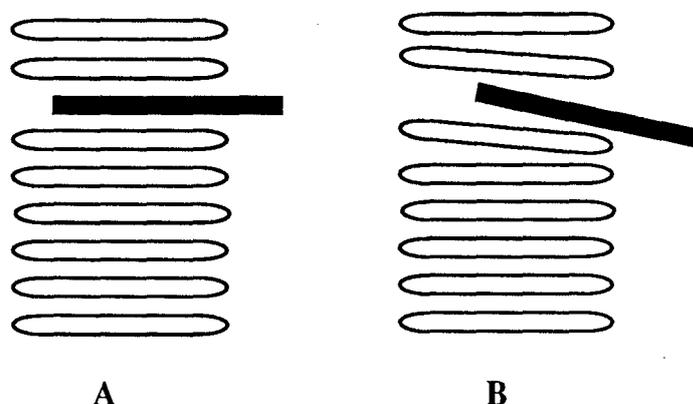
## Discussion

L'intercalation du chromophore acridine des ligands hybrides (1) et (2) a été prouvée expérimentalement. La viscosimétrie attribue à ces deux molécules un pouvoir intercalant similaire. Cependant le dichroïsme linéaire et la méthode de transfert d'énergie apportent des informations supplémentaires. Pour (1), la valeur du dichroïsme à 440 nm (bande d'absorption de l'acridine) est voisine de celle de l'ADN à 260 nm tandis que l'accessibilité de l'aromatique (0,26) à la sonde de terbium est légèrement supérieure à celle de la glycydanilinoamino-9 acridine (0,19). Le composé (2) présente un dichroïsme inférieur à celui de l'ADN et une accessibilité de l'acridine assez élevée (0,33) tout comme NetGA.

Compte-tenu de ces résultats, nous proposons les modèles suivants d'interaction de (1) et (2) avec l'ADN (**Figure 19**) :

- le chromophore acridine de (1) est orienté parallèlement au plan des plateaux de paires de bases mais son recouvrement avec les plateaux de bases n'est pas total ;

- le parallélisme entre l'acridine de (2) et les plateaux de bases n'est pas respecté. Dans ce cas, l'aromatique est positionné de manière légèrement externe par rapport à la double hélice d'ADN.



**Figure 19:** Représentations schématiques du mécanisme d'intercalation potentiel du chromophore acridine des ligands hybrides (1) (A) et (2) (B).

Comme les peptides seuls ont peu d'affinité pour l'ADN (cf 1-2-1)), l'intercalation doit être le processus primaire d'interaction de ces ligands hybrides. De cette manière, un premier ancrage à l'ADN des peptides est permis. Ceux-ci, ensuite, peuvent se positionner de façon beaucoup plus affine à l'intérieur du petit sillon de leur site de liaison en perturbant simultanément l'intercalation du chromophore acridine. Néanmoins on ne peut pas exclure l'hypothèse que le processus primaire de liaison à l'ADN des molécules hybrides soit la fixation du fragment peptidique. Cette fixation probablement externe pourrait se caractériser par une constante de dissociation importante et l'intercalation de la partie acridine, en renforçant l'affinité du peptide pour l'ADN, diminuerait par là même cette dissociation défavorable.

Si la fixation de la chaîne peptidique perturbe le processus intercalatif et donc la conformation de l'ADN au niveau du site d'intercalation, il ne faut pas pour autant oublier les altérations conformationnelles induites par l'acridine même à savoir une détorsion et une élongation de l'ADN. Il est certain que la déformation conformationnelle globale résultant de l'interaction de (1) et (2) avec l'ADN est complexe, comme cela a été constaté pour tous les ligands hybrides étudiés à ce jour (Bailly et Hénichart, 1992).

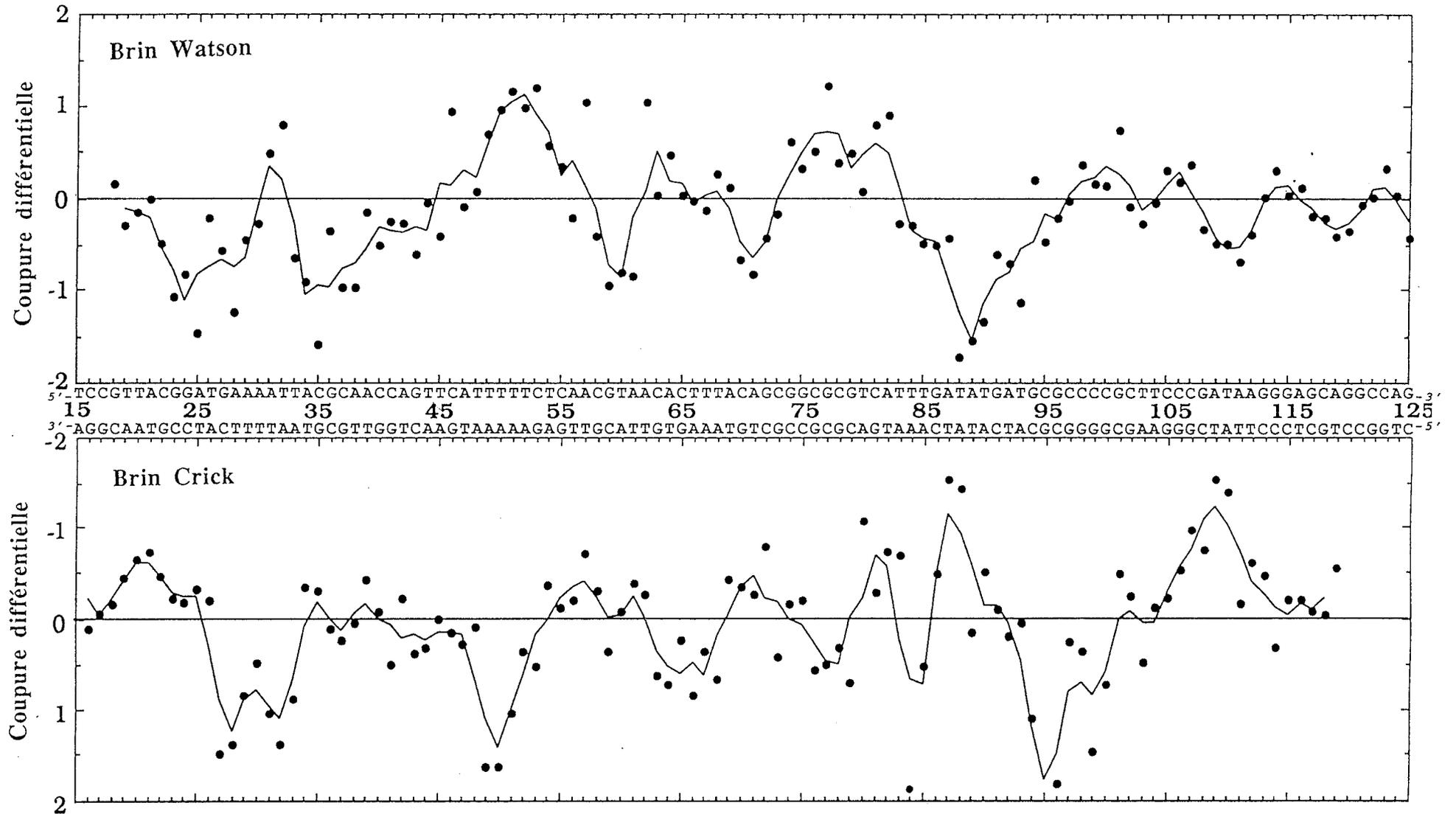
Il est nécessaire enfin de rappeler que les données expérimentales recueillies montrent un mode d'interaction de (2) avec l'ADN très voisin de celui de NetGA et, à ce titre, l'analogie établie par M.Suzuki entre l'octapeptide SPKKSPKK et la nétropsine se trouve confirmée par nos résultats.

### 1-2-3) Sélectivité de liaison

Dans le but de déterminer une sélectivité de liaison éventuelle, les deux ligands hybrides ont été étudiés par la technique des empreintes ou "footprinting" à l'aide d'agents de coupure enzymatique (DNAase I) et chimique (radicaux hydroxyle générés par le complexe Fe(II)-EDTA. La modification par l'agent chimique OsO<sub>4</sub>/pyridine et le dichroïsme linéaire électrique ont aussi apporté des résultats complémentaires.

#### \* Footprinting à la DNAase I (voir p.135)

La figure 20 montre une analyse densitométrique de la coupure par la DNAase I du fragment d'ADN *tyr T* de *E. Coli* incubé en présence de (2). Le site de liaison de (2) le plus protégé de l'attaque enzymatique se situe autour de la position 87 et consiste en une séquence de sept à dix paires de bases. D'autres sites de liaison plus faibles souvent à caractère séquentiel mixte (AT/GC) sont présents. Globalement les "footprints" des deux brins sont en bonne concordance, excepté pour le site autour de la position 40 qui n'est protégé par (2) que sur le brin 5'---> 3' (appelé brin Watson). Par ailleurs, on constate que d'autres séquences (positions 50 et 77 du brin Watson; positions 30, 50 et 97 du brin Crick) présentent un taux de coupure par la DNAaseI augmenté en présence de (2). Il s'agit d'enchaînements homopolymériques en adénine et thymine (c'est-à-dire 5'-(AA..)<sub>n</sub>-3' et 5'-(TT...)<sub>n</sub>-3') ou de séquences riches en résidus GC. Les taux de coupure plus élevés résultent de la redistribution de l'enzyme le long de la séquence d'ADN ou plus vraisemblablement de l'apparition de changements conformationnels de l'ADN (Goodisman et Dabrowiak, 1992). Les perturbations de la structure de la double hélice induites par la fixation de (2) rendraient ainsi certaines séquences d'ADN plus facilement accessibles à la DNAaseI. On ne peut donc exclure le fait que la liaison du composé (2) sur certaines séquences soit défavorisée par de telles déformations de l'ADN. D'autres techniques complémentaires devront être mises en oeuvre. Dans les mêmes conditions expérimentales, aucun footprint n'est observé lors de la fixation de (1) sur le fragment *tyr T*.

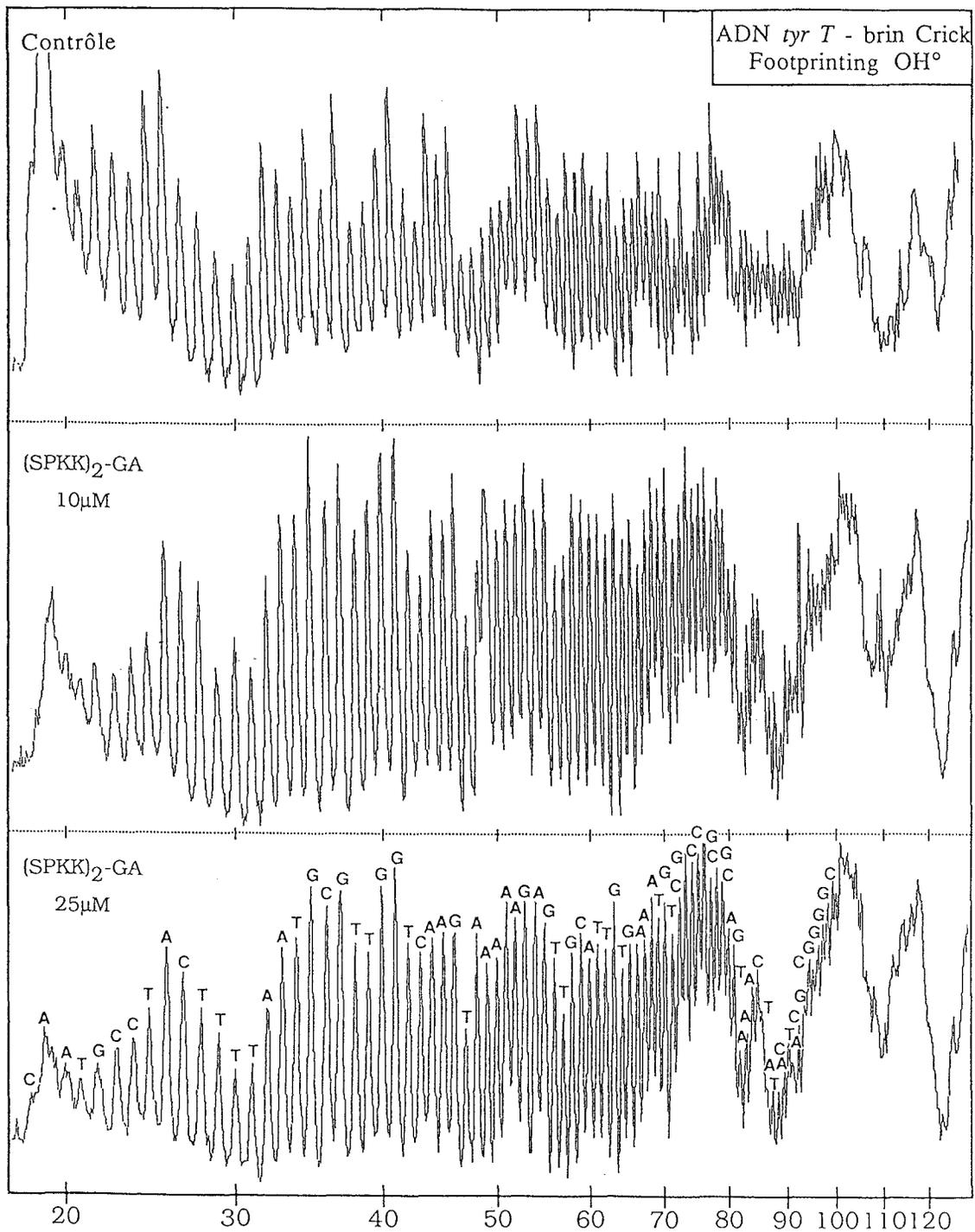


**Figure 20:** Coupe différentielle des brins Watson et Crick du fragment *tyr T* induite par la DNAaseI en présence du ligand hybride (2). Les zones d'intensités de coupe négatives correspondent aux sites de liaison de (2) et les zones d'intensités positives à des sites rendus plus accessibles à l'enzyme.

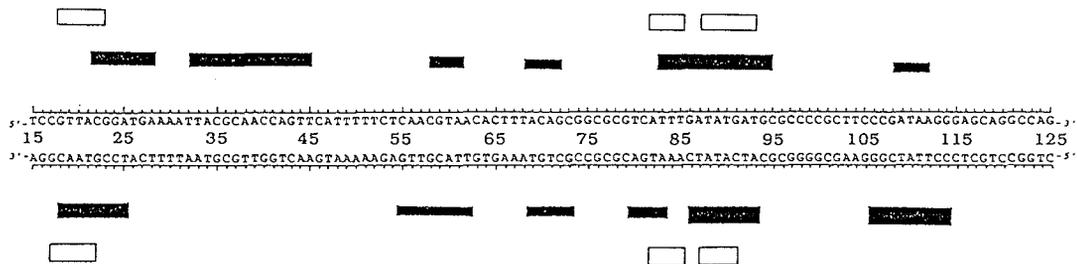
**\* Footprinting aux radicaux hydroxyle (voir p.135)**

Le radical hydroxyle est un agent de coupure beaucoup moins sensible que la DNAase I aux variations structurales de l'ADN. Dans ces conditions, les différences entre les taux de coupure sont moins évidentes et une analyse densitométrique très fine est nécessaire pour identifier des sites protégés par des ligands (**Figure 21**). Comme précédemment avec la DNAase I, d'éventuels sites de liaison de (1) n'ont pu être détectés. Par contre, le composé (2) protège certaines séquences de l'attaque radicalaire (**Figure 21**) à des concentrations 5 à 15 fois supérieures à celles utilisées lors de l'expérience avec la DNAase I, ce qui traduit la plus grande sensibilité de la DNAase I.

Ainsi deux zones de protection majeures sont observées autour de la position 20 et entre les positions 82 et 93. Ce sont des sites qui ont déjà été identifiés avec la DNAase I (**Figure 22**). Il faut néanmoins remarquer que les radicaux hydroxyle permettent une résolution encore meilleure de la protection de la séquence 82-93: celle-ci est en fait constituée de deux sites de liaison adjacents de quatre à cinq paires de bases chacun situés aux positions 82 et 88. D'autres zones du fragment d'ADN protégées de l'attaque par la DNAase I (positions 58, 70 et 110) voient au contraire leur réactivité aux radicaux hydroxyle inchangée. Ces trois sites de liaison du composé (2) (positions 20, 82 et 88) consistent tous en des séquences riches en AT non homopolymériques situées à proximité de paires de bases GC. La différence majeure du composé hybride (2) par rapport à l'octapeptide basique seul est qu'il ne reconnaît plus les zones homopolymériques riches en adénine et thymine situées autour des positions 30 et 50 (Churchill et Suzuki, 1989). Ceci reflète indubitablement une influence restrictive de l'intercalation du chromophore aromatique sur la liaison adjacente du motif peptidique.



**Figure 21:** Analyse densitométrique de la coupure par les radicaux hydroxyle du fragment d'ADN *tyr T* seul (contrôle) puis en présence de concentrations croissantes en composé (2) (ou (SPKK)<sub>2</sub>-GA).



**Figure 22:** Comparaison des sites de liaison du composé (2) déterminés par les méthodes de footprinting à la DNAse I (rectangles noirs) et aux radicaux hydroxyle (rectangles blancs). L'épaisseur des rectangles est fonction de l'importance de la protection contre l'attaque des agents de coupure induite par la fixation de (2).

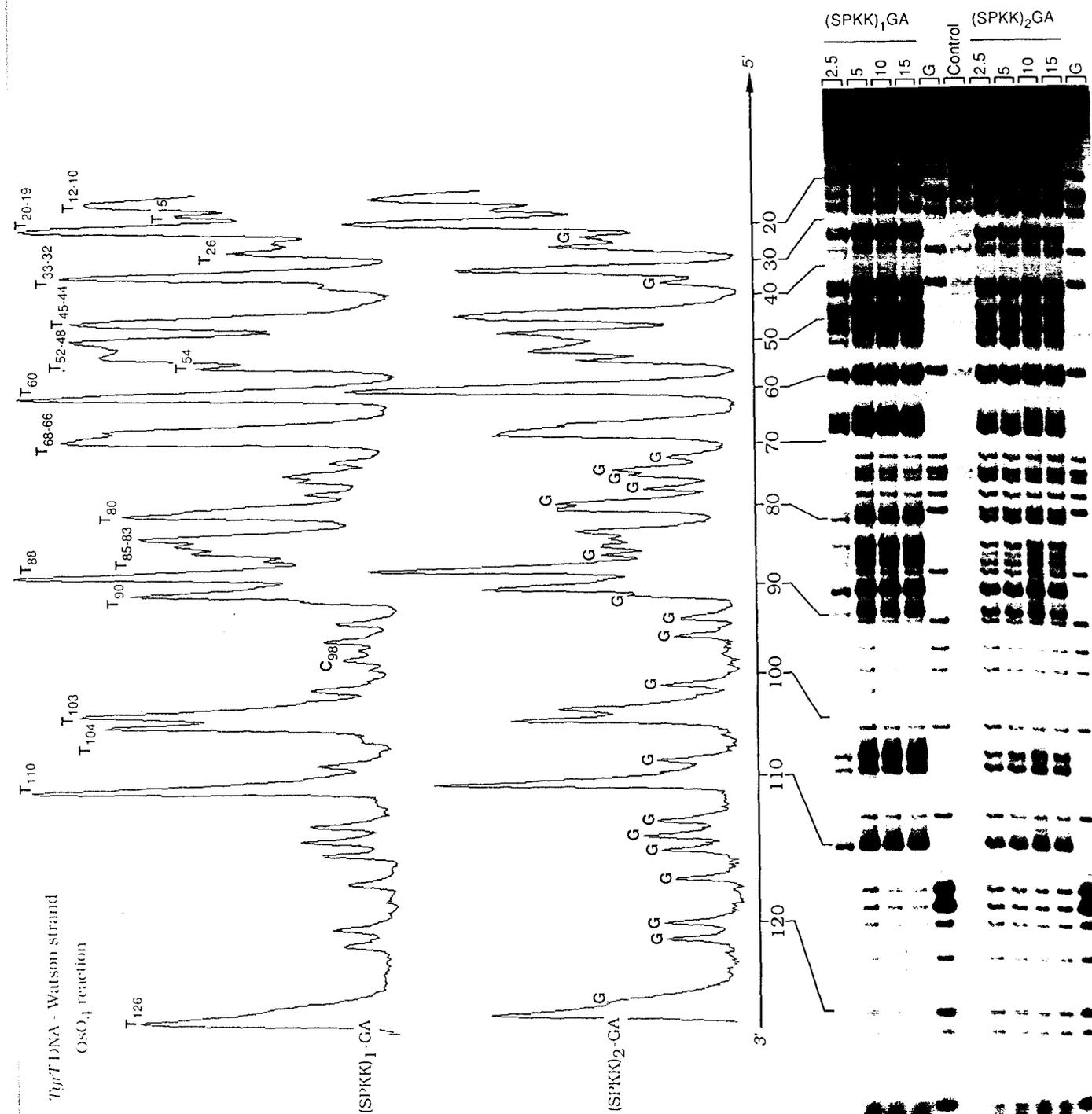
### \* Modification chimique par l'agent tétroxyde d'osmium/pyridine

La **figure 23** illustre une étude comparative de la réactivité du brin Watson du fragment *tyr T* en absence et en présence des composés hybrides (1) et (2).

Pour l'ADN seul, des intensités faibles de coupure sont observées au niveau des guanines. Celles-ci ne résultent pas de la réaction de ces bases avec le tétroxyde d'osmium qui est spécifique des pyrimidines mais du traitement alcalin (pipéridine 1M, 30 min., 90°C) effectué après l'incubation en présence de OsO<sub>4</sub>. Un tel traitement provoque très souvent des coupures au niveau des guanines du fait de leur faible stabilité dans ces conditions excessives.

En présence de (2), une hyperréactivité de certaines thymines se manifeste; celles-ci sont d'ailleurs fréquemment situées à l'intérieur ou à la proximité de sites de liaison de (2) (cf 1-2-2)). De même la fixation de (1) sur l'ADN induit des sites d'hyperréactivité similaires (**Figure 23**). Néanmoins une différence notable au niveau du triplet de thymines des positions 83-85 est observée: celles-ci sont plus accessibles à l'agent OsO<sub>4</sub> en présence de (1). Or ces bases font partie d'un site majeur de reconnaissance de (2) identifié par les deux méthodes de footprinting utilisées.

Sachant qu'aucun footprinting de (1) n'a été mis en évidence, que ce soit au niveau de ce site ou sur une autre séquence du fragment, ceci montre de manière indirecte une différence notable entre les sélectivités de liaison des deux molécules hybrides. Il apparaît qu'un fragment peptidique contenant au moins deux motifs SPKK est nécessaire pour obtenir une sélectivité AT suffisante.



**Figure 23** : Comparaison de la réactivité à l'agent  $\text{OsO}_4$ /pyridine des bases thymines du fragment *tyr T* (brin Watson) en présence des composés (1) et (2) (ou  $(\text{SPKK})_1\text{GA}$  et  $(\text{SPKK})_2\text{GA}$  respectivement).

### \* Dichroïsme linéaire électrique

Une étude de l'interaction de (1), (2), de l' amino-9 acridine et de la glycy l anilinoamino-9 acridine avec des ADN naturels et des polynucléotides de compositions variées (variation du pourcentage de résidus GC de 0 à 100%) a été effectuée par dichroïsme linéaire électrique. Le paramètre mesuré lors de cette étude est le rapport:  $(\Delta A/A \text{ ligand } 440)/(\Delta A/A \text{ ADN } 260)$  (Abréviation: RD). Il s'agit du dichroïsme réduit du ligand mesuré en présence d'ADN dans la bande d'absorption de l'acridine (à 440 nm) divisé par le dichroïsme réduit de l'ADN seul à 260 nm. La comparaison des valeurs de ce rapport RD pour un ligand en fonction de la composition des polynucléotides permet dès lors d'appréhender sa sélectivité globale de liaison.

Ainsi l' amino-9 acridine possède une sélectivité GC avec des valeurs RD maximales pour le polydG-polydC et le poly(dGC)-poly(dGC) et minimales pour le polydA-polydT et le poly(dAT)-poly(dAT) (**Tableau VII**), en accord avec les données bibliographiques (Feigon *et al.*, 1984). L'addition d'une chaîne N-glycylaniline à ce chromophore modifie de façon surprenante cette sélectivité puisque la liaison de la glycy lanilinoamino-9 acridine au polydG-polydC (RD= 0,876) est fortement défavorisée comparativement à celle au poly(dAT)-poly(dAT) (RD= 1,168) et au polydA-polydT (RD= 0,961). Ce gain notable en sélectivité AT n'exclut pas pour autant la liaison aux résidus GC car les valeurs RD de poly(dGC)-poly(dGC) et des ADN de compositions intermédiaires sont aussi importantes.

En résumé, le classement des différents ADN suivant l'ordre croissant des RD est le suivant:

polydG-polydC < polydA-polydT < poly(dGC)-poly(dGC)  $\equiv$  thymus de veau (ou C.T.; 42% GC) < *Clostridium perfringens* (ou C.P.; 23% GC) < poly(dAT)-poly(dAT) < *Micrococcus lysodeikticus* (ou M.L.; 72% GC)

Les ordres croissants des RD sont de même établis pour les ligands hybrides:

polydA-polydT < polydG-polydC < C.T. < M.L.  $\equiv$  poly(dGC)-poly(dGC) < poly(dAT)-poly(dAT) < C.P., pour (1)

et

polydA-polydT < M.L. < polydG-polydC < poly(dGC)-poly(dGC) < C.T. < C.P. < poly(dAT)-poly(dAT) pour (2).

ADN	%GC	RD (1)	RD (2)	RD GA	RD AA
$\Delta A/A$ ADN (260)	100	0,815	0,766	0,876	1,087
poly(dGC)-poly(dGC)	100	0,981	0,903	1,085	1,139
<i>Micrococcus lysodeik.</i>	72	0,981	0,723	1,212	0,975
Thymus de veau	42	0,959	1,068	1,090	1,084
<i>Clostridium perfr.</i>	23	1,137	1,191	1,111	0,992
poly(dAT)-poly(dAT)	0	1,122	1,226	1,168	0,815
polydA-polydT	0	0,695	0,376	0,961	0,843

**Tableau VII** : Rapports de dichroïsmes réduits (RD) des composés hybrides (1) et (2), de la glycyanilinoamino-9 acridine (GA) et de l' amino-9 acridine (AA) pour des ADN naturels et des polynucléotides de compositions variées. Le rapport RD est égal à:  $[\Delta A/A \text{ ADN+ligand (440 nm)}]/[\Delta A/A \text{ ADN (260 nm)}]$ . Les expériences ont été effectuées à un rapport ligand/ADN de 0,1 (100 $\mu$ M en ADN) et à un champ électrique de 13,2 kV/cm.

Il est clair que, dans le cas des molécules hybrides, la liaison est fortement avantagée avec le polynucléotide poly(dAT)-poly(dAT) et l'ADN *Clostridium perfringens* comparativement à l'homopolymère polydA-polydT. L'écart entre les RD du poly(dAT)-poly(dAT) et du polydA-polydT est tout aussi significatif puisqu'un facteur de 1,2, 1,6 et 3,2 sépare ces valeurs pour la glycyanilinoamino-9 acridine, (1) et (2) respectivement.

Selon ces résultats, les molécules hybrides (1) et (2) démontrent donc une certaine sélectivité pour les enchaînements AT alternés pouvant inclure occasionnellement des résidus GC comme c'est le cas dans l'ADN *Clostridium perfringens* (23% de résidus GC). Le chromophore glycyanilinoamino-9 acridine

joue un rôle certain dans cette sélectivité puisque sa liaison au poly(dAT)-poly(dAT) et au *Clostridium perfringens* est favorisée. Par ailleurs la préférence nette de (1) et (2) pour le polymère alterné poly(dAT)-poly(dAT) au détriment de l'homopolymère polydA-polydT met en évidence l'intervention des motifs SPKK car ce phénomène est beaucoup moins marqué au sein de la glycy lanilinoamino-9 acridine. Plus la taille de la chaîne peptidique est importante, plus cette préférence pour les enchaînements AT alternés croît. La sélectivité AT mise en évidence par les techniques de footprinting est ainsi confirmée par les mesures de DLE.

Par conséquent, les mêmes études ont été effectuées sur l'octapeptide SPKKSPKK (S<sub>2</sub>) pour essayer de révéler une sélectivité éventuelle de ce peptide.

Comme S<sub>2</sub> ne possède pas de bande d'absorption caractéristique (à des longueurs d'onde supérieures à 260nm), une nouvelle définition du rapport RD a dû être adoptée:  $RD' = (\Delta A/A \text{ ADN}/S_2 \text{ 260}) / (\Delta A/A \text{ ADN 260})$ . Il s'agit du dichroïsme réduit de l'ADN à 260 nm en présence de peptide divisé par le dichroïsme du même ADN en absence du peptide. Les valeurs du **tableau VIII** ne mettent en évidence aucune sélectivité particulière du peptide.

Le classement des ADNs par ordre croissant des RD' est:

poly(dGC)-poly(dGC) < poly(dAT)-poly(dAT) = polydA-polydT < polydG-polydC < *Micrococcus bysodeikticus* < *Clostridium perfringens* < thymus de veau.

La différence séparant les valeurs RD' du polydA-polydT, 1,23 et de l'ADN *Clostridium perfringens*, 1,32 est faible, ce qui montre un comportement similaire du peptide vis-à-vis de ces deux ADN et de tous ceux dont le RD' est compris entre 1,23 et 1,32. De manière surprenante, en présence de thymus de veau, la valeur RD' observée de 1,46 est légèrement supérieure.

Néanmoins, ces résultats doivent être considérés avec précaution car ils sont à relier en fait à l'effet du peptide sur la conformation de l'ADN plutôt qu'à son interaction proprement dite. De plus le manque de sélectivité constaté peut être attribué au fait que l'étude a été réalisée à un rapport peptide/ADN de 0,1 alors qu'en dichroïsme circulaire, des changements de spectre significatifs n'ont été observés qu'à partir d'un rapport de 0,2 au moins (cf 1-2-2)).

ADN	% GC	$\Delta A/A$ (ADN) (260 nm)	$\Delta A/A(ADN+S_2)$ (260 nm)	$\frac{\Delta A/A(ADN+S_2)}{\Delta A/A(ADN)}$
polydG-polydC	100	-0,236	-0,299	1,26
poly(dGC)-poly(dGC)	100	-0,137	-0,140	1,02
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	72	-0,320	-0,411	1,28
Thymus de veau	42	-0,340	-0,499	1,46
<i>Clostridium perfringens</i>	23	-0,319	-0,423	1,32
poly(dAT)-poly(dAT)	0	-0,371	-0,457	1,23
polydA-polydT	0	-0,263	-0,323	1,23

**Tableau VIII** : Influence du peptide SPKKSPKK (ou  $S_2$ ) sur le dichroïsme linéaire d'ADNs et de polynucléotides de compositions variées.  $\Delta A/A(ADN)$  correspond au dichroïsme réduit de l'ADN (100  $\mu M$ ) et  $\Delta A/A(ADN+S_2)$  au dichroïsme du même ADN en présence du peptide  $S_2$  (10  $\mu M$ ). Les mesures sont effectuées à 260 nm à un champ électrique  $E$  de 13,2 kV/cm.

**Remarque** : Cette méthode de mesure de rapports de dichroïsmes réduits a été appliquée récemment à une vingtaine de ligands de l'ADN et s'avère très fiable car les conclusions tirées à propos de la sélectivité et du mode d'interaction de ces ligands sont parfaitement en accord avec les données bibliographiques existantes (Bailly *et al.*, 1992c).

## Discussion

Les résultats issus de l'analyse de la sélectivité de liaison des molécules hybrides par les méthodes de footprinting (à la DNAase I et aux radicaux hydroxyle) et par le dichroïsme linéaire électrique concordent pour établir que les sites préférentiels de liaison de ces molécules consistent en des enchaînements AT alternés situés à proximité de résidus GC. Leur liaison aux séquences d'adénine et de thymine homooligomériques est de plus fortement défavorisée, contrairement au peptide basique seul. Ceci met clairement en évidence le changement de sélectivité résultant de l'introduction du chromophore intercalant glycydanilino-9 acridine sur les motifs peptidiques. Celui-ci possède certes une légère sélectivité de liaison pour les séquences AT alternées au détriment des séquences homooligomériques correspondantes mais beaucoup moindre que celle des ligands hybrides: les fragments peptidiques jouent donc un rôle dans cette sélectivité et apportent une affinité supplémentaire nécessaire à la stabilisation du complexe ligand/ADN, les deux propriétés sélectivité et affinité étant étroitement liées. Ceci est d'autant plus justifié qu'un gain de sélectivité notable est obtenu lorsque le nombre de motifs SPKK est multiplié par deux et l'une des preuves expérimentales les plus fortes est qu'aucun site de liaison de (1) à l'ADN n'a pu être identifié par footprinting, contrairement à (2). Pour expliquer cette sélectivité, on peut émettre l'hypothèse que les séquences AT alternées s'accommodent mieux des contraintes conformationnelles certaines (cf 1-2-2)) induites par la fixation des molécules hybrides par rapport aux séquences homooligomériques d'adénine et de thymine. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que les séquences  $(A)_n:(T)_n$  et  $(AT)_n:(AT)_n$  présentent des propriétés conformationnelles différentes. Les séquences  $(A)_n:(T)_n$  sont rigides et se caractérisent par des structures courbes résultant de phénomènes de "bending" alors que les séquences  $(AT)_n:(AT)_n$  sont plus flexibles (Crothers *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1985b). Il en résulte que l'adaptation conformationnelle réciproque du ligand hybride pour une séquence d'ADN et vice-versa pourrait être meilleure dans le cas des enchaînements alternés AT.

## Conclusion

Une analyse détaillée de l'interaction avec l'ADN des composés (1) et (2) a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques variées. Le concept "ligand hybride" s'est tout d'abord révélé utile si l'on considère l'importance des constantes d'affinité obtenues, bien supérieures à celles des fragments peptidique et aromatique seuls. (1) et (2) présentent tous deux une interaction bifonctionnelle avec l'ADN faisant intervenir d'une part une fixation vraisemblablement dans le petit sillon du motif peptidique et d'autre part une intercalation du chromophore acridine entre les plateaux de paires de bases. Néanmoins la fraction peptidique perturbe de façon certaine le processus d'intercalation de l'acridine et ce phénomène est d'autant plus marqué que la taille du peptide croît. Ainsi, pour le composé (2), une intercalation partielle se produit comme cela avait été constaté pour la molécule hybride nétoprsine-acridine NetGA (Bailly *et al.*, 1990a). A ce titre, l'analogie entre le motif peptidique SPKKSPKK et la nétoprsine proposée par Suzuki (Suzuki, 1989a) est applicable aux molécules hybrides correspondantes, (2) (c'est-à-dire SPKKSPKKGA) et NetGA.

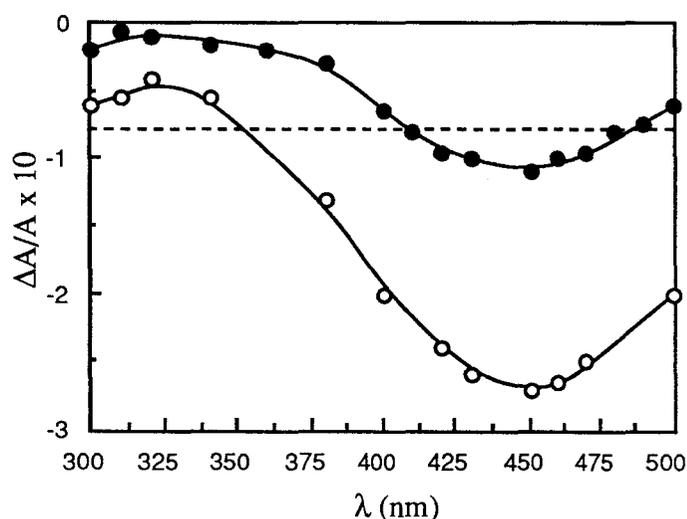
Enfin une **sélectivité de liaison aux enchaînements alternés AT** situés à proximité de plateaux GC a été démontrée pour les deux ligands. Cette sélectivité exclut de façon notoire les séquences d'adénine ou de thymine homooligomériques qui sont reconnues préférentiellement par les motifs SPKK (Churchill et Suzuki, 1989) et est, elle-aussi, fonction de la taille du fragment peptidique, le composé (2) présentant une sélectivité bien supérieure à celle de son homologue (1).

### 1-3) Interaction avec la chromatine

Les modalités d'interaction des ligands hybrides (1) et (2) avec l'ADN seul ont été précisément établies. Néanmoins la majorité de l'ADN des cellules eucaryotes est intégrée au sein de la chromatine qui fait intervenir, par ordre de complexité croissante, la structure nucléosomale puis celle de la fibre de 30 nm. Cette complexité structurale ainsi que la présence de protéines (dont les principales sont les histones) peuvent réduire *in vivo* l'accessibilité à l'ADN de ligands. C'est pourquoi nous avons effectué une étude de l'interaction *in vitro* de (1) et (2) avec de la chromatine purifiée (voir p.127) afin de mieux nous rapprocher de la situation rencontrée *in vivo*.

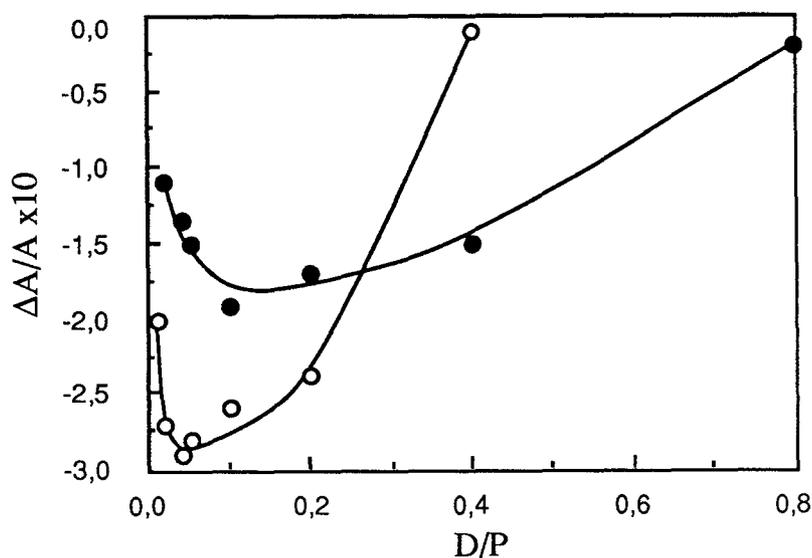
#### \* Dichroïsme linéaire électrique

Si l'on admet que la fibre chromatinienne s'oriente parallèlement à l'axe du champ électrique (Hagman *et al.*, 1989), les dichroïsmes négatifs de la chromatine à 260 nm et des deux ligands à 440 nm suggèrent qu'un processus d'intercalation du chromophore acridine a bien lieu pour (1) et (2). Le composé (2) présente un dichroïsme à 440 nm de -0,11 légèrement plus important que celui de la chromatine à 260 nm (-0,08) (Figure 24). Cette situation est parfaitement semblable à celle déjà reportée pour le composé NetGA (Baillly *et al.*, 1992b). En outre le dichroïsme de (1) est largement supérieur à celui de (2) (d'un facteur 2,5) (Figure 24).



**Figure 24** : Spectres de dichroïsme électrique des complexes (1)-chromatine (○) et (2)-chromatine (●) à un rapport ligand/chromatine de 0,02 et à un champ électrique de 13 kV/cm. Le pointillé montre la valeur du dichroïsme de la chromatine seule à 260 nm.

L'influence du rapport ligand/ADN (D/P) a aussi été examinée (**Figure 25**). Pour les deux ligands, un phénomène de précipitation se produit pour des valeurs D/P supérieures à 0,4, ce qui a provoqué une augmentation notable de leurs absorbances à 440 nm. C'est pourquoi les courbes de la **figure 25** ne sont significatives que pour les D/P inférieures à 0,2. Celles-ci présentent des maxima de dichroïsme à des D/P de 0,03 et 0,1 pour (1) et (2) respectivement et l'on retrouve comme précédemment une différence notable entre les valeurs de dichroïsme de (1) et (2). Ces premières mesures laissent penser qu'en présence de chromatine le composé (2) présente un pouvoir intercalant nettement inférieur à celui de (1), comme dans le cas de l'ADN. Nous n'avons pu appréhender la liaison des motifs SPKK puisque ces peptides ne possèdent pas de bande d'absorption caractéristique en UV (à des longueurs d'onde supérieures à 260 nm). Il faut rappeler que, pour le composé NetGA, la fixation du fragment nétopisine à la chromatine reste qualitativement la même par rapport à l'ADN seul (Bailly *et al.*, 1992b).



**Figure 25** : Dichroïsme linéaire électrique ( $\Delta A/A$ ) à 440 nm et à un champ électrique de 13 kV/cm des complexes (1)-chromatine (○) et (2)-chromatine (●) en fonction du rapport ligand/chromatine (D/P).

Par ailleurs les rapports du dichroïsme des complexes ligand/chromatine à 440 nm au dichroïsme de la chromatine seule à 260 nm ou  $[(\Delta A/A)_{\text{ligand+chrom.}(440)}]/[(\Delta A/A)_{\text{chrom.}(260)}]$  sont de 3 et 2 pour (1) et (2)

respectivement ( $E = 13 \text{ kV/cm}$ ;  $D/P = 0,2$ ; **Figure 25**). Ces valeurs élevées des rapports de dichroïsme pourraient traduire un déroulement du nucléosome induit par la liaison des composés (1) et (2). Mais ceci est exclu par le fait que le dichroïsme de la chromatine à 260 nm varie peu en présence des ligands alors que, dans une telle situation, il devrait augmenter de façon notable. Il est en revanche plus plausible que (1) et (2) se lient préférentiellement à l'ADN linker car cet ADN est beaucoup plus accessible que l'ADN nucléosomal et sa capacité à s'orienter dans un champ électrique est nettement plus forte.

En résumé, les ligands hybrides (1) et (2) semblent interagir avec la chromatine au niveau de l'ADN linker. Cette fixation s'effectue d'autant mieux que le potentiel intercalant de la molécule est important.

**\* Transfert d'énergie de fluorescence de chélates de terbium exalté par la diffusion (ou méthode DEFET)**

Le facteur d'accessibilité réduit de l'acridine (facteur  $a'$ ) du composé (1) reste quasiment inchangé quand on passe de l'ADN (0,26) à la chromatine (0,24) (**Tableau IX**).

Ligand	$k_b^\circ$ ( $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$k_f^\circ$ ( $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$J_f$ $J_b$		a	$a'$	$a'$ (DNA)	a (DNA)
			( $10^{-15} \text{ M} \cdot \text{cm}^{-3}$ )					
(1)	0,567	2,788	1,57	1,32	0,20	0,24	0,26	0,20
(2)	0,678	1,544	0,716	3,46	0,43	0,09	0,31	0,28

**Tableau IX** : Paramètres du transfert d'énergie de fluorescence entre le chélate de terbium  $\text{TbHED3A}^\circ$  et les accepteurs (1) et (2) liés à la chromatine.  $a$  est le facteur d'accessibilité défini selon Wensel *et al.* (1985) et  $a'$  le facteur d'accessibilité réduit selon notre définition.

Apparemment la situation est totalement différente pour (2) puisque le facteur  $a'$  en présence de chromatine (0,09) est fortement diminué comparativement à l'ADN (0,31). Néanmoins cette valeur faible doit être prise avec précaution puisqu'elle résulte principalement d'une augmentation importante de l'intégrale de recouvrement. Or le calcul de cette intégrale est relativement délicat et imprécis puisque le composé (2) possède une absorbance faible dans la région 450-700 nm (les deux limites du spectre d'émission de fluorescence du chélate de terbium utilisé) (voir p.130). Par contre, si l'on considère les facteurs d'accessibilité selon la première définition de Wensel *et al.* (1985) (voir p.130), il apparaît que l'acridine de (2) est plus accessible à la sonde de terbium en présence de chromatine ( $a = 0,43$ ) plutôt qu'en présence d'ADN ( $a = 0,28$ ) alors que le composé (1) se comporte à nouveau de façon similaire dans les deux cas (Tableau IX). Cette donnée est corroborée par le fait qu'aucun effet hypochromique significatif n'est observé par spectroscopie d'absorption UV lors de l'interaction de (2) avec la chromatine, contrairement à la situation établie avec l'ADN (cf 1-2-1)).

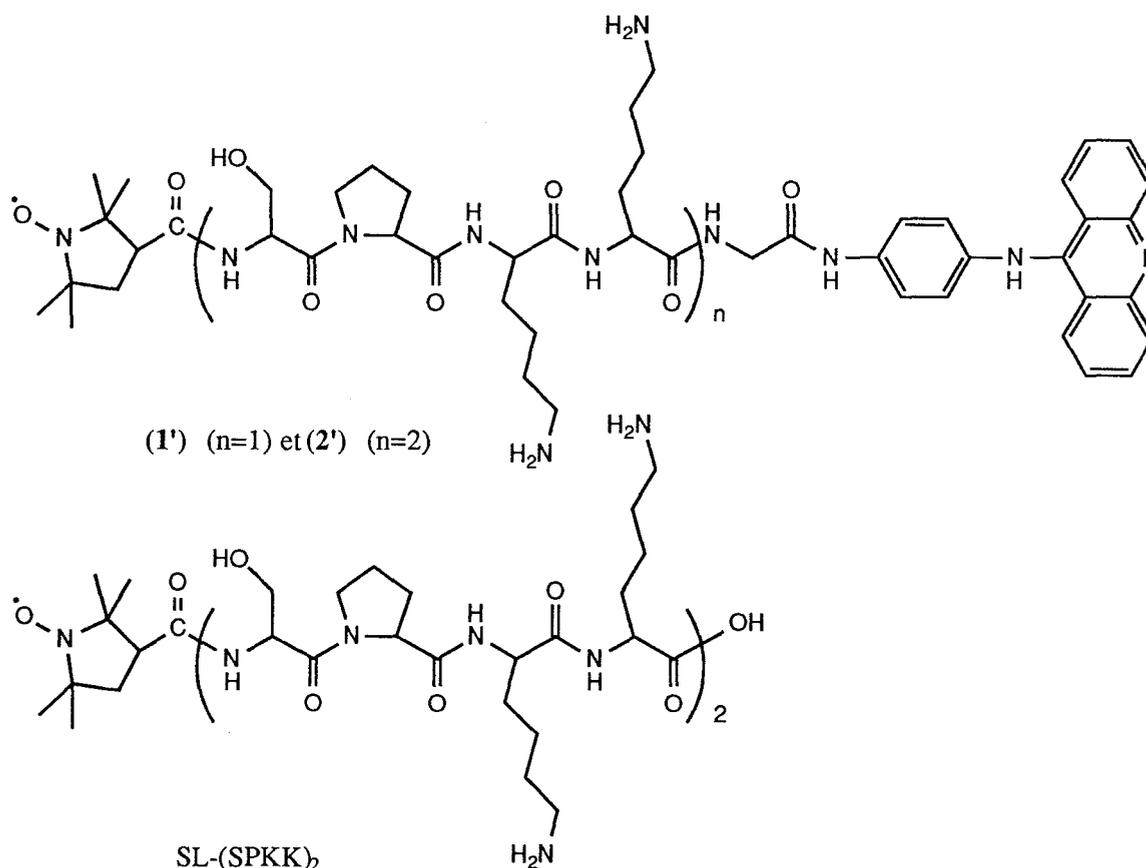
## Conclusion

L'incorporation de l'ADN au sein de la structure chromatinienne ne modifie pas la fixation du composé (1). Au contraire, l'interaction de (2) avec la chromatine se trouve défavorisée. Comme une différence entre les potentiels intercalants des deux molécules comparable à celle établie en présence d'ADN est observée, ce phénomène est certainement imputable à la taille de la chaîne peptidique plus importante du ligand (2). L'analogie d'interaction avec l'ADN de (2) et de NetGA ne semble donc plus valable avec la chromatine puisqu'il a été montré que NetGA se fixe à l'ADN et à la chromatine de manières similaires (Bailly *et al.*, 1992b).

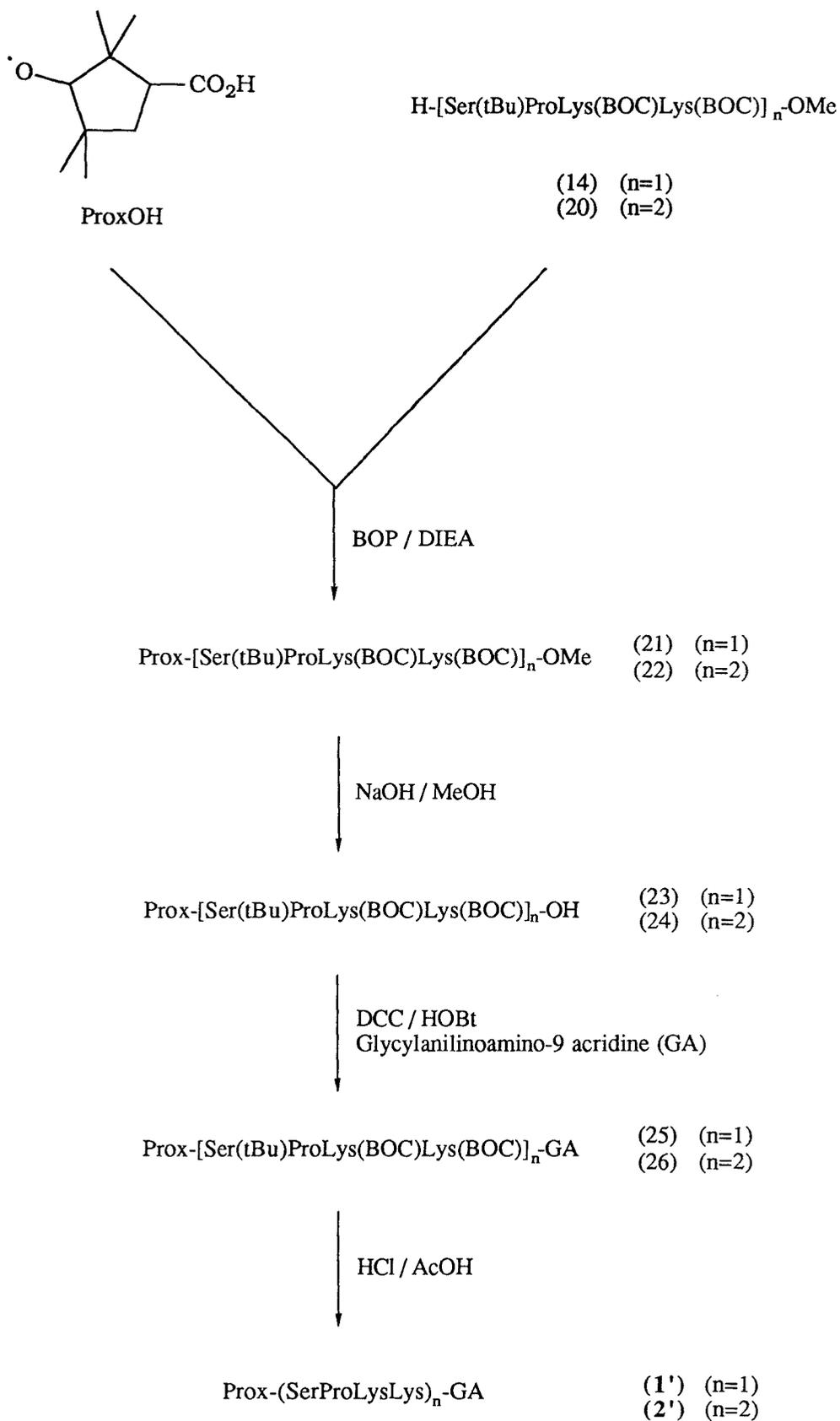
## 1-4) Activité biologique

### 1-4-1) Pénétration cellulaire (voir p.140)

Pour que la sélectivité de liaison de (1) et (2) ait des répercussions physiologiques, encore faut-il vérifier que ces composés possèdent des propriétés de pénétration cellulaire. Pour cela un marqueur de spin (en l'occurrence l'acide 2,2,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxylique ou 3-carboxy-propyl) a été greffé sur l'extrémité N-terminale des deux molécules hybrides (1) et (2) ainsi que du peptide SPKKSPKK pour donner respectivement les composés (1'), (2') et SL-(SPKK)<sub>2</sub> (SL pour "Spin Label") (Figure 26). L'utilisation du radical libre SL permet de suivre le cheminement de ces trois composés au sein de cellules par une détection en Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) selon une méthodologie déjà éprouvée au laboratoire, notamment pour les dérivés de la nêtropsine (Bailly *et al.*, 1989a, 1990b).



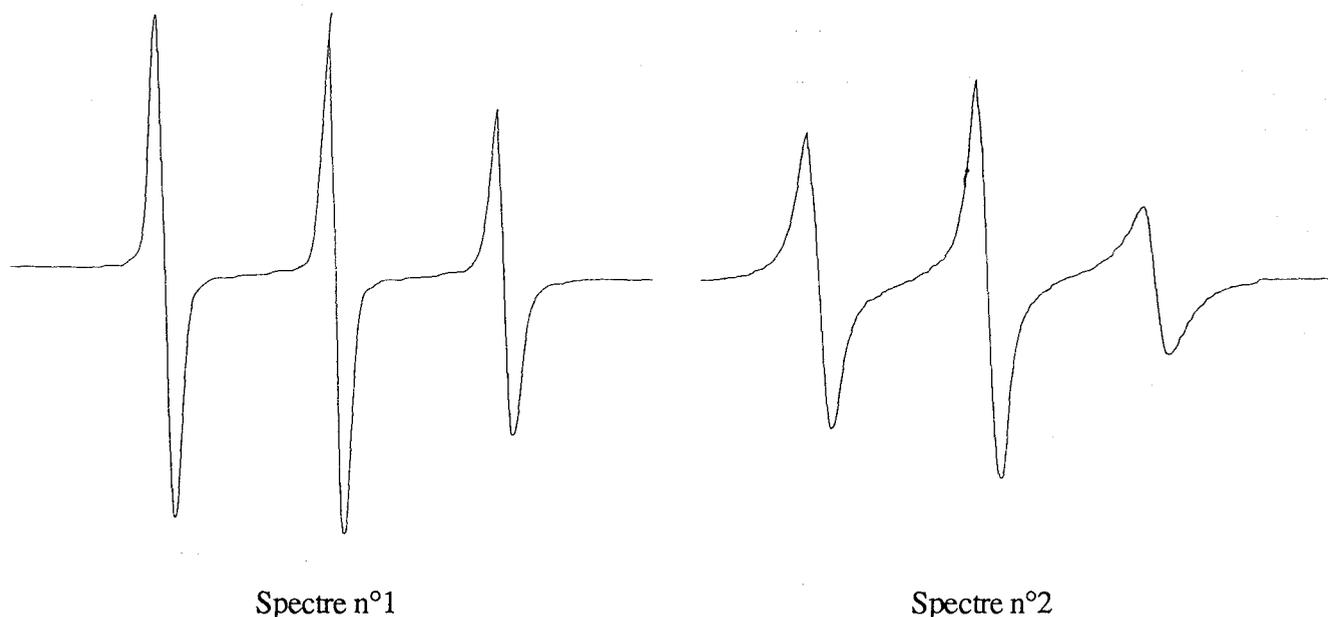
**Figure 26** : Structures des composés (1'), (2') et SL-(SPKK)<sub>2</sub>.



**Schéma II** : Synthèse des composés (1') et (2').

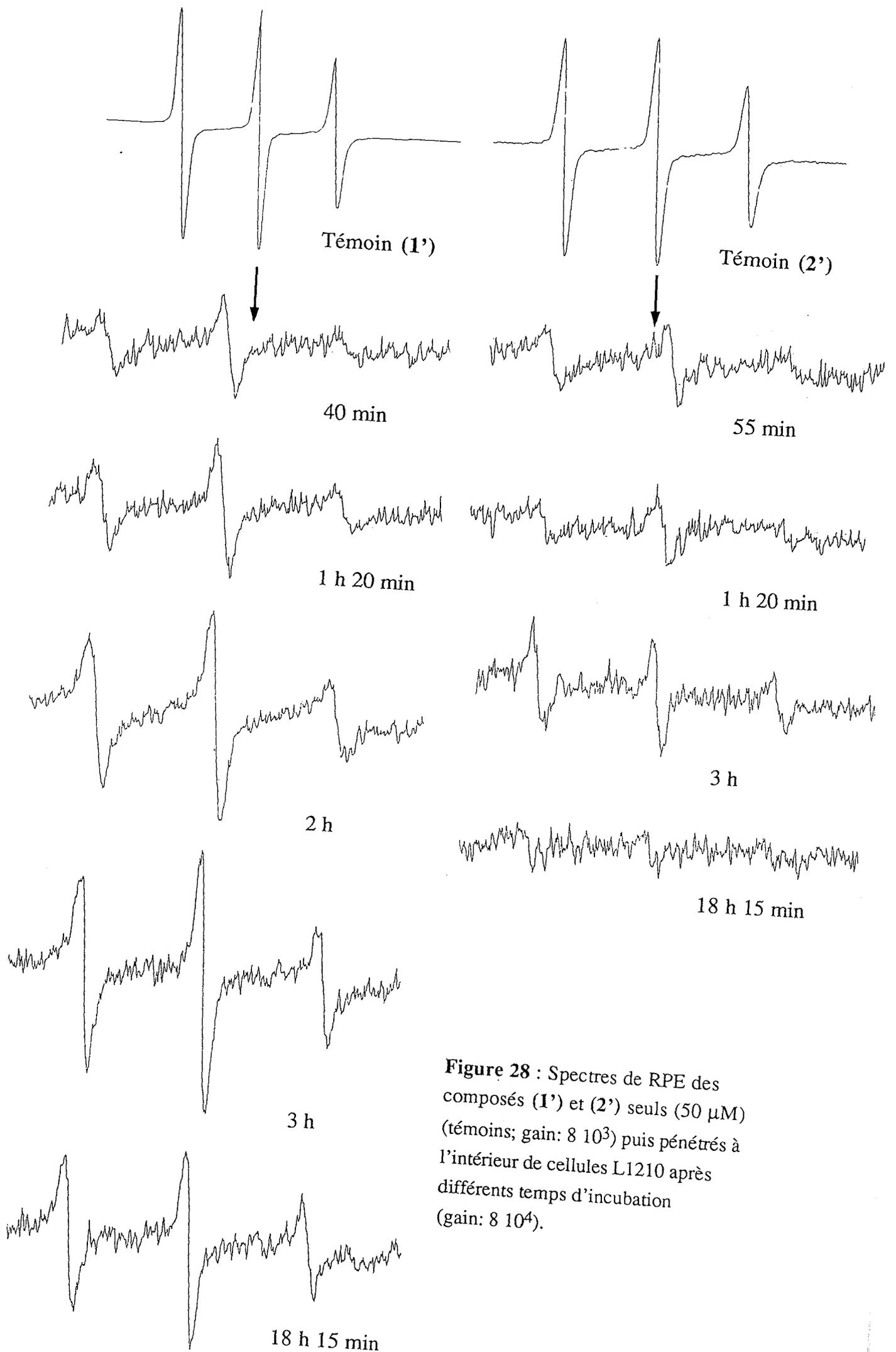
Les dérivés hybrides (1') et (2') ont été synthétisés en phase liquide selon le schéma II (voir p.115) tandis que le composé SL-(SPKK)<sub>2</sub> a été élaboré en phase solide par utilisation de la chimie des Fmoc (Fmoc pour Fluorényl-Méthyl-Oxy-Carbonyle) (voir p.121).

Le composé (1') se caractérise en RPE par un spectre isotrope qui présente une troisième raie un peu moins intense que les deux premières (Figure 27, spectre n°1). L'incubation de ce marqueur de spin en présence d'ADN de thymus de veau révèle un spectre isotrope dont les raies d'intensités plus faibles sont élargies (Figure 27, spectre n°2). Ceci suggère une interaction du composé (1') avec l'ADN, interaction qui perturbe légèrement la libre rotation du groupement nitroxyde. Cette situation a de même été constatée pour les ligands (2') et SL-(SPKK)<sub>2</sub>.



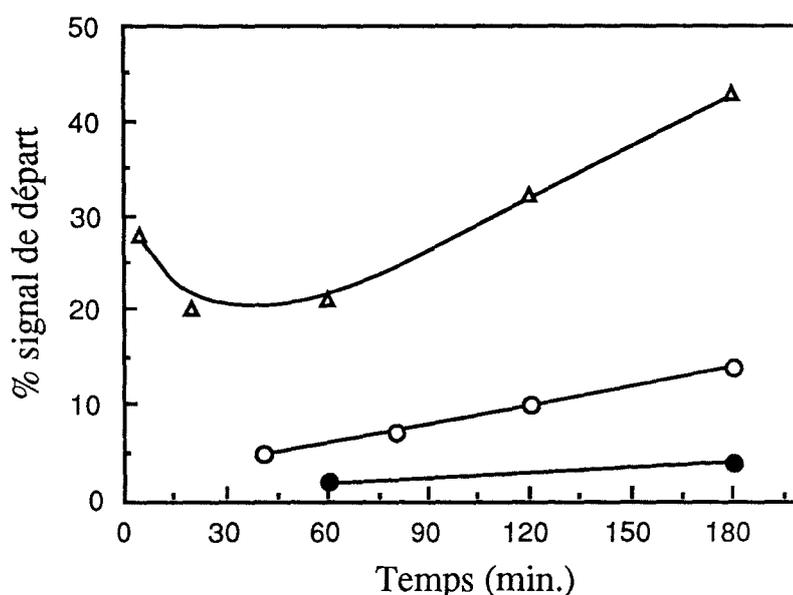
**Figure 27** : Spectres de RPE du composé (1') seul (100  $\mu$ M; spectre n°1) et de son complexe avec l'ADN de thymus de veau (spectre n°2). Gain:  $8 \cdot 10^3$ .

Ces trois composés sont ajoutés à une culture de cellules leucémiques murines (L1210) à une concentration finale de 50  $\mu$ M. Après différents temps d'incubation, des prélèvements sont effectués et les cellules sont centrifugées à basse vitesse puis séparées du milieu de culture (voir p.140). L'intensité du signal de RPE mesuré est alors comparée à celle du signal initial (au temps "zéro"). Les spectres obtenus sont représentés sur la figure 28. En considérant la surface des pics (proportionnelle à la



**Figure 28** : Spectres de RPE des composés (1') et (2') seuls ( $50 \mu\text{M}$ ) (témoins; gain:  $8 \cdot 10^3$ ) puis pénétrés à l'intérieur de cellules L1210 après différents temps d'incubation (gain:  $8 \cdot 10^4$ ).

quantité de produits) comparativement au témoin, on peut évaluer de façon globale la cinétique d'incorporation des différentes molécules (**Figure 29**). Il est clair que les deux ligands hybrides (**1'**) et (**2'**) pénètrent de manières très différentes à l'intérieur des cellules alors que le composé SL-(SPKK)<sub>2</sub> n'est pas capable de traverser les membranes cellulaires. Ainsi le pourcentage du signal de départ retrouvé au sein des cellules au bout de trois heures d'incubation (qui n'est absolument pas extrapolable en terme de concentration) et de 14 et 4% pour (**1'**) et (**2'**) respectivement (**Figure 29**). Au bout de 18 heures, au contraire, ce signal est affaibli pour (**1'**) et il disparaît pour (**2'**), ce qui laisse supposer une dégradation cellulaire des deux composés (**Figure 28**).



**Figure 29** : Cinétique d'incorporation des molécules hybrides SL-NetGA ( $\Delta$ ) (cellules KB<sub>3</sub>), (**1'**) ( $\circ$ ) et (**2'**) ( $\bullet$ ) (cellules L1210).

Le taux de pénétration de (**1'**) est à peu près trois fois inférieur à celui de NetGA (**Figure 29**) (Bailly, 1990b). Néanmoins cette comparaison est peu rigoureuse puisque l'étude faite avec NetGA a été effectuée sur une autre lignée cellulaire (cellules KB<sub>3</sub>). Même si les composés hybrides (**1'**) et (**2'**) démontrent des propriétés de pénétration cellulaire faibles, il faut avant tout souligner la fonction capitale de vectorisation de l'acridine bien mise en évidence par le fait que le dérivé SL-(SPKK)<sub>2</sub> dépourvu de ce chromophore n'est pas capable de pénétrer à l'intérieur des cellules.

Une expérience similaire permettra d'appréhender ultérieurement la localisation subcellulaire au niveau du noyau et du cytoplasme des composés (**1'**) et (**2'**).

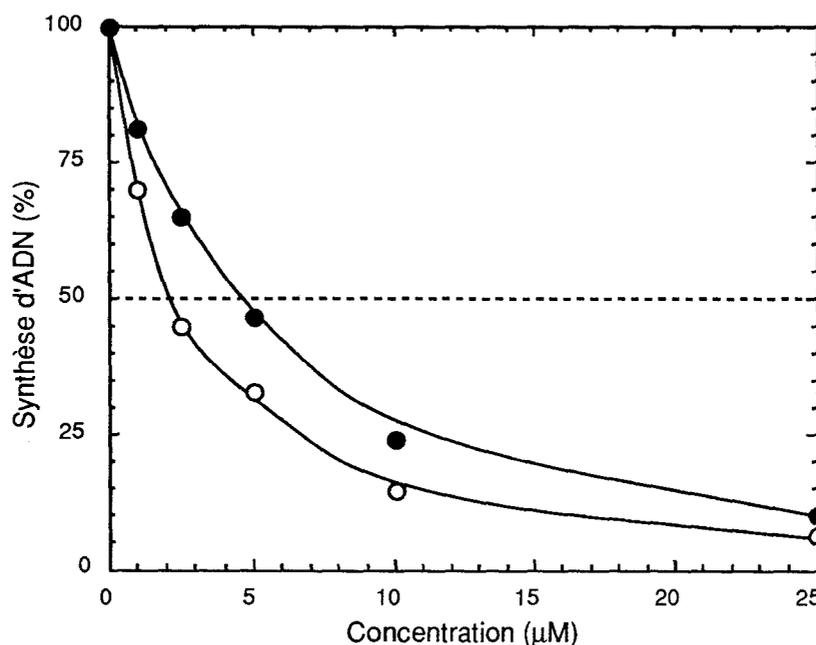
### 1-4-2) Tests *in vitro* (voir p.141)

Les propriétés d'inhibition de synthèse de l'ADN, d'inhibition de croissance et de cytotoxicité des molécules hybrides (1) et (2) ont été déterminées sur des cellules leucémiques murines (L1210).

#### \* Inhibition de synthèse de l'ADN

Le suivi de la synthèse d'ADN est effectué par une mesure de l'incorporation de thymidine tritiée après une incubation préalable des cellules en présence de différentes concentrations en composés (1) et (2).

Un effet marqué (80 à 85% d'inhibition) est obtenu avec une concentration de 25  $\mu\text{M}$  en (1) et (2) (Figure 30). Néanmoins, pour toutes les concentrations inférieures, le composé (1) présente une activité supérieure à celle de (2). Ainsi les doses  $I_{ADN\ 50}$  (concentrations en ligand nécessaires pour inhiber de 50% la synthèse d'ADN) sont égales à 2 et 4,5  $\mu\text{M}$  pour (1) et (2) respectivement.



**Figure 30** : Effet des composés hybrides (1) (○) et (2) (●) sur l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules L1210. Les cellules ont été incubées pendant 6h avec les deux ligands avant l'addition de la thymidine- $^3\text{H}$  pendant 2h.

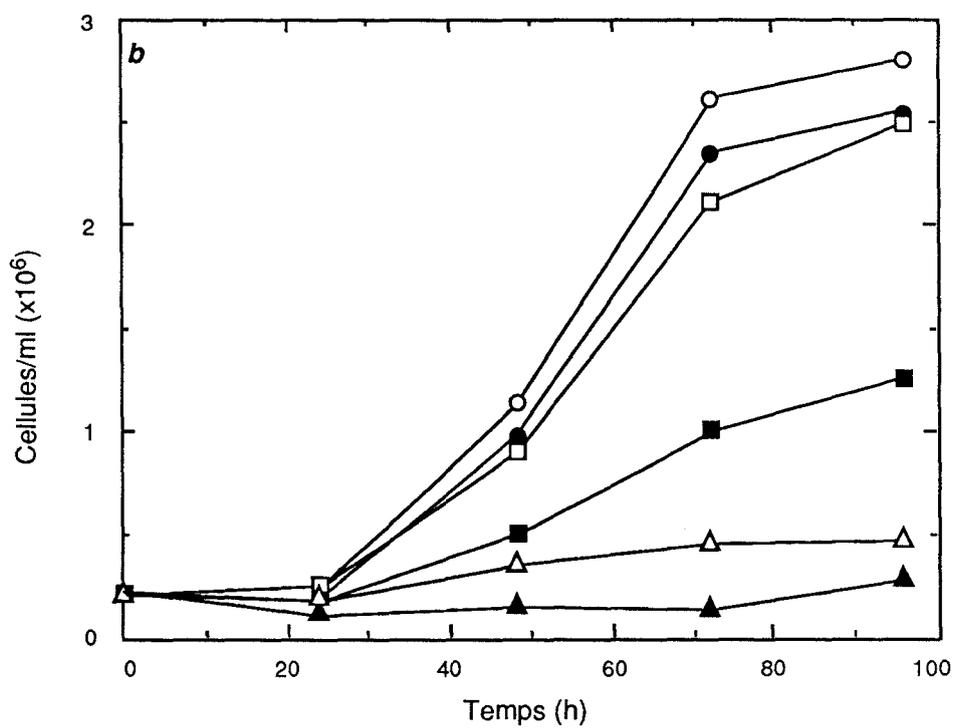
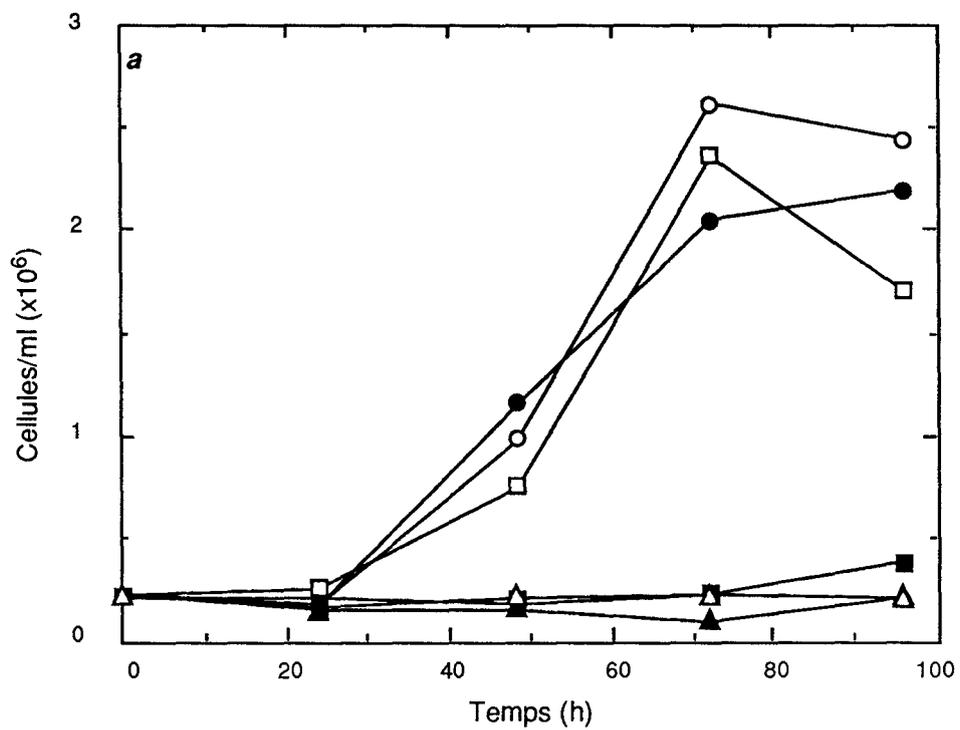
Ces résultats tendent à montrer que (1) est un meilleur inhibiteur de synthèse de l'ADN *in vitro* que (2). Cependant, à ce stade de l'étude, il n'est pas possible de déterminer précisément si l'effet observé résulte d'une inhibition directe des systèmes ADN-polymérase due à un masquage des sites de fixation des enzymes intervenant dans la réplication (ce que l'on définit habituellement comme une "template inhibition"; Gale *et al.*, 1980). Il est tout à fait possible que les ligands provoquent une latence cellulaire momentanée pendant laquelle les cellules s'accumuleraient à un stade prémitotique; ainsi il est bien connu que certaines molécules intercalantes ont la propriété de modifier la progression du cycle cellulaire en provoquant l'arrêt de ce cycle au niveau de la phase G<sub>2</sub> (Ralph *et al.*, 1983). La décroissance de la radioactivité pourrait aussi résulter d'un effet cytotoxique des ligands; mais cette éventualité est quasiment exclue puisque, au bout de six heures d'incubation, le taux de viabilité cellulaire est quasiment inchangé.

#### \* Inhibition de la croissance cellulaire et pouvoir cytotoxique

Les cellules L1210 sont incubées en présence de différentes concentrations (0,5 à 50  $\mu\text{M}$ ) des ligands (1) et (2). Puis leur croissance est suivie durant quatre jours.

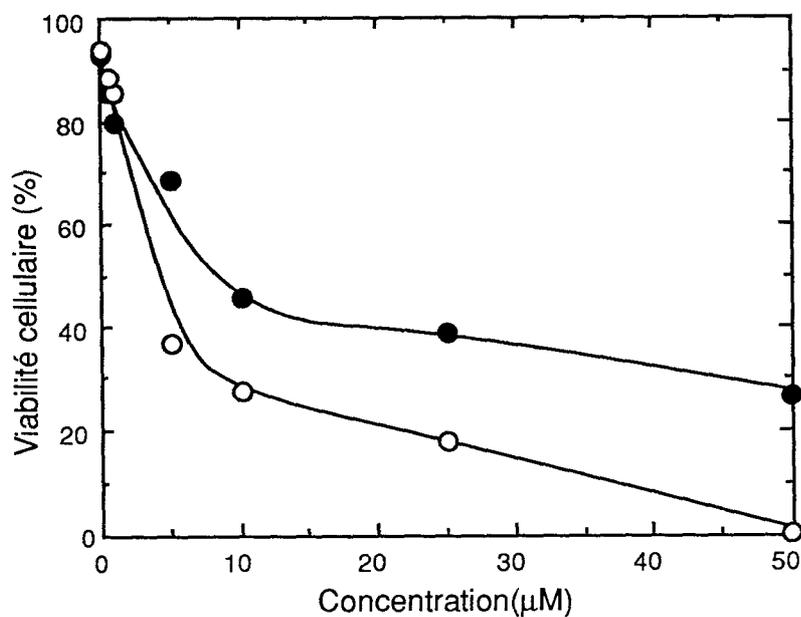
En présence du composé (2), une inhibition significative de la croissance n'est observée que pour des concentrations supérieures à 5  $\mu\text{M}$  (Figure 31). En revanche, à cette même concentration, (1) inhibe complètement la prolifération cellulaire. La différence entre les pouvoirs cytostatiques de (1) et (2) est nette si l'on compare leurs doses IC<sub>50</sub> (concentrations en ligands nécessaires pour inhiber de 50% la croissance cellulaire). Ainsi, au bout de quatre jours, des valeurs IC<sub>50</sub> de 1,7 et 4,8  $\mu\text{M}$  sont obtenues pour (1) et (2) respectivement. Dans les mêmes conditions expérimentales, des doses IC<sub>50</sub> égales à 1 et 0,075  $\mu\text{M}$  caractérisent NetGA et l'amsacrine.

De même les deux molécules démontrent des pouvoirs cytotoxiques très différents. En présence d'une concentration de 5  $\mu\text{M}$  en composé (1), la viabilité cellulaire n'est plus que de 37% alors qu'avec (2), elle est deux fois plus importante (70%) (Figure 32). A la même concentration (5  $\mu\text{M}$ ), des viabilités de 40 et 10% sont obtenues pour NetGA et l'amsacrine.



**Figure 31:** Inhibition de la croissance de cellules leucémiques murines (L1210) par les composés (1) (a) et (2) (b). (○) contrôle; (●) 0,5  $\mu\text{M}$ ; (□) 1  $\mu\text{M}$ ; (■) 5  $\mu\text{M}$ ; (△) 10  $\mu\text{M}$ ; (▲) 50  $\mu\text{M}$ .

Ces résultats montrent clairement que les ligands hybrides (1) et (2) possèdent un bon pouvoir cytostatique et une cytotoxicité assez faible. Dans les deux cas, le composé (1) présente une activité bien meilleure que celle de son homologue (2) et voisine de celle de NetGA. Néanmoins cette activité reste en-deçà de celle de l'amsacrine. De manière très intéressante, cette différence d'activité dénotée entre les deux molécules est à mettre en relation avec leurs capacités de pénétration cellulaire distinctes observées précédemment.



**Figure 32** : Effet des composés hybrides (1) (○) et (2) (●) sur la viabilité des cellules leucémiques murines L1210.

## Conclusion

Concernant l'interaction avec l'ADN, le concept "ligand du petit sillon-intercalant" s'est révélé intéressant, s'agissant du modèle (SPKK)<sub>n</sub>GA étudié. La présence de l'intercalant acridine permet notamment d'apporter une affinité importante aux motifs peptidiques SPKK, conférant ainsi de fortes propriétés de liaison aux molécules hybrides. La complexité du mode de fixation à l'ADN de ces ligands a bien été appréhendée par l'utilisation de techniques physicochimiques très variées. Chaque fraction des molécules hybrides (fragment peptidique se logeant dans le petit sillon ou chromophore acridine intercalant) est susceptible d'influencer la liaison de l'autre. Ainsi, comme il a été évoqué précédemment, l'intercalant permet un premier ancrage du peptide à la double hélice d'ADN. Ce même peptide, une fois correctement fixé dans son site de liaison, peut alors perturber de façon plus ou moins importante suivant sa taille le processus d'intercalation. Les modalités d'interaction du composé (2) (ou (SPKK)<sub>2</sub>GA) avec l'ADN, voisines de celles de NetGA, apportent par ailleurs un certain fondement à l'analogie établie par M. Suzuki entre le peptide SPKKSPKK et la nétoposine.

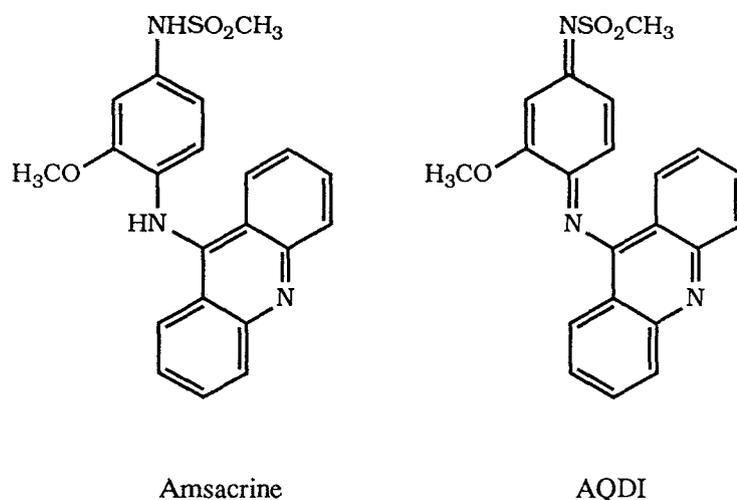
L'étude du modèle (SPKK)<sub>n</sub>GA a aussi bien mis en évidence le rôle critique tenu par le chromophore acridine dans les propriétés de pénétration cellulaire des molécules hybrides. Néanmoins ces molécules ont fait preuve d'activités cytostatique et cytotoxique limitées, comparativement à celles du témoin amsacrine (dont le chromophore anilinoamino-9 acridine est dérivé structurellement). Ceci tend à suggérer que le processus d'intercalation est une condition nécessaire à l'activité antitumorale mais pas suffisante (Auclair *et al.*, 1988) car la plupart des chromophores intercalants se lient fortement à l'ADN sans présenter d'activité antitumorale significative (Feigon *et al.*, 1984).

L'amsacrine est actuellement la molécule de référence utilisée dans le traitement de certaines leucémies (Zittoun, 1982; Cassileth et Gale, 1986) et des analogues sont en cours d'essais cliniques (Léopold *et al.*, 1987; Hardy *et al.*, 1988). Contrairement à l'anilinoamino-9 acridine, elle possède d'autres formes de cytotoxicité et notamment des propriétés d'oxydation. C'est pourquoi nous avons élaboré une nouvelle série hybride du type "peptide-intercalant" où l'on retrouve la structure complète de l'amsacrine.

## 2) LE MODELE (SPKK)<sub>N</sub>AMSA

### 2-1) Elaboration du modèle

Les substituants méthoxy (-OCH<sub>3</sub>) et méthanesulfonamide (-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) présents dans la structure de l'amsacrine (ou m-AMSA) jouent un rôle important dans l'activité biologique de ce composé. Ils concourent à la formation de la structure quinonimine oxydée de m-AMSA appelée AQDI (N<sup>1</sup>-méthylsulfonyl-N<sup>4</sup>-(acridinyl-9)-méthoxy-3-cyclohexadiène-2,5-diimine 1,4) (Figure 33). Cette oxydation en forme AQDI a lieu en présence de métaux (Cu<sup>2+</sup> en particulier) et est à la base d'un mécanisme de coupure de l'ADN qui est supposé faire intervenir des radicaux libres oxygénés (Wong *et al.*, 1984a,b; Bernier *et al.*, 1989). Plus particulièrement la présence du groupement -OCH<sub>3</sub> en méta sur le noyau benzénique est nécessaire à l'activité car il s'avère que la o-AMSA (où ce groupement est en position ortho) est inactive. Ce mécanisme observé *in vitro* pourrait être une forme potentielle de cytotoxicité *in vivo* comparable à celle de la bléomycine utilisée en cancérologie (Oberley et Buettner, 1979; Burger *et al.*, 1981) ou de la 9-hydroxyellipticine (Meunier *et al.*, 1988). Il ne faut pas pour autant oublier le mécanisme d'action principal de l'amsacrine qui consiste en une stabilisation du complexe ADN-topoisomérase II (Drlica et Franco, 1988).

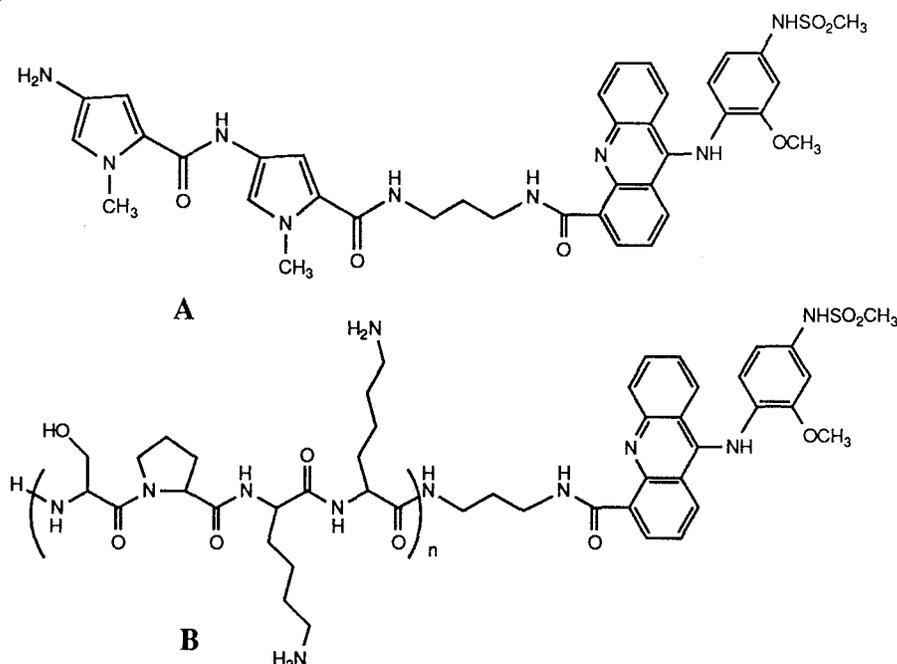


**Figure 33** : Structures de l'amsacrine et de sa forme oxydée quinonimine AQDI.

Les substituants méthoxy et méthanesulfonamide ne sont pas présents sur la fraction anilinoamino-9 acridine des hybrides (SPKK)<sub>n</sub>GA. Pour induire les

propriétés citées plus haut, nous avons envisagé l'élaboration de molécules hybrides de type  $(\text{SPKK})_n\text{AMSA}$ . Cependant le greffage de motifs peptidiques SPKK sur l'amsacrine n'est plus réalisable au niveau du groupement amino de l'aniline, comme cela avait été le cas pour le modèle  $(\text{SPKK})_n\text{GA}$  précédent. Nous avons dès lors choisi de l'effectuer en position 4 sur le noyau acridine. Cette position est accessible chimiquement et il faut noter que des dérivés 4-carboxamido-amsacrine ont déjà fait l'objet d'études approfondies, tendant à prouver l'intérêt pharmacologique d'une telle substitution (Denny *et al.*, 1982; Wakelin *et al.*, 1990). Le connecteur liant la fraction peptidique au chromophore intercalant qui était un résidu glycyle pour le modèle précédent a été remplacé par une chaîne diaminopropyle. Celle-ci, par sa longueur et sa flexibilité plus importantes, devrait permettre la fixation optimale des deux fragments des molécules hybrides.

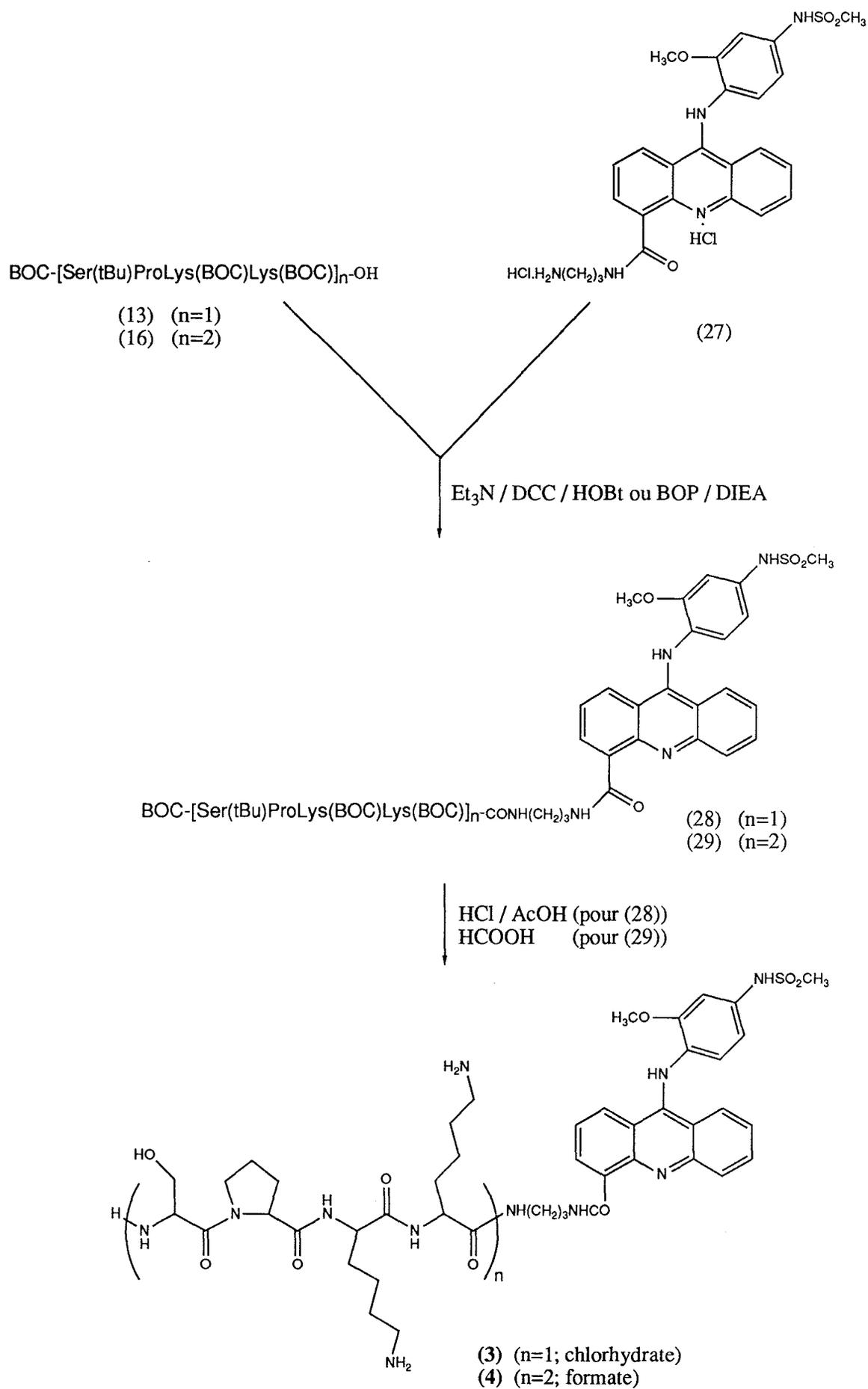
Selon l'ensemble des critères décrits précédemment, les ligands (3) et (4) représentatifs du modèle  $(\text{SPKK})_n\text{AMSA}$  (Figure 34) devraient présenter une activité biologique accrue comparativement à celle de leurs homologues respectifs du modèle  $(\text{SPKK})_n\text{GA}$ . Simultanément la structure NetAMSA (Figure 34) a été élaborée au laboratoire (Klupsch, 1991). Ses propriétés physicochimiques et biologiques ont été comparées tout au long de l'étude à celles des ligands (3) et (4) sur la base de l'analogie entre le peptide  $(\text{SPKK})_2$  et la nétropsine proposée par Suzuki.



**Figure 34:** Structures des molécules hybrides NetAMSA (A), (3) ( $n=1$ ) et (4) ( $n=2$ ) (B).

## 2-2) Synthèse (voir p.123)

La méthode utilisée pour l'élaboration des molécules hybrides (3) et (4) est quasiment identique à celle adoptée pour les composés (1) et (2). Les peptides (13) et (16) synthétisés selon le schéma I (voir p.115 et article n°1) sont couplés par la méthode DCC/HOBt au composé (27), dérivé de l'amsacrine substitué en 4 par une chaîne carboxamidopropylamine (molécule fournie par le Pr.W.A.Denny, Université d'Auckland, Nouvelle Zélande). Les composés (28) et (29) ainsi obtenus sont alors traités respectivement par une solution d'acide acétique saturée en acide chlorhydrique et par une solution d'acide formique à 98% dans l'eau pour fournir (3) et (4) (Schéma III). Le recours à une acidolyse finale par HCOOH pour la déprotection du composé (29) se justifie par le fait qu'un traitement en milieu acide plus fort (HCl/AcOH ou HBr/AcOH) entraîne la formation d'un mélange de produits de dégradation.



**Schéma III** : Synthèse des composés hybrides (3) et (4).

## 2-3) Interaction avec l'ADN

### 2-3-1) Affinité et sélectivité de liaison

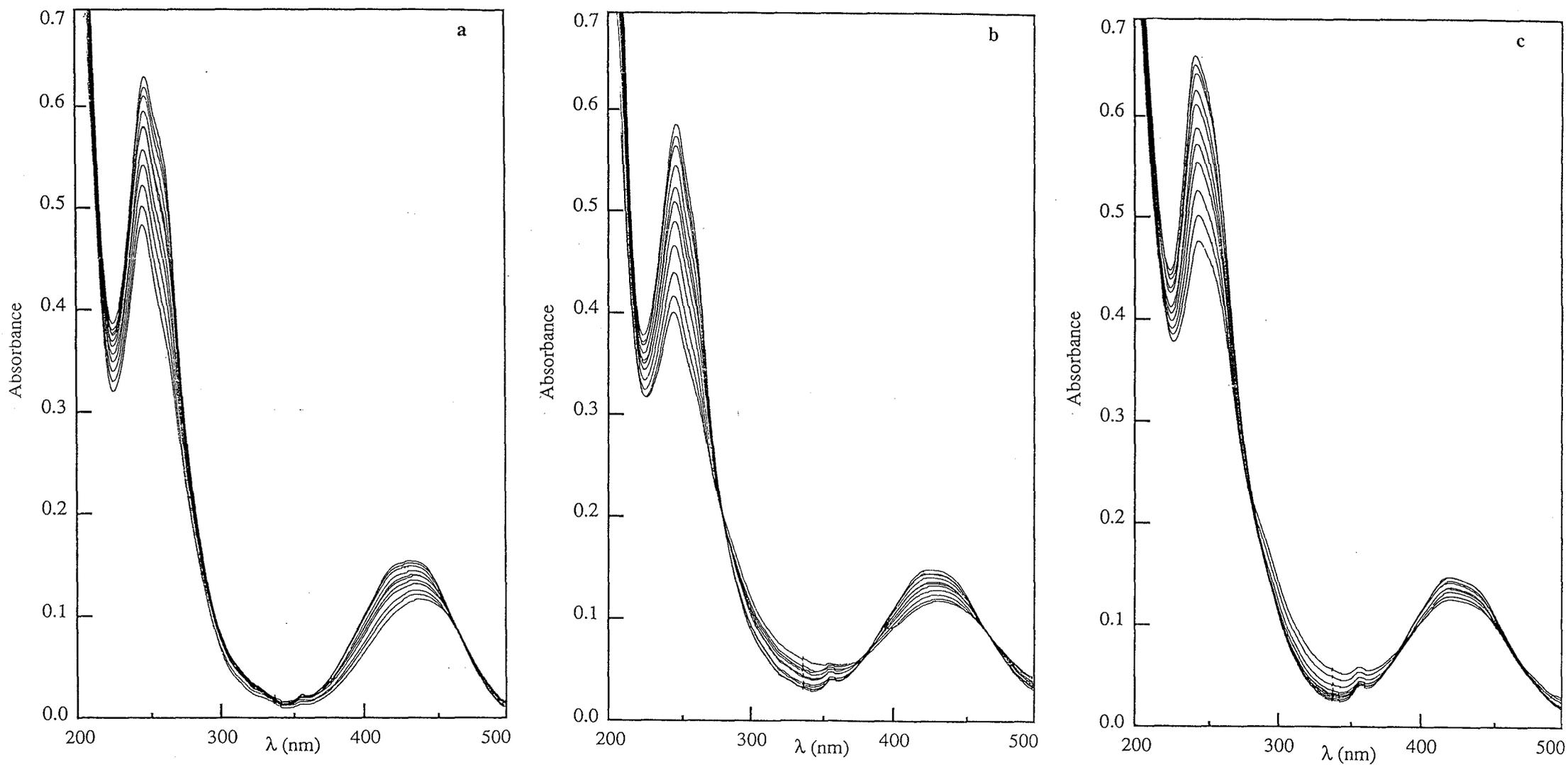
#### \* Spectroscopie d'absorption UV

La liaison des composés hybrides (3), (4) et du dérivé de l'amsacrine (27) (AMSAC<sub>3</sub>) à l'ADN est caractérisée par les changements induits dans leur spectre d'absorption UV par addition de quantités croissantes d'ADN (Figure 35). A 440 nm, bande d'absorption du chromophore aromatique, les hypochromismes présentés par les trois ligands sont similaires: ils sont par exemple de 22,5%, 21,5% et 15,0% pour (27), (3) et (4) respectivement à un P/D de 1,5 (Figure 35). La valeur plus faible de (4) est imputable à un début de précipitation observée à partir d'un P/D de 1,1.

#### \*Quenching de fluorescence (Tableau X)

Les composés (3), (4) et (27) sont capables de diminuer la fluorescence du complexe éthidium/ADN de thymus de veau à des concentrations quatre fois inférieures à celle de la nétoprosine (Nt). De même, pour ces trois ligands, une compétition avec le fluorophore Hoechst 33258 est observée, les valeurs Q<sub>50</sub> étant deux fois moindres que celle de Nt. Ceci suggère bien que (3), (4) et (27) ont la propriété de se comporter comme des agents intercalants (tels que l'éthidium) et comme des ligands du petit sillon (tels que Hoechst 33258), d'une manière analogue à celle du composé NetAMSA.

En présence du polynucléotide alterné poly(dAT)-poly(dAT) et comparativement à l'ADN de thymus de veau, les valeurs Q<sub>50</sub> de ces trois ligands varient peu. Tel n'est pas le cas de la nétoprosine: lorsque le pourcentage en résidus GC passe de 42 (ADN de thymus de veau) à 0% (poly(dAT)-poly(dAT)), une diminution nette de la valeur Q<sub>50</sub> est notée. Elle est d'un facteur 2 pour le quenching de l'éthidium et d'un facteur 1,4 pour Hoechst. Ainsi cette expérience fait apparaître la spécificité AT caractéristique de la nétoprosine tandis qu'aucune sélectivité marquée ne ressort pour les ligands hybrides (3) et (4).



**Figure 35** : Spectres d'absorption UV de l'AMSAC<sub>3</sub> (a), des molécules hybrides (3) (b) et (4) (c) pour des rapports ADN/ligand croissants de: 0, 0.07, 0.10, 0.30, 0.40, 0.60, 0.70, 0.90, 1.10, 1.30 et 1.50.

	AMSAC <sub>3</sub> (27)	(3)	(4)	Nt	NetAMSA
Ethidium + ADN de thymus de veau	0,9	1,0	0,9	4,0	2,0
Hoechst + ADN de thymus de veau	0,4	0,4	0,4	0,9	0,7
Ethidium + poly(dAT)-poly(dAT)	0,9	0,9	0,9	2,0	1,3
Hoechst + poly(dAT)-poly(dAT)	0,3	0,3	0,3	0,6	0,5

**Tableau X** : Quenching de fluorescence des complexes éthidium (et Hoechst) / ADN de thymus de veau (et poly (dAT)-poly(dAT)) induit par les ligands hybrides (3), (4) et NetAMSA ainsi que les composés de référence nétoprosine (Nt) et AMSAC<sub>3</sub> (27); le rapport fluorophore/ADN est de 0,1; les valeurs Q<sub>50</sub> (concentrations suffisantes pour réduire la fluorescence de 50%) sont exprimées en  $\mu\text{M}$ .

Aucune différence significative n'est constatée entre les composés (3), (4) et (27). Selon ce test, la simple substitution en position 4 de l'amsacrine par une chaîne carboxamidopropylamine confère au composé (27) (AMSAC<sub>3</sub>) des propriétés de quenching comparables à celles des ligands hybrides (3) et (4) dont le groupement en position 4 a pourtant une taille considérablement accrue. Il faut alors remarquer que les conditions expérimentales utilisées dans ce test impliquent qu'il y ait avant tout un quenching de fluorescence "indirect". En effet l'ADN (20  $\mu\text{M}$ ) est en excès par rapport au fluorophore (2  $\mu\text{M}$ ) qui ne peut donc se lier à tous les sites potentiels de la double hélice. Il est dès lors plus probable qu'un second ligand diminue la fluorescence initiale essentiellement par des mécanismes indirects plutôt que par une compétition directe (au cours de laquelle le compétiteur remplace le fluorophore sur ses sites de liaison) (Baguley *et al.*, 1981; Baguley et Le Bret, 1984). Pour éliminer ces mécanismes indirects de quenching, nous nous sommes donc ensuite placés dans des conditions inverses où l'ADN (1  $\mu\text{M}$ ) est en défaut par rapport au fluorophore (1,26  $\mu\text{M}$ ) (Baguley *et al.*, 1981) (voir p.129).

Les valeurs Q<sub>50</sub> du **tableau XI** montrent cette fois-ci une différence nette entre les composés hybrides (3), (4) et le composé de référence AMSAC<sub>3</sub> (27). Celle-ci se traduit par une diminution d'un facteur 6 à 20 des valeurs Q<sub>50</sub> de (3) et (4) par rapport à celles de (27). Autrement dit une affinité notoire est apportée par la chaîne peptidique de motifs SPKK et ce gain d'affinité est fonction de la taille du peptide, les valeurs Q<sub>50</sub> de (4) étant inférieures à celles de (3). L'analogie

pseudeptidique NetAMSA révèle dans tous les cas des propriétés de quenching intermédiaires entre celles de (3) et (4) si ce n'est en présence d'ADN de thymus de veau (voir la justification ci-après). Par ailleurs, contrairement au test précédent, le peptide SPKKSPKK (ou S<sub>2</sub>) induit un quenching de fluorescence mais à des concentrations très importantes 15 à 200 fois supérieures à celles de la nétrropsine, prouvant une fois de plus son affinité nettement moindre.

	AMSAC <sub>3</sub> (27)	(3)	(4)	Nt	NetAMSA	S <sub>2</sub>
ADN de thymus de veau	3,0	0,5	0,3	2,0	3,4	25
poly(dAT)-poly(dAT)	4,6	0,7	0,2	0,1	0,4	20
poly(dA)-poly(dT)	5,8	0,7	0,3	0,1	0,4	15

**Tableau XI** : Quenching de fluorescence de complexes éthidium/ADN induit par les ligands hybrides (3), (4), NetAMSA ainsi que les composés de référence nétrropsine (Nt), AMSAC<sub>3</sub> (27) et SPKKSPKK (S<sub>2</sub>); le rapport fluorophore /ADN est de 1,26; les valeurs Q<sub>50</sub> (concentrations suffisantes pour réduire la fluorescence de 50%) sont exprimées en  $\mu\text{M}$ .

En ce qui concerne la sélectivité de liaison, la spécificité AT de la nétrropsine est clairement mise en évidence puisqu'une baisse des valeurs Q<sub>50</sub> d'un facteur 20 est observée quand on passe de l'ADN de thymus de veau aux polynucléotides poly(dAT)-poly(dAT) et poly(dA)-poly(dT). En outre, aucune variation significative n'est notée pour les ligands hybrides (3) et (4).

#### \* Analyse quantitative par spectroscopie UV (Scatchard)

Les expériences de quenching de fluorescence ont montré que les composés (3), (4) et (27) possèdent des affinités différentes pour un même ADN. Une détermination des constantes d'affinité de chaque ligand est dès lors nécessaire pour quantifier ces différences.

L'analyse des représentations de Scatchard selon un modèle à 2 sites indépendants non coopératifs donne les résultats suivants :

- pour le composé (27) (ou AMSAC<sub>3</sub>):

$$K_a(1) = 11,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}, \quad n(1) = 0,068$$

$$K_a(2) = 0,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}, \quad n(2) = 0,098$$

- pour le ligand hybride (3):

$$K_a(1) = 6,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}, \quad n(1) = 0,073$$

$$K_a(2) = 0,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}, \quad n(2) = 0,174$$

Si un gain d'affinité substantiel est obtenu pour (3) comparativement à (27) (notamment pour la constante d'affinité correspondant à la première classe de sites de chaque ligand), la taille des sites de liaison reste de façon surprenante quasiment semblable alors que (3) devrait couvrir logiquement des sites plus étendus.

Nous n'avons pu obtenir de représentations de Scatchard convenables pour le composé (4) car une précipitation des complexes (4)/ADN se produit très rapidement. Dans les conditions expérimentales (faibles forces ioniques), les courbes présentent une forme convexe, ce qui pourrait signifier une coopérativité de liaison à l'ADN de (4).

### \*Dichroïsme linéaire électrique

L'évolution, en fonction de la composition en bases des ADN, du dichroïsme réduit du chromophore acridine à 460 nm par rapport à celui de l'ADN à 260 nm a été suivie de manière à appréhender l'intercalation de cet aromatique (**Tableau XII**).

Selon les valeurs des rapports de dichroïsme réduit (ou valeurs RD), l'AMSAC<sub>3</sub> présente une certaine sélectivité GC sans pour autant exclure la fixation aux polynucléotides riches en résidus AT. Pour les ligands hybrides (3) et (4), les classements des ADN par ordre croissant des rapports RD sont les suivants:

- poly(dA)-poly(dT) < poly(dAT)-poly(dAT) < Thymus de veau (42%GC)  $\cong$  *Micrococcus lysodeikticus* (72%GC) = poly(dG)-poly(dC) = poly(dGC)-poly(dGC)  $\cong$  *Clostridium perfringens* (23%GC) pour (3) et

- poly(dA)-poly(dT) << Thymus de veau < *Micrococcus lysodeikticus*  $\equiv$  poly(dGC)-poly(dGC)  $\equiv$  poly(dG)-poly(dC) < *Clostridium perfringens* < poly(dAT)-poly(dAT) pour (4).

Ce classement des ADN suggère une reconnaissance peu sélective des séquences d'ADN par (3) puisque les valeurs RD de tous les ADN possédant un certain pourcentage de résidus GC sont très proches les unes des autres ( $\approx 1,40$ ). La liaison aux polynucléotides poly(dA)-poly(dT) et poly(dAT)-poly(dAT) est comparativement un peu moins favorisée. Il semble donc que le térapeptide SPKK ne soit pas suffisant pour conférer la moindre sélectivité de liaison. Ceci tend à confirmer les résultats observés précédemment avec l'homologue (1).

Au contraire le ligand (4) montre une sélectivité notable pour les séquences riches en résidus AT. En effet les valeurs RD les plus importantes sont obtenues avec le copolymère poly(dAT)-poly(dAT). Les variations des RD ne peuvent que refléter l'influence du peptide (SPKK)<sub>2</sub> qui, selon toute vraisemblance, permet la fixation au niveau des sites AT. Il est à noter que, comme pour l'homologue (2), le composé (4) se fixe mieux aux séquences AT alternées par rapport aux séquences homopolymériques (A)<sub>n</sub>-(T)<sub>n</sub>. Il semble donc relativement probant que le peptide (SPKK)<sub>2</sub> constitue un motif de reconnaissance sélectif des sites AT.

En résumé, le composé (3) ne présente pas de sélectivité de liaison notable. A ce stade de l'étude, on ne peut certes pas non plus proposer de façon non équivoque une sélectivité pour (4). Néanmoins le fait que ce composé présente une différence entre les rapports RD des polynucléotides poly(dAT)-poly(dAT) et poly(dA)-poly(dT) similaire à celle de (2) laisse penser qu'une certaine analogie de liaison est possible entre les composés (4) et (2). Une étude par footprinting des ligands hybrides (3) et (4) permettra de corroborer ou non cette hypothèse.

ADN	% GC	$\frac{\Delta A/A \text{ AmsaC}_3(460)}{\Delta A/A \text{ ADN (260)}}$	$\frac{\Delta A/A (3) (460)}{\Delta A/A \text{ ADN (260)}}$	$\frac{\Delta A/A (4) (460)}{\Delta A/A \text{ ADN (260)}}$	$\frac{\Delta A/A \text{ NetAmsa (460)}}{\Delta A/A \text{ ADN (260)}}$	$\frac{-\Delta A/A \text{ NetAmsa (310)}}{\Delta A/A \text{ ADN (260)}}$
poly[(dG)-(dC)]	100	1,57	1,41	0,83	0,93	0,10
poly[(dGC)-(dGC)]	100	1,95	1,41	0,80	0,88	0,13
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	72	1,61	1,41	0,78	0,75	0,86
Thymus de veau	42	1,25	1,40	0,70	1,32	0,98
<i>Clostridium perfringens</i>	23	1,54	1,47	0,92	1,42	1,54
poly[(dAT)-(dAT)]	0	1,37	1,00	1,04	1,04	1,62
poly[(dA)-(dT)]	0	1,54	0,87	0,49	0,67	1,20

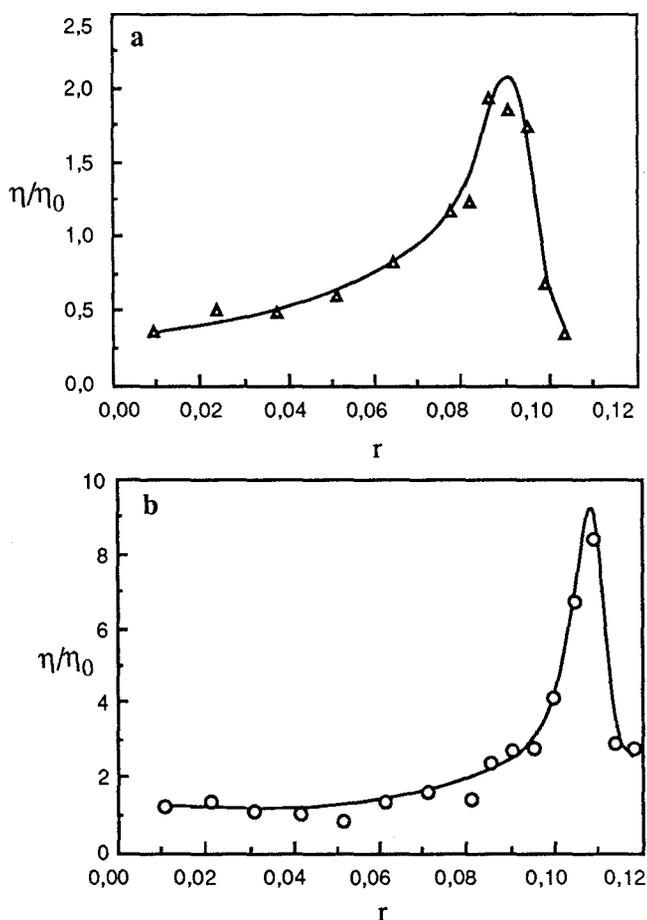
**Tableau XII** : Rapports de dichroïsmes réduits (RD) des molécules hybrides NetAMSA, (3) et (4) et du composé de référence AMSAC<sub>3</sub> pour des ADN naturels et des polynucléotides de compositions variées. Les expériences ont été effectuées à un rapport ligand/ADN de 0,1 (100µM en ADN) et à un champ électrique de 13,2 kV/cm.

### 2-3-2) Mode d'interaction avec l'ADN

#### \* Viscosimétrie

Le composé (27) ou AMSAC<sub>3</sub> entraîne une détorsion de l'ADN de 20° (Figure 36), valeur très proche de celle de l'amsacrine (20,5°; Wakelin *et al.*, 1990).

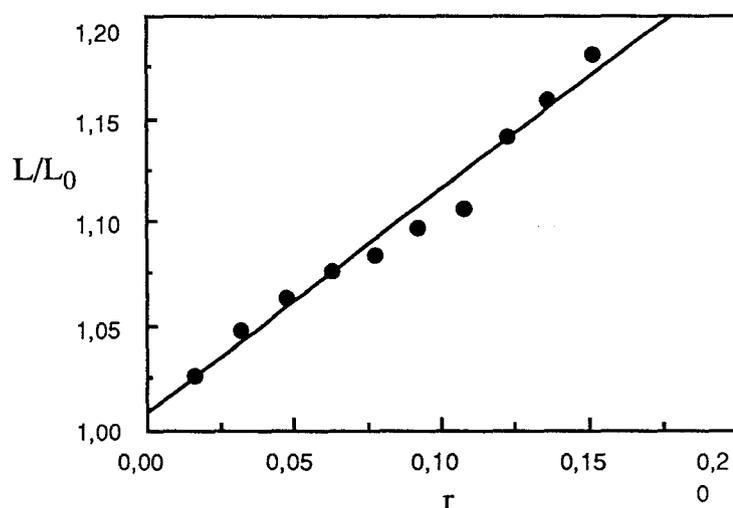
Les deux ligands hybrides (3) et (4) ont des angles de détorsion identiques de 16,5° (Figure 36). Cette valeur légèrement inférieure à celle de l'AMSAC<sub>3</sub> suggère une certaine influence de la chaîne peptidique sur le processus d'intercalation et la détorsion qui en résulte. Néanmoins cette influence est très minime puisqu'un angle de 16 à 17° caractérise l'amino-9 acridine qui est un très bon intercalant. De même certains dérivés de l'amsacrine substituée en position 4 induisent une détorsion très voisine (15 à 17°; Wakelin *et al.*, 1990).



**Figure 36** : Courbes de titration de la viscosité de l'ADN circulaire superenroulé (120  $\mu$ M) avec le composé de référence AMSAC<sub>3</sub> (a) et le ligand hybride (3) (b). Une courbe quasiidentique à celle de (3) est obtenue pour (4).

L'élongation est l'autre déformation majeure de l'ADN induite par la liaison d'une molécule intercalante. Selon la théorie, la représentation du changement de la longueur apparente de l'ADN,  $L/L_0$  en fonction du rapport  $D/P$  (encore appelé  $r$ ; rapport de la concentration molaire du ligand ajouté sur la concentration initiale d'ADN) donne une droite de pente 1 pour un intercalant (élongation de 3,4 Å) tandis qu'une pente de 2 est obtenue pour un bis-intercalant (voir p.134). Il a été montré que l'élongation de l'ADN varie de façon significative avec la structure du ligand intercalant. Alors que des intercalants tels que l'adriamycine et la 9-méthoxyellipticine provoquent l'augmentation de viscosité attendue, d'autres donnent des pentes un peu inférieures à 1 comme c'est le cas de la proflavine (0,80) et du bromure d'éthidium (0,73) (Cohen et Eisenberg, 1969; Saucier *et al.*, 1971).

Dans le cas du ligand hybride (3), une droite de pente quasiment égale à 1 est obtenue (Figure 37). Il en est de même avec le composé (4) qui démontre une progression linéaire de la longueur apparente de l'ADN jusqu'à un rapport  $r$  de 0,07. Au-delà de cette valeur, une nette diminution est constatée, phénomène vraisemblablement attribuable à une précipitation des complexes ligand/ADN observée expérimentalement.



**Figure 37** : Elongation de l'ADN de thymus de veau (770  $\mu$ M) en présence du composé (3).

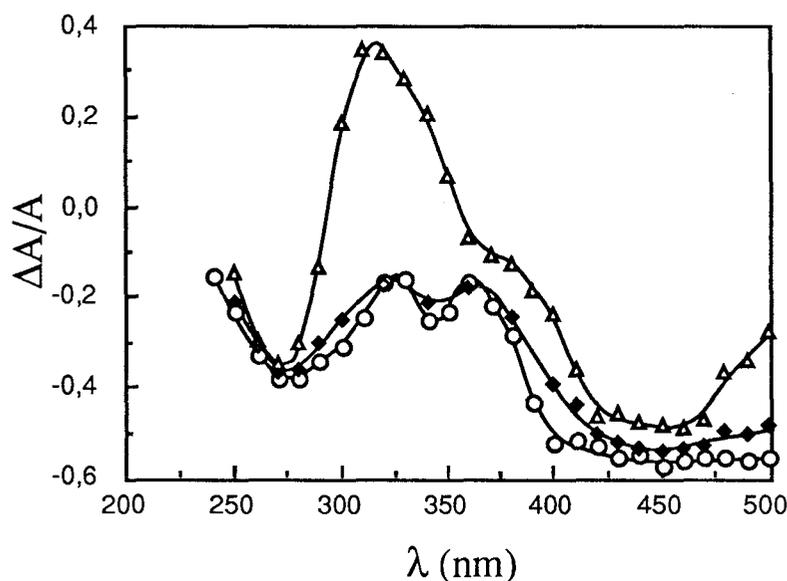
Des expériences similaires de titration de la viscosité d'ADN circulaire superenroulé et d'ADN de thymus de veau avec le peptide SPKKSPKK n'ont par

ailleurs mis en évidence aucun effet de ce peptide sur l'hélicité de l'ADN (détorsion et longueur).

Selon ces résultats, il est clair que les composés (3) et (4) s'intercalent de manière correcte entre les plateaux de paires de bases de l'ADN. Ceci a été corroboré par une étude en dichroïsme linéaire électrique.

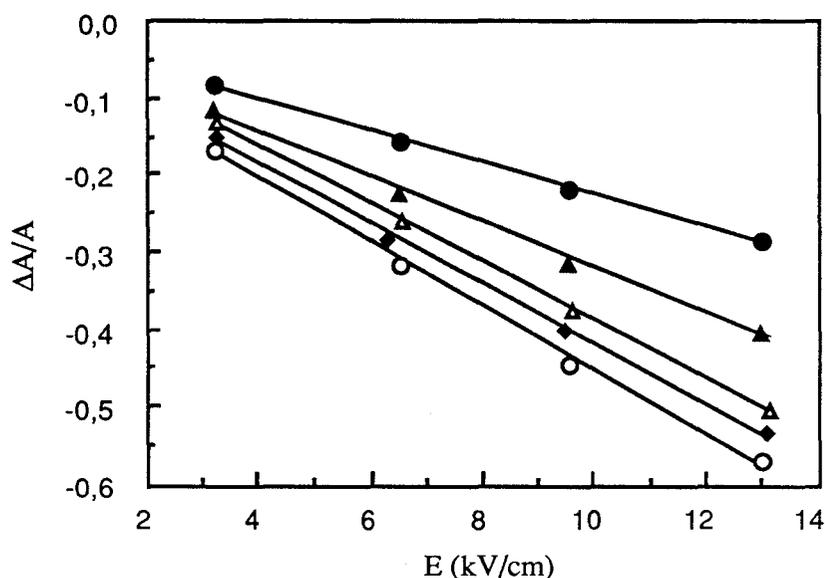
### \* Dichroïsme linéaire électrique

Les spectres de dichroïsme des composés hybrides (3) et NetAMSA ainsi que du dérivé de l'amsacrine, AMSAC<sub>3</sub>, présentent tous un dichroïsme négatif intense dans la région 440-460 nm, bande d'absorption caractéristique de l'acridine (**Figure 38**). Ceci montre sans équivoque que toutes ces molécules sont capables de s'intercaler parfaitement entre les plateaux de paires de bases. De plus, le spectre de NetAMSA montre à 310 nm (bande d'absorption spécifique de la nétropsine) un dichroïsme positif, ce qui témoigne de la fixation dans le petit sillon du fragment bis-pyrrole de Nt. Dans le cas des dérivés hybrides (3) et (4), l'interaction des motifs SPKK avec le petit sillon ne peut être étudiée par dichroïsme linéaire puisque ces peptides ne présentent pas de bande d'absorption à des longueurs d'onde supérieures à 260 nm.



**Figure 38** : Spectres de dichroïsme linéaire électrique des complexes AMSAC<sub>3</sub>-ADN (◆), (3)-ADN (○) et NetAMSA-ADN (Δ). Les spectres ont été obtenus à 13,2 kV/cm et à un rapport ligand/ADN de 0,1.

L'étude de la variation en fonction du champ électrique du dichroïsme réduit de tous ces composés (à 460 nm) et de l'ADN (à 260 nm) permet d'effectuer une comparaison précise des processus d'intercalation (**Figure 39**).



**Figure 39** : Variation du dichroïsme réduit des composés AMSAC<sub>3</sub> (◆), (3) (○), (4) (●) et NetAMSA (▲) à 460 nm ainsi que de celui de l'ADN (△) à 260 nm en fonction du champ électrique.

Les composés (3), NetAMSA et AMSAC<sub>3</sub> présente des dichroïsmes encore plus importants que celui de l'ADN. Ceci prouve qu'une intercalation totale du chromophore acridine se produit, processus qui pourrait être favorisé par l'intervention de la chaîne (pseudo)peptidique.

On peut aussi émettre l'hypothèse que les valeurs plus importantes du dichroïsme résultent d'une rigidification (ou "stiffening") de la double hélice d'ADN induite par la liaison de ces molécules, ce qui provoquerait une orientation plus facile de l'ADN dans le champ électrique.

Le ligand hybride (4) se distingue des autres molécules car son dichroïsme réduit est plus faible que celui de l'ADN. Mais cette différence est minime puisque le rapport  $\Delta A/A$  (4)/ $\Delta A/A$  ADN est de 0,7. Or ce même rapport prend une valeur de 0,3 pour le composé (2) qui se caractérise par une intercalation partielle de l'acridine (cf

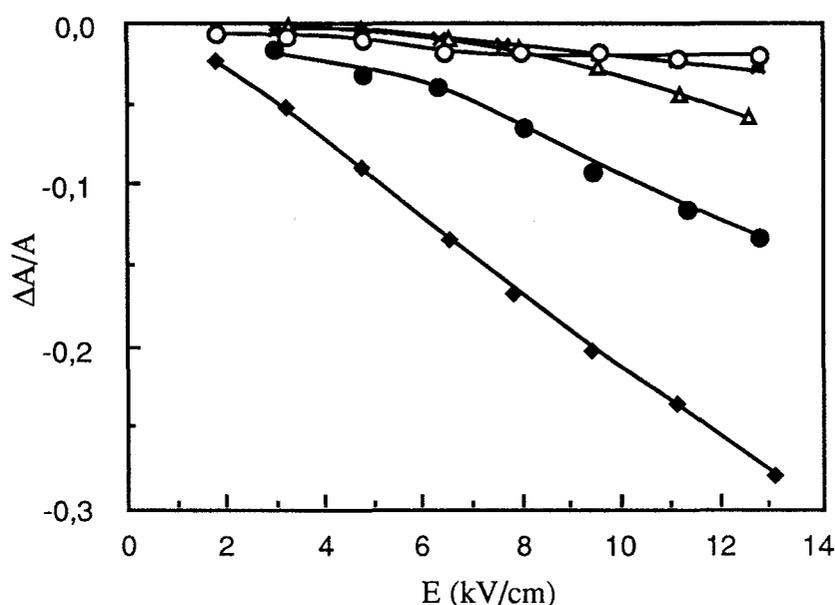
Chapitre II-1-2-2)). Il en résulte que le ligand (4) présente un processus d'intercalation très légèrement perturbé par rapport au cas optimal.

## Conclusion

Ces études physicochimiques ont montré que les ligands hybrides (3) et (4) présentent un mode bifonctionnel d'interaction avec l'ADN. L'intercalation du chromophore acridine est totale pour le composé (3) tandis qu'elle est très légèrement perturbée pour (4). La fixation de la chaîne peptidique de motifs SPKK dans le petit sillon de l'ADN est plausible selon les quenchings importants de la fluorescence du colorant Hoechst 33258. Par ailleurs le rôle de ces peptides dans l'apport d'une affinité aux molécules hybrides est indéniable. Il semble que le ligand (3) ne démontre pas de sélectivité de liaison notable. On peut émettre l'hypothèse que le site de liaison préférentiel de (4) consiste en des séquences alternées AT pouvant éventuellement inclure des résidus GC car l'intercalation de l'acridine se trouve fortement favorisée dans ces conditions. Cette sélectivité de liaison potentielle du composé (4) devra être prouvée de manière directe par des expériences de footprinting complémentaires.

## 2-4) Interaction avec la chromatine

A un rapport chromatine/ligand (ou P/D) de 10, une différence notable entre les dichroïsmes électriques à 460 nm des composés AMSAC<sub>3</sub> et (3) est observée (Figure 40).



**Figure 40** : Evolution en fonction du champ électrique du dichroïsme réduit à 460 nm du complexe AMSAC<sub>3</sub>-chromatine à un rapport chromatine/ligand (P/D) de 10 (◆), du complexe (3)-chromatine à un P/D de 10 (○) et de 20 (●), du complexe (4)-chromatine à un P/D de 20 (✱) et à 260 nm de la chromatine seule (100 μM) (Δ).

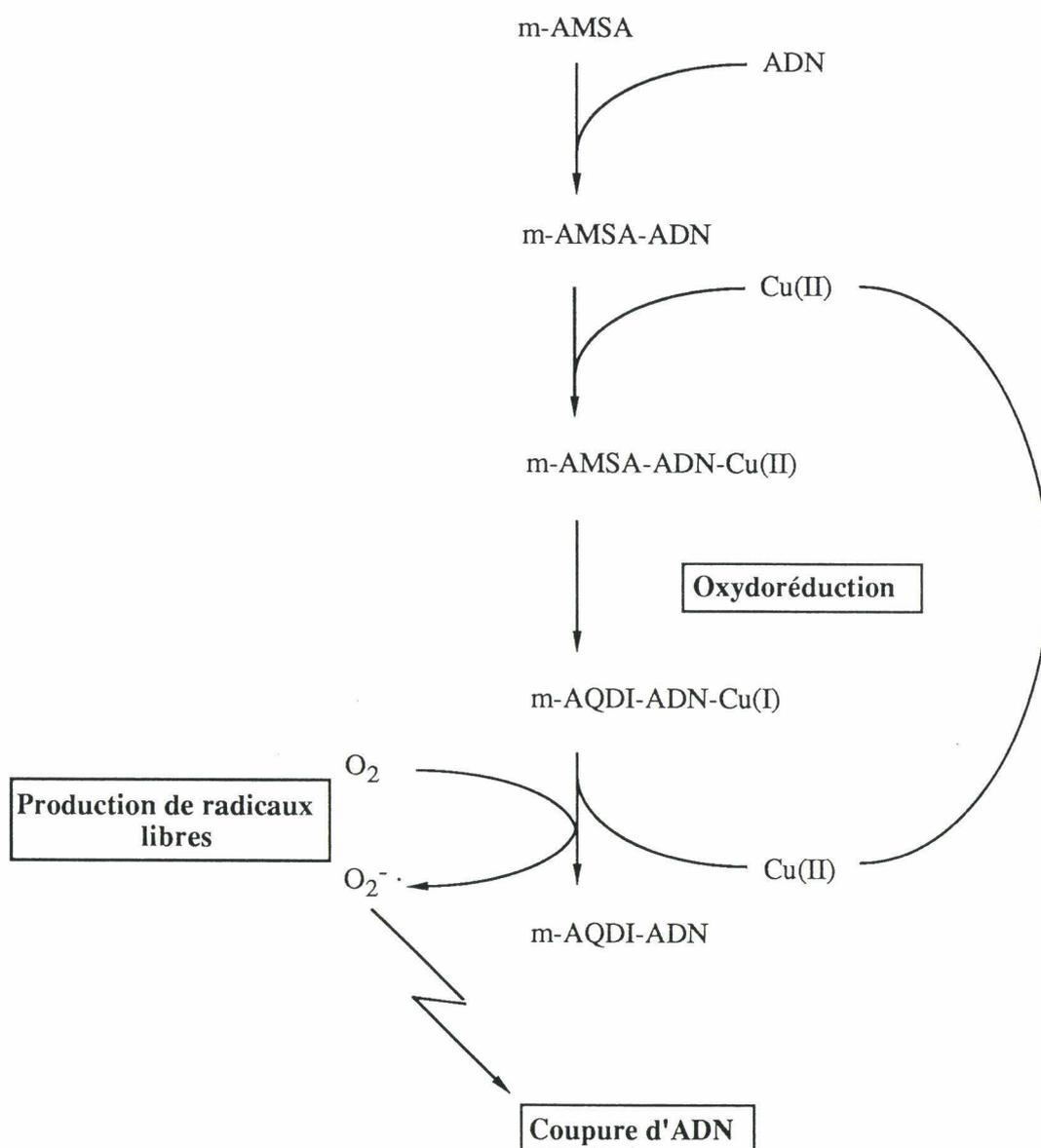
Ainsi, à un champ électrique de 13 kV/cm, l'AMSAC<sub>3</sub> présente un dichroïsme négatif cinq fois plus intense que celui de la chromatine seule tandis que le dichroïsme de (3) est au contraire trois fois plus faible. Le ligand (4) n'a pas pu être étudié dans ces conditions à cause d'une précipitation de ses complexes avec la chromatine. L'intercalation de l'AMSAC<sub>3</sub> n'est donc pas du tout perturbée par l'inclusion de l'ADN au sein de la structure chromatinienne alors que celle du composé (3) est a priori défavorisée. Néanmoins, à une concentration plus faible c'est-à-dire à un P/D de 20, (3) se caractérise par un dichroïsme supérieur à celui de la chromatine (Figure 40). L'interaction de (3) avec la chromatine est donc fonction de la

concentration et se produit de manière optimale aux valeurs de P/D élevées. Par contre, la fixation de (4) au sein de la chromatine semble désavantagée. Le dichroïsme obtenue à un P/D de 20, voisin de celui du composé (3) à un P/D de 10, suggère que l'intercalation est fortement perturbée (Figure 40).

Les composés (3) et AMSAC<sub>3</sub>, étant donné leurs dichroïsmes importants (comparativement à celui de la chromatine), doivent probablement se lier à l'ADN linker car cet ADN est plus accessible à des ligands que l'ADN nucléosomal et qu'il présente une meilleure capacité d'orientation dans un champ électrique.

## 2-5) Oxydation et activité biologique

Selon le mécanisme de cytotoxicité potentielle proposé par Wong *et al.* (Wong *et al.*, 1984a,b), l'oxydation de l'amsacrine en forme quinone-imine AQDI s'accompagne de la réduction de cuivre cuivrique (Cu(II)) en cuivre cuivreux (Cu(I)). Le cuivre I ainsi généré s'oxyde spontanément en présence d'oxygène pour régénérer du cuivre II et produire des radicaux libres oxygénés susceptibles alors d'induire des coupures d'ADN (**Figure 41**).



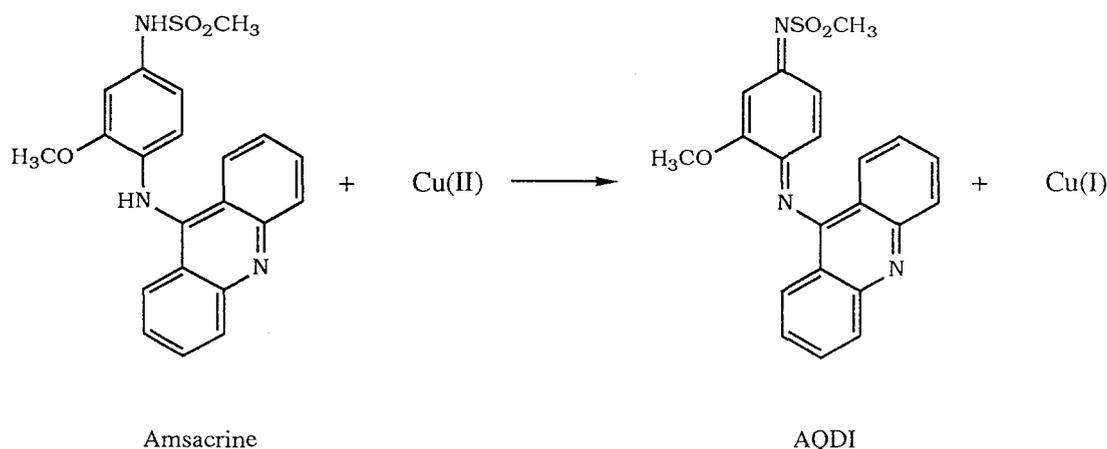
**Figure 41** : Mécanisme de cytotoxicité de l'amsacrine selon Wong *et al.* (1984 a,b).

Nous avons étudié ces propriétés pour les molécules hybrides (3) et (4) en appréhendant successivement leurs capacités d'oxydation, de production de radicaux libres et d'induction de coupures d'ADN.

### 2-5-1) Mesure de l'oxydation en présence de cuivre

(voir p.138)

L'amsacrine est capable de s'oxyder en présence de cuivre cuivrique pour donner un dérivé de type quinone-imine (AQDI) et du cuivre cuivreux:



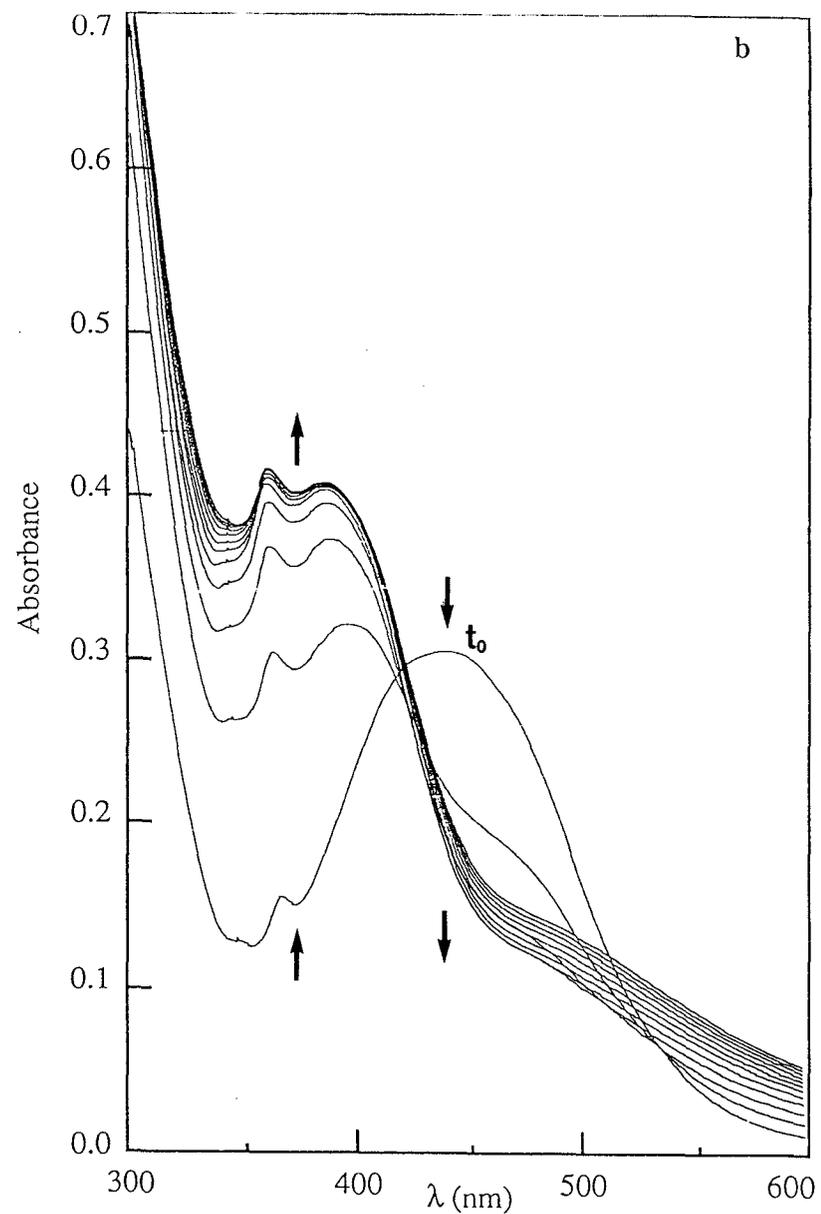
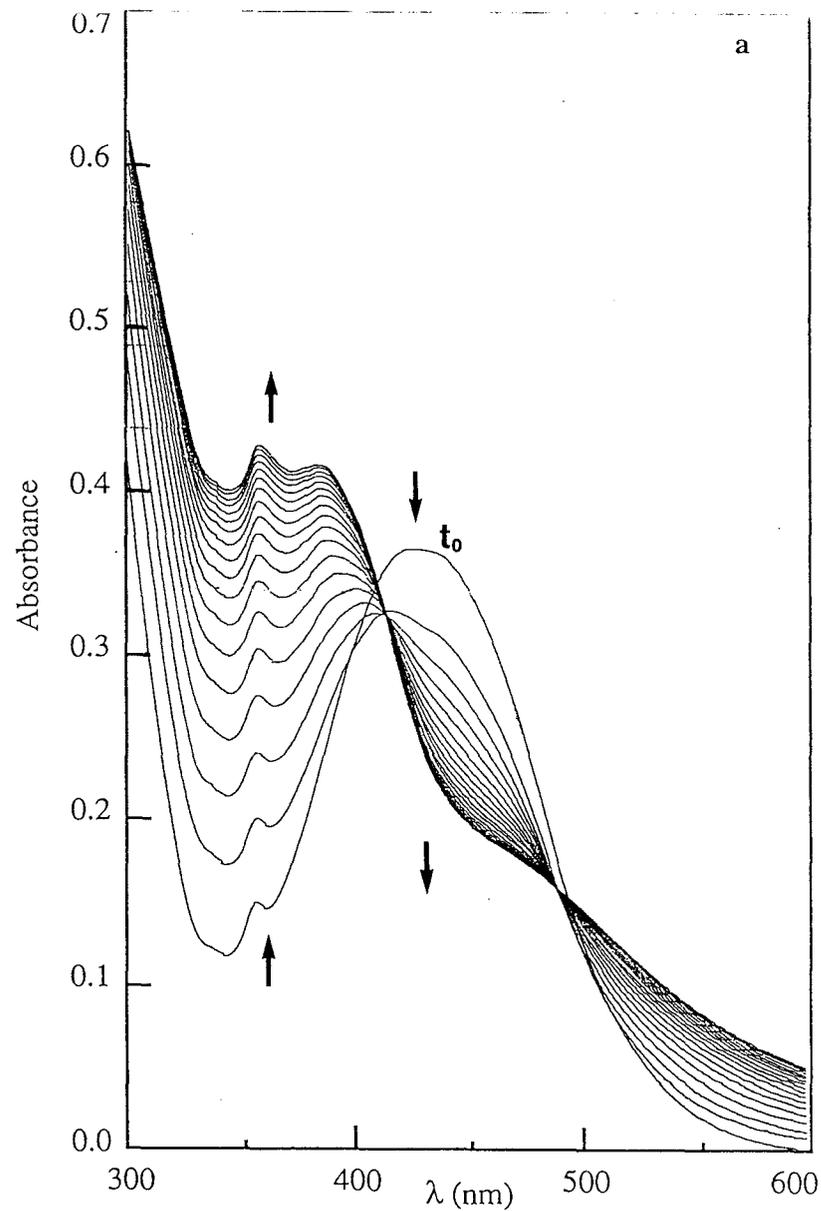
L'oxydation peut être suivie en spectroscopie d'absorption UV car les espèces réduites et oxydées absorbent à des longueurs d'ondes différentes et caractéristiques. L'addition de cuivre à une solution de ligand déclenche immédiatement ce processus d'oxydation dont la vitesse est fonction de la nature du composé, de la concentration en cuivre et surtout du pH de la solution (Wong *et al.*, 1984a,b).

Un exemple de spectres obtenus est présenté **figure 42**. L'oxydation se manifeste par une diminution nette de la bande caractéristique de l'amsacrine à 440 nm, la croissance simultanée de l'absorbance dans la région 300-400 nm et l'apparition d'un nouveau maximum d'absorption à 390 nm (**Figure 42**). A partir de telles séries de spectres, les paramètres  $t_{1/2}$  et  $t$  correspondant respectivement aux temps de demi-oxydation et d'oxydation complète ont été déterminés (**Tableau XIII**).

Comme l'indique clairement ce tableau, à pH 9,2, la substitution de l'amsacrine native en position 4 de l'acridine accroît de manière significative la vitesse d'oxydation des ligands et cet effet est à mettre en relation avec la taille de la chaîne latérale puisque les composés (3), (4) et NetAMSA présentent tous des valeurs  $t_{1/2}$  et  $t$  nettement inférieures à celles de l'AMSAC<sub>3</sub> (exception faite des valeurs  $t$  du composé (4)).

Pour des rapports Cu/ligand (C/L) de 3 et 1 et un pH de 9,2, les dérivés hybrides (3) et (4) sont similaires en ce qui concerne les temps de demi-oxydation mais très différents pour les temps d'oxydation totale puisqu'un facteur de 8 à 10 sépare les valeurs  $t$  de (3) et (4). A un rapport C/L de 0,1, les différences entre (3) et (4) s'intensifient même car (4) présente alors une valeur  $t_{1/2}$  trois fois supérieure à celle de (3). Par ailleurs NetAMSA a un comportement relativement similaire à celui de (3), avec des valeurs  $t_{1/2}$  certes supérieures mais des valeurs  $t$  assez voisines.

On notera que ces paramètres d'oxydation sont dépendants de la concentration en cuivre. A un rapport cuivre/ligand de 0,1, l'oxydation est certes plus lente qu'à des rapports plus élevés mais elle se produit cependant. La présence d'ADN influe aussi notablement sur la vitesse d'oxydation: la cinétique de l'AMSAC<sub>3</sub>, de NetAMSA et de (4) est considérablement améliorée en présence d'ADN tandis que celle de (3) reste quasiment constante. Le pH de la solution est également important. L'oxydation est très lente à pH neutre comparativement au pH basique de 9,2 mais les composés hybrides restent toujours plus sensibles que le témoin amsacrine.



**Figure 42** : Autooxydation du dérivé de l'amsacrine AMSAC<sub>3</sub> (a) et du ligand hybride (3) (b) en présence de cuivre en concentrations équimolaires (50  $\mu$ M). Les spectres d'absorption ont été enregistrés toutes les quatre minutes dans un tampon borate de sodium 50 mM, pH 9,2. Le spectre initial du ligand avant l'addition de cuivre est indiqué  $t_0$ . Le sens des flèches indique la direction des variations d'absorbance.

	C/L	pH	t <sub>1/2</sub> (min)	t (min)	C/L	pH	ADN	t <sub>1/2</sub> (min ou heures)	t (min ou heures)
Amsacrine	3	9.2	60	220	3	9.2	+	/	/
AMSAC <sub>3</sub>	3	9.2	13.3	91	3	9.2	+	4.3	58
(3)	3	9.2	1.9	18	3	9.2	+	1.7	22
(4)	3	9.2	2	186	3	9.2	+	1.7	82
NetAMSA	3	9.2	3.1	49	3	9.2	+	1.3	15
Amsacrine	1	9.2	135	345	1	7.0	-	>>20 h	/
AMSAC <sub>3</sub>	1	9.2	12.8	98	1	7.0	-	5.5 h	18 h
(3)	1	9.2	2.1	30	1	7.0	-	7.6 h	38.3 h
(4)	1	9.2	2.3	254	1	7.0	-	11 h	60 h
NetAMSA	1	9.2	4.1	50	1	7.0	-	>6.5 h	>20 h
Amsacrine	0.1	9.2	/	/					
AMSAC <sub>3</sub>	0.1	9.2	21	137					
(3)	0.1	9.2	5.1	58					
(4)	0.1	9.2	18	508					
NetAMSA	0.1	9.2	39	212					

**Tableau XIII** : Variation des paramètres cinétiques de l'oxydation des dérivés de l'amsacrine (concentration de 50  $\mu\text{M}$ ) en fonction de la concentration en sulfate de cuivre (C/L = [cuivre]/[ligand]) et du pH du tampon utilisé. En présence d'ADN (0,6 équivalent), les concentrations en ligands sont de 25  $\mu\text{M}$ .

**2-5-2) Mise en évidence de la production de radicaux libres oxygénés par chimioluminescence** (voir p.138)

Une méthode de chimioluminescence faisant intervenir la lucigénine capable de piéger les anions superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) permet de doser les espèces radicalaires de l'oxygène (Allen, 1986; Peters *et al.*, 1990). La luminescence (exprimée en cps) est directement proportionnelle à la quantité de radicaux libres émis par le système rédox.

A un pH de 9,2, les cinétiques de productions obtenues avec les ligands hybrides (3) et (4) comparativement à celles du composé témoin AMSAC<sub>3</sub> sont présentées sur la **figure 43**. Sans apport de cuivre, une production de radicaux libres est observée. Celle-ci peut être attribuée aux traces métalliques contaminant les solutions aqueuses utilisées. La chimioluminescence la plus intense est obtenue avec (3) et (4), l'AMSAC<sub>3</sub> et NetAMSA étant relativement moins performants. En présence de cuivre, la production d'espèces radicalaires est nettement améliorée pour les quatre composés (**Tableau XIV**).

C/L	0	0,05	0,1
AMSAC <sub>3</sub>	28 000	60 118	80 961
(3)	54 890	93 433	116 663
(4)	58 413	96 593	122 719
NetAMSA	11 778	37 273	47 465

**Tableau XIV** : Dosage par chimioluminescence de radicaux libres oxygénés produits par les composés AMSAC<sub>3</sub>, NetAMSA, (3) et (4). Nombre de coups enregistrés pendant une période de 30 secondes au bout d'une heure d'incubation à différents rapports Cuivre/Ligand (C/L). Les expériences ont été effectuées à un pH de 9,2 en présence de quantités équimolaires de lucigénine et de ligands (100µM).

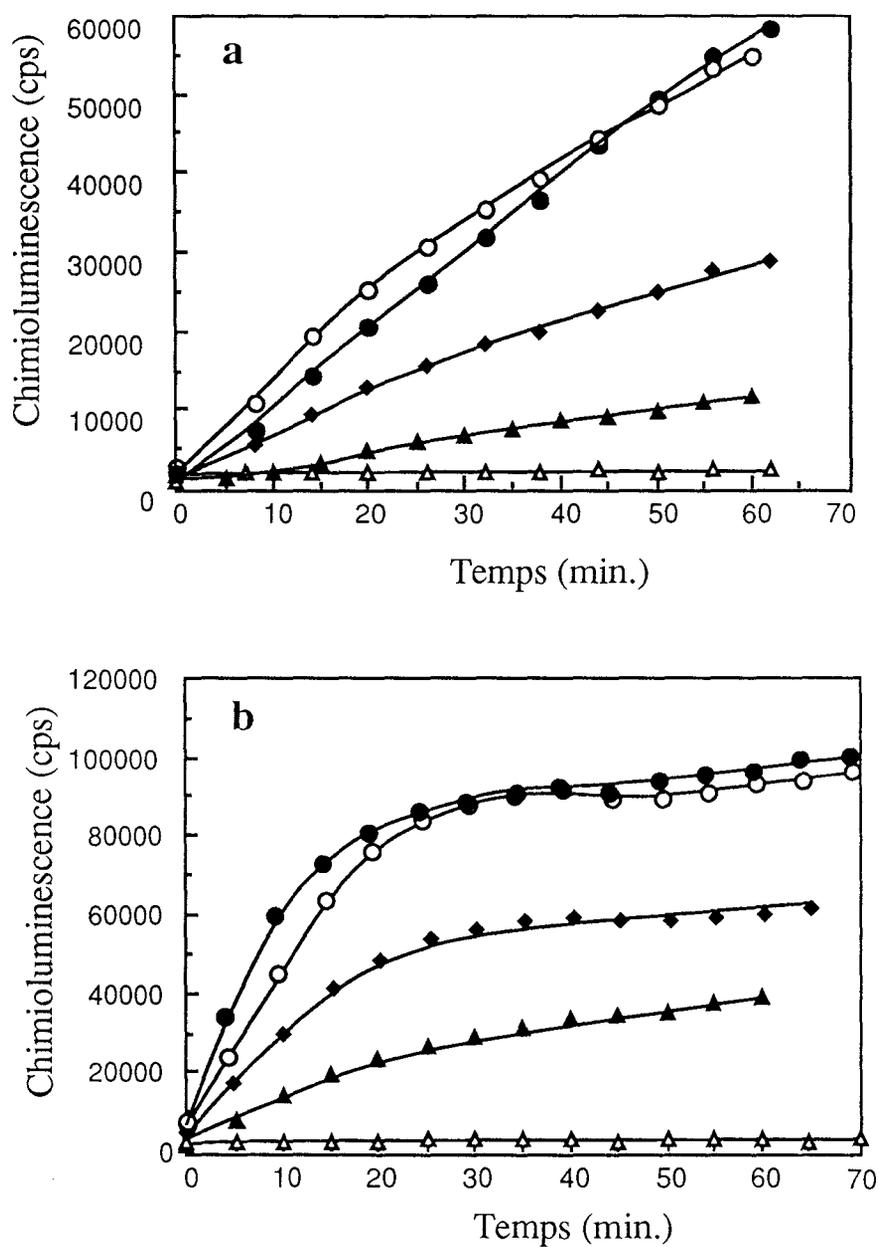
Après une heure d'incubation et pour un rapport Cuivre/Ligand (C/L) de 0,05, la luminescence est augmentée d'un facteur 3,1 , 2,1 , 1,7 et 1,6 pour NetAMSA, l'AMSAC<sub>3</sub>, (3) et (4) respectivement. A un rapport C/L de 0,1, ces facteurs prennent les valeurs de 4,0 , 2,9 , 2,1 et 2,1. Les deux composés hybrides ont des propriétés voisines supérieures à celles de l'AMSAC<sub>3</sub> et de NetAMSA,(4) présentant cependant

une luminescence un peu supérieure à celle de (3) au bout de 40 à 50 min. d'incubation. L'addition de cuivre provoque par ailleurs un changement dans l'évolution des cinétiques. En absence de cuivre, une progression quasilineaire de la luminescence caractérise les quatre ligands tandis qu'à des rapports C/L de 0,05 et 0,1 une rupture de la pente est observée après 20 à 30 min, la luminescence évoluant alors beaucoup plus lentement. Des concentrations supérieures en cuivre défavorisent nettement le processus puisque la luminescence atteint rapidement au bout de 20 à 30 min. d'incubation un maximum (dont la valeur est très inférieure à la production observée pour un rapport C/L de 0,1) puis décroît fortement.

En présence d'ADN (0,6 équivalent), les quatre composés se classent suivant des positions relatives inchangées comparativement à l'étude précédemment décrite. Néanmoins les valeurs de luminescence sont fortement affaiblies. Ceci n'est pas surprenant car les radicaux libres oxygénés générés sont susceptibles d'induire des coupures de l'ADN et la quantité disponible pour réagir avec le lucigénine s'en trouve par conséquent amoindrie.

A un pH de 7,0, nous n'avons mis en évidence aucune production de radicaux libres par les quatre composés et ceci n'est pas imputable à une inactivité de la lucigénine à ce pH, puisqu'un témoin positif est obtenu en présence d'un mélange de Cu(II) et d'eau oxygénée. En fait ce phénomène résulte de la cinétique d'oxydation très lente de ces molécules à pH neutre. Les temps de demi-oxydation sont importants (8 à 10 heures) (cf **Tableau XIII**) et simultanément la concentration en lucigénine diminue à cause de son inactivation en solution (phénomène attribuable au "bruit de fond" qui caractérise la luminescence de la lucigénine en absence d'un quelconque ligand).

S'il a été démontré jusqu'à maintenant que la lucigénine est un réactif spécifique des anions superoxyde, on ne peut exclure sa réaction avec d'autres espèces radicalaires, ce qui pourrait être le cas dans cette étude. En effet l'utilisation en RPE des composés 5,5-diméthyl-N-oxy-1-pyrroline et N-tertiobutyl- $\alpha$ -phénylnitrone susceptibles de piéger les radicaux libres  $O_2^{\cdot-}$  et  $OH^{\cdot}$  (phénomène de "spin trapping") n'a mis en évidence aucune production de ces espèces radicalaires lors de l'incubation de l'amsacrine et de NetAMSA en présence de cuivre. Il se pourrait que les espèces détectées par chimioluminescence fassent intervenir la structure de l'amsacrine et l'on aurait alors à faire à des "radicaux acridinyl".



**Figure 43 :** Chimiluminescence induite par la lucigénine (100  $\mu$ M) ( $\Delta$ ) en absence (a) et en présence de cuivre (b) par les composés AMSAC<sub>3</sub> ( $\blacklozenge$ ), (3) ( $\circ$ ), (4) ( $\bullet$ ) et NetAMSA ( $\blacktriangle$ ) (100  $\mu$ M pour chaque molécule).

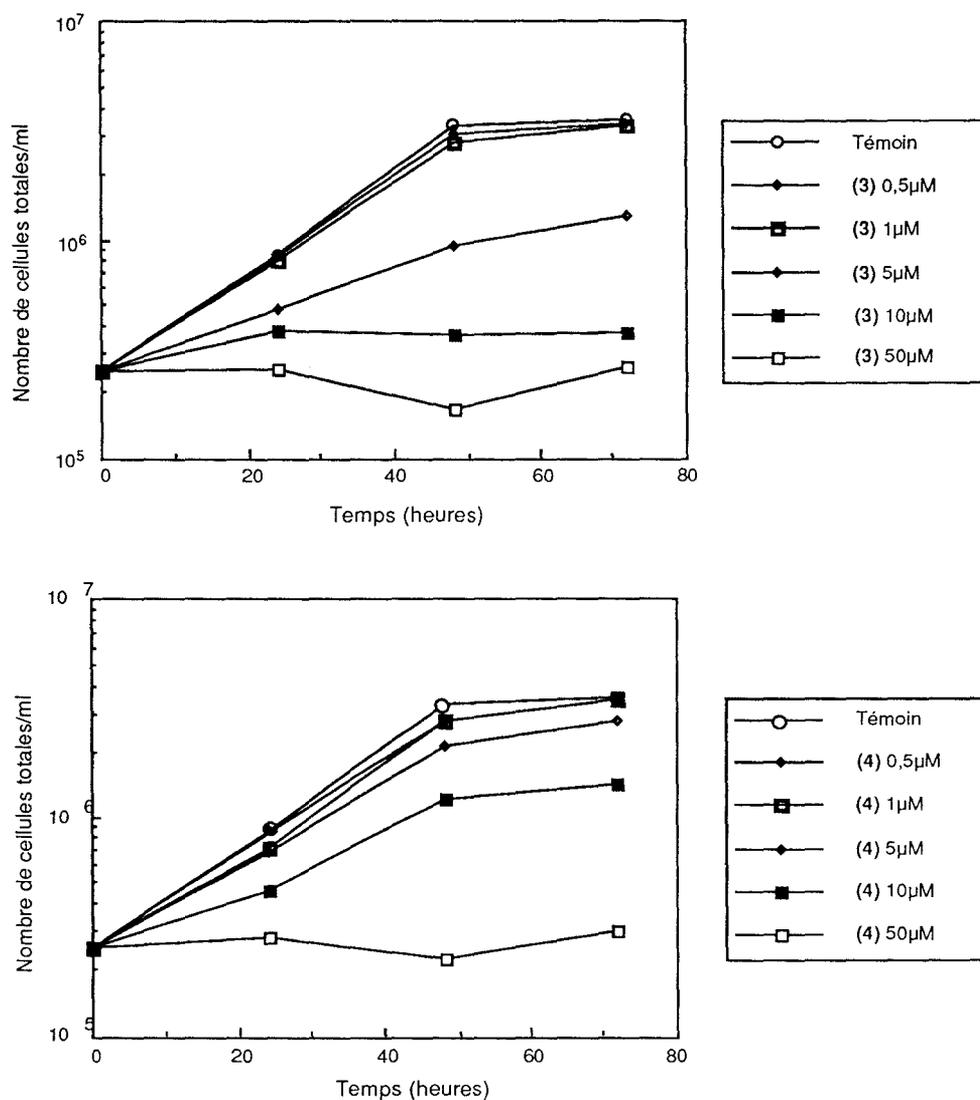
### 2-5-3) *Coupure d'ADN* (voir p.139)

Lorsqu'un plasmide natif de forme superenroulée (I) subit une coupure sur un seul brin, l'ADN se détord en une structure circulaire (forme II). Si la coupure a lieu sur les deux brins, l'ADN apparaît sous une forme linéaire (III). La capacité des différents produits étudiés à couper l'ADN est dès lors mise en évidence en suivant l'apparition des différentes formes d'ADN en gel d'agarose.

L'hybride NetAMSA présente des propriétés de coupure plus marquées que celles de l'amsacrine. Ainsi, à des concentrations équimolaires en cuivre et en ligand (70  $\mu\text{M}$ ), l'ADN est presque totalement converti sous forme II circulaire en présence du composé NetAMSA alors qu'une plus grande proportion d'ADN reste sous forme I avec l'amsacrine. Par contre, nous n'avons constaté aucune induction de coupures par les ligands hybrides (3) et (4). Notamment un retard des bandes caractéristiques du plasmide et une altération de leurs migrations différentielles sont provoquées par (3) et (4) (à partir d'une concentration de 30 et 20  $\mu\text{M}$  pour (3) et (4) respectivement). C'est pourquoi nous avons dû effectuer les expériences à des concentrations faibles en ligand, nettement inférieures à celles utilisées lors de l'étude avec NetAMSA (75 à 100  $\mu\text{M}$ ). Ce processus qui reflète certainement une compaction encore plus importante du plasmide provoquée par la liaison de (3) et (4) a donc considérablement restreint les limites expérimentales de notre étude.

### 2-5-4) *Etude in vitro du pouvoir cytotoxique*

L'effet des molécules hybrides (3) et (4) sur la multiplication des cellules leucémiques murines L1210 est présenté **Figure 44**. Au bout de trois jours d'incubation, une dose de 5  $\mu\text{M}$  en composé (3) induit une inhibition de croissance notable alors que, pour une même concentration en (4), l'effet est beaucoup plus faible. On remarquera aussi que, de manière plus globale, l'évolution de l'effet inhibiteur en fonction de la concentration en ligand est progressive pour (4) tandis qu'un écart net s'établit entre des doses de 1 et 5  $\mu\text{M}$  en composé (3) (**Figure 44**). Cette différence de pouvoirs inhibiteurs de croissance cellulaire des composés (3) et (4) se reflète non seulement dans les valeurs  $\text{IC}_{50}$  (doses en ligands suffisantes pour inhiber de 50% la croissance cellulaire; 3,8 et 8,2  $\mu\text{M}$  pour (3) et (4)) mais aussi dans les valeurs  $\text{IC}_{100}$  (doses suffisantes pour provoquer un arrêt de la croissance cellulaire; 10 et 50  $\mu\text{M}$  pour (3) et (4)).



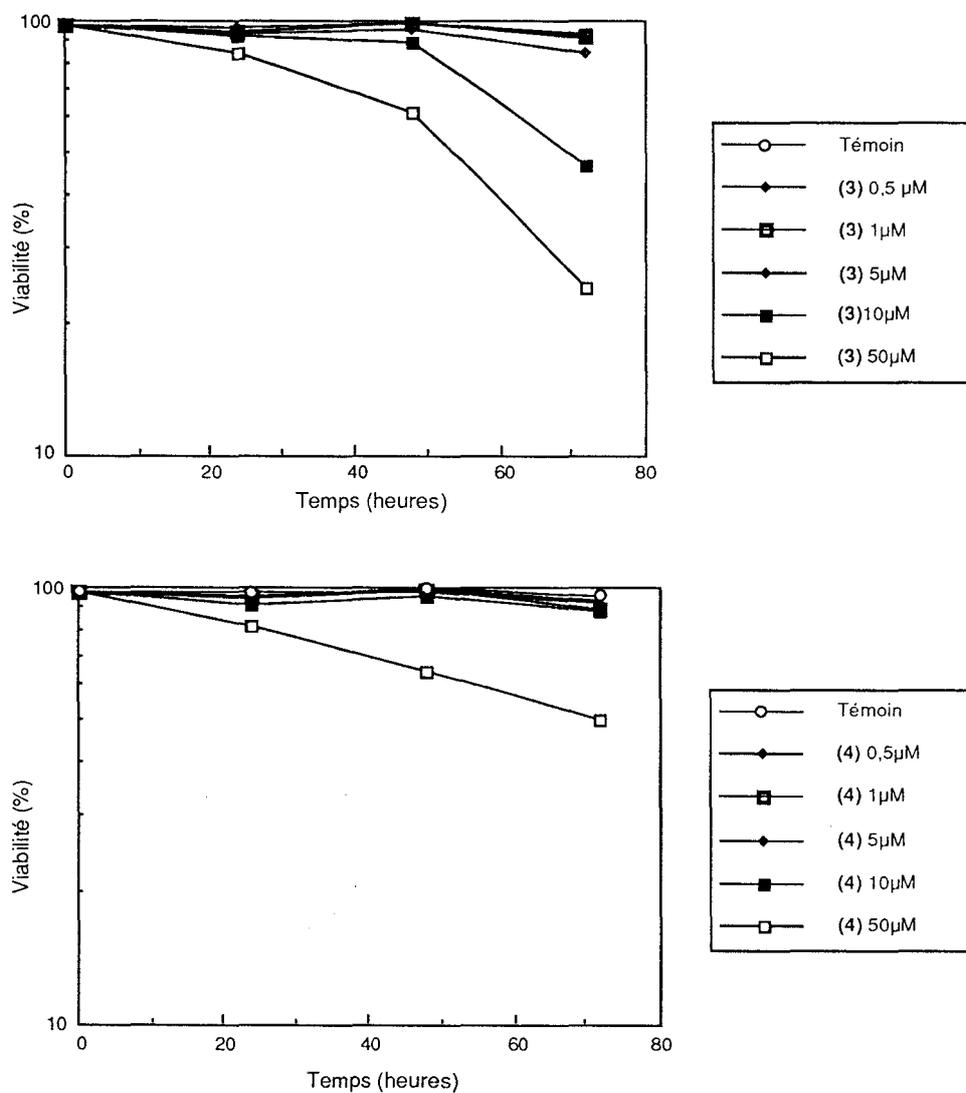
**Figure 44 :** Effet des composés hybrides (3) et (4) sur la croissance des cellules leucémiques murines L1210.

De même, les ligands (3) et (4) présentent des pouvoirs cytotoxiques très différents. Une concentration de 10 et 50  $\mu\text{M}$  en (3) et (4) respectivement réduit la viabilité cellulaire de 50% (Figure 45).

Le témoin S<sub>2</sub> (peptide SPKKSPKK) a été testé simultanément et n'a révélé aucune activité cytotatique ni cytotoxique.

Les deux composés hybrides (3) et (4) se caractérisent donc par un pouvoir cytotatique notable et un pouvoir cytotoxique faible.

Dans les deux cas, le ligand (3) est meilleur que (4). Comparativement ils présentent tous deux des propriétés bien supérieures à celles de NetAMSA mais qui restent en-deçà de celles de l'amsacrine de référence. En effet NetAMSA et l'amsacrine présentent des valeurs  $IC_{50}$  de 50 et  $0,07 \mu\text{M}$  tandis que leurs concentrations suffisantes pour réduire la viabilité cellulaire de 50% sont de 50 et  $0,5 \mu\text{M}$ .



**Figure 45** : Effet des composés hybrides (3) et (4) sur la viabilité des cellules leucémiques murines L1210.

## Conclusion

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur la mise en évidence *in vitro* de propriétés physicochimiques et biochimiques de l'amsacrine et de ses dérivés hybrides (3) et (4) qui pourraient être à la base d'une forme de cytotoxicité potentielle (parmi d'autres). Ce mécanisme d'action faisant intervenir le caractère oxydoréducteur de l'amsacrine a été mis en évidence en milieu cellulaire et il est favorisé aux pH basiques (pH 9,2) assez éloignés des conditions physiologiques. On ne peut bien sûr présager d'un tel mécanisme en milieu cellulaire *in vitro* voire *in vivo*. Ainsi les composés (3) et NetAMSA aux propriétés oxydoréductrices relativement voisines présentent *in vitro* des pouvoirs cytotoxiques nettement différents. Il est clair que d'autres facteurs doivent entrer en ligne de compte:

i) si l'on s'en tient seulement au mécanisme oxydoréducteur étudié, les molécules pourraient se comporter différemment quant à leur inactivation extranucléaire. En effet il a été démontré que le dérivé oxydé AQDI conjugué au glutathion constitue le catabolite microsomal essentiel de l'amsacrine (Shoemaker *et al.*, 1984). L'oxydation d'un ligand potentiel de l'ADN à ce niveau cellulaire conduit dès lors à un composé inactif puisque, d'une part, il n'a pas atteint sa cible nucléaire, l'ADN, et que, d'autre part, il est sous une forme quinone-imine non réactive d'après le mécanisme de Wong *et al.* (1984 a,b);

ii) le mécanisme principal de la cytotoxicité de l'amsacrine consiste en une stabilisation du complexe ADN-topoisomérase II (Drlica et Franco, 1988) et cette forme de cytotoxicité n'a pas été abordée lors de cette étude;

iii) la pénétration cellulaire et la localisation subcellulaire jouent un rôle tout aussi déterminant comme nous l'avons démontré pour les ligands (1) et (2) représentatifs du modèle (SPKK)<sub>n</sub>GA;

iv) la dégradation enzymatique peut affecter de façons différentes les molécules et, plus particulièrement, les dérivés peptidiques (3) et (4) comparativement à NetAMSA.



# CONCLUSION

Nous avons étudié deux séries hybrides répondant au concept "ligand du petit sillon- intercalant" en associant à l'amsacrine (ou à l'une de ses structures chimiques dérivées) un ou deux motifs peptidiques SPKK. L'utilisation de techniques physicochimiques et biochimiques variées a clairement montré que ces molécules hybrides interagissent avec l'ADN par un processus bimodal faisant intervenir d'une part l'intercalation du chromophore acridine entre les plateaux de paires de bases de l'ADN et d'autre part la fixation dans le petit sillon du fragment peptidique à la manière de la nétoprosine. De plus cette liaison a lieu préférentiellement au niveau de séquences alternées riches en résidus AT. Cependant les molécules hybrides ont fait preuve d'une activité biologique plus faible que celle du témoin amsacrine.

Ce travail montre clairement que toute stratégie basée uniquement sur l'amélioration des propriétés de liaison aux acides nucléiques, aussi rationnelle soit-elle, ne constitue pas le moyen absolu permettant l'obtention de composés plus actifs. Néanmoins la perte d'efficacité est certainement compensée par un gain en sélectivité.

L'ADN nucléaire fait partir de la chromatine, une structure complexe et compacte qui inclut des protéines dont notamment les histones. Cette organisation chromatinienne peut modifier l'accessibilité aux molécules de certains sites d'ADN, comparativement à l'ADN seul. C'est pourquoi une étude de l'interaction des ligands avec la chromatine s'impose comme nous l'avons effectuée.

Les molécules, pour atteindre leurs cibles potentielles nucléaires, doivent de plus traverser les membranes cytoplasmique et nucléaire. Encore faut-il qu'elles ne soient pas non plus dégradées. Les transits cellulaires et membranaires apparaissent de plus en plus comme le facteur prépondérant susceptible de limiter l'activité de substances chimiques. Ce facteur devrait être pris en compte au même titre que la liaison à l'ADN pour la conception de substances antitumorales. Peut-être conviendrait-il de coupler de telles molécules hybrides à un système de vectorisation nucléaire (de type peptide caryophile par exemple) pour qu'elles puissent atteindre leurs cibles potentielles dans de meilleures conditions ? (Hamy et al., 1991). La situation peut encore être rendue plus complexe par le fait qu'une même molécule peut posséder au niveau nucléaire plusieurs formes de cytotoxicité comme c'est le cas de l'amsacrine (stabilisation du complexe ADN-topoisomérase II et propriétés oxydoréductrices).

Si l'on se place maintenant au niveau d'un organisme entier, les facteurs pharmacocinétiques et la distribution des substances sont de nouveaux paramètres importants.

Il est donc bien évident que la liaison à l'ADN n'est qu'une étape tardive dans le mode d'action de substances chimiques et que bien d'autres facteurs sont à considérer. Cependant l'on ne peut rationnellement concevoir de nouveaux composés en tenant compte de tous ces paramètres.

Les modèles étudiés au cours de ce travail ne constituent qu'une base préliminaire pour la conception de nouvelles molécules. Ils ont servi avant tout de "sondes" des acides nucléiques et nous avons appréhendé de manière approfondie leurs modalités d'interaction avec l'ADN. A ce propos une étude par RMN<sup>1</sup>H à haut champ est en cours et permettra d'élucider précisément les interactions à la base de la reconnaissance sélective de l'ADN par ces molécules hybrides.

Du point de vue de la sélectivité de liaison, nous avons démontré que les sites préférentiels reconnus consistent en des séquences alternées d'adénine et de thymine pouvant inclure des résidus GC alors que les séquences homooligomériques d'adénine et de thymine sont formellement exclues. Il est à noter que cette discrimination n'est pas effectuée par les composés pseudopeptidiques nétropsine et distamycine. Néanmoins les séquences reconnues sont courtes (5 à 6 paires de bases) comparativement à la taille requise pour obtenir un effet génomique sélectif (au moins 15 paires de bases). D'autres modèles pourront être élaborés en augmentant le nombre de motifs SPKK de la même manière que Youngquist et Dervan (1985a) avaient accru le nombre de sous-unités N-méthylpyrrolocarboxamide de la nétropsine.

Par ailleurs ces structures hybrides peptidiques doivent être sensibles à un certain nombre de protéases et elles devront être rendues résistantes à ces enzymes par un "drug design" peptidique approprié sans altérer, si cela est possible, la conformation potentielle particulière des motifs SPKK. Ces modifications destinées à rigidifier l'ensemble et à le rendre plus stable vis-à-vis des peptidases pourront être réalisées en remplaçant des acides aminés naturels par des acides aminés modifiés (non reconnus par les enzymes) ou en effectuant une modification chimique des liaisons peptidiques, mais elles devront respecter la conformation en *turn* s'adaptant à la géométrie de l'ADN. Idéalement l'hybride devrait prendre en compte les avantages des peptides simples SPKK et ceux des pseudopeptides de type nétropsine.

Du point de vue de la vectorisation, le rôle critique tenu par l'acridine a été clairement mis en évidence. Mais la pénétration cellulaire reste faible et d'autres systèmes de vectorisation pourront peut-être être employés.

Les potentialités de perturbation sélective de certaines fonctions génomiques par ces modèles hybrides sont donc évidemment restreintes. Néanmoins l'utilisation de ces modèles pour une régulation répressive de la transcription est tout à fait envisageable car ces molécules sont susceptibles de perturber l'arrangement nucléosomal au niveau de régions-clés de l'ADN linker.



# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## 1 - SYNTHÈSE CHIMIQUE

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

- support: gel de silice 60F254 d'épaisseur 0,25 mm, référence 5735 Merck
- révélation: UV (254 et 366 nm), iode et ninhydrine
- solvants de migration (v/v): chloroforme-méthanol (A) 80:20; (B) 90:10; (F) 95:5; hexane-acétone (G) 50:50; (C) 60:40; (D) 70:30; n-butanol-acide acétique-pyridine-eau (E) 30:6:24:20; n-butanol-acide acétique-eau (H) 10:20:40.

Les spectres IR sont réalisés sur un spectrographe Perkin-Elmer 177 en dispersion dans le KBr pour les solides; les fréquences d'absorption sont exprimées en nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Les spectres de RMN<sup>1</sup>H sont enregistrés sur un appareil Brüker WP80SY (à 80 MHz) ou Brüker AM400WB (à 400 MHz), avec le tétraméthylsilane pour référence interne; chaque signal est repéré par son déplacement chimique  $\delta$  (exprimé en ppm), sa morphologie (s: singulet; d: doublet; t: triplet; q: quadruplet; m: massif) et son intensité.

Les spectres de masse sont réalisés sur un spectromètre Kratos MS50RF (FAB, Fast Atom Bombardment).

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées avec le gel de silice 60 de granulométrie 0,040 - 0,063 mm (230-400 Mesh ASTM), référence 9385 Merck.

**Abréviations utilisées:** AcOEt: acétate d'éthyle ; AcOH: acide acétique; BOC: tertibutyloxycarbonyle; BOP: Benzotriazolyl N-OxytrisdiméthylaminoPhosphonium; DCC: dicyclohexylcarbodiimide; DCHA: dicyclohexylammonium; DCU: dicyclohexylurée; DIEA: diisopropyléthylamine; DMF: diméthylformamide; DMSO: diméthylsulfoxyde; GA: glycyanilinoamino-9 acridine; HOBt: 1-hydroxybenzotriazole; MeOH: méthanol; SPKK: SerProLysLys; tBu: tertibutyle; Ser: sérine; Pro: proline; Lys: lysine; SL: spin label; Z: benzyloxycarbonyle.

### 1-1) Dérivés hybrides du type (SPKK)<sub>n</sub>GA, (1) et (2)

Les composés (1) et (2) ainsi que les peptides SPKK (19) et SPKKSPKK (18) ont été synthétisés en phase liquide suivant le schéma I et les modes opératoires détaillés dans l'article n°1.

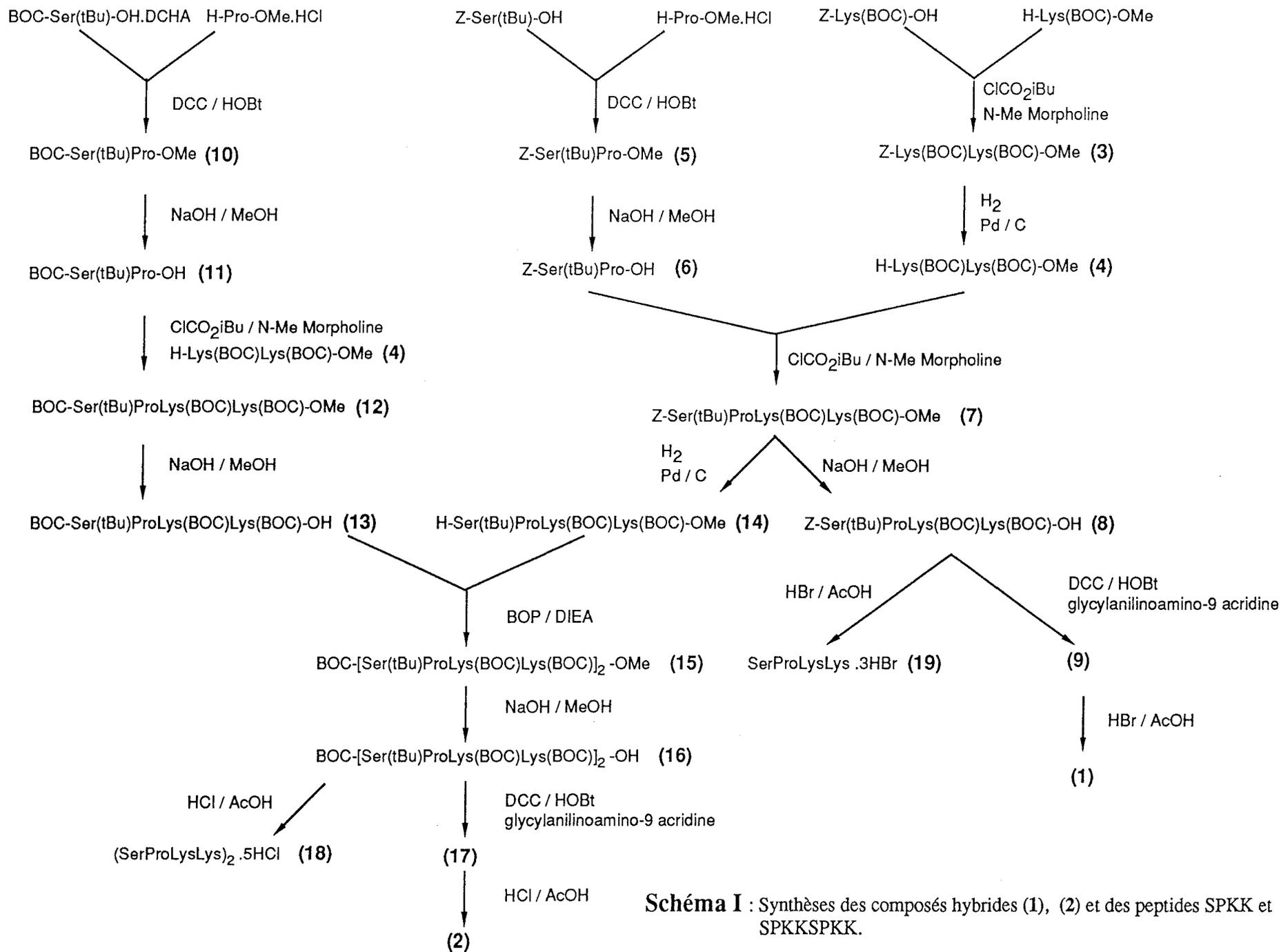
### 1-2) Dérivés peptidiques porteurs du marqueur de spin 3-carboxy-proxyle

#### 1-2-1) Dérivés hybrides SL-SPKKGA (1') et SL- (SPKK)<sub>2</sub>GA (2')

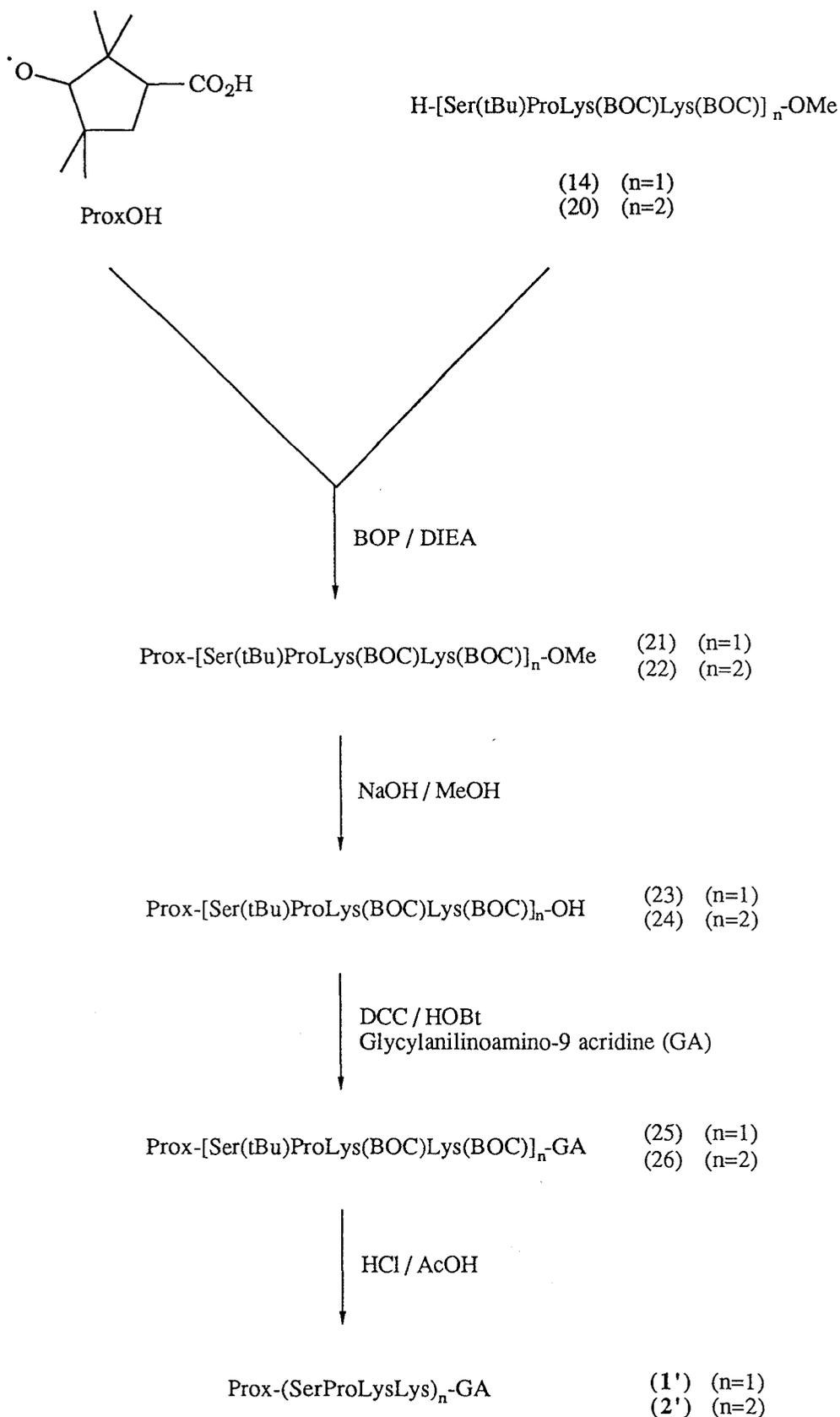
Les composés (1') et (2'), dérivés de (1) et (2) par greffage sur l'extrémité N-terminale peptidique du marqueur de spin 3-carboxy-proxyle (acide 2,2,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxylique) ont été synthétisés en phase liquide suivant le schéma II.

Ester méthylique de la (N $\alpha$ -benzyloxycarbonyl)(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysine (19)

Les térapeptides (8) (0,49 g; 0,58 mmole) et (14) (0,42 g; 0,58 mmole) (cf Article n°1) sont couplés dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) en présence d'un équivalent du réactif de Castro (BOP) (0,22 g; 0,58 mmole) et de 1,1 équivalent de diisopropyléthylamine (108  $\mu$ l) pendant une nuit à température ambiante. La solution est lavée successivement par HCl 1M, H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub> 1M et H<sub>2</sub>O puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après évaporation du solvant organique sous vide, le composé (19) est obtenu sous forme d'une poudre blanche (0,80 g; 88%). RF (F) : 0,48; RF (G) : 0,17; RMN<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  1,1 (s, 18H, O-tertiobutyle); 1,4 (s, 36H, CH<sub>3</sub> BOC); 2,0 (m, 8H, CH<sub>2</sub>,  $\beta$ Pro, CH<sub>2</sub>  $\gamma$ Pro); 2,9 (m, 8H,  $\epsilon$ CH<sub>2</sub> Lys); 3,6 (s, 3H, ester COOHCH<sub>3</sub>); 5,0 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Z); 7,4 (s, 5H, 5 CH(Z)); SM (FAB+) : 1562 (M<sup>+</sup>+1).



**Schéma I** : Synthèses des composés hybrides (1), (2) et des peptides SPKK et SPKKSPKK.



**Schéma II** : Synthèse des composés (1') et (2').

Ester méthylique de la (O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(Nε-tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(Nε-tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(Nε-tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(Nε-tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysine (20)

L'octapeptide (19) (0,4 g; 0,25 mmole) dissous dans le méthanol (10 ml) est soumis pendant une heure à une hydrogénolyse sous pression atmosphérique en présence de charbon palladié (10%Pd) (100 mg). Après filtration sur célite, le méthanol est évaporé sous vide pour donner le composé (20) (0,35 g; 96%). RF(A) : 0,79; RF(F) : 0; RMN<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) : disparition des pics caractéristiques du groupement Z à 5,0 et 7,4 ppm; SM (FAB+) : 1427 (M<sup>+</sup>+1).

Ester méthylique de la Nα-(2,5,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxy)-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(Nε-tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(Nε-tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysine (21)

Le tétrapeptide (14) (0,22 g; 0,30 mmole) (cf Article n°1) et l'acide 2,5,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxylique (ou 3-carboxy-proxyl, Aldrich) (57 mg; 0,30 mmole) sont couplés dans le dichlorométhane en présence d'un équivalent de réactif BOP (135 mg) et de 1,1 équivalent de diisopropyléthylamine (57 μl) pendant une nuit à température ambiante. La solution est lavée successivement par HCl 1M, H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub> 1M et H<sub>2</sub>O puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après évaporation du solvant organique sous vide, on obtient 0,24 g du composé (21) (87%). RF(B) : 0,81; RF(F) : 0,39; SM (FAB+) : 898 (M<sup>+</sup>+1).

Ester méthylique de la Nα-(2,5,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxy)-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(Nε-tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(Nε-tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(Nε-tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(Nε-tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysine (22)

L'octapeptide (20) (0,15 g; 0,10 mmole) et l'acide 2,5,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxylique (20 mg; 0,10 mmole) sont couplés suivant la méthode BOP/DIEA et le protocole décrit pour la préparation de (21). On obtient le composé (22) (0,13 g; 77%) ; RF(B) : 0,81; RF(F) : 0,42; SM (FAB+) : 1595 (M<sup>+</sup>+1).

N $\alpha$ -(2,5,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxy)-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysine (23)

Le composé (21) (0,14 g; 0,16 mmole) est dissous dans le méthanol (10 ml) en présence d'un excès de soude (4 équivalents). Le mélange réactionnel est agité pendant une nuit à température ambiante. Après un contrôle par CCM, le méthanol est évaporé sous vide et le résidu est repris par l'eau. La solution est alors acidifiée par addition de HCl 1M jusqu'à un pH de 3-4 et le composé (23) est recueilli dans une phase organique par plusieurs extractions successives avec AcOEt. Après l'évaporation sous vide de AcOEt, (23) est obtenu sous forme d'une poudre blanche (0,12 g; 87%) RF(B) : 0,17; RF(F) : 0; SM (FAB+) : 884 (M<sup>+</sup>+1).

N $\alpha$ -(2,5,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxy)-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysine (24)

Le composé (24) est obtenu par une saponification en milieu méthanolique de (22) (0,10 g; 0,06 mmole) selon le protocole décrit pour la préparation de (23). (60 mg ; 60%); RF(B) : 0,14; RF(F) : 0; SM (FAB+) : 1581 (M<sup>+</sup>+1).

4-(acridinyl-9-amino)-N-[N $\alpha$ -(2,5,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxy)-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-L-glycyl]aniline (25)

L'acide (23) (83 mg; 0,09 mmole) est dissous dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) puis agité à 0°C pendant une heure en présence de DCC (19 mg; 0,09 mmole) et HOBt (14 mg; 0,09 mmole). La 4-(acridinyl-9-amino)-N-glycylaniline (ou composé GA) (Hénichart *et al.*, 1982; Morier-Teissier *et al.*, 1989) (32 mg; 0,09 mmole) dissoute dans le DMF (1 ml) est alors ajoutée. Après 18 heures de réaction à 0°C, le mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /DMF est évaporé sous vide puis la DCU est précipitée dans l'éther à froid et filtrée. Après mise à sec de la solution, le résidu est alors purifié par une chromatographie sur colonne de silice dans le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15 (v/v). Le composé (25) est obtenu sous forme d'une poudre orange (70 mg; 62%). RF(A) : 0,79; RF(B) : 0,43; SM (FAB+) : 1209 (M<sup>+</sup>+1).

4-(acridinyl-9-amino)-N-[N $\alpha$ -(2,5,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxy)-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-L-glycyl]aniline (26)

L'acide (24) (31 mg; 0,02 mmole) est couplé à la 4-(acridinyl-9-amino)-N-glycylaniline (6,7 mg; 0,02 mmole) par la méthode DCC/HOBt selon le protocole décrit pour la préparation de (25). Le résidu obtenu après couplage est de même soumis à une chromatographie sur colonne de silice dans le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 85:15 pour donner (26) (11 mg; 30%). Rf(A) : 0,74; Rf(B) : 0,39; SM (FAB+) : 1905 (M<sup>+</sup>+1).

4-(acridinyl-9-amino)-N-[N $\alpha$ -(2,5,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxy)-L-seryl-L-prolyl-L-lysyl-L-lysyl-L-glycyl]aniline, trichlorhydrate (1')

Le composé (25) (68 mg; 0,05 mmole) dissous dans l'acide acétique (10 ml) est soumis à l'action de l'acide chlorhydrique gazeux pendant 30 minutes. La solution est mise à sec puis lavée plusieurs fois par l'éther. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne dans le système n-butanol/AcOH/H<sub>2</sub>O 10:20:40 (v/v). Les fractions recueillies sont évaporées sous vide, redissoutes dans l'eau puis lyophilisées pour donner (1') sous forme d'une poudre orange (47 mg; 78%).

RF(E) : 0,71; RF(H) : 0,52; SM (FAB+) : 952 (M<sup>+</sup>+1).

4-(acridinyl-9-amino)-N-[N $\alpha$ -(2,5,5,5-tétraméthyl-1-oxy-pyrrolidine-3-carboxy)-L-seryl-L-prolyl-L-lysyl-L-lysyl-L-seryl-L-prolyl-L-lysyl-L-lysyl-L-glycyl]aniline, pentachlorhydrate (2')

L'acidolyse en milieu HCl/AcOH du composé (26) (14 mg; 0,007 mmole) est effectuée de la même façon que pour la préparation de (1'). Le résidu obtenu après réaction est purifié par chromatographie sur colonne dans le système n-butanol/AcOH/Pyridine/H<sub>2</sub>O 30:6:24:20. On obtient le composé (2') sous forme d'une poudre orange (4 mg; 35%).

RF(E) : 0,71; RF(H) : 0,38; SM (FAB+) : 1393 (M<sup>+</sup>+1).

### *1-2-2) Dérivé peptidique SL-SPKKSPKK*

Le dérivé du peptide Ser-Pro-Lys-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys porteur du marqueur de spin 3-carboxyproxyl du côté N-terminal a été synthétisé en phase solide ou hétérogène.

Nous rappellerons ici brièvement le principe de la synthèse peptidique en phase solide (Schéma IV).

Au support insoluble (résine) est fixé un premier acide aminé protégé au niveau de sa fonction  $\text{NH}\alpha$  par un groupement 9 fluorénylméthoxy-carbonyl (Fmoc) qui absorbe en UV à 301 nm et qui est labile aux amines primaires et secondaires mais résistant aux acides.

Cet acide aminé est alors déprotégé sélectivement au niveau de sa fonction  $\text{NH}\alpha$  par une solution de pipéridine à 20% dans le diméthylformamide (DMF). La résine est lavée par du DMF. L'acide aminé suivant (toujours protégé au niveau de sa fonction  $\text{NH}\alpha$  et de ses chaînes latérales si besoin en est) est couplé à la chaîne peptidique néoformée ou au premier acide aminé. En fin de couplage, un test qualitatif simple de Kaiser (à la ninhydrine) permet de mettre en évidence d'éventuelles fonctions amines primaires ou secondaires libres n'ayant pas réagi. Une nouvelle étape de lavage suit le couplage afin d'éliminer l'excès de réactifs. Le cycle de couplage et de déprotection est répété jusqu'à obtention de la séquence peptidique désirée. Chaque cycle de couplage dure environ 40 à 50 minutes. En fin de synthèse, le peptide est clivé de sa résine.

L'intérêt de cette méthode réside non seulement dans sa simplicité et sa rapidité mais aussi dans le suivi de la réaction rendu possible par la détection en UV à 301 nm du groupement Fmoc. Le rendement de chaque étape de couplage étant toujours inférieur à 100%, des versions tronquées du peptide sont élaborées et une étape de purification poussée s'avère nécessaire.

Dans le cas plus particulier de la synthèse du composé Prox-Ser-Pro-Lys-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys (ou SL-SPKKSPKK), nous avons utilisé la résine du type Novasyn KA (à 0,1 mmole/g de groupements hydroxyle) et les acides aminés Fmoc-Ser(tBu)-OPfp, Fmoc-Pro-OPfp et Fmoc-Lys(Boc)-OPfp. Le couplage de ces acides aminés activés par un ester de pentafluorophényle (-OPfp) est réalisé en présence d'une quantité équimolaire de 1-hydroxy-benzotriazole (HOBt), les mélanges acide aminé/HOBt étant introduits en excès par rapport à la quantité de résine utilisée (2,5 équivalents). Le marqueur de spin 3-carboxyproxyl (acide 2,2,5,5-tétraméthyl-1-oxy-

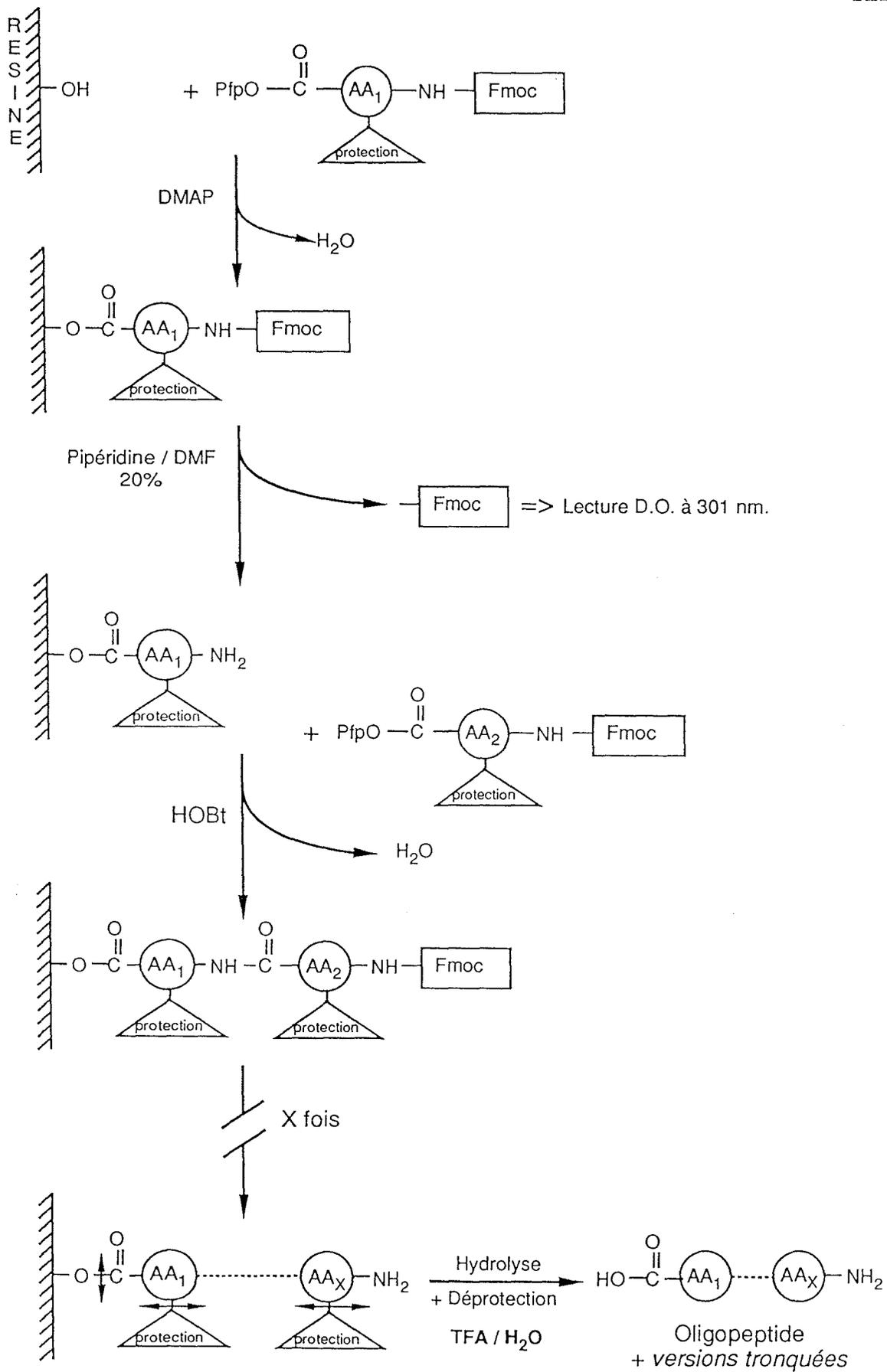


Schéma IV

pyrrolidine-3-carboxylique) est activé par le réactif BOP (Benzotriazolyl N-Oxytrisdiméthyl amino-Phosphonium) en présence de diisopropyléthylamine. A l'issue de la synthèse, la résine est retirée de la colonne de réaction puis lavée successivement par le DMF, le n-butanol, l'acide acétique et le n-butanol. Le clivage final du peptide de la résine ainsi que la déprotection des chaînes latérales des acides aminés sont effectués par un traitement à l'aide d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) (95%)/H<sub>2</sub>O (5%) pendant 1 h 30. Après filtration de la résine, la solution TFA/H<sub>2</sub>O est évaporée sous vide et le peptide est précipité dans l'éther.

Le résidu est alors purifié par chromatographie liquide à haute performance sur colonne C18 avec un système acétonitrile (12%) / TFA 1% dans l'eau (88%) et un débit de 1,5 ml/min. La détection est effectuée à 210 nm et le pic majoritaire obtenu (60%; temps de rétention de 13 min.) est identifié en spectrométrie de masse comme étant le produit désiré (FAB+: 1068 (M<sup>+</sup>+1)).

### 1-3) Dérivés hybrides du type (SPKK)<sub>n</sub>Amsa, (3) et (4)

Les composés (3) et (4) ont été synthétisés en phase liquide suivant le schéma III. Le dichlorhydrate de 3-méthoxy-4-[4-(3-aminopropylaminocarbonyl)-acridinyl-9-amino]-N-méthanesulfonanilide (27) (encore appelé AmsaC<sub>3</sub>) nous a été fourni par le Professeur W.A. Denny (Université d'Auckland, Nouvelle Zélande).

3-méthoxy-4-[4-[(N $\alpha$ -tertiobutyloxycarbonyl)-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-(N $\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl-aminopropylaminocarbonyl]-acridinyl-9-amino]-N-méthanesulfonanilide (28)

L'acide (13) (0,14 g; 0,17 mmole) (cf Article n°1) est dissous dans le DMF anhydre (5 ml) puis agité pendant une heure à 0°C en présence de DCC (39 mg; 0,19 mmole) et HOBt (29 mg; 0,19 mmole). Le composé (27) (98 mg; 0,17 mmole) préalablement neutralisé dans le DMF par de la triéthylamine (2 équivalents, 48  $\mu$ l) est alors ajouté. Le couplage est réalisé pendant une nuit à 0°C. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu est purifié par une chromatographie sur colonne de silice avec le solvant d'éluion CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95:5 v/v). On obtient 100 mg du composé (28) (44%). RF (F) : 0.18; RMN<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  1,1 (s, 9H, O-tertiobutyle); 1,4 (s, 27H, CH<sub>3</sub> BOC); 2,0 (m, 4H, CH<sub>2</sub> $\beta$  Pro, CH<sub>2</sub> $\gamma$  Pro); 2,9 (m, 4H,  $\epsilon$ CH<sub>2</sub> Lys); 3,0 (m, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,5 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6,7-8,6 (m, 10H, CH aromatiques); SM (FAB+) : 1291 (M<sup>+</sup>+1).

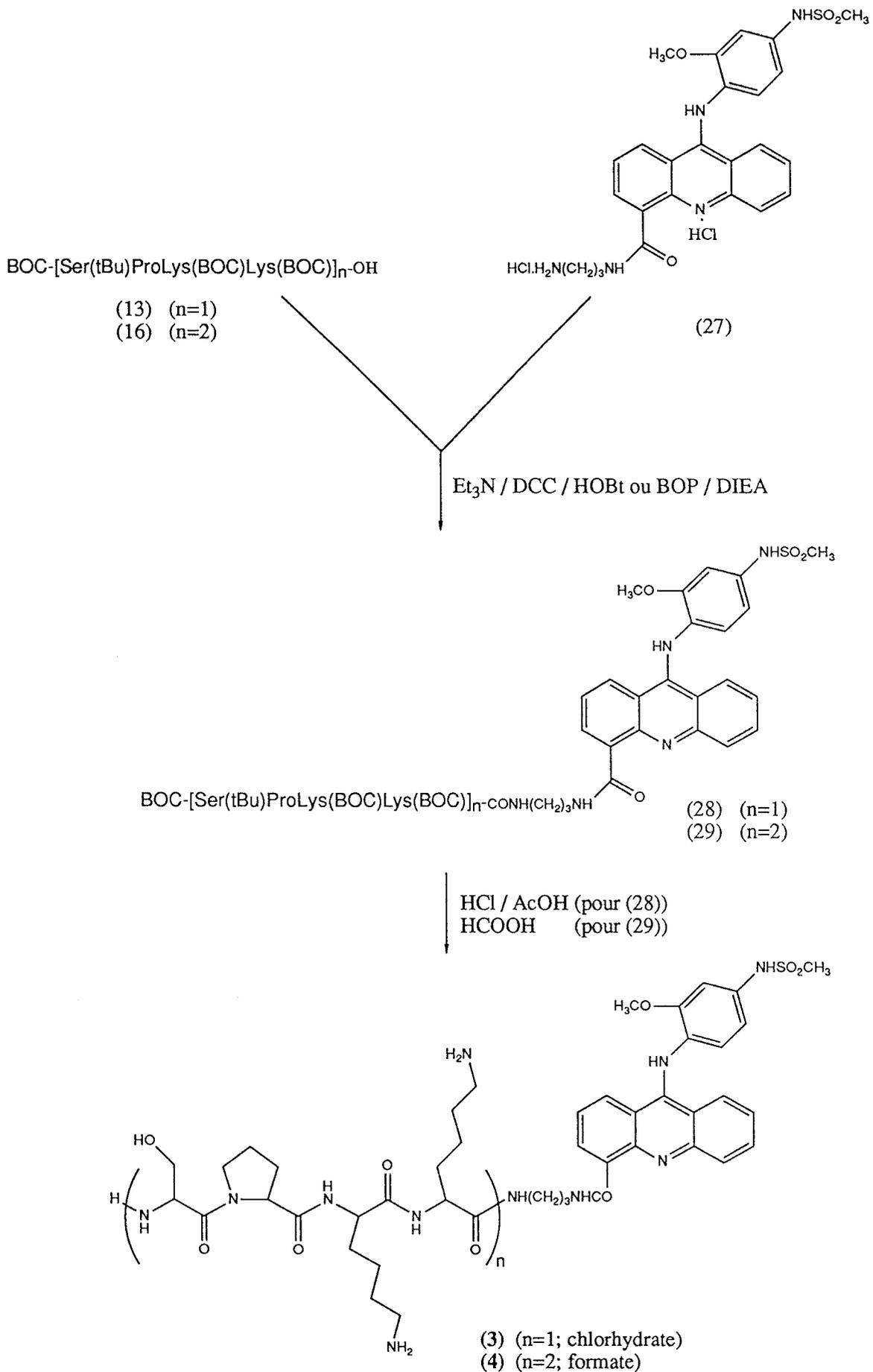


Schéma III : Synthèse des composés hybrides (3) et (4).

3-méthoxy-4-[4-[[ $(N\alpha$ -tertiobutyloxycarbonyl)-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl- $(N\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl- $(N\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl- $(N\alpha$ -tertiobutyloxycarbonyl)-(O-tertiobutyl)-L-seryl-L-prolyl- $(N\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl- $(N\epsilon$ -tertiobutyloxycarbonyl)-L-lysyl]-aminopropylaminocarbonyl]-acridinyl-9-amino]-N-méthanesulfonanilide (29)

L'acide (16) (0,15 g; 0,1 mmole) (cf Article n°1) et le composé (27) (56 mg; 0,1 mmole) sont dissous dans le DMF (10 ml) et mis en présence du réactif BOP (44 mg; 0,1 mmole) et de diisopropyléthylamine (50  $\mu$ l; 0,3 mmole). Le couplage est effectué pendant une nuit à température ambiante puis le DMF est évaporé sous vide. Le résidu est redissous dans  $CH_2Cl_2$  et lavé plusieurs fois par  $H_2O$ . La phase organique est alors séchée sur  $Na_2SO_4$  puis mise à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice avec le solvant d'élution  $CH_2Cl_2/MeOH$  (92:8 v/v) pour donner (29) (0,121 g; 61%) ; RF (B): 0.74; RMN<sup>1</sup>H (DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  1,1 (s, 18H, O-tertiobutyle); 1,4 (s, 45H,  $CH_3BOC$ ); 3,0 (m, 3H,  $SO_2CH_3$ ); 3,5 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 6,7-8,6 (s, 10H, CH aromatiques); SM (FAB+) : 1988 ( $M^++1$ ).

3-méthoxy-4-[4-[[L-seryl-L-prolyl-L-lysyl-L-lysyl]-aminopropylaminocarbonyl]-acridinyl-9-amino]-N-méthanesulfonanilide, tétrachlorhydrate (3)

L'acidolyse en milieu HCl/AcOH du composé (28) (86 mg; 0,06 mmole) est effectuée à température ambiante pendant 40 minutes. La solution est alors mise à sec et le résidu est lavé plusieurs fois à l'éther. On obtient le composé (3) sous forme d'une poudre orange (65 mg; 90 %) ; RF (E) : 0.48; RF (H) : 0.43; RMN<sup>1</sup>H (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) :  $\delta$  1,37 (m, 4H,  $2CH_2 \gamma Lys$ ), 1,55-1,89 (m, 10H,  $CH_2$ ,  $2CH_2 \beta Lys$ ,  $2CH_2 \delta Lys$ ), 2,05 (m, 4H,  $CH_2 \beta Pro$ ,  $CH_2 \gamma Pro$ ), 3,12 (s, 3H,  $SO_2CH_3$ ), 3,45 (m, 6H,  $2CH_2NH$ ,  $CH_2 \delta Pro$ ), 3,53 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3,70 (m, 2H,  $CH_2 \beta Ser$ ), 4,20 (m, 9H, 3  $NH_3^+$ ), 4,30-4,55 (m, 4H,  $2CH \alpha Lys$ ,  $CH \alpha Pro$ ,  $CH \alpha Ser$ ), 7,12-8,35 (m, 13H, 10CH Ar, 1NH, 2NH Lys), 9,45 (m, 1H, NH), 10,13 (m, 1H, NH), 11,56 (m, 1H, NH), 14,3 (m, 1H,  $NH^+$ ); SM (FAB+) : 934 ( $M^++1$ ).

3-méthoxy-4-[4-[[L-seryl-L-prolyl-L-lysyl-L-lysyl-L-seryl-L-prolyl-L-lysyl-L-lysyl]-aminopropylaminocarbonyl]-acridinyl-9-amino]-N-méthanesulfonamide, hexaformate (4)

La déprotection du composé (29) (39 mg; 0,02 mmole) a été effectuée par un traitement à l'acide formique (à 98% dans l'eau) pendant une heure à température ambiante. L'acide est alors évaporé sous vide et le résidu est purifié par une chromatographie sur colonne de silice avec le solvant d'élution AcOH 50%. Les fractions recueillies sont mises à sec, redissoutes dans l'eau et lyophilisées. On obtient 25 mg du composé (4) (77%). RF (E) : 0.45; RF (H) : 0.24; RMN<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) :  $\delta$  1,33 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub>  $\gamma$ Lys), 1,55-1,89 (m, 18H, CH<sub>2</sub>, 4CH<sub>2</sub>  $\beta$ Lys, 4CH<sub>2</sub>  $\delta$ Lys), 2,05 (m, 8H, 2CH<sub>2</sub>  $\beta$ Pro, 2CH<sub>2</sub>  $\gamma$ Pro), 3,12 (s, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,45 (m, 8H, 2 CH<sub>2</sub>NH, 2CH<sub>2</sub>  $\delta$ Pro), 3,53 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,70 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>  $\beta$ Ser), 4,20 (m, 15H, 5NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 4,30-4,55 (m, 8H, 4CH  $\alpha$ Lys, 2CH  $\alpha$ Pro, 2CH  $\alpha$ Ser), 7,12-8,35 (m, 15H, 10CH Ar, 1NH, 4NH Lys), 8,55 (m, 1H, NH Ser), 9,45 (m, 1H, NH), 10,13 (m, 1H, NH), 11,56 (m, 1H, NH), 14,3 (m, 1H, NH<sup>+</sup>); SM (FAB<sup>+</sup>) : 1375 (M<sup>+</sup>+1).

## 2) INTERACTION AVEC L'ADN ET LA CHROMATINE

Les ADN naturels de thymus de veau, *Clostridium perfringens* et *Micrococcus lysodeikticus* ainsi que les polynucléotides synthétiques poly(dAT)-poly(dAT), poly(dGC)-poly(dGC), poly(dA)-poly(dT) et poly(dG)-poly(dC) (Sigma) ont été utilisés sans purification préliminaire. Leurs concentrations ont été déterminées à l'aide de leurs coefficients d'extinction molaires respectifs qui sont de 6600, 6600, 6950, 6600, 7400, 6000, et 7400 M<sup>-1</sup>-cm<sup>-1</sup>.

La chromatine a été préparée à partir d'érythrocytes de poulet selon le protocole de Koch par l'équipe du Pr C. Houssier (Université de Liège) (Flock, 1991) et dialysée plusieurs fois contre le tampon cacodylate de sodium 1 mM (pH 6,5). Des rapports d'absorbance A(260)/A(230) et A(260)/A(280) respectivement égaux à 1,5 et 1,8 ainsi que les mesures optiques révèlent que la chromatine purifiée n'est pas dénaturée. Elle doit être alors utilisée immédiatement car la stabilité de l'ensemble protéines-ADN est relativement faible. La concentration a également été déduite en utilisant le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon(260) = 6700 \text{ M}^{-1}\text{-cm}^{-1}$ .

Les composés non synthétisés au laboratoire (ou non fournis par des collaborateurs) utilisés comme témoins sont d'origine commerciale: nétoprosine (Fluka), bromure d'éthidium (Serva), Hoechst 33258 (bisbenzimidazole, Sigma), actinomycine D (Merck), rouge neutre et vert de méthyle (Aldrich).

### 2-1) Spectres d'absorption UV

Les spectres d'absorption des différentes molécules et de leur complexe avec l'ADN (ou la chromatine) sont enregistrés dans une zone de longueur d'ondes de 200 à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon-Kontron 810-820 couplé à un enregistreur Uvikon 21 et à une imprimante Uvikon 48. La cuve de mesure en quartz de 3 ml et de trajet optique de 10 mm contient la molécule à tester à une concentration de 15  $\mu\text{M}$  dans le tampon Tris-HCl 1mM, pH 7,0. L'ADN de thymus de veau (ou la chromatine) est ajouté par incréments à partir d'une solution mère à 300  $\mu\text{M}$ .

## 2-2) Dénaturation thermique d'ADN

Il est établi que l'interaction de substances avec l'ADN (intercalantes ou ligands du petit sillon) entraîne une stabilisation de la double hélice d'ADN vis-à-vis de la dénaturation thermique. Ainsi l'augmentation de la température de dénaturation thermique,  $\Delta T_m$ , d'un ADN en présence d'un ligand donne une estimation de sa capacité à stabiliser la double hélice. Par ailleurs les valeurs de  $\Delta T_m$  obtenues sur des ADN de compositions variables permettent d'estimer le degré de sélectivité globale du ligand pour certains ADN.

Les courbes de dénaturation (ou de fusion) de l'ADN sont obtenues en enregistrant l'évolution de l'absorbance à 260 nm de la solution en fonction de la température. En effet l'augmentation de température induit un désappariement des bases de l'ADN et donc une hyperchromicité. La température de demi-transition encore appelée température de fusion de l'ADN ( $T_m$  pour melting temperature) correspond à la température à laquelle 50% de l'ADN se trouvent dénaturés c'est-à-dire au point d'inflexion de la sigmoïde de transition hyperchrome. Le couplage du spectrophotomètre Uvikon-Kontron 810-820 à un bain thermostaté (unité Haake P620) permet la programmation d'une montée progressive de la température des échantillons à raison de 1°C/minute. L'absorbance à 260 nm est enregistrée à partir de 50°C, en présence d'ADN de thymus de veau ( $T_m$  de 66°C) et de 30°C, en présence du polynucléotide poly(dAT)-poly(dAT) ( $T_m$  de 44°C). Le tampon 0,1 SSC (citrate de sodium 1,5 mM ; chlorure de sodium 15 mM ; pH 7,0) est utilisé.

## 2-3) Analyses par Scatchard

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

Les absorbances de solutions de ligands à des concentrations croissantes sont mesurées en absence et en présence d'une quantité fixe (50 à 200  $\mu\text{M}$  selon les cas) pour donner les valeurs d'absorbance  $A_f$  et  $A_b$  respectivement. En présence d'ADN, comme la titration est réalisée à 264 nm (pour les composés (1) et (2)) ou à 250 nm (pour les composés (3), (4) et (27)), une quantité équimolaire d'ADN est mise dans la cuve de référence afin d'atténuer l'influence de l'absorption intrinsèque du polynucléotide à ces longueurs d'onde. Pour chaque rapport ligand/ADN, le facteur  $C_b$  est calculé grâce à la relation 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 d'ADN,  $\epsilon_f$  est le coefficient d'extinction molaire du ligand libre et  $\epsilon_b$  est le coefficient d'extinction molaire du ligand lié à l'ADN.  $\epsilon_b$  correspond aux valeurs  $\epsilon$  du ligand quand il est en très large défaut par rapport à l'ADN (c'est-à-dire pour les premiers points de la titration).

Les mesures d'absorption sont effectuées dans le tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, pH 7,0. Le "fitting" des courbes obtenues est obtenu par l'utilisation du programme Enzfitter (Leatherbarrow, 1990) selon le modèle à un ou deux sites indépendants non coopératifs et a été réalisé par le Pr C. Houssier (Université de Liège).

#### 2-4) Quenching de fluorescence

Cette méthode permet d'appréhender les molalités d'interaction des ligands étudiés suivant l'importance relative de la diminution (ou quenching) de la fluorescence des complexes éthidium-ADN et Hoechst-ADN qu'ils induisent. Les mesures sont effectuées à température ambiante dans le tampon Tris-HCl 1 mM, pH 7,0 à l'aide d'un spectrofluorimètre Kontron SFM25 équipé d'un enregistreur Plotter 800. Les complexes éthidium-ADN et Hoechst-ADN sont excités à 546 et 353 nm respectivement tandis que l'émission de fluorescence est mesurée à 595 et 465 nm. Les valeurs  $Q_{50}$  sont définies comme étant les concentrations en ligand compétiteur suffisantes pour réduire la fluorescence initiale de 50%.

Une première méthode consiste à mettre le fluorophore (2  $\mu\text{M}$ ) en défaut par rapport à l'ADN (20  $\mu\text{M}$ ). Dans un second temps, nous nous sommes placés dans des conditions expérimentales inverses où le fluorophore (1,26  $\mu\text{M}$ ) est en excès par rapport à l'ADN (1  $\mu\text{M}$ ). En effet ces conditions sont mieux susceptibles de refléter

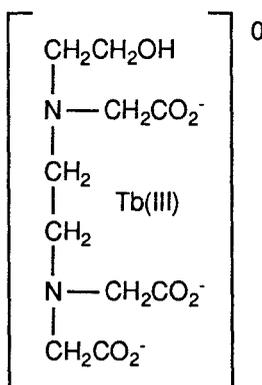
une compétition directe entre le ligand ajouté et le fluophore de départ en éliminant des mécanismes indirects de quenching de fluorescence (Baguley *et al.*, 1981; Baguley et Le Bret, 1984).

## 2-5) Transfert d'énergie de fluorescence de chélates de terbium exalté par la diffusion (ou méthode DEFET)

Les études ont été réalisées par l'équipe du Pr C. Houssier (Université de Liège).

La mesure des transferts d'énergie de fluorescence entre un chélate de terbium et une substance étudiée seule, d'une part, et liée à l'ADN (ou à la chromatine), d'autre part, est corrélée à l'accessibilité du chélate au complexe ligand-ADN (ou chromatine) (Lerho *et al.*, 1990; Lerho, 1991; Wensel *et al.*, 1985; Wensel *et al.*, 1983). Dans le cas plus précis de notre étude, cette méthode nous a permis d'appréhender la position du chromophore acridine des ligands étudiés relativement aux paires de bases du site d'intercalation. Autrement dit plus l'acridine est "enfouie" entre les paires de bases de l'ADN, plus son accessibilité à la sonde de terbium est réduite et le transfert d'énergie se trouve de ce fait amoindri.

Le chélate de terbium III utilisé, TbHED3A<sup>0</sup> (Figure 46) est préparé selon le protocole de Wensel *et al.* (1983) par réaction de TbCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O avec un léger excès d'acide N-(2-hydroxy éthyl)-éthylènediaminetriacétique (HED3A). Les ions Cl<sup>-</sup> sont éliminés par lavage sur colonne AG1X8 (Bio Rad; forme acétate) au moyen d'eau bidistillée. Les fractions contenant TbHED3A<sup>0</sup> sont identifiées par mesure de la fluorescence émise à 544 nm pour une excitation à 370 nm.



**Figure 46** : Structure du chélate de terbium TbHED3A<sup>0</sup>

Les temps de vie de fluorescence sont mesurés avec un appareil à comptage de photons Edinburgh 199S, équipé d'une lampe à xénon pulsée modèle 199XF, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étant fixées à 370 et 544 nm, respectivement. L'acquisition de la décroissance de fluorescence est réalisée à l'aide d'un ordinateur PC contenant une carte analyseur multicanaux (MCA). L'intervalle de temps correspondant à chaque canal est fixé à 40  $\mu$ s. 250 canaux de mémoire sont suffisants pour nos mesures.

Nous avons, de cette manière, déterminé les temps de vie de fluorescence du chélate TbHED3A<sup>o</sup> en présence de ligands seuls en solution ou après addition d'ADN ou de chromatine. Les échantillons sont préparés en mélangeant dans le tampon cacodylate (1 mM, pH 6,5) des petites quantités de solutions stock de chélate, de ligand et d'ADN (ou de chromatine) (volume final: 1 ml). Les concentrations finales sont de  $5 \cdot 10^{-4}$  M pour le chélate de terbium, 0 à 80  $\mu$ M pour le ligand et 2  $\mu$ M en ADN (ou chromatine).

Quand les conditions de limite de diffusion rapide sont satisfaites, le déclin de luminescence du Tb<sup>3+</sup> est donné par (Wensel *et al.*, 1985):

$$-\frac{d[\text{Tb}^*]}{dt} = \frac{1}{\tau} [\text{Tb}^*] = \left( \frac{1}{\tau_0} + k_2 [A] \right) [\text{Tb}^*]$$

où [Tb\*] est la concentration molaire en donneurs excités, [A] la concentration molaire en accepteurs (ici le ligand),  $k_2$  ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) la constante de vitesse du transfert d'énergie,  $\tau$  et  $\tau_0$  les temps de vie de fluorescence en présence et en absence d'accepteur.

Le facteur d'accessibilité est défini par:  $a = k_b^o/k_f^o$  où  $k_b^o$  et  $k_f^o$  sont les constantes de vitesse du transfert d'énergie du chélate TbHED3A<sup>o</sup> vers le ligand en présence et en absence de macromolécule respectivement.

Nous avons corrigé cette définition du facteur  $a$  selon Wensel *et al.* (1985) en faisant intervenir les intégrales de recouvrement spectral:

$$a' = (k_b^o/J_b) / (k_f^o/J_f) = a \times J_f / J_b$$

où  $J_f$  et  $J_b$  sont les intégrales de recouvrement entre le spectre d'émission du chélate et le spectre d'absorption du ligand en absence et en présence de macromolécule. Ce facteur réduit  $a'$  a notamment l'avantage de ne dépendre que de la distance séparant le chélate du ligand.

Les intégrales de recouvrement spectral sont par ailleurs calculées entre 450 et 700 nm (les deux limites du spectre d'émission de fluorescence de TbHED3A°) en utilisant la méthode des rectangles:

$$J = \frac{\int_{450}^{700} F(\lambda) A(\lambda) \lambda^4 / C \int_{450}^{700} F(\lambda)}{\int_{450}^{700} F(\lambda)}$$

où les valeurs  $F(\lambda)$  (intensités de fluorescence du chélate) sont obtenues à partir d'un spectre d'émission de fluorescence de TbHED3A° et les absorbances  $A(\lambda)$  sont celles d'une concentration  $C$  de ligand.

## 2-6) Dichroïsme linéaire électrique

Le dichroïsme ( $\Delta A$ ) est défini comme une absorption différentielle observée quand un faisceau de lumière polarisée linéairement traverse un milieu anisotrope. Lorsqu'une solution d'ADN (ou de chromatine) (milieu isotrope) est soumise à l'action d'un champ électrique, les molécules d'ADN s'orientent dans ce champ. Le grand axe de l'ADN se trouve alors (plus ou moins) parallèle à la direction du champ électrique. Une telle solution constitue un milieu anisotrope susceptible de fournir un dichroïsme. Le dichroïsme réduit ( $\Delta A/A$ ) se définit comme le rapport entre le dichroïsme ( $\Delta A$ ) mesuré à une longueur d'onde donnée et l'absorbance  $A$  de la solution en l'absence de champ électrique à la même longueur d'onde.

Les ligands en interaction avec l'ADN ou la chromatine suivent l'effet d'orientation du support macromoléculaire auquel ils sont fixés. Il s'ensuit l'apparition d'un dichroïsme dans la bande d'absorption du ligand. Le signe et l'amplitude de ce dichroïsme sont liés à la position du ligand par rapport à l'axe d'orientation de son support:

- |                  |   |
|------------------|---|
| $\Delta A/A < 0$ | pour les ligands s'intercalant. Leur moment de transition est parallèle au moment de transition des plateaux de bases et perpendiculaire à l'axe d'orientation de la macromolécule, |
| $\Delta A/A = 0$ | pour une orientation de $54^\circ 45'$ ou pour une dispersion aléatoire des ligands,  |

$\Delta A/A > 0$

pour les composés se plaçant dans le petit sillon. Le moment de transition de chromophores est plus ou moins perpendiculaire à celui des plateaux de bases et parallèle à l'axe d'orientation du support polynucléotidique.

Les mesures de dichroïsme électrique sont effectuées avec une instrumentation informatisée utilisant le procédé décrit par Houssier et O'Konski (1981) et sont exprimées sous la forme du dichroïsme réduit  $\Delta A/A = (A_{//} - A_{\perp})/A$  ( $\Delta A$  est obtenu à partir des mesures de  $\Delta A_{//} = A_{//} - A$  en utilisant la relation  $\Delta A = 1,5 (A_{//} - A)$ ), où  $A$  est l'absorbance en l'absence de champ, mesurée dans la même cellule (10 mm), avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 5.

Les rapports  $(\Delta A/A)_{\text{ligand}} / (\Delta A/A)_{\text{ADN}}$  des dichroïsmes réduits à un champ électrique donné du ligand et de l'ADN mesurés dans leur bande d'absorption respective sont par ailleurs en relation directe avec l'orientation relative du ligand par rapport à l'axe de la double hélice (Houssier, 1981).

Les expériences ont été réalisées dans le tampon cacodylate de sodium (1 mM, pH 6,5) à un rapport D/P de 0,1 (10  $\mu\text{M}$  de ligand pour 100  $\mu\text{M}$  d'ADN ou de chromatine).

## 2-7) Dichroïsme circulaire

Les expériences sont effectuées à 20°C sur un dichrographe Jobin-Yvon Mark V interfacé à un ordinateur Apple et à une table traçante HP7044B. A une concentration fixe d'ADN (100  $\mu\text{M}$ ) dans le tampon cacodylate de sodium (1 mM, pH 6,5) sont ajoutées des quantités croissantes de ligand. Les courbes sont présentées sous la forme de l'ellipticité molaire par nucléotide  $[\theta]$  en fonction de la longueur d'onde.

L'ellipticité molaire  $[\theta]$  est donnée par la relation:

$$[\theta] = 3300 \Delta \epsilon = 3300 \frac{\Delta A}{lc} = 3300 \left( \frac{A_g - A_d}{lc} \right)$$

où  $l$  est la longueur du trajet optique (10 mm),  $C$  est la concentration en ADN et  $\Delta A$  est la différence d'absorbance entre les rayons polarisés circulairement gauche et droit.

## 2-8) Viscosimétrie

### 2-8-1) Elongation de l'ADN

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):

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

$L$  : longueur de l'ADN en présence du produit

$L_0$  : 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

$t_0$  : temps d'écoulement du tampon SHE

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

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 3,4 Å par molécule liée, alors que la pente est de 2,0 pour un bis-intercalant.

Les mesures 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 0,01 M (9,4 mM NaCl, 2 mM HEPES (acide(N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-2-éthanesulfonique)/ 10 µM EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique), pH 7). Les solutions sont filtrées préalablement à l'aide d'un filtre millipore 0,45 µM. Des quantités croissantes de ligands (solutions mères à 2 mM) sont ajoutées à l'ADN de thymus de veau (770 µM).

### 2-8-2) Détorsion de l'ADN

Le changement dans la superhélicité d'un ADN circulaire double brin superenroulé droit (ici le plasmide pBR322), conséquence logique de la liaison d'une molécule intercalante, est suivi par la variation de la viscosité du complexe ligand/ADN pour des quantités croissantes de ligand ajoutées.

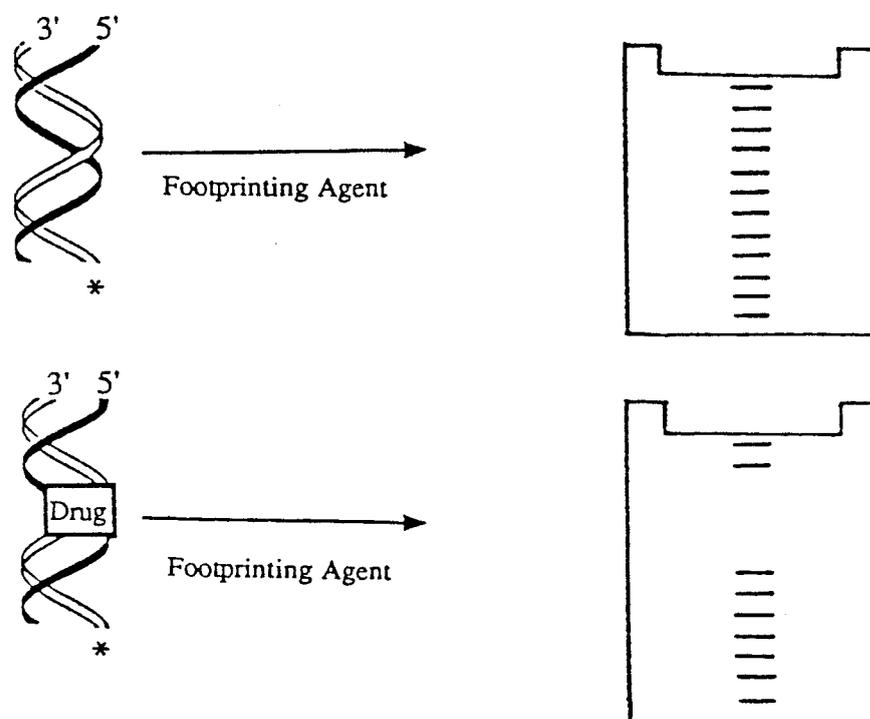
Par addition du ligand, l'hélice superenroulée droite se détord jusqu'à ce que l'ADN soit totalement relâché. Si l'on continue à ajouter ce ligand, il y a inévitablement inversion du superenroulement, indicatif de l'intercalation, avec formation d'une hélice superenroulée gauche. L'angle de détorsion mesuré à partir de l'inversion du sens de détorsion est calculé en prenant pour angle de référence, celui de l'éthidium ( $26^\circ$ ) (Wang, 1974).

Les études sont réalisées selon les protocoles établis par Saucier *et al.* (1971) et Revet *et al.* (1971) sur l'appareil décrit précédemment (cf 2-8-1)) Le viscosimètre contient 2 ml d'une solution d'ADN 120  $\mu\text{M}$ . Les produits à tester sont ajoutés par incréments de 5-10  $\mu\text{l}$  d'une solution 150  $\mu\text{M}$ .

### 2-9) 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 Micrococcale) 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 (**Figure 47**). La séquence du site de protection est déterminée par référence à des marqueurs (généralement en révélant les guanines au diméthylsulfate).



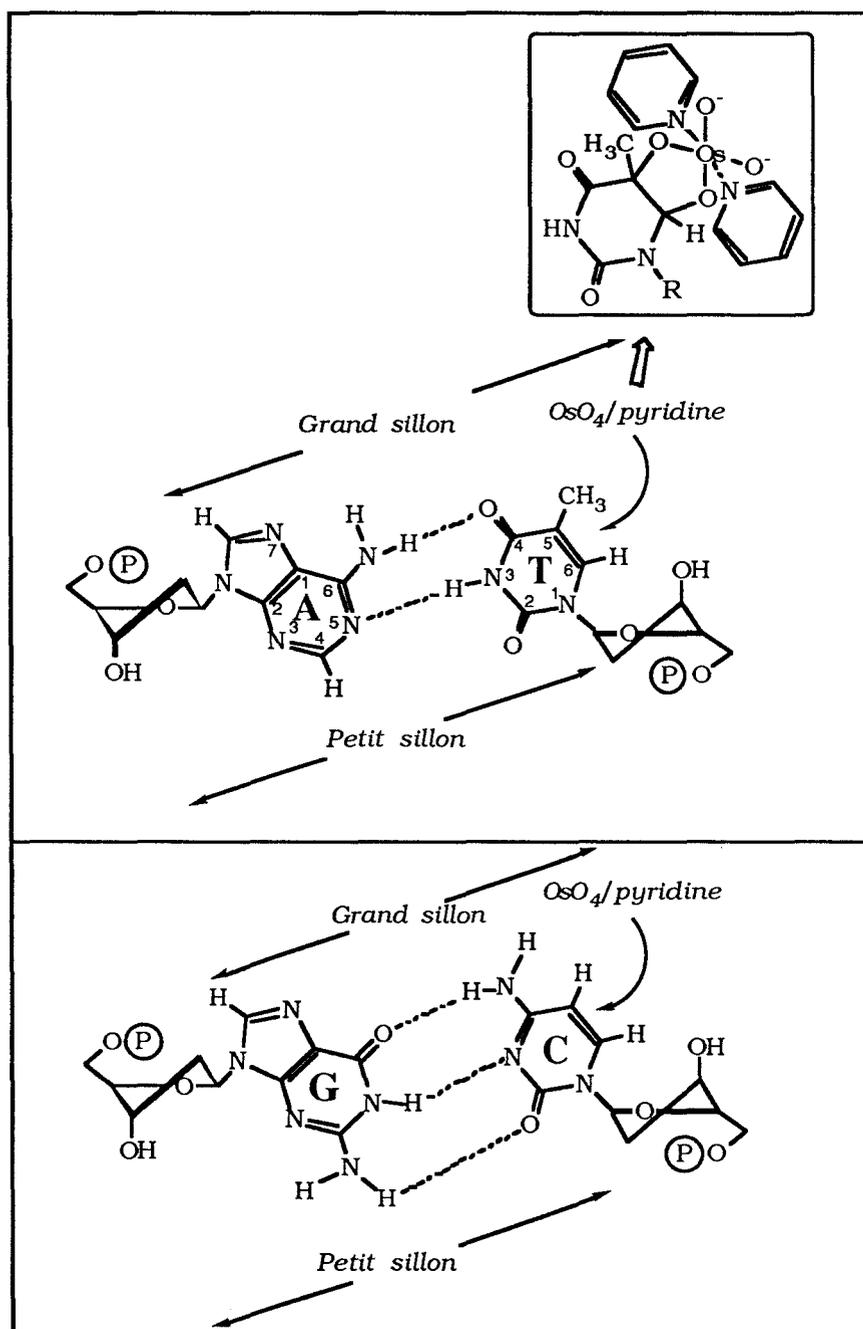
**Figure 47** : Principe du footprinting

La sélectivité de liaison des molécules hybrides (1) et (2) a été étudiée par le footprinting à l'aide de la DNAase I et des radicaux hydroxyle comme agents de coupure. Les modes opératoires sont décrits de manière précise dans l'article n°2.

## 2-10) Modification de l'ADN par l'agent chimique tétroxyde d'osmium / pyridine

Le couple  $\text{OsO}_4$  / pyridine est un agent qui réagit de manière préférentielle au niveau de la double liaison 5,6 des pyrimidines située dans le grand sillon de l'ADN (Johnston et Rich, 1985; Palecek, 1991) (**Figure 48**). La réactivité de cet agent

chimique est, de plus, nettement plus importante en présence des thymines comparativement aux cytosines. C'est une sonde très sensible aux altérations conformationnelles de l'ADN et plus particulièrement aux modifications dans l'empilement des bases. Ainsi les séquences de l'ADN subissant des changements conformationnels constituent des sites d'hyperréactivité pour le tétraoxyde d'osmium.



**Figure 48** : Réactivité de l'agent chimique  $\text{OsO}_4$  / Pyridine.

Le principe de cette expérience est dans son ensemble similaire à celui du footprinting. La coupure au niveau des pyrimidines modifiées par OsO<sub>4</sub> est réalisée par un traitement alcalin à la pipéridine (1 M, 30min., 90°C). Les différents fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant et les sites d'hyperréactivité de OsO<sub>4</sub> (bandes les plus intenses) sont identifiés par référence à un témoin (G track) (cf article n°2).

### 3) ETUDE DE L'OXYDATION DES DERIVES DE L'AMSACRINE PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION UV

L'oxydation des composés (3), (4), NetAMSA et AMSAC<sub>3</sub> (50 μM), en présence de CuSO<sub>4</sub> (3, 1 et 0,1 équivalents) dans le tampon borate 50 mM pH 9,2 est suivie par un balayage spectral de 300 à 600 nm. Une concentration en ligand de 25 μM est utilisée pour les expériences en présence d'ADN (0,6 équivalents; 15 μM).

Les cinétiques d'oxydation à pH 7,0 sont effectuées dans le tampon Tris 10 mM, NaCl 10 mM.

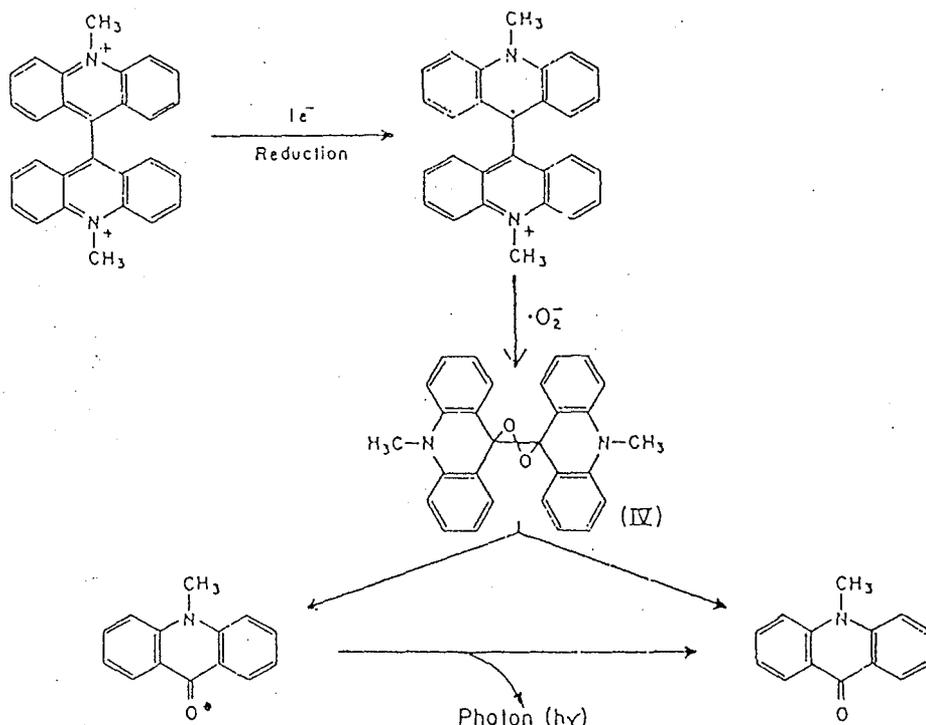
Le spectrophotomètre utilisé est le même que celui décrit en 2-1).

### 4) CHIMIO-LUMINESCENCE

Cette technique permet de suivre la production de radicaux libres oxygénés (O<sub>2</sub><sup>-</sup> dans ce cas précis) (Allen, 1986; Peters *et al.*, 1990). Le mécanisme est décrit **figure 49**. La sonde luminescente utilisée, en l'occurrence la lucigénine, subit une réduction en présence de cuivre cuivreux (Cu<sup>+</sup>) pour fournir un radical cationique. Lors d'une réaction cation-anion radical-radical ce dérivé radicalaire réagit avec les radicaux libres O<sub>2</sub><sup>-</sup> produits par le ligand en présence de cuivre pour former un intermédiaire de type dioxéthane instable. Cette espèce se scinde spontanément en deux composés N-méthylacridone dont l'un se trouve dans un état excité. Le retour de ce dérivé à l'état stable s'accompagne d'une émission photonique (fluorescence) détectable par le luminomètre.

Des solutions de lucigénine (100 μM) et de sulfate de cuivre (5 et 10 μM) dans le tampon borate de sodium 50 mM sont mélangées rapidement avant d'ajouter la solution du ligand testé (3), (4), NetAMSA ou AMSAC<sub>3</sub>) (100 μM final) pour initialiser la réaction. Le luminomètre (modèle Packard-picolite) est programmé pour

enregistrer les nombres de coups (cps) pendant une période de 30 secondes à 37°C. Les enregistrements sont effectués toutes les 3-5 minutes pendant 1 heure.



**Figure 49** : Mécanisme de réaction de la lucigénine avec l'anion superoxyde.

## 5) ETUDE DE LA COUPURE D'ADN EN GEL D'AGAROSE

Lorsque le plasmide pBR322 (Boehringer) super-enroulé (forme I) subit une coupure monobrin, il apparaît sous forme circulaire relâchée (forme II) alors que la coupure double brin fournit un ADN de forme linéaire ouverte (forme III). Les trois formes possèdent des migrations électrophorétiques différentes en gel d'agarose (0,8%). Les fragments sont visualisés sous rayonnement UV après fixation par le bromure d'éthidium.

L'ADN est coupé en présence de cuivre et de ligand (concentrations variables) dans le tampon borate utilisé pour les tests d'oxydation. Après 2 h à température ambiante, la réaction est arrêtée par addition d'EDTA. L'électrophorèse a lieu dans le tampon TBE (Tris 8,9mM-Borate 8,9mM-EDTA 2,5mM; pH 8,3), à 60 V pendant 2h.

## 6) RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE

Les mesures de RPE sont enregistrées sur un spectrophotomètre Varian E 109X-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, 8 G; constante de temps, 0,25 sec; temps d'enregistrement, 4 min; gain modulable.

### *6-1) Pénétration cellulaire*

Les trois composés porteurs du marqueur de spin 3-carboxyproxyl sont ajoutés à une culture de cellules leucémiques murines (L1210) à une concentration finale de 50  $\mu$ M. Après différents temps d'incubation, des prélèvements sont effectués et les cellules sont centrifugées à basse vitesse puis séparées du milieu de culture. Les cellules sont à nouveau mises en suspension par addition de 1ml de sérum physiologique (NaCl 9‰) puis centrifugées. Les mesures sont alors effectuées après avoir ajouté au culot de centrifugation 0,5 ml de sérum physiologique.

### *6-2) Détection de la production de radicaux libres oxygénés par spin trapping*

Les expériences ont été effectuées en milieu basique (pH 9,0) en incubant les ligands AMSA, AMSAC<sub>3</sub> et NetAMSA (1,25 mM) en présence de Cu(II) (1,25 mM) et des piègeurs de radicaux DMPO (5,5-diméthyl-N-oxy-1-pyrroline) et PBN (N-tertiobutyl- $\alpha$ -phénylnitron) (40 mM). Des spectres témoins du DMPO, du PBN et de chaque ligand ont confirmé l'absence de signal dans ces conditions.

## 7) ACTIVITE BIOLOGIQUE

Les tests ont été réalisés en collaboration avec le Dr N. Pommery (Faculté de Pharmacie, Lille).

### *7-1) Cultures cellulaires*

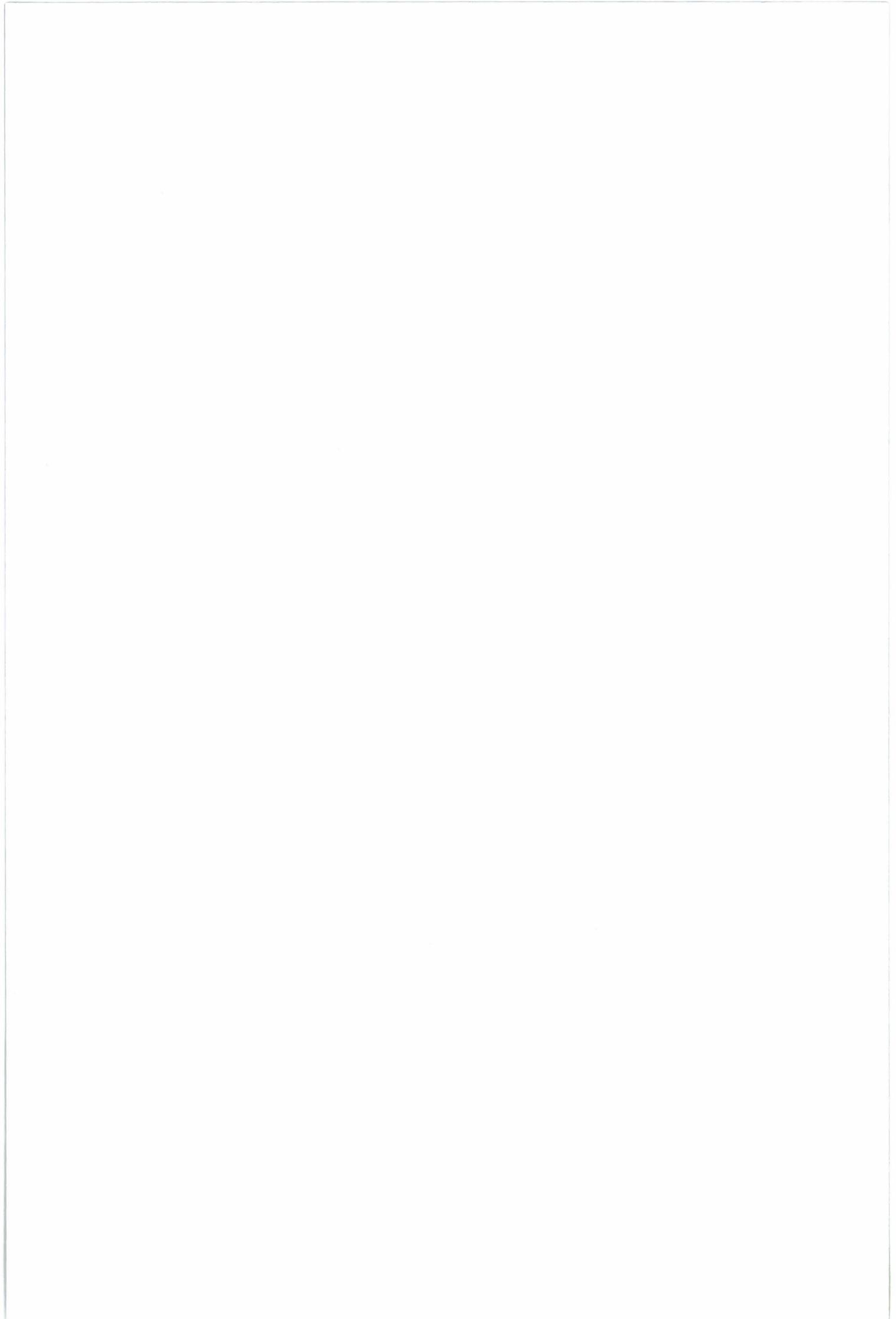
Des cellules leucémiques L1210 de souris sont maintenues en croissance logarithmique en suspension dans le milieu RPMI-1640 (GIBCO) contenant 10% de sérum fœtal de veau. Les cellules sont cultivées dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> (Corning) sous une atmosphère saturée en H<sub>2</sub>O et contenant 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C.

### *7-2) Mesure de la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée*

Les cellules L1210 en phase exponentielle de croissance sont incubées pendant 6 h à 37°C en présence de solutions stériles du ligand testé (concentrations finales 0,1 - 25 µM). Une incubation avec la thymidine tritiée à 10 µCi/ml (43 Ci/mmol, CEA) est alors effectuée pendant 2 h à 37°C. Les cellules sont lavées deux fois dans un tampon salin puis placées pendant 10 min. dans 1 ml de tampon hypotonique (Tris.HCl 0,01 M, pH 8,1, NaCl 0,05 M, EDTA 0,001 M). Elles sont éclatées par des congélations et des décongélations successives puis reprises par une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 10%. Après 30 min. d'incubation à 37°C, la solution cellulaire est filtrée à l'aide de filtres en fibres de cellulose. Ceux-ci sont rincés par le TCA 10% (10ml) puis l'éthanol (3ml) avant d'être séchés. La radioactivité est comptée en présence d'un liquide de scintillation (Aqualyte).

### *7-3) Mesure du pouvoir cytotoxique in vitro*

Pour chaque essai, 10 ml d'une suspension de cellules L1210 (0,2 10<sup>6</sup> cellules/ml) sont incubés en présence de concentrations variables en ligands (0,5; 1; 5; 10 et 50 µM) pendant 4 jours (pour les composés (1) et (2)) ou 3 jours (pour les composés (3), (4) et NetAmsa) sans changer le milieu de culture. Chaque jour, les cellules sont comptées et la viabilité est mesurée après dilution par le bleu trypan (les cellules mortes fixent ce colorant alors que les cellules vivantes l'excluent).



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

AGGARWAL A.K., RODGERS D.W., DROTTAR M., PTASHNE M., HARRISON C. (1988). Recognition of a DNA operator by the repressor of phage 434: a view at high resolution. Science **242**, 899-907.

ALBER T., DAO-PIN S., WILSON K., WOZNIAK J.A., COOK S.P., MATTHEWS B.W. (1987). Contributions of hydrogen bonds of Thr 157 to the thermodynamic stability of phage T4 lysozyme. Nature **330**,41-46.

ALLAN J., HARTMAN P.G., CRANE ROBINSON C., AVILES F.X. (1980). The structure of histone H<sub>1</sub> and its location in chromatin. Nature **288**, 675-679.

ALLEN R.C. (1986). Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. Methods Enzymol. **133**, 449-493.

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

ASHLEY C.T., PENDLETON C.G., JENNINGS W.W., SAXENA A., GLOVER C.V.G. (1989). Isolation and sequencing of cDNA clones encoding *Drosophila* chromosomal protein D<sub>1</sub>. J. Biol. Chem. **264**, 8394-8401.

AUCLAIR C., SCHWALLER M.A., RENE M., BANOUN H., SAUCIER J.M., LARSEN A.K. (1988). Relationships between physicochemical and biological properties in series of oxazolopyridocarbazole derivatives (OPCd); comparison with related anti-tumor 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., LE BRET M. (1984). Quenching of DNA-ethidium fluorescence by amsacrine and other antitumor agents: a possible electron-transfer effect. Biochemistry **23**, 937-943.

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

BAILLY C., HENICHART J.P. (1990b). Subcellular distribution of a nitroxide spin-labeled netropsine-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. (1990c). Sequence-selective binding of an ellipticine derivative to DNA. Nucl. Acids Res. **18**, 6283-6291.

BAILLY C., HENICHART J.P. (1991). DNA recognition by intercalator-minor-groove binder hybrid molecules. Bioconjugate Chem. **2**, 379-393.

BAILLY C., DENNY W.A., MELLOR M.E., WARING M.J. (1992a). Sequence specificity of the binding of 9-aminoacridine and amsacrine-4-carboxamides to DNA studied by DNase I footprinting. Biochemistry **31**, 3514-3524.

BAILLY C., COLLYN-D'HOOOGHE M., LANTOINE D., FOURNIER C., HECQUET B., FOSSE P., SAUCIER J.M., COLSON P., HOUSSIER C., HENICHART J.P. (1992b). Biological activity and molecular interaction of a netropsin-acridine hybrid ligand with chromatin and topoisomerase II. Biochem. Pharmacol. **43**, 457-466.

BAILLY C., COLSON P., HENICHART J.P., HOUSSIER C. (1992c). Drug-DNA sequence-dependent interactions analyzed by electric linear dichroism. Soumis pour publication.

BEARDSLEY T. (1991). La régulation des gènes. Pour la Science **168**, 54-64.

BELENGUER P., CAIZERGUES-FERRER M., LABBE J.C., DOREE M., AMALRIC F. (1990). Mitosis-specific phosphorylation of nucleolin by p34<sup>cdc2</sup> protein kinase. Mol. Cell. Biol. **10**, 3607-3618.

BERG O.G., von HIPPEL P.H. (1988). Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. Trends Biochem Sci. **13**, 207-211.

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

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. Interact. **70**, 103-115.

BISHOP J.M. (1987). The molecular genetics of cancer. Science **235**, 305-311.

BONNEFOY E., ROUVIERE-YANIV J. (1991). HU and IHF, two homologous histone-like proteins of *Escherichia coli*, form different protein-DNA complexes with short DNA fragments. EMBO J. **10**, 687-696.

BOWLER B.E., AHMED K.J., SUNDQUIST W.I., HOLLIS L.S., WHANG E.E., LIPPARD S.J. (1989). Synthesis, and DNA-binding properties of (1,2-diaminoethane) platinum(II) complexes linked to the DNA intercalator acridine orange by trimethylene and hexamethylene chains. J. Am. Chem. Soc. **111**, 1299-1306.

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.

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.

CARRONDO M.A.A. DE C.T., COLL M., AYMAMI J., WANG A.H.J., VAN DER MAREL G.A., VAN BOOM J.H., RICH A. (1989). Binding of a Hoechst dye to d(CGCGATATCGCG) and its influence on the conformation of the DNA fragment. Biochemistry **28**, 7849-7859.

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

CHAIRES J.B. (1989). Unusual condensation behaviour of poly(dA)-poly(dT). Biopolymers **28**, 1645-1650.

CHAIRES J.B. (1990). Biophysical chemistry of the daunomycin-DNA interaction. Biophys. Chem. **35**, 191-202.

CHEN W., TABOR S., STRUHL K. (1987). Distinguishing between mechanisms of eukaryotic transcriptional activation with bacteriophage T7 RNA polymerase. Cell **50**, 1047-1055.

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.

CHEN S., LEUPIN W., RANCE M., CHAZIN W.J. (1992). Two-dimensional NMR studies of d(GGTTAATGCGGT).d(ACCGCATTAAACC) complexed with the minor groove binding drug SN-6999. Biochemistry **31**, 4406-4413.

CHURCHILL M.E.A., SUZUKI M. (1989). "SPKK" motifs prefer to bind to DNA at A/T rich sites. EMBO J. **8**, 4189-4195.

CHURCHILL M.E.A., TRAVERS A.A. (1991). Protein motifs that recognize structural features of DNA. Trends Biochem. Sci. **16**, 92-97.

CISEK L.J., CORDEN J.L. (1989). Phosphorylation of RNA polymerase by the murine analogue of the cell-cycle control protein cdc2. Nature **339**, 379-384.

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

COLL M., FREDERICK C.A., WANG A.H-J., RICH A. (1987). A bifurcated hydrogen-bonded conformation in the d(A.T) base pairs of the DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) and its complex with distamycin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 8385-8389.

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.

CORDEN J.L. (1990). Tails of RNA polymerase II. Trends Biochem. Sci. **15**, 383-387.

CRAIG N.L., NASH H.A.; (1984). E. Coli integration host factor binds to specific sites in DNA. Cell **39**, 707-716.

CROTHERS D.M., HARAN T.E., NADEAU J.G. (1990). Intrinsically bent DNA. J. Biol. Chem. **265**, 7093-7096.

CZUPRYN M., SOLNICA L., TCOZKO K. (1985). Non histone proteins of the transcriptionally active chromatin fraction of *Physarum polycephalum*, associated with nucleosome linker DNA instead of histone H<sub>1</sub>. FEBS Lett. **189**, 89-91.

DASGUPTA, D., GOLDBERG I.H. (1986). Mode of reversible binding of neocarzinostatin chromophore to DNA: base sequence dependency of binding. Nucl. Acid Res. **14**, 1089-1105.

DASGUPTA D., HOWARD F.B., SASISEKHARAN V., MILES H.T. (1990). Drug DNA-binding specificity: binding of netropsin and distamycin to poly(d2NH<sub>2</sub>A-dT). Biopolymers **30**, 223-227.

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

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

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

DIMARCO A., SOLDATI M., FIORETTI A. (1964). Antimitotic activity of distamycin A. Acta Univ. Intern. Contra. Cancrum **20**, 423-426.

DORN A., AFFOLTER M., MULLER M., GEHRING W.J., LEUPIN W. (1992). Distamycin-induced inhibition of homeodomain-DNA complexes. EMBO J. **11**, 279-286.

DRAETTA G. (1990). Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. Trends Biochem. Sci. **15**, 378-382.

DREW H.R., TRAVERS A.A. (1984). DNA structural variations in the *E. Coli tyr T* promoter. Cell **37**, 491-502.

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

DWYER T.J., GEIERSTANGER B.H., BATHINI Y., LOWN J.W., WEMMER D.E. (1992). Design and binding of a distamycin A analogue to d(CGCAAGTTGGC).d(GCCAACTTGGC): synthesis, NMR studies and implications for the design of sequence-specific minor groove binding oligopeptides. J. Am. Chem. Soc. **114**, 5911-5919.

ECKNER R., BIRNSTIEL M.L. (1989). Cloning of cDNAs coding for human HMG I and HMG Y proteins: both are capable of binding to the octamer sequence motif. Nucl. Acids Res. **17**, 5947-5959.

EGLI M., WILLIAMS L.D., FREDERICK C.A., RICH A. (1991). DNA-nogalamycin interactions. Biochemistry **30**, 1364-1372.

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.

ERARD M., LAKHDAR-GHAZAL F., AMALRIC F. (1990). Repeat peptide motifs which contain  $\beta$ -turns and modulate DNA condensation in chromatin. Eur. J. Biochem. **191**, 19-26.

FAGAN P., WEMMER D.E. (1992). Cooperative binding of distamycin A to DNA in the 2:1 mode. J. Am. Chem. Soc. **114**, 1080-1081.

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

FELSENFELD G. (1992). Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. Nature **355**, 219-224.

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.

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)<sub>2</sub> by quantitative DNAase I footprinting. Biochemistry **27**, 6026-6032.

FLOCK S. (1991). Etude des interactions du DNA et de la chromatine avec des composés à activité pharmacologique, par transfert d'énergie de fluorescence. Licence de Sciences Chimiques (Université de Liège).

FOURNEL J., GANTER P., KOENIG F., DE RATULD Y., WERNER G.H. (1965). Antiviral activity of distamycin A. In " Antimicrobial Agents Chemotherapy " HOBBY G.L. (ed.) pp.599-604.

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.

FOX K.R., SANSOM C.E., STEVENS M.F.G. (1990). Footprinting studies on the sequence-selective binding of pentamidine to DNA. FEBS Lett. **266**, 150-154.

FREDERICK C.A., GRABLE J., MELIA M., SAMUDZI C., JEN. JACKSON L., WANG B.C., GREENE P., BOYER H.W., ROSENBERG J.M. (1984). Kinked DNA in crystalline complex with Eco RI endonuclease. Nature, **309**, 327-331.

FRANCOIS J.C., SAISON-BEHMOARAS T., HELENE C. (1988). Sequence-specific recognition of the major groove of DNA by oligodeoxynucleotides via triple helix formation. Footprinting studies. Nucl. Acids Res. **16**, 11431-11440.

FRATINI A.V., KOPKA M.L., DREW H.R., DICKERSON R.E. (1982). Reversible binding and helix geometry in a B-DNA dodecamer: CGCGAATT<sup>Br</sup>CGCG. J. Biol. Chem., **256**, 14686-14702.

FRIEDMAN D.I. (1988). Integration host factor: a protein for all reasons. Cell **55**, 545-554.

FRITZSCHE H., TRIEBEL H., CHAIRES J.B., DATTA GUPTA N., CROTHERS D. (1982). Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: geometry of intercalation of iremycin and daunomycin. Biochemistry **21**, 3940-3946.

GALE E.F., CUNDLIFFE E., REYNOLDS P.E., RICHMOND M.H., WARING M.J. (1981). In "The molecular basis of antibiotic action." Wiley, second edition, pp.314-333.

GASSER S.M., LAEMMLI U.K. (1986). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes off *D. melanogaster*. Cell **46**, 521-530.

GOLDBERG Y., GLINEUR C., GESQUIERE J.C., RICOUART A., SAP J., VENNSTROM B., GHYSDAEL J. (1988). Activation of protein kinase C or cAMP-dependent protein kinase increases phosphorylation of the c-erbA-encoded thyroid hormone receptor and of the v-erbA-encoded protein. EMBO J. **7**, 2425-2433.

GOODISMAN J., DABROWIAK J.C. (1992). Structural changes and enhancements in DNase I footprinting experiments. Biochemistry **31**, 1058-1064.

GOURDIE T.A., VALU K.K., GRAVATT G.L., BORITZKI T.J., BAGULEY B.C., WAKELIN L.P.G., WILSON W.R., WOODGATE P.D., DENNY W.A. (1990). DNA-directed alkylating agents. 1. Structure-activity relationships for acridine-linked aniline mustards: consequences of varying the reactivity of the mustard. J. Med. Chem. **33**, 1177-1186.

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

GUPTA G., SARMA M.H., SARMA R. (1984). Structure and dynamics of netropsin-poly(dAdT).poly(dA-dT) complex: 500 MHz <sup>1</sup>H-NMR studies. J. Biomol. Struct. Dyn. **1**, 1457-1472.

HAGMAR P., MARQUET R., COLSON P., KUBISTA M., NIELSEN P., NORDEN B., HOUSSIER C. (1989). Electric and flow linear dichroism of unfolded and condensed chromatin: a comparative study at low and intermediate ionic strength. J. Biomol. Struct. Dyn. **7**, 19-33.

HAHN F.E. (1977). Distamycin and netropsin as inhibitors of RNA and DNA polymerases. Pharmac. Ther. A (Pergamon Press) 1,475-485.

HAMY F., VERWAERDE P., HELBECQUE N., FORMSTECHEP P., HENICHART J.P. (1991). Nuclear targeting of a viral-cointernalized protein by a short signal sequence from human retinoic acid receptors. Bioconjugate Chem. 2, 376-378.

HANSEN J.C., AUSIO J. (1992). Chromatin dynamics and the modulation of genetic activity. Trends Biochem. Sci. 17, 187-191.

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.

HAUPT I., THRUM H. (1971). Effect of netropsin on the growth and nucleic acid and protein biosynthesis of E. coli. Z. Allg. Mikrobiol. 11,457-460.

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

HERFELD P., HELISSEY P., GIORGI-RENAULT S. (1992). Synthèse de dérivés mixtes flavine-oligoimidazolecarboxamides. Communication par affiche; XXVIIIèmes Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique; Toulouse.

HERTZBERG R.P., HECHT S.M., REYNOLDS V.M., MOLINEUX I.J., HURLEY L.H. (1986). DNA sequence specificity of the pyrrolo(1,4)benzodiazepine antitumor antibiotics. Methidiumpropyl-EDTA-Iron(II) footprinting analysis of DNA binding sites for anthramycin and related drugs. Biochemistry 25,1249-1258.

HILL C.S., PACKMAN L.C., THOMAS J.O. (1990). Phosphorylation at clustered SerProXLys(Arg) motifs in sperm specific histones H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub>B. EMBO J. 9,805-813.

HILL C.S., RIMMER J.M., GREEN B.M., FINCH J.T., THOMAS J.O. (1991). Histone-DNA interactions and their modulation by phosphorylation of Ser-Pro-X-Lys/Arg motifs. EMBO J. 10, 1939-1948.

HOHMANN P. (1983). Phosphorylation of H<sub>1</sub> histones. Mol. Cell. Biol. 57, 81-92.

HOUSIER C., O'KONSKI C.T. (1981). In Molecular Electro-Optics. Krause S. (ed.), p.309-339. Series B64, Nato Advanced Study Institute, New York.

HOUSIER C.(1981). In Molecular Electro-Optics. Krause S. (ed.), p.363-398. Series B64, Nato Advanced Study Institute, New York.

JACKSON M.E. (1991). Negative regulation of eukaryotic transcription. J. Cell. Sci. 100, 1-7.

JOHNSON K.R., LEHN D.A., REEVES R. (1989). Alternative processing of mRNAs encoding mammalian chromosomal high-mobility-group proteins HMG-I and HMG-Y. Mol. Cell. Biol. **9**, 2114-2123.

JOHNSTON B.H., RICH A. (1985). Chemical probes of DNA conformation: detection of Z-DNA at nucleotide resolution. Cell **42**, 713-724.

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.

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

KAS E., IZAURRALDE E., LAEMMLI U.K. (1989). Specific inhibition of DNA binding to nuclear scaffolds and histone H<sub>1</sub> by distamycin. The role of oligo(dA).oligo(dT) tracts. J. Mol. Biol. **210**, 587-599.

KEMP B.E., PEARSON R.B. (1990). Protein kinase recognition sequence motifs. Trends Biochem. Sci. **15**, 342-346.

KHARRAT A., DERANCOURT J., DOREE M., AMALRIC F., ERARD M. (1991). Synergistic effect of histone H<sub>1</sub> and nucleolin on chromatin condensation in mitosis: role of a phosphorylated heteromer. Biochemistry **30**, 10329-10336.

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). <sup>1</sup>H NMR studies on the interaction between distamycin A and a symmetrical DNA dodecamer. Biochemistry **25**,3296-3303.

KLUPSCH F. (1991). Conception d'un modèle hybride nétoprosine-amsacrine, ligand séquence-spécifique de l'ADN. Diplôme Universitaire d'Etudes Approfondies Sciences de la Vie et de la Santé (Lille I).

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., GOODSELL 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<sup>B</sup>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.

KUROYEDOV A.A., GROKHOVSKY S.L., ZHUZE A.L., NOSIKOV V.V., POLYANOVSKY O.L. (1977). Distamycin A and its analogs as agents for blocking of endo R Eco RI activity. Gene **1**,389-395.

LAMB N.J.C., CAVADORE J.C., LABBE J.C., MAURER R.A., FERNANDEZ A. (1991). Inhibition of cAMP-dependent protein kinase plays a key role in the induction of mitosis and nuclear envelope breakdown in mammalian cells. EMBO J. **10**, 1523-1533.

LANGAN T.A., GAUTIER J., LOHKA M., HOLLINGSWORTH R., MORENO S., NURSE P., MALLER J., SCAFANI R.A. (1989). Mammalian growth-associated H<sub>1</sub> histone kinase: a homolog of cdc2<sup>+</sup>/CDC28 protein kinases controlling mitotic entry in yeast and frog cells. Mol. Cell. Biol. **9**, 3860-3868.

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.

LAVERY R., PULLMAN B. (1985). The dependence of the surface electrostatic potential of B-DNA on environmental factors. J. Biomol. Struct. Dyn. **2**, 1021-1027.

LEATHERBARROW R.J. (1990). Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. Trends Biochem. Sci. **15**, 455-457.

LEE J.S., WARING M.J. (1978). Bifunctional intercalation and sequence-specificity in the binding of quinomycin and triostin antibiotics to DNA. Biochem. J. **173**, 115-128.

LEE M., CHANG D-K., HARTLEY J.A., PON R.T., KROWICKI K., LOWN J.W. (1988a). Structural and dynamic aspects of binding of a prototype lexitropsin to the decadeoxyribonucleotide d(CGCAATTGCG)<sub>2</sub> deduced from high resolution <sup>1</sup>H NMR studies. Biochemistry **27**, 445-455.

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)<sub>2</sub> : structural and dynamic aspects deduced from high field <sup>1</sup>H-NMR studies . Nucl. Acids Res. **16**, 665-684 .

LEE S.H., GOLDBERG I.H. (1989). Sequence-specific, strand-selective, and directional binding of neocarzinostatin chromophore to oligodeoxyribonucleotides. Biochemistry **28**, 1019-1026.

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 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.

LE PEUCH C. (1990). La régulation de la division cellulaire. Médecine/Sciences 6, 10-17.

LERHO M., FAVAZZA M., HOUSIER C. (1990). Labelling of histone H5 and its interaction with DNA. 2. Cooperative binding of histone H5 to DNA as probed by steady state fluorescence and diffusion-enhanced energy transfer. J. Biomol. Struct. Dyn. 7, 1301-1319.

LERHO M. (1991). Le transfert d'énergie exalté par la diffusion. Application à l'étude de l'interaction de divers ligands avec le DNA et la chromatine. Doctorat en Sciences Physiques (Université de Liège).

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.

LOWN J.W., KROWICKI K., BHAT U.G., SKOROBOGATY A., WARD B., DABROWIAK J.C. (1986). 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. (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.

LUCK G., ZIMMER C. (1973). Interaction of netropsin with DNA in the course of the B-A transition. Studia Biophys. 40,9-12.

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.

LUND T., HOLTLUND J., FREDRIKSEN M., LALAND S.G. (1983). On the presence of two new high mobility group-like proteins in the HeLa 53 cells. FEBS Lett. 152, 163-167.

LUND T., HOLTLUND J., LALAND S.G. (1985). On the phosphorylation of low molecular mass HMG (high mobility group) proteins in Ehrlich ascites cells. FEBS Lett. 180, 275-279.

LUND T., DAHL K.H., MORK E., HOLTLUND J., LALAND S.G. (1987). The human chromosomal protein HMG I contains two identical palindrome amino acid sequences. Biochem. Biophys. Res. Comm. 146, 725-730.

LUND T., LALAND S.G. (1990). The metaphase specific phosphorylation of HMG I. Biochem. Biophys. Res. Comm. 171, 342-347.

LYAMICHEV V.I., MIRKIN S.M., FRANK-KAMENETSKII M.D., CANTOR C.R. (1988). A stable complex between homopyrimidine oligomers and the homologous regions of duplex DNAs. Nucl. Acids Res. **16**, 2165-2178.

MANNERMAA R.T., OIKARINEN J. (1991). The histone H<sub>1</sub>-*lacZ*' fusion protein produced in *Escherichia coli* binds to the 5'-TTGGCAnnnTGCCAA-3' motif on DNA. FEBS Lett. **278**, 115-119.

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 polyd(AT). Nucl. Acids Res. **11**, 2857-2870.

MARQUET R., HOUSIER C., FREDERICQ E. (1985). An electro-optical study of mechanisms of DNA condensation induced by spermine. Biochim. Biophys. Acta **825**, 365-374.

MARQUET R., HOUSIER C. (1988). Different binding modes of spermine to AT and GC base pairs modulate the bending and the stiffening of the DNA double helix. J. Biomol. Struct. Dyn. **6**, 235-246.

MARTIN J.C., WARTELL R.M., O'SHEA D.C. (1978). Conformational features of distamycin-DNA and netropsin-DNA complexes by Raman spectroscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 5483-5487.

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

MEUNIER G., DE MONTAUZON D., BERNADOU J. (1988). The biooxidation of cytotoxic ellipticine derivatives: a key to structure-activity relationship studies? Mol. Pharmacol. **33**, 93-105.

MICHENKOVA L., ZIMMER C. (1980). Reversion of the B to A transition of DNA induced by specific interaction with the oligopeptide distamycin A. Biopolymers **19**, 823-831.

MONTMINY M.R., BILEZIKJIAN L.M. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. Nature **328**, 175-178.

MOREAU J., MARCAUD L., MASCHAT F., KEJZLAROVA-LEPESANT J., LEPESANT J.A., SCHERRER K. (1982). A+T rich linkers define functional domains in eukaryotic DNA. Nature **295**, 260-262.

MORENO S., NURSE P. (1990). Substrates for p34<sup>cdc2</sup>: *in vivo* veritas? Cell **61**, 549-551.

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

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.

OIKARINEN J. (1991). Histone H<sub>1</sub> and the regulation of transcription by nuclear receptors. FEBS Lett. **294**, 6-10.

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

PALECEK E. (1991). Local supercoil-stabilized DNA structures. Clin. Rev. Biochem. Mol. Biol. **26**, 151-226.

PALMER B.D., LEE H.H., JOHNSON P., BAGULEY B.C., WICKLAM G., WAKELIN L.P.G., McFADYEN W.D., DENNY W.A. (1990). DNA-directed alkylating agents. 2. Synthesis and biological activity of platinum complexes linked to 9-anilinoacridine. J. Med. Chem. **33**, 3008-3014.

PARDI A., MORDEN K.M., PATEL D.J., TINOCO I. (1983). Kinetics for exchange of the imino protons of the d(CGCGAATTCGCG) double helix in complexes with the antibiotics netropsin and/or actinomycin. Biochemistry **22**,1107-1113.

PATEL D.J. (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. (1982). Antibiotic DNA interaction : intermolecular Overhauser effects in the netropsin-d(CGCGAATTCGCG) complex in solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**,6424-6428.

PATEL D.J., KOZLOWSKI S.A., PARDI A., BHATT R., IKUDA S., ITAKURA K. (1983). Sequence dependence of DNA conformation, dynamics and interactions in solution. In "Specificity and biological interactions", Int. Symp. at the Pontifical Academy of Sciences, vol.55, CHAGAS C., PULLMAN B., eds, Vatican Press, pp.133-173.

PELTON J.G., WEMMER D.E. (1989). Structural characterization of a 2:1 distamycin A-d(CGCAAATTGGC) complex by two-dimensional NMR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**,5723-5727.

PETER M., NAKAGAWA J., DOREE M., LABBE J.C., NIGG E.A. (1990). Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. Cell **60**, 791-801.

PETERS T.R., TOSK J.M., GOULBOURNE E.A. (1990). Lucigenin chemiluminescence as a probe for measuring reactive oxygen species production in *Escherichia coli*. Anal. Biochem. **186**, 316-319.

- PILCH D.S., LEVENSON C., SHAFER R.H. (1991). Structure, stability and thermodynamics of a short intermolecular purine-purine-pyrimidine triple helix. Biochemistry **30**, 6081-6087.
- PLOUVIER B. (1991). Analogues thiazoliques de la n tropsine. Interaction avec l'ADN et pouvoir cytotoxique. Thèse d'universit  (Lille I).
- POCCIA D.L., GREEN G.R. (1992). Packaging and unpackaging the sea urchin sperm genome. Trends Biochem. Sci. **17**, 223-227.
- PORTUGAL J. (1989). Footprinting analysis of sequence-specific DNA-drug interactions. Chem.-Biol. Interact. **71**, 311-324.
- 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.
- PULLMAN A., PULLMAN B. (1981). Molecular electrostatic potential of the nucleic acids. Quart. Rev. Biophys. **14**, 289-380.
- RALPH R.K., MARSHALL B., DARKIN S. (1983). Anti-cancer drugs which intercalate into DNA: how do they act? Trends Biochem. Sci. **8**, 212-214.
- REES D.C., LEWIS M., LIPCOMB W.N. (1983). Refined crystal structure of carboxypeptidase A at 1.54   resolution. J. Mol. Biol. **168**, 367-387.
- REEVES R., ELTON P.S., NISSEN M.S., LEHN D., JOHNSON K.R. (1987). Posttranscriptional gene regulation and specific binding of the nonhistone protein HMG-I by the 3'-untranslated region of bovine interleukin 2 cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 6531-6535.
- REEVES R., NISSEN M.S. (1990). The AT-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide for recognizing DNA structure. J. Biol. Chem. **265**, 8573-8582.
- REEVES R., LANGAN T.A., NISSEN M. (1991). Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc2 kinase: reduction of binding affinity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 1671-1675.
- REINERT K.E., THURM H. (1970). Conformational changes of DNA by interactions with oligopeptide antibiotics as studied by viscometric investigations. Studia Biophys. **24/25**, 319-325.
- RENZ M., DAY L.A. (1976). Transition from noncooperative to cooperative and selective binding of histone H<sub>1</sub> to DNA. Biochemistry **15**, 3220-3228.
- REYET 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.

REY I., SOUBIGOU P., CARTWRIGHT T., TOCQUE B. (1990). Oncogenic proteins, new targets for chemotherapeutic agents against cancer. Fund. Clin. Pharmacol. **4**, 401-422.

RHODES D. (1985). Structural analysis of a triple complex between the histone octamer, a *Xenopus* gene for 5S RNA and transcription factor IIIA. EMBO J. **4**, 3473-3482.

RODRIGUEZ A.T., FERNANDEZ B.A., GARCIA A.J., MORAN F., SUAU P., MONTERO F. (1988). Interaction of the C-terminal domain of the histone H<sub>1</sub> with DNA. Biochem. Pharmacol. **37**, 1841-1842.

RODRIGUEZ A.T., PEREZ L., MORAN F., MONTERO F., SUAU P. (1991). Cooperative interaction of the C-terminal domain of histone H<sub>1</sub> with DNA. Biophys. Chem. **39**, 145-152.

ROTH S.Y., ALLIS C.D. (1992). Chromatin condensation: does histone H<sub>1</sub> dephosphorylation play a role? Trends Biochem. Sci. **17**, 93-98.

RUSSELL GROVE J., PRICE D.J., GOODMAN H.M., AVRUCH J. (1987). Recombinant fragment of protein kinase inhibitor blocks cyclic AMP-dependent gene transcription. Science **238**, 530-533.

SAUCIER J.M., FESTY B., LE PECQ J.B. (1971). The change of 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.

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.

SCHWALLER M.A., AYBARD J., AUCLAIR C., PAOLETTI C., DODIN G. (1989). The GC base-pair preference of 2-N-methyl 9-hydroxyellipticinium. Eur. J. Biochem. **181**, 129-134.

SCOTT E.V., ZON, G., MARZILLI L.G., WILSON W.D. (1988a). 2D NMR investigation of the binding of the anticancer drug actinomycin D to duplexed dATCGCGAT: conformational features of the unique 2:1 adduct. Biochemistry **27**, 7940-7951.

SCOTT E.V., JONES R.L., BANVILLE D.L., ZON G., MARZILLI L.G., WILSON W.D. (1988b). <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR investigations of actinomycin D binding selectivity with oligodeoxyribonucleotides containing multiple adjacent d(GC) sites. Biochemistry **27**, 915-923.

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)<sub>2</sub>. Biochemistry **27**, 4340-4349.

SHIN Y.A., EICHHORN G.L. (1984). Formation of  $\psi(+)$  and  $\psi(-)$  DNA. Biopolymers **23**, 325-335.

SHOEMAKER D.D., CYSYK R.L., GORMLEY P.E., DE SOUZA J.J.V., MALSPEIS L. (1984). Metabolism of 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide by rat liver microsomes. Cancer Res. **44**, 1939-1945.

SLUKA J.P., HORWATH S.J., GLASGOW A.C., SIMON M.I., DERVAN P.B. (1990). Importance of minor groove contacts for recognition of DNA by the binding domain of Hin recombinase. Biochemistry **29**, 6551-6561.

SOLOMON M., STRAUSS F., VARSHAVSKY A. (1986). A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six AT base pairs in duplex DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 1276-1280.

STAYNOV D.Z., CRANE ROBINSON C. (1988). Footprinting of linker histones H<sub>5</sub> and H<sub>1</sub> on the nucleosome. EMBO J. **7**, 3685-3691.

STRUHL K. (1985). Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 8419-8423.

SUBRAMANIAN P.S., RAVISHANKER G., BEVERIDGE D.L. (1988). Theoretical considerations on the "spine of hydration" in the minor groove of the d(CGCGAATTCGCG).d(GCGCTTAAGCGC): Monte Carlo computer simulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 1836-1845.

SUCK D., LAHM A., OEFNER C. (1988). Structure refined to 2Å of a nicked DNA octanucleotide complex with DNase I. Nature **332**, 464-468.

SUN J.S., FRANCOIS J.C., MONTENAY-GARESTIER T., SAISON-BEHMOARAS T., ROIG V., THUONG N.T., HELENE C. (1989). Sequence-specific intercalating agents: intercalation at specific sequences on duplex DNA via major groove recognition by oligonucleotide-intercalator conjugates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 9198-9202.

SUZUKI M. (1989a). SPKK, a new nucleic acid binding unit of protein found in histone. EMBO J. **8**, 797-804.

SUZUKI M. (1989b). SPXX, a frequent sequence motif in gene regulatory proteins. J. Mol. Biol. **207**, 61-84.

SUZUKI M. (1990). The heptad repeat in the largest subunit of RNA polymerase II binds by intercalating into DNA. Nature **344**, 562-565.

SUZUKI M., SOHMA H., YAZAWA M., YAGI K., EBASHI S. (1990). Histone H<sub>1</sub> kinase specific to the SPKK motif. J. Biochem. **108**, 356-364.

SUZUKI M., YAGI N. (1991). Structure of the SPXX motif. Proc. R. Soc. Lond. B. **246**, 231-235.

SUZUKI M. (1991). The DNA-binding motif, SPKK and its variants. In *Nucleic acids and molecular biology*, vol. 5 (ed. F. Eckstein & D.M.J. Lilley), 126-140. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

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

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 <sup>1</sup>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.

VAN DYKE M.W., HERTZBERG R.P., DERVAN P.B. (1983). 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.

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.

WARING M.J. (1986). Recognition of DNA by quinoxaline antibiotics. Molecular mechanisms of carcinogenic and antitumor activity (Chagas C., Pullman B., Eds) pp.317-337, Adenine Press, New York.

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.

WENSEL G., MEARES C.F. (1983). Electrostatic properties of myoglobin probed by diffusion-enhanced energy transfer. Biochemistry **22**, 6247-6254.

WENSEL T.G., CHANG C.H., MEARES C.F. (1985). Diffusion-enhanced energy-transfer study of DNA-bound cobalt(III) bleomycins: comparisons of accessibility and electrostatic potential with DNA complexes of ethidium and acridine orange. Biochemistry **24**, 3060-3069.

WHITE S.W., APPELT K., WILSON K.S., TANAKA I. (1989). A protein structural motif that bends DNA. Proteins: structure, function and genetics **5**, 281-288.

- WILSON W.D., WANG Y.H., KUSUMA S., CHANDRASEKARAN S., YANG N.C., BOYKIN D.W. (1985a). Binding strength and specificity in DNA interactions: the design of AT specific intercalators. J. Am. Chem. Soc. **107**, 4989-4995.
- WILSON W.D., WANG Y.H., KRISHNAMOORTHY C.R., SMITH J.C. (1985b). Poly(dA).poly(dT) exists in an unusual conformation under physiological conditions: propidium binding to poly(dA).poly(dT) and poly(dAT).poly(dAT). Biochemistry **24**, 3991-3999.
- WILSON W.D., TANIOUS F.A., BARTON H.J., JONES R.L., FOX K.R., WYDRA R.L., STREKOWSKI L. (1990). DNA sequence dependent binding modes of 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Biochemistry **29**, 8452-8461.
- WINTER E., VARSHAVSKY A. (1989). A DNA binding protein that recognizes oligo(dA)oligo(dT)tracts. EMBO J. **8**, 1867-1877.
- 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.
- YANG C.C., NASH H.A. (1989). The interaction of *E. Coli* IHF protein with its specific binding sites. Cell **57**, 869-880.
- YANG-YEN H.F., ROTHBLUM L.I. (1988). Purification and characterization of a high-mobility-group-like DNA-binding protein that stimulates rRNA synthesis in vitro. Mol. Cell. Biol. **8**, 3406-3414.
- YOUNGQUIST R.S., DERVAN P.B. (1985a). Sequence specific recognition of B-DNA by oligo(N-methylpyrrolecarboxamides). Proc.Natl.Acad.Sci.USA. **82**, 2565-2569.
- YOUNGQUIST R.S., DERVAN P.B. (1985b). Sequence specific recognition of B-DNA by bis(EDTA-Dst)fumaramide. J.Am.Chem.Soc. **107**, 5528-5529.
- ZASEDATELEV A.S., ZHUZE A.L., ZIMMER C., GROKHOVSKY S.L., TUMANYAN V.G., GURSKY G.V., GOTTIKH B.P. (1978). A stereochemical model for molecular mechanism of AT pair recognition exhibited by binding of distamycin A and netropsin to DNA. Studia Biophys. **67**, 47-48.
- ZHANG X., PATEL D. (1990). Solution structure of the nogalamycin-DNA complex. Biochemistry **26**, 9451-9466.
- 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., KAKIUCHI N., GUSCHLBAUER W. (1982). Differential stabilization by netropsin of inductible B-like conformations in deoxyribo-, nitro- and 2'-deoxy-2'-fluoribo-adenosine containing duplexes of (dA)<sub>n</sub>-(dT)<sub>n</sub> and (dA)<sub>n</sub>-(dU)<sub>n</sub>. Nucl. Acids Res. **10**,1721-1732.

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. Mol. Biol. **47**, 31-112.

ZITTOUN R. (1985). m-AMSA: a review of clinical data. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. **21**, 649-653.

ZLATANOVA J. (1990). Histone H<sub>1</sub> and the regulation of transcription of eukaryotic genes. Trends Biochem. Sci. **15**, 273-276.



## PUBLICATIONS

Le travail présenté a fait l'objet des publications suivantes:

### **Article n°1:**

Relationship between DNA-binding and biological activity of anilinoacridine derivatives containing the nucleic acid-binding unit SPKK. (1992). Anti-Cancer Drug Design **7**, 83-100.

C. Houssier, P. Colson.

Laboratoire de Chimie Macromoléculaire et de Chimie Physique, Université de Liège, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgique.

N. Pommery.

Faculté de Pharmacie, Rue Laguesse, 59045 Lille, France.

F. Bailly, C. Bailly, N. Helbecque, J.P. Hénichart.

INSERM U16, Place de Verdun, 59045 Lille, France.

### **Article n°2:**

Selective binding to AT sequences in DNA by an acridine-linked peptide containing the SPKK motif. (1992). Biochemical and Biophysical Research Communications **184**, 930-937.

M.J. Waring.

Département de Pharmacologie, Université de Cambridge, Tennis Court Road, CB2 1QJ, Angleterre.

F. Bailly, C. Bailly, J.P. Hénichart.

INSERM U16, Place de Verdun, 59045 Lille, France.

# Relationship between DNA-binding and biological activity of anilinoacridine derivatives containing the nucleic acid-binding unit SPKK

F. Bailly<sup>1</sup>, C. Bailly<sup>1</sup>, N. Helbecque<sup>1</sup>, N. Pommery<sup>2</sup>, P. Colson<sup>3</sup>, C. Houssier<sup>3</sup> & J.P. Hénichart<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U.16, Place de Verdun, 59045 Lille, France, <sup>2</sup>Faculté de Pharmacie, Rue Laguesse, 59045 Lille, France and <sup>3</sup>Laboratoire de Chimie Macromoléculaire et Chimie Physique, Université de Liège, Sart-Tilman, 4000 Liège, Belgium

**Summary:** The synthesis of two peptidic derivatives, including an anilinoacridine chromophore (related to the antileukemic drug amsacrine) and either the tetrapeptide SPKK (a nucleic acid-binding unit) (**1**) or the octapeptide SPKKSPKK (**2**), has been carried out. The interaction of both drugs with DNA has been studied. Binding data are consistent with a model in which the acridine nucleus occupies an intercalation site and the tetrapeptidic or octapeptidic portion is located in the DNA minor groove. Compound **1** fully intercalates into DNA. In contrast, minor groove binding of the octapeptide SPKKSPKK seems to partially modify the intercalative properties of the acridine moiety of **2**. *In vitro* cytostatic and cytotoxic activities against a murine leukemia cell line (L1210), as well as inhibition of [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation, are reported. Compound **1**, which is a better inhibitor of DNA synthesis than **2**, is also 2.8-fold more potent in terms of growth inhibition. Both drugs are efficient cytostatic agents, but are weakly cytotoxic. The DNA-binding abilities of the two molecules are well correlated to their biological properties. Thus, DNA can be considered as the primary target for these new ligands.

**Key words:** anilinoacridine derivatives/biological activity/DNA binding/SPKK

## Introduction

A large number of antitumor agents in present clinical use are intercalating drugs which exert their cytotoxic action by interfering with DNA metabolism (Denny, 1989; Baguley, 1991). However, recent findings have clearly shown that intercalation is often accompanied by groove binding of a part of the molecule. For example, actinomycin D, daunomycin and amsacrine (m-Amsa), which bind to DNA by an intercalative process involving phenoxazone, anthraquinone and aminoacridine chromophores, respectively, have been shown to bring in an additional mode of interaction in the DNA grooves, implying a peptidic part for actinomycin D (Scott *et al.*, 1988), a sugar moiety for daunomycin (Wang *et al.*, 1987) and an aryl ring for amsacrine (Denny & Wakelin, 1986). A bimodal mechanism of binding to DNA has also been described for the antibiotics of the echinomycin family (Wakelin & Waring, 1976; Helbecque *et al.*, 1985) which was the rational basis for the design of hybrid molecules combining an intercalating chromophore, phenoxazone (Dervan, 1986), acridine (Eliadis *et al.*, 1988), ellipticine (Subra *et al.*, 1991), to a minor groove-

---

Correspondence: J.P. Hénichart

Received 29 May 1991; accepted 4 October 1991

binding entity structurally related to the natural antibiotic netropsin (Zimmer & Wahnert, 1986). In this perspective, we studied a netropsin–acridine hybrid ligand, abbreviated NetGA, which proved efficient as a drug able to bind to DNA in a sequence-specific manner by simultaneous intercalation and a groove-binding process (Bailly *et al.*, 1989, 1990).

Recently, a new peptidic DNA-binding motif, the tetrapeptide SPKK (Ser-Pro-Lys-Lys) has been proposed (Suzuki, 1989). SPKK dimers and hexamers were shown to compete with the AT-specific DNA-binding dye Hoechst 33258; nevertheless, they present a lower degree of specificity than Hoechst (Churchill & Suzuki, 1989; Suzuki, 1989). Statistical studies suggested that SPKK forms a  $\beta$ -turn stabilized by an additional hydrogen bond between the Ser side chain OH group and the main chain NH group of the third residue Lys (Suzuki, 1989). Such a side chain–main chain interaction can produce a turn by itself, called Asx-turn (Rees *et al.*, 1983; Alber *et al.*, 1987). Moreover, a model was devised for the  $S_2$  peptide, SPKKSPKK, in which the amides of Ser (the only amides to be free in the  $\beta$ -turn/Asx-turn mixed conformation) were relatively well overlapped onto the amides of netropsin known to form three centered hydrogen bonds with DNA. Thus, a succession of SPKK motifs may bind to AT-rich sequences in the minor groove by adopting a crescent shape similar to that of netropsin and also by using the same specific hydrogen bonds (Suzuki, 1989). Similar characteristics were proposed for a consensus peptide from non-histone chromosomal protein HMG-I (Reeves & Nissen, 1990).

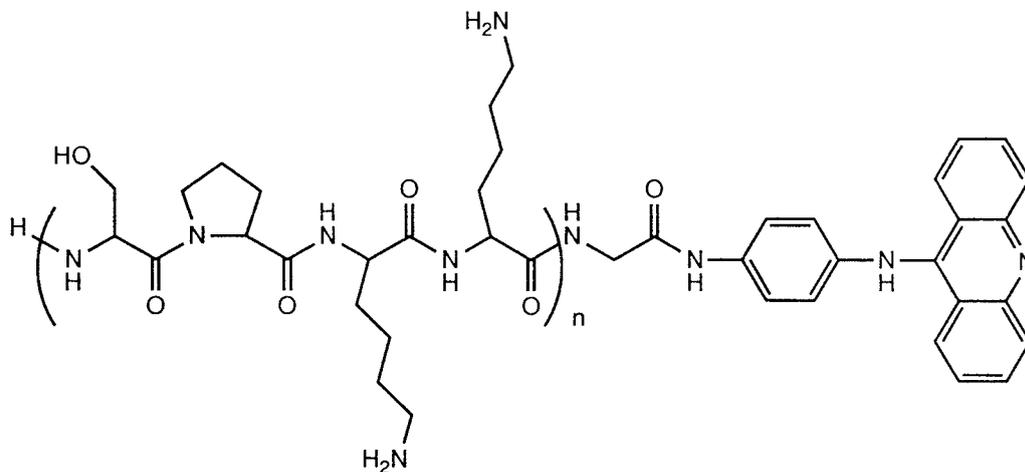
This analogy established between the SPKK motif and netropsin led us to design new mixed-function ligands. These models consist of linking one or two potentially minor groove-binding SPKK motifs to an anilino-9-aminoacridine intercalating moiety via a glycyl spacer. The rationale behind such a design would be to improve the DNA-binding properties of the SPKK motif by the introduction of an intercalator which provides a tight anchorage to DNA.

In this study, we report the synthesis, DNA-binding studies by several physicochemical techniques and preliminary biological evaluation of the two hybrid molecules **1** and **2** (Figure 1).

## Materials and methods

### Chemistry

The purity of all compounds has been assessed by TLC,  $^1\text{H-NMR}$  and FAB mass spectroscopy. The IR spectra were obtained on a Perkin-Elmer 177 spectrophotometer



**Figure 1** Structure of the synthetic hybrid compounds **1** ( $n=1$ ) and **2** ( $n=2$ )

in KBr pellets.  $^1\text{H-NMR}$  spectra were recorded on a Bruker WP 80 SY or on a Bruker AM 400 WB spectrophotometers. Chemical shifts are reported in p.p.m. from tetramethylsilane as an internal standard and are given in  $\delta$  units. FAB mass spectra were determined on a Kratos MS-50 RF mass spectrometer arranged in an EBE geometry. The sample was bombarded using a beam of xenon with a kinetic energy of 7 keV. The mass spectrometer was operated at 8 kV accelerating voltage with a mass resolution of 300. TLC was carried out using silica gel 60F-254 Merck (0.25 mm thick) pre-coated UV-sensitive plates in the following solvent systems (ratios by volume): (A)  $\text{CHCl}_3$ -MeOH, 80:20; (B)  $\text{CHCl}_3$ -MeOH, 90:10; (C) hexane-acetone, 60:40 (D) hexane-acetone, 70:30; (E) *n*-butanol-acetic acid-pyridine-water, 30:6:24:20. Spots were visualized by inspection under UV light at 254 nm and after exposure to vaporized  $\text{I}_2$  and/or ninhydrin. Kieselgel 60 (230-400 mesh) of Merck was used for column chromatography. Amino acid derivatives were purchased from Novabiochem and TEBU.

*N* $\alpha$ -Z-*N* $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl-*N* $\epsilon$ -BOC-*L*-lysine methyl ester (**3**). *N* $\alpha$ -Z-*N* $\epsilon$ -BOC-*L*-lysine (0.641 g, 1.68 mmol), where Z is benzyloxycarbonyl and BOC is *t*-butyloxycarbonyl, was first activated in the presence of *N*-methylmorpholine (186  $\mu\text{l}$ , 1.68 mmol) and isobutyl chloroformate (222  $\mu\text{l}$ , 1.68 mmol) for 3 min at  $-20^\circ\text{C}$  in  $\text{CHCl}_3$  (2 ml). A solution of *N* $\epsilon$ -BOC-*L*-lysine methyl ester, hydrochloride (0.5 g, 1.68 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (2 ml) was stirred at  $-20^\circ\text{C}$  with one equivalent of *N*-methylmorpholine and added. Coupling was realized at  $-20^\circ\text{C}$  for 3 h and then at room temperature overnight. The solution was extracted successively with 1 M  $\text{NaHCO}_3$ , water, 1 M HCl, water and then dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The organic solvent was evaporated to dryness to give an amorphous compound (0.95 g, 90% yield); Rf(C): 0.52; IR:  $\nu$  1750 (CO ester), 1700 (CO urethane), 1665  $\text{cm}^{-1}$  (CO amide);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ):  $\delta$  1.4 (s, 18H,  $\text{CH}_3$  BOC), 2.9 (m, 4H,  $\epsilon\text{CH}_2$  Lys), 3.6 (s, 3H, ester  $\text{COOCH}_3$ ), 5.0 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  Z), 6.5 (m, 2H, 2NH), 7.4 (s, 5H, 5CH(Z)), 8.0 (m, 2H, 2NH); FAB: 623 ( $\text{M}^+ + 1$ ).

*N* $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl-*N* $\epsilon$ -BOC-*L*-lysine methyl ester (**4**). A solution of **3** (0.423 g, 0.68 mmol) in methanol containing Pd on carbon was bubbled with  $\text{H}_2$  for 30 min under strong stirring. After filtration on celite, the solvent was removed *in vacuo* to give **4** (0.32 g, 95% yield); Rf(C) = 0.1, Rf(B) = 0.44; ninhydrin test positive; IR: disappearance of the CO urethane band at 1700  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ): disappearance of the peaks corresponding to the Z group at 5 and 7 p.p.m., other peaks as above; FAB: 490 ( $\text{M}^+ + 1$ ).

*N* $\alpha$ -Z-(*O*-*t*-butyl)-*L*-seryl-*L*-proline methyl ester (**5**). *L*-Proline methyl ester (0.436 g, 3.38 mmol) (obtained from the hydrochloride salt) was added at  $0^\circ\text{C}$  to a solution of *N* $\alpha$ -Z-(*O*-*t*-butyl)-*L*-serine (1 g, 3.38 mmol), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (0.698 g, 3.38 mmol) and *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) (1.036 g, 6.77 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (10 ml). The mixture was stirred overnight at  $0^\circ\text{C}$ . *N,N'*-dicyclohexylurea (DCU) was removed by filtration; the organic layer was extracted with 1 M  $\text{NaHCO}_3$ , water, 1 M HCl, water and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . After removing the solvent *in vacuo*, **5** was obtained as an oil (1.18 g, 86% yield); Rf(A): 0.92, Rf(D): 0.44; IR:  $\nu$  1760 (CO ester), 1700 (CO urethane), 1670  $\text{cm}^{-1}$  (CO amide);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ):  $\delta$  1.1 (s, 9H, *O*-*t*-butyl), 2.0 (m, 4H,  $\text{CH}_2$   $\beta$ Pro,  $\text{CH}_2$   $\gamma$ Pro), 3.4 (m, 2H,  $\text{CH}_2$   $\delta$ Pro), 3.6 (s, 3H, ester  $\text{COOCH}_3$ ), 4.4 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha$ Pro), 5.0 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  Z), 7.4 (s, 5H, aromatic protons); FAB: 407 ( $\text{M}^+ + 1$ ).

*N* $\alpha$ -Z-(*O*-*t*-butyl)-*L*-seryl-*L*-proline (**6**). Compound **5** (2.205 g, 5.42 mmol) was dissolved in methanol (100 ml) in the presence of an excess of NaOH. The mixture was stirred overnight and the solvent was evaporated *in vacuo*. After TLC control, the

solution was acidified to pH 3–4 by the addition of 1 M HCl. **6** was extracted in an AcOEt layer and obtained as an oil after evaporation to dryness (2 g, 96% yield); Rf(A): 0.69, Rf(D): 0.1; IR: no more band at  $1760\text{ cm}^{-1}$  (CO ester);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ): disappearance of the peak corresponding to the methyl ester at 3.6 p.p.m.; FAB: 393 ( $\text{M}^+ + 1$ ).

*N* $\alpha$ -Z-(*O*-*t*-butyl)-*L*-seryl-*L*-prolyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysine methyl ester (**7**). Compound **7** was obtained by coupling of **4** and **6** by the method (*N*-methylmorpholine/isobutyl chloroformate) used for the preparation of **3**. White powder (90% yield); Rf(A): 0.95, Rf(B): 0.80, Rf(C): 0.28; IR:  $\nu$  1760 (CO ester), 1700 (CO urethane), 1640–1680  $\text{cm}^{-1}$  (CO amide);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ):  $\delta$  1.1 (s, 9H, *O*-*t*-butyl), 1.4 (s, 18H,  $\text{CH}_3$  BOC), 2.0 (m, 4H,  $\text{CH}_2\beta\text{Pro}$ ,  $\text{CH}_2\gamma\text{Pro}$ ), 2.9 (m, 4H,  $\epsilon\text{CH}_2$  Lys), 3.6 (s, 3H, ester  $\text{COOCH}_3$ ), 4.3 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha\text{Pro}$ ), 5.0 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  Z), 7.4 (s, 5H, 5CH(Z)); FAB: 864 ( $\text{M}^+ + 1$ ).

*N* $\alpha$ -Z-(*O*-*t*-butyl)-*L*-seryl-*L*-prolyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysine (**8**). Saponification of **7** (same method as for the preparation of **6**) gave **8** as a white powder (90% yield); Rf(A): 0.80, Rf(B): 0.40; IR: no more band at  $1760\text{ cm}^{-1}$  (CO ester);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ): disappearance of the peak corresponding to the methyl ester at 3.6 p.p.m.; FAB: 850 ( $\text{M}^+ + 1$ ).

*L*-Seryl-*L*-prolyl-*L*-lysyl-*L*-lysine, hydrobromide (**19**). A solution of **8** (0.318 g, 0.37 mmol) in 20 ml of acetic acid (AcOH) saturated with HBr was stirred for 20 min and evaporated. The residue was dissolved several times in ethanol and evaporated to dryness, then dissolved in water (20 ml), washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 20$  ml) and lyophilized (0.231 g, 88% yield); Rf(A): 0.20, Rf(B): 0; FAB: 459 ( $\text{M}^+ + 1$ ).

*N* $\alpha$ -BOC-(*O*-*t*-butyl)-*L*-seryl-*L*-proline methyl ester (**10**). *L*-Proline methyl ester (0.271 g, 1.68 mmol) (obtained from the hydrochloride salt) was coupled to *N* $\alpha$ -BOC-(*O*-*t*-butyl)-*L*-serine (0.44 g, 1.68 mmol) (obtained from the dicyclohexylammonium salt) according to the same procedure (DCC/HOBt) as for the preparation of **5**. **10** was obtained as an oil (0.47 g, 75% yield); Rf(A): 0.90, Rf(D): 0.47; IR:  $\nu$  1760 (CO ester), 1700 (CO urethane), 1670  $\text{cm}^{-1}$  (CO amide);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ):  $\delta$  1.1 (s, 9H, *O*-*t*-butyl), 1.4 (s, 9H,  $\text{CH}_3$  BOC), 2.0 (m, 4H,  $\text{CH}_2\beta\text{Pro}$ ,  $\text{CH}_2\gamma\text{Pro}$ ), 3.4 (m, 2H,  $\text{CH}_2\delta\text{Pro}$ ), 3.6 (s, 3H, ester  $\text{COOCH}_3$ ), 4.4 (m, 1H,  $\text{CH}\alpha\text{Pro}$ ); FAB: 373 ( $\text{M}^+ + 1$ ).

*N* $\alpha$ -BOC-(*O*-*t*-butyl)-*L*-seryl-*L*-proline (**11**). Saponification of **10** (0.432 g, 1.16 mmol) gave **11** as an oil (0.4 g, 96% yield); Rf(D) = 0.1; IR: no more band at  $1760\text{ cm}^{-1}$  (CO ester);  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ): disappearance of the peak corresponding to the methyl ester at 3.6 p.p.m.; FAB: 359 ( $\text{M}^+ + 1$ ).

*N* $\alpha$ -BOC-(*O*-*t*-butyl)-*L*-seryl-*L*-prolyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysine methyl ester (**12**). The dipeptide **11** (0.395 g, 1.1 mmol) was coupled to the dipeptide **4** (0.538 g, 1.1 mmol) by the *N*-methylmorpholine/isobutyl chloroformate method to give **12** as a white powder (0.66 g, 71% yield); Rf(B): 0.82, Rf(C): 0.37;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ): presence of all the peaks corresponding to dipeptides **11** and **4**; FAB: 830 ( $\text{M}^+ + 1$ ).

*N* $\alpha$ -BOC-(*O*-*t*-butyl)-*L*-seryl-*L*-prolyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysine (**13**). Saponification of **12** (0.654 g, 0.78 mmol) gave **13** as a white powder (0.57 g, 89% yield); Rf(A): 0, Rf(B): 0.1;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ): disappearance of the peak corresponding to the methyl ester at 3.6 p.p.m.; FAB: 816 ( $\text{M}^+ + 1$ ).

(*O*-*t*-Butyl)-*L*-seryl-*L*-prolyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysine methyl ester (**14**). Tetrapeptide **7** (1.18 g, 1.36 mmol) dissolved in methanol (150 ml) was selectively N-deprotected by hydrogen (atmospheric pressure) for 1 h in the presence of Pd catalyst (10% Pd) (0.22 g). The mixture was filtered on celite and the solvent removed *in vacuo* to give **14** (0.841 g, 85% yield); Rf(B): 0.46; ninhydrin test positive; <sup>1</sup>H-NMR (Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>): disappearance of the peaks corresponding to the Z group at 5.0 and 7.4 p.p.m.; FAB: 730 (M<sup>+</sup>+1).

N $\alpha$ -BOC-[(*O*-*t*-butyl)-*L*-seryl-*L*-prolyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysine]<sub>2</sub> methyl ester (**15**). Tetrapeptides **13** (0.2 g, 0.24 mmol) and **14** (0.18 g, 0.24 mmol) were coupled in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) in the presence of one equivalent of diisopropylethylamine (46  $\mu$ l) and one equivalent of Castro's reagent, benzotriazol-1-yl-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) (0.108 g, 0.24 mmol) overnight at room temperature. The solution was successively extracted with 1 M HCl, water, 1 M NaHCO<sub>3</sub>, water, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated *in vacuo* to give **15** (0.303 g, 81% yield); Rf(B): 0.69; FAB: 1527 (M<sup>+</sup>+1).

N $\alpha$ -BOC-[(*O*-*t*-butyl)-*L*-seryl-*L*-prolyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysine]<sub>2</sub> (**16**). Saponification of **15** (0.283 g, 0.18 mmol) gave **16** as a white powder (0.252 g, 90% yield); Rf(A): 0.86, Rf(B): 0; <sup>1</sup>H-NMR (Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>): disappearance of the peak corresponding to the methyl ester at 3.6 p.p.m.; FAB: 1513 (M<sup>+</sup>+1).

(*L*-Seryl-*L*-prolyl-*L*-lysyl-*L*-lysine)<sub>2</sub>, hydrochloride (**18**). A solution of **16** (60 mg, 0.04 mmol) in 5 ml of AcOH saturated with HCl was stirred for 30 min and evaporated to dryness. The residue was dissolved several times in ethanol and evaporated to dryness, then dissolved in water (10 ml), washed with AcOEt (2  $\times$  10 ml) and lyophilized. White powder (28 mg, 65% yield); Rf(E): 0.5; FAB: 899 (M<sup>+</sup>+1).

4-(9-Acridinylamino)-N-[N $\alpha$ -Z-[(*O*-*t*-butyl)-*L*-seryl-*L*-prolyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl-glycyl]aniline (**9**). 4-(9-Acridinylamino)-*N*-glycylaniline was prepared according to a previously described procedure (Hénichart *et al.*, 1982; Morier-Teissier *et al.*, 1989). The acid **8** (0.232 g, 0.27 mmol) was stirred at 0°C with DCC (0.062 g, 0.30 mmol) and HOBT (0.046 g, 0.30 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml). 4-(9-Acridinylamino)-*N*-glycylaniline (0.094 g, 0.27 mmol) dissolved in dimethylformamide (DMF) (5 ml) was added. Coupling was realized for 18 h at 0°C. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF mixture was evaporated *in vacuo*. DCU was precipitated in ether and discarded by filtration. The residue was purified on a silica gel column with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (80:20) as solvent to give **9** (0.204 g, 64% yield); Rf(A): 0.89, Rf(B): 0.43; <sup>1</sup>H-NMR (Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>): appearance of peaks in the aromatic region (7–8 p.p.m.) corresponding to the anilino-9-acridinylamino moiety; FAB: 1174 (M<sup>+</sup>+1).

4-(9-Acridinylamino)-N-(*L*-seryl-*L*-prolyl-*L*-lysyl-*L*-lysyl-glycyl)aniline, hydrobromide (**1**). Deprotection of **9** (0.124 g, 0.1 mmol) was realized by HBr/AcOH acidolysis. The residue obtained after lyophilization of the aqueous layer was purified by column chromatography successively in solvent systems *n*-butanol-acetic acid-water (10:2:3) and acetic acid (35%) to isolate **1** as a red powder (0.062 g, 54% yield); Rf(A): 0, Rf(E): 0.3; FAB: 783 (M<sup>+</sup>+1).

4-(9-Acridinylamino)-N-[N $\alpha$ -BOC-[(*O*-*t*-butyl)-*L*-seryl-*L*-prolyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl-N $\epsilon$ -BOC-*L*-lysyl]<sub>2</sub>-glycyl]aniline (**17**). The octapeptide **16** (0.262 g, 0.17 mmol) was coupled to 4-(9-acridinylamino)-*N*-glycylaniline (60 mg, 0.17 mmol) by the DCC/HOBT

method. DCU was discarded by precipitation in ether. **17** was obtained as a red powder in an excellent yield (0.3 g, 94% yield); Rf(A): 0.82;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{Me}_2\text{SO-d}_6$ ): appearance of peaks in the aromatic region (7–8 p.p.m.) corresponding to the anilino-9-acridinyl-amino moiety; FAB: 1837 ( $\text{M}^++1$ ).

*4-(9-Acridinylamino)-N-[(L-seryl-L-prolyl-L-lysyl-L-lysyl)<sub>2</sub>-glycyl]aniline, hydrochloride (2)*. Deprotection of **17** (0.11 g, 0.06 mmol) was realized by HCl/AcOH acidolysis for 30 min. The same procedure was used as for HBr/AcOH acidolysis. The residue obtained after lyophilization was submitted to column chromatography in solvent system *n*-butanol–acetic acid–pyridine–water (30:6:24:20) to give compound **2** (60 mg, 69% yield); Rf(E): 0.17; FAB: 1223 ( $\text{M}^++1$ ).

#### *DNA solutions and buffers*

Calf thymus DNA (highly polymerized sodium salt), poly[d(AT)-d(AT)] and poly[d(GC)-d(GC)] polynucleotides were purchased from Sigma Chemical Co. and used without purification. The molar concentrations, expressed in terms of mononucleotide residues, were determined spectrophotometrically, using the following extinction coefficients (in  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ):  $\epsilon_{260} = 6700$  for poly[d(AT)-d(AT)],  $\epsilon_{254} = 8400$  for poly[d(GC)-d(GC)],  $\epsilon_{260} = 6600$  for calf thymus DNA.

UV measurements were conducted in 0.1 SSC buffer (SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0) for thermal denaturation experiments and in 10 mM Tris–HCl, 10 mM NaCl buffer (pH 7.0) for Scatchard analysis. Fluorescence measurements were made in 1 mM Tris–HCl buffer (pH 7.0).

#### *Absorption coefficients and 'melting' curves*

These were measured using a Uvikon Kontron 810/820 spectrophotometer coupled to a Uvikon Recorder 21 and a Uvikon Thermoprinter 48. Samples were placed in a thermostatically controlled cell holder (10 mm path length). The cuvette was heated by circulating water from a Haake unit set. The temperature inside the cuvette was monitored by using a thermocouple in contact with the solution. The absorbance at 260 nm was measured over the range 20–95°C with a heating rate of 1°C/min. The 'melting' temperature ( $T_m$ ) was taken as the mid-point of the hyperchromic transition.

#### *Analysis of binding data*

The binding parameters, binding constants  $K$  and binding stoichiometries  $n$  (number of ligand molecules per nucleotide base), were determined from the Scatchard equations using the one-site model. The experiments were performed at 264 nm and an equal concentration of DNA was added to the reference cell, taking into account its absorbance at this wavelength and assuming that the DNA spectrum is not altered by the binding. Fitting of the experimental points was achieved with the Enzfitter program (Leatherbarrow, 1990).

#### *Fluorescence intensities*

These were recorded at 20°C on a Jobin-Yvon J-Y-3 spectrophotofluorometer. All measurements were made in a 1 cm light path cuvette in a 1 mM Tris–HCl buffer (pH 7.0), using 20  $\mu\text{M}$  DNA and 2  $\mu\text{M}$  ethidium bromide or Hoechst 33258 as competitors. The DNA–ethidium complex was excited at 546 nm and the fluorescence

measured at 595 nm. For Hoechst, excitation was at 353 nm and fluorescence was measured at 465 nm.

#### *Linear dichroism*

The electric dichroism measurements were performed using the procedures outlined previously (Fredericq & Houssier, 1973; Houssier & O'Konski, 1981). Equations used for calculation of the different parameters are reported elsewhere (Bailly *et al.*, 1990).

#### *Cell cultures*

L1210 mouse leukemia cells were grown in RPMI 1640 medium (Gibco) containing foetal calf serum (10%); the assays were performed in the same medium. Cultures used to assess drug effects were in the exponential growth phase with a doubling time of 13–15 h.

#### *Measurements of DNA synthesis*

L1210 cells in exponential growth were incubated for 6 h at 37°C in growth medium containing various doses of **1** and **2** (0.1–25 µM). Cells were incubated for 2 h at 37°C in growth medium containing 10 µCi/ml [<sup>3</sup>H]thymidine (43 Ci/mM, CEA). The radioactive medium was removed, the cells washed twice in saline buffer and allowed to swell for 10 min in ice in 1 ml of hypotonic buffer (TNE: 0.01 M Tris-HCl, pH 8.1; 0.05 M NaCl; 0.001 M EDTA). The cells were then disrupted by congelation–decongelation (three times) and digested by proteinase K (100 mg/ml, 4 h at 37°C). The trichloroacetic acid (TCA)-precipitable radioactivity was collected on a filter and counted in a liquid scintillation counter.

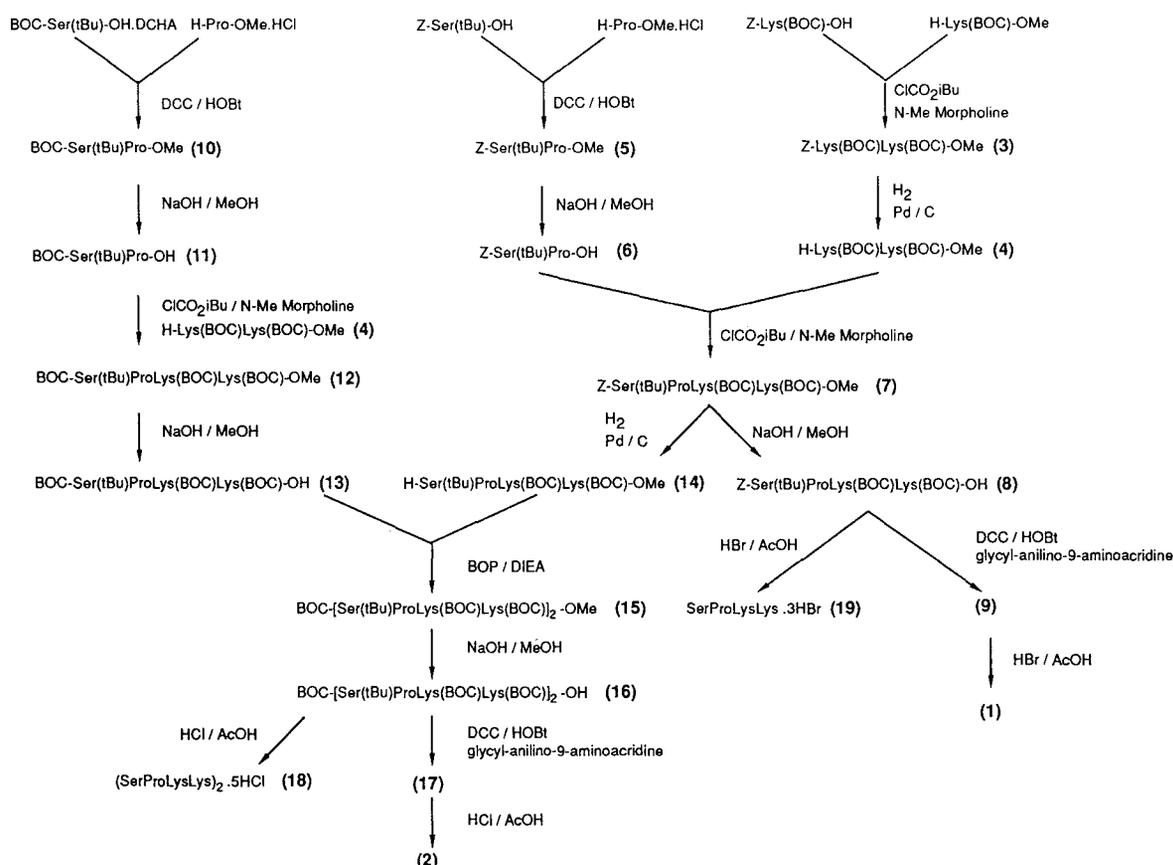
#### *Growth and viability assays*

Cell suspensions containing  $0.2 \times 10^6$  L1210 cells/ml were incubated with **1** or **2** at various concentrations (0.5, 1, 5, 10 and 50 µM) for 4 days. Cell growth and viability were estimated by counting the cells after dilution with trypan blue solution. Results were expressed as a percentage of control growth and viability.

## **Results and discussion**

### *Chemistry*

Scheme I illustrates the procedure for the synthesis of hybrid compounds **1** and **2**, and peptidic references SPKK and (SPKK)<sub>2</sub>. Coupling of Z-Ser(tBu)-OH and H-Pro-OMe was realized using DCC and HOBt. Saponification by NaOH-MeOH gave the corresponding C-deprotected dipeptide. Z-Lys(BOC)-OH and H-Lys(BOC)-OMe were coupled by a mixed anhydride procedure and the obtained dipeptide was N-deprotected by hydrogenolysis over a Pd/C catalyst. The two selectively deprotected dipeptides were coupled by the same mixed anhydride procedure to give the fully protected tetrapeptide Z-Ser(tBu)-Pro-Lys(BOC)-Lys(BOC)-OMe (**7**). The same procedure was used for the preparation of the tetrapeptide BOC-Ser(tBu)-Pro-Lys(BOC)-Lys(BOC)-OMe (**12**), using BOC-Ser(tBu)-OH instead of Z-Ser(tBu)-OH. The corresponding C-deprotected derivative of **12** (saponification) **13**, and the N-deprotected derivative of **7** (hydrogenolysis over Pd/C) **14**, were coupled, using BOP reagent to give the fully protected

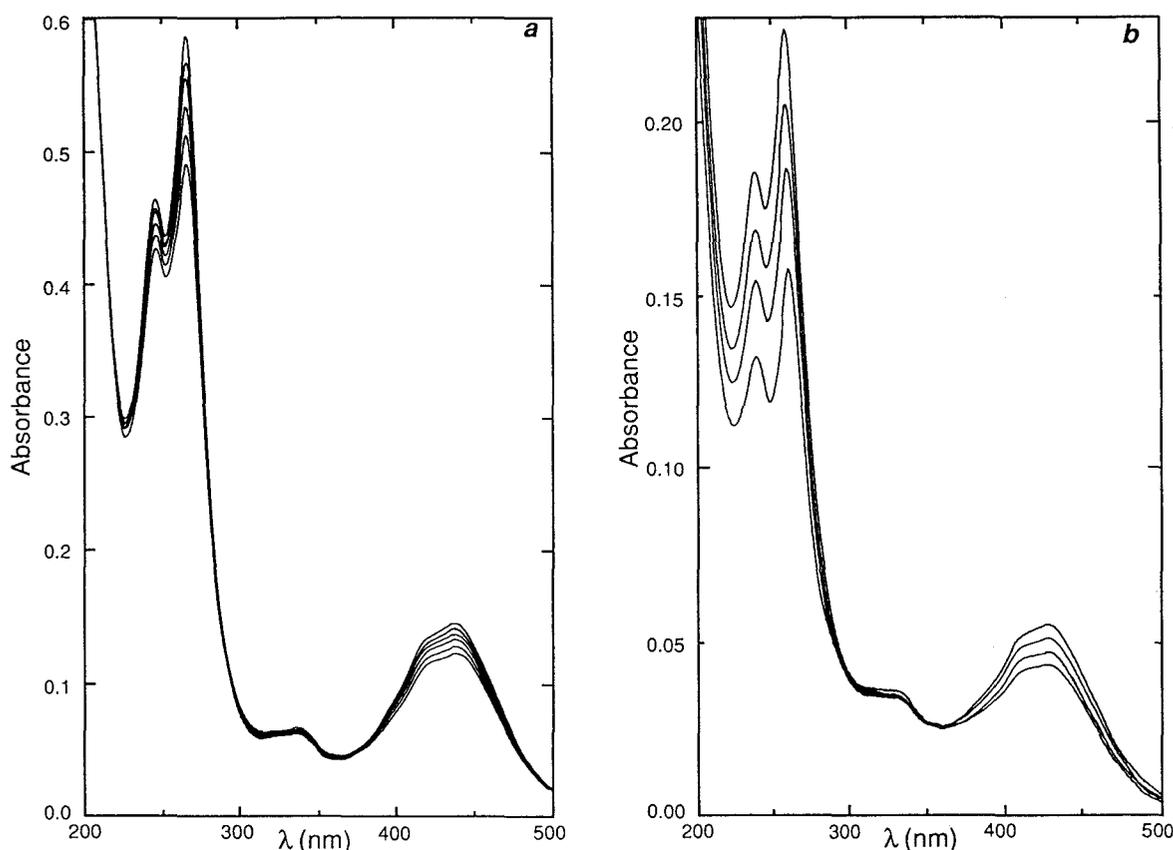


**Scheme I** Synthesis of 1, 2 and the peptides SPKK, (SPKK)<sub>2</sub>

octapeptide BOC-[Ser(tBu)-Pro-Lys(BOC)-Lys(BOC)]<sub>2</sub>-OMe (15). The selectively C-deprotected derivatives of 7 and 15 (saponification), compounds 8 and 16, respectively, were coupled by a DCC/HOBt procedure to the 4-(9-acridinylamino)-*N*-glycylaniline obtained by neutralization of the corresponding trifluoroacetate with NaHCO<sub>3</sub> (Hénichart *et al.*, 1982; Morier-Teissier *et al.*, 1989) to give the fully protected hybrid ligands 9 and 17. The tetrapeptidic derivative of glycyl-anilino-9-aminoacridine was treated with HBr-AcOH to give compound 1 and the octapeptidic homolog with HCl-AcOH to give compound 2. Tetrapeptide Ser-Pro-Lys-Lys and octapeptide (Ser-Pro-Lys-Lys)<sub>2</sub> were obtained by treatment of 8 and 16 with HBr-AcOH and HCl-AcOH, respectively.

### Interaction with DNA

**Absorption spectra of ligands and their complexes with calf thymus DNA.** Evidence for binding of compounds 1 and 2 to DNA was deduced from the changes in the UV visible absorption spectra (Figure 2) of the ligands when calf thymus DNA was added. The hypochromic effect was found to be larger for the dimeric hybrid than for the monomeric one. The relative decrease in absorption at 430 nm was 23% for 2 at a ligand/DNA ratio of 2.6 and 7% for 1 under the same conditions (Figure 2). It should be noted that the two anilino-aminoacridine-containing peptides 1 and 2 present quite different absorbances at 430 nm; in particular, compound 2 has a substantially lower molar extinction coefficient compared to the usual values obtained for anilino-aminoacridines. Neither massive



**Figure 2** UV absorption spectra of the ligands **1** (a) and **2** (b) (15  $\mu\text{M}$  each) and their complexes with calf thymus DNA (phosphate DNA to drug ratios from top to bottom: (a) 0, 0.19, 0.38, 0.62, 0.86 and 1.10; (b) 0, 0.09, 0.19 and 0.38). DNA at the same concentration was used as a blank

dimerization of **2** nor lack of purity can be implied and this phenomenon remains an enigmatic finding without explanation.

*Binding constants for ligands/calf thymus DNA interactions.* Titrations performed within a complete range of drug/DNA ratios have been used to determine the binding affinities of the two hybrid ligands. Binding constants  $K_a(\mathbf{1}) = 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_a(\mathbf{2}) = 9.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  and binding site sizes  $n(\mathbf{1}) = 0.1$ ,  $n(\mathbf{2}) = 0.025$  were measured under similar conditions for **1** and **2**, respectively. Thus, **1** binds to DNA with a greater affinity than **2** (by a factor of 4) and, moreover, both compounds present binding affinities much superior to that of the netropsin-acridine hybrid NetGA ( $K_a = 10^6 \text{ M}^{-1}$ ; Bailly *et al.*, 1990). Comparing the  $n$  values, it seems that the site size for compound **2** is larger than that of **1**, as expected from the structure of the ligands. The high values of  $n$  appear somewhat problematic, but might result from large drug-induced structural DNA modifications.

*Thermal denaturation.* Stabilization of calf thymus DNA and poly[d(AT)-d(AT)] against thermal denaturation by the hybrid ligands **1** and **2** has been evaluated. The same experiments were carried out with the intercalating part glycyl-anilino-9-aminoacridine, the peptides SPKK and SPKKSPKK, netropsin and the netropsin-acridine hybrid ligand NetGA as references. Data are summarized in Table I.

**Table I**  $\Delta T_m$  values of calf thymus DNA and poly[d(AT)-d(AT)] induced by the hybrid compounds and parent molecules

D/P	$\Delta T_m$ , poly[d(AT)-d(AT)]					$\Delta T_m$ , calf thymus DNA (42% GC)				
	0.05	0.1	0.25	0.5	1	0.05	0.1	0.25	0.5	1
(1)*	(a) 2.8	(a) 5.1 (b) 26	(a) 20.4 (b) 30.3	(c) 33.5	/	4	8	(c) 21	/	/
(2)*	(a) 1.6 (b) 20	(a) 4.3 (b) 25.5	(c) 33	(c) 39	/	1.5	3	8	13	/
SPKK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SPKKSPKK	0	0	0	0.3	1	0	0	0	0	0
Glycylanilino-9-aminoacridine	4.8	5.7	9	13.8	19	0.7	2	4.7	5.6	8.5
Netropsin	21.5	29	31	/	/	10.5	12	15	18	22
NetGA	2	5	10	18	19	1	3	5	7	8

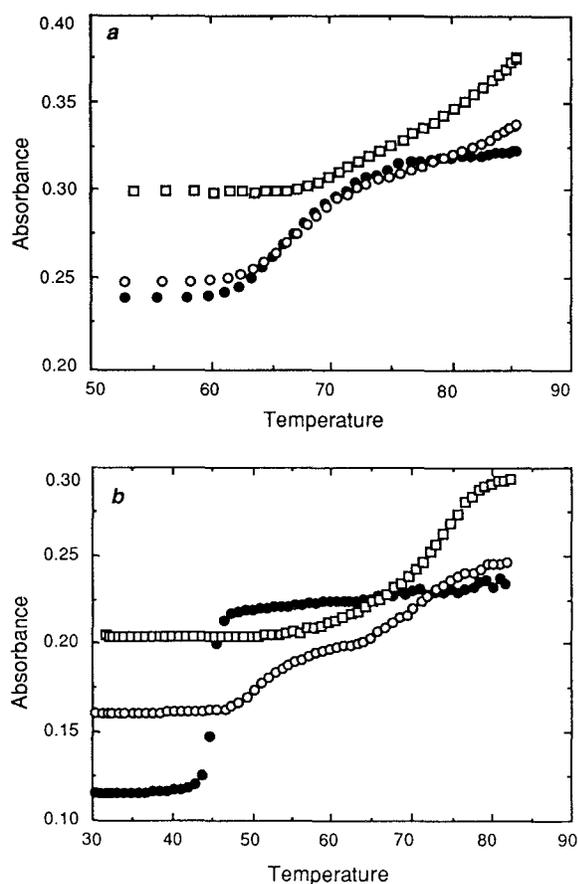
\* (a): values of the first transition; (b): values of the second transition; (c): underestimated values; only partial (and not complete) transitions were observed because of instrumental limitations; / : data not measurable experimentally;  $\Delta T_m$ : elevation in thermal denaturation temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), D/P: drug to phosphate DNA residue ratio.

Among the hybrid ligands, compound **1** was the best compound to stabilize calf thymus DNA against thermal denaturation. Both peptides SPKK and SPKKSPKK and the intercalating moiety glycy-anilino-9-aminoacridine produced no effect and a weak stabilization, respectively. These  $\Delta T_m$  values for **1**, slightly inferior to those of netropsin, are representative of a strong interaction involving a binding of the peptide (probably via electrostatic bonds between the Lys side chain amine groups and the phosphates of the double helix), allowed by a preliminary intercalative process (as evidenced by the lack of notable stabilization induced by the peptide alone).

Compound **2** gave lower  $\Delta T_m$  values than **1**, but also higher values than those of the intercalating and peptidic moieties alone. Such values provide evidence for the binding of the two parts of the molecules. The two hybrid ligands were better than NetGA.

The same experiments on poly[d(AT)-d(AT)] showed that **1** and **2** induced comparable  $\Delta T_m$  values. Nevertheless, **2** was better than **1** beyond a drug to phosphate ratio (D/P) of 0.2. At these ratios ( $>0.2$ ), the two compounds exhibited properties similar to those of netropsin. The very different  $\Delta T_m$  values of the two DNAs in the presence of the bifunctional ligands suggest a certain preference for AT sites, as observed for netropsin (experiments could not be performed with poly[d(GC)-d(GC)] because of its too high 'melting' temperature).

Melting profiles showed a biphasic shape. This was particularly obvious for **1** in the presence of poly[d(AT)-d(AT)] (Figure 3). Two transitions could be observed between D/P ratios of 0.08 and 0.2, then one single transition was visible at higher D/P ratios. In the presence of calf thymus DNA, the phenomenon was observed for D/P values up to 0.07, but was less obvious (Figure 3) because only the beginning of the second transition could be observed. **2** revealed these characteristics in the presence of poly[d(AT)-d(AT)] (two transitions for D/P values between 0.05 and 0.15). Such biphasic phenomena could be assigned to a binding cooperativity which has already been observed for the interaction of the C-terminal domain of the histone H<sub>1</sub> (containing SPKK motifs) with DNA (Rodriguez *et al.*, 1988).



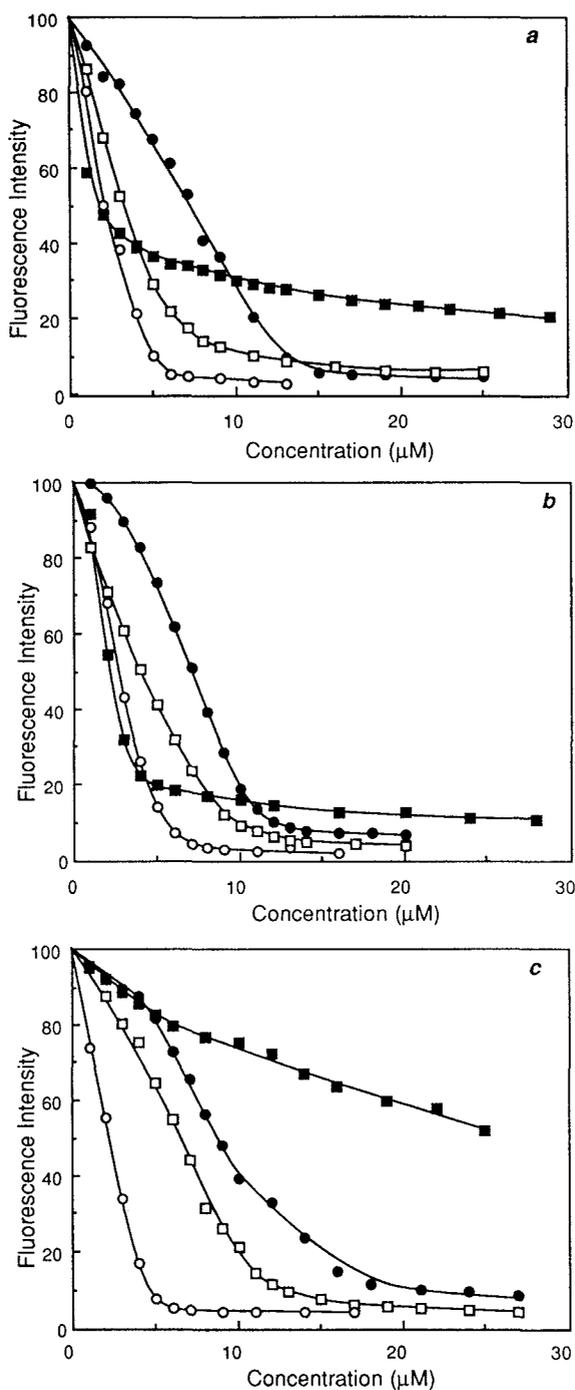
**Figure 3** Plot of absorbance at 260 nm versus temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ). Typical curves obtained for the hybrid ligand **1** in the presence of calf thymus DNA (a) and poly[d(AT)-d(AT)] (b) at different drug/DNA ratios: (a) 0 ( $\bullet$ ), 0.025 ( $\circ$ ), 0.1 ( $\square$ ); (b) 0 ( $\bullet$ ), 0.1 ( $\circ$ ), 0.2 ( $\square$ )

*Fluorescence studies.* The effects of the drugs **1** and **2** on ethidium-DNA and Hoechst-DNA (calf thymus, poly[d(AT)-d(AT)], poly[d(GC)-d(GC)]) fluorescence has been studied and compared to the reference compounds netropsin and glycyL-anilino-9-aminoacridine (Figure 4).

In any case, **1** gave the largest quenching of fluorescence, compared to glycyL-anilino-9-aminoacridine and **2**. The differences between these three ligands are obvious when comparing the  $Q_{50}$  values (concentrations of drug to give 50% quenching). For example,  $Q_{50}$  values obtained for quenching of ethidium-poly[d(AT)-d(AT)] complexes were 3, 4 and  $7\ \mu\text{M}$  for **1**, glycyL-anilino-9-aminoacridine and **2**, respectively. Differences with netropsin were also clear at high drug concentrations where quenching values for the hybrid ligands were largely higher than for netropsin. The peptides SPKK and SPKKSPKK alone gave no quenching under the same conditions, confirming their poor binding affinity (previously deduced from the thermal denaturation experiments).

The results led to the conclusion that the hybrid ligands **1** and **2** can be considered as intercalating agents by competing with ethidium bromide. In the light of these results, some lack of specificity can be advanced (same orders of quenching magnitude for the three kinds of ethidium-DNA complexes).

Quenching of DNA-bound Hoechst (DNA calf thymus and poly[d(AT)-d(AT)] complexes revealed the same order of quenching strength as above : **1** > glycyL-anilino-9-



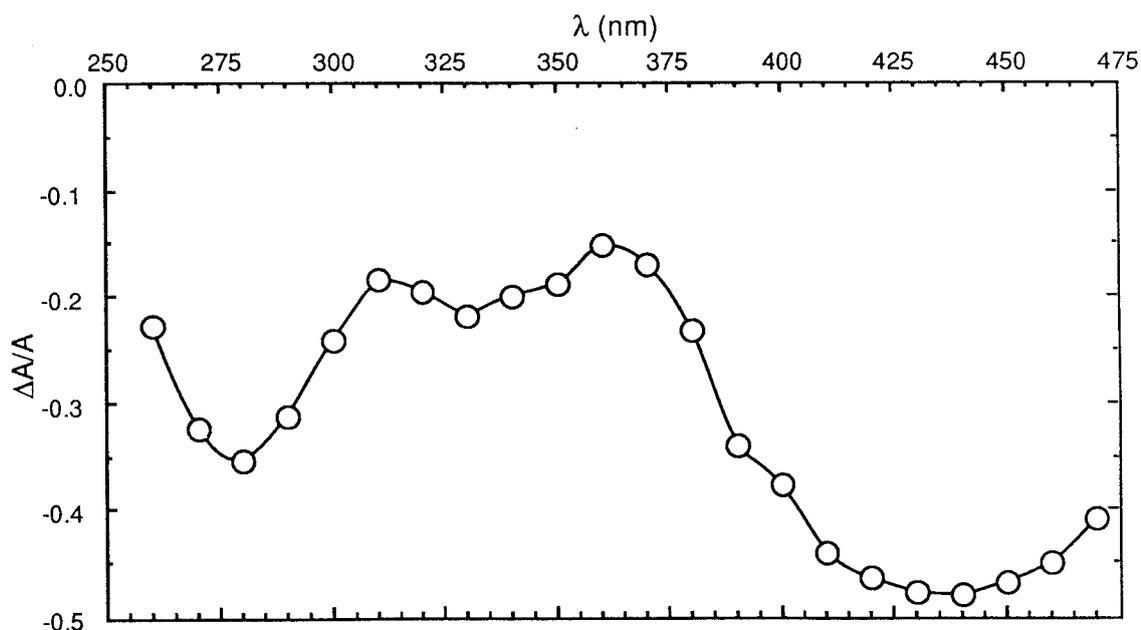
**Figure 4** Reduction of the fluorescence intensity (%) of ethidium–DNA complexes by addition of (1) (○), (2) (●), glycyL-anilino-9-aminoacridine (□), netropsin (■). (a) Calf thymus DNA; (b) poly[d(AT)-d(AT)]; (c) poly[d(GC)-d(GC)]

aminoacridine > 2 (data not shown). The two control peptides alone still had no significant effect. The ability of 1 to quench the fluorescence of the Hoechst dye bound either to calf thymus DNA or poly[d(AT)-d(AT)] was comparable to that of netropsin and quite superior to that of 2. Therefore, minor groove binding of the peptidic moiety of 1 and 2, to a lesser extent, can be postulated, as previously shown by Suzuki with SPKKSPKK (Churchill & Suzuki, 1989; Suzuki, 1989).

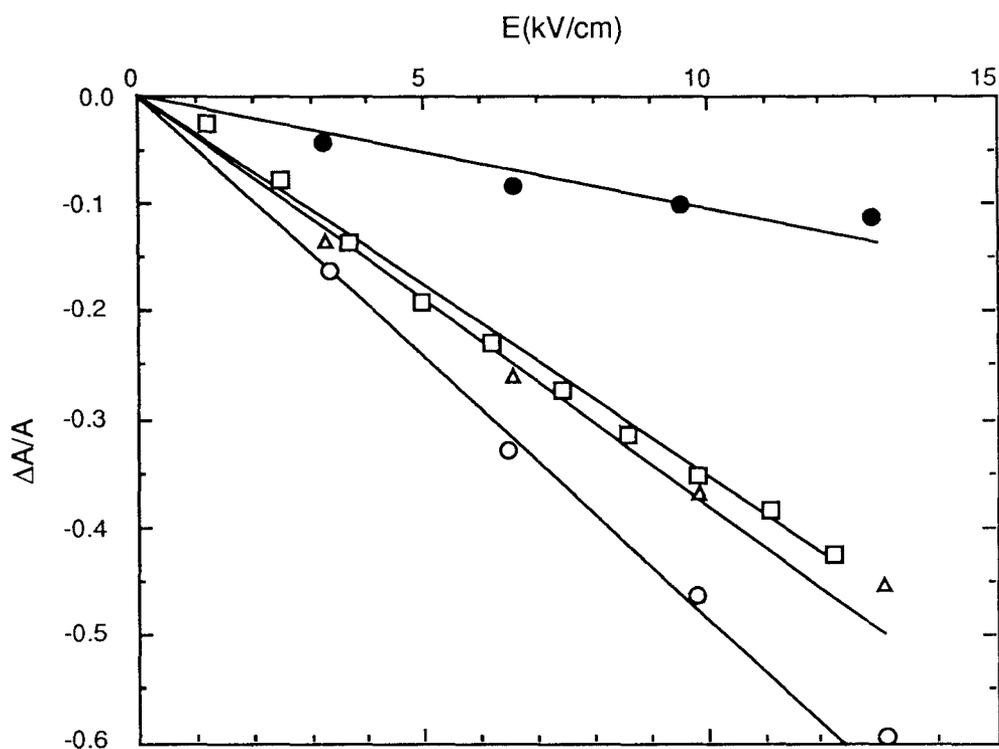
*Electric linear dichroism.* The 1-DNA complex linear dichroism (LD) spectrum (Figure 5) showed a negative dichroism region (375–475 nm), reflecting the orientation of the acridine chromophore. As the peptidic moiety only absorbs at 260 nm, the interaction of **1** and **2** with calf thymus DNA could only be investigated in the long-wavelength visible absorption band of acridine (440 nm).

At 440 nm, the glycyL-anilino-9-aminoacridine moiety of **1** studied alone exhibited a negative LD close to that of the DNA bases (Figure 6), supporting a binding mode in which the acridine is stacked parallel to the bases, i.e. an intercalative process. The LD values for **1** were more negative than those for glycyL-anilino-9-aminoacridine, suggesting that the intercalating process is strengthened by the association of the tetrapeptidic moiety. However, when the intercalating chromophore is linked to the octapeptidic moiety, the intensity of the LD value at 440 nm fell significantly. Such was the case for the hybrid compound NetGA (Bailly *et al.*, 1990). This could be attributed to a partial intercalative process; nevertheless, a more plausible explanation would be that the fully intercalated acridinyl chromophore of **2** is tilted with respect to the plane of the base pairs in the binding site. Thus, compound **2** and NetGA may behave similarly and probably bind to DNA in similar fashions.

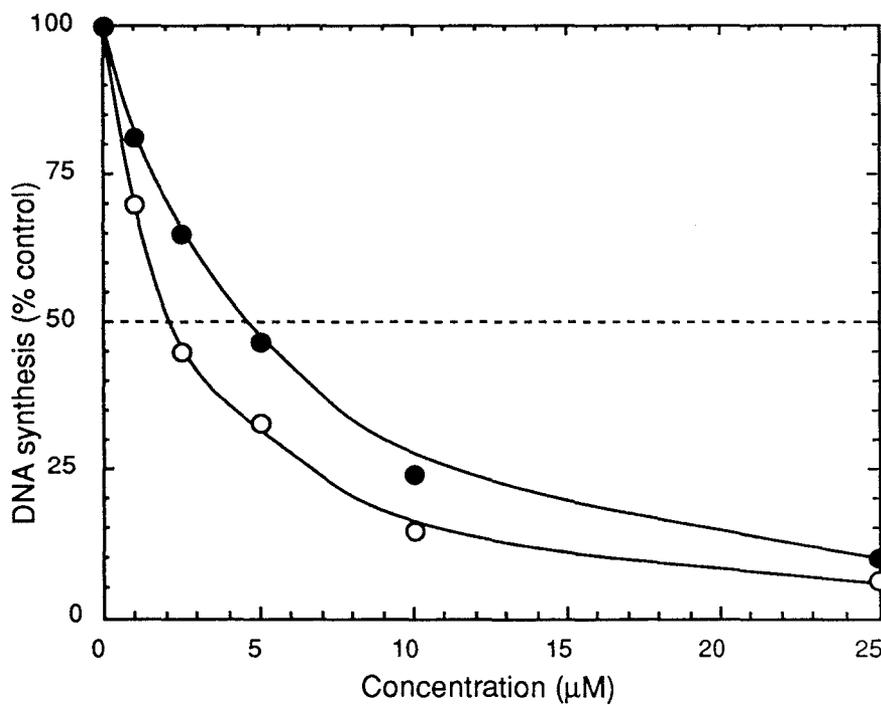
*Inhibition of DNA synthesis.* DNA synthesis was followed by the amount of [<sup>3</sup>H]thymidine incorporated into TCA-insoluble materials derived from treated L1210 cells, compared with untreated controls. As shown in Figure 7, a marked inhibitory effect (80–85%) was apparent using 25  $\mu$ M drugs. The inhibitory effect rose gradually with increasing drug concentration. The activity of **1** was consistently greater than that of **2** throughout the entire experiment.  $I_{DNA50}$  (drug concentration which inhibits DNA synthesis by 50% under the conditions described in Materials and methods) values are estimated to be 2 and 4.5  $\mu$ M for **1** and **2**, respectively. Thus, once again, **1** is more potent than **2**. DNA synthesis inhibition effects of **1** and **2** in cultured L1210 leukemia cells are relevant to the physicochemical data on the DNA-binding properties of these drugs. DNA binding and resultant steric interference with DNA polymerase action (or DNA-



**Figure 5** Reduced linear dichroism ( $\Delta A/A$ ) spectrum of 1-DNA complex at a drug to phosphate DNA ratio of 0.1 and at 12.5 kV/cm



**Figure 6** Field strength dependence of the electric dichroism for DNA ( $\Delta$ ) at 260 nm and its complex with 1 ( $\circ$ ), 2 ( $\bullet$ ) and glycyL-anilino-9-aminoacridine ( $\square$ ) at 440 nm



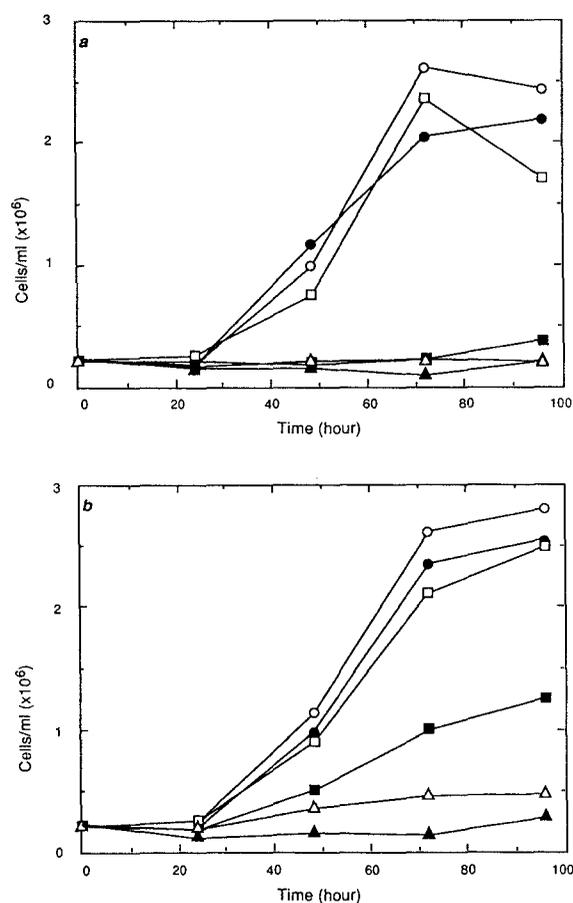
**Figure 7** Inhibitory effects of 1 ( $\circ$ ) and 2 ( $\bullet$ ) on the incorporation of [ $^3$ H]thymidine into DNA in cultured L1210 leukemia cells. Each point represents the mean of four experiments

binding proteins in general) may be considered to be the mechanistic explanation for DNA synthesis inhibition induced by **1** and **2**.

Nevertheless, it should be pointed out that these experiments do not give any information on the intimate mechanism of inhibition of DNA synthesis. The observed effects can be due to direct inhibition of DNA synthesis by template inhibition; however, the period of drug incubation used in the assays (6 h) does not allow us to conclude whether such a direct mechanism can be retained. Moreover, DNA replication can be stopped because the hybrid ligands have perturbed the cell cycle (especially as DNA intercalating agents are well known to modify cell cycle progression and to cause cells to accumulate in the G<sub>2</sub>+M phase). Further investigations of the drugs' effects on cell cycle distribution using flow cytometry will be necessary to clarify this point.

#### Growth and viability assays

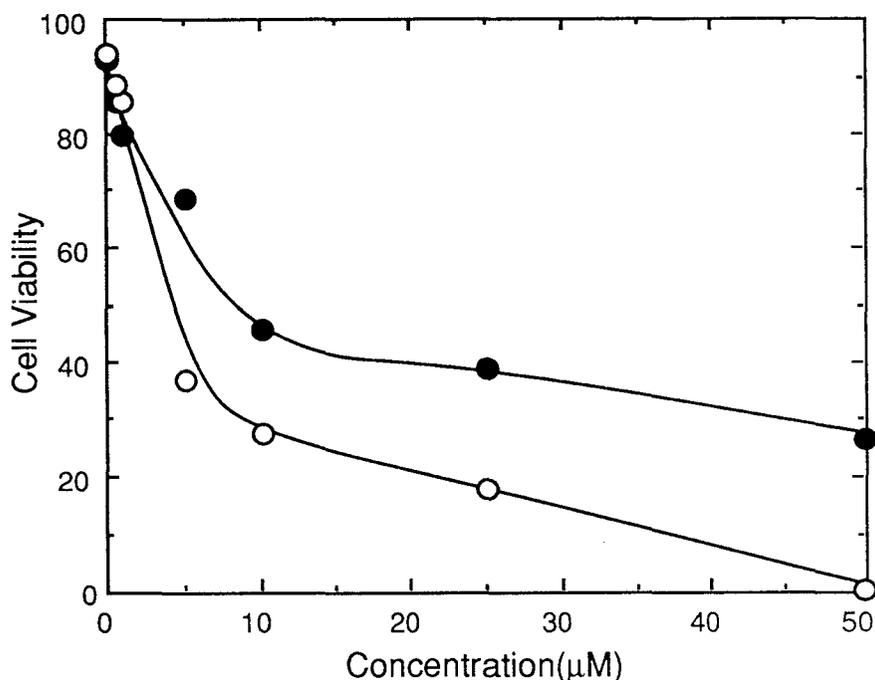
L1210 leukemia cells were incubated in the presence of **1** and **2** at concentrations ranging from 0.5 to 50  $\mu$ M. Cell growth was followed during the next 4 days. The results presented in Figure 8 illustrate the cytostatic effect of both drugs. Cultures treated with the lowest doses of **2** (0.5 and 1  $\mu$ M) escaped the cytostatic effect and were able to grow at the same rate as the control cells. Growth inhibition could be observed with **2** for concentrations up to 5  $\mu$ M, with practically no growth at 50  $\mu$ M **2**.



**Figure 8** Growth rate of L1210 leukemia cells in control cultures (○) or during continuous incubation with 0.5 (●), 1 (□), 5 (■), 10 (△) and 50  $\mu$ M (▲) **1** (a) and **2** (b). Each point is the mean of four experiments

In contrast, the SPKK hybrid (**1**) exhibited a more pronounced cytostatic effect. **1** at 5  $\mu\text{M}$  completely inhibited L1210 cell proliferation. A marked effect was detected at 1  $\mu\text{M}$  **1** after 4 days growth. Comparison of the  $\text{IC}_{50}$  (drug concentration which inhibits cell growth by 50%) for **1** and **2** indicated that **1** was 2.8-fold more potent than **2** in terms of L1210 growth inhibition. After 4 days, an  $\text{IC}_{50}$  of 1.7 and 4.8  $\mu\text{M}$  for **1** and **2**, respectively was measured. Comparative  $\text{IC}_{50}$  values of **1** and 0.075  $\mu\text{M}$  were obtained under the same conditions for the netropsin hybrid derivative NetGA and m-Amsa, respectively.

Measurements of cellular viability upon the addition of various concentrations of **1** and **2** (Figure 9) provided clear evidence that the two drugs behave differently. Such curves attest to the cytotoxic, and not cytostatic, effect of the two studied compounds. For



**Figure 9** Measurement of L1210 cell viability (%) with increasing drug concentrations. **1**, (○); **2**, (●)

example, with 5  $\mu\text{M}$  **1**, cell viability was severely impaired (37%), while with 5  $\mu\text{M}$  **2** a large amount of cells (70%) remained viable. Simultaneously, cell viabilities of 40 and 10% were obtained with 5  $\mu\text{M}$  NetGA and amsacrine, respectively. Therefore, the more potent compound **1** presents properties similar to those of NetGA.

Moreover, when exponentially growing L1210 cells were grown in the presence of **1**, strong and reproducible alterations of cell morphology occurred on the day following drug addition to the medium. Cells were characterized by their giant size and hypertrophied nuclei. A significant proportion of cells were multinucleated (binucleated, sometimes trinucleated), but continued to exclude trypan blue for a while. For doses  $>25 \mu\text{M}$ , such morphological changes were less noticed due to rapid cell lysis. This effect, specific to **1** (not seen with **2**), reflects a general feature of cells subjected to the action of an antitumor agent.

With both drugs, a direct correlation exists between DNA-binding properties, inhibition of DNA synthesis *in vitro* and cytotoxicity. The lower affinity of **2** for DNA results

in a weaker activity *in vitro*. Moreover  $IC_{50}$  and  $I_{DNA50}$  values are very similar. Therefore, it is tempting to postulate that the observed cytotoxic effect directly results from inhibition of DNA synthesis due to tight binding to DNA. Nevertheless, such a correlation is still raw in the light of the present results and should be taken with care. In particular, the differences between compounds **1** and **2**, in terms of mol. wt and positive charge, must have a noticeable influence on their kinetics of intracellular penetration and their subcellular distribution. Thus, intracellular concentrations of compounds **1** and **2** could be quite different for the same applied dose.

Finally, it should be noted that other cellular targets may be implicated. In particular, the topoisomerase II–DNA complex, known to be a primary target of amsacrine (Nelson *et al.*, 1984) and some related acridines (including NetGA), may certainly provide an adequate target for these compounds.

## Discussion

The results from several different complementary techniques have provided information concerning the mechanisms of binding of the hybrid ligands **1** and **2**. All the data reported here show that **1** behaves differently to **2** upon binding to DNA.

An intercalative process of the acridinyl moiety has been clearly demonstrated for **1**; this confers high DNA affinity to the resulting hybrid ligand, although the SPKK moiety alone has no affinity. The binding of the peptidic moiety certainly implies electrostatic bonds between  $N\epsilon$  atoms of the lysine side chains and the DNA phosphates, as strongly suggested for all these kinds of peptides rich in basic residues (Churchill & Travers, 1991); furthermore it may be a minor groove binding. The latter assumption is based on the strong fluorescence quenching of the Hoechst–DNA complex induced by **1** (identical to that measured with netropsin) and on the higher  $\Delta T_m$  values obtained with poly[d(AT)-d(AT)] compared to calf thymus DNA. Indeed, AT nucleotide sequence specificity is more characteristic of minor groove binders such as netropsin or distamycin. Therefore, it can be postulated that, besides intercalation of the acridine rings, the basic peptide binds in the minor groove. Nevertheless, a strict AT specificity cannot be advanced because of the comparable quenching properties observed with three DNAs of different base pair arrangements.

The acridinyl and peptidic moieties of **2** also bind to DNA simultaneously. However, the parallelism between the acridine and the base pairs is disrupted. This could be assigned to the influence of the peptide chain whose minor groove or external binding hinders the intercalative process. This phenomenon was also observed for the netropsin–acridine hybrid ligand NetGA and tends to confirm the analogy proposed between netropsin and the octapeptide SPKKSPKK (Suzuki, 1989). Nevertheless, it should be pointed out that intercalation of **2** is first necessary to ensure binding of the weakly DNA-affinic peptidic part.

The role of the spacer chain must also not be forgotten. It plays a critical function (Dervan, 1986) and must be chosen judiciously to allow simultaneous binding of the two moieties of hybrid molecules. That is why a novel class of hybrid ligands including longer and more flexible linkers is currently being investigated in order to determine a possible role of the spacer chains in the binding ability of these ligands.

Footprinting studies were realized too. The DNase I method did not give any significant footprint. Nevertheless, recent experiments using the hydroxyl radical as a cleaving agent are encouraging and the results will be reported in due course.

Finally, this series of compounds showed noticeable and interesting biological activities *in vitro*. The cytotoxicity, and growth inhibitory and DNA synthesis inhibitory

abilities of the two hybrid molecules were well correlated with their DNA-binding properties. These *in vitro* studies cannot be the only criteria for judging the usefulness of these peptide-acridine conjugates in terms of potential antitumor agents. It seems, however, that **1** is worthy of further investigation *in vivo*.

### Acknowledgements

This research was supported by grants from the 'Ligue Nationale Contre Le Cancer' and the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-Communauté Française de Belgique' agreement.

### References

- ALBER, T., DAO-PIN, S., WILSON, K., WOZNIAK, J.A., COOK, S.P. & MATTHEWS, B.W. (1987). Contributions of hydrogen bonds of Thr 157 to the thermodynamic stability of phage T4 lysozyme. *Nature*, **330**, 41.
- BAGULEY, B.C. (1991). DNA intercalating anti-tumour agents. *Anti-Cancer Drug Design*, **6**, 1.
- BAILLY, C., POMMERY, N., HOUSSIN, R. & HENICHART, J.P. (1989). Design, synthesis, DNA binding and biological activity of a series of DNA minor groove-binding intercalating drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **78**, 910.
- BAILLY, C., HELBECQUE, N., HENICHART, J.P. & 5 others (1990). Molecular recognition between oligopeptides and nucleic acids. DNA sequence specificity and binding properties of an acridine-linked netropsin hybrid ligand. *Journal of Molecular Recognition*, **3**, 26.
- CHURCHILL, M.E.A. & SUZUKI, M. (1989). SPKK motifs prefer to bind to DNA at A/T rich sites. *The EMBO Journal*, **8**, 4189.
- CHURCHILL, M.E.A. & TRAVERS, A.A. (1991). Protein motifs that recognize structural features of DNA. *Trends in Biochemical Sciences*, **16**, 92.
- DENNY, W.A. (1989). DNA-intercalating ligands as anti-cancer drugs: prospects for future design. *Anti-Cancer Drug Design*, **4**, 241.
- DENNY, W.A. & WAKELIN, L.P.G. (1986). Kinetic and equilibrium studies of the interaction of amsacrine and anilino ring-substituted analogues with DNA. *Cancer Research*, **46**, 1717.
- DERVAN, P.B. (1986). Design of sequence-specific DNA-binding molecules. *Science*, **232**, 464.
- ELIADIS, A., PHILIPS, D.R., REISS, J.A. & SKOROBOGATY, A. (1988). The synthesis and DNA footprinting of acridine-linked netropsin and distamycin bifunctional mixed ligands. *Journal of the Chemical Society, London, Chemical Communications*, 1049.
- FREDERICQ, E. & HOUSSIER, C. (1973). *Electric Dichroism and Electric Birefringence*. Clarendon Press: Oxford.
- HELBECQUE, N., BERNIER, J.L. & HENICHART, J.P. (1985). Design of a new polyintercalating drug, a bis-acridinyl peptidic analogue of triostin A. *Biochemical Journal*, **225**, 829.
- HENICHART, J.P., BERNIER, J.L. & CATTEAU, J.P. (1982). Interaction of 4-(9-acridinylamino)aniline and derivatives with DNA. Influence of a lysylglycyl side chain on the binding parameters. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **363**, 835.
- HOUSSIER, C. & O'KONSKI, C.T. (1981). Electro-optical instrumentation systems with their data acquisition and treatment. In *Molecular Electro-Optics*. Krause, S. (ed.), p. 309. Series B64, Nato Advanced Study Institute: New York.
- LEATHERBARROW, R.J. (1990). Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. *Trends in Biochemical Sciences*, **15**, 455.
- MORIER-TESSIER, E., BAILLY, C., BERNIER, J.L. & 6 others (1989). Synthesis, biological activity and DNA interaction of anilino-acridine and bithiazole peptide derivatives related to the anti-tumor drugs m-Amsa and bleomycin. *Anti-Cancer Drug Design*, **4**, 37.
- NELSON, E.M., TEWEY, K.M. & LIU, L.F. (1984). Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, **81**, 1361.
- REES, D.C., LEWIS, M. & LIPCOMB, W.N. (1983). Refined crystal structure of carboxypeptidase A at 1.54 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **168**, 367.
- REEVES, R. & NISSEN, M.S. (1990). The AT-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide for recognizing DNA structure. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 8573.
- RODRIGUEZ, A.T., FERNANDEZ, B.A., GARCIA TEJEDOR, A.J., MORAN, F., SUAU, P. & MONTERO, F. (1988). Interaction of the C-terminal domain of the histone H<sub>1</sub> with DNA. *Biochemical Pharmacology*, **17**, 1841.
- SCOTT, E.V., ZON, G., MARZILLI, L.G. & WILSON, W.D. (1988). 2D NMR investigation of the binding of the anticancer drug actinomycin to duplexed dATCGCGAT: conformational features of the unique 2:1 adduct. *Biochemistry*, **27**, 7940.
- SUBRA, F., CARTEAU, S., PAGER, J. & six others (1991). Bis(pyrrolocarboxamide) linked to intercalating chromophore oxazolo-pyridocarbazole (OPC): selective binding to DNA and polynucleotides. *Biochemistry*, **30**, 1642.
- SUZUKI, M. (1989). SPKK, a new nucleic acid binding unit of protein found in histone. *The EMBO Journal*, **8**, 797.
- WAKELIN, L.P.G. & WARING, M.J. (1976). The binding of echinomycin to deoxyribonucleic acid. *Biochemical Journal*, **157**, 721.
- 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(CpGpTpApCpGp) at 1.2 Å resolution. *Biochemistry*, **26**, 1152.
- ZIMMER, C.H. & WÄHNERT, 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. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **47**, 31.

**SELECTIVE BINDING TO AT SEQUENCES IN DNA BY AN ACRIDINE-LINKED  
PEPTIDE CONTAINING THE SPKK MOTIF**Fabrice Bailly<sup>§</sup>, Christian Bailly<sup>§</sup>, Michael J. Waring<sup>#</sup> and Jean-Pierre Hénichart<sup>§</sup><sup>§</sup>Centre de Recherche INSERM, Place de Verdun, 59045 Lille, France<sup>#</sup>Department of Pharmacology, University of Cambridge, Tennis Court Road, CB2 1QJ, U.K.

Received March 6, 1992

The sequence selectivity of binding to DNA by an acridine-linked peptide ligand has been investigated by means of footprinting methodologies. The ligand conjugates an anilino-acridine intercalating chromophore with the potentially minor groove binder octapeptide SPKKSPKK. This basic peptide corresponds to a highly conserved DNA recognition motif found in histone H1 and several other nonhistone proteins. Three complementary techniques using DNase I, hydroxyl radicals and osmium tetroxide as sequencing probes have been employed to evaluate both the sequence specificity of binding and the drug-induced conformational changes in DNA. The results converge to demonstrate the AT-selectivity and support a model in which the peptide moiety lies in the minor groove. DNA-binding sites of the conjugate are restricted to a few alternating AT-sequences proximal to GC-rich regions. Binding to homooligomeric runs of A and T is clearly disfavoured by the hybrid whereas such sequences represent preferred binding sites for the unsubstituted basic peptide. These differences reflect the influence of the anilino-acridine chromophore, which evidently contributes to the DNA recognition process allowing the peptide only to contact defined DNA sequences. © 1992 Academic Press, Inc.

The antibiotics and drugs netropsin, distamycin, berenil, Hoechst 33258, pentamidine and DAPI all adopt a crescent conformation roughly complementary to the spiral of the DNA double helix. They share the common property of binding to DNA by displacing the spine of hydration within AT-rich sequences of the minor groove (1). Similarly, proteins such as HMG-1, IHF, nucleolin, datin and histone H1 interact specifically with contiguous AT base pairs in DNA via minor groove contacts (2). Histone H1 triggers nucleosome aggregation to solenoid structures and also binds in a specific manner to AT-rich DNA sequences, termed scaffold-associated regions (SAR), that mediate specific binding to the nuclear scaffold (3). It has been suggested that SAR, and in particular arrays of oligo(dA).oligo(dT) tracts which they contain, determine via a cooperative assembly of histone H1 the conformation of chromatin domains and consequently set up the potential transcription repertoire of the cell (4). Thus, histone H1 seems to play a determinant role in transcriptional repression (5). The interaction between H1 and AT-rich DNA sequences implicates the highly conserved and repeated peptide motif SPKK (Ser-Pro-Lys-Lys). The dimer (SPKK)<sub>2</sub> is presumed to adopt a  $\beta$ -turn structure and, as a consequence, may present a crescent shaped conformation similar to that of minor groove binders (6). The peptide (SPRK)<sub>2</sub> (R = Arg) selectively binds to AT-rich sequences

presumably through minor groove contacts as does Hoechst 33258 (7). All the proteins cited above interact with DNA through key sequence-specific contacts between SPKK-like motifs and AT-rich DNA sequences (3). The SPKK motif has also been found in the *jun* protein which, combined with *fos*, is able to regulate transcription (8). Thus, the SPKK motif may be a crucial DNA-recognizing element which mediates the activity of various regulatory proteins and may serve as a common switch for gene regulation (9).

These considerations led us to elaborate hybrid molecules in which one or two units of the SPKK tetrapeptide are connected via a Glycyl linker to an anilino-aminoAcridine derivative (GA) structurally related to the antileukemic drug amsacrine (10). Such conjugates typify the concept of ligands having mixed binding functions (11). Studies of the strength and mode of binding of the (SPKK)<sub>2</sub>GA hybrid ligand to DNA are consistent with a model in which the octapeptide resides in the minor groove and the acridine nucleus occupies an intercalation site. However, it remains plausible that the presence of a basic peptide bearing as many as five free amino groups is itself sufficient to favour external grafting with respect to minor groove insertion, just as observed with polyamines (12).

The questions which we wish to address here are: (i) is the peptide-acridine hybrid ligand able to recognize selectively AT sequences as does the peptide alone? (ii) does the acridine chromophore modulate the DNA recognition properties of the basic peptide? For that purpose, three complementary DNA footprinting methodologies, using DNAase I, hydroxyl radicals and osmium tetroxide as DNA sequencing agents have been applied.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and Biochemicals.** The synthesis of the (SPKK)<sub>2</sub>GA hybrid ligand was recently reported (10). Electrophoretic reagents were from BDH. DNAase I (Sigma Chemical Co.) stored in 20 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 8.0, was freshly diluted to the desired concentration prior to use. The *tyr T* DNA fragment, cleaved with restriction endonucleases *AvaI* and *EcoRI* (New England Biolabs) to yield 5'-overhanging ends, was obtained from plasmid pKMΔ-98 containing the tyrosine tRNA promoter (13) and was 3'-labelled using [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP for the Watson strand and [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (6000Ci/mmol, New England Nuclear) for the Crick strand in the presence of reverse transcriptase (Pharmacia) by standard procedures (14,15). The singly end-labelled 160 base pairs *tyr T* DNA fragment was purified by electrophoresis on a 6% non-denaturing polyacrylamide gel prior to being resuspended in 10 mM Tris, 10mM NaCl buffer pH 7.0.

**Deoxyribonuclease I digestion.** DNAase I footprinting experiments were performed essentially according to published protocols (14,15). Partial digestions of DNA were performed at 37°C with aliquots removed from the digestion mixture 1 and 5 minutes after the addition of the nuclease. The DNAase I concentration was carefully adjusted so that only a small fraction of the total DNA molecules was cleaved ("single-hit" kinetic conditions).

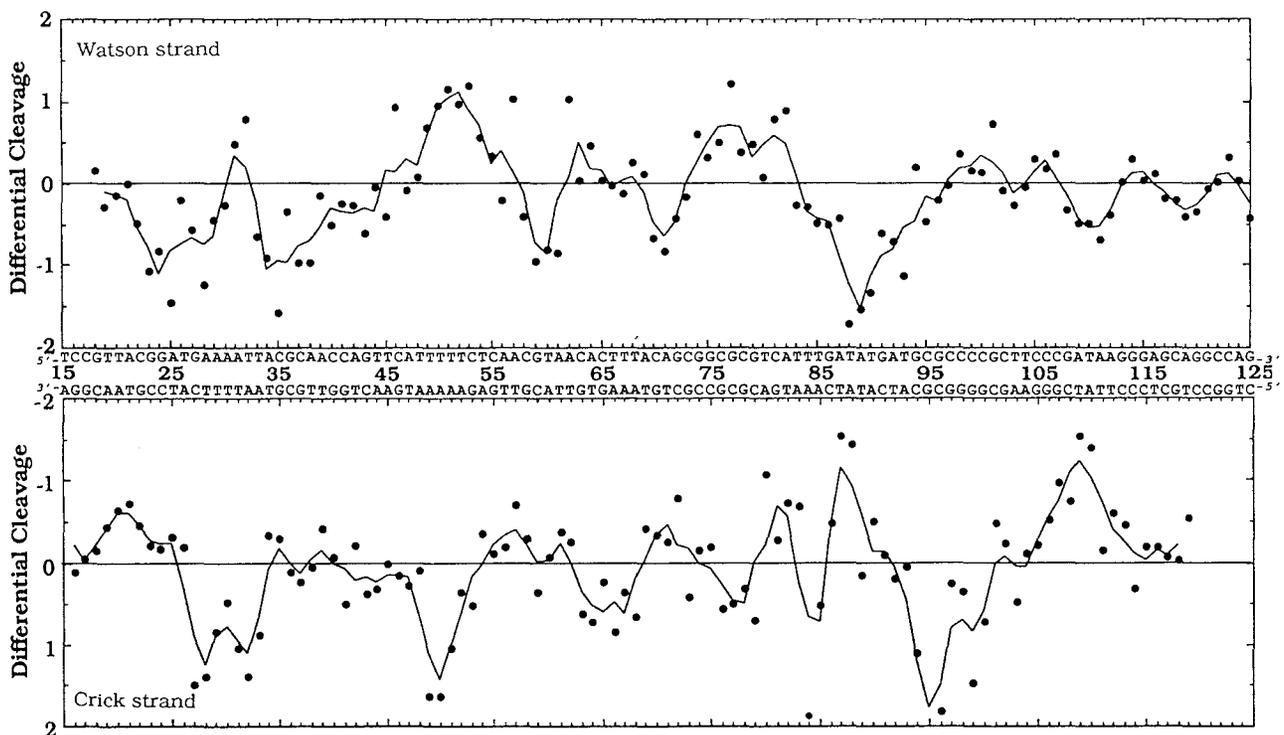
**Hydroxyl radical footprinting.** Hydroxyl radicals were generated by the reduction of hydrogen peroxide by iron(II)-EDTA complexes in the presence of ascorbic acid. The experimental procedure strictly followed a described protocol (16) without modification.

**Osmium tetroxide-pyridine modification.** DNA was modified by OsO<sub>4</sub> in the presence of pyridine following a standard procedure (17). Oxidized DNA samples were subsequently treated with 1M piperidine at 90°C for 15 min to cause cleavage at adduct sites, and then electrophoresed.

**Electrophoresis and densitometry.** Products of cleavage reactions were taken up in dye-containing formamide loading buffer, boiled for 3 min and then chilled in an ice-bath just before being loaded on a sequencing gel. Electrophoreses were carried out on 8% polyacrylamide gels with 7M urea in TBE buffer. Gels were fixed in 10% acetic acid, dried at 80°C and then exposed to Kodak X-OMAT films at -70°C in the presence of intensifying screens. Autoradiograms were scanned using a computer-operated videodensitometer. Band intensities were quantitated by integration of densitometer tracings of autoradiograms in regions where peaks were sufficiently resolved to permit accurate integration. Quantitative analysis of the gel electrophoresis profiles was performed by integration of the area under each peak using a specific computer program (18).

## RESULTS

**DNAase I footprinting** experiments were conducted with the *Escherichia coli tyr T* promoter DNA  $^{32}\text{P}$ -labelled on either the top (Watson) strand or the bottom (Crick) strand. Intensities from selected gel lanes on the autoradiograms were converted to numerical probabilities of cleavage. The differential cleavage plot in Figure 1 indicates that the main protected region is consistently found on the Watson strand of the duplex around position 87 and extends over 10 or more base pairs. Closer inspection of the plot reveals the presence of several other weaker binding sites, often of AT-rich character. Rates of DNAase I attack are reasonably well correlated between the two strands of the double helix. However, the mixed AT/GC sequence around position 40 on the Watson strand appears protected from DNAase I cleavage by the drug while the complementary sequence on the Crick strand is not noticeably protected. The rate of cleavage of certain bonds is enhanced in the presence of the drug relative to the control. This is especially noticeable around positions 50 and 77 of the Watson strand, and 30, 50 and 97 on the Crick strand, i.e. at runs of As and Ts as well as at pure GC sequences. These DNAase I cleavage enhancements likely occur as a result of conformational changes induced in the DNA by binding of the drug to neighbouring sites. Indeed,

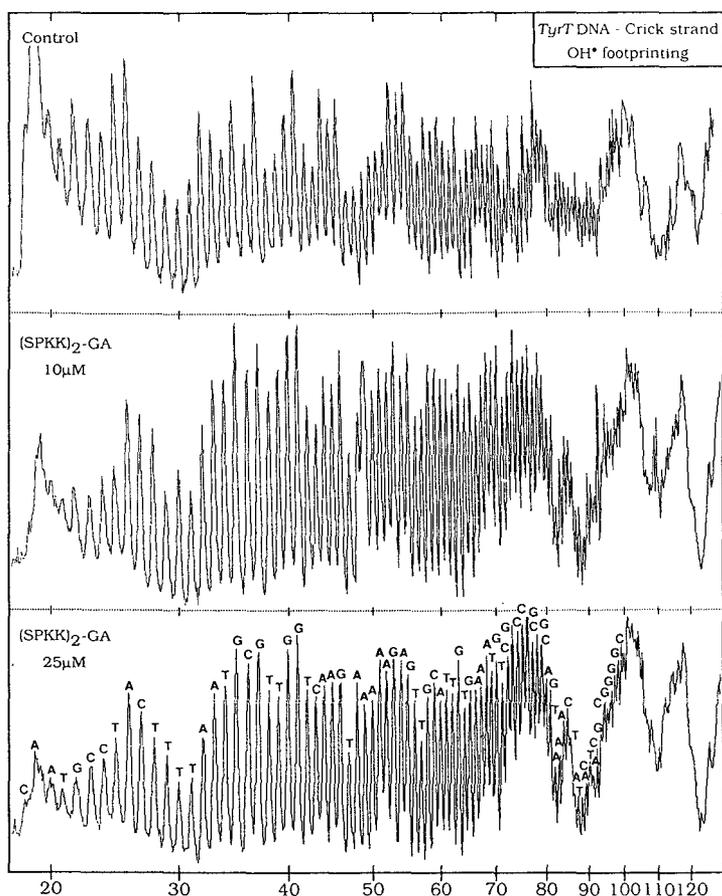


**Figure 1. DNAase I footprinting.**

Differential cleavage plots showing the susceptibility of the *tyrT* DNA fragment to DNAase I in the presence of  $2\mu\text{M}$   $(\text{SPKK})_2\text{GA}$ . The upper panel shows differential cleavage of the upper "Watson" strand, the lower of the complementary "Crick" strand. 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, given closely similar extents of overall digestion. Note that for clarity the ordinate scales for the two strands are inverted, so that the deviation of the points towards the lettered sequence corresponds to a ligand-protected site (negative values) and deviation away represents enhanced cleavage (positive values). Differential cleavage intensities are displayed on a logarithmic scale for the sake of convenience. The line represents the 3-bond running average of individual data points.

binding of groove binder-intercalator hybrid molecules introduces particular constraints in the DNA duplex structure as a result of their bipartite mode of binding (11). The possibility that local structural factors affect the interaction of the hybrid with its binding sequences cannot be ignored. Consequently, interpretation of the DNAase I footprinting in terms of sequence specific recognition (as usually done) may be biased by concomitant DNA structural changes. Therefore, another approach was adopted.

**Hydroxyl radical footprinting.** Figure 2 shows densitometric scans of an autoradiogram obtained after partial digestion of the Crick strand labelled *tyr T* fragment complexed with the hybrid ligand. This method is much less sensitive to variations in DNA structure than DNAase I footprinting. Indeed, the cleavage of the naked DNA is much more even than with the nuclease. However, DNA cleavage is slightly reduced in the T- and A-tract regions around position 30 and 50, respectively. The hybrid ligand had to be added at 5- to 15-fold higher concentration than used in DNAase I experiments to produce areas of DNA cleavage inhibition. The large protected region between positions 82 and 93 found using DNAase I is much better resolved with hydroxyl radicals and is evidently composed of two distinct juxtaposed binding domains. Another region of attenuated



**Figure 2. Densitometric scans of Fe(II)-EDTA footprints.**

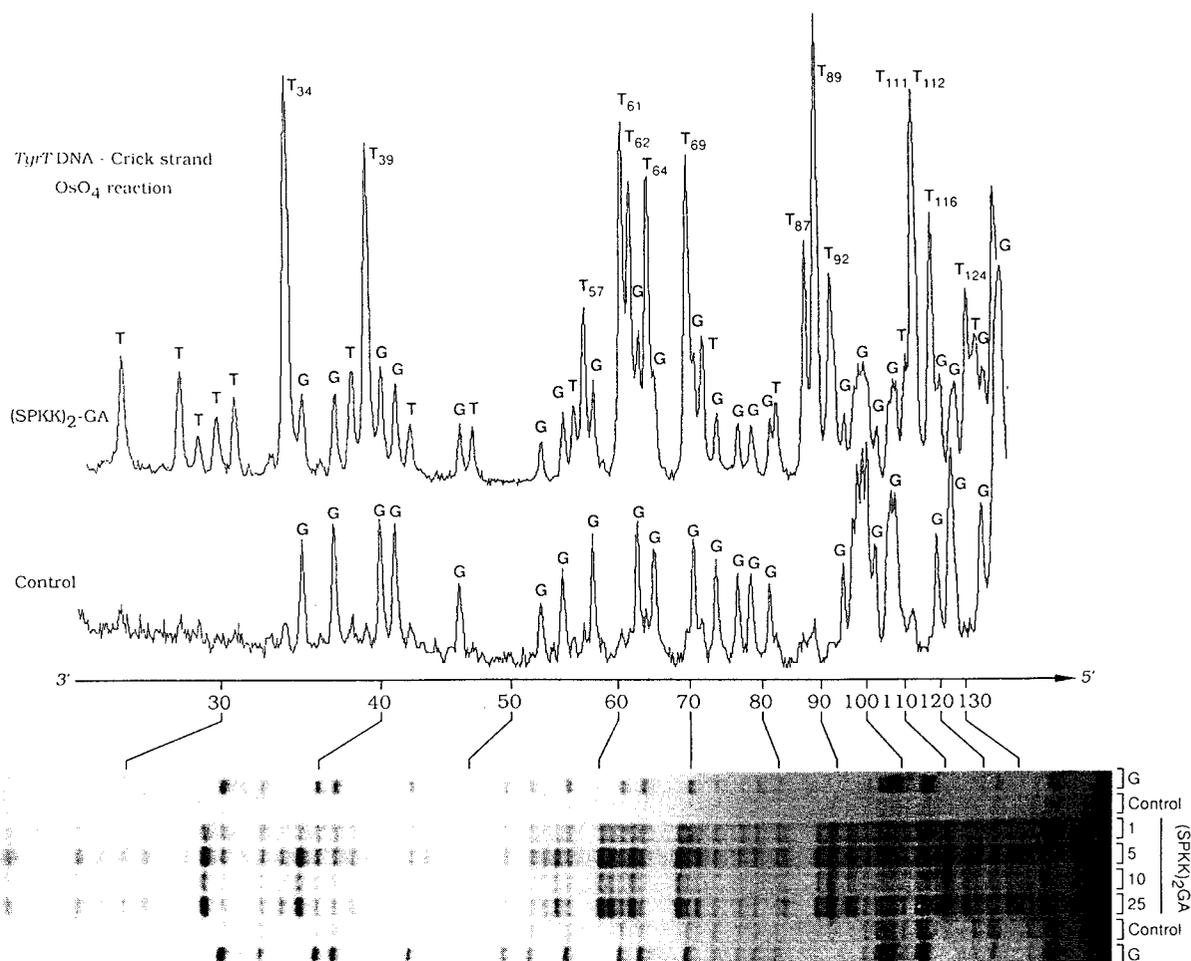
DNA cleavage by hydroxyl radicals was performed in the absence of ligand (control) or in the presence of different concentrations of the ligand as indicated. Numbers at the bottom of the figure indicate nucleotide positions for the *tyr T* DNA fragment according to Figure 1.

cleavage is seen around position 20. All three binding sites detected by both DNAase I and hydroxyl radicals at positions 20, 82 and 88 correspond to AT-rich sequences flanked by GC bases. Neither the oligo-T (positions 28-31) nor the oligo-A (positions 48-52) stretches are protected by the drug. These two homooligomeric runs were revealed by the same technique to be preferential binding sites for the octapeptide SPRKSPRK (7) and netropsin (16). Such oligo(dA):(dT) tracts have a narrow minor groove (19) which constitutes a geometrically ideal pocket for minor groove binding agents but to which the peptide-acridine hybrid molecule surprisingly fails to bind. The different behaviour of the unsubstituted peptide and the conjugate necessarily reflects the influence of the acridine chromophore whose binding is perhaps not sequence neutral, although footprinting experiments with the Glycyl anilino-Acridine intercalating moiety alone (GA) were unsuccessful. The three other ligand binding sites detected around positions 58, 70 and 110 with DNAase I are not revealed with hydroxyl radicals. However, the information obtained from the chemical footprinting method is in broad terms reminiscent of that obtained with the enzymic method and tends to suggest that the interaction of the conjugate with DNA requires an AT domain, presumably for binding of its peptide moiety, proximal to GC sites, very likely required for the chromophore to intercalate. The most GC-rich sequences in the *tyr T* fragment around positions 75 and 100 are cleaved most efficiently in the presence of the drug by both DNAase I and hydroxyl radicals. These GC-rich sequences are good candidates for binding of intercalating agents (20,21) and anilino-acridine derivatives in particular (22). We may thus postulate that the GC-avoidance is primarily driven by the peptide moiety which dictates binding to AT sites. Similar behaviour was observed previously with netropsin-acridine hybrid ligands which recognize exclusively AT sites (23,24).

**Fine mapping with osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>).** A typical autoradiograph showing the OsO<sub>4</sub> reactivity of the thymines in the Crick strand of the *tyr T* fragment is presented in Figure 3. The corresponding densitometric scans emphasize the differences in reactivity of the DNA fragment in the absence and presence of increasing concentrations of the conjugate. With DNA alone, OsO<sub>4</sub> reactions are restricted to G residues which exhibit similar, relatively low reactivity as a result of treatment with hot piperidine. When (SPKK)<sub>2</sub>GA-DNA complexes are subjected to pyridine/OsO<sub>4</sub>-piperidine treatment every G residue is cleaved as with the control and in addition the susceptibility of thymines to attack by OsO<sub>4</sub> is significantly increased. Only a limited number of T residues exhibit enhanced sensitivity while the other Ts are weakly cleaved like the Gs. At first sight, thymidines that exhibit the most acute sensitivity to OsO<sub>4</sub> in the presence of the conjugate are ones that are flanked by a G on the 5' side while Ts flanked by a G on the 3' side remain feebly reactive. Indeed, the 3'-TG dinucleotides at positions 34-35, 39-40, 57-58, 62-63, 64-65, 69-70 and 116-117 are major OsO<sub>4</sub> hypersensitive sites. In contrast the 3'-GT dinucleotides at positions 37-38, 41-42, 46-47, 55-56, 70-71, and 81-82 are not particularly reactive. Within the two juxtaposed binding sites the two Ts of the TATA box (positions 87 and 89) are strongly reactive while the T at position 82 (Crick strand) and Ts at positions 83-85 (Watson strand, not shown) display unaltered reactivity.

## DISCUSSION

DNAase I footprinting reveals that the site most favoured for binding of (SPKK)<sub>2</sub>GA encompasses the Pribnow box of the *tyr T* promoter sequence 5'-TATGATG at position 87-94.



### Figure 3. OsO<sub>4</sub> modification.

Piperidine-induced specific strand cleavage at pyridine-OsO<sub>4</sub> modified bases in the *tyr T* DNA fragment labelled at the 3'-end of the Crick strand, in the absence (control lanes) and presence of increasing concentrations of (SPKK)<sub>2</sub>GA. The concentration (μM) of the drug is shown at the top of the appropriate gel lanes. The track labelled G represents a dimethylsulphate-piperidine marker specific for guanine. Numbers at the side of the gel refer to nucleotide position in the sequence of the *tyr T* fragment indicated in Figure 1.

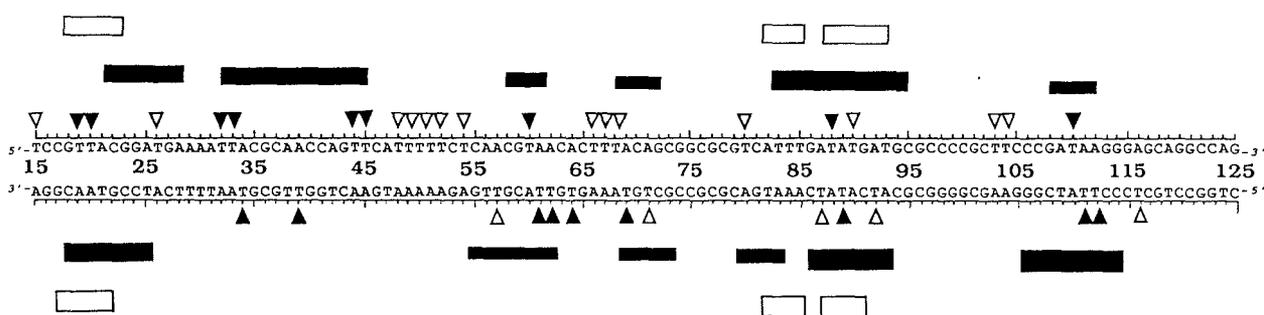
Hydroxyl radicals yield higher resolution footprints, allowing the identification of two individual closely spaced drug binding sites each of which encompasses 4-5 base pairs as expected for such a hybrid ligand. DNAase I allows the detection of several additional weak footprints probably corresponding to low-affinity drug binding sites that are not detected with Fe-EDTA as a probe. However, the nuclease does not permit the use of drug concentrations higher than 2 μM due to immediate precipitation of the drug-DNA-enzyme complex. This adverse effect is hardly surprising since the drug bears five positively charged amino groups free to bridge DNA-phosphate groups and carboxyl-bearing amino acids of the enzyme via electrostatic contacts.

It has frequently been noted in earlier footprinting experiments, especially with intercalating agents (15,20-22), that drugs can render certain sequences (in particular runs of As and Ts) more sensitive to cleavage by DNAase I. The nuclease hypersensitivity phenomenon was explained by invoking the theory that the drug opens up the DNA minor groove so that DNA sequences which are normally

refractory to nuclease attack are rendered more susceptible. The hydroxyl radical method also suggests that the conformation of the DNA is altered at some sites and thus buttresses the idea that the drug indeed opens up the minor groove, making it more A-DNA like. Furthermore, experiments with  $\text{OsO}_4$  tend to confirm the ability of the ligand to alter DNA structure in a sequence-dependent manner. However, it is wise to exercise caution in interpreting the cleavage enhancement phenomenon since the footprinting technique cannot by itself establish the nature of the structural variations.

To sum up the data, DNAase I and hydroxyl radical footprinting concur in revealing that the ligand prefers AT sequences over GC regions for binding. These results indirectly lend weight to a postulated model in which the  $\beta$ -turn structured basic peptide is accommodated in the minor groove in forming three hydrogen bonds to AT base pairs. However, both enzymic and chemical footprinting methods clearly reveal that the peptide-acridine hybrid ligand avoids binding to oligoA or T stretches and prefers binding to alternating AT sequences flanked by GC residues. Therefore, the situation reported here with  $(\text{SPKK})_2\text{GA}$  is slightly different from that observed with the peptide alone. Binding of the octapeptide SPRKSPRK (7) requires a definite minor groove architecture found notably at the 3' end of an  $(\text{A})_n:(\text{T})_n$  tract, the point at which the minor groove is narrowest (19). The peptide-acridine hybrid contrasts with the related basic peptide in being more tolerant to GC base pairs, particularly at the ends of its binding sites. This most likely reflects the presence of the amsacrine-like chromophore, believed to exhibit a slight preference for GC rich sequences over AT (22,25).

Double stranded B-DNA is poorly affected by  $\text{OsO}_4$  due to the stacking of the bases which partially shields the susceptible 5,6 double bond of thymines. As a consequence, enhancement of  $\text{OsO}_4$  reactivity directly reflects induction of conformational alterations in DNA and disruption of base stacking in particular. Figure 4 compares the pattern of  $\text{OsO}_4$  hyperreactivity with the binding sites inferred from DNAase I and hydroxyl radical footprinting. Hyperreactive thymidines are frequently located within or adjacent to drug binding sites. Strongly hyperreactive thymidines are found around position 88 corresponding to the preferential drug binding site. At this position there apparently exists a nice correlation between negative footprint (i.e. the suppression of bands caused



**Figure 4. Summary of footprinting results.**

Comparison of binding sites determined by digestion of the substrate *tyr T* DNA fragment with DNAase I (filled bars), Fe(II)/EDTA-generated hydroxyl radicals (open bars) and sites of reactivity towards osmium tetroxide. The thickness of the bars corresponds to the relative amount of protection. Filled and open triangles denote strong and weak  $\text{OsO}_4$  hypersensitive thymines, respectively. Data are compiled from quantitative analysis of several sequencing gels and must be considered as a set of averaged values.

by DNAase I and hydroxyl radicals) and positive footprint (i.e. appearance of a band due to OsO<sub>4</sub> reaction). The T stretch from positions 28 to 31, which is not identified as being a possible site of binding but is flanked by two binding sites, remains insensitive to OsO<sub>4</sub>. It may be that the drug can induce local changes in the DNA conformation around its binding sites but that these alterations do not propagate along the T tract. Or, perhaps, the conformation of the sequence is changed to yield an OsO<sub>4</sub> unreactive structure.

The 5,6 double bond of thymine in B-DNA is located in the major groove of the double helix. Thus, the drug probably binds through the minor groove, leaving the opposite major groove free for access to the probe. The fact that the reactivity of the DNA toward dimethylsulfate and methylene blue is unchanged in the presence of the drug further supports this view. Binding of the ligand would be expected to cause significant unwinding of the helix. Thus, the accessibility of thymines is probably further facilitated by a widening of the major groove resulting from intercalation of the acridine chromophore. In conclusion, the (SPKK)<sub>2</sub>GA hybrid ligand seems to bind preferentially to AT sequences but subject to interesting restrictions on the nature of the recognized sequences imposed by its aromatic chromophore moiety.

**Acknowledgments:** This work was supported by grants (to J-P. H.) from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Association pour la Recherche sur le Cancer; (to M.J. W.) from the Cancer Research Campaign, the Medical Research Council and the Royal Society. F.B. is indebted to the "Ligue Nationale Contre le Cancer" for a research fellowship.

## REFERENCES

1. Zimmer, C., and Wähnert, U. (1986) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 47, 31-112.
2. Churchill, M.E.A., and Travers, A.A. (1991) *Trends. Biochem. Sci.* 16, 92-97.
3. Käs, E., Izaurralde, E., and Laemmli, U.K. (1989) *J. Mol. Biol.* 210, 587-599.
4. Izaurralde, E., Käs, E., and Laemmli, U.K. (1989) *J. Mol. Biol.* 210, 573-585.
5. Laybourn, P.J., and Kadonaga, J.T. (1991) *Science* 254, 238-245.
6. Suzuki, M. (1989) *EMBO J.* 8, 797-804.
7. Churchill, M.E.A., and Suzuki, M. (1989) *EMBO J.* 8, 4189-4195.
8. Oikarinen, J. (1991) *FEBS Lett.* 294, 6-10.
9. Suzuki, M. (1989) *J. Mol. Biol.* 207, 61-84.
10. Bailly, F., Bailly, C., Helbecque, N., Pommery, N., Colson, P., Houssier, C., and Hénichart, J.P. (1991) *Anti-Cancer Drug Des.* 7, 81-98.
11. Bailly, C., and Hénichart, J.P. (1991) *Bioconjugate Chem.* 2, 379-393.
12. Tabor, C.W., and Tabor, H. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53, 749-790.
13. Lamond, A.I., and Travers, A.A. (1983) *Nature* 305, 248-250.
14. Drew, H.R., and Travers, A.A. (1984) *Cell* 37, 491-502.
15. Low, C.M.L., Drew, H.R., and Waring, M.J. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 4865-4877.
16. Portugal, J., and Waring, M.J. (1987) *FEBS Lett.* 225, 195-200.
17. McLean, M.J., and Waring, M.J. (1988) *J. Mol. Recognit.* 1, 138-158.
18. Smith, J.M., and Thomas, D.J. (1990) *CABIOS* 6, 93-99.
19. Nelson, H.C.M., Finch, J.T., Luisi, B.F., and Klug, A. (1987) *Nature* 330, 221-226.
20. Bailly, C., OhUigin, C., Rivalle, C., Bisagni, E., Hénichart, J.P., and Waring, M.J. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 6283-6291.
21. Fox, K.R., and Waring, M.J. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 491-507.
22. Bailly, C., Denny, W.A., Mellor, L.E., Wakelin, L.P.G., and Waring, M.J. (1992) *Biochemistry in press.*
23. Bailly, C., Helbecque, N., Hénichart, J.P., Colson, P., Houssier, C., Rao, K.E., and Lown, J.W. (1990) *J. Mol. Recognit.* 3, 26-35.
24. Eliadis, A., Phillips, D.R., Reiss, J.A., and Skorobogaty, A. (1988) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1049-1052.
25. Feigon, J., Denny, W.A., Leupin, W., and Kearns, D.R. (1984) *J. Med. Chem.* 27, 450-465.

## Abstract

Amsacrine is a powerful antileukemic drug which binds to DNA by an intercalative process.

The tetrapeptide SPKK (Seryl-Prolyl-Lysyl-Lysine), a nucleic acid-binding unit, is able to fit snugly into the minor groove of AT-rich DNA sequences like the antibiotic netropsin.

Two serie of hybrid molecules in which one or two units of the SPKK motif are connected via linkers to either an anilinoacridine chromophore (related to amsacrine) or amsacrine itself, have been elaborated. Their DNA-binding parameters (mode of interaction, DNA-binding affinity and sequence selectivity) have been determined by extensive physicochemical and biochemical techniques (UV absorption spectroscopy, fluorescence, viscometry, linear and circular dichroisms, footprinting...).

The *in vitro* biological activities of the molecules against a murine leukemic cell line are reported as well as their redox properties.

This research has clearly shown the AT selectivity of the conjugates and the crucial role of the acridine chromophore in conferring antitumor activity.





## RESUME

L'amsacrine est un médicament antileucémique synthétique puissant qui interagit avec l'ADN par un processus d'intercalation.

Le motif peptidique SPKK (Ser-Pro-Lys-Lys) est un fragment de l'histone H1 susceptible de se fixer sélectivement dans le petit sillon de l'ADN à la manière de la nétropsine, antibiotique naturel antitumoral et antiviral.

Deux séries hybrides répondant au concept "ligand du petit sillon-intercalant" ont été élaborées en associant à l'amsacrine ou à l'une de ses structures chimiques dérivées un puis deux motifs SPKK. Le mode de liaison à l'ADN de ces molécules hybrides a été clairement défini par la convergence de nombreuses techniques physicochimiques (spectroscopie d'absorption UV; fluorescence; dichroïsmes circulaire et linéaire; viscosimétrie) et biochimiques (footprinting). Par ailleurs leurs propriétés d'oxydation ont été étudiées (spectroscopie d'absorption UV; chimioluminescence).

L'activité biologique de ces modèles hybrides a aussi été appréhendée *in vitro*, comparativement à celle du composé témoin amsacrine.

### MOTS CLES :

NETROPSINE	MOTIF SPKK	FIXATION DANS LE PETIT SILLON
AMSACRINE	INTERCALATION	LIAISON A L'ADN
PENETRATION CELLULAIRE		ACTIVITE BIOLOGIQUE