

gen 20000759

50376
1996
308

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

N° d'ordre : 1854

année 1996

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

présentée à l'Université de Lille I
Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE ET MACROMOLECULAIRE

par

Sylvain ROUTIER



***SYNTHESES, PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET
BIOLOGIQUES DE COMPLEXES DE SALENES
FONCTIONNALISES.***

Soutenu le 2 décembre 1996 devant la commission d'examen

JURY:

Président: Mr A. LABLACHE-COMBIER.

Rapporteurs: Mr B. MEUNIER.
Mr. P. COLSON.

Examineurs: Mr. C. BAILLY.
Mr. J. L. BERNIER.
Mr. J.P. CATTEAU.
Mr. G. NOWOGROCKI.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Chimie Organique Physique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, dirigé par Monsieur le Professeur Alain Lablache-Combiér, Directeur de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Lille. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur le Professeur Jean-Luc Bernier, qui a dirigé ce travail. Il m'a soutenu, guidé et toujours écouté avec une attention et une disponibilité dont je lui sais gré.

Je suis très honoré de la présence de Monsieur Bernard Meunier, Directeur de Recherches au C.N.R.S. au Laboratoire de Chimie de Coordination du C.N.R.S. de Toulouse, ainsi que de celle de Monsieur le Professeur Pierre Colson, de l'Université de Liège. Celui-ci a participé à ce travail en réalisant les expériences de dichroïsme linéaire électrique et de dichroïsme circulaire. Je leur suis reconnaissant d'avoir bien voulu juger ce travail.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le Professeur Jean-Pierre Catteau, pour avoir facilité grandement mon travail et m'avoir guidé dans les caractérisations physico-chimiques. Il est toujours disponible et m'a soutenu moralement dans les tracasseries quotidiennes.

A Monsieur Christian Bailly, Chargé de Recherches INSERM à l'Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, j'adresse mes respectueux remerciements pour toutes les études biochimiques qu'il a réalisées, pour sa disponibilité et pour avoir essayé de m'initier avec patience à toutes ces techniques étrangères pour un chimiste.

Je remercie Monsieur le Professeur Guy Nowogrocki, de l'Université d'Amiens, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et de siéger dans ce jury.

Je tiens à remercier le Docteur Jean François RIOU qui a réalisé dans les laboratoires de Rhône Poulenc-Rorer les tests d'inhibition enzymatique et de cytotoxicité.

Enfin, je voudrais également remercier mes collègues du laboratoire pour les bons moments passés avec eux au cours de cette période.

A ma mère,
mon père,
mon frère.

A Sylvie.

SOMMAIRE

	pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - L'ADN ET LES NUCLEASES CHIMIQUES	5
I.1. L'ADN.	6
I.2. Les nucléases.	8
I.2.1. Les nucléases issues de produits naturels.	9
I.2.1.1. Les bléomycines.	9
I.2.1.2. Les porphyrines.	11
I.2.1.3. Les tripeptides.	13
I.2.2. Les nucléases synthétiques.	14
I.2.2.1. L'acide éthylène diamine tétraacétique ou EDTA.	14
I.2.2.2. La phénanthroline et ses dérivés.	15
I.2.2.3. Les salènes.	16
I.2.3. Les sites et mécanismes de coupure de l'ADN.	18
I.2.4. Conclusion.	21
CHAPITRE II - LES SALENES.	23
II.1. Synthèse d'un salène fonctionnalisé.	24
II.1.1. Méthode.	24
II.1.2. Synthèse des salènes.	25
II.1.2.1. Synthèse du (S)-6-(<i>ter</i> butyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane <u>5</u> .	25
II.1.2.2. Obtention des salènes déprotégés, complexés par du cuivre (II) <u>9</u> et du nickel (II) <u>10</u> .	28
II.1.2.3. Synthèse du salène déprotégé complexé par le manganèse (III) <u>13</u> .	30

II.2. Résonance paramagnétique électronique R.P.E. : étude des complexes.	38
II.2.1. Principe.	38
II.2.2. Etude R.P.E. des salènes complexés par le cuivre <u>6</u> et <u>9</u>.	38
II.2.3. Etude R.P.E. du salène complexé par le manganèse <u>12</u>.	42
II.2.3.1. Le manganèse de degré d'oxydation (II).	42
II.2.3.2. Le manganèse de degré d'oxydation (III).	44
II.2.3.3. Le manganèse de degré d'oxydation (IV).	44
II.2.3.4. Résultats obtenus avec le salène complexé par le manganèse <u>12</u> .	44
II.2.4. Production de radicaux libres.	46
II.2.4.1. Méthode.	46
II.2.4.2. Résultats obtenus avec le salène complexé par le cuivre (II) <u>9</u> .	48
II.3. Spectroscopie U.V.-Visible des salènes.	49
II.3.1. Détermination du pKa du ligand <u>8</u>.	49
II.3.1.1. Spectres U.V. du ligand <u>8</u> .	49
II.3.1.2. Application de la méthode HENDERSON-HASSELBACH.	50
II.3.2. Etude U.V. de la complexation.	52
II.3.3. Etude de la complexation selon la méthode de JOB.	54
II.3.3.1. Cas des solutions isomolaires.	54
II.3.3.2. Cas des solutions non isomolaires.	60
II.3.4. Conclusion.	65
II.4. Voltamétrie cyclique des complexes de salène.	67
II.4.1. Principe et méthode.	67
II.4.2. Résultats obtenus avec les salènes complexés au cuivre (II) <u>6</u> et <u>9</u>.	70
II.4.3. Résultats obtenus avec les salènes complexés par le nickel (II) <u>7</u> et <u>10</u>.	75
II.4.4. Résultats obtenus avec le salène complexé par le manganèse (III) <u>12</u>.	80
II.4.5. Conclusion.	83

II.5. Etude de l'activité nucléase des salènes.	85
II.5.1. Liaison à l'ADN.	85
II.5.1.1. Spectroscopie d'absorption (U.V.-Visible).	85
II.5.1.2. Viscosimétrie.	88
II.5.1.3. Dichroïsme circulaire CD.	89
II.5.1.4. Dichroïsme linéaire électrique DLE.	95
II.5.1.5. Expériences de « footprinting ».	99
II.5.1.6. Conclusion sur la liaison à l'ADN.	103
II.5.2. La coupure d'ADN.	105
II.5.2.1. La coupure de plasmide.	105
II.5.2.2. Coupure de fragments de longueurs définies marqués au ³² P.	107
II.5.2.3. Coupure d'oligonucléotide possédant une boucle mono brin.	109
II.5.2.6. Conclusion sur les coupures d'ADN.	112
CHAPITRE III - ASSOCIATION DES SALENES AVEC DES INTERCALANTS.	114
III.1. ASSOCIATION AVEC LES ANTHRAQUINONES.	115
III.1.1. Généralités.	115
III.1.1.1. Liaison à l'ADN des anthraquinones.	116
III.1.1.2. Production de radicaux libres.	116
III.1.1.3. Autres actions des dérivés anthraquinoniques.	118
III.1.2. Molécules synthétisées.	119
III.1.3. Synthèse des synthons anthraquinoniques.	122
III.1.4. Synthèse des hybrides anthraquinone-salène complexé.	125
III.1.5. Etude de l'activité nucléase des hybrides anthraquinone-salène	128
III.1.5.1. Liaison à l'ADN.	128
III.1.5.2. Activité nucléasique des hybrides anthraquinone-salène complexé.	132
III.1.5.3. Mise en évidence de la production de radicaux libres oxygénés par la technique de « spin-trapping ».	134
III.1.5.4. Effets sur les topoisomérases in vitro.	136
III.1.5.5. Activité cytotoxique.	137
III.1.6. Conclusion.	139

III.2. Association avec l'ellipticine.	140
III.2.1. Liaison avec l'ADN.	141
III.2.2. Autres propriétés.	141
III.2.3. Présentation de la molécule hybride.	142
III.2.4. Méthode et synthèse.	143
III.3. Etude de l'activité nucléase des hybrides ellipticine-salène.	146
III.3.1. Liaison à l'ADN.	146
III.3.1.1. Spectroscopie d'absorption (U.V.-Visible).	146
III.3.1.2. Expériences de « footprinting ».	147
III.3.1.3. Conclusion sur la liaison de <u>45</u> avec l'ADN.	149
III.3.2. La coupure d'ADN.	149
III.3.2.1. La coupure de plasmide.	149
III.3.2.2. Coupure de fragments de longueurs définies marqués au ³² P.	150
III.3.2.3. Coupures de fragments de 4 ou 5 kb.	151
III.3.3. Conclusion.	151
CONCLUSION.	152
PARTIE EXPERIMENTALE.	155
BIBLIOGRAPHIE.	191
PUBLICATIONS.	205

INTRODUCTION

Durant ces dernières années, il y a eu une explosion dans la recherche et l'évaluation d'agents naturels capables d'interagir avec l'ADN et de le couper, ainsi que dans la conception et la synthèse de composés modèles pouvant reconnaître sélectivement et couper l'ADN. L'utilité de tels composés est énorme. Elle s'étend de la création d'enzymes de restriction artificielles à l'usage de la biologie moléculaire, au développement de nouveaux médicaments pouvant être utilisés en chimiothérapie du cancer.

En ce qui concerne la biologie moléculaire, ces agents naturels ou synthétiques sont des outils remarquables pour comprendre les mécanismes complexes qui gèrent la division cellulaire, la croissance cellulaire, le stockage, la transmission et l'expression de l'information génétique. Ils peuvent servir par exemple à découper l'ADN et identifier les gènes, à initier des synthèses de protéines ou à définir les différentes formes de liaisons à la double hélice.

En ce qui concerne l'activité thérapeutique, les composés interagissant avec les acides nucléiques représentent de loin la plus large classe d'agents antitumoraux¹. Ces médicaments sont usuellement classés en quatre catégories (tableau 1, page 4):

- les agents alkylants.
- les agents intercalants.
- les agents se liant au petit sillon.
- les nucléases (agents de coupure).

Pour tous ces produits, l'ADN constitue la cible intracellulaire majeure car la cellule cancéreuse se caractérise avant tout par une prolifération non contrôlée. Les nucléases sont une famille importante car dans les agents appartenant aux autres familles de cette classification (intercalants et autres), on trouve des molécules capables également de couper l'ADN. Elles peuvent donc être considérées comme nucléases.

La relation entre structure et activité, dans ces séries, n'est pas encore bien définie. Bien que chaque classe de composés renferme des propriétés de liaison à l'ADN similaires, les propriétés biologiques peuvent varier énormément. Par exemple, certains intercalants sont des anticancéreux puissants (daunomycine, actinomycine, amsacrine). D'autres sont des antiparasitaires (lucanthone, pyronaridine), des antiviraux (tilorone) ou des antimicrobiens (éthidium)². D'autres intercalants sont au contraire carcinogènes (9-amino-acridine) et ne

présentent pas d'activité antitumorale. Dans les différentes familles de médicaments antitumoraux, certains se lient avec une certaine sélectivité à l'ADN³⁻⁷. Cette sélectivité de liaison serait l'un des facteurs importants de l'activité antitumorale de ces produits. D'autres médicaments possèdent des propriétés de nucléase. Ce sont des dérivés capables de se lier à l'ADN et d'induire des coupures sur les acides nucléiques au niveau des fonctions phosphodiester. Cette propriété de coupure pourrait également être partie prenante dans leur activité antitumorale. Ces propriétés sont-elles nécessaires et suffisantes?

Afin de pouvoir apporter quelques éclaircissements à ce sujet, nous avons réalisé des nucléases synthétiques nouvelles et cherché à relier leur éventuelle activité biologique à leur pouvoir de fixation (spécifique ou non) sur l'ADN, et à leur capacité à couper l'ADN (de manière sélective ou non).

Nous présenterons notre travail de la manière suivante: après avoir rappelé les principales caractéristiques de l'ADN et la structure de quelques nucléases naturelles ou chimiques déjà existantes, nous relaterons la synthèse de nouvelles nucléases sur la base du salène [N¹, N²-bis(salicylidène)-éthylènediamine] (figure 1) que nous avons fonctionnalisé puis complexé par des métaux de transition. L'étude des propriétés physico-chimiques et biologiques des complexes de ce salène sera rapportée.

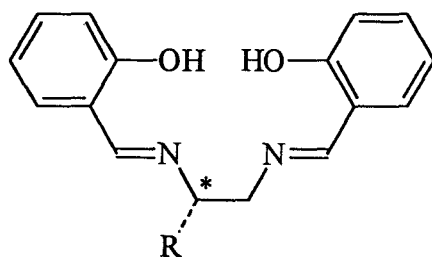


Figure 1 : structure du ligand salène complexant les métaux de transition. R représente un bras espaceur avec un groupe fonctionnel.

Puis, la synthèse de molécules hybrides sera abordée. Il s'agit de molécules comportant le salène relié par un bras espaceur à des synthons. Ces synthons issus d'agents antitumoraux se lient de façon spécifique à l'ADN par intercalation. Les différentes propriétés biologiques de molécules hybrides seront étudiées et comparées à celles des salènes seuls.

Agents alkylants**moutardes à l'azote**

méchloréthamine
chlorambucile
melphalan
cyclophosphamide
ifosfamide

nitrosourées

carmustine
lomustine

aziridines

thiotépa
triéthylènemélatine
trénimon

alkylsulfonates

busulfan

époxydes

dianhydrogalacticol
dibromodulcitol

analogues du platine

cisplatine
carboplatine

autres

procarbazine
dacarbazine
mitomycines

Agents intercalants**anthracyclines**

daunomycine
doxorubicine
épirubicine
idarubicine

anthraquinones et dérivés

mitoxantrone
piroxantrone
merbarone
oxanthrazole

acridines

amsacrine
nitracrine
DACA

autres

actinomycine D
amonafide, mitonafide
elliptinium

Agents coupant l'ADN

antibiotique bléomycine
bléomycine A2
phléomycine
tallysomyne

Agents se liant au petit sillon

mitramycine
adozelosine

Autres

cristanol
dynémicine
misonidazole
dérivés de la camptothécine

Tableau 1 : principales séries d'agents antitumoraux agissant sur l'ADN, utilisés en clinique ou en essais cliniques.

CHAPITRE I
L'ADN ET
LES NUCLEASES CHIMIQUES

I.1. L'ADN.

Selon le modèle de Watson et Crick^{8,9}, l'ADN est une double hélice antiparallèle constituée par l'enchaînement alterné désoxyribose-phosphate (figure 2). Sur chaque désoxyribose, une base comme l'adénine (A), la thymine (T), la cytosine (C) et la guanine (G) est accrochée. Ces bases sont appariées deux à deux par des liaisons hydrogène, l'adénine avec la thymine et la cytosine avec la guanine. Ces liaisons sont au nombre de deux entre les bases A et T et au nombre de trois entre G et C (figure 2).

L'ADN peut adopter plusieurs conformations dites de type A, B et Z. Les conformations A et Z ont d'abord été mises en évidence sous certaines conditions non naturelles avant d'être identifiées *in vivo*. La conformation de l'ADN la plus souvent rencontrée dans les cellules est néanmoins le type B où les plans de bases s'empilent régulièrement avec un espace de 3,4 Å entre eux et de façon perpendiculaire à l'axe de l'hélice^{10,11}. Des sous-structures, appelées grand et petit sillons, se forment par cet enchaînement régulier. Ces sillons situés de part et d'autre de l'ADN constituent des « canaux » permettant à différentes protéines ou enzymes d'accéder à l'information génétique.

Cette liaison de protéines à l'ADN est le premier pas vers la réplication de l'ADN ou la production d'ARN, et donc vers le développement cellulaire. La reconnaissance des séquences particulières de l'ADN par ces protéines, en particulier par les facteurs de transcription, fait intervenir différents types de liaisons:

- des liaisons hydrogène.
- des interactions électrostatiques.
- des forces de van der Waals.

Celles-ci s'établissent entre ces éléments et les bases de l'ADN, au niveau du petit et/ou du grand sillon. Le grand sillon de l'ADN, par définition très profond et relativement large, accueille des protéines de contrôle telles que des promoteurs ou des répresseurs car son contenu, sous forme de groupes fonctionnels réalisant des liaisons, est important^{11,9}. Dans le petit sillon de l'ADN, plus étroit mais plus profond, d'autres protéines peuvent se fixer¹². Il s'agit, par exemple de protéines chromosomales (histone HI), de protéines impliquées dans la condensation de l'ADN, de facteurs de transcription (TFIID) qui se lient à la « TATA

box »^{13,14}. Certaines reconnaissent des séquences de l'ADN¹⁵, le plus souvent des séquences riches en paires de bases A-T¹⁶⁻¹⁸.

Les éléments responsables de liaisons avec l'ADN, souvent interdépendants, reconnaissent des séquences d'enchaînement de bases pour entamer ou finir leur action. L'exemple de l'ADN polymérase, enzyme responsable de la biosynthèse d'ADN, est significatif de ce phénomène. Celle-ci a en effet besoin de la présence préalable d'autres enzymes, comme les topoisomérases I ou II. Ces dernières se lient à l'ADN, le coupent et le délient. L'ADN polymérase peut alors s'insérer dans l'« oeil » de réplication créé. Suite à cette phase de réplication, les topoisomérases interviennent de nouveau pour recondenser l'ADN. D'autres facteurs se lient de la même manière à l'ADN: c'est le cas des protéines de stabilisation, des ribonucléases, des polymérases d'élongation ou encore des enzymes de déroulement.

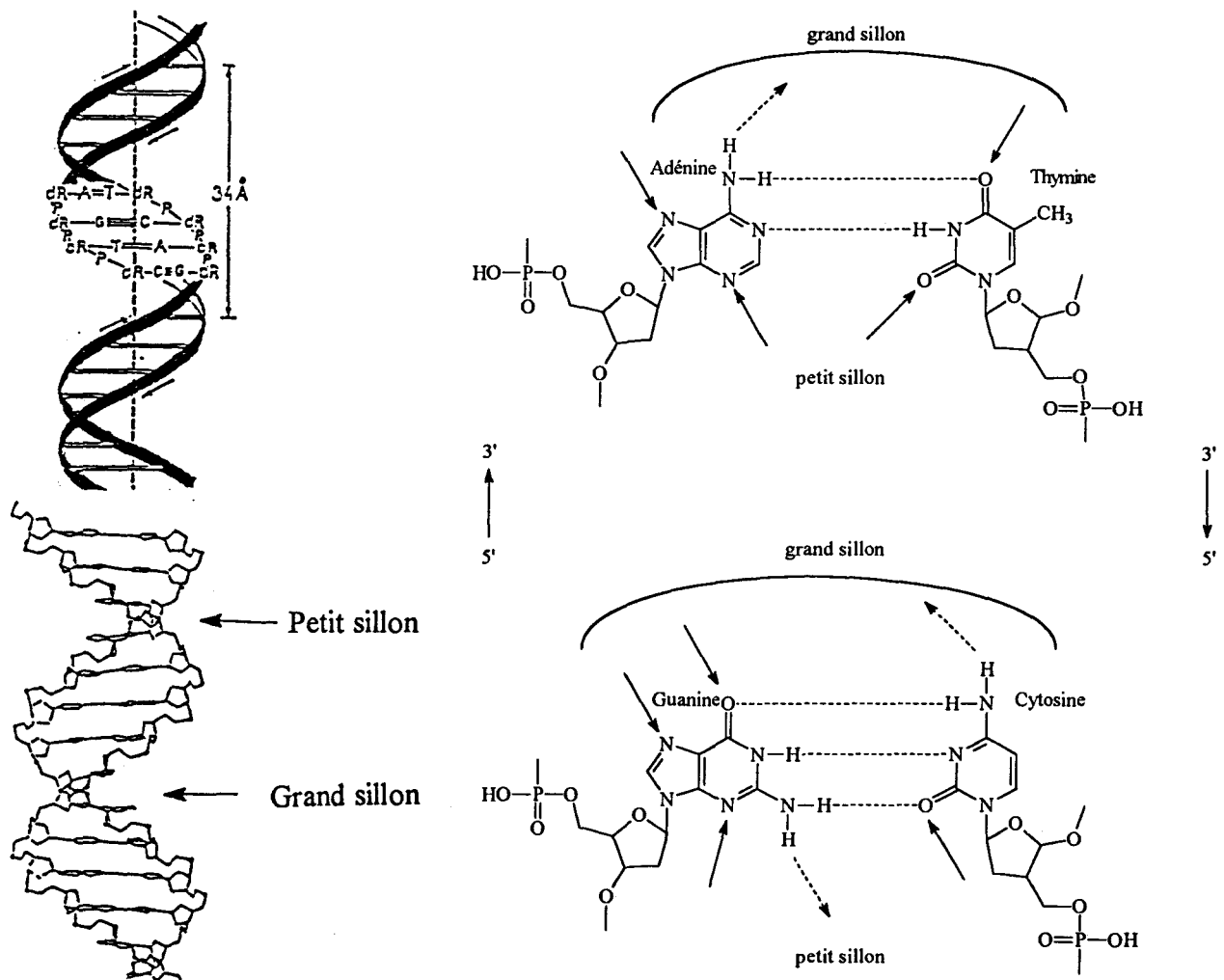


Figure 2 : à gauche, schéma de l'ADN double brin de type B ; à droite, représentation des bases A, T, G et C, des liaisons hydrogène (-----), des groupes donneurs (.....>) et accepteurs (----->) de liaisons hydrogène, orientation des fonctions et des liaisons vers le petit ou le grand sillon.

I.2. Les nucléases.

Le terme de nucléase désigne des agents capables de couper les acides nucléiques. Cette activité peut être initiée par différents types d'attaques: action de métaux de coordination, catalyse acido-basique, attaques nucléophiles, attaques radicalaires qui aboutissent toutes à une rupture des liaisons phosphodiesteres.

Ces nucléases utiles en biologie moléculaire catalysent la coupure de l'ADN ou des ARN avec une vitesse 10^{12} fois supérieure à celle d'une coupure non catalysée¹⁹. Cette propriété est applicable aux nucléases enzymatiques telles que les ribosymes, les endonucléases de restriction ou des nucléases non spécifiques, comme la nucléase micrococcale ou les DNAases.

Il existe également des nucléases issues de produits naturels telles que la bléomycine, les porphyrines ou des complexes peptidiques. On trouve aussi des nucléases synthétiques comme l'acide éthylène diamine tétraacétique, la phénanthroline et les salènes.

Nous nous sommes surtout intéressés aux derniers modèles pour lesquels généralement la coupure d'ADN passe par des complexes subissant des réactions d'oxydoréduction. Ceci conduit:

- soit à la production d'espèces radicalaires diffusibles, telles que les radicaux hydroxyle.
- soit à la production d'oxygène singulet.
- soit à la formation d'une espèce métal-oxo qui va alors modifier les bases de l'ADN²⁰.

L'ADN ou les ARN sont alors coupés spécifiquement ou de façon aléatoire au niveau des enchaînements phosphates, des sucres ou encore des bases de l'ADN²⁰.

Nous avons dégagé les principes gérant les différentes activités de nucléases en choisissant quelques exemples caractéristiques.

I.2.1. Les nucléases issues de produits naturels.

I.2.1.1. Les bléomycines.

Les bléomycines (BLM) isolées sous forme de complexe cuivrique d'une culture de *streptomyces verticillus*²¹ sont une famille d'antibiotiques glycopeptidiques prescrits dans le traitement de certaines tumeurs²². Les bléomycines coupent l'ADN par un processus faisant intervenir la formation d'un complexe fer-oxygène activé. De nombreuses études ont été réalisées sur le mode d'action de ces molécules. Elles permettent une bonne compréhension des mécanismes d'action des nucléases^{23,24}. Les différentes bléomycines se différencient par l'amide terminale branchée sur la fraction bithiazole²⁵. Nous appellerons bléomycine, la bléomycine A₂ (figure 3) qui est la plus abondante.

Cette molécule peut être regardée comme une entité possédant plusieurs composantes structurales. La complexation du fer s'effectue par l'amine secondaire, le groupement pyrimidine, l'imidazole, l'amine primaire et un azote de fonction amide pour former un complexe pentadenté (figure 4). D'autres métaux comme le cuivre, le cobalt et le manganèse sont également connus pour complexer la bléomycine^{23,24}. Une fraction disaccharide facilite la formation du complexe Fe-O₂ en formant une cavité. Elle agit aussi sur le transport membranaire. Le site d'affinité pour l'ADN est la partie bithiazole qui interagit spécifiquement avec certaines séquences de nucléotides. Un bras espaceur positionne chaque fragment de la bléomycine à une distance appropriée et dans une bonne orientation par rapport à l'ADN. Il jouerait également un rôle prépondérant dans l'affinité pour la double hélice²⁷.

La bléomycine se lie probablement au petit sillon de l'ADN et couvre 2 à 3 paires de bases²⁸⁻²⁹. Elle induit de fortes coupures d'ADN. A cet égard, elle peut être considérée comme une enzyme où la partie bithiazole serait le site de liaison au substrat et où la partie complexant le fer serait le site catalytique de l'enzyme³⁰. Le complexe fer-oxygène activé effectue la coupure avec une spécificité pour les désoxyriboses situés dans les enchaînements 5'-GC-3' ou 5'-GT-3'³¹. Le groupement amino en position 2 de la purine est un élément de reconnaissance fondamental dans la coupure spécifique de l'ADN³¹.

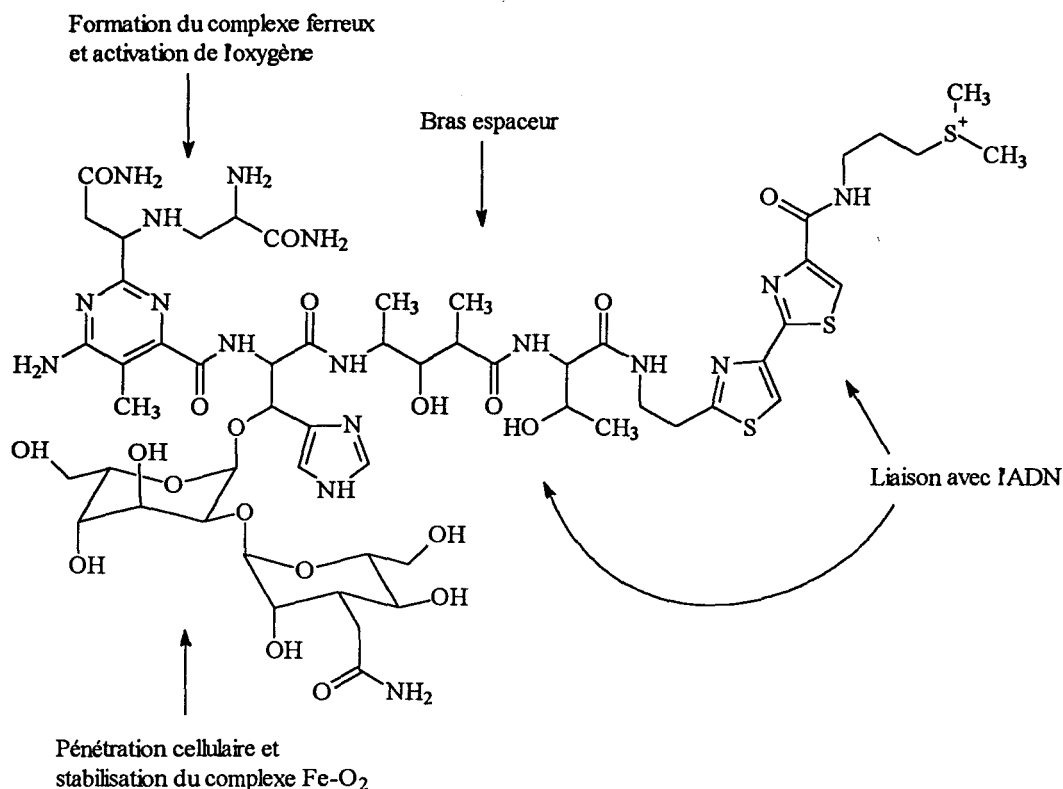


Figure 3 : structure de la bléomycine A2 (BLM)

D'autres complexes de la bléomycine induisent des coupures de l'ADN. Ainsi, la bléomycine complexée par le cobalt réagit par photoactivation en présence d'oxygène pour former une espèce Cobalt-O₂ produisant des dommages irréversibles sur les bases de l'ADN²⁵. Le complexe de manganèse possède une activité nucléasique qui provoque des coupures mono et double brin de l'ADN. Son activité représente cependant 1 à 3 % de celle démontrée pour le complexe de fer²⁴. Avec les complexes cuivriques de la bléomycine, aucune coupure d'ADN n'a pu être visualisée *in vitro*. En revanche, le complexe Cu-BLM permet l'inhibition de la croissance de cellules cancéreuses. Ce fait contradictoire serait lié à un échange cuivre-fer à l'intérieur des cellules²⁴.

La bléomycine est l'exemple du concept d'association maintes fois repris pour concevoir des nucléases³²⁻³⁸. Selon ce modèle, la nucléase type posséderait une partie se liant à l'ADN et une partie complexante, reliées entre elles par un bras espaceur.

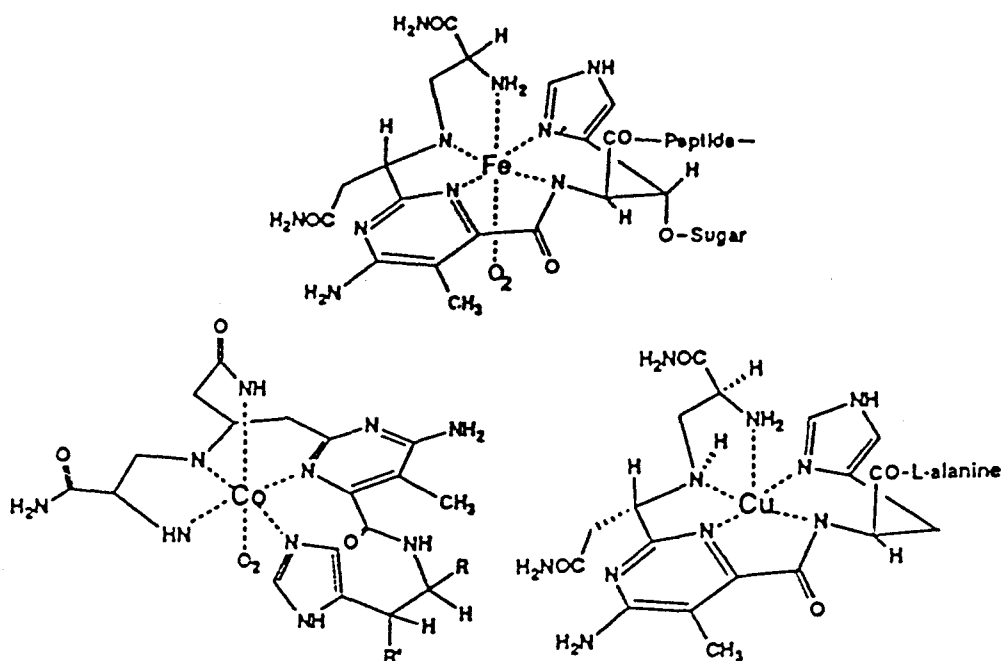


Figure 4 : complexes de fer, cuivre, cobalt et manganèse de la bléomycine.

I.2.1.2. Les porphyrines.

Les métalloporphyrines (figure 5) sont des analogues du groupe prosthétique des enzymes contenant de l'hème. Elles catalysent sélectivement des réactions en utilisant le fer comme métal de transition et le même ligand macrocyclique (protoporphyrine IX)³⁹.

Outre la capacité des métalloporphyrines à catalyser des réactions, les porphyrines complexées par différents métaux sont capables d'engendrer des coupures d'ADN. Ces molécules photosensibles peuvent en effet produire de l'oxygène singulet afin de causer des dégâts irréversibles dans des tissus néoplasiques¹⁹.

Le ligand porphyrine possède quatre unités pyrroles responsables de la complexation de nombreux métaux. Ainsi coexistent dans cette famille, des complexes de zinc, de fer, de nickel et de manganèse. Les sites préférentiels de liaison à l'ADN de ces différents complexes ont été étudiés¹⁹.

Ceux-ci sont fonctions de l'état de coordination des porphyrines et des métaux impliqués. Non complexées, ces molécules s'intercalent. En présence d'ions métalliques possédant un ligand axial, ces molécules se lient au petit sillon de l'ADN. Le complexe de

manganèse se lie dans le petit sillon aux sites de l'ADN comportant trois triplets consécutifs A-T. Les complexes de fer et de zinc ont une préférence pour les régions riches en paires de bases A-T. Les complexes de cuivre et de nickel se fixent quant à eux aussi bien aux fragments A-T que G-C³⁹.

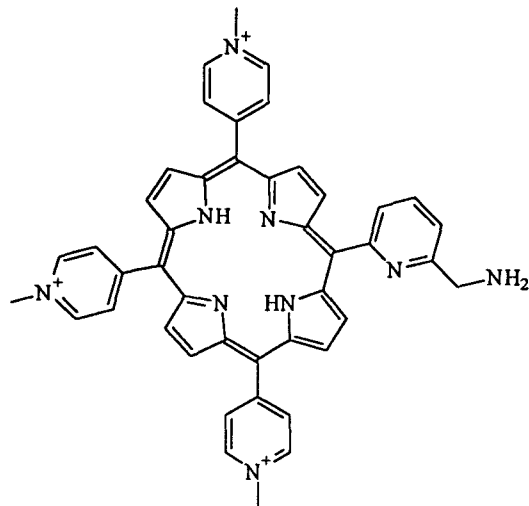


Figure 5 : dérivé de porphyrine capable par complexation métallique d'induire des scissions de l'ADN double brin.

Après une activation préalable, ces complexes métalliques sont capables d'exercer leur activité nucléasique sur l'ADN ou l'ARN. La coupure d'ADN par le complexe de manganèse (III) est due à un intermédiaire manganèse-oxo et a lieu au niveau des séquences de liaison riches en fragments A-T. Ce composé est celui qui présente le plus d'intérêt car il produit des coupures spécifiques d'ADN. Des porphyrines complexées par le cuivre (II) ont montré également des coupures très fortes sur les ADN circulaires fermés. En revanche, aucune coupure efficace n'a été observée en présence de zinc (II), cobalt (II), nickel (II), plomb (II), manganèse (II), fer (III) ou cadmium (II). La nature du métal complexant a donc une grande influence sur le mode de liaison et sur les possibilités de coupures de l'ADN¹⁹.

Le concept d'association déjà évoqué pour la bléomycine a été appliqué avec des dérivés de type métalporphyrine qui ont été associés à différents vecteurs, afin de modifier la cible de leur activité nucléasique. Ces différents vecteurs peuvent être des intercalants tels que l'acridine³⁹, des dipyrindiimidazoles³⁹ et la 9-méthoxyellipticine⁴⁰, ou des ligands du petit sillon comme la nétropsine^{41,42}

Le dérivé associant la 9-méthoxyellipticine avec une porphyrine complexée par le manganèse, possède des propriétés semblables à la bléomycine³⁹.

I.2.1.3. Les tripeptides.

Certains tripeptides comme Gly-Gly-His et Gly-His-Lys complexent les cations métalliques du nickel ou du cuivre. Ces peptides issus du site actif de protéines comme l'albumine et l' α -fétoprotéine possèdent une affinité de liaison à l'ADN et exercent une activité de nucléase en présence d'agents activateurs¹⁹. Le complexe de cuivre plan-carré du tripeptide Gly-His-Lys se lie au petit sillon de l'ADN et se place parallèlement aux brins de l'ADN. Il exerce une activité de nucléase par l'intermédiaire de radicaux libres.

Le peptide Gly-Gly-His complexé (figure 6) par le nickel engendre une oxydation des azotes N₇ des guanines de l'ADN. Cette modification de l'ADN peut engendrer ultérieurement des scissions de l'ADN¹⁹.

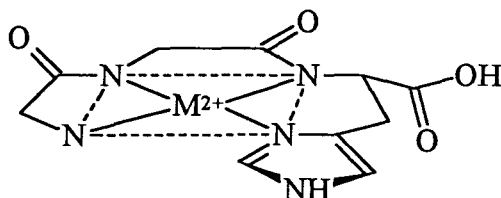


Figure 6 : structure du complexe métallique du tripeptide Gly-Gly-His

Les éléments importants à retenir de ces exemples sont le rôle des métaux dans le mode de coupure: les complexes cuivriques coupent par production de radicaux hydroxyle, les complexes de nickel par fixation sur une guanine, puis oxydation de cette base, comme nous le verrons plus tard.

Ces peptides ont eux aussi fait l'objet de nombreuses associations (figure 7) avec:

- des intercalants (acridine⁴³, anthracènediones⁴⁴).
- des molécules se liant au petit sillon de l'ADN (nétropsine⁴⁵).

Plus récemment, le complexe Gly-Gly-His-complexé par le nickel (II) a été couplé à un acide nucléique peptidique⁴⁶ (PNA).

Ils ont révélé une liaison forte avec l'ADN et une activité nucléasique.

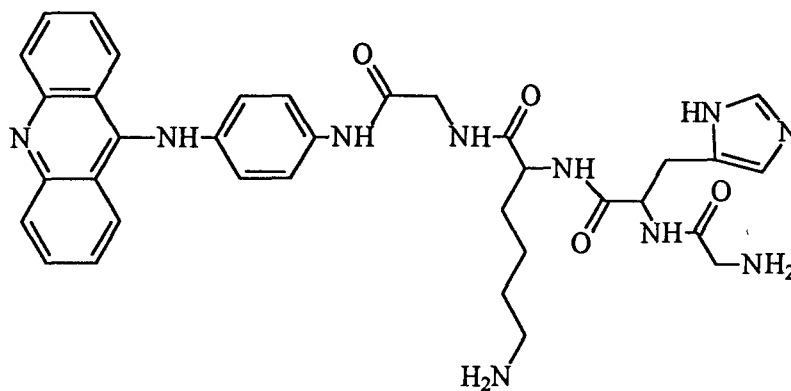


Figure 7 : structure de l'hybride associant le tripeptide Gly-His-Lys et l'anilinoacridine

I.2.2. Les nucléases synthétiques.

I.2.2.1. L'acide éthylène diamine tétraacétique ou EDTA.

L'EDTA est connu pour complexer très fortement les cations métalliques¹⁹. Ces complexes ont fait l'objet de nombreuses études aussi bien en physicochimie qu'en biologie moléculaire. Le complexe Fe-EDTA catalyse la réduction de l'eau oxygénée, ce qui permet de générer des radicaux hydroxyle OH° par l'intermédiaire d'une réaction de Fenton (figure 8).

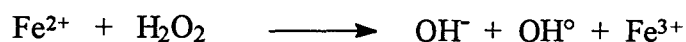


Figure 8 : réaction de Fenton.

Ces radicaux hydroxyle générés sont capables de couper l'ADN. De ce fait, le complexe Fe-EDTA est devenu depuis quelques temps une nucléase utilisée dans la technique du footprinting⁴⁷. Ce composé, tout comme le complexe de manganèse des porphyrines, a été associé à différentes molécules connues pour leur liaison à l'ADN. Ceci a eu pour but d'amener le cation métallique à proximité de la double hélice d'ADN. L'association du bromure de méthidium avec l'EDTA donne un exemple concret de ce phénomène : cette molécule appelée méthidium propyl-EDTA s'intercale et coupe l'ADN à de très faibles concentrations (10 nM) en présence de réducteur¹⁹ (figure 9). Cet agent de coupure est désormais largement utilisé pour le footprint. De la même manière, l'EDTA a été associé à de nombreux ligands du petit sillon, comme la distamycine et ses dérivés⁴⁷⁻⁵³. De telles molécules constituent un autre exemple d'application du concept d'association développé précédemment.

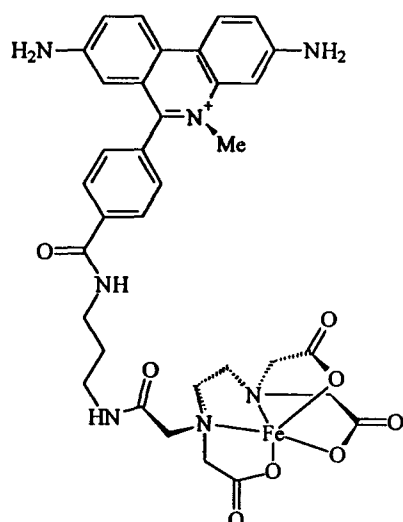


Figure 9 : structure du complexe méthidium propyl-EDTA.

D'autres métaux tels que le cuivre, le nickel et le zinc forment des complexes stables avec l'EDTA et bloquent la complexation du fer. Ceci inhibe malheureusement l'activité nucléasique du complexe Fe-EDTA et limite fortement son utilisation¹⁹.

I.2.2.2. La phénanthroline et ses dérivés.

La phénanthroline est un intercalant capable de complexer le cuivre. En présence d'eau oxygénée comme agent activateur, elle coupe ensuite les désoxyribonucléotides au niveau des fonctions phosphodiester¹⁹.

Plus précisément, le complexe formé résulte de l'association de deux orthophénanthrolines avec un atome de cuivre. L'utilisation de techniques spectroscopiques et viscosimétriques ont montré qu'il s'intercale partiellement dans l'ADN. L'une des unités phénanthroline se place entre les paires de bases, tandis que l'autre reste logée dans le petit sillon de l'ADN. Toutefois, le cuivre reste accessible à l'eau oxygénée. Il est alors réduit et engendre la formation de radicaux hydroxyle coupant l'ADN au niveau des liaisons phosphodiester.

La complexation de la 1,10-phénanthroline (ou de molécules apparentées) par le ruthénium a permis d'obtenir d'autres complexes de type octaédrique⁵⁴ (figure 10). Le ruthénium complexe en effet trois unités de phénanthroline. Ces complexes octaédriques se

lient à l'ADN⁵⁵⁻⁵⁸. Ils réagissent avec l'ADN non plus par un mécanisme radicalaire mais par une production d'oxygène singulet.

Sur la base des complexes de la phénanthroline, d'autres complexes au rhodium (figure 10) ont été synthétisés. Leurs structures sont, là encore, octaédriques. Ils se lient à l'ADN, mais de façon non spécifique. La coupure aléatoire qu'ils engendrent sur l'ADN en font de bons réactifs de footprinting (peu utilisés).

Ces exemples nous montrent une fois de plus l'importance des métaux intervenant dans la complexation, sur le mode de liaison à l'ADN et la coupure.

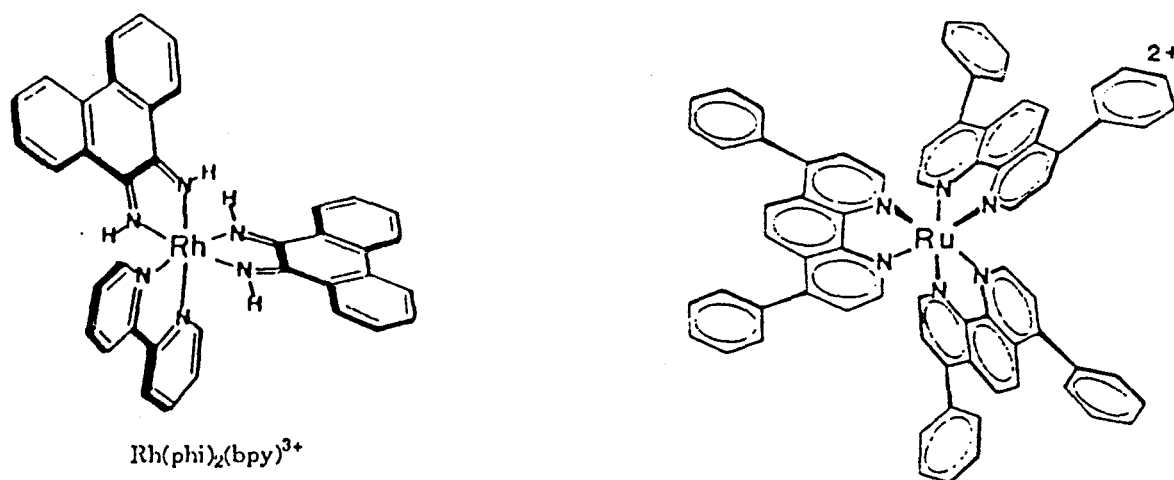


Figure 10 : complexes octaédriques du rhodium et du ruthénium de la 1,10-phénanthroline ou de ses dérivés.

I.2.2.3. Les salènes.

Les salènes (N,N'-bis(salicylidène)éthylènediamine) se révèlent de bons chélateurs de métaux. Ces complexes possèdent une géométrie carrée ou pyramidale à base carrée, selon la nature du métal complexé. La double charge négative obtenue sur le ligand par l'ionisation des fonctions phénols en phénolates permet d'obtenir avec des cations doublement chargés, des complexes globalement neutres.

Le manganèse, le cobalt, le chrome, le nickel, et le cuivre complexent les salènes. Les références concernant leur activité de nucléase sont assez restreintes, comparées à celles concernant leur activité en catalyse chimique. Plusieurs propriétés de ces complexes peuvent toutefois être dégagées en fonction de la nature du métal.

Les salènes hydrosolubles complexant le cuivre se lient à l'ADN parallèlement aux paires de bases⁵⁹. Cette liaison serait due à une intercalation dans le grand sillon de l'ADN, de la structure plane du salène complexé. Apparemment, quel que soit le métal complexant et la structure du ligand de type salène, aucune variation de liaison n'a été détectée. En revanche, la nature de la complexation a une énorme influence sur les potentiels rédox et donc sur l'activité nucléasique en présence d'oxygène.

Les salènes complexés par le cobalt en présence d'oxygène moléculaire et d'un agent réducteur, engendrent des coupures d'ADN double brin^{60,61}.

Les salènes complexés par le nickel se lient directement à l'ADN double brin mais ne le coupent pas. En revanche l'ADN mono brin et l'ARN sont coupés^{62,63}. Les salènes complexés par le nickel réagissent d'abord par une alkylation. L'alkylation est spécifique des guanines dont les positions N₇ ou C₈ sont des sites d'alkylation connus de l'ADN. La coupure de l'ADN est obtenue ensuite après action d'un agent d'activation oxydant comme nous le verrons après.

Par ailleurs, un produit résultant du remplacement des fonctions phénols par des fonctions énols n'a donné aucune activité de type nucléase. Cette différence de réactivité peut donc être attribuée à l'intervention d'un radical phénoxy dans le mécanisme de coupure⁶².

Les salènes complexés par le manganèse possèdent également une activité de nucléase⁶⁴. Ils se lient à l'ADN au niveau de séquences riches en paires de bases A-T du petit sillon. En présence d'agent activant, ils coupent l'ADN de la même façon que les porphyrines complexées par ce métal.

Les premiers travaux sur les salènes montrent qu'il s'agit de nucléases intéressantes, dont le mode d'action se rapproche des modèles porphyrines ou phénanthroline. Des molécules hybrides développant le concept d'association n'ont pas encore été réalisées.

I.2.3. Les agents activateurs de coupure de l'ADN.

Les différentes nucléases existantes engendrent des scissions importantes de l'ADN, soit par activation de l'oxygène ambiant (formation d'une espèce métal-oxo, production de radicaux libres OH° ou d'oxygène singulet) ou encore par alkylation. En général, l'activité *in vitro* de ces différentes nucléases nécessite l'intervention d'un agent activateur. Celui-ci est variable: il dépend uniquement de la nature du métal.

Certains métaux nécessitent une réduction préalable. Les complexes du fer (III) sont réduits en présence de magnésium (II) ou de dithiothréitol DTT pour donner du fer (II) capable de rentrer dans le cycle de Fenton²⁴. Le même agent activateur Mg(II) est utilisé pour les complexes de rhodium et de ruthénium. Ces deux métaux peuvent également initier des scissions de l'ADN par irradiation^{19,54}. Le cuivre (II) est réduit en présence d'acide mercaptopropionique MPA ou de DTT. L'eau oxygénée est aussi utilisée pour initier des coupures par certains complexes de cuivre (II)^{19,65,66}.

D'autres complexes, en revanche, nécessitent une oxydation préalable, avant de pouvoir exercer leur action de nucléases. Les complexes de manganèse (III) sont oxydés en présence de monopersulfate de potassium ou de monoperoxyphthalate de magnésium MMPP³⁹. Les complexes de nickel (II) sont oxydés en présence d'oxone KHSO_5 ou de MMPP^{62,63}.

L'importance de la présence de l'agent activant le métal a également été démontrée dans le cas de complexes de cobalt (II)³⁵ (figure 11). Celui-ci est capable de couper l'ADN si une réduction préalable par le DTT a eu lieu. En revanche, si un oxydant comme le MMPP est présent, aucune coupure de l'ADN n'est visualisée. Ceci est dû au mécanisme de coupure et aux différents intermédiaires permettant à l'activité de nucléase de se manifester. En effet, le cobalt (II) active l'oxygène pour former une espèce cobalt(II)- O_2 responsable de la coupure d'ADN. La présence de DTT permet l'obtention de cette espèce. Le cooxydant MMPP ajouté au complexe de cobalt (II) détruit l'intermédiaire Cobalt(II)- O_2 en faisant passer le métal au degré d'oxydation (III). Le DTT permet de régénérer le métal sous sa forme (II).

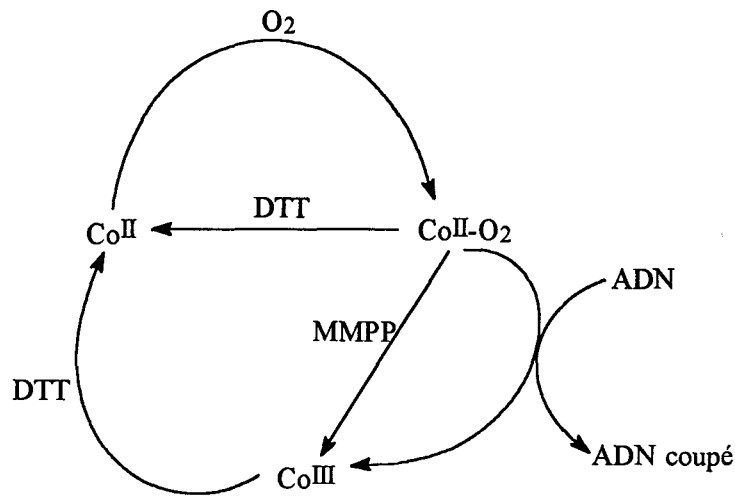


Figure 11 : cycle catalytique et différentes espèces du cobalt impliquées, soit en présence d'oxygène seul ou en présence d'agent activateur DTT ou désactivateur MMPP, lors de la coupure d'ADN.

Ces activations entraînent l'attaque directe des bases ou des modifications sur le désoxyribose des nucléotides. Ceci a pour effet d'hydrolyser les fonctions phosphodiesteres de nucléotides. Il existe différents processus de coupure selon les métaux impliqués.

Le mécanisme décrit essentiellement pour les complexes de nickel des salènes et des tripeptides consiste en une action directe sur les bases⁶⁷ d'oligonucléotides mono-brins (figure 12). Le nickel (II) complexant le ligand organique subit une oxydation en nickel (III) par action de l'oxone KHSO_5 . Il s'ensuit alors un pontage de l'azote situé en N_7 des guanosines par le métal. La guanosine est oxydée en un composé sensible au traitement à la pipéridine.

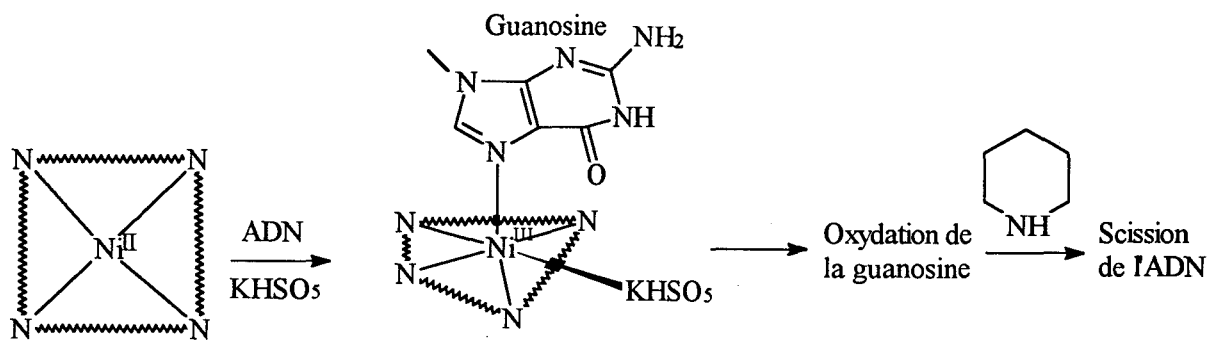


Figure 12 : mode d'alkylation des complexes de nickel en présence d'oxone comme agent activateur des coupures d'ADN.

Pour d'autres métaux, le mécanisme de coupure peut provenir d'une espèce radicalaire par arrachement d'un atome d'hydrogène au niveau du désoxyribose.

Tous les carbones du sucre peuvent participer à ce type de réaction: C_1^{24} (figure 14), C_2 , $C_3^{24,39}$ (figure 13), C_4 ou C_5^{20} . Le H_1 est arraché par le complexe du cuivre (II) de la phénantroline et les porphyrines complexées par le manganèse (III). L'hydrogène H_3 est attaqué par les complexes de rhodium. L'hydrogène H_4 est arraché par la phénanthroline complexée par le cuivre (II), la bléomycine, le complexe Fer-EDTA et le méthyldiumpropyl-EDTA. L'hydrogène H_5 est touché par les porphyrines cationiques complexées par le manganèse (III).

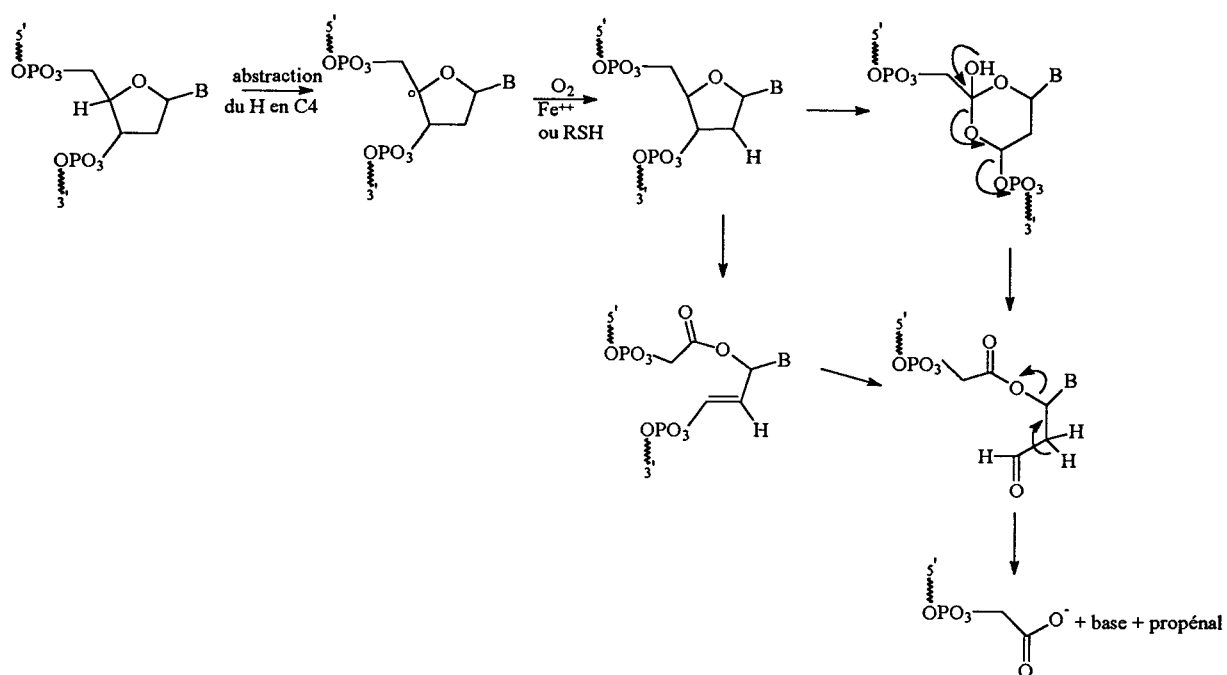


Figure 13 : mécanisme de coupure de l'ADN par abstraction radicalaire de l'hydrogène en C_4 du désoxyribose.

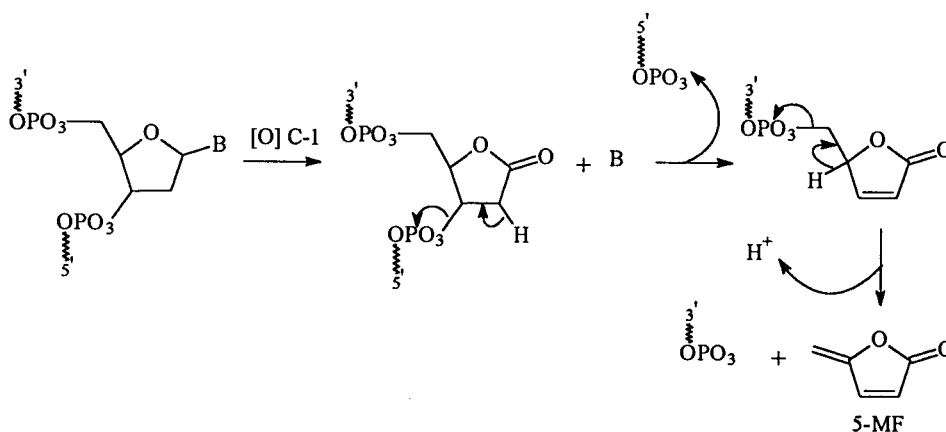


Figure 14 : réaction de coupure de l'ADN par oxydation du carbone C_1 du désoxyribose ; production de 5-MF = 5-méthylène-furanone.

I.2.4. Conclusion.

De nombreuses nucléases sont utilisées comme agent de coupure de l'ADN. Ces coupures aléatoires ou spécifiques de l'ADN sont déjà mises à profit pour étudier l'ADN lui-même ainsi que le mode de liaison à l'ADN de molécules chimiques ou protéiniques. L'utilité des nucléases réside également dans le fait que certaines d'entre elles puissent posséder une activité antitumorale.

Pour concevoir des nouvelles nucléases à potentialité antitumorale, nous avons retenu l'exemple de la bléomycine. Le concept consiste en la synthèse de molécules hybrides possédant une fraction affine pour l'ADN et une fraction capable de couper l'ADN. De telles molécules ont déjà été réalisées en utilisant comme agent de coupure:

- des porphyrines au manganèse.
- du Fe-EDTA.
- des peptides chélatant les métaux de transition.

Les salènes par contre, sont encore peu étudiés, mais possèdent de façon établie des propriétés de nucléase. Ils n'ont jamais été inclus dans des molécules hybrides.

Notre objectif s'inscrit dans le design et le développement de telles molécules. Après avoir préparé un salène fonctionnalisé par une chaîne amino alkyle, nous avons étudié sa complexation par le cuivre, le nickel et le manganèse en utilisant différentes techniques physicochimiques telles que:

- la RPE afin de déterminer la géométrie et la structure des complexes.
- la spectroscopie UV-visible pour déterminer le pKa du ligand, la stoechiométrie des complexes formés en solution et les constantes d'association des métaux avec le ligand.
- La voltammétrie cyclique pour déterminer les potentiels d'oxydo-réduction des métaux complexant le ligand.

Une étude des propriétés biologiques des produits a ensuite été réalisée. Leur liaison avec l'ADN et leur propriété de nucléase ont été déterminées. L'activité sur les DNA topoisomérases I et II ont été évaluées, ainsi que la cytotoxicité sur des cellules de carcinome épidermique KB afin de repérer une éventuelle activité antitumorale.

Par la suite, dans un esprit de conception de molécules hybrides, les salènes complexés ont été associés à des synthons connus pour leur spécificité de liaison à l'ADN. Cette évolution pourrait permettre aux salènes complexés d'atteindre la cible de façon différente. Des synthons ont fait l'objet d'une association avec les salènes:

- des dérivés de type anthracène-9,10-diones.
- un dérivé de l'ellipticine.

Ces synthons (figure 15) agissent par intercalation dans le grand sillon de l'ADN. Plusieurs études ont été menées sur ces molécules hybrides afin de mettre en évidence leur type de liaison à l'ADN et leur propriété de nucléase. Leur cytotoxicité a été évaluée.

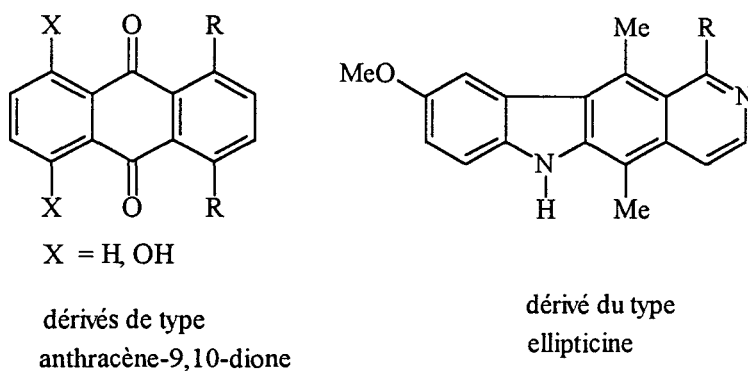


Figure 15 : synthons utilisés pour obtenir les différents hybrides synthons-salènes complexés (R = chaîne aminoalkyle).

CHAPITRE II
LES SALENES

II.1. Synthèse d'un salène fonctionnalisé.

II.1.1. Méthode.

Les salènes, de façon générale, sont obtenus en condensant l'aldéhyde salicylique et une β diamine. Ils sont ensuite stabilisés par un métal. Pour notre part, nous avons choisi trois métaux :

- le cuivre (II).
- le nickel (II).
- le manganèse (III).

Dans ce travail, le ligand a été fonctionnalisé sur le fragment éthylène diamine par un bras amino alkyle afin de pouvoir le greffer facilement par la suite aux différents vecteurs qui ont été prévus (figure 16).

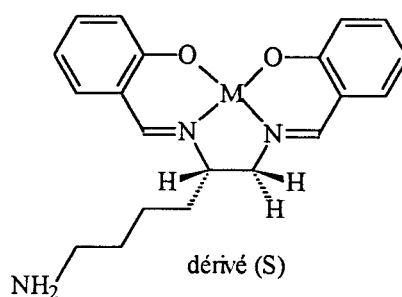


Figure 16 : salène asymétrique et fonctionnalisé, complexé par un métal M.

Le précurseur du salène doit être une β diamine. Pour réaliser un composé comportant un carbone asymétrique, nous avons choisi de partir d'un acide α aminé, la L (S) Lysine, qui possède :

- une fonction amine en ω sur sa chaîne latérale qui sera protégée lors des différentes étapes de synthèse puis, déprotégée dans la phase terminale de la synthèse des salènes.
- une fonction acide carboxylique convertible en méthylène-amine. La fonction NH_2 ainsi obtenue en β du carbone asymétrique sert à l'obtention de l'une des deux fonctions imines du salène.

○ une fonction amine en α du carbone asymétrique servant à la formation de l'autre fonction imine du salène. Cette fonction est protégée de façon orthogonale par rapport à la protection de la chaîne latérale.

Ce procédé de synthèse (figure 17) permet d'obtenir des salènes chiraux en fixant l'asymétrie dès le début de la synthèse. Les différentes transformations appliquées à la L (S) lysine ne sont pas racémisantes.

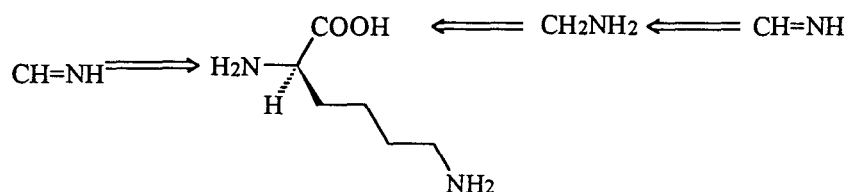


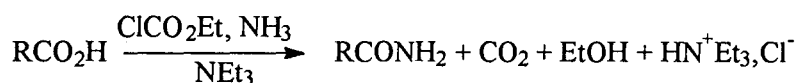
Figure 32 : rétrosynthèse permettant d'obtenir les fonctions imines du salène à partir des fonctions de la L (S) Lysine.

II.1.2. Synthèse des salènes.

II.1.2.1 Synthèse du (S)-6-(*ter*butyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane 5.

Pour façonner la β diamine il faut transformer la fonction carboxylique en méthylène amine primaire. Les deux fonctions amines existantes doivent donc être bloquées de façon orthogonale tandis que la fonction carboxylique doit rester libre. Nous sommes donc partis de la L'(S) Lysine protégée sur l' α N par un groupement benzyloxycarbonyle et sur l' ϵ N par un groupement *ter*butyloxycarbonyle. L'acide 1 est transformé en produit diaminé 5 en quatre étapes (figure 20 page 27).

La fonction acide carboxylique est transformée en amide primaire⁶⁸ selon la réaction :



Le chloroformiate d'éthyle ajouté à -10°C permet la formation d'un anhydride mixte avec l'acide carboxylique. L'acide chlorhydrique formé est neutralisé par la triéthylamine présente dans le milieu. L'addition d'ammoniac directement dissous dans le solvant permet le clivage de l'anhydride sans apporter d'eau. L'amide 2 est obtenue avec un rendement de 85 %.

L'amide primaire **2** est ensuite transformée en nitrile par déshydratation en présence de triéthylamine et d'anhydride trifluoroacétique⁶⁹(figure 18). Cette réaction s'effectue d'abord à 0 °C pour obtenir la forme tautomère de la fonction amide primaire, une imine hydroxylée. Ensuite, l'anhydride vient estérifier la fonction hydroxyle. Un mécanisme à 6 centres entraîne le départ du groupement trifluoroacétate et permet la formation du nitrile. De plus, la triéthylamine neutralise l'acide trifluoroacétique formé, ce qui évite l'acidification du milieu et la coupure éventuelle du groupement *ter*butyloxy-carbonyle de la chaîne latérale. Le nitrile **3** est obtenu avec un rendement de 83 %.

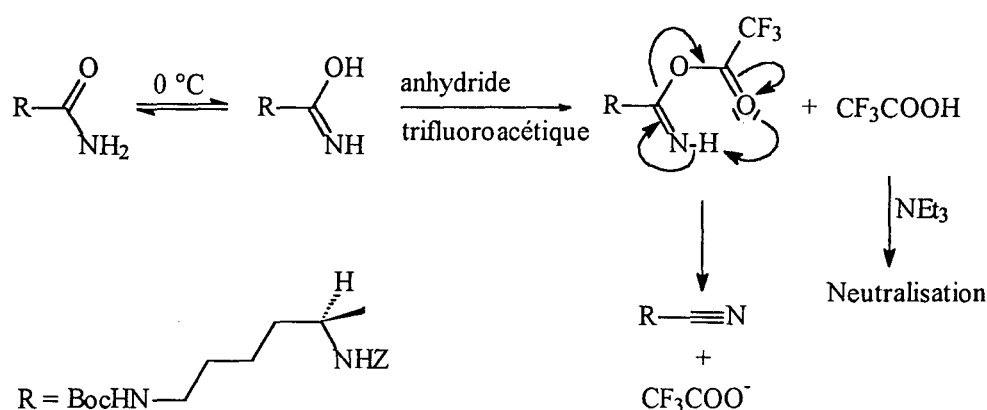


Figure 18 : réaction de déshydratation de l'amide primaire **2** en nitrile **3** en présence de triéthylamine et d'anhydride trifluoroacétique.

La libération de la β diamine se fait en une seule étape par réduction du nitrile⁷⁰ et par le clivage du groupement benzyloxy-carbonyle en présence d'hydrogène, de nickel de Raney, sous 50 atmosphères et en présence d'ammoniac. Cette opération donne les produits **4** et **5** (figure 20). La formation de la diamine **5** est favorisée par un temps de réaction de 12 heures en autoclave.

Le produit **5** est obtenu avec un rendement de 93 %. L'ammoniac dissous dans le solvant active non seulement le catalyseur mais aussi empêche la formation d'amine secondaire. En effet, la réduction du nitrile passe par un intermédiaire imine. Une amine primaire peut s'additionner sur le carbone de cet intermédiaire pour donner une amine secondaire (figure 19).

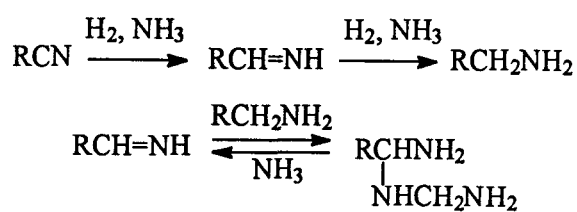


Figure 19 : réduction du nitrile en présence d'hydrogène et de nickel de Raney et réaction parasite.

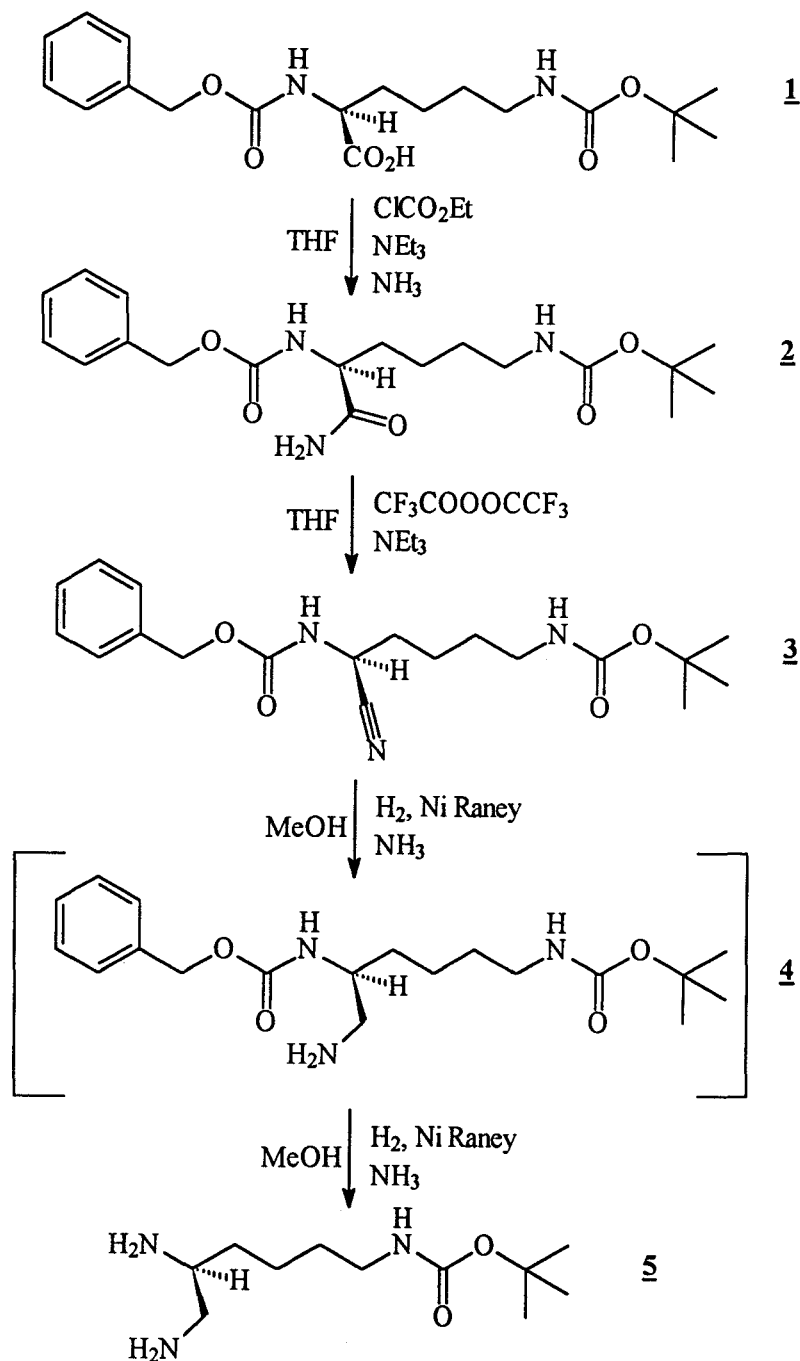


Figure 20 : synthèse du (S)-6-(*tert*butyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane **5**.

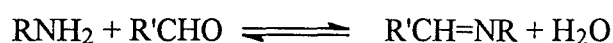
II.1.2.2. Obtention des salènes déprotégés, complexés par du cuivre (II) 9 et du nickel (II) 10.

Deux méthodes différentes^{71,72} ont permis d'obtenir les salènes complexés par du cuivre (II) et par du nickel (II) (figure 21).

La première s'effectue en une étape, à partir de la réaction de la β diamine 5 sur l'aldéhyde salicylique. Cette première étape conduit *in situ* au ligand 8 qui n'est pas isolé, mais complexé directement par les métaux introduits sous forme d'acétate de cuivre (II) monohydraté ou d'acétate de nickel (II) tétrahydraté. Les salènes complexés par le cuivre (II) 6 et par le nickel (II) 7 sont obtenus après recristallisation, avec des rendements respectifs de 57 et 41 %.

La seconde permet tout d'abord l'isolement du ligand 8 seul, obtenu par la formation en milieu neutre d'une diimine phénolique à partir de la diamine 5 et de l'aldéhyde salicylique.

La réaction d'obtention de l'imine est une réaction réversible:



Cette réaction se décompose en deux étapes successives en équilibre. La première consiste en une addition sur la fonction aldéhyde suivie d'une déshydratation pour aboutir à l'imine recherchée. L'eau est éliminée au fur et à mesure de sa formation par l'ajout dans le milieu de tamis moléculaire de 3 Å. Afin d'essayer d'améliorer cette élimination, différents agents desséchants comme le sulfate de magnésium et le sulfate de sodium ont été testés lors de cette réaction, sans donner les évolutions attendues sur les rendements.

Sachant que des conditions opératoires en milieu acide entraînent une coupure des fonctions imine, la purification du ligand par flash chromatographie se fait en présence de triéthylamine ajoutée à hauteur de 1 % dans l'éluant, afin d'éviter une coupure des fonctions imine lors du contact du salène avec la silice acide. Le ligand 8, après purification sur gel de silice, est obtenu avec un rendement de 71 %.

L'ajout sur le ligand de deux équivalents de soude permet l'obtention des fonctions phénolates. La réaction de complexation par de l'acétate de cuivre (II) monohydraté et par de l'acétate de nickel (II) tétrahydraté est alors effectuée. Les salènes complexés par le cuivre (II) **6** et par le nickel (II) **7** sont obtenus avec les rendements respectifs de 80 et 85 % après recristallisation.

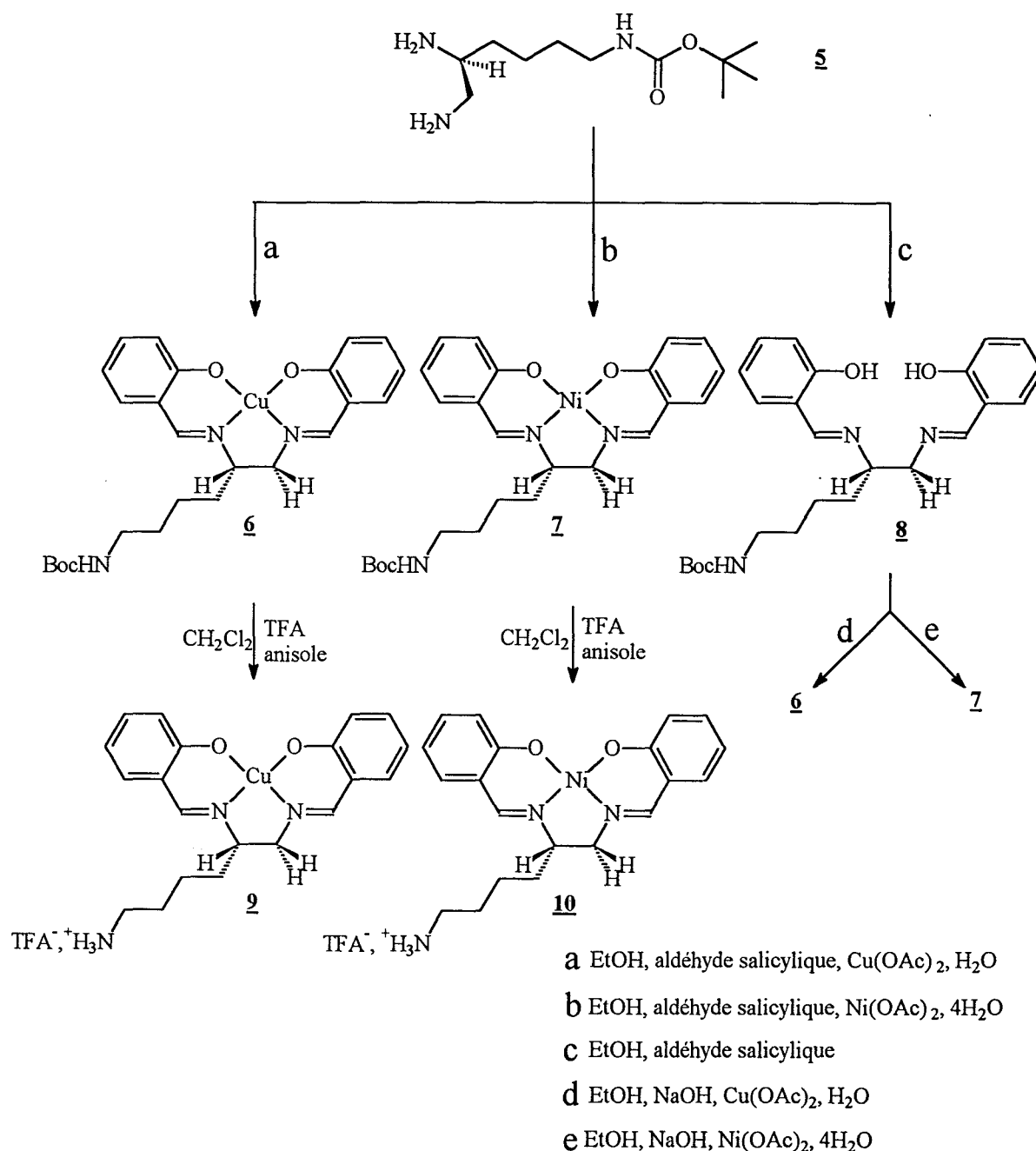


Figure 21 : synthèse du ligand **8** et des salènes déprotégés complexés par du cuivre (II) **9** et du nickel (II) **10**.

La déprotection du groupement *ter*butyloxycarbonyle porté par la chaîne latérale du ligand **8** est impossible en milieu acide en raison de la présence des fonctions imine, instables dans de telles conditions.

En revanche, lorsque le ligand est complexé par du cuivre (II) ou du nickel (II), la déprotection du groupement *ter*butyloxycarbonyle de la chaîne latérale du salène peut être effectuée de manière classique, par l'action de l'acide trifluoroacétique en présence d'anisole. L'emploi d'anisole n'est pas systématique lors de la déprotection du groupe *ter*butyloxycarbonyle. Il joue un rôle dans l'élimination des produits résultants de la coupure du groupement protecteur. Celle-ci entraîne en effet la formation d'isobutène, qui en présence d'acide fort (acide trifluoroacétique) génère une espèce carbocation très réactive et piégée par l'anisole lors d'une réaction de substitution électrophile aromatique.

Les salènes déprotégés complexés par le cuivre (II) **9** et par le nickel (II) **10** sont obtenus avec des rendements respectifs de 61 et 78 %.

II.1.2.3. Synthèse du salène déprotégé complexé par le manganèse (III) **13**.

Le salène protégé complexé par le manganèse (III) est obtenu selon un mode opératoire⁷³ différant un peu de ceux utilisés pour les salènes complexés par le cuivre (II) **6** ou par le nickel (II) **7** (figure 22). La première étape consiste à introduire sous argon l'aldéhyde salicylique et la β diamine **5** pour former la diimine.

La complexation du ligand se fait grâce à de l'acétate de manganèse (II) tétrahydraté. Les complexes de manganèse (II) sont très sensibles et peu maniables, tandis que les complexes de manganèse (III) sont stables à l'eau, la chaleur, l'air et la lumière. Le produit **11** non isolé est donc oxydé à l'air en présence de chlorure de lithium, ce qui permet d'obtenir le salène complexé par le manganèse (III) **12**. L'ion chlorure présent dans le milieu permet alors au manganèse de prendre un cinquième ligand. L'oxydation qui se produit est une oxydation à un électron réalisée grâce à la mise à l'air du mélange réactionnel. Le salène complexé par le manganèse (III) **12** est obtenu après recristallisation avec un rendement de 30 %.

La déprotection du composé **12** par les réactifs classiques que sont l'acide trifluoroacétique, l'acide formique ou encore l'acide chlorhydrique gazeux n'a pas donné le produit attendu **13**. Toutes ces méthodes de déprotection du groupement *ter*butyloxy-carbonyl ont généré en spectrométrie de masse une espèce commune à $M_{13} + 3$. Cette espèce observée en spectrométrie de masse (FAB^+) a été analysée par RMN du proton 1H et du carbone ^{13}C sans pouvoir être identifiée. Le produit obtenu est sûrement multisalin. Des essais de neutralisation par différentes bases comme la soude, la triéthylamine, le carbonate de soude ou de potassium ont été tentés, mais jamais le produit final n'a été isolé ni même détecté par spectrométrie de masse.

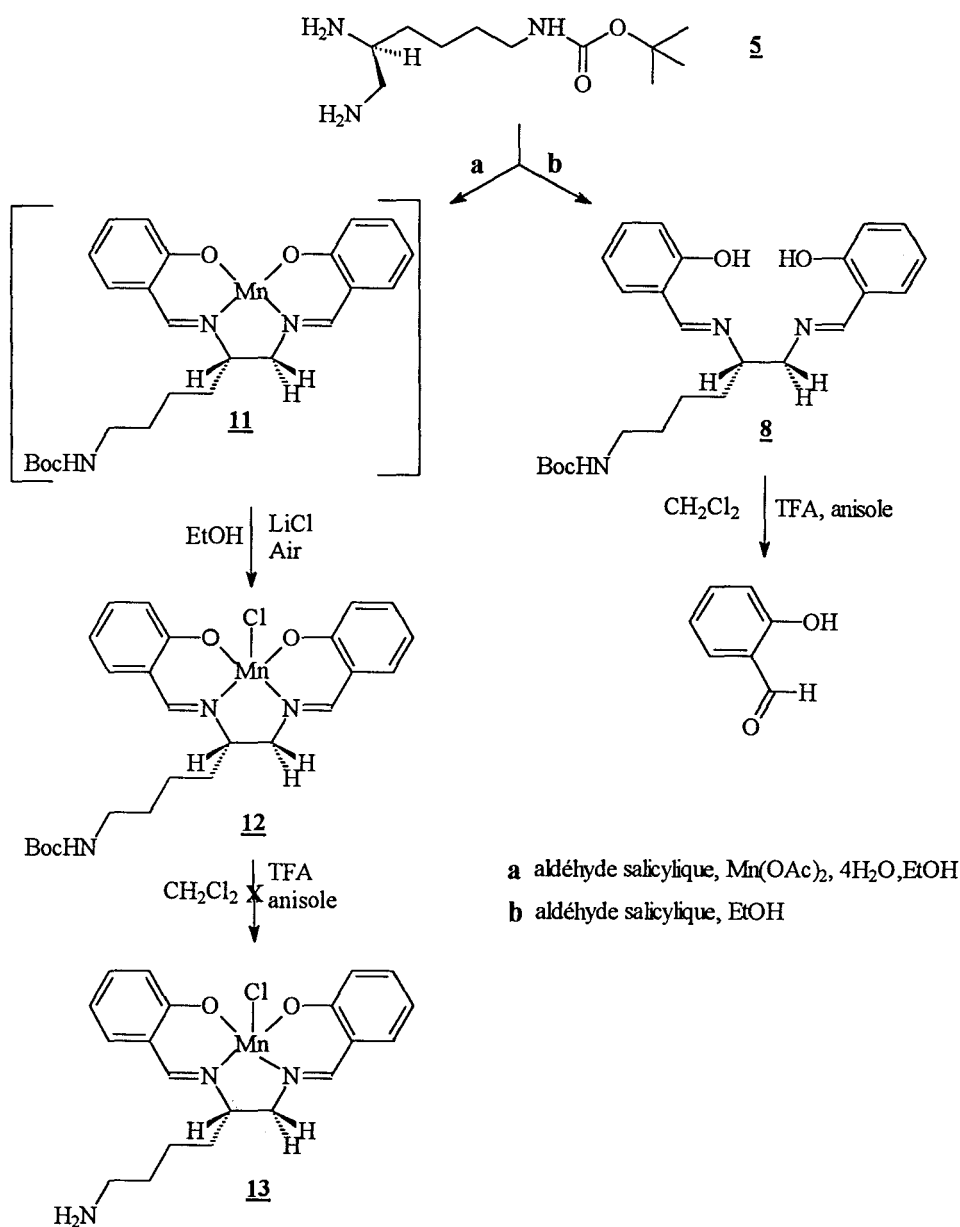


Figure 22 : synthèse du salène complexé par le manganèse (III) **13**.

Une voie de synthèse un peu différente a été envisagée, avec une complexation finale, après déprotection du salène. Après avoir obtenu le ligand seul **8**, sa déprotection est tentée par les méthodes classiques déjà énoncées ainsi que par une méthode catalytique au nitrate d'ammonium et de cérium^{61,74} (CAN, $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$, sans donner le résultat escompté).

La déprotection au CAN fait intervenir un cycle catalytique d'oxydo-réduction du cérium. Ce cycle catalytique (figure 23) fait intervenir l'oxydation du groupe carbonyle du groupement Boc en un radical cation tandis que le cérium passe du degré d'oxydation (IV) au degré (III). Le seul produit caractérisé, après déprotection par les trois agents classiques déjà énoncés, est l'aldéhyde salicylique provenant de la coupure des fonctions imines.

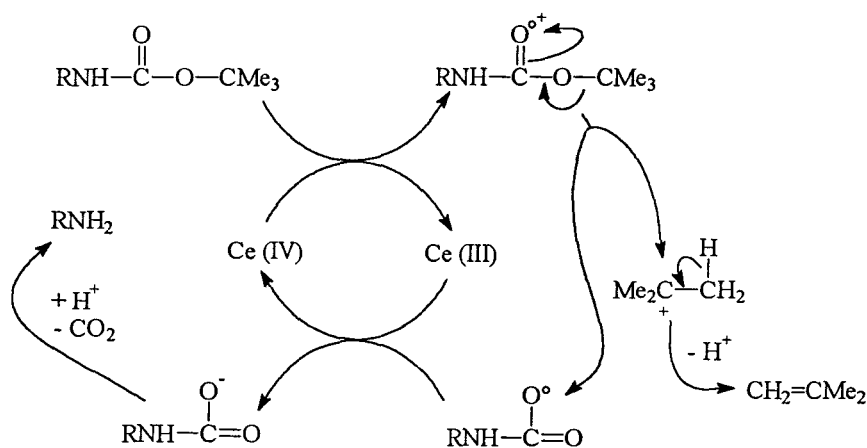


Figure 23 : cycle catalytique de déprotection du groupement *ter*butyloxycarbonyle par le CAN.

Le schéma de synthèse a été revu (figure 25) pour employer une protection de la chaîne latérale compatible avec les fonctions imines c'est-à-dire un groupement protecteur se coupant en milieu basique. L'emploi du FMOC est tout de suite écarté, car les transformations successives nécessaires pour atteindre la β diamine font appel à une réduction catalytique ainsi qu'à des bases auxquelles le groupement FMOC est sensible.

Le choix de protection de la chaîne latérale s'est porté sur le groupement phthalyle^{75,76} (figure 24). L'amide **2** est déprotégée par l'acide trifluoroacétique en présence d'anisole pour obtenir le sel d'ammonium quaternaire **14** avec un rendement de 100 %.

Ce sel d'ammonium quaternaire est mis en réaction avec l'anhydride phtalique en présence de triéthylamine. Malheureusement, cette voie n'a donné le résultat attendu qu'avec des rendements de 25 %. La réaction a ensuite été mise en oeuvre avec le N-carbéthoxyphtalimide, réactif conçu pour réaliser la protection par un groupement phtalyle des amines primaires des chaînes latérales des acides aminés. Le produit **15** est obtenu avec 82 % de rendement. Le mécanisme de protection de ce réactif permet d'éviter l'apparition d'un acide carboxylique difficilement déshydratable lors de l'utilisation de l'anhydride phtalique⁷⁶.

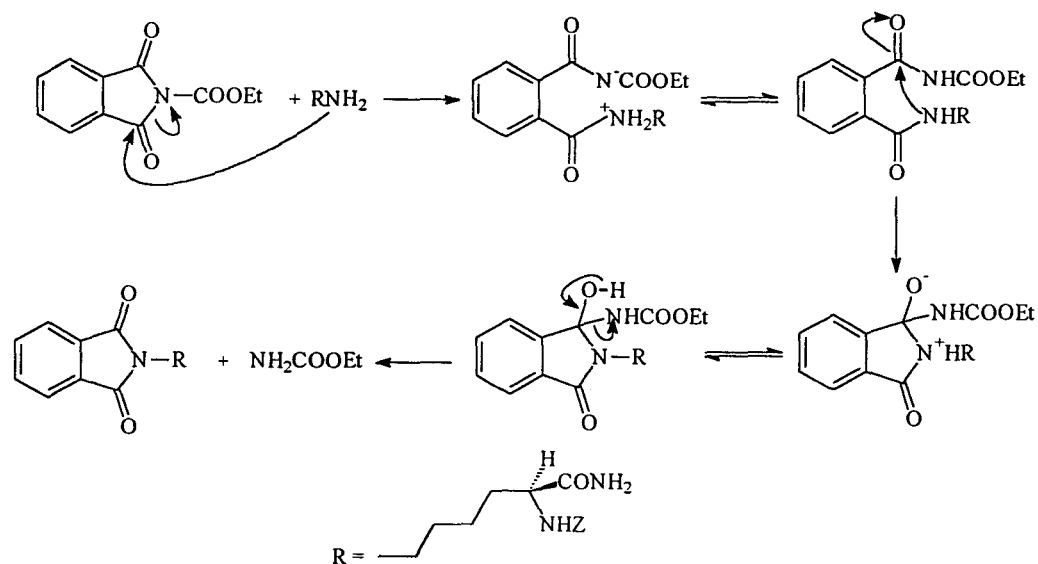


Figure 24 : mécanisme de phtalylation.

La fonction amide primaire de ce dérivé phtalylé **15** subit alors une déshydratation en nitrile **16** grâce à l'anhydride trifluoroacétique. Le produit **16** est obtenu avec un rendement de 74 %.

La réduction de la fonction nitrile et la coupure de la fonction benzyloxycarbone en autoclave ont été effectuées sous 50 atmosphères, à 50 °C sans ajout d'ammoniac, car le groupement phtalyle est sensible à celui-ci. La β diamine phtalylée sur la chaîne latérale **18** n'est pas obtenue. Seuls des sous-produits de réaction ou de dégradation du synthon ont été isolés. L'utilisation de l'ammoniac ou de la potasse dans l'autoclave en présence du produit **16** n'a pas non plus donné le produit de réaction attendu. Le groupement phtalyle subit l'attaque de l'ammoniac ou de la potasse.

Une autre voie de synthèse a alors été tentée, en utilisant toujours le groupement phtalyle, mais à un autre stade de la synthèse. Cette voie allonge le schéma de synthèse et joue sur les systèmes de protection et déprotection des groupements benzyloxycarbonyle et *ter*butyloxycarbonyle. Initialement, le nitrile **3** est réduit et la fonction benzyloxycarbonyle est coupée en même temps, par un temps de séjour important en autoclave, en présence de nickel de Raney et d'ammoniac.

Dans cette modification du schéma de synthèse (figure 26), seule la fonction nitrile du composé **3** est réduite en diminuant le temps de séjour en autoclave à 6 heures. Le dérivé amine **4** obtenu est ensuite protégé par l'intervention du chloroformiate de benzyle. Le dérivé **19** est obtenu avec le rendement de 93 %. Ce produit est une triamine dont les fonctions en α et β sont protégées par le groupement benzyloxycarbonyle tandis que l'amine de la chaîne latérale est bloquée par un groupement *ter*butyloxycarbonyle. Ce groupement *t*Boc est alors coupé par l'action d'acide trifluoroacétique, en présence d'anisole pour obtenir le produit **20** avec un rendement de 92 %.

Les étapes ultérieures sont en cours de réalisation. Le sel trifluoroacétique obtenu sera neutralisé en présence de triéthylamine et la fonction amine sera protégée par un groupement phtalyle. Les fonctions benzyloxycarbonyle seront alors déprotégées sous pression d'une atmosphère d'hydrogène et en présence de palladium sur charbon. La β diamine **18** bloquée sur sa chaîne latérale par un groupement phtalyle sera ainsi obtenue. La réaction de cette diamine avec l'aldéhyde salicylique (figure 27) donnera le ligand **22** protégé par le groupement phtalyle. Ce ligand sera déprotégé⁷⁷ en présence d'hydrazine, puis complexé par le manganèse pour donner le produit **13**.

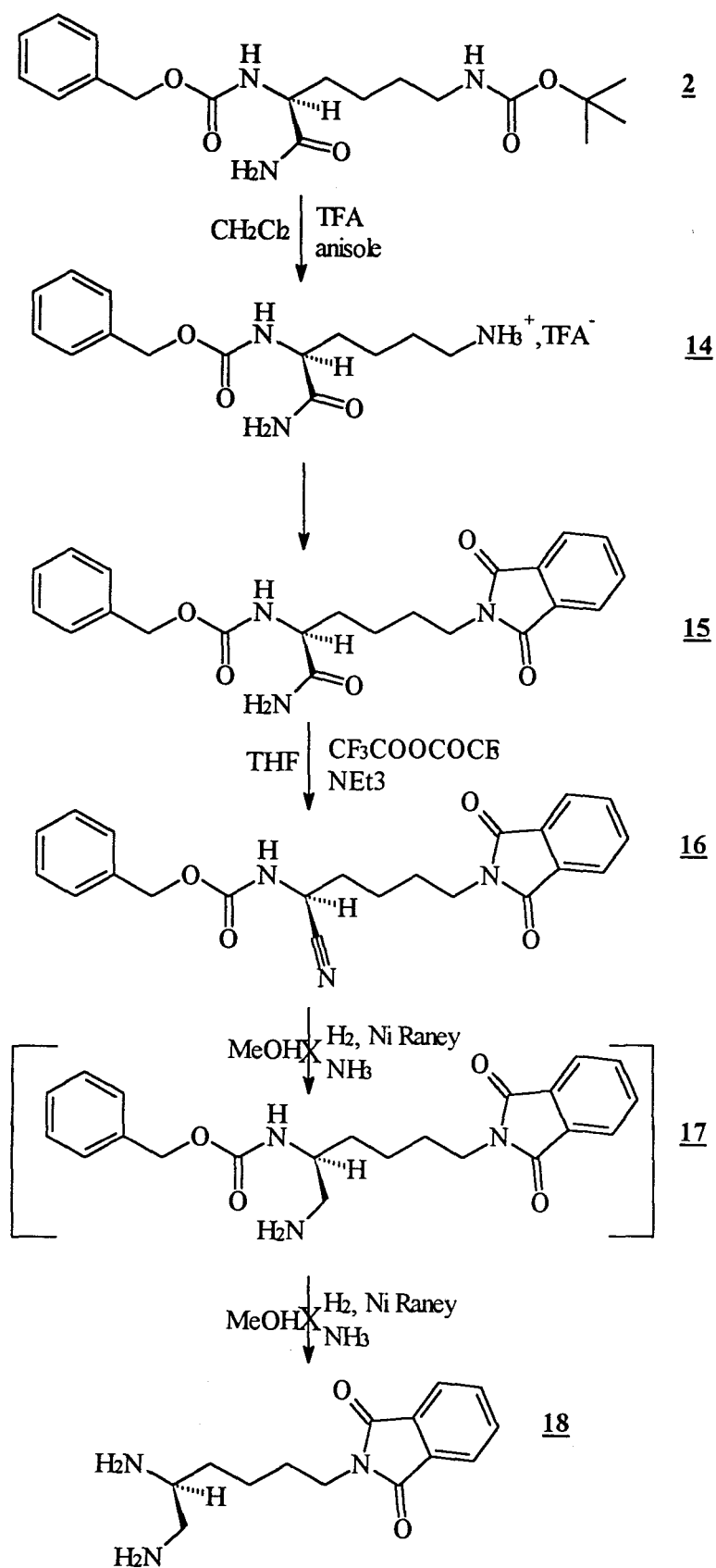


Figure 25 : alternative de synthèse différente pour l' α,β diamine phtalylée 18 à partir de la $N\alpha$ -Z-N ϵ -Boc lysinamide 2.

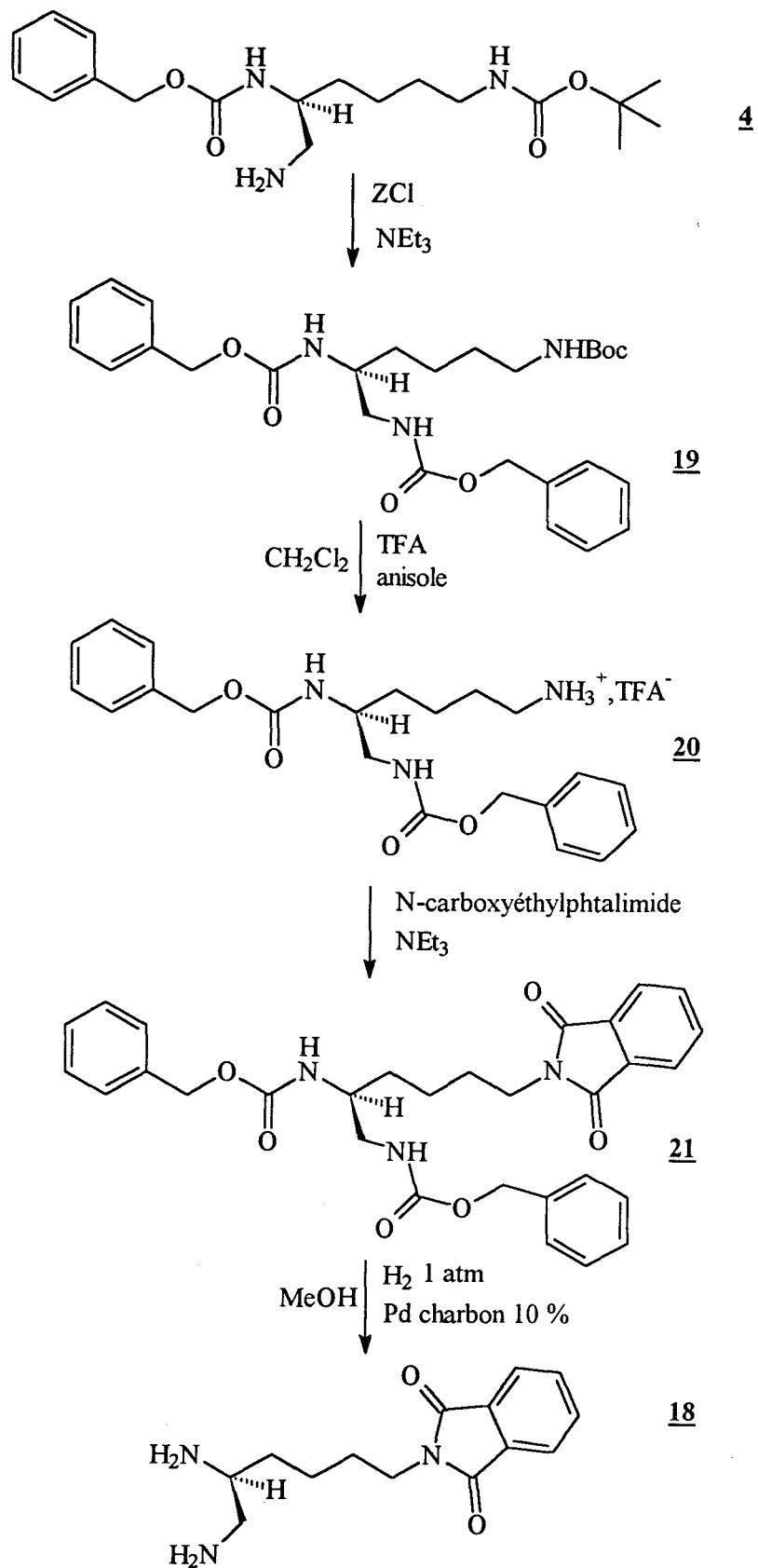


Figure 26 : alternative de synthèse pour l' α,β diamine phталylée **18** à partir de l' amine **4**.

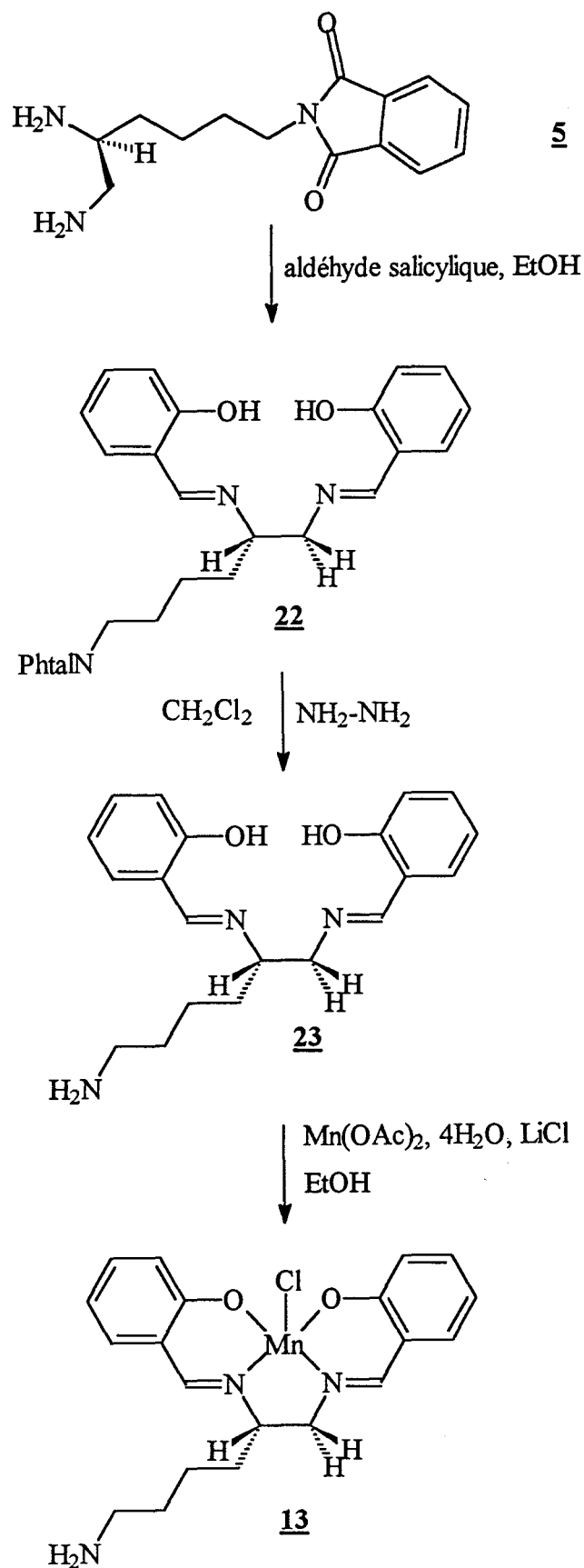


Figure 27 : obtention du salène déprotégé complexé par le manganèse (III) 13.

II.2. Résonance paramagnétique électronique R.P.E. : étude des complexes.

II.2.1. Principe.

La résonance paramagnétique électronique permet de mettre en évidence l'existence et la structure de nombreux complexes métalliques paramagnétiques. Cette technique est en effet sensible aux espèces possédant des électrons non appariés et donne des informations sur leur état d'oxydation et sur leur environnement.

Sous l'action d'un champ magnétique H , la dégénérescence des niveaux d'énergie de nombre quantique magnétique différent est levée. Les transitions observées ont lieu entre ces niveaux et seront obtenues par l'absorption d'une fréquence caractéristique dans le domaine des micro-ondes. La résonance se produira alors pour un champ qui satisfera l'équation fondamentale $h.\nu = g.\beta.H$.

II.2.2. Etude R.P.E. des salènes complexés par le cuivre 6 et 9.

Le cuivre (II) possède 9 électrons d qui, appariés au maximum, lui confèrent un spin total $S = 1/2$. On admet habituellement que les ligands entourant l'ion Cu^{2+} sont disposés selon un arrangement octaédrique distordu, avec quatre ligands dans un plan incluant l'ion Cu^{2+} et deux autres ligands en position axiale perpendiculaires à ce plan.

Ces ligands axiaux sont généralement peu liés à l'ion cuivrique et joueront un rôle mineur dans les propriétés magnétiques et optiques des complexes cuivriques. Si l'on néglige les ligands axiaux on se trouvera donc dans un environnement plan carré dans le cas où Cu^{2+} est localisé dans le plan des quatre ligands axiaux ou pyramidal dans le cas où Cu^{2+} est en dehors du plan des ligands.

Ce genre d'environnement conduit à des spectres RPE de « type axial », avec une absorption importante à champ élevé caractérisé par une valeur g_{\perp} et une absorption plus faible à champ faible caractérisée par une valeur g_{\parallel} .

Les isotopes 63 et 65 du cuivre ont un spin nucléaire $I = 3/2$. On obtiendra donc une structure hyperfine à 4 raies, caractérisée par une constante de couplage A_{\perp} à champ élevé et une constante de couplage A_{\parallel} à champ faible. La constante hyperfine A_{\perp} est généralement très petite, ce qui rend difficile sa détermination expérimentale.

En résumé, la détermination de g_{\parallel} et A_{\parallel} sera facile à effectuer. La valeur de g_{\perp} sera mesurée plus ou moins facilement (difficilement dans le cas d'un mélange de spectres)⁷⁸. Ces différentes valeurs seront dépendantes de la nature des ligands et de leur disposition autour de l'ion cuivrique. En pratique, ne seront déterminées que les valeurs de A_{\parallel} et de $g_{\parallel} = g$, en utilisant la référence externe $g_{ref} = 2,0028$. La valeur de g se calculera par la relation $g = g_{ref} \cdot H_{ref} / H$. Les valeurs de g_{\parallel} et A_{\parallel} dépendront de la nature des ligands et de leur disposition autour de l'ion central Cu^{2+} .

Des solutions sont réalisées pour l'acétate de cuivre (II) monohydraté à $10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$ dans un mélange eau / DMSO 80 / 20, et pour les complexes **6** et **9** à $10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$ dans le DMSO. Les spectres R.P.E. sont enregistrés en solution gelée à 77 K. Les conditions opératoires sont: constante de temps 0,25 seconde, amplitude de modulation 8 G, fréquence de modulation 100 Khz, gain $5 \cdot 10^2$, puissance 10 mW, fréquence microonde 9,3 Ghz.

Le spectre obtenu avec l'acétate de cuivre (II) (figure 29 A) est caractérisé par un g_{\parallel} élevé 2,35 et une constante hyperfine A_{\parallel} de 137,5 gauss. Selon Peisach et Blumberg⁷⁹ de telles valeurs correspondent au complexe $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ en pH neutre ou légèrement acide.

Les spectres des salènes complexés par le cuivre (II) **6** et **9** (figures 29 B et C) ainsi que celui d'une référence (figure 29 D), le complexe de cuivre de la N,N'-bis(salicylidène éthylènediamine) ont été enregistrés dans les mêmes conditions que pour l'acétate de cuivre (II). Ils présentent les caractéristiques habituelles des complexes cuivriques monomoléculaires à l'état fondamental $d_x^2-y^2$ avec des valeurs A_{\parallel} autour de 190 gauss et g_{\parallel} autour de 2,22.

telles valeurs sont caractéristiques d'ions cuivriques liés à deux atomes d'azote et deux atomes d'oxygène⁷⁹.

Un comptage du nombre d'atome de cuivre (II) contenu dans les molécules a été réalisé. La valeur de la double intégration des spectres RPE est en effet une fonction du nombre d'ions cuivriques contenus dans la molécule. En utilisant les différentes solutions de même concentration et en ramenant la valeur des doubles intégrations à 1 pour le salène de référence (figure 28), des valeurs (tableau 2) proches de 1 sont obtenues pour les deux produits 6 et 9.

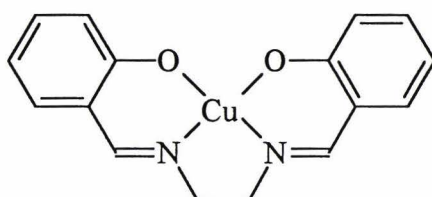


Figure 28 : salène N,N'-bis(salicylidène)-éthylènediamine complexé par de cuivre (II).

Produits	Valeur de la double intégration	$A_{//}$ (Gauss)	$g_{//}$
$\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6$	---	137,5	2,35
complexe cuivrique du salène de référence	1	191	2,21
<u>6</u>	1,06	192,5	2,22
<u>9</u>	1,03	191,25	2,23

Tableau 2 : valeurs de la double intégration des spectres RPE des complexes cuivriques par rapport à la référence fixée à 1; valeurs de $A_{//}$ et $g_{//}$.

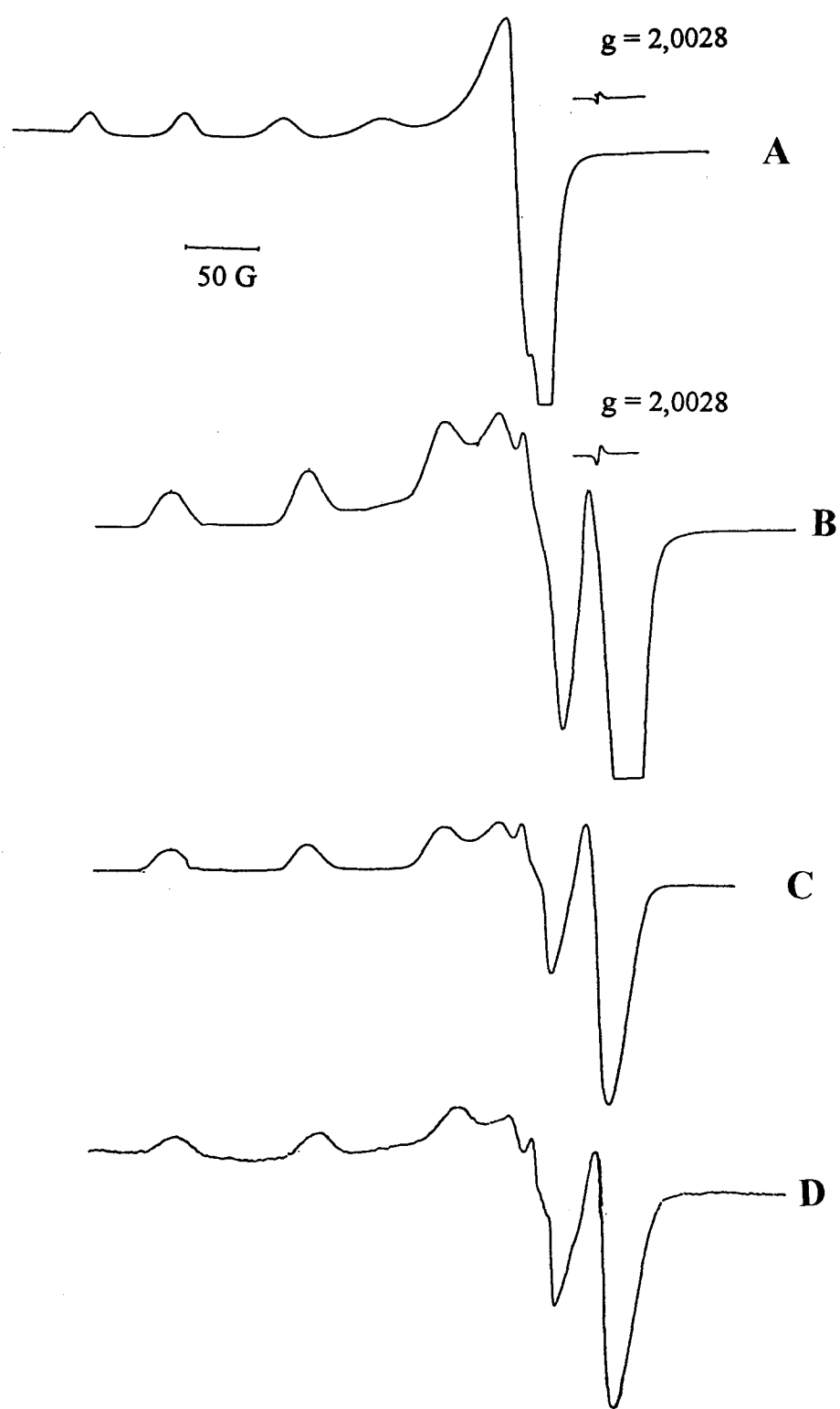


Figure 29 : exemple de spectres RPE obtenus avec:
A l'acétate de cuivre (II).
B le complexe 6.
C le complexe 2.
D la référence.

II.2.3. Etude R.P.E. du salène complexé par le manganèse 12.

Le manganèse est un des métaux de transition les plus abondants dans l'écorce terrestre et, par conséquent, il se rencontre dans de nombreuses enzymes⁸⁰. La majorité des enzymes à manganèse utilise cet ion au degré d'oxydation II et possède généralement un ion manganèse par site actif (superoxyde dismutase à manganèse par exemple).

Cependant, des enzymes à deux ions par site actif : émolase, concanavine A⁸¹ ont été étudiées ainsi que l'enzyme du photosystème II qui contient quatre ions manganèse par site actif⁸². Pour tous ces cas, la proximité de plusieurs ions manganèse est responsable des interactions dipolaires et d'échange qui détermineront les propriétés magnétiques de ces molécules complexes.

Dans le cas de notre étude, les salènes à manganèse synthétisés sont mononucléaires. Nous limiterons donc notre étude à ce cas relativement simple, en envisageant les principaux degrés d'oxydation.

II.2.3.1. Le manganèse de degré d'oxydation (II).

A ce degré d'oxydation le manganèse est dans une configuration d^5 à haut spin. Cela entraîne un « quenching » du moment cinétique orbital qui se traduit par une valeur de g quasiment isotrope autour de la valeur 2.

En solution aqueuse, Mn^{2+} est complexé par 6 molécules d'eau avec une géométrie octaédrique. En phase liquide, l'agitation moléculaire et le haut degré de symétrie entraînent la nullité des « paramètres en champ nul » D et E (zéro field splitting).

Le spin électronique total de Mn^{2+} est de $5/2$ ainsi que le spin nucléaire du ^{55}Mn . On a donc au total 36 états de spin, en tenant compte à la fois du spin nucléaire et du spin électronique. Ces 36 états de spin sont dégénérés en absence de champ magnétique extérieur, et en respectant la règle de non-changement de spin nucléaire, trente transitions sont théoriquement possibles.

En présence d'un champ magnétique extérieur, les 5 transitions $\Delta M_s = \pm 1$ se produiront à la même énergie. On observera donc uniquement le couplage hyperfin dû au manganèse, soit 6 raies, chacune de ces raies renfermant 5 transitions.

Quand Mn^{2+} est lié à une protéine ou à des ligands organiques volumineux, l'abaissement de la symétrie et le ralentissement des mouvements moléculaires font que les paramètres en champ nul (ZFS) deviennent différents de zéro. Dans ce cas, les cinq transitions $\Delta M_s = \pm 1$ se produiront à des énergies différentes et l'allure du spectre dépendra essentiellement de la valeur du paramètre en champ nul D .

On pourra donc observer trois types de spectres:

○ si $D \ll h\nu$, toutes les transitions de structure fine sont accessibles, mais on ne verra pratiquement que la transition $M_s = -\frac{1}{2} \leftrightarrow M_s = +\frac{1}{2}$, les autres transitions étant très fortement élargies. En phase liquide, on aura pratiquement l'allure du complexe $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$, soit 6 raies situées aux environs de $g = 2$ avec cependant une surface d'intégration 5 fois plus faible que pour l'hexaaquamanganèse.

○ si $D \gg h\nu$, on a une très forte anisotropie et de grandes vitesses de relaxation. Les raies très élargies ne sont généralement pas visibles à température ambiante. La valeur élevée de D ne rend observable que la transition $M_s = -\frac{1}{2} \leftrightarrow M_s = +\frac{1}{2}$ mais, contrairement au cas précédent, on a ici une forte anisotropie. On peut résumer les principales caractéristiques RPE obtenues en bande X en fonction de la symétrie du système⁸³:

- * système à symétrie cubique: une simple raie voisine de $g = 2$.
- * système à symétrie axiale: 2 raies autour de $g_{\parallel} = 2$ et $g_{\perp} = 6$.
- * système à symétrie orthorhombique où $E = D/3$: une seule raie vers $g = 4,27$.

On retrouve ainsi l'essentiel des résultats observés pour le Fer(III) (même configuration d^5).

○ si $D \cong h\nu$, les spectres en bande X seront très difficilement observables. On aura intérêt à travailler en bande Q car on reviendra alors au premier cas avec $D < h\nu$.

II.2.3.2. Le manganèse de degré d'oxydation (III).

Il y a très peu d'observations RPE du manganèse (III). En général, les valeurs des paramètres en champ nul sont très importantes et empêchent ainsi toute observation en bande X puisque le niveau $M_s = 0$ n'est pas dégénéré.

II.2.3.3. Le manganèse de degré d'oxydation (IV).

On a ici 4 états de spins électroniques $-3/2, -1/2, +1/2, +3/2$, qui vont se répartir en deux doublets de Kramer. Même si les paramètres en champ nul sont supérieurs à $h\nu$, la transition $M_s = +1/2 \leftrightarrow M_s = -1/2$ sera toujours visible. Comme pour le manganèse (II), le manganèse (IV) pourra être traité comme un pseudo système à spin $1/2$. Dans le cas d'un système à symétrie axiale, on observera deux raies ayant les valeurs $g_{\parallel} = 2$ et $g_{\perp} = 4$. On rencontrera ce cas dans les porphyrines à manganèse⁸⁴.

II.2.3.4. Résultats obtenus avec le salène complexé par le manganèse 12.

Une solution d'acétate de manganèse à 10^{-2} mol.l⁻¹ est réalisée dans le DMSO puis congelée à 77 K. Les conditions opératoires sont: constante de temps 0,25 seconde, amplitude de modulation 8 G, fréquence de modulation 100 Khz, gain $2 \cdot 10^3$, puissance 10 mW, fréquence microonde 9,31 Ghz.

Ce spectre montre la transition $M_s = 1/2 \leftrightarrow M_s = -1/2$ vers $g = 2$, avec les 6 raies du couplage hyperfin dû au manganèse. Ce spectre est caractéristique du manganèse de degré d'oxydation (II) (figure 31 A).

Nous avons enregistré les spectres RPE du salène complexé par le manganèse 12 avec un gain de 10^4 (figure 31 B) et du salène commercial (figure 30) pour lequel le manganèse est au degré d'oxydation (III) (figure 31 C), avec un gain cinq fois plus fort.

Aucun signal n'est observé, ce qui confirme le passage au degré d'oxydation (III) du manganèse contenu dans le produit 12.

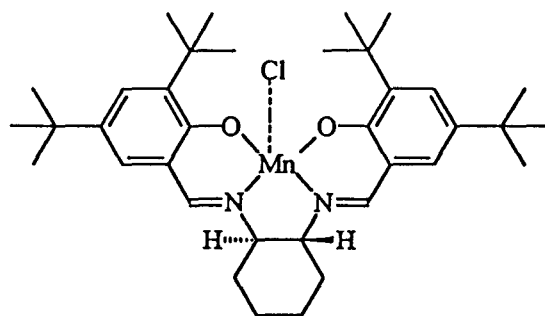


Figure 30 : structure du produit commercial complexé par du manganèse (III): le complexe de manganèse du (S,S)-(+)-N,N'-bis(3,5-di-*tert*-butylsalicylidène)-1,2-cyclo-hexane diamine.

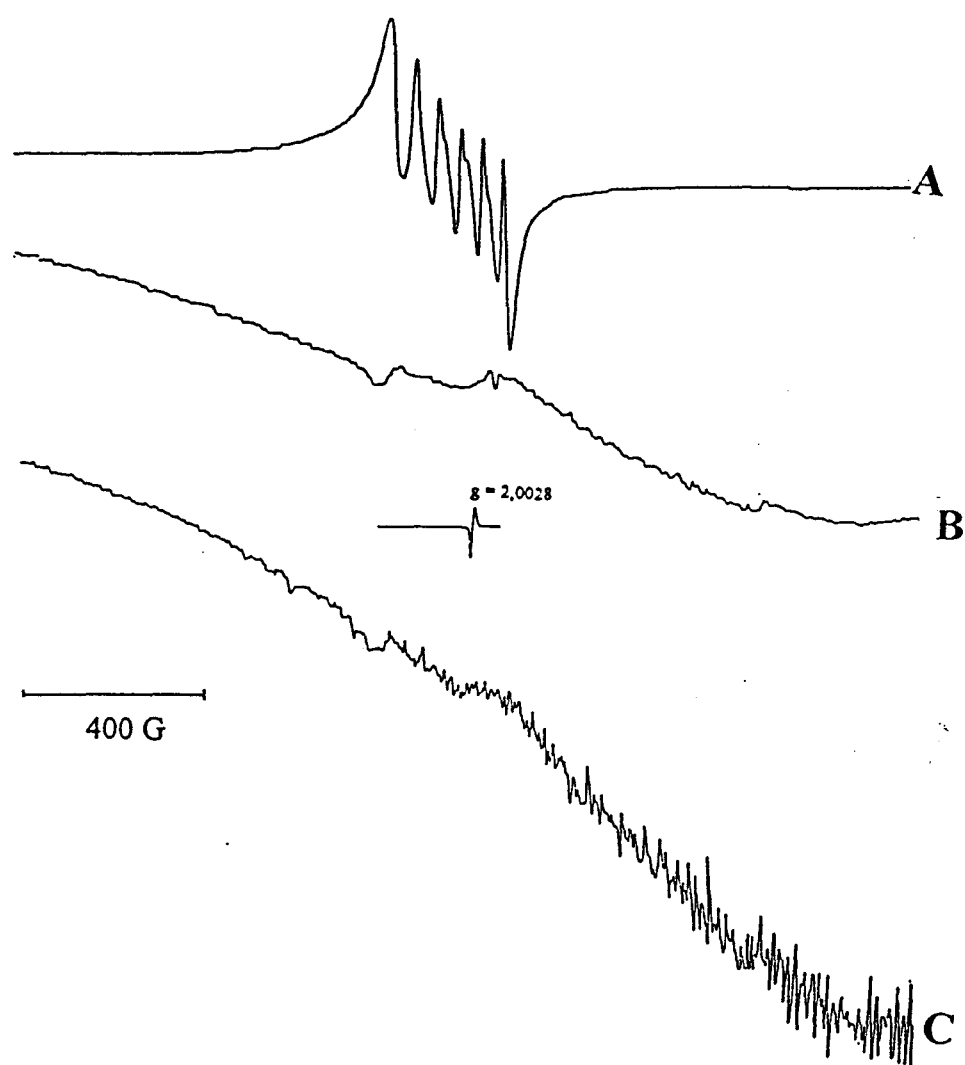


Figure 31 : spectres de l'acétate de manganèse (A) et du salène 12 (B) et du salène commercial (C).

II.2.4. Production de radicaux libres.

Une étude de production de radicaux libres a été menée sur les salènes complexés par le cuivre (II) et le nickel (II), en utilisant le DMPO (5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxyde) comme agent piègeur de radicaux libres⁸⁵.

II.2.4.1. Méthode.

La formation de radicaux libres peut être détectée par RPE si la durée de vie de ces radicaux est suffisamment longue. Des renseignements concernant leur environnement et leur liberté de mouvement peuvent être obtenus. En revanche, la mise en évidence d'espèces radicalaires transitoires, de courte durée de vie, nécessite l'emploi de la technique du « spin-trapping » ou piégeage de radicaux libres. Cette technique utilise la propriété qu' a un composé diamagnétique, ici le DMPO (figure 32), de capter les radicaux libres produits dans le milieu réactionnel, pour former un adduit paramagnétique facilement détectable en RPE. Selon le radical capté, ce spin adduit possède une structure et un spectre RPE différents. Ces différences permettent ainsi de déduire quelles sont les espèces radicalaires produites lors de l'expérience.

Dans le cas des salènes, des solutions à 10^{-2} mol.l⁻¹ dans le DMSO ont été préparées. Un témoin contenant uniquement du DMSO a été lui aussi réalisé. Pour capter les radicaux libres produits, du DMPO est ajouté à chaque tube. Puis pendant 4 minutes, on place la solution sous courant gazeux d'oxygène. Un autre témoin consistant en une solution contenant le produit et le DMPO dans le DMSO est placé sous courant d'azote de type U pendant 4 minutes.

Si des radicaux libres sont produits à partir de l'oxygène, il ne peut s'agir que des anions superoxyde O_2° ou des radicaux hydroxyle OH° . Seuls les adduits DMPO-OOH et DMPO-OH doivent alors être observés (figure 33). Mais l'adduit DMPO-OOH se transforme spontanément en DMPO-OH, ce qui gêne la caractérisation du radical. Les radicaux hydroxyle réagissent avec le DMSO en générant des radicaux CH_3° qui forment l'adduit DMPO- CH_3 (figure 33) en plus de l'adduit normal DMPO-OH. On peut attribuer l'adduit DMPO-OH à une

production d' OH° que lorsqu'il existe conjointement avec l'adduit DMPO-CH_3 . Sinon, l'adduit DMPO-OH provient vraisemblablement de la décomposition de l'adduit DMPO-OOH .

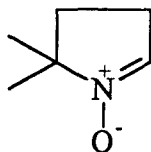
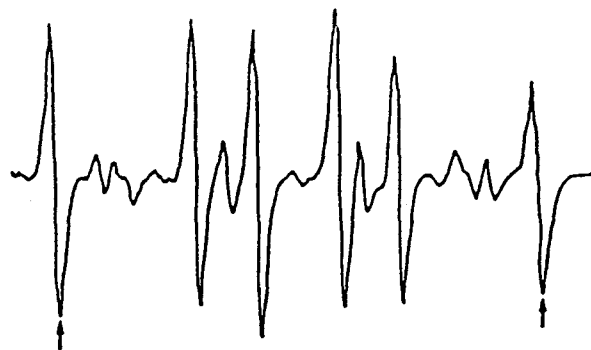
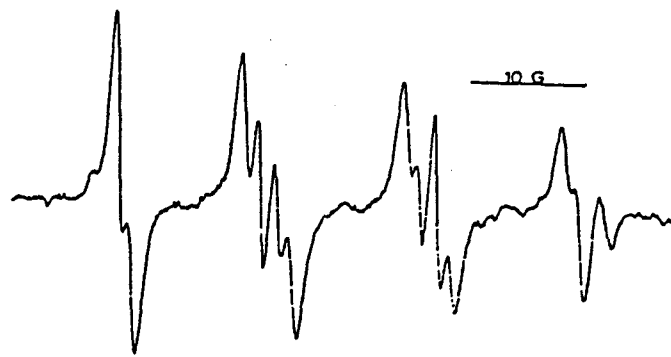


Figure 32 : structure du DMPO



DMPO-CH_3 $A_N = 16 \text{ G}$, $A_H = 23 \text{ G}$



DMPO-OOH $A_N = 14,2 \text{ G}$; $A_H^\alpha = 11,6 \text{ G}$; $A_H^\beta = 1,2 \text{ G}$



DMPO-OH $A_N = 14,8 \text{ G}$; $A_H = 14,8 \text{ G}$

Figure 33 : spectres RPE des différents adduits du DMPO.

II.2.4.2. Résultats obtenus avec le salène complexé par le cuivre (II) **9**.

Des solutions du complexe **9** sont réalisées à 10^{-3} mol.l⁻¹ dans le DMSO. Après passage sous courant d'azote pour le témoin, sous courant d'oxygène pendant 4 minutes pour la solution expérimentale, les spectres R.P.E. sont enregistrés. Les conditions opératoires sont: constante de temps 0,25 seconde, amplitude de modulation 8 G, fréquence de modulation 100 Khz, gain $8 \cdot 10^4$, puissance 10 mW, fréquence microonde 9,44 Ghz.

Les spectres obtenus (figure 34) avec le complexe de cuivre (II) sont caractéristiques de l'adduit DMPO-OH (bandes hyperfines d'intensité 1 : 2 : 2 : 1; $a_N = a_H = 14,8$ G). N'ayant pas de signaux correspondant au DMPO-CH₃ (six bandes d'intensité égales), il est possible de conclure que le signal observé provient de la production d'anion superoxyde O₂⁻. En revanche, aucun signal n'a été observé avec les témoins et le salène complexé par le nickel (II).

Le fait que le complexe de cuivre (II) puisse interagir avec l'oxygène pour produire des radicaux libres oxygénés laisse entrevoir de bonnes possibilités concernant l'activité de nucléase de ce produit.

Aucune espèce radicalaire n'a été mise en évidence avec les salènes complexés par le nickel (II) dans les mêmes conditions que précédemment. Si ces produits génèrent eux aussi une activité nucléasique, celle-ci aura lieu par un processus autre que la production de radicaux libres oxygénés.

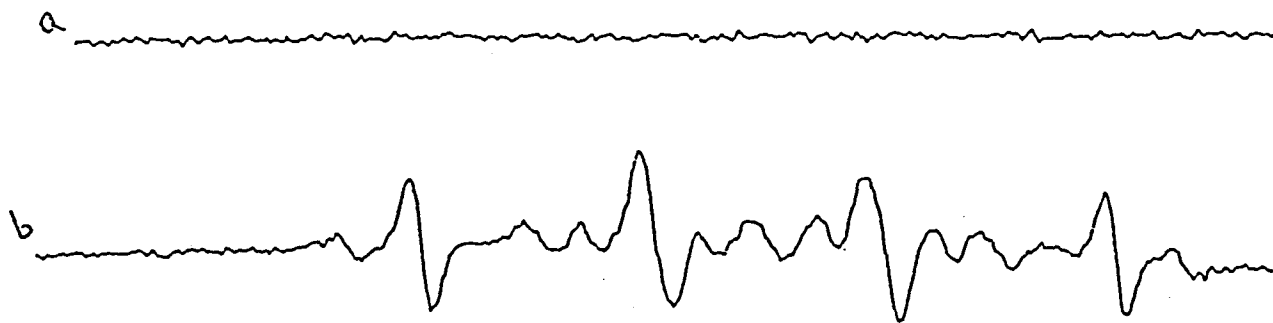


Figure 34 : spectres RPE obtenus (a) en présence de DMPO seul avec un courant d'oxygène de 4 minutes; (b) en présence de salène **9**, de DMPO sous courant d'oxygène pendant 4 minutes.

II.3. Spectroscopie U.V.-Visible des salènes.

Pour obtenir des complexes du ligand **8**, il a semblé nécessaire de connaître ses propriétés et la complexation. Dans ce but le ligand seul a été étudié par spectroscopie U.V. et le pKa de ses fonctions phénoliques a été déterminé. Dans une seconde étude, après avoir obtenu les salènes complexés par le cuivre (II), le nickel (II) et le manganèse (III), les constantes d'association des différents métaux avec le ligand salène ont été déterminées par spectroscopie UV-visible.

II.3.1. Détermination du pKa du ligand **8**.

II.3.1.1. Spectres U.V. du ligand **8**.

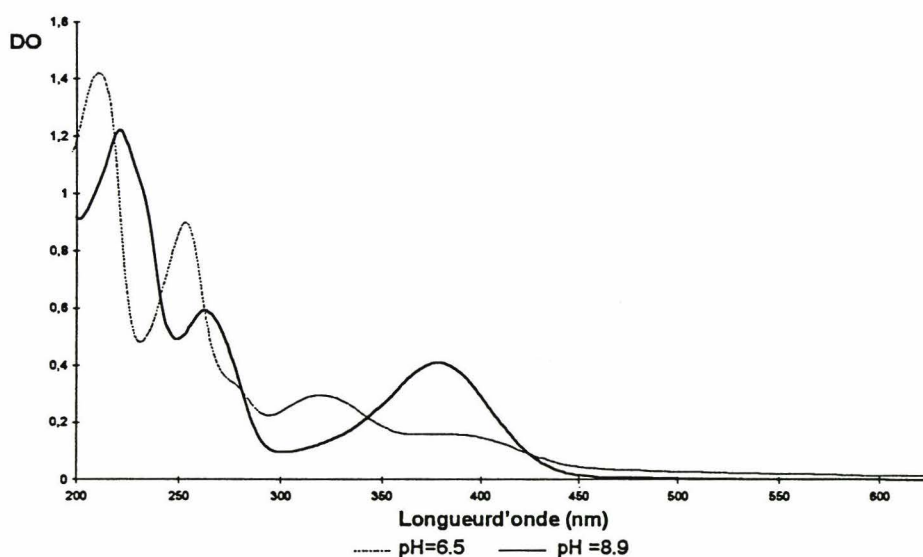


Figure 35 : spectre U.V. du ligand à 10^{-3} mol.l⁻¹ en solution dans le mélange eau / éthanol 90 / 10, à pH = 6,5 et 8,9.

Une nette différence de spectre du ligand est visible lors du changement de pH (figure 35). Ceci est essentiellement dû à la perte des protons des fonctions phénol du ligand **8**.

Cette différence spectrale est surtout interprétable pour les bandes situées entre 300 et 400 nm. A pH légèrement acide (pH = 6,5), deux bandes sont apparentes à 384 et 323 nm tandis qu'à pH basique (pH = 8,9), seule la bande à 378 nm est observable. Ces bandes sont donc directement reliées au passage de la forme phénol à la forme phénolate.

De plus, dans la zone spectrale entre 200 et 300 nm, seules deux bandes d'absorption sont visibles. La bande située à 213 nm à pH acide subit un effet bathochrome en milieu basique. Le ligand absorbe alors à 221 nm. Une bande à 256 nm, pratiquement constante (différence inférieure à 5 nm entre les deux spectres), reste en revanche présente à la fois en milieu basique et en milieu acide. Ces deux bandes ne sont donc pas liées au changement d'état du ligand.

II.3.1.2. Application de la méthode de HENDERSON - HASSELBACH⁸⁶.

Cette méthode repose sur l'étude de la variation du coefficient d'absorption en fonction du pH à une longueur d'onde fixe. La bande d'absorption située à 256 nm est toujours présente lors des variations de pH mais fluctue en absorbance au cours de l'équilibre. En travaillant à cette longueur d'onde, le pK_a a été déterminé selon la méthode de HENDERSON - HASSELBACH.

Principe.

Un équilibre acido basique est généralement décrit par la concentration totale en soluté:

$$C_0 = C_{B^-} + C_{BH} \quad (1)$$

La constante d'équilibre est donnée par la relation :

$$K_a = C_{B^-}(H_3O^+) / C_{BH} \quad (2)$$

L'absorbance A est donnée dans une cuve de 1 cm par :

$$A_{obs} = A_{BH} + A_{B^-} = \epsilon_{BH}C_{BH} + \epsilon_{B^-}C_{B^-} \quad (3)$$

En combinant (1) et (3) C_{B^-} et C_{BH} sont obtenus et introduits dans (2) pour obtenir :

$$K_a = [(A_{obs} - \epsilon_{BH}C_0) / (\epsilon_{B^-}C_0 - A_{obs})] (H_3O^+)$$

$\epsilon_{BH}C_0$ représente l'absorbance de la solution en milieu acide (forme protonée) et $\epsilon_{B^-}C_0$ représente l'absorbance de la solution en milieu basique (forme déprotonée).

On peut déduire de ces relations pour la détermination du pK_a :

$$pH = pK_a + \log [(A_{max} - A) / (A - A_{min})]$$

A_{max} représente l'absorbance du soluté à un pH acide, A représente l'absorbance du soluté au pH expérimental et A_{min} représente l'absorbance du soluté à un pH basique.

Méthode.

Une solution 10^{-3} molaire du ligand **8** est réalisée. Le solvant utilisé est une solution aqueuse à 10 % en méthanol. L'addition d'acide perchlorique permet l'obtention du $\text{pH} = 1$. Le balayage en pH est effectué par ajouts de faibles quantités de solution de soude concentrée. L'utilisation de micropipettes permet de s'affranchir de la variation de volume. L'avantage de l'utilisation du couple $\text{HClO} / \text{ClO}^- \text{Na}^+$ est que celui-ci n'interfère que très peu avec les substrats ou avec les métaux lors des réactions de complexation. La courbe obtenue en traçant pH en fonction de A montre un point d'inflexion (figure 36). La dérivée seconde (figure 37) de cette équation à $\text{pH} = \text{pK}_a$ est nulle car elle correspond au point d'inflexion de la courbe. Il apparaît une valeur pour laquelle la dérivée seconde s'annule. Ce point correspond à :

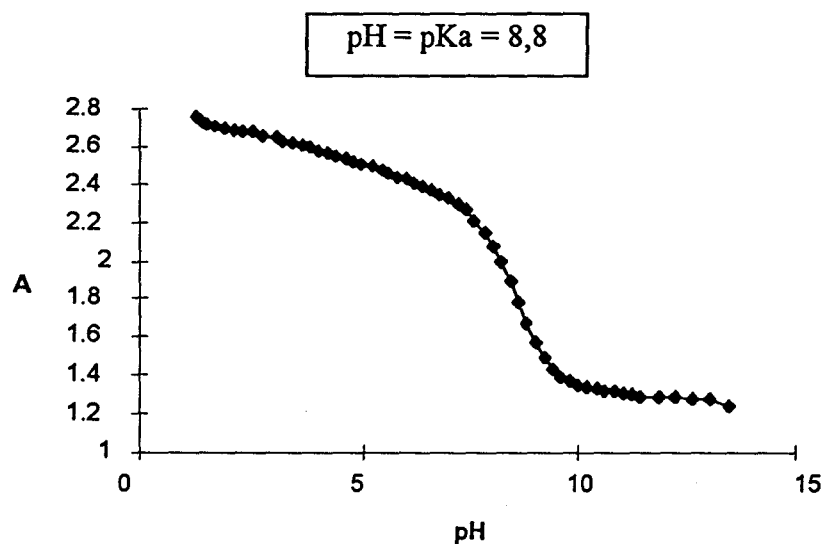


Figure 36 : variation de l'absorbance A du ligand **8** en fonction du pH à 256 nm.

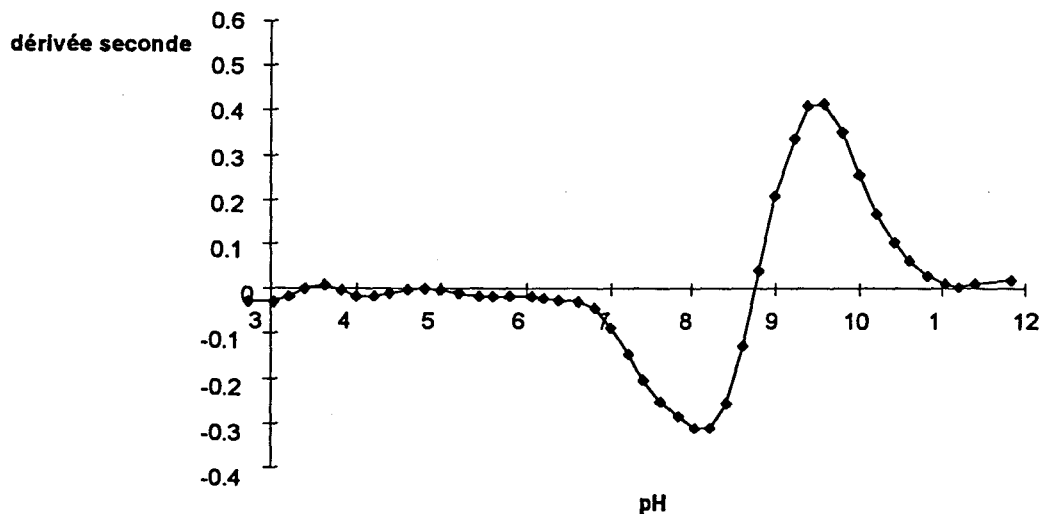


Figure 37 : représentation de la dérivée seconde en fonction du pH .

II.3.2. Etude U.V. de la complexation.

La formation d'un complexe métallique se traduit par un changement du spectre d'absorption de l'ion métallique et du ligand.

Les transitions observées sont de deux types : les transitions d-d dues à l'ion métallique dans la région du visible et, dans la région des ultraviolets, les transitions résultant de transferts d'électrons entre le ligand et le métal (transfert de charge) ainsi que les transitions intraligands (généralement du type $\pi \rightarrow \pi^*$ ou $\sigma \rightarrow \sigma^*$).

- Transitions issues du métal.

Les transitions d-d sont généralement de faible intensité. Elles permettent d'obtenir des informations quand à la structure du complexe formé.

La région des transitions électroniques relatives aux orbitales d du métal, transition d-d se situe pour $\lambda > 400$ nm.

- Autres transitions.

- Transitions par transfert de charge.

Les bandes de transfert de charge sont souvent observées comme des épaulements dans les spectres d'absorption. Ces bandes sont associées au transfert d'un électron d'une orbitale d'un atome vers une orbitale d'un autre atome. Des transitions $L \rightarrow M$ ou $M \rightarrow L$ sont observées⁸⁷. La région des transitions électroniques par transfert de charge se situe à une longueur d'onde comprise entre 230 et 350 nm.

- Transitions intraligands.

La région des transitions intraligands se situe à $\lambda < 250$ nm.

Afin d'étudier la complexation du métal par le ligand, il a fallu déterminer des bandes d'absorption permettant d'observer l'évolution de la complexation. Les superpositions des spectres U.V. du ligand seul et des complexes déjà formés, donnent les valeurs des absorbances correspondant à un maximum pour les complexes et à un minimum pour le ligand et ce à la fois à pH acide et basique.

Dans le cas du salène complexé par le cuivre (II) (figure 38), les bandes d'absorption maximales à 243 nm et à 357 nm correspondent à des vallées pour le ligand, que ce soit en milieu acide ou basique. Ces deux bandes d'absorption permettent l'observation des phénomènes de complexation du cuivre (II) par le ligand **8**.

Pour les mêmes raisons, l'étude de la complexation du salène par le nickel (II) (figure 39) a été effectuée grâce aux bandes d'absorption à 244 nm et à 324 nm. Enfin l'étude de la complexation du salène par le manganèse (II) (figure 40) a été réalisée avec les bandes situées à 240 nm et à 314 nm.

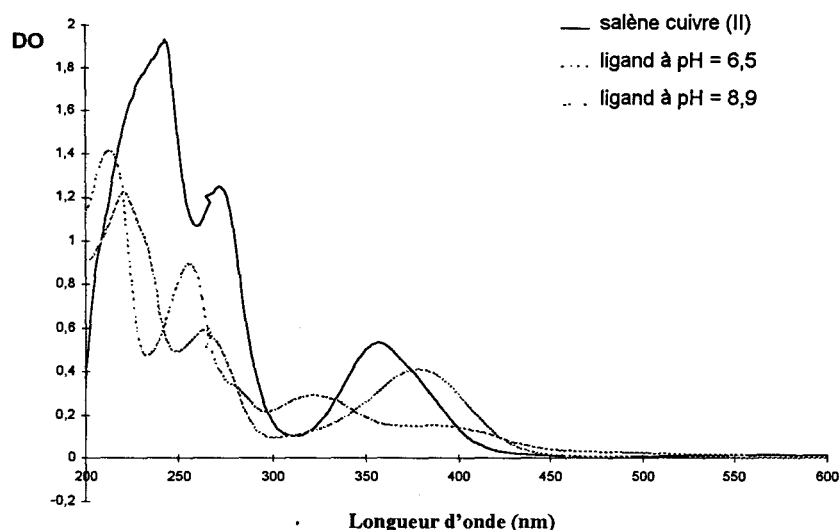


Figure 38 : représentation de la densité optique du salène complexé par le cuivre (II) et du ligand seul aux pH = 6,5 et 8,9 en fonction de la longueur d'onde.

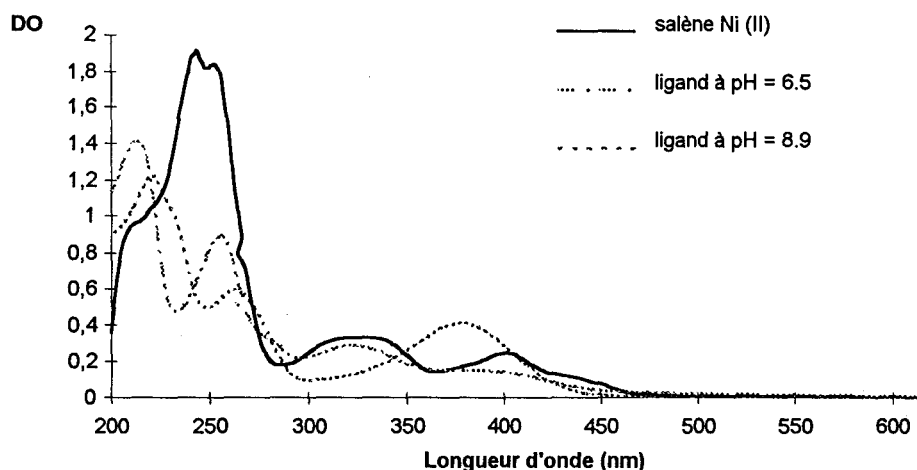


Figure 39 : représentation de la densité optique du salène complexé par le nickel (II) et du ligand seul aux pH = 6,5 et 8,9 en fonction de la longueur d'onde.

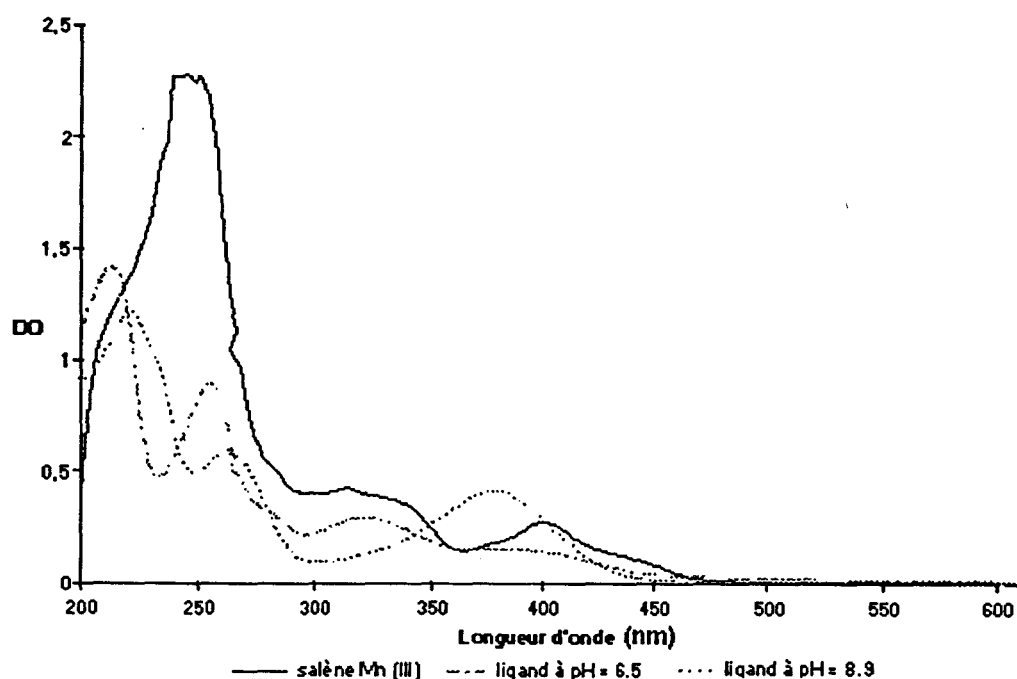


Figure 40 : représentation de la densité optique du salène complexé par le manganèse (III) et du ligand aux pH = 6,5 et 8,9 en fonction de la longueur d'onde.

II.3.3. Etude de la complexation selon la méthode de JOB⁸⁸.

Par spectrométrie d'absorption U.V., la méthode de JOB, appelée méthode des variations continues, permet l'obtention de la stoechiométrie^{89,90} des complexes formés en solution dans des conditions isomolaires en ligand et métal.

Cette méthode permet aussi de déterminer la valeur de la constante d'association^{91,92} métal-ligand en solution, en utilisant cette fois des concentrations non isomolaires en métal et en ligand.

II.3.3.1. Cas des solutions isomolaires.

Méthode des variations continues.

L'équilibre suivant est étudié :



La méthode fait abstraction de la perte éventuelle de proton lors de la complexation du ligand L par le cation M ainsi que des charges portées par les différentes espèces. Ceci permet une simplification des équilibres mis en jeu mais ne fausse en rien les résultats obtenus.

La courbe des écarts est construite avec la loi des mélanges, c'est-à-dire des écarts entre la courbe expérimentale et la droite qui joint les points correspondant aux constituants simples. Cette courbe présente un maximum (ou un minimum) pour la « composition maximum » elle-même.

Pour tous les complexes, des solutions aqueuses sont réalisées à $5 \cdot 10^{-5}$, $8 \cdot 10^{-5}$ et 10^{-4} mol.l⁻¹ en cation et en ligand **8**. La solution à 10^{-4} mol.l⁻¹ en ligand contient 7 % d'éthanol. L'évolution de l'absorbance en fonction de la fraction volumique en ligand a été étudiée à pH = 6.5 et 8.9. Les différents pH sont obtenus en ajoutant de faibles quantités de soude 1N ou d'acide chlorhydrique 1N. La cuve de mesure renferme x ml de la solution de cation et 1-x ml de la solution de ligand **8**. La référence contient 1-x ml de la solution de ligand et x ml d'eau distillée. Les courbes représentant l'absorbance en fonction de la fraction volumique sont tracées.

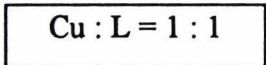
La détermination du maximum ou minimum de chaque courbe est effectuée en prenant l'intersection de deux droites. La première correspond à l'équation obtenue si le métal M est en excès par rapport au ligand L et possède une pente de type $([M] + [L]) / n$. La seconde correspond à l'équation obtenue si le ligand L est en excès par rapport au métal M et possède une pente de type $-([M] + [L]) / m$.

Cas de la complexation de **8** par le cuivre (II).

Les solutions mères de cation ont été préparées grâce à de l'acétate de cuivre (II) monohydraté solubilisé par de l'eau distillée.

Les courbes représentant l'évolution de l'absorbance en fonction de la fraction volumique en ligand ont été tracées (figure 41), puis les valeurs des x maxima des différents essais ont été reportées dans le tableau 3.

Les valeurs des maxima des courbes se situent autour d'une valeur moyenne de 0.5 et ce quel que soit le pH utilisé. Le complexe formé entre le cuivre (II) et le ligand **8** a une unique stoechiométrie de type :



pH = 6,5, condition isomolaire entre le cuivre et le ligand				
[L] mol l ⁻¹	[Cu ²⁺] mol l ⁻¹	λ nm	x maximum	x maximum moyen
5 10 ⁻⁵	5 10 ⁻⁵	356	0.53	
		242	0.64	
8 10 ⁻⁵	8 10 ⁻⁵	356	0.52	
		242	0.63	0.563
1 10 ⁻⁴	1 10 ⁻⁴	356	0.53	
		242	0.53	
pH = 8,9, condition isomolaire entre le cuivre et le ligand				
[L] mol l ⁻¹	[Cu ²⁺] mol l ⁻¹	λ nm	x maximum	x maximum moyen
5 10 ⁻⁵	5 10 ⁻⁵	356	0.43	
		242	0.39	
8 10 ⁻⁵	8 10 ⁻⁵	356	0.51	
		242	0.48	0.467
1 10 ⁻⁴	1 10 ⁻⁴	356	0.55	
		242	0.44	

Tableau 3 : valeurs maximales des fractions molaires, dans des conditions isomolaires entre le cuivre (II) et le ligand à 5.10⁻⁵, 8.10⁻⁵ et 10⁻⁴ mol.l⁻¹, à 356 et 242 nm et à pH = 6,5 et 8,9.

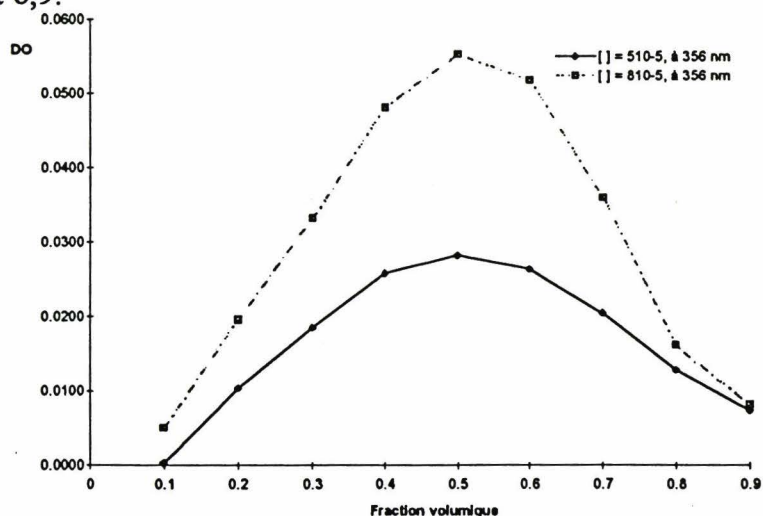
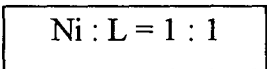


Figure 41 : représentation de la densité optique en fonction de la fraction volumique à pH = 6,5 pour le cuivre (II) en présence de ligand en quantité isomolaire.

Cas de la complexation de **8** par le nickel (II).

Les solutions mères de cation ont été préparées grâce à de l'acétate de nickel (II) tétrahydraté solubilisé par de l'eau distillée.

Le tracé des courbes (figure 42) représentant l'évolution de l'absorbance en fonction de la fraction volumique en ligand a donné les valeurs des x maxima reportées dans le tableau 4. Les valeurs des maxima des courbes se situent autour d'une valeur moyenne de 0,5, quel que soit le pH utilisé. Le complexe formé entre le nickel (II) et le ligand **8** a une unique stoechiométrie de type :



pH = 6,5, condition isomolaire entre le nickel et le ligand				
[L] mol l-1	[Ni ²⁺] mol l ⁻¹	λ nm	x max	x max moyen
5 10 ⁻⁵	5 10 ⁻⁵	324	0,41	
		244	0,47	
8 10 ⁻⁵	8 10 ⁻⁵	324	0,48	
		244	0,54	0,502
1 10 ⁻⁴	1 10 ⁻⁴	324	0,58	
		244	0,53	
pH = 8,8, condition isomolaire entre le nickel et le ligand				
[L] mol l-1	[Ni ²⁺] mol l ⁻¹	λ nm	x max	x max moyen
5 10 ⁻⁵	5 10 ⁻⁵	324	0,43	
		244	0,66	
8 10 ⁻⁵	8 10 ⁻⁵	324	0,55	
		244	0,64	0,533
1 10 ⁻⁴	1 10 ⁻⁴	324	0,43	
		244	0,49	

Tableau 4 : valeur des maxima de fraction molaire en condition isomolaire entre le Nickel (II) et le ligand **8**, à 5.10⁻⁵, 8.10⁻⁵ et 10⁻⁴ mol.l⁻¹, pH = 6,5 et 8,9, à 324 et 244 nm.

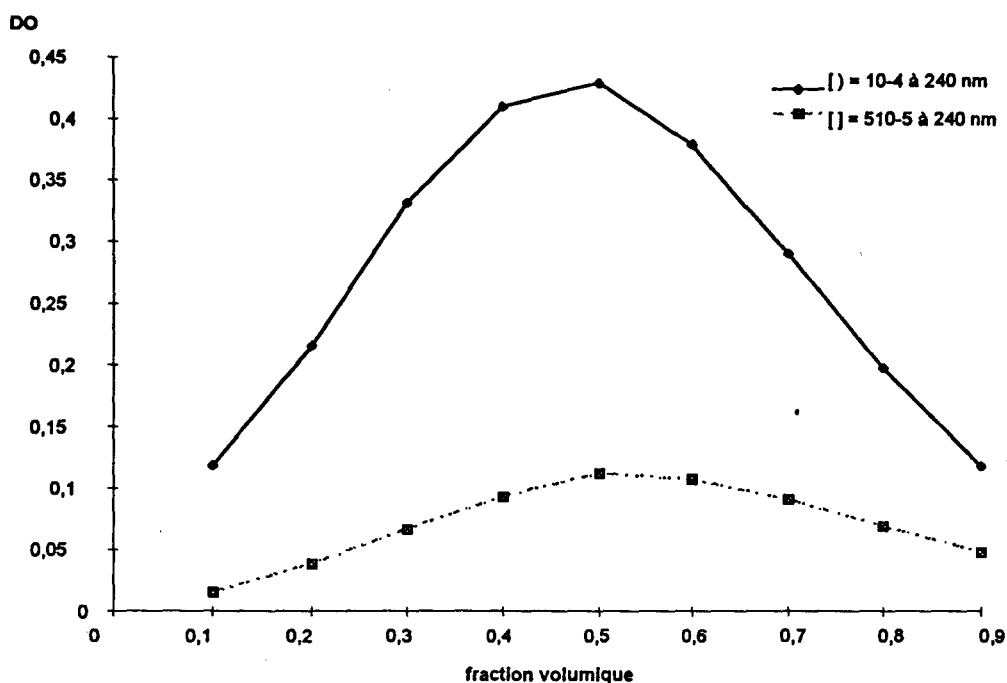


Figure 42 : représentation de la densité optique en fonction de la fraction volumique à pH = 8,9 pour le nickel (II).

Cas de la complexation de 8 par le manganèse (II).

Alors que le salène complexé par le manganèse **11** isolé pendant les modes opératoires, possède un degré d'oxydation III, la complexation initiale qui s'effectue avec le ligand **8** est due à la présence d'acétate de manganèse manganèse de degré d'oxydation II. Les solutions mères de cations ont donc été préparées avec de l'acétate de manganèse (II) tétrahydraté solubilisé par de l'eau distillée.

Le tracé des courbes (figure 43) représentant l'évolution de l'absorbance en fonction de la fraction volumique en ligand a donné les valeurs des x maxima reportées dans le tableau 5.

pH = 6,5, condition isomolaire entre le manganèse et le ligand				
[L] mol l ⁻¹	[Mn ²⁺] mol l ⁻¹	λ nm	x maximum	x maximum moyen
5 10 ⁻⁵	5 10 ⁻⁵	314	0,68	
		240	0,58	
8 10 ⁻⁵	8 10 ⁻⁵	314	0,6	
		240	0,63	0,650
1 10 ⁻⁴	1 10 ⁻⁴	314	0,68	
		240	0,73	
pH = 8,9, condition isomolaire entre le manganèse et le ligand				
[L] mol l ⁻¹	[Mn ²⁺] mol l ⁻¹	λ nm	x maximum	x maximum moyen
5 10 ⁻⁵	5 10 ⁻⁵	314	0,68	
		240	0,71	
8 10 ⁻⁵	8 10 ⁻⁵	314	0,65	
		240	0,73	0,680
1 10 ⁻⁴	1 10 ⁻⁴	314	0,64	
		240	0,67	

Tableau 5 : valeur des maxima des fraction molaire en condition isomolaire entre le manganèse et le ligand **8** à 5.10⁻⁵, 8.10⁻⁵ et 10⁻⁴ mol.l⁻¹, à pH = 6,5 et 8,9, à 314 et 240 nm.

Les valeurs des maxima des courbes se situent autour d'une valeur moyenne de 0,66 pour un pH acide et autour de 0,68 pour un pH basique. Le complexe formé entre le manganèse (II) et le ligand **8** a une stoechiométrie de type :

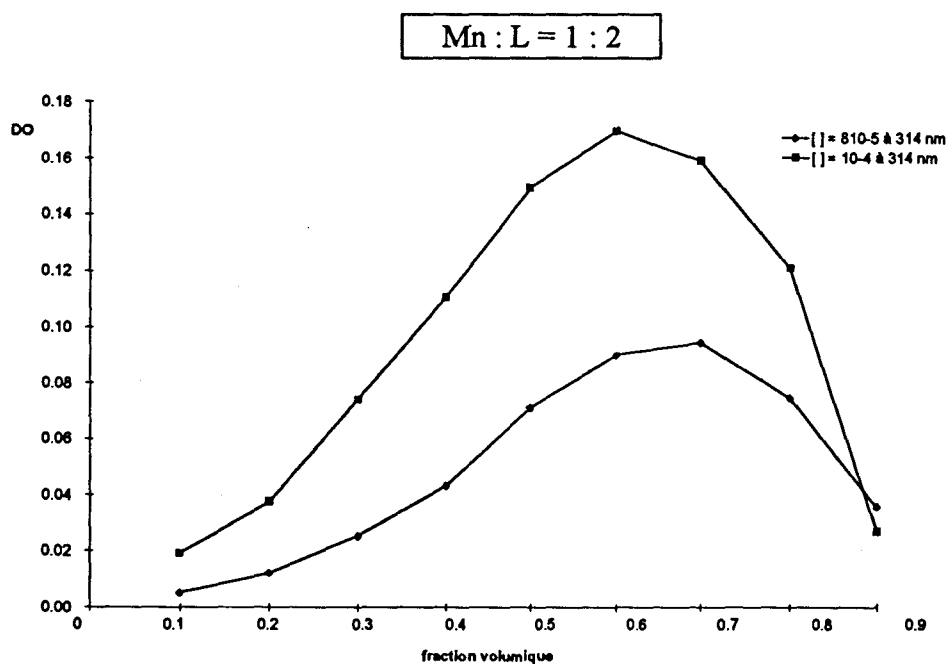
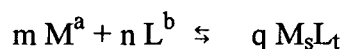


Figure 43 : représentation de la densité optique en fonction de la fraction volumique à pH = 8,9 pour le manganèse (II)

II.3.3.2. Cas des solutions non isomolaires.

Etude théorique.

Supposons un équilibre du type :



M représente le cation de charge a, L représente le ligand de charge b, $M_s L_t$ représente le complexe où les charges se répartissent en s pour le cation et en t pour le ligand.

Préparons une solution de concentration [M] en cation et une solution de concentration [L] en ligand telle que [L] = p[M]. Mélangeons un volume x de la seconde avec un volume (1-x) de la première. x est donc égal à $V_L / (V_L + V_M)$.

Il faut maintenant déterminer la composition du mélange pour laquelle la teneur en complexe est la plus grande possible c'est-à-dire pour laquelle la concentration $[M_s L_t]$ est maximale.

Grâce à la loi d'action de masse et à la détermination de la teneur en M et L à chaque instant, trois équations sont déduites:

$$[M]^m \cdot [L]^n = K \cdot [M_s L_t]^q \quad (1)$$

$$[M] \cdot (1-x) = a \cdot [M] + s [M_s L_t] \quad (2)$$

$$p \cdot [M] \cdot (1-x) = b \cdot [L] + t [M_s L_t] \quad (3)$$

La concentration en complexe ne dépend que de la composition x du mélange considéré lorsque [M] et p sont fixés. Après dérivation de ces trois équations par rapport à x, il suffit donc pour connaître x d'écrire que la dérivée s'annule.

La méthode de JOB donne une valeur pour la constante d'instabilité K_i :

$$K_i = \frac{[M]^{m+n-p} \cdot p^{n-p} \cdot m^m \cdot n^n \cdot [(t+s)p \cdot x - t]^{m+n}}{a^m \cdot b^n \cdot (n \cdot p \cdot s - m \cdot t)^{m+n-p} \cdot [n - (m+n) \cdot x]^q}$$

Si l'on pose l'équilibre simplificateur où l'abstraction des charges donne $a = b = 1$ et où $q = 1$ et sachant que $m \cdot a = q \cdot s$ et que $n \cdot b = q \cdot t$, il est trouvé que $s = m$ et $n = t$.

L'équilibre s'écrit alors :



La formule de JOB simplifiée donne :

$$K_i = \frac{[M]^{m+n-1} \cdot p^{n-1} \cdot [(n+m)p \cdot x - n]^{m+n}}{m^{n-1} \cdot n^{m-1} \cdot (p-1)^{m+n-1} \cdot [n - (m+n) \cdot x]}$$

La composition maximale dépend donc à la fois des concentrations des deux solutions primitives en cation et en ligand et de la constante K_i . Par conséquent, si l'on connaît x , une valeur pour K_i peut alors être calculée.

La composition du maximum sera toujours comprise entre deux valeurs limites. La première ($n / (m+n)$) correspond à la formule du complexe. La seconde ($n / (m \cdot p + n)$) correspond au mélange des deux constituants dans la proportion même où ils sont contenus dans le complexe, compte tenu des concentrations. Si le complexe est très dissocié, la composition du maximum sera très voisine de la composition du complexe, quel que soit le rapport des concentrations initiales des deux solutions. Si au contraire le complexe est très peu dissocié, la composition du maximum variera selon ce rapport de concentrations et sera très voisine de la composition théorique correspondant à une réaction totale.

Ce raisonnement repose sur l'hypothèse qu'il ne se forme qu'un complexe unique lors de la complexation dans les conditions expérimentales fixées. Lors de l'étude de la complexation du salène **8** en condition isomolaire, un maximum (ou minimum) est observé sur les courbes représentant l'absorbance en fonction de la fraction volumique en ligand. Ceci indique bien la présence d'un seul complexe et permet l'application de la méthode des variations continues. La courbe des écarts avec la loi des mélanges, c'est-à-dire des écarts entre la courbe expérimentale et la droite qui joint les points correspondant aux constituants simples, est construite. Cette courbe présente un maximum (ou un minimum) pour la composition maximum elle-même.

Les solutions en cation et en ligand sont préparées comme dans l'étude précédente. La même méthode est utilisée pour préparer les cuves de mesure et de référence. L'absorbance en fonction de la fraction volumique en ligand est étudiée à $\text{pH} = 6.5$ et à $\text{pH} = 8.9$.

Les courbes représentant l'absorbance en fonction de la fraction volumique sont tracées. La détermination du maximum ou minimum de chaque courbe est effectuée en prenant l'intersection de deux droites. La première correspond à l'équation obtenue si le métal M est en excès par rapport au ligand L et possède une pente :

$$([M] + [L]) / n.$$

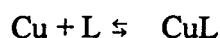
La seconde correspond à l'équation obtenue si le ligand L est en excès par rapport au métal M et possède une pente :

$$-([M] + [L]) / m.$$

Calcul de K_i pour la complexation du cuivre (II) par le ligand 8.

Lors de l'expérience réalisée avec des concentrations isomolaires, l'existence du complexe CuL a été prouvée.

L'équilibre considéré est le suivant :



La formule de K_i utilisée devient :

$$K_i = \frac{[M] [(1+p).x - 1]^2}{(p-1) [1 - 2.x]}$$

Les courbes (figure 44) représentant l'évolution de l'absorbance sont tracées en fonction de la fraction volumique en ligand. Puis les valeurs des x maximum des différents essais sont reportées dans le tableau 6.

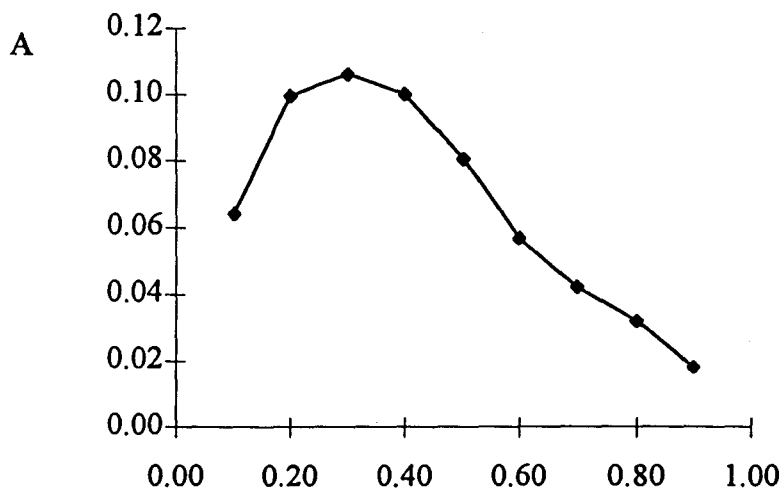


Figure 44 : représentation de l'absorbance en fonction de la fraction volumique à pH = 8,9 à 244 nm pour le cuivre (II) à $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ et le ligand à $10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$.

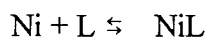
Détermination de Ki à pH = 6,5						
λ nm	x	[Cu]	[L]	$p=([L] / [Cu])$	Ki	Ki moyen
357	0,28	5,00E-05	1,00E-04	2	2,91E-06	
243	0,28	5,00E-05	1,00E-04	2	2,91E-06	
357	0,19	1,00E-05	1,00E-04	10	2,13E-06	
243	0,21	1,00E-05	1,00E-04	10	3,29E-06	3,09E-06
357	0,43	8,00E-05	1,00E-04	1,25	2,41E-06	
243	0,46	8,00E-05	1,00E-04	1,25	4,90E-06	
Détermination de Ki à pH = 8,9						
λ nm	x	[Cu]	[L]	$p=([L] / [Cu])$	Ki	Ki moyen
357	0,32	5,00E-05	1,00E-04	2	2,22E-07	
243	0,35	5,00E-05	1,00E-04	2	4,17E-07	
357	0,12	1,00E-05	1,00E-04	10	1,50E-07	4,91E-07
243	0,16	1,00E-05	1,00E-04	10	9,44E-07	
357	0,45	8,00E-05	1,00E-04	1,25	5,00E-07	
243	0,44	8,00E-05	1,00E-04	1,25	7,13E-07	

Tableau 6 : données permettant la détermination de Ki.

Calcul de Ki pour la complexation du nickel (II) par le ligand 8.

Lors de l'expérience réalisée avec des concentrations isomolaires, l'existence du complexe NiL a été prouvée.

L'équilibre considéré est le suivant :



La formule de Ki utilisée devient :

$$Ki = \frac{[M] [(1 + p).x - 1]^2}{(p - 1) [1 - 2.x]}$$

La solution mère de cation est préparée avec de l'acétate de nickel (II) tétrahydraté solubilisé par de l'eau distillée.

Les courbes représentant l'évolution de l'absorbance en fonction de la fraction volumique en ligand sont tracées, puis les valeurs des x maxima des différents essais sont reportées dans le tableau 7.

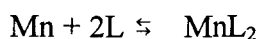
Détermination de Ki à pH = 6,5						
λ nm	x	[Ni]	[L]	$p=([L]/[Ni])$	Ki	Ki moyen
324	0,47	5,00E-05	1,00E-04	2	1,40E-04	
244	0,48	5,00E-05	1,00E-04	2	2,42E-04	
324	0,43	1,00E-05	1,00E-04	10	1,10E-04	1,57E-04
244	0,45	1,00E-05	1,00E-04	10	1,73E-04	
324	0,27	8,00E-05	1,00E-04	1,25	1,07E-04	
244	0,49	8,00E-05	1,00E-04	1,25	1,68E-04	
Détermination de Ki à pH = 8,9						
λ nm	x	c Ni	[L]	$p=([L]/[Ni])$	Ki	Ki moyen
324	0,43	5,00E-05	1,00E-04	2	3,00E-05	
244	0,45	5,00E-05	1,00E-04	2	6,13E-05	
324	0,41	1,00E-05	1,00E-04	10	7,61E-05	4,94E-05
244	0,42	1,00E-05	1,00E-04	10	9,10E-05	
324	0,40	8,00E-05	1,00E-04	1,25	1,60E-05	
244	0,39	8,00E-05	1,00E-04	1,25	2,18E-05	

Tableau 7 : données permettant la détermination de Ki.

Calcul de Ki pour la complexation du manganèse (II) par le ligand 8.

Lors de l'expérience réalisée avec des concentrations isomolaires, l'existence du complexe MnL_2 a été démontrée.

L'équilibre considéré est le suivant :



La formule de Ki utilisée devient :

$$Ki = \frac{[M]^2 \cdot p^1 \cdot [(2+p) \cdot x - 2]^3}{m^1 \cdot (p-1)^2 \cdot [2-3 \cdot x]}$$

La solution mère de cation est préparée grâce à de l'acétate de manganèse (II) tétrahydraté solubilisé par de l'eau distillée.

Les courbes représentant l'évolution de l'absorbance en fonction de la fraction volumique en ligand sont tracées, puis les valeurs des x maxima des différents essais sont reportées dans le tableau 8.

Détermination de Ki à pH = 6,5						
λ nm	x	[L]	[Mn]	$p = ([L] / [Mn])$	Ki	Ki moyen
302	0.62	1.00E-04	5.00E-05	2	3.95E-09	
233	0.65	1.00E-04	5.00E-05	2	2.16E-08	
302	0.67	1.00E-04	1.00E-05	10	-2.72E-07	-5.17E-08
233	0.59	1.00E-04	1.00E-05	10	7.04E-09	
302	0.64	1.00E-04	8.00E-05	1.25	8.19E-10	
233	0.67	1.00E-04	8.00E-05	1.25	-7.16E-08	
Détermination de Ki à pH = 8,9						
λ nm	x	[L]	[Mn]	$p = ([L] / [Mn])$	Ki	Ki moyen
302	0.6	1.00E-04	5.00E-05	2	1.60E-09	
233	0.56	1.00E-04	5.00E-05	2	2.16E-10	
302	0.64	1.00E-04	1.00E-05	10	2.83E-08	-3.97E-08
233	0.67	1.00E-04	1.00E-05	10	-2.72E-07	
302	0.63	1.00E-04	8.00E-05	1.25	1.25E-10	
233	0.65	1.00E-04	8.00E-05	1.25	3.65E-09	

Tableau 8 : données permettant la détermination de Ki.

Les valeurs négatives obtenues pour Ki seront justifiées dans la conclusion.

II.3.4. Conclusion.

Les valeurs des constantes d'instabilité Ki des salènes complexés par le cuivre (II) et par le nickel (II) permettent d'obtenir les constantes de stabilité $K = [\text{complexe}] / ([L][M]) = 1 / Ki$.

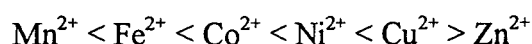
On préfère souvent exprimer ces valeurs en Log K indiquées dans le tableau 9.

	Ki	K=1/Ki	Log K
salène complexé au Ni(II), pH = 6,5	1.57E-04	6.37E+03	3.80
salène complexé au Ni(II), pH = 8,9	4.94E-05	2.02E+04	4.31
salène complexé au Cu(II), pH = 6,5	3.09E-06	3.24E+05	5.51
salène complexé au Cu(II), pH = 8,9	4.91E-07	2.04E+06	6.31

Tableau 9 : récapitulatif des différentes constantes d'association et de dissociation obtenues avec les différents complexes.

Les valeurs trouvées montrent une bonne complexation du ligand par les métaux cuivre et nickel. Ceci est en accord avec la littérature⁹³ pour des complexes de même type. Ce résultat est expliqué par la nature du ligand, qui possède des fonctions chélatantes contenant de l'oxygène et de l'azote. En effet, les coordinants organiques contenant de l'azote et impliqués dans des réactions de complexation sont par ordre décroissant les amines primaires, secondaires et tertiaires, les bases de Schiff, les amides, les groupes nitroso (NO), les oximes (C=N-OH) et les groupements azo (N=N). Les imines sont donc de très bons groupements complexants⁹⁴. De même, la stabilité du complexe augmente avec la basicité du ligand oxygène, selon l'ordre OH > phénolate > carboxylate.

Le ligand **8** possédant à la fois des fonctions imines et phénolates est donc un très bon complexant. La complexation du salène par le cuivre est meilleure que celle du salène par le nickel. Ceci est toujours en accord avec G.Schwarzenbach⁹⁴, qui dresse une classification des métaux susceptibles de complexer des ligands azotés et oxygénés selon l'ordre :



Le cas du manganèse est très donc différent. La réaction de complexation étudiée ne permet pas de conclure à une valeur correcte de K. Celle-ci doit être très faible car les maxima trouvés approchent de $[n / (m+n)] = 2 / 3$. Cette limite correspond à l'existence de ligand et de métal complètement dissocié. Une seconde preuve de cette faible constante d'association vient des spectres U.V obtenus. Quelles que soient les concentrations en Mn^{2+} , les amplitudes de DO n'excèdent pas 0,15 alors que dans le cas du cuivre et du nickel ces amplitudes montent jusqu'à 0,3-0,4.

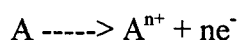
Les mesures qui ont été effectuées correspondent à une différence entre le spectre du complexe (la cuve de mesure contient du métal et du ligand) éventuellement formé et le spectre du ligand (la cuve de référence ne contient que du ligand). Une faible différence de DO entre les deux cuves implique donc une très faible formation de complexe et donc, une valeur faible pour la constante de stabilité. Afin de pouvoir la déterminer, il peut être envisagé de changer les conditions opératoires (augmenter la concentration en manganèse), de changer de technique en utilisant, par exemple, une méthode potentiométrique, ou en étudiant la complexation du ligand avec du manganèse (III). C'est en effet le complexe de manganèse (III) qui est obtenu après oxydation à l'air du métal en présence de chlorure de lithium.

II.4. Voltamétrie cyclique des complexes de salène.

II.4.1. Principe et méthode.

La réversibilité d'un système d'oxydo-réduction peut être étudiée de façon détaillée en enregistrant un ensemble de courbes intensité-potential pour différentes concentrations en produit étudié et ce, à différentes vitesses de balayage. Le mode de balayage correspond en général à une variation linéaire de potentiel avec le temps. On enregistre l'intensité du courant en fonction du potentiel. La méthode s'appelle voltamétrie à balayage linéaire. Les courbes obtenues sont représentées figure 45.

Lors du balayage en potentiel croissant, pour une réaction du type :



En choisissant un potentiel de départ inférieur au potentiel d'oxydation, le courant anodique (provenant de l'oxydation) augmente pendant que la vitesse d'oxydation de A augmente. Quand la vitesse de disparition de A devient trop importante, sa concentration à l'électrode s'annule. Seul le courant de diffusion intervient et le courant anodique diminue. Le pic observé correspond à un courant anodique i_{pa} pour un potentiel anodique E_{pa} .

Quand le sens du balayage est inversé, la concentration en espèce réductible A^{n+} est importante. En effectuant cette réduction, un pic de courant cathodique i_{pc} à un potentiel cathodique E_{pc} est alors détecté. Le balayage aller-retour constitue la voltamétrie cyclique. Le voltamogramme est caractérisé, d'une part par le rapport des intensités des courants de pic $-i_{pa} / i_{pc}$, d'autre part par l'écart moyen des potentiels de pic $(E_{pa} + E_{pc}) / 2 = E^{\circ}$, encore appelé $E^{1/2}$. Les valeurs de i_{pa} , i_{pc} , E_{pa} , E_{pc} sur les voltamogrammes sont déterminées comme indiqué sur la figure 45.

Dans un système idéalement réversible, le voltamogramme obtenu répond à quatre critères⁹⁵:

- le rapport $-i_{pa} / i_{pc}$ est égal à l'unité, quelles que soient la vitesse de balayage en potentiel et les valeurs des coefficients de diffusion. Si ce rapport est différent de

l'unité, la réaction chimique est couplée au transfert de charge ou des phénomènes plus complexes à l'électrode se produisent.

- la différence de potentiel $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$ doit être égale à $2,3 R T / n$ où n est le nombre d'électrons échangés lors de l'oxydo-réduction c'est-à-dire de 57 mV à 25 °C dans le cas d'un seul électron échangé. Cet écart doit être indépendant de la vitesse de balayage.
- l'intensité du pic cathodique croît linéairement avec la racine carrée de la vitesse de balayage en potentiel ($V^{1/2}$).
- le potentiel à $E_{p/2} - E_p$, où $E_{p/2}$ est le potentiel à l'intensité $i_p/2$ doit être égal à $2,3 R T / n$.

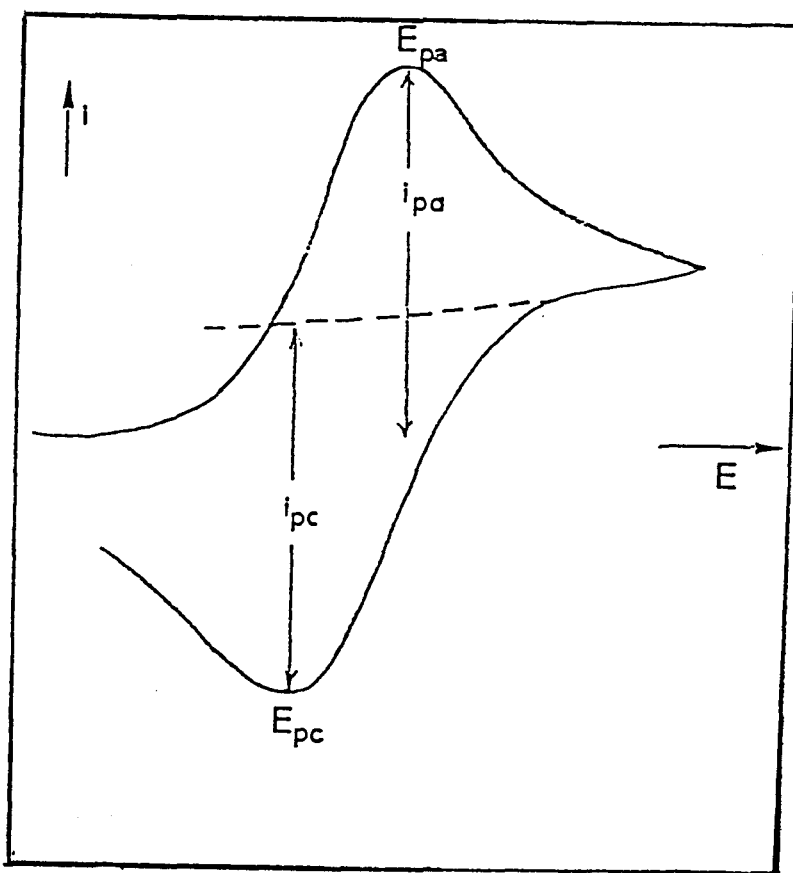


Figure 45 : exemple de voltamogramme avec les valeurs caractéristiques de E_{pa} , E_{pc} , i_{pa} et i_{pc} .

L'étude du système d'oxydo-réduction permet de plus de déterminer si le système est rapide ou lent. Cette caractéristique est encore donnée par la différence de potentiel ΔE_p . Si seulement cette valeur évolue fortement avec la vitesse de balayage alors que toutes les autres

caractéristiques d'un système réversible restent valables, le système est dit lent. Sinon, le système est dit rapide.

Dans certains cas, la valeur de ΔE_p peut être dépendante de la vitesse de balayage et l'intensité du pic de réduction i_{pc} ne varie pas linéairement avec $V^{1/2}$. Ou encore, le rapport des intensités n'est égal à l'unité que dans certaines conditions. Le système d'oxydo-réduction observé est alors qualifié de quasi-réversible. Dans ce cas, des paramètres de cinétique de diffusion sont à prendre en considération.

Un système d'oxydo-réduction est dit irréversible lorsque la valeur de E° change en fonction de la vitesse de balayage⁹⁶.

Différentes électrodes sont utilisées pour mesurer les intensités et imposer les potentiels lors du balayage:

- une électrode de platine, électrode de travail.
- une électrode au calomel, électrode de référence.
- une électrode de platine, électrode auxiliaire.

Le potentiel de l'électrode de travail est mesuré par rapport à l'électrode de référence située au voisinage. L'électrode auxiliaire permet de faire passer dans la solution le courant électrique nécessaire pour produire le potentiel désiré.

Les différentes expériences de voltamétrie ont été réalisées sur les salènes protégés complexés par le cuivre (II) 6, le nickel (II) 7 et le manganèse (III) 12 ainsi que sur les salènes déprotégés complexés par le cuivre (II) 9 et le nickel (II) 10. Les concentrations des solutions sont de $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ et de $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$. L'électrolyte support est le sel perchlorique de la tétraméthylamine recristallisé deux fois dans l'eau et séché à 60°C sous vide pendant 4 heures, avant utilisation. Le solvant utilisé est le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 0,01 % en eau. Les différentes solutions sont préparées sous courant d'azote.

Les mêmes conditions opératoires ont été utilisées pour dégager les valeurs des potentiels rédox des ions libres pour les couples du cuivre (II)/(I), du nickel (II)/(I) et du

manganèse (II)/(III). Pour cela les acétates de cuivre (II) monohydraté, de nickel (II) tétrahydraté et de manganèse (II) tétrahydraté ont été utilisés.

Afin de relier les valeurs des potentiels rédox des complexes à une activation potentielle de l'oxygène, une expérience de voltamétrie a de plus été menée en présence d'oxygène gazeux. Celui-ci a été dissous dans la cuve de mesure par bullage pendant deux minutes avant balayage en potentiel.

Les courbes ont été enregistrées pour des vitesses croissantes de 25, 50, 100, 200 mV/s pour chacun des produits et à une vitesse supplémentaire de 400 mV/s pour le salène complexé par le manganèse (III). Seules trois caractéristiques de réversibilité du système d'oxydo-réduction ont été étudiées. Il s'agit de:

- l'étude de l'évolution de l'intensité du pic cathodique i_{pc} en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage $V^{1/2}$.
- l'étude du rapport $-i_{pc} / i_{pa}$.
- l'étude de la variation de ΔE_p .

II.4.2. Résultats obtenus avec les salènes complexés au cuivre (II) 6 et 9.

A la vue des valeurs de ΔE_p obtenues pour les faibles vitesses de balayage, proches de la valeur théorique d'une réduction à un électron, les différents voltamogrammes obtenus (figures 46 et 47) indiquent donc une réduction à un électron du cuivre (II) en cuivre (I) pour les composés 6 et 9. Ce résultat a été obtenu en réalisant différents balayages. Un balayage du potentiel -1,2 V vers 1,2 V n'a pas donné le pic correspondant à un maximum en intensité i_{pa} . Ce résultat indique que le pic i_{pa} est dû à une oxydation d'une espèce formée lors du balayage en réduction. Dans toutes les mesures de potentiels redox, le balayage en potentiel a été réalisé des valeurs fortes en potentiel vers les valeurs faibles afin d'étudier le couple cuivre (II) / (I).

Les caractéristiques de ce système d'oxydo-réduction sont reportées dans le tableau 10 et sur les figures 48 à 51.

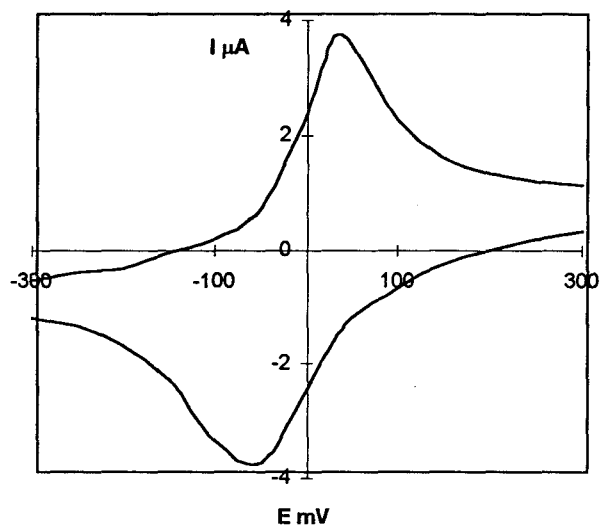


Figure 46 : voltamogramme obtenu avec le salène complexé par le cuivre (II) protégé 6. Le balayage en potentiel est effectué de 1,2 à -1,2 V. Cette courbe représente l'évolution de i (μA) en fonction de E (mV) pour une concentration en produit de $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ et une vitesse de balayage de 100 mV.s^{-1} .

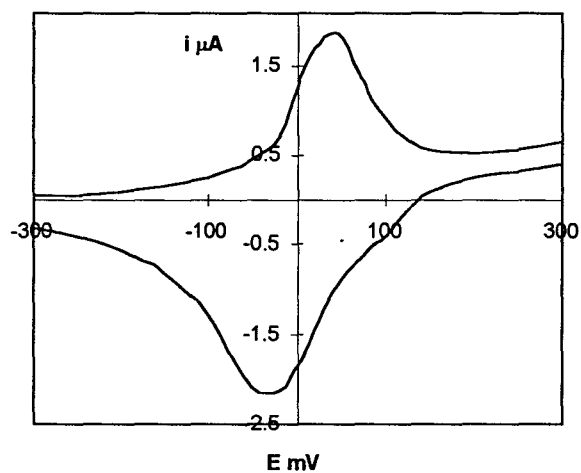


Figure 47 : voltamogramme obtenu avec le salène déprotégé complexé par le cuivre (II) 9. Le balayage en potentiel est effectué de 1,2 à -1,2 V. Cette courbe représente l'évolution de i (μA) en fonction de E (mV) pour une concentration en produit de $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ et une vitesse de balayage de 100 mV.s^{-1} .

	V (mV/s)	i_{pc} (μ A)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	i_{pc} / i_{pa}	E° (mV)	ΔE_p (mV)
Cu protégé 10^3 mol l^{-1}	200	1,9	20	-52	1,04	-16	72
	100	1,7	15	-48	1,04	-17	63
	50	1,2	15	-46	1,04	-16	61
	25	0,9	13	-43	1,02	-15	56
Cu protégé $2 \cdot 10^3 \text{ mol l}^{-1}$	200	3,8	31	-65	0,98	-17	96
	100	3,1	24	-56	1,05	-16	80
	50	2,6	17	-48	0,96	-15	65
	25	1,8	15	-45	1,03	-15	60
Cu déprotégé 10^3 mol l^{-1}	200	2,0	53	-39	1,00	7	92
	100	1,3	46	-29	0,99	8	75
	50	0,9	44	-27	1,01	9	71
	25	0,5	40	-22	1,02	9	61
Cu déprotégé à $2 \cdot 10^3 \text{ mol l}^{-1}$	200	3,9	61	-44	1,01	9	105
	100	2,5	50	-34	1,01	8	84
	50	1,7	43	-23	1,04	10	66
	25	0,9	40	-20	0,98	10	59

Tableau 10 : récapitulatif des différentes caractéristiques issues des voltamogrammes réalisés avec le complexe de Cu(II) protégé (II) 6 et avec le complexe de Cu(II) déprotégé (II) 9.

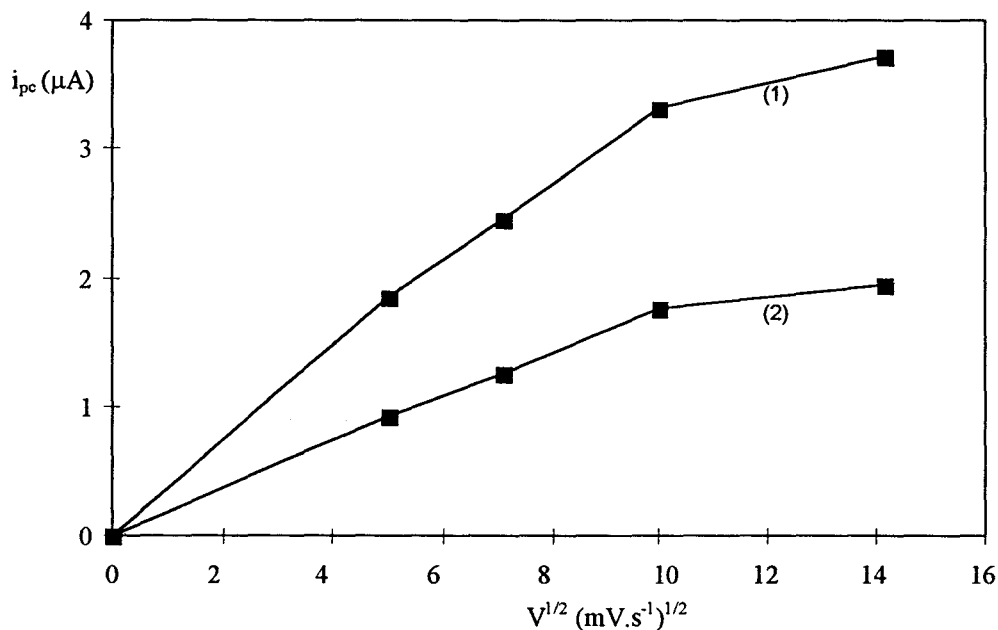


Figure 48 : évolution de l'intensité du pic cathodique i_{pc} en fonction de la racine carrée de la vitesse $V^{1/2}$ pour le salène complexé par le cuivre (II) 6. Les concentrations sont pour (1) de $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ et pour (2) de $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

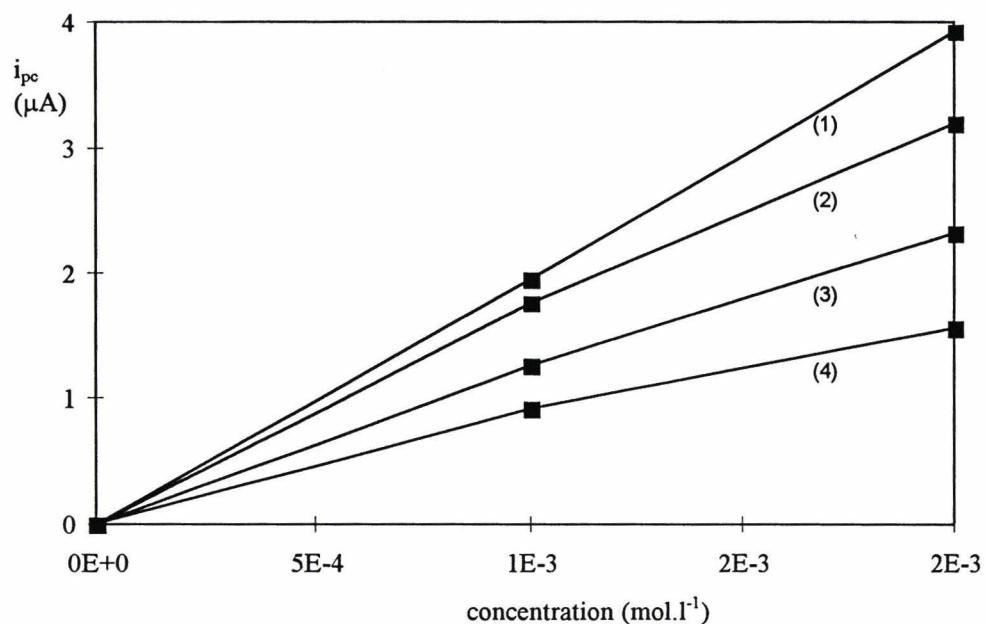


Figure 49 : évolution de l'intensité du pic cathodique i_{pc} en fonction de la concentration pour le salène complexé par le cuivre (II) 6. Les vitesses de balayage sont de (1) 200 mV/s, (2) 100 mV/s, (3) 50 mV/s, (4) 25 mV/s.

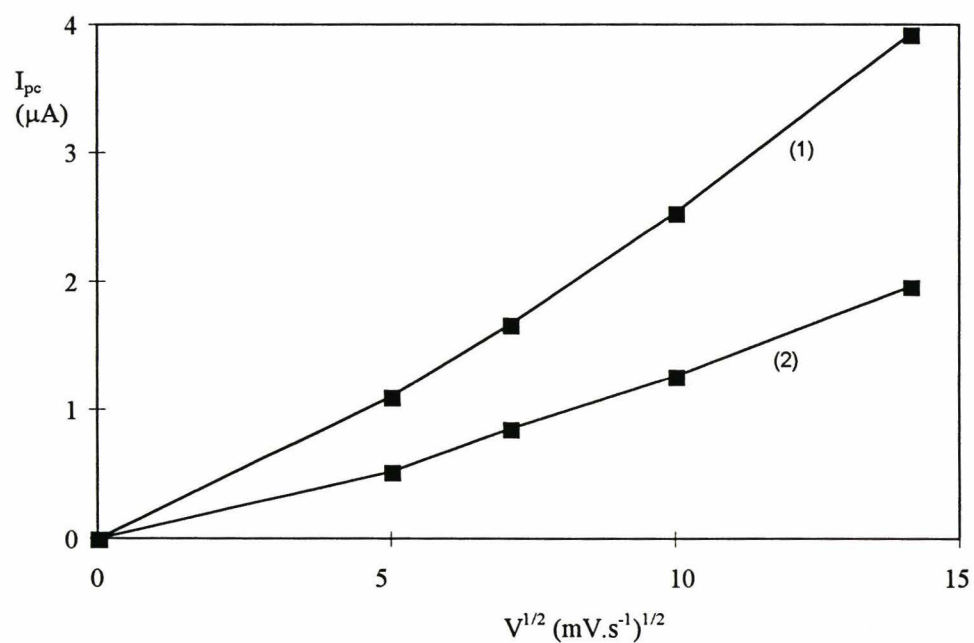


Figure 50 : évolution de l'intensité du pic cathodique i_{pc} en fonction de la racine carrée de la vitesse $V^{1/2}$ pour le salène complexé par le cuivre (II) 9. Les concentrations sont pour (1) de $2 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹ et pour (2) de 10^{-3} mol.l⁻¹.

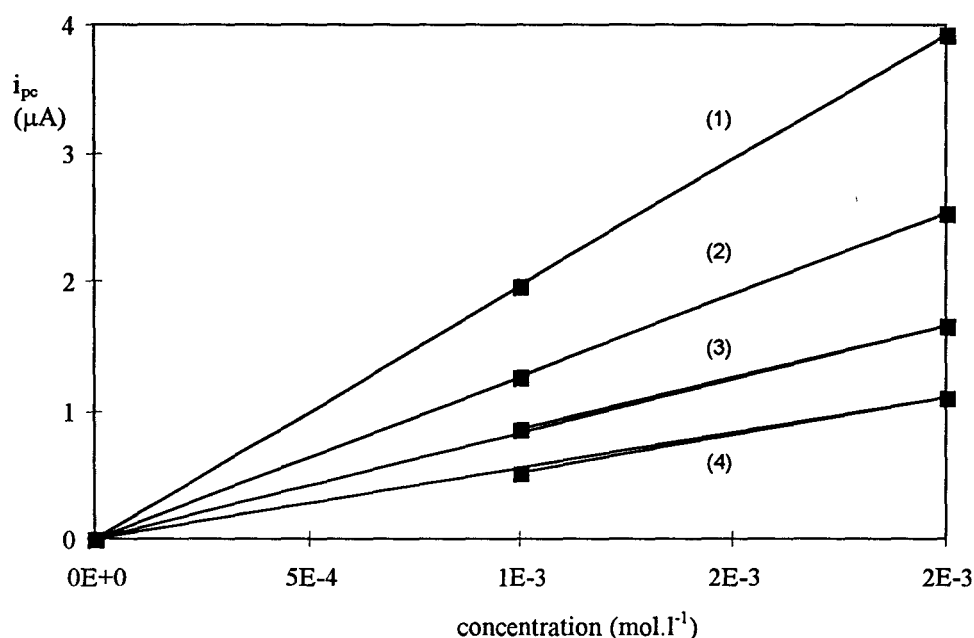


Figure 51 : évolution de l'intensité du pic cathodique i_{pc} en fonction de la concentration pour le salène protégé complexé par le cuivre (II) 9. Les vitesses de balayage sont de (1) 200 mV/s, (2) 100 mV/s, (3) 50 mV/s, (4) 25 mV/s.

Dans le cas du salène protégé complexé par le cuivre (II) 6, les paramètres de réversibilité sont pratiquement respectés pour des vitesses de balayage inférieures ou égales à 100 mV/s. Le système voit sa valeur de ΔE_p évoluer avec la vitesse, ce qui indique un système lent d'oxydo-réduction. Après 100 mV/s, la valeur de i_{pc} ne varie plus linéairement avec la racine carrée de la vitesse, ce qui indique une évolution vers une quasi-réversibilité du système à des vitesses de balayage élevées. Une valeur du potentiel rédox de ce complexe est dégagée :

$$E^\circ = -0,015 \text{ V}$$

Comme dans le cas du salène protégé 6, les paramètres de réversibilité pour le composé déprotégé 9 sont respectés pour toutes les vitesses de balayage. Dans le cas du salène

déprotégé, le système est donc réversible dans la gamme de vitesse de balayage étudiée. La valeur du potentiel rédox de ce salène est de :

$$E^{\circ} = 0,008 \text{ V}$$

De plus dans les mêmes conditions opératoires, une valeur similaire du potentiel de réduction de ce métal libre en solution a pu être déterminée pour l'acétate de cuivre (II) monohydrate:

$$E^{\circ} = -0,041 \text{ V}$$

La complexation du cuivre (II) par le salène entraîne donc une légère différence de potentiel rédox du métal. La complexation du salène par le cuivre (II) ne rend le métal un peu plus oxydant que lorsqu'il se trouve libre en solution. Cette variation du potentiel rédox du métal en fonction du ligand peut s'effectuer aussi bien vers un pouvoir plus oxydant que plus réducteur, comme cela a déjà été décrit pour certaines molécules apparentées au salène complexées par le cuivre (II)^{97,98}.

L'oxydation du cuivre (II) complexant les deux salènes, en cuivre (III) n'a malheureusement pas pu être étudiée dans les conditions opératoires utilisées.

II.4.3. Résultats obtenus avec les salènes complexés par le nickel (II) 7 et 10.

En utilisant la même méthode que pour les salènes complexés par le cuivre (II), il est aisé de montrer que les salènes complexés au nickel (II) 7 et 10 subissent une réduction à un électron en nickel (I). Les voltamogrammes obtenus (figure 52) et leurs caractéristiques sont développés figures 53 à 56 et tableau 11.

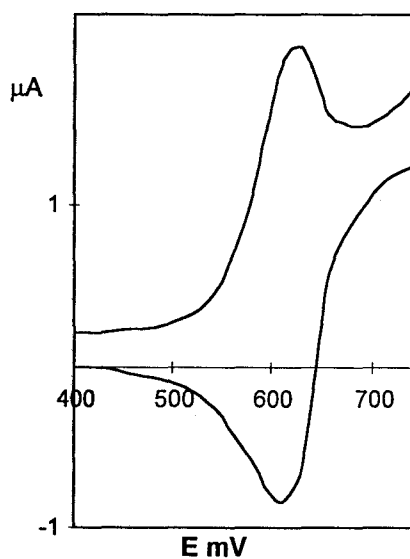
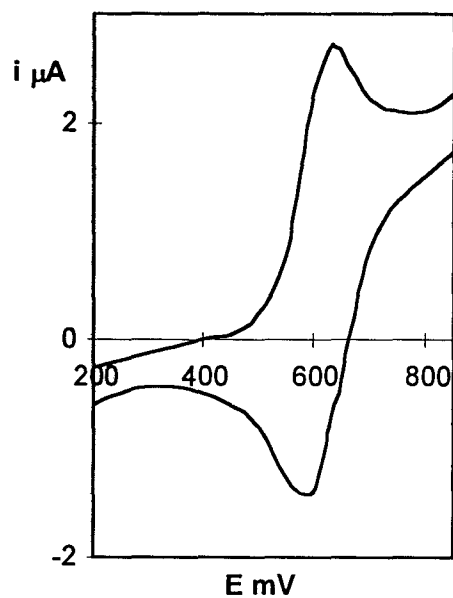


Figure 52 : voltammogrammes obtenus avec les salènes complexés par le nickel (II) protégés **7** (en haut) et déprotégés **10** (en bas). Le balayage en potentiel est effectué de 1,2 à -1,2 V. Ces courbes représentent l'évolution de i (μA) en fonction de E (mV) pour une concentration en produit de $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ et une vitesse de balayage de 25 mV.s^{-1} .

	V mV/s	ipc (μA)	Epa (mV)	Epc (mV)	ipc /ipa	E° (mV)	ΔEp (mV)
Ni protégé 10 ⁻³ mol l ⁻¹	200	2,0	686	588	0,98	637	98
	100	1,6	674	603	0,99	638	71
	50	1,5	671	606	0,85	638	65
	25	1,3	662	608	0,73	635	54
Ni protégé 2.10 ⁻³ mol l ⁻¹	200	4,5	684	588	1,09	636	96
	100	3,7	675	605	1,01	640	71
	50	3,7	672	609	0,73	641	63
	25	3,1	667	611	0,63	639	56
Ni déprotégé 10 ⁻³ mol l ⁻¹	200	1,9	692	602	0,99	647	89
	100	1,4	686	608	0,96	647	78
	50	1,1	676	617	0,98	646	59
	25	0,7	675	619	1,06	647	56
Ni déprotégé à 2.10 ⁻³ mol l ⁻¹	200	3,8	695	594	1,04	645	101
	100	2,9	686	610	0,95	648	77
	50	2,2	678	616	0,98	647	62
	25	1,5	675	617	1,00	646	58

Tableau 11 : récapitulatif des différentes caractéristiques issues des voltamogrammes réalisés avec le complexe protégé de nickel (II) 7 et le complexe déprotégé de nickel (II) 10.

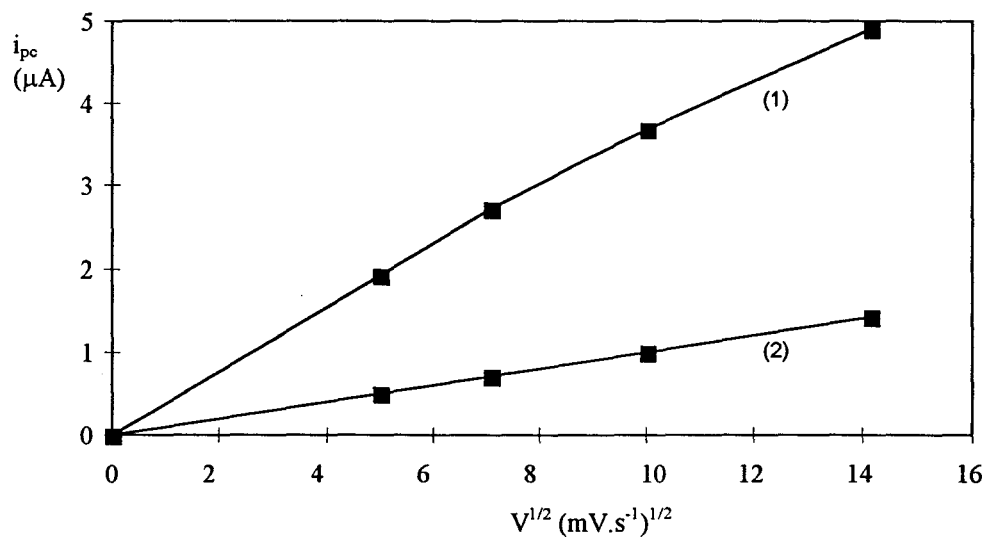


Figure 53 : évolution de l'intensité du pic cathodique i_{pc} en fonction de la racine carrée de la vitesse $V^{1/2}$ pour le salène protégé complexé par le nickel (II) 7. Les concentrations sont pour (1) de $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot l^{-1}$ et pour (2) de $10^{-3} \text{ mol} \cdot l^{-1}$.

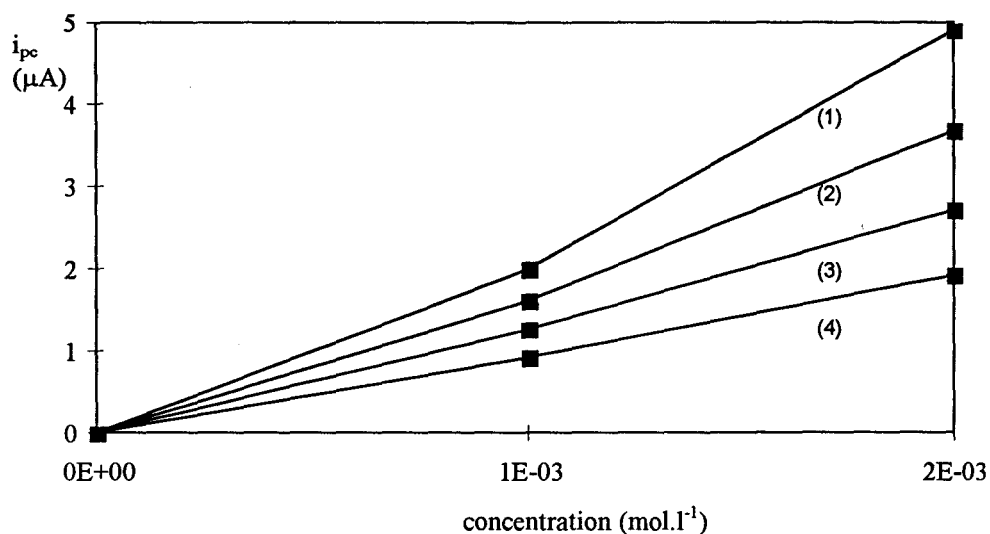


Figure 54 : évolution de l'intensité du pic cathodique i_{pc} en fonction de la concentration pour le salène protégé complexé par le nickel (II) 7. Les vitesses de balayage sont de (1) 200 mV/s, (2) 100 mV/s, (3) 50 mV/s, (4) 25 mV/s.

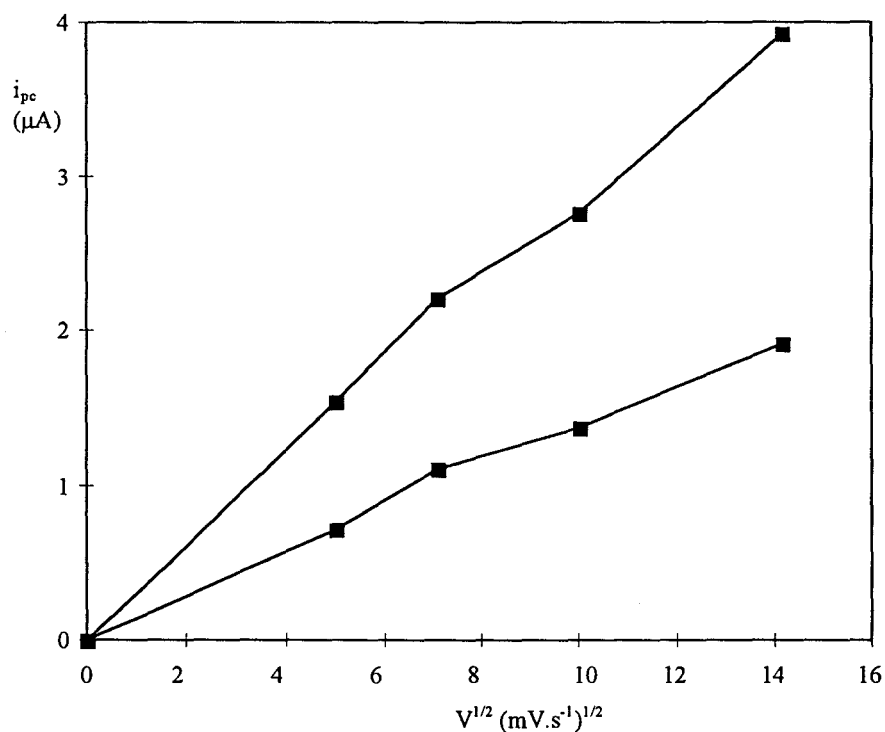


Figure 55 : évolution de l'intensité du pic cathodique i_{pc} en fonction de la racine carrée de la vitesse $V^{1/2}$ pour le salène déprotégé complexé par le nickel (II) 10. Les concentrations sont pour (1) de $2 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹ et pour (2) de 10^{-3} mol.l⁻¹.

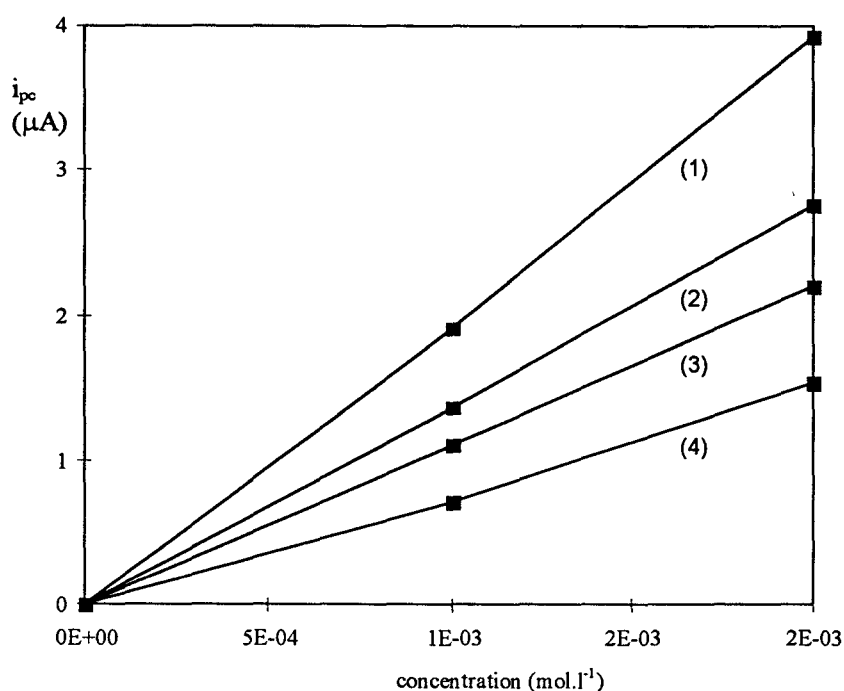


Figure 56 : évolution de l'intensité du pic cathodique i_{pc} en fonction de la concentration pour le salène déprotégé complexé par le nickel (II) 10. Les vitesses de balayage sont de (1) 200 mV/s, (2) 100 mV/s, (3) 50 mV/s, (4) 25 mV/s.

Ainsi, pour les salènes complexés au nickel (II), les valeurs reportées de ΔE_p laissent suggérer une réduction à un électron du nickel (II) en nickel (I). Cette conclusion n'est obtenue qu'en regardant les faibles valeurs de balayage utilisées. En effet, dans les différentes expériences réalisées pour ces vitesses de balayage, les valeurs de ΔE_p s'approchent bien de la valeur théorique correspondant à l'échange d'un électron.

Le système est réversible, rapide jusqu'à une vitesse de balayage de 100 mV/s. Au delà le système devient quasi-réversible puisque la valeur de ΔE_p s'éloigne de la valeur théorique et ce en fonction de la vitesse de balayage en potentiel.

La valeur du demi potentiel E° pour le salène 7 est de :

$$E^\circ = 0,638 \text{ V.}$$

La valeur du demi potentiel E° pour le salène **10** est de :

$$E^\circ = 0,647 \text{ V.}$$

Il faut noter que l'étude voltamétrique de l'acétate de nickel tétrahydraté, utilisé dans les mêmes conditions que les salènes complexés par le nickel (II), n'a pas permis de dégager le potentiel rédox de ce produit. Il est possible que celui-ci soit en dehors de la gamme de potentiel autorisé par l'expérience (balayage maximum utilisé de -1,8 à 1,8 Volt). Ce résultat confirme donc une influence très forte de la nature du ligand sur le potentiel d'oxydo-réduction du nickel.

De nombreuses références relatent l'oxydation ou la réduction de complexes de nickel (II). Certaines de ces oxydations se font à un électron et dépendent du ligand utilisé⁹⁹. D'autres études font référence à une réduction à un ou deux électrons du métal complexant^{97,98,100}. Ces différents résultats dépendent à la fois des conditions opératoires et de la structure des complexes étudiés. Dans l'étude que nous avons menée, le salène complexé par le nickel (II) subit une réduction à un seul électron.

II.4.4. Résultats obtenus avec le salène complexé par le manganèse (III) 12.

Par les différents changements de sens du balayage en potentiel, déjà explicités pour les salènes complexés par le cuivre (II) et par le nickel (II), seule la réduction à un électron du manganèse (III) a pu être mise en évidence.

Les conditions de travail n'ont pas permis l'étude du passage du manganèse (III) en manganèse (IV). D'ailleurs, il a été tenté de visualiser une réduction du métal de degré d'oxydation (II) formé par la première réduction en ses degrés d'oxydation (I) ou (0). Malheureusement aucune de ces différentes possibilités n'a pu être mise en évidence.

Les différents résultats issus des voltamogrammes (figure 57) sont reportés dans le tableau 12 et les figures 58 et 59.

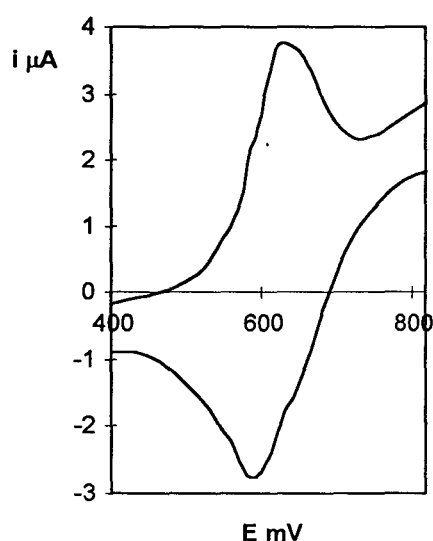


Figure 57 : voltammogramme obtenu avec le salène complexé par le manganèse (III) 12. Le balayage en potentiel est effectué de 1,2 à -1,2 V. Ces courbes représentent l'évolution de i (μA) en fonction de E (mV) pour une concentration en produit de $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ et une vitesse de balayage de 25 mV.s^{-1} .

	V (mV/s)	i_{pc} (μA)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	i_{pc} / i_{pa}	E° (mV)	ΔE_p (mV)
Mn protégé $10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$	400	7.9	657	558	0.99	608	99
	200	5.6	641	565	0.99	603	76
	100	4.0	643	569	1.00	606	74
	50	2.8	637	575	0.98	606	62
	25	1.8	636	582	1.04	609	55
Mn protégé $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$	400	14.2	678	537	0.99	608	141
	200	11.2	653	566	0.99	610	86
	100	7.8	644	568	1.01	606	76
	50	5.4	642	570	1.00	606	72
	25	3.7	639	574	1.00	607	65

Tableau 12 : récapitulatif des différentes caractéristiques issues des voltammogrammes réalisés avec le salène protégé complexé par le Mn(III) 12.

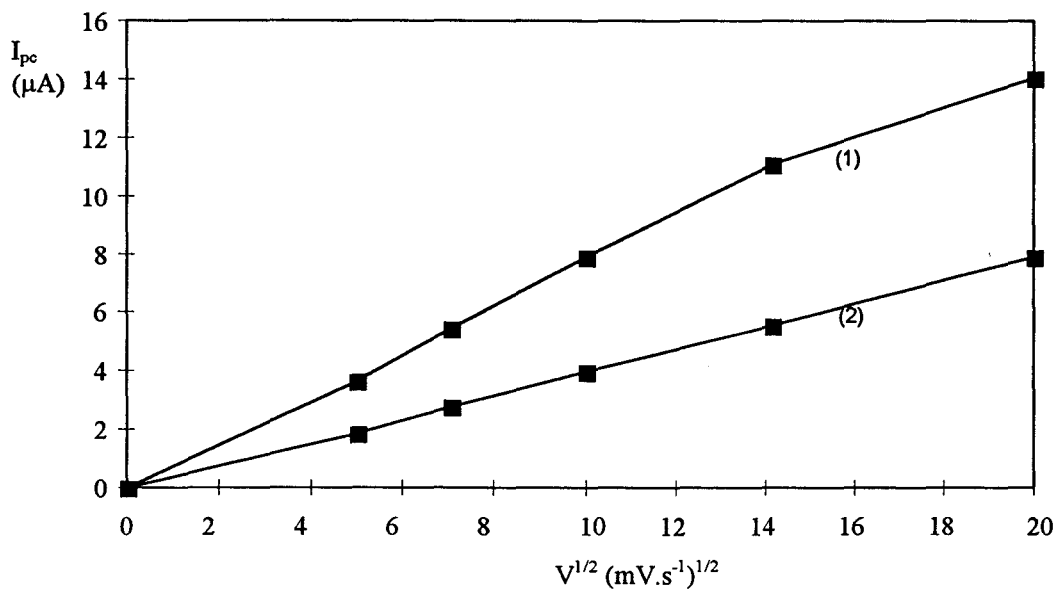


Figure 58 : évolution de l'intensité du pic cathodique i_{pc} en fonction de la racine carrée de la vitesse $V^{1/2}$ pour le salène protégé complexé par le manganèse (III) 12. Les concentrations sont pour (1) de $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ et pour (2) de $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$.

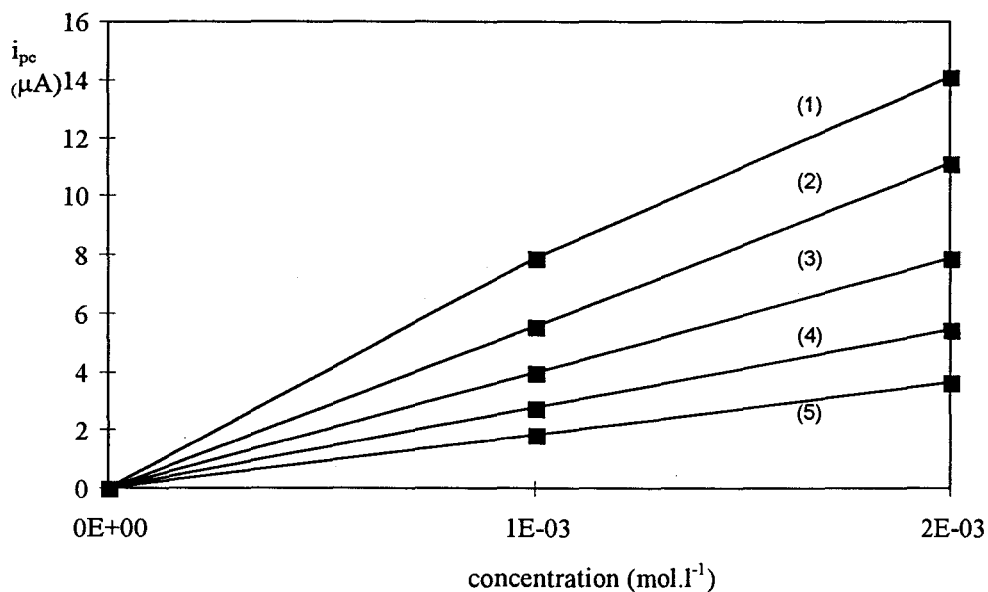


Figure 59 : évolution de l'intensité du pic cathodique i_{pc} en fonction de la concentration pour le salène protégé complexé par le manganèse (III) 12. Les vitesses de balayage sont de (1) 400 mV/s, (2) 200 mV/s, (3) 100 mV/s, (4) 50 mV/s, (5) 25 mV/s.

Les expériences permettent bien de déduire que ce système correspond à une réduction à un électron du manganèse (III). Ce système d'oxydo-réduction du manganèse est réversible et rapide jusqu'à une vitesse de balayage de 200 mV / s. Pour une vitesse de 400 mV / s la valeur de i_p/i_{pa} reste proche de l'unité, mais la différence ΔE évolue en fonction de la vitesse. Le système devient donc quasi-réversible.

La valeur du potentiel rédox du manganèse est de :

$$E^\circ = 0,605 \text{ V.}$$

L'utilisation dans les mêmes conditions d'acétate de manganèse (II) tétrahydraté n'a pas permis, dans la gamme de potentiel variant de -1,8 à 1,8 V, l'étude de son oxydation à un électron pour amener le métal à son degré d'oxydation (III).

Contrairement aux salènes complexés par le nickel (II), une étude de voltamétrie a été réalisée sur différents complexes possédant cinq ligands complexés au manganèse (III), et a permis l'étude de son potentiel de réduction. Cette étude fait varier la nature du ligand sur la partie phénolique. Les phénols utilisés pour obtenir les bases de Schiff ont été substitués par une gamme de groupements électroattracteurs ou électrodonneurs. Il s'en suit une forte évolution des potentiels rédox, en fonction de la nature des substituants. Ainsi, sur ces molécules, le potentiel de réduction du manganèse (III) varie de -0.300 à 0.100 Volt¹⁰¹.

Le complexe au manganèse (III) **12** étudié, possède quatre ligands. Il a un potentiel rédox plus élevé que la gamme décrite par la littérature pour les complexes possédant cinq ligands¹⁰¹. Cette dernière observation confirme davantage l'influence du ligand sur le potentiel rédox du métal complexant.

II.4.5. Conclusion.

Les métaux des salènes protégés et déprotégés peuvent donc subir une réduction réversible pour des faibles vitesses de balayage en potentiel. Pour des vitesses plus élevées, le système d'oxydo-réduction des produits apparaît comme quasi-réversible, puisque la valeur de

ΔE_p s'éloigne de la valeur théorique utilisée pour déterminer le nombre d'électrons échangés lors des réductions.

La faible différence de E° observée lors de l'étude des salènes protégés et déprotégés semble indiquer que l'amine de la chaîne latérale n'a pas d'influence sur le potentiel d'oxydo-réduction des métaux. Une complexation de l'amine aurait modifié considérablement le potentiel rédox des métaux, puisque le complexe serait passé d'une structure plane à base carrée à une structure pyramidale à base carrée. D'ailleurs, une preuve supplémentaire de la conservation de la géométrie est donnée par la RPE abordée dans un chapitre précédent. En effet les salènes complexés par le cuivre, protégé **6** et déprotégé **9**, ont des valeurs de $g_{//}$ et $A_{//}$ très voisines en solution gelée. Les valeurs sont toujours caractéristiques d'un complexe plan carré.

Une expérience menée avec l'oxygène a permis de dégager son potentiel rédox dans les conditions opératoires identiques à celles utilisées pour les salènes. La valeur de $E^\circ = -0,8$ V a été obtenue. Les salènes complexés par le cuivre (II), le nickel (II) et manganèse (III) ont des potentiels de réduction bien supérieurs à celui de l'oxygène. Ils sont donc incapables de réduire l'oxygène sous leurs degrés d'oxydation initiaux. Une réduction ou oxydation préalable peut en revanche engendrer cette réduction et aboutir à la production d'espèces radicalaires de l'oxygène. C'est d'ailleurs le cas lors des différentes réactions initiées par les salènes complexés par le cuivre, où le dithiothréitol et l'acide mercaptopropionique sont utilisés pour réduire le cuivre (II) en cuivre (I). Le manganèse est oxydé par le monoperoxyphthalate de magnésium et le monophosphate de potassium, quant aux composés du nickel, ils sont oxydés selon les cas par l'oxone ou le monoperoxyphthalate de magnésium.

II.5. Etude de l'activité nucléase des salènes.

Différentes techniques de biologie moléculaire ont été utilisées afin de déterminer les interactions des salènes complexés par le cuivre (II) **9** et le nickel (II) **10** avec l'ADN, et de mettre en évidence des réactions éventuelles de coupure d'ADN. Le rapport **P** / **D** utilisé correspond au rapport ADN-Phosphate / produit (« **D**rug ») utilisé.

II.5.1. Liaison à l'ADN.

Les différentes techniques abordées sont toutes basées sur des mesures spectroscopiques et hydro-dynamiques, à savoir :

- l'absorption U.V.
- la viscosimétrie.
- le dichroïsme circulaire (D.C).
- le dichroïsme linéaire électrique (D.L.E.).

Toutes ces études ont pour objet d'obtenir des informations complémentaires sur la nature des interactions des salènes complexés par le cuivre (II) **9** ou par le nickel (II) **10** avec l'ADN.

II.5.1.1. Spectroscopie d'absorption (U.V.-Visible).

Les salènes **9** et **10** et l'ADN possèdent des bandes d'absorption électronique différentes. Lorsque le ligand est lié à l'ADN, celui-ci voit son spectre perturbé. Il s'ensuit alors un déplacement des longueurs d'onde de façon hypso ou bathochrome et une variation des intensités des bandes d'absorption de façon hypo ou hyperchrome.

Résultats : salène complexé par le cuivre (II) 9.

Cette étude a été menée en utilisant des concentrations définies d'ADN de thymus de veau, en présence de concentrations différentes du salène complexé par le cuivre (II). Pratiquement, une solution concentrée de salène **9** est préparée, puis des volumes de celle-ci

sont ajoutés progressivement à une solution d'ADN jusqu'à l'obtention du rapport ADN / salène (P / D) désiré.

Le spectre d'absorption du composé seul possède un maximum à 326 nm et un autre à 398 nm. La bande d'absorption située à 326 nm se déplace et se retrouve centrée à 323 nm en présence d'ADN de thymus de veau. Ce déplacement de 3 nm vers les plus fortes longueurs d'ondes (effet bathochrome), ainsi que la baisse d'intensité de celle-ci de 13 % (effet hypochrome maximum pour un rapport P / D de 20) indiquent bien une liaison du salène complexé par le cuivre (II) avec l'ADN double brin de thymus de veau. Une légère évolution de la bande d'absorption située à 398 nm est aussi décelable (résultats non montrés).

Résultats : salène complexé par le nickel (II) 10.

Dans cette étude, l'évolution du spectre UV-visible est réalisée en ajoutant à une solution d'ADN de thymus de veau de concentration connue, des volumes d'une solution de salène 10.

Avec le salène complexé par le nickel (II) 10, l'évolution des spectres d'absorption en présence d'ADN de thymus de veau est plus nette, comme le montre la figure 60. Le salène 10 possède une bande d'absorption située à 310 nm et une autre à 391 nm. Par ajout d'ADN, le suivi de l'évolution de la longueur d'onde de la bande située initialement à 391 nm, ainsi que l'évolution de son absorbance sont possibles (figure 61).

Ces graphes montrent tout d'abord une décroissance de l'intensité de la bande d'absorption à 391 nm pour un rapport ADN / produit (P / D) de 10. Cette intensité reste constante à de plus hauts rapports P / D (figure 61), c'est-à-dire quand le composé complexé par le nickel (II) est complètement lié à l'ADN. Cet effet hypochrome est de 25 % pour un rapport P / D de 20.

L'interaction du salène complexé par le nickel (II) 10 avec l'ADN engendre de plus un effet bathochrome dans le domaine de l'absorption visible. Celui-ci est de 16 nm pour la bande d'absorption située à 391 nm qui se retrouve à 407 nm. Le déplacement de la bande d'absorption située à 310 nm est toutefois plus faible (5 nm).

L'interaction du salène complexé par le nickel (II) avec l'ADN perturbe donc le chromophore du salène, une fois que la liaison à l'ADN a eu lieu.

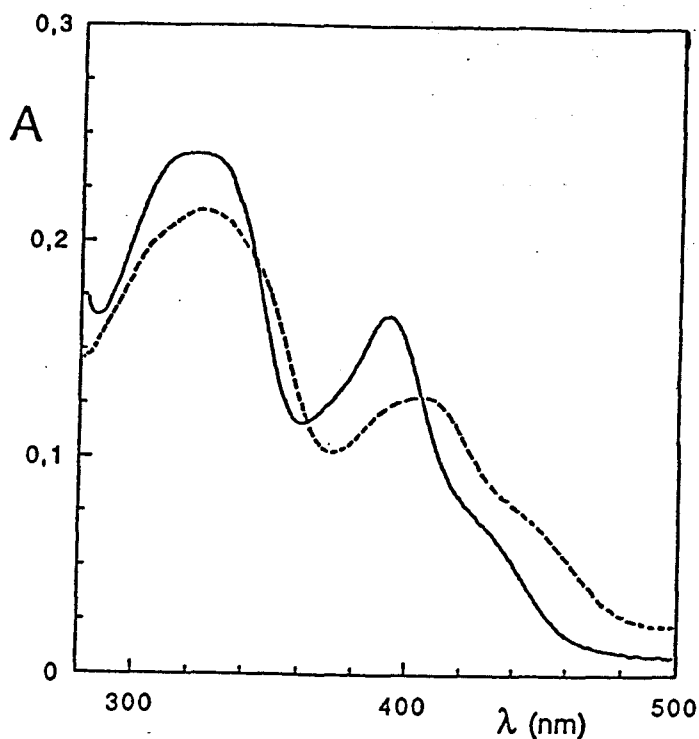


Figure 60 : spectres d'absorption du salène complexé par le nickel (II) 10 à 50 mM en absence (ligne pleine) ou en présence (ligne pointillée) d'ADN de thymus de veau à 1,1 mM.

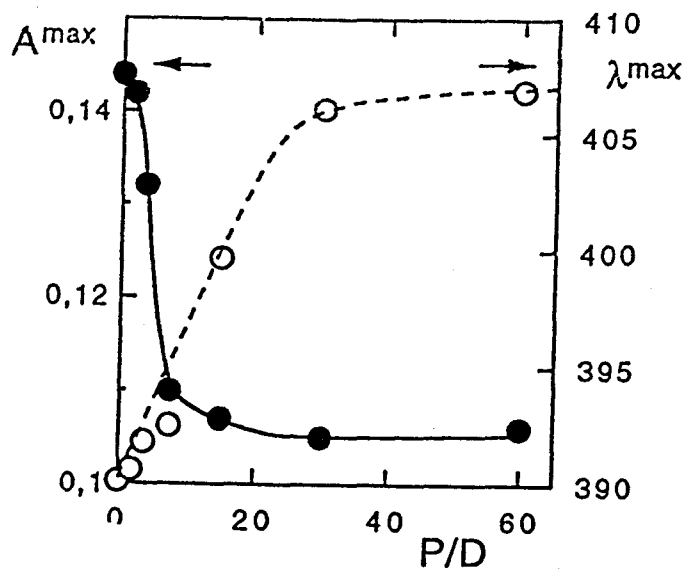


Figure 61 : variation de l'absorbance A_{max} (●) ou de la longueur d'onde (○) en fonction de la croissance du rapport ADN-Phosphate / produit 10 (P/D).

II.5.1.2. Viscosimétrie.

Méthode.

Une des conséquences de la liaison d'une molécule intercalante avec un ADN circulaire double brin superenroulé droit est un changement dans la superhélicité. Ce changement 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. La viscosité atteint alors un maximum. Si l'on continue à ajouter ce ligand, il se produit une inversion de superenroulement avec formation d'une double hélice superenroulée gauche. La viscosité diminue à nouveau. L'angle de détorsion, mesuré à partir de l'inversion du sens de détorsion, est calculé par rapport au bromure d'éthidium, dont l'angle de détorsion de l'ADN est connu¹⁰² (26°).

Les études sont réalisées selon les protocoles établis^{103,104} à l'aide d'un viscosimètre capillaire plongé dans un bain d'eau thermostatée à $25^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Les temps d'écoulement sont mesurés trois fois avec une précision de 0,1 s et le temps moyen est calculé. L'ADN plasmique pUC12 superenroulé est utilisé dans les mesures de viscosimétrie. Les échantillons de la substance testée en solution (1-2 mM) sont titrés directement dans le viscosimètre contenant 2 ml d'une solution d'ADN de plasmide (250 μM). Après chaque addition, les solutions sont agitées dans le viscosimètre. Les expériences sont menées dans un tampon 10 mM tris-HCl (pH: 7,0) et 10 mM NaCl.

Résultats : salène complexé par le cuivre (II) 9.

L'évolution de la viscosité, en fonction du rapport produit **9** / ADN, a été suivie (figure 62). Des concentrations différentes de salène complexé par le cuivre ne provoquent presque pas de changement de viscosité sur la solution d'ADN superenroulé. Cette expérience menée avec le bromure d'éthidium, intercalant de référence, provoque une augmentation, puis une chute de la viscosité, en utilisant des doses croissantes de ce produit.

Apparemment, la liaison du salène **9** à l'ADN, n'induit pas de modifications fortes dans la torsion de la double hélice d'ADN. Il ne s'agit donc vraisemblablement pas d'une intercalation entre deux plans de paires de bases.

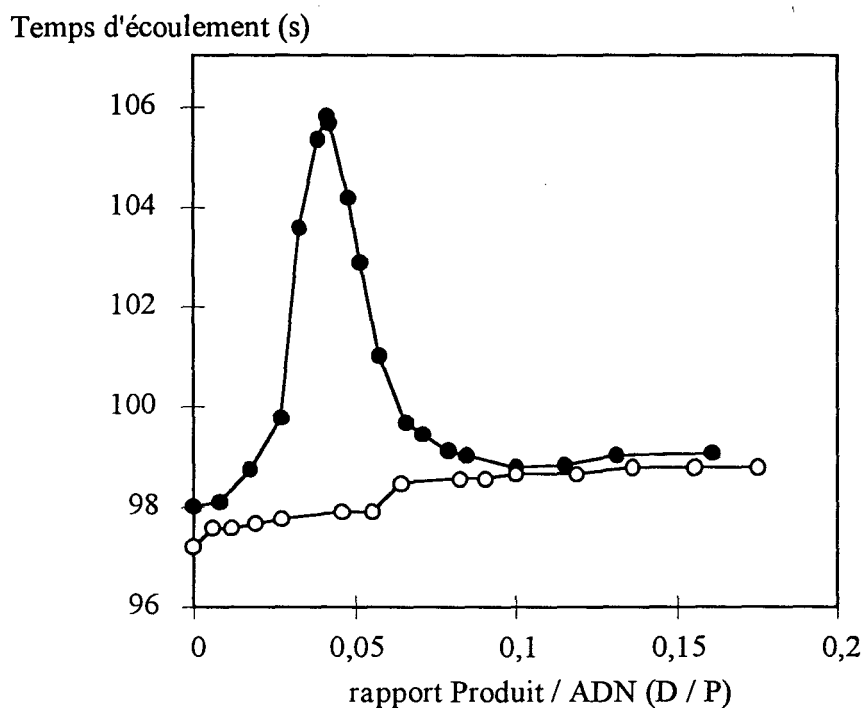


Figure 62 : temps d'écoulement de solutions de pUC12 (ADN double brin circulaire fermé) avec le composé **9** (○) et le bromure d'éthidium¹⁰⁵ (●). Le temps d'écoulement est tracé en fonction du rapport molaire de produit ajouté par nucléotide d'ADN.

II.5.1.3. Dichroïsme circulaire.

Les expériences ont été effectuées au Laboratoire de Chimie Macromoléculaire et Chimie Physique du Professeur C. Houssier de Liège. Le Professeur P. Colson a effectué les mesures optiques.

Méthode.

Le dichroïsme circulaire repose sur le fait que des constituants possédant une asymétrie absorbent différemment la lumière polarisée. Le dichroïsme circulaire fait donc appel à l'absorption lumineuse et à l'activité optique. Il ne peut se manifester qu'au voisinage d'une longueur d'onde d'absorption de la substance optiquement active. La mesure du dichroïsme

circulaire dans le visible d'un complexe est une caractéristique du complexe seul: en effet, les formes non complexées du ligand ne présentent qu'une absorption dans l'ultraviolet et le métal non complexé, étant inactif optiquement, ne présente aucun spectre dichroïque.

Une macromolécule asymétrique comme l'ADN possède, comme le complexe, un spectre dichroïque. Si le complexe se lie selon un mode unique avec cette macromolécule, l'asymétrie globale et donc les spectres dichroïques sont perturbés. Ils restent identiques si cette liaison est aléatoire.

Les expériences sont réalisées à 20°C sur un dichographe Jobin-Yvon CD6 couplé à un ordinateur. Les solutions sont placées dans des cuves de quartz de 1 cm.

Dans un premier temps, l'interaction de l'ADN de thymus de veau avec le salène complexé par le cuivre (II) et le nickel (II) a été effectuée. Dans un second temps, afin d'évaluer la sélectivité de liaison du ligand complexé par le cuivre (II) vis à vis des paires de bases A-T ou G-C, d'autres expériences de DC ont été menées en utilisant des polynucléotides de synthèse aux compositions en bases variées.

Les mesures sont effectuées par addition progressive d'ADN ou de polynucléotides à une solution de ligand seul jusqu'à l'obtention de la concentration désirée.

Résultats : le salène complexé par le cuivre (II) 9.

Dans ces différentes expériences, l'ADN utilisé est de l'ADN de thymus de veau (56 % en paires de bases A-T), les différents polynucléotides utilisés sont le poly(dA-dT)-poly(dA-dT), le poly(dG-dC)-poly(dG-dC) et le poly(dI-dC)-poly(dI-dC) (figure 63).

L'addition d'ADN de thymus de veau induit des changements significatifs dans ces spectres de DC (figure 63a). La bande à 330 nm, correspondant au salène, décroît lorsque la quantité d'ADN de thymus de veau augmente. Dans la région spectrale entre 350 et 420 nm, régions d'absorption du salène complexé par le cuivre (II), une forte augmentation des bandes est observée.

Ces deux variations entraînent la naissance de deux points isodichroïques à 318 et 354 nm. Ces deux points et les proportions spectrales qui restent constantes, c'est-à-dire augmentent ou décroissent régulièrement en fonction des concentrations, indiquent l'existence d'un mode de liaison unique. Ces deux éléments de variation indiquent de plus que la liaison apparaît géométriquement homogène.

Le copolymère alterné poly(dA-dT)-poly(dA-dT) induit de fortes et significatives variations dans les spectres de DC du salène complexé par le cuivre (II) **9** (figure 63b). Cependant, la variation des intensités des spectres de DC est moins prononcée que dans les spectres de DC utilisant de l'ADN de thymus de veau. Pour une liaison du salène avec des séquences exclusivement de type A-T, les intensités des spectres de DC devraient donc être plus importantes avec le copolymère poly(dA-dT)-poly(dA-dT) qu'avec l'ADN de thymus de veau.

En utilisant le copolymère poly(dG-dC)-poly(dG-dC), quels que soient les rapports entre le copolymère et le produit, les spectres de DC ne varient pas (figure 63c). Ces résultats montrent donc que le salène complexé par le cuivre (II) se lie préférentiellement aux séquences A-T plutôt qu'aux séquences G-C. Ce résultat d'ailleurs est corrélé par les faibles amplitudes de signaux de DC obtenus avec le copolymère poly(dG-dC)-poly(dG-dC), par rapport aux forts signaux obtenus en utilisant de l'ADN de thymus de veau.

Le remplacement des guanosines par des inosines a ensuite été effectué (figure 63d). Les inosines sont des homologues des guanines dans lesquels l'amine 2 a été remplacée par un groupement méthyle. En effet, l'amine en position 2 des guanines est le groupement le plus exposé (vers l'extérieur de la double hélice de l'ADN) dans le petit sillon de l'ADN.

Ce remplacement ne modifie pas beaucoup la liaison du composé au copolymère. En effet, les spectres de DC entre les copolymères poly(dG-dC)-poly(dG-dC) et le poly(dI-dC)-poly(dI-dC) pour un rapport polynucléotide / produit de 20 sont quasiment identiques. De plus, aucune bande d'absorption correspondant au salène **9** n'est apparue à 390 nm lorsque ces deux copolymères ont été utilisés. Ceci laisse supposer que le ligand **9** interagit moins ou différemment avec les polynucléotides G-C et I-C qu'avec le copolymère poly(dA-dT)-poly(dA-dT) ou l'ADN de thymus de veau.

De plus, le fait que remplacement de l'amine 2 des guanines n'ait pratiquement pas d'influence sur la liaison du composé avec l'ADN, exclut une liaison du côté du petit sillon de l'ADN. Ceci est contraire à ce qui a été décrit pour les produits ayant une spécificité pour les paires de bases A-T ligands du petit sillon (nétropsine, Hoechst 33258, DAPI, bérénil), pour les produits spécifiques des paires de bases G-C ligands du petit sillon de l'ADN (mitamycine, chromomycine) ainsi que pour les intercalants¹⁰⁶⁻¹¹⁰ (actinomycine, échinomycine).

Nous pouvons donc supposer une liaison du salène complexé par le cuivre (II) 2 côté grand sillon de l'ADN qui ne soit pas une intercalation.

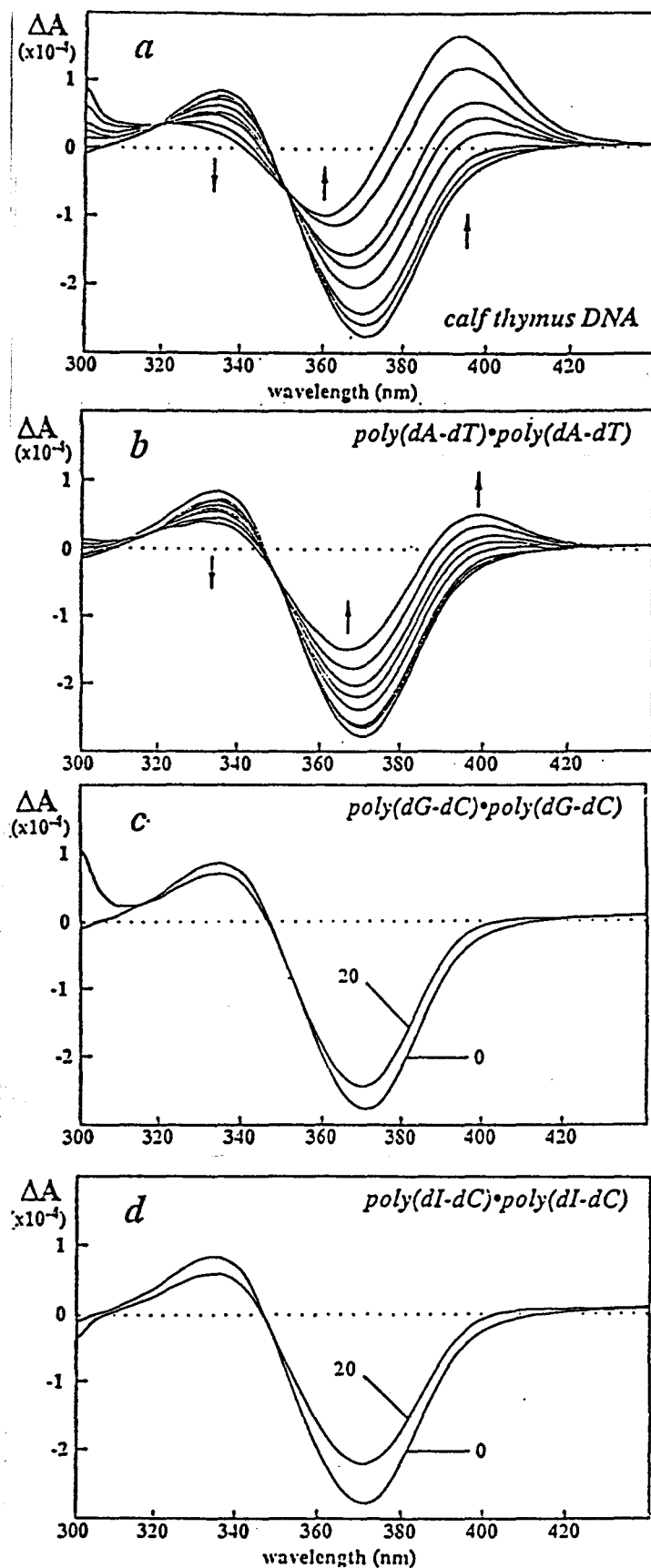


Figure 63 : dichroïsme circulaire. Titration du dérivé **9** avec (a) ADN de thymus de veau, (b) poly(dA-dT)-poly(dA-dT). Les figures (c) et (d) montrent les spectres de DC du dérivé avec ou sans poly(dG-dC)-poly(dG-dC) (c) et poly(dI-dC)-poly(dI-dC) (d). Dans les figures (a) et (b), les proportions ADNphosphate/dérivé **9** (P/D) augmentent selon la règle 0,1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 15 ; 20. Dans les figures (c) et (d) les proportions P/D sont identiques. Les spectres du dérivé sont obtenus en présence ou en absence d'acides nucléiques.

Résultats : le salène complexé par le nickel (II) 10.

L'étude des spectres de dichroïsme circulaire du salène complexé par le nickel (II) **10** a été menée en présence d'ADN de thymus de veau. Les spectres de DC obtenus ont la même allure générale que ceux obtenus en présence de salène complexé par le cuivre (II).

En effet, la bande d'absorption du ligand **10** située à 310 nm décroît régulièrement lorsque la concentration en ADN augmente (figure 64). Les bandes d'absorption du ligand situées entre 330 nm et 400 nm subissent une forte augmentation lorsque la concentration en ADN de thymus de veau augmente. Aucun point isodichroïque n'est en revanche apparu. L'interaction du salène **10** avec l'ADN est donc indéniable, mais apparaît géométriquement moins homogène.

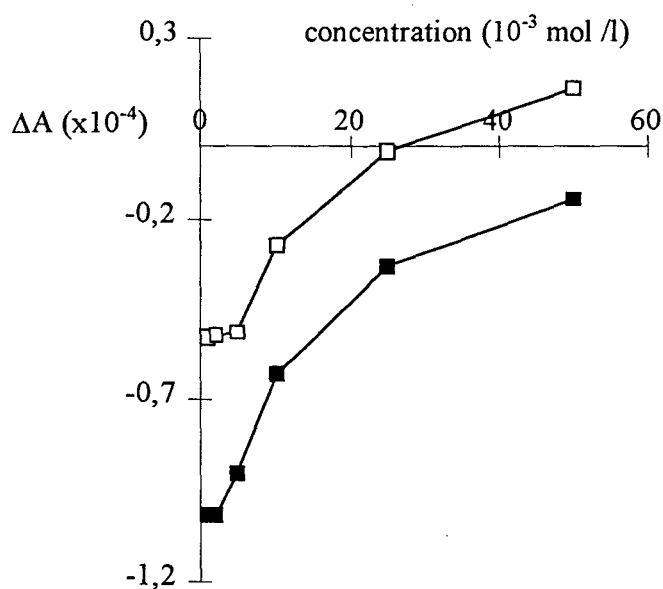


Figure 64 : évolution du dichroïsme circulaire avec le salène complexé par le nickel (II) **10** à (□) 330 nm et (■) 400 nm. L'ADN utilisé est de l'ADN de thymus de veau. La proportion ADNphosphate/**10** (P/D) est de 20.

II.5.1.4. Dichroïsme linéaire électrique D.L.E..

Les expériences ont été effectuées au Laboratoire de Chimie Macromoléculaire et Chimie Physique du Professeur C. Houssier de Liège. Le Professeur P. Colson a effectué les mesures optiques.

Il s'agit d'une méthode de choix pour évaluer la liaison des produits avec l'ADN¹¹⁰.

Méthode.

Le dichroïsme (ΔA) est défini comme une absorption différentielle, observée lorsqu'un faisceau de lumière polarisée linéairement traverse un milieu anisotrope. Lorsqu'une solution d'ADN (milieu isotrope) est soumise à l'action d'un champ électrique, les molécules d'ADN s'orientent dans ce champ^{111,112}. Le grand axe de l'ADN se trouve alors presque 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 (ΔA) 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 (ici l'ADN):

$\Delta A / A < 0$ 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 des chromophores est plus ou moins perpendiculaire à celui des plateaux de bases et parallèle à l'axe d'orientation de l'ADN.

Résultats : salène complexé par le cuivre (II) 9.

Les expériences ont été réalisées dans un tampon cacodylate de sodium (1 mM, pH = 6,5) en fonction:

- du rapport ADN / Produit (P / D), à champ électrique et longueur d'onde (340 nm) constants .
- de la longueur d'onde, avec un rapport P / D de 20 (10 μ M de ligand pour 100 μ M d'ADN) et un champ électrique constant.
- du champ électrique, avec un rapport P / D de 20 (10 μ M de ligand pour 100 μ M d'ADN) et à longueur d'onde constante (à 340 nm pour le ligand et 260 nm pour l'ADN seul).

Lors de l'expérience de dichroïsme linéaire électrique menée avec l'ADN de thymus de veau, deux éléments sont en faveur d'un positionnement du salène parallèlement aux plans définis par les paires de bases de l'ADN double brin:

- dans les courbes obtenues en fonction de la longueur d'onde (figure 65), le dichroïsme réduit $\Delta A / A$ est toujours négatif entre 300 et 420 nm, région spectrale indépendante de l'ADN.
- dans les spectres de dichroïsme réduit $\Delta A / A$ en fonction du champ électrique (figure 66), les signaux émis dépendent pareillement du champ électrique appliqué à 260 nm pour les bases de l'ADN et à 340 nm. Les bases de l'ADN et le complexe de cuivre (II) donnent donc des valeurs similaires de dichroïsme réduit.

De plus, dans les spectres enregistrés en fonction du rapport P / D (figure 67), l'intensité des signaux diminue fortement lorsque P / D augmente puis se stabilise lorsque P / D atteint la valeur de 20. Cette évolution indique que le salène complexé par du cuivre (II) 9 est complètement lié à l'ADN pour un rapport P / D \geq 20.

De tels signaux, larges et négatifs, laissent présager une liaison du salène 9 dans le grand sillon de l'ADN, parallèlement aux plans des paires de bases. En effet, une liaison du complexe avec le petit sillon de l'ADN aurait dû donner a priori des spectres de dichroïsme linéaire électrique toujours positifs.

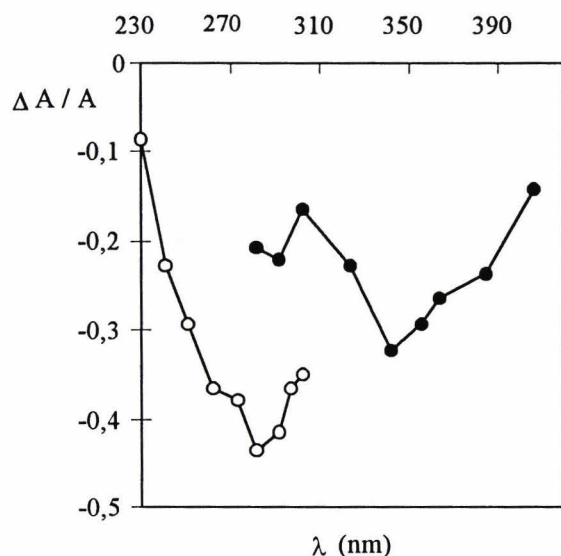


Figure 65 : dichroïsme réduit en fonction de la longueur d'onde pour $P / D = 20$, avec un champ de 12,5 kV/cm, pour (○) ADN seul et (●) complexe ADN-salène Cu (II) 2.

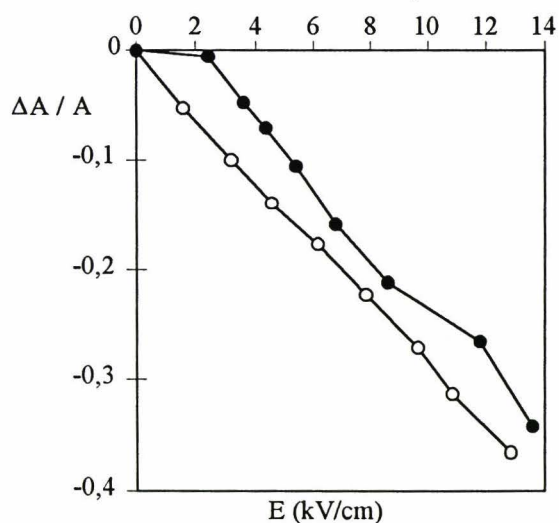


Figure 66 : dichroïsme réduit en fonction du champ électrique pour le complexe ADN-salène Cu (II) 2 (●) et pour l'ADN seul (○). La longueur d'onde est de 340 nm pour le salène 2 et 260 nm pour l'ADN. Le rapport P/D est de 20.

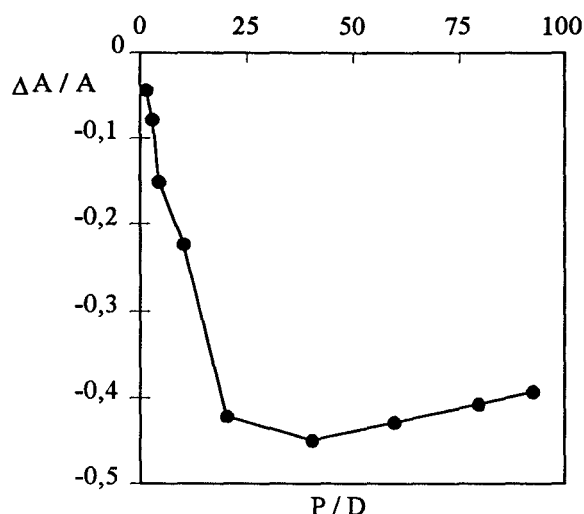


Figure 67 : dichroïsme réduit en fonction du rapport P / D à 340 nm avec un champ de 12,5 kV/cm pour le complexe ADN-salène Cu (II) 9.

Résultats : salène complexé par le nickel (II) 10.

Différentes expériences de dichroïsme linéaire électrique ont été réalisées avec le salène complexé par le nickel (II) 10, soit avec de l'ADN de thymus de veau, soit avec les copolymères alternés poly(dA-dT)-poly(dA-dT) ou poly(dG-dC)-poly(dG-dC). Le tampon utilisé est un tampon cacodylate de sodium (1mM, pH = 6,5), les spectres de dichroïsme linéaire électrique ont été enregistrés (figure 68) en fonction de la longueur d'onde avec un rapport P / D de 20 (10 μ M en ligand 10 ; 100 μ M en ADN ou polynucléotides).

Quelle que soit l'expérience avec l'ADN de thymus de veau ou les différents copolymères, les signaux de D.L.E. sont toujours négatifs, ce qui suggère une orientation du salène 10 parallèlement aux plans définis par les paires de bases.

Le fait que les mêmes variations de D.L.E. soient obtenues avec le copolymère poly(dA-dT)-poly(dA-dT) et avec l'ADN de thymus de veau, alors que les signaux sont presque nuls avec le copolymère poly(dG-dC)-poly(dG-dC), indique bien que le composé se lie préférentiellement aux séquences riches en paires de bases A-T. Il faut toutefois remarquer que les intensités des spectres de D.L.E. sont moins fortes en utilisant le copolymère poly(dA-dT)-poly(dA-dT) que l'ADN de thymus de veau, qui a une quantité relativement égale en paires de bases A-T et G-C.

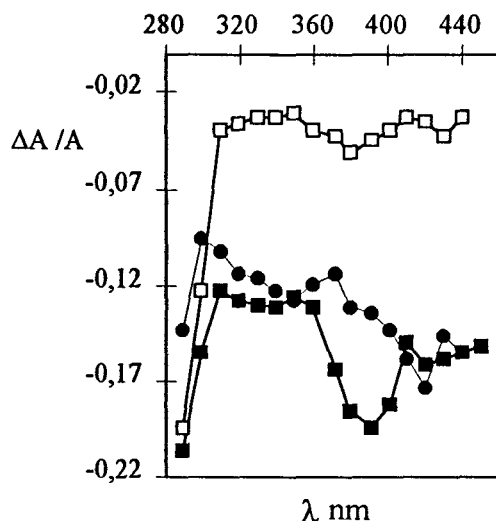


Figure 68 : dichroïsme réduit en fonction de la longueur d'onde pour un rapport ADN (ou copolymère) / salène complexé par le nickel (II) 10 égal à 20 , avec un champ de $12,5$ kV/cm. (■) ADN de thymus de veau, (●) copolymère poly(dA-dT)-poly(dA-dT), (□) copolymère poly(dG-dC)-poly(dG-dC).

II.5.1.5. Expériences de « footprinting ».

méthode.

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 réversible¹¹³. Actuellement, on dispose d'endonucléases de restriction pour couper l'ADN et de techniques qui permettent l'isolement des fragments d'ADN obtenus. Ceux-ci ont un nombre suffisant de paires de bases ou de combinaisons de paires de bases pour être représentatifs de tous les sites possibles de liaisons de petites molécules à l'ADN.

Des techniques enzymatiques permettent de marquer (au phosphore ^{32}P le plus souvent) une extrémité de l'un des brins de fragments d'ADN (en $5'$ par une kinase ou en $3'$ par la polymérase de Klenow ou la reverse transcriptase). Les agents utilisés en « footprinting » sont de type enzymatique (DNAaseI, DNAaseII ou nucléase micrococcale) ou chimique (radicaux hydroxyle générés par divers types de complexes métalliques). Dans certaines conditions opératoires, ils coupent statistiquement l'ADN 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 polyacrylamide¹¹⁴.

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, figure 69) dans l'échelle des fragments d'ADN. La séquence du site de protection est déterminée par référence à des marqueurs (généralement en révélant les guanines au sulfate de diméthyle).

Les expériences de « footprinting » ont été réalisées à l'aide de la DNAase I comme agent de coupure¹¹⁵. Les fragments de restriction utilisés sont purifiés et marqués au ³²P selon les protocoles standards¹¹⁶. Les fragments d'ADN de composition différentes: 117-mer et 265-mer du plasmide pBS ont été utilisés avec les salènes complexés par le cuivre (II) 9 et par le nickel (II) 10.

Les expériences sont effectuées sur un volume total de 10 µl. Les échantillons (3 µl) de fragments d'ADN marqué sont incubés avec 5 µl de solution tampon, contenant le produit à tester à la concentration désirée. Après 30 à 60 minutes d'incubation à 37 °C pour atteindre l'équilibre, la digestion enzymatique est initiée par l'ajout de 2 µl d'une solution de DNAase I jusqu'à une concentration finale en enzyme de 0,01 unité / ml. Après 3 minutes, la digestion est arrêtée par l'addition de 3 µl d'une solution de formamide contenant un colorant. Les échantillons sont chauffés à 90 °C pendant 4 minutes, puis plongés dans la glace pendant 4 autres minutes, avant de réaliser l'électrophorèse sur un gel de séquençage (0,3 mm d'épaisseur, 8% acrylamide contenant de l'urée 8 M). Celle-ci est réalisée à 1500 V pendant 2 heures. Le gel est ensuite trempé dans un bain d'acide acétique à 10 % pendant 15 min, fixé sur un papier absorbant et séché à 80 °C. L'autoradiogramme et la titration du phosphore sont ensuite réalisés¹¹⁵.

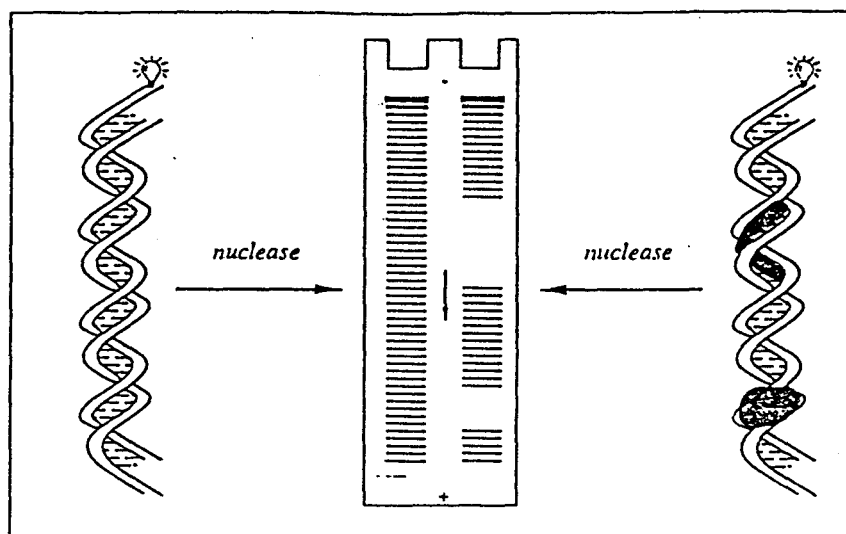


Figure 69 : schéma représentatif d'un résultat de footprinting sur un gel d'électrophorèse.

Résultats : salène complexé par le cuivre (II) 9.

Sur les gels d'électrophorèse, aucun site d'inhibition de l'activité enzymatique de la DNAase I n'est visualisé. La liaison du produit à l'ADN ne perturbe pas la digestion de celui-ci par l'enzyme.

Les différentes expériences de footprinting n'ont pas confirmé la préférence de liaison du salène complexé par le cuivre (II) 9 avec les séquences riches en paires de bases A-T, comme l'avaient montré assez nettement les spectres de dichroïsme circulaire avec les différents copolymères.

Résultats : salène complexé par le nickel (II) 10.

Aucune inhibition de l'activité de la DNAase I n'est observée lors des expériences de footprinting réalisées avec le salène complexé par le nickel (II) (figure 70). La préférence de liaison de ce produit avec les séquences riches en paires de bases A-T de l'ADN avait pourtant été mise en évidence lors des expériences de dichroïsme linéaire électrique réalisées avec les copolymères de différentes constitutions.

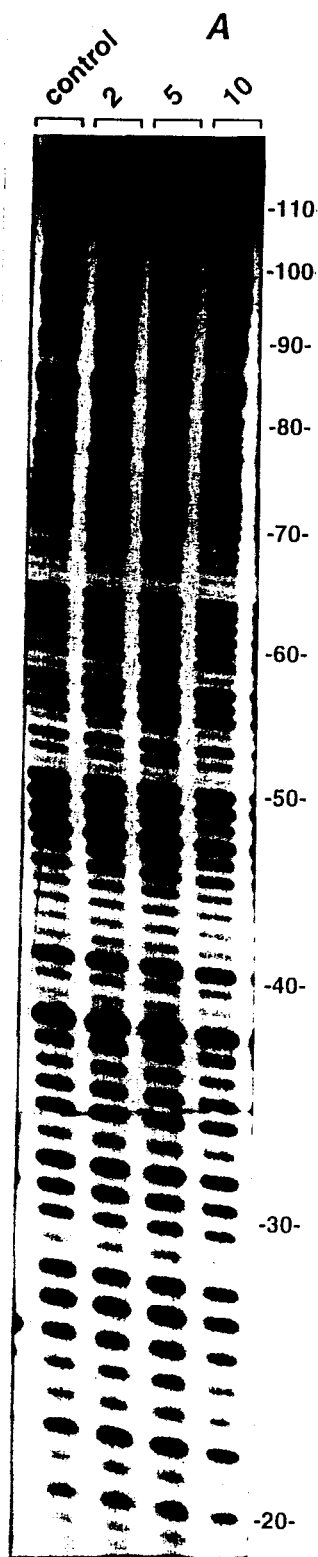


Figure 70 : footprinting à la DNAase I réalisé sur un fragment 117-mer, marqué à son extrémité 3' avec du ^{32}P et en présence du salène complexé par le nickel (II) 10. La ligne de contrôle ne contient pas de produit. Les nombres sur le bord du gel se réfèrent à la séquence du fragment d'ADN.

II.5.1.6. Conclusion sur la liaison à l'ADN.

Les différentes données spectroscopiques et hydrodynamiques fournissent des renseignements sur la géométrie et la sélectivité de liaison du salène complexé par le cuivre (II) **9** et par le nickel (II) **10**, avec l'ADN.

Conclusion : salène complexé par le cuivre (II) **9**.

Le ligand cuivrique **9** se lie à l'ADN avec une géométrie unique préférentielle, comme l'a montré l'apparition de points isodichroïques dans les spectres de dichroïsme circulaire.

Les spectres de dichroïsme linéaire électrique indiquent que le salène complexé par le cuivre (II) est orienté parallèlement aux plans définis par les paires de bases (avec un angle de + ou - 10°).

Au premier abord, une telle orientation semble compatible avec un processus d'intercalation comme cela a été récemment proposé pour d'autres salènes complexés au cuivre (II)¹⁹. Mais le composé **9** n'a pas d'effet sur la viscosité de l'ADN superenroulé. Ce résultat est donc incompatible avec une intercalation même partielle dans l'ADN (figure 71). Tous les intercalants provoquent en effet un désenroulement de la double hélice¹¹⁷.

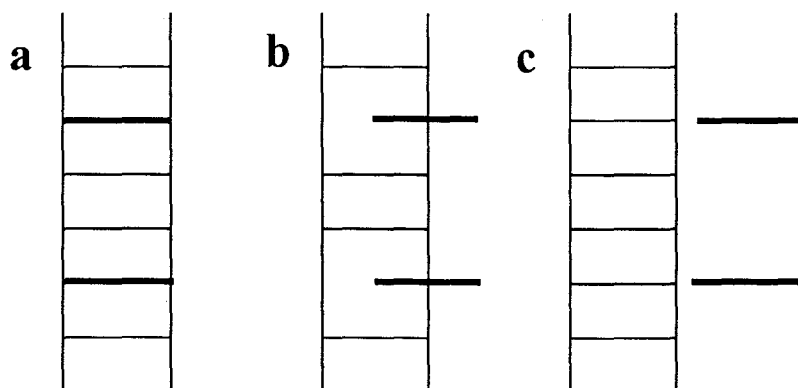


Figure 71 : (a) intercalation, (b) intercalation partielle, (c) positionnement par rapport à l'ADN du salène complexé par le nickel (II).

Les intensités de dichroïsme circulaire obtenus avec l'ADN de thymus de veau et le poly(dA-dT)-poly(dA-dT), indiquent une préférence vers les enchaînements A-T. Ils sont aussi en conflit avec une intercalation¹¹⁸⁻¹²⁰. Cette préférence de liaison n'a pas été confirmée par la technique du footprinting à la DNAase I.

Le dernier mode de liaison à examiner est celui d'une interaction à l'extérieur de la double hélice, par insertion dans le petit ou le grand sillon, de manière parallèle aux paires de bases. Ce processus est différent d'une intercalation et peut avoir lieu de façon spécifique, comme l'ont montré les résultats de dichroïsme circulaire. Les spectres de dichroïsme linéaire électrique s'opposent à l'hypothèse d'une complexation de l'ADN par le salène **2** dans le petit sillon. Ces mêmes spectres devraient montrer en effet dans ce cas de larges signaux positifs, or ceux-ci sont toujours négatifs.

Nous pouvons donc supposer que le complexe **2** se lie dans le grand sillon de l'ADN, et ce pour deux raisons:

- ce procédé de liaison n'induit pas forcément de détorsion de la double hélice.
- le grand sillon est suffisamment large pour accepter le composé orienté de façon parallèle par rapport aux plans définis par les paires de bases de l'ADN.

Il faut d'ailleurs noter qu'une telle insertion à côté des bases dans le grand sillon de l'ADN a été proposée pour certains complexes trisphénantrolines / métal¹²¹.

Ces résultats de liaison ressemblent à ceux obtenus pour des alcaloïdes¹²² plans et les phénothiazines de type bleu de méthylène, connus pour se lier au grand sillon de poly(dA-dT)-poly(dA-dT)¹²³.

L'observation critique, selon laquelle la substitution des résidus guanosines en inosines n'a pas d'effet sur la liaison composé avec l'ADN, est enfin en accord avec l'hypothèse de liaison avec le grand sillon. En effet, tous les produits qui se lient dans le petit sillon de l'ADN sont sensibles à la présence ou à l'absence de l'amine en position 2 de la guanine. Ce groupement est le plus exposé dans cette partie de l'ADN et est directement responsable de l'interaction des molécules avec l'ADN¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. A titre d'exemple, les seuls produits connus,

dont la liaison à l'ADN ne dépend pas de la position de ce groupe amine 2 des guanines, sont les dérivés bis-naphtylimides, interagissant avec le grand sillon de la double hélice¹²⁴.

Conclusion: le salène complexé par le nickel (II) 10.

Bien que les expériences de viscosimétrie soient ici absentes, les expériences d'absorption U.V., de dichroïsme circulaire et de dichroïsme linéaire électrique donnent les mêmes résultats qu'avec le salène complexé par le cuivre (II) 9. On peut supposer que le salène complexé par le nickel (II) 10 se lie avec l'ADN en dehors de la double hélice, parallèlement aux paires de bases, dans le grand sillon de l'ADN.

II.5.2. La coupure d'ADN.

Après avoir déterminé le mode de liaison avec l'ADN des salènes complexés par le cuivre (II) 9 et par le nickel (II) 10, nous avons mené des études de coupure de l'ADN. Les tests de coupures d'ADN ont été utilisés en ayant recours soit à un ADN plasmidique (passage d'une forme superenroulée à une forme ouverte ou linéaire), soit à un fragment de restriction marqué au ³²P (séquencage des sites de coupures), soit à un oligonucléotide.

II.5.2.1. La coupure de plasmide.

Pour réaliser ces expériences, les produits sont incubés avec l'ADN double brin superenroulé de plasmide. De l'acide 2-mercaptopropionique (MPA) est ajouté pour initier les réactions de coupures du complexe de cuivre (II) 9, tandis que de l'oxone (KHSO₅) ou du complexe de magnésium de l'acide monopéroxyphthalique (MMPP) est utilisé pour activer le dérivé contenant du nickel (II) 10. Après incubation, les fragments d'ADN sont séparés sur un gel polyacrylamide dénaturant.

La conversion du plasmide superenroulé d'ADN (forme I) en sa forme circulaire (forme II) correspond à une coupure monobrin. La conversion du même plasmide en sa forme linéaire (forme III) correspond à une coupure double brin. L'apparition de ces formes est déterminée en fonction de la migration électrophorétique. Les tests ont été exécutés en

conditions aérobies. Les différents fragments sont révélés par un bain au bromure d'éthidium, puis dans un bain d'eau. Les gels sont ensuite photographiés sous lumière ultraviolette.

Chaque échantillon contient 4 μ l d'ADN superenroulé pUC12 (3 μ g), 5 μ l de solutions (2 à 500 μ M) de salène complexé par le cuivre (II) **9** et 1 μ l d'acide mercaptopropionique (MPA) pour initier la réaction. Après une heure d'incubation, à 37 °C, 1 μ l de bleu non dénaturant (0,25 % bleu de bromophénol, 0,25 % de xylène cyanol, 30 % glycérol dans l'eau) est ajouté à chaque tube et les solutions sont déposées sur un gel d'agarose 0,9 %. L'électrophorèse est arrêtée après 2 heures à 100 V dans un tampon TBE (89 mM tris-borate, pH = 8,3, 1 mM EDTA). Les gels sont ensuite plongés dans une solution de bromure d'éthidium pendant 30 min, puis lavés par de l'eau et enfin photographiés sous lampe U.V.

Résultats: salène complexé par le cuivre (II) **9**.

Le complexe de cuivre (II) **9** est capable de catalyser les coupures oxydantes de l'ADN (figure 72). L'incubation de l'ADN de plasmide, à 37°C, pendant une heure, avec une concentration en composé de 50 μ M, induit la complète conversion de la forme I en forme II. On peut donc conclure que l'activation du complexe cuivrique engendre une coupure monobrin de l'ADN double hélice. En augmentant les concentrations de salène complexé, la probabilité d'une seconde coupure est augmentée. Ceci est très visible sur le gel, avec l'apparition d'une forme III pour une concentration en composé \geq 100 μ M.

L'activation la plus efficace a été obtenue avec le MPA, réactif de choix lors des études de coupures d'ADN des complexes cuivre-phénanthroline^{19,65}. Des coupures beaucoup moins importantes ont été observées en utilisant le dithiothréitol comme agent activant et encore moins importantes en utilisant de l'eau oxygénée.

Résultats : salène complexé par le nickel (II) **10**.

Le processus opératoire utilisé ici est le même que pour le salène complexé par le cuivre (II) **9**, sauf que l'agent activateur du salène **10** n'est plus le MPA mais l'oxone KHSO₅.

Après 2 heures d'incubation, aucune coupure n'a été détectée avec les salènes complexés par le nickel (II). Ce résultat peut s'expliquer. Il a été décrit que les salènes complexés par le nickel (II) coupent l'ADN dans des régions monobrins (parties en boucles ou en épingles à cheveux), mais pas les doubles hélices d'ADN^{62,67,125}.

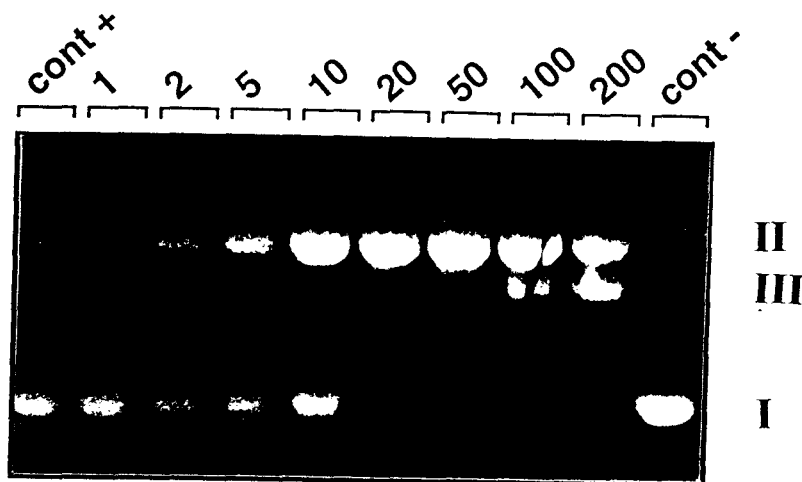


Figure 72 : coupure d'un ADN circulaire fermé pUC12 par le salène complexé par le cuivre (II) **9** en présence de MPA comme agent réducteur. Les concentrations (μM) sont indiquées en haut de chaque gel. Les contrôles + et - sont l'ADN seul et l'ADN en présence de MPA incubés sans produit respectivement.

II.5.2.2. Coupure de fragments de longueurs définies marqués au ^{32}P .

D'autres études de coupure sont réalisées en utilisant les fragments d'ADN 117-mer et 265-mer marqués au ^{32}P utilisés en footprinting. Ils sont préparés à partir d'un ADN de plasmide pBS digéré par les enzymes de restriction *EcoRI* et *PvuII*. Sachant que la séquence en paires de bases de ces fragments est connue, la technique a pour intérêt de déterminer si les coupures observées se font de façon spécifique. La résolution de cette technique permet de discerner les différents fragments d'ADN formés à une paire de base près. Un marquage sur l'extrémité 3' ou 5' de ces ADN est possible afin d'étudier la coupure sur l'un puis sur l'autre brin de l'ADN (figure 73).

Les produits sont incubés avec l'ADN marqué au ^{32}P . Le temps d'incubation est de deux heures. Les échantillons contiennent 2 μl d'ADN, 4 μl de produit (concentration de 5, 20,

100 mM) et 1 μ l d'agent activant (concentration de 1 à 20 mM). Le MPA est utilisé dans le cas du salène complexé par le cuivre (II) **9** et l'oxone dans le cas du salène complexé par le nickel (II) **10**. Après incubation, les échantillons sont lyophilisés, resuspendus dans 4 μ l de bleu dénaturant (solution aqueuse contenant un colorant et 80% de formamide), puis chauffés à 90 °C pendant 4 min, et immédiatement après plongés dans la glace. Les échantillons sont alors déposés sur gel de polyacrylamide dénaturant et soumis à électrophorèse. Le gel est autoradiographié et un comptage par accumulation d'image du phosphore est réalisé¹¹⁵.

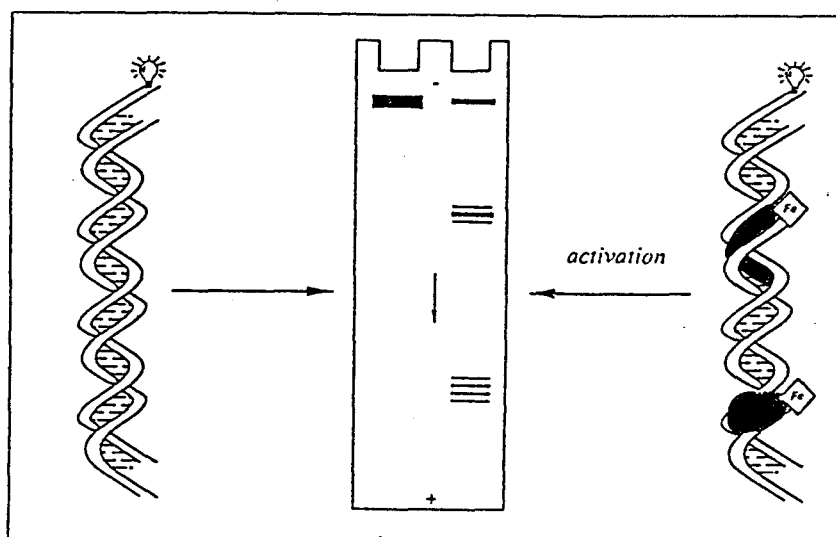


Figure 73 : représentation de la coupure obtenue avec un produit possédant une affinité pour l'ADN. La liaison est spécifique.

Résultats : salène complexé par le cuivre (II) 9.

Au regard des différentes expériences, toutes les bandes de coupures des ADN marqués sont présentes. Elles s'amplifient en fonction de la concentration en produit et non en fonction de la concentration en MPA. Ceci reste logique, car le MPA ne doit pas influencer la capacité de coupure du produit testé.

Le produit contenant du cuivre (II) **9** induit donc des coupures au hasard, indépendantes des séquences d'ADN.

Résultats :salène complexé par le nickel (II) 10.

Dans les mêmes conditions que pour le salène complexé par le cuivre (II), aucune coupure ne peut être détectée avec le composé contenant du nickel (II) 10 sur les ADN double brin. Ce résultat est en accord avec une absence de coupure de l'ADN double brin par ce type de composé.

II.5.2.3. Coupure d'oligonucléotide possédant une boucle mono brin.

Considérant que les salènes complexés par du nickel (II) ne coupent pas les ADN double brin, mais qu'ils induisent des modifications spécifiques sur les guanines des ARN et des ADN mono brin^{62,63,125-127}, des tests de coupures sur des ADN double brin contenant une structure en épingle à cheveux (« hairpin ») ont été menés. Cette partie mono brin constituée par la boucle devrait subir l'action nucléasique du composé complexé par le nickel (II) 10.

L'utilisation de trois nucléotides complémentaires 17-mer 5'-AGTCTAT-XXX-TTAGACT, où X = A, C ou G successivement, va permettre de déterminer si le salène complexé par le nickel (II) coupe l'ADN mono brin et s'il possède une spécificité de coupure. Ces différents oligonucléotides forment une structure en « hair pin » (boucle notée hA, hC, hG). Ils possèdent 6 paires de bases appariées et une boucle apicale de 5 bases TXXXT (figure 74) non appariées. Dans cette boucle, l'ADN est donc mono brin. Ces oligonucléotides sont marqués sur leur extrémité 5' au ³²P.

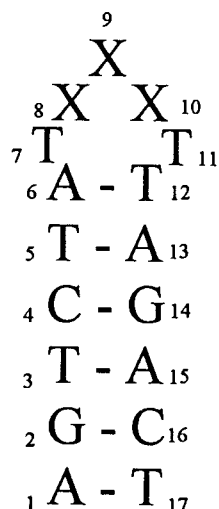


Figure 74 : oligonucléotides utilisés où X = A, C ou G.

Après incubation de 30 minutes, les fragments d'ADN sont mis à chauffer dans la pipéridine à 90 °C pendant 12 minutes et les échantillons sont lyophilisés. Les produits de coupure sont alors resuspendus dans 5 µl de solution contenant 80 % de formamide, 10 mM d'EDTA et 0,1 % en colorant. Les échantillons sont chauffés à 90 °C pendant 4 minutes, refroidis dans la glace et déposés sur un gel de séquence (15 % polyacrylamide, 7 M en urée).

Dans le cas de l'activation par l'oxone (figure 76), après 15 minutes d'incubation, aucune coupure dans les boucles contenant les bases C et A n'est visible. En revanche, pour la boucle contenant les bases G, les fragments correspondant aux coupures en T₇, G₈, G₉ et G₁₀ sont visibles pour une dose de 0,5 µM. Pour une dose en composé **10** de 10 µM, seulement 30 secondes suffisent pour induire des coupures en G₈, G₉ et G₁₀ (figure 75).

De plus, quelle que soit la boucle utilisée, une coupure supplémentaire en G₂ apparaît pour une concentration en complexe **10** de 10 µM, et ce pour les trois oligonucléotides hG, hC et hA. En utilisant le MMPP (figure 77) comme agent activateur, les mêmes fragments de coupure dans la boucle hG sont observables pour des doses en salène **10** de 0,1 µM. Contrairement à ce qui a été observé en activant par l'oxone, l'activation par le MMPP ne permet pas de mettre en évidence de coupure sur la guanine G₂, et ce quel que soit le fragment marqué utilisé.

Lorsque le temps d'incubation est de 30 secondes, le salène complexé par le nickel (II) activé par l'oxone, coupe le triplet GGG de la boucle hG. La base située en G₂ n'est touchée qu'au bout de 2 minutes d'incubation.

La coupure de l'ADN mono brin par le salène complexé par le nickel (II) est donc dépendante non seulement de la concentration mais aussi du temps d'incubation. De plus, le fait que la guanine en G₈ soit plus touchée que la G₂ montre que le salène coupe spécifiquement les résidus guanines les plus accessibles.

Les fragments sont tous visualisés par autoradiogramme, après avoir fait chauffer les échantillons dans la pipéridine. Ce détail expérimental permet de mieux résoudre les différents

fragments sur les gels de séquence. Cependant, les espèces oxydées sont bien visibles sans ce traitement alcalin.

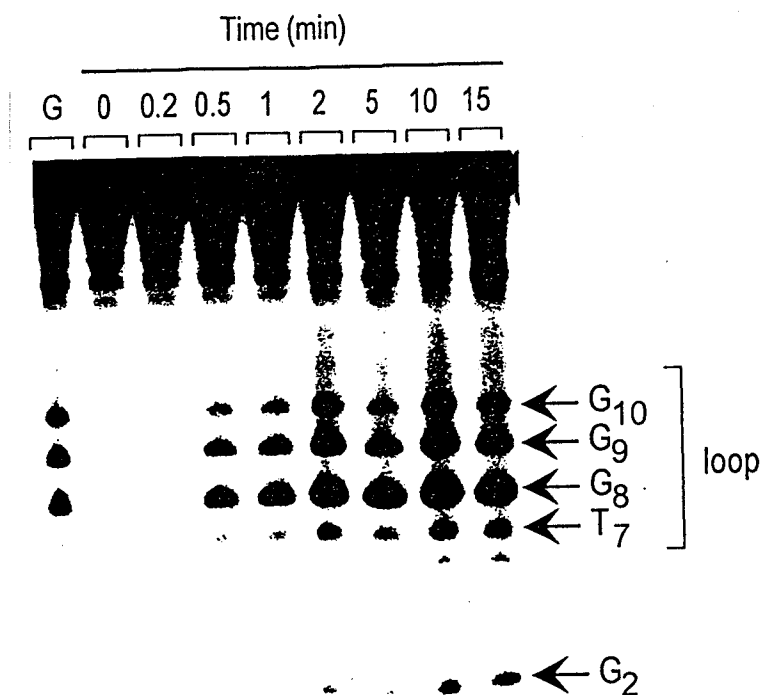


Figure 75 : évolution de la coupure de l'oligonucléotide contenant la séquence monobrin GGG en présence du salène complexé par le nickel (II) 10 à 10 μM et d'oxone (50 μM).

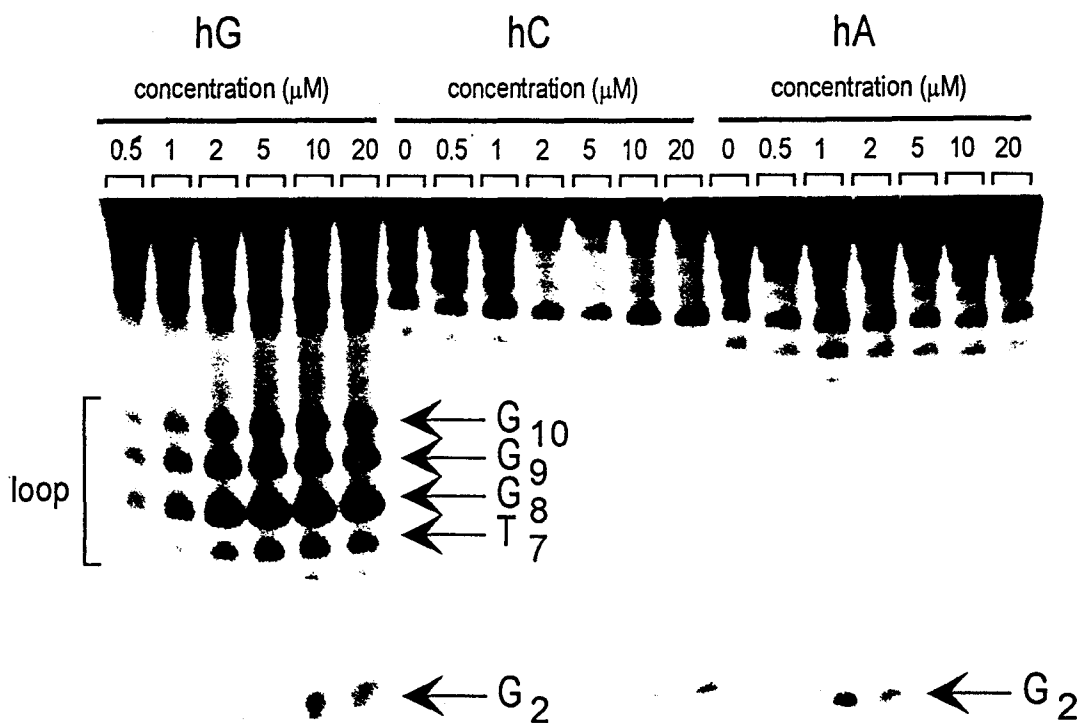


Figure 76 : coupure par le composé 10 d'oligonucléotides possédant une boucle mono brin en épingle à cheveux, marqués au ^{32}P sur l'extrémité 5' en présence d'oxone KHSO_5 .

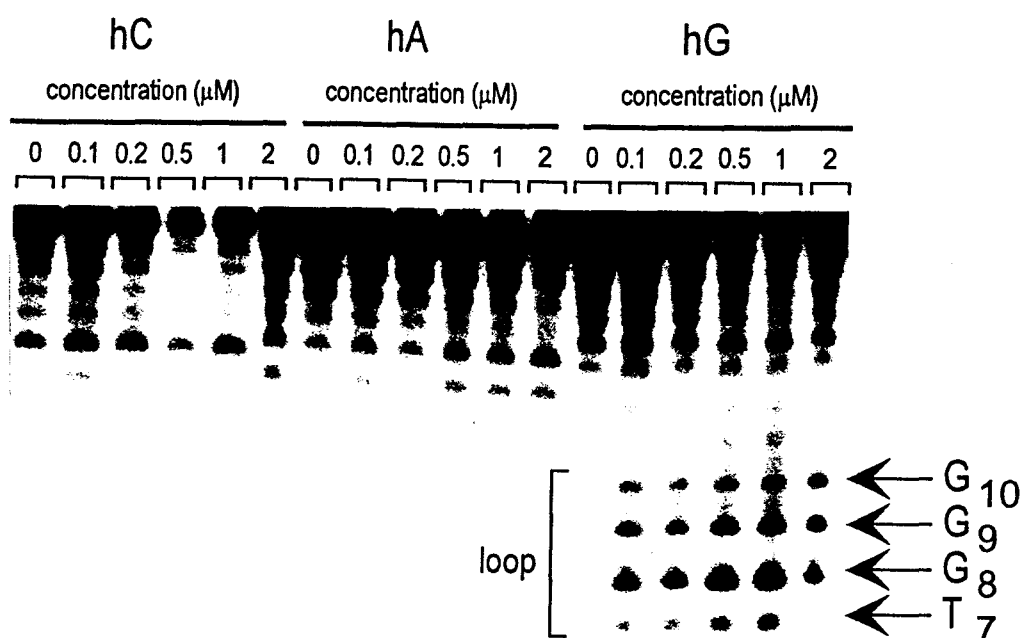


Figure 77 : coupure par le composé **10** d'oligonucléotides possédant une boucle mono brin en épingle à cheveux, marqués au ^{32}P sur l'extrémité 5' en présence de monopéroxy-phtalate de magnésium MMPP. Les concentrations (μM) en produit **10** sont indiquées en haut de chaque gel.

II.5.2.6. Conclusion sur les coupures d'ADN.

Le salène complexé par le cuivre (II) **9** induit des coupures monobrin de la double hélice d'ADN. Ces coupures se font au hasard. Ceci semble compatible avec une liaison non spécifique de ce salène **9** avec l'ADN et n'explique pas la sélectivité de séquence A-T observée en DC.

Aucune coupure d'ADN double brin ne peut être détectée avec les dérivés contenant du nickel (II) **10**, ce qui est en accord avec la littérature. En revanche, ce salène **10** coupe l'ADN monobrin. Cette coupure oxydante est spécifique des résidus guanines les plus exposés.

Toutes ces coupures visualisées, à la fois sur l'ADN double brin pour le salène complexé par le cuivre (II) **9** et sur l'ADN mono brin pour le salène complexé par le nickel (II) **10**, ont nécessité l'intervention d'agents activateurs. Cette utilisation corrèle le résultat de voltammétrie cyclique qui montre qu'aucun des salènes **9** et **10** ne peut, dans son état de base, activer l'oxygène. Le résultat de coupure spécifique du salène complexé par le nickel (II) **10** indique vraisemblablement la formation d'une espèce Nickel-Oxo active. Celle-ci est générée à

côté de l'ADN et exerce son action sur celui-ci^{61,63,67,126,127}. Ce résultat est d'ailleurs confirmé par l'absence de toute espèce radicalaire en RPE.

En revanche, dans le cas du salène complexé par le cuivre (II) 9, il a été montré que sa liaison s'effectue de façon spécifique, alors que les coupures observées sur les fragments d'ADN double brin de 117 et 265 paires de bases se font de façon complètement aléatoire. Cette apparente contradiction est tout à fait compatible avec la production de radicaux hydroxyle qui a par ailleurs été montrée par la technique du « spin-trapping » en RPE.

Ces deux salènes 9 et 10 sont de très bons candidats pour être utilisés comme nucléases chimiques aléatoires dans le cas du composé 9 et spécifiques de coupures d'ADN monobrin au niveau des guanines avec le composé 10. Ces produits pourraient être utilisés comme agents de coupure dans les expériences de « footprinting ».

Lorsque le salène complexé par le manganèse (III) 13 sera obtenu, les mêmes études seront effectuées sur ce nouveau composé, afin de voir si le changement de métal de transition ne lui conférerait pas de nouvelles propriétés, différentes de celle des complexes de cuivre (II) 9 et de nickel (II) 10. De plus il est d'ores et déjà envisageable de complexer notre synthon salénique par d'autres métaux comme le chrome, le cobalt et le ruthénium, afin d'élargir le champ de nos investigations dans la conception de nouvelles nucléases.

Nous allons chercher, dans la seconde partie du travail, à modifier les modes de liaison et de coupure observées ici avec les complexes de salène seuls, en réalisant des molécules hybrides avec des synthons possédant une affinité particulière pour l'ADN.

CHAPITRE III

***ASSOCIATION DES SALENES
AVEC DES INTERCALANTS***

III.1. ASSOCIATION AVEC LES ANTHRAQUINONES.

III.1.1. Généralités

Comme nous l'avons mentionné précédemment, on peut espérer modifier l'affinité des salènes pour l'ADN ou leur pénétration cellulaire, en les associant à des synthons, dont les propriétés antitumorales sont reconnues. Un des choix pour véhiculer les salènes vers l'ADN est l'utilisation d'une fraction anthraquinonique. Les deux synthons utilisés sont issus de la mitoxantrone ou de l'amétantrone (figure 78).

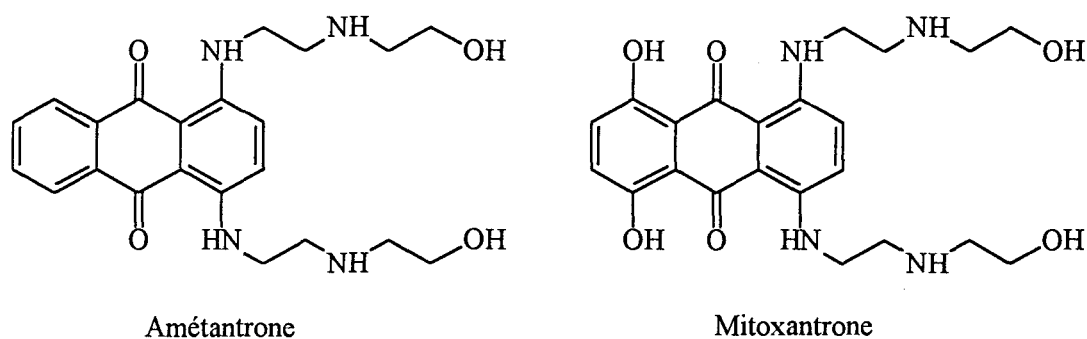


Figure 78 : L'amétantrone et la mitoxantrone.

Ces deux molécules ont été très étudiées et diffèrent par les substituants portés par la fraction anthraquinonique. La mitoxantrone est un dérivé 1,4-bis-aminoalkyl-5,8-dihydroxy-9,10-anthracènedione, tandis que l'amétantrone est son homologue non hydroxylé sur les positions C₅ et C₈¹²⁸. Il est intéressant de noter que l'amétantrone est plus active *in vitro* que la mitoxantrone, tandis que l'inverse s'applique sur l'activité *in vivo*.

La mitoxantrone est utilisée en clinique et possède des actions diverses ce qui multiplie sa cytotoxicité. Ses fractions anthraquinoniques se lient à l'ADN dont elles inhibent la réplication, ainsi que la biosynthèse d'ARN¹²⁹. Un second effet renforçant la cytotoxicité est la capacité des médicaments à produire des radicaux libres hydroxylés qui vont créer des coupures au sein de l'ADN¹³⁰. Un troisième facteur contribuant à l'activité de la mitoxantrone et de l'amétantrone est l'inhibition de la topoisomérase II¹³¹. Les deux propriétés importantes de ces produits, qui vont nous intéresser dans la conception de molécules hybrides avec le salène, sont leur capacité à se lier et induire des coupures d'ADN.

III.1.1.1. Liaison à l'ADN des anthraquinones.

La mitoxantrone et l'amétantrone se lient à l'ADN par intercalation. Ces molécules se placent à 90° par rapport à l'axe de la double hélice, tout en prenant la place d'une paire de bases, ce qui a pour effet de détordre la double hélice. Cette intercalation se produit grâce au chromophore plan anthraquinonique, tandis que les deux chaînes latérales s'étendent en dehors de l'hélice. Ces chaînes engagent des liaisons électrostatiques avec la partie périphérique anionique de la double hélice, dans le grand sillon^{129,132,133}.

De plus, les séquences entourant le site d'intercalation influent sur la spécificité de liaison de la mitoxantrone. Il a ainsi pu être déterminé que les sites spécifiques d'intercalation de la mitoxantrone sont 5'(A/T)CA et 5'(A/T)CG. L'amétantrone possède les mêmes sites de liaisons à l'ADN que la mitoxantrone. L'absence des hydroxyles entraîne en revanche une plus grande vitesse de dissociation.

III.1.1.2. Production de radicaux libres.

Le second élément qui justifie le choix des anthraquinones comme synthon à associer à nos salènes est celui qui confère aux molécules, mitoxantrone et amétantrone, leur caractère cytotoxique, c'est-à-dire la production de radicaux libres. Celle-ci peut s'effectuer, soit par une oxydation soit par une réduction des molécules.

La mitoxantrone et l'amétantrone sont oxydées sous l'effet de peroxydases. Cette oxydation peut expliquer la formation de différents métabolites de la mitoxantrone¹³⁴ (figure 79). Ce mécanisme oxydatif, qui passe par un radical cation, peut intervenir dans la production de radicaux libres oxygénés.

Les deux composés anthraquinoniques ne sont pas réduits par les NADPH-Cytochrome-P450-Réductase car ils les inhibent^{135,136}. Pourtant, le phénomène de réduction des fonctions quinones peut s'effectuer *in vitro* en présence de NADPH¹³⁷⁻¹³⁹. La semiquinone formée peut alors activer l'oxygène, le réduire et initier la formation du radical superoxyde. Ce radical se dismute pour former de l'eau oxygénée qui entraîne à son tour, par réaction de Fenton en présence de métaux, la formation d'OH°.

En présence de l'amétantrone, seule une production de radicaux hydroxyle a été mise en évidence. La présence de radicaux superoxyde a été démontrée dans le cas de la mitoxantrone mais cette production reste marginale face à celle de radicaux hydroxyle décelés en majorité. Les principaux radicaux formés sont responsables de la coupure de la double hélice d'ADN par la mitoxantrone et l'amétantrone.

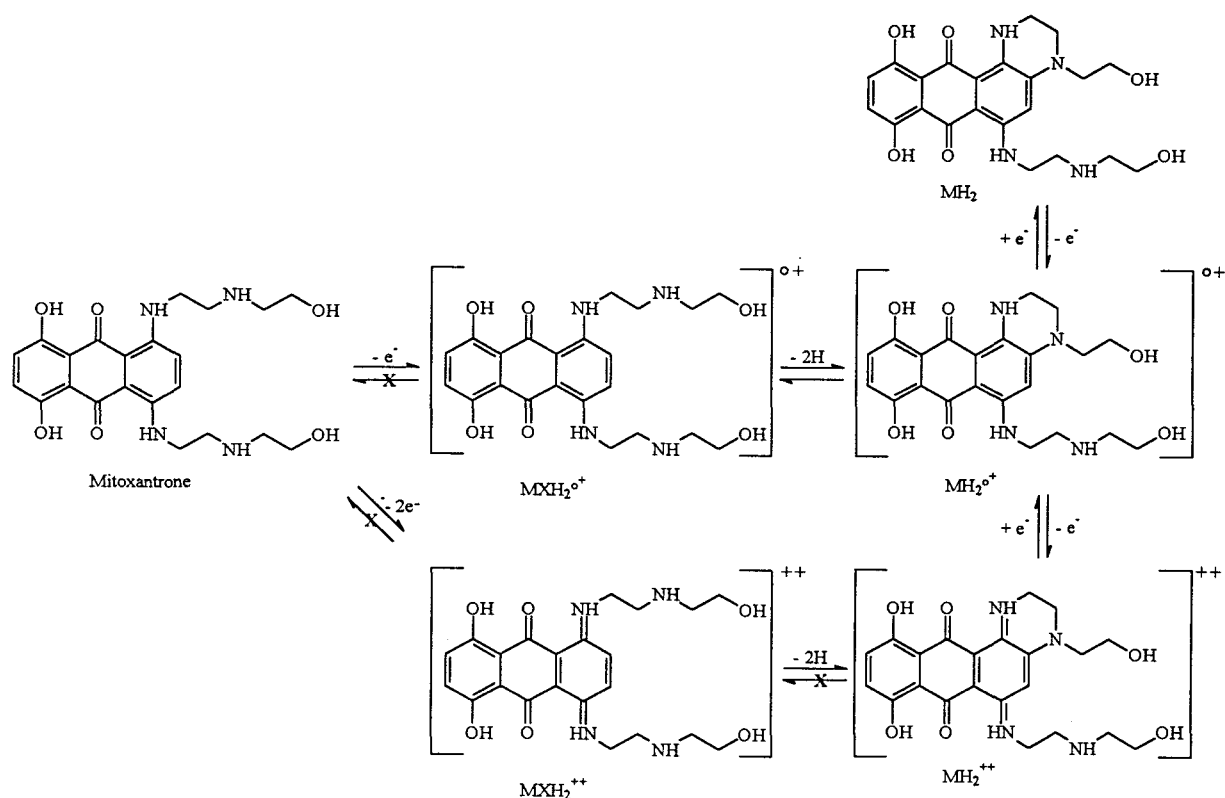


Figure 79 : schéma d'oxydation de la mitoxantrone MXH_2 en radical cation $MXH_2^{\bullet+}$ suivi par la formation du métabolite $MH_2^{\bullet+}$.

III.1.1.3. Autres actions des dérivés anthraquinoniques.

Les dérivés de type anthraquinonique que sont la mitoxantrone et l'amétantrone produisent des radicaux libres qui vont couper l'ADN. Ceci leur confère une cytotoxicité. Un autre volet de la cytotoxicité est leur pouvoir d'inhibition des topoisomérases. Ces enzymes nucléaires permettent de modifier la topologie de l'ADN lors des phases de transcription, de réplication et de recombinaison. Ces enzymes se liant à l'ADN existent sous deux formes: les topoisomérases I et les topoisomérases II.

Ces deux familles diffèrent par le mécanisme d'action. La topoisomérase I induit des coupures transitoires sur un seul brin de l'ADN. Le brin resté intact passe alors dans cette coupure et l'enzyme relie alors les morceaux créés. L'ADN est détordu. La topoisomérase II agit sur les deux brins de l'ADN pour le délier^{140,141} (étape 2 à 3, figure 80). Après avoir réalisé cette phase, l'enzyme fait intervenir un cofacteur, l'ATP (étape 3 à 4). Une rotation des deux fragments l'un par rapport à l'autre s'opère (étape 4). L'ADN est refermé (étape 4 à 5). L'hydrolyse de l'ATP permet à l'enzyme de retrouver sa conformation initiale (étape 5 à 6). L'ADN délié est alors utilisable pour les phases de transcription et de réplication.

A la fin de ces différents processus nucléaires, les topoisomérases interviennent de nouveau pour réaliser leur action en sens contraire et recréer ainsi la double hélice originale¹⁴⁰.

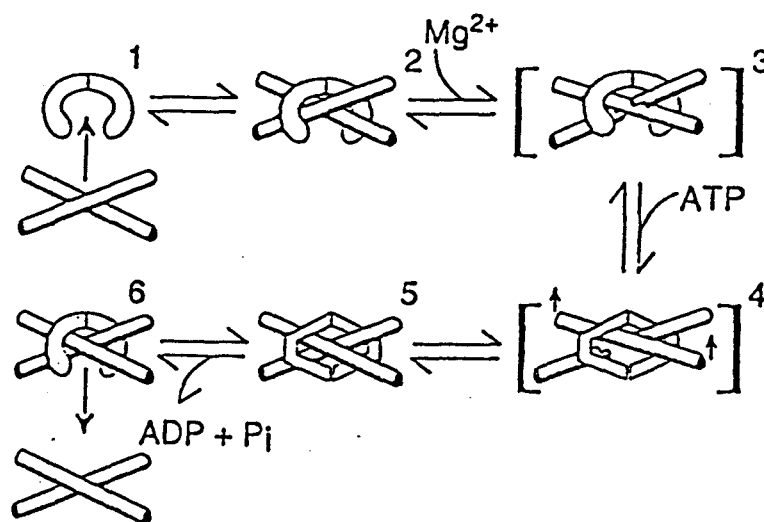


Figure 80 : schéma catalytique de la topoisomérase II sur l'ADN représenté sous forme de cylindres.

Les inhibiteurs de topoisomérases interfèrent sur le cycle catalytique des enzymes en formant un complexe ternaire ADN-produit-enzyme. Ce complexe, dans le cas des anthraquinones, bloque l'étape de ligation, ce qui laisse un ADN non fonctionnel, bloqué dans sa phase de réplication¹⁴² et entraîne la mort de la cellule.

III.1.2. Molécules synthétisées.

Une aide majeure pour déterminer la structure la plus adéquate à introduire dans les hybrides anthraquinone-salène a été l'étude des relations structure-activité existantes pour les molécules de type aminoalkylaminoanthraquinones. Ces relations structure-activité indiquent quelques facteurs impératifs à une bonne activité de ces dérivés :

- la présence de chaînes éthylène diamine en C₁ et C₄ du noyau anthraquinonique^{128,143,144}.
- la présence simultanée de deux chaînes latérales en C₁ et C₄ n'est pas nécessaire pour l'interaction avec l'ADN. Une de ces chaînes peut être remplacée par une fonction hydroxyle ou amine¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Cependant, la présence des deux chaînes est nécessaire à l'activité antitumorale.
- la présence des groupes hydroxyle en C₅ et C₈ favorise l'activité *in vivo*, en leur absence, on obtient des produits actifs *in vitro*.
- l'activité antitumorale n'est pas corrélée à la capacité de liaison à la double hélice^{148,149}.

Grâce à ces différentes indications, le bras espaceur primaire attaché sur les fractions anthraquinoniques a été choisi de type aminoéthylamino. Afin de pouvoir coupler les salènes par leur fonction amine terminale, une fonction carboxylique libre sur les chaînes latérales des anthraquinones est nécessaire. C'est pourquoi le fragment aminoéthylamino a été substitué par condensation de l'anhydride succinique (figure 81).

De plus, en suivant toujours les relations structure-activité, des dérivés mono et disubstitués en C₁ et C₄ sur la partie anthraquinonique issue de l'amétantrone ont été réalisés. Sur les dérivés hydroxylés en C₅ et C₈ de type mitoxantrone, seuls des produits disubstitués ont été synthétisés. Le couplage de ces molécules avec les salènes complexés par le cuivre (II) et le nickel (II) a permis d'obtenir les molécules représentées figure 81.

Deux différents effets de cette association sont envisageables. Dans le cas des molécules comportant du nickel (II), les fractions anthraquinoniques sont considérées avant tout comme vecteur. En effet, comme il a été vu lors de l'étude du salène complexé par le nickel (II), l'activité de nucléase de celui-ci s'exerce uniquement lorsque le métal est oxydé tandis que l'anthraquinone coupe l'ADN après réduction préalable.

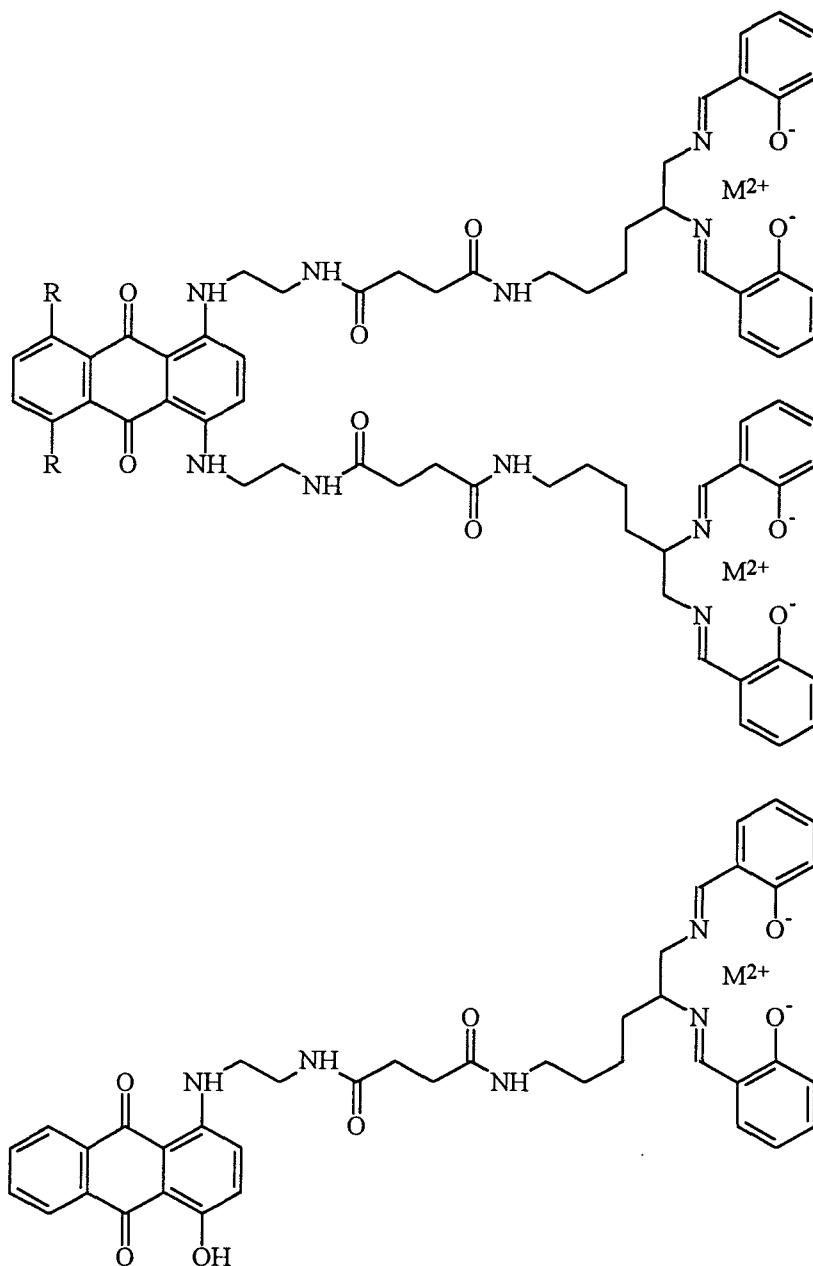


Figure 81 : molécules synthétisées. M = Cu, Ni ; R = H, OH.

Pour les hybrides comportant du cuivre (II), l'approche diffère. Outre le fait que l'anthraquinone va amener la partie complexée par le cuivre (II) vers l'ADN, il est possible

d'envisager une complémentarité d'action. Ce phénomène pourrait amplifier l'activité de nucléase du salène déjà observée. Le système créé pourrait fonctionner comme des enzymes appelées « amines oxydase à cuivre ».

Ces enzymes font intervenir un système quinone / hydroquinone (Qox / Qred) et un complexe de cuivre (II)¹⁵⁰. Le site catalytique de ces enzymes est connu et schématisé figure 82. Selon ce modèle, l'oxydation du système hydroquinone / Cu²⁺ permet l'activation de l'oxygène et va engendrer la production d'eau oxygénée. En présence de traces métalliques, cette eau oxygénée peut facilement fournir des radicaux hydroxyle qui vont détruire l'ADN.

Dans notre cas, les molécules hybrides possèdent une partie quinonique réduite (système quinone-imine) et du cuivre (II). L'activation du système avec l'oxygène peut donc se faire comme dans le cas des enzymes.

La synthèse des molécules hybrides et leur étude sur le plan biochimique ont été réalisées. Ces différentes études ont permis de vérifier si la liaison des produits à l'ADN est modifiée, soit dans le sens de l'affinité des parties intercalantes, soit dans le sens de l'affinité des fractions complexantes. De plus, il sera possible de vérifier si cette association modifie les activités nucléasiques décrites auparavant pour les salènes, en espérant atteindre des liaisons ou des coupures spécifiques de l'ADN. Enfin, le pouvoir d'inhibition des topoisomères I et II par les différents hybrides, ainsi que leur cytotoxicité sur des cellules de carcinome épidermique humain (cellules KB) ont été examinés.

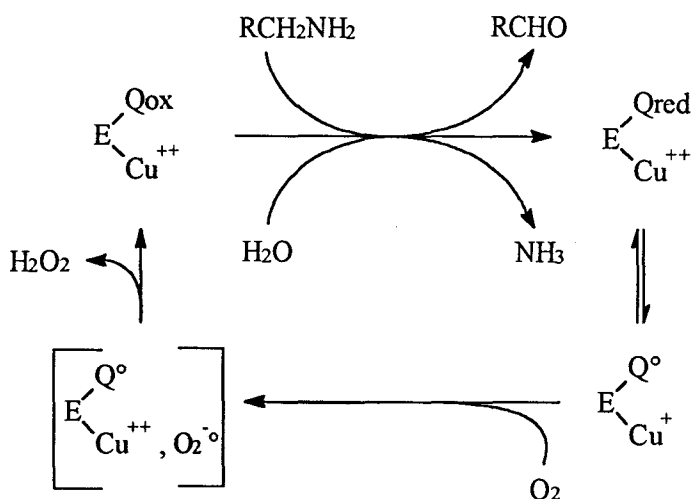


Figure 82 : cycle catalytique d'amines oxydase à cuivre. E = enzyme, Qox = quinone, Q red hydroquinone, Q^o = radical semiquinone.

III.1.3. Synthèse des synthons anthraquinoniques.

Le point de départ de cette synthèse est la leucoquinizarine (1,5-dioxo-2,3-dihydro-9,10-dihydroxynaphtalène) commerciale 23 et la dihydroxyleucoquinizarine (1,5-dioxo-2,3-dihydro-5,8,9,10-tétrahydroxynaphtalène) 24 non commerciale (figure 83), fournie par les laboratoires ICI. La mise au point des modes opératoires a été effectuée sur le produit 23 puis appliquée au produit 24.

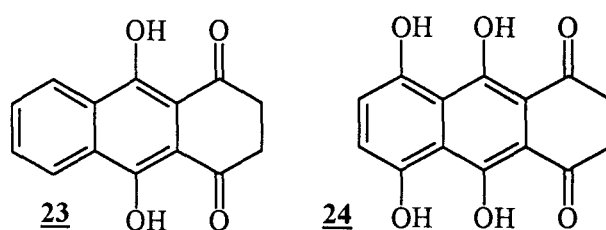


Figure 83 : molécule de départ, la leucoquinizarine 23 et la dihydroxyleucoquinizarine 24.

Tout d'abord, la leucoquinizarine est condensée à un bras espaceur N^1 -(*ter*butyl oxycarbonyl)-1,2-diaminoéthane 27. Ce bras est synthétisé à partir du chlorhydrate d'aminoacétonitrile^{151,152} (figure 84).

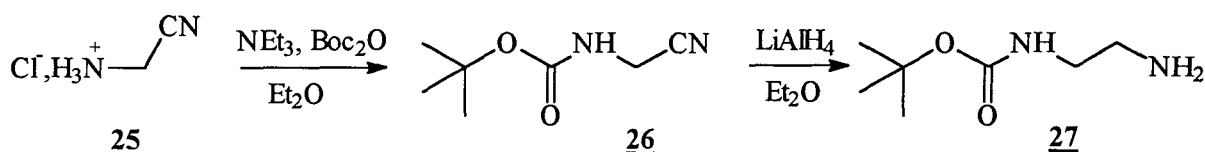


Figure 84 : synthèse du bras N^1 -(*ter*butyloxycarbonyl)-1,2-diaminoéthane 27.

Sous l'action de di-*tert*-butyldicarbonate (Boc_2O), le chlorhydrate d'aminoacétonitrile 25 donne en présence de triéthylamine, le produit 26. La réduction de la fonction nitrile par $LiAlH_4$ donne après hydrolyse le bras espaceur 27 avec un rendement de 94 %.

La condensation du bras 27 avec la leucoquinizarine 23 conduit à deux produits après oxydation à l'air (figure 85): le produit monosubstitué 28 et le produit disubstitué 29. Il faut souligner l'importance du dégazage du méthanol, solvant de manipulation, avant son utilisation. En effet, toute trace d'oxygène entraîne une oxydation prématurée des produits réactionnels et augmente donc la proportion de produit monosubstitué par rapport au produit

disubstitué. De plus, si la température excède 60 °C, une forte dégradation des produits est observée, avant l'étape d'oxydation. Les produits **28** et **29** sont obtenus respectivement avec les rendements de 24 et 55 %.

Le traitement de ces deux produits par l'acide trifluoroacétique permet la coupure du groupement *ter*butyloxy-carbonyle. Les produits **30** et **31** sont obtenus quantitativement. La dernière étape consiste en l'ouverture, en présence de pyridine, de l'anhydride succinique par les amines désalifiées des produits **30** et **31**. Les acides terminaux **32** et **33** sont obtenus avec les rendements de 51 et 94 %.

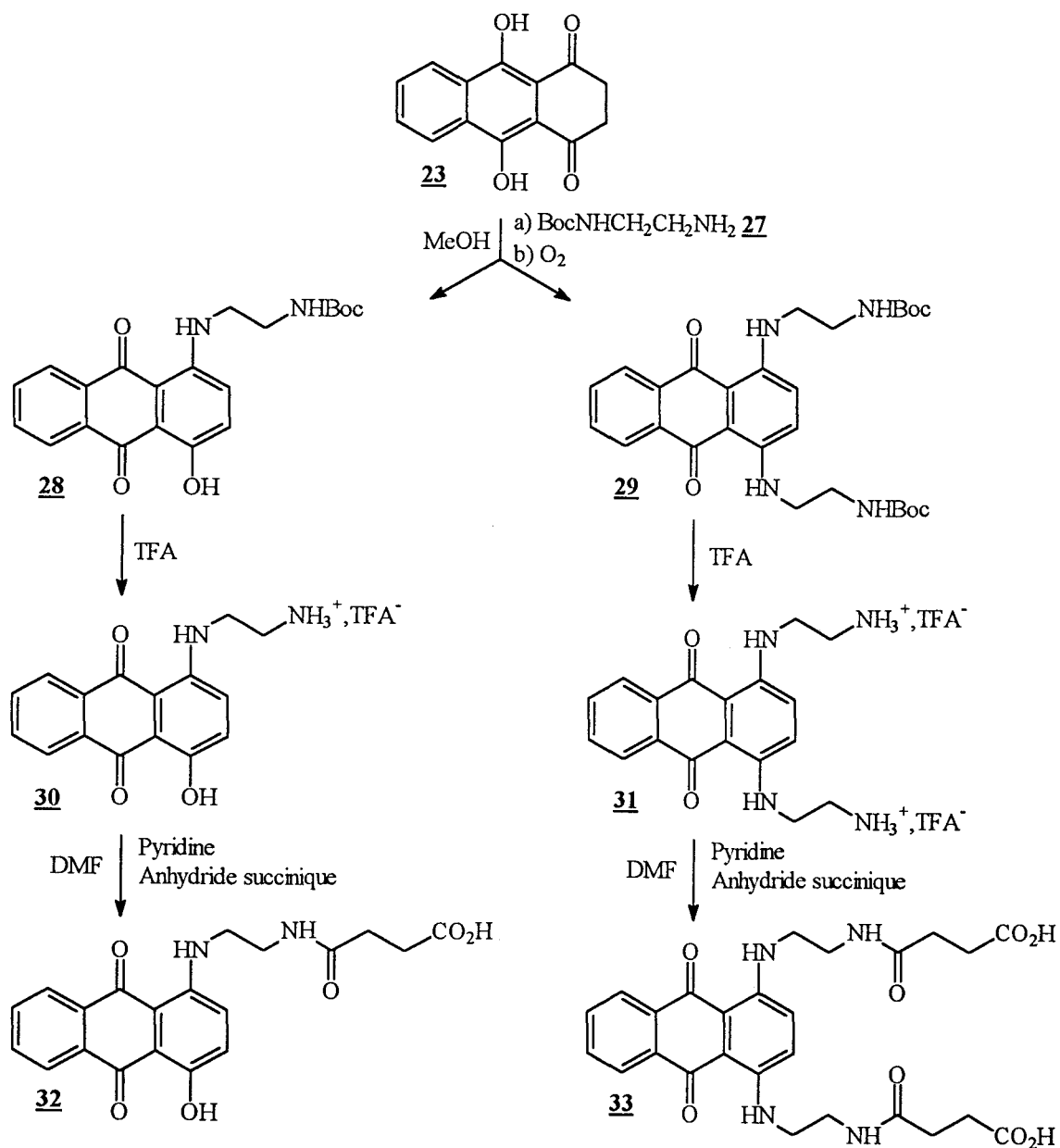


Figure 85 : synthèse de la [1-(2-succinyl)aminoéthylamino]-4-hydroxy-anthracène-9,10-dione **32** et du 1,4-bis-[(2-succinyl)aminoéthylamino]anthracène-9,10-dione **33**.

Tandis que l'étape de condensation du bras espaceur **27** sur la leucoquinizarine donne un produit monosubstitué **32** et un produit disubstitué **33**, la condensation du même bras sur la dihydroxyleucoquinizarine **24**, en milieu anaérobie, donne le produit de disubstitution **35** et des produits de dégradation et de cyclisation¹²⁸. Le produit issu de la monosubstitution **34** existe, mais n'est pas isolé. Le produit **37** est obtenu avec un rendement de 55 % (figure 86).

Le produit **35** soumis au traitement de l'acide trifluoroacétique donne le produit déprotégé **36** avec un rendement quantitatif. Le traitement du produit diaminé **36** en présence de pyridine et d'anhydride succinique génère l'acide carboxylique **37** avec un rendement de 80 %.

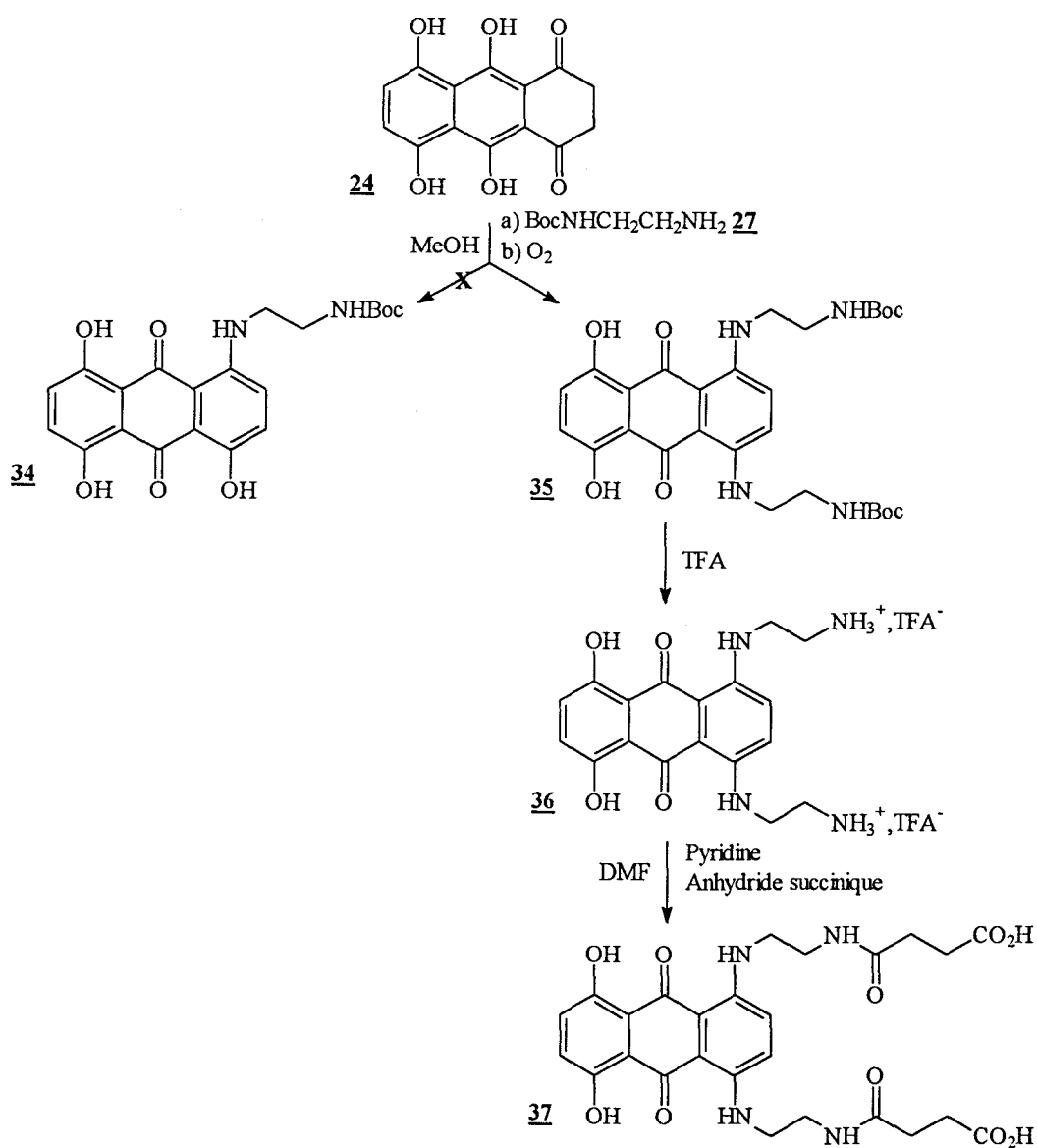


Figure 86 : synthèse de la 1,4-bis[(2-succinylaminoéthyl)amino]-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione **37**.

II.1.4. Synthèse des hybrides anthraquinone-salène complexé.

Les produits **32**, **33** et **37** possèdent tous trois des fonctions carboxyliques libres qui vont être couplées, selon une méthode peptidique¹⁵³, avec les amines primaires des chaînes latérales des salènes, complexés par du cuivre (II) **9** et par du nickel (II) **10**. La procédure générale de ces couplages est la suivante : l'acide carboxylique est mélangé aux agents de couplage dicyclohexylcarbodiimide DCC et N-hydroxybenzotriazole HOBt puis, après un temps de réaction de 1 à 2 heures, l'amine désalifiée par la triéthylamine est ajoutée au milieu réactionnel.

L'inconvénient de cette méthode est la formation d'une N-acyl urée avec la DCC et l'acide carboxylique. En travaillant à 0 °C, sa formation est évitée. L'ajout de la DCC forme un ester activé, l'HOBt permettant l'obtention d'un autre ester encore plus réactif, augmentant la vitesse du couplage peptidique et évitant la racémisation.

L'introduction de l'amine primaire désalifiée par la triéthylamine permet au couplage peptidique de s'effectuer (figures **87**, **88** et **89**). Le couplage des produits **32**, **33**, **37** avec le salène complexé au cuivre (II) donne les produits **38**, **39** et **40**. Avec le salène complexé au nickel (II), les produits **41** et **43** sont obtenus (tableau **13**).

Un problème s'est posé pour l'obtention du produit **42**. Les spectroscopies I.R. et U.V. montrent dans le mélange brut de réaction, une association des deux synthons de départ, mais ni la RMN du ¹³C, ni la spectrométrie de masse ne le confirment.

L'analyse complète des produits contenant du nickel (II), **41** et **43** ne pose pas de problème. Pour les produits contenant du cuivre (II), **38**, **39** et **40**, la masse, l'I.R. et l'U.V. nous renseignent sur le poids moléculaire et les fonctions organiques. Par contre, l'analyse par RMN n'est plus possible, car le cuivre (II) est paramagnétique. La comparaison des doubles intégrations des spectres RPE obtenus, par rapport au spectre d'un salène complexé avec un seul atome de cuivre (II), permet le comptage du nombre d'atome de cuivre (II) lorsque les concentrations sont fixées. Ainsi, **9** et **38** ne contiennent qu'un seul atome de cuivre (II), alors que **39** et **40** en contiennent deux (figures **87**, **88**, **89**).

	Dérivé anthraquinonique 32	Dérivé anthraquinonique 33	Dérivé anthraquinonique 37
Salène complexé par le cuivre (II) 9	Produit 38 , (rendement = 78 %)	Produit 39 , (rendement = 37 %)	Produit 40 , (rendement = 56 %)
Salène complexé par le nickel (II) 10	Produit 41 , (rendement = 49 %)	Produit 42 , (non obtenu)	Produit 43 , (rendement = 56 %)

Tableau 13 : produits obtenus lors des couplages et rendements de réactions.

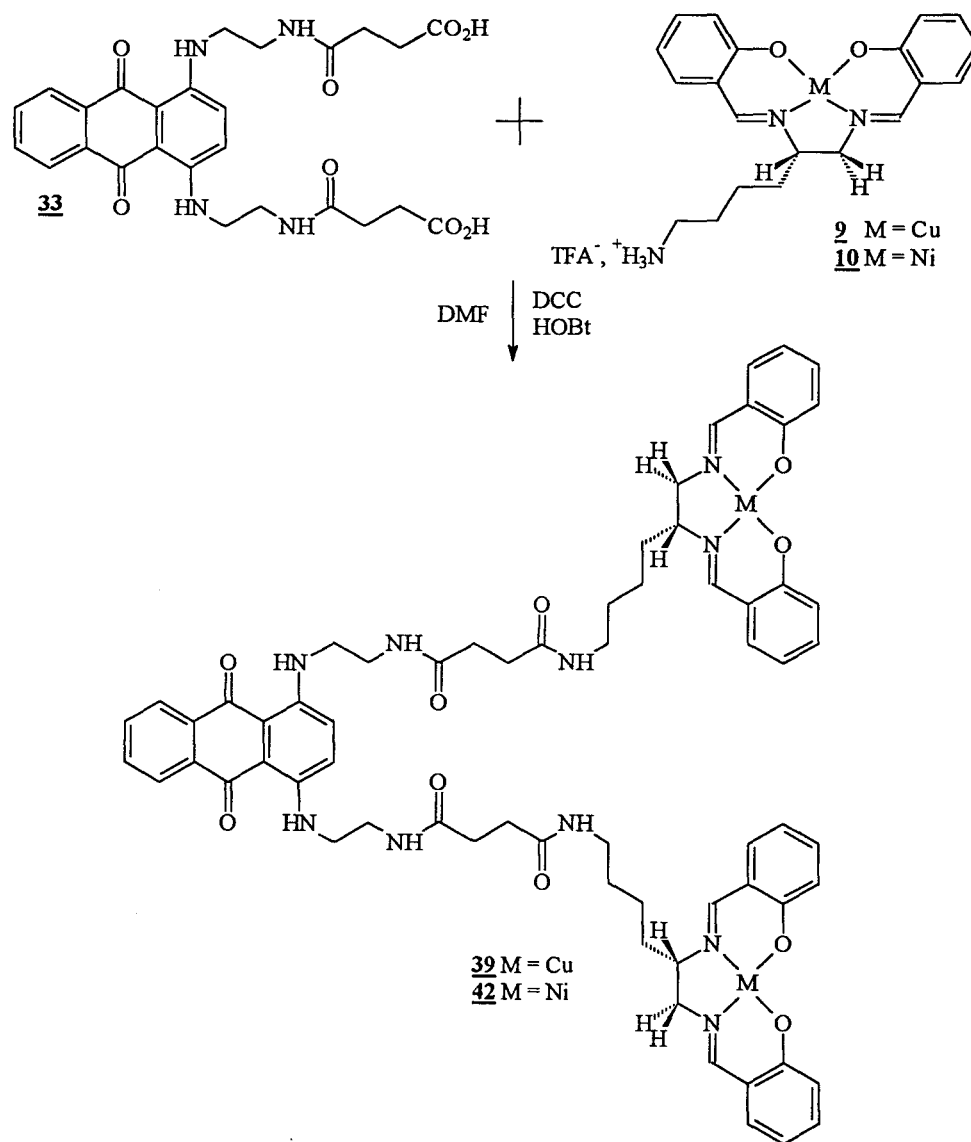


Figure 87 : obtention des produits **39** et **42**.

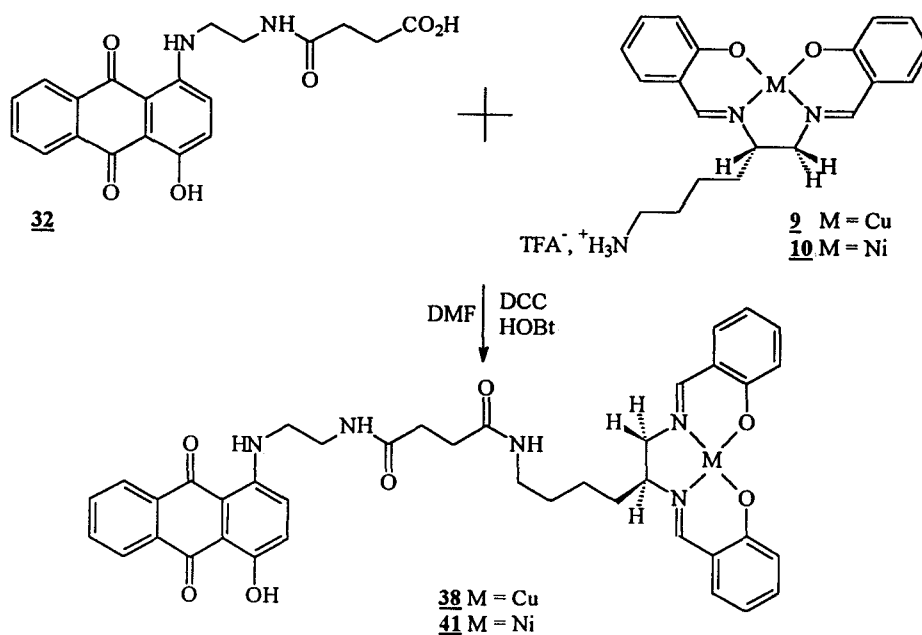


Figure 88 : obtention des produits 38 et 41.

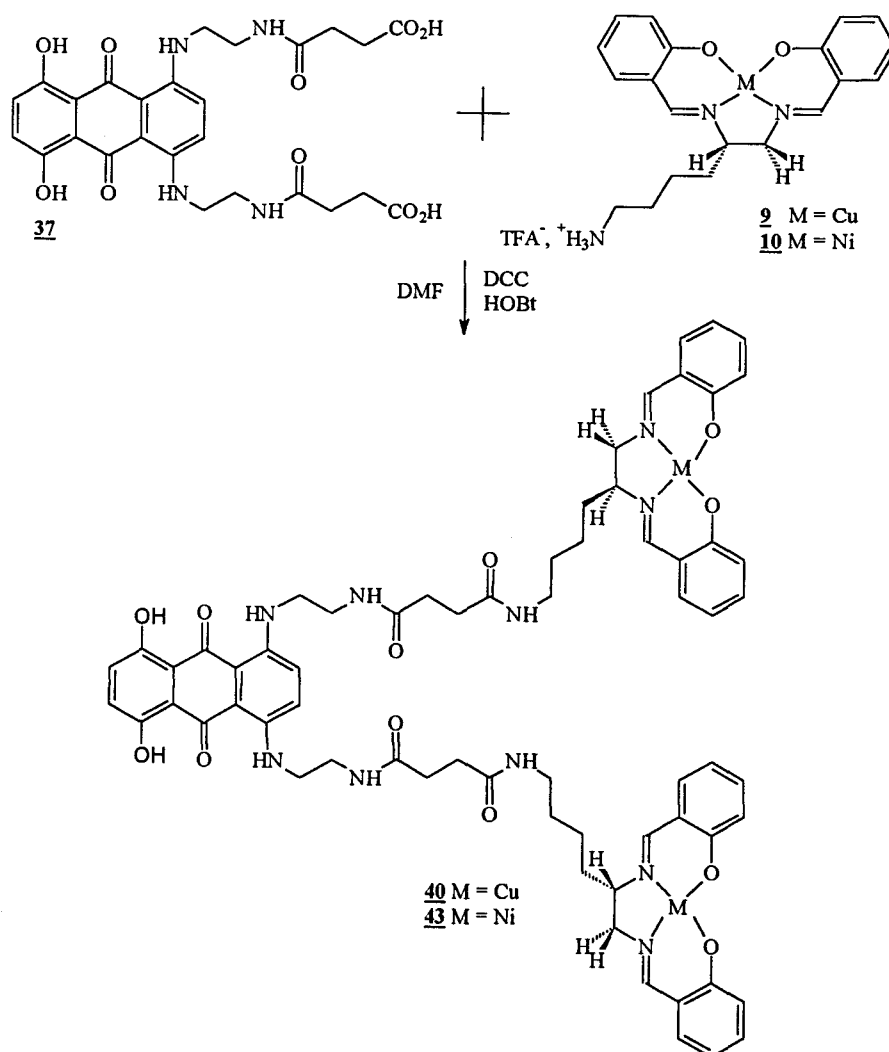


Figure 89 : obtention des produits 40 et 43.

III.1.5. Etude de l'activité nucléase des hybrides anthraquinone-salène.

Tout d'abord la liaison des produits à l'ADN a été examinée, puis les propriétés de coupure ont été étudiées. Afin d'avoir un aperçu de la différence entre les produits hybrides (38, 39, 40, 41, 43) et les synthons intercalants, les dérivés 31 et 36 ont fait l'objet des mêmes analyses que les molécules hybrides. Enfin, des tests d'inhibition des topoisomérases I et II et de cytotoxicité ont été réalisés pour évaluer l'activité cytotoxique des différents dérivés.

III.1.5.1. Liaison à l'ADN.

Ces expériences ont été réalisées avec deux fragments de 117 et 265 paires de bases, marqués en l'extrémité 3' par du phosphore ^{32}P . Le mode opératoire est identique à celui utilisé dans le chapitre des salènes. Le temps d'incubation des produits avec l'ADN est de 30 à 60 minutes à 37 °C. Les autoradiogrammes obtenus avec les produits anthraquinoniques 31 et 36 sont présentés sur la figure 89.

Avec ces deux produits, les bandes de coupures observées grâce à la DNAase I avec les produits sont différentes de celles obtenues dans les contrôles. Dans plusieurs régions, cette coupure est significativement réduite. Ces évolutions indiquent une protection de certaines zones de l'ADN.

Afin de savoir si ces deux produits se lient avec les mêmes régions de l'ADN que la mitoxantrone et l'amétantrone, les intensités des différentes bandes des différents gels ont été mesurées par densitométrie et converties en points différentiels de coupure (résultats non montrés). En accord avec des résultats décrits pour la mitoxantrone¹⁵⁴, les sites préférentiels de fixation de nos deux dérivés 31 et 36 sont les sites riches en paires de bases G-C.

L'intensité des bandes est souvent réduite à ces séquences. C'est le cas pour la séquence GCATGCCTGC entre les nucléotides 39 et 48. Sur les gels, ce phénomène est visible par une diminution et une disparition nette des bandes de coupure lorsque les concentrations en produit augmentent. A l'inverse, plus la dose en produit augmente et plus le clivage par la DNAase I des sites riches paires de bases A-T est important. Ce résultat est notamment visible sur les footprints, pour la séquence AATTAAC située entre les paires de

bases 73 et 79. Les deux dérivés **31** et **36** possèdent donc une sélectivité pour l'ADN comparable à la mitoxantrone et à l'amétantone. De plus, à la vue des deux footprints, les bandes de coupure de l'ADN sont moins nettes et moins prononcées pour le dérivé dihydroxylé **36** que pour son homologue non-hydroxylé sur le chromophore anthraquinonique **31**. Ce résultat indique donc que la liaison à l'ADN est moins forte pour le dérivé **36** que pour son homologue **31**. Néanmoins, il est possible d'affirmer que ces deux dérivés se lient préférentiellement aux séquences contenant le trinuécléotide 5'-(A/T)GC ou 5'-(A/T)CA, qui sont les séquences de liaison à l'ADN déterminées pour la mitoxantrone¹⁵⁶.

La même expérience de footprinting a été réalisée en présence de nos hybrides anthraquinones salènes complexés par le nickel (II) et le cuivre (II), et ce, dans les mêmes conditions. Il a été vu qu'avec le salène complexé par le nickel (II) **10**, aucune séquence particulière n'est reconnue. En revanche, l'association aux anthraquinones peut conférer aux hybrides **41** et **43** obtenus, une sélectivité de séquence lors de la liaison avec l'ADN.

Comme il est possible de le voir sur le gel, les dérivés monosubstitué **41** et disubstitué **43** révèlent une préférence de liaison à l'ADN pour les régions riches en paires de bases G-C. Ce résultat est observable sur les gels (figure 90) pour la séquence située autour de la position 40, qui correspond à un enchaînement de paires de base du type 5'-AGGACGG. Dans le cas de ces deux hybrides, la préférence de liaison des dérivés anthraquinoniques non associés **31** et **36** est retrouvée. Donc, l'association du salène complexé par le nickel (II) aux anthraquinones donne la sélectivité de liaison qui était recherchée. En revanche aucune protection de l'ADN n'a été visualisée après digestion par la DNAase I avec tous les dérivés hybrides contenant du cuivre (II) **38**, **39**, **40**. Ce résultat a d'ailleurs aussi été obtenu avec le salène complexé par le cuivre (II) **9**.

Ces différents résultats concernant la liaison de nos produits hybrides montrent qu'il existe une influence apparente du métal sur la reconnaissance de séquences particulières de l'ADN.

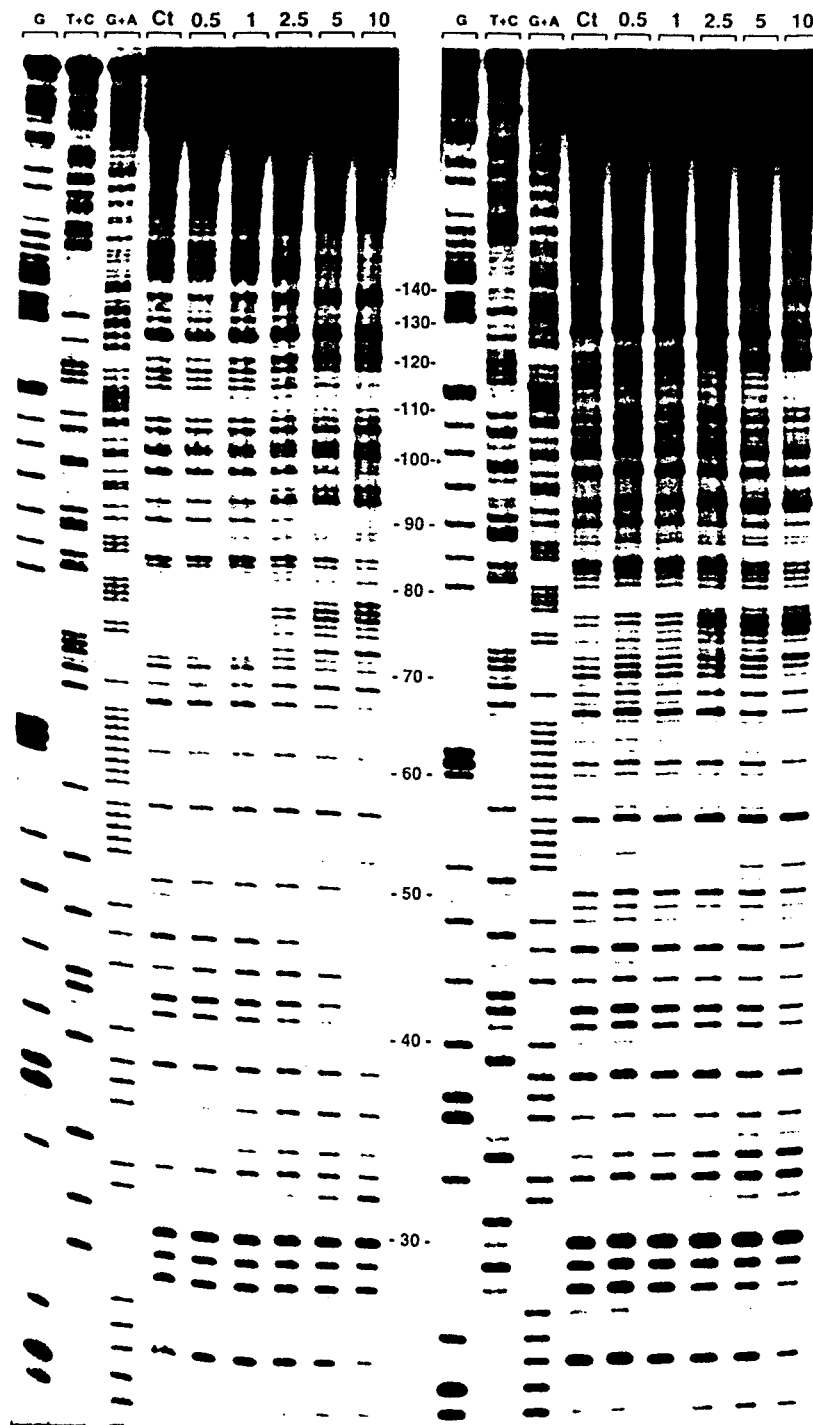


Figure 89 : footprinting réalisés en incubant les dérivés anthraquinoniques **36** (à gauche) et **31** (à droite) avec le fragment 265-mer d'ADN marqué au ^{32}P et digérés à la DNAase I. Les produits de coupure sont résolus sur un gel polyacrylamide 8% contenant de l'urée 8M. Les concentrations (μM) des produits testés sont indiqués en haut de chaque gel. Les lignes de contrôle Ct ne contiennent pas de produit. Les colonnes indiquées T+C, G+A et G représentent les séquences des marqueurs spécifiques Maxam-Gilbert pour les résidus pyrimidines, purines et guanine respectivement. Les chiffres indiqués le long des gels indiquent la séquence du fragment.

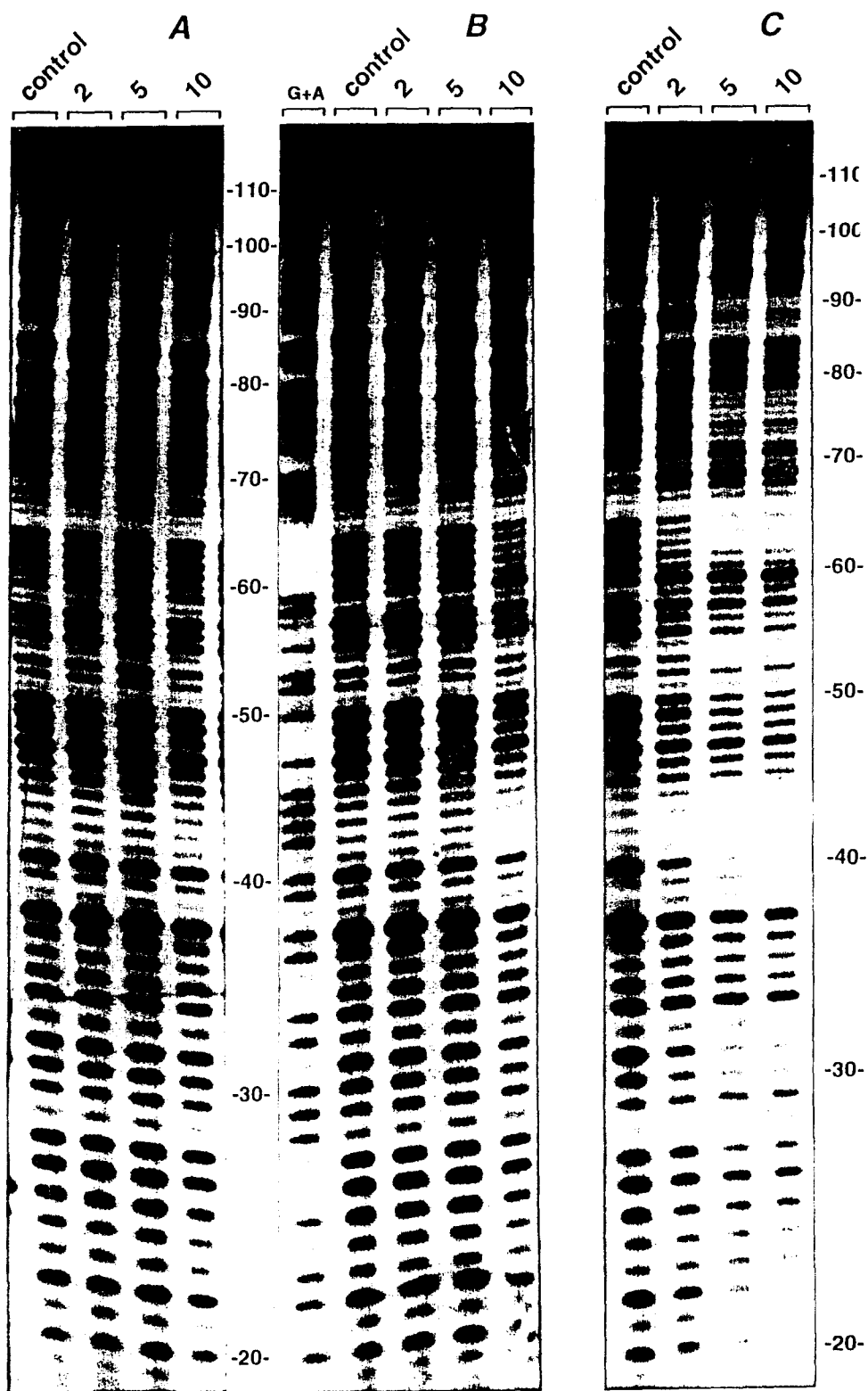


Figure 90 : footprinting réalisés en incubant le salène complexé par le nickel (II) 10 (A) et les hybrides anthraquinone-salène complexé par le nickel (II) mono 41 (B) et disubstitué 42 (C) avec un fragment de 117 paires de bases issu du plasmide pBs en présence de DNAase I comme agent de coupure.

III.1.5.2. Activité nucléasique des hybrides anthraquinones-salène complexé.

Coupure d'ADN superenroulé.

Bien que l'oxone active la coupure du salène complexé par le nickel (II) **10**, l'association de celui-ci avec les anthraquinones n'a pas permis de visualiser de coupures de l'ADN double brin^{62,67,125}. Ce résultat est donc identique à celui trouvé pour le salène complexé par le nickel (II) **10** qui ne coupait que l'ADN monobrin avec une sélectivité pour les guanines les plus exposées.

En revanche, les composés **38**, **39**, **40** contenant des fractions salènes complexés par le cuivre (II) engendrent tous des coupures du plasmide, que ces dérivés soient non hydroxylés mono **38** ou disubstitués **39**, ou qu'ils soient dihydroxylés disubstitués **40**. L'activation de la coupure est réalisée avec une intervention de MPA, comme dans le cas du salène complexé par le cuivre (II) **10**. Des coupures de l'ADN superenroulé ont aussi été visualisées en présence des différents produits et de dithiothréitol ou d'eau oxygénée, mais elles sont nettement moins importantes que dans le cas d'une activation par le MPA.

Comme il a déjà été déterminé, après incubation du salène **10** avec le plasmide, celui-ci est converti de sa forme I en sa forme II, lorsque les concentrations atteignent 200 μM . A cette concentration, un peu de la forme initiale du plasmide est encore présente. En revanche, les dérivés hybrides anthraquinones salènes complexés par le cuivre (II) montrent des propriétés de nucléases plus importantes (figure 91).

Pour les trois hybrides **38**, **39**, et **40**, une concentration de 50 μM en produit est nécessaire pour induire la complète conversion du plasmide de sa forme I en sa forme II. Une petite quantité de forme III est détectable à partir des concentrations de 100 μM , en particulier avec les composés anthraquinoniques disubstitués par le salène complexé par le cuivre (II) **39** et **40**. Cette apparition d'ADN linéaire est davantage due à une accumulation de coupures mono brin de l'ADN qu'à une réelle coupure de l'ADN double brin.

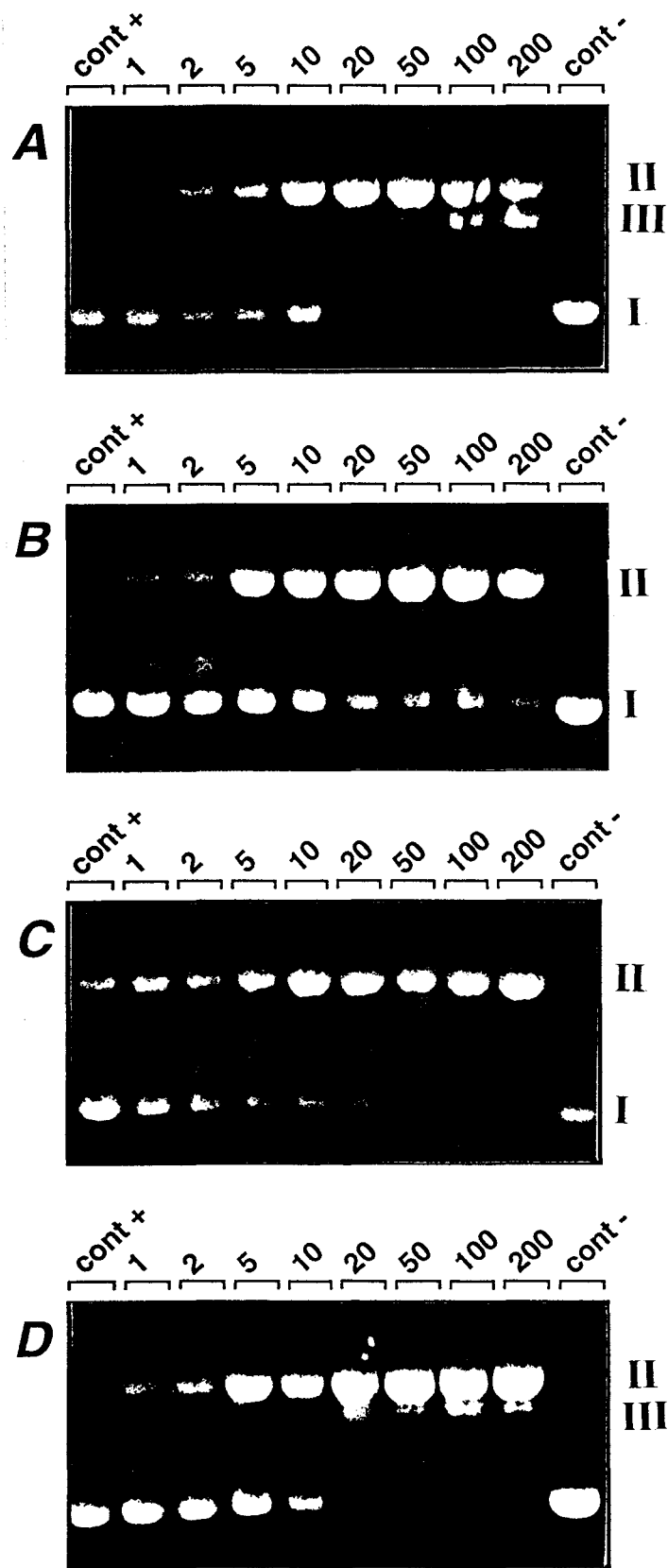


Figure 91 : gels d'électrophorèse après coupure d'ADN superenroulé pUC12 par les produits salène complexé par le cuivre (II) 10 (panneau A), et par les hybrides anthraquinones salènes complexés par le cuivre (II) 38, 39, 40 (panneaux B, C, D, respectivement). Les concentrations (μM) en produit sont indiquées en haut de chaque ligne. Les contrôles + et - se réfèrent à l'ADN de plasmide incubé sans produit, en présence ou en absence de MPA respectivement.

De plus il peut être déduit que l'introduction d'un second salène de cuivre (II) sur les noyaux anthraquinoniques renforce de façon conséquente l'activité de nucléase des produits. En revanche, la présence ou l'absence des groupements hydroxyle sur le noyau anthraquinonique disubstitué (39 et 40) ne change pas l'intensité des coupures du plasmide. Ces groupements n'ont donc pas d'influence sur l'activité de nucléase des produits hybrides anthaquinones-salènes complexés par le cuivre (II).

Coupure de fragments d'ADN.

D'autres tests de coupure d'ADN ont été réalisés avec les fragments de 117 et 265 paires de bases d'ADN, comme dans le cas des études de footprinting. Ces différentes expériences ont pour but de déterminer si les molécules hybrides coupent l'ADN avec une sélectivité de séquence. Les produits ont donc été incubés avec les fragments d'ADN et les agents activant les coupures, le MPA pour les produits contenant du cuivre (II) et l'oxone pour ceux contenant du nickel (II). Là encore, aucune coupure des fragments d'ADN n'a pu être visualisée avec les hybrides 41 et 43 contenant du nickel, résultat toujours en accord avec la capacité des complexes du nickel (II) à couper uniquement l'ADN mono brin.

En revanche, ces coupures sont visualisées lorsque les fragments d'ADN sont incubés avec les produits 38, 39, 40 qui contiennent un ou deux atomes de cuivre (II). Lors de l'examen des gels obtenus, toutes les bandes correspondant à chaque fragmentation possible des fragments d'ADN sont présentes. Ce résultat indique donc une coupure non spécifique de l'ADN. Il est d'ailleurs compatible avec ceux de footprinting, révélant une liaison non spécifique avec l'ADN, des produits contenant du cuivre (II).

III.1.5.3. Mise en évidence de la production de radicaux libres oxygénés par la technique du « spin-trapping ».

La technique du spin trapping, déjà utilisée pour le salène complexé par le cuivre (II), a été mise en oeuvre pour les composés anthraquinoniques associés au salène complexé par le cuivre (II). Après avoir réalisé une solution à 10^{-2} mole.l⁻¹ de ces composés dans le DMSO, un courant gazeux d'oxygène a été appliqué à la solution pendant 4minutes afin de bien la saturer.

Des spectres RPE ont ensuite été réalisés à température ambiante, après l'ajout de 5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxyde (DMPO), agent capteur de radicaux libres.

Avec les hybrides anthraquinoniques 38, 39 et 40, les spectres de RPE obtenus sont caractéristiques d'un adduit DMPO-OH (figure 92), comme il a déjà été démontré avec le salène complexé par le cuivre (II) 10. L'intensité de ces spectres étant la même que dans le cas du salène, il est possible de conclure que la quantité de radicaux libres produits par les hybrides est quasiment identique. En présence de DMSO, la production de radicaux OH° amène à la formation d'un signal DMPO-CH₃. Ce signal n'a pas été observé dans nos expériences. On peut donc supposer que le signal de DMPO-OH provient plus de la décomposition du signal de DMPO-OOH que d'une interaction de radicaux OH° sur le DMPO.

On peut donc conclure que les molécules hybrides contenant du cuivre (II) activent l'oxygène pour former de l'O₂° mais que la production ultérieure d'OH° n'est pas ici mise en évidence. Néanmoins, ces radicaux O₂° peuvent se dismuter spontanément et générer de l'eau oxygénée. Celle-ci en rencontrant un cuivre (I) des dérivés hybrides liés à l'ADN peut produire les radicaux OH° qui vont créer les coupures d'ADN qui ont été visualisées dans les tests précédents.

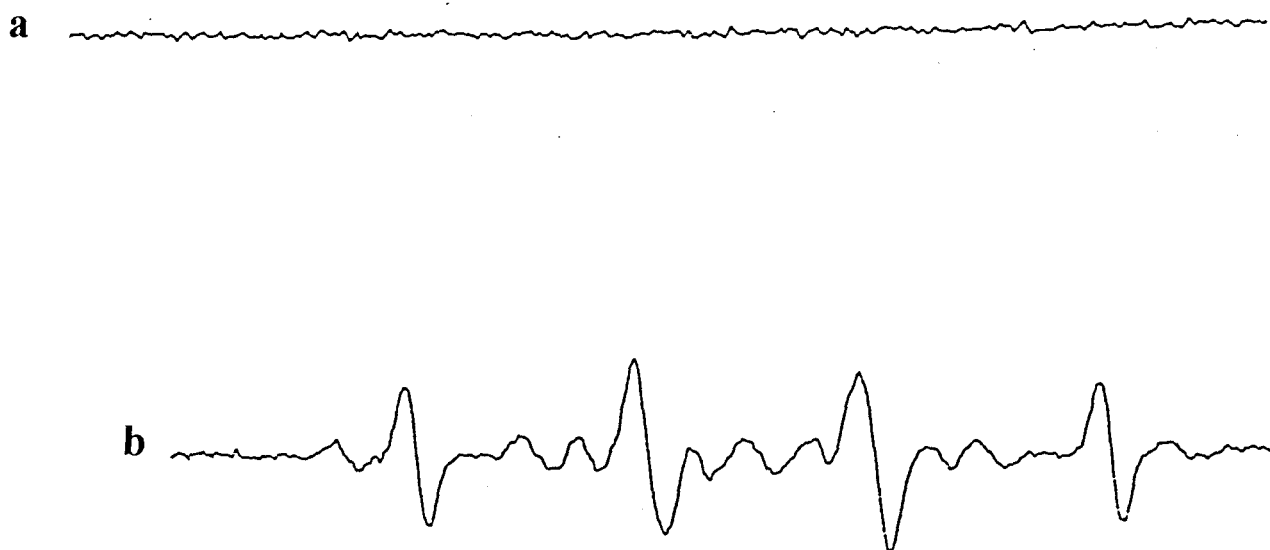


Figure 92 : spectre RPE obtenus avec (a) le DMPO seul dans le DMSO, (b) les hybrides et le DMPO dans le DMSO, après passage d'un courant gazeux d'oxygène pendant 4 minutes dans les solutions.

II.1.5.4. Effets sur les topoisomérases *in vitro*.

Les expériences ont été effectuées chez Rhône Poulenc-Rorer par le Docteur J.F. Riou.

Les effets des hybrides anthraquinoniques-salènes complexés **38**, **39**, **40**, **41**, **43** et leurs parents anthraquinoniques **31** et **36** ont été étudiés sur les topoisomérases I et II (toutes deux purifiées à partir de thymus de veau¹¹⁵). Le potentiel d'inhibition des différents composés a été effectué par inspection des autoradiogrammes et comparaison de la coupure de l'ADN en présence ou en absence de produit. La mitoxantrone est utilisée comme référence d'inhibition de la topoisomérase II et la camptothécine est utilisée comme référence de l'inhibition de la topoisomérase I.

Les concentrations minimales nécessaires pour détecter une inhibition enzymatique sont indiquées tableau 14 (page 138). Presque aucun des composés n'inhibe la topoisomérase I. Seule une légère inhibition est décelable pour le composé anthraquinonique dihydroxylé **36** et le composé anthraquinonique monosubstitué par un salène complexé par le cuivre (II) **38** (10 mM). Cet effet reste toutefois modeste lorsqu'on le compare à celui de la camptothécine, inhibiteur de référence pour la topoisomérase I. Son homologue possédant un atome de nickel (II) **41** quant à lui, n'inhibe pas la topoisomérase I. Dans ce cas, la nature du métal aurait une influence sur l'inhibition de la topoisomérase I.

Les composés anthraquinoniques simples, possédant ou non des groupements hydroxyles en positions C₅ et C₈ sur l'anthraquinone (**36** et **31** respectivement), inhibent la topoisomérase II, mais la dose nécessaire à cette inhibition (0,1 et 1 µM respectivement) reste largement supérieure à celle nécessaire pour la mitoxantrone (0,01 µM).

Les hybrides ne possédant pas d'hydroxyles sur l'anthraquinone en positions C₅ et C₈ (dérivés **38**, **39**, et **41**) n'inhibent pas la topoisomérase II. La coupure d'ADN avec ces produits n'est détectée qu'à des hautes concentrations (100 µM). Ce résultat est faible par rapport au composé anthraquinonique simple correspondant **31**. La liaison d'un salène complexé au chromophore anthraquinonique diminue donc de façon très significative la capacité d'inhibition de la topoisomérase II.

Bien que l'inhibition de la topoisomérase II ne soit pas négligeable avec les hybrides anthraquinoniques possédant des groupements hydroxyles **40** et **43** (1 μ M), elle est toutefois diminuée par rapport à leur homologue anthraquinonique seul **36** (0,1 μ M).

Cette dernière observation tend à montrer que les composés, hybrides ou non, possédant des hydroxyles en positions C₅ et C₈ (**36**, **40**, **43**) inhibent davantage les topoisomérases II que les composés non hydroxylés (**31**, **38**, **39**, **41**). Les hybrides agissent moins bien que les anthraquinones simples : le salène gêne l'interaction avec la DNA topoisomérase II. De plus, la nature du métal ne semble pas avoir d'influence sur l'inhibition de la topoisomérase II.

III.1.5.5. Activité cytotoxique.

L'activité cytotoxique des produits a également été déterminée chez Rhône Poulenc-Rorer par le Docteur J. F. Riou. La cytotoxicité des produits a été examinée en utilisant les cellules KB de carcimone épidermique humain après 4 jours d'exposition (tableau 14). Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées (l'IC₅₀ représente la dose pour laquelle 50 % d'inhibition de croissance cellulaire est atteint).

En comparant les cytotoxicités des deux composés anthraquinoniques seuls **31** (0,03 mM) et **36** (0,01 mM), on remarque que la présence des hydroxyles sur les anthraquinones entraîne une augmentation de celle-ci. Cette différence est aussi observable en comparant leur capacité à inhiber la topoisomérase II. A première vue, il semble que l'activité cytotoxique des composés anthraquinoniques est corrélée à l'induction de coupure d'ADN observée avec les topoisomérases II.

Les hybrides inhibant, soit la topoisomérase I (**38**), soit la topoisomérase II (**40** et **43**), sont cytotoxiques (0,2 mM, 0,3 mM, et 0,3 mM respectivement). Les dérivés non cytotoxiques **39** (> 10 mM) et **41** (1 mM), sont ceux qui n'inhibent ni la topoisomérase I, ni la topoisomérase II. L'observation effectuée avec les composés anthraquinoniques seuls semble donc se confirmer. La présence de groupes hydroxyle sur la fraction anthraquinone est

importante pour la cytotoxicité. Par exemple, le produit **40** possède des groupements hydroxyyles. Ce composé est plus cytotoxique (0,3 mM) que sont homologue non hydroxylé **39** (>10 mM). En revanche, la nature du métal (cuivre **40** ou nickel **43**) a peu d'influence.

D'une manière générale, les hybrides sont moins actifs, ce qui est logique puisque les salènes **9** et **10** ne sont pas cytotoxiques.

Produits	Topo I, MIC (μM) ^a	Topo II, MIC (μM) ^a	IC50 (mM) ^b
31	> 100	1	0,03
36	10	0,1	0,01
38	10	100	0,2
39	100	100	>10
40	> 100	1	0,3
41	>100	>100	1
43	>100	1	0,3
mitoxantrone	> 100	0,01	0,003
camptothécine	0,01	> 100	0,016

Tableau 14 : effet des hybrides [anthraquinones salènes] complexés par le cuivre (II) et le nickel (II) ainsi que les dérivés anthraquinoniques seuls sur les topoisomérases I et II *in vitro*. Propriétés cytotoxiques sur les cellules KB de carcinome humain. a = concentration minimale en produit pour induire une coupure d'ADN par les topoisomérases. b = concentration en produit qui inhibe la croissance cellulaire de 50 % après incubation de 96 heures. Chaque essai a été réalisé 4 fois.

III.1.6. Conclusion.

Ces résultats montrent que le couplage des salènes complexés par le cuivre (II) et le nickel (II) à des synthons anthraquinoniques diminue la cytotoxicité des dérivés anthraquinoniques. Ceci est en accord avec le fait que les salènes seuls ne sont pas cytotoxiques. Une difficulté de pénétration cellulaire de la fraction salène peut être invoquée pour expliquer ce manque d'activité.

En revanche, les hybrides contenant des complexes du cuivre (II) possèdent une plus forte activité de nucléase que les salènes seuls. Cette différence est encore plus marquée lorsque deux salènes complexés sont attachés sur le chromophore anthraquinonique. L'activité de nucléase *in vitro* n'est donc pas corrélée à la cytotoxicité des produits. Si on considère par ailleurs les hybrides contenant du nickel (II), aucun ne coupe l'ADN double brin mais certains sont cytotoxiques. Ceci confirme le manque de relation entre activité cytotoxique et capacité à couper l'ADN.

De plus, la nature du métal influence grandement la reconnaissance des molécules vis à vis de l'ADN. Ainsi les complexes du cuivre (II) coupent l'ADN mais ne se lient pas de façon spécifique. Les hybrides contenant du nickel (II) se lient à l'ADN avec une sélectivité pour les régions riches en paires de bases G-C, la séquence préférentielle des anthraquinones. Celle-ci est différente de l'affinité des salènes complexés par le nickel (II) qui est plutôt une affinité pour les séquences riches en paires de bases A-T.

L'activité cytotoxique semble également indépendante de ce paramètre. Elle est liée à la présence de groupes hydroxyle en positions C₅ et C₈ sur le noyau anthraquinonique. L'activité d'inhibition des topoisomérases II est également corrélée à la présence de ces groupements.

III.2. Association avec l'ellipticine.

Il a été constaté que les molécules hybrides associant une anthraquinone avec les salènes complexés par le cuivre (II) ne possèdent plus de liaison spécifique avec l'ADN. En revanche, la spécificité de liaison des dérivés anthraquinoniques est retrouvée si le salène associé à cet intercalant contient du nickel (II).

Afin de vérifier si le métal utilisé dans ce type d'association influe réellement sur la liaison de telles molécules avec l'ADN, il a été alors envisagé de reprendre ce concept avec un autre intercalant, un dérivé de l'ellipticine (figure 93 A).

L'ellipticine (9-hydroxy-5,11-diméthyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazole) est un alcaloïde plan polycyclique possédant une forte activité antitumorale¹⁵⁶. Lors de pharmacomodulation sur le squelette de l'ellipticine, des dérivés approchants ont été synthétisés. Tout d'abord la 9-méthoxyellipticine (figure 93 B) a été synthétisée. Ce produit possède un spectre d'activité antitumorale très large¹⁵⁷. Un développement ultérieur portant sur la substitution de cette molécule méthoxylée par des chaînes aliphatiques a montré que la meilleure activité antitumorale était attribuée au composé portant une chaîne de type 1-(3-(diéthylamino)propyl)amino sur la structure polycyclique (figure 93 C).

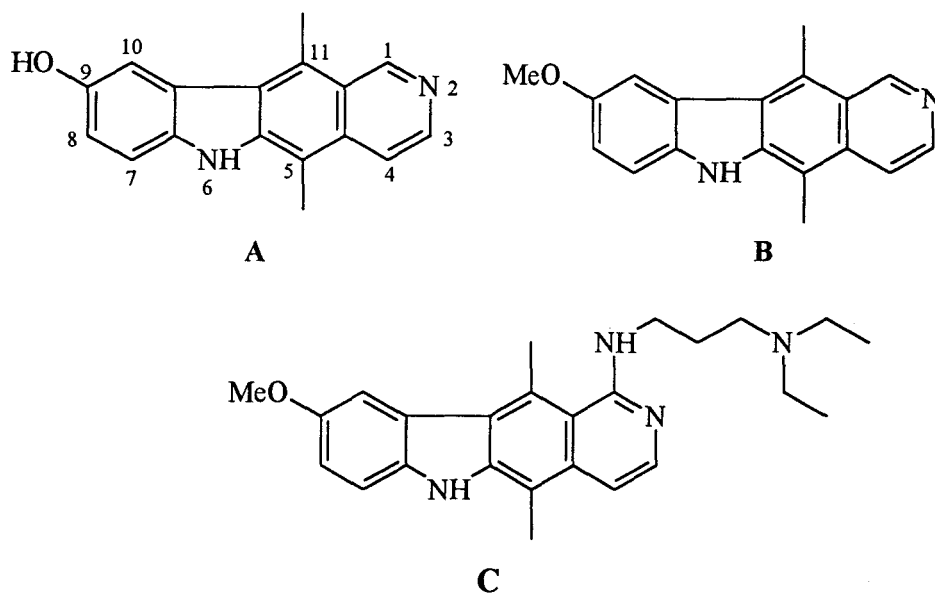


Figure 93 : structure de l'ellipticine (A), de la 9-hydroxyellipticine (B) et du 1-[[3-(diéthylamino)propyl]amino]-9-méthoxyellipticine (C).

III.2.1. Liaison avec l'ADN.

Les molécules de type ellipticine interagissant avec l'ADN sont tous monocationiques à pH physiologique. En effet, dans ces conditions, l'azote en position 2 de l'ellipticine est protonné.

La molécule chargée interagit fortement avec les charges portées par l'ADN et explique le fait que les différentes expériences menées sur l'ADN aient montré une liaison forte de ces dérivés de l'ellipticine avec l'ADN. Cette liaison détord légèrement et de façon localisée l'ADN, ce qui est compatible avec un processus d'intercalation. D'autres résultats confirment cette hypothèse. Cette intercalation est aussi due à la planéité de la molécule, comme dans le cas de la mitoxantrone. Selon certains calculs, les dérivés de l'ellipticine se positionnent comme la mitoxantrone, selon un angle de 90° par rapport à l'axe de la double hélice d'ADN. De plus, cette intercalation s'effectue de façon spécifique. Une spécificité a été démontrée clairement pour les régions riches en paires de bases G-C¹⁵⁸ avec un dérivé de l'ellipticine.

Bien que ces dérivés agissent avec l'ADN et exercent une cytotoxicité importante *in vitro* sur les cellules cancéreuses, le métabolisme fort et très facile subi *in vivo* par ces molécules limite leurs utilisations en tant que médicaments. Ce problème n'est toutefois pas important pour l'utilisation de ces synthons comme vecteurs afin de construire des nucléases artificielles

III.2.2. Autres propriétés.

Le métabolisme des dérivés de la méthoxyellipticine permet sa déméthylation en position 9. Les produits ainsi obtenus, possèdent un système oxydatif de type quinone-imine. Grâce à cette oxydation, les dérivés de la 9-hydroxyellipticine deviennent des agents d'alkylation de l'ADN. Cette alkylation crée des dommages irréversibles sur l'ADN et participe donc à la cytotoxicité de ces molécules.

Une autre propriété de l'ellipticine et de ses dérivés est l'inhibition des topoisomérases II¹⁵⁹. En effet, ces molécules créent avec l'enzyme un complexe très stable qui empêche

l'enzyme d'exercer son action de coupure de l'ADN. Cette propriété d'inhibition participe aussi à la cytotoxicité des produits vis à vis des cellules malignes¹⁵⁹.

Le modèle de l'ellipticine possède donc de nombreuses similitudes d'action avec les molécules anthraquinoniques, à la fois sur le modèle de l'intercalation et sur l'activité inhibitrice des topoisomérases.

III.2.3. Présentation de la molécule hybride.

L'association d'un dérivé de type ellipticine avec une fraction complexante de métaux a déjà été utilisée. Ainsi, une molécule associant ce synthon à un fragment de porphyrine complexée par le manganèse a été réalisée¹⁶⁰. Dans ce modèle, les propriétés des deux éléments actifs sur l'ADN ont été retrouvés. La préférence de liaison de ce produit s'effectue avec les séquences riches en paires de bases A-T, comme le dérivé intercalant seul. De plus, les propriétés de nucléases des métalloporphyrines complexées par le manganèse ont été mises en évidence sur l'ADN double brin.

Le dérivé d'ellipticine a donc été associé avec les salènes complexés par le cuivre (II) et le nickel (II). Les différentes propriétés de ces synthons s'ajouteront, mais aucune synergie de coupure d'ADN n'est envisageable puisque le synthon ellipticine ne possède pas d'activité nucléasique intrinsèque.

Afin de réaliser ce projet, un produit dérivant du composé C (figure 93 page140) a été fourni par le Docteur E. Bisagni (CNRS Orsay). Ce composé (figure 94) fait l'objet d'une variation structurale de la chaîne latérale. Le fragment diméthylamino est remplacé par une chaîne N-éthylsuccinique. Le dérivé obtenu possède non seulement toutes les homologues structurales avec le composé C mais aussi une fonction acide carboxylique libre, facilement utilisable pour greffer les différents salènes.

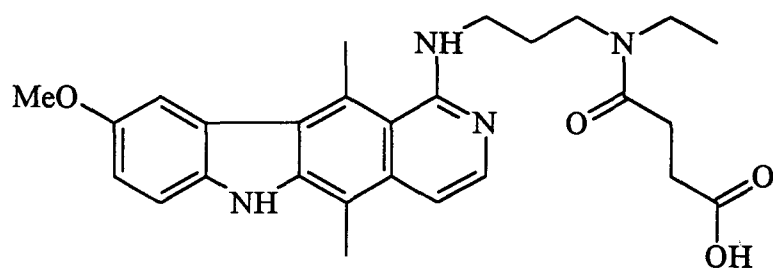


Figure 94 : structure du synthon ellipticine.

Grâce à ce synthon, les nouvelles molécules hybrides ont été obtenues. Elles possèdent, comme celles issues des synthons anthraquinoniques une partie affine pour l'ADN, une partie complexée par un métal de transition et un bras espaceur de type pseudo peptidique. Ce bras espaceur est de longueur comparable à celui utilisé dans le chapitre précédent. Les molécules hybrides cibles sont décrites figure 95.

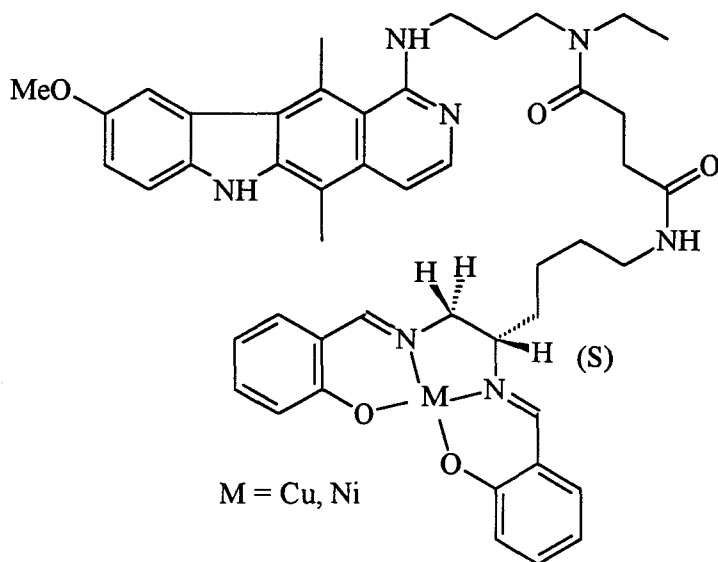


Figure 95 : structure des hybrides ellipticine associée aux salènes complexés.

Ces nouvelles molécules font l'objet de tous les tests de liaison et de coupure d'ADN réalisés sur les hybrides anthraquinoniques. En changeant ainsi la structure de la partie intercalante, il est espéré que les salènes ainsi vectorisés se lieront à l'ADN avec les mêmes propriétés que le synthon ellipticine, ce qui n'était pas le cas en utilisant les synthons anthraquinoniques associés avec le salène complexé par le cuivre (II). De plus, cette association permettra peut être d'engendrer des coupures spécifiques de l'ADN. Dans le cas de l'association du dérivé ellipticine avec le salène complexé par le nickel (II), une coupure de l'ADN est quant à elle espérée.

III.2.4. Méthode et synthèse.

Le synthon ellipticine possédant une fonction acide carboxylique libre **44** est couplé avec la fonction amino portée par les salènes déprotégés complexés par le cuivre (II) **9** et le nickel (II) **10**.

La méthode utilisée pour réaliser ce couplage est celle déjà utilisée lors de la synthèse des hybrides anthraquinoniques. Après l'introduction de l'acide **44**, de la DCC et de l'HOBt, après leur dissolution à 0°C dans la DMF, un temps d'incubation de une heure trente permet l'obtention de l'ester activé. L'amine **9** ou **10** est alors introduite, puis la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 4 jours. Les produits hybrides (figure **96**) contenant du cuivre (II) **45** et **46** contenant du nickel (II) sont respectivement obtenus avec les rendements de 65 et 50 %.

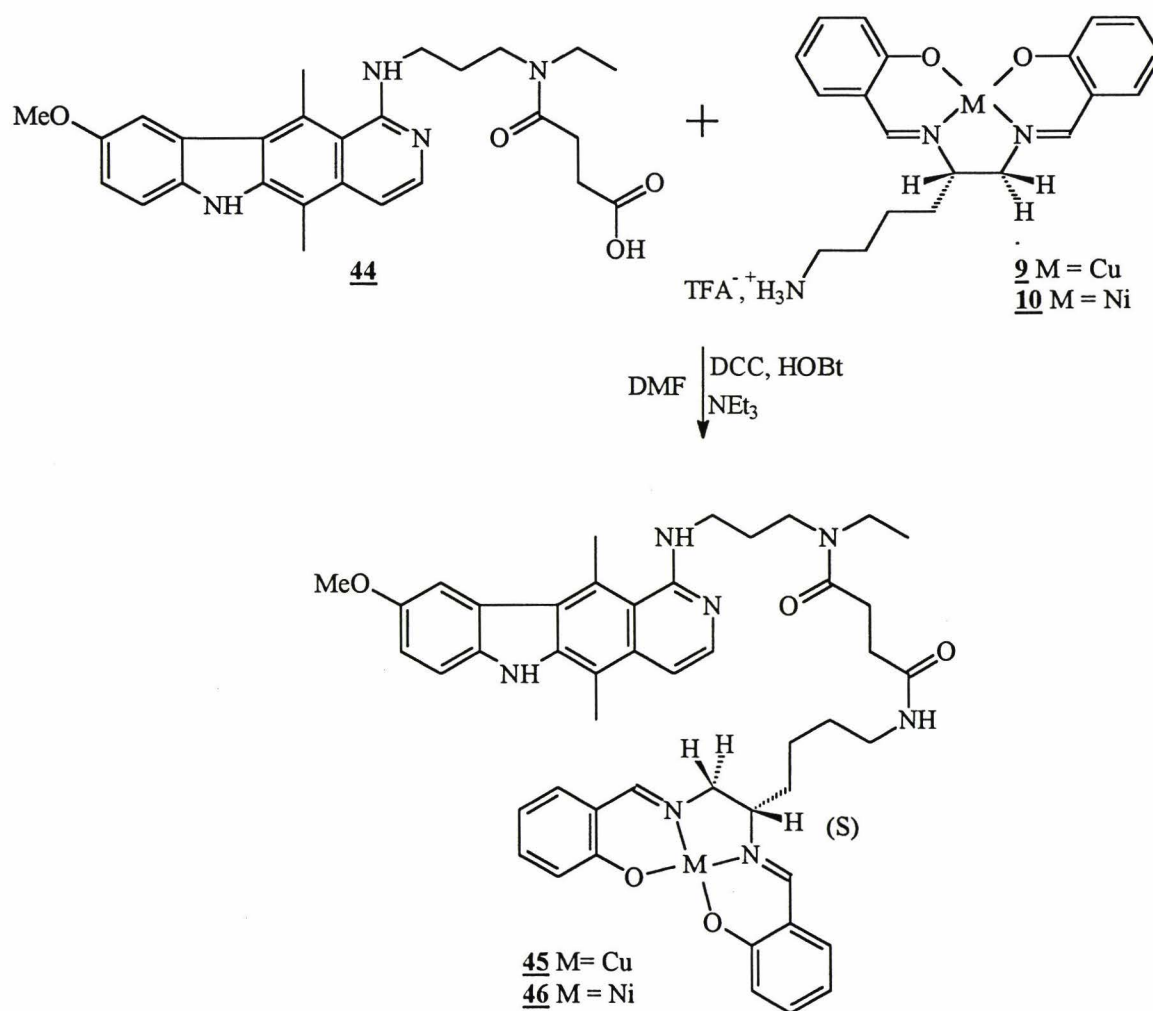


Figure **96** : obtention des hybrides **45** et **46**.

III.3. Etude de l'activité nucléase des hybrides ellipticine-salène.

Différentes techniques de biologie moléculaire ont été utilisées afin de déterminer les interactions des hybrides 45 avec l'ADN et de mettre en évidence des réactions de coupure d'ADN.

III.3.1. Liaison à l'ADN.

III.3.1.1. Spectroscopie d'absorption (U.V.-Visible).

Le salène complexé par le cuivre (II) et la fraction ellipticine possèdent des bandes d'absorption électronique différentes (figure 97). En couplant ces deux molécules, certaines bandes sont conservées dans les hybrides. Il s'agit de la bande à 306 nm, correspondant au salène et de la bande 352 nm, correspondant à la fraction ellipticine. L'expérience est menée avec une solution d'ADN de thymus de veau et une solution d'hybride à 50 μM . La première mesure est effectuée en présence de produit seul et la seconde avec un rapport ADN / hybride de 90. En présence d'ADN, la bande d'absorption centrée à 306 nm se déplace à 318 nm. Ce déplacement de 12 nm vers les plus fortes longueurs d'ondes (effet bathochrome), ainsi que la baisse d'intensité de celle-ci de 22 % indiquent une liaison du salène complexé par le cuivre (II) avec l'ADN de thymus de veau. La bande d'absorption située à 352 nm se déplace aussi avec un effet bathochrome 3 nm et subit aussi une baisse d'intensité de 7 % attestant aussi de la fixation de l'ellipticine à l'ADN.

III.3.1.2. Expériences de « footprinting ».

Les expériences de « footprinting » ont été réalisées à l'aide de la DNAase I comme agent de coupure⁹⁸. Les protocoles d'obtention de l'ADN et les modes opératoires avec l'hybride 45 sont les mêmes que décrits précédemment. Le volume total des échantillons est de 10 μl . Ceux-ci contiennent 2 μl d'ADN marqué, 4 μl de solution tampon contenant le dérivé 45 à la concentration désiré, 2 μl d'eau. Après incubation 2 μl d'une solution de DNAase I est ajoutée.

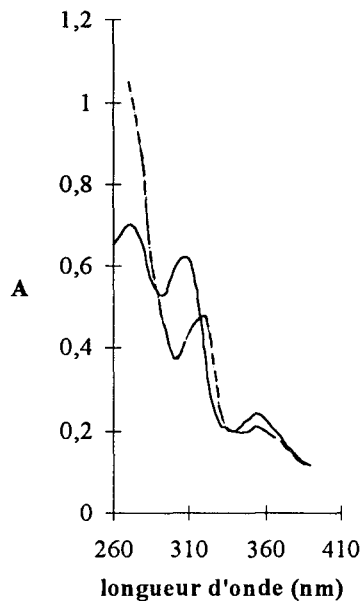


Figure 97 : spectres d'absorption de l'hybride ellipticine-salène complexé par le cuivre (II) en absence (ligne pleine) ou en présence (ligne pointillée) d'ADN de thymus de veau (P / D = 90).

Les gels montrent plusieurs sites intéressants (figure 98). Sur le gel correspondant à l'ADN de 117 paires de bases, les sites de protections de coupures par la DNAase I sont situés entre les paires de bases 30 à 38, 52 à 60, 71 à 74. Ces régions correspondent respectivement aux séquences 3'-GTACCGGC-5', 3'-AGCACTGA-5' et 3'-CGGC-5'.

Les sites d'intensification des coupures de la DNAase I sont visibles dans la région des paires de bases 42 à 47, 63 et 66 et enfin 84 à 88. Elles correspondent aux séquences 3'-AAAATG-5', 3'-TTTT-5', et 3'-AATTA-5' respectivement. Le gel réalisé avec le fragment de 265 paires de bases présente aussi des sites de protection et d'augmentation de coupures. Le site majeur de protection se situe entre les paires de bases situées de 87 à 91 et correspond à une séquence 3'-CCGC-5'. Les sites essentiels d'augmentation des coupures sont situés entre les positions 52 et 56 et entre 74 et 80. Les séquences en paires de bases sont pour ces positions 3'-GAAAA-5' et 3'-AATTA-5' respectivement.

A la vue de ces différents résultats, la protection de coupure a lieu dans les régions riches en paires de bases G-C tandis que l'amplification s'est effectuée dans les régions riches en paires de bases A-T. On peut affirmer que l'hybride se lie préférentiellement aux séquences riches en paires de bases G-C. L'hybride ellipticine-salène complexé par le cuivre (II) **45** se lie donc avec l'ADN avec la même préférence que l'ellipticine seule, à savoir les régions riches en paires de bases G-C¹⁵⁸. L'ellipticine a donc bien servi de vecteur à l'ensemble de l'hybride.

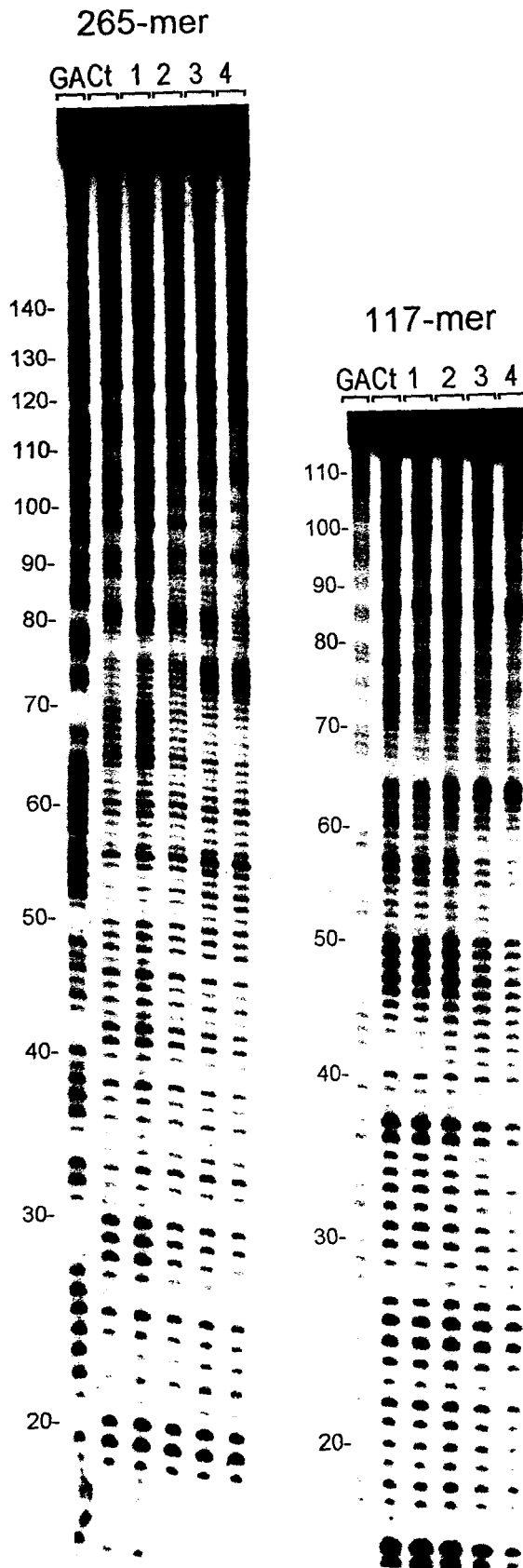


Figure 98 : « footprinting » réalisé avec la DNAse I sur les fragments de 265 (à gauche) et 117 (à droite) paires de bases marqués à leur extrémité 5' avec du ^{32}P et en présence de l'hybride 45. La ligne de contrôle Ct ne contient pas de produit. La ligne GA représente les marqueurs spécifiques des résidu purines. Les nombres sur le côté des gels se réfèrent à la séquence du fragment d'ADN.

III.3.1.3. Conclusion sur la liaison de 45 avec l'ADN.

Les spectres d'absorption U.V. réalisés entre l'ADN de thymus de veau et l'hybride ellipticine-salène complexé par le cuivre (II) 45 montrent une liaison de cette molécule hybride avec l'ADN. Les différents résultats de « footprinting » obtenus confirment cette liaison et montrent une préférence du complexe 45 pour les régions riches en paires de bases G-C. Cette séquence préférentielle est conforme à l'affinité de l'ellipticine seule pour l'ADN.

III.3.2. La coupure d'ADN.

Trois techniques ont été envisagées :

- la coupure d'ADN circulaire double brin super-enroulé de plasmide.
- la coupure de fragments d'ADN double brin de plasmide définis dans le nombre de paires de bases.
- la coupure d'un long fragment d'ADN (4 kb ou 5 kb).

III.3.2.1. La coupure de plasmide.

Pour réaliser ces expériences, les produits sont incubés avec l'ADN double brin superenroulé de plasmide. De l'acide 2-mercaptopropionique (MPA) est ajouté pour initier les réactions de coupures de l'hybride contenant du cuivre (II). Après incubation, les fragments d'ADN sont séparés sur un gel polyacrylamide dénaturant. Les protocoles expérimentaux utilisés sont les mêmes que précédemment.

L'hybride 45 est capable de catalyser les coupures oxydantes de l'ADN (figure 99). L'incubation de l'ADN de plasmide avec une concentration en composé de 20 μ M, induit la complète conversion de la forme I en forme II. On peut donc conclure que l'activation du complexe cuivrique engendre une coupure monobrin de l'ADN double hélice. Bien qu'en augmentant les concentrations de salène complexé, la probabilité d'une seconde coupure est augmentée. Cependant celle-ci n'est pas détectée. Ce résultat diffère donc de celui obtenu avec le salène seul 2 qui induisait à forte concentration, l'apparition de forme III linéaire.

De plus, à partir de 20 μM et en augmentant les concentrations en produit jusqu'à 80 μM , les formes I et II sont retardées sur le gel et migrent différemment. Ceci est essentiellement dû à une accumulation de liaison de l'hybride avec l'ADN. Ce résultat montre donc une liaison de l'hybride avec l'ADN et confirme les résultats de « footprinting ».

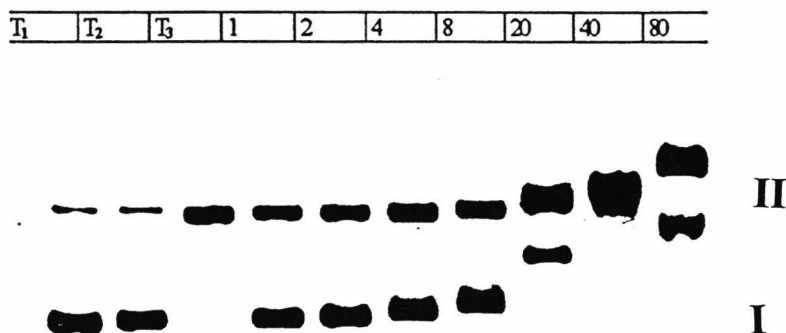


Figure 99 : coupure d'un ADN circulaire fermé pUC12 par le salène complexé par l'hybride 5 en présence de MPA comme agent réducteur. Les concentrations (μM) sont indiquées en haut de chaque gel.

III.3.2.2. Coupure de fragments de longueurs définies marqués au ^{32}P .

Les modes opératoires utilisés ici avec l'hybride 45 sont les mêmes que ceux décrits précédemment.

Ces expériences sont réalisées sur un fragment de 265 paires de bases marqué en 3'. Au regard des différentes expériences, toutes les bandes de fragmentation des ADN marqués sont présentes. Elles s'amplifient en fonction de la concentration en produit (5 à 50 μM) mais pas en fonction du MPA (25 à 500 μM). Les intensités de ces bandes de coupures sont néanmoins plus faibles que celles observées avec le salène seul 9.

L'hybride ellipticine-salène **45** permet donc des coupures de l'ADN. Celles-ci sont moins importantes que celles observée avec le salène complexé par le cuivre (II) **9**. Dans les deux cas ces coupures s'effectuent de façon non-spécifiques et rappellent le mécanisme radicalaire par production de radicaux libres oxygénés mis en avant précédemment avec les complexes de cuivre (II).

III.3.2.3. Coupures de fragments de 4 ou 5 kb.

Le mode opératoire utilisé pour ces fragments est identique à celui employé dans le cas d'un ADN superenroulé. La migration sur gel fait apparaître une forme retard correspondant à une forte liaison de l'hybride avec l'ADN. Ce résultat est d'ailleurs obtenu avec les deux hybrides **45** (complexe cuivrique) et **46** (complexe de nickel (II)). En revanche, aucune trainée de coupure n'est visualisée avec ces composés. Une étude plus approfondie est donc nécessaire, afin de trouver les conditions opératoires permettant la visualisation de coupures de l'ADN par les hybrides.

III.3.3. Conclusion sur la coupure.

Les hybrides **45** et **46** se lient à l'ADN. Celle-ci est confirmée par l'étude U.V., et les tests de coupures de plasmide et d'ADN de 4 ou 5 kb. Les expériences de footprinting montrent que la liaison de l'hybride **45** s'effectue préférentiellement dans les séquences riches en paires de bases G-C, la séquence de liaison de l'ellipticine.

De plus, l'hybride **45** coupe l'ADN. Mais son activité nucléasique reste plus faible que celle du salène seul. On peut supposer que la fraction ellipticine s'intercale dans l'ADN. Le salène se positionnerait différemment par rapport à l'ADN, ce qui diminuerait la capacité de coupure.

Ces quelques résultats sont préliminaires. Ils montrent une activité nucléasique potentielle, mais surtout une forte liaison des hybrides avec l'ADN. L'étude de l'activité nucléase des hybrides **45** et **46**, leur action sur les topoisomérases I et II, ainsi que leur cytotoxicité est en cours de réalisation.

CONCLUSION

Nous avons synthétisé et étudié, par différentes techniques spectroscopiques et biochimiques, les salènes complexés par le cuivre (II) et le nickel (II). La synthèse mise en oeuvre fait appel à une transformation d'un acide aminé, la L (S) lysine. La transformation de la fonction acide en un groupe méthylène amine permet d'obtenir facilement le ligand fonctionnalisé. La complexation par différents métaux de transition peut se faire simultanément, lors de la synthèse du ligand, ou ultérieurement. Ce procédé, facilement applicable à tous les acides α aminés disponibles permettra d'obtenir une panoplie de salènes fonctionnalisés différemment. Par ailleurs, les chaînes latérales permettent d'accrocher au salène complexé tout type de molécule.

Toutefois, le salène possède des fonctions imines sensibles aux conditions acides. Selon les groupes protecteurs ou le métal utilisés, des problèmes peuvent survenir comme dans le cas de notre salène complexé par le manganèse. Ce dérivé a nécessité un changement de voie de synthèse, actuellement en cours de réalisation.

Les salènes que nous avons obtenus ont été étudiés par différentes techniques physicochimiques. La spectroscopie U.V. a permis de déterminer le pKa du ligand, la stoechiométrie du complexe formé en solution (complexe 1:1 pour le cuivre et le nickel; 2:1 pour le manganèse) et les constantes d'association. Ces mesures permettent d'appréhender le phénomène de complexation. La R.P.E. a permis la caractérisation de la géométrie des complexes à base carrée dans le cas du cuivre (II) et du degré d'oxydation du manganèse engagé dans la complexation. Les différents potentiels redox ont été déterminés par voltamétrie cyclique. Tous les potentiels obtenus montrent qu'aucun des salènes ne peut réduire l'oxygène spontanément et qu'ils nécessitent donc une activation préalable. De plus les salènes protégés ou déprotégés possèdent les mêmes caractéristiques: la fonction amine portée par la chaîne latérale n'influe donc pas sur la complexation.

Les tests biologiques et physicochimiques ont montré que les salènes se lient à l'ADN vraisemblablement dans le grand sillon, avec une préférence pour les séquences riches en paires de bases A-T. Les hybrides se lient à l'ADN de la même façon que la partie intercalante (séquences riches en G-C pour l'ellipticine et triplets 5'-(A/T)GC ou 5'-(A/T)CA pour les

anthraquinones). Les anthraquinones et l'ellipticine sont donc de bons vecteurs pour les salènes.

Les salènes se sont révélés de bons agents de coupure. Le salène complexé par le cuivre (II) coupe l'ADN de façon non spécifique. Le salène complexé par le nickel (II) coupe sélectivement au niveau des guanines non appariées les plus exposées. Le mécanisme de coupure par les complexes du cuivre laisse supposer l'intervention de radicaux hydroxyle, tandis que les complexes de nickel semblent agir par un mécanisme d'alkylation suivi d'une oxydation de la base. Les hybrides contenant du cuivre (II) coupent l'ADN de façon non spécifique. Aucun de ceux contenant du nickel (II) ne coupe l'ADN. Le couplage à un intercalant des complexes de cuivre (II) n'a pas permis de rendre la coupure sélective. Tous ces composés induisant des dégradations de l'ADN peuvent être utilisés comme nucléases.

Les propriétés d'inhibition des topoisomérases et de cytotoxicité ont été étudiées pour les salènes et les hybrides anthraquinoniques. Les salènes n'inhibent pas les enzymes et sont faiblement cytotoxiques. La liaison à une anthraquinone induit une inhibition des topoisomérases II, mais elle reste toujours inférieure à celle des anthraquinones seules. Ceci est peut-être dû au manque de pénétration cellulaire des fractions salènes. On n'observe pas de différence notable entre complexes de cuivre et de nickel. D'une manière générale, tous les composés cytotoxiques inhibent les topoisomérases I ou II. La cytotoxicité semble donc reliée à cette inhibition enzymatique et non à l'affinité ou à la capacité de coupure de l'ADN.

Sur la base des résultats obtenus, nous avons développé d'autres molécules. Nous avons synthétisé des hybrides associant le salène complexé par le cuivre (II) à un fragment de type distamycine, à une polyamine de type spermine (figure 100) et à un oligonucléotide. Grâce à ces associations, nous espérons vectoriser notre salène dans le petit sillon de l'ADN (lorsque le vecteur est de type distamycine), dans le grand sillon (dans le cas de l'oligonucléotide) ou vers les groupements phosphates (lorsque le vecteur est de type spermine). Ces molécules sont en cours d'étude. Par ailleurs, des salènes comportant d'autres chaînes latérales, apportées par des acides aminés L ou D variables peuvent être réalisés et étudiés en tant que nucléases, mais aussi comme éventuels agents de catalyse asymétriques¹⁶¹⁻¹⁷⁴. Il peut être envisagé également d'introduire sur la fraction aromatique des salènes, des groupements hydroxyle

supplémentaires afin de créer un ensemble complexe métallique / système hydroquinonique, capable de réduire l'oxygène sans intervention d'agents activateurs (figure 101).

Dans un proche avenir, nous nous proposons de modifier un intercalant, la phénantroline et de lui imposer une complexation métallique à géométrie carrée. Grâce à ce nouveau concept, le bras espaceur maintes fois utilisé est supprimé au profit d'une molécule compacte qui, nous l'espérons, donnera de bons résultats de coupure d'ADN. Un autre avantage de ce produit, serait que le ligand seul puisse interagir avec l'ADN et subir dans le milieu réactionnel la complexation. Ce type de dérivé pourrait alors agir plus facilement *in vivo*.

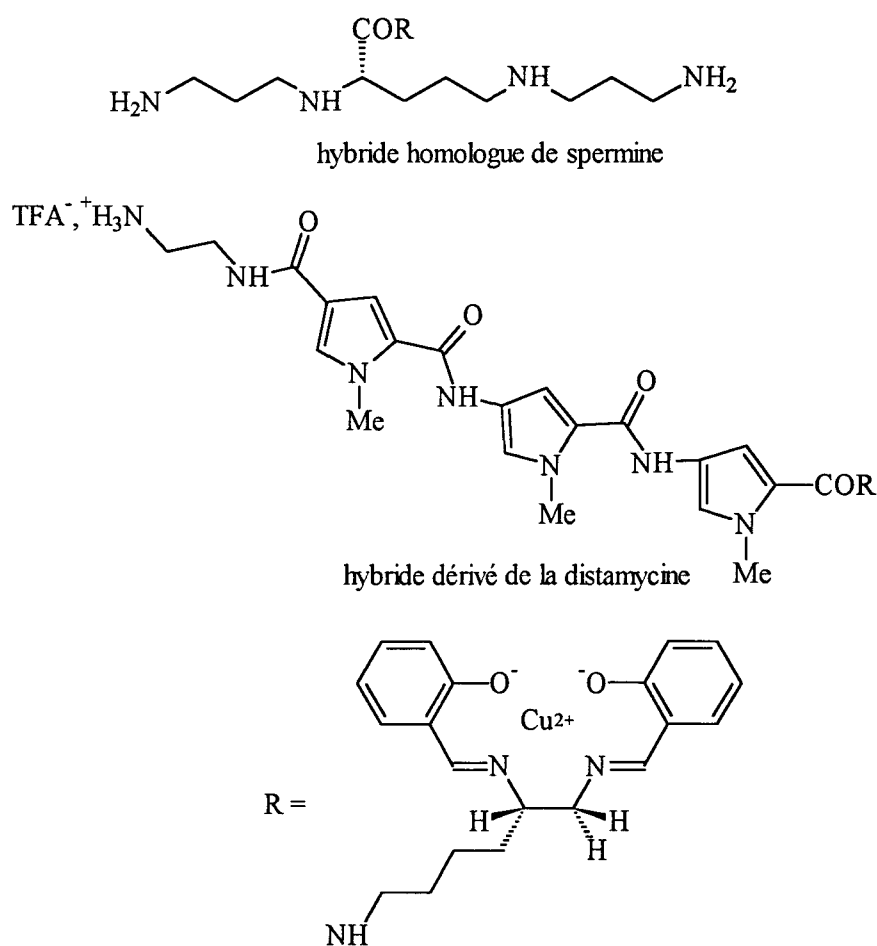


Figure 100 : structure des hybrides de type distamycine et spermine synthétisés.

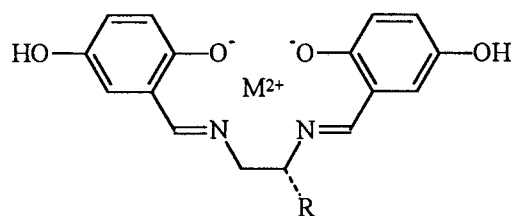


Figure 101 : ensemble complexe métallique / système hydroquinonique.

PARTIE
EXPERIMENTALE

TECHNIQUES D'ANALYSES.

Les chromatographies sur couche mince CCM sont effectuées sur gel de silice 60F254 d'épaisseur 0,2 mm, de référence 5735 Merck. Elles permettent de vérifier la pureté des produits, avant et après les purifications sur colonnes et sont révélées à l'U.V. ou à la ninhydrine 0,1 % dans le méthanol pour les composés azotés.

Les colonnes flash sur gel de silice sont réalisées avec de la silice Si60 granulométrie 0,04-0,063 mm de référence Merck 11567. Les solvants de migration sont indiqués pour chaque cas.

Les spectres de masse en impact électronique IE sont réalisés sur un spectromètre quadrupolaire RIBERMAG R 10-10 fonctionnant à 70 eV. Les spectres de masse en « fast atomic bombardment » positifs ou négatifs (FAB⁺ ou FAB⁻) sont réalisés sur un spectromètre de masse Kratos MS-50RF arrangé en géométrie EBE.

Les spectres IR sont réalisés sur un spectrographe Perkin-Helmer 881 en utilisant des pastilles de KBr comme support inerte. Seuls les pics significatifs sont indiqués.

Les spectres RMN ¹H et ¹³C sont enregistrés sur un Bruker 300 WB. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au triméthylsilane utilisé comme référence interne. Les constantes de couplage *J* sont données en Hertz.

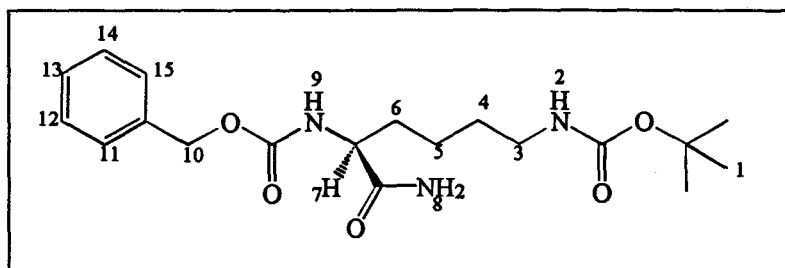
Les points de fusions sont mesurés sur une plaque chauffante Thermopan et ne sont pas corrigés.

Les angles de rotation optiques sont mesurés sur un polarimètre Model 241. La relation utilisée est $\alpha_{lu} = \alpha_D^{25} \times C \times L$, où *C* est la concentration exprimée en g/ml, *L* est la largeur de la cuve exprimée en dm. On détermine donc $\alpha_D^{25} = \alpha_{lu} / (C \times L)$, et le pouvoir rotatoire spécifique est exprimé suivant le modèle $[\alpha]_D^{25} \pm X$ (*C* en g/100 ml, solvant utilisé).

Les numérotations indiquées sur les figures des différents produits synthétisés ne correspondent pas à une numérotation de nomenclature systématique mais sont une aide à l'identification des signaux de ¹H RMN.

MODES OPERATOIRES.

N α -Z-N ϵ -Boc-L-Lysinamide 2.



Sous argon, dans un ballon de 100 ml, 2 g (5,26 mmoles) de N α -Z-N ϵ -Boc-L-Lysine 1 sont dissous dans 30 ml de THF distillé sur sodium / benzophénone. On ajoute goutte à goutte et sous forte agitation 0,74 ml (5,31 mmoles) de triéthylamine. Le mélange réactionnel est refroidi à -10 °C. 0,55 ml (5,75 mmoles) de chloroformiate d'éthyle sont alors ajoutés goutte à goutte et la température est maintenue à -10 °C pendant 45 minutes. 30 ml de THF sec préalablement saturés en ammoniac et refroidis à -10 °C sont ajoutés. On laisse revenir le mélange réactionnel à température ambiante. Après 12 heures d'agitation, les solvants sont évaporés. Le produit réactionnel est repris par 200 ml d'eau et 150 ml d'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est extraite par 3 x 100 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées par 3 x 100 ml de bicarbonate de sodium molaire et séchées sur sulfate de sodium. En concentrant la solution, le produit cristallise sous forme de produit blanc.

CCM : R_f = 0,74; éluant CHCl₃ / MeOH 4 / 1.

Rendement : 85 %, m = 1,7 g.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3370-3310 (NHCO); 3200 (NH₂); 2965 (CH₂, CH₃); 1680 (CONH₂); 1655 (CO); 1535 (NHCO).

PF : 141 - 142 °C.

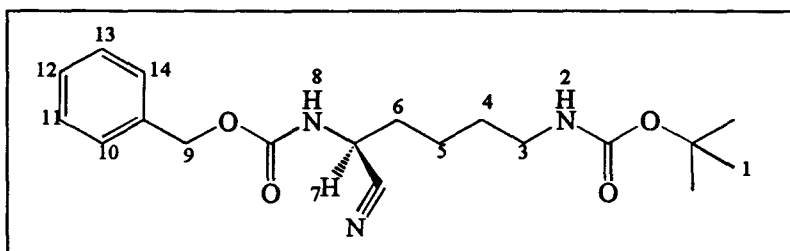
SM IE : (M + 1)⁺ = 380.

¹H RMN (CDCl₃, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,4 (s, 9H, H₁); 1,47 (m, 4H, H₄, H₅); 1,62 (m, 2H, H₆); 3,06 (m, 2H, H₃); 4,15 (m, 1H, H₇); 5,10 (s, 2H, H₁₀); 5,55 (m, 1H, H₉); 5,92 (m, 1H, H₂); 6,40 (m, 2H, H₈); 7,42 (s, 5H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ) : 22,60 (CH_2); 28,40 (CH_3); 29,43 (CH_2); 40,42 (CH_2); 48,44 (CH_2); 64,64 (CH_2); 77,32 (CH); 78,96 (Cq); 126,88 (CH); 127,23 (CH); 141,41 (Cq); 156,33 (Cq).

$[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ (c 4, MeOH) : - 17.

(S)-1-cyano- N^1 -(benzyloxycarbonyl)- N^5 -(*ter*butyloxycarbonyl)-1,5-diaminopentane **3**.



Sous argon, dans un ballon de 100 ml, 1,6 g (4,26 mmoles) de **2** sont dissous dans 20 ml de THF sec et 1,4 ml (10,04 mmoles) de triéthylamine. Le mélange est refroidi par un bain de glace et 0,7 ml (4,95 mmoles) d'anhydride trifluoroacétique est ajouté goutte à goutte. La réaction est agitée 1 heure à 0 °C puis 12 heures à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau. Après évaporation des solvants, les sels et l'amide **2** n'ayant pas réagi sont dissous dans 150 ml d'éther éthylique. La phase organique est lavée par 2 x 50 ml d'une solution d'acide chlorhydrique décimolaire puis par 100 ml d'une solution de soude décimolaire et enfin par 100 ml d'eau. La phase étherée est séchée sur sulfate de sodium puis le solvant est distillé sous pression réduite. Le nitrile est récupéré sous forme de cristaux blancs.

CCM : $R_f = 0,84$; éluant CHCl_3 80 : MeOH 20.

Rendement : 83 %, m = 1,26 g.

IR (KBr, cm^{-1}) : 3370 (NHCO); 2965 (CH_3); 1715 (CO); 1540 (NHCO).

PF : 81 - 82 °C.

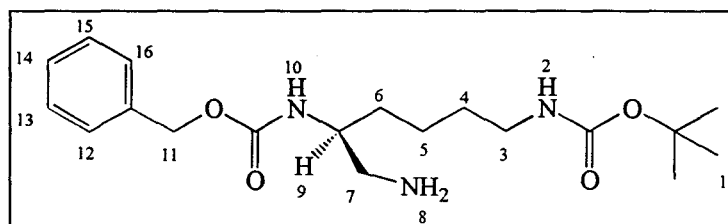
SM IE : $(M + 1)^+ = 362$.

^1H RMN (CDCl_3 , δ ppm, J Hz, TMS) : 1,38 (m, 11H, H_1 H_5); 1,47 (m, 4H, H_4 , H_6); 3,10 (m, 2H, H_3); 4,53 (m, 1H, H_7); 5,14 (s, 2H, H_9); 5,76 (m, 2H, H_2 , H_8); 7,34 (s, 5H, H_{10} , H_{11} , H_{12} , H_{13} , H_{14}).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ) : 21,27 (CH_2); 28,37 (CH_3); 29,38 (CH_2); 32,11 (CH_2); 39,42 (CH_2); 42,65 (CH); 67,63 (CH_2); 79,49 (Cq); 118,61 (Cq); 128,35 (CH); 128,59 (CH); 135,66 (Cq); 156,38 (Cq); 155,39 (Cq).

$[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ (c 4, MeOH) : - 27.

(S)-N²-(benzyloxycarbonyl)-N⁶-(*tert*butyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane 4.



0,5 g (1,38 mmoles) de 3 est introduit dans un autoclave et dissous dans 30 ml de méthanol sec saturé en ammoniac. 1,5 g de nickel de Raney sont lavés abondamment au méthanol puis ajoutés au mélange et une pression de 50 atmosphères d'hydrogène est appliquée. Le mélange réactionnel est chauffé à 50 °C pendant 6 heures. Le catalyseur est filtré sur célite. Le solvant est distillé sous pression réduite et le produit est purifié par flash chromatographie sur gel de silice. L'éluant MeOH 20 CHCl_3 80 est utilisé. Le produit est récupéré sous forme de solide blanc.

CCM : Rf = 0,55; éluant CHCl_3 60 : MeOH 40.

Rendement : 85 %, m = 0,3 g.

IR (KBr, cm^{-1}) : 3200-3600 (NH_2); 2850-2910 (CH_3); 1680 (CO); 1550 (NHCO).

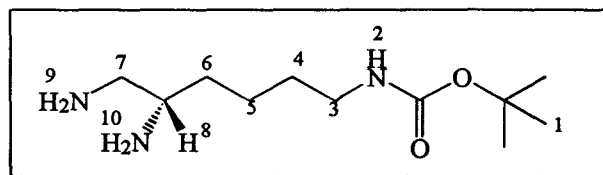
PF : 114 - 116 °C.

SM IE : $(\text{M} + 1)^+ = 366$.

^1H RMN (CDCl_3 , δ ppm, J Hz, TMS) : 1,28-1,34 (m, 13H, H₁, H₄, H₅); 2,07 (m, 2H, H₆); 2,54 (m, 2H, H₇); 2,98 (m, 2H, H₃); 3,56 (m, 1H, H₉); 4,90 (m, 1H, H₂); 4,99 (s, 2H, H₁₁); 5,46 (m, 1H, H₁₀); 6,82 (m, 2H, H₈); 7,25 (m, 5H, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ) : 22,96 (CH_2); 28,38 (CH_3); 29,70 (CH_2); 32,04 (CH_2); 40,04 (CH_2); 44,97 (CH_2); 53,37 (CH); 64,49 (CH_2); 78,89 (Cq); 127,97 (CH); 128,44 (CH); 136,57 (Cq); 156,16 (Cq); 156,71 (Cq).

(S)-N⁶-(*ter*butyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane 5.



0,5 g (1,38 mmoles) de 3 est introduit dans un autoclave et dissous dans 30 ml de méthanol sec saturé en ammoniac. 1,5 g de nickel de Raney sont lavés abondamment au méthanol puis ajoutés au mélange et une pression de 50 atmosphères d'hydrogène est appliquée. Le mélange réactionnel est chauffé à 50 °C pendant 12 heures. Le catalyseur est filtré sur célite. Le solvant est distillé sous pression réduite et le produit est récupéré sous forme de solide amorphe.

CCM : R_f = 0,15; éluant CHCl₃ 60 : MeOH 40.

Rendement : 93 %, m = 0,3 g.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3200-3600 (NH₂); 2800-2900 (CH₃); 1690 (CO); 1540 (NHCO).

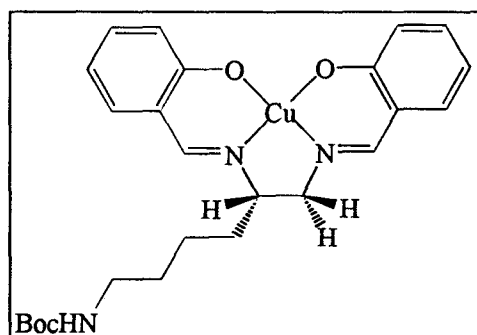
PF : 46 - 48 °C.

SM IE : (M + 1)⁺ = 232.

¹H RMN (DMSO d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,32-1,46 (m, 13H, H₁, H₄, H₅); 1,78 (m, 2H, H₆); 2,66 (m, 2H, H₃); 2,92-3,17 (m, 3H, H₇, H₈); 5,05 (m, 2H, H₉); 6,82 (m, 2H, H₁₀).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO d₆, δ) : 22,28 (CH₂); 23,74 (CH₂); 28,43 (CH₃); 29,43 (CH₂); 32,66 (CH₂); 39,78 (CH₂); 50,50 (CH₂); 79,04 (Cq); 156,25 (Cq).

Complexe de cuivre (II) du (S)-N¹, N²- bis(salicylidène)-N⁶-(*ter*butyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane 6.



Dans un ballon de 100 ml, 400 mg (1,72 mmoles) de 5 sont dissous dans 25 ml d'éthanol sec et 650 μ l d'aldéhyde salicylique sont ajoutés. Le mélange est porté à reflux pendant 3 heures. Parallèlement, 1,60 g (4,42 mmoles) d'acétate de nickel (II) monohydraté sont ajoutés au mélange réactionnel. La complexation évolue au reflux de l'éthanol. La solution vire au brun. Après une heure, le solvant est évaporé et le résidu est repris 50 ml d'acétate d'éthyle. Un solide jaune vert précipite. Après filtration du solide, l'acétate d'éthyle est évaporé. Un solide orange précipite lors de l'ajout d'éther éthylique. Le produit est récupéré par filtration, puis séché.

CCM : $R_f = 0,55$; éluant MeOH.

Rendement : 41 %, $m = 0,37$ g.

IR (KBr, cm^{-1}) : 3200 (NHCO); 2900 (CH, CH_3); 1690 (NHCO); 1640 (imine).

PF : 135 - 137 °C.

SM FAB⁺ : $(M + 1)^+ = 495$; $(2 \times M + 1)^+ = 991$.

UV (10^{-4} M, nm) : 409; 323; 281.

¹H RMN (acétone d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,36 (m, 11H, H₁, H₅); 1,55 (m, 2H, H₆); 1,87 (m, 2H, H₄); 3,03 (m, 2H, H₃); 3,20 (m, 1H, H₇); 3,39 (m, 1H, H₈); 3,76 (m, 1H, H₉); 5,96 (m, 1H, H₂); 6,48 (m, 2H, H₁₃); 6,75 (m, 2H, H₁₁); 7,16 (m, 4H, H₁₂, H₁₄); 7,80 (s, 2H, H₁₀).

¹³C RMN (75 MHz, acétone d₆, δ) : 28,09 (CH_2); 34,12 (CH_2 , CH_3); 40,53 (CH_2); 45,03 (CH_2); 67,6 (CH_2); 73,46 (CH_2); 85,89 (Cq); 120,59 (CH); 125,58 (CH); 126,11 (Cq), 137,71 (CH), 137,98 (CH); 138,58 (CH); 167,0 (CH); 168,0 (CH); 170,38 (Cq).

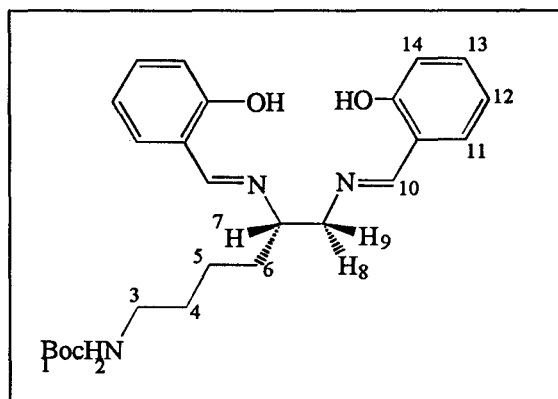
$[\alpha]^{25}_D$ (c 0,04, MeOH) : - 52.

Analyse élémentaire : $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{Ni}$

Calculée : C, 60,51; H, 6,29; N, 8,46.

Trouvée : C, 60,64; H, 6,23; N, 8,51.

(S)-N¹, N²- bis(salicylidène)-N⁶-(terbutyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane **8.**



Dans un ballon de 100 ml, 500 mg (2,16 mmoles) de **5** sont dissous dans 25 ml d'éthanol sec. 650 μ l d'aldéhyde salicylique sont ajoutés ainsi que du tamis moléculaire 3 Å en poudre. Le mélange est porté à reflux pendant 3 heures. Le tamis est filtré et lavé abondamment avec de l'éthanol. Après évaporation du solvant, le produit réactionnel brut est purifié par chromatographie flash sur gel de silice. Le mélange éther de pétrole 50 / éther éthylique 50 est utilisé comme éluant. Le produit obtenu est sous forme d'huile jaune.

CCM : Rf = 0,34; éluant éther de pétrole 50 / éther éthylique 50.

Rendement : 71 %, m = 0,68 g.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3300 (NHCO, OH); 2940 (CH₂), 1720 (CO du Boc); 1620 (imine).

SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 440.

¹H RMN (CDCl₃, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,24 (m, 2H, H₅); 1,40 (s, 9H, H₁); 1,47 (m, 2H, H₆); 1,84 (m, 2H, H₄); 3,09 (t, J = 6,5, 2H, H₃); 3,47 (m, 1H, H₇); 3,65 (m, 1H, H₈); 3,88 (m, 1H, H₉); 4,55 (m, 1H, H₂); 6,84 (t, J = 8,5, 2H, H₁₃); 6,90 (d, J = 7,3, 2H, H₁₁); 7,18 (d, J = 7,8, 2H, H₁₂); 7,25 (d, J = 8, 2H, H₁₄); 8,27 (s, 2H, H₁₀).

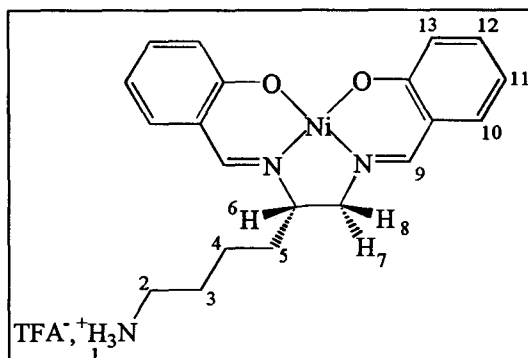
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃, δ) : 23,37 (CH₂); 28,40 (CH₃); 29,96 (CH₂); 33,69 (CH₂); 40,30 (CH₂); 64,54 (CH); 70,10 (Cq); 79,03 (Cq); 116,89 (CH); 118,47 (CH); 131,49 (CH); 132,39 (CH); 156,02 (Cq); 161,00 (Cq); 165,21 (Cq); 166,48 (Cq).

[α]²⁵_D (c 0,05, DMSO) : + 17.

Analyse élémentaire : C₂₅H₃₃N₃O₄ Calculée : C, 68,31; H, 7,56; N, 9,56.

Trouvée : C, 68,37; H, 7,48; N, 9,58.

Sel trifluoroacétique du complexe de nickel (II) du (S)-N¹, N²-bis(salicylidène)-1,2,6-triaminohexane 10.



Dans un ballon de 25 ml, 200 mg (0,4 mmoles) de 7 sont dissous dans 15 ml de CH₂Cl₂ puis 5 µl (0,04 µmole) d'anisole sont ajoutés. L'introduction de 1,1 ml (11,41 mmoles) d'acide trifluoroacétique à température ambiante fait virer la solution au vert clair. Après 45 minutes, le solvant est évaporé et le résidu est dissous dans EtOH puis le solvant est évaporé afin d'éliminer les traces de TFA. Le produit est lavé abondamment à l'éther éthylique et récupéré sous forme de solide orange hygroscopique.

CCM : R_f = 0; éluant MeOH.

Rendement : 78 %, m = 0,16 g.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3200 (NHCO); 1640 (imine).

PF : 150 - 152 °C.

SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 509 non détecté; (M - TFA)⁺ = 396.

UV (10⁻⁴ M, nm) : 409; 323; 281.

¹H RMN (DMSO d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,35 (m, 2H, H₄); 1,57 (m, 2H, H₅); 1,69 (m, 2H, H₃); 2,77 (m, 2H, H₂); 2,88 (m, 1H, H₈); 3,09 (m, 1H, H₇); 3,66 (m, 1H, H₆); 6,49 (m, 2H, H₁₂); 6,67 (m, 2H, H₁₀); 7,15 (m, 2H, H₁₁); 7,28 (m, 2H, H₁₃); 7,72 (s, 3H, H₁); 7,84 (s, 2H, H₉).

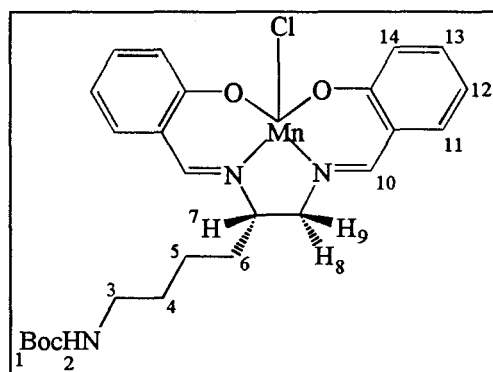
¹³C RMN (75 MHz, DMSO d₆, δ) : 22,09 (CH₂); 26,40 (CH₂, CH₃); 26,66 (CH₂); 34,58 (CH₂); 61,88 (CH₂); 67,26 (CH); 119,66 (CH); 120,13 (Cq); 120,34 (Cq); 132,68 (CH), 132,98 (CH), 133,49 (CH); 162,21 (CH); 163,06 (CH); 163,80 (Cq).

[α]_D²⁵ (c 0,05, DMSO) : - 49.

Analyse élémentaire : C₂₂H₂₄N₃O₄F₃Ni Calculée : C, 51,79; H, 4,74; N, 8,23.

 Trouvée : C, 51,68; H, 4,72; N, 8,26.

Complexe de chlorure de manganèse (III) du (S)-N¹, N²- bis(salicylidène)-N⁶- (terbutyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane 12.



Dans un ballon de 100 ml, 400 mg (1,72 mmoles) de 5 sont dissous dans 25 ml d'éthanol sec et 650 µl d'aldéhyde salicylique sont ajoutés. Le mélange est porté à reflux pendant 3 heures. Parallèlement, 1,25 g (5,1 mmoles) d'acétate de manganèse (II) tétrahydraté sont ajoutés au mélange réactionnel. La complexation évolue au reflux de l'éthanol. La solution vire au brun. Après une heure, 650 mg (15,3 mmoles) de chlorure de lithium sont ajoutés et le reflux est maintenu encore 30 minutes. Le solvant est évaporé et le résidu est repris 30 ml de CHCl₃. La phase organique est lavée par 3 x 30 ml d'eau, séchée et le solvant évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié par recristallisation dans un mélange EtOH / eau à 4 °C. Les cristaux obtenus sont rouge brique.

CCM : R_f = 0, 74; éluant MeOH.

Rendement : 30 %, m = 0,28 g.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3400 (NHCO); 2910 (CH₂), 1740 (NHCO); 1610 (imine).

PF : 136 - 137 °C.

SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 527 non détecté; (M + 1 - Cl)⁺ = 492; (2 x (M + 1) - Cl)⁺ = 1019.

UV (10⁻⁴ M, nm) : 409; 322; 281.

¹H RMN (CDCl₃, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,30 (m, 11H, H₁, H₅); 1,51 (m, 2H, H₆); 1,76 (m, 2H, H₄); 3,09 (m, 2H, H₃); 3,49 (m, 1H, H₇); 3,70 (m, 2H, H₈, H₉); 4,55 (m, 1H, H₂); 6,47 (m, 2H, H₁₃); 6,99 (m, 2H, H₁₁, H₁₂); 7,25 (m, 4H, H₁₄); 7,31 (m, 2H, H₁₀).

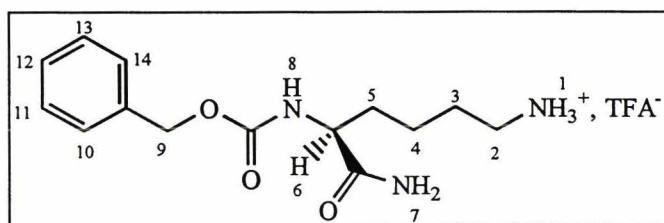
^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ) : 23,22 (CH_2); 28,42 (CH_3); 30,02 (CH_2); 35,61 (CH_2); 40,12 (CH_2); 62,78 (CH); 64,56 (CH_2); 79,89 (Cq); 115,00 (CH); 119,95 (Cq); 121,52 (CH), 132,31 (CH), 132,67 (CH); 133,74 (CH); 133,87 (CH); 161,06 (CH); 164,54 (CH); 164,86 (Cq).

$[\alpha]_D^{25}$ (c 0,05, DMSO) : - 49.

Analyse élémentaire : $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{MnCl}$ Calculée : C, 56,87; H, 5,92; N, 7,96.

Trouvée : C, 56,75; H, 6,00; N, 7,91.

Sel trifluoroacétique du $\text{N}\alpha$ -Z- $\text{N}\epsilon$ -amino-L-Lysinamide 14.



Dans un ballon de 25 ml, 1 g (2,63 mmoles) de 2 est dissous dans 15 ml de CH_2Cl_2 puis 5 μl (0,04 μmole) d'anisole sont ajoutés. 2 ml (22,82 mmoles) d'acide trifluoroacétique sont alors introduits goutte à goutte à température ambiante. Après 1 heure, le solvant est évaporé et le résidu est dissous dans EtOH puis le solvant est évaporé afin d'éliminer les traces de TFA. Le produit est lavé abondamment à l'éther éthylique et récupéré sous forme de solide blanc hygroscopique.

CCM : $R_f = 0$; éluant MeOH.

Rendement : 100 %, m = 1,02 g.

IR (KBr, cm^{-1}) : 3200 (NH_3^+); 2950 (CH_2 , CH_3); 1660 (CONH_2).

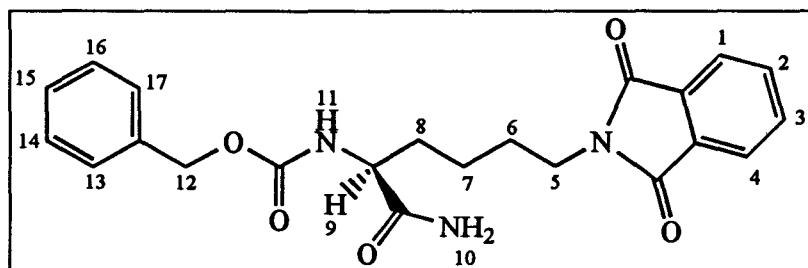
PF : 97 - 99 °C.

SM FAB⁺ : $(\text{M})^+ = 393$ non détecté ; $(\text{M} - \text{TFA})^+ = 280$.

^1H RMN (DMSO d_6 , δ ppm, J Hz, TMS) : 1,29 (m, 2H, H_4); 1,51 (m, 4H, H_3 , H_5); 2,75 (m, 2H, H_2); 3,87 (m, 1H, H_6); 5,01 (s, 2H, H_9); 5,90 (m, 2H, H_7); 7,01 (m, 1H, H_8); 7,33 (m, 5H, H_{10} , H_{11} , H_{12} , H_{13} , H_{14}); 7,74 (m, 3H, H_1).

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO d_6 , δ) : 22,44 (CH_2); 26,60 (CH_2); 31,24 (CH_2); 34,58 (CH_2); 38,62 (CH_2); 54,31 (CH_2); 66,37 (CH); 127,69 (CH); 128,32 (CH); 137,02 (Cq); 155,97 (Cq); 173,86 (Cq).

α -Z-N ϵ -(phtalyl)-L-Lysinamide 15.



Dans un ballon de 100 ml, 2,25 g (5,72 mmoles) de 14 sont dissous dans 10 ml de tétrahydrofurane sec. 0,85 ml (6,08 mmoles) de triéthylamine est alors ajouté au mélange à température ambiante puis 1,43 (6,52 mmoles) de N-carboxyéthylphthalimide. Le mélange réactionnel est porté au reflux pendant 2 jours. Le solvant est distillé sous pression réduite et le résidu repris par 200 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est successivement lavée par 100 ml de carbonate de sodium 10 % puis par 2 x 100 ml d'acide chlorhydrique 1 N et enfin par 200 ml d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium puis filtrée et enfin l'acétate d'éthyle est évaporé sous pression réduite. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc.

CCM : Rf = 0.75; éluant MeOH 10 / CHCl₂ 90.

Rendement : 82 %, m = 1,92 g.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3380 - 3300 (NHCO); 3200 (NH₂); 2935 (CH₂, CH₃); 1770 (CO); 1655 (CONH₂).

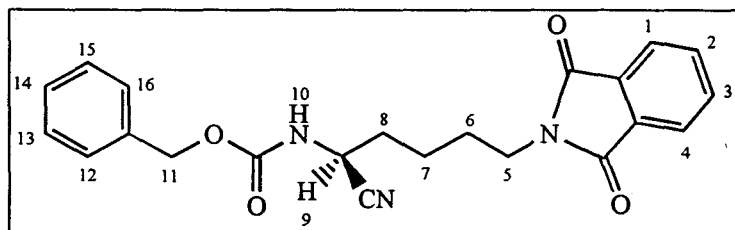
PF : 150 - 152 °C.

SM VISION⁺ : (M + 1)⁺ = 410 ; (M + Na)⁺ = 432 ; (M + K)⁺ = 448.

¹H RMN (DMSO d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,31 (m, 2H, H₆); 1,60 (m, 4H, H₇, H₈); 3,65 (m, 2H, H₅); 4,11 (m, 1H, H₉); 5,04 (s, 2H, H₁₂); 5,85 (m, 2H, H₁₀); 6,33 (m, 1H, H₁₁); 7,31 (s, 5H, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₁₇); 7,68 (m, 2H, H₂, H₃), 7,83 (m, H₁, H₄)/

¹³C RMN (75 MHz, DMSO d₆, δ) : 22,41 (CH₂); 27,93 (CH₂); 31,60 (CH₂); 37,13 (CH₂); 54,31 (CH₂); 66,07 (CH); 123,24 (CH); 128,52 (CH); 128,01 (CH); 132,02 (Cq); 133,97 (CH); 138,17 (Cq); 168,54 (Cq).

(S)-1-cyano-N¹-(benzyloxycarbonyl)-N⁵-(phthalyl)-1,5-diaminopentane 16.



Sous argon, dans un ballon de 50 ml, 0,75 g (1,83 mmoles) de 15 est dissous dans 20 ml de DMF distillé sur LiAlH₄ et 0,6 ml (3,9 mmoles) de triéthylamine. Le mélange est refroidi par un bain de glace et 0,55 ml (3,9 mmoles) d'anhydride trifluoroacétique est ajouté goutte à goutte. La réaction est agitée 1 heure à 0 °C puis 12 heures à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau. Après évaporation des solvants, le résidu est dissous dans 150 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée par 2 x 50 ml d'une solution d'acide chlorhydrique décimolaire puis par 100 ml d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée, puis le solvant est distillé sous pression réduite. Le nitrile est récupéré sous forme de cristaux blancs.

CCM : R_f = 0,84; éluant CHCl₃ 90 : MeOH 10.

Rendement : 74 %, m = 0,53 g.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3370 (NHCO); 2965 (CH₃); 1715 (CO); 1540 (NHCO).

PF : 54 - 55 °C.

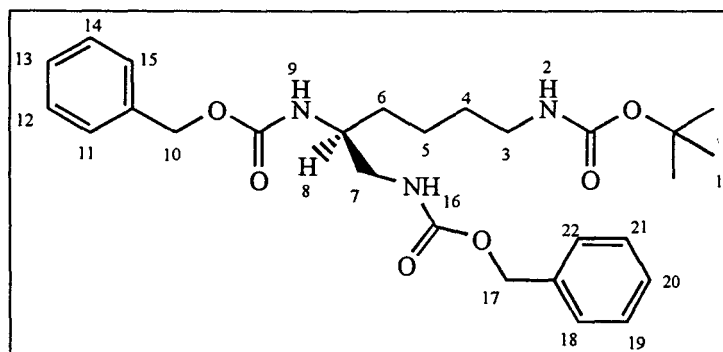
SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 392.

¹H RMN (CDCl₃, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,50 (m, 2H, H₇); 1,75 (m, 2H, H₆); 1,90 (m, 2H, H₈); 3,68 (m, 2H, H₅); 4,60 (m, 1H, H₉); 5,12 (s, 2H, H₁₁); 5,22 (m, 1H, H₁₀); 7,32 (s, 5H, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₆); 7,68 (m, 2H, H₂, H₃); 7,82 (m, 2H, H₁, H₄).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃, δ) : 22,32 (CH₂); 27,63 (CH₂); 32,36 (CH₂); 37,01 (CH₂); 42,56 (CH); 67,59 (CH₂); 118,63 (CH); 123,30 (CH); 128,22 (CH); 128,40 (CH); 128,54 (CH); 131,92 (Cq); 134,05 (CH); 135,66 (Cq); 155,28 (Cq); 168,50 (Cq).

[α]_D²⁵ (c 4, MeOH) : - 27.

(S)-N¹, N²-bis(benzyloxycarbonyl)-N⁶-(*ter*butyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane 19.



Dans un ballon de 50 ml, 0,80 g (2,19 mmoles) de 4 est dissous dans 10 ml de méthanol. A température ambiante, 0,36 ml (4,38 mmoles) de triéthylamine est ajoutée. Sous forte agitation, à 0 °C, 0,44 g (4,38 mmoles) de chloroformiate de benzyle est ajouté. Le mélange réactionnel est laissé revenir à température ambiante et est agité pendant 12 heures. Le solvant est distillé sous pression réduite puis le résidu repris dans 100 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est alors lavée successivement par 2 x 100 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N puis par 2 x 100 ml de solution de carbonate de sodium 1 N et enfin par 2 x 100 ml d'eau. La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium puis filtrée et distillée sous pression réduite. Le produit est un solide blanc.

CCM : R_f = 0,68; éluant CHCl₃ 90 : MeOH 10.

Rendement : 93 %, m = 1,01 g.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3370 (NHCO); 2965 (CH₃, CH₂); 1715 (CO); 1540 (NHCO).

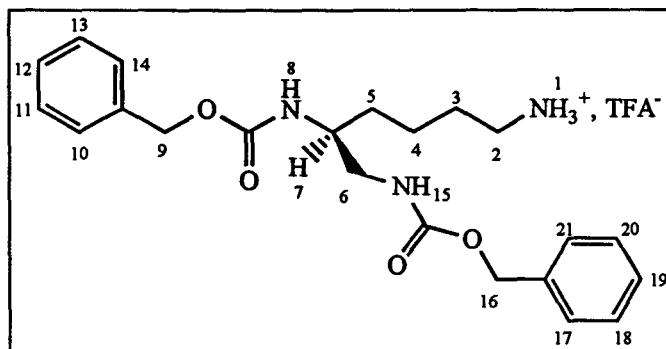
PF : 69-72 °C.

SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 500.

¹H RMN (CDCl₃, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,33-1,44 (m, 15H, H₁, H₄, H₅, H₆); 3,05 (m, 2H, H₃); 3,77 (m, 2H, H₇); 4,30 (m, 1H, H₈); 4,66 (s, 2H, H₁₇); 5,12 (s, 2H, H₁₀); 5,22 (m, 1H, H₉); 5,58 (m, 1H, H₁₆); 7,36 (m, 10H, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₅, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁, H₂₂).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃, δ) : 20,19 (CH₂); 30,68 (CH₃); 32,45 (CH₂); 36,66 (CH₂); 43,33 (CH₂); 54,67 (CH₂); 55,93 (CH₂); 60,71 (CH); 117,95 (CH); 118,42 (CH); 118,95 (CH); 119,26 (CH); 119,41 (CH); 119,63 (CH); 132,10 (C_q); 140,22 (C_q); 159,36 (C_q); 170,18 (C_q).

(S)-N¹, N²-bis(benzyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane 20.



Dans un ballon de 25 ml, 200 mg (0,4 mmoles) de 18 sont dissous dans 10 ml de CH₂Cl₂ puis 2 µl (0,01 µmole) d'anisole sont ajoutés. L'introduction de 1 ml (10,37 mmoles) d'acide trifluoroacétique à température ambiante fait virer la solution au vert clair. Après 45 minutes, le solvant est évaporé et le résidu est dissous dans EtOH puis le solvant est évaporé afin d'éliminer les traces de TFA. Le produit est lavé abondamment à l'éther éthylique et récupéré sous forme de solide blanc.

CCM : R_f = 0; éluant MeOH.

Rendement : 92 %, m = 0,19 g.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3300 (NH₃⁺); 2975 (CH₃, CH₂); 1710 (CO); 1545 (NHCO).

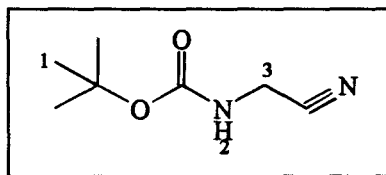
PF : 152-154 °C

SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 514 non détecté; (M - TFA)⁺ = 430.

¹H RMN (DMSO d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,25-1,55 (m, 6H, H₃, H₄, H₅); 2,76 (m, 2H, H₂); 3,12 (m, 1H, H₆); 3,46 (m, 1H, H₇); 5,04 (m, 4H, H₉, H₁₆); 5,81 (m, 1H, H₈); 7,34 (m, 10H, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₃, H₁₄, H₁₇, H₁₈, H₁₉, H₂₀, H₂₁); 7,88 (m, 3H, H₁).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO d₆, δ) : 21,26 (CH₂); 32,25 (CH₂); 33,47 (CH₂); 35,29 (CH₂); 41,34 (CH₂); 56,72 (CH₂); 57,65 (CH₂); 59,71 (CH); 127,48 (CH); 127,60 (CH); 128,04 (CH); 128,21 (CH); 128,33 (CH); 137,17 (Cq); 141,57 (Cq); 161,73 (Cq); 172,51 (Cq).

(terbutyloxycarbonyl)aminoacétonitrile 26.



Dans un bicol de 500 ml, 15 g (96,15 mmoles) de chlorure d'amino acétonitrile 25 sont dissous dans 75 ml de chloroforme. 125 ml de triéthylamine sont alors ajoutés sous agitation, à température ambiante, ainsi qu'une solution de 35,6 g (160 mmoles) d'anhydride de tertibutyloxycarbonyle dissous préalablement dans 75 ml de chloroforme. Le mélange réactionnel est porté 24 heures à reflux. Le précipité est filtré et rincé par 2 x 25 ml de chloroforme. Après évaporation, le solide obtenu est repris dans l'acétate d'éthyle (250 ml). La solution est alors lavée par 2 x 100 ml d'acide chlorhydrique 1 N, puis par 100 ml d'eau. La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium, filtrée, puis évaporée. Une huile jaune est alors obtenue.

CCM : $R_f = 0,75$, éluant EtOH 20 / CH_2Cl_2 80.

Rendement : 93 %, $m = 47,05$ g.

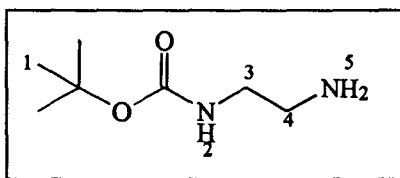
IR (KBr, cm^{-1}) : 3360 (NHCO); 2240 (CN), 1710 (CO du Boc).

SM IE : $(M + 1)^+ = 157$.

^1H RMN (CDCl_3 , δ ppm, J Hz, TMS) : 1,31 (s, 9H, H_1); 3,92 (m, 2H, H_3); 5,81 (s, 1H, H_2).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ) : 28,06 (CH_3); 28,99 (CH_2); 60,34 (CH_2); 70,72 (Cq); 116,86 (Cq); 155,40 (Cq).

N^1 -(terbutyloxycarbonyl)-1,2-diaminoéthane 27.



Dans un bicol de 500 ml, 10,80 g (69,2 mmoles) de 26 sont pesés et dissous dans 150 ml d'éther éthylique fraîchement distillé sur LiAlH_4 . Sous forte agitation, 3,15 g (83 mmoles)

de LiAlH_4 sont introduits à 0 °C par petites portions. Lorsque tout le réactif est introduit, la réaction évolue pendant 3 heures. L'excès de réactif est détruit par l'introduction goutte à goutte d'acétate d'éthyle puis d'eau. Les sels formés sont filtrés et rincés abondamment à l'acétate d'éthyle. Après décantation, séchage de la phase organique sur sulfate de sodium, filtration et évaporation de celle-ci, une huile jaune est obtenue.

CCM : Rf = 0,18, éluant EtOH 20 / CH_2Cl_2 80.

Rendement : 94 %, m = 8,86 g.

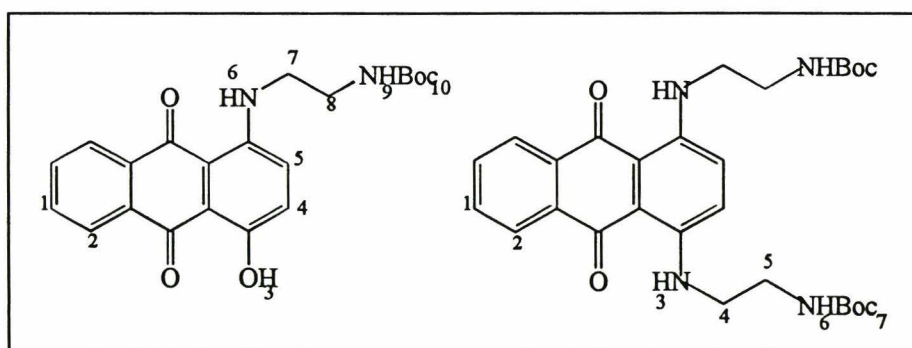
IR (KBr, cm^{-1}) : 3340 (NHCO, NH_2); 1670 (CO du Boc).

SM IE : $(M + 1)^+ = 161$.

^1H RMN (CDCl_3 , δ ppm, J Hz, TMS) : 1,38 (s, 9H, H_1); 1,51 (s, 2H, H_3); 2,73 (m, 2H, H_4); 3,09 (m, 2H, H_3); 5,05 (s, 1H, H_2).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ) : 28,27 (CH_3); 41,63 (CH_2); 43,16 (CH_2); 78,84 (Cq); 156,26 (Cq).

1-[(*ter*butyloxycarbonyl)aminoéthylamino]-4-hydroxy-anthracène-9,10-dione 28 et 1,4-bis[(*ter*butyloxycarbonyl)aminoéthylamino]anthracène-9,10-dione 29.



La manipulation s'effectue sous argon. Dans un bicol de 250 ml, 800 mg (3,5 mmoles) de leucoquinizarine sont pesés et 50 ml de méthanol fraîchement distillé sur Mg / I_2 sont ajoutés pour dissoudre la leucoquinizarine. 5,28 g (33 mmoles) de 27 solubilisés par 30 ml de méthanol sont introduits. La réaction est portée au reflux pendant 4 heures. Après évaporation du solvant, le brut réactionnel est laissé une nuit sous courant d'air. Tous les produits s'oxydent et sont purifiés par chromatographie flash sur gel de silice. L'éluant CH_2Cl_2 90 / AcOEt 10 est utilisé pour récupérer 28 (produit monosubstitué violet Rf = 0,85), puis 29 (produit disubstitué bleu Rf = 0,26). Les produits sont obtenus sous forme solide.

28, CCM : Rf = 0,85; éluant CH₂Cl₂.

28, Rendement : 24 %, m = 0,32 g.

28, PF : 167 - 168 °C.

28, IR (KBr, cm⁻¹) : 3400 (OH, NH); 2990(CH₂); 1710 (CO du Boc), 1620 (CO anthra).

28, SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 383.

28, ¹H RMN (DMSO d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,34 (s, 9H, H₁₀); 3,18 (t, J = 5,9, 2H, H₈); 3,47 (t, J = 6,0, 2H, H₇); 7,04 (s, 2H, H₉); 7,29 (d, J = 9,6, 1H, H₅); 7,32 (d, J = 9,7, 1H, H₄); 7,85 (m, 2H, H₁); 8,20 (m, 2H, H₂); 10,26 (s, 1H, H₆); 10,43 (s, 1H, H₃).

28, ¹³C RMN (75 MHz, DMSO d₆, δ) : 28,18 (CH₃); 39,67 (CH₂); 41,57 (CH₂); 77,80 (Cq); 107,43 (Cq); 112,76 (Cq); 125,17 (CH); 125,82 (CH); 126,14 (CH); 128,45 (CH); 131,74 (Cq); 132,75 (CH), 134,52 (CH); 134,60 (Cq); 147,27 (Cq); 155,80 (Cq); 156,10 (Cq); 180,51 (Cq), 186,56 (Cq).

29, CCM : Rf = 0,26; éluant CH₂Cl₂.

29, Rendement : 55 %, m = 1,02 g.

29, PF : 214 - 216 °C.

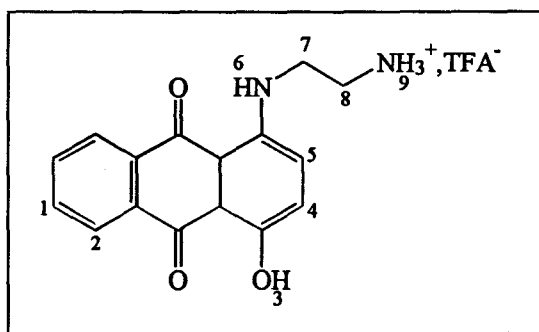
29, IR (KBr, cm⁻¹) : 3400 (NH); 2900(CH₂); 1720 (CO du Boc), 1620 (CO anthra).

29, SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 525.

29, ¹H RMN (DMSO d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,34 (s, 18H, H₈); 3,17 (t, J = 5,8, 4H, H₆); 3,47 (t, J = 5,9, 4H, H₅); 7,03 (s, 2H, H₇); 7,52 (s, 2H, H₃); 7,77 (d, J = 5,8, 2H, H₁); 8,21 (d, J = 5,8, 2H, H₂); 10,84 (s, 2H, H₄).

29, ¹³C RMN (75 MHz, DMSO d₆, δ) : 28,21 (CH₃); 39,78 (CH₂); 41,55 (CH₂); 77,79 (Cq); 108,67 (Cq); 124,34 (CH); 125,63 (CH); 132,29 (CH); 133,83 (CH); 146,03 (Cq); 155,81 (Cq); 180,70 (Cq).

Trifluoroacétate du 1-[(aminoéthyl)amino]-4-hydroxy-anthracène-9,10-dione **30**.



Dans un ballon de 25 ml, 300 mg (0,78 mmole) de 28 sont pesés. Sous agitation et à température ambiante, 2 ml d'acide trifluoroacétique sont ajoutés goutte à goutte. La solution vire au rouge. Après 45 minutes, le solvant est évaporé et le résidu est dissous dans EtOH puis le solvant évaporé afin d'éliminer les traces de TFA. Le produit obtenu est violet.

CCM : Rf = 0; éluant MeOH.

Rendement : 100 %, m = 0,307 g.

PF : 122 - 124 °C.

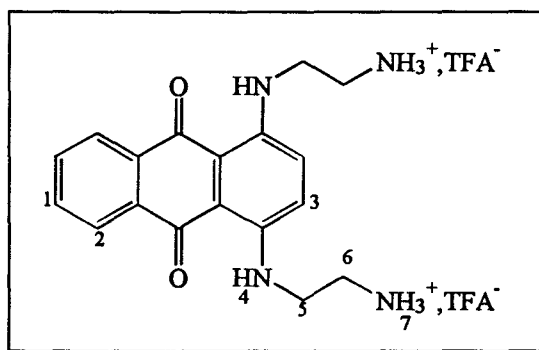
IR (KBr, cm^{-1}) : 3400 (OH, NH_3^+); 2900 (CH_2); 1680 (anthra).

SM FAB⁺ : (M - TFA)⁺ = 283.

¹H RMN (DMSO d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 3,04 (m, 2H, H₈); 3,66 (m, 2H, H₇); 7,30 (d, J = 9,6, 1H, H₅); 7,49 (d, J = 9,7, 1H, H₄); 7,87 (m, 2H, H₁); 8,03 (s, 3H, H₉); 8,22 (d, J = 6,9, 2H, H₂); 10,14 (m, 1H, H₆); 10,56 (s, 1H, H₃).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO d₆, δ) : 38,10 (CH_2); 39,56 (CH_2); 77,80 (Cq); 108,36 (Cq); 113,05 (Cq); 124,99 (CH); 125,99 (CH); 126,29 (CH); 128,54 (CH); 131,83 (Cq); 133,13 (CH); 134,50 (Cq); 134,77 (CH); 146,67 (Cq); 156,09 (Cq); 181,16 (Cq); 186,56 (Cq).

Bistrifluoroacétate du 1,4-bis[(aminoéthyl)amino]anthracène-9,10-dione 31.



Dans un ballon de 25 ml, 900 mg (1,71 mmole) de 29 sont pesés. Sous agitation et à température ambiante, 10 ml d'acide trifluoroacétique sont ajoutés goutte à goutte. La solution vire au rouge. Après 45 minutes, le solvant est évaporé et le résidu est dissous dans EtOH puis le solvant évaporé afin d'éliminer les traces de TFA. Le produit obtenu est bleu.

CCM : Rf = 0; éluant MeOH.

Rendement : 100 %, m = 0,94 g.

PF : 203 - 205 °C.

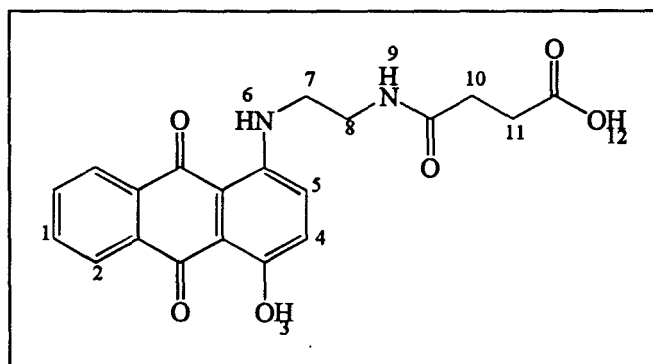
IR (KBr, cm^{-1}) : 3300 (NH_3^+); 2900(CH_2); 1690 (CO anthra).

SM FAB⁺ : (M - 2 x TFA)⁺ = 496.

¹H RMN (DMSO d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 3,08 (m, 4H, H₅); 3,73 (m, 4H, H₆); 7,51 (s, 2H, H₃); 7,83 (d, J = 5,8, 2H, H₁); 8,04 (s, 6H, H₇); 8,24 (d, J = 5,8, 2H, H₂); 10,84 (s, 2H, H₄).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO d₆, δ) : 38,36 (CH_2); 39,58 (CH_2); 109,68 (Cq); 123,99 (CH); 125,77 (CH); 132,75 (CH); 133,68 (Cq); 145,34 (CH); 181,56 (Cq).

1-[(2-(succinylamino))éthylamino]-4-hydroxyanthracène-9,10-dione 32.



Dans un ballon de 25 ml, 150 mg (0,37 mmole) de 30 sont dissous dans 10 ml de diméthylformamide. 1,5 ml de pyridine sont ajoutés sous agitation à température ambiante. 100 mg (0,84 mmole) d'anhydride succinique sont alors introduits dans le mélange. La réaction est chauffée à 100 °C pendant 3 heures. Après avoir évaporé les solvants, l'anhydride et 30 restants sont dissous dans une solution d'acide citrique 10 %, et placés sous agitation pendant 15 minutes. Le résidu solide est filtré puis rincé par 15 ml de méthanol et par 10 ml d'éther éthylique. Le précipité violet est récupéré et séché sous vide.

CCM : R_f = 0,72; éluant MeOH.

Rendement : 51 %, m = 73 g.

PF : 181 - 183 °C.

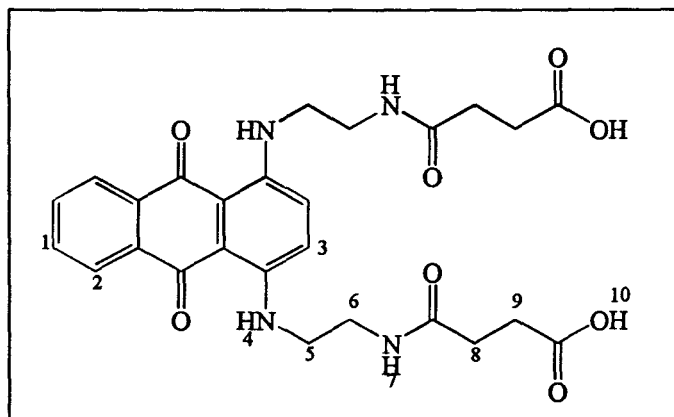
IR (KBr, cm^{-1}) : 3400 (NH, OH); 2900(CH_2); 1740 (CO acide); 1620 (CO anthra); 1560 (NHCO).

SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 383.

^1H RMN (DMSO d_6 , δ ppm, J Hz, TMS) : 2,29 (t, $J = 6,3$, 2H, H_{11}); 2,42 (t, $J = 6,5$, 2H, H_{10}); 3,29 (m, 2H, H_8); 3,49 (m, 2H, H_7); 7,36 (d, $J = 9,6$, 1H, H_5); 7,57 (d, $J = 9,6$, 1H, H_4); 7,90 (m, 2H, H_1); 8,15 (s, 1H, H_9); 8,25 (d, $J = 7,1$, 2H, H_2); 10,30 (s, 1H, H_3); 12,10 (s, 1H, H_{12});.

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO d_6 , δ) : 29,07 (CH_2); 29,97 (CH_2); 38,58 (CH_2); 41,33 (CH_2); 107,62 (Cq); 112,91 (Cq); 125,46 (CH); 125,99 (CH); 126,33 (CH), 128,72 (Cq); 131,89 (Cq); 132,98 (CH); 134,73 (CH); 147,39 (Cq); 156,18 (Cq); 171,58 (Cq); 173,81 (Cq); 180,81 (Cq); 186,79 (Cq).

1,4-bis-[(2-(succinylamino))éthylamino]anthracène-9,10-dione 33.



Dans un ballon de 100 ml, 960 mg (1,73 mmole) de 31 sont dissous dans 15 ml de diméthylformamide. 10 ml de pyridine sont ajoutés sous agitation à température ambiante. 730 mg (6,18 mmole) d'anhydride succinique sont alors introduits dans le mélange. Celui-ci est chauffé à 100 °C pendant 3 heures. Après avoir évaporé les solvants, l'anhydride et 31 restants sont dissous dans 80 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 1 N et placés sous agitation pendant 15 minutes. Le résidu solide est filtré puis rincé par 50 ml d'acétate d'éthyle et par 50 ml d'éther éthylique. Le précipité bleu est récupéré et séché.

CCM : $R_f = 0,83$; éluant MeOH.

Rendement : 94 %, $m = 0,86$ g.

PF : 179 - 180 °C.

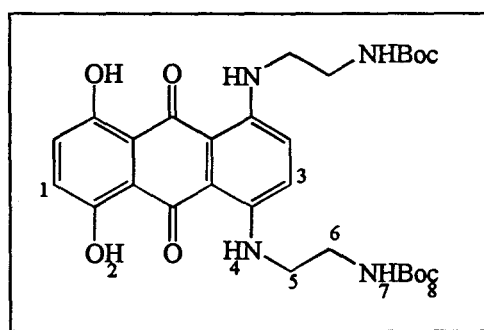
IR (KBr, cm^{-1}) : 3400 (NH, OH); 2900 (CH_2); 1715 (CO acide); 1640 (CO anthra); 1560 (CO amide).

SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 525.

¹H RMN (DMSO d6, δ ppm, J Hz, TMS) : 2,33 (t, J = 6,9, 4H, H₉); 2,43 (t, J = 7,4, 4H, H₈); 3,25 (t, J = 5,6, 4H, H₅); 3,49 (t, J = 5,6, 4H, H₆); 7,55 (s, 2H, H₃); 7,77 (d, J = 5,8, 2H, H₁); 8,15 (m, 2H, H₇); 8,22 (d, J = 5,8, 2H, H₂); 10,80 (s, 2H, H₄).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO d6, δ) : 29,09 (CH₂); 29,98 (CH₂); 38,77 (CH₂); 41,27 (CH₂); 108,69 (Cq); 124,41 (CH); 125,67 (CH); 132,31 (CH); 133,81 (Cq); 145,98 (Cq); 171,57 (Cq); 173,83 (Cq); 181,13 (Cq).

1,4-bis[(*ter*butyloxycarbonyl)aminoéthylamino]-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione **35**.



La manipulation s'effectue sous argon. Dans un bicol de 250 ml, 940 mg (3,43 mmoles) de 5,8-dihydroxyleucoquinizarine sont pesés et 50 ml de méthanol fraîchement distillé sur Mg / I₂ sont ajoutés pour dissoudre la 5,8-dihydroxyleucoquinizarine. 4,7 g (29,3 mmoles) de **27** solubilisés par 30 ml de méthanol sont introduits. Le mélange réactionnel est porté au reflux pendant 4 heures. Après évaporation du solvant, le brut réactionnel est laissé une nuit sous courant d'air. Le produit s'oxyde et est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (gradient d'éluion CH₂Cl₂ 90 / AcOEt 10 puis CH₂Cl₂ 50 / AcOEt 50). Le produit **35** est obtenu sous forme de solide bleu.

CCM : R_f = 0,35; éluant CH₂Cl₂ 50 / AcOEt 50.

Rendement : 55 %, m = 1,02 g.

PF : 187 - 188 °C.

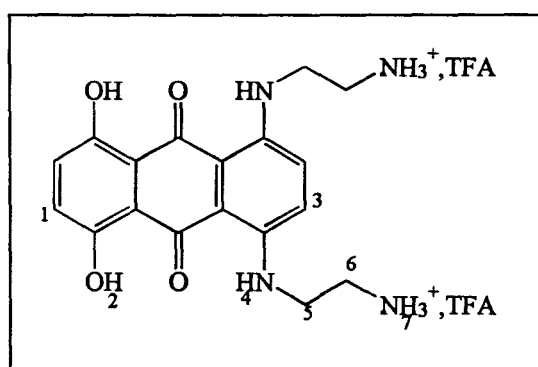
IR (KBr, cm⁻¹) : 3300 (NH, OH); 2950 (CH₂); 1690 (CO du Boc); 1620 (CO anthra).

SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 557.

^1H RMN (DMSO d_6 , δ ppm, J Hz, TMS) : 1,35 (s, 18H, H_8); 3,02 (t, $J = 5,9$, 4H, H_6); 3,54 (t, $J = 5,8$, 4H, H_3); 7,07 (m, 2H, H_7); 7,14 (s, 2H, H_3); 7,58 (s, 2H, H_1); 10,05 (s, 2H, H_4); 10,61 (s, 2H, H_2).

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO d_6 , δ) : 38,38 (CH_3); 45,54 (CH_2); 47,18 (CH_2); 77,46 (Cq); 83,06 (Cq); 112,61 (Cq); 120,16 (Cq); 129,54 (CH); 130,68 (CH); 152,45 (Cq); 159,78 (Cq); 155,56 (Cq).

Bistrifluoroacétate du 1,4-bis[(aminoéthyl)amino]-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione
36.



Dans un ballon de 50 ml, 300 mg (0,53 mmole) de **35** sont pesés. Sous agitation et à température ambiante, 10 ml d'acide trifluoroacétique sont ajoutés goutte à goutte. La solution vire au rouge. Après 45 minutes, le solvant est évaporé et le résidu est dissous dans EtOH puis le solvant évaporé afin d'éliminer les traces de TFA. Le produit obtenu est bleu.

CCM : $R_f = 0$; éluant MeOH.

Rendement : 100 %, $m = 0,31$ g.

PF : > 350 °C.

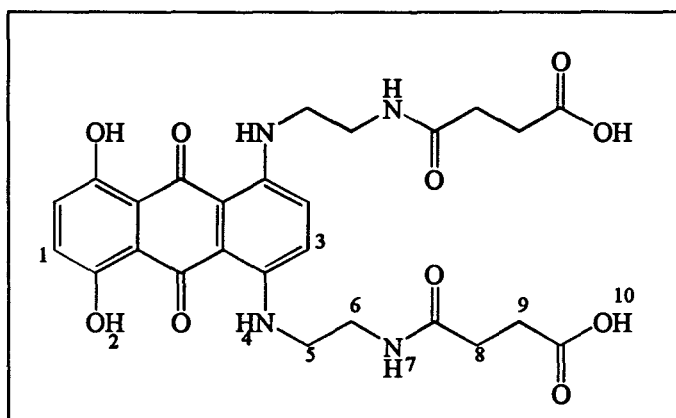
IR (KBr, cm^{-1}) : 3400 (NH_3^+ , OH); 2900 (CH_2); 1680 (CO anthra).

SM FAB $^+$: $(M - 2 \times \text{TFA})^{2+} = 342$

^1H RMN (DMSO d_6 , δ ppm, J Hz, TMS) : 3,07 (m, 4H, H_3); 3,75 (m, 4H, H_6); 7,20 (s, 2H, H_3); 7,55 (s, 2H, H_1); 8,01 (s, 6H, H_7); 10,42 (s, 2H, H_4); 10,59 (s, 2H, H_2).

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO d_6 , δ) : 38,26 (CH_2); 39,75 (CH_2); 108,43 (Cq); 114,55 (Cq); 124,73 (CH); 124,95 (CH); 146,34 (Cq); 154,76 (CH); 184,23 (Cq).

1,4-bis-[(2-(succinylamino))éthylamino]-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione 37.



Dans un ballon de 100 ml, 860 mg (1,47 mmoles) de 36 sont dissous dans 30 ml de diméthylformamide. 10 ml de pyridine sont ajoutés sous agitation à température ambiante. 500 mg (4,23 mmoles) d'anhydride succinique sont alors introduits dans le mélange. Celui-ci est chauffé à 100 °C pendant 2 heures. Après avoir évaporé les solvants, l'anhydride et 36 restants sont dissous dans 80 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 1 N et placés sous agitation pendant 15 minutes. Le résidu solide est filtré puis rincé par 50 ml d'acétate d'éthyle et par 50 ml d'éther éthylique. Le précipité bleu est récupéré et séché sous vide.

CCM : $R_f = 0,90$; éluant MeOH.

Rendement : 80 %, $m = 0,65$ g.

PF : 241 - 243 °C.

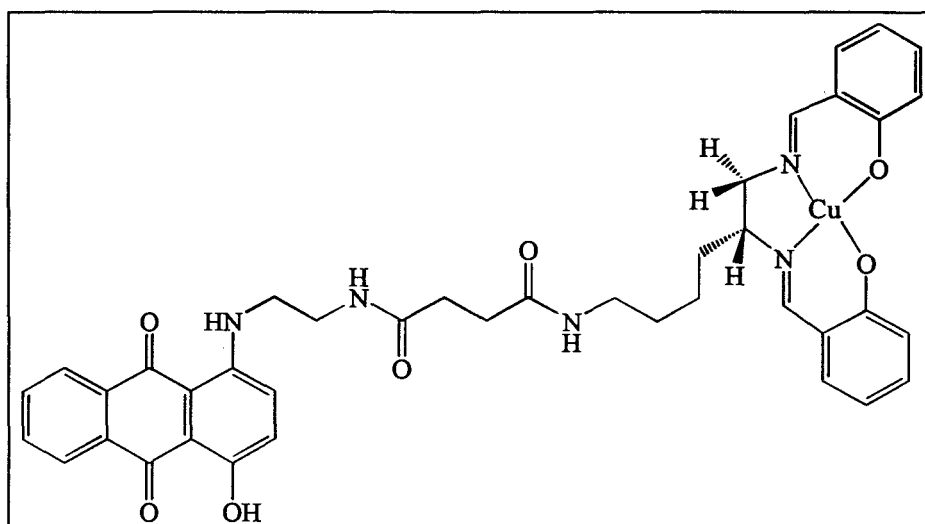
IR (KBr, cm^{-1}) : 3400 (NH, OH); 2900 (CH_2); 1700 (CO acide); 1640 (CO anthra); 1560 (CO amide).

SM FAB⁺ : $(M + 1)^+ = 557$.

¹H RMN (DMSO d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 2,32 (t, $J = 6,3$, 4H, H₉); 2,42 (t, $J = 6,0$, 4H, H₈); 3,30 (t, $J = 5,8$, 4H, H₆); 3,53 (t, $J = 5,9$, 4H, H₅); 7,12 (s, 2H, H₃); 7,59 (s, 2H, H₂); 8,16 (m, 2H, H₇); 10,54 (s, 4H, H₂, H₄).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO d₆, δ) : 29,07 (CH_2); 29,98 (CH_2); 43,82 (CH_2); 46,74 (CH_2); 107,34 (Cq); 114,79 (Cq); 124,09 (CH); 124,92 (CH); 146,85 (Cq); 154,52 (Cq); 171,64 (Cq); 173,82 (Cq); 183,19 (Cq).

Complexe de cuivre (II) du (S)-1-{{1-[4-((N, N'-bissalicylidènamino)éthyl)aminobutyl]succinyl}aminoéthyl}amino}-4-hydroxyanthracène-9,10-dione 38.



Dans un ballon de 10 ml, sous agitation à 0 °C, 21,4 mg (55,87 µmoles) de 32, 20 mg (96,94 µmoles) de dicyclocarbodiimine et 11,8 mg (87,32 µmoles) de N-hydroxybenzotriazole sont dissous dans 1,5 ml de diméthylformamide. La réaction est agitée à 0 °C pendant 2 heures. Une solution de 37,46 mg (72,8 µmoles) de 9 dissous dans 500 µl de diméthylformamide et de 12,1 µl (86,82 µmoles) de triéthylamine est ajoutée. La réaction évolue à 0 °C pendant 1 heure puis à température ambiante pendant 4 jours. Le solvant est évaporé et le brut réactionnel lavé successivement par 2 x 10 ml de chloroforme, 25 ml d'acide citrique à 10 %, 2 x 10 ml de méthanol. Un lavage par 3 x 5 ml d'éther éthylique provoque la cristallisation du produit sous forme de solide brun.

CCM : R_f = 0,1; éluant MeOH.

Rendement : 78 %, m = 33,4 mg.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3400 (NH, OH, phénolate); 2920 (CH, CH₂); 1630 (CO anthra); 1625 (imine); 1560 (NHCO).

PF : 138 - 140 °C.

SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 766.

UV (10⁻⁵ M, nm) : 562; 362; 257; 241.

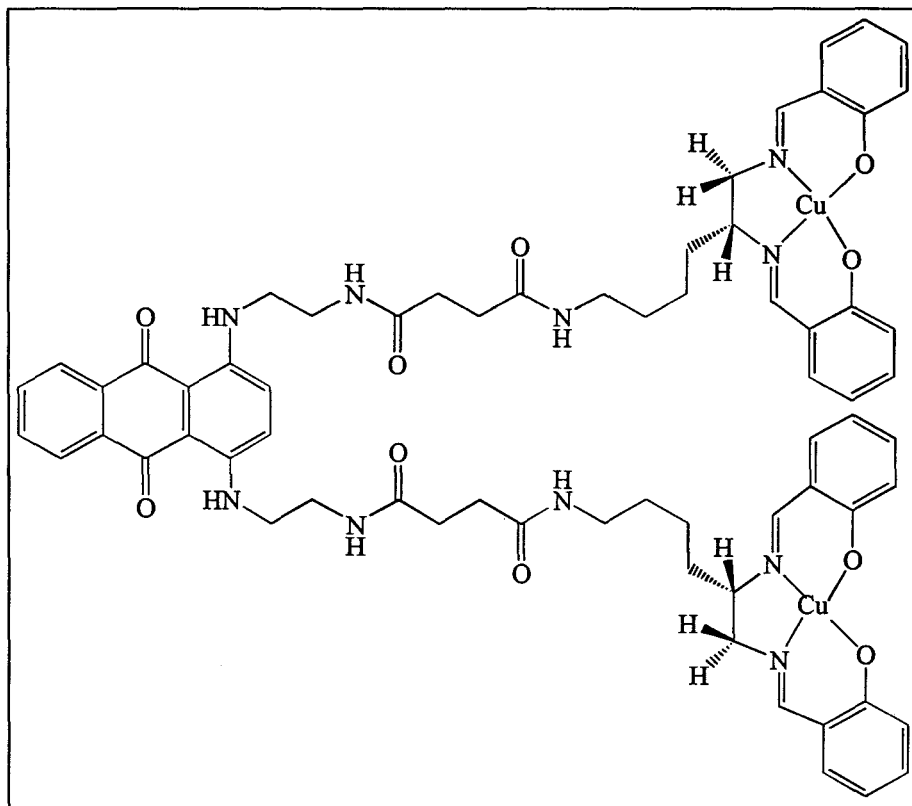
RPE (DMSO) : A_g = 192 G; g_g = 2,23.

Analyse élémentaire : $C_{40}H_{39}N_5O_7Cu$

Calculée : C, 62,77; H, 5,13; N, 9,15.

Trouvée : C, 62,65; H, 5,08; N, 9,11.

Bicomplexe de cuivre (II) du (S,S)-1,4-bis{[1-[4-((N, N'-bissalicylidèneamino)éthyl)amino]butyl]succinyl]aminoéthyl]amino}anthracène-9,10-dione 39.



Dans un ballon de 10 ml, sous agitation à 0 °C, 20 mg (38,16 μ moles) de 33, 17,3 mg (83,84 μ moles) de dicyclocarbodiimine et 11,34 mg (83,91 μ moles) de N-hydroxybenzotriazole sont dissous dans 2 ml de diméthylformamide. La réaction est agitée à 0 °C pendant 2 heures. Une solution de 41,19 mg (80,05 μ moles) de 9 dissous dans 1 ml de diméthylformamide et de 11,53 μ l (82,73 μ moles) de triéthylamine est ajoutée. La réaction évolue à 0 °C pendant 1 heure puis à température ambiante pendant 4 jours. Le solvant est évaporé et le brut réactionnel lavé successivement par 2 x 10 ml de chloroforme, 25 ml d'acide citrique à 10 %, 2 x 10 ml de méthanol. Un lavage par 3 x 5 ml d'éther éthylique provoque la cristallisation du produit sous forme de solide noir.

CCM : $R_f = 0$; éluant MeOH.

Rendement : 37 %, m = 18 mg.

IR (KBr, cm^{-1}) : 3400 (NH, OH, phénolate); 2920 (CH, CH_2); 1630 (CO anthra); 1630 (imine); 1540 (NHCO).

F : 174 - 176 °C.

SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 1290.

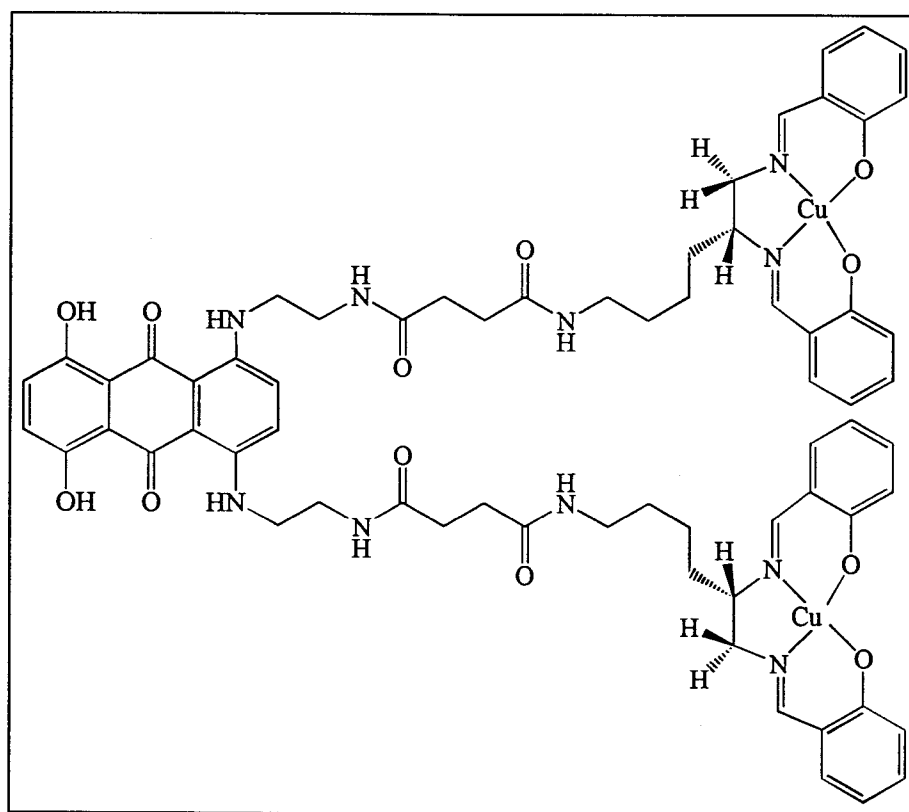
UV (10^{-5} M, nm) : 640; 596; 362; 258; 240.

RPE (DMSO) : $A_{\nu} = 194$ G; $g_{\nu} = 2,22$.

Analyse élémentaire : $\text{C}_{66}\text{H}_{70}\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{Cu}_2$ Calculée : C, 61,43; H, 5,46; N, 10,85.

Trouvée : C, 61,25; H, 5,42; N, 10,82.

Bicomplexe de cuivre (II) du (S,S)-1,4-bis{[1-[4-((N, N'-bissalicylidènamino)éthyl)amino butyl]succinyl]aminoéthyl]amino}-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione 40.



Dans un ballon de 10 ml, sous agitation à 0 °C, 21,1 mg (37,88 μmoles) de 37, 24,9 mg (120,68 μmoles) de dicyclocarbodiimine et 15,4 mg (113,96 μmoles) de N-hydroxybenzotriazole sont dissous dans 1,5 ml de diméthylformamide. La réaction est est

agitée à 0 °C pendant 2 heures. Une solution de 45,6 mg (88,63 µmoles) de **9** dissous dans 0,5 ml de diméthylformamide et de 22 µl (79,78 µmoles) de triéthylamine est ajoutée. La réaction évolue à 0 °C pendant 1 heure puis à température ambiante pendant 4 jours. Le solvant est évaporé et le brut réactionnel lavé successivement par 2 x 10 ml de chloroforme, 25 ml d'acide citrique à 10 %, 2 x 10 ml de méthanol. Un lavage par 3 x 5 ml d'éther éthylique provoque la cristallisation du produit sous forme de solide noir.

CCM : Rf = 0; éluant MeOH.

Rendement : 56 %, m = 28 mg.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3400 (NH, OH, phénolate); 2920 (CH, CH₂); 1630 (CO anthra); 1625 (imine); 1560 (NHCO).

PF : 190 - 192 °C.

SM FAB⁺ : (M + 1)⁺ = 1322.

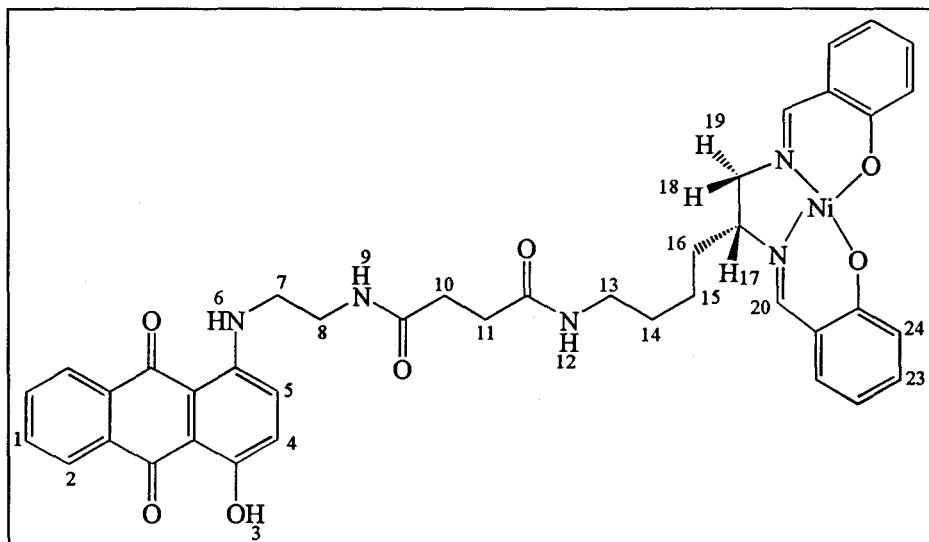
UV (10⁻⁵ M, nm) : 679; 626; 364; 287.

RPE (DMSO) : A_w = 197,5 G; g_w = 2,22.

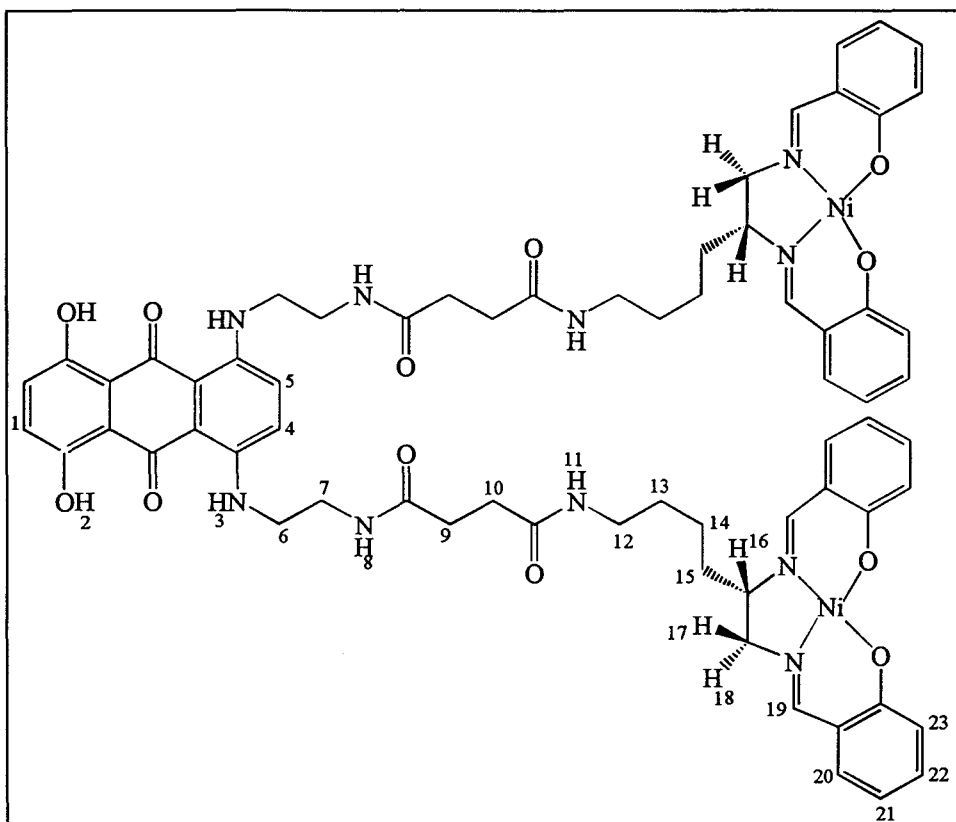
Analyse élémentaire : C₆₆H₇₀N₁₀O₁₂Cu₂ Calculée : C, 59,94; H, 5,33; N, 10,59.

Trouvée : C, 59,83; H, 5,32; N, 10,62.

Complexe de Nickel (II) du (S)-1-[[1-[4-((N, N'-bissalicylidènamino)éthyl)aminobutyl]succinyl]aminoéthyl]amino}-4-hydroxyanthracène-9,10-dione **41.**



Bicomplexe de Nickel (II) du (S,S)-1,4-bis{[1-[4-((N, N'-bissalicylidènamino)éthyl)amino butyl]succinyl]aminoéthyl]amino}-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione 43.

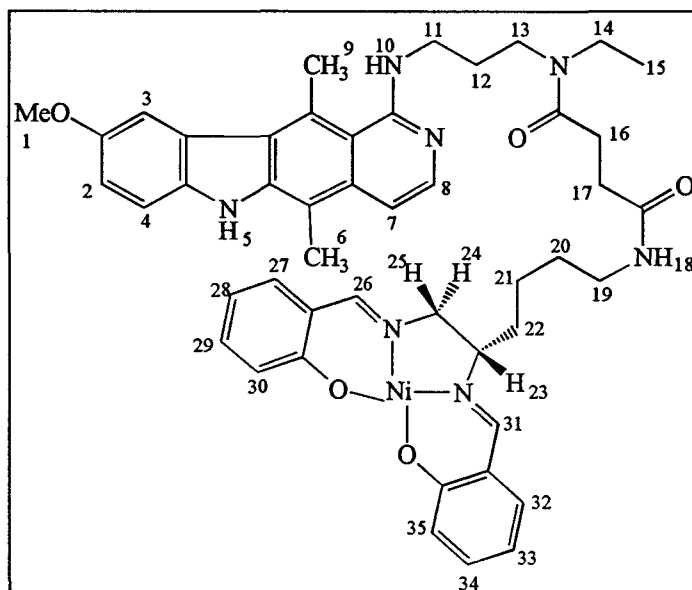


Dans un ballon de 10 ml, sous agitation à 0 °C, 25,5 mg (45,78 µmoles) de 37, 31,05 mg (150,5 µmoles) de dicyclocarbodiimine et 21,5 mg (159,14 µmoles) de N-hydroxybenzotriazole sont dissous dans 1,5 ml de diméthylformamide. La réaction est agitée à 0 °C pendant 2 heures. Une solution de 63,1 mg (123,96 µmoles) de 10 dissous dans 0,5 ml de diméthylformamide et de 22 µl (153,82 µmoles) de triéthylamine est ajoutée. La réaction évolue à 0 °C pendant 1 heure puis à température ambiante pendant 4 jours. Le solvant est évaporé et le brut réactionnel lavé successivement par 2 x 10 ml de chloroforme, 25 ml d'acide citrique à 10 %, 2 x 10 ml de méthanol. Un lavage par 3 x 5 ml d'éther éthylique provoque la cristallisation du produit sous forme de solide vert.

CCM : Rf = 0; éluant MeOH.

Rendement : 56 %, m = 33 mg.

Complexe de nickel (II) du (S) 1-{{3,3-éthylamino[[4-((N,N'-bissalicylidèneamino)éthyl)aminobutyl]aminosuccinyl]propyl]amino}-9-méthoxy-5,11-diméthyl-6H-pyrido [4,3-b]carbazole 46.



Dans un ballon de 10 ml, sous agitation à 0 °C, 28,6 mg (60,0 µmoles) de 44, 20 mg (96,93 µmoles) de dicyclocarbodiimine et 20 mg (147,98 µmoles) de N-hydroxybenzotriazole sont dissous dans 1,5 ml de diméthylformamide. La réaction est agitée à 0 °C pendant 2 heures. Une solution de 32,0 mg (62,85 µmoles) de 10 dissous dans 1 ml de diméthylformamide et de 9,03 µl (73,95 µmoles) de triéthylamine sont ajoutés. La réaction évolue à 0 °C pendant 1 heure puis à température ambiante pendant 4 jours. Le solvant est évaporé et le brut réactionnel lavé successivement par 25 ml d'acide citrique à 10 %, 2 x 10 ml de bicarbonate de sodium 1 N et enfin 2 x 20 ml d'eau. Le produit est dissous dans un minimum de mélange méthanol /dichlorométhane (10 / 90) et la solution est séchée sur sulfate de sodium puis filtrée. Après évaporation des solvants sous pression réduite, le produit attendu est récupéré sous forme de solide brun.

CCM : 0,00; éluant MeOH 10/ CH₂Cl₂ 90.

Rendement : 50 %, m = 25 mg.

IR (KBr, cm⁻¹) : 3400 (CONH); 2940 (CH₂, CH₃); 1720 (CONH); 1680 (CONH); 1630 (imine).

PF : 162-163 °C

SM Désorption laser⁺ : $(M + 1)^+ = 854,7$; $(M + Na)^+ = 876,7$; $(M + K)^+ = 892,6$.

¹H RMN (D₂O, δ ppm, J Hz, TMS) : 1,01-1,21 (m, 7H, H₁₅, H₂₁, H₂₂); 1,58-1,73 (m, 4H, H₁₂, H₂₀); 2,50-2,67 (m, 11H, H₆, H₁₃, H₁₄, H₁₆, H₁₇); 3,16-3,64 (m, 10H, H₉, H₁₁, H₁₉, H₂₃, H₂₄, H₂₅); 3,88 (s, 3H, H₁); 5,57 (m, 1H, H₁₈); 6,51 (m, 3H, H₁₀, H₂₉, H₃₄); 6,68 (m, 2H, H₂₇, H₃₂); 7,18-7,29 (m, 6H, H₇, H₂, H₂₈, H₃₀, H₃₃, H₃₅); 7,48 (m, 1H, H₃); 7,78-7,97 (m, 4H, H₄, H₈, H₂₆, H₃₁); 11,36 (m, 1H, H₅).

¹³C RMN (75 MHz, D₂O, δ) : 13,56 (CH₂); 14,75 (CH₂); 20,80 (CH₃); 25,32 (CH₂); 36,12 (CH₂); 28,16 (CH₂); 34,18 (CH₂); 35,69 (CH₂); 40,56 (CH₂); 44,33 (CH₂); 48,31 (CH₂); 49,46 (CH₂); 55,80 (CH₃); 56,65 (CH₃); 62,79 (CH₂); 65,81 (CH); 90,43 (CH); 105,83 (CH); 107,99 (CH); 112,36 (CH); 115,19 (CH); 120,66 (CH); 125,33 (CH); 133,63 (CH); 134,43 (CH); 163,05 (CH); 163,91 (CH).

Analyse élémentaire : C₄₇H₅₃N₇O₅Ni

Calculée : C, 66,09; H, 6,26; N, 11,49.

Trouvée : C, 66,19; H, 6,16; N, 11,41.

BIBLIOGRAPHIE

1. WARING M. J., DNA modification and cancer, *Annu. Rev. Biochem.*, **1981**, 50, 159-166.
2. WAKELIN L. P. G., WARING M. J., DNA intercalating agents, *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Sammes P. G. Pergamon Press Oxford, **1990**, 2, 703-724.
3. FEIGON J., DENNY W. A., LEUPIN W., KEARNS D. R., Interactions of antitumor drugs with natural DNA: ¹H NMR study of binding mode and kinetics, *J. Med. Chem.*, **1984**, 27, 450-459.
4. BAILLY C., WARING M. J., Preferential intercalation at AT sequence in DNA by lucanthone, hycanthone and indazole analogs. A footprinting study, *Biochemistry*, **1993**, 32, 5985-5993.
5. BAILLY C., WARING M. J., Footprinting studies on the sequence-selective binding of tilorone to DNA, *Antiviral Chem. Chemother.*, **1993**, 4, 113-122.
6. BAILLY C., DENNY W. A., MELLOR L., WAKELIN L. P. G., WARING M. J., Sequence-specificity of the binding of 9-aminoacridine and amsacrine-4-carboxamides to DNA studied by DNAase I footprinting, *Biochemistry*, **1992**, 31, 3514-3522.
7. BAILLY C., HENICHART J. P., COLSON P., HOUSSEIER C., Drug-DNA sequence dependant interactions analysed by electric linear dichroism, *J. Mol. Recognit.*, **1992**, 5, 155-171.
8. WATSON J. D., CRICK S. H. C., Molecular structure of nucleic acids. Structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, **1953**, 171, 737-738.
9. ALLEMAND J. F., BENSIMON A., BENSIMON D., CARON F., CHATENAY D., CLUZEL P. H., CROQUETTE V., HELLER C., LAVERY R., LEBRUN A., STRICK T., VIONY J. L., L'ADN ressort moléculaire, *Pour la science*, **1996**, 76-82.
10. DREW H. R., DICKERSON R. E., Structure of B-DNA dodecamer. III. Geometry of hydration, *J. Mol. Biol.*, **1981**, 151, 5535-5556.
11. DREW H. R., Les doubles hélices d'ADN et les informations génétiques, *Pour la Science*, **1984**, 76, 20-37.
12. LOWN J. W., Design and development of sequence selective lexitropsin DNA minor groove binders, *Drug Development Res.*, **1995**, 34, 145-183.
13. LEE D. K., HORIKOSHI M., ROEDER R. G., Interaction of TFIID in the minor groove of the TATA element, *Cell*, **1991**, 67, 1241-1253.
14. STARR D. B., HAWLEY D. K., TFIID binds in the minor groove of the TATA box, *Cell*, **1991**, 67, 1231-1242.

16. REARDON B. J., WINTERS R. S., GORDON D., WINTERS E., A peptide motif that recognizes A.T. tracts in DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 11327-11332.
17. KING C. Y., WEISS M. A., The SRY high-mobility-group box recognizes DNA by partial intercalation in the minor groove: a topological mechanism of sequence specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 11990-11994.
18. WONG J. M., BATIMAN E., BTP-DNA interactions in the minor groove discriminate between A:T and T:A base pair, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 1890-1896.
19. SIGMAN D. S., MAZUMDER A., PERRIN D. M., Chemical nucleases, *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 2295-2316.
20. PRATVIEL G., BERNADOU J., MEUNIER B., Carbon-hydrogen bonds of DNA sugar units as targets for chemical nucleases and drugs, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, 746-769.
21. UMEZAWA H., MAEDA K., TAHEUCHI T., OKAMI Y., New antibiotics, bleomycin A and B, *J. Antibiot.*, **1966**, 19, 200-209.
22. UMEZAWA H., Advances in bleomycin studies, *Bleomycin chemical biochemical and biological aspects*, Hecht S. M. ed Springer Verlag N. Y., **1979**, 24-36.
23. STUBBE J., KOZARICH J. W., WU W., VANDERWALL D. E., Bleomycins: a structural model for specificity, binding, and double strand cleavage, *Acc. Chem. Res.*, **1996**, 29, 322-330.
24. STUBBE J., KOZARICH J. W., Mechanisms of bleomycin-induced DNA degradation, *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 1107-1136.
25. FUJI A., TAKITA T., MAEDA K., UMEZAWA H., New components of bleomycin, *J. Antibiot.*, **1973**, 26, 396-397.
26. HECHT S.M., The chemistry of activated bleomycin, *Acc. Chem. Res.*, **1986**, 19, 383-391.
27. NATRAJAN A., HECHT S. M., Bleomycins: mechanism of polynucleotide recognition and oxidative degradation, *Molecular Aspects of anticancer Drug-DNA interactions*, Neidle S. And WARING M. J. Eds, Macmillan London, **1994**, 2, 197-242.
28. WU W., VANDERWALL D. E., STUBBE J., TURNER C. J., Interaction of Co-bleomycin A2 (green) with d(CCAGGCCTGG)₂: evidence of intercalation using 2D NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 10843-10844.
29. MANDERVILLE R. A., ELLENA J. F., HECHT S. M., Interaction of Zn(II)-bleomycin with d(CGCTAGCG)₂. A binding model based on NMR experiments and restrained molecular dynamics calculations, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 7891-7903.

30. SAM J. W., TANG X. J., MAGLIOZZO R. S., PEISACH J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 1012-1018.
31. BAILLY C., WARING M. J., The purine 2-amino group as a critical recognition element for specific DNA cleavage by bleomycin and calicheamicin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 7311-7316.
32. KHODA J., SHINOSUKA K., SAWAI H., A novel bleomycin model compound bearing hydrophilic steric factor exhibited high oxygen activating capacity, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 5575-5578.
33. OTSUKA M., MASUDA T., HAUPT A., OHNO M., SHIRAKI T., SUGIURA Y., MAEDA K., Man-designed bleomycin with altered sequence specificity in DNA cleavage, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 838-845.
34. OWA T., HAUPT A., OTSUKA M., KOBAYASHI S., TOMIOKA N., ITAI A., OHNO M., SHIRAKI T., SUGIURA M., MAEDA K., Man-designed bleomycins: significance of the binding sites enzyme models and the stereochemistry of the linker chain. *Tetrahedron*, **1992**, 48, 1193-1208.
35. HUANG L., MORGAN R., LOWN J. W., Design of DNA-cleaving molecules which incorporate a simplified metal-complexing moiety of bleomycin and lexitropsin carriers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, 3, 1751-1753.
36. HUANG L., QUADA J. C., LOWN J. W., Design and synthesis of DNA cleaving bleomycin models: 1,2-trans disubstituted cyclopropane units as novel linkers, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 5323-5328.
37. HUANG L., QUADA J. C., LOWN J. W., Design, synthesis, and sequence selective DNA cleavage of functional models of bleomycins. II. 1,2-trans-disubstituted cyclopropane units as novel linkers, *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, 3, 647-655.
38. (a) LOWN J. W., JOSHUA A., Bleomycin models haemin-acridines which bind to DNA and cause oxygen-dependant scission, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1982**, 1289-1300.
(b) HASHIMOTO Y., IJIMA H., NOZAKI Y., SHUDO K., Functional analogues of bleomycin : DNA cleavage by bleomycin and hemin-intercalators, *Biochemistry*, **1986**, 25, 5103-5110.
(c) DING L., ETEMAD-MOGHADAM G., CROS S., AUCLAIR C., MEUNIER B., Cytotoxic hybrid molecules 'metalloporphyrin-ellipticine' having a high affinity for DNA, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 1711-1713.
39. MEUNIER B., Metalloporphyrins as versatile catalysts for oxydation reactions and oxidative DNA cleavage, *Chem. Rev.*, **1992**, 92, 1411-1456.
40. SENTAGNE C., FERY-FORGUES S., MEUNIER B., PAILLOUS N., Binding characteristics of zinc porphyrin-ellipticine hybrid molecules with DNA, *New J. Chem.*, **1994**, 18, 1253-1262.

41. ANNHEIM-HERBELIN G., PERREE-FAUVET M., GAUDEMER A., HELISSEY P., GIORGI-RENAULT S., Porphyrin-netropsin: a potential ligand of DNA, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 7263-7266.
42. PERREE-FAUVET M., GRESH N., Structure and energetics in the complexes of a double-stranded B-DNA dodecamer with netropsin derivatives of a tricationic water-soluble porphyrin: a theoretical investigation. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1994**, 11, 1203-1209.
43. MORIER-TEISSIER E., BAILLY C., BERNIER J. L., HOUSSIN R., HELBECQUE N., CATTEAU J. P., COLSON P., HOUSSEIER C., HENICHART J. P., 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*, **1989**, 4, 37-52.
44. MORIER-TEISSIER E., BOITTE N., HELBECQUE N., BERNIER J. L., POMMERY N., DUVALET J. L., FOURIER C., HECQUET B., CATTEAU J. P., HENICHART J. P., Synthesis and antitumor properties of an anthraquinone bisubstituted by the copper chelating peptide Gly-Gly-L-His, *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 2084-2090.
45. BAILLY C., SUN J. S., COLSON P., HOUSSEIER C., HELENE C., WARING M. J., HENICHART J. P., Design of sequence-specific DNA cleaving molecule which conjugates a copper-chelating peptide, a netropsin residue, and an acridine chromophore, *Bioconjugate Chem.*, **1992**, 3, 100-103.
46. FOOTER M., EGHOLM M., KRON S., COULL J. M., MATSUDAIRA P., Biochemical evidence that a D-loop is part of a four-stranded PNA-DNA bundle. Nickel-mediated cleavage of duplex DNA by a Gly-Gly-His bis-PNA, *Biochemistry*, **1996**, 35, 10673-10680.
47. SWALLEY E. S., BAIRD E. E., DERVAN P. B., Recognition of a 5'-(A,T)GGG(A,T)₂-3' sequence in the minor groove of DNA by an eight-ring hairpin polyamide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 8198-8206.
48. SCHULTZ P. G., DERVAN P. B., Distamycin and penta-N-methylpyrrole-carboxamide binding sites on native DNA, a comparison of methyldiumpropyl-EDTA-iron (II) footprinting and DNA affinity cleaving, *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **1983**, 1, 1133-1139.
49. TAYLOR J. S., SCHULTZ P. G., DERVAN P. B., DNA affinity cleaving. Sequence specific cleavage of DNA by distamycin-EDTA Fe(II) and EDTA-distamycin Fe(II), *Tetrahedron*, **1984**, 40, 457-465.
50. SCHULTZ P. G., TAYLOR J. S., DERVAN P. B., Design and synthesis of a sequence-specific DNA cleaving molecule. (distamycin-EDTA)iron(II), *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 6861-6863.
51. SCHULTZ P. G., DERVAN P. B., Sequence-specific double-strand cleavage of DNA by bis(EDTA-distamycin Fe^{II}) and EDTA-bis(distamycin) Fe^{II}, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 7748-7750.

52. YOUNGQUIST R. S., DERVAN P. B., A synthetic peptide binds 16 base pairs of A,T double helical DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 7564-7566.
53. YOUNGQUIST R. S., DERVAN P. B., Sequence-specific recognition of B-DNA by bis(EDTA-distamycin)fumaramide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 5528-5533.
54. BARTON J. K., Metal and DNA : molecular left-handed complements, *Science*, **1986**, 233, 727-734.
55. SATYANARAYANA S., DABROWIAK J. C., CHAIRES J. B., Neither Δ - nor Λ -tris(phenantroline)ruthenium(II) binds by classical intercalation, *Biochemistry*, **1992**, 31, 9319-9324.
56. SATYANARAYANA S., DABROWIAK J. C., CHAIRES J. B., Tris(phenantroline) ruthenium(II) enantiomer interactions with DNA: mode and specificity of binding, *Biochemistry*, **1992**, 32, 2573-2584.
57. ERIKSON M., LEIJON M., HIORT C., NORDEN B., GRASLUND A., Minor groove binding of $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ to $[\text{d}(\text{CGCGATCGCG})]_2$ evidenced by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 4933-4934.
58. BARTON J. K., Metals and DNA: molecular left handed complements, *Science*, **1986**, 233, 727-734.
59. SATO K., CHIKIRA M., FUJII Y., KOMATSU A., Stereospecific binding of chemically modified Salen-type Schiff base complexes of copper (II) with DNA [salen = bis(salicylidene)ethylenediamine], *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 625-626.
60. BHATTACHARYA S., MANDAL S. S., Ambient water soluble cobalt-salen complex for DNA cleavage, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 2489-2491.
61. MULLER J. G., ZHENG P., ROKITA S. E., BURROWS C. J., DNA and RNA modification promoted by $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_2$ and KHSO_5 : guanine selectivity, temperature dependence, and mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 2320-2325.
62. MULLER J. G., PAIKOFF S. J., ROKITA S. E., BURROWS C. J., DNA modification promoted by water-soluble nickel (II) salen complexes : a switch to DNA alkylation, *J. Inorg. Biochem.*, **1994**, 54, 199-206.
63. WOODSON S. A., MULLER J. G., BURROWS C. J., ROKITA S. E., A primer assay for modification of guanine by Ni(II) complexes, *Nucleic Acids Research*, **1993**, 21, 5524-5525.
64. GRAVERT D. J., GRIFFIN J. H., Specific DNA cleavage mediated by $[\text{salenMn}(\text{III})]^+$, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 820-822.
65. SIGMAN D. S., Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper ion, *Acc. Chem. Res.*, **1986**, 19, 180-186.

66. SIGMAN D. S., BRUCE T. W., MAZUMDER A., SUTTON C. L., Targeted chemical nucleases, *Acc. Chem. Res.*, **1993**, 26, 98-104.
67. MULLER G. G., CHEN X., DADIZ A. C., ROKITA S. E., BURROWS C. J., Ligands effects associated with the intrinsic selectivity of DNA oxidation promoted by Nickel (II) macrocyclic complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 6407-6411.
68. HOUSSIN R., BERNIER J. L., HENICHART J. P., A convenient and general method for the preparation of *tert*-butyloxycarbonyl aminoalkane nitrile and their conversion to mono *tert*-butyloxycarbonyl alkane diamines, *Synthesis*, **1988**, 3, 259-261.
69. MASUI Y., CHINO N., SAKAKIBARA S., The modification of tryptophyl residues during the acidic cleavage of Boc groups. Studies with Boc tryptophan, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1980**, 53, 464-468.
70. BERGERON D. J., GARLICH J.R., Amines and polyamines from nitriles, *Synthesis*, **1991**, 1, 782-785.
71. HU Y., HU H., Novel selective oxydation of 5-substituted-2-hydroxy-3-hydroxymethyl-benzaldehydes, *Synthesis*, **1991**, 4, 325-326.
72. BOTTCHE A., HELLIAS H., MULLER L., PAULUS H., Oxygen activated nickel (II) tetrahydrosalen complexes with the formation of nickel (II) dihydrosalen complexes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1992**, 31, 623-625.
73. ZHANG W., JACOBSEN E. N., A symmetric olefin epoxydation with sodium hypochlorite catalysed by easily prepared chiral Mn (III) salen complexes, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 2296-2298.
74. HWU J. R., JAIN M. L., TSAY S. C., HAKIMELAHI G. H., Ceric ammonium nitrate in the deprotection of *tert*-butyloxycarbonyl group, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 2035-2038.
75. Mc ARTHUR C. R., WORSTER P. M., OKON A. U., Amino group blocking. Improved method for N-phtaloylation using N-(ethoxycarbonyl)phtalimide, *Synth. Comm.*, **1983**, 13, 311-318.
76. NEFKENS G. H. L., TESSER G. I., NIVARD R. J. F., A simple preparation of phtaloyl amino acids via a mild phtaloylation, *Rec. Trav. Chim. Pays-bas*, **1960**, 79, 688-698.
77. BODANSKY M., ONDETTI M. A., BIRKHIMER C. A., THOMAS P. L., Synthesis of arginine-containing peptides through their ornithine analogs. Synthesis of arginine vasopressin, arginine vasotocin, and L-Histidinyl-L-phenylalanyl-L-arginyl-L-tryptophylglycine, *J. Org. Chem.*, **1964**, 86, 4452-4459.
78. FINKELSTEIN E., ROSEN G. H., RAUCKMAN E. J., Spin-trapping of superoxyde, *Mol. Pharmacol.*, **1979**, 16, 676-685.

79. PEISACH J., BLUMBERG W. E., Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **1974**, 165, 691-708.
80. SCHRAM C. L., WEDLER F. C., *Manganese in metabolism and enzyme function*, Academic press N.Y., **1986**.
81. MEIROVITCA E., LUZ Z., KALB J., Electron spin resonance spectroscopy of single crystals of concanavalin A, *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 96, 7538-7546.
82. BRUNDIG C. W., QUE L., Metal clusters in proteins, *ACS symposium series*, **1988**, 372, 221-237.
83. LYNCH W. B., BOORSE R. S., FREED J. H., A 250 Ghz ESR study of highly distorted Manganese complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 10909-10915.
84. HORI H., IKEDA-SAITO M., YONETANI T., *Biochem. Biophys. Acta.*, **1987**, 912, 74-81.
85. JANZEN E. G., JANDRISITS L. T., SHETTY R. V., LARRY HAIRE D., HILBORN J. W., Synthesis and purification of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide for biological applications, *Chem.-Biol. Interact.*, **1989**, 70, 167-172.
86. HERDERSON L. J., *UV-VIS spectroscopy and its applications*, Springer laboratory, **1992**, 131-164.
87. COTTON F. A., WILKINSON G., *Advanced inorganic chemistry*, Interscience London, **1972**.
88. JOB P., Formation de complexes minéraux en solution, *Ann. Chim.*, **1927**, 113-203.
89. SCHAEPPY Y., TREADWELL W. D., Über die Kolorimetrische Bestimmung des Stöchiometrie einiger Farbcomplexe, *Helv. Chim. Acta.*, **1948**, 7, 577-588.
90. VORSBURGH W. C., COOPER G. R., The identification of complex ions in solution by spectroscopic measurements, *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 437-442.
91. KINGERY W. D., HUME D. N., A spectrophotometric investigation of bismuth thiocyanate complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, 71, 2393-2397.
92. KATZIN L. I., GEBERT E., Spectrophotometric investigation for cobaltous nitrate in organic solvents, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 5455-5463.
93. PIERRE J. L., CHAUTEMS P., REFAIF S., BEGUIN C., MARZOUKI A. E., SERRATRICE G., SAINT-AMANT E., REY P., Imidazolate-bridged dicopper (II) and copper-zinc complexes of a macrobicyclic ligand (Criptand). A possible model for the chemistry of Cu-Zn superoxide dismutase, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 1965-1973.

94. SCHWARZENBACH G., the general selective and specific formation of complexes by metallic cations, *Adv. Inorg. Radiochem.*, 1961, 3, 265-271.
95. HAMMERICH O., PARKER V. D., *Organic electrochemistry*, Hemming Lund, Marcel Dekker inc, New-York, 1991, 121-205.
96. TALLEC A., *Electrochimie organique*, synthèses et mécanismes, Masson, Paris, 1985, 58-74.
97. VAN VEGGEL F. C. J. M., BOS M., HARKEMA S., VAN DE BOVENKAMP H., VERBOOM W., REEDIJK J., REINHOUDT D. N., Macrocyclic trinucleating ligands for cocomplexation of two « soft » (Cu^{2+} , Ni^{2+} , or Zn^{2+}) metal center and one « hard » (Ba^{2+} or Cs^+) metal center, *J. Org. Chem.*, 1991, 56, 225-235.
98. KODAMA M., KIMURA E., Square planar co-ordination of the 12-membered macrocyclic tetraamine ligand 1,4,7,10-tetra-azacyclodecane-2,6-dione, *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, 1981, 694-700.
99. DE C. T. CARRONDO M. A. A. F., DE CASTRO B., COELHO A. M., DOMINGES D., FREIRE C., MORAIS J., Electrochemical and structural studies of nickel (II) complexes with N_2O_2 Schiff bases ligands derived from 2-hydroxy-1-naphtaldehyde. Molecular structure of $\text{N,N}'$ -2,3-diyl-bis(2-hydroxy-1-naphtylideneimine) nickel (II), *Inorg. Chim. Acta.*, 1993, 205, 157-166.
100. DIETRICH-BUCHECKER C., KERN J. M., SAUVAGE J. P., An air-stable d9 nickel (I) catenate : stabilisation of monovalent nickel by interlocked macrocyclic ligands, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1985, 760-785.
101. COLEMAN W. M., COEHRING R. R., TAYLOR L. T., MASON J. G., BOGGESS R. K., Electrochemical studies on a series of manganese (III) complexes containing symmetrical pentadentate ligands, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, 101, 2311-2315.
102. WANG J.C., 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.*, 1974, 89, 783-801.
103. SAUCIER J. M., FESTY B., LE PECQ J. B., The change of the torsion of the DNA helix caused by intercalation. II. Measurement of the relative change of torsion induced by various intercalating drugs. *Biochimie*, 1971, 53, 973-980.
104. REVET B., SCHMIR M., VINOARD J., Direct determination of the superhelix density of closed circular DNA by viscometric titration. *Nature New Biol.*, 1971, 229, 10-13.
105. WARING M. J., HENLEY S. M., Stereochemical aspects of the interaction between steroidal diamines and DNA, *Nucleic Acids Res.*, 1975, 567-586.
106. WARING M. J., BAILLY C., The purine 2-amino group as a critical recognition element for binding of small molecules to DNA, *Gene*, 1994, 149, 69-76.

107. BAILLY C., WARING M. J., Transferring the purine 2-amino group from guanines to adenines in DNA changes the sequence-specific binding of antibiotics, *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, 885-892.
- 108; BAILLY C., WARING M. J., The purine 2-amino group as a critical recognition element for specific DNA cleavage by bleomycin and calicheamicin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 7311-7316.
109. BAILLY C., COLSON P., HENICHART J. P., HOUSSEIER C., The different modes of binding of Hoechst 33258 to DNA studied by electric linear dichroism, *Nucleic acids Res.*, **1993**, 21, 3705-3709.
110. COLSON P., BAILLY C., HOUSSEIER C., Electric linear dichroism as a new tool to study sequence preference in drug binding to DNA, *Biophys. Chem.*, **1996**, 58, 125-140.
111. HOUSSEIER C., Investigating nucleic acids, nucleoproteins, polynucleotids, and their interactions with small ligands by electro-optical systems, *In Molecular Electro-Optics*, Krause S, Ed., Plenum Publishing Corporation, New-York, **1981**, 363-398.
112. BAILLY C., HENICHART J. P., COLSON P., HOUSSEIER C., Drug-DNA sequence-dependent interactions analysed by electric linear dichroism, *J. Mol. Recognit.*, **1992**, 5, 155-171.
113. PORTUGAL J., Footprinting analysis of sequence-specific DNA-drug interactions, *Chem. Biol. Interact.*, **1989**, 71, 311-324.
114. MAXAM A. M., GILBERT W., A new method for sequencing DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1977**, 74, 560-564.
- 115 BAILLY C., WARING J. M., Comparison of different footprinting methodologies for detecting binding sites for a small ligand on DNA, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1995**, 12, 869-898.
116. MANIATIS T., FRITSCH E. F., SAMBROOK J., *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New-York, **1982**.
117. WARING M. J., Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs. evidence for molecular models involving intercalation, *J. Mol. Biol.*, **1970**, 54, 247-279.
118. LYNG R., HÅRD T., NORDEN B., Induced CD of DNA intercalators : electric dipole allowed transitions, *Biopolymers*, **1987**, 26, 1327-1345.
119. LYNG R., RODGER A., NORDEN B., The CD of ligand-DNA systems I. poly(dG-dC) B-DNA, *Biopolymers*, **1991**, 31, 1709-1720.
120. LYNG R., RODGER A., NORDEN B., The CD of ligand-DNA systems. II. poly(dA-dT) B-DNA, *Biopolymers*, **1992**, 32, 1201-1215.

121. TERBRUEGGEN R. H., BARTON J. K., Sequence specific DNA-binding by a rhodium complex : recognition based on sequence-dependent twistability, *Biochemistry*, **1995**, 34, 8227-8234.
122. CARPASSE M., HOUSSEIER C., Do planar alkaloids from *Stychnos usambarensis* intercalate into the DNA helix, *Biochimie*, **1983**, 65, 157-167.
123. TUIITE E., NORDEN B., Sequence specific interactions of methylene blue with polynucleotides and DNA : a spectroscopic study, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 7548-7556.
124. BAILLY C., BRANA M., WARING M. J., Sequence-selective intercalation of antitumour bis-naphthalimides into DNA : evidence for an approach via the major groove. *Eur. J. Biochem.*, **1996**, 240, 195-208.
125. BURROWS C. J., ROKITA S. E., Recognition of guanine structure in nucleic acids by nickel complexes, *Acc. Chem. Res.*, **1994**, 27, 295-301.
126. CHEN X., WOODSON S. A., BURROWS C. J., ROKITA S. E., A highly sensitive probe for guanine N7 in folded structures of RNA : application to tRNA^{Phe} and *tetrahymena* group I intron, *Biochemistry*, **1993**, 32, 7610-7616.
127. CHENG C. C., ROKITA S. E., BURROWS C. J., Nickel (III)-promoted cleavage with ambient dioxygen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, 32, 277-284.
128. MURDOCK K. C., CHIOLD R. G., FABIO P. F., ANGIER R. B., Antitumor agent 1. 1,4-bis(aminoalkyl)amino-9,10-anthracenedione, *J. Med. Chem.*, **1979**, 22, 1024-1030.
129. LOWN J. W., MORGAN A. R., YEN S. F., WANG Y. H., WILSON W. D., Characteristics of binding of the anticancer agents mitoxantrone and ametantrone and related structures to deoxyribonucleic acids, *Biochemistry*, **1985**, 24, 4028-4095.
130. POWIS W., Free radical formation by antitumor quinones, *Free Rad. Biol. Med.*, **1989**, 6, 63-101.
131. TENNEY K. W., ROOVE T. C., YANG L., HALLIGAN B. D., LIU L. F., Adriamycin induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II, *Science*, **1984**, 226, 466-469.
132. KZAPUSCINSKI J., DARZYNKIEWICZ Z., TRAGANOS F., MELAMED M. R., Interaction of a new antitumor agent, 1,4-dihydroxy-5,8-bis((2-((2-hydroxyethyl)amino)-ethyl)-amino)-9,10-anthracenedione, with nucleic acids, *Biochem. Pharmacol.*, **1981**, 30, 231-240.
133. LOWN J. W., HANSTOCK C. C., High field ¹H NMR analysis of the 1:1 intercalation complex of the antitumor agent mitoxantrone and the DNA duplex d(CpGpCpGp)₂, *J. Biomol. Struct Dyn.*, **1985**, 2, 1097-1106.

134. KOLODZIEJCZICK P., KRZYSTOF R., LOWN J. C., Enzymatic oxidative activation and transformation of the antitumor agent mitoxantrone, *Free Rad. Biol. Med.*, **1988**, 5, 13-25.
135. LOWN J. W. CHEN H. H., PLANBECK J. A., Diminished superoxide anion generation by reduced 5-iminodaunorubicin relative to daunorubicin and the relationship to cardiotoxicity of the anthracycline antitumor agents, *Biochem. Pharm.*, **1979**, 28, 2563-2568.
136. KARASCH E. D., NOVAK R. F., Inhibition of microsomal oxidative drug metabolism by 1,4-bis-(2-(hydroxyethyl)amino-ethylamino)-9,10-anthracenedione diacetate, a new antineoplastic agent, *Mol. Pharm.*, **1982**, 22, 471-478.
137. SINHA B. K., TRUSH M. A., KENNEDY K. A., NIMNAUGH E. G., Enzymatic activation and binding of adriamycin to nuclear DNA, *Cancer Res.*, **1984**, 44, 2892-2896.
138. BASRA J., BROWN J. R., PATERSON L. H., Free radical formation *in vitro* by cytotoxic anthraquinone derivatives; comparaisn with doxorubicin, *Investigational New Drugs*, **1984**, 2, 117-124.
139. BASRA J., WOLF C. R., BROWN J. R., PATERSON L. H., Evidence for human liver mediated free-radical formation by doxorubicin and mitoxantrone. *Anti Cancer Drug Design*, **1985**, 1, 45-52.
140. DUGUET M., RIOU J. F., De la topologie de l'ADN aux médicaments antibiotiques et anticancéreux, *Médecine / Sciences*, **1994**, 10, 962-972.
141. FELSENFELD D., L'ADN, *Pour la Science*, **1985**, 98, 30-41.
142. FOX M. E., SMITH P. J., Long-term inhibition of DNA synthesis and the persistence of trapped topoisomerase II complexes in determining the toxicity of the antitumor DNA intercalators mAMSA and mitoxantrone, *Cancer Res.*, **1990**, 50, 5813-5818.
143. ZEE-CHEN R. K. Y., CHENG C.C., Antineoplastic agents. Structure-activity relationship study of bis(substitutedaminoalkylamino)anthraquinones, *J. Med. Chem.*, **1978**, 21, 291-294.
144. KATZHENDLER J., GEAN K. F., BAR-AD G., TASHMA Z., BEN-SHOSHAN R., RINGEL I., BACHRACH U., RAMU A., Synthesis of aminoanthraquinone derivates and their *in vitro* evaluation as anti-cancer drugs, *Eur. J. Med. Chem.*, **1991**, 24, 23-30.
145. ISLAM S. A., NEIDLE S., GANDECHA B. M., PARTRIDGE M., PATTERSON L. H., BROWN J. R., Comparative computer graphics and solution studies of the DNA interaction of substituted anthraquinones based on doxorubicin and mitoxantrone, *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 857-864.
146. STEFANSKA B., DZIEDUSZICKA M., MARTELLI S., BOROWSKI E., Synthesis of unsymmetrically substituted 1,4-bis((aminoalkyl)amino)anthracene-9,10-diones as potentiel antileukemic agents, *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 1724-1728.

149. FAULDS D., BALFOUR J. A., CHRIS P., LANGTRY H. D., Mitoxantrone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetics properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer, *Drugs*, 1991, 41, 400-449.
150. Mc INTIRE W. S., HARTMANN C., *Copper-containing amine oxidases, principles and applications of quinoproteins*, Marcel Dekker Inc., New York, 1993, 97-171.
151. RAVIKUVAR V. T., A convenient large scale synthesis of N-Boc-ethylenediamine, *Synth. Comm.*, 1994, 24, 1767-1772.
152. NYSTROM R. F., BROWN W. G., Reduction of organic compounds by lithium aluminium hydride, *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, 70, 3738-3740.
153. JONES J., Peptide bond formation, *The chemical synthesis of peptides*, Clarendon press oxford, 1994, 42-76.
154. FOX K. R., WARING M. J., BROWN J. R., NEIDLE S., DNA sequence preferences to: anti-cancer drug mitoxantrone and related anthraquinones revealed by DNAaseI footprinting, *FEBS Lett.*, 1986, 202, 289-294.
155. PANOUSIS C., PHILLIPS D. R., DNA sequence specificity of mitoxantrone, *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 1342-1345.
156. AUCLAIR C., Multimodal action of antitumor agents on DNA: the ellipticine series, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, 258, 1-24.
157. KOHN K. W., WARING M. J., GLAUBIGER D., FRIEDMANN C. A., Intercalative binding of ellipticine to DNA, *Cancer Res.*, 1975, 35, 71-76.
158. BAILLY C., OHUIGIN C., RIVALLE C., BISAGNI E., HENICHART J. P., WARING M. J., Sequence-selective binding of an ellipticine derivative with DNA, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 6283-6291.
159. FOSSE P., RENE B., LE BRET M., PAOLETTI C., SAUCIER J. M., Sequence requirements for mammalian topoisomerase II mediated DNA cleavage stimulated by an ellipticine derivative, *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 2861-2868.
160. DING L., ETEMAD-MOGHADAM G., CROS S., AUCLAIR C., MEUNIER B., Syntheses and in vitro evaluation of water-soluble cationic metalloporphyrin-ellipticine molecules having a high affinity for DNA, *J. Med. Chem.*, 1991, 34, 900-906.
161. GANESHPURE P. A., SATISH S., SIVARAM S., Alkene epoxidation with iodosylbenzene catalysed by polymeric Schiff base chelate, *J. Mol. Catal.*, 1989, 50, L1-L5.
162. MARTINEZ L. E., LEIGHTON J. L., CARSTEN D. H., JACOBSEN E. N., Highly enantioselective ring opening of epoxides catalysed by (salen)Cr(III) complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 5897-5902.

161. GANESHPURE P. A., SATISH S., SIVARAM S., Alkene epoxidation with iodosylbenzene catalysed by polymeric Schiff base chelate, *J. Mol. Catal.*, **1989**, 50, L1-L5.
162. MARTINEZ L. E., LEIGHTON J. L., CARSTEN D. H., JACOBSEN E. N., Highly enantioselective ring opening of epoxides catalysed by (salen)Cr(III) complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 5897-5902.
163. TAQUI KAHN M. M., HALLIGUDI S. B., SUMITA S., SHAIKH Z. A., Reductive carbonylation of nitrobenzene to phenylurethane catalysed by Ru(III)-schiff base complexes, *J. Mol. catal.*, **1990**, 57, 301-305.
164. ODENKIRK W., RHEINGOLD A. L., BOSNICH B., Homogeneous catalysis: a ruthenium-based Lewis-acid catalyst for the diels-alder reaction, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 6392-6398.
165. DEBABRATA C., BAJAJ H. C., HALLIGUIDI S. B., BHATT K. N., Catalysis of alkene hydrogenation and oxidation by nickel-salophen complex ; a novel bifunctional catalyst, *J. mol. Catal.*, **1993**, 84, L1-L5.
166. YOON H., WAGLER T. R., O'CONNOR K. J., BURROWS C. J., High turnover rates in pH-dependent alkene epoxidation using NaOCl and square planar nickel (II) catalysts, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 4568-4571.
167. NODA K., HOSOYA N., IRIE R., YAMASHITA Y., KATSUKI T., Catalytic asymmetric oxidation of sulfides using (salen)manganese(III) complex as a catalyst, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 9609-9618.
168. ROBERT A., TSAPARA A., MEUNIER B., Brominated and chlorinated manganese chiral Schiff base complexes as epoxidation catalysts, *J. Mol. Catal.*, **1993**, 85, 13-19.
169. DENG L., JACOBSEN E. N., A practical enantioselective synthesis of the taxol side chain via asymmetric catalysis, *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 4320-4323.
170. FUKUDA T., KATSUKI T., Mn-salen catalysed asymmetric oxidation of enol derivatives, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 4389-4392.
171. SCHWANKREIS T., BERKESSEL A., A biomimetic catalyst for the asymmetric epoxidation of unfunctionalized olefins with hydrogen peroxide, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 4785-4788.
172. SALEM I. A., A kinetic approach for the homogeneous reaction between N,N'-propylenebis(salicylideneiminato)manganese(III) complex and hydrogen peroxide in aqueous solution, *Polyhedron*, **1994**, 13, 1547-1551.
173. TRIVEDI B. M., BHATTACHARYA K., GANESHPURE P. A., SATISH S., Epoxidation of olefins catalysed by Mn(III)-Schiff base complexes, *J. Mol. Catal.*, **1992**, 75, 109-115.

174. AKAI T., HATA E., YOROZU K., MUKAIYAMA T., Cobalt(II) complex catalysed epoxidation of olefins by combined use of molecular oxygen and cyclic ketones, *Chem. Lett.*, 1992, 10, 2077-2080.

PUBLICATIONS

Synthesis of a Functionalized Salen-Copper Complex and Its Interaction with DNA

Sylvain Routier,[†] Jean-Luc Bernier,^{†,*} Michael J. Waring,[‡] Pierre Colson,[§] Claude Houssier,[§] and Christian Bailly^{†,*}

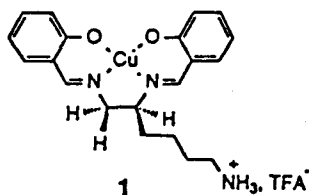
Laboratoire de Chimie Organique Physique, URA CNRS 351, USTL Bât. C3, 59655 Villeneuve d'Ascq, France, Department of Pharmacology, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QJ, England, Laboratoire de Chimie Macromoléculaire et Chimie Physique, Université de Liège, Liège 4000, Belgium, and Institut de Recherches sur le Cancer, INSERM U 124, Place de Verdun 59045 Lille, France

Received October 12, 1995^o

An original procedure for efficient synthesis of a functionalized salen-copper complex is reported. The mode of binding to DNA of the salen-Cu^{II} complex was investigated by viscometry as well as by absorption, circular, and linear dichroism spectroscopy. The complex can induce DNA strand breakage in the presence of a reducing agent as revealed by a plasmid cleavage assay. The spectroscopic and biochemical data indicate that the salen-Cu^{II} complex induces single-stranded breaks via an interaction within one of the grooves of the double helix.

Introduction

There is continuing interest in DNA-binding metal complexes. Cu-phenanthroline, Fe-EDTA, Mn-porphyrin, and Ru-polypyridyl complexes are typical examples of metal chelates capable of triggering single- and/or double-stranded DNA cleavages after activation with appropriate reducing agents.¹ Studies on their DNA binding/cleaving properties are of great importance for the design of sequence-specific or stereospecific artificial nucleases. Metal complexes of salen [bis(salicylidene)ethylenediamine]² can also induce DNA cleavage³ but, so far as we are aware, their mechanism of binding to nucleic acids has received little attention.⁴ In this paper, we report an original procedure for efficient synthesis of a functionalized salen-Cu complex (1). Preliminary studies on the DNA-binding and DNA-cleaving properties of this copper complex using viscometry, measurements of absorption, circular and electric linear dichroism, and gel electrophoresis are described.



Results and Discussion

Synthesis (Scheme 1). The key intermediate for the synthesis of the functionalized salen-copper complex 1 is the asymmetric α,β -diamine 5 which was synthesized following a sequential method.⁵ The amide 3 was obtained from the commercially available N^o-Z-N^o-BOC-L-lysine 2 after treatment with ethyl chloroformate in ammonia-saturated THF. Dehydration of the carboxamide 3 with trifluoroacetic anhydride in the presence of triethylamine furnished the nitrile 4 which was then subjected to hydrogenation (over Raney-Ni) under high pressure. The benzyloxycarbonyl protecting group was cleaved during this reaction (hydrogenolysis). The α,β -diamine 5 was then condensed with salicylaldehyde in the presence of cuprous acetate monohydrate to give the BOC-protected compound 6. Finally, deprotection under acid conditions and purification afforded the salen-Cu complex 1 in 61% yield. The ESR parameters ($g_{\parallel} = 2.23$ and $A_{\parallel} = 191$ G) for the Cu^{II}-salen complex 1 are typical of a square planar complex. It is noteworthy that the chemical procedure outlined in Scheme 1 is generally applicable for the synthesis of other metal-salen-amino acid complexes. Recently, the synthesis of Ni and Mn-salen complexes has been successfully completed using the same route.

Binding to DNA. We set out to define the mode of interaction between the copper-salen complex 1 and calf thymus DNA using a combination of spectroscopic and hydrodynamic measurements.

Absorption. The electronic absorption spectrum of compound 1 is significantly perturbed on binding to DNA. Relative to the absorption spectrum of the DNA-free compound, the absorption band centered at 346 nm is red-shifted by 3 nm and displays 13% hypochromism upon interaction of the ligand with DNA (not shown). Attempts to determine binding isotherms were made by titrating measured quantities of a stock solution of compound 1 into a known volume of calf thymus DNA solution and monitoring the resulting changes in the absorption spectrum of the ligand. The bathochromic shift proved too weak to permit a clear distinction between free and bound molecules and consequently

[†] CNRS URA351.

[‡] University of Cambridge.

[§] Université de Liège.

^o INSERM U124.

* Corresponding authors: J. L. Bernier, Fax (+33) 20 43 65 61; C. Bailly, Fax (+33) 20 52 70 83.

^o Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, March 15, 1996.

(1) (a) Barton, J. K. *Science* 1986, 233, 727-734. (b) Sigman, D. S. *Acc. Chem. Res.* 1986, 19, 180-186. (c) Stubbe, J.; Kozarich, J. W. *Chem. Rev.* 1987, 87, 1107-1136. (d) Sigman, D. S.; Mazumder, A.; Perrin, D. M. *Chem. Rev.* 1993, 93, 2295-2316. (e) Pratviel, G.; Bernadou, J.; Meunier, B. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 746-769.

(2) Pedersen, C. J. *Science* 1968, 241, 536-540.

(3) (a) Gravert, D. J.; Griffin, J. H. *J. Org. Chem.* 1993, 58, 820-822. (b) Burrows, C. J.; Rokita, S. E. *Acc. Chem. Res.* 1994, 27, 295-301. (c) Woodson, S. S.; Muller, J. G.; Burrows, C. J.; Rokita, S. E. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 5524-5525. (d) Bhattacharya, S.; Mandal, S. S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1995, 2489-2490.

(4) Sato, K.; Chikira, M.; Fujii, Y.; Komatsu, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1994, 625-626.

(5) Houssier, R.; Bernier, J.-L.; Hénichart, J.-P. *Synthesis* 1988, 259-260.

Scheme 1

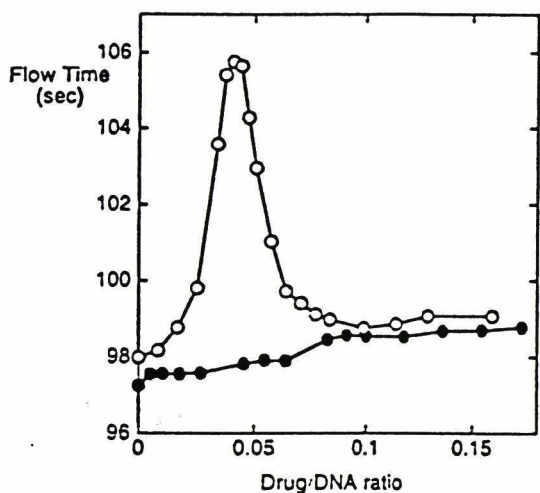
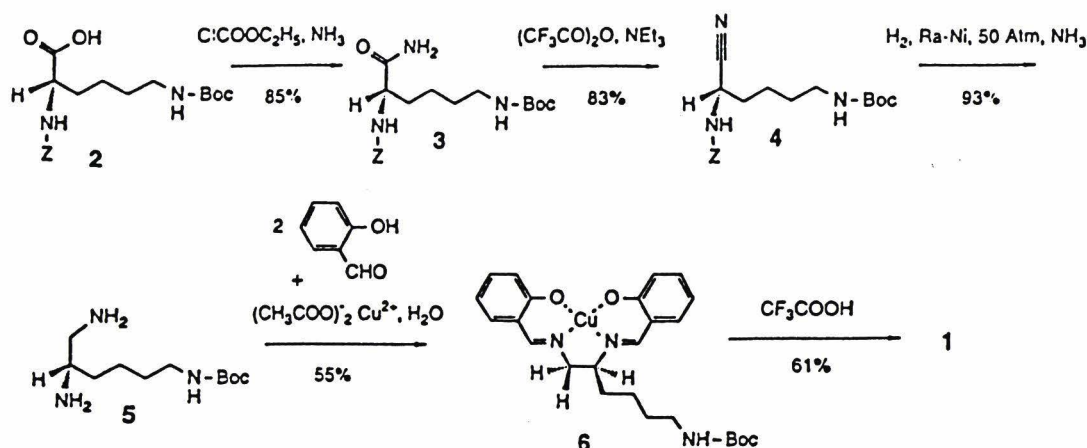


Figure 1. Viscometric titrations of pUC12 closed circular duplex DNA with compound 1 (J) and ethidium bromide (E). The flow time is plotted as a function of the molar ratio of drug added per DNA nucleotide.

attempts to estimate the binding constant from conventional Scatchard analysis failed. As an alternative procedure to examine the strength of the drug-DNA interaction, we employed fluorescence spectroscopy to investigate competition between the test drug and the intercalating drug ethidium bromide for available binding sites. The concentrations of compound 1 required to reduce by 50% the fluorescence of the DNA-ethidium complex under standard conditions (Q_{50}) were $12 \mu\text{M}$ with calf thymus DNA, $21 \mu\text{M}$ with poly(dA-dT)·poly(dA-dT) and $> 50 \mu\text{M}$ with poly(dG-dC)·poly(dG-dC). The finding that the drug diminishes the fluorescence of the ethidium-poly(dA-dT)·poly(dA-dT) complex more efficiently than the ethidium-poly(dG-dC)·poly(dG-dC) complex is consistent with the CD data (see below) suggesting that the drug interacts preferentially with AT rather than GC sequences. It speaks for an affinity of the drug toward the AT polynucleotide which is at least 2-fold higher than that for the GC polymer.

Viscometry. Compound 1 causes practically no change in the viscosity of a supercoiled DNA solution whereas a classical rise and fall in viscosity is observed with ethidium bromide (Figure 1). Apparently, binding of the salen-Cu complex to DNA does not induce any significant change in the winding of the helix.

Circular Dichroism (CD). The CD spectrum of the Cu-salen chelate 1 in solution reflects the asymmetric structure of the salen moiety. Addition of calf thymus

DNA induces significant changes in its CD spectrum (Figure 2a). The band at 330 nm decreases as the DNA concentration is raised; meanwhile the CD in the 350–420 nm region increases significantly. The two isodichroic points at 318 and 354 nm and the constant spectral proportions indicate the existence of a single binding mode. Thus the binding appears geometrically homogeneous.

To evaluate the binding selectivity of compound 1 vis-à-vis GC or AT base pairs, further CD titration experiments were performed using synthetic polynucleotides having defined base compositions. As observed with calf thymus DNA, addition of the alternating copolymer poly(dA-dT)·poly(dA-dT) induces significant changes in the CD spectrum of the salen-Cu complex (Figure 2b). However, the variation in CD intensity is less pronounced than seen with calf thymus DNA which contains a nearly equal proportion of AT and GC base pairs. By contrast, the CD spectrum of the ligand is little affected by addition of poly(dG-dC)·poly(dG-dC) (Figure 2c), therefore suggesting that compound 1 binds preferentially to AT sequences rather than to GC sequences.⁶ A preference for AT sequences has also been reported for Mn^{III}-salen complexes.^{3a} Substitution of inosine for guanosine does not markedly promote binding of 1 to the polymer (Figure 2d). The CD spectra of complexes between compound 1 and either poly(dG-dC)·poly(dG-dC) or poly(dI-dC)·poly(dI-dC) at a polynucleotide/ligand ratio of 20 are almost identical. In neither case does a positive CD band appear at 390 nm, suggesting that the ligand has minimal interaction with the GC- and IC-containing polynucleotides. In other words, unlike what we found recently with AT-specific (e.g. netropsin, Hoechst 33258, berenil, DAPI) and GC-specific (e.g. mithramycin, chromomycin) minor groove binders and with intercalating drugs (e.g. actinomycin, echinomycin),⁷ removal of the 2-amino group of guanine (which is exposed in the minor groove of DNA) has practically no influence on the binding of the salen-Cu complex 1 to DNA.

(6) Footprinting experiments using DNAase I as cleaving agent have failed to confirm the apparent preference for binding to AT sequences inferred from the CD titration experiments. The lack of detectable footprints may be due to the low affinity of the salen-Cu complex for DNA and possibly from the mechanism of recognition of DNA by DNAase I. The nuclease binds to the minor groove of DNA whereas compound 1 is suspected to interact within the major groove.

(7) (a) Waring, M. J.; Bailly, C. *Gene* 1994, 149, 69–79. (b) Bailly, C.; Waring, M. J. *Nucleic Acids Res.* 1995, 23, 885–892. (c) Bailly, C.; Waring, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 7311–7316. (d) Bailly, C.; Colson, P.; Hélichart, J.-P.; Houssier, C. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 3705–3709.

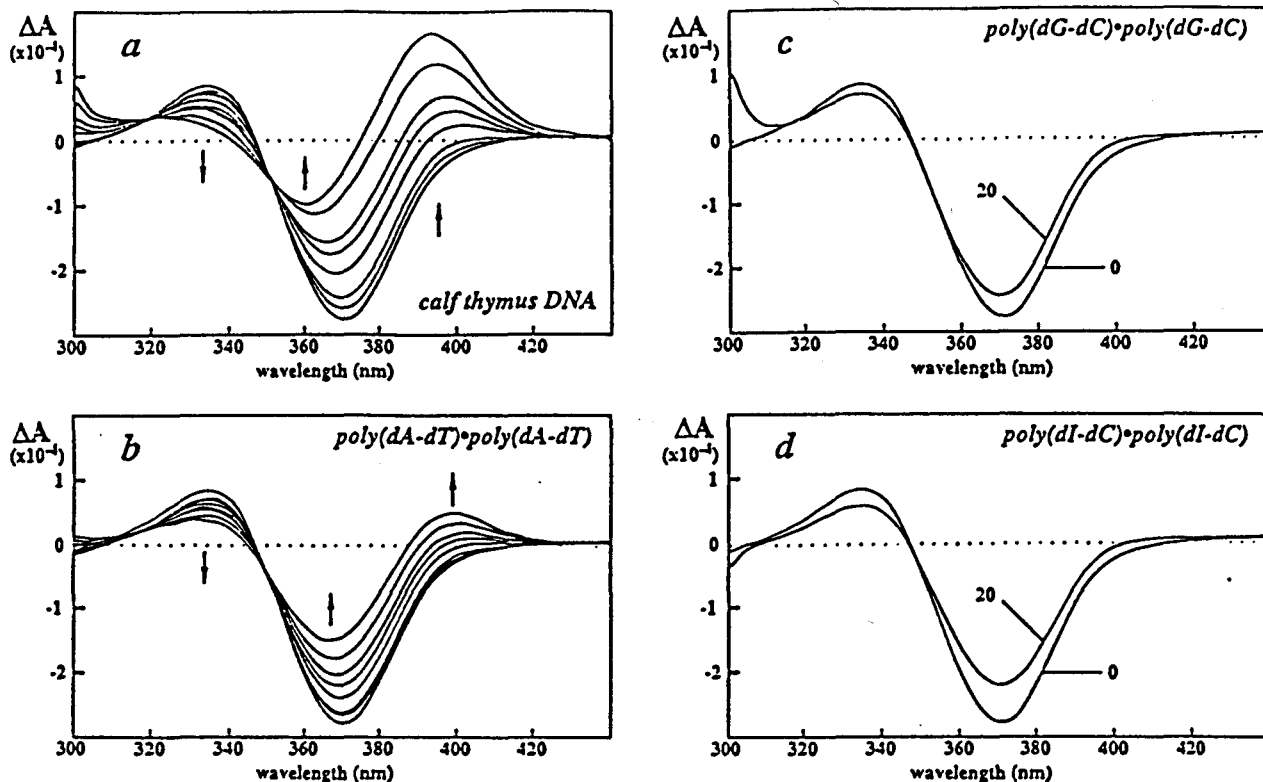


Figure 2. Circular dichroism. Titration of compound 1 with (a) calf thymus DNA, (b) poly(dA-dT)·poly(dA-dT). Panels c and d show the CD spectra of compound 1 in the absence or presence of (c) poly(dG-dC)·poly(dG-dC) and (d) poly(dI-dC)·poly(dI-dC). In panels a and b, the DNA-phosphate/drug ratio (P/D) increased as follows (bottom to top curves at 370 nm): 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20. In panels-c and d, the P/D ratio is indicated. Solutions of drug with or without nucleic acids were scanned in 1 cm quartz cuvettes using a Jobin-Yvon CD6 dichrograph. Measurements were made by progressive addition of DNA to a ligand solution of constant concentration in order to obtain the desired drug/DNA ratios.

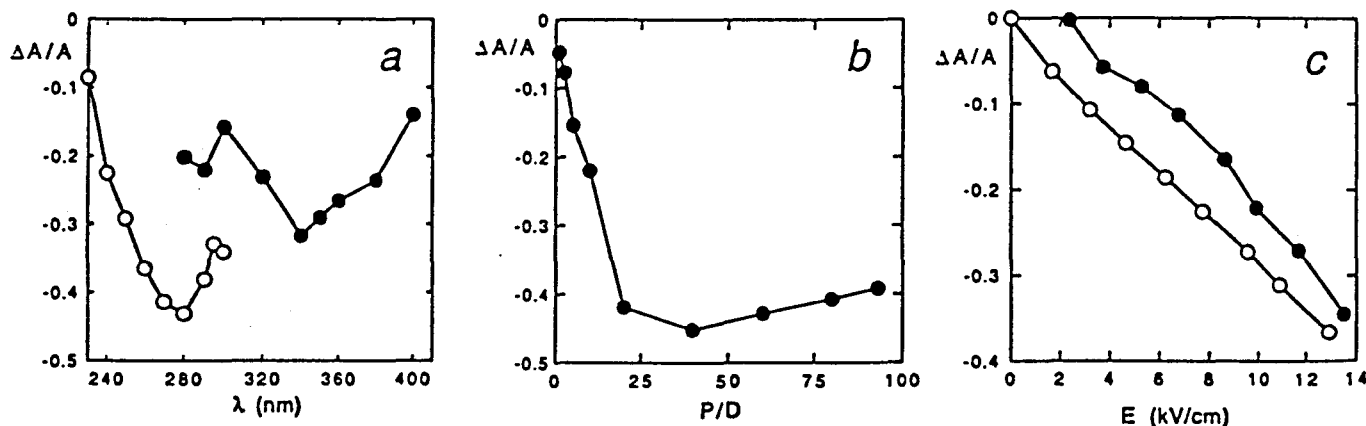


Figure 3. Dependence of the reduced dichroism $\Delta A/A$ on (a) wavelength, (b) the DNA-phosphate to drug ratio (P/D), and (c) electric field strength for compound 1-DNA complex (J) and for DNA alone (E). Conditions: (a) $P/D = 20$, 12.5 kV/cm, (b) 340 nm, 12.5 kV/cm, (c) 340 nm for 1, 260 nm for DNA, $P/D = 20$ in 1 mM sodium cacodylate buffer, pH 6.5.

Electric linear dichroism (ELD) represents a sensitive method for investigating drug binding to DNA.⁸ Figure 3 illustrates a typical experimental data set showing the dependence of the reduced dichroism on the wavelength, the drug/DNA ratio and the electric field. The reduced dichroism $\Delta A/A$ is always negative in sign even in the 300–420 nm absorption band where there is no contribution from the DNA molecules. When compound 1 is fully bound to DNA (at $P/D \geq 20$) the DNA bases and the salen-copper complex display comparable reduced dichroism values. The fact that $\Delta A/A$ depends similarly upon field strength at 260 nm for the DNA

bases and at 340 nm for compound 1 indicates that the planar copper complex is tilted close to the plane of the DNA bases.

The spectroscopic and hydrodynamic data reported above provide key information about the binding geometry of the Cu-salen complex 1 when associated with DNA. The copper chelate almost certainly binds to DNA with a single preferred geometry as judged from the CD spectra. The ELD data indicate that the Cu-salen complex is oriented roughly parallel to the plane of the base pairs (within 10°). At first sight, such an orientation would be consistent with an intercalative mode of binding as recently proposed for structurally related Cu-salen derivatives.⁴ But the viscometric results are hard to

(8) Colson, P.; Bailly, C.; Houssier, C. *Biophys. Chem.* 1996, 58, 125–140.

reconcile with any binding model based on intercalation, even partial, of compound 1 into the DNA double helix. The manifest lack of effect of the Cu-salen derivative 1 on the viscosity of supercoiled DNA is frankly incompatible with an intercalative binding mode, given that all intercalating drugs provoke significant unwinding of the double helix.⁹ The intense and positive CD signals obtained with calf thymus DNA and poly(dA-dT)·poly(dA-dT) are also in conflict with intercalation.¹⁰ External binding of the ligand at the surface of the double helix is also unlikely since such a process would be expected to be completely nonspecific as regards orientation whereas the CD spectra attest that the binding is geometrically homogeneous. The possibility that the chelate fits into one of the grooves of DNA has been examined and appears most likely at first sight, though insertion of a ligand into the minor groove of DNA gives rise to large positive ELD signals⁸ whereas those observed for the complex between compound 1 and calf thymus DNA are always negative. We considered the possibility of a binding site within the major groove of DNA. This would probably not require unwinding of the helix, and the major groove is certainly large enough to accommodate the Cu-salen chelate oriented parallel to the base pairs. Insertion between the major groove edges of the bases has been proposed for certain metal-trisphenanthroline complexes.¹¹ Moreover, the binding data obtained with compound 1 are reminiscent of those reported for planar alkaloids¹² and the phenothiazinium dye methylene blue which is believed to bind in the major groove of poly(dA-dT)·poly(dA-dT).¹³ Our finding that the substitution of inosine for guanosine residues has no effect on the binding of compound 1 to DNA would be compatible with major groove binding, since all drugs which interact with DNA via the minor groove have been found to be sensitive to the presence or absence of the guanine 2-amino group, even if they do not interact with it directly.⁷ The only drugs we have found so far whose binding to DNA is not dependent on the placement of the 2-amino group of guanine are bis-naphthalimide derivatives which are believed to interact in the major groove of the double helix.¹⁴ However, the case for major groove binding of 1 is far from proved, and the hypothesis must at present be considered speculative, though binding of some sort into either or both of the helical grooves seems most probable.

DNA cleavage was analyzed by monitoring the conversion of supercoiled plasmid DNA (form I) to the nicked circular molecules (form II) and linear DNA (form III). The tests were performed under aerobic conditions in the presence of 2-mercaptopropionic acid (MPA) as a reducing agent. As shown in Figure 4, compound 1 is able to catalyze oxidative cleavage of DNA. Incubation of the plasmid at 37 °C for 1 h with 50 μM compound 1 causes the complete conversion of form I to the nicked form II. We therefore conclude that the activation of the copper complex leads mainly to single strand cleavage of duplex

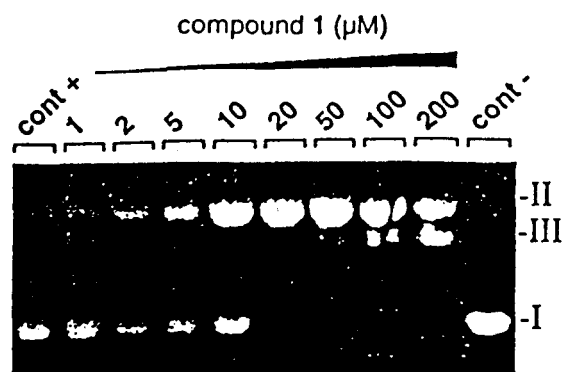


Figure 4. Cleavage of closed circular pUC12 DNA (form I) by compound 1 in the presence of 2-mercaptopropionic acid (MPA) as reducing agent. Forms II and III refer to the nicked and linear DNA forms, respectively. The drug concentration (μM) is indicated at the top of each gel lane. Control lanes marked cont + and cont - refer to the plasmid DNA incubated without drug in the presence and absence of MPA, respectively.

DNA. As the salen concentration increases the probability of double-strand scissions is enhanced once the DNA has undergone a single-strand break. This is manifested in the gel by the appearance of linearized DNA molecules (form III). The reactive species (presumably oxygen-based radicals)¹⁵ have free access to the site of first cleavage. High resolution affinity cleavage studies, to be reported in detail elsewhere (manuscript submitted for publication), reveal that the reaction is essentially non-sequence-specific. The Cu-salen derivative 1 complements the tool box of reagents which can be utilized to produce single-strand cleavage of DNA.

In conclusion, the results suggest that the functionalized salen-Cu^{II} complex 1 studied here induces DNA cleavage via an interaction within one of the grooves of the double helix. Both the peculiar mode of binding to DNA and the DNA-cleaving properties entreat further exploration into the use of metal-salen complexes as tools for investigating DNA structure and for the active interest in developing metal-containing artificial nucleases. The newly introduced butylamino side chain may ultimately allow tailoring of the chelate to facilitate cellular transport and DNA recognition. In particular, it would be interesting to tether the functionalized salen derivative 1 to an oligonucleotide for sequence-specific recognition of DNA via triple-helix formation along the lines already attempted with Mn-porphyrin and Cu-phenanthroline conjugates.¹⁶ Such efforts have now been initiated.

Experimental Section

Synthesis. The purity of all compounds was assessed by TLC, ¹H- and ¹³C-NMR, and by mass spectrometry. Kieselgel 60 (004-0063 mesh) was used for flash chromatography columns. TLC was carried out using silica gel 60F-254 (0.25

(9) Waring, M. J. *J. Mol. Biol.* 1970, 54, 247-279.
 (10) (a) Lyng, R.; Hård, T.; Nordén, B. *Biopolymers* 1987, 26, 1327-1345. (b) Lyng, R.; Rodger, A.; Nordén, B. *Biopolymers* 1991, 31, 1709-1720. (c) Lyng, R.; Rodger, A.; Nordén, B. *Biopolymers* 1992, 32, 1201-1215.
 (11) (a) Haworth, I. S.; Elcock, A. H.; Freeman, J.; Rodger, A.; Richards, W. G. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1991, 9, 23-44. (b) Terbruggen, R. H.; Barton, J. K. *Biochemistry* 1995, 34, 8227-8234.
 (12) Caprasse, M.; Houssier, C. *Biochimie* 1983, 65, 157-167.
 (13) Tuite, E.; Nordén, B. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 7548-7556.
 (14) Bailly, C.; Braña, M.; Waring, M. J. *Eur. J. Biochem.* 1996, submitted.

(15) The formation of free-radical species generated from oxygenated solutions of compound 1 in the presence of MPA was monitored by spin-trapping experiments with 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO). ESR signals characteristic of DMPO-OH ($A_N = A_H = 14.9G$) were recorded suggesting the production of superoxide anions $O_2^{\cdot-}$. The postulated mechanism of DNA cleavage by the salen-Cu complex involves reduction of $I-Cu^{II}$ to $I-Cu^I$ which reacts with O_2 to give $O_2^{\cdot-}$ followed by the formation of hydrogen peroxide. H_2O_2 would decompose upon reaction with DNA-bound $I-Cu^I$ to yield OH^{\cdot} radicals capable of reacting with the deoxyribose residues in DNA.

(16) (a) Thuong, N. T.; Hélène, C. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1993, 32, 666-690. (b) Bigey, P.; Pratiel, G.; Meunier, B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1995, 181-182.

mm thick) precoated UV sensitive plates. Spots were visualized by inspection under visible light or UV at 254 nm. Melting points were determined in a hot plate microscope and are uncorrected. $^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded on a Bruker AM 300 WB. Chemical shifts were reported from tetramethylsilane as an internal reference and are given in δ (ppm) units. IR spectra were obtained using KBr pellets and only the principal sharp peaks are given. ESR spectra were recorded at 77 K, with a maximum modulation amplitude of 8 G in a dual cavity operating in the TE₁₀₄ mode. Samples were frozen in liquid nitrogen into 4 mm diameter cylindrical quartz tubes. The g factor measurements were related to the "strong pitch", $g = 2.0028$. FAB mass spectra were determined on a mass spectrometer arranged in EBE geometry. Samples were 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 3000. IE mass spectra were determined on a quadrupole spectrometer with a kinetic energy of 70 eV.

N^α-Z-N^ε-BOC-L-lysineamide (3). A solution of N^α-Z-N^ε-BOC-L-lysine (2) (5.26 mmol, 2 g), NEt₃ (5.31 mmol, 740 mL), and ethyl chloroformate (5.75 mmol, 550 mL) in dry THF (30 mL) was stirred under argon at -10°C for 45 min, 30 mL of ammonia-saturated THF were added, and the mixture was stirred for 1 h at -10°C and then overnight at room temperature. The solvent was removed by distillation under reduced pressure, and the residue was dissolved in ethyl acetate (150 mL). The organic layer was washed with 1 N Na₂CO₃ (100 mL) and water (100 mL). After drying over Na₂SO₄ and filtration, the solvent was removed by distillation under reduced pressure. Compound 3 was obtained as a white solid (1.7 g; 85%), mp 141–142°C; $[\alpha]_D^{25} -1.75$ (c 4 × 10⁻², MeOH); IR (KBr, cm⁻¹) ν 3370–3310, 3200, 2965, 1680, 1655, 1535; EIMS 380 (M + 1)⁺; R_f (MeOH/CHCl₃ 20:80) 0.74; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ 1.4 (s, 9H), 1.47 (m, 4H), 1.62 (q, 2H), 3.06 (m, 2H), 4.15 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 5.75 (m, 2H), 6.40 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃) δ 22.6 (CH₃), 28.40 (CH₃), 29.43 (CH₂), 40.02 (CH₂), 44.38 (CH₂), 64.64 (CH₂), 77.32 (CH), 78.96 (C_q), 126.88 (CH), 127.23 (CH), 141.41 (C_q), 156.33 (C_q). Anal. Calcd for C₁₉H₂₅N₃O₅: C, 60.16; H, 7.65; N, 11.08. Found: C, 60.1; H, 7.5; N, 10.9.

(S)-1-Cyano-N¹-(benzyloxycarbonyl)-N³-(tert-butyloxycarbonyl)-1,5-diaminopentane (4). A solution of 3 (4.21 mmol, 1.6 g) and NEt₃ (10.04 mmol, 1.4 mL) in THF (20 mL) was stirred under argon at 0°C. Trifluoroacetic anhydride (4.95 mmol, 0.7 mL) was added dropwise, and the mixture was stirred for 1 h at 0°C and then overnight at room temperature. The solvent was removed by distillation under reduced pressure, and the residue was dissolved in Et₂O (150 mL). The organic layer was washed in turn with 0.1 N HCl (100 mL), 0.1 N NaOH (100 mL), and water (100 mL). After drying over Na₂SO₄, the solvent was removed by distillation under reduced pressure. Compound 4 was obtained as a white solid (1.26 g; 83%); mp 81–82°C, $[\alpha]_D^{25} -27$ (c 4 × 10⁻², MeOH), IR (KBr, cm⁻¹) ν 3370, 2965, 1715, 1690, 1540; EIMS 361 (M + 1)⁺; R_f (MeOH/CHCl₃ 20:80) 0.85; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ 1.38 (m, 11H), 1.47 (m, 4H), 3.10 (m, 2H), 4.53 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 5.76 (m, 2H), 7.34 (m, 5H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃) δ 21.27 (CH₂), 28.37 (CH₃), 29.38 (CH₂), 32.11 (CH₂), 39.42 (CH₂), 42.65 (CH), 67.63 (CH₂), 79.49 (C_q), 118.61 (C_q), 128.35 (CH), 128.59 (CH), 135.66 (C_q), 156.38 (C_q), 155.39 (C_q). Anal. Calcd for C₁₉H₂₇N₃O₄: C, 63.16; H, 7.48; N, 11.63. Found: C, 63.1; H, 7.5; N, 11.5.

(S)-6-(tert-Butyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane (5). A solution of 4 (1.38 mmol, 500 mg) containing Raney Ni (1 g) in MeOH (20 mL) saturated with ammonia was stirred under 50 atm hydrogen at 50°C for 24 h. The reaction mixture was filtered, and the solvent was removed under reduced pressure to give compound 5 as a pink solid (93%, 0.3 g); mp 46–48°C; IR (KBr, cm⁻¹) ν 3200–3600, 2800–2900, 1690, 1540, EIMS 232 (M + 1)⁺; R_f (MeOH/CHCl₃ 40:60) 0.15; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ 1.3–1.6 (m, 15H) 1.88 (m, 2H) 2.7–3.1 (m, 3H) 5.23 (m, 4H) 7.32 (m, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃) δ 22.28 (CH₂), 23.74 (CH₂), 28.43 (CH₃), 29.43 (CH₂), 32.66 (CH₂), 39.78 (CH₂), 50.50 (CH), 79.04 (C_q), 156.25 (C_q). Anal. Calcd for C₁₁H₂₅N₃O₂: C, 57.14; H, 10.82; N, 18.18. Found: C, 57.1; H, 10.9; N, 18.2.

(S)-N¹,N²-Bis(salicylidene)-6-(tert-butyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane Copper Complex (6). A solution of 5 (1.3 mmol, 300 mg) and salicylaldehyde (6.10 mmol, 650 mL) in dry EtOH (25 mL) and cuprous acetate monohydrate (3.05 mmol, 610 mg in 5 mL of water) was refluxed under argon for 4 h. The solvent was distilled off under reduced pressure, and the residue was triturated with CH₂Cl₂. After filtration, the solvent was removed by distillation under reduced pressure. Compound 6 was recrystallized from ethanol/water (1:1) (55%, 0.36 g); mp 135–136°C; $[\alpha]_D^{25} -25$ (c 4 × 10⁻⁴, MeOH); IR (KBr, cm⁻¹) ν 3400, 3370, 2950, 1715, 1615; MS (FAB+) 501-(M + 1)⁺, 1002 (2 × (M + 1))⁺; R_f (MeOH) 0.00; ESR A₁₁ 192.5 G, g_{11} 2.22.

(S)-N¹,N²-Bis(salicylidene)-1,2,6-triaminohexane, Trifluoroacetate, Copper Complex (1). Trifluoroacetic acid (11.41 mmol, 1.01 mL) was added dropwise at room temperature to a solution of 6 (0.19 mmol, 100 mg) in 15 mL of CH₂Cl₂ containing anisole (4.6 μ mol, 5 μ L). The resulting mixture was stirred for 30 min and then evaporated to dryness. The crude residue was dissolved in ethanol, and the solvent was removed by distillation under reduced pressure. The final compound was recrystallized from EtOH as green solid (61%, 60 mg); mp 158–160°C; IR (KBr, cm⁻¹) ν 3200, 1620; MS (FAB+) 401(M)⁺, 801 (2 × (M))⁺; R_f (MeOH) 0.00; ESR A₁₁ 191.25 G, g_{11} 2.23.

General. Ethidium bromide was purchased from Boehringer (Mannheim, Germany); stock solutions were prepared in water. A 100 mM stock solution of compound 1 was prepared in DMSO since it is poorly soluble in water. This solution was stored at -20°C in the dark and diluted to a working concentration with water. All other chemicals were analytical grade reagents, and all solutions were prepared using doubly deionized, Millipore-filtered water. DNA from calf thymus and the double-stranded polymers poly(dA-dT)-poly(dA-dT), poly(dG-dC)-poly(dG-dC), and poly(dI-dC)-poly(dI-dC) were from Sigma Chemical Co. (La Verpillière, France). Calf thymus DNA was deproteinized with sodium dodecyl sulfate (protein content <0.2%) and all nucleic acids were dialyzed against 1 mM sodium cacodylate buffer pH 6.5.

Viscosity measurements were carried out in a capillary viscometer submerged in a 45 L water bath which was maintained at 25 ± 0.1°C. Flow times were measured at least in triplicate to an accuracy of ±0.1 s with a stopwatch, and the average time was calculated. The pUC12 plasmid DNA was isolated by a standard sodium dodecyl sulfate-sodium hydroxide lysis procedure and purified by banding twice in CsCl-ethidium bromide gradients. This procedure yields pure covalently closed circular supercoiled DNA suitable for viscosity measurements. Aliquots (1–5 μ L) of the test drug solution (1–2 mM) were titrated directly into the viscometer containing 2 mL of a 250 μ M solution of the plasmid. After each addition the solutions were carefully mixed with a small flow of air through the dilution bulb of the viscometer and the flow times measured. Experiments were conducted in buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) and 10 mM NaCl. The system was calibrated using ethidium bromide as a control.¹⁷

Absorption Spectroscopy. Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 5 spectrophotometer using a 10 mm optical pathlength. Titrations of the drugs with DNA, covering a large range of drug/DNA-phosphate ratios (D/P), were performed by adding aliquots of a concentrated DNA solution to a drug solution at constant ligand concentration (10 μ M).

Fluorescence measurements were made using a 10 mm lightpath cuvette in a 0.01 M ionic strength buffer (9.3 mM NaCl, 2 mM Na acetate, 0.1 mM EDTA) using 20 μ M DNA or polynucleotide and 2 μ M ethidium bromide. The DNA-ethidium complex was excited at 546 nm and the fluorescence measured at 595 nm.¹⁸

Circular dichroism (CD) measurements were recorded on a Jobin-Yvon CD6 dichrograph interfaced to a microcomputer.

(17) Waring, M. J.; Henley, S. M. *Nucleic Acids Res.* 1975, 2, 567–586.

(18) Baguley, B. C.; Denny, W. A.; Atwell, G. J.; Cain, B. F. *J. Med. Chem.* 1981, 24, 170–177.

Solutions of drugs and/or nucleic acids were scanned in 1 cm quartz cuvettes. Measurements were made by progressive addition of DNA or polynucleotide to a pure ligand solution to obtain the desired drug/nucleic acid ratios.

Electric Linear Dichroism (ELD). The theory and practice for measurements of electric linear dichroism have already been the subject of detailed reports.¹⁹ The optical set-up for a high sensitivity T-jump instrument equipped with a Glan polarizer was used under the following conditions: bandwidth 3 nm, sensitivity limit 0.001 in $\Delta A/A$, response time 3 μ s. All experiments were conducted at 20 °C with a 10 mm path length Kerr cell having 1.5 mm electrode separation, in 1 mM sodium cacodylate buffer, pH 6.5. The conductivity of the solutions, measured with a Metrohm conductimeter Model E527, ranged from 0.8 to 1.2 mS. The DNA samples were oriented by rectangular electric pulses at 13 kV/cm, and the drug under test was present at 10 μ M together with the DNA or polynucleotide at 100 μ M, unless otherwise stated. Linear dichroism ΔA is defined as the difference between the absorbance for light polarized parallel (A_{\parallel}) and perpendicular (A_{\perp}) to the applied field at a given wavelength. The reduced

dichroism is $\Delta A/A = (A_{\parallel} - A_{\perp})/A$, where A is the isotropic absorbance of the sample measured in the absence of electric field at the same wavelength and using the same pathlength.

DNA Cleaving Activity. Each reaction mixture contained 4 μ L of supercoiled pUC12 DNA (3 μ g), 5 μ L of compound 1 (2 to 500 μ M), and 1 μ L of MPA (25 mM) to initiate the reaction. After 1 h incubation at 37 °C, 1 μ L of loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in H₂O) was added to each tube and the solution was loaded on to a 0.9% agarose gel. The electrophoresis was carried out for about 2 h at 100 V in TBE buffer (89 mM Tris-borate pH 8.3, 1 mM EDTA). Gels were stained with ethidium bromide (1 μ g/ μ L) and then destained for 30 min in water prior to being photographed under UV light.

Acknowledgment. This work was done under the support of research grants (to J.L.B.) from the CNRS; (to M.J.W.) from the Wellcome Trust, CRC, AICR and the Sir Halley Stewart Trust; (to P.C. and C.H.) from the FRFC convention 2.4501.91 and the Télévie-FNRS contract 7.4526.94; and (to C.B.) from the INSERM. Support by the "convention INSERM-CFB" is acknowledged.

JO951840C

¹⁹ (a) Houssier, C. In *Molecular Electro-Optics*; Krause, S., Ed.; Plenum Publishing Corp.: New York, 1981; pp 363-398. (b) Bailly, C.; Hénichart, J.-P.; Colson, P.; Houssier, C. *J. Mol. Recognit.* 1992, 5, 155-171.



Salen–Anthraquinone Conjugates. Synthesis, DNA-Binding and Cleaving Properties, Effects on Topoisomerases and Cytotoxicity

Sylvain Routier,^a Nicole Cotelle,^a Jean-Pierre Catteau,^a Jean-Luc Bernier,^{a,*} Michael J. Waring,^b Jean-François Riou^c and Christian Bailly^{d,*}

^aLaboratoire de Chimie Organique Physique, URA CNRS 351, USTL Bât. C3, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

^bDepartment of Pharmacology, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QJ, U.K.

^cRhône-Poulenc Rorer, Centre de Recherche de Vitry-Alfortville, 94403 Vitry sur Seine, France

^dInstitut de Recherches sur le Cancer, INSERM U 124, Place de Verdun, 59045 Lille, France

Abstract—A series of amidoethylamino-anthraquinone derivatives bearing either one or two salen (bis(salicylidene)ethylenediamine) moieties complexed with Cu^{II} or Ni^{II} have been synthesized, and their DNA-binding and cleaving properties examined. The effects of the mono- and di-substituted anthracenedione–salen conjugates on DNA cleavage mediated by topoisomerases I and II have also been determined, as well as their cytotoxicity toward human KB cells. The anthraquinone–salen•Ni^{II} conjugates bind to GC-rich sequences in DNA, but do not cleave the macromolecule. By contrast, the anthraquinone–salen•Cu^{II} hybrids do not recognize particular nucleotide sequences but efficiently induce single-strand breaks in DNA after activation. The 5,8-dihydroxy-anthraquinone conjugates are more cytotoxic and more potent toward topoisomerase II than the non-hydroxylated analogues, but they are less cytotoxic than the salen-free anthraquinones. The attachment of a salen•Cu^{II} complex to the anthraquinone chromophore can confer DNA cleaving properties *in vitro*, but this is at the expense of cytotoxic activity. Anthraquinone–salen•Cu^{II} complexes may find useful employ as footprinting probes for investigating ligand–DNA interactions. Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd

Introduction

Anthracenediones represent an important class of antitumour agents.^{1–3} Mitoxantrone (Fig. 1), which is the lead compound in the series, is routinely used in the clinic for the treatment of certain hematological malignancies, as well as for ovarian and breast cancers.^{4–8} In common with the anthracyclines, the mechanism by which antitumour anthracenediones exert their cytotoxic activities is multimodal and involves (1) interaction with DNA^{9–13} (preferentially at pyrimidine-3',5'-purine GC-rich sites)^{14–16} and nucleic acid condensation,¹⁷ (2) inhibition of topoisomerase II activity leading to DNA cleavage,^{18,19} and (3) production of DNA damaging free radicals.^{20–23} As with many DNA intercalating drugs (such as anthracyclines or amsacrine), topoisomerase II-dependent DNA cleavage is thought to be the critical event responsible for the anticancer activity; whereas, free radical-mediated DNA cleavage is probably more closely related to the cardiotoxic side effects of mitoxantrone.²⁴ In the past 10 years numerous anthracenedione derivatives have been synthesized with the aim of finding related compounds showing better therapeutic efficacy together with fewer side effects.^{25–27} The chemical modifications of mitoxantrone, which have commonly been considered, concern either the nature and position of the aminoacyl side chains^{28–35} or the chromophore unit (e.g., azaanthracenediones, anthrapyrazoles).^{36–39} An alternative strategy involves attaching the anthraquinone chromophore to a metal complex capable of triggering DNA cleavage. Anthra-

quinone derivatives linked to the copper-chelating peptides GGH and GHK have been synthesized previously.^{40–42} A conjugate bearing two GGH•Cu^{II} moieties at positions 1 and 4 of the anthracenedione chromophore has shown potent cytotoxic activity *in vitro* and was found to be more active than mitoxantrone against P388 leukemia in mice.⁴² The antitumour activity of the anthraquinone–bis(GGH•Cu^{II}) hybrid molecule was attributed to its propensity to bind tightly to DNA and to induce DNA cleavage via the production of oxygen-based free radicals. These promising results, together with findings reported by us and others on acridine–metal complexes^{43–46} and bleomycin models,^{47–49} suggest that the concept of attaching a metal complex to an intercalating chromophore is valid and warrants further development.

In the present article, we report the synthesis of novel aminoalkylamino 1,4-anthracene-9,10-diones substituted with one or two tetradentate copper- and nickel-chelating ligands structurally related to salen [bis(salicylidene)ethylenediamine].⁵⁰ Complexes of salen with Ni^{II} or Cu^{II} (but also Mn^{II}) can induce DNA cleavage under reducing conditions.^{51–54} The linkage of salen•metal complexes to the side chains of mitoxantrone are expected to confer DNA cleaving properties in much the same way as previously shown with GGH–anthraquinone conjugates. Here we describe the DNA-binding and cleaving properties, the effects on topoisomerase II *in vitro*, and the production of oxygen radical species by the Cu^{II} or Ni^{II} complexes of the mono- and bis-substituted anthraquinone–salen conju-

gates (Fig. 1). Preliminary biological studies comparing the cytotoxic activities of the conjugates with those of the parent compounds towards a human KB cell line are also provided.

Results

Chemistry

The synthesis of the salen•Cu^{II} complex **6** has recently been reported.⁵⁵ A similar strategy was used to synthesize the salen•Ni^{II} complex **8** (Scheme 1). Briefly, treatment of the commercially available *N*α-*Z*-*N*ε-Boc-L-lysine (**1**) with ethyl chloroformate in ammonia-saturated THF gave the carboxamide **2**, which was then dehydrated with trifluoroacetic anhydride in the presence of triethylamine to provide the nitrile **3**. Hydrogenation of **3** over Raney nickel gave the asymmetric α,β diamine **4**.⁵⁶ The benzyloxycarbonyl (*Z*) protecting group was cleaved during this reaction (hydrogenolysis). The α,β diamine **4** was then condensed with salicylaldehyde in the presence of cuprous acetate monohydrate or nickel acetate tetrahydrate to afford the Boc¹-protected copper and nickel complexes **5** and **7**, respectively. The Boc¹-protecting group of compounds **5** and **7** was removed under acidic conditions to yield the corresponding amines **6** and **8**.

The chemical procedure outlined in Scheme 1 has general applicability for other amino acids.

The synthesis of the anthraquinone–salen conjugates is depicted in Scheme 2. The anthracenedione **11** and dihydroxyanthracenedione **13** were prepared by condensation of leucoquinizarine **9** or 5,8-dihydroxy-leucoquinizarine **10** with Boc¹-ethylenediamine followed by air oxidation of the dihydro intermediates, as previously described.⁴² The mono-substituted anthraquinone derivatives are also formed during the reaction, but only the non-hydroxylated mono-substituted compound **12** could be isolated and purified by column chromatography. Cleavage of the Boc¹-protecting group from the mono- and bis-substituted aminoethylamino-anthraquinones **11**–**13** afforded compounds **14**–**16**, which were then treated with succinic anhydride in the presence of pyridine to produce the corresponding succinyl-aminoethylamino-anthraquinone derivatives **17**–**19**. Finally, the anthraquinone–salen•Cu^{II} complexes **20**, **21**, and **22** were obtained by condensation of the anthraquinones **17**, **18**, or **19** with the salen•Cu^{II} complex **6** via a conventional coupling procedure using dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt). The same method was applied using the salen•Ni^{II} complex **8** to obtain the anthraquinone–salen•Ni^{II} conjugates **23** and **24**. Various methods were tried to synthesize the non-hydroxylated anthraquinone substituted with two salen•Ni^{II} complexes, but this compound could not be obtained.

Binding to DNA

Two DNA fragments of 117 and 265 base pairs were cut from plasmid pBS with the restriction enzymes *Eco*RI and *Pvu*II; each was prepared with one of the complementary strands labelled at the 3'-end with ³²P. DNase I was allowed to cleave the DNA fragment alone or after prior equilibration with the drugs under test. A typical autoradiogram from such an experiment, applied to the water-soluble anthraquinone derivatives **14** and **16**, is presented in Figure 2. With both compounds, the relative pattern of cleavage differs substantially from that seen in the drug-free (control) lanes, and there are several regions where the susceptibility to DNAase I cutting is significantly reduced (footprints). This convincingly demonstrates that both anthracenediones bind to DNA in a sequence-selective fashion. Band intensities from the different gel lanes were measured by densitometry and converted into differential cleavage plots (not shown). In agreement with the results reported for mitoxantrone,¹⁴ we found that the cleavage at GC-rich sequences is often reduced, such as at the sequence GCATGCCTGC between nucleotide positions 39 and 48; whereas, regions of enhanced cleavage (sometimes quite pronounced) occur mainly at AT-rich sequences such as the octanucleotide AATTAAC between positions 73 and 79. The two anthraquinones differ little as regards their selectivity, but it is frequently the case that footprints are slightly more pronounced with the dihydroxy anthraquinone **16** than with analogue **14**,

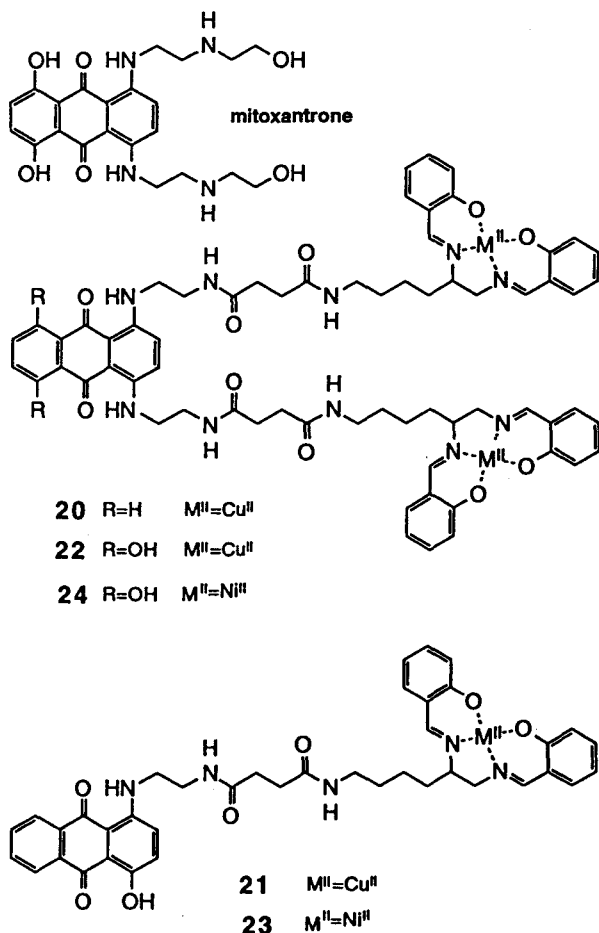
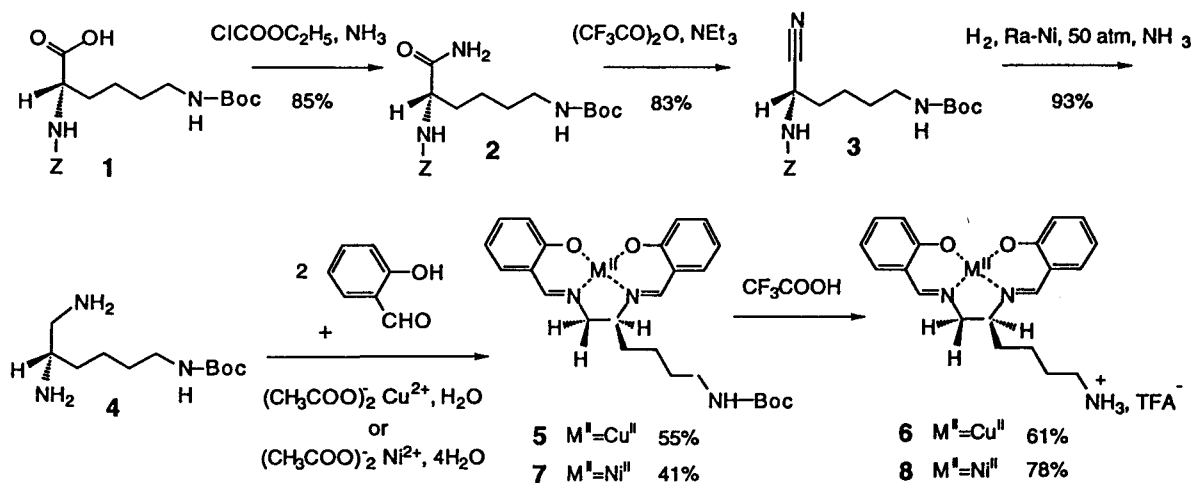


Figure 1. Chemical structure of mitoxantrone and the salen–anthraquinone conjugates.



Scheme 1.

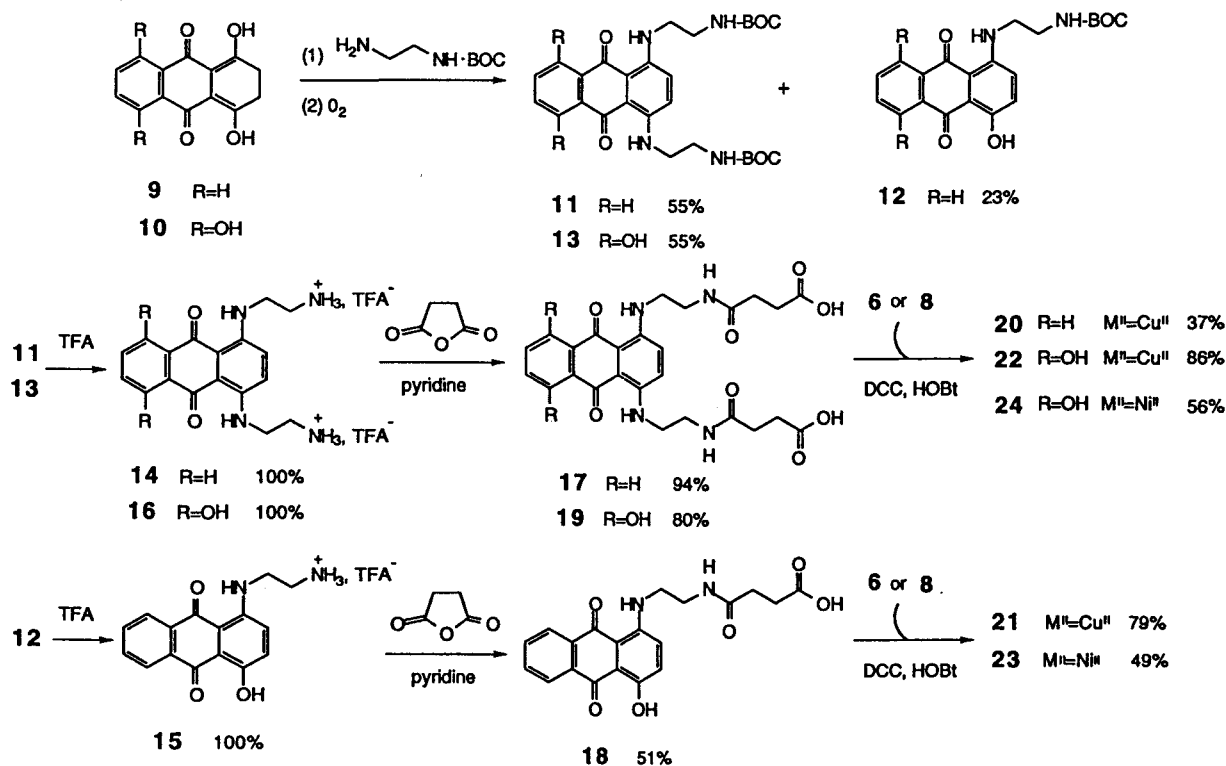
which lacks the OH groups on the anthraquinone chromophore. The footprinting data are consistent with preferred binding of the two anthraquinones to sequences containing the trinucleotides 5'-(A/T)CG or 5'-(A/T)CA, which are the consensus sequences recently determined for mitoxantrone.¹⁶

The salen•Ni^{II} complex **8** does not recognize any particular nucleotide sequence in DNA, but linkage to the anthraquinone chromophore confers sequence selectivity. The anthraquinone-(bis-salen)•Ni^{II} conjugate **24** and, to a lesser extent, its mono-substituted counterpart **23** exhibit a preference for GC-rich

regions, such as the sequence 5'-ACGACGG around position 40 (Fig. 3). By contrast, no inhibition of cleavage by DNase I could be detected with any of the salen•Cu^{II} complexes, whether the copper complex was attached to the anthraquinone chromophore or not. The chemical nature of the chelated metal apparently influences the recognition of particular DNA sequences by the anthraquinones.

DNA cleaving properties

Strand scission was analyzed by monitoring the conversion of supercoiled plasmid DNA (form I) to nicked



Scheme 2.

circular molecules (form II) and linear DNA (form III). The tests were performed under aerobic conditions in the presence of a reducing agent, 2-mercapto-propionic acid (MPA) for the copper complexes and KHSO_5 (oxone) for the nickel complexes. None of the drugs can cleave DNA in the absence of a reducing agent. Although it has been reported that $\text{salen}\cdot\text{Ni}^{\text{II}}$ complexes can induce DNA cleavage when activated with oxone,⁵³ we could not detect any cutting of plasmid DNA with the nickel complexes **8**, **23**, and **24**. This is not really surprising since in previous studies with $\text{salen}\cdot\text{Ni}^{\text{II}}$ complexes, cleavage was observed at

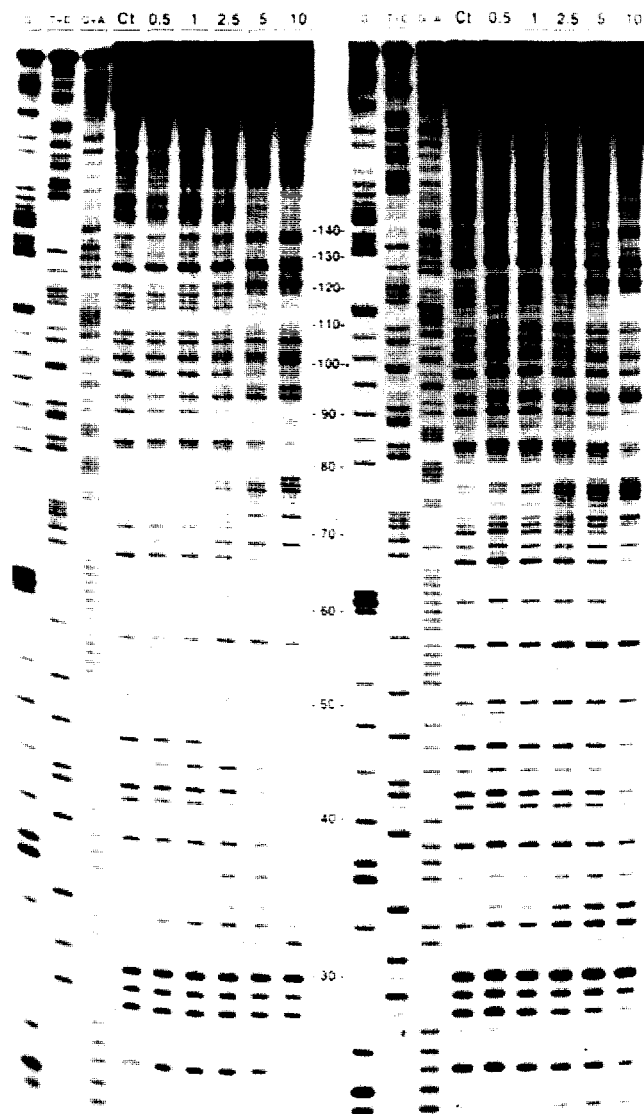


Figure 2. DNase I footprinting with the 265-mer *PvuII-EcoRI* fragment of the plasmid pBS in the presence of various concentrations of the anthraquinone derivatives **16** (left panel) and **14** (right panel). The DNA was 3'-end labelled at the *EcoRI* site with $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP in the presence of AMV reverse transcriptase. Products of DNase I digestion were resolved on an 8% polyacrylamide gel containing 8 M urea. The concentration (mM) of the drug tested is shown at the top of each gel lane. Control tracks labelled 'Ct' contained no drug. The tracks labelled T+C, G+A, and G represent Maxam-Gilbert sequencing markers specific for pyrimidine, purine, and guanine residues, respectively. Numbers between the two panels refer to the published nucleotide sequence of the fragment.⁶²

single-stranded regions of DNA (bulges and hairpins), but not within the B-form double-stranded helix.^{52,53,57} By contrast, the $\text{salen}\cdot\text{Cu}^{\text{II}}$ complexes cleave DNA very efficiently (Fig. 4). Cutting of the plasmid by the $\text{salen}\cdot\text{Cu}^{\text{II}}$ ligands is most efficient when the activation is performed with mercaptopropionic acid (MPA), which is also the reagent of choice for DNA cleavage by phenanthroline- Cu^{II} complexes.^{58,59} Much weaker cutting was observed using dithiothreitol, and very little cleavage at all was seen using hydrogen peroxide (data not shown).

Incubation of the plasmid for 2 h at 37°C with increasing concentrations of the $\text{salen}\cdot\text{Cu}^{\text{II}}$ compound **6** causes conversion of form I to the nicked form II, but even with a drug concentration as high as 200 μM a small fraction of the supercoiled plasmid remains intact (Fig. 4, panel A). The $\text{salen}\cdot\text{Cu}^{\text{II}}$ compounds equipped with an anthraquinone chromophore are much more active than **6**, which lacks the intercalating moiety.

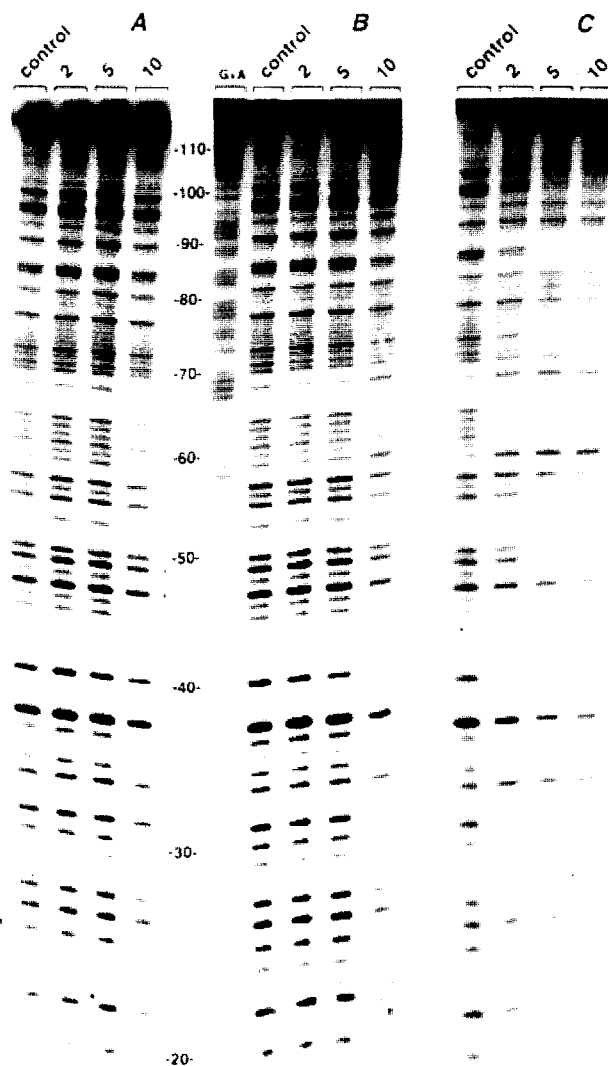


Figure 3. DNase I footprinting with the 3'-end labelled 117-mer fragment of the plasmid pBS in the presence of the $\text{salen}\cdot\text{Cu}^{\text{II}}$ complex **8** (a) and the anthraquinone- $\text{salen}\cdot\text{Ni}^{\text{II}}$ conjugates **23** (b) and **24** (c). Other details as for Figure 2.

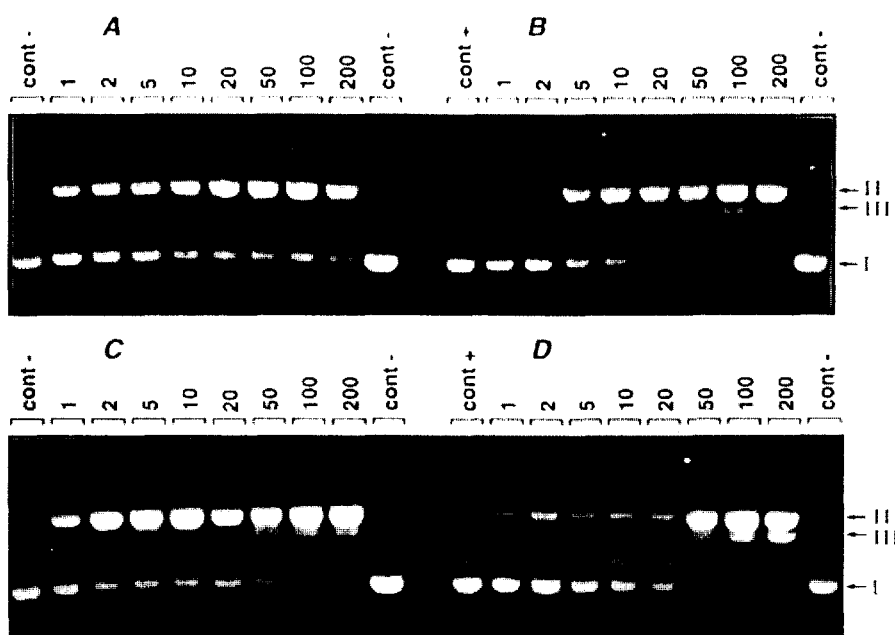


Figure 4. Cleavage of closed circular pUC12 DNA (form I) by the salen•Cu^{II} complex 6 (A) and the anthraquinone-salen•Cu^{II} conjugates 18 (B), 19 (C), and 17 (D) in the presence of 2-mercaptopropionic acid (MPA) as reducing agent. Forms II and III refer to the nicked and linear DNA forms, respectively. The drug concentration (μM) is indicated at the top of each gel lane. Control lanes marked cont+ and cont- refer to the plasmid DNA incubated without drug in the presence and absence of MPA, respectively.

Indeed, with the three conjugates 20, 21, and 22 (Fig. 4, panels B, C, and D), a concentration of 50 μM is sufficient to cause the complete conversion of form I to form II. A small amount of linear DNA (form III) can be detected at high concentrations, particularly with the (bis-salen)-anthraquinone conjugates 20 and 22. The appearance of linear DNA is attributed to the accumulation of single-stranded cleavages rather than to double-stranded cleavage. Introduction of a second salen•Cu^{II} complex on to the anthraquinone chromophore slightly reinforces the extent of DNA cleavage, but the presence or absence of the hydroxyl group on the anthraquinone ring apparently has little, if any, effect on the cutting efficiency. The anthraquinone-salen•Cu^{II} conjugates, thus, represent efficient tools for single-strand cleavage of DNA.

Oxygen radical species are most likely to be responsible for DNA cleavage by the salen•Cu^{II} complexes, as judged from ESR studies using 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) as a spin-trapping agent. DMPO was added to the salen•Cu^{II} compounds in an Me₂SO solution saturated with oxygen. Figure 5 [(b) and (c)] shows ESR spectra characteristic of DMPO-OH adducts (hyperfine splitting 1:2:2:1; $a_N = a_H = 14.87$ G). No such ESR signal was observed in the absence of the salen•Cu^{II} complex [Fig. 5(a)] nor with the salen•Ni^{II} complexes. The ESR signals obtained with the salen•Cu^{II} compound 6 and the anthraquinone-salen•Cu^{II} conjugates 17–19 are very similar, indicating that the different copper complexes produce roughly equal amounts of oxygen-based radicals. We did not observe any signal characteristic of the DMPO-CH₃ adduct (a signal consisting of six lines with equal intensities), which would be expected from

the trapping of CH₃ radicals formed by the reaction of Me₂SO with hydroxyl radicals OH[•]. We therefore conclude that the DMPO-OH adducts detected by ESR arise from the decomposition of DMPO-OOH adducts, which speaks for the production of superoxide anions O₂^{•-}.

The postulated mechanism of DNA cleavage by the salen•Cu complex in the presence of MPA involves reduction of salen•Cu^{II} to salen•Cu^I which reacts with O₂ to give O₂^{•-} followed by the formation of H₂O₂. H₂O₂ would decompose upon reaction with DNA-bound salen•Cu^I to yield OH[•] radicals capable of reacting with the deoxyribose residues of the DNA.

DNA-cleavage experiments were also performed with the ³²P labelled 117-mer and 265-mer DNA fragments

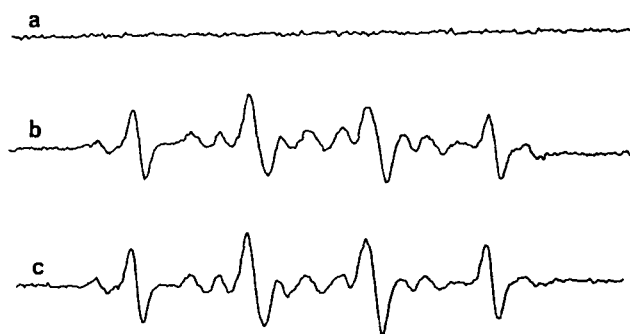


Figure 5. ESR spectra of DMPO adducts obtained from oxygenated aqueous solutions of DMPO in the absence (a) and presence of the salen•Cu^{II} complex 6 (b) and the anthraquinone-salen•Cu^{II} conjugate 22 (c). The drug solution (and the control) was bubbled with O₂ for 4 min prior to adding the DMPO. Experimental conditions: time constant 0.25 s, gain 1.25×10^4 , microwave frequency 9.44 GHz.

used for footprinting to determine whether the anthraquinone-salen•Cu^{II} conjugates induce random or sequence-dependent breaks in DNA. The drugs were incubated with the radioactively labelled DNA, followed by MPA to initiate the cleavage reaction. After 2 h of incubation, the DNA cleavage products were separated on a denaturing polyacrylamide gel. No cleavage sites could be detected with the KHSO₅-activated salen•Ni^{II} complexes; whereas, with the MPA activated salen•Cu^{II} complexes, weak cleavage was found to occur at random, independent of the DNA sequence (data not shown). This result is entirely consistent with non-specific binding of the anthraquinone-salen•Cu^{II} conjugates to DNA as determined by footprinting.

Effects on topoisomerases in vitro

The effects of the salen-anthraquinone conjugates and their parent compounds on topoisomerase I and II (both purified from calf thymus) were studied using the ³²P labelled 4330 bp *EcoRI-HindIII* fragment of pBR322 as a substrate. The DNA cleavage products were analyzed by agarose gel electrophoresis under alkaline conditions (for topoisomerase I) or neutral conditions (for topoisomerase II). Drugs were tested at different concentrations varying from 0.1 to 100 μM. The inhibitory potency of the compounds was assessed by inspection of the autoradiograms and by comparing the cleavage of DNA by the enzyme in the absence and presence of the drug. The minimum drug concentration required to detect a stimulation of DNA cleavage is indicated in Table 1. Practically none of the compounds inhibit topoisomerase I. A slight induction of DNA cleavage was observed with the dihydroxy-anthraquinone **16** and the mono-salen-anthraquinone **21**, but the effect is rather modest compared with the effect obtained with the reference topoisomerase I inhibitor camptothecin.⁶⁰ The salen-free anthraquinone derivatives **14** and **16** stimulate topoisomerase II-mediated

DNA cleavage at 1 and 0.1 μM, respectively, although the concentration required to detect stimulation of cleavage is much higher than the concentration of mitoxantrone required to produce the same extent of cleavage (0.01 μM). The salen•Cu^{II} and salen•Ni^{II} complexes **6** and **8**, lacking the anthraquinone moiety, exert absolutely no effect on topoisomerase II. The linkage of the salen•metal complex to the anthraquinone chromophore significantly decreases the capacity of the drug to interfere with topoisomerase II, since stimulation of DNA cleavage with the salen conjugates **20** and **21** lacking the hydroxy groups on the anthraquinone ring could be detected only at the highest drug concentration (100 μM). However, cleavage stimulation was observed at concentrations as low as 1 μM with the two (bis-hydroxy)anthraquinone-salen Cu^{II} and Ni^{II} complexes **22** and **24**.

Cytotoxic activity

The cytotoxicity of the test drugs was examined using KB human epidermoid carcinoma cells exposed to each agent for 4 days. IC₅₀ values are collated in Table 1. The anthracenedione derivatives **14** and **16** are about tenfold less cytotoxic than mitoxantrone and this is surely connected with the observation that they are tenfold less active on topoisomerase II in vitro than mitoxantrone. At first sight, it is tempting to speculate that the cytotoxic activities of the salen-containing compounds correlate with their capacity to stimulate DNA cleavage by topoisomerase II. Both the salen•metal complexes **6** and **8** and the salen-anthraquinone conjugate **20**, which fail to inhibit topoisomerase II, are not cytotoxic; whereas, the salen-anthraquinone conjugates **22** and **24**, which can stimulate DNA cleavage by topoisomerase II, kill the cells very efficiently. However, the anthraquinone **21** attached to only one salen•Cu^{II} complex is also cytotoxic, yet it has no effect on topoisomerases. For the anthraquinone-salen•Ni^{II} complex **23**, the cytotoxic activity may result from the additive effect against topoisomerases I and II.

Table 1. Effects on topoisomerases I and II in vitro, and cytotoxicity of the salens and anthraquinone-salen conjugates towards KB human carcinoma cells

	MIC (μM) ^a		IC ₅₀ (μM) ^b
	Topo-I	Topo-II	
6	>100	>100	>10
8	>100	>100	>10
14	>100	1	0.03
16	10	0.1	0.01
20	>100	100	>10
21	10	100	0.2
22	>100	1	0.3
23	>100	>100	1
24	>100	1	0.3
Mitoxantrone	>100	0.01	0.003
Camptothecin ^c	0.01	>100	0.016

^aMinimum drug concentration required to stimulate DNA cleavage by topoisomerase.

^bDrug concentration that inhibits cell growth by 50% after incubation for 96 h. Each drug concentration was tested in quadruplicate.

^cData from ref 61.

Discussion

The results reported here show that linkage to the salen•metal complex diminishes the cytotoxicity of the anthraquinone derivatives. They therefore contrast with the results previously obtained with anthraquinone-peptide•Cu^{II} conjugates.⁴² Attachment of the salen•Cu^{II} complex to the anthraquinone chromophore can confer DNA cleaving properties (at least in vitro), but this is at the expense of cytotoxic activity. The reduced ability of the conjugates to interfere with topoisomerase II, compared with the metal-free anthraquinone derivatives, may account for their reduced cytotoxic potential. Other factors such as changes in the redox potential, inappropriate metabolic activation, cellular distribution, and/or cellular uptake may also be involved. The nature of the metal chelated by the salen moiety influences the capacity of a

particular anthraquinone-salen conjugate to bind to DNA and cleave it. The selectivity for binding to GC-rich sequences conferred by the anthraquinone moiety is retained with the nickel complexes, but not with the copper complexes. Despite the observation that the conjugates **22** and **24** exhibit moderate cytotoxic activity and inhibit topoisomerase II, anthraquinone-salen•Cu^{II} hybrid molecules apparently are not very promising as antitumour agents, but they might turn out to be interesting as DNA cleavers. Salen•Cu^{II} complexes equipped with an intercalating chromophore such as compounds **20** and **22**, which efficiently cleave double-stranded DNA irrespective of its primary nucleotide sequence, might be used as probes for investigating DNA structure and/or the sequence-specificity of protein-DNA interactions. Studies currently under way will determine whether anthraquinone-salen conjugates complexed with various divalent metals such as Cu^{II} or Mn^{II} can be employed as footprinting agents as is the case with other metal chelates attached to an intercalating drug (e.g., methidiumpropyl-EDTA•Fe^{II}, acridine-EDTA•Fe^{II}).

Experimental

Synthesis

The purity of all compounds was assessed by TLC, ¹H and ¹³C NMR, and MS. Kieselgel 60 (004-0063 mesh, Merck) was used for flash chromatography. TLC was carried out using Silica Gel 60F-254 (Merck, 0.25 mm thick) precoated UV sensitive plates. Spots were visualized by inspection under visible light or UV at 254 nm. Melting points were determined in a Thermopan hot plate microscope and are uncorrected. ¹H NMR spectra were recorded on a Bruker AM 300 WB. Chemical shifts were measured from tetramethylsilane as an internal reference and are given in δ ppm units; coupling constants (*J*) are given in Hz. IR spectra were measured with a Perkin-Elmer 1310 spectrophotometer using KBr pellets, and only the principal sharp peaks are given. FABMS were determined on a Kratos MS-50 RF mass spectrometer arranged in EBE geometry. Samples were 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 3000. IE mass spectra were determined on a quadrupolar spectrometer Ribermag R10-10 with a kinetic energy of 70 eV. Optical rotations were measured with a Perkin-Elmer polarimeter (Model 241).

Nα-Z-Nε-Boc-L-lysynamide (2). A solution of *Nα-Z-Nε-Boc-L-lysine* (**1**, 2 g, 5.26 mmol), NEt₃ (0.74 mL, 5.31 mmol) and ethyl chloroformate (0.55 mL, 5.75 mmol) in dry THF (30 mL) was stirred under argon at -10 °C for 45 min. Ammonia-saturated THF (30 mL) was added and the mixture was stirred for 1 h at -10 °C and then overnight at room temperature. The solvent was removed by distillation under reduced pressure and the residue was dissolved in EtOAc (150

mL). The organic layer was washed with 1 N Na₂CO₃ (100 mL) and water (100 mL). After drying over Na₂SO₄ and filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure. Compound **2** was obtained as a white solid (1.7 g, 85%): mp 141-142 °C; [α]_D²⁵ -1.75 (c 4, MeOH); IR (KBr): ν 3370-3310, 3200, 2965, 1680, 1655, 1535 cm⁻¹; EI-MS: 380 (M+1)⁺; R_f (MeOH:CHCl₃, 20:80), 0.74; ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.4 (s, 9H), 1.47 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 3.06 (m, 2H), 4.15 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 5.75 (m, 2H), 6.40 (m, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 22.6 (CH₂), 28.40 (CH₃), 29.43 (CH₂), 40.02 (CH₂), 44.38 (CH₂), 64.64 (CH₂), 77.32 (CH), 78.96 (Cq), 126.88 (CH), 127.23 (CH), 141.41 (Cq), 156.33 (Cq). Anal. calcd for C₁₉H₂₉N₃O₅: C, 60.16; H, 7.65; N, 11.08. Found: C, 59.98; H, 7.62; N, 11.07.

(S)-1-Cyano-N-[benzyloxycarbonyl]-N'-[tert-butylloxycarbonyl]-1,5-diaminopentane (3). A solution of **2** (1.6 g, 4.21 mmol), NEt₃ (1.4 mL, 10.04 mmol) in THF (20 mL) was stirred under argon at 0 °C. Trifluoroacetic anhydride (0.7 mL, 4.95 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 1 h at 0 °C, then overnight at room temperature. The solvent was removed by distillation under reduced pressure and the residue was dissolved in Et₂O (150 mL). The organic layer was washed in turn with 0.1 N HCl (100 mL), 0.1 N NaOH (100 mL), and water (100 mL). After drying over Na₂SO₄ and filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure. Compound **3** was obtained as a white solid (1.26 g, 83%): mp 81-82 °C; [α]_D²⁵ -27 (c 4, MeOH); IR (KBr): ν 3370, 2965, 1715, 1690, 1540 cm⁻¹; EI-MS: 362 (M+1)⁺; R_f (MeOH:CHCl₃, 20:80), 0.85; ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.38 (m, 11H), 1.47 (m, 4H), 3.10 (m, 2H), 4.53 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 5.76 (m, 2H), 7.34 (m, 5H); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 21.27 (CH₂), 28.37 (CH₃), 29.38 (CH₂), 32.11 (CH₂), 39.42 (CH₂), 42.65 (CH), 67.63 (CH₂), 79.49 (Cq), 118.61 (Cq), 128.35 (CH), 128.59 (CH), 135.66 (Cq), 156.38 (Cq), 155.39 (Cq). Anal. calcd for C₁₉H₂₇N₃O₄: C, 63.16; H, 7.48; N, 11.63. Found: C, 63.28; H, 7.46; N, 11.59.

(S)-6-(tert-Butyloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane (4). A solution of **3** (500 mg, 1.38 mmol) containing Raney nickel (1 g) in ammonia saturated MeOH (20 mL) was stirred under 50 hydrogen atmosphere at 50 °C for 24 h. The reaction mixture was filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure to give compound **4** as a pink solid (0.3 g, 93%): mp 46-48 °C; IR (KBr): ν 3200-3600, 2800-2900, 1690, 1540 cm⁻¹; EISM 232 (M+1)⁺; R_f (MeOH:CHCl₃, 40:60), 0.15; ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.3-1.6 (m, 15H), 1.88 (m, 2H), 2.7-3.1 (m, 3H), 5.23 (m, 4H), 7.32 (m, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 22.28 (CH₂), 23.74 (CH₂), 28.43 (CH₃), 29.43 (CH₂), 32.66 (CH₂), 39.78 (CH₂), 50.50 (CH), 79.04 (Cq), 156.25 (Cq); Anal. calcd for C₁₁H₂₅N₃O₂: C, 57.14; H, 10.82; N, 18.18. Found: C, 57.25; H, 10.78; N, 18.13.

(S)-N,N'-(Bis-salicylidene)-6-(tert-butylloxycarbonyl)-1,2,6-triaminohexane copper complex (5). A solution of **4** (0.3 g, 1.3 mmol), salicylaldehyde (0.65 mL, 6.10 mmol) in dry EtOH (25 mL) and copper(II) acetate

monohydrate (0.57 g, 3.05 mmol in 5 mL of water) was refluxed under argon for 4 h. The solvent was distilled under reduced pressure and the residue was triturated with CH_2Cl_2 . After filtration of the copper salts, the solvent was evaporated under reduced pressure. Compound **5** was recrystallized from ethanol:water (0.36 g, 55%): mp 135–136 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -25 (c 0.04, MeOH); IR (KBr): ν 3400, 3370, 2950, 1715, 1615 cm^{-1} ; MS (FAB+): 501(M+1)⁺, 1002 (2 × (M+1))⁺; R_f (MeOH), 0.00; ESR: $A_{||}$ 192.5 G, $g_{||}$ 2.22. Anal. calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{Cu}$: C, 59.94; H, 6.19; N, 8.39. Found: C, 59.76; H, 6.17; N, 8.42.

(S)-N,N'-(Bis-salicylidene)-1,2,6-triaminohexane trifluoroacetic acid copper complex (**6**). Trifluoroacetic acid (1.01 mL, 11.41 mmol) was added dropwise at room temperature to a solution of **5** (0.1 g, 0.19 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL) containing anisole (5 μL , 0.04 μmol). The resulting mixture was stirred for 30 min and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in EtOH and the solvent evaporated to dryness several times. Compound **6** was recrystallized from EtOH as a green solid (60 mg, 61%): mp 158–160 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -8 (c 0.05, DMSO); IR (KBr): ν 3200, 1620 cm^{-1} ; MS (FAB+): 401 (M-CF₃CO₂)⁺, 802 (2 × (M))⁺; R_f (MeOH), 0.00; ESR: $A_{||}$ 191.25 G, $g_{||}$ 2.23. Anal. calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4\text{F}_3\text{Cu}$: C, 51.31; H, 4.66; N, 8.16. Found: C, 51.20; H, 4.64; N, 8.13.

(S)-N,N'-(Bis-salicylidene)-1,2,6-triaminohexane nickel complex (**7**). A solution of **4** (0.4 g, 1.72 mmol), salicylaldehyde (0.65 mL, 6.10 mmol) in dry EtOH (25 mL) and nickel(II) acetate tetrahydrate (1.6 g, 6.42 mmol) was refluxed under argon for 3 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude material was recrystallized from Et₂O to give compound **7** as an orange solid (0.35 g, 41%): mp 135–137 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -52 (c 0.05, DMSO); IR (KBr): ν 3300, 2900, 1715, 1640 cm^{-1} ; MS (FAB+): 496 (M+1)⁺, 991 (2 × (M+1))⁺; R_f (MeOH), 0.00; ¹H NMR (acetone-*d*₆): δ 1.36 (m, 11H), 1.55 (m, 2H), 1.87 (m, 2H), 3.03 (m, 2H), 3.20 (m, 1H), 3.39 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 5.96 (m, 1H), 6.48 (m, 2H), 6.75 (m, 2H), 7.16 (m, 4H), 7.80 (s, 2H); ¹³C NMR (acetone-*d*₆): δ 28.09 (CH₂), 34.12 (CH₂, CH₃), 40.53 (CH₂), 45.03 (CH₂), 67.60 (CH₂), 73.46 (CH), 85.89 (Cq), 120.59 (CH), 125.58 (CH), 126.11 (Cq), 137.71 (CH), 137.98 (CH), 138.58 (CH), 167.00 (CH), 168.00 (CH), 170.38 (Cq). Anal. calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{Ni}$: C, 60.52; H, 6.25; N, 8.47. Found: C, 60.64; H, 6.23; N, 8.51.

(S)-N,N'-(Bis-salicylidene)-1,2,6-triaminohexane trifluoroacetic acid nickel complex (**8**). Trifluoroacetic acid (1.01 mL, 11.41 mmol) was added dropwise at room temperature to a solution of **7** (0.2 g, 0.4 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL) containing anisole (5 μL , 0.04 μmol). The mixture was stirred for 30 min and then evaporated to dryness. The residue was dissolved in EtOH and the solvent evaporated to dryness several times. Compound **8** was crystallized as an orange hygroscopic solid from EtOH (0.16 g, 78%): mp 150–152 °C; IR (KBr): ν 3200, 1640 cm^{-1} ; MS

(FAB+): 396 (M-CF₃CO₂)⁺; $[\alpha]_D^{25}$ -49 (c 0.05, DMSO); R_f (MeOH), 0.00; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.35 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.69 (m, 2H), 2.77 (m, 2H), 2.88 (m, 1H), 3.09 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 6.49 (m, 2H), 6.67 (m, 2H), 7.15 (m, 2H), 7.28 (m, 2H), 7.72 (s, 3H), 7.84 (s, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 22.09 (CH₂), 26.40 (CH₂), 26.66 (CH₂), 34.58 (CH₂), 61.88 (CH₂), 67.26 (CH), 119.66 (CH), 120.13 (Cq), 120.34 (Cq), 132.68 (CH), 133.49 (CH), 162.21 (CH), 163.06 (CH), 163.80 (Cq). Anal. calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4\text{F}_3\text{Ni}$: C, 51.79; H, 4.71; N, 8.24. Found: C, 51.68; H, 4.72; N, 8.26.

1,4-Bis[Boc-aminoethylamino]anthracene-9,10-dione (**11**) and 1-[(Boc-aminoethyl)amino]-4-hydroxyanthracene-9,10-dione (**12**). The mono- and di-substituted anthraquinones **11** and **12** were synthesized from leucoquinizarine **9** (0.8 g, 3.50 mmol) and Boc-ethylenediamine (5.28 g, 33 mmol) according to the procedure previously described.⁴² Compounds **11** and **12** were purified by flash chromatography on a silica gel.

Compound 11. Blue solid (1.02 g, 55%): mp 214–216 °C; IR (KBr) ν 3400, 2980, 1720, 1620 cm^{-1} ; MS (FAB+): 525 (M+1)⁺; R_f (CH₂Cl₂), 0.26; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.34 (s, 18 H) 3.17 (t, $J=5.8$ Hz, 4H), 3.47 (t, $J=5.9$ Hz, 4H), 7.03 (m, 2H), 7.52 (s, 2H), 7.77 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 8.21 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 10.84 (s, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 28.21 (CH₃), 39.78 (CH₂), 41.55 (CH₂), 77.79 (Cq), 108.67 (Cq), 124.34 (CH), 125.63 (CH), 132.29 (CH), 133.83 (CH), 146.03 (Cq), 155.81 (Cq), 180.70 (Cq). Anal. calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$: C, 64.12; H, 6.97; N, 10.68. Found: C, 63.99; H, 6.99; N, 10.65.

Compound 12. Violet solid (0.31 g, 23%): mp 167–168 °C; IR (KBr): ν 3400, 2990, 1710, 1620 cm^{-1} ; MS (FAB+): 383 (M+1)⁺; R_f (CH₂Cl₂), 0.85; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.34 (s, 9H), 3.18 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 3.47 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 7.04 (m, 1H), 7.29 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J=9.7$ Hz, 2H), 7.85 (m, 2H), 8.20 (m, 2H), 10.26 (s, 1H), 10.43 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 28.18 (CH₃), 39.67 (CH₂), 41.57 (CH₂), 77.80 (Cq), 107.43 (Cq), 112.76 (Cq), 125.17 (CH), 125.82 (CH), 126.14 (CH), 128.45 (Cq), 131.74 (Cq), 132.75 (CH), 134.52 (CH), 134.60 (Cq), 147.27 (Cq), 155.80 (Cq), 180.51 (Cq), 186.56 (Cq). Anal. calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 65.97; H, 5.76; N, 7.33. Found: C, 65.77; H, 5.76; N, 7.85.

1,4-Bis[Boc-aminoethylamino]-5,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione (**13**). Reaction of 5,8-dihydroxyleucoquinizarine (0.94 g, 3.43 mmol) with freshly distilled Boc-ethylenediamine (4.7 g, 29.3 mmol) under the conditions previously described⁴² afforded the anthraquinone **13**, which was obtained as a blue solid after purification by flash chromatography (1.02 g, 55%): mp 187–188 °C; IR (KBr): ν 3300, 2950, 1690, 1620 cm^{-1} ; MS (FAB+): 557 (M+1)⁺; R_f (CH₂Cl₂:AcOEt, 50:50), 0.35; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.35 (s, 18 H), 3.02 (t, $J=5.9$ Hz, 4H), 3.54 (t, $J=5.8$ Hz, 4H), 7.07 (m, 2H), 7.14 (s, 2H), 7.58 (s, 2H), 10.50 (s, 2H), 10.61 (s, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 38.38 (CH₃), 45.54 (CH₂), 47.18 (CH₂), 77.46 (Cq), 83.06 (Cq), 112.61

(Cq), 120.16 (Cq), 129.54 (CH), 130.68 (CH), 152.45 (Cq), 159.78 (Cq), 188.56 (Cq). Anal. calcd for $C_{28}H_{36}N_4O_8$: C, 60.43; H, 6.47; N, 10.07. Found: C, 60.30; H, 6.46; N, 10.10.

1,4-[Aminoethylamino]anthracene-9,10-dione bis-trifluoroacetic acid (14). Trifluoroacetic acid (10 mL) was added dropwise to a well stirred solution of **6** (0.9 g, 1.71 mmol) in 10 mL of CH_2Cl_2 . The resultant mixture was maintained at room temperature for 45 min prior to evaporation of the solvent under vacuo. The crude residue was treated with ethanol to obtain compound **14** as a blue solid (0.94 g, 100%): mp 203–205 °C; IR (KBr): ν 3300, 2900, 1690 cm^{-1} ; MS (FAB+): 326 ($M+1$)⁺; R_f (MeOH), 0.00; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.08 (m, 4H), 3.73 (m, 4H), 7.51 (s, 2H), 7.83 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 8.04 (s, 6H), 8.24 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 10.64 (s, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 38.36 (CH₂), 39.58 (CH₂), 109.68 (Cq), 123.99 (CH), 125.77 (CH), 132.75 (CH), 133.68 (Cq), 145.34 (Cq), 181.56 (Cq). Anal. calcd for $C_{22}H_{22}N_4O_6F_6$: C, 47.82; H, 3.98; N, 10.14. Found: C, 47.67; H, 3.97; N, 10.11.

1-[Aminoethylamino]-4-hydroxyanthracene-9,10-dione trifluoroacetic acid (15). Treatment of **12** (0.30 g, 0.78 mmol) with trifluoroacetic acid under the same conditions as described for **14** afforded the mono-substituted anthraquinone **15** as a violet solid (0.307 g, 100%): mp 122–124 °C; IR (KBr): ν 3400, 2900, 1680 cm^{-1} ; MS (FAB+): 283 ($M-CF_3CO_2^-$)⁺; R_f (MeOH), 0.00; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.04 (m, 2H), 3.66 (m, 2H), 7.30 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J=9.7$ Hz, 1H), 7.87 (m, 2H), 8.03 (s, 3H), 8.22 (d, $J=6.9$ Hz, 2H), 10.14 (m, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 38.10 (CH₂), 39.56 (CH₂), 77.80 (Cq), 108.36 (Cq), 113.05 (Cq), 124.99 (CH), 125.99 (CH), 126.29 (CH), 128.54 (CH), 131.83 (Cq), 133.13 (CH), 134.50 (Cq), 134.77 (CH), 146.67 (Cq), 156.09 (Cq), 181.16 (Cq), 186.84 (Cq). Anal. calcd for $C_{18}H_{15}N_2O_5F_3$: C, 54.55; H, 3.81; N, 7.07. Found: C, 54.69; H, 3.85; N, 7.22.

1,4-Bis [aminoethylamino] -5,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione bistrifluoroacetic acid (16). The Boc-protecting group of compound **12** was cleaved with trifluoroacetic acid as described for **14**. Blue solid (0.31 g, 100%): mp >350 °C; IR (KBr): ν 3400, 2900, 1680 cm^{-1} ; MS (FAB+): 358 (M)²⁺; R_f (MeOH), 0.00; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.07 (m, 4H), 3.75 (m, 4H), 7.20 (s, 2H), 7.55 (s, 2H), 8.01 (s, 6H), 10.42 (s, 2H), 13.46 (s, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 38.26 (CH₂), 39.75 (CH₂), 108.43 (Cq), 114.55 (Cq), 124.73 (CH), 124.95 (CH), 146.34 (Cq), 154.76 (Cq), 184.23 (Cq). Anal. calcd for $C_{22}H_{22}N_4O_8F_6$: C, 45.20; H, 3.76; N, 9.59. Found: C, 45.13; H, 3.77; N, 9.61.

1,4-Bis[2-(succinylaminoethyl)amino]anthracene-9,10-dione (17). Succinic anhydride (0.73 g, 6.18 mmol) and 10 mL of pyridine were added dropwise to a solution of **14** (0.96 g, 1.73 mmol) in DMF (15 mL). The mixture was stirred at reflux for 3 h. The solvent was evaporated and the crude residue was dissolved in

1 N HCl (80 mL) and stirred for 15 min. Compound **17** was collected by filtration and successively washed with EtOAc (50 mL) and Et₂O (50 mL, 0.86 g, 94%): mp 179–180 °C; IR (KBr) ν 3400, 2900, 1715, 1640 cm^{-1} ; MS (FAB+): 525 ($M+1$)⁺; R_f (MeOH), 0.83; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 2.33 (t, $J=6.9$ Hz, 4H), 2.43 (t, $J=7.4$ Hz, 4H), 3.28 (t, $J=5.6$ Hz, 4H), 3.49 (t, $J=5.4$ Hz, 4H), 7.55 (s, 2H), 7.77 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 8.15 (m, 2H), 8.22 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 10.80 (s, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 29.09 (CH₂), 29.98 (CH₂), 38.77 (CH₂), 41.27 (CH₂), 108.69 (Cq), 124.41 (CH), 125.67 (CH), 132.31 (CH), 133.81 (Cq), 145.98 (Cq), 171.57 (Cq), 173.83 (Cq), 181.13 (Cq). Anal. calcd for $C_{26}H_{28}N_4O_8$: C, 59.54; H, 5.38; N, 10.68. Found: C, 59.72; H, 5.39; N, 10.82.

1-[2-(Succinylaminoethyl) amino]-4-hydroxyanthracene-9,10-dione (18). Succinic anhydride (0.10 g, 0.84 mmol) and 1.5 mL of pyridine were added dropwise to a solution of **15** (0.15 g, 0.37 mmol) in DMF (15 mL). The solution was stirred at reflux for 3 h prior to evaporation of the solvent. The resulting crude residue was dissolved in 10% citric acid (50 mL) and stirred for 15 min. Compound **18** was collected by filtration and successively washed with AcOEt (10 mL) and Et₂O (10 mL; 0.73 mg, 51%): mp 181–183 °C; IR (KBr): ν 3400, 2900, 1740, 1640 cm^{-1} ; MS (FAB+): 383 ($M+1$)⁺; R_f (MeOH), 0.72; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 2.29 (t, $J=6.3$ Hz, 4H), 2.42 (t, $J=6.5$ Hz, 2H), 3.29 (m, 2H), 3.49 (m, 2H), 7.36 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 7.90 (m, 2H), 8.15 (s, 1H), 8.25 (d, $J=7.1$ Hz, 2H), 10.30 (s, 1H), 10.40 (s, 1H), 12.10 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 29.07 (CH₂), 29.97 (CH₂), 38.58 (CH₂), 41.33 (CH₂), 107.62 (Cq), 112.91 (Cq), 125.46 (CH), 125.99 (CH), 126.33 (CH), 128.72 (Cq), 131.89 (Cq), 132.98 (CH), 134.73 (CH), 147.39 (Cq), 156.18 (Cq), 171.58 (Cq), 173.81 (Cq), 180.81 (Cq), 186.79 (Cq). Anal. calcd for $C_{20}H_{18}N_2O_6$: C, 62.82; H, 4.71; N, 7.33. Found: C, 62.94; H, 4.72; N, 7.31.

1,4-Bis [2-(succinylaminoethyl)amino]-5,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione (19). Succinic anhydride (0.50 g, 4.23 mmol) and 10 mL of pyridine were added dropwise to a solution of **16** (0.86 g, 1.47 mmol) in 30 mL of DMF. The mixture was stirred at reflux for 2 h. The solvent was evaporated and the crude residue was dissolved in 1 N HCl (80 mL) and stirred for 15 min. A blue solid was collected by filtration and successively washed with AcOEt (50 mL) and Et₂O (50 mL). After drying, compound **19** was obtained as a blue solid (0.65 g, 80%): mp 241–243 °C; IR (KBr): ν 3400, 2900, 1700, 1640 cm^{-1} ; MS (FAB+): 557 ($M+1$)⁺; R_f (MeOH), 0.90; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 2.32 (t, $J=6.3$ Hz, 4H), 2.42 (t, $J=6.0$ Hz, 4H), 3.30 (t, $J=5.8$ Hz, 4H), 3.53 (t, $J=5.9$ Hz, 4H), 7.12 (s, 2H), 7.59 (s, 2H), 8.16 (m, 2H), 10.54 (s, 4H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 29.07 (CH₂), 29.98 (CH₂), 43.82 (CH₂), 46.74 (CH₂), 107.34 (Cq), 114.79 (Cq), 124.09 (CH), 124.92 (CH), 146.85 (Cq), 154.52 (Cq), 171.64 (Cq), 173.82 (Cq), 181.19 (Cq). Anal. calcd for $C_{26}H_{28}N_4O_{10}$: C, 56.11; H, 5.03; N, 10.07. Found: C, 56.22; H, 5.05; N, 10.11.

(*S,S*)-1,4-Bis[[2-[1-[4-(*N,N'*-bis-salicylidenamino)ethyl]aminobutyl]succinyl]aminoethyl]diamino]anthracene-9,10-dione bis-Cu^{II} complex (**20**). A solution of **17** (20 mg, 38.16 μmol), dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 17.3 mg, 83.84 μmol) and *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt, 11.34 mg, 83.91 μmol) in dry DMF (50 mL) was stirred at 0 °C. After 1 h, a solution of the salen•Cu^{II} complex **6** (41.19 mg, 80.05 μmol) and Et₃N (11 μL, 82.73 μmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 4 days. The solvent was removed in vacuo and the crude material was successively washed with CHCl₃ (20 mL), 10% citric acid (25 mL) and methanol (20 mL), and finally by Et₂O (30 mL). The anthraquinone-salen•Cu^{II} conjugate **20** was obtained as a black solid (18 mg, 37%): mp 174–176 °C; IR (KBr): ν 3400, 2920, 1630 cm⁻¹; MS (FAB+): 1290 (M+1)⁺; R_f (MeOH), 0.00; ESR: A_{||} 194 G, g_{||} 2.22. Anal. calcd for C₆₆H₇₀N₁₀O₁₀Cu₂: C, 61.44; H, 5.43; N, 10.86. Found: C, 61.25; H, 5.42; N, 10.82.

(*S*)-1-[[2-[1-[4-(*N,N'*-bis-salicylidenamino)ethyl]aminobutyl]succinyl]aminoethyl]amino]-4-hydroxyanthracene-9,10-dione Cu^{II} complex (**21**). Compound **21** was synthesized by coupling the acid **18** and the amine **6** using DCC-HOBt as described for **20**. (42.1 mg, 79%): mp 138–140 °C; [α]_D²⁵ < 1 (c 5 × 10⁻⁴, DMSO); IR (KBr): ν 3400, 2920, 1630, 1625 cm⁻¹; MS (FAB+): 766 (M+1)⁺; R_f (MeOH), 0.10; ESR: A_{||} 194.2 G, g_{||} 2.23. Anal. calcd for C₄₀H₃₉N₅O₇Cu: C, 62.78; H, 5.10; N, 9.15. Found: C, 62.65; H, 5.08; N, 9.11.

(*S,S*)-1,4-Bis[[2-[1-[4-(*N,N'*-bis-salicylidenamino)ethyl]aminobutyl]succinyl]aminoethyl]diamino]-5,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione bis-Cu^{II} complex (**22**). Compound **22** was synthesized by coupling the acid **19** and the amine **6** using DCC-HOBt as described for **20** (43 mg, 86%): mp 190–192 °C; IR (KBr): ν 3400, 2920, 1630, 1625 cm⁻¹; MS (FAB+): 1322 (M+1)⁺; R_f (MeOH), 0.00; ESR: A_{||} 197.5 G, g_{||} 2.22. Anal. calcd for C₆₆H₇₀N₁₀O₁₂Cu₂: C, 59.95; H, 5.30; N, 10.60. Found: C, 59.83; H, 5.32; N, 10.62.

(*S*)-1-[[2-[1-[4-(*N,N'*-bis-salicylidenamino)ethyl]aminobutyl]succinyl]aminoethyl]amino]-4-hydroxyanthracene-9,10-dione Ni^{II} complex (**23**). The mono-substituted anthraquinone-salen•Ni^{II} conjugate **23** was prepared by coupling the amine **8** with the acid **18** as described for **21**. Violet solid (36.7 mg, 49%): mp 182–183 °C; [α]_D²⁵ < 1 (c 5 × 10⁻⁴, DMSO); IR (KBr): ν 3200, 2900, 1625 cm⁻¹; MS (FAB+): 760 (M+1)⁺; R_f (MeOH), 0.20; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.00–1.70 (m, 6H), 2.27–2.35 (m, 4H), 3.00–3.60 (m, 9H), 5.58 (m, 1H), 6.48 (m, 2H), 6.66 (s, 2H), 7.11–7.76 (m, 8H), 8.22 (m, 3H), 10.28 (m, 2H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 28.81 (CH₂), 30.77 (CH₂), 33.34 (CH₂), 34.84 (CH₂), 38.09 (CH₂), 40.42 (CH₂), 41.39 (CH₂), 47.50 (CH₂), 61.85 (CH), 67.42 (CH₂), 107.62 (Cq), 112.95 (Cq), 119.77 (CH), 120.21 (CH), 120.41 (CH), 125.52 (CH), 126.03 (CH), 128.04 (Cq), 128.74 (Cq), 131.93 (Cq), 132.73 (Cq), 133.01 (CH), 133.59 (Cq), 134.76 (CH),

147.41 (Cq), 156.20 (Cq), 156.62 (Cq), 162.16 (CH), 163.12 (CH), 164.11 (Cq), 171.13 (Cq), 172.05 (Cq), 180.88 (Cq), 186.84 (Cq). Anal. calcd for C₄₀H₃₉N₅O₇Ni: C, 63.18; H, 5.13; N, 9.21. Found: C, 63.05; H, 5.11; N, 9.25.

(*S,S*)-1,4-[[2-[1-[4-(*N,N'*-bis-salicylidenamino)ethyl]aminobutyl]succinyl]aminoethyl]diamino]-5,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione bis-Ni^{II} complex (**24**). Compounds **19** (25.5 mg, 45.78 μmol) and **8** (63.1 mg, 123.96 μmol) were coupled as described for **20**. Green solid (33 mg, 56%): mp > 350 °C; IR (KBr): ν 3400, 2950, 1640, 1620 cm⁻¹; MS (FAB+) 1312 (M+1)⁺; R_f (MeOH), 0.00; ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.30–1.80 (m, 12H), 2.20–2.30 (m, 8H), 2.75 (m, 2H), 3.90–3.60 (m, 16H), 6.48 (m, 2H), 6.50 (m, 4H), 6.60 (m, 4H), 7.00–7.20 (m, 10H), 7.60 (m, 2H), 7.80 (m, 4H), 8.12 (5m, 4H), 10.54 (m, 4H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ 23.11 (CH₂), 32.20 (CH₂), 35.71 (CH₂), 37.37 (CH₂), 38.96 (CH₂), 36.61 (CH₂), 42.55 (CH₂), 43.16 (CH₂), 68.31 (CH), 115.17 (CH), 120.68 (CH), 125.27 (CH), 126.38 (CH), 129.28 (CH), 133.67 (CH), 134.50 (CH), 157.35 (CH) 163.11 (CH), 164.01 (CH). Anal. calcd for C₆₆H₇₀N₁₀O₁₂Ni₂: C, 60.79; H, 5.33; N, 10.67. Found: C, 60.74; H, 5.31; N, 10.64.

DNase I footprinting

The restriction fragments used in the footprinting and DNA cleavage experiments were purified and labelled using standard methods.⁶¹ DNase I footprinting experiments were performed essentially according to the protocol recently described.⁶² Briefly, reactions were conducted in a total volume of 10 μL. Samples (3 μL) of the labelled DNA fragment were incubated with 5 μL of buffer solution containing the desired drug concentration. After 30–60 min incubation at 37 °C to ensure equilibration, the digestion was initiated by adding 2 μL of a DNase I solution so as to yield a final enzyme concentration of ca. 0.01 unit/mL. After 3 min, the digestion was stopped by addition of 3 μL of an 80% formamide solution containing tracking dyes. Samples were heated at 90 °C for 4 min and chilled in ice for 4 min prior to electrophoresis. Electrophoresis, autoradiography and quantitation by storage phosphor imaging were performed as previously described.⁶¹

DNA cleavage

Each reaction mixture contained 4 μL of supercoiled pUC12 DNA (3 μg), 5 μL of drug (2 to 400 μM) and 1 μL of MPA (25 mM) to initiate the reaction. After 2 h incubation at 37 °C, 1 μL of loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in H₂O) was added to each tube and the solution was loaded on to a 0.9% agarose gel. Electrophoresis was carried out for about 2 h at 100 V in TBE buffer (89 mM tris-borate pH 8.3, 1 mM EDTA). Gels were stained with ethidium bromide (1 μg/mL) then destained for 30 min in water prior to being photographed under UV light.

ESR

ESR measurements were recorded on a Varian E-109 X-band spectrometer with a dual cavity operating in the TE 104 mode for analyzing the copper complexes. A 100 kHz high frequency modulation with a maximum amplitude of 8 Gauss was used with a 10 mW microwave power and g values were determined from the Varian 'strong pitch', $g=2.0028$. 10 mM solutions of salen•Cu^{II} complexes in Me₂SO were dispensed into a 4 mm diameter cylindrical quartz tube. ESR analyses were conducted at 77 K on glycerol glasses. For the spin trapping experiments, we used a cavity operating in the TM 110 mode with a maximum modulation amplitude of 1 Gauss and a 100 kHz high-frequency modulation with 10 mW microwave power. The solutions were examined in flat quartz cells inserted in an E-238 cavity. The spin-trapping agent 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO, purchased from Sigma Chem. Co.) was used at a concentration of 7 mg/mL. The post-DMPO time was 8 min.

Topoisomerase I and II DNA cleavage reaction

Topoisomerase I and topoisomerase II were purified from calf thymus using an adaptation of procedures described previously.⁶³ The cleavage reaction mixture contained 20 mM Tris HCl pH 7.4, 60 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol (plus 10 mM MgCl₂ and 1 mM ATP for topoisomerase II), 2×10^{-4} dpm of α -³²P-pBR322 DNA and the indicated drug concentrations. The reaction was initiated by the addition of topoisomerase I or II (20 units in 20 μ L reaction volume) and allowed to proceed for 10 min at 37 °C. Reactions were stopped by adding SDS to a final concentration of 0.25% and proteinase K to 250 μ g/mL, followed by incubation for 30 min at 50 °C. For topoisomerase I, samples were denatured by the addition of 10 μ L denaturing loading buffer consisting of 0.45 M NaOH, 30 mM EDTA, 15% (w/v) sucrose, 0.1% bromocresol green prior to loading onto a 1% agarose gel in TBE buffer (89 mM Tris base, 89 mM boric acid, 2.5 mM Na₂ EDTA, pH 8.3) containing 0.1% SDS. Electrophoresis was maintained at 2 V/cm for 18 h.

Cell cultures and growth inhibition assay

The KB human carcinoma cell line was obtained from the ATCC (Rockville, Maryland). Cells were grown as monolayers in Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 2 mM glutamine, 200 IU/mL penicillin, 200 μ g/mL streptomycin, 50 μ g/mL gentamicin, and 50 μ g/mL nystatin supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal calf serum at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Experiments were carried out with exponentially growing cells as previously described.⁶⁴ Briefly, 2×10^{-4} cells/mL were seeded in 96-well microculture plates with various drug concentrations (semi-log dilutions). After a 96 h incubation at 37 °C, cells were incubated with 0.02% neutral red for 16 h, then washed and lysed with 1%

SDS. The incorporation of the dye, which reflects cellular growth and viability, was evaluated by measuring the optical density at 540 nm for each well using a Titertek multiwell spectrophotometer. Each point was measured in quadruplicate and results were expressed as percent of cell growth inhibition determined relative to that of untreated control cells. The drug concentration which inhibits cell growth by 50% (IC₅₀) was determined from semi-logarithmic plots.

Acknowledgement

This work was done under the support of research grants (to J.L.B.) from the CNRS, (to M.J.W.) from the Wellcome Trust, CRC, AICR, and the Sir Halley Stewart Trust and (to C.B.) from the INSERM and the ARC. The authors thank Lucile Grondard and Odile Petitgenet (Rhône-Poulenc Rorer) for their helpful technical assistance with the topoisomerase and cytotoxicity assays.

References

1. Lown, J. W.; Reszka, K.; Kolodziejczyk, P.; Wilson, W. D. In *Molecular Mechanisms Of Carcinogenic and Antitumor Activity*; Chagas, C.; Pullman, B., Eds.; Adenine: New York, 1987, pp 243-274.
2. Lown, J. W. *Anthracyclines and Anthracenedione-Based Anticancer Agents*; Elsevier Science: Amsterdam, 1988.
3. Reszka, K.; Kolodziejczyk, P.; Hartley, J. A.; Wilson, W. D.; Lown, J. W. In *Bioactive Molecules*; Lown, J. W., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1988, Vol. 6; pp 401-445.
4. Cornbleet, M. A.; Stuart-Harris, R. C.; Smith, I. E.; Coleman, R. E.; Rubens, R. D.; McDonald, M.; Mouridsen, H. T.; Rainer, H.; van Oosterom, A. T.; Smyth, J. F. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1984**, *20*, 1141.
5. Henderson, C.; Allegra, J. C.; Woodcock, T. J. *Clin. Oncol.* **1989**, *7*, 560.
6. Faulds, D.; Balfour, J. A.; Chrisp, P.; Langtry, H. D. *Drugs* **1991**, *41*, 400.
7. Stuart-Harris, R. C.; Bozek, T.; Pavlidis, N. A.; Smith, I. E. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1984**, *12*, 1.
8. van de Graaf, W. T. A.; de Vries, E. G. E. *Anti-cancer Drugs* **1990**, *1*, 109.
9. Lown, J. W.; Morgan, A. R.; Yen, S.-F.; Wang, Y.-H.; Wilson, W. D. *Biochemistry* **1985**, *24*, 4028.
10. Gandecha, B. M.; Brown, J. R.; Crampton, M. R. *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 337.
11. Krishnamoorthy, C. R.; Yen, S.-F.; Smith, J. C.; Lown, J. W.; Wilson, W. D. *Biochemistry* **1986**, *25*, 5933.
12. Denny, W. A.; Wakelin, L. P. G. *Anti-Cancer Drug Des.* **1990**, *5*, 189.
13. Tanious, F. A.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; Wilson, W. D. *Biochemistry* **1992**, *31*, 11632.
14. Fox, K. R.; Waring, M. J.; Brown, J. R.; Neidle, S. *FEBS Lett.* **1986**, *202*, 289.
15. Chen, K.-X.; Gresh, N.; Pullman, B. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 3779.

16. Panousis, C.; Phillips, D. R. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 1342.
17. Kapuscinski, J.; Darzynkiewicz, Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 6302.
18. Fox, M. E.; Smith, P. J. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 5813.
19. Capranico, G.; De Isabella, P.; Tinelli, S.; Bigioni, M.; Zunino, F. *Biochemistry* **1994**, *32*, 3038.
20. Fisher, G. R.; Brown, J. R.; Patterson, L. H. *Free. Rad. Res. Commun.* **1990**, *11*, 117.
21. Fisher, G. R.; Gutierrez, P. L.; Oldcorne, M. A.; Patterson, L. H. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 575.
22. Fisher, G. R.; Patterson, L. H. *J. Pharm. Pharmacol.* **1991**, *43*, 65.
23. Armitage, B.; Yu, C.; Devadoss, C.; Schuster, G. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9847.
24. Fisher, G. R.; Patterson, L. H. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1992**, *30*, 451.
25. Palù, G.; Palumbo, M.; Antonello, C.; Meloni, G. A.; Marciiani-Magno, S. *Mol. Pharmacol.* **1986**, *29*, 211.
26. Palumbo, M.; Palù, G.; Gia, O.; Ferrazzi, E.; Gastaldi, S.; Antonello, C.; Meloni, G. A. *Anti-Cancer Drug Des.* **1987**, *1*, 337.
27. Zwelling, L. A.; Mayes, J.; Altschuler, E.; Satitpunwaycha, P.; Tritton, T. R.; Hacker, M. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 265.
28. Cheng, R. K.-Y.; Podrebarac, E. G.; Menon, C. S.; Cheng, C. C. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 501.
29. Islam, S. A.; Neidle, S.; Gandecha, B. M.; Partridge, M.; Patterson, L. H.; Brown, J. R. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 857.
30. Collier, D. A.; Neidle, S. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 847.
31. Palumbo, M.; Gatto, B. In *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interactions*; Pullman, B.; Jortner, J., Eds.; Kluwer Academic: London, 1987; pp 207-224.
32. Krapcho, A. P.; Getahun, Z.; Avery, Jr K. L.; Vargas, K. J.; Hacker, M. P.; Spinelli, S.; Pezzoni, G.; Manzotti, C. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2373.
33. Gresh, N.; Kahn, P. H. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1990**, *7*, 1141.
34. Gresh, N.; Kahn, P. H. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1991**, *8*, 827.
35. Agbandje, M.; Jenkins, T. C.; McKenna, R.; Reszka, A. P.; Neidle, S. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1418.
36. Krapcho, A. P.; Landi, J. J.; Hacker, M. P.; McCormack, J. J. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1124.
37. Krapcho, A. P.; Petry, M. E.; Getahun, Z.; Landi, Jr J. J.; Stallman, J.; Polsenberg, J. F.; Gallagher, C. E.; Maresch, M. J.; Hacker, M. P.; Giuliani, F. C.; Beggiolini, G.; Pezzoni, G.; Menta, E.; Manzotti, C.; Oliva, A.; Spinelli, S.; Tognella, S. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 828.
38. Gandolfi, C. A.; Beggiolini, G.; Menta, E.; Palumbo, M.; Sissi, C.; Spinelli, S.; Johnson, F. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 526.
39. De Isabella, P.; Palumbo, M.; Sissi, C.; Capranico, G.; Carenini, N.; Menta, E.; Oliva, A.; Spinelli, S.; Krapcho, A. P.; Giuliani, F. C.; Zunino, F. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *30*, 30.
40. Morier-Teissier, E.; Bernier, J. L.; Lohez, M.; Catteau, J. P.; Hénichart, J. P. *Anti-Cancer Drug Des.* **1990**, *5*, 291.
41. Morier-Teissier, E.; Bernier, J. L.; Coulaud, D.; Hénichart, J. P.; Delain, E. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1992**, *9*, 653.
42. Morier-Teissier, E.; Boitte, N.; Helbecque, N.; Bernier, J. L.; Pommery, N.; Duvalet, J. L.; Fournier, C.; Hecquet, B.; Catteau, J. P.; Hénichart, J. P. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2084.
43. Morier-Teissier, E.; Bailly, C.; Bernier, J. L.; Houssin, R.; Helbecque, N.; Catteau, J. P.; Colson, P.; Houssier, C.; Hénichart, J. P. *Anti-Cancer Drug Des.* **1989**, *4*, 37.
44. Lown, J. W.; Sondhi, S. M.; Ong, C. W.; Skorobogaty, A.; Kishikawa, H.; Dabrowiak, J. C. *Biochemistry* **1986**, *25*, 5111.
45. Lown, J. W.; Joshua, A. V. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 1298.
46. Bailly, C.; Sun, J. S.; Colson, P.; Houssier, C.; Hélène, C.; Waring, M. J.; Hénichart, J. P. *Bioconj. Chem.* **1992**, *3*, 100.
47. Kénani, A.; Lohez, M.; Houssin, R.; Helbecque, N.; Bernier, J. L.; Lemay, P.; Hénichart, J. P. *Anti-Cancer Drug Des.* **1987**, *2*, 47.
48. Bailly, C.; Bernier, J. L.; Houssin, R.; Helbecque, N.; Hénichart, J. P. *Anti-Cancer Drug Des.* **1987**, *1*, 303.
49. Lown, J. W. *Drug Dev. Res.* **1995**, *34*, 145.
50. Pedersen, C. J. *Science* **1968**, *241*, 536.
51. Gravert, D. J.; Griffin, J. H. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 820.
52. Muller, J. G.; Paikoff, S. J.; Rokita, S. E.; Burrows, C. J. *J. Inorg. Biochem.* **1994**, *54*, 199.
53. Burrows, C. J.; Rokita, S. E. *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 295.
54. Sato, K.; Chikira, M.; Fujii, Y.; Komatsu, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 625.
55. Routier, S.; Bernier, J. L.; Waring, M. J.; Colson, P.; Houssier, C.; Bailly, C. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 2326.
56. Houssin, R.; Bernier, J. L.; Hénichart, J. P. *Synthesis* **1988**, 259.
57. Muller, J. G.; Chen, X.; Dadiz, A. C.; Rokita, S. E.; Burrows, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6407.
58. Sigman, D. S. *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 180.
59. Sigman, D. S.; Mazumder, A.; Perrin, D. M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2295.
60. Janin, Y. L.; Croisy, A.; Riou, J. F.; Bisagni, E. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3686.
61. Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, 1982.
62. Bailly, C.; Waring, M. J. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, *12*, 869.
63. Riou, J. F.; Gabillot, M.; Philippe, M.; Schrevel, J.; Riou, G. *Biochemistry* **1986**, *35*, 1471.
64. Madelaine, J.; Prost, S.; Naudin, A.; Riou, G.; Lavelle, F.; Riou, J. F. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45*, 339.

(Received in U.S.A. 3 January 1996; accepted 14 March 1996)

DNA recognition by two mitoxantrone analogues: influence of the hydroxyl groups

Christian Bailly^a, Sylvain Routier^b, Jean-Luc Bernier^b, Michael J. Waring^{c,*}

^aInstitut de Recherches sur le Cancer, INSERM U124, Place de Verdun, 59045 Lille, France

^bLaboratoire de Chimie Organique Physique, URA CNRS 351, USTL Bât. C3, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

^cDepartment of Pharmacology, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QJ, UK

Received 30 November 1995

Abstract The clinically useful anticancer drug mitoxantrone intercalates preferentially into 5'-(A/T)CG and 5'-(A/T)CA sites on DNA. The 5,8 hydroxyl substituents on its anthracenedione chromophore are available to interact with the double helix. Footprinting experiments with two anthraquinone derivatives structurally related to mitoxantrone and ametantrone have been undertaken to assess the influence of the hydroxyl groups on the DNA recognition process. The results confirm that they do play a role in the recognition of preferred nucleotide sequences and suggest that the binding of anthraquinones to a 5'-(A/T)CG site is dependent on the presence of the 5,8 hydroxyl substituents whereas binding to 5'-(A/T)CA sites appears to proceed just as well without them.

Key words: Mitoxantrone; DNA recognition; Anticancer drug; Footprinting

1. Introduction

The synthetic antitumour drug mitoxantrone (Fig. 1) has major clinical value in the treatment of several leukemias as well as solid tumours such as breast cancer because it is less cardiotoxic than the classical anthracycline antibiotics [1,2]. This 1,4-[bis-(aminoalkyl)amino]-anthracene-9,10-dione derivative binds to cellular nucleic acids, causes chromatin compaction, produces damaging radicals and interferes with topoisomerase II activity so as to induce DNA strand breaks [3–7]. The interaction with DNA and consequent damage are thought to be essential for its therapeutic effect [8,9].

Spectroscopic studies originally showed that mitoxantrone binds preferentially to GC-rich DNA and synthetic polynucleotides [10–15]. A preference for alternating purine(3',5')-pyrimidine sequences was subsequently inferred from footprinting and theoretical studies [16,17]. More recently, selective recognition of 5'-(A/T)CG and 5'-(A/T)CA trinucleotides was deduced from *in vitro* transcription assays [18]. Although the molecular determinants implicated in DNA recognition by mitoxantrone have yet to be identified, it is believed that the two hydroxyethylaminoalkyl side chains are, at least in part, responsible for its sequence selectivity since the length, position and nature of these positively charged side chains strongly influence the stability of drug–DNA complexes [13,15,19,20].

In addition, it has been postulated that the hydroxyl groups at positions 5 and 8 on the anthraquinone chromophore might also contribute to the interaction because mitoxantrone dissociates more slowly from DNA than does its non-hydroxylated homologue ametantrone [15]. Various studies comparing the DNA binding properties of mitoxantrone and ametantrone concur that the 5,8-(OH)₂ groups stabilize the drug–DNA complex [3,13,21]. To elucidate the role of these phenolic hydroxyl substituents we have investigated the sequence-specific recognition of DNA by two mitoxantrone analogues which both lack the hydroxyethyl groups on the aminoalkyl side chains and differ by the presence or the absence of hydroxyl substituents at positions 5 and 8 (Fig. 1). DNase I footprinting experiments suggest that the hydroxyl groups are involved in the recognition of 5'-(A/T)CG trinucleotides but not of 5'-(A/T)CA.

2. Materials and methods

2.1. Drugs

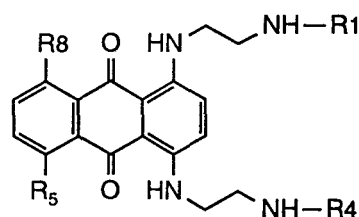
Compounds A and B were prepared by condensation of leucoquinizarine or 5,8-dihydroxy-leucoquinizarine with t-Boc-ethylenediamine followed by air oxidation of the dihydro intermediates as previously described [22,23]. Stock solutions were prepared in 10 mM Tris-HCl buffer containing 10 mM NaCl (pH 7.0) and stored at 4°C.

2.2. Viscometry

Viscosity measurements were carried out using a specially constructed capillary viscometer as previously described [24]. Unwinding angles were estimated with reference to that of ethidium bromide (26°) used as a control [25].

2.3. DNA fragments

The 117 bp fragment was cut out of plasmid pBS with *EcoRI* and *PvuII* and 3'-end labelled at the *EcoRI* site with [α -³²P]dATP in the



mitoxantrone	R1=R4=CH ₂ CH ₂ OH	R5=R8=OH
ametantrone	R1=R4=CH ₂ CH ₂ OH	R5=R8=H
compound A	R1=R4=H	R5=R8=OH
compound B	R1=R4=H	R5=R8=H

Fig. 1. Structures of anthracenedione drugs.

*Corresponding author. Fax (44) (1223) 33 40 40.
E-mail: mjw11@cus.cam.ac.uk

Abbreviations: bp, base pairs; DAP, 2,6-diaminopurine.

presence of AMV reverse transcriptase. *tyrT*(A93) DNA was cut out of plasmid pKmp27 with *EcoRI* and *AvaI* and 5'-end labelled with [γ - 32 P]ATP in the presence of T4 polynucleotide kinase [26,27]. Molecules substituted with inosine and/or DAP were prepared per [27]. Labelled DNA was purified by 6% polyacrylamide gel electrophoresis prior to being resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 7.0 buffer containing 10 mM NaCl.

2.4. DNase I footprinting

DNase I experiments were performed essentially according to the original protocol [28]. Briefly, the digestion of 6 μ l samples of the labelled DNA fragment was initiated by adding 2 μ l of a DNase I solution so as to yield a final enzyme concentration of about 0.01 unit/ml. After 3 min, the digestion was stopped by freeze drying, samples were lyophilized, washed once with 50 μ l of water, lyophilized again and then resuspended in 4 μ l of an 80% formamide solution containing tracking dyes. Samples were heated at 90°C for 4 min and chilled in ice for 4 min prior to electrophoresis.

2.5. Electrophoresis and quantitation by storage phosphor imaging

DNA cleavage products were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (0.3 mm thick, 8% acrylamide containing 8 M urea). After electrophoresis (about 2.5 hours at 60 Watts, 1600 V in TBE buffer, BRL sequencer model S2), gels were soaked in 10% acetic acid for 15 min, transferred to Whatman 3MM paper, dried under vacuum at 80°C, and examined by autoradiography using either a phosphorimager or X-ray films (Fuji R-X) exposed at -70°C with an intensifying screen. For quantitative analysis, a Molecular Dynamics 425E PhosphorImager was used to collect data from storage screens exposed to the dried gels overnight at room temperature. Base line-corrected scans were analyzed by integrating all the densities between two selected boundaries using ImageQuant version 3.3 software.

3. Results and discussion

Prior to investigating sequence specific binding to DNA, viscometric measurements using closed circular duplex DNA were performed in order to compare the effects of the two anthraquinone derivatives on DNA supercoiling. Both drugs unwind the double helix to a similar extent. The unwinding angle, measured by titrating drug into supercoiled DNA at various concentrations, was estimated to be 16° for compound A and 15° for compound B respectively. Similar unwinding angles have been reported for mitoxantrone and structurally related anthraquinones [11,19,29] confirming that both derivatives A and B can also intercalate into DNA.

In the first series of footprinting experiments, performed with a 117 bp restriction fragment from plasmid pBS in the presence of increasing concentrations of compounds A and B, the cleavage pattern differs substantially from that in the control samples (Fig. 2) suggesting that both ligands are capable of interacting with DNA in a sequence-selective fashion. At 5 μ M the involvement of a specific binding process can easily be seen by the blockage of nuclease activity around nucleotide positions 31, 55 and 74. The ratio of fractional cleavage in the presence of drug to that in the drug-free control was calculated for each internucleotide linkage and used to construct differential cleavage plots (Fig. 3). They reveal that a feature common to both drugs is the enhancement of cutting by DNase I at phosphodiester bonds between bases 62–69 and 80–90 indicating that binding to AT-rich sequences is disfavoured, just as reported with mitoxantrone [16]. Similarly, GC-containing homopurine-homopyrimidine tracts do not afford binding sites for compounds A and B since in neither case are the trinucleotides GGG and CCC at positions 61, 68 and 79 protected from

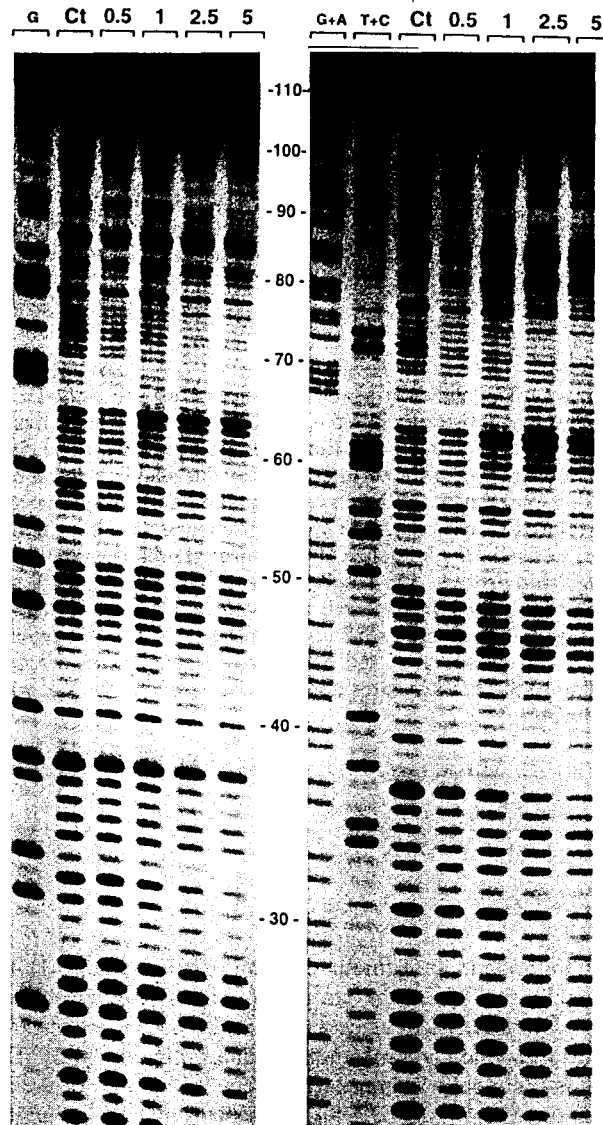


Fig. 2. DNase I footprinting with the 117-mer fragment in the presence of compound A (left panel) and B (right panel) at concentrations (μ M) shown at the top of each gel lane. The control tracks labelled 'Ct' contained no drug. The tracks labelled T+C, G+A and G represent Maxam-Gilbert sequencing markers specific for pyrimidine, purine, and guanine residues respectively. Numbers refer to the nucleotide sequence shown in Fig. 3.

attack. The two drugs bind preferentially to alternating purine-pyrimidine sequences containing both A·T and G·C base pairs. With the dihydroxy-anthraquinone derivative A every region protected from DNase I cleavage (a presumptive drug binding site) lies squarely around the trinucleotide ACG or 5'-(A/T)CA (which is equivalent to 5'-TG(A/T)), marked respectively by black and hatched rectangles in Fig. 3A. 5'-(A/T)CG or 5'-(A/T)CA triplets are the consensus sequences reported for mitoxantrone [18]. This observation immediately establishes that the hydroxyethyl terminal groups which distinguish mitoxantrone from compound A are not responsible for the sequence-selective recognition process.

The sequences which are protected from DNase I cleavage by compound B are comparable to but distinct from those

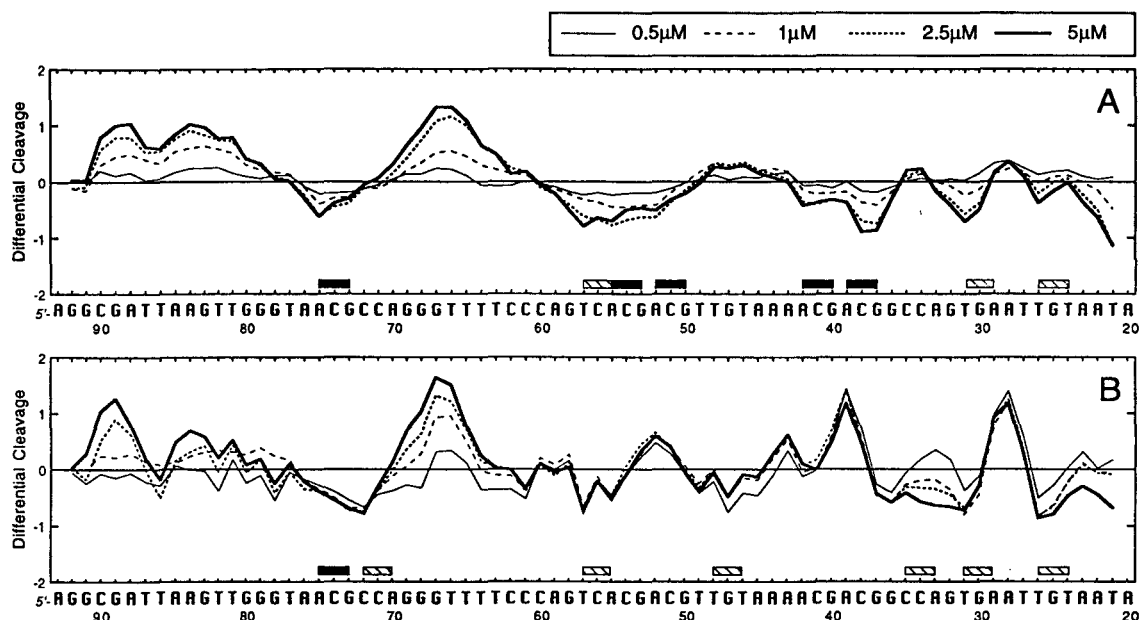


Fig. 3. Differential cleavage plots showing differences in susceptibility of the 117-mer fragment to DNase I cleavage in the presence of drugs A (top panel) and B (bottom panel). Vertical scales are in units of $\ln(f_a) - \ln(f_c)$, where f_a is the fractional cleavage at any bond in the presence of the drug and f_c is the fractional cleavage of the same bond in the control. Negative values correspond to a ligand-protected site and positive values represent enhanced cleavage. Black boxes indicate the triplet sequences 5'-ACG. Hatched boxes mark the triplets 5'-AGT or 5'-TCA.

protected by compound A. There is rather poor correspondence between the drug B-protected sites and the ACG triplets. On the other hand, there is a relatively good correspondence with the sites containing a CA or TG step such as the trinucleotides CCA, TCA and TGT marked as hatched rectangles in Fig. 3B. Therefore, the results suggest that binding to a 5'-(A/T)CG site is dependent on the presence of the 5,8 hydroxyl groups on the anthracenedione chromophore whereas binding to 5'-(A/T)CA sites proceed to a large extent irrespective of the presence or absence of hydroxyl groups.

The generality of these observations has been confirmed with the 160 bp *tyrT*(A93) DNA fragment which was previously employed to study the sequence specificity of mitoxantrone [16] as well as a variety of other DNA-binding drugs [30]. This DNA fragment offers weaker binding sites for the anthraquinones than the 117-mer. However, the differential cleavage plots shown in Fig. 4 corroborate the conclusions drawn with the pBS fragment. The regions of reduced nuclease cleavage in the presence of compounds A and B match quite well, though not exclusively, with CG- or CA (TG)-containing sites. In most

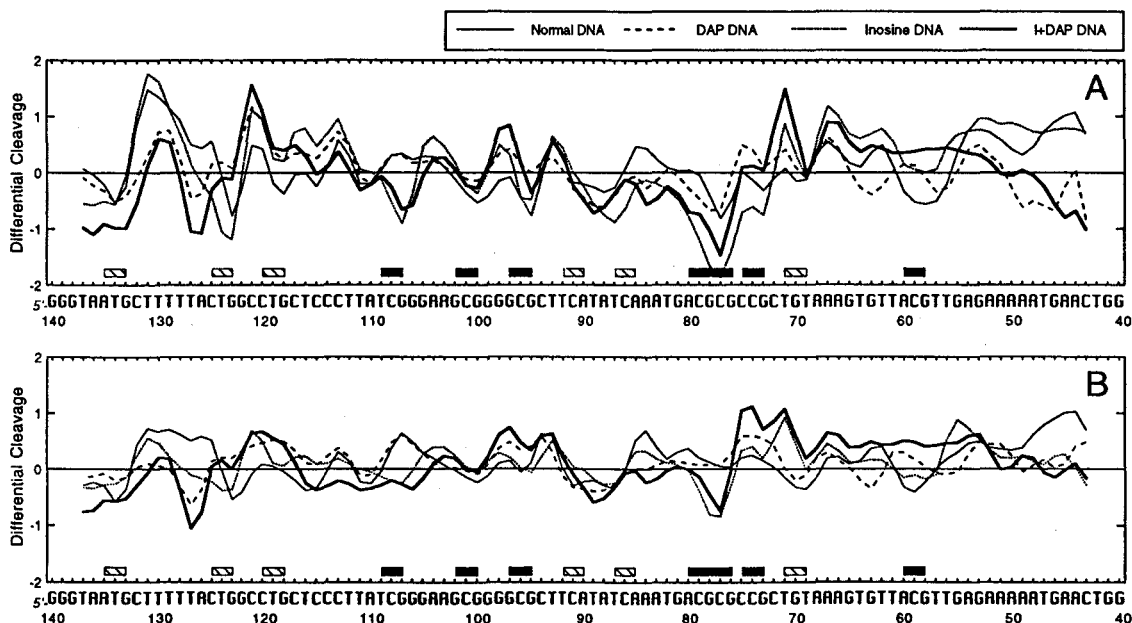


Fig. 4. Nuclease cleavage of *tyrT*(A93) DNA containing natural nucleotides, inosine in place of guanosine, DAP in place of adenine, or both inosine and DAP, in the presence of 5 μ M drugs A and B. Other details as for Fig. 3.

cases, footprints at XCG sites (black rectangles) are observed with the bis-hydroxylated compound A whereas they are less pronounced or absent with the non-hydroxylated analogue B. This is particularly noticeable around the sequence ACGCGCCG extending from positions 80 to 73 which denotes a strong binding site for drug A but not for drug B. Conversely, footprints at CA or TG steps are detected almost identically with compounds A and B.

Finally, the influence of a structural modification which affects the minor groove of the DNA helix was examined, namely the effect of transposing the purine 2-amino group from guanine to adenine nucleotides [27]. Both compounds A and B were found to footprint on the modified DNA molecules in much the same way as they do on natural *tyrT* DNA (Fig. 4), showing that sequence recognition by these molecules cannot depend upon interaction with the 2-amino group of guanine located in the minor groove. This is consistent with an intercalation process which would leave the alkylamine side chains sitting in the major groove, as is believed to be the case for mitoxantrone [18] and bis-naphthalimide drugs [25].

Acknowledgements: We thank Dean Gentle for his invaluable technical assistance. This work was supported by grants (to M.J.W.) from the Cancer Research Campaign, the Wellcome Trust, and the Association for International Cancer Research; (to J.L.B.) from the CNRS and (to C.B.) from the INSERM and the ARC. C.B. thanks the Sir Halley Stewart Trust.

References

- [1] van de Graaf, W.T.A. and de Vries, E.G.E. (1990) *Anti-Cancer Drugs* 1, 109–125.
- [2] Faulds, D., Balfour, J.A., Chrisp, P. and Langtry, H.D. (1991) *Drugs* 41, 400–449.
- [3] Kapuscinski, J. and Darzynkiewicz, Z. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6302–6306.
- [4] Fox, M.E. and Smith, P.J. (1990) *Cancer Res.* 50, 5813–5818.
- [5] Fisher, G.R., Brown, J.R. and Patterson, L.H. (1990) *Free. Rad. Res. Commun.* 11, 117–125.
- [6] Fisher, G.R., Gutierrez, P.L., Oldcorne, M.A. and Patterson, L.H. (1992) *Biochem. Pharmacol.* 43, 575–585.
- [7] Capranico, G., De Isabella, P., Tinelli, S., Bigioni, M. and Zunino, F. (1994) *Biochemistry* 32, 3038–3046.
- [8] Lown, J. W., Reszka, K., Kolodziejczyk, P. and Wilson, W. D. (1987) in: *Molecular Mechanisms of Carcinogenic and Antitumor Activity* (Chagas, C. and Pullman, B., Eds.) pp. 243–274, Adenine Press, New York.
- [9] Reszka, K., Kolodziejczyk, P., Hartley, J.A., Wilson, W.D. and Lown, J.W. (1988) in: *Bioactive Molecules* (Lown, J.W., Ed.) Vol. 6, Elsevier, Amsterdam, pp. 401–445.
- [10] Kapuscinski, J., Darzynkiewicz, Z., Traganos, F. and Melamed, M. R. (1981) *Biochem. Pharmacol.* 30, 231–240.
- [11] Lown, J.W., Morgan, A.R., Yen, S.-F., Wang, Y.H. and Wilson, W.D. (1985) *Biochemistry* 24, 4028–4035.
- [12] Gandecha, B.M., Brown, J.R. and Crampton, M.R. (1985) *Biochem. Pharmacol.* 34, 337–346.
- [13] Krishnamoorthy, C.R., Yen, S.-F., Smith, J.C., Lown, J.W. and Wilson, W.D. (1986) *Biochemistry* 25, 5933–5940.
- [14] Kotovych, G., Lown, J.W. and Tong, J.P.K. (1986) *J. Biomol. Struct. Dyn.* 4, 111–125.
- [15] Denny, W.A. and Wakelin, L.P.G. (1990) *Anti-Cancer Drug Des.* 5, 189–20.
- [16] Fox, K.R., Waring, M.J., Brown, J.R. and Neidle, S. (1986) *FEBS Lett.* 202, 289–294.
- [17] Chen, K.-X., Gresh, N. and Pullman, B. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 3779–3812.
- [18] Panousis, C. and Phillips, D.R. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1342–1345.
- [19] Collier, D.A. and Neidle, S. (1988) *J. Med. Chem.* 31, 847–857.
- [20] Taniou, F.A., Jenkins, T.C., Neidle, S. and Wilson, W.D. (1992) *Biochemistry* 31, 11632–11640.
- [21] Palumbo, M., Palù, G., Gia, O., Ferrazzi, E., Gastaldi, S., Antonello, C. and Meloni, G.A. (1987) *Anti-Cancer Drug Des.* 1, 337–346.
- [22] Greenhalgh, C.W. and Hughes, N. (1968) *J. Chem. Soc.* 1284.
- [23] Morier-Teissier, E., Boitte, N., Helbecque, N., Bernier, J.L., Pommery, N., Duvalet, J.L., Fournier, C., Hecquet, B., Catteau, J.P. and Hénichart, J.P. (1993) *J. Med. Chem.* 36, 2084–2090.
- [24] Waring, M.J. and Henley, S.M. (1975) *Nucleic Acids Res.* 2, 567–586.
- [25] Bailly, C., Braña, M. and Waring, M.J. (1996) *Biochemistry*, submitted.
- [26] Bailly, C. and Waring, M.J. (1993) *Biochemistry* 32, 5985–5993.
- [27] Bailly, C. and Waring, M.J. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23, 885–892.
- [28] Low, C.M.L., Drew, H.R. and Waring, M.J. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 4865–4877.
- [29] Islam, S.A., Neidle, S., Gandecha, B.M., Partridge, M., Patterson, L.H. and Brown, J.R. (1985) *J. Med. Chem.* 28, 857–864.
- [30] Waring, M.J. and C. Bailly (1994) *J. Mol. Recognition* 7, 109–122.

HIGHLY PREFERENTIAL CLEAVAGE OF UNPAIRED GUANINES IN DNA BY A FUNCTIONALIZED SALEN-NICKEL COMPLEX

Sylvain Routier,^a Jean-Luc Bernier,^a Jean-Pierre Catteau^a and Christian Bailly^{b,*}

^aLaboratoire de Chimie Organique Physique, URA CNRS 351, USTL C3, 59655 Villeneuve d'Ascq and

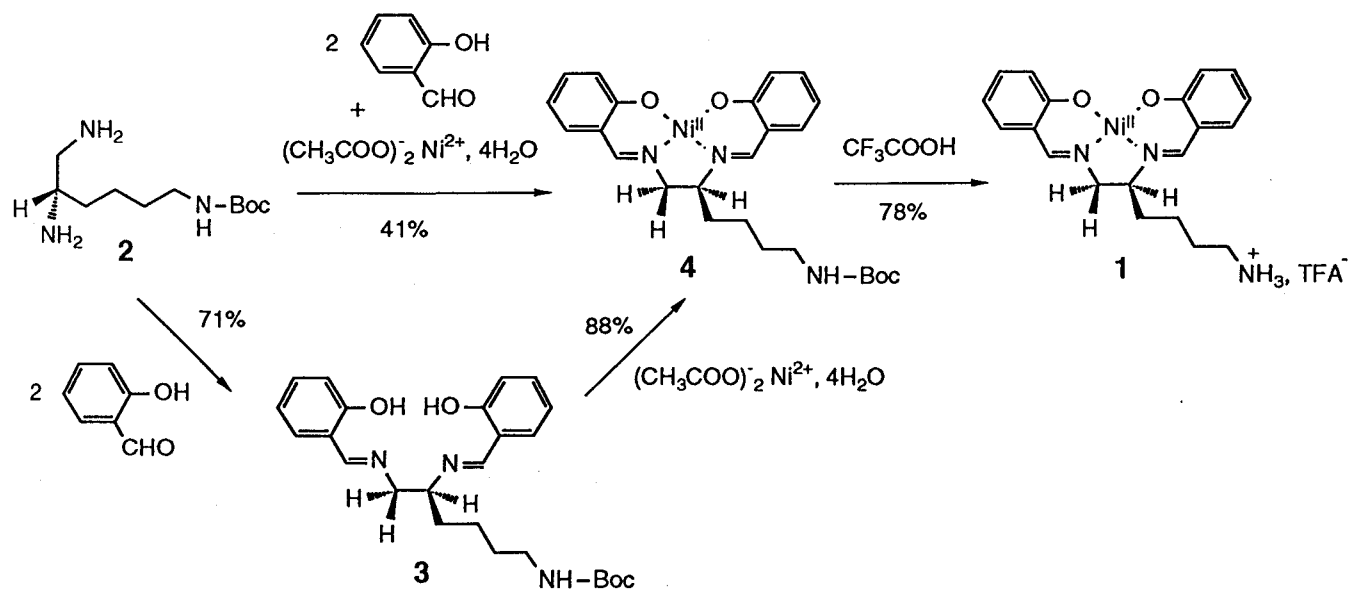
^bInstitut de Recherches sur le Cancer, INSERM U-124, Place de Verdun 59045 Lille, France

Abstract: In the presence of oxygen donor compounds, a functionalized salen-nickel complex poorly cuts double-stranded DNA but induces strong cleavages at guanine residues in the single-stranded region of hairpin oligonucleotides.

Transition metal complexes that induce damages to nucleic acids provide useful tools in molecular biology to study DNA and RNA structure and function. Phenanthroline-Cu, porphyrin-Mn, EDTA-Fe as well as certain rhodium and ruthenium complexes are among the most frequently used synthetic catalysts to investigate nucleic acids conformation and ligand-DNA interactions.¹

Derivatives of bis(salicylidene)ethylenediamine, usually referred to as salen, can complex metals and induce DNA cleavage. Different types of DNA damages can occur depending on the chemical reactivity of the complexed metal. Salen-Cu^{II} complexes in the presence of a reducing agent generate oxygen free radicals which attack DNA non specifically;² salen-Mn^{III} complexes induce efficient cleavage at AT-rich DNA sequences in the presence of an oxidant;³ salen-Co^{II} complexes can cleave DNA spontaneously under ambient aerobic conditions⁴ and salen-Ni^{II} complexes generally provoke guanine-specific modification of DNA and RNA.⁵

The results reported by others²⁻⁵ and us⁶ with salen-metal complexes suggest that the concept of probing nucleic acid structures with salen-based ligands is valid and warrant further development. In this context, we now report the DNA binding and cleaving properties of a functionalized salen-Ni complex **1**.



Two procedures can be adopted to synthesize the salen-type Schiff base. The nickel complex can be formed directly via reaction of *S*-6-*N*-BOC-1,2,6-triaminohexane **2** with salicylaldehyde in the presence of nickel acetate.⁶ Although this procedure proves satisfactory, we found that the alternative route which consists in the formation of the salen prior to complexation with the metal was more convenient. Moreover, the BOC-protected salen derivative **3** provides a versatile reagent for chelating different metals, i.e. Ni, Cu or Mn chosen at will. The BOC-protecting group can be removed with trifluoroacetic acid without destroying the complex.⁷ A UV absorption dilution study using the Job method⁸ was performed to determine the stability of the salen•Ni complex **4**. This yielded a value of $2 \pm 0.2 \times 10^4 \text{ dm}^3 \times \text{mol}^{-1}$ for the complex in aqueous solution. Cyclic voltammetry⁹ was used to investigate the redox properties of the salen-Ni complexes incorporating the tetradentate Schiff base. Redox potential (E°) of + 0.635 mV and + 0.645 mV were determined for compounds **4** and **1** respectively.

Figure 1 displays the absorption spectra of compound **1** in the absence and presence of DNA. Significant spectral changes occur attesting that the ligand interacts strongly with DNA. The absorption at 392 nm decreases up to a DNA-phosphate/drug ratio (P/D) of about 10 and then remains constant at higher P/D when the ligand is fully bound to DNA (inset in Fig.1). A marked hypochromism is observed in the 320 nm and 400 nm bands (up to 25% at a DNA/ligand ratio of 20). The interaction of the complex with DNA also causes a bathochromic shift of 16 nm in the visible absorption maximum (from 391 nm to 407 nm, inset in Fig. 1), owing to the perturbation of the complexed chromophore system upon binding to DNA.

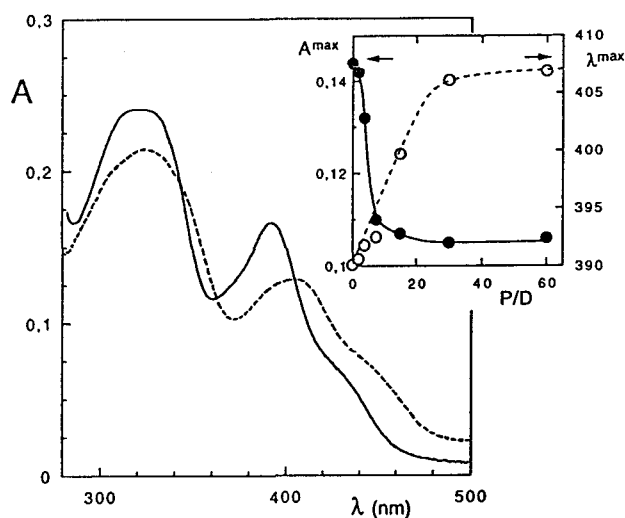


Fig. 1 Absorption spectra of compound **1** (50 μM) in the absence (full line) and presence (dashed line) of calf thymus DNA (1.1 mM). The inset shows the variation of the absorbance A^{\max} (●) and the wavelength λ^{\max} (○) with increasing DNA-phosphate/compound **1** ratio (P/D).

In the first set of experiments, DNA scission was analyzed using double stranded restriction fragments but practically no cleavage could be detected (data not shown). Then we investigated the cleavage reaction using three complementary 17-mer oligonucleotides 5'-AGTCTAT-XXX-TTAGACT where X=A, C or G. These oligonucleotides form stable hairpin structures (noted hA, hC and hG) with 6 base pairs and an apical loop of 5 bases (Fig. 2). The salen•Ni complex alone does not cleave DNA but the cleavage reaction can be initiated in the presence of oxygen donor compounds such as potassium monoperoxysulfate (KHSO_5) and magnesium monoperoxyphthalic acid (MMPP).

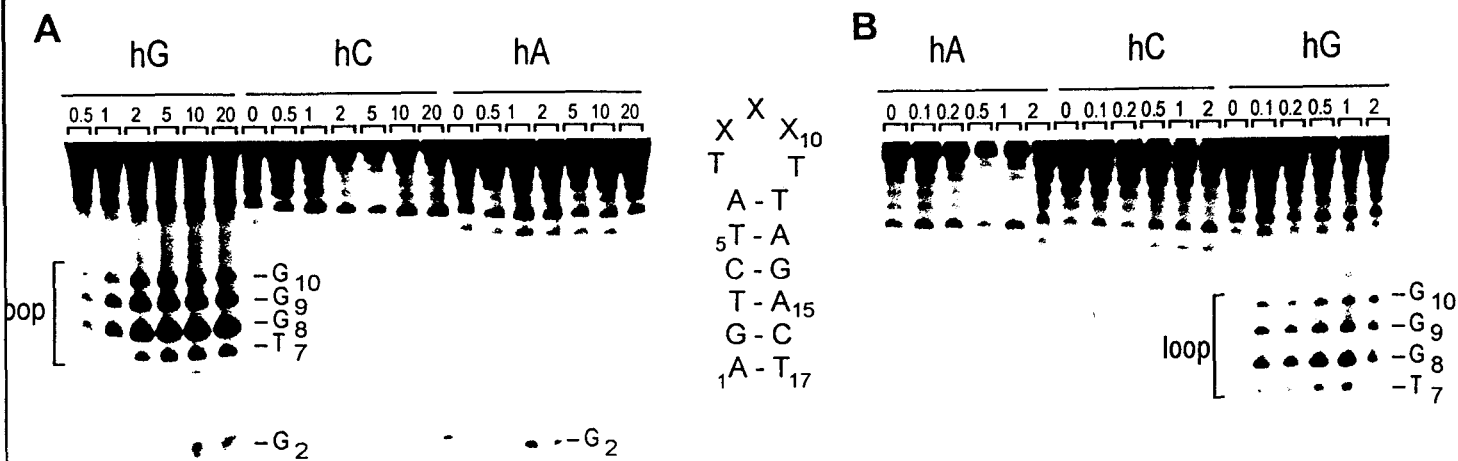


Fig. 2 Cleavage of ³²P 5'-end labelled hairpin oligonucleotides (2µM) by compound 1 in the presence of KHSO₅ (A) or magnesium monoperoxyphthalate (B). The secondary structure of the 17-mer oligonucleotides hA, hC and hG is indicated. The concentration (µM) of 1 is shown at the top of each gel lane. DNA samples were treated with 1 in the presence of 50 µM KHSO₅ or MMPP for 15 min at room temperature and then precipitated with cold ethanol. The DNA pellet was resuspended in 40 µl 1M piperidine, boiled for 12 min at 90 °C and then lyophilized. Cleavage products were resuspended in 5 µl 80% formamide containing 10 mM EDTA and 0.1% tracking dyes. Samples were heated to 90 °C for 4 min and then chilled in an ice-bath just before being loaded on a sequencing gel (15% polyacrylamide, 7 M urea). Major sites of cleavage are marked.

With either KHSO₅ (Fig. 2A) or MMPP (Fig. 2B) the cutting occurs exclusively at the GGG triplet of hG. No cleavage can be detected with hC and hA even when using higher salen concentrations and with longer incubation times. The cutting is concentration- and time-dependent. The extent of cutting is already quite large after only 30 sec incubation of DNA with 10 µM compound 1 (Fig. 3). When using a salen-Ni concentration ≥ 5 µM, a faint band can be detected at the paired guanine at position 2 but, as judged from the measured intensities of the bands in each autoradiograms, the extent of cleavage is at least two orders of magnitude lower at G₂ compared to G₈. Therefore, we must conclude that the reaction is specific for accessible guanine residues. The cutting sites were visualized on the autoradiograms after boiling the DNA samples with piperidine. Cleavage can also be detected without alkaline treatment of the oxidized products but in this case the cleavage species are not well resolved on the sequencing gels. By analogy with other related metal complexes, it is plausible to believe that upon activation an active oxidizing species (i.e. an oxosalenato complex) is generated in the vicinity of the DNA target.

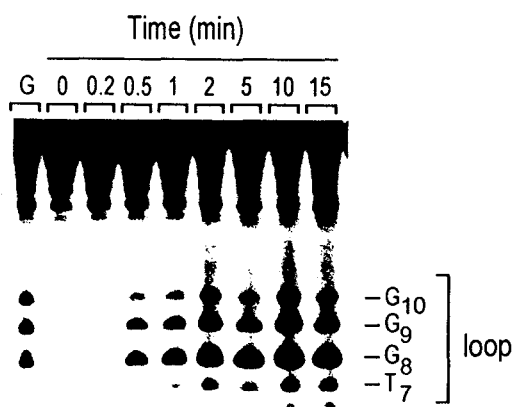
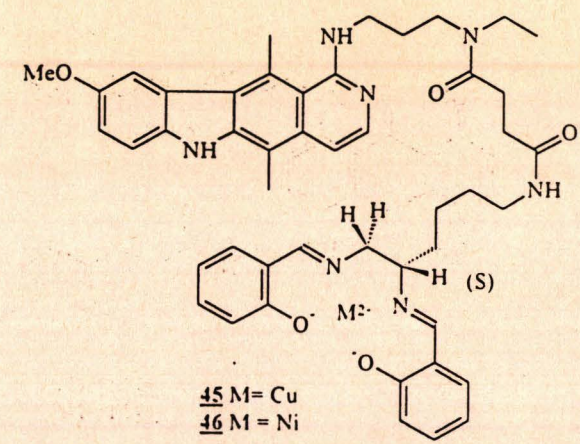
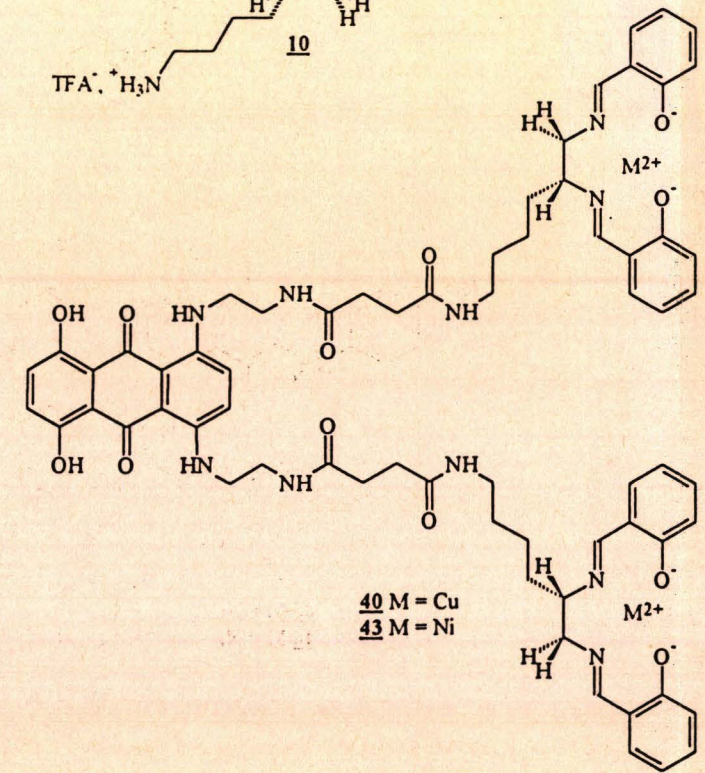
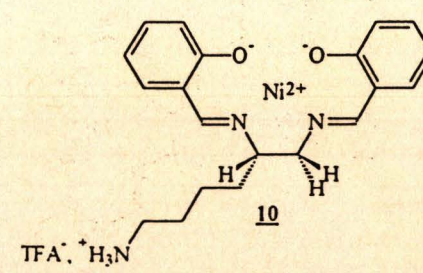
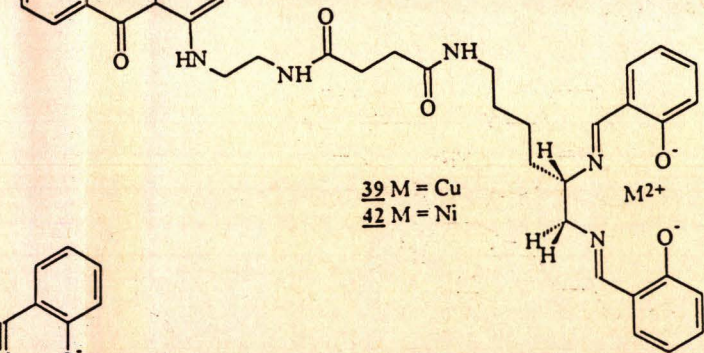
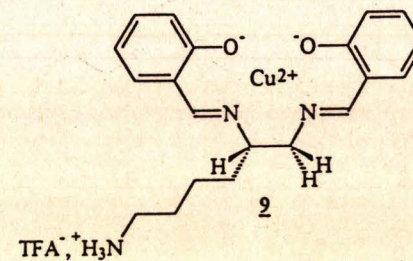
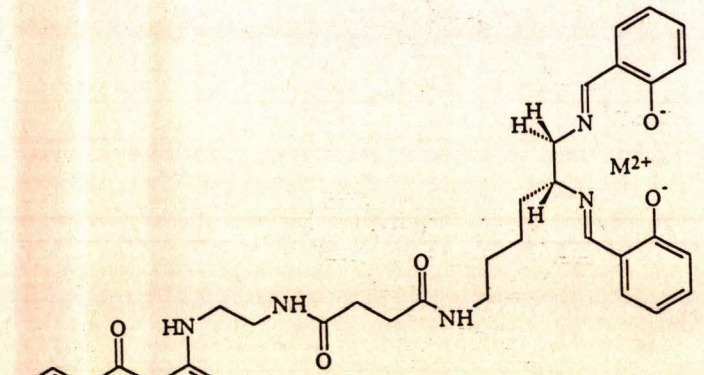
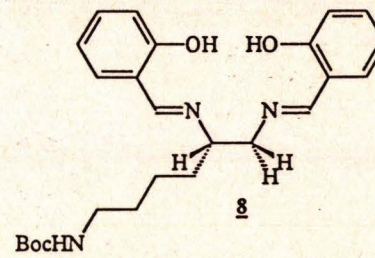
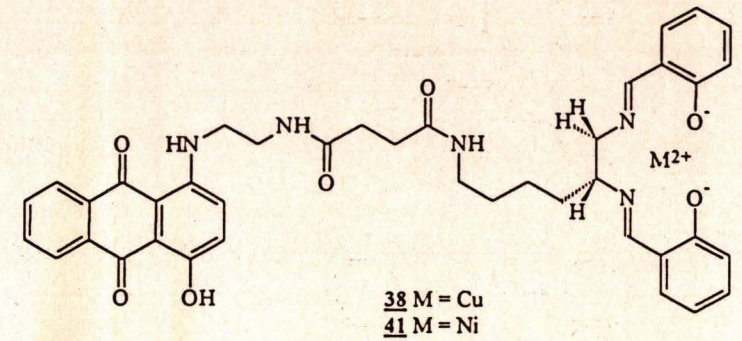
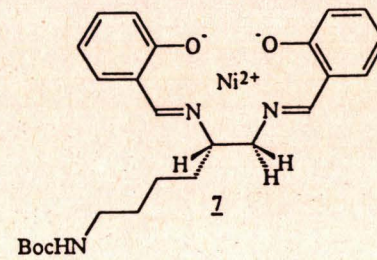
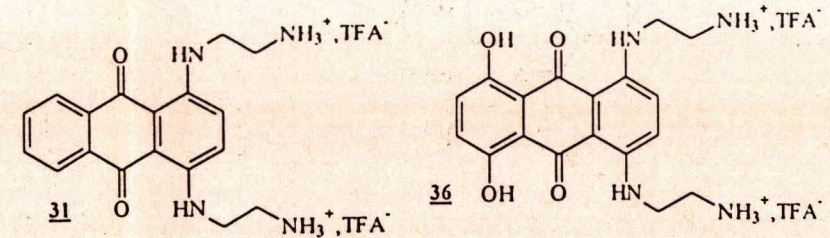
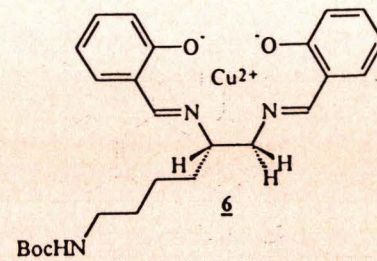


Fig. 3 Time course of the cleavage of the GGG-containing hairpin oligonucleotide (2µM) by compound 1 (10µM) in the presence of 50 µM KHSO₅. Other detail as for Fig. 2.

The above results corroborate the findings of previous studies^{5,10} that positively charged salen-Ni complexes can promote efficient cleavage of DNA with a pronounced preference for accessible guanines. The newly introduced butylamino side chain on the salen moiety is now used to tailor peptides and oligonucleotides with the aim of designing sequence-specific chemical nucleases.

References and Notes

1. Sigman, D. S.; Mazumder, A.; Perrin, D. M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2295. Barton, J. K. *Science* **1986**, *233*, 727; Chow, C. S.; Barton, J. K. *Methods Enzymol.* **1992**, *212*, 219. Meunier, B. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1411. Pratviel, G.; Bernadou, J.; Meunier, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 746.
2. Sato, K.; Chikira, M.; Fujii, Y.; Komatsu, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 625.
3. Gravert, D. J.; Griffin, J. H. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 820. Gravert, D. J.; Griffin, J. H. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 4837.
4. Bhattacharya, S.; Mandal, S.S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2489.
5. Muller, J. G.; Chen, X.; Dadiz, A. C.; Rokita, S. E.; Burrows, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6407; Chen, X.; Woodson, S. A.; Burrows, C. J.; Rokita, S. E. *Biochemistry* **1993**, *32*, 7610; Woodson, S. A.; Muller, J. G.; Burrows, C. J.; Rokita, S. E. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5524. Cheng, C.-C.; Rokita, S. E.; Burrows, C. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 277; Muller, J. G.; Paikoff, S. J.; Rokita, S. E.; Burrows, C. J. *J. Inorg. Biochem.* **1994**, *54*, 199; Burrows, C. J.; Rokita, S. E. *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 295.
6. Routier, S.; Bernier, J.-L.; Waring, M. J.; Colson, P.; Houssier, C.; Bailly, C. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2326; Routier, S.; Cotelle, N.; Catteau, J.-P.; Bernier, J.-L.; Waring, M. J.; Riou, J.-F.; Bailly, C. *BioOrg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1185.
7. Analytical data for compounds **1**, **2** and **4** are given in ref. 6. Selected spectroscopic data for compound **3**: $[\alpha]_D^{25} +17$ (c 0.04, DMSO); IR (CCl₄) ν 3300, 2940, 1720, 1620 cm⁻¹; MS (FAB⁺) 4940 (M+1)⁺; R_f (petroleum ether/Et₂O 50:50) 0.34; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.24 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.47 (m, 2H), 1.84 (m, 2H), 3.09 (t, *J* = 6.48, 2H), 3.47 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 3.88 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 6.84 (t, *J* = 8.5, 2H), 6.90 (d, *J* = 7.3, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.8, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.0, 2H), 8.27 (s, 2H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 23.37 (CH₂), 28.40 (CH₃), 29.96 (CH₂), 33.69 (CH₂), 40.30 (CH₂), 64.54 (CH₂), 70.10 (Cq), 79.03 (Cq), 116.89 (CH), 118.47 (CH), 131.49 (CH), 132.39 (CH), 156.02 (Cq), 161.00 (Cq), 165.21 (Cq), 166.48 (Cq). Anal. Calcd for C₂₅H₃₃N₃O₄: C, 68.30; H, 7.57; N, 9.56. Found: C, 68.64; H, 7.43; N, 9.51.
8. Job, P. *Ann. Chim.* **1927**, 113; Kingery, W. D.; Hume, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2393.
9. von Veggel, C. J. M.; Bos, M.; Harkema, S.; von de Bonvenkamp, H.; Verboom, W.; Reedijk, J.; Reinhoudt, D. N. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 225.
10. Muller, J. G.; Zheng, P.; Rokita, S. E.; Burrows, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2320.



Résumé

Le travail consiste en la synthèse de différents complexes de salène asymétrique comportant une chaîne latérale fonctionnalisée.

Une étude physico-chimique est ensuite menée utilisant les spectres UV, RPE, voltammétrie cyclique.

L'interaction de ces complexes avec l'ADN (liaison et coupure) est étudiée par différentes méthodes (dichroïsme circulaire, dichroïsme linéaire électrique), viscosimétrie, UV, gel d'électrophorèse...

Les complexes de cuivre se lient de manière spécifique dans le grand sillon de l'ADN et coupent de façon aléatoire l'ADN double brin.

Les complexes de nickel se lient de manière spécifique dans le grand sillon de l'ADN et coupent l'ADN mono brin aux guanines les plus exposées.

L'activité sur les DNA topoisomérases et l'activité cytotoxique est discrète et discutée.

Des molécules hybrides associant par la chaîne latérale fonctionnalisée des salènes à des synthons possédant une affinité pour l'ADN (anthracène-9,10-diones, polyamine, dystamycine, ellipticine) sont également synthétisées et leur interaction avec l'ADN est décrite.

Mots clés:

SALENES

COMPLEXES Cu II, Ni II, Mn III

RPE

ACTIVITE NUCLEASIQUE

SYNTHESE

CONSTANTE D'ASSOCIATION

DNA TOPOISOMERASES

CYTOTOXICITE