

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

---

N° d'ordre :

Année 1996

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

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

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE ET MACROMOLECULAIRE

par

Nezha BOITTE-HADDOU

***SYNTHESE DE DERIVES ANTHRAQUINONIQUES. ETUDE DE  
LEURS PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES, BIOLOGIQUES ET  
D'INTERACTION AVEC L'ADN***

soutenue le 28 février 1996



**Jury :**

Président :	Mr. BERNIER J-L.
Rapporteurs :	Mme. GIORGI-RENAULT S. Mme. TEISSIER-MORIER E.
Examineurs :	Mr. LESIEUR D. Mr. BAILLY C. Mr. HENICHART J-P.

*Ce travail a été effectué sous la direction scientifique de Monsieur Jean-Pierre HENICHART, Professeur à l'Institut de Chimie Pharmaceutique de Lille. Je saisis cette occasion pour vous exprimer toute ma gratitude pour l'étude que vous m'avez confiée et surtout pour m'avoir poussée à aller jusqu'au bout de ce travail. Soyez assuré de mon admiration, de mon respect et de ma profonde reconnaissance.*

*A Monsieur Daniel L'ESIEUR, Professeur à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury. Veuillez trouver ici tous mes sincères remerciements pour m'avoir accueillie au sein de l'Institut de Chimie Pharmaceutique de Lille et de m'avoir permis de suivre les enseignements précieux du Mastère en Drug Design.*

*A Monsieur Jean-Luc BERNIER, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, vous me faites l'honneur de présider ce jury. Je suis très touchée de votre présence et vous remercie pour votre disponibilité et pour les conseils que vous m'avez prodigués.*

*A Madame Sylviane GIORGI-RENAULT, Professeur à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Université René Descartes, Paris V), je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de l'intérêt que vous accordez à ce travail. Soyez assurée de ma gratitude et de mon respect.*

*A Madame Elisabeth TEISSIER-MORIER, Chargé de Recherche INSERM, je suis particulièrement sensible à votre présence dans ce jury. Je tiens à vous exprimer mes sentiments de sincère reconnaissance pour votre disponibilité permanente, vos multiples conseils et votre aide précieuse tout au long de ce travail.*

*A Monsieur Christian BAILLY, Chargé de Recherche INSERM, je vous adresse mes respectueux remerciements pour tous les tests que vous avez réalisés et pour votre présence dans ce jury.*

*Mes sincères remerciements à Madame Nicole POMMERY qui m'a fait part de son amicale contribution à ce travail en réalisant les essais biologiques.*

*Enfin, un grand merci à tous mes amis de laboratoire en particulier à : Saïd, Habib, Corinne, Jean-François, Anne, Karine, Edith, Laurence, Manu... et tous ceux que je ne pourrais citer car la liste risquerait d'être très longue.*

*A mon Merwann adorable et adoré  
et à  
la mémoire de son premier thymine.*

*A Eric...*

*A ma famille et à tous mes amis.*

# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

## CHAPITRE I : ANTHRAQUINONES-MITOXANTRONE..... 11

I-1 Les antibiotiques de type (aminoalkylamino)anthraquinone .....	12
I-1-1 Historique .....	12
I-1-2 Relations structure-activité .....	18
I-2 La mitoxantrone.....	19
I-2-1 Structure et caractéristiques physiques.....	19
I-2-2 Le procédé de synthèse .....	19
I-2-3 Mécanismes d'action.....	20
I-2-3-1 Interaction avec l'ADN .....	20
I-2-3-2 Condensation des acides nucléiques .....	24
I-2-3-3 Action sur la topoisomérase II.....	25
I-2-3-4 Activation enzymatique et production de radicaux libres .....	26
I-2-4 Activité biologique .....	29
I-2-5 Efficacité clinique et tolérance.....	30
I-2-6 Résistance à la mitoxantrone .....	31
I-3 Les analogues des anthracène-9,10-diones .....	32
I-3-1 Les (amidoalkyl)anthracène-9,10-diones.....	32
I-3-2 Les dérivés aza-anthracène-9,10-diones.....	33

## CHAPITRE II : ANTHRAQUINONE-POLYAMINES ..... 37

II-1 Les polyamines naturelles.....	38
II-1-1 Structure chimique et propriétés physiques .....	38
II-1-2 Biosynthèse des polyamines .....	39
II-1-3 Contrôle de la biosynthèse .....	41

II-2 Les interactions polyamines-ADN .....	42
II-2-1 Modes d'interaction .....	42
II-2-2 Spécificité de liaison .....	43
II-2-2-1 Etudes à partir de modèles moléculaires .....	44
II-2-2-2 Etudes à partir d'ADN en solution .....	47
II-3 Les polyamines et la thérapie anticancéreuse .....	52
II-3-1 Rôle des polyamines dans la prolifération cellulaire.....	52
II-3-2 Les inhibiteurs d'enzymes.....	52
II-3-2-1 Les inhibiteurs de l'ODC .....	52
II-3-2-2 Les inhibiteurs de l'AdoMet DC.....	53
II-3-3 Les analogues directs des polyamines .....	56
II-3-4 Les analogues indirects des polyamines .....	58
II-3-4-1 Chlorambucil-polyamines.....	59
II-3-4-2 Aziridine-polyamines .....	60
II-3-4-3 Anthracène-polyamines.....	61
II-4 Les hybrides anthraquinone-polyamines : travaux réalisés .....	62
II-4-1 Stratégie de synthèse.....	62
II-4-1-1 Synthèse du dérivé 1,4,5,8-tétrahydroxyanthracène-9,10-dione...	64
II-4-1-2 Fixation des alkylamines sur la DHQ .....	64
II-4-1-3 Allongement de la chaîne éthanolamine.....	66
II-4-1-4 Deuxième stratégie de synthèse.....	67
II-4-2 Interaction avec l'ADN .....	72
II-4-2-1 Mode d'interaction avec l'ADN.....	72
II-4-2-2 Sélectivité de liaison.....	74
II-4-3 Activité biologique .....	82
Discussion .....	88

## **CHAPITRE III : ANTHRAQUINONE-PEPTIDE** .....

III-1 Design de modèles hybrides "peptide chélateur-intercalant" .....	92
III-2 Le modèle (Gly-His-Lys)-anthraquinone .....	94
III-2-1 Structure et synthèse .....	94
III-2-2 Tests d'activité .....	95

III-3 Le modèle (Gly-Gly-L-His)-anthraquinone : travaux réalisés.....	96
III-3-1 Caractéristiques du peptide.....	96
III-3-2 Stratégie de synthèse.....	98
III-3-2-1 Synthèse du tripeptide Gly-Gly-L-His-OH.....	98
III-3-2-2 Synthèse du dérivé anthraquinone-peptide.....	99
III-3-3 Interaction avec l'ADN.....	101
III-3-3-1 Affinité de liaison à l'ADN.....	101
III-3-3-2 Mode d'interaction avec l'ADN.....	103
III-3-4 Etude des complexes cuivriques par RPE.....	106
III-3-5 Détection des radicaux libres par "spin-trapping".....	108
III-3-6 Activité biologique.....	110
III-3-6-1 Etude de l'activité cytotoxique <i>in vitro</i> .....	110
III-3-6-2 Etude de l'activité antitumorale <i>in vivo</i> .....	113
Discussion.....	116

## CHAPITRE IV : ANTHRAQUINONE-LIGAND DU PETIT SILLON.....118

IV-1 Les antibiotiques de type pyrrole amidine : nétropsine et distamycine.....	119
IV-1-1 Structures chimiques et propriétés physiques.....	119
IV-1-2 Interaction avec l'ADN.....	120
IV-1-2-1 Spécificité de liaison et mode d'interaction.....	120
IV-1-2-2 Géométrie et dynamique.....	124
IV-1-2-3 Constantes d'association et aspects thermodynamiques.....	125
IV-1-2-4 Stoechiométrie.....	126
IV-1-3 Activité biologique.....	128
IV-2 Design de nouveaux ligands séquence-spécifiques.....	128
IV-3 Les hybrides ligands du petit sillon-intercalants.....	130
IV-3-1 Les modèles naturels.....	130
IV-3-2 Les premiers hybrides de synthèse.....	132
IV-4 Les hybrides Nt/Dst-intercalants.....	135
IV-4-1 Les dérivés acridiniques de la Nt et de la Dst.....	135
IV-4-1-1 L'hybride NetGA.....	135
IV-4-1-2 L'hybride NetAmsa.....	137

IV-4-2 Les dérivés de l'ellipticine.....	139
IV-5 Hybride anthraquinonique de la nétropsine : travaux réalisés .....	142
IV-5-1 Stratégie de synthèse.....	143
IV-5-2 Mode d'interaction avec l'ADN .....	146
IV-5-3 Sélectivité de liaison .....	152
IV-5-4 Activité biologique .....	162
Discussion .....	166
<b>CONCLUSION</b> .....	168
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	171
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	211

## LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
AdoMet DC	adénosylméthionine décarboxylase
ARN	acide ribonucléique
Boc	tert-butyloxycarbonyle
C	cytosine
CCM	chromatographie sur couche mince
CD	circular dichroism
CI <sub>50</sub>	concentration en produit nécessaire pour inhiber la croissance du témoin de 50%
CLHP	chromatographie liquide haute pression
DAE	1,2-diaminoéthane
DAO	diamineoxydase
DCC	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DFMO	difluorméthylornithine
DHQ	dihydroxyquinizarine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
Dst	distamycine
EDC	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
F(°C)	point de fusion
G	guanine
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
IR	infra-rouge
LD	linear dichroism
MDR	multidrug resistance

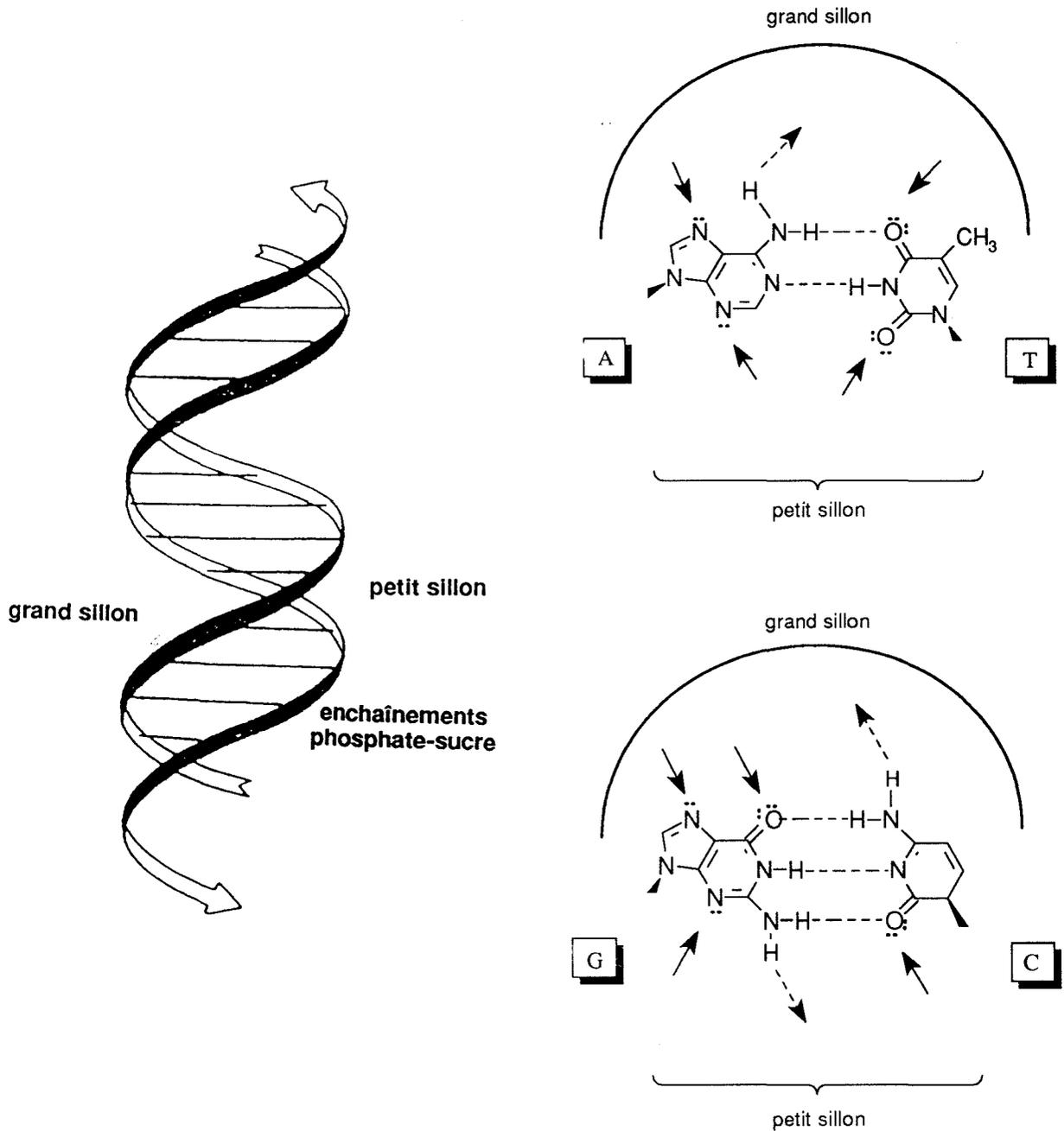
MGBG	méthylglyoxal-bis(guanylhydrazone)
Nt	nétropsine
ODC	ornithine décarboxylase
Q50	concentration en produit nécessaire pour réduire de 50% la fluorescence initiale du bromure d'éthidium
RD	rapport de dichroïsme
Rf	retention factor
RMN	résonance magnétique nucléaire
RPE	résonance paramagnétique électronique
SM	spectrométrie de masse
SSAT	spermidine/spermine acétyltransférase
T	thymine
T/C(%)	temps de survie médian du groupe testé/temps de survie médian du groupe de contrôle
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
Tm	température de dénaturation thermique de l'ADN
Z	benzyloxycarbonyle

# *INTRODUCTION*

La composante essentielle d'une conception rationnelle de médicaments réside dans l'établissement des bases moléculaires de la pathologie que l'on désire traiter et, par voie de conséquence, dans la définition de la cible sur laquelle il serait judicieux d'intervenir. Grâce à la biologie moléculaire, l'origine génétique du cancer a pu être clairement établie. La phase initiale de l'induction du cancer résulte de l'activation par des agents chimiques, physiques, viraux ou inflammatoires de protooncogènes en oncogènes qui, s'ils sont exprimés, conduiront à l'apparition de protéines anormales et à une prolifération anarchique. Cette activation a lieu selon trois processus majeurs : la translocation chromosomique, l'amplification ou la mutation génétique. Il est donc évident que l'ADN doit constituer la cible principale des agents anticancéreux (Hurley et Boyd, 1988). En effet, bien que le(s) mécanisme(s) d'action précis de la plupart des agents anticancéreux dont on dispose actuellement reste(nt) partiellement et même quelquefois totalement inconnu(s), la double hélice d'ADN est considérée comme la cible privilégiée de leur action cytotoxique (Baguley, 1982, 1991).

L'ADN adopte une structure de double hélice constituée de deux brins antiparallèles de bases adénine (A), thymine (T), guanine (G) et cytosine (C) soutenus par des enchaînements phosphate. L'appariement des bases A avec les bases T et des bases G avec les bases C se fait par l'intermédiaire de liaisons hydrogène. Bien que la conformation la plus fréquemment adoptée par l'ADN double brin soit la forme B (fig 1) (Drew et Dickerson, 1981 ; Dickerson, 1984), les formes A et Z ont été observées sous certaines conditions (Dickerson, 1984). L'ADN-B est caractérisé par une hélice droite régulière dans laquelle les paires de bases sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice. Deux sillons se forment entre les deux enchaînements phosphate, se sont les canaux d'informations de la double hélice qui peuvent être lus à partir de l'extérieur. Ils sont connus sous les noms de petit et grand sillons (fig 1).

Le plus simple mécanisme employé par les protéines pour distinguer des séquences particulières d'ADN fait intervenir des liaisons hydrogène spécifiques entre les bases et les chaînes d'acides aminés dans le grand et le petit sillon. Le grand sillon, relativement large (24 Å) et moyennement profond, est fréquemment employé par les protéines de contrôle telles que les promoteurs et les répresseurs à cause de son contenu important en informations sous forme de groupements fonctionnels. La reconnaissance moléculaire de séquences particulière de l'ADN par ces protéines fait intervenir des liaisons hydrogène spécifiques, des interactions électrostatiques et des contacts de Van der Waals. Le petit sillon, moins large (10 Å) mais plus profond, est le principal site de fixation de petites molécules. En effet, le manque d'informations contenues dans le petit sillon (en terme de donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène) permet seulement à de petites protéines et des petites molécules d'entrer en contact avec les bases (Lown, 1995).

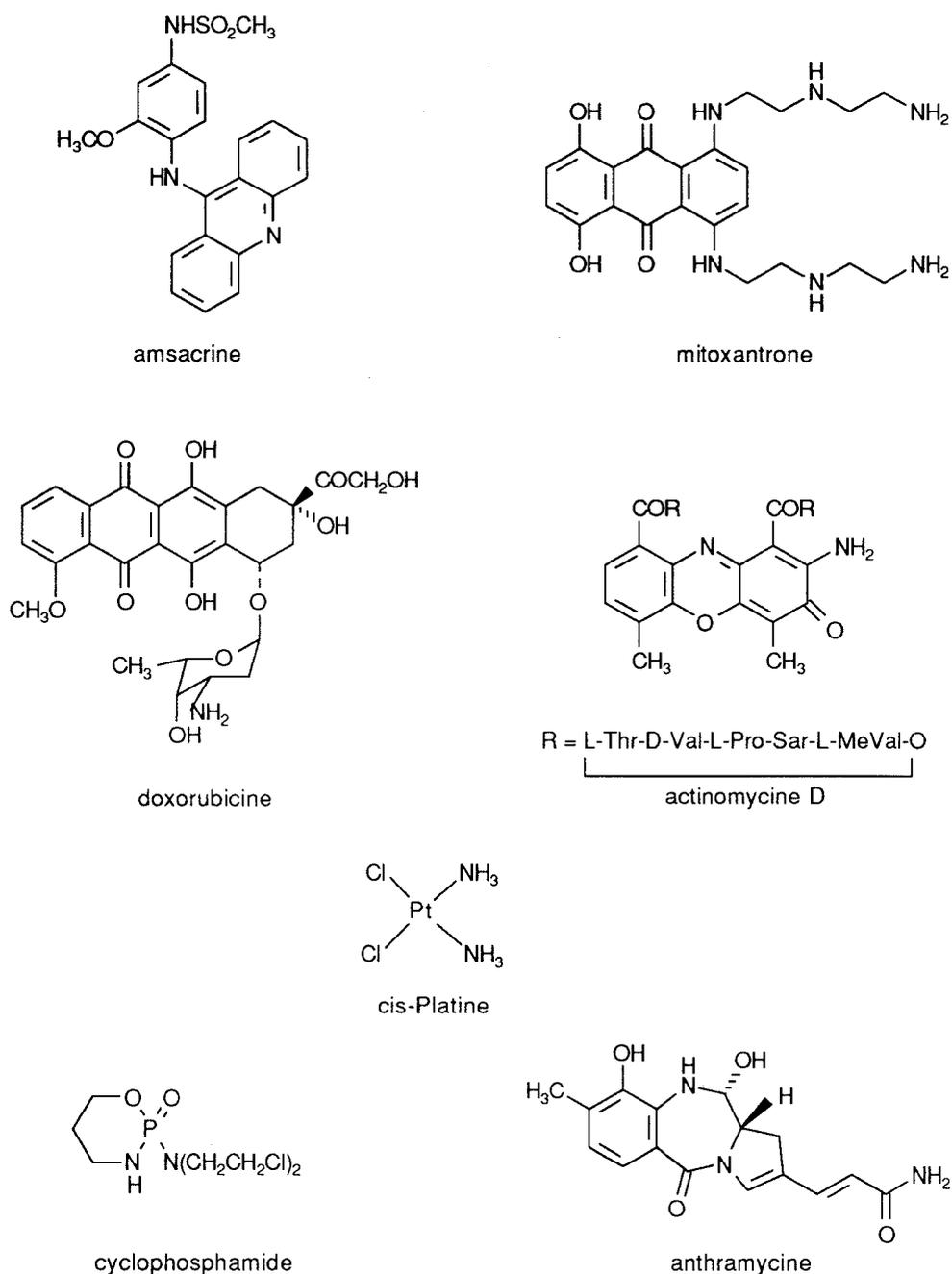


**Figure 1:** Vue schématique de l'ADN-B double brin montrant le grand et le petit sillon. A droite: les deux paires de bases AT et GC avec leurs groupements donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène.

De façon classique, on peut considérer qu'il existe deux classes de dérivés qui interagissent avec l'ADN : les intercalants et les ligands qui se lient au niveau des sillons. Ce dernier groupe inclut les agents qui se lient de façon non covalente et ceux qui possèdent des fonctions chimiques réactives c'est-à-dire les alkylants. Cette classification est assez schématique puisque la plupart des agents intercalants connus possèdent une partie non intercalante (sucre, oligopeptides...) capable d'interagir avec les sillons de l'ADN. Il est intéressant de noter que la liaison externe de cette partie non intercalante est cruciale pour leur efficacité thérapeutique (exemple : anthracyclines et anthracènediones) (Baguley, 1991). La partie non intercalante placée au niveau du grand ou du petit sillon constitue un élément de reconnaissance et favorise la sélectivité de séquence de la partie intercalante. La capacité de liaison avec l'ADN n'est pas une condition suffisante pour qu'un ligand soit un agent antitumoral. En général, l'agent interagissant avec l'ADN est doté d'un effet cytotoxique quand des dommages sur l'ADN interviennent (coupure de l'ADN, inhibition des topoisomérases...) suite à sa liaison à la double hélice.

Les intercalants sont des hétérocycles aromatiques plans, qui se glissent entre deux plateaux de paires de bases de la double hélice d'ADN, le plus souvent une guanine et une cytosine provoquant ainsi une déformation de l'hélice (Baguley, 1991). Ils provoquent ensuite des dommages au niveau de l'ADN soit par un processus de dégradation oxydatif, soit par alkylation électrophile covalente ou alors par stabilisation du complexe clivable ADN-topoisomérase II. La famille des anthracyclines, antibiotiques d'origine naturelle ou semi-synthétique dont le chef de file est la doxorubicine (antitumoral le plus utilisé en clinique) (Lown, 1993), est la plus représentative des agents intercalants. Citons également comme intercalant la mitoxantrone de la famille des anthracène-9,10-diones (Faulds et coll., 1991), l'amsacrine et l'actinomycine D (Baguley, 1991) (fig 2).

Les alkylants sont des composés qui se fixent de façon non réversible à l'ADN. La formation d'une liaison covalente entre un site nucléophile d'une base purique ou pyrimidique (le plus souvent l'azote en 7 de la guanine) et l'alkylant électrophile, induit une inhibition de la synthèse d'ADN et d'ARN. Parmi les principaux alkylants, se trouvent les moutardes à l'azote comme les cyclophosphamides, les nitrosourées, l'antramycine, la mitomycine, le cis-platine... (fig 2).



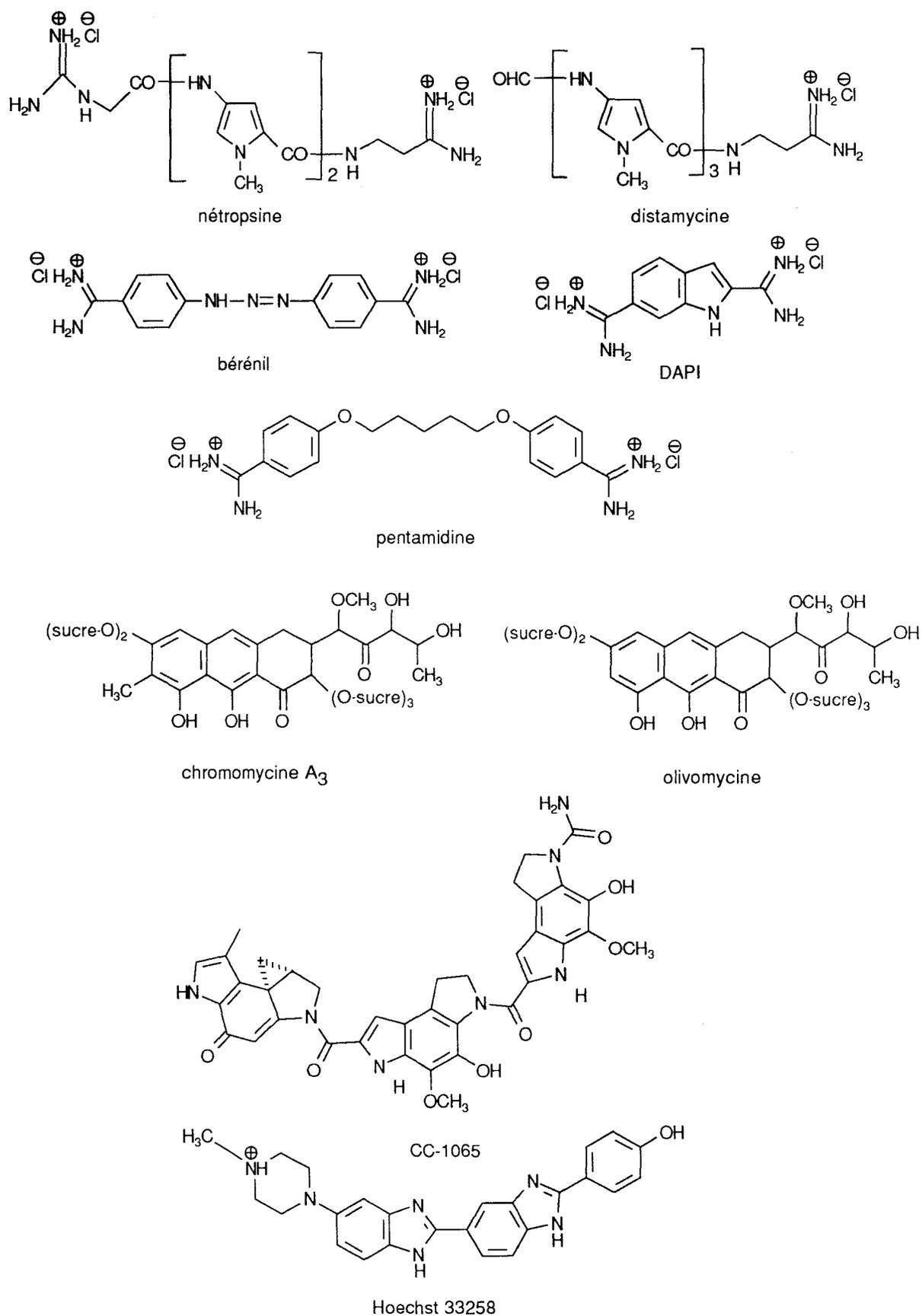
**Figure 2** : Structure chimique de quelques agents intercalants et alkylants.

La deuxième classe des agents interagissant avec l'ADN, comporte les molécules qui se lient aux sillons de l'ADN de façon réversible et sans intercalation. Les ligands du petit sillon qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique constituent une classe importante de composés dotés de plusieurs activités biologiques. Ils présentent des propriétés antivirales, antibactériennes et antitumorales. La plupart des ligands du petit sillon possèdent au moins une charge positive et se lient dans le petit sillon en reconnaissant de façon prédominante les séquences riches en résidus AT (Zunino et coll., 1995). Parmi ces composés on trouve les antibiotiques d'origine naturelle : la nétoposine et la distamycine

(fig 3). Les dérivés synthétiques sont représentés par la famille des diarylamidines comme le bérénil et le DAPI et la pentamidine (fig 3) (Baguley, 1982 ; Zunino et coll., 1995). Pour se glisser dans le petit sillon, ils doivent déplacer les molécules d'eau présentes (Kopka et coll., 1985a ; Patel et coll., 1982), ce qui n'entraîne qu'une faible déformation de la structure de l'hélice d'ADN (Klevit et coll., 1986 ; Carrondo et coll., 1989). Quelques molécules sont connues pour avoir une spécificité G-C, c'est le cas de la chromomycine A<sub>3</sub>, de l'olivomycine A (fig 3) (Baguley, 1982) et de l'anthracycline (fig 2) (Zunino et coll., 1995). Les petites molécules qui se lient au niveau du petit sillon de l'ADN ont une activité cytotoxique parce qu'elles interfèrent avec la liaison des protéines nécessaires pour la réplication et la transcription de l'ADN (Kahne, 1995).

Comme nous l'avons déjà signalé, la classification des agents interagissant avec l'ADN est très schématique. En effet, certaines molécules possèdent un mode de liaison mixte. C'est le cas particulièrement de la bléomycine dont la partie bithiazole, intercalant partiel (Hénichart et coll., 1985b), se lie également dans le petit sillon et crée des dommages oxydatifs (Stubbe et Kosarich, 1987). Un autre exemple concerne celui des ligands qui se lient dans le petit sillon mais aussi l'alkylent de façon irréversible tels que l'anthracycline de la famille des pyrrolo[1,4]benzodiazépine (fig 2) et le CC-1065 de la famille des cyclopropylpyrroloindole (fig 3) (Zunino et coll., 1995). D'autres ligands du petit sillon exercent leur activité cytotoxique en interférant avec l'activité catalytique des topoisomérases comme le dérivé Hoechst 33258 qui est un inhibiteur de la topoisomérase I (fig 3) (Zunino et coll., 1995).

Dans chacune de ces classes de molécules les relations structure-activité ont été étudiées dans le but de développer des analogues plus actifs et d'élucider les mécanismes d'action. De ces études, il ressort que la spécificité de reconnaissance lors de l'interaction avec l'ADN est primordiale pour l'efficacité des agents cytotoxiques.



**Figure 3** : Structure chimique de quelques agents se liant au niveau des sillons de l'ADN.

L'objectif majeur de la chimie médicinale et bioorganique moderne concerne le design de molécules synthétiques capables de mimer les différents aspects des molécules biologiques. L'étude détaillée de tels modèles pourrait conduire au développement de meilleurs agents thérapeutiques. Depuis quelques années, des efforts considérables ont été déployés afin de mieux comprendre les processus de reconnaissance moléculaire entre de petites molécules et les acides nucléiques. En effet, la reconnaissance moléculaire est un phénomène à la fois important et fondamental dans les processus biologiques tels que la catalyse enzymatique, la réplication, la transcription, la réponse immunologique ainsi que l'action de plusieurs médicaments (Lown, 1995). La détermination de l'origine de cette reconnaissance moléculaire est particulièrement intéressante puisque l'inhibition sélective de la transcription peut conduire au contrôle de l'expression génétique. Par conséquent, le design de molécules ayant une spécificité de fixation sur certaines séquences de l'ADN pourrait déboucher sur la conception de molécules susceptibles de se fixer sur des séquences spécifiques de l'ADN de cellules tumorales ou des ADN viraux. Par ailleurs, les ligands ayant une grande sélectivité de reconnaissance devraient produire une meilleure réponse biologique et une moindre toxicité, pour une dose donnée, par rapport aux ligands non sélectifs (Kahne, 1995 ; Lown, 1995). A l'heure actuelle, plusieurs approches sont développées pour obtenir des ligands à haute affinité et spécificité de fixation pour la double hélice d'ADN :

□ la stratégie antigène : elle consiste à synthétiser des oligonucléotides de séquence complémentaire susceptibles de reconnaître l'ADN par formation de triple hélice. En effet, les oligonucléotides sont capables de former par insertion dans le grand sillon une triple hélice avec appariement des bases puriques (Hélène et Toulmé, 1990). L'avantage théorique est qu'il n'y a pas de limite à la taille de la cible. Cependant, cette approche se heurte à des difficultés non encore résolues à l'heure actuelle telles que la faible pénétration cellulaire, la sensibilité aux nucléases intracellulaires et la faible liaison aux acides nucléiques ; un large excès est nécessaire pour avoir un effet biologique. De plus, la reconnaissance est limitée à des séquences homopuriniques ou homopyrimidiniques dans le grand sillon d'où une sélectivité peu élevée (François et coll., 1988 ; Lyamichev et coll., 1988 ; Hélène, 1991).

□ la deuxième approche consiste à améliorer l'affinité et la sélectivité des ligands de l'ADN déjà connus, en particulier les ligands du petit sillon tels que la nétrropsine et la distamycine. En effet, des modifications rationnelles des structures de ces ligands constituent une source prometteuse de composés efficaces utilisables pour le contrôle de l'expression génétique. Une telle approche a permis le développement des lexitropsines (Lown, 1988, 1995 ; Plouvier et coll., 1991).

□ la conception d'inhibiteurs de la topoisomérase II. En effet, les topoisomérases I et II (enzymes qui régulent la topologie de l'ADN) sont essentielles pour la sauvegarde de l'intégrité du matériel génétique durant les processus de transcription, de réplication et de recombinaison (Wigley, 1995 ; Watt et Hickson, 1994). Les topoisomérases constituent des cibles cellulaires de plusieurs agents anticancéreux (agents intercalants, ligands des sillons de l'ADN). Elles interagissent en stabilisant le complexe ternaire enzyme-ligand-ADN, provoquant ainsi une stimulation de la coupure de la double hélice. Différentes investigations ont permis de progresser dans la compréhension des structures et des fonctions des topoisomérases. Les études de sélectivité de séquences de la coupure de l'ADN provoquée par différents agents ainsi que des études de relation structure-activité ont permis d'identifier les déterminants structuraux pour la spécificité de séquence (Binaschi et coll., 1995 ; Capranico et Zunino, 1995). Ceci devrait permettre le design de nouveaux agents capables de cibler des régions particulières du génome.

□ enfin, la conception d'inhibiteurs des protéine-tyrosine kinases (PTKs). Les PTKs régulent la prolifération et la différenciation cellulaire. Une forte corrélation existe entre la surexpression des PTKs et un certain nombre de maladies prolifératives telles que le cancer, l'athérosclérose et le psoriasis. Par conséquent, le développement d'inhibiteurs des PTKs représente une approche nouvelle pour le design d'agents antiprolifératifs (Burke, 1994 ; Levitzki et Gazit, 1995). Ces inhibiteurs pourraient aussi constituer des sondes pharmacologiques intéressantes pour l'étude des mécanismes de transduction des récepteurs de facteurs de croissance (Burke, 1994 ; Levitzki et Gazit, 1995).

Ces deux dernières voies de recherches font l'objet de deux thèses en cours de préparation dans le laboratoire.

L'efficacité de tels dérivés est fonction de plusieurs paramètres. En effet, comme tout ligand, ces molécules devraient répondre aux critères suivants :

- une pénétration cellulaire et une stabilité vis-à-vis des enzymes cellulaires suffisantes pour permettre d'accéder au récepteur (ADN),
- une affinité élevée pour l'ADN,
- la liaison à l'ADN étant une condition non suffisante pour qu'un ligand soit un agent antitumoral efficace, ces agents devraient être capables d'induire des dommages au niveau de l'ADN (formation de complexes stables avec les topoisomérases par exemples ou induction de dégradations physiques de l'ADN...).

L'objectif de notre travail s'inscrit dans la deuxième approche et concerne le développement de molécules dites "**hybrides**" car constituées par l'association chimique de

deux molécules connues. Ce concept original, inspiré des modes de liaison à l'ADN de divers antibiotiques d'origine naturelle, devrait aboutir à des modèles de ligands ayant une grande affinité pour l'ADN et/ou dotés d'une spécificité de liaison (Bailly et Hénichart, 1991 ; 1994). Plusieurs modèles hybrides ont été synthétisés et étudiés au sein du laboratoire. Des molécules hybrides associant un agent intercalant et un peptide chélateur (Morier-Teissier et coll., 1989 ; 1990), ou un ligand spécifique du petit sillon (Bailly et Hénichart, 1991; 1994, et références citées) se sont ainsi montrées particulièrement intéressantes.

Dans le cadre de notre étude, le choix de la partie intercalante s'est porté sur le noyau anthraquinonique de la mitoxantrone. La mitoxantrone a été choisie pour son activité antitumorale reconnue et surtout pour ses propriétés d'interaction avec l'ADN (cf chapitre I). Cette partie intercalante a été associée à :

- ❑ des fractions polycationiques. Les chaînes polyaminées ont été utilisées pour leur analogie avec les polyamines naturelles (Tabor et Tabor, 1984 ; Marton et Feuerstein, 1986 ; Pegg, 1988),
- ❑ des fractions chélatrices de métaux. En l'occurrence le peptide Gly-Gly-L-His qui a été choisi pour son pouvoir chélateur de métaux (Yokoyama et coll., 1974 ; Kuroda et Aiba, 1979). En effet, sa présence met à proximité de l'ADN un système chélateur capable de produire des radicaux libres qui peuvent couper l'ADN double brin (Chiou, 1983).
- ❑ des fractions ligands du petit sillon. La nétropsine antibiotique de type pyrroleamidine a été utilisée pour sa spécificité de fixation à l'ADN (cf chapitre IV).

Dans le premier chapitre, nous ferons un rappel de l'état actuel des connaissances sur les propriétés biologiques, thérapeutiques et d'interaction avec l'ADN des anthraquinones en particulier de la mitoxantrone. Dans les chapitres II, III et IV, nous développerons la synthèse des molécules hybrides obtenues.

Les modèles hybrides conçus ont été étudiés tant du point de vue de leur interaction avec l'ADN par des techniques physicochimiques variées que de leur activité biologique *in vitro* et *in vivo* pour l'analogue Gly-Gly-L-His-anthraquinone. Toutes les données recueillies pour ces ligands ont par ailleurs été comparées à celles disponibles pour leurs homologues précédemment élaborés au laboratoire (chapitres II, III et IV).

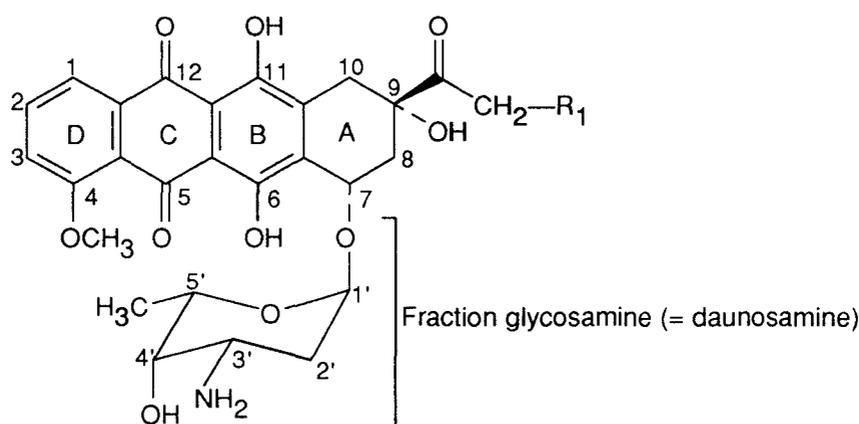
# CHAPITRE I

## *ANTHRAQUINONES-MITOXANTRONE*

## I-1 Les antibiotiques de type (aminoalkylamino)anthraquinone

### I-1-1 Historique

Les antibiotiques de la famille des anthracyclines (Lown, 1993), dont les chefs de file sont la daunomycine et la doxorubicine (adriamycine) (fig 4), se sont révélés posséder des propriétés anticancéreuses largement utilisées en clinique. La daunomycine est utilisée dans le traitement des leucémies aiguës, alors que la doxorubicine est utilisée dans le traitement des tumeurs solides. Ces deux composés sont constitués d'un chromophore aglycone constitué de 4 noyaux et d'un résidu sucre (fraction glycosamine). Cependant leur utilité clinique est limitée par les toxicités qui leur sont associées. Il s'agit surtout d'une cardiotoxicité dose-limitante (Young et coll., 1981 ; Lown, 1983).



**Figure 4 :** Structure spatiale des deux chefs de file des anthracyclines  
 daunomycine R<sub>1</sub> = H  
 doxorubicine R<sub>1</sub> = OH.

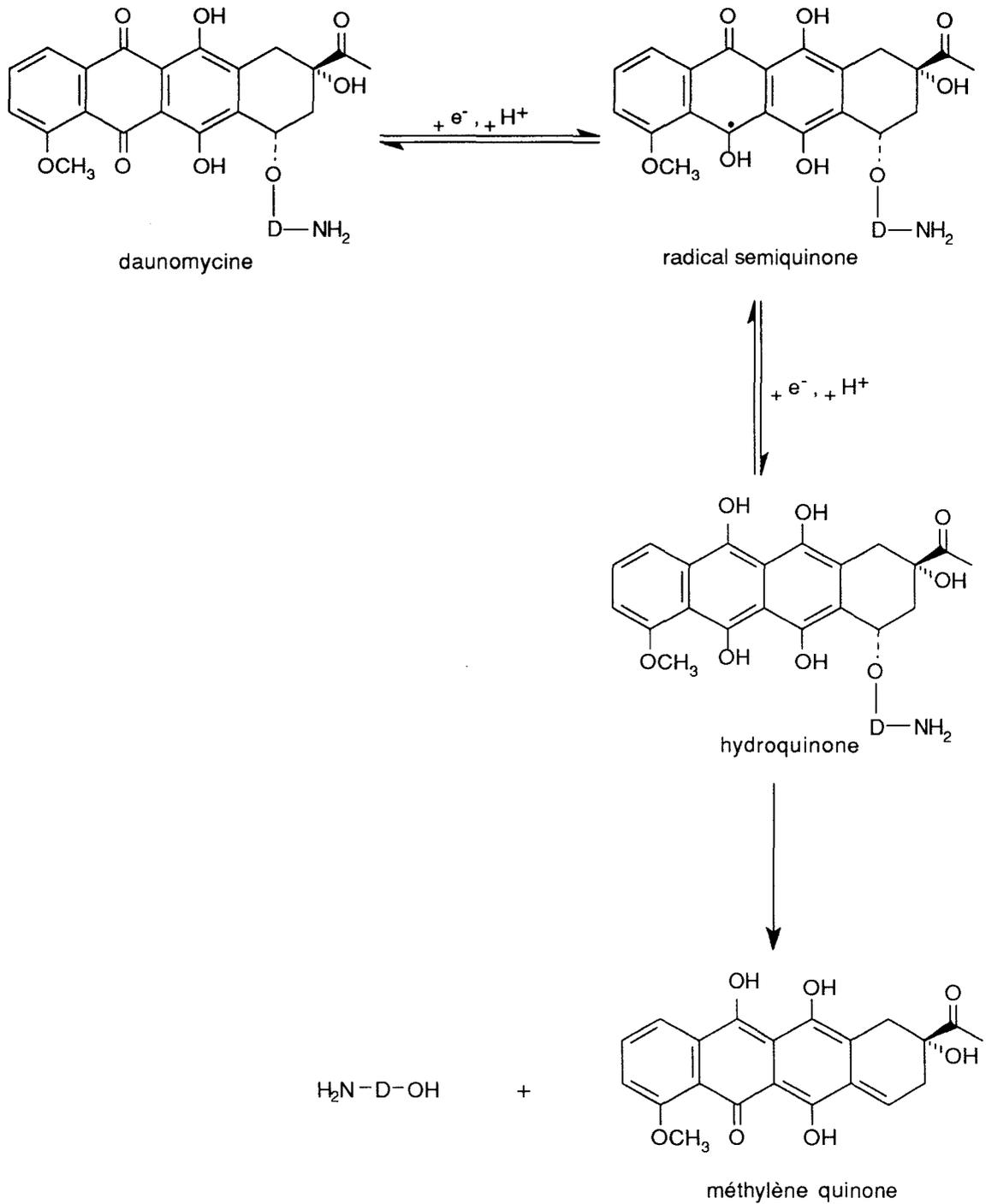
Par conséquent, des efforts considérables ont été déployés pour comprendre le mécanisme d'action de ces antibiotiques et pour élucider l'origine de cette cardiotoxicité (Lown, 1983 ; Lown et coll., 1982). Des modifications structurales ou le design de nouvelles substances inspirées par ce modèle devraient permettre de diminuer sinon d'éliminer leur cardiotoxicité.

La cible intracellulaire des anthracyclines est l'ADN nucléaire (Wang et coll., 1987). L'interaction des anthracyclines avec l'ADN se fait par intercalation du chromophore aglycone plan (noyaux B, C, D). Le noyau cyclohexène A est dans le petit sillon de la double hélice (Wang et coll., 1987). Les substituants qui se trouvent sur ce noyau forment des liaisons hydrogène avec les paires de bases avant et après le site d'intercalation. L'oxygène de l'hydroxyle en 9 forme deux liaisons hydrogène avec les

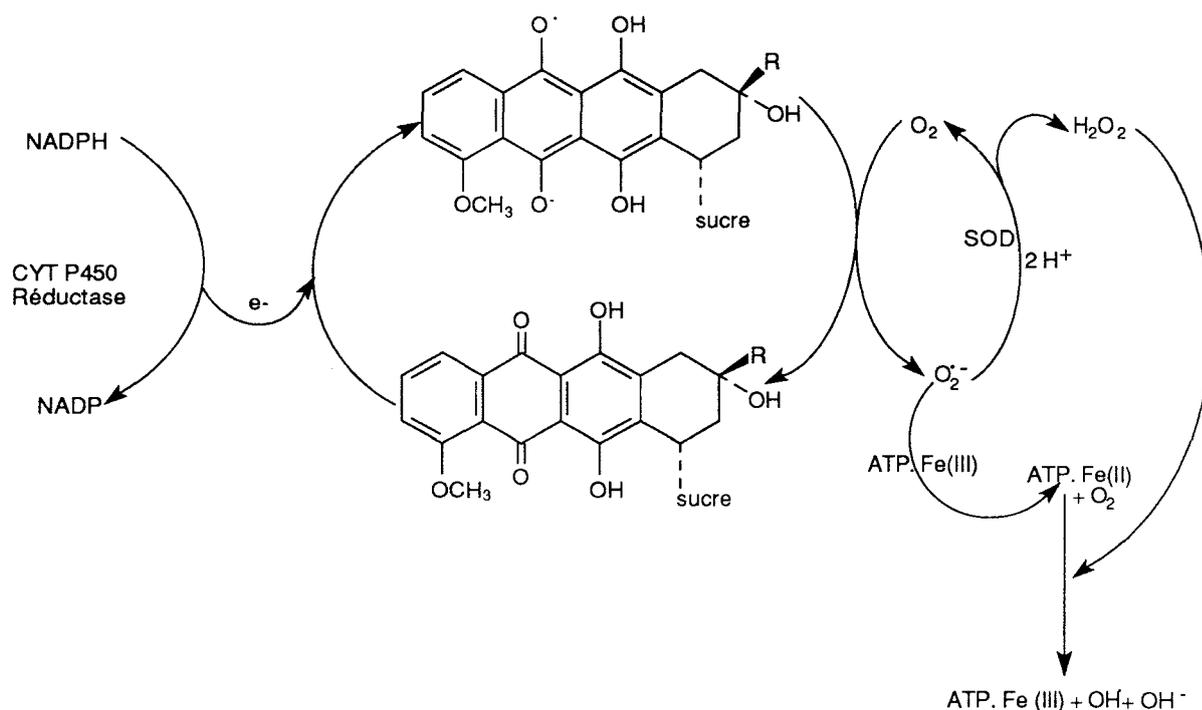
azotes 3 et 2 d'une base guanine adjacente. Le sucre se lie dans le petit sillon (Wang et coll., 1987). L'intercalation peut induire une cytotoxicité, soit directement par inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN, soit indirectement par coupure simple ou double brin des acides nucléiques (Islam et coll., 1985). En effet, l'intercalation est le processus primaire de l'interaction des anthracyclines avec l'ADN, mais en fait *in vivo* la molécule est activée par une réduction faisant intervenir 1 ou 2 électrons (Rao et coll., 1978 ; Gianni et coll., 1982). La réduction à un électron produit le radical semiquinone. L'élimination de la fonction glycosidique (groupe partant) est observée après réduction par deux électrons (fig 5) (Kleyer et Koch, 1984 ; Anne et Moiroux, 1985). Elle provoque la formation d'un électrophile (méthylène quinone) susceptible d'alkyler de nombreuses molécules vitales (protéines, lipides, acides nucléiques) (Bachur et coll., 1978 ; Sinha et coll., 1984).

La cardiotoxicité des anthracyclines a été reliée à leur capacité à subir une réduction par des enzymes mitochondriales (NADH déshydrogénase) ou microsomiales (NADPH cytochrome P-450 réductase) en radicaux semiquinones (Kalyanaraman et coll., 1984 ; 1991). Il a été montré que le radical semiquinone, sous certaines conditions (concentration faible en  $O_2$ ), est capable de réduire les complexes de fer ferrique et de mobiliser le fer de la ferritine *in vitro*. Il en résulte, une production de radicaux libres oxygénés ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ) par le biais de la réaction de Fenton (Kalyanaraman et coll., 1991). Par ailleurs, ce radical semiquinone est capable de se recombinaison avec l'oxygène moléculaire pour former des peroxydes et des radicaux libres hydroxyle (fig 6 ; Lown et coll., 1982) qui vont induire la peroxydation des lipides au niveau des microsomes hépatiques, des mitochondries et surtout des sarcosomes cardiaques (Bachur et coll., 1978 ; Basra et coll., 1985 ; Thornalley et Dodd, 1985). Deux éléments étayent l'hypothèse d'une cardiotoxicité due aux radicaux libres oxygénés (Kalyanaraman et coll., 1991):

- *in vivo*, la cardiotoxicité engendrée par les anthracyclines est inhibée par des capteurs de radicaux libres "scavengers" et par des chélateurs de fer,
- des analogues des anthracyclines ne pouvant subir le cycle de réduction enzymatique sont très peu ou pas cardiotoxiques.

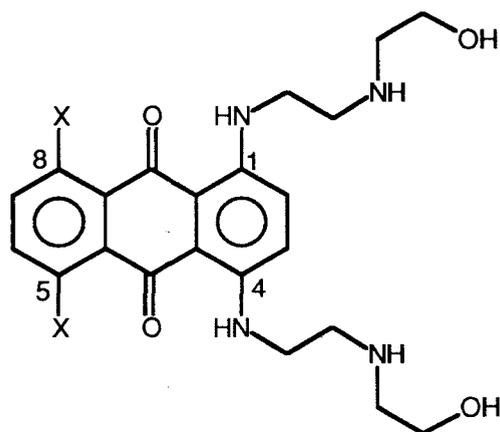


**Figure 5 :** Schéma de réduction de la daunomycine : réduction réversible à 1 e<sup>-</sup> en radical semiquinone suivie d'une autre réduction à 1e<sup>-</sup> en hydroquinone. La coupure irréversible de la fraction glycosidique de l'hydroquinone donne une méthylène quinone (Kleyer et Koch, 1984 ; Anne et Moiroux, 1985).



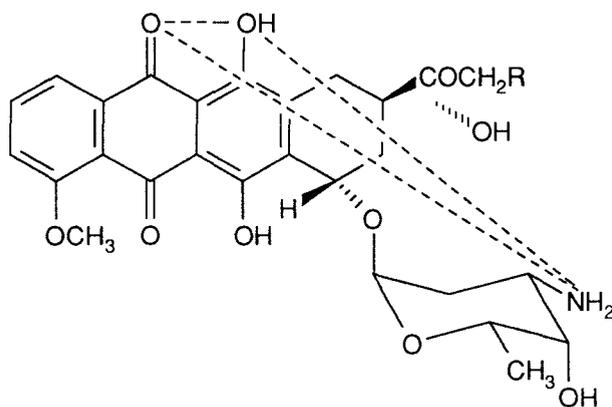
**Figure 6 :** Représentation schématique du cycle de réduction enzymatique du chromophore anthracycline conduisant à l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , puis au radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$  après intervention des complexes de fer (Lown et coll., 1982).

Depuis 1974, Adamson a proposé, sur la base d'études de relations structure-activité (RSA) des anthracyclines, que l'activité antitumorale exigeait la présence du noyau aromatique plan et celle du groupement basique amino de l'ensemble glycosamine et que la cardiotoxicité était due à ce même ensemble, son départ permettant à l'anthracycline d'être captée par les cellules du muscle cardiaque. Cette proposition suggérait que le remplacement de la fraction glycosamine par des chaînes basiques amino ou aminoalkyle, ayant leur atome d'azote placé à une bonne distance par rapport aux atomes d'oxygène de la partie aglycone, devrait conduire à des composés qui se lieraient de la même façon à l'ADN et qui auraient une activité antitumorale sans cardiotoxicité. Dès lors, l'Allied Chemical Corporation (USA) a fourni au National Cancer Institute (NCI) tout un ensemble de composés afin de tester leur activité anticancéreuse. L'un de ces composés, la 1,4-bis[(2-(2-hydroxyéthyl)amino)éthylamino]anthracène-9,10-dione (amétantrone ou AQ, fig 7), développé à l'origine comme colorant (ou pigment) pour la fabrication d'encre, s'est avéré présenter une activité significative vis-à-vis de la leucémie P-388 et posséder les caractéristiques structurales requises (Adamson, 1974) pour expliquer une telle activité.



**Figure 7 :** Structure spatiale de la mitoxantrone (DHAQ) et de l'amétantrone (AQ)  
 $X = H$  : AQ ;  $X = OH$  : DHAQ.

Par ailleurs, Cheng et coll., (1979) avaient observé la présence d'une structure commune à de nombreux agents antitumoraux (il s'agit du triangle N-O-O) incluant la doxorubicine et la daunomycine (fig 8).



**Figure 8 :** Hypothèse du triangle N-O-O appliquée aux anthracyclines.

Sur la base de cette observation, quatre groupes d'analogues du dérivé de l'amétantrone ont été synthétisés et testés. Ils incluent :

- des modifications de la chaîne aminoéthylaminoéthanol,
- des substitutions du noyau,
- l'incorporation de la chaîne aminoéthylaminoéthanol sur d'autres système aromatiques,
- des combinaisons des modifications précédentes.

Zee Cheng et Cheng (1978) ont synthétisé et testé 14 analogues de l'amétantrone. Le nouveau dérivé 1,4-dihydroxy-5,8-bis[(2-(2-hydroxyéthyl)amino)éthylamino]-9,10 anthracènedione (DHAQ ou mitoxantrone ou novantrone, fig 7) s'est révélé être le plus actif (Zee Cheng et Cheng, 1978 ; Cheng et coll., 1979 ; Johnson et coll., 1979). Pendant ce temps, Murdock et ses collaborateurs - qui travaillaient indépendamment aux laboratoires Lederlé - ont synthétisé 56 dérivés (aminoalkylamino)anthraquinones disubstitués pour améliorer la faible activité antitumorale du composé 1,4-bis[(-2(diméthylamino)éthyl)amino]anthracène-9,10-dione. Le dérivé le plus actif était le dichlorhydrate de la mitoxantrone (Murdock et coll., 1979 ; Wallace et coll., 1979). Depuis, plus de 300 dérivés des (aminoalkylamino)anthraquinones ont été synthétisés et testés pour leur activité anticancéreuse (Krapcho et coll., 1986 ; Uyeki et coll., 1981 ; Zee Cheng et Cheng, 1982).

La mitoxantrone possède la meilleure activité antitumorale. Ceci peut être expliqué par l'hypothèse du "triangle N-O-O" parfaitement défini dans la structure de la mitoxantrone comme le montre la figure.9, hypothèse corroborée par le fait que l'analogue possédant les chaînes aminopentanol dépourvues d'atome d'azote au centre est totalement inactif (Cheng et coll., 1981).

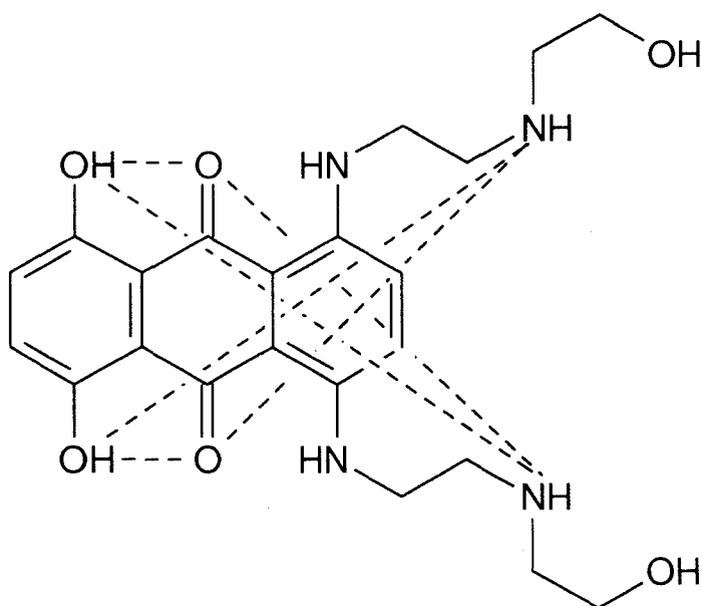


Figure 9 : Hypothèse du triangle N-O-O appliquée à la mitoxantrone.

## I-1-2 Relations structure-activité

Les relations structure-activité des aminoalkylaminoanthraquinones ont été étudiées par plusieurs équipes, la nature et la position des chaînes latérales s'avérant être des éléments cruciaux pour l'activité biologique. Ces relations peuvent être résumées comme suit :

- une bonne activité antitumorale exige la présence des groupements éthylènediamine sur les positions C1 et C4 du noyau anthraquinonique (Zee Cheng, 1978 ; Murdock et coll., 1979 ; Katzhendler et coll., 1989),
- toute disubstitution en C1 et C5 donne des dérivés inactifs (Zee Cheng et Cheng, 1978 ; Johnson et coll., 1979 ; Katzhendler et coll., 1989),
- la présence simultanée de deux chaînes latérales basiques n'est pas absolument nécessaire pour avoir une activité antitumorale. Des composés dans lesquels l'une des chaînes est remplacée par un groupement OH, NH<sub>2</sub> ou par d'autres chaînes gardent une activité significative (Islam et coll., 1985 ; Stefanska et coll., 1989 ; Krapcho et coll., 1991 ),
- les deux azotes basiques sur chaque chaîne latérale sont nécessaires à l'activité, mais l'augmentation de la distance entre ces deux azotes, l'addition d'autres centres basiques ou l'addition de substituants volumineux sur l'azote terminal diminuent l'activité. Seule l'addition du groupement hydroxyéthyle sur l'azote terminal augmente l'activité en apportant un caractère hydrophile qui l'emporte sur la baisse d'activité provoquée par le groupe éthyle seul (Zee Cheng et Cheng, 1978),
- les groupements hydroxyle en positions C5 et C8 augmentent l'activité contrairement à tout autre substituant (Cl par exemple) (Zee Cheng et coll., 1987 ; Murdock et coll., 1979).

En dépit du fait que les (aminoalkylamino)anthraquinones ont été synthétisées pour interagir avec l'ADN, aucune corrélation n'a pu être établie entre leur capacité de liaison à la double hélice d'ADN, d'inhibition de synthèse des acides nucléiques et leur activité antitumorale *in vivo* (Johnson et coll., 1979 ; Faulds et coll., 1991).

## I-2 La Mitoxantrone

### I-2-1 Structure et caractéristiques physiques

La dérivé 1,4-dihydroxy-5,8-bis[(2-(2-hydroxyéthyl)aminoéthyl)amino]-9,10 anthracènedione ou mitoxantrone ou DHAQ (fig 7) est une anthraquinone bisubstituée par deux groupements hydroxyle et deux chaînes latérales basiques disposées symétriquement de part et d'autre du noyau chromophore tricyclique plan. Le principe actif est utilisé sous forme de dichlorhydrate et se présente sous forme de poudre microcristalline soluble dans l'eau.

La présence des fonctions amine donne à la molécule de mitoxantrone un caractère basique. Les  $pK_1$  et  $pK_2$  sont proches l'un de l'autre et ont des valeurs comprises entre 6,5 et 8 (Kapuscinski et coll., 1981). A pH 7, le médicament est principalement sous forme monocationique. Sachant que lorsque le pH du milieu est égal au pKa d'un acide, la concentration en forme acide est égale à celle en forme basique, et vu les valeurs de pKa de la mitoxantrone, la charge positive est partagée entre les deux sites basiques, chaque site possédant en moyenne une demi-charge positive. On peut supposer que les protons se fixent préférentiellement sur les azotes des chaînes latérales plutôt que sur les azotes directement fixés au cycle aromatique car les amines secondaires sont plus basiques que les azotes de la paraphénylènediamine.

### I-2-2 Le procédé de synthèse

Les détails de synthèse et les caractéristiques de ce produit sont décrits par Zee Cheng et Cheng (1978) et Murdock et coll., (1979). Leur stratégie de synthèse, basée sur la méthode publiée en 1968 par Greenhalgh et Hughes, fait intervenir une condensation de la 5,8-dihydroxyleucoquinizarine avec un excès de l'amine appropriée suivie d'une oxydation à l'air de l'intermédiaire dihydro (fig 10).

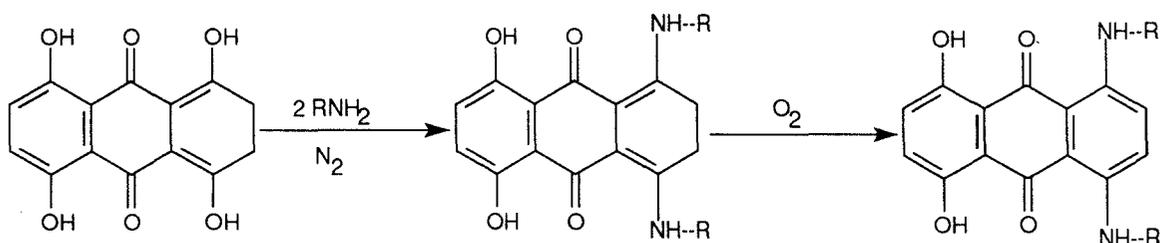


Figure 10 : Stratégie de synthèse des aminoalkylanthraquinones.

### I-2-3 Mécanismes d'action

Malgré l'intérêt porté à la mitoxantrone depuis sa découverte, pour son utilité clinique et de son importante activité biologique, son mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé. Il s'agit probablement d'un mécanisme de nature multimodale.

#### I-2-3-1 Interaction avec l'ADN

##### a- Modalités d'interaction

Comme pour les anthracyclines, les acides nucléiques représentent la cible intracellulaire de la mitoxantrone. Elle se lie à la fois à l'ADN et à l'ARN nucléaires ainsi qu'à l'ARN cytoplasmique (Kapuscinski et coll., 1981). De plus, cette fixation sur l'ARN se produit à de plus faibles concentrations intracellulaires que celles nécessaires à l'interaction avec l'ADN. Le médicament est ainsi responsable d'un blocage direct de la synthèse des protéines. Il interagit par intercalation de son chromophore plan entre les plateaux de paires de base, l'intercalation étant cependant limitée par la présence des chaînes latérales étendues (Kapuscinski et coll., 1981 ; Lown et coll., 1985 ; Lown et Hanstock, 1985). Ces chaînes engagent des liaisons électrostatiques avec la partie périphérique anionique de la double hélice.

Des études en spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) (Lown et Hanstock, 1985) ainsi que des études théoriques (Islam et coll., 1985 ; Chen et coll., 1986) du complexe de la mitoxantrone avec différents oligonucléotides ont montré que le chromophore s'intercale de telle sorte que son grand axe est perpendiculaire à l'axe des paires de bases et que les deux chaînes latérales se fixent dans le grand sillon. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par étude en RMN-2D du complexe d(CGCG)<sub>2</sub>-mitoxantrone (Lown et Hanstock, 1985), en modélisation moléculaire du complexe d(CG)<sub>2</sub>-mitoxantrone (Islam et al 1985 ; Collier et Neidle 1988) et par des études de cinétique de liaison (Denny et Wakelin, 1990). L'étude de dérivés (amidoalkyl)anthracène-9,10-diones substitués en 1,4 ; 1,5 ; 1,8 et 2,6 (Islam et coll., 1985 ; Agbandje et coll., 1992 ; Tanious et coll., 1992) montre que les dérivés substitués en 1,4 et 1,8 comme la mitoxantrone s'intercalent avec les deux chaînes dans le grand sillon, alors que les dérivés 1,5 et 2,6 s'intercalent avec l'une des chaînes dans le grand sillon et l'autre dans le petit sillon de la double hélice. Cette dernière disposition confère une stabilité au complexe ligand/ADN qui pourrait expliquer la cytotoxicité. Ceci confirme encore une fois le modèle d'intercalation de la mitoxantrone dans lequel les deux chaînes latérales se situent dans le grand sillon. On peut ainsi conclure que la position des chaînes latérales dicte le

mode de liaison par intercalation des dérivés anthracène-9,10-dione (Tanious et coll., 1992). Cette intercalation provoque une détorsion de la double hélice d'ADN d'un angle allant de  $17^\circ$  à  $26^\circ$  selon les auteurs (Kapuscinski et coll., 1981 ; Lown et coll., 1985), ces angles étant déterminés par une méthode de viscosimétrie (Kapuscinski et coll., 1981 ; Lown et coll., 1985) ou par une méthode utilisant la topoisomérase (Lown et coll., 1985). De plus la mitoxantrone interagit aussi directement avec l'ADN et l'ARN simple brin à la différence des intercalants classiques (Kapuscinski et coll., 1981). Ceci laisse supposer que la molécule établit des liaisons électrostatiques avec la partie anionique périphérique de la double hélice d'ADN.

Lorsque la concentration en médicament devient importante, un processus unique de fixation à l'extérieur par interactions électrostatiques (sans intercalation) peut également se produire. Il est même possible qu'il y ait compétition entre l'intercalation et la fixation externe dans certaines conditions de forces ioniques et pour certains rapports ADN/DHAQ (Kapuscinski et coll., 1981). En effet, cet auteur a montré que l'intercalation se faisait préférentiellement lorsque le rapport ADN/DHAQ est faible. Ce rapport ADN/DHAQ *in vitro* conforte l'hypothèse suivant laquelle l'activité biologique est due à l'intercalation. La constante d'association importante de la mitoxantrone vis-à-vis des sites d'intercalation ( $K_i = 1,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) comparée à celle du bromure d'éthidium ( $K_i = 0,86 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) ou à celle de la daunomycine ( $K_i = 0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) constitue une preuve supplémentaire de la prédominance du mécanisme d'intercalation aux doses pharmacologiques.

L'intercalation des anthracène-9,10-diones comme la mitoxantrone et l'amétantrone au niveau de l'ADN semble être l'événement principal de leur interaction avec l'ADN. Cependant, cette intercalation n'est pas suffisante pour expliquer l'activité antitumorale. Elle semble être responsable de l'ancrage de ces molécules sur des sites spécifiques avant que d'autres mécanismes n'interviennent.

#### b- Sélectivité et affinité de liaison

Les constantes d'association de la mitoxantrone et d'autres dérivés des (aminoalkylamino)anthraquinones ont été déterminées par des études de spectrométrie d'absorption (Krishnamoorthy et coll., 1986 ; Lown et coll., 1986a). Ces composés peuvent être classés en trois catégories :

- la mitoxantrone et les composés ayant également un OH sur le cycle aromatique et sur les chaînes latérales ont une valeur de  $K_a$  proche de  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ,
- les composés possédant des OH sur le cycle aromatique mais dépourvus de OH sur les chaînes latérales ont une valeur de  $K_a$  proche de  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ,
- les composés dépourvus de OH possédant différents substituants sur le cycle aromatique ont une valeur de  $K_a$  proche de  $0,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

Il est à noter que les valeurs de  $K_a$  dépendent énormément des conditions opératoires en particulier de la nature du tampon (force ionique). Pour la mitoxantrone par exemple :  $K_a = 6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  dans le tampon PIPES 10 (PIPES 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,1 M, pH 7) ;  $K_a = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  dans le tampon PIPES 50 (PIPES 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 7) (Lown et coll., 1985).

La mitoxantrone ne présente aucune préférence pour les différentes conformations des acides nucléiques ; elle interagit autant avec l'ADN en conformation A qu'avec l'ADN en conformation B (Kapusinski et coll., 1981). Elle présente une légère préférence pour les séquences alternées en particulier les régions où il y a alternance cytosine-guanine (Krishnamoorthy et coll., 1986). Des études en RMN-2D du complexe  $d(\text{CGCG})_2$ -mitoxantrone (Lown et Hanstock, 1985) ainsi que des études théoriques (Chen et coll., 1986) ont montré que la mitoxantrone se liait à l'ADN avec une sélectivité pour les sites pyrimidine-3'-5'-purine. La sélectivité de la mitoxantrone peut être schématisée de la façon suivante :



Ces résultats ont été confirmés par des études de "foot print" utilisant la DNase I comme agent de coupure enzymatique. Ces études ont été réalisées afin de définir une éventuelle spécificité de liaison (Fox et coll., 1986). Tous les sites pyrimidine-3'-5'-purine sont protégés de la coupure à la DNAase I. Il s'agit de sites riches en résidus GC.

Des essais d'inhibition de transcription *in vitro* ont été réalisés pour déterminer la spécificité de liaison de la mitoxantrone (Panousis and Phillips, 1994). Les blocages de la transcription par l'ARN polymérase d'*E.coli* sont observés de façon dominante sur les séquences 5'-CpA (64%) et à un moindre degré sur les séquences 5'-CpG (25%). Globalement, 93% des sites bloqués sont des séquences pyrimidine-3'-5'-purine. Ce

résultat est totalement en accord avec les études théoriques (Chen et coll., 1986) et avec les études de "footprinting" (Fox et coll., 1986). Les séquences entourant le site d'intercalation influent sur la spécificité de liaison de la mitoxantrone puisque les sites de blocage contiennent des bases A/T avant le site d'intercalation CpA et CpG. Ainsi les séquences spécifiques d'intercalation de la mitoxantrone sont 5'-(A/T)CA et 5'-(A/T)CG. Par ailleurs, la localisation du blocage transcriptionnel sur une paire de base avant le site d'intercalation est conforme au modèle dans lequel les chaînes latérales sont dans le grand sillon (Panousis et Phillips, 1994).

### c- Cinétique de liaison

La cinétique d'association de la mitoxantrone avec l'ADN est trop rapide pour pouvoir être suivie par stopped-flow. Cependant, il est possible de suivre la cinétique de dissociation des complexes ligand-ADN grâce à la dissociation forcée au dodécylate de sodium (SDS). C'est la technique du "SDS driven dissociation" (Lown et coll., 1985 ; Krishnamoorthy et coll., 1986). La mitoxantrone et la daunomycine ont des constantes de vitesse de dissociation similaires qui sont inférieures à celles de l'amétantrone. La force ionique et la température ont les mêmes effets sur les constantes de vitesse de ces deux molécules. L'analyse des effets provoqués par la force ionique suggère que les deux molécules se lient à l'ADN selon un processus biphasique. Il y a tout d'abord formation rapide d'un complexe extérieur initial suivi d'une intercalation plus lente.

La dissociation de la daunomycine à partir de ses complexes avec les deux oligonucléotides poly[d(G-C)]<sub>2</sub> et poly[d(A-T)]<sub>2</sub> est un processus mono-exponentiel avec des constantes de vitesse très proches. Par contre, la mitoxantrone présente une vitesse de dissociation plus lente à partir de son complexe avec le nucléotide poly[d(G-C)]<sub>2</sub> par rapport à celle avec poly[d(A-T)]<sub>2</sub> alors que sa cinétique de dissociation à partir des deux complexes est bi-exponentielle. Deux explications sont possibles :

□ la mitoxantrone se lie à l'ADN selon deux modes d'intercalation différents : un premier mode avec les deux chaînes latérales dans le même sillon et un deuxième avec chaque chaîne dans un sillon (Krishnamoorthy et coll., 1986). Comme, nous l'avons signalé précédemment, différentes études ont montré clairement que la mitoxantrone se liait à l'ADN avec les deux chaînes dans le grand sillon (Chen et coll., 1986 ; Lown et Hanstock, 1986 ; Collier et Neidle 1988 ; Denny et Wakelin 1990),

□ la mitoxantrone se lie et se dissocie différemment avec les sites pyrimidine-3',5'-purine et purine-3',5'-pyrimidine (Krishnamoorthy et coll., 1986). Cette préférence pour les sites pyrimidine-3',5'-purine a été mise en évidence lors d'études de "footprinting" à la DNAase I (Fox et coll., 1986) et des essais de transcription *in vitro* (Panousis et Philips, 1994).

La mitoxantrone se dissocie beaucoup plus lentement que son homologue non hydroxylé l'amétantrone. Ceci met en évidence l'importance des groupements hydroxyle dans la liaison à l'ADN et corrobore les résultats des études de RMN et de cinétique de liaison (Lown et Hanstock, 1985 ; Denny et Wakelin, 1990) qui suggérait que le chromophore plan était dans une orientation perpendiculaire à l'axe de l'hélice.

#### I-2-3-2 Condensation des acides nucléiques

L'amétantrone et la mitoxantrone ont des structures similaires alors que leurs effets cytostatiques et cytotoxiques sont différents. La mitoxantrone est 10 à 100 fois plus active que l'amétantrone. L'une des corrélations capables d'expliquer cette différence réside dans leur capacité à condenser les acides nucléiques (Kapuscinski et Darzynkiewicz, 1984, 1986). En effet, la mitoxantrone condense les acides nucléiques (même *in situ*) à des concentrations 5 à 40 fois plus faibles que celles de l'amétantrone.

Cette condensation peut être étudiée par microscopie électronique (Kapuscinski et Darzynkiewicz, 1986) ou par mesure de la dispersion de la lumière (Kapuscinski et Darzynkiewicz, 1984 ; Cera et Palumbo, 1990). La mitoxantrone provoque l'agrégation et la compaction de l'ADN par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques entre les chaînes latérales cationiques et les enchaînements phosphate. Elle induit aussi des changements dans les nucléoles (ségrégation des composantes fibrillaires, désintégration du nucléole). De plus, la mitoxantrone comme la daunomycine est capable d'augmenter les constantes de sédimentation de la chromatine. Par conséquent, elle compacte et condense aussi la chromatine (Waldes et Center, 1981, 1982). Tous ces effets sont observés à des doses pharmacologiques. Il est donc possible que les effets pharmacologiques s'exercent par l'intermédiaire de ces mécanismes en particulier la condensation de l'ARN dans le nucléole (Kapuscinski et Darzynkiewicz, 1986).

### I-2-3-3 Action sur la topoisomérase II

Les topoisomérases sont des enzymes nucléaires qui permettent de modifier la topologie de l'ADN durant les processus de transcription, de réplication et de recombinaison. Elles sont essentielles à la sauvegarde de l'intégrité du matériel génétique (Watt et Hickson, 1994 ; Wigley, 1995). Les topoisomérases se divisent en deux classes mécanistiques : topoisomérase I et II. La topoisomérase I induit des coupures transitoires sur un seul brin de l'ADN, le brin intact passe à travers la coupure puis l'enzyme réalise la ligation. La topoisomérase II, quant à elle, provoque des cassures transitoires sur les deux brins de l'ADN. Cette coupure permet à un ADN double brin de passer à travers celle-ci avant que l'enzyme ne réalise la ligation. Par ailleurs deux isoenzymes distinctes de la topoisomérase II sont présentes dans les cellules de mammifères : topoisomérase I $\alpha$  (170 kDa) et I $\beta$  (180 kDa) (Capranico et Zunino, 1995).

Les topoisomérases sont considérées comme des cibles privilégiées d'importants agents anticancéreux tels que les agents intercalants ou les ligands du petit sillon (Corbett et Osheroff, 1993 ; Capranico et Zunino, 1995). Ces agents interfèrent sur le cycle catalytique de l'enzyme en formant un complexe ternaire enzyme-ligand-ADN stimulant ainsi la coupure de l'ADN ou inhibent l'activité de l'enzyme sans stimuler la coupure.

La mitoxantrone, comme d'autres agents intercalants (anthracyclines, acridines...) est un inhibiteur puissant de la topoisomérase II. Elle forme un complexe ternaire stable mitoxantrone-ADN-topoisomérase appelé "complexe clivable" qui s'accumule et empêche l'enzyme d'effectuer la ligation. L'accumulation des cassures peut être létale pour la cellule (Crespi et coll., 1986 ; Fox et Smith, 1990). Un modèle a été proposé récemment, basé sur la spécificité de séquence du clivage par la topoisomérase II de l'ADN SV40 en présence de la doxorubicine (Capranico et coll., 1990a, b). Ce modèle suggère qu'un complexe ternaire se forme dans lequel la molécule interagit de façon plus ou moins intercalante avec les deux paires de bases entourant le site de clivage de l'ADN, interférant ainsi sur les fonctions de l'enzyme. Ce modèle est confirmé par des études plus récentes de la sélectivité de stimulation de la topoisomérase II par la mitoxantrone (Capranico et coll., 1993). Lors de cette étude, il a été montré que la mitoxantrone comme le téniposide (VM-26) exigeait une cytosine ou une thymine (bases pyrimidiques) à la position -1 du site de coupure de l'ADN. Ces résultats sont basés sur des analyses statistiques des sites de clivage. Malgré leurs différences structurales, la mitoxantrone et le VM-26 ont le même profil de spécificité de séquence. Les auteurs en déduisent qu'il faudrait une nouvelle classification des inhibiteurs des topoisomérases II (Capranico et coll., 1993). Le rôle pharmacologique de cette spécificité de coupure n'a pas encore été

établi. La modification de l'une des chaînes latérales de la mitoxantrone n'altère pas la capacité de la molécule à stimuler la coupure de l'ADN. Par contre, la suppression des deux groupements OH (c'est le cas de l'amétantrone) affecte de façon très importante l'interaction avec la topoisomérase II. Ce résultat met en évidence le rôle critique joué par ces groupements dans la stabilisation du complexe ternaire (De Isabella et coll., 1993). Il existerait donc une corrélation entre le pouvoir cytotoxique et la capacité d'induction de coupure de l'ADN par interaction avec la topoisomérase II au sein de la classe des anthracènediones qui serait en accord avec d'autres inhibiteurs (Capranico et coll., 1990b). La persistance et peut-être la capacité progressive de la mitoxantrone à piéger la topoisomérase II ont été observées et pourraient expliquer la dépression à long terme de la synthèse d'ADN, l'arrêt en phase G<sub>2</sub> du cycle cellulaire ainsi que la mort cellulaire (Fox et Smith, 1990).

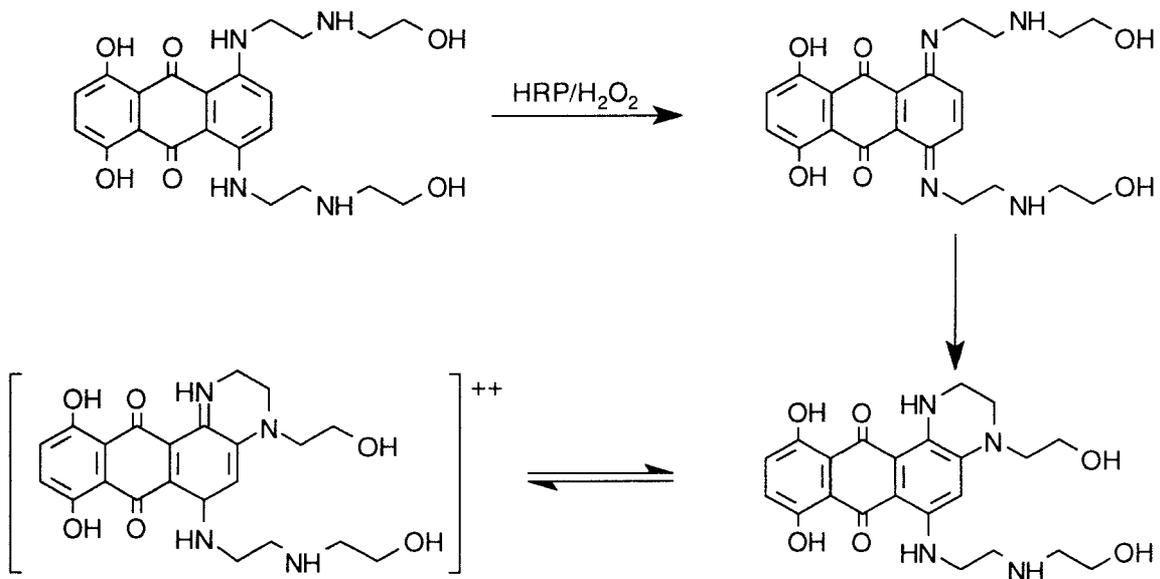
La mitoxantrone, comme d'autres inhibiteurs des topoisomérases (étoposide, adriamycine...), provoque des cassures chromosomiques et des échanges de chromatides dans des cultures de cellules ovariennes de hamster chinois (Medeiros et Takahashi, 1994 ; Suzuki et coll., 1995). Par conséquent, la stabilisation du complexe clivable et l'induction d'aberrations chromosomiques semblent être liées.

#### 1-2-3-4 Activation enzymatique et production de radicaux libres

La mitoxantrone a un potentiel redox de -0,897 V (plus négatif que celui de la 5-iminodaunorubicine : -0,67 V) et n'est donc pas sujette à un métabolisme réductif *in vivo* au vu de quoi elle est moins cardiotoxique que les anthracyclines (Sinha et coll., 1983; Lown et coll., 1986a). Elle s'avère même être un puissant antioxydant, probablement par interruption des réactions en chaîne de peroxydation (Kharash et Novak, 1982, 1983a, b). En effet, la mitoxantrone et l'amétantrone sont capables de prévenir la peroxydation des lipides induite par les anthracyclines (Kharash et Novak, 1982, 1983b). L'incapacité des anthracène-9,10-diones telles que la mitoxantrone et l'amétantrone à induire la peroxydation des lipides est en accord avec leur moindre cardiotoxicité comparativement à la doxorubicine et la daunomycine.

Lown a montré que la mitoxantrone est susceptible de subir une oxydation enzymatique (Lown et coll., 1986a) sous l'effet de la peroxydase de raifort (HRP) en présence d'eau oxygénée. Cette oxydation s'accompagne d'une cyclisation intramoléculaire pour donner le métabolite primaire de la mitoxantrone (dérivé hexahydronaphto[2,3,f]quinoxaline-7,12-dione) (fig 11). Le métabolite primaire de la mitoxantrone est généré par cyclisation intramoléculaire de l'intermédiaire électrophile très

réactif quinonediimine résultant de l'oxydation de la structure phénylènediamine. En effet, le site d'oxydation enzymatique est situé sur l'un des azotes adjacent au cycle aromatique et non sur les OH en 1 et 4 puisque l'amétantrone (analogue de la mitoxantrone dépourvu de OH en 1 et 4) subit le même type d'oxydation (Lown et coll., 1986a). L'oxydation est irréversible mais le métabolite primaire peut subir d'autres réactions avec la peroxydase en présence d'eau oxygénée pour donner une iminoquinone oxydée. Ces processus complémentaires sont totalement réversibles (Lown et coll., 1986a). Plus récemment, il a été démontré que la mitoxantrone pouvait subir le même type d'oxydation sous l'action de la myéloperoxydase (MPO) en présence d'eau oxygénée. Par conséquent, les auteurs soulignent le rôle que pourrait jouer cette enzyme dans l'activité de la mitoxantrone vis-à-vis des leucémies myéloïdes (Panousis et coll., 1994).



**Figure 11 :** Représentation schématique de l'oxydation catalytique irréversible de la mitoxantrone en quinonediimine suivie d'une cyclisation en métabolite primaire qui subit à son tour une oxydation réversible en iminoquinone oxydée.

Bien que la mitoxantrone soit un mauvais substrat pour la NADPH cytochrome P-450 réductase, on a pu mettre en évidence, par des études en RPE, un signal correspondant au radical semiquinone lors de son incubation avec des microsomes de foie (rat, singe et homme) ou des nucléoles de foie (singe) en présence de NADPH (Sinha et coll., 1983 ; Basra et coll., 1984, 1985). Par ailleurs, Duthie et Grant (1989) ont montré que la cytotoxicité de la mitoxantrone dépendait de son métabolisme par le cytochrome P-450 car l'inhibition de ce groupe d'enzymes entraîne une perte totale de l'inhibition de croissance dans les cellules HepG2 humaines. Ce résultat a été confirmé lors d'études par CLHP couplée à un spectromètre de masse des métabolites biliaires de la mitoxantrone (Mewes et coll., 1993). Ce radical semiquinone instable est capable de réduire l'oxygène

moléculaire en initiant la formation de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ . Cet anion peut se dismuter spontanément en  $O_2$  et  $H_2O_2$ . L'anion  $O_2^{\cdot-}$  peut en outre réduire les ions métalliques.  $H_2O_2$ , en présence d'ions métalliques réduits, est responsable de la formation du radical  $OH^{\cdot}$  (réaction de Fenton). La combinaison des deux réactions est connue sous le nom de cycle d'Haber-Weiss (fig 12) catalysé par les métaux de transition tels que le cuivre ou le fer. En effet, le métabolisme des anthraquinones serait associé à la formation d'anions superoxyde, d' $H_2O_2$  et de radicaux  $OH^{\cdot}$  comme l'indiquent les études par spin trapping utilisant la 5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxyle (DMPO) comme piègeur de radicaux libres (Fisher et coll., 1992). Ces réactions pourraient être en rapport avec l'activité biologique de la mitoxantrone.

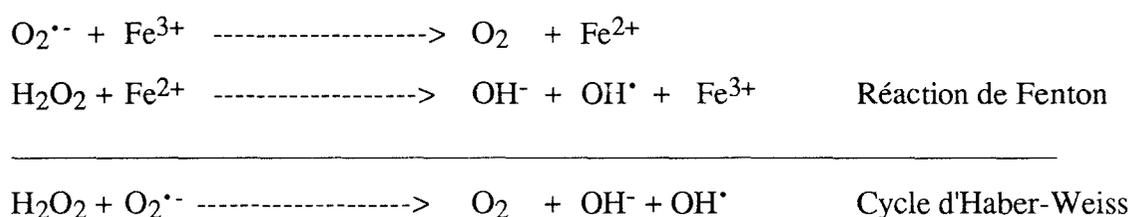


Figure 12 : Cycle d'Haber-Weiss.

Deux autres métabolites ont été identifiés dans l'urine ; il s'agit cette fois de l'oxydation des chaînes latérales en acide (fig 13). Les métabolites A et B sont inactifs vis-à-vis de la leucémie P388 *in vivo*. Ils sont considérés comme des métabolites de détoxication (Chiccarelli et coll., 1986).

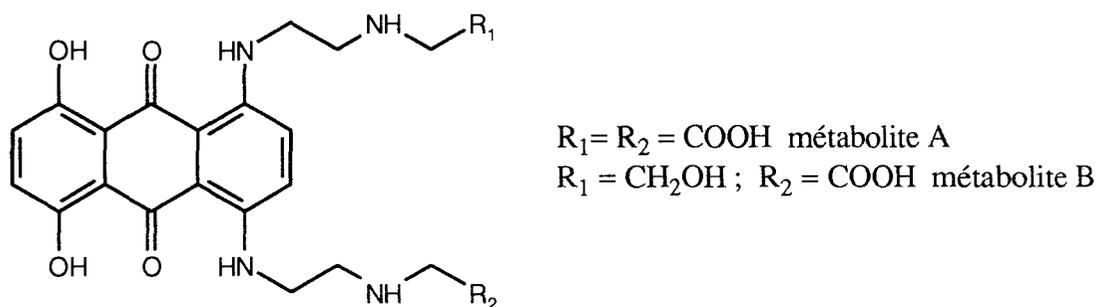


Figure 13 : Structure chimique des métabolites urinaires humains de la mitoxantrone.

## I-2-4 Activité biologique

Les études de cinétique cellulaire ont montré un blocage en phase  $G_2$  *in vitro* et aussi une plus grande sensibilité en phase S (Kapuscinski et coll., 1981). Cependant il existe une activité à toutes les phases du cycle (agent indépendant du cycle).

La mitoxantrone a démontré une activité antitumorale nette sur plusieurs modèles de tumeurs greffées chez l'animal en particulier la leucémie P-388, le mélanome B16 et la leucémie L1210 (Faulds et coll., 1991). Plusieurs explications de l'action anticancéreuse de la mitoxantrone ont été avancées :

- l'intercalation empêche la fixation de la DNA-polymérase inhibant ainsi la réplication et la division cellulaire (Johnson et coll., 1979 ; Kapuscinski et coll., 1981 ; Lown et coll., 1985),
- lorsque la molécule s'intercale, elle conduit à une neutralisation des charges négatives des phosphates. Cela diminue les forces de répulsion et augmente les interactions polymère-polymère pour aboutir finalement à la condensation. Il existe une corrélation entre l'activité antitumorale de cet agent et sa capacité à condenser l'ADN (Kapuscinski et Darzynkiewicz, 1984, 1986),
- la mitoxantrone est un inhibiteur de la topoisomérase II (Crespi et coll., 1986). Cette inhibition provoque un effet cytotoxique par coupure de l'ADN,
- la mitoxantrone, comme toutes les quinones, peut être réduite par des systèmes, enzymatiques ou non, en produisant un radical semi-quinone instable puis des radicaux libres  $OH\cdot$  par le biais du cycle d'Haber-Weiss (Sinha et coll., 1983 ; Basra et coll., 1984, 1985). Les radicaux  $OH\cdot$  très réactifs sont capables d'arracher des atomes d'hydrogène à des substrats biologiques tels que l'ADN ou d'induire des perturbations de la membrane et des inactivations d'enzymes (Moore, 1977 ; Favaudon, 1982 ; Halliwell et Gutteridge, 1984 ; Kappus, 1986 ; Kolodziejczyk et coll., 1988),
- la mitoxantrone se liant directement sur l'ARN nucléaire et cytoplasmique induit un effet cytotoxique en bloquant la synthèse des protéines (Kapuscinski et coll., 1981). Il s'agit d'un "effet cytotoxique direct".

Il faut noter que l'observation de corrélations entre l'activité antitumorale et certains effets décrits n'implique pas nécessairement que ces effets soient la cause première de l'activité de la molécule. Ils peuvent très bien résulter d'effets secondaires sans relation avec l'activité cytotoxique du médicament.

### I-2-5 Efficacité clinique et tolérance

La toxicité de la mitoxantrone se caractérise essentiellement par un effet myélosuppressif. Celui-ci est cependant toléré cliniquement. Cette myélosuppression, marquée par la leucopénie plus que par la thrombopénie, a été observée en monothérapie comme en polychimiothérapie.

Les effets secondaires non hématologiques observés avec la mitoxantrone sont rarement importants, toujours tolérés, ne gênant jamais le traitement. Ceci permet de maintenir la qualité de vie des patients traités. Les effets les plus fréquents sont les troubles digestifs (nausées et vomissements), les mucites, les stomatites et l'alopécie.

Les essais comparatifs avec la doxorubicine ont montré que la mitoxantrone induisait des effets indésirables à la fois moins fréquents et moins intenses. De plus il semble ne pas exister de résistance croisée entre les deux produits. Les tests cliniques ont montré sa faible cardiotoxicité, significativement inférieure à celle des anthracyclines (Benjamain, 1995 ; Decastro et coll., 1995). Cependant il est recommandé, chez les patients ne présentant aucun risque cardiaque et lorsque les doses deviennent élevées, d'entreprendre une surveillance cardiaque. Pour les patients présentant, avant administration du médicament, un facteur de risque cardiaque, la surveillance cardiaque doit être entreprise dès le début du traitement (Faulds et coll., 1991).

Ainsi la mitoxantrone, grâce à son efficacité thérapeutique élevée et sa faible toxicité, trouve une place légitime dans le traitement de première intention des cancers du sein (Hainsworth, 1995). Une synergie thérapeutique considérable a été observée quand la mitoxantrone est administrée en combinaison avec d'autres agents (Faulds et coll., 1991) : carboplatine et cyclophosphamides (Stiff et coll., 1994) ; etoposide (Daenen et coll., 1994) ; vinorelbine (Vogel, 1995 ; Ferrero et coll., 1995) ; epirubicine (Pavesi et coll., 1995). Ce synergisme thérapeutique dépend du dosage, du régime d'administration ainsi que du mode d'action de chacun des agents.

### I-2-6 Résistance à la mitoxantrone

La résistance cellulaire aux agents anticancéreux est une des causes majeures des échecs de la chimiothérapie anticancéreuse. L'étude de certaines tumeurs résistantes a permis d'identifier un mécanisme de résistance croisée ou "*multidrug resistance*" (MDR) entre divers agents anticancéreux. Les cytotoxiques concernés par ce phénomène incluent les anthracyclines (doxorubicine), vincaalcaloïdes (vincristine, vinblastine), les

épipodophyllotoxines.(étoposide, téniposide)..., ils ont des structure et des modes d'action différents (Selassie et coll., 1990). La MDR peut être liée à la modification des mécanismes de transport membranaire de ces médicaments, consécutive à une surexpression d'une glycoprotéine membranaire, la glycoprotéine P (GP 170). D'autres mécanismes de la MDR ont été décrits, notamment une MDR atypique (AT-MDR) résultant d'une altération de la topoisomérase II (Mestdagh et coll., 1993, 1994).

La résistance à la mitoxantrone est atypique et manifeste une résistance croisée partielle avec les autres intercalants. En effet, différentes études cliniques ont montré qu'il n'existait pas de résistance croisée complète entre la mitoxantrone et les anthracyclines en particulier la doxorubicine (Faulds et coll., 1991 ; Klumper et coll., 1995). Par conséquent, la mitoxantrone semble être un composé de substitution dans certains cas de résistance à la doxorubicine. Il est à noter que les lignées cellulaires résistantes à la mitoxantrone présentent une résistance croisée avec la doxorubicine.

Une surexpression de la glycoprotéine P a été observée dans certaines, mais pas toutes les lignées cellulaires. La réversion de la résistance à la mitoxantrone par des bloqueurs classique de MDR (vérapamil, cyclosporine A...) est en effet très rare (Dalton et coll., 1988 ; Nakagawa et coll., 1992). Dans les lignées cellulaires HL60 (leucémie) (Harker et coll., 1989 ; 1991), GLC4 (cancer du poumon) (van der Graff et coll., 1994), MCF7 (tumeur mammaire) (Nakagawa et coll., 1992), WiDR (cancer du colon) (Dalton et coll., 1988) et P388 (leucémie) (Harker et coll., 1989), seule la lignée P388 présente une résistance croisée liée à une surexpression de la glycoprotéine P. Pour la lignée HL60, la résistance est attribuée à une altération de l'activité de la topoisomérase II et une réduction de la coupure de l'ADN induite par l'interaction de la mitoxantrone avec la topoisomérase II (Harker et coll., 1991, 1995). La même MDR atypique liée à la topoisomérase II a été décrite pour la lignée A2780 (cancer des ovaires) (Cimoli et coll., 1995). D'autres mécanismes ont été suggérés pour expliquer la résistance à la mitoxantrone : altération des processus de transport et de détoxification cellulaire (Coloma et coll., 1994) ou activation des systèmes de réparation de l'ADN (Faulds et coll., 1991). Ainsi plusieurs mécanismes semblent être impliqués dans le phénomène de résistance à la mitoxantrone.

La mitoxantrone a prouvé son efficacité clinique. Cependant, une certaine cardiotoxicité et une efficacité diminuée vis-à-vis des tumeurs résistantes à l'adriamycine limitent son activité thérapeutique. Ainsi, il existe toujours un besoin de développer des analogues de la mitoxantrone et de sa molécule parente l'adriamycine, ayant le même indice thérapeutique mais actifs vis-à-vis des lignées résistantes.

## I-3 Les analogues des anthracène-9,10-diones

### I-3-1 Les (amidoalkyl)anthracène-9,10-diones

Plusieurs dérivés (amidoalkyl)anthracène-9,10-diones ont été synthétisés et étudiés pour leur mode de liaison à l'ADN et leur activité antitumorale. Il s'agit d'analogues non hydroxylés sur le chromophore anthraquinonique (absence de OH en position 1 et 4 par rapport à la mitoxantrone). Les dérivés monosubstitués en position 1 (Palumbo et Magno, 1983 ; Palumbo et coll., 1983), en position 2 (Palu et coll., 1986), ainsi que les dérivés disubstitués en 1,4 (Collier et Neidle, 1988 ; Martelli et coll., 1988), en 2,4 (Palumbo et coll., 1987) et 2,6 (Agbandje et coll., 1992) ont été étudiés. La comparaison de leurs activités a montré qu'il existait une corrélation entre l'activité cytotoxique, la position et la longueur des substituants. En général, les chaînes de type  $\text{-NHCO}(\text{CH}_2)_n\text{NR}_2$  avec  $n = 2$  donnent une activité significative et améliorent les caractéristiques de liaison à l'ADN. Cependant, tous ces dérivés possèdent une activité cytotoxique modeste par rapport à celle de la mitoxantrone. Diverses études physico-chimiques et biochimiques ont montré que les (amidoalkyl)anthracène-9,10-diones s'intercalaient au niveau de l'ADN. Les dérivés substitués en 1,4 comme leur homologues amino s'intercalent avec leurs deux chaînes latérales logées dans le grand sillon de l'ADN. Quant aux analogues substitués en 2,6, ils s'intercalent avec chacune des deux chaînes dans un sillon de l'ADN (Tanious et coll., 1992). Ils possèdent une cinétique de liaison lente par rapport à celle des intercalants classiques et celle de la nogalamycine possédant des chaînes rigides. Les auteurs suggèrent que des intercalants ayant une cinétique de liaison aussi lente pourraient inhiber les enzymes associées à l'ADN et ainsi mettre en évidence un nouveau type d'activité pharmacologique. Il est à noter que les dérivés 1,4 possèdent une plus grande affinité pour l'ADN et sont beaucoup plus toxiques que les dérivés 2,6.

Des études de modélisation moléculaire ont montré que les composés 2,6-(amidoalkyl)anthracène-9,10-diones possédant des chaînes  $\text{-NHCO}(\text{CH}_2)_n\text{NR}_2$  -contrairement aux dérivés 1,4- pouvaient interagir et stabiliser préférentiellement des structures de triple hélice par rapport à des structures de double hélice (Fox et coll., 1995). Les dérivés 2,6 s'intercalent au niveau de la triple hélice avec un empilement significatif entre le chromophore amidoanthraquinone et les bases de l'ADN. Les analogues 1,4 ne peuvent pas se loger de cette façon sans provoquer une perturbation excessive et une déformation de la triple hélice dues aux contraintes stériques qui les forcent à se lier dans la direction du grand sillon de la double hélice (qui loge le troisième brin dans la structure triple hélice). Ces résultats ont été confirmés par des études de "footprinting" (Fox et coll., 1995) qui ne révèlent aucune disparité en terme de stabilisation de la triple hélice entre les différents dérivés 2,6 testés. Ainsi, les contributions électrostatiques des chaînes sont

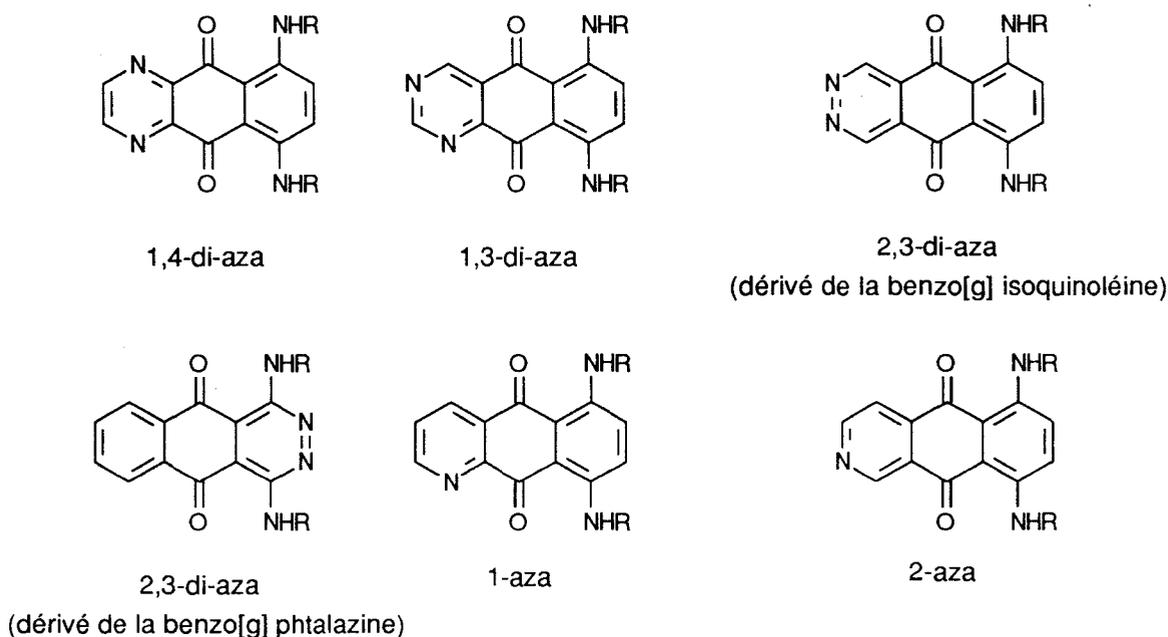
faibles proportionnellement aux interactions du chromophore amidoanthraquinonique avec les paires de base du site d'intercalation.

### I-3-2 Les dérivés aza-anthracène-9,10-diones

Les hétéroanalogues des anthracène-9,10-diones connaissent un développement important depuis quelques années. En effet, l'introduction d'hétéroatomes dans le chromophore anthraquinonique pourrait affecter de façon significative l'interaction de ces molécules avec leurs cibles biologiques. Ces hétéroanalogues pourraient (Krapcho et coll., 1994, 1995 ; Gandolfi et coll., 1995) :

- retenir les caractéristiques planes et spatiales pour la reconnaissance moléculaire de l'hôte telle que l'intercalation au niveau de l'ADN,
- être dotés de nouveaux sites basiques et de liaisons hydrogène, pouvant améliorer l'affinité pour l'ADN et/ou affecter l'interaction avec la topoisomérase II,
- posséder des propriétés redox altérées et être ainsi moins toxiques.

La présence d'atome(s) d'azote en particulier pourrait conduire à des molécules qui se lieraient à l'ADN par intercalation avec une affinité supérieure à celle des dérivés carbocycliques et dont l'interaction avec les topoisomérases II serait plus puissante (Krapcho et coll., 1994). L'introduction d'atomes d'azote dans différentes positions du noyau anthracène-9,10-dione a été examinée de façon systématique dans le but de découvrir des analogues des anthracènediones de deuxième génération. De ces efforts résulte la préparation des dérivés hétérocycliques bioisostères aza et di-aza-anthracènediones (fig 14).



**Figure 14 :** Structures chimiques des différents dérivés hétérocycliques bioisostères aza et di-aza-anthracènediones.

En général, les dérivés 2-aza sont 30 à 100 fois plus actifs, vis-à-vis des cellules L1210 *in vitro*, que les dérivés 1-aza et di-aza (Hazelhurst et coll., 1995a, b). Les analogues 2,3-di-aza dérivés de la benzo[g]phthalazine possèdent un large spectre d'activité incluant plusieurs lignées cellulaires *in vitro* avec une efficacité égale et même parfois supérieure à celle de la mitoxantrone (Gandolfi et coll., 1995) mais sont inactifs *in vivo*. Dans cette série, comme dans la série 2-aza (Krapcho et coll., 1994), le dérivé possédant des chaînes latérales semblables à celles de la mitoxantrone est inactif *in vivo* et *in vitro*. Ainsi, les relations structure-activité d'une nouvelle classe de molécules ne peuvent pas toujours être corrélées à celle d'une classe existante malgré les similitudes apparentes des deux classes.

En ce qui concerne leur interaction avec l'ADN, ces dérivés sont capables de s'intercaler dans la double hélice mais leur affinité pour cette cible reste inférieure à celle de la mitoxantrone (De Isabella et coll., 1995). Les dérivés 2-aza, dérivés les plus cytotoxiques, interagissent seulement par intercalation contrairement aux dérivés 1-aza qui, comme la mitoxantrone, sont capables de se lier à l'extérieur sans intercalation dans certaines conditions de force ionique et de concentration. L'affinité des dérivés 2-aza est 5 à 7 fois supérieure à celle des dérivés 1-aza et di-aza (Hazelhurst et coll., 1995a, b). Tous ces dérivés ont peu, ou pas, d'effet sur la topoisomérase II, ce qui entraîne une réduction de l'activité cytotoxique (De Isabella et coll., 1995). Aucune correspondance n'a pu être dégagée quand la liaison à l'ADN, la cytotoxicité et l'internalisation cellulaire sont prises en considération en particulier pour le dérivé BBR2778 (fig 15). Alors que ses propriétés

pharmacocinétiques et pharmacologiques sont défavorables, en comparaison avec celles de la mitoxantrone, ce dérivé possède une activité antitumorale supérieure (leucémies) sinon comparables (tumeurs solides) à celle de la mitoxantrone. Il est considéré comme le premier analogue de deuxième génération des anthracène-9,10-diones et comme excellent candidat pour un développement clinique (Krapcho et coll., 1994 ; De Isabella et coll., 1995).

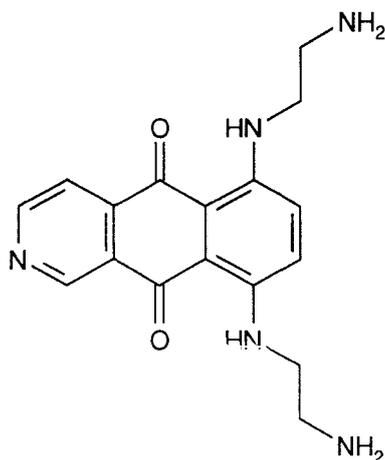


Figure 15: Structure chimique du dérivé BBR2778.

L'analyse des propriétés de liaison à l'ADN et des relations structure-activité au sein de la famille des anthracène-9,10-dione en particulier la mitoxantrone et ses dérivés nous ont conduit à sélectionner les critères structuraux résumés sur le schéma (fig 16) pour la conception de la partie intercalante des analogues que nous allons synthétiser et étudier au cours de ce travail.

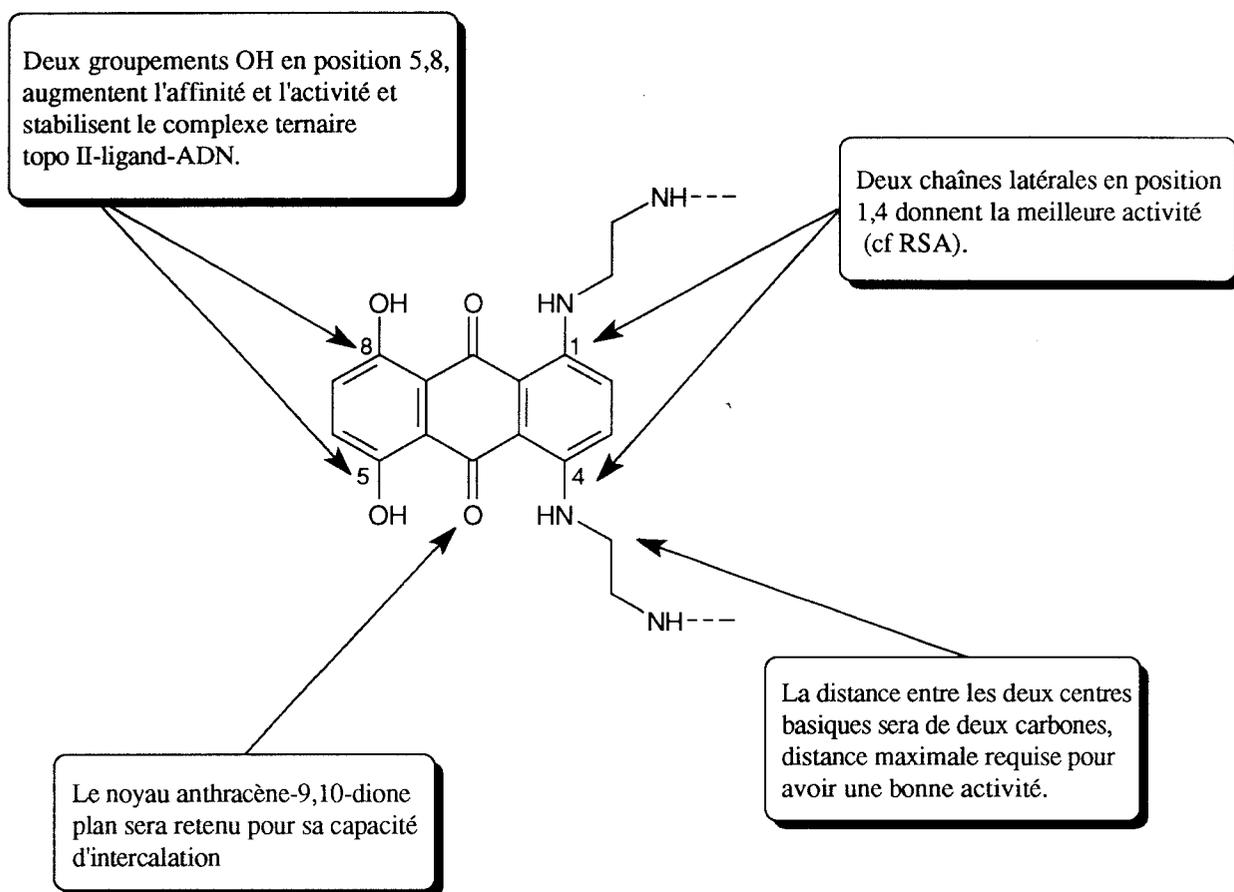


Figure 16 : Critères structuraux adoptés pour la synthèse des hybrides.

Dans le deuxième chapitre, nous développerons la synthèse des molécules hybrides dans lesquelles des chaînes polyaminées sont fixées à la place des chaînes latérales de la mitoxantrone. Le troisième et le quatrième chapitre auront pour objet l'étude d'analogues dans lesquels le peptide Gly-Gly-L-His et la partie bispyrrolique de la nétropsine remplacent la partie aminoéthanol de la mitoxantrone

## CHAPITRE II

### *ANTHRAQUINONE-POLYAMINES*

## II-1 Les polyamines naturelles

### II-1-1 Structure chimique et propriétés physiques

Les "polyamines", simples polycations aliphatiques forment une classe particulièrement importante. Les polyamines (fig 17) spermidine [N-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane], spermine [N,N'-bis-(aminopropyl)-1,4-diaminobutane] ainsi que la diamine putrescine [1,4-diaminobutane] sont considérées comme ubiquitaires dans les cellules vivantes (Tabor et Tabor, 1984).

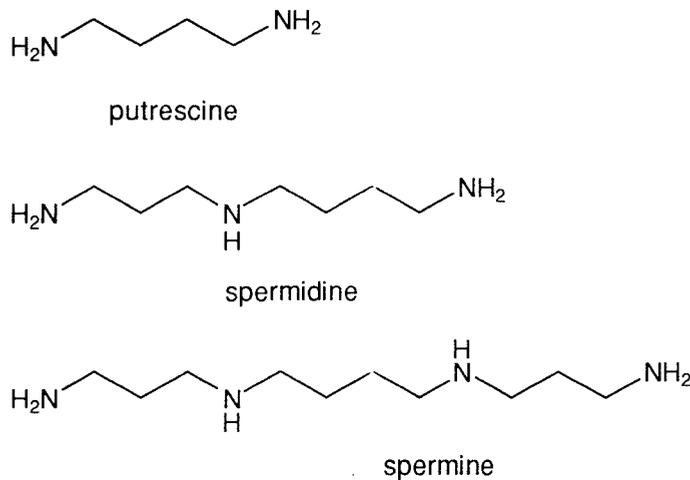


Figure 17 : Structures chimiques des polyamines.

Bien que la spermine ait été observée et décrite par Leeuwenhoek depuis très longtemps (Brand et coll., 1994), les polyamines et leurs analogues n'ont suscité de l'intérêt que depuis les trois dernières décennies. Cela s'est traduit, depuis le début des années soixante, par une littérature qui ne cesse d'augmenter.

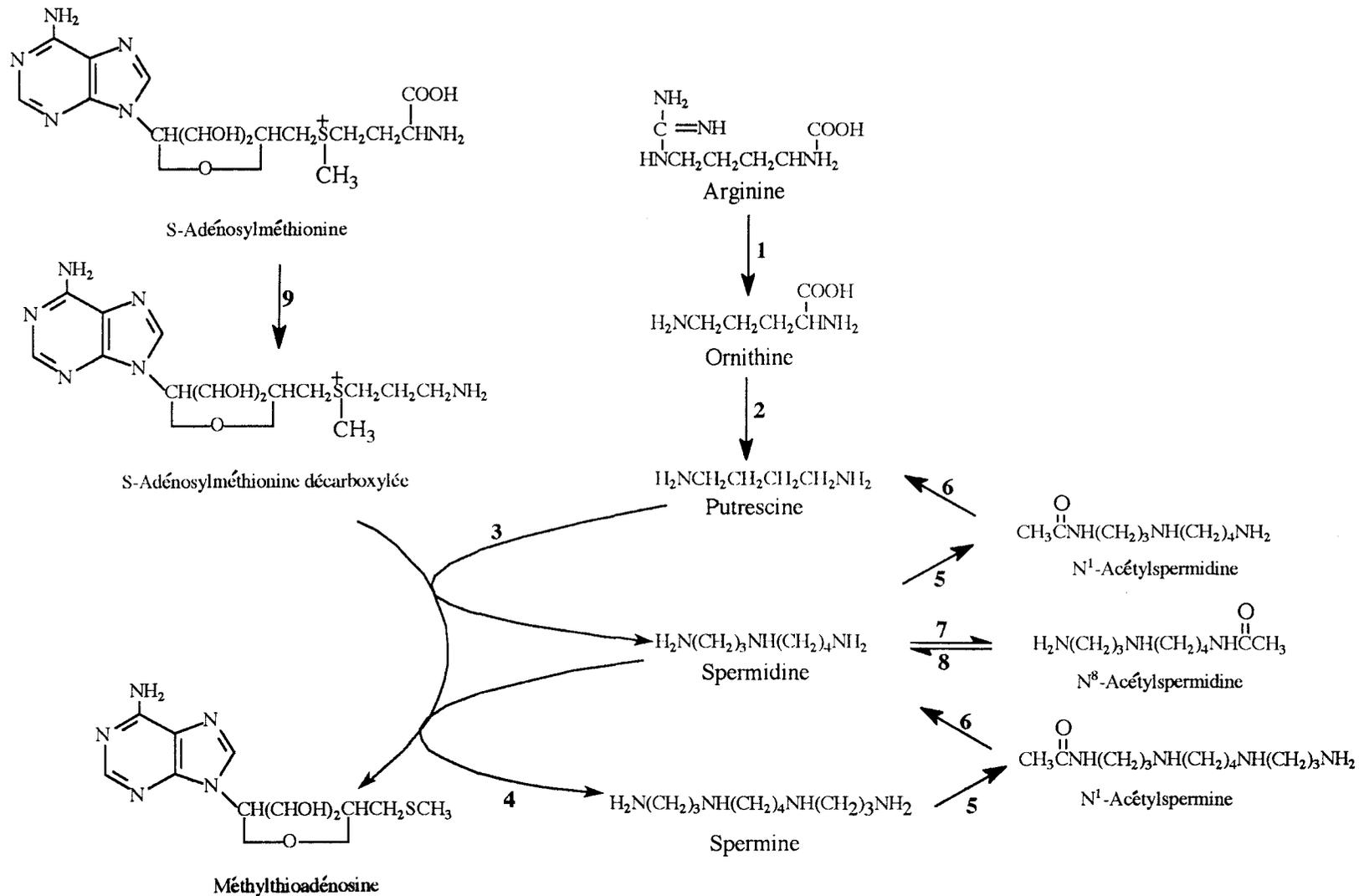
La caractéristique spécifique des polyamines réside dans leur caractère polybasique qui leur confère une plus grande affinité vis-à-vis des constituants acides par rapport à celle observée avec les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$   $\text{Ca}^{2+}$  et les monoamines. En effet, contrairement aux cations inorganiques, les charges positives sont distribuées le long de la chaîne carbonée et non pas localisées sur un point précis (Marton et Feuerstein, 1986). Ce caractère est beaucoup plus prononcé avec la spermine à cause de ses quatre charges positives. Il est probable que la nature polybasique des polyamines soit très importante dans la détermination de leurs actions physiologiques. Cependant, il est difficile de savoir si les effets observés lors d'expériences, en particulier *in vitro*, sont en rapport avec une action physiologique ou sont simplement des artefacts résultant d'interactions non spécifiques entre polyamines (polycations) et polyacides (polyanions) (Tabor et Tabor, 1984).

## II-1-2 Biosynthèse des polyamines

La putrescine, la spermidine et la spermine sont produites dans les cellules suivant un schéma de biosynthèse bien régulé (fig 18) (Marton et Feuerstein, 1986 ; Pegg, 1988 ; Dredar et coll., 1989).

Dans les cellules de mammifères, les polyamines ont pour précurseurs les aminoacides arginine et méthionine (Tabor et Tabor, 1984 ; Pegg, 1988). Le précurseur immédiat est la diamine putrescine. Elle est formée à partir de l'ornithine sous l'action de l'ornithine décarboxylase (ODC). La putrescine est ensuite convertie en spermidine puis en spermine par l'intermédiaire des deux aminopropyltransférases : spermidine-synthase et spermine-synthase. Les deux enzymes utilisent la S-adénosyl-L-méthionine en tant que donneur de groupement aminopropyle, mais sont spécifiques de leur substrats respectifs à savoir la putrescine pour la spermidine-synthase et la spermidine pour la spermine-synthase. La S-adénosyl-L-méthionine est préalablement décarboxylée par l'enzyme S-adénosylméthionine décarboxylase (AdoMet DC). Ainsi, le groupement aminopropyle des polyamines provient de la méthionine.

Les cellules contiennent des enzymes cytoplasmiques capables de dégrader la spermine en spermidine et la spermidine en putrescine. Ces deux étapes font intervenir deux types d'enzymes : la polyamine oxydase (PAO) et la spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acétyltransférase (SSAT). Après acétylation du groupement aminopropyle terminal par ces deux dernières enzymes, les dérivés N<sup>1</sup>-acétylés de la spermine et de la spermidine deviennent substrats de la PAO qui coupe un groupement 3-acétamidopropanal générant ainsi la spermidine et la putrescine. Les cellules contiennent aussi une enzyme nucléaire, appelée N<sup>8</sup>-acétylspermidine qui catalyse l'acétylation du groupement aminobutyle de la spermidine. Ce dérivé N<sup>8</sup>-acétylé est ensuite très rapidement et sélectivement désacétylé dans le cytoplasme (Dredar et coll., 1989, Huang et coll., 1992 ; Desiderio et Bardella, 1995) par l'enzyme N<sup>8</sup>-acétylspermidine deacétylase. En effet, il n'est pas détecté dans la plupart des tissus. Enfin, la putrescine est soit dégradée sous l'action des enzymes diamine-oxydases soit rejetée par la cellule.



**Figure 18 :** Schéma de biosynthèse des polyamines. Les enzymes sont : 1 = arginase, 2 = ornithine décarboxylase (ODC) , 3 = spermidine synthase, 4 = spermine synthase, 5 = spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acétyltransférase (SSAT), 6 = polyamine oxydase (PAO), 7 = spermidine N<sup>8</sup>-acétyltransférase, 9 = S-adenosylméthionine décarboxylase (AdoMet DC).

### II-1-3 Contrôle de la biosynthèse

Le cycle de biosynthèse des polyamines est peu commun car il consiste en quatre étapes irréversibles. Sa régulation est un processus aussi riche que compliqué. Les polyamines sont régulées à travers leur synthèse, leur dégradation, leur captation et leur excrétion.

Il est clairement établi que la synthèse de la putrescine est régulée par la disponibilité de l'ornithine et l'activité de l'ODC. Sa conversion en polyamine, quant à elle, est régulée par l'AdoMet DC. Le flux à partir des synthèses est contrôlé par l'approvisionnement en adénosylméthionine décarboxylée dont la disponibilité dépend des taux relatifs des deux synthèses et de leur substrats amines.

L'ODC et L'AdoMet DC sont hautement régulées par la cellule et répondent à une large variété de stimuli affectant la prolifération et le contenu cellulaire en putrescine et polyamines (Pegg, 1988).

L'augmentation rapide et profonde de l'activité de l'ODC, en réponse à des hormones, des facteurs de croissance et certains médicaments, est surtout due à une augmentation de la synthèse de la protéine d'une part et à sa stabilisation d'autre part. L'ODC est fortement réprimée par les polyamines, il en résulte une diminution de la concentration en protéine. Au contraire, une réduction des quantités intracellulaires des polyamines sous l'action d'inhibiteurs entraîne une augmentation de leur contenu en ODC (Pegg, 1988).

L'AdoMet DC est régulée par la putrescine, la spermidine et la spermine et leurs effets sont entièrement différents. La putrescine active directement l'AdoMet DC (Tabor et Tabor, 1984). Dans ce cas, l'augmentation des taux de putrescine conduit à une grande production de l'adénosylméthionine décarboxylée qui peut être utilisée par la spermidine synthase et ainsi convertir la putrescine en spermidine. Le contenu cellulaire en spermidine et spermine est alors supérieur à celui de leur précurseur chez les cellules ayant cette enzyme activée par la putrescine. Chez les *E. coli*, l'AdoMet DC n'est pas activée par la putrescine. Le contenu cellulaire en putrescine est supérieur à celui de la spermidine (Tabor et Tabor, 1984). A l'inverse, la spermidine et la spermine répriment l'AdoMet DC. En effet la quantité de protéine augmente quand les quantités intracellulaires en polyamines diminuent sous l'action d'inhibiteurs et régresse lors d'un apport de polyamines exogènes. Cet effet est dû en partie à un taux de dégradation élevé de la protéine mais la cause majeure semble être le changement dans les taux de synthèse.

L'activité de l'enzyme SSAT peut être induite par différents agents toxiques tels le tétrachlorure de carbone (Matsui et Pegg, 1980) ou par administration de spermidine ou de spermine (Pegg, 1988) mais il est insensible à la putrescine. L'activation se traduit par une augmentation du taux de la protéine grâce à une forte synthèse et une faible dégradation.

Ainsi les trois enzymes-clés de la biosynthèse des polyamines sont : l'ODC et l'AdoMet DC pour la synthèse et la SSAT pour le catabolisme. Leur temps de demi-vie très court (<1heure), leur régénération très rapide dans la plupart des cellules ainsi que leur répression par les polyamines posent problème dans le design d'inhibiteurs de l'ODC et de l'AdoMet DC qui auraient un potentiel et une longévité suffisante pour être des médicaments (Pegg, 1988).

## II-2 Les interactions polyamines-ADN

### II-2-1 Modes d'interactions

L'interaction des polyamines avec les acides nucléiques est responsable d'une grande partie de leurs fonctions biologiques. Chez *Escherichia coli*, 90% de la spermidine sont liés à l'ARN, 5% à l'ADN et seulement 0,8% aux lipides membranaires (Ruiz-Herrera et coll., 1995). Les polyamines interagissent avec les acides nucléiques à plusieurs niveaux. On observe plusieurs phénomènes :

- ❑ condensation et agrégation de l'ADN par altération de la conformation (Tabor et Tabor, 1984 ; Srivenugopal et coll., 1987 ; Sikorav et coll., 1994),
- ❑ augmentation de la température de dénaturation thermique ( $T_m$ ) de l'ADN et donc stabilisation de la double hélice (Tabor et Tabor, 1984 ; Marton et Feuerstein, 1986),
- ❑ protection de l'ADN vis-à-vis de l'irradiation aux rayons X et de la dégradation enzymatique (Marton et Feuerstein, 1986),
- ❑ stimulation de la synthèse d'ADN et d'ARN *in vitro* (Tabor et Tabor, 1984),
- ❑ augmentation de l'angle moyen de l'ADN au coeur des nucléosomes ( $36^\circ$  au lieu de  $34^\circ$ ). Cette torsion est en partie responsable de la stabilisation des nucléosomes par les polyamines (Clarck et coll., 1991),

Enfin, les polyamines sont capables d'inhiber la méthylation de l'ADN en bloquant sélectivement la cytosine-ADN méthyltransférase (Ruiz-Herrera et coll., 1995).

## II-2-2 Spécificité de liaison

Les premiers modèles relatifs aux interactions polyamines-acides nucléiques prenaient essentiellement en compte les **interactions électrostatiques** entre les charges positives des fonctions amine des polyamines et les charges négatives portées par les groupements phosphate des acides nucléiques (Liquori et coll., 1967 ; Suwalsky et coll., 1969). Dans ces modèles, la chaîne tétraméthylène de la spermine traverse le petit sillon de l'ADN-B, les amines primaires interagissant avec les oxygènes des enchaînements phosphate du même côté du petit sillon (fig 19). Le défaut de ce modèle a été mis en évidence lors d'études de modélisation moléculaire. En effet, on observe la formation dans le petit sillon d'un espace en dessous de la chaîne tétraméthylène de la spermine. Cette chaîne étant hydrophobe, le remplissage de cet espace par des molécules d'eau est très peu favorisé énergétiquement.

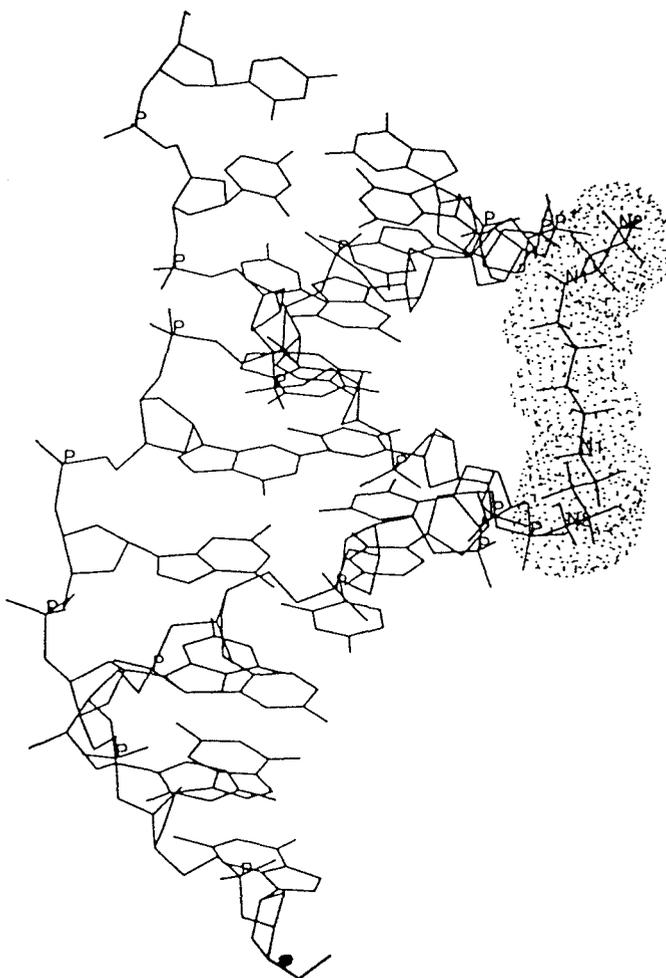


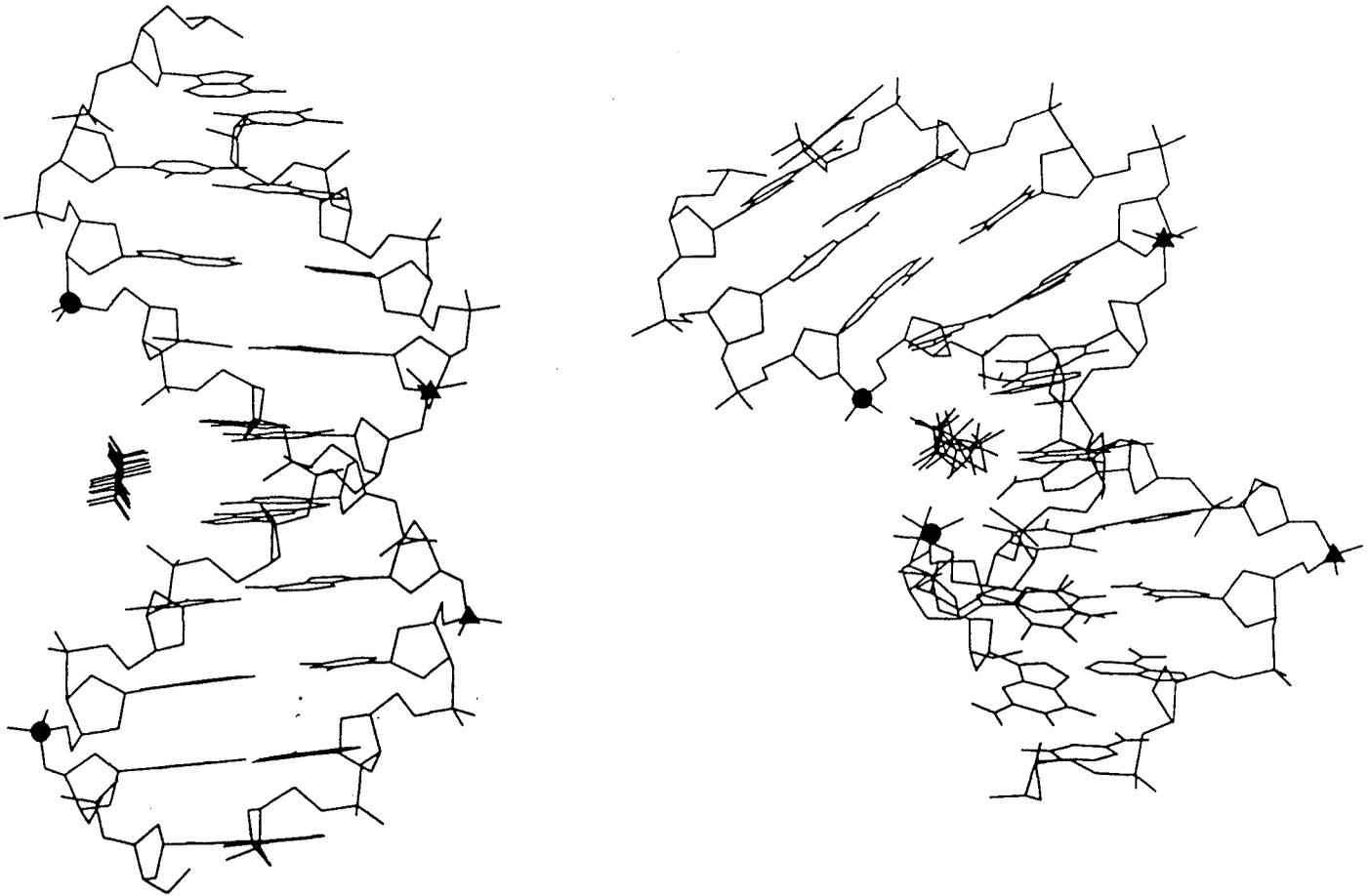
Figure 19 : Modèle de Liquori. La spermine pont le petit sillon de l'ADN.

Il a ensuite été suggéré que la liaison était le résultat d'interactions **non spécifiques** entre les polyamines et les acides nucléiques. Drew et Dickerson ont publié en 1981 les résultats d'études de diffraction aux rayons X de l'ADN dodécamère d(CGCGAATTCGCG) cristallisé en présence de la spermine. Une seule molécule de spermine est liée par dodécamère dans le grand sillon (Drew et Dickerson, 1981). Des études biochimiques entreprises par Pochon (Pochon et Cohen, 1972) ont montré que la liaison des polyamines à l'ARN de transfert (t-ARN) était **spécifique**. D'autres études concernant la structure de la liaison des polyamines à l'ADN-Z et l'ARN-Z (Basu et coll., 1988), les changements conformationnels de l'ADN par les analogues des polyamines (Thomas et Bloomfield, 1983, 1984 ; Vertino et coll. 1987) ainsi que des études de la cinétique d'échange H-D des acides nucléiques (Basu et coll., 1987), mettent en évidence la nature spécifique de l'interaction polyamines-acides nucléiques.

#### II-2-2-1 Etudes à partir de modèles moléculaires

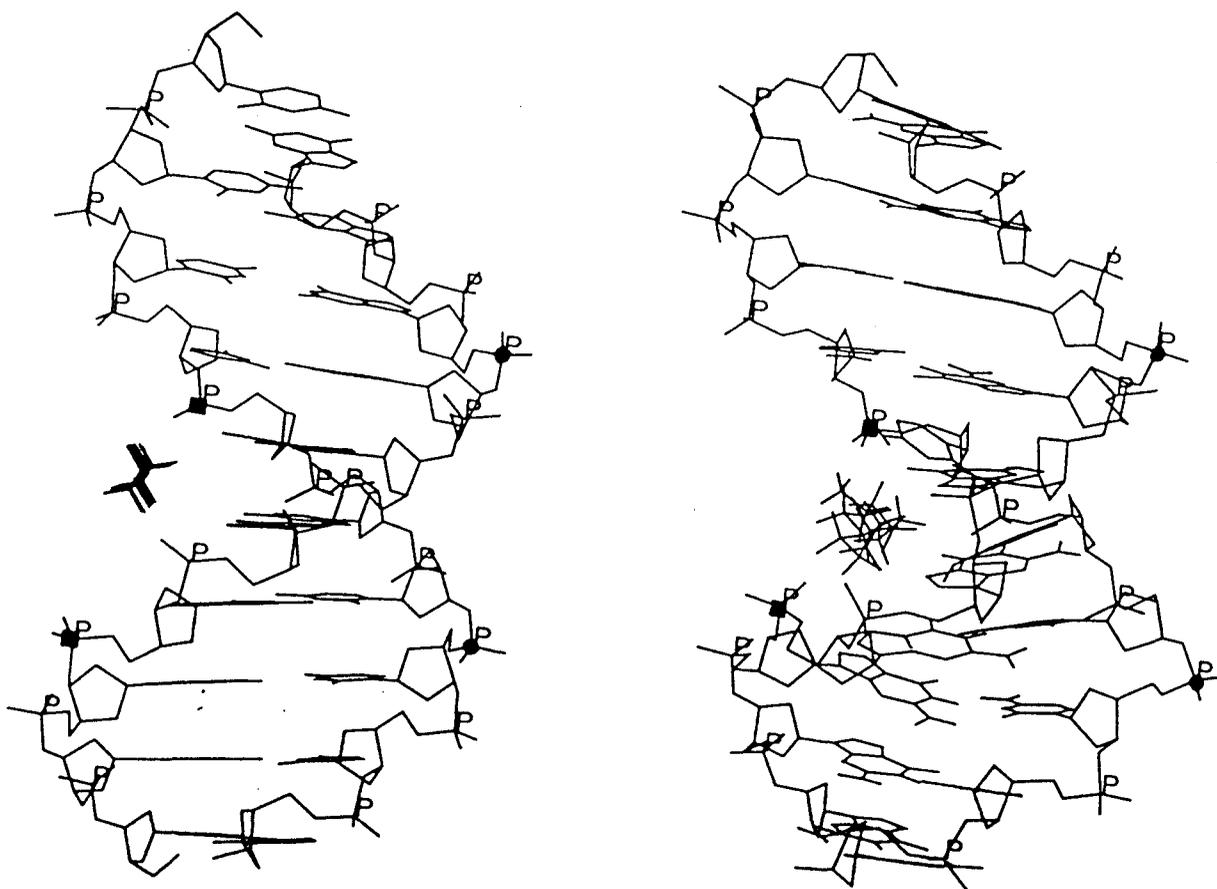
La modélisation moléculaire a été utilisée pour étudier les interactions polyamines-ADN. Ainsi les interactions entre la spermine et l'ADN-B constitué de séquences alternées purine/pyrimidine homo et hétéropolymériques ont été modélisées (Feuerstein et coll., 1989, 1990, 1991). Une configuration énergétique minimale existe pour quatre différents types d'association de la spermine à l'ADN : polyamine située le long du petit sillon ou à l'intérieur de celui-ci ou pontant ce dernier, ou alors située à l'intérieur du grand sillon.

La spermine s'associe plus fortement dans le grand sillon des séquences hétéropolymériques, entraînant corrélativement une courbure de l'ADN ayant pour conséquence d'induire la formation d'un petit sillon plus étroit et d'un grand sillon plus large (fig 20). Cette courbure de l'ADN entraîne également des changements dans la conformation des groupements désoxyribose, ayant pour conséquence un rapprochement des groupements phosphate.



**Figure 20 :** Interaction de la spermine avec l'hétéropolymère d(AC)<sub>5</sub>-d(GT)<sub>5</sub>. A gauche : la spermine dans le grand sillon avant minimisation d'énergie. Le grand sillon marqué par les cercles noirs et le petit sillon par les triangles. A droite : la spermine dans le grand sillon après minimisation d'énergie. La spermine est enveloppée dans le grand sillon entraînant une diminution de la taille de celui-ci. L'ADN se courbe, ce qui augmente la taille du petit sillon (Feuerstein et coll., 1990).

Dans le cas des séquences homopolymériques, la spermine s'associe également avec plus d'affinité dans le grand sillon, mais n'entraîne pas une courbure de l'ADN aussi importante que celle constatée avec les séquences hétéropolymériques (fig 21). Dans le cas des homopolymères, la différence entre les énergies de liaison dans le petit sillon et le grand sillon de l'ADN est malgré tout très inférieure à celle constatée pour ces mêmes localisations dans le cas d'hétéropolymères. Il semble ainsi exister des sites spécifiques sur certaines séquences de l'ADN (par exemple sur le grand sillon d'un hétéropolymère) qui seraient plus aptes à lier la spermine.



**Figure 21 :** Interaction de la spermine avec l'homopolymère d(G)<sub>10</sub>-d(C)<sub>10</sub> dans le grand sillon de l'ADN. A gauche : la spermine dans le grand sillon avant minimisation d'énergie. A droite : après minimisation d'énergie. Malgré un changement dans l'emplacement des atomes dans l'ADN, la taille du grand sillon (carrés) et celle du petit sillon (cercles) restent inchangées (Feuerstein et coll., 1990).

Feuerstein et ses collaborateurs ont aussi utilisé la dynamique moléculaire pour modéliser les interactions entre des séquences homo et hétéropolymériques et la spermine en présence d'ADN de configuration spatiale courbe ou droite (Feuerstein et coll., 1989). L'eau et les contre-ions ont été inclus lors des simulations ainsi qu'un suivi au cours du temps. Ils ont constaté que les molécules de spermine restaient associées à l'ADN courbe (hétéropolymérique) au cours d'une simulation de 40 picosecondes, tandis que la spermine associée à l'ADN non courbe (homopolymérique) était rapidement libérée dans le solvant. Cette observation a confirmé que la spermine associée dans le grand sillon de l'ADN courbe (constituée de séquences alternées purine/pyrimidine) correspondait à la configuration la plus stable parmi les différents types de liaisons envisagées et testées pour cette polyamine.

Le rétrécissement du grand sillon, l'altération de la configuration spatiale des molécules de désoxyribose, ainsi que le rapprochement des groupements phosphate

sont des caractéristiques de la forme A de l'ADN (ADN-A). Dans un environnement favorable, les polyamines sont capables d'induire, dans des séquences spécifiques en solution, la transition ADN-B en ADN-A et ADN-B en ADN-Z (Zhurkin et coll., 1980. Thomas et Bloomfield, 1985). En effet, il a été constaté lors d'expériences de simulations prenant en compte la dynamique moléculaire que l'interaction de la spermine avec le polymère courbe pouvait entraîner suffisamment d'altérations dans l'empilement des bases nucléiques pour favoriser la rotation d'une guanine en dehors de sa position normale. Un tel comportement mime la transition d'ADN-B en ADN-Z, au cours de laquelle les résidus puriques passent d'une conformation "anti" à une conformation "syn" (Feuerstein et coll., 1991).

Les informations obtenues à partir de ces études de modélisations moléculaires peuvent être utilisées lors de l'interprétation de données physico-chimiques relatives aux interactions polyamines-ADN, et ce type d'approche peut être source d'arguments théoriques entrant dans le cadre d'hypothèses de travail.

#### II-2-2-2 Etudes à partir d'ADN en solution

Le fait que de faibles concentrations de spermidine et de spermine puissent introduire une transition ADN-B/ADN-Z (Thomas et Bloomfield, 1984) et une courbure de l'ADN (Basu et coll., 1987, Marquet et Houssier, 1988) souligne l'implication probable des polyamines dans la conformation spatiale de l'ADN *in vivo*. La transition ADN-B/ADN-Z pourrait être impliquée dans l'expression génétique ainsi que dans la mise en phase des nucléosomes au cours de la condensation de la chromatine, tandis que la triple hélice pourrait jouer un rôle dans les processus de recombinaison et de réparation de l'ADN.

Les premières études portant sur les interactions polyamines-ADN en solution mettaient principalement l'accent sur la capacité des polyamines à condenser l'ADN. Puisque d'autres polycations, tel que  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^+$ , induisent des effets similaires (Tabor et Tabor, 1984), l'interaction polyamines-ADN a été modélisée en utilisant la théorie de la condensation par contre-ions (théorie de Manning). Dans ce modèle, l'ADN est représenté par une distribution uniforme de charges négatives et la spermine comme une charge ponctuelle déplacée de façon non-spécifique sur la surface de l'ADN. En soutien à ce modèle théorique, des études cinétiques de la condensation de l'ADN ont révélé que la cinétique de liaison des polyamines était trop rapide pour permettre leur liaison à des sites spécifiques (Porschke, 1984).

L'étude de signaux RMN des protons des CH<sub>2</sub> de la spermine ainsi que celle des Effets Overhauser Nucléaires (NOE) entre la spermine et un dodécanucléotide suggèrent également l'absence de spécificité de l'interaction spermine-ADN (Wemmer et coll., 1985). Cependant, les signaux RMN ne représentent qu'une moyenne des signaux produits par l'ensemble des molécules de ligands en solution. Les signaux provenant de molécules de spermine liées de façon spécifique à l'ADN, auraient pu ainsi être masqués par ceux issus des autres molécules de spermine associées de manière non-spécifique. Cullis et coll., (1995) sont arrivés à la même conclusion. En effet, lors des études de spécificité de liaison de leurs analogues chlorambucil-spermine et -spermidine, ces deux derniers présentaient la même spécificité que le chlorambucil seul. La partie polyammonium ne perturbait pas le site préférentiel de pontage de l'ADN. Ce résultat confirme que les polyamines se lient à l'ADN de façon essentiellement non-spécifique et que l'association est principalement électrostatique.

D'autres expériences ont au contraire fourni des arguments en faveur de la spécificité des interactions polyamines-ADN. Les expériences de liaison d'anticorps anti-forme Z avec une séquence poly(dG-Br<sup>5</sup>-dC) de forme Z ont montré (Basu et coll., 1988) que si la spermine inhibait la fixation des anticorps au niveau de la surface convexe de l'ADN-Z, cette polyamine n'altérerait en rien la liaison des anticorps sur le squelette phosphaté. Par conséquent, la spermine semble avoir un site spécifique de liaison situé à la surface de l'ADN-Z.

En ce qui concerne l'ADN-B, des études d'échange H-D par stopped-flow (Basu et coll., 1987) couplées à des études de relaxation RMN (Plum et Bloomfield, 1990a), ont révélé que non seulement la spermine, mais également la spermidine, augmentaient la vitesse d'échange des protons des fonctions imine présentes dans les séquences poly(dA-dT), sans pour autant modifier notablement les vitesses d'échange des protons des fonctions amine. Ces résultats furent mis sur le compte d'une courbure de l'ADN induite par la spermine, ce qui est en accord avec les observations précédentes lors des études de modélisation moléculaire. L'induction d'une telle courbure élargit le petit sillon et accroît l'accessibilité des bases d'ADN au solvant, ce qui pourrait accélérer les vitesses d'échanges des imino-protons de la séquence poly(dA-dT). Contrairement aux séquences poly(dA-dT), les imino-protons des séquences poly(dG-dC) sont protégés par une liaison hydrogène supplémentaire au niveau du petit sillon, ce qui entraverait leur accessibilité au solvant et entraînerait une diminution de la vitesse d'échange (Basu et coll., 1987).

Des études de biréfringence électrique des complexes spermine-poly(dG-dC) et spermine-poly(dA-dT) ont révélé que la spermine diminuait le temps de relaxation

de la séquence poly(dA-dT) et augmentait celui de la séquence poly(dG-dC) (Marquet et Houssier, 1988). Ceci fournit une preuve supplémentaire quant à la capacité à courber l'ADN au niveau de régions riches en AT. Shinder et Gold (1989) ont étudié les effets de la spermidine sur la fixation de la sous unité gpNU1 de la protéine terminase  $\lambda$  de l'ADN du bactériophage  $\lambda$ . Pour se fixer à cet ADN in vitro la sous-unité gpNU1 nécessite habituellement la présence d'un facteur d'intégration (Intégration Host Factor : IHF) qui est une protéine capable de courber l'ADN. Leurs résultats montrent que la spermidine pourrait se substituer à l'IHF et faciliter la fixation de la sous-unité. Aucune preuve directe d'une courbure de l'ADN induite par les polyamines n'a pu jusqu'à présent être apportée. Les arguments développés ci-dessus indiquent que la spermine possède un site spécifique de fixation à la surface de l'ADN-Z en solution et qu'elle semble agir directement sur la configuration spatiale des séquences poly(dG-dC) et poly(dA-dT) sous forme B.

Les effets de la spermine sur la fluorescence du complexe ethidium-ADN tendent à montrer que les modifications conformationnelles induites par la spermine dans une séquence poly(dA)-poly(dT) homopolymérique diffèrent de celles induites dans une séquence poly(dA-dT) hétéropolymérique (Delcros et coll., 1993). La digestion enzymatique d'agrégats spermidine-ADN a également montré que la fixation de cette polyamine était séquence spécifique (Srivenugopal et coll., 1987). De telles associations des polyamines à des séquences spécifiques d'ADN ainsi que les effets en découlant quant à la conformation spatiale de l'ADN ne peuvent être expliquées par la théorie de la condensation par contre-ions (théorie de Manning). Plum et Bloomfield (1990b) ont signalé que dans des conditions réactionnelles identiques, les valeurs des constantes de fixation de la poly[d(AT)].poly[d(AT)] à l'un des cations trivalents que sont la spermidine, la N<sup>8</sup>-methylspermidine et le Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub><sup>3+</sup>, pouvaient varier de deux ordres de grandeur. Ils ont proposé que la spécificité des interactions électrostatiques entre l'ADN et les polyamines pourrait être expliquée par une théorie proche de celle de Manning, qui tiendrait également compte de l'effet de rayon de cation ainsi que des moments dipolaires résiduels au niveau des différentes séquences de bases de l'ADN (Plum et Bloomfield, 1990c).

Schmid et Behr (1991) ont utilisé la sonde SperN<sub>2</sub><sup>5+</sup> (sperminediazonium ; fig 22) pour révéler le site de liaison de la spermine à l'ADN par analyse électrophorétique des coupures induites dans un fragment de restriction marqué au phosphore-32.

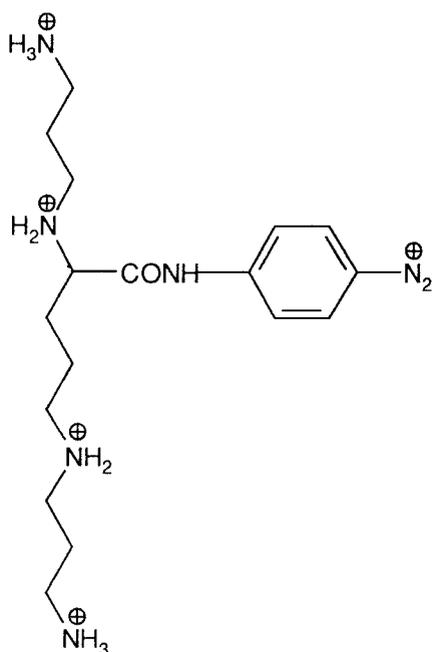
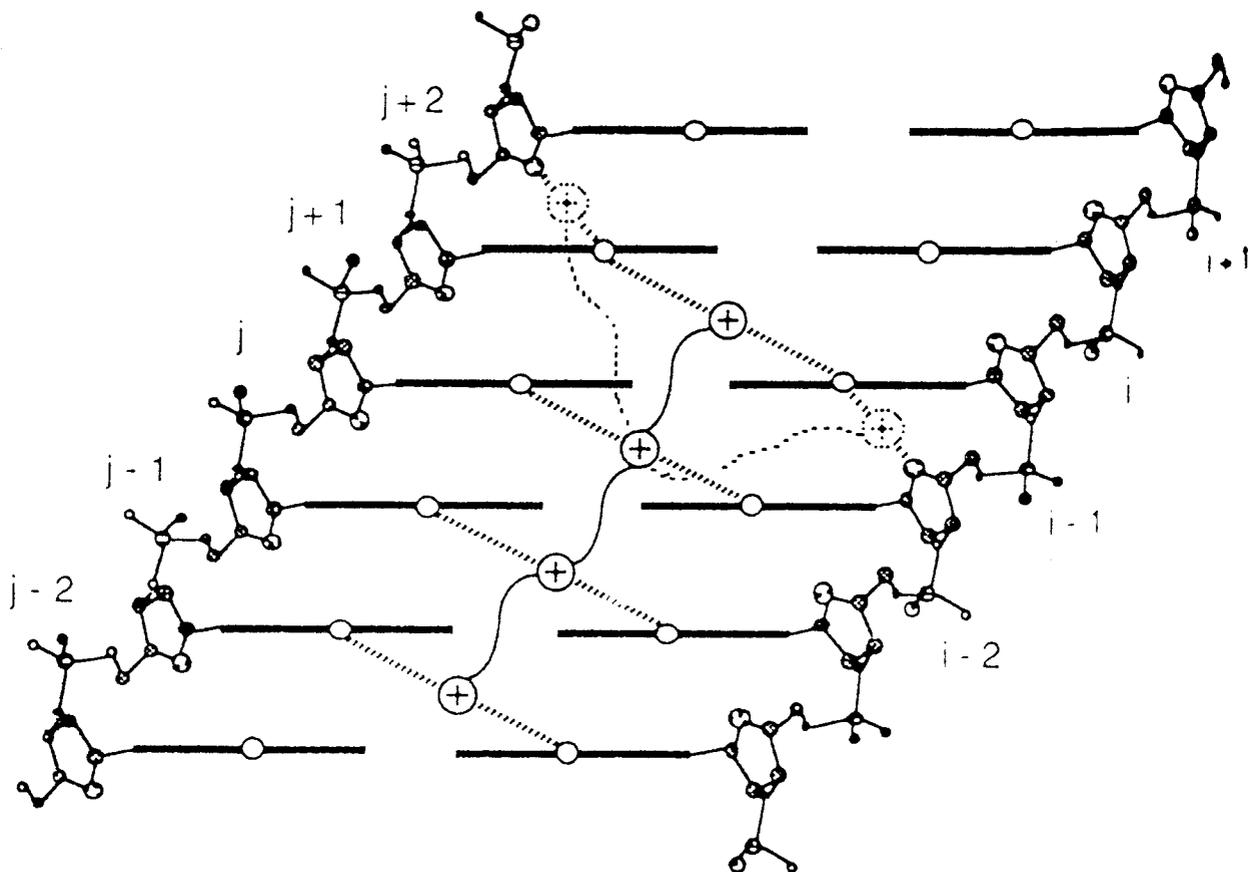


Figure 22 : Structure chimique de la sonde SperN<sub>2</sub><sup>5+</sup>.

Les sites de coupures sont très semblables, que le fragment soit marqué à l'extrémité 3' ou 5', mais pour ce dernier, les coupures sont décalées systématiquement de 2-3 paires de bases vers les fragments plus grands. La similarité des spectres exclut la possibilité de liaison directe de la spermine avec les groupements phosphate et le sens de décalage permet de préciser dans quel sillon de l'ADN elle se trouve. Cette expérience prouve de manière non ambiguë que la spermine se trouve exclusivement dans le petit sillon de l'ADN-B. La nature ondulatoire des profils de coupure reflète une légère sélectivité de séquence de la spermine pour des régions riches en adénine et thymine. Des résultats similaires ont été obtenus pour la putrescine et pour  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ . La localisation dans le petit sillon et la préférence pour les régions AT où le sillon est particulièrement étroit montrent que les polyamines sont guidées par le potentiel électrostatif le long de l'ADN. Ce potentiel est maximum au fond du petit sillon tapissé par deux accepteurs de liaison hydrogène ( $\text{O}^2$  de pyrimidine et  $\text{N}^3$  de purine) par paire de base, quelle que soit la séquence. Il est donc très probable que chaque groupement ammonium établisse un double pont hydrogène avec ces atomes. Les trois ou quatre groupements méthylène séparant une fonction amine de la suivante sont juste suffisants pour joindre deux paires de bases successives. Ces considérations conduisent au modèle schématisé fig 23.



**Figure 23 :** Représentation schématique de la spermine liée dans le petit sillon de l'ADN.

La vue est dans le plan des bases nucléiques pointant leur atomes  $O^2$  et  $N^3$  (-O-) en direction des groupements  $H_2N^+$ (+) (Schmid et Behr, 1991).

Mais la réalité est moins figée que ne le suggère ce schéma. Par conséquent, le mouvement moléculaire de la polyamine peut se faire par sauts successifs de chaque groupement  $H_2N^+$  entre de multiples sites de liaison équidistants et isoénergétiques ; la polyamine peut progresser extrêmement vite dans le petit sillon sans avoir à le quitter. La polyamine va vers le grand sillon dans l'ADN-A (Schmid et Behr, 1991).

Comme on peut le constater le débat reste ouvert quant à la spécificité d'interactions entre les polyamines et l'ADN. Les résultats théoriques et expérimentaux, présentés ci dessus, montrent que les polyamines influent sur la conformation de l'ADN *in vitro*. L'existence de tels effets *in vivo*, devrait sans nul doute avoir des retombées importantes quant aux processus tels que la condensation de la chromatine, l'organisation des nucléosomes, la régulation de la transcription ou encore la recombinaison cellulaire.

## II-3 Les polyamines et la thérapie anti-cancéreuse

### II-3-1 Rôle des polyamines dans la prolifération cellulaire

L'initiation de la croissance *in vivo* et *in vitro* des cellules de mammifères est accompagnée à la fois d'une augmentation des activités des différentes enzymes de biosynthèse des polyamines et de celle des concentrations intercellulaires en polyamines. En effet, les concentrations des polyamines sont faibles dans les cellules au repos, elles augmentent rapidement lors de la stimulation de la division par des facteurs de croissance, des hormones ou des promoteurs tumoraux (Marton et Feuerstein, 1986 ; Pegg, 1988).

L'importance des polyamines dans les phénomènes de croissance et de prolifération a été mise en évidence lors d'expériences dans lesquelles la biosynthèse des polyamines est empêchée par des mutants ou par des inhibiteurs des deux enzymes les plus importantes l'ODC et l'AdoMet DC (Tabor et Tabor, 1984 ; Pegg, 1988). Par ailleurs, il a été observé que lorsque la croissance cellulaire était maintenue grâce à un apport exogène de spermine, les activités de l'ODC et de l'AdoMet DC étaient diminuées. Les inhibiteurs de biosynthèse des polyamines peuvent donc constituer une classe intéressante d'agents thérapeutiques dans des maladies invoquant un dysfonctionnement de la prolifération cellulaire telles que le cancer. En effet, le taux de biosynthèse des polyamines est très élevé dans les cellules transformées comme le montrent à la fois les quantités importantes des enzymes (ODC ; AdoMet DC) et les fortes concentrations intracellulaires des polyamines.

### II-3-2 Les inhibiteurs d'enzymes

L'ODC et l'AdoMet DC, enzymes clés de la biosynthèse des polyamines dans les cellules de mammifères, constituent deux cibles intéressantes pour le design de molécules capables d'interférer avec le métabolisme des polyamines. Cependant, le manque d'informations concernant les sites catalytiques de ces enzymes en plus de l'incomplète compréhension du métabolisme et des fonctions individuelles de chacune des polyamines posent un problème pour le design d'inhibiteurs puissants et spécifiques (Wu et Woster, 1992 ; Stanek et coll., 1993a, b).

#### II-3-2-1 Les inhibiteurs de l'ODC

L' $\alpha$ -difluoromethylornithine (DFMO) (fig 24) est l'inhibiteur de l'ODC le plus étudié (Matcalf et coll., 1978 ; Sunkara et coll., 1980, 1983 ; Sano et coll., 1984 ; Pegg, 1988 ; Meyskens et coll., 1994).

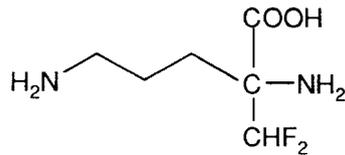


Figure 24 : Structure chimique de la DFMO.

La DFMO est un inhibiteur irréversible de l'ODC (Matcalf et coll., 1978). Cette inhibition provoque la déplétion des concentrations intracellulaires en putrescine, produit de décarboxylation de l'ornithine, et de son dérivé la spermidine (Pegg, 1988). Les taux de spermine sont très peu ou pas affectés par l'inhibiteur. La DFMO inhibe ou ralentit la prolifération d'une large variété de cellules normales et tumorales *in vitro*. Cette inhibition est facilement vaincue par l'approvisionnement des cellules en polyamines exogènes. Par conséquent, la DFMO est un inhibiteur spécifique de l'ODC (Sunkara et coll., 1980). L'effet cytotoxique ou cytostatique de la DFMO dépend du type cellulaire et des conditions de cultures (Sano et coll., 1984 ; Luk et Baylin, 1986). Des effets similaires ont été observés *in vivo*. De plus, les métastases sont inhibées de façon impressionnante (Sunkara et coll., 1983). La DFMO s'est avérée très peu cytotoxique lors d'essais cliniques en chimiothérapie anticancéreuse humaine (Meyskens et coll., 1994). De plus, la DFMO est un inhibiteur puissant de la carcinogenèse dans plusieurs modèles animaux. Il est spécialement actif dans la prévention des cancers de la peau, du colon, du sein et de la vessie. Les mécanismes de cette prévention restent inconnus (Meyskens et coll., 1994).

La DFMO a été utilisée pour potentialiser l'activité cytotoxique de plusieurs agents anticancéreux connus : cis-platine (Allen et Natale, 1986 ; Chang et coll., 1984), doxorubicine, vinblastine (Allen et Natale, 1986), 1,3-bis-(2-chloroéthyl)-1-nitrosourée (BCNU) (Sano et coll., 1984 ; Seidenfeld et Komar, 1985 ; Seidenfeld et coll., 1987). Cette potentialisation dépend à la fois du type cellulaire et des protocoles expérimentaux (Pegg, 1988).

### II-3-2-2 Les inhibiteurs de l'AdoMet DC

En 1972, Williams-Ashman et Scherone découvrent que le methylglyoxal bis-(guanylhydrazone) (MGBG) (fig 25 ; 1) était un inhibiteur puissant de l'AdoMet DC. Le MGBG augmente les concentrations intracellulaires de la putrescine et diminue celles de la spermine et de la spermidine. Il inhibe aussi la croissance et la viabilité des cellules (Pegg, 1988). Ces effets sont réversés, dans certains cas, par l'administration de spermidine exogène.

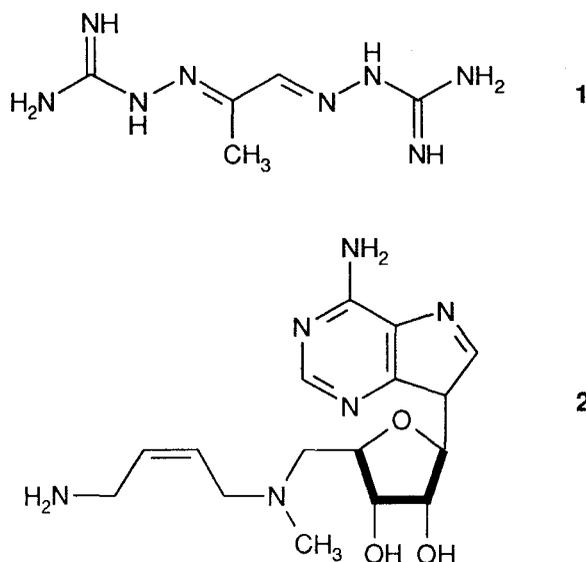


Figure 25 : Structure chimique de MGBG (1) et de AbeAdo (2).

Le MGBG n'est pas un inhibiteur spécifique, il inhibe aussi les DAO et s'avère être un inducteur puissant de la SSAT (Pegg, 1988). Il possède une activité antileucémique et une certaine efficacité vis-à-vis de quelques tumeurs solides. Cependant, son utilisation clinique est limitée par sa grande toxicité. En effet, le MGBG s'accumule fortement dans la cellule et provoque des dégâts au niveau des mitochondries (Pathak et coll., 1977). La cytotoxicité du MGBG n'est pas due principalement à la déplétion du contenu cellulaire en polyamines. Sa structure proche de celle des polyamines lui permet d'utiliser le même système de transport et de remplacer la spermidine dans certains sites de la cellule (Pegg, 1988).

D'autres inhibiteurs plus puissants et plus spécifiques ont été conçus et étudiés (Pegg, 1988). Ces composés inhibent la biosynthèse des polyamines dans les cellules L1210 conduisant ainsi à une accumulation massive de la putrescine et une réduction de la spermine, de la spermidine, de la S-adénosylméthionine décarboxylée et de la 5'-méthylthioadénosine. La prolifération cellulaire est inhibée après déplétion des deux polyamines. Ce résultat montre que la putrescine seule ne peut pas se substituer aux polyamines lors de la prolifération des cellules L1210. Tous ces composés se sont avérés ni assez puissants ni suffisamment stables et enfin pas assez sélectifs. En effet, leur utilisation est limitée par leur courte durée de vie dans les milieux de culture. L'inhibition de l'AdoMet DC pour une durée limitée ralentit mais n'arrête pas la prolifération cellulaire. (Pegg, 1988). Ce résultat a été confirmé lors d'études utilisant des inhibiteurs plus stables (Casara et coll., 1989 ; Wu et Woster, 1992 ; Stanek et coll., 1993a, b) tels que AbeAdo ou 5'[[*(Z)*-4-amino-2-butenyl]méthylamino]-5'-déoxyadénosine (Byers et coll., 1994a, b) (fig

25 ; 2) analogue de la S-adenosylméthionine. Il inhibe de façon irréversible l'AdoMet DC de source bactérienne ou mammifère (Casara et coll., 1989). L'AdoMet DC possède un résidu pyruvate, lié de façon covalente, essentiel à l'activité et qui participe à la catalyse en formant une base de Schiff avec le substrat (Wu et Woster, 1992). Il a été proposé que cet analogue devrait se lier au résidu pyruvoyle de l'enzyme comme le substrat naturel et qu'il formerait ainsi un accepteur de Michael très réactif au niveau du site actif par une catalyse basique. L'attaque par un nucléophile situé à la surface de l'enzyme conduirait ensuite à une liaison irréversible de l'inhibiteur sur le site actif (Casara et coll., 1989 ; Wu et Woster, 1992).

Tant que la structure tridimensionnelle de l'enzyme reste inconnue, le développement de nouveaux inhibiteurs contribuerait de façon très significative à la compréhension des événements au niveau du site catalytique de l'enzyme. Actuellement, deux classes d'inhibiteurs sont étudiés en phase préclinique, il s'agit :

- ❑ d'analogues du MGBG qui sont des inhibiteurs plus compétitifs et plus spécifiques que la molécule parente,
- ❑ d'analogues de la S-adenosylméthionine qui sont des inhibiteurs irréversibles se liant de façon covalente au résidu pyruvate au niveau du site actif de l'enzyme.

Un certain succès a été atteint à travers cette approche. En effet, la DFMO et le MGBG se sont révélés efficaces *in vitro* et *in vivo* vis-à-vis de certaines tumeurs. Malheureusement, les essais cliniques n'ont pas reflété les succès obtenus avec les systèmes modèles. Les produits étaient soit trop toxiques comme le MGBG, soit incapables d'exercer le même impact sur les tumeurs humaines (Bergeron et coll., 1995). Cependant les réductions puissantes des activités de l'ODC et de l'AdoMet DC observées ont encouragé à poursuivre les travaux entamés dans ce sens. Par ailleurs, ces inhibiteurs ne permettaient pas la déplétion de toutes les polyamines ce qui pourrait expliquer la non toxicité de certains inhibiteurs. L'inhibition d'une étape du cycle de biosynthèse provoque l'augmentation des autres polyamines aussi bien avant qu'après le site de blocage. Des inhibiteurs ou une combinaison d'inhibiteurs capables d'induire la déplétion totale de toutes les polyamines devraient être toxiques (Huang et coll., 1994 ; Linares et coll., 1994). Enfin, grâce à toutes ces études expérimentales et cliniques entreprises avec les inhibiteurs d'enzymes, il est maintenant bien établi que le design de molécules interférant avec la biosynthèse des polyamines, ou bien leurs fonctions biologiques, représente une stratégie intéressante pour le traitement des désordres prolifératifs.

### II-3-3 Les analogues directs des polyamines

Des quantités micromolaires de polyamines exogènes peuvent réguler négativement l'activité des enzymes intervenant dans le cycle de biosynthèse des polyamines. Bien que la biosynthèse soit interrompue dans ces conditions, les cellules continuent à proliférer en utilisant les polyamines exogènes en remplacement des polyamines endogènes dans leurs fonctions nécessaires à la croissance (Porter et coll., 1987). Dès lors, des molécules capables de réguler les enzymes de biosynthèse et néanmoins incapables de se substituer aux polyamines naturelles dans leurs fonctions biologiques, peuvent constituer une classe intéressante d'agents antiprolifératifs (Porter et coll., 1982, 1987).

L'idée était de concevoir des analogues des polyamines ayant des structures si proches de celles des molécules naturelles qu'ils seraient à même de réguler négativement les enzymes de la même façon que lorsque les cellules sont exposées aux polyamines exogènes. De tels analogues pourraient être incorporés via le système de transport des polyamines naturelles. Une fois dans la cellule, ils devraient être distribués au niveau des mêmes sites. De plus, ils devraient ne pas être métabolisés de la même façon que les polyamines naturelles et provoquer la déplétion de toutes les polyamines. Plusieurs analogues ont été synthétisés et testés quant à leur capacité à :

- pénétrer dans les cellules en empruntant le système de transport membranaire des polyamines,
- inhiber la prolifération cellulaire ou se substituer aux polyamines naturelles dans leur rôle d'inducteurs de croissance cellulaire,
- réguler ou supprimer les activités enzymatiques,
- induire des changements conformationnels au niveau de l'ADN.

La plupart des analogues provoquent la déplétion intracellulaire de toutes les polyamines (Basu et coll., 1994 ; Bergeron et coll. 1994). Cependant, tous n'inhibent pas la prolifération cellulaire. En effet, les bis(alkyl)polyamines en particulier N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(éthyl)spermidine et N<sup>1</sup>,N<sup>11</sup>-bis(éthyl)spermine (Porter et coll., 1982, 1987 ; Bergeron et coll., 1989), capables de vider la cellule de tout son contenu en putrescine et spermidine et d'une partie de la spermine, sont aussi aptes à inhiber la croissance cellulaire. Par contre, d'autres analogues de la spermidine et certains analogues de la putrescine reversent l'inhibition induite par la DFMO (Porter et coll., 1987 ; Basu et coll., 1989). Cette observation reflète leur capacité à interagir avec les sites de liaisons intracellulaires des

polyamines et à mimer les fonctions physiologiques des polyamines naturelles. D'autres séries de polyamines N-alkylées ainsi que des homologues de la spermine ont été synthétisés. Tous ces produits ont fait preuve d'activité antiproliférative vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires *in vivo* et *in vitro*. Tous ces composés :

- utilisent le système de transport des polyamines pour leur incorporation à l'intérieur de la cellule (Bergeron et coll., 1989 ; Porter et coll., 1987),
- provoquent la déplétion des polyamines (Bergeron et coll., 1989 ; Basu et coll., 1993a,b),
- réduisent fortement l'activité de l'ODC et de l'AdoMet DC (Porter et coll., 1987, 1993, 1994),
- régulent positivement , dans certains cas, la SSAT (Casero et coll., 1994, 1995 ; Porter et coll., 1994 ; Saab et coll., 1993).

Les charges négatives des acides nucléiques constituent les sites de liaison probables des polyamines cationiques. Les polyamines naturelles provoquent des altérations dans la conformation de l'ADN *in vivo*. Les plus importantes sont l'induction de la transition ADN-B/ADN-Z et celle d'une courbure sur certaines séquences nucléotidiques probablement par formation de liaisons hydrogène avant le début de l'agrégation ou de la condensation (Basu et coll., 1987 ; Marquet et Houssier, 1988 ; Feuerstein et coll., 1989 ; Plum et Bloomfield, 1990a). Ces propriétés, spécifiques de certaines séquences nucléotidiques, sont probablement impliquées dans les processus de condensation de la chromatine, le positionnement et la distribution des nucléosomes ainsi que dans l'activité transcriptionnelle de gènes spécifiques (Basu et coll., 1992). Par conséquent, la distribution des charges positives à la surface d'analogues des polyamines est très importante pour leur interaction avec l'ADN (Basu et coll., 1994 ; Bergeron et coll., 1995). Plusieurs analogues des polyamines différant par leur longueur de chaîne, et probablement par la distribution des charges le long de cette chaîne, diffèrent dans leurs propriétés de liaison à l'ADN (Basu et coll., 1990a ; Delcros et coll., 1993). Certains possèdent une cytotoxicité considérable vis-à-vis de cellules tumorales humaines en culture tissulaire et une efficacité thérapeutique importante sur des modèles animaux (Bergeron et coll., 1989 ; Basu et coll., 1990b ; Porter et coll., 1993). Les propriétés antiprolifératives des analogues cytotoxiques des polyamines dépendent plus de leur présence intracellulaire que de leur capacité à induire la déplétion des polyamines intracellulaires. Ainsi, l'association de ces analogues avec les éléments subcellulaires semble jouer un rôle crucial dans leur cytotoxicité (Basu et coll., 1994).

Les effets d'un certain nombre d'analogues de la spermine sur la transition ADN-B/ADN-Z et sur l'agrégation de l'ADN ont été étudiés en utilisant les techniques de dichroïsme circulaire et d'absorption UV (Basu et coll., 1989, 1990a, b). La capacité des analogues à induire la transition ADN-B/ADN-Z chute avec la diminution de la longueur de la chaîne alkyle centrale. Ce résultat est en accord avec des travaux ultérieurs concernant des analogues de la spermidine de formule générale :  $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_nNH_2$  ( $n = 2$  à  $8$ ) où la spermidine ( $n = 4$ ) était la plus efficace. Toute augmentation ou diminution de la chaîne altérait l'induction ADN-B/ADN-Z (Basu et coll., 1989). Ainsi, la distribution spatiale des charges positives le long de la surface des polyamines et de leurs analogues est très importante à la fois pour leur association avec l'ADN et pour l'induction des transitions conformationnelles. Cette distribution constitue aussi un facteur déterminant pour l'inhibition de la croissance cellulaire et pour la cytotoxicité (Basu et coll., 1994). L'alkylation des amines primaires réduit fortement la capacité à agréger l'ADN. Ceci montre l'importance de ces amines dans le processus d'agrégation et de condensation des acides nucléiques (Basu et coll., 1989).

La plupart des analogues étudiés provoquent la déplétion de toutes les polyamines, mais seuls les analogues qui n'induisent pas de transition ADN-B/ADN-Z et/ou l'agrégation de l'ADN sont de bons inhibiteurs de la prolifération cellulaire (Basu et coll., 1989 ; Feuerstein et coll., 1991). Sur la base des effets des analogues des polyamines sur la structure de l'ADN et sur la croissance cellulaire, Basu et ses collaborateurs proposent : "s'ils sont internalisés, des analogues des polyamines, ayant plus d'affinité pour l'ADN mais incapables de le courber ou de l'agréger *in vitro* aussi bien que la spermine, devraient posséder des propriétés antiprolifératives" (Basu et coll., 1993a, b). Cette hypothèse est appuyée par l'observation que les analogues 1,14-bis(éthylamino)-5,10-diazatétradécane (BE-4-4-4) et 1,19-bis(éthylamino)-5,10,15-triazanonadécane (BE-4-4-4-4) ont une affinité pour l'ADN de thymus de veau supérieure à celle de la spermine alors que leur capacité à agréger l'ADN est faible par rapport à celle de la spermine (Basu et coll., 1992, 1993a, b).

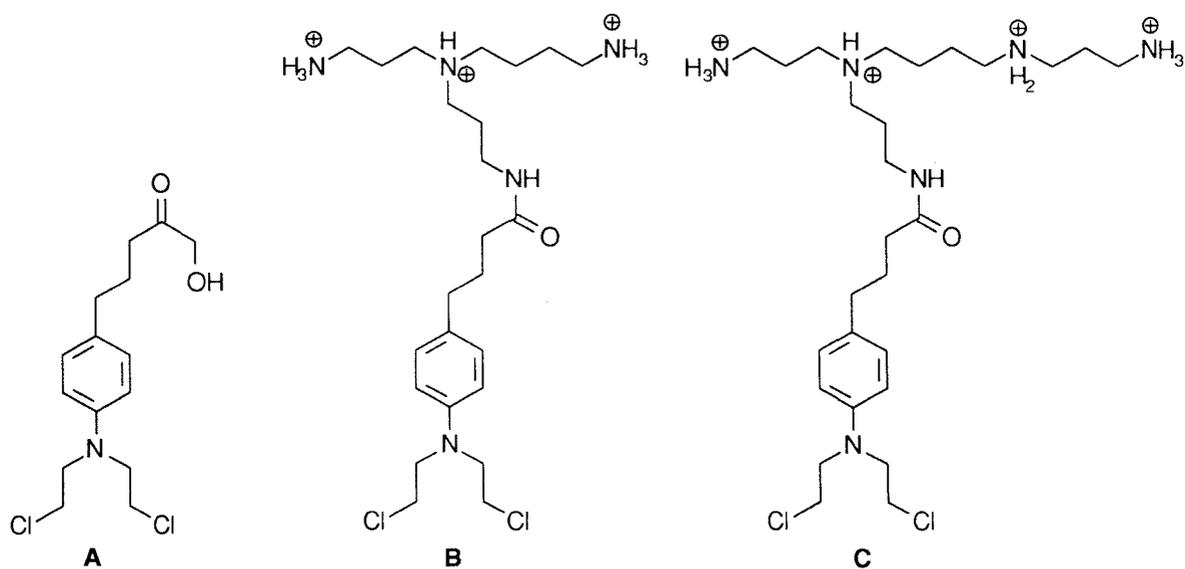
## II-3-4 les analogues indirects des polyamines

Les polyamines sont transportées à l'intérieur des cellules par l'intermédiaire de transporteurs membranaires spécifiques (Nadler et Takahashi, 1985 ; Grillo et Colombatto, 1994 ; Khan et coll., 1994). Ce mécanisme est beaucoup plus actif dans les cellules en prolifération que dans les cellules au repos (Yuan et coll., 1994). En effet, la captation des polyamines extracellulaires par les cellules cancéreuses est essentielle au maintien de leur prolifération rapide *in vivo*.

Plusieurs équipes ont essayé d'exploiter ce système de transport en conjuguant des agents cytotoxiques connus aux polyamines. Ces hybrides devraient être internalisés dans les cellules par le système de captation des polyamines et ainsi s'accumuler sélectivement au niveau des tissus tumoraux. L'ADN étant la cible intracellulaire de ces agents cytotoxiques, leur conjugaison avec les polyamines devrait augmenter leur affinité grâce à la nature polycationique des polyamines (Verschoyle et coll., 1994).

#### II-3-4-1 Chlorambucil-polyamines

Le chlorambucil (fig 26 ; A) est l'un des agents alkylants les mieux tolérés. Il est utilisé dans le traitement du cancer des ovaires, du sein, des leucémies lymphocytaires aiguës et de la maladie d'Hodgkin. Il est capté par les cellules par simple diffusion et exerce ses effets cytotoxiques en interagissant avec l'ADN (Bank et coll., 1989). Dans le but d'exploiter le système de captation des polyamines naturelles, le chlorambucil a été associé à la spermidine (fig 26 ; B) (Cullis et coll., 1994). Cet analogue devrait posséder une plus grande affinité pour l'ADN. Effectivement, le chlorambucil-spermidine ponte l'ADN natif *in vitro* avec une efficacité augmentée d'un facteur  $10^4$ . Ceci démontre la capacité des polyamines à diriger des agents cytotoxiques vers l'ADN. Sa cytotoxicité *in vitro* vis-à-vis des cellules ADJ/PC6 est 35 fois supérieure à celle du chlorambucil. Par contre, l'activité cytotoxique *in vivo* vis-à-vis des cellules tumorales ADJ/PC6 chez la souris est seulement multipliée par un facteur quatre (Cullis et coll., 1994) mais il est dix fois plus toxique (Verschoyle et coll., 1994). L'analogue chlorambucil-spermine (fig 26 ; C) est beaucoup plus actif que son homologue précédent (Cullis et coll., 1995).

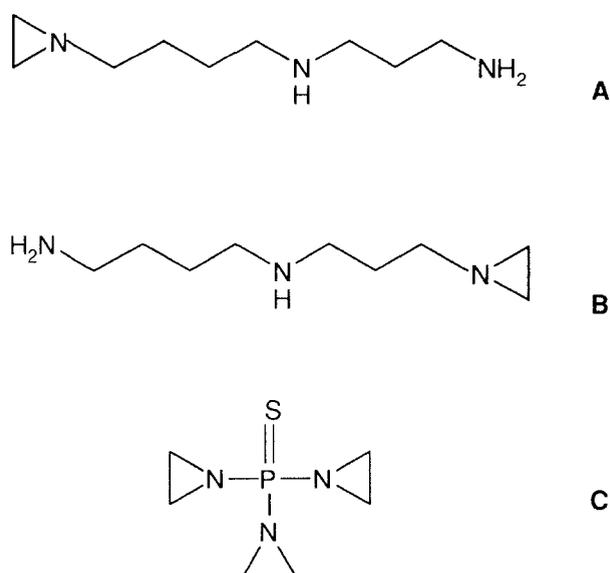


**Figure 26 :** Structures chimiques du chlorambucil (A), chlorambucil-spermidine (B), chlorambucil-spermine (C).

Malgré la présence des deux chaînes polyaminées, les deux analogues présentent la même spécificité de séquence que le chlorambucil. Ils ne perturbent pas les sites de pontage au niveau de l'ADN. Ainsi, aucune perturbation locale de la conformation de l'ADN n'est induite par la partie polyammonium. Ces résultats ont une implication très importante concernant la nature des interactions polyamines/ADN. Cullis et coll., (1995) en ont conclu que les polyamines se liaient à l'ADN de façon non spécifique. Leurs interactions seraient principalement électrostatiques.

#### II-3-4-2 Aziridine-polyamines

Le remplacement de chacune des amines primaires de la spermidine par le noyau aziridine, dont le caractère alkylant a été mis en évidence (Musser et coll., 1992), a abouti à deux analogues possédant une activité cytotoxique (fig 27 ; A et B) (Yuan et coll., 1993).



**Figure 27 :** Structures chimiques des analogues aziridinyl-spermidine : N<sup>1</sup>-aziridinyl-spermidine (A) ; N<sup>8</sup>-aziridinyl-spermidine (B) et du thiotepa (C).

Le mécanisme exact par lequel ces analogues inhibent la prolifération cellulaire reste inconnu. Cependant, les études préliminaires suggèrent que la cytotoxicité des aziridinyl-spermidines dépendrait de leur nature polyaminée et pourrait avoir une sélectivité pour les cellules cancéreuses (Yuan et coll., 1994). En effet, la cytotoxicité de ces deux analogues est augmentée par le prétraitement des cultures cellulaires par la DFMO. Un tel prétraitement n'a aucun effet sur la cytotoxicité induite par le thiotepa (N-N'-N''-triéthylèthiophosphoramidate) (fig 27 ; C). Par ailleurs, les deux analogues entraînent aussi bien la déplétion de la putrescine que celle de la spermidine et celle de la

spermine et sont internalisés par le système de transport des polyamines naturelles (Yuan et coll., 1994). Des études de l'activité antitumorale *in vivo* ainsi que de la toxicité au stade préclinique sont en cours.

### II-3-4-3 Anthracène-polyamines

Le noyau anthracène a été couplé à la spermine par l'intermédiaire d'une liaison amide pour donner l'analogue anthracène-9-carbonyl-N<sup>1</sup>-spermine (fig 28). Ses modes de liaison à l'ADN ont été étudiés en utilisant les techniques d'absorption, de dichroïsme linéaire (LD) et circulaire (CD), ainsi que la modélisation moléculaire (Adlam et coll., 1994). Cet analogue a été conçu d'une part en tant que ligand et d'autre part pour faciliter la détection spectroscopique des polyamines. Il possède de multiples modes de liaison.

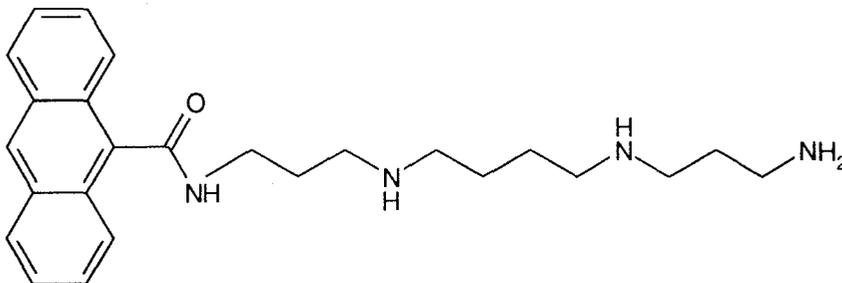


Figure 28 : Structure chimique de l'anthracène-9-carbonyl-N<sup>1</sup>-spermine.

Malgré sa faible charge positive, l'anthracène-9-carbonyl-N<sup>1</sup>-spermine stabilise l'ADN dans des proportions plus importantes que ne le font la spermine et la spermidine. Le mode de liaison le plus stable est l'intercalation du noyau anthracène. Pour l'ADN de thymus de veau ainsi que pour le nucléotide poly(dG-dC).poly(dG-dC) la liaison par intercalation est la plus favorable jusqu'à un rapport ADN/ligand = 10. A des concentrations supérieures, le noyau anthracène ne peut pas être intercalé. En effet, les spectres de DL montrent une baisse d'orientation des molécules d'ADN quand les concentrations en ligand augmentent. Ceci indique que l'hybride anthracène-spermine courbe l'ADN de la même façon que la spermine et la spermidine (Feuerstein et coll., 1990 ; Adlam et coll., 1994). Pour le polynucléotide poly(dA-dT).poly(dA-dT), il existerait une compétition entre deux modes de liaison : l'intercalation et la liaison dans le petit sillon. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par modélisation moléculaire (Adlam et coll., 1994).

## II-4 Les hybrides anthraquinone-polyamines : travaux réalisés

Sur le principe des analogues indirects des polyamines présentés précédemment, dans lesquels la partie polycationique apportait à la fois plus d'affinité pour l'ADN, plus de disponibilité à l'intérieur des cellules et plus de cytotoxicité sans altérer leurs propres propriétés, nous avons entrepris la synthèse d'analogues dans lesquels le noyau anthraquinonique de la mitoxantrone est associé à des chaînes polycationiques, ceci dans le but d'étudier l'influence de la nature et de la longueur des chaînes sur l'intercalation et la spécificité de fixation à l'ADN ainsi que sur la cytotoxicité *in vitro*. Les composés synthétisés et étudiés sont présentés sur la figure 29.

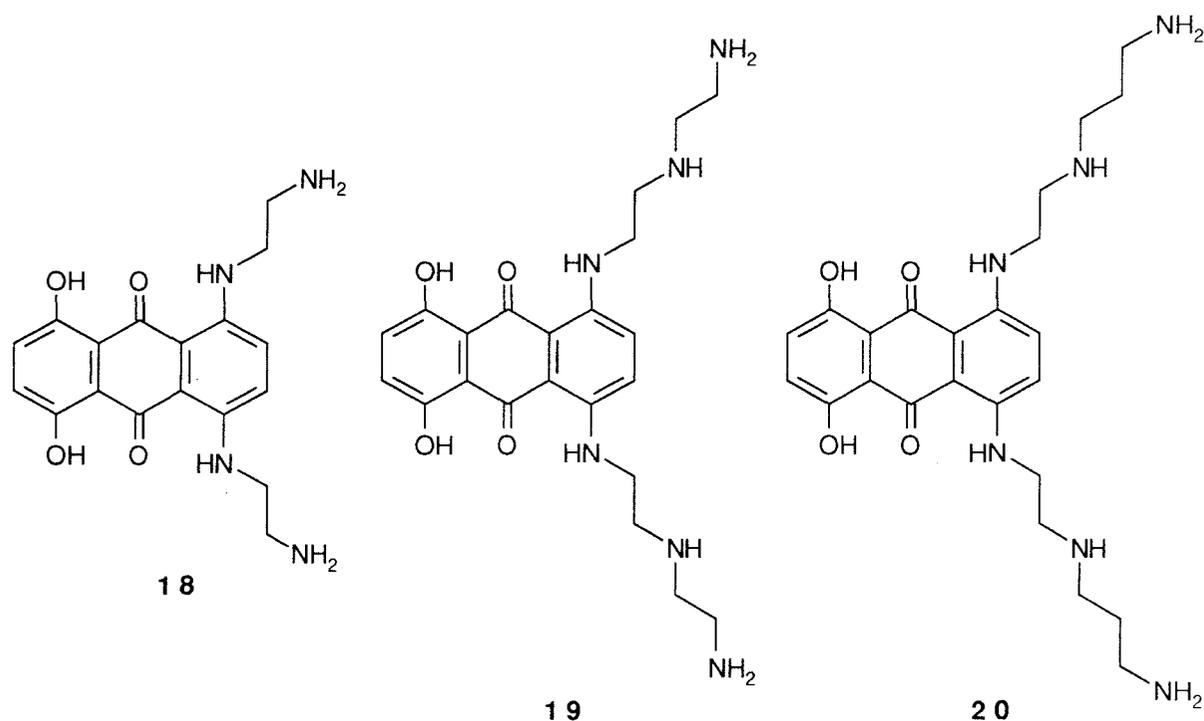


Figure 29 : Structures chimiques des analogues anthraquinones-polyamines.

### II-4-1 Stratégie de synthèse

Les aminoalkylaminoanthraquinones peuvent être préparées par l'intermédiaire de méthodes générales de substitutions nucléophiles. Celles-ci incluent : **a/** la substitution d'hydroxyanthraquinones (Zee Cheng et coll., 1979 ; Murdock et coll., 1979), **b/** substitution de leucohydroxyanthraquinones (Greenhalgh et Hughes, 1968 ; Zee Cheng et Cheng, 1978), **c/** substitution de chloroanthraquinones (Zee Cheng et coll., 1987) ou fluoroanthraquinones (Krapcho et coll., 1991). Nous avons adopté la méthode **b** pour l'élaboration de nos dérivés. Le schéma (fig 30) résume la voie de synthèse envisagée.

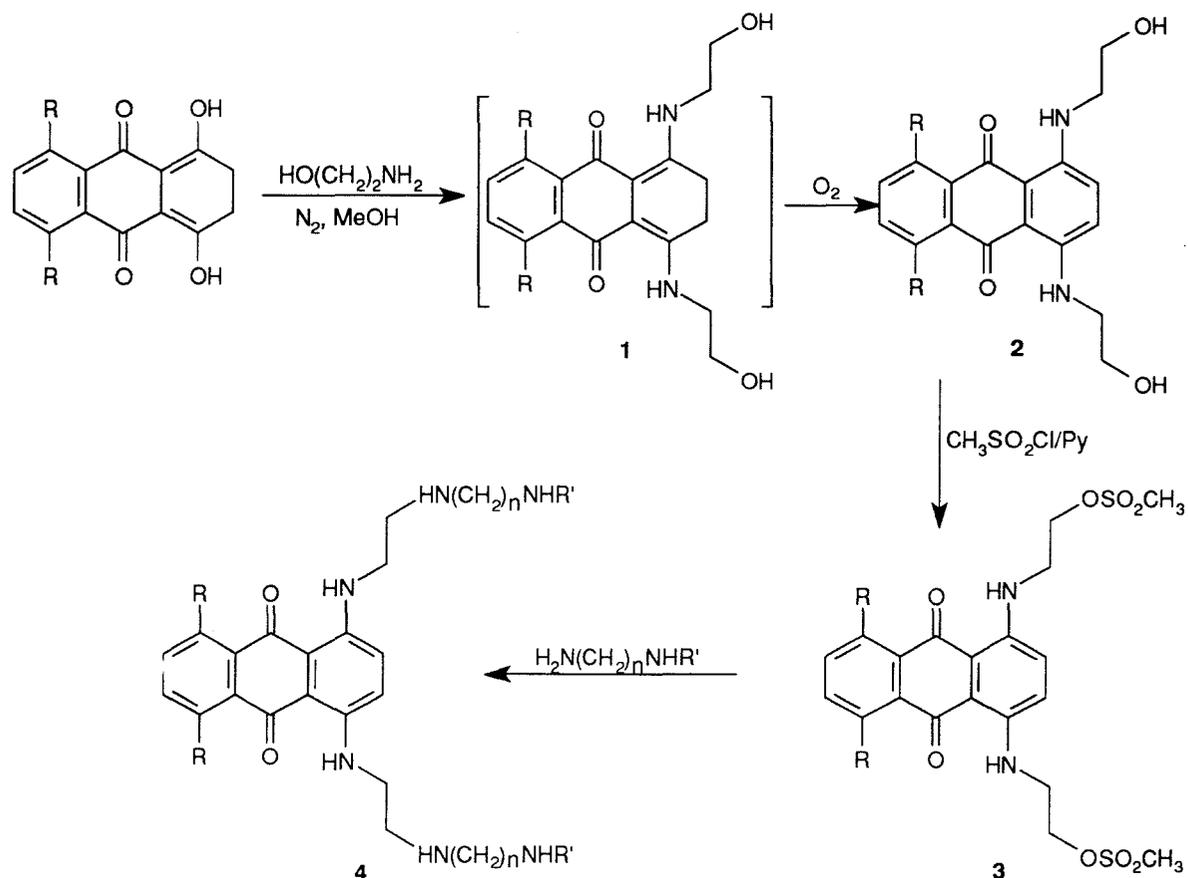


Figure 30 : Schéma de synthèse adopté pour l'élaboration des aminoalkylaminoanthraquinones  $\text{R} = \text{H}$  ou  $\text{OH}$  ;  $\text{R}' = \text{H}$  ou aminoalkyl.

Le réactif de départ est le dérivé 2,3-dihydro-1,4,5,8-tétrahydroxyanthracène-9,10-dione. L'éthanolamine a été choisie afin de permettre l'introduction de deux centres basiques séparés par deux carbones comme dans le cas de la mitoxantrone et comme l'exigent d'ailleurs les relations structure-activité dans cette famille (cf Chapitre I). Une stratégie presque identique a été utilisée par Katzhendler (Katzhendler et coll., 1989) pour élaborer une série d'anthraquinones non hydroxylées et monosubstituées en position 1, 2 ou disubstituées en position 1,5 ou 1,8 dans le but d'établir les relations structure-activité relatives à ces positions. La différence réside dans la première étape où l'éthanolamine n'a pas été fixée sur le leucodérivé mais sur des dérivés chlorés en positions adéquates. Par ailleurs Gibson (Gibson et coll., 1991) a exploité la même stratégie pour synthétiser des anthraquinones substituées en position 1 qui ont été par la suite reliées à des complexes de platine.

### II-4-1-1 Synthèse du dérivé 1,4,5,8-tétrahydroxyanthracène-9,10-dione

Plusieurs stratégies sont décrites pour synthétiser le dérivé 1,4,5,8-tétrahydroxyanthracène-9,10-dione appelé aussi dihydroxyquinizarine ou DHQ à partir : de colorants commerciaux au moyen de leur dégradation (Allen et coll., 1941) ; d' $\alpha$ -dihydroxyanthraquinones par l'intermédiaire de dérivés nitrés (Allen et coll., 1941 ; Houben-Weyl, 1979) ; de la quinizarine en passant par un dérivé dihalogéné... Cependant, aucune d'entre elles n'est vraiment satisfaisante car elles conduisent à des mélanges d'isomères ou les conditions de réaction sont trop difficiles ou les matières premières ne sont pas disponibles. La méthode choisie donne un produit exempt d'isomères de position. Sa séquence réactionnelle est représentée sur la figure 31.

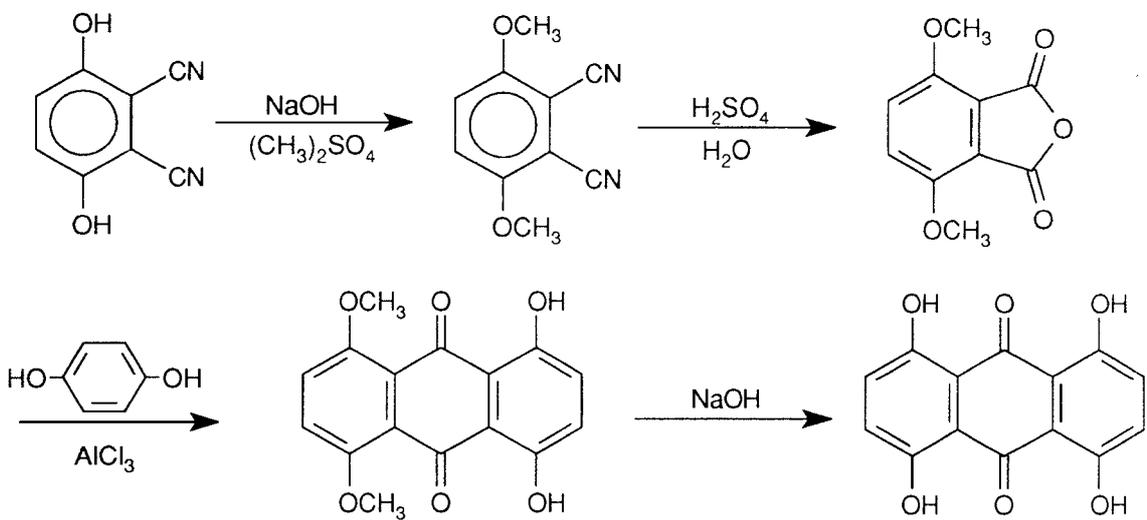


Figure 31 : Schéma de synthèse de la DHQ.

La première réaction est une méthylation classique qui s'effectue avec un bon rendement (85%). La structure est confirmée par la présence de deux groupements méthoxy (OMe) sur le spectre RMN. La condensation de l'hydroquinone avec l'anhydride est une réaction de Friedel et Crafts (Allen et coll., 1941 ; Houben-Weyl, 1979), qui s'effectue en milieu fondu, en présence d'un excès d' $\text{AlCl}_3$ . Le rendement est faible (12%). Une telle réaction n'a pas lieu en présence d'acide phosphorique. Le produit obtenu est purifié par extractions et chromatographie sur colonne de silice. La déméthylation se fait en milieu alcalin pour donner la DHQ.

### II-4-1-2 Fixation des alkylamines sur la DHQ

La fixation des alkylamines sur les fonctions OH en 1,4 des anthraquinones est facilitée par leur activation au moyen d'une réduction de type Clemmensen du cycle

aromatique par le zinc en milieu acétique (Bruce et Thomson, 1952). La condensation est réalisée alors sur le dérivé réduit, appelé aussi leucodérivé, par chauffage en présence d'un excès d'amine sous atmosphère d'azote afin d'éviter la réoxydation. Lorsque la condensation est terminée, l'oxydation a lieu spontanément à l'air libre (Greenhalgh et Hughes, 1968 ; Zee Cheng et Cheng, 1978). Greenhalgh et Hughes (1968) ont montré que la condensation sur les leucodérivés de la quinizarine ou de la dihydroxyquinizarine pouvait s'accompagner d'une cyclisation de type Mickael pour donner le produit secondaire hexahydronaphto[2,3-f]quinoxaline-7,12-dione (fig 32). Une telle cyclisation n'a lieu qu'avec l'éthylène diamine et ses dérivés monosubstitués tels que le 2-(2-aminoéthylamino)éthanol utilisé pour la synthèse de la mitoxantrone. Une telle cyclisation pourrait être évitée en travaillant à basse température (50°C°) (Wallace et coll., 1979).

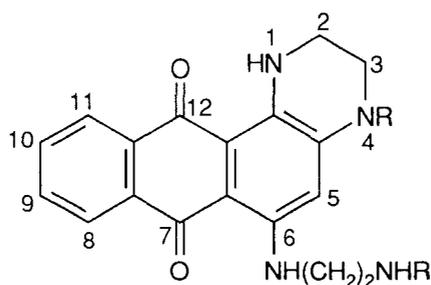


Figure 32 : Structure chimique de l'hexahydronaphto[2,3-f]quinoxaline-7,12-dione.

Zee Cheng et Cheng (1978) lors de la condensation de l'éthylène diamine sur le leucodérivé de la quinizarine ont isolé un autre produit secondaire ayant un point de fusion élevé et une solubilité très modérée dans les solvants tels que EtOH et  $\text{CHCl}_3$ . L'analyse élémentaire indique la présence de trois azotes et suggère la structure reportée fig 33 pour ce produit qui se formerait, vraisemblablement, grâce à une condensation intramoléculaire des deux chaînes terminales avec élimination d'une molécule d'ammoniac (Zee Cheng et Cheng, 1978).

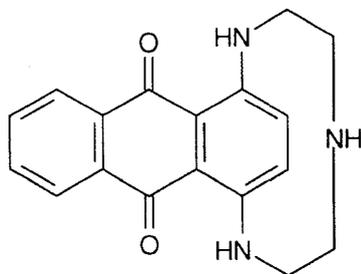


Figure 33 : Structure chimique supposée du produit isolé par Zee Cheng et Cheng (1978).

De telles réactions secondaires ne peuvent avoir lieu lorsque l'on utilise l'éthanolamine. Le composé 1,4-bis-(hydroxyéthylamino)-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione **2a** (R = OH ; fig 30) a été préparé selon cette méthode. En effet, le traitement du 2,3-dihydro-1,4,5,8-tetrahydroxyanthracène-9,10-dione (LDHQ) par un excès

d'éthanolamine dans MeOH sous une atmosphère d'azote pendant 3h en chauffant à 50-55°C donne l'intermédiaire **1** (non isolé) qui s'oxyde par agitation à l'air libre durant une nuit. Le produit **2a** est purifié par chromatographie sur colonne de silice.

#### II-4-1-3 Allongement de la chaîne éthanolamine

Le composé **2a** (R = OH ; fig 30) isolé de l'étape précédente est traité par un excès de chlorure de mésyle dans la pyridine à température ambiante. L'addition d'eau permet de faire précipiter le dérivé **3a** (R = OH ; fig 30) qui est purifié par recristallisation dans MeOH (Katzhendler et coll., 1989). La réaction du composé **3a** avec l'éthylène diamine (R' = H ; n = 2 ; fig 30) en excès s'effectue dans CH<sub>3</sub>CN à reflux. Gibson (Gibson et coll., 1991) isole son dérivé monosubstitué non hydroxylé 1-[2-(2-aminoéthylamino)éthylamino]anthracène-9,10-dione par extraction avec CHCl<sub>3</sub> puis recristallisation dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O. Dans notre cas, nous avons obtenu un mélange de produits hydrosolubles dont aucun, après séparation, ne possédait le spectre RMN attendu. Afin d'éviter la formation de produits secondaires et de faciliter la purification des produits, nous avons envisagé de protéger l'une des amines primaires de l'éthylène diamine par un groupement tertbutyloxycarbonyle (Boc).

L'éthylène diamine protégée de façon asymétrique est préparée selon la méthode décrite par Houssin et coll., (1988) (fig 34). Elle implique un blocage de la fonction amine primaire de l'aminoacétonitrile (produit commercial) ; la réaction propre et rapide fournit le produit **5**. Cet intermédiaire est soumis à la réduction, en présence de Nickel Raney, dans une solution alcoolique saturée en ammoniac. Une pression peu élevée (quelques dizaines d'atmosphères) et une température faible de l'ordre de 50-60°C pour éviter l'hydrogénolyse de la fonction carbamate, sont suffisantes pour donner le produit **6** dans de bonnes conditions.

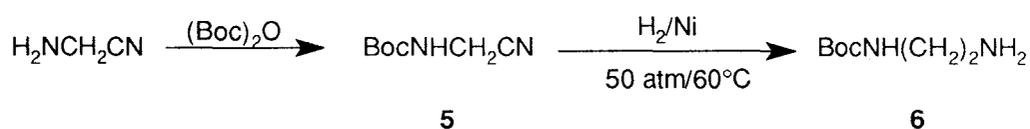


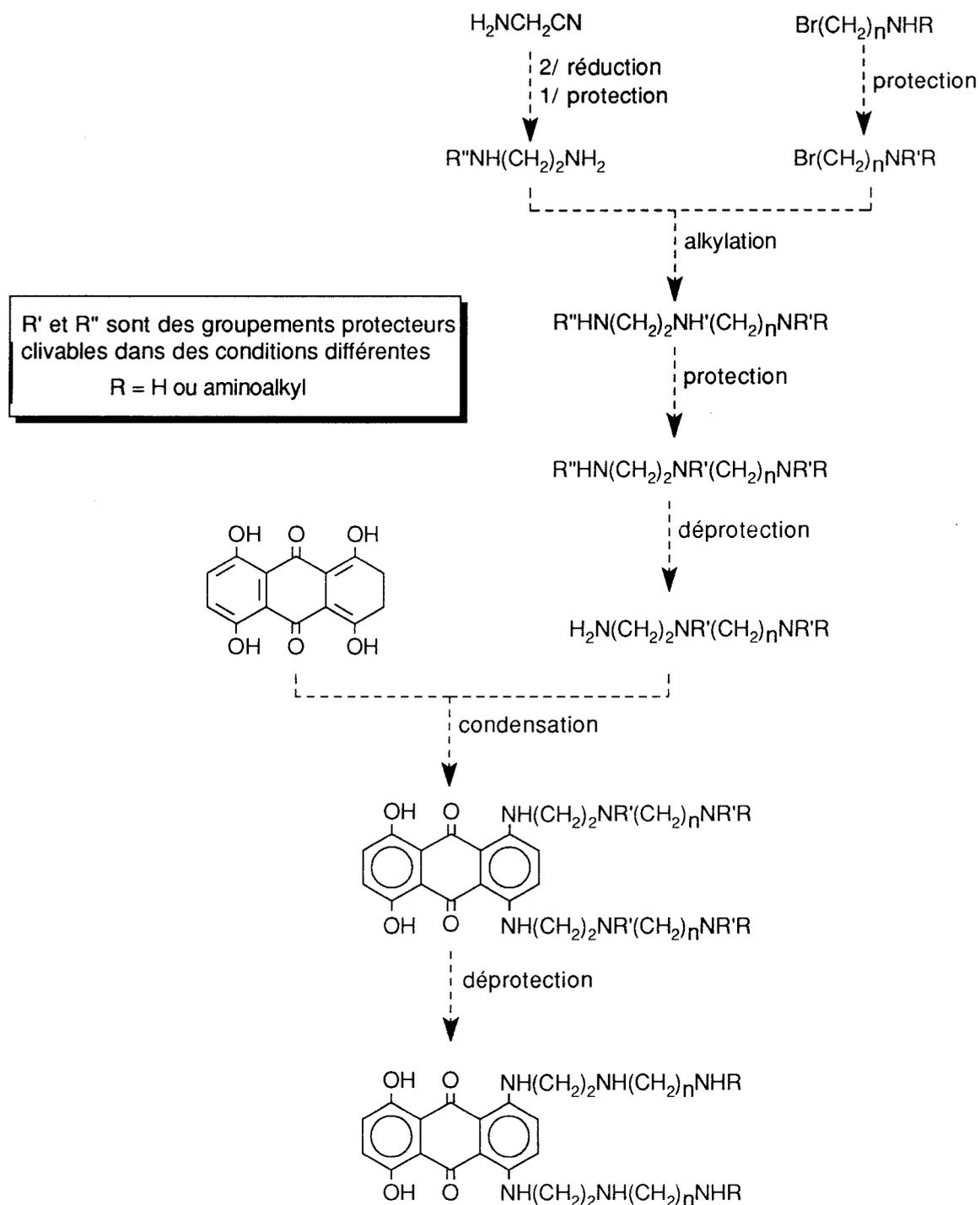
Figure 34 : Synthèse de l'éthylène diamine monoprotégée.

Afin de se rapprocher au plus des structures décrites (Katzhendler et coll., 1989 ; Gibson et coll., 1991), nous avons décidé de fixer l'amine **6** sur le dérivé non hydroxylé en 5,8. Le dérivé **3b** (R = H, fig 30), obtenu de la même façon que son homologue hydroxylé, est mis en réaction avec l'amine protégée **6** en large excès dans les mêmes conditions que précédemment (fig 30). Il se forme plusieurs produits comme nous

l'avons visualisé en suivant l'évolution de la réaction par CCM. Leur séparation par chromatographie sur colonne de silice a permis d'isoler une fraction dont l'analyse par spectrométrie de masse ne révèle la présence d'aucun pic moléculaire correspondant au dérivé **4b** ( $R = R' = H$  ; fig 30). L'un des pics de masse correspond au dérivé monosubstitué. Travaillant déjà en excès (12 équivalents d'amine pour 1 équivalent d'anthraquinone), il nous est paru inutile d'augmenter les quantités d'amines dans le but de favoriser la disubstitution. Nous avons donc décidé d'abandonner cette voie de synthèse.

#### II-4-1-4 Deuxième stratégie de synthèse

La deuxième possibilité qui s'offrait à nous était de préparer les chaînes aminées à part et les fixer sur le leucodérivé de l'anthraquinone par la suite. La synthèse de tels composés de structures linéaires à priori relativement simples, se heurte principalement au problème de sélectivité de réactions, telle que l'alkylation par exemple, sur des composés présentant simultanément une ou plusieurs fonctions amine primaire ou secondaire. Pour parer à ces problèmes nous avons fait appel à divers groupements protecteurs usuels pour la synthèse peptidique. Le schéma (fig 35) représente la nouvelle voie de synthèse adoptée.



**Figure 35 :** Voie de synthèse alternative.

Les matières premières sont d'une part l'éthylène diamine monoprotégée sur l'une de ses fonctions amines primaires, obtenue selon le schéma de synthèse fig 34 ; d'autre part, une bromoamine dont la protection est assurée par un groupement benzyloxycarbone (Z). Ce groupement est introduit par l'intermédiaire du réactif chloroformiate de benzyle (ZCl), la réaction s'amorçant dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à froid ( $0^\circ\text{C}$ ) puis se poursuivant à température ambiante avec de bons rendements (fig 36).

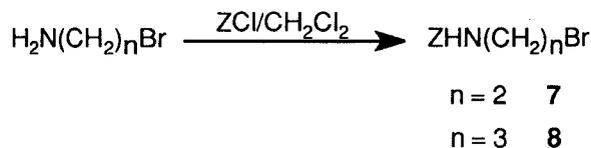


Figure 36 : Protection des bromoamines.

L'alkylation de l'amine **6** avec les dérivés bromés **7** et **8** dans  $\text{CH}_3\text{CN}$  à 50-55°C donne les dérivés **9** et **10** (fig 38) respectivement sous forme de bromhydrate. De telles alkylations pouvaient se faire dans le DMF en présence de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (Huang et coll., 1992). Le rendement décrit est de 48% après purification sur colonne de silice éluée par un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$  (8 : 1,5 : 0,5). Nous obtenons des rendements de l'ordre de 38% après recristallisation des bromhydrates **9** et **10**. La purification a été d'autant plus facile que les deux dérivés précipitaient dans le milieu réactionnel, à chaud pour le dérivé **9** et à froid pour le dérivé **10**.

Par ailleurs, nous avons utilisé dans un premier temps une autre méthode décrite par Sundaramoorthi et coll., (1984) pour l'obtention du dérivé **9** (fig 37). La glycine protégée par un groupement Z sur sa fonction amine (produit commercial) est condensée à l'amine **6** en présence de réactifs classiques de couplage peptidique : diméthylaminopyridine (DMAP) et 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide (EDC), avec un rendement de (77,5%).

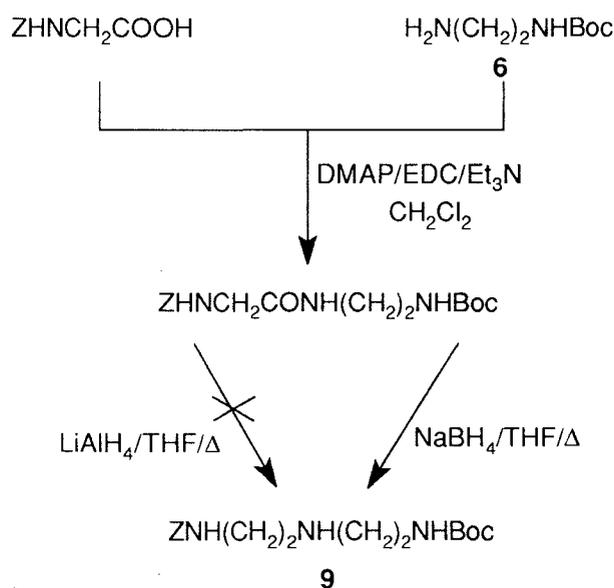


Figure 37 : Synthèse du dérivé **9** selon le protocole décrit par Sundaramoorthi et coll., (1984).

Le dérivé **9** est accessible par réduction de la fonction CO de l'amide intermédiaire. Nous avons effectué quelques essais de réduction par  $\text{LiAlH}_4$  dans le THF selon un protocole décrit par Israel et coll., (1973) qui préconise l'utilisation de 2 équivalents de  $\text{LiAlH}_4$  par mole d'amide à réduire. Nous avons utilisé jusqu'à 4 équivalents et chauffé à reflux dans le THF durant 48h sans succès. La réduction par  $\text{NaBH}_4/\text{TFA}$  dans le THF (Sundaramoorthi et coll., 1984) donne des produits secondaires en quantités importantes, et ne permet d'isoler que 10% du dérivé **9** pur sous forme de chlorhydrate précipité par  $\text{CH}_3\text{CN}$  et recristallisé dans  $\text{AcOEt}$ . alors que l'auteur annonce 65% de rendement en produit isolé après purification sur colonne de silice. Devant ces résultats, nous avons abandonné cette voie de synthèse.

Les amines secondaires des composés **9** et **10** ont été protégées dans des conditions classiques (Levchine et coll., 1994) par des groupements Boc ( $n = 2$ ) et Z ( $n = 3$ ) pour donner les dérivés **11** et **12** avec des rendements de 95,5% et 89% respectivement (fig 38). Ces protections ont été effectuées dans le but d'éviter toute réaction secondaire lors de la condensation sur le leucodérivé, en particulier la cyclisation (cf II-4-1-2) puisque ces chaînes sont des dérivés monosubstituées de l'éthylènediamine.

L'élimination du groupement Z du dérivé **11** s'effectue sans problème par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon dans  $\text{EtOH}$ . L'amine **13** est obtenue pure après recristallisation dans l'hexane. L'acidolyse en milieu  $\text{HCl}/\text{EtOH}$  du dérivé **12** permet l'obtention de l'amine **14** qui précipite dans le milieu réactionnel. La condensation des amines **6**, **13** et **14** sur le leucodérivé 2,3-dihydro-1,4,5,8-tétrahydroxyanthracène-9,10-dione a été réalisée selon la méthode décrite par Greenhalgh et Hughes (1968). Les composés **15**, **16** et **17** obtenus sont traités par le TFA,  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{HBr}$  et  $\text{HCl}/\text{MeOH}$  respectivement afin de libérer leur fonctions amines.

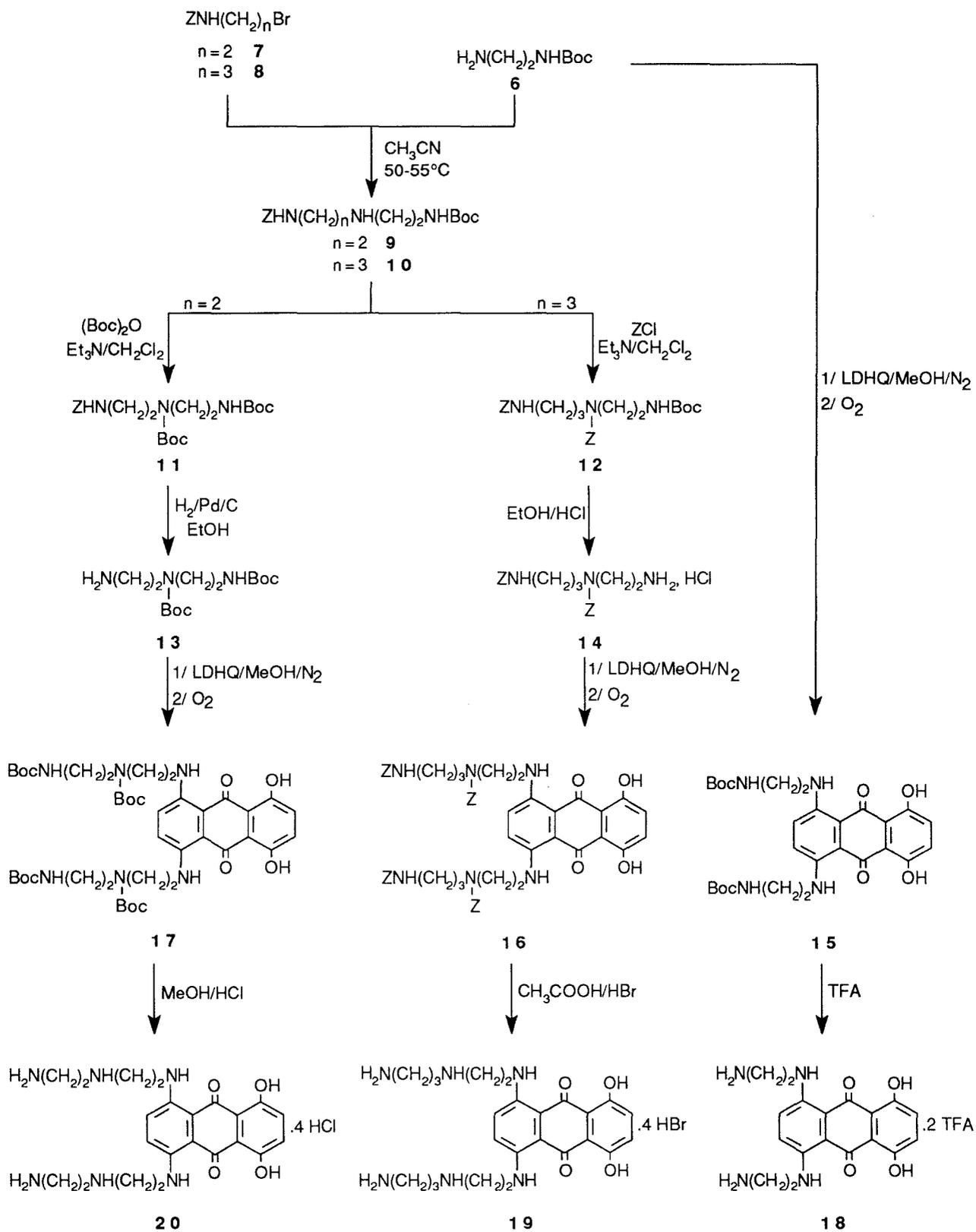


Figure 38 : Synthèse des dérivés **18**, **19** et **20**.

## II-4-2 Interaction avec l'ADN

Les molécules hybrides ont été synthétisées dans le but d'étudier l'influence de la longueur et de la nature des chaînes latérales sur l'affinité et la sélectivité de la mitoxantrone et des anthraquinones en général. Le mode d'interaction de ces composés avec l'ADN a été appréhendé en utilisant la technique de viscosimétrie, leur spécificité de liaison en utilisant la technique du "footprinting". Ces deux études ont été réalisées par le Dr Christian BAILLY (INSERM, U124 Lille).

### II-4-2-1 Mode d'interaction avec l'ADN

L'intercalation d'une substance dans l'ADN se traduit par une élongation ; les mesures de viscosité d'une solution d'ADN en présence de produit à tester constituent une méthode efficace pour mettre en évidence l'intercalation. L'élongation est calculée en utilisant l'équation de COHEN et EISENBERG (1966, 1969) et en faisant l'approximation suivante : la viscosité intrinsèque est identique à la viscosité réduite. Les valeurs de temps d'écoulement sont directement transformées en longueurs apparentes selon l'expression :

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

$L_0$  : longueur de l'ADN libre.

$L$  : longueur de l'ADN + produit.

$t_0$  : temps d'écoulement du tampon.

$t_C$  : temps d'écoulement de l'ADN + produit.

$t_D$  : temps d'écoulement de l'ADN libre.

$r$  : nombre de moles de ligand liées par mole de paire de bases.

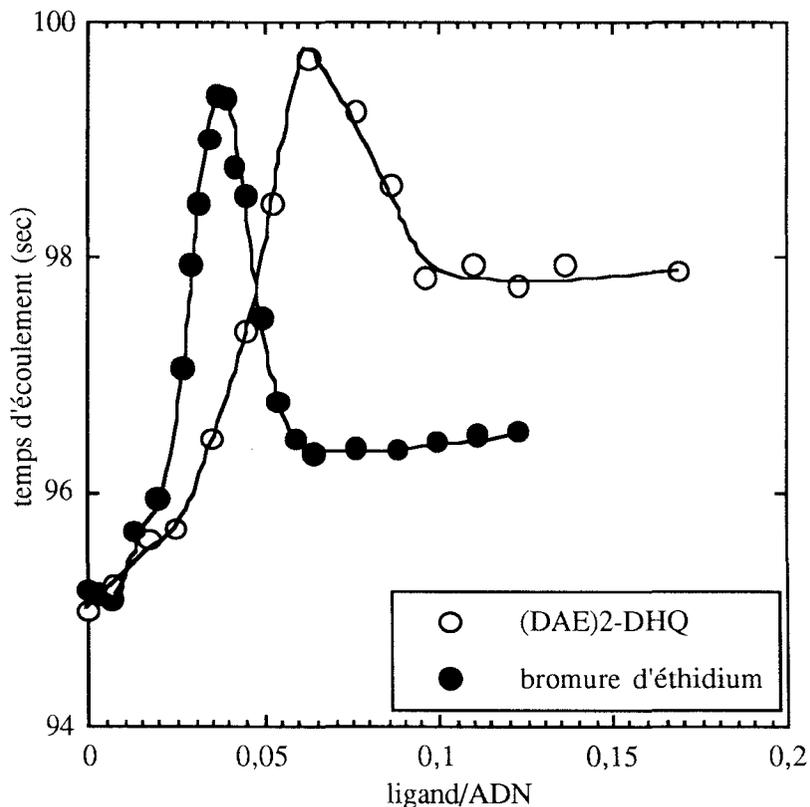
La variable utilisée est en fait  $r = [\text{produit étudié}]/[\text{ADN}]$  c'est-à-dire : nombre de moles de ligand liées par mole de paires de bases de l'ADN. Un graphe représentant  $L/L_0$  en fonction du nombre de moles de ligand liées ( $r$ ) donne une pente de 1 pour un mono-intercalant alors que la pente est de 2 pour un bis-intercalant.

L'allongement par intercalation sur une hélice d'ADN superenroulée provoque sa détorsion. En effet, par addition du ligand, l'hélice superenroulée droite se détord jusqu'à ce que l'ADN soit totalement relâché. Si l'on continue à ajouter le ligand, il y a inévitablement inversion du superenroulement avec formation d'une hélice

superenroulée gauche. L'angle de détorsion est mesuré à partir de l'inversion du sens d'enroulement. Sa valeur exacte est déterminée en utilisant un composé de référence, en l'occurrence le bromure d'éthidium, intercalant puissant, dont on connaît l'angle de détorsion ( $26^\circ$ ; Wang, 1974) et l'équation (1):  $r_{eq}$  est déterminé graphiquement en traçant  $\eta/\eta_0$  en fonction de  $r$  ( $\eta$  : viscosité de la solution d'ADN + produit ;  $\eta_0$  : viscosité de l'ADN seul) :

$$r_{eq}(\text{BrEth}) \times \phi = r_{eq}(\text{produit}) \times \phi' \quad (\text{équation 1})$$

Le changement dans la superhélicité de l'ADN superenroulé (ici le plasmide pBR322), conséquence logique de la liaison des molécules **18**, **19** et **20** possédant le noyau anthraquinonique plan potentiellement intercalant, est suivi par la variation de la viscosité des complexes **18**, **19** ou **20**/ADN pour des quantités croissantes de ligands ajoutées. La courbe (fig 39) reflète les changements du super-enroulement qui résultent de la détorsion subie par la double hélice et causée par sa liaison avec l'hybride **18** appelé aussi (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (les mêmes courbes sont obtenues pour les composés **19** et **20**). Les angles de détorsion obtenus sont de  $16^\circ$ . Cette valeur est proche de celle décrite pour la mitoxantrone ( $17^\circ 5'$ ) (Lown et coll., 1985).



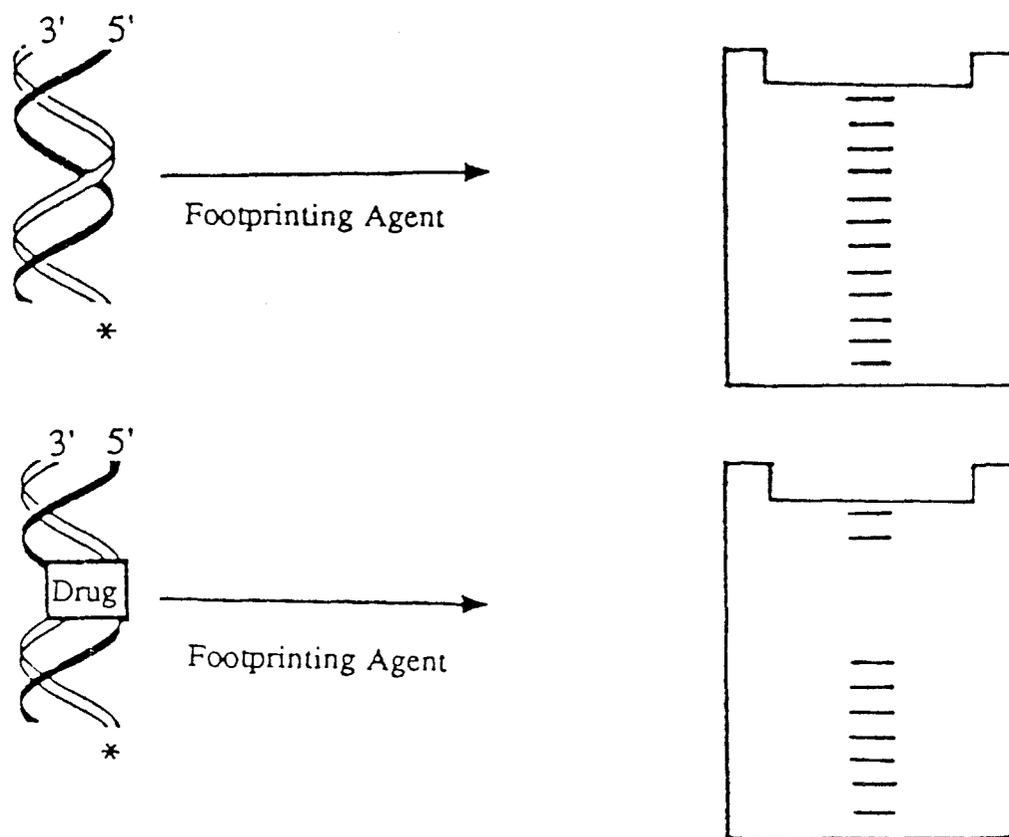
**Figure 39** : Courbes de titration de la viscosité de l'ADN circulaire superenroulé avec (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**) et le bromure d'éthidium. La concentration en ADN est de  $250\mu\text{M}$ . Les mesures sont réalisées à  $25^\circ\text{C}$  dans le tampon Tris  $10\text{ mM}$ , NaCl  $10\text{ mM}$ , pH7.

Selon ces résultats, il est clair que les composés **18**, **19** et **20** s'intercalent de manière correcte entre les plateaux de paires de bases de l'ADN. L'intercalation n'est donc pas perturbée par le remplacement des chaînes aminoéthanol de la mitoxantrone par un hydrogène ou par des bras comportant un centre basique supplémentaire.

#### II-4-2-2 Sélectivité de liaison

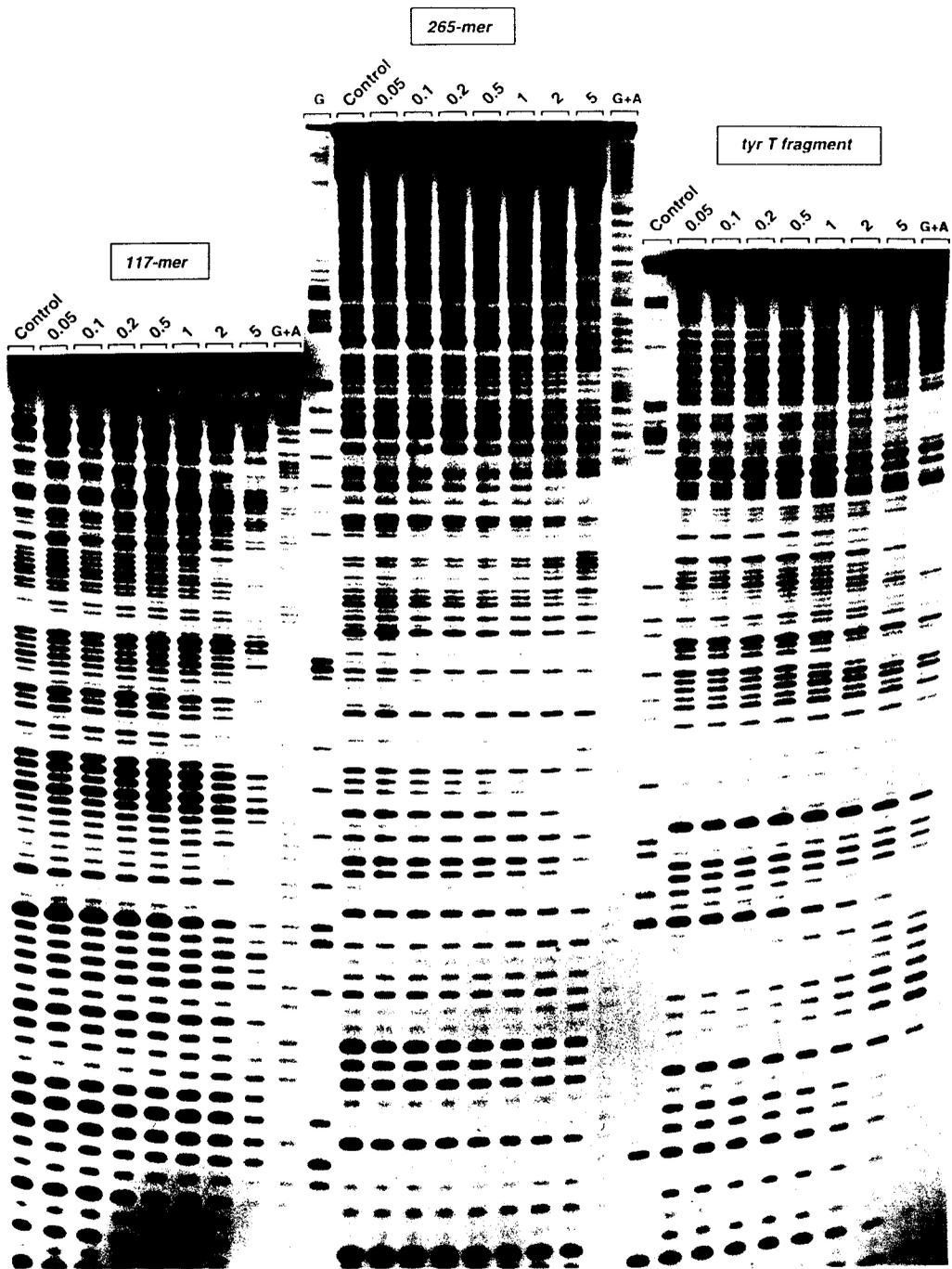
Le "footprinting" ou "technique des empreintes" est une technique très fine utilisée pour l'analyse de la spécificité de séquences des protéines et de composés qui se lient à l'ADN de façon réversible (Portugal, 1989). Actuellement, on dispose d'endonucléases de restriction et de techniques qui permettent l'isolement de fragments d'ADN ; ces fragments ont un nombre suffisamment grand de paires de bases ou de combinaisons de paires de bases pour être représentatifs de tous les sites possibles de liaisons à l'ADN de petites molécules. Des techniques enzymatiques permettent de marquer (au phosphore 32 le plus souvent) l'une des extrémités de l'un des brins (en 5' par une kinase, en 3' par la polymérase de Kleenow ou la reverse transcriptase) de fragments d'ADN.

Les agents utilisés en "footprinting" sont de type enzymatique (DNAase I, DNAase II ou Nucléase Micrococcale) ou chimique (radicaux hydroxyles générés par divers types de complexes métalliques) et coupent, dans certaines conditions opératoires, statistiquement l'ADN double brin au niveau de chacune des bases. Après incubation avec la molécule testée et coupure du fragment de restriction marqué radioactivement, l'ensemble des fragments de coupure ainsi générés qui ne diffèrent en longueur que d'une paire de base sont séparés en gel dénaturant de polyacrylamide (Maxam et Gilbert, 1977). Ainsi, une molécule liée spécifiquement à un site défini de l'ADN protège cet ADN de la coupure en masquant les paires de base de ce site. Ceci apparaît sur l'autoradiogramme (reflet du gel d'électrophorèse) sous forme d'un trou ou d'une empreinte (d'où le nom de cette technique) dans l'échelle des fragments d'ADN (fig 40).

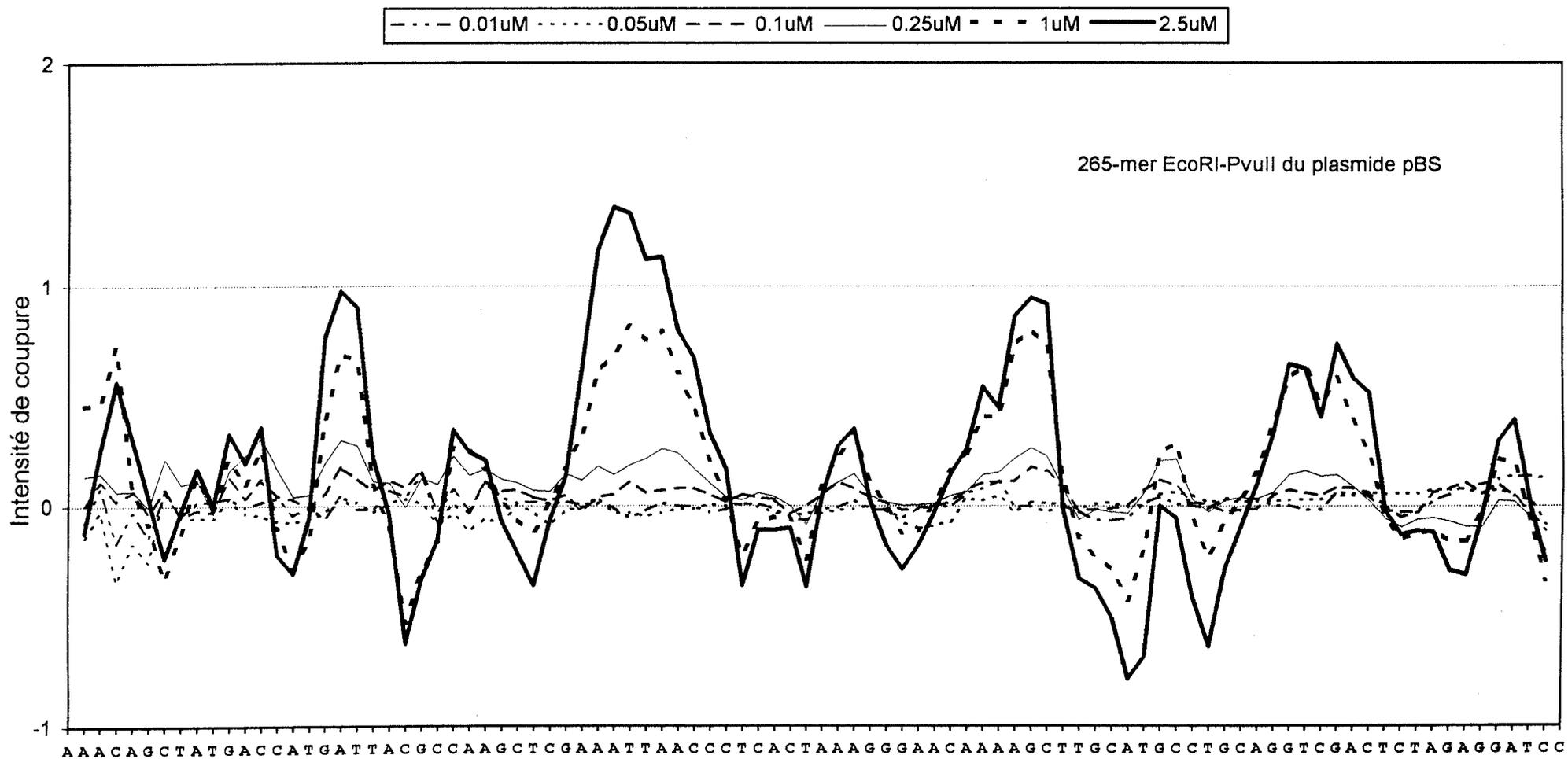


**Figure 40 :** Principe de la technique du "footprinting".

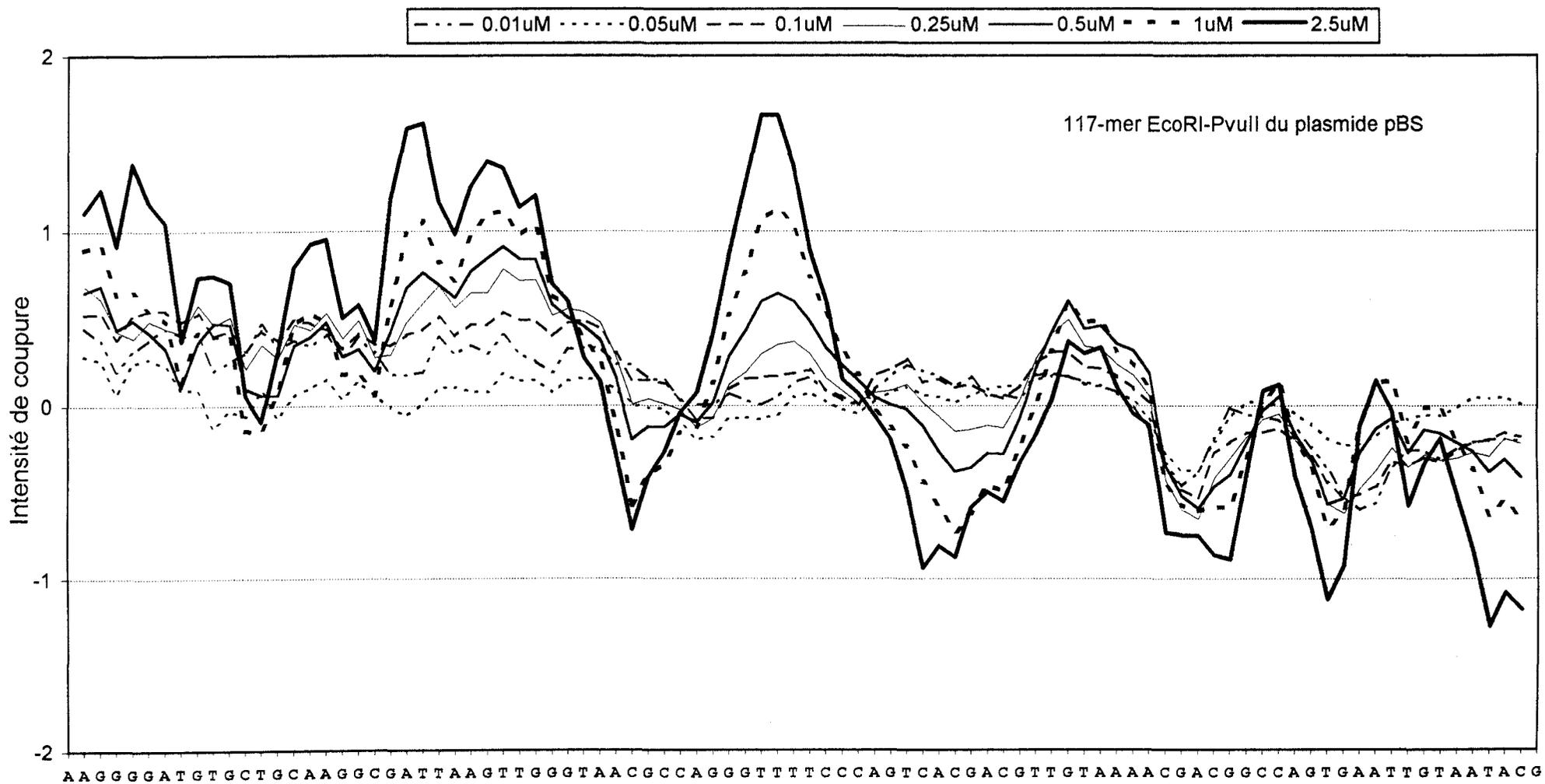
La séquence du site de protection est déterminée par référence à des marqueurs (généralement en révélant les guanines au diméthylsulfate). La sélectivité de liaison des molécules hybrides **18**, **19** et **20** a été étudiée par le "footprinting" à l'aide de la DNAase I comme agent de coupure. Ces études ont été effectuées sur trois fragments différents : les fragments 117 et 265 -mer *EcoRI-PvuII* du plasmide pBS et le fragment *tyr T* de *E. Coli* (160-mer). Les autoradiogrammes obtenus pour (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**) sont présentés figure 41. Les figures 42, 43 et 44 montrent les analyses densitométriques de la coupure par la DNAase I des trois fragments en présence de concentrations croissantes de ligand. Le tableau 1 résume les séquences protégées de la coupure enzymatique et celles rendues plus accessibles à celle-ci. Il est à noter que les mêmes résultats ont été obtenus pour les deux autres hybrides **19** et **20**.



**Figure 41 :** Footprinting à la DNAase I avec les fragments 265 et 117-mer EcoRI-PvuII du plasmide pBS et le fragment *tyr T* (160-mer) en présence de différentes concentrations de  $(DAE)_2$ -DHQ (**18**). Les concentrations en  $\mu\text{M}$  du ligand sont indiquées en haut de chaque ligne du gel. Les lignes marquées "G+A" et "G" représentent les marqueurs de séquençage Maxam-Gilbert spécifiques des résidus purine et guanine respectivement.



**Figure 42 :** Footprinting à la DNAase I du fragment 265-mer *EcoRI-PvuII* du plasmide pBS en présence de concentrations croissantes du ligand (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**). Les zones d'intensité de coupure négative correspondent aux sites de liaison de la molécule et les zones d'intensité positive à ceux rendus plus accessibles à l'attaque enzymatique.



**Figure 43 :** Footprinting à la DNAase I du fragment 117-mer *EcoRI-PvuII* du plasmide pBS en présence de concentrations croissantes du ligand (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**).

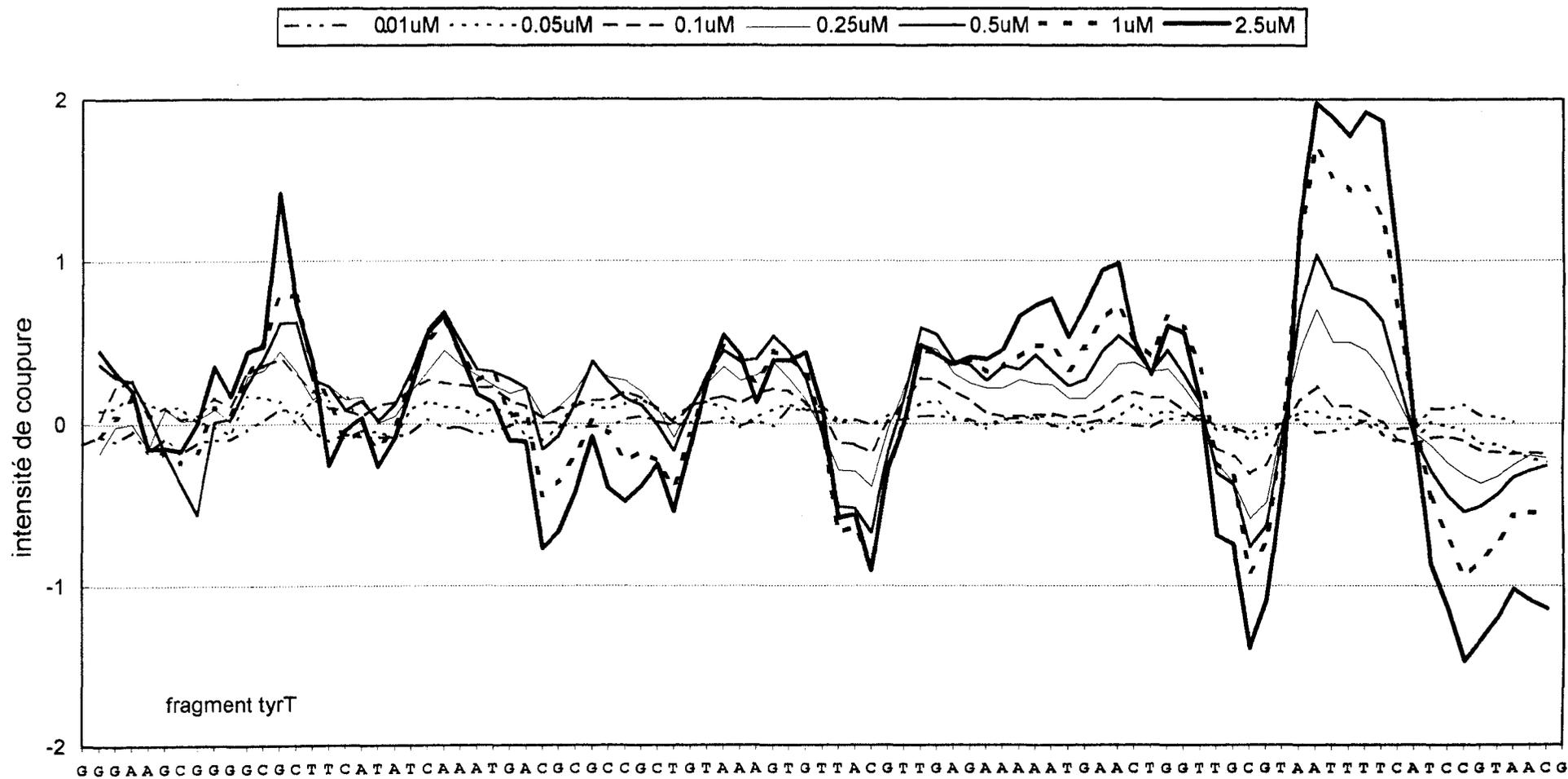


Figure 44 : Footprinting à la DNAase I du fragment *tyr T* de *E. Coli* (160-mer) en présence de concentrations croissantes du ligand (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**).

Fragments	Séquences protégées	séquences non protégées
117-mer	ACGCC GTCACGACG CGACGG AGTGA AATACG	CGATTAAGTTGGG GGGTTTTTC TGTA
265-mer	CCAT ACGC AGCTC CTCACTA TGCAT CTGC	CAG GATT AAATTAAACCC AAGCT AGGTCGACT
<i>tyr T</i> 160-mer	ACGC GCCGCTG TTACGT TGCGT TCCGTAACG	CGCT AAAAA GAAC AATTTTC

**Tableau 1 :** Séquences protégées et non protégées induites par (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**) sur les trois fragments étudiées à une concentration de 2,5 µM.

L'analyse globale des coupures différentielles indique que les sites protégés sont en général des séquences alternées AT et GC, alors que les sites rendus accessibles à l'attaque enzymatique par la DNAase I sont souvent des séquences homopolymériques. Toutes ces séquences protégées sont riches en paires de bases cytosine-guanine. Ainsi, comme la mitoxantrone (Krishnamoorthy et coll., 1986), les dérivés étudiés s'intercalent entre les plateaux de paires de bases avec une préférence pour les séquences alternées en particulier celles riches en enchaînements cytosine-guanine. La taille des séquences varie de quatre à neuf paires de bases (fragments *Tyr T* et 117-mer). Une étude similaire réalisée avec la daunomycine indique des tailles de séquences allant de quatre à quatorze paires de bases (Chaires et coll., 1987).

Des cinq séquences protégées sur le fragment 117-mer, 80% (4/5) contiennent des séquences 5'-CG ; les 20% (1/5) restants des séquences 5'-CA (ou 5'-TG sur le brin complémentaire). Pour le fragment 265-mer, 16,6% (1/6) des séquences contiennent des bases 5'-CG, les cinq autres, sauf une, des bases 5'-CA (4/5 ; 66,6%).

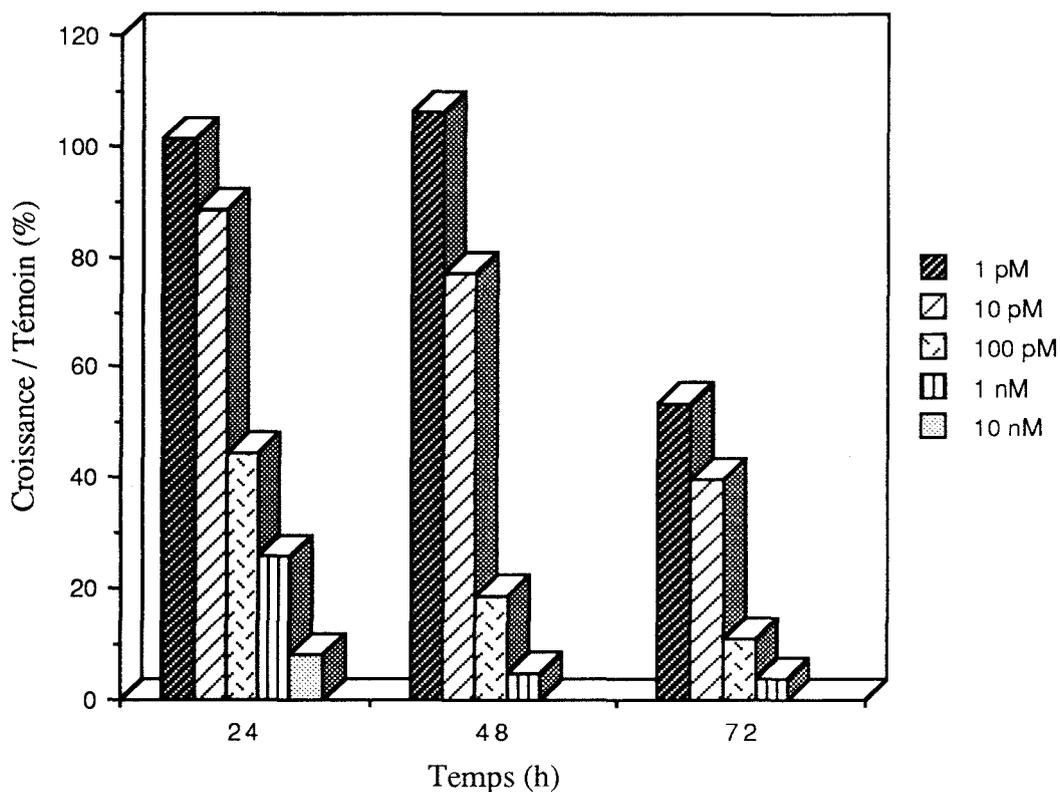
Enfin, pour le fragment *tyr T* 100% des séquences protégées contiennent des bases 5'-CG. Par conséquent, les trois composés ont une préférence, comme la mitoxantrone, pour les oligomères ayant des séquences pyrimidine(5'-3')purine (Lown et Hanstock, 1985 ; Chen et coll., 1986 ; Fox et coll., 1986). Des essais d'inhibition de la transcription *in vitro* en présence de la mitoxantrone ont montré que les blocages se faisaient de façon dominante sur les séquences 5'-CA (64%) et à moindre degré sur les séquences 5'-CG (29%). Globalement, 93% des sites bloqués ont des séquences pyrimidine(5'-3')purine (Panousis et Phillips, 1994).

Une analyse plus fine des séquences entourant les doublets CA et CG contenus dans les différentes séquences, révèle que ces doublets sont entourés dans leur majorité par des résidus adénine ou thymine. De plus, dans ces séquences les triplets contenant des bases CG peuvent exister en une ou plusieurs copies. Un résultat similaire a été rapporté pour la daunomycine. En effet, l'étude par la technique du "footprinting" à la DNAase I de la spécificité de liaison de la daunomycine, utilisant le fragment *Tyr T* (160-mer), a montré que les séquences protégées étaient riches en résidus GC entourés de résidus adénine ou thymine, ces résidus pouvant apparaître une ou plusieurs fois dans la même séquence (Chaires et coll., 1987, 1990). Le site préférentiel de liaison de la daunomycine est un triplet 5'(A/T)-GC ou 5'(A/T)-CG (Chaires et coll., 1990). Pour la mitoxantrone (Panousis et Phillips, 1994) et les dérivés (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**), **19** et **20**, il s'agit de triplets 5'(A/T)-CA ou 5'(A/T)-CG.

Ainsi, la spécificité de liaison de la mitoxantrone n'est pas altérée par le remplacement des chaînes aminoéthanol par un hydrogène ou par des chaînes contenant de nouveaux centres basiques.

### II-4-3 Activité biologique

La cytotoxicité des composés (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**), **19** et **20** a été évaluée par la détermination de l'activité antiproliférative *in vitro* sur des cellules leucémiques L1210 de souris et sur des cellules de tumeur mammaire MCF7. Ce travail a été réalisé par le Dr Nicole POMMERY dans le laboratoire de Toxicologie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille II. Les résultats sont rapportés sur les histogrammes d'inhibition de croissance et de dose-survie (fig 45 à 50).



**Figure 45 :** Histogramme d'inhibition de croissance des cellules MCF7 en présence de concentrations variables de (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**).

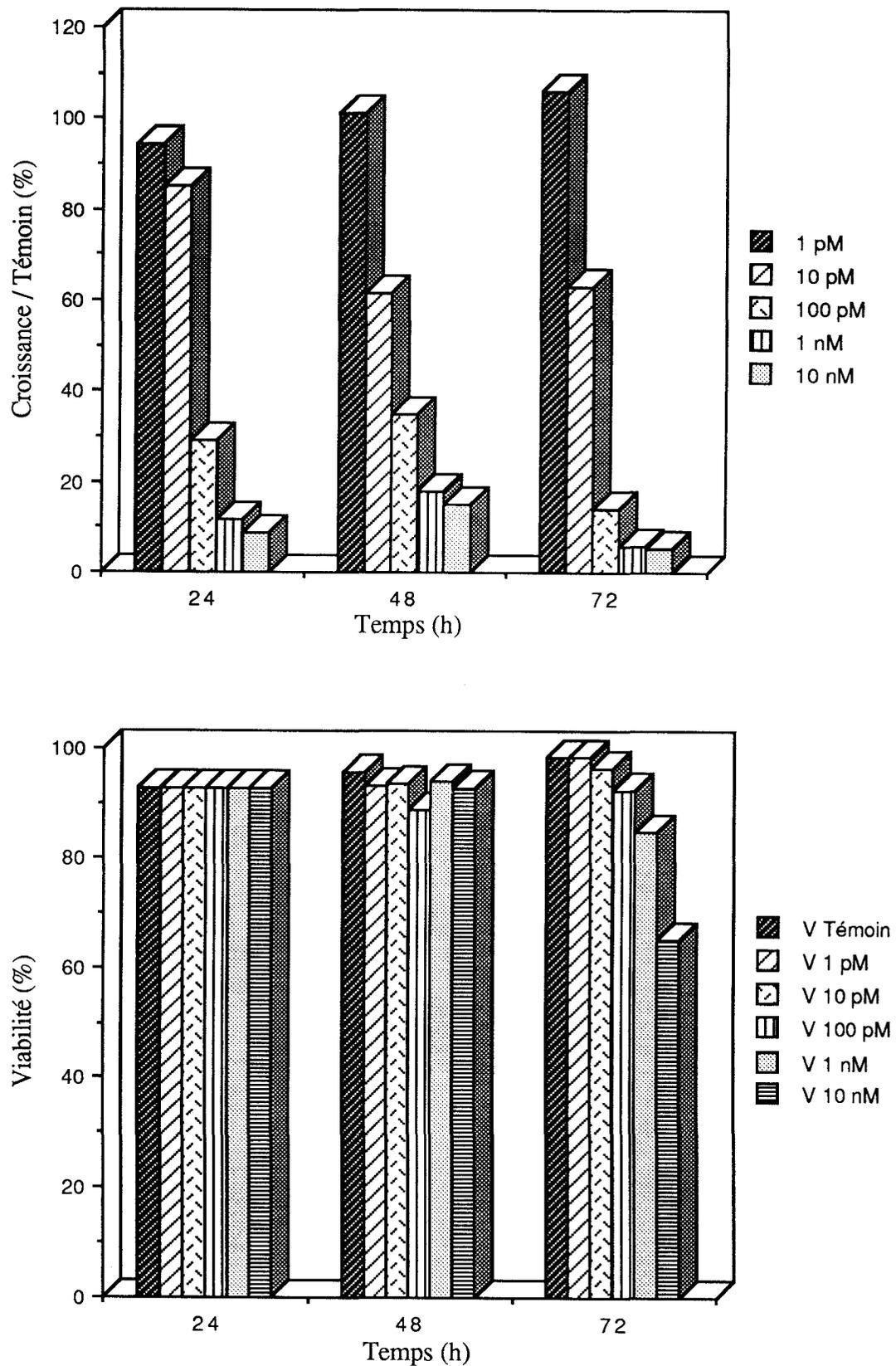


Figure 46 : Histogrammes d'inhibition de croissance et de dose-survie des cellules L1210 traitées par des concentrations variables de (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (18).

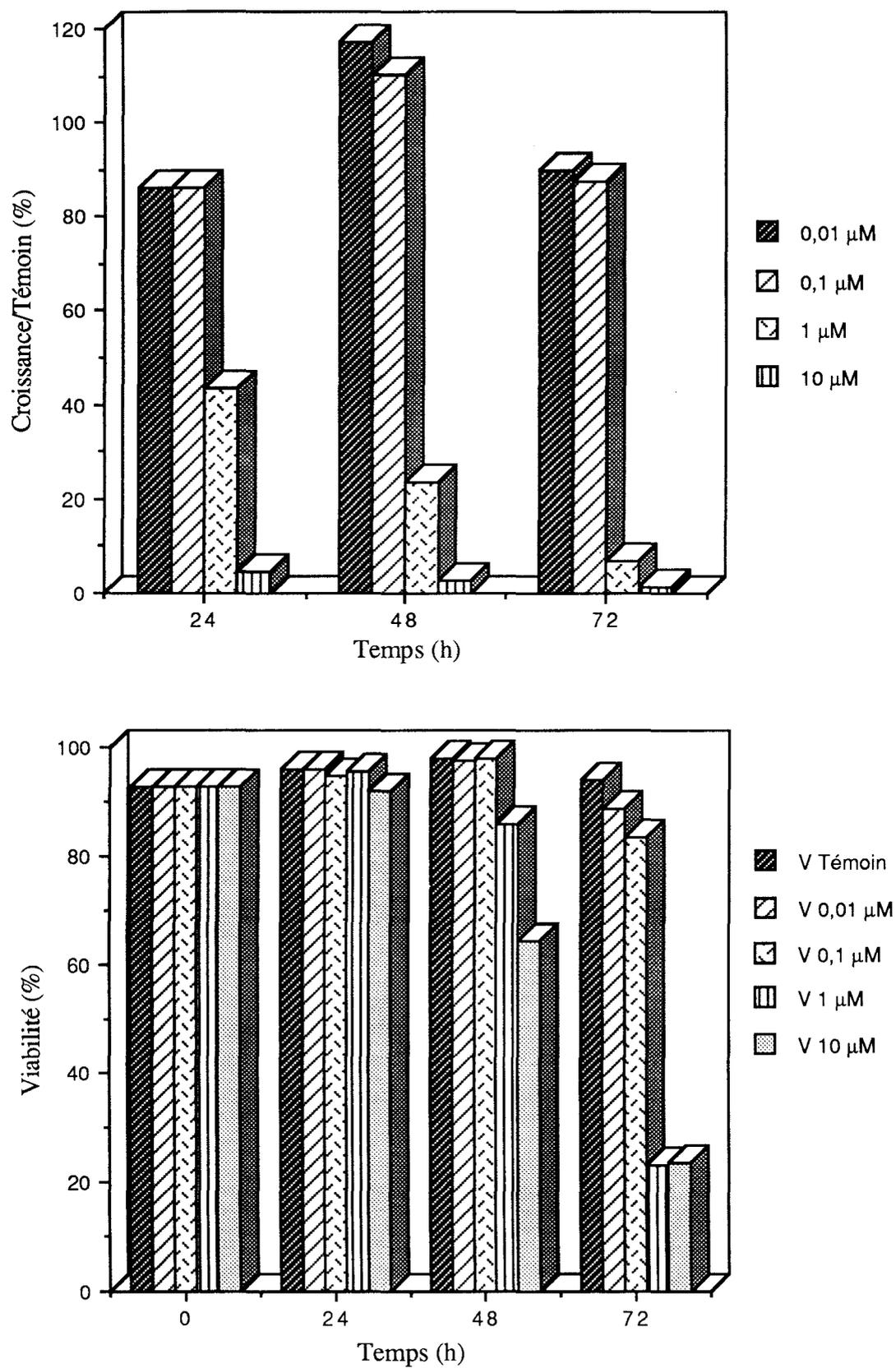


Figure 47 : Histogrammes d'inhibition de croissance et de dose-survie des cellules L1210 par le composé **19**.

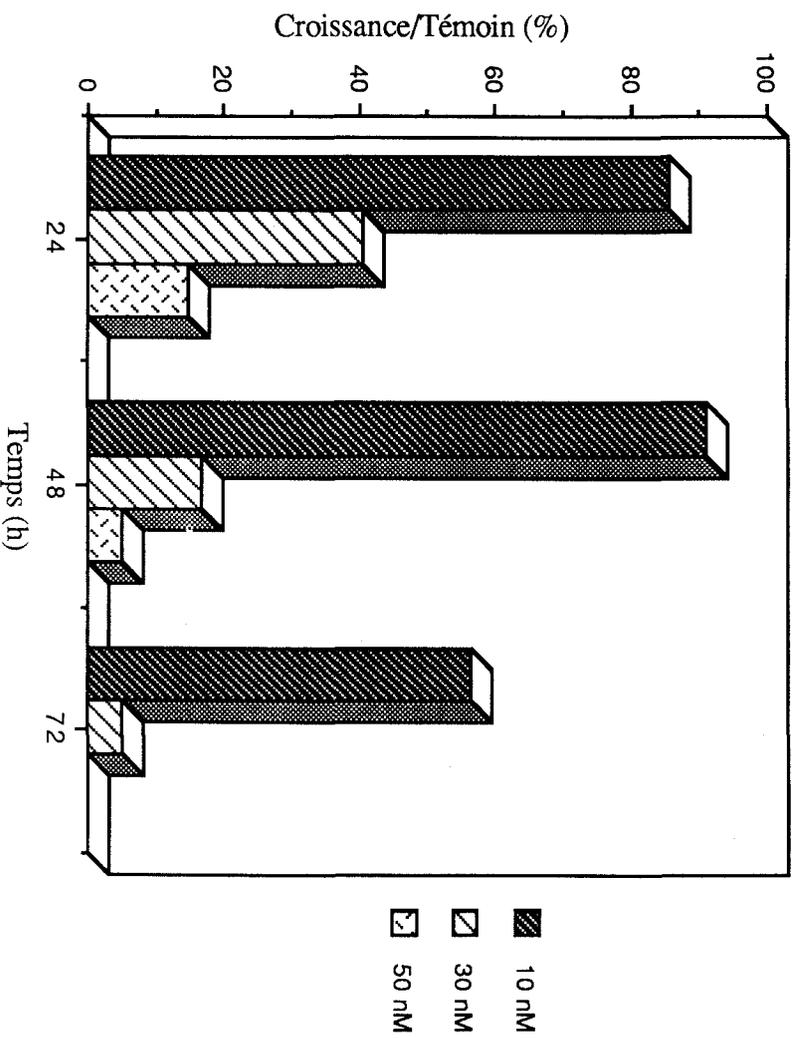


Figure 48 : Inhibition de croissance des cellules MCF7 en présence de concentrations variables du composé **19**.

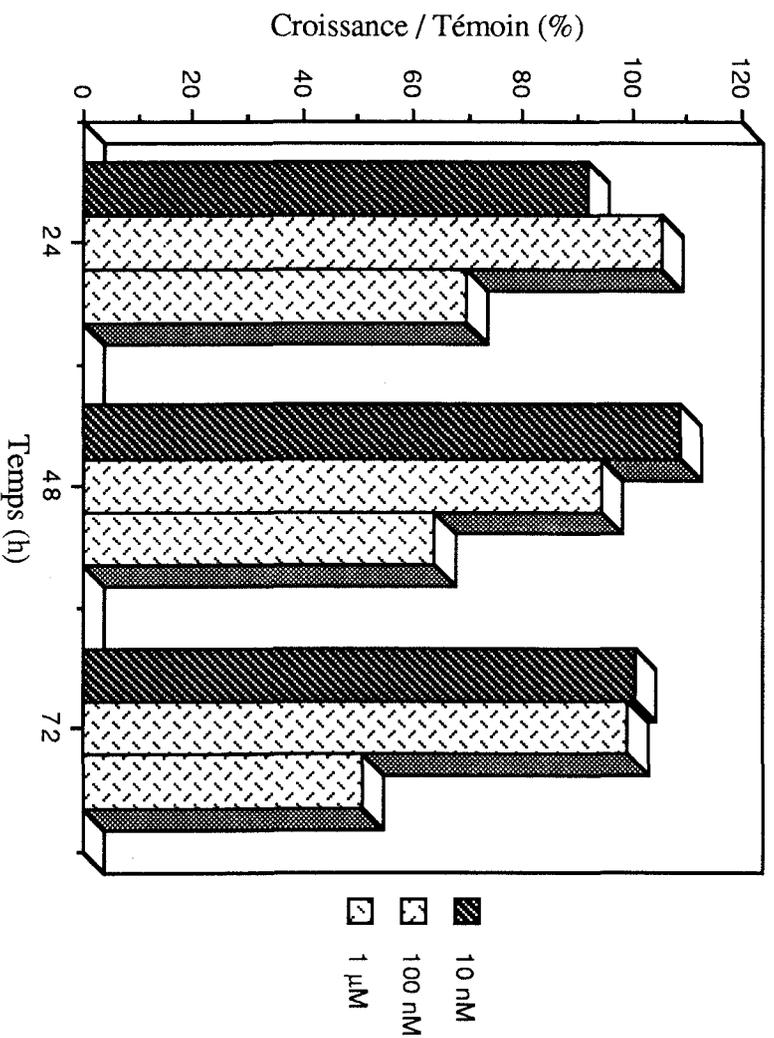


Figure 49 : Inhibition de croissance des cellules leucémiques L1210 en présence de concentrations variables du composé **20**.

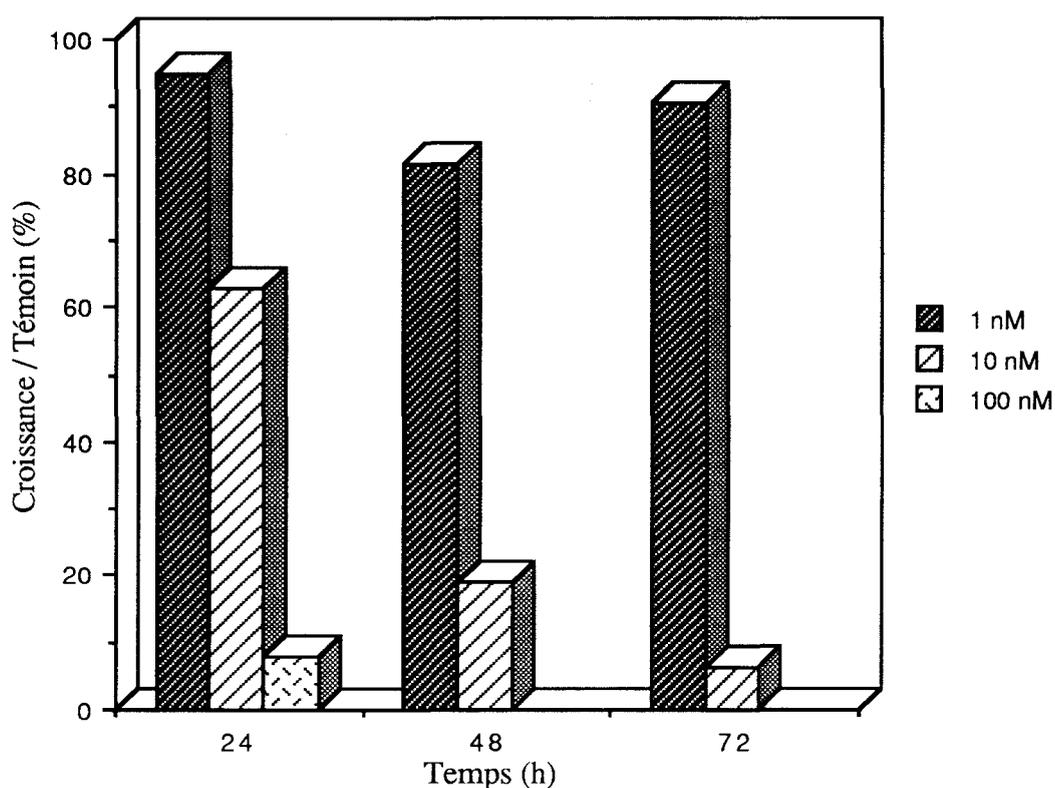


Figure 50 : Inhibition de croissance des cellules MCF7 par le composé **20** présent en concentrations variables.

Les trois composés possèdent une activité antitumorale et antileucémique sur les lignées MCF7 et L1210. Les valeurs des  $CI_{50}$  (concentration en produit nécessaire pour inhiber de 50% la croissance du témoin) sont regroupées dans le tableau 2 en comparaison avec celles obtenues pour la mitoxantrone.

	L1210	MCF7
mitoxantrone (DHAQ)	$7 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-7}$
(DAE) <sub>2</sub> -DHQ ( <b>18</b> )	$1,5 \cdot 10^{-11}$	$2 \cdot 10^{-12}$
<b>19</b>	$5,1 \cdot 10^{-7}$	$1,8 \cdot 10^{-8}$
<b>20</b>	$1 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-9}$

Tableau 2 : Valeurs des  $CI_{50}$  induites par les différents composés vis-à-vis des deux lignées cellulaires L1210 et MCF7.

L'activité cytotoxique diminue considérablement en passant du dérivé (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**) vers le dérivé **19** puis vers le **20**. Ainsi, la cytotoxicité *in vitro* de ces

composés est très sensible à l'adjonction d'un centre basique et à moindre degré à la distance qui le sépare de celui déjà existant. La même corrélation a été rapportée pour des dérivés monosubstitués et non hydroxylés possédant les mêmes chaînes que nos dérivés quant à leur activité d'inhibition de croissance vis-à-vis des cellules leucémique P388 (Katzhendler et coll., 1989). Il est à noter que les  $CI_{50}$  décrites sont de l'ordre du  $\mu\text{M}$ , ce qui confirme l'importance de la disubstitution en 1,4 et de la présence des groupements OH en 5,8 pour l'activité. Le dérivé (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**) est plus actif que la mitoxantrone *in vitro* vis-à-vis des deux lignées cellulaires. Au contraire, des études de l'activité biologique *in vivo* montrent que la mitoxantrone est plus active que (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**) vis-à-vis de la leucémie P388 (Zee Cheng et Cheng, 1978 ; Murdock et coll., 1979). Globalement, les trois dérivés possèdent un pouvoir cytostatique considérable.

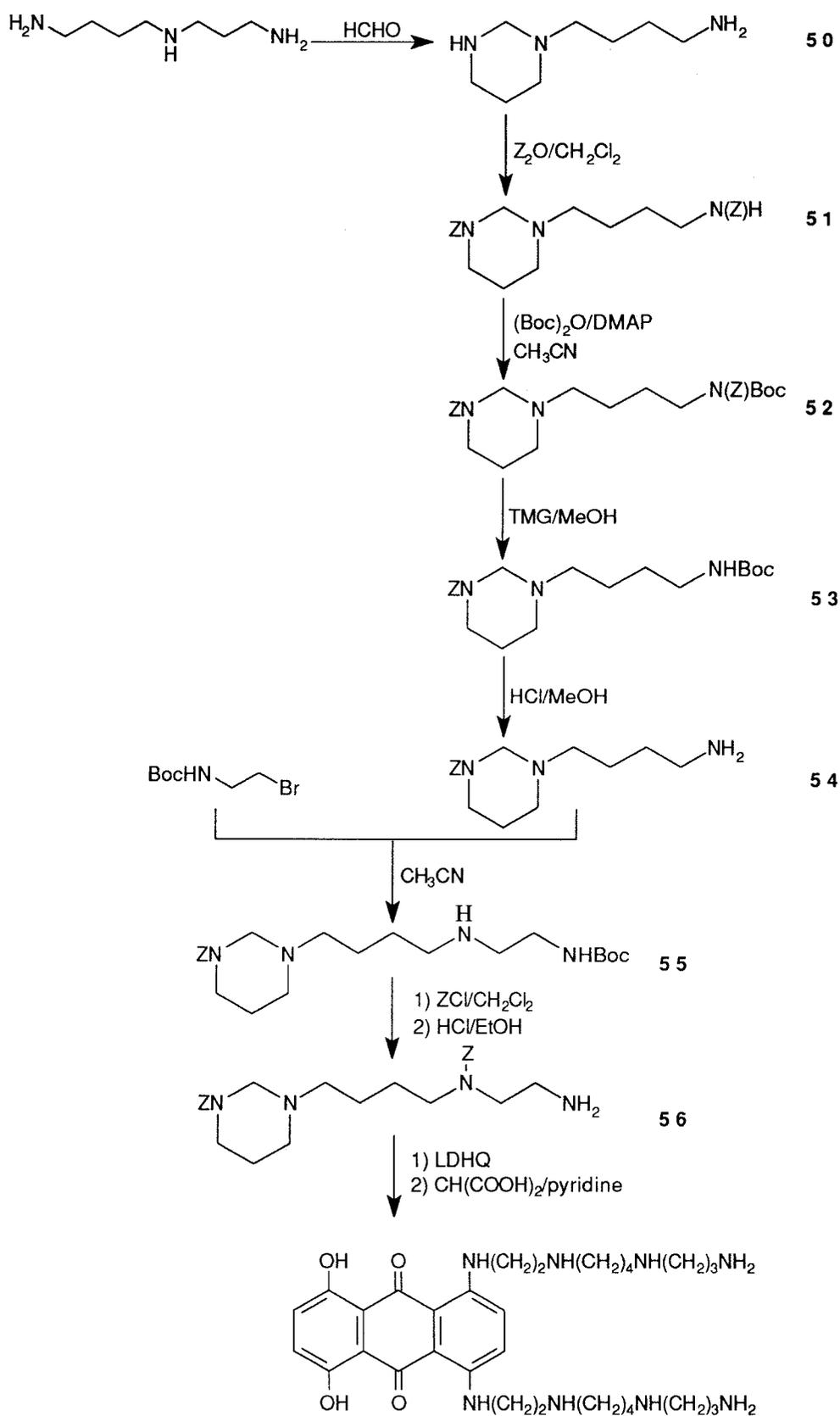
Par ailleurs, les composés étudiés sont moins toxiques que la mitoxantrone comme le montrent les histogrammes de dose-survie. En effet, les viabilités des cellules L1210 après 48 h d'incubation sont de: 100% pour (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**) à 10nM (plus forte concentration utilisée) ; 85% pour le dérivé **19** à 1 $\mu\text{M}$  contre 15% pour la mitoxantrone à 1 $\mu\text{M}$ . Ainsi, les composés (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**), **19** et **20** se caractérisent par un effet cytostatique important et un pouvoir cytotoxique faible.

## Discussion

Le but de cette étude consistait à synthétiser et étudier des hybrides possédant à la fois le noyau anthraquinonique de la mitoxantrone et des chaînes polyaminées (diamine, triamine et tétramine).

La première stratégie de synthèse consistait à greffer l'éthanolamine sur le leucodérivé de l'anthraquinone (Greenhalgh et Hughes, 1968) puis allonger cette chaîne, après son activation par un groupement  $\text{SO}_2\text{CH}_3$ , par adjonction de diamines ou de triamines. Cette voie de synthèse n'a pas donné les résultats escomptés. Ceci nous a conduit à développer une deuxième stratégie dont le principe était de synthétiser les chaînes à part puis les greffer sur le noyau de base. Comme nous l'avons déjà signalé la synthèse de tels composés linéaires et à priori relativement simples se heurte à plusieurs problèmes. En particulier le problème de sélectivité de réaction puisqu'ils présentent simultanément une ou plusieurs fonctions amine primaire ou secondaire. Pour parer à ce problème, nous avons retenu la solution habituelle qui fait appel aux groupements protecteurs. Cette stratégie nous a permis de synthétiser la diamine  $(\text{DAE})_2\text{-DHQ}$  (**18**) et les triamines **19** et **20**.

Afin d'accéder à un hybride ayant des chaînes contenant des résidus spermidine [ $\text{HN}(\text{CH}_2)_2\text{HN}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ], une nouvelle approche est en cours de développement (fig 51). Cette fois-ci la matière première est la spermidine elle même. Cette approche est basée sur l'utilisation du composé  $\text{N}^1, \text{N}^4$ -méthylènespermidine (**50**) facilement accessible par réaction de la spermidine avec le formaldéhyde (Ganem et Chantrapomma, 1983 ; Nagarajan et Ganem, 1985). En effet, les trois fonctions amines de ce composé sont devenues suffisamment différentes, l'une étant primaire, l'autre secondaire et la troisième tertiaire, pour permettre la réalisation de transformations régiosélectives. Les étapes principales résident d'une part, dans la transformation du dérivé **51** ( $\text{N}^1, \text{N}^4$ -méthylène- $\text{N}^1, \text{N}^8$ - $\text{Z}_2$ -spermidine), en utilisant  $(\text{Boc})_2\text{O}$  en présence de DMAP en tant que catalyseur, en dérivé **52** ( $\text{N}^8$ -Boc- $\text{N}^1, \text{N}^4$ -méthylène- $\text{N}^1, \text{N}^8$ - $\text{Z}_2$ -spermidine). D'autre part, dans le clivage sélectif du groupement Z de l'amine primaire qui s'effectue grâce à une méthanolyse catalysée par la tetraméthylguanidine (TMG) pour donner le dérivé **53** ( $\text{N}^8$ -Boc- $\text{N}^1, \text{N}^4$ -méthylène- $\text{N}^1$ -Z-spermidine) (Almeida et coll., 1988). Cependant, les rendements obtenus pour ces quatre étapes sont inférieures à ceux décrits par Almeida et coll., (1988), chacune d'elles nécessitant une purification par chromatographie sur gel de silice.



58

**Figure 51** : Nouvelle approche pour la synthèse d'un dérivé anthraquinone-spermidine.

L'étude de l'intercalation des dérivés (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**) **19** et **20** par la technique de viscosimétrie montre qu'ils se lient à l'ADN par un processus d'intercalation. Les angles de détorsions obtenus sont de 16°. Cette valeur est très proche de celle décrite pour la mitoxantrone 17°5 (Lown et coll., 1985). Pour les anthraquinones disubstituées en position 1,4, 1,5 et 1,8 par des chaînes 1-amino-2-diéthylaminoéthane l'angle de détorsion est de 14°3 (Islam et coll., 1985). Par conséquent, la capacité d'intercalation n'est pas altérée par le remplacement des chaînes aminoéthanol de la mitoxantrone par un hydrogène ou par des chaînes comportant un nouveau centre basique. Il en est de même pour la spécificité de liaison qui a été mise en évidence en réalisant des expériences de "footprinting" à la DNAase I. En effet, les séquences spécifiques d'intercalation sont 5'-(A/T)CG et 5'-(A/T)CA comme pour la mitoxantrone (Panousis et Phillips, 1994).

Au contraire, lors des études de l'activité cytotoxique et cytostatique *in vitro* vis-à-vis de la lignées cellulaires L1210, à l'exception du dérivé (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**), une baisse notable de l'activité cytostatique est observée. Ainsi, les chaînes aminoéthanol jouent un rôle important dans l'activité cytostatique et cytotoxique de la mitoxantrone.

Le dérivé (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**) est plus actif que la mitoxantrone *in vitro* sur les deux lignées cellulaires étudiées contrairement aux études réalisées *in vivo* vis-à-vis de la leucémie P388 (Zee Cheng et Cheng, 1978 ; Murdock et coll., 1979). Son activité sur la topoisomérase II de thymus de veau a été étudiée (par Monsieur Jean-François RIOU de Rhône-Poulenc Rorer) en utilisant un fragment de 4330 paires de bases issu du plasmide pBR322. Les concentrations minimales nécessaires pour induire une coupure de l'ADN avec la topoisomérase II sont de 0,01, 0,1 et 1 µM pour la mitoxantrone et pour les dérivés (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**) et son homologue non hydroxylé en position 5,8 respectivement. Ce résultat confirme d'une part, le mode de liaison par intercalation qui a été mis en évidence par les mesures de viscosimétrie. D'autre part, il montre l'importance des chaînes aminoéthanol et des groupements hydroxyle en 5,8 dans la stabilisation du complexe clivable ligand-enzyme-ADN.

Enfin, cette étude nous a conforté dans notre choix des éléments structuraux des anthraquinones (cf chapitre I). Le dérivé (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**) qui répond à toutes ces exigences (substitution en 1,4 ; groupements OH en position 5,8 ; deux azotes basiques séparés par deux carbone) est le plus actif. Dans les deux chapitres suivants les chaînes peptidiques et pseudopeptidiques seront fixées grâce à une liaison amide sur ce dérivé.

## CHAPITRE III

### *ANTHRAQUINONE-PEPTIDE*

La dégradation de l'ADN constitue un mécanisme important conduisant à la mort cellulaire. Ce mécanisme est utilisé par une large variété d'agents antitumoraux qui interagissent avec la double hélice. La conception de substances susceptibles de dégrader l'ADN suite à une liaison spécifique représente une stratégie intéressante pouvant conduire à des ligands très efficaces. De telles modifications de la structure de l'ADN peuvent être apportées par différents systèmes : alkylants (cis-platine, moutardes à l'azote...), systèmes à groupements photoactivables (flavines...) ou par un système producteur de radicaux libres. Dans ce dernier cas, il s'agit souvent d'un système chélateur de métaux en particulier des peptides.

### III-1 Design de modèles hybrides "peptide chélateur-intercalant"

La bléomycine, antibiotique anticancéreux, est l'une des substances naturelles répondant à ce concept. De nombreux autres composés antitumoraux isolés d'organismes bactériens ou fongiques sont aussi à inclure dans cette catégorie. C'est le cas notamment de la chromomycine, la streptomycine, la néocarzinostatine et la mitomycine. Le mode d'action de ces composés est toujours métal-dépendant et ADN-dépendant.

La bléomycine, en présence de fer et d'oxygène moléculaire est capable de produire de grandes quantités de radicaux libres oxygénés et d'induire des coupures spécifiques au niveau de l'ADN. La recherche d'analogues synthétiques simplifiés fonctionnant selon le même processus que le modèle naturel a amené à concevoir un composé nommé AMPHIS (Hénichart et coll., 1982, 1985a) capable de mimer les fonctions de liaison au métal et d'activation de l'oxygène. Le couplage de cette partie complexant les métaux avec le chromophore intercalant anilinoacridine a conduit à un composé capable de lier et couper l'ADN de façon très significative (Bailly et Hénichart, 1994).

Dès lors, il semblait intéressant pour le design de nouvelles molécules à potentialité anticancéreuse d'associer un noyau polycyclique aromatique pouvant s'insérer dans la double hélice d'ADN et un site de fixation du cuivre en l'occurrence un peptide chélateur :

- les hybrides obtenus devraient posséder une affinité pour l'ADN grâce à la fraction intercalante ;
- la présence du peptide pourrait faciliter la pénétration cellulaire de l'intercalant, stabiliser le complexe ligand/ADN et potentialiser son action antitumorale ;

□ l'intercalant amènerait à proximité de l'ADN un système chélateur producteur de radicaux libres capables de le dégrader et d'induire ainsi une action cytotoxique.

L'un des premiers modèles hybrides réalisés au laboratoire a été celui de Morier-Teissier (1989) où le tripeptide Gly-His-Lys (GHK) a été lié de façon covalente au chromophore N-(p-anilino)-9-aminoacridine (GHK-anilinoacridine) (fig 52), fraction intercalante de l'amsacrine avec un résidu glycyle qui sert de connecteur entre le peptide et l'acridine. Gly-His-Lys est un peptide isolé du plasma sous forme de complexe cuivrique (à la concentration importante de 200 mg/ml). Ce peptide constitue un facteur de croissance pour différentes cellules (Pickart et Thaler, 1973 ; Pickart et coll., 1973, 1980 ; Pickart et Lovejoy, 1987). Il est donc biologiquement stable sous forme complexée. Le résidu lysyle devrait intensifier la liaison à l'ADN car il est susceptible d'engager une liaison saline avec un groupement phosphate de l'ADN (Karup et coll., 1988).

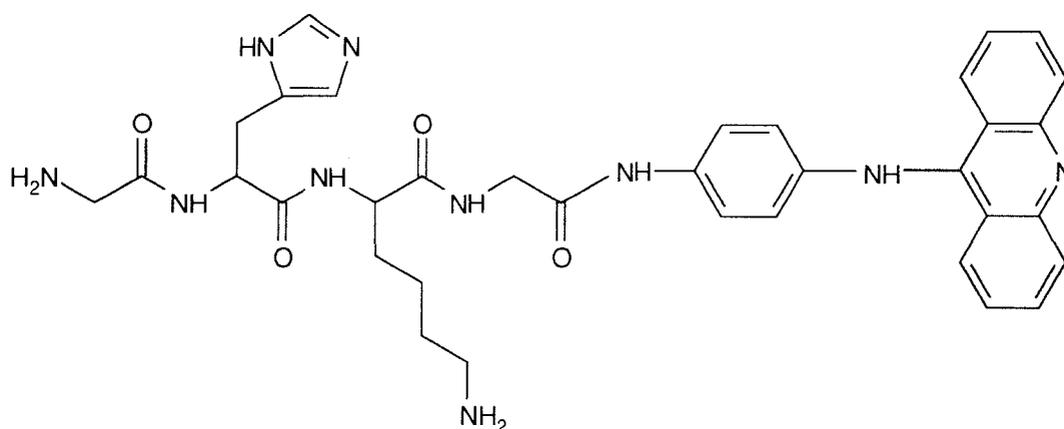


Figure 52 : Structure de l'hybride GHK-anilinoacridine.

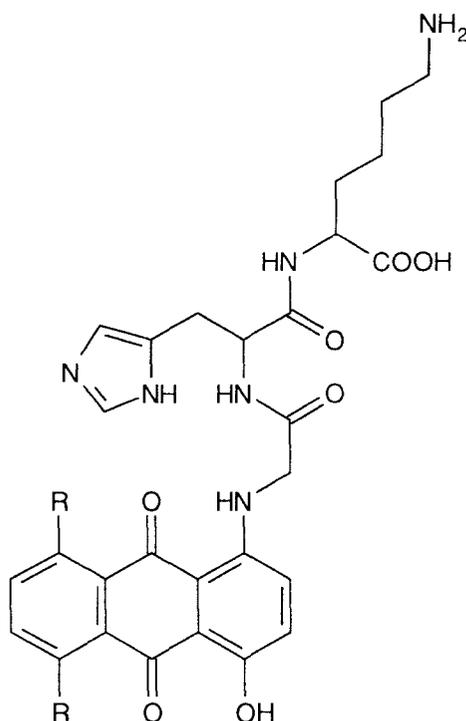
L'hybride synthétisé se lie à l'ADN par un processus intercalatif rigoureusement défini par dichroïsme linéaire. La production de radicaux libres oxygénés a été mise en évidence par spin-trapping. Les propriétés antitumorales de ce produit sont satisfaisantes et semblent correspondre à sa capacité à inhiber la synthèse d'ADN *in vitro* (Morier-Teissier et coll., 1989). Au vu de ces résultats, il semble que les propriétés antitumorales de tels composés dépendent de leur capacité à se lier à l'ADN et des mécanismes d'oxydoréduction nécessitant des interactions entre ces ligands, les métaux et l'oxygène moléculaire. Ce dernier phénomène fournit des espèces radicalaires actives capables de dégrader l'ADN. Cette première approche du concept "peptide chélateur-intercalant" par le peptide Gly-His-Lys est positive et a incité à poursuivre ce travail en choisissant un nouveau chromophore intercalant.

## III-2 Le modèle (Gly-His-Lys)-anthraquinone

### III-2-1 Structure et synthèse

La suite du travail effectué au laboratoire a consisté à synthétiser et étudier des hybrides associant le noyau polycyclique anthraquinonique de la mitoxantrone potentiellement intercalant et le peptide chélateur Gly-His-Lys (GHK) destiné à améliorer la disponibilité du cuivre ; sa proximité peut catalyser la bioactivation des quinones et favoriser la production des radicaux libres par le biais de la réaction de Fenton (Morier-Teissier et coll., 1990).

L'hybride 4,5,8-trihydroxy-1-(Gly-His-Lys)-9,10 anthracènedione (DHQ-GHK, fig 53) et son homologue 5-hydroxy-1-(Gly-His-Lys)-9,10 anthracènedione (Q-GHK, fig 53), dépourvu de groupements hydroxyle en 5 et 8, ont été préparés selon la méthode décrite par Greenhalgh et Hugues (1968). L'amine utilisée a été la glycine qui, du fait de sa structure, conduit à une monosubstitution. La condensation ultérieure du dipeptide His-(Z)Lys-OBz a conduit après déprotection aux dérivés DHQ-GHK et Q-GHK.



**Figure 53 :** Structure des deux hybrides (Gly-His-Lys)-anthraquinone  
R = OH DHQ-GHK ; R = H Q-GHK.

### III-2-2 Tests d'activité

L'affinité pour l'ADN a été testée en utilisant les techniques de quenching de fluorescence et de dénaturation thermique (Morier-Teissier et coll., 1990). Les valeurs des constantes obtenues, (Q-GHK :  $\Delta T_m = 4^\circ 2$ ,  $Q_{50} = 4 \mu M$  ; DHQ-GHK :  $\Delta T_m = 11^\circ 3$ ,  $Q_{50} = 3 \mu M$ ) (Morier-Teissier et coll., 1990), montrent que l'intensité de liaison augmente avec la présence des fonctions hydroxyle en 5 et 8 et que son ordre de grandeur est celui correspondant à un dérivé monosubstitué qui se lie moins bien qu'un dérivé disubstitué comme l'amétantrone (AQ) ou la mitoxantrone (DHAQ). L'intensité de liaison entre l'ADN et ces produits n'a pu être mesurée car il se produit une précipitation sous forme de filaments.

La formation de complexes cuivriques a été étudiée en résonance paramagnétique électronique (RPE) avec des rapports Cu/P égaux à 0,2. Le spectre obtenu pour DHQ-GHK est identique à celui obtenu pour la fraction peptidique seule, le complexe cuivrique se forme donc sur la fraction peptidique, tandis qu'il se forme un complexe faisant intervenir deux molécules de produit et 4 azotes dans le cas de la mitoxantrone ou de Q-GHK (Morier-Teissier et coll., 1990).

Cette formation de complexes cuivriques entraîne une production de radicaux libres mise en évidence par spin-trapping en utilisant la N-phényl-t-butyl nitron (PBN). Le cuivre seul ou en présence d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) produit peu de radicaux libres, de même que la mitoxantrone ou Q-GHK. Seul DHQ-GHK mis en présence de cuivre en produit en grande quantité (Morier-Teissier et coll., 1990). Afin de savoir si cette production de radicaux libres conduit à une coupure d'ADN, un ADN circulaire pouvant subir une coupure monobrin ou double brin a été utilisé. L'ADN incubé en présence de Cu,  $H_2O_2$  et d'un réducteur (ascorbate) ou en présence de DHQ-GHK seul ne subit pas de coupure, mais lorsqu'il est associé au mélange Cu/ $H_2O_2$ /ascorbate dans des proportions telles que Cu/P = 0,2 et surtout 0,1 la coupure est fortement augmentée. Quand ce rapport augmente et que le complexe ne se forme plus sur le chaînon peptidique mais sur le noyau anthraquinonique, la coupure n'a plus lieu (Morier-Teissier et coll., 1990).

Ces résultats préliminaires montrent l'efficacité du rapprochement entre une molécule anthraquinonique hydroxylée et un peptide chélateur du cuivre lorsque leurs proportions respectives permettent la formation du complexe sur le chaînon peptidique. Cependant, l'hybride DHQ-GHK n'est pas cytotoxique pour les cellules tumorales de type KB ou L1210, sans doute parce que les molécules très hydrophiles ne pénètrent pas dans la cellule (Morier-Teissier et coll., 1990).

Afin d'obtenir des molécules non plus monosubstituées mais disubstituées dont l'intercalation devrait être mieux stabilisée, nous avons ajouté un bras espaceur entre l'anthraquinone et le peptide comme dans le cas de la mitoxantrone. Il s'agit de l'éthylène diamine dans laquelle les deux atomes d'azote sont séparés par deux carbones (cf RSA, Chapitre I). Sur cette fraction amine sera fixé un tripeptide plus lipophile Gly-Gly-L-His dont le complexe cuivrique s'est révélé être un agent de coupure (Chiou, 1983 ; Mack et coll., 1988). Ceci devrait nous permettre d'obtenir une molécule ayant plus d'affinité pour l'ADN et capable de le couper.

### III-3 Le modèle (Gly-Gly-L-His)-anthraquinone : travaux réalisés

#### III-3-1 Caractéristiques du peptide

Le peptide Gly-Gly-L-His constitue la fraction complexante de la sérum albumine humaine (Lau et coll., 1974 ; Laussak et Sarkar, 1984). Il est capable de complexer les métaux de transition tels le cuivre et le nickel (Bossu et Mergerum, 1976 ; Bossu et coll., 1978 ; Lappin et coll., 1978 ; Sakurai et Nakahara, 1979). Gly-Gly-L-His complexe le cuivre dans un rapport molaire 1 : 1 et à des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 11 (Yokoyama et al 1974 ; Kuroda et Aiba, 1979). Chaque atome de cuivre est chélaté par l'azote du groupe amino terminal, par les azotes des deux peptides suivants et par un azote du groupe imidazole du résidu histidine (fig 54) ; le tout est dans un arrangement carré légèrement déformé (Camerman et coll., 1976).

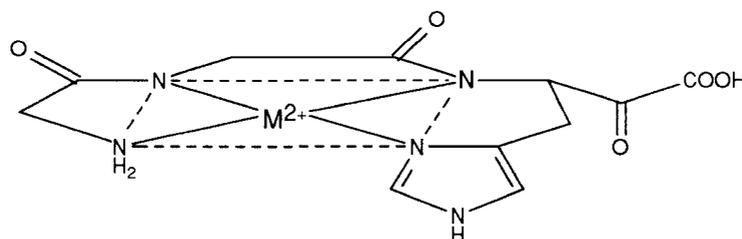
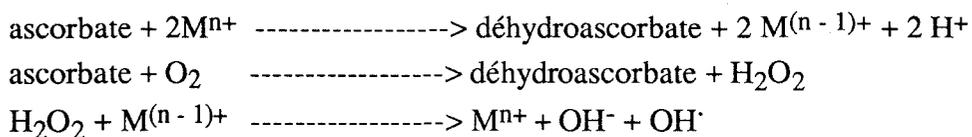


Figure 54 : Structure du complexe métallique du tripeptide Gly-Gly-L-His.

Gly-Gly-L-His amplifie l'activité antitumorale de l'ascorbate. En effet, il potentialise l'action du système  $H_2O_2/Cu(II)/$ ascorbate qui induit une coupure de l'ADN et des protéines (Chiou, 1983 ; Inoue et Kawanishi, 1989). Les dommages causés sur l'ADN sont dus aux radicaux libres hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) produits selon le mécanisme suivant (Chiou, 1983) : ( $M^{n+}$  représente l'ion cuivrique libre ou complexé) :



Par ailleurs, une étude récente (Liang et coll., 1995), ayant pour but d'exploiter le potentiel des peptides contenant des groupements fonctionnels (guanidinium, amino, amido) employés par les protéines pour reconnaître leurs sites sur les acides nucléiques ou par les agents antitumoraux d'origine naturelle, a évalué la capacité et la spécificité de coupure par les tripeptides amide Gly-Gly-His-NH<sub>2</sub>, Lys-Gly-His-NH<sub>2</sub> et Arg-Gly-His-NH<sub>2</sub> en présence de Ni(II). Cette étude montre que, quand ils sont liés au Ni(II) et activés de façon appropriée, ces métallopeptides peuvent modifier sélectivement l'ADN. La liaison dans le petit sillon de ces trois métallopeptides a été mise en évidence par l'analyse des coupures produites sur les deux extrémités 3' et 5' de fragments d'ADN marqués. La présence de la distamycine (Dst) inhibe considérablement la coupure induite par ces peptides ce qui confirme la liaison dans le petit sillon de l'ADN (Liang et coll., 1995). Les sites de sélectivité observés peuvent être altérés par la nature du substituant de l'acide aminé et sa position dans le tripeptide. En effet, les peptides chargés (contenant des résidus Arg ou Lys) sont plus efficaces que le peptide neutre (contenant un résidu Gly), sans doute grâce à leur interaction électrostatique avec la périphérie anionique de l'ADN. En plus, ces peptides chargés possèdent une sélectivité pour les sites A/T alternés beaucoup plus marquée que celle du peptide neutre Gly-Gly-His-NH<sub>2</sub>. Les sites A/T homopolymériques sont beaucoup moins reconnus par les trois métallopeptides.

La capacité des complexes cuivriques du tripeptide Gly-Gly-L-His à dégrader l'ADN en présence d'ascorbate et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a été exploitée par Dervan (Mack et coll., 1988 ; Mack et Dervan, 1990) pour la synthèse d'un polypeptide contenant le domaine de liaison à l'ADN de la recombinaison Hin (résidus 139-190) et le tripeptide Gly-Gly-L-His dans le but de concevoir des protéines capables de couper l'ADN sur des sites spécifiques. Le résidu de 55 acides aminés GGH(Hin 139-190) contient alors deux domaines ayant des fonctions bien distinctes : le tripeptide chélateur de métaux de transition tels le Cu et le Ni et le domaine Hin (139-190) en conformation hélice-tour-hélice responsable de la spécificité de liaison. Ce résidu seul ou en présence de Cu (II) ne provoquent aucune coupure de l'ADN. Par contre en présence d'ascorbate et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> une coupure a été mise en évidence. De plus cette coupure a lieu au niveau des sites de liaison de la recombinaison Hin (Mack et Dervan, 1992).

Le tripeptide Gly-Gly-L-His a été couplé à la nétrropsine ligand spécifique du petit sillon (cf Chapitre IV) par l'intermédiaire de 2 ou 3 résidus glycine (Nikolaev et coll., 1993). L'analogue contenant trois résidus glycine est capable de complexer le cuivre dans un rapport 1 : 1 comme le peptide lui même, de se lier dans le petit sillon sous forme complexée et non complexée en couvrant trois paires de bases et de couper sélectivement l'ADN de façon très efficace en présence d'ascorbate et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ceci constitue une preuve supplémentaire quant à la capacité du tripeptide Gly-Gly-L-His à complexer le cuivre et à induire une coupure de l'ADN. Par conséquent en l'associant au noyau anthraquinonique de la mitoxantrone on était en droit d'espérer une activité biologique par le biais de ces mécanismes.

### III-3-2 Stratégie de synthèse

Dans un travail précédent (Morier-Teissier et coll., 1990), il avait été envisagé de fixer directement la glycine sur le noyau anthraquinonique puis le dipeptide. Quelles que soient les conditions opératoires utilisées, il y a toujours eu monosubstitution comme l'a montré la présence de trois fonctions OH en RMN (Morier-Teissier et coll., 1990). Ceci est dû à la proximité de la fonction COOH qui désactive les fonctions NH<sub>2</sub>. L'utilisation d'un bras espaceur diaminoéthyle (DAE), ne contenant pas de groupement carboxyle, permet d'obtenir un dérivé disubstitué en 1,4 (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**) (cf Chapitre II) sur lequel seront fixées les chaînes peptidiques.

#### III-3-2-1 Synthèse du tripeptide Gly-Gly-L-His-OH

Pour les fonctions amine, le groupe protecteur choisi est le benzyloxycarbonyle Z ou Cbz, très bon groupement protecteur permanent, clivable par HF, HBr dans AcOH ou par hydrogénation catalytique en présence de charbon palladié. Il est introduit par l'intermédiaire du chloroformiate de benzyle en milieu basique.

Dans notre cas, c'est la glycine qui est protégée sur sa fonction amine. Nous avons choisi de protéger la fonction carboxylique par un ester méthylique, His-OMe, 2HCl étant un produit commercial. La saponification se fait à l'aide de soude en solution méthanolique en fin de synthèse peptidique.

Le couplage entre acides aminés est facilité par l'activation de la fonction acide formant la liaison amide. La méthode retenue est celle aux carbodiimides ; elle est

très utilisée car les carbodiimides sont stables à température ambiante, très réactifs et donnent de bons rendements, la réaction se faisant en une seule étape. Cette méthode a un inconvénient majeur qui est la formation de N-acylurée qui peut être évitée en travaillant à basse température. L'apport d'un activateur de réaction, le N-hydroxybenzotriazole HOBt, permet de passer par l'intermédiaire d'un ester activé qui augmente la cinétique de la réaction. La triéthylamine ajoutée libère la fonction amine de l'histidine bloquée sous forme de chlorhydrate. La figure 55 résume la stratégie de synthèse du tripeptide.

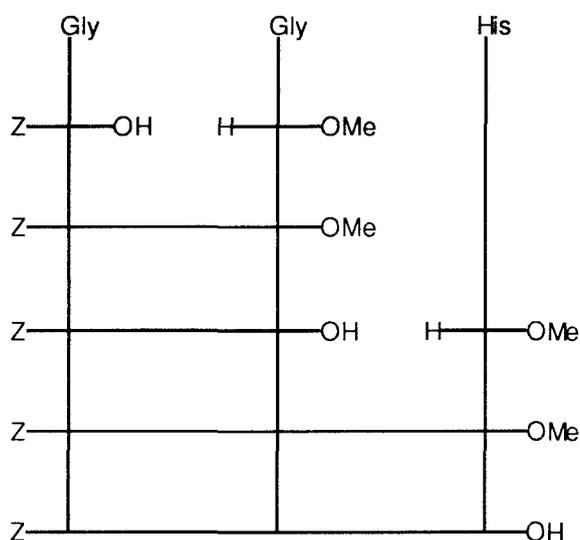


Figure 55 : Schéma de synthèse du peptide Gly-Gly-L-His-OH

Pour isoler le peptide, le précipité de dicyclohexylurée (DCU) est éliminé par filtration. Outre cela, on procède à des extractions par HCl (1N) qui éliminent l'acide aminé en excès présentant une fonction amine libre sous forme de chlorhydrate soluble dans l'eau et par le bicarbonate de soude  $\text{NaHCO}_3$  pour transformer l'acide aminé ayant une fonction acide libre en dérivé sodé soluble dans la phase aqueuse. Ceci n'est valable que si le peptide lui-même n'est pas soluble dans l'eau. L'utilisation de Boc-Gly-Gly-L-His-OMe, qui avait été envisagée dans un premier temps, a été abandonnée car il est soluble dans l'eau, en milieu acide et basique, ce qui a rendu sa purification difficile.

### III-3-2-2 Synthèse du dérivé anthraquinone-peptide

La  $(\text{DAE})_2\text{-DHQ}$  (**18**) se terminant par une fonction amine est couplée au tripeptide Z-Gly-Gly-L-His-OH (**23**) selon la méthode de couplage déjà décrite c'est-à-dire en présence de DCC et HOBt (fig 56). L'hybride **24** protégé est purifié par chromatographie sur colonne de silice avant d'être traité par HBr dans l'acide acétique pour éliminer la fonction Z. L'hybride **25** (Gly-Gly-L-His-DAE) $_2$ -DHQ, soluble dans l'eau, est lyophilisé.

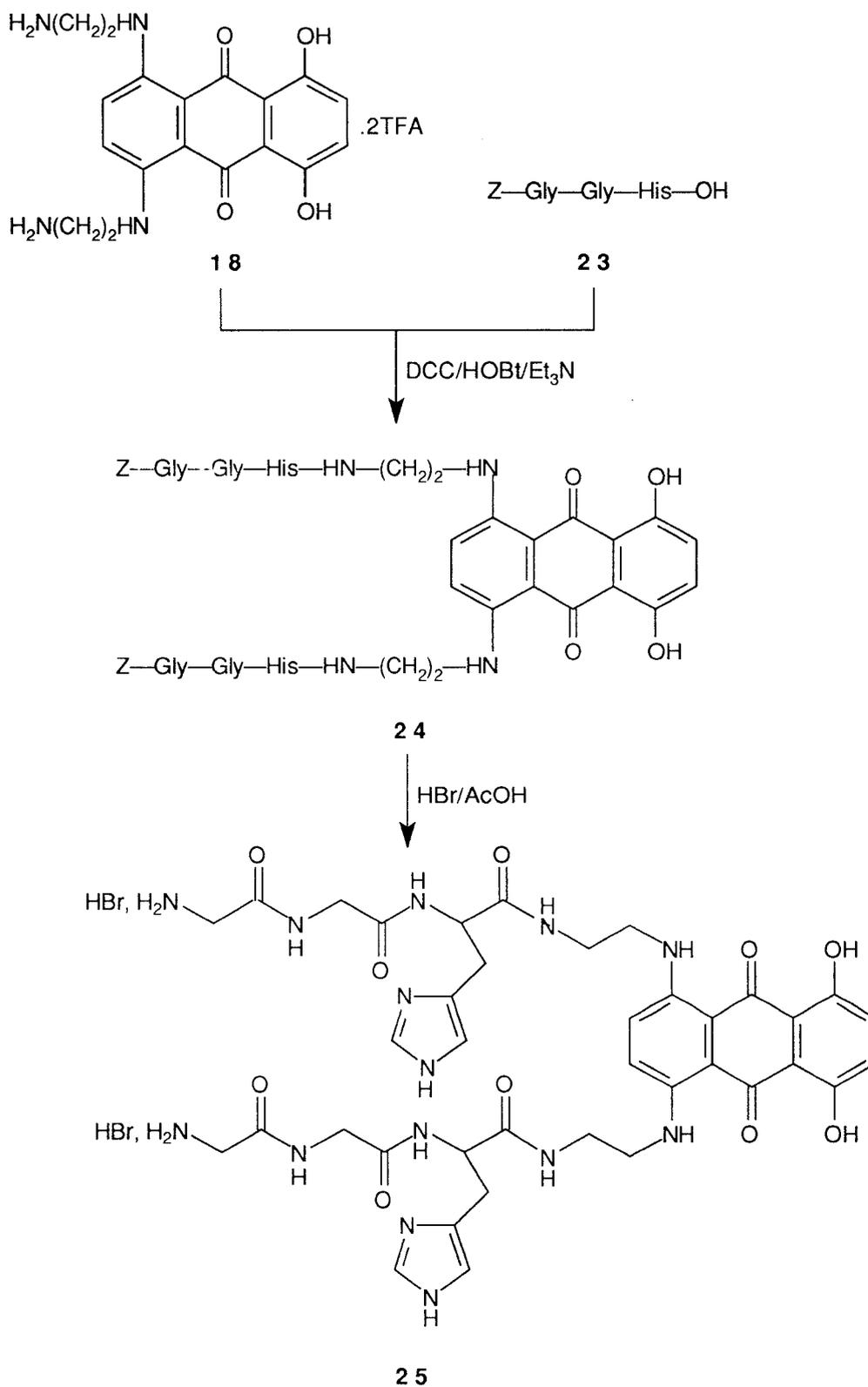


Figure 56 : Schéma de synthèse de l'hybride (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**25**).

### III-3-3 Interaction avec l'ADN

Dans le but d'étudier l'affinité de la molécule hybride (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ et de la comparer à celle des molécules parentes, nous avons étudié son interaction avec l'ADN par trois techniques différentes : dénaturation thermique de l'ADN, quenching de fluorescence en présence d'ADN et viscosimétrie.

#### III-3-3-1 Affinité de liaison à l'ADN

##### \* Modification de la température de dénaturation thermique

Les liaisons hydrogène ainsi que les interactions hydrophobes des bases sont à l'origine de la structure tridimensionnelle en double hélice de l'ADN. Ces deux composantes sont les responsables et les témoins de la stabilité thermodynamique de l'édifice. Un changement de température modifiera la conformation de la double hélice d'ADN en rompant les liaisons hydrogène entre les bases nucléiques. Une déstabilisation s'ensuit et se traduit par un désappariement des deux brins. Comme l'absorbance des brins non appariés est supérieure à celle des brins appariés, pour lesquels les bases interagissent entre elles, une augmentation de l'absorbance à 260 nm se produit (hyperchromicité) (fig 57).

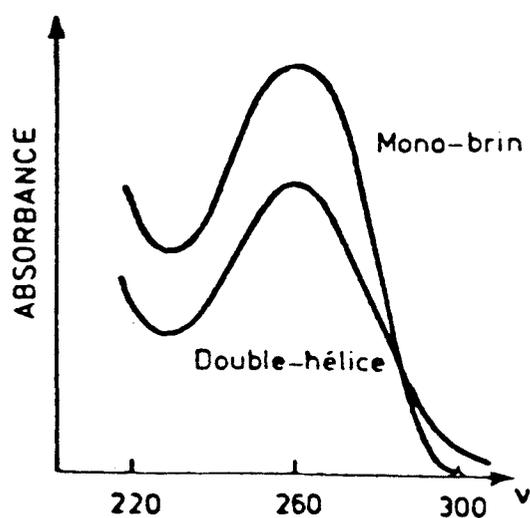


Figure 57

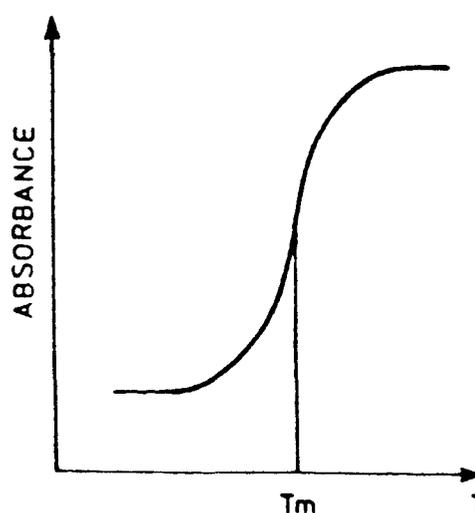


Figure 58

Les courbes de dénaturation de l'ADN sont obtenues en enregistrant l'évolution de

l'absorbance à 260 nm de la solution en fonction de la température. La température de demi-transition ou "température de fusion" de l'ADN ( $T_m$  pour melting temperature) correspond à la température à laquelle 50% de l'ADN se trouve dénaturé, c'est-à-dire au point d'inflexion de la sigmoïde de transition hyperchrome (fig 58).

La température à laquelle cette modification a lieu est un paramètre qui caractérise la stabilité de l'ADN. L'affinité d'une molécule pour l'ADN peut s'évaluer par la variation de la valeur  $T_m$  de dénaturation de l'ADN lié. Un  $\Delta T_m > 0$  ( $\Delta T_m = T_{m\text{ADN lié}} - T_{m\text{ADN libre}}$ ) correspond à une augmentation de la stabilité de l'ADN due par exemple à l'intercalation du produit dans la chaîne d'ADN.

La température de demi-transition de l'ADN de thymus de veau (42% GC) seul est  $T_m = 69^\circ\text{C}$ . Les  $T_m$  mesurés après interaction avec (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**25**) pour différents rapports [(Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ]/[ADN] sont groupés dans le tableau 3.

[ligand]/[ADN]	0,2	0,4	0,6	0,8	1
$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	76°6	82°3	85°9	86°	86°1
$\Delta T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	7°6	13°3	16°9	17°	17°1

$$\Delta T_m = T_m - 69^\circ$$

**Tableau 3 :** Valeurs de  $\Delta T_m$  (élévation de la température de fusion de l'ADN de thymus de veau en  $^\circ\text{C}$ ) du composé (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ pour différents rapports [ligand]/[ADN].

Le  $\Delta T_m$  positif et important de (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DAE implique qu'il stabilise la double hélice d'ADN. Il est du même ordre de grandeur que celui cité pour la mitoxantrone ( $\Delta T_m = 15^\circ 9$  ; Collier and Neidle, 1988) et plus élevé que celui obtenu pour le produit monosubstitué DHQ-GHK ( $\Delta T_m = 11^\circ 3$  ; Morier-Teissier et coll., 1990).

#### \* Quenching de fluorescence

La fluorescence du bromure d'éthidium, dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement 545 et 595 nm, est augmentée quand il est lié à l'ADN. L'addition d'un autre ligand provoque une réduction de cette fluorescence due au déplacement du bromure d'éthidium par le ligand. Avec un rapport initial BET/ADN = 0,1 (concentration du bromure d'éthidium/concentration du mononucléotide), une valeur de 100% est attribuée à la fluorescence obtenue. L'addition progressive du médicament fait régresser le taux de fluorescence  $Q$ . Sur la courbe  $Q = f$  (concentration en produit ajouté),

il est possible de déterminer la valeur  $Q_{50}$ , concentration de produit qui permet d'obtenir 50% de la valeur initiale de la fluorescence. Une valeur  $Q_{50}$  faible correspond à un produit qui déplace facilement le bromure d'éthidium.

Les valeurs  $Q_{50}$  relevées à partir des courbes sont comparées à celles obtenues pour la mitoxantrone et autres intercalants. Le tableau 4 résume ces résultats.

Abréviations	$Q_{50}$
mitoxantrone	0,10
DHQ-GHK	3
(Gly-Gly-L-His-DAE) <sub>2</sub> -DHQ	0,23

Tableau 4 : Comparaison des valeurs  $Q_{50}$  de la mitoxantrone et des hybrides DHQ-GHK et (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ.  $Q_{50}$  : concentration ( $\mu\text{M}$ ) de produit nécessaire pour diminuer de 50% la fluorescence du bromure d'éthidium (BET) lié à l'ADN pour un rapport  $[\text{BET}]/[\text{ADN}] = 0,1$ .

Le changement de la chaîne latérale et l'utilisation de la monosubstitution donne une plus faible affinité pour les sites d'association du bromure d'éthidium. Le modèle DHQ-GHK s'avère 30 fois moins actif que la mitoxantrone. Par contre la disubstitution par un bras espaceur DAE associé à un peptide Gly-Gly-L-His-OH en positions 1-4 induit une grande amélioration de l'affinité. En effet, le modèle (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ est à peine 2,3 moins actif que la mitoxantrone. Ceci constitue une preuve supplémentaire de l'intercalation du nouveau modèle synthétisé.

Pour appréhender de manière précise la nature de l'interaction (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ/ADN, des études de viscosimétrie sont effectuées.

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

#### \* Viscosimétrie

La courbe (fig 59) résume les résultats obtenus pour le modèle (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ. L'augmentation de la longueur apparente produite par ce dernier se caractérise par une pente de 0,72 (élongation de 2,45 Å) très proche de la valeur obtenue pour la mitoxantrone (pente 0,96 ; élongation 3,26 Å) ainsi que de celle obtenue pour la daunorubicine (3,4 Å) (Saucier et coll., 1971). De ce fait, son interaction avec l'ADN est compatible avec celle d'un mono-intercalant.

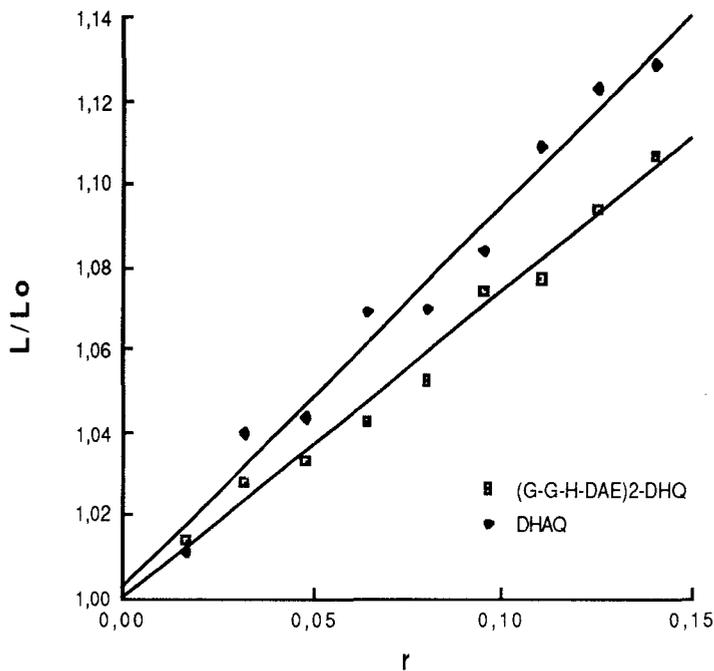
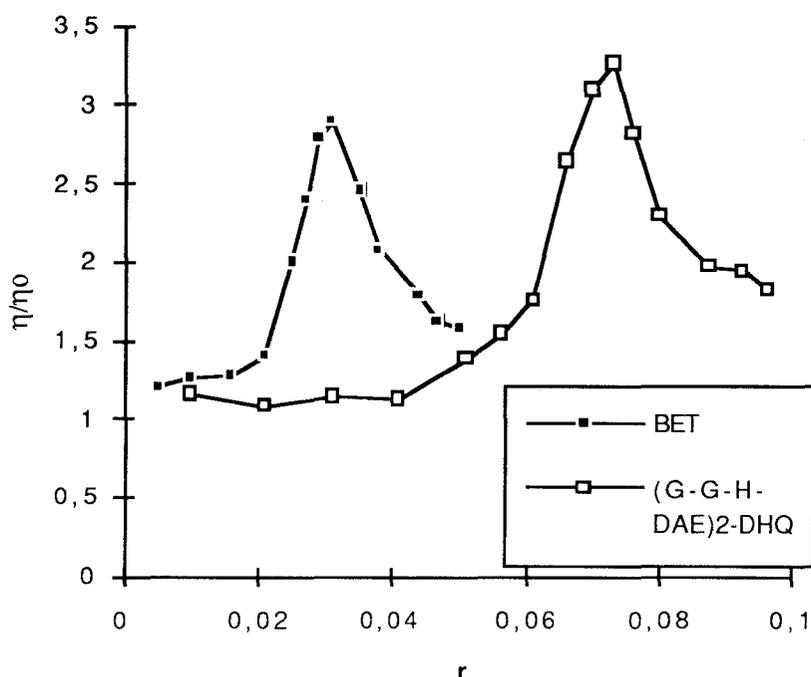


Figure 59 : Elongation de l'ADN de thymus de veau en présence de (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ et de la mitoxantrone (DHAQ) ; l'expérience a été réalisée à 27°C dans un tampon SHE 0,01M. La concentration, exprimée en phosphate, est de 848,5  $\mu$ M. Les composés testés sont ajoutés par incréments à partir d'une solution 2,5 mM.

Le changement dans la superhélicité de l'ADN circulaire, conséquence de l'intercalation, est suivie par la variation de la viscosité du complexe (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ/ADN pour des quantités croissantes de produit. L'angle de détorsion, mesuré à partir de l'inversion du sens de détorsion d'un ADN circulaire double-brin super-enroulé à droite, est calculé par convention à partir de l'angle 26° créé par le bromure d'éthidium (Wang, 1974). La courbe (fig 60) reflète les changements du super-enroulement qui résultent de la détorsion subie par la double hélice et causée par sa liaison avec (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ.



**Figure 60** : Courbes de titration de la viscosité de l'ADN circulaire superenroulé avec l'hybride (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ et le bromure d'éthidium (BET). La concentration en ADN est de 105,9 μM. Les expériences sont réalisées à 27°C dans le tampon SHE 0,01 M.

L'angle de détorsion obtenu est de 10,97°. Cette valeur reste inférieure à celles obtenues pour le bromure d'éthidium (26°) (Wang, 1974) et pour la mitoxantrone (17,5°) (Lown et coll., 1985). Néanmoins ce résultat est en accord avec ceux obtenus pour différentes anthraquinones monosubstituées (10,6°) et disubstituées (14,2°) (Islam et coll., 1985). Des valeurs aussi faibles ont été décrites pour d'autres intercalants : adriamycine (12°) (Waring, 1981) ; daunorubicine (10°) (Saucier et coll., 1971). Ceci reflète soit les fortes influences changeant l'interaction entre le ligand intercalé et les deux paires de bases adjacentes soit l'existence de plusieurs modes de liaison.

Dans tous les cas, ces résultats confirment bien ceux obtenus par les études de dénaturation thermique et de quenching de fluorescence. On peut donc avancer l'hypothèse d'une intercalation partielle de l'hybride entre les plateaux de paires de bases, par l'intermédiaire du noyau plan anthraquinonique, due vraisemblablement aux chaînes peptidiques étendues.

### III-3-4 Etude des complexes cuivriques par RPE

La résonance paramagnétique électronique (RPE) permet de mettre en évidence l'existence et la structure de complexes cuivriques. Cette technique est sensible aux atomes possédant un électron non apparié et donne des informations sur leur état d'oxydation et sur leur environnement.

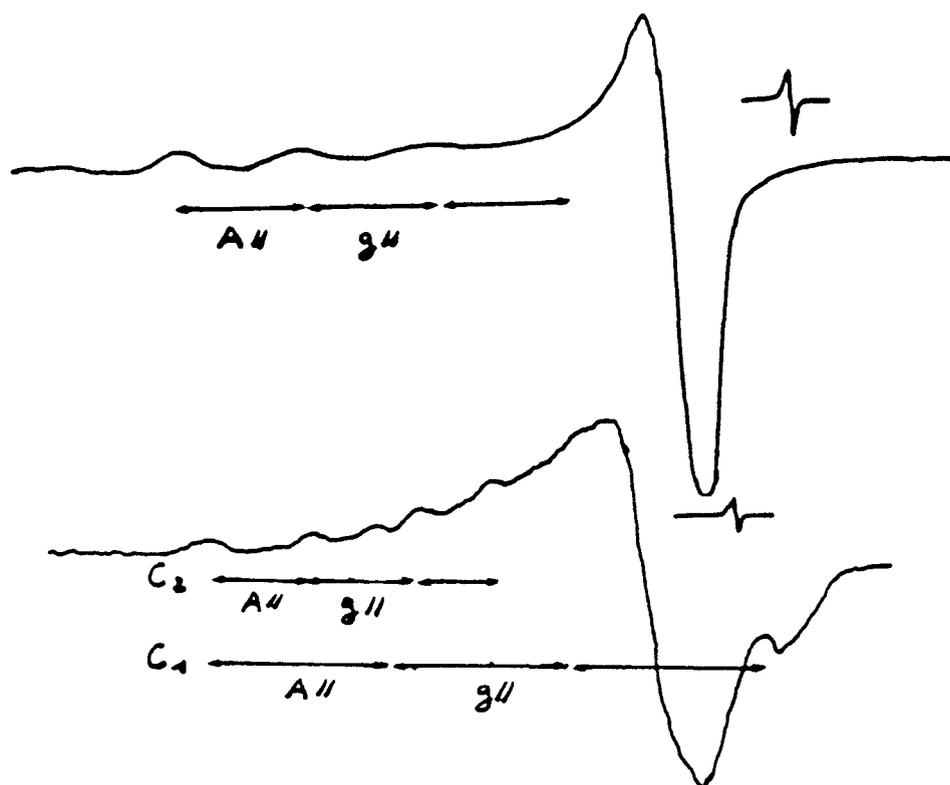
L'ion cuivrique possède un électron célibataire :  $\text{Cu}^{++} : 4s^0 3d^9$ . Son spin électronique total est donc  $S = 1/2$ . Sous l'action d'un champ magnétique  $H$ , cet électron résonnera pour une fréquence  $\nu$  telle que la relation  $\mathbf{h} \times \nu = \mathbf{g} \times \beta \times \mathbf{H}$  soit vérifiée, où  $g$  est un facteur spécifique d'une espèce paramagnétique donnée, qui renseigne sur l'environnement chimique de l'électron et  $\beta$  le magnéton de Bohr, facteur de conversion du moment cinétique en moment magnétique.

Les spectres sont enregistrés à  $77^\circ\text{K}$ . En phase solide, l'orientation de l'ion cuivrique par rapport au champ  $H$  intervient, car le facteur  $g$  est dit à géométrie axiale et par conséquent se décompose en  $g_{//}$  (qui correspond à la direction parallèle à  $H$ ) et  $g_{\perp}$  (qui correspond aux directions perpendiculaires à  $H$ ).

L'absorption d'énergie lors de la résonance se traduit par un spectre à quatre raies dans le cas du cuivre car il y a interaction des moments magnétiques de l'électron célibataire et des noyaux voisins. Le spin nucléaire du cuivre "I" est égal à  $3/2$ . Le cuivre possède donc quatre états de spin :  $+3/2$ ,  $+1/2$ ,  $-1/2$ ,  $-3/2$ . Cette interaction crée donc quatre niveaux d'énergie. Les règles de sélection autorisent quatre transitions entre ces niveaux. Ce couplage spin-électronique/spin-nucléaire, appelé couplage hyperfin, est caractérisé par des constantes de couplage  $A_{//}$  et  $A_{\perp}$  (à cause de la symétrie axiale qui engendre des différences de valeurs selon les trois directions de l'espace).

$A_{\perp}$  est très inférieur à  $A_{//}$ . En pratique on lit directement  $A_{//}$  sur le spectre et on calcule  $g_{//}$  à partir de la relation  $\mathbf{h} \times \nu = \mathbf{g}_{//} \times \beta \times \mathbf{H}_{//}$  en utilisant une référence pour laquelle  $g_{\text{réf}} = 2,0028$ .  $A_{\perp}$  et  $g_{\perp}$  sont difficilement observables sur les spectres.

Les spectres RPE sont enregistrés pour deux valeurs de pH où l'histidine est protonée (pH = 5) ou non (pH = 8) et pour un rapport Cu/P = 1,8, puisqu'il y a deux fragments peptidiques capables de complexer le cuivre. Les spectres obtenus se différencient totalement de ceux observés en présence du cuivre libre non complexé. La figure 61 correspond aux spectres RPE des divers complexes cuivriques caractérisés par les constantes de couplage hyperfin  $A_{//}$  et les facteurs  $g_{//}$ .



**Figure 61 :** Spectres du cuivre en présence de  $(\text{Gly-Gly-L-His-DAE})_2\text{-DHQ}$  aux deux valeurs de pH 5 et 8.

Le tableau 5 résume ces résultats.

pH	5			8		
	$A_{//}$	$g_{//}$	complexe	$A_{//}$	$g_{//}$	complexe
C1	125	2,296	2N	130	2,296	2N
C2	-----	-----	-----	215	2,188	4N

**Tableau 5 :** Valeurs de  $A_{//}$  et  $g_{//}$  des différentes espèces observées aux deux valeurs de pH.

Les valeurs de  $g_{//}$  permettent de déterminer la nature et le nombre de ligands du cuivre II en se référant aux valeurs habituellement obtenues pour les peptides complexant le cuivre avec plusieurs atomes d'azote.

Les valeurs obtenues nous permettent de dire qu'à pH acide (pH = 5) une seule espèce C1, faisant intervenir seulement deux azotes, est observée. Par contre à pH basique (pH = 8) un complexe supplémentaire à 4 azotes est détecté. De façon à aller plus en avant dans notre étude et pour savoir si la complexation du cuivre est suivie d'une production de radicaux libres, une étude de spin-trapping a été réalisée.

### III-3-5 Détection des radicaux libres par "spin-trapping"

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 mouvements peuvent être obtenus. Par contre, la mise en évidence d'espèces radicalaires transitoires de courte durée de vie nécessite l'emploi de la technique de "spin-trapping" (piégeage des radicaux libres). Cette technique utilise l'aptitude d'un composé diamagnétique, en l'occurrence le PBN (N-phenyl-tert-butyl nitron) (fig 62), à capter les radicaux libres produits dans le milieu d'expérimentation, pour former un spin-adduit paramagnétique stable facilement observable en RPE. Le spin-adduit formé est un nitroxyde stable possédant un électron célibataire sur l'atome d'azote donc fournissant un signal en RPE.

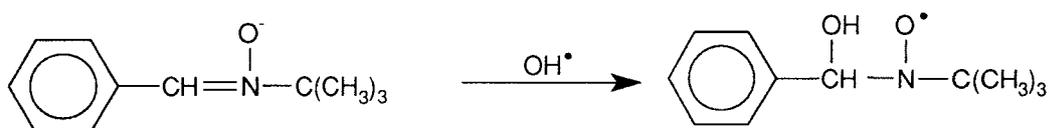


Figure 62 : Structure des molécules : PBN et PBN-OH

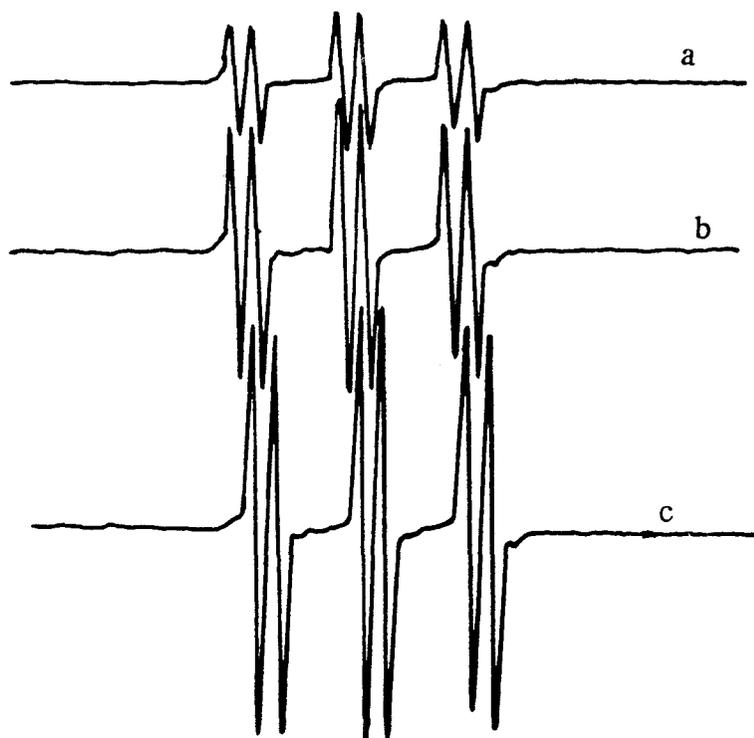
Nous avons réalisé trois témoins :

□ un témoin (1) qui permet de tester le système PBN/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui ne doit donner aucun signal car il n'y a pas de production de radicaux libres.

□ un témoin (2) qui teste le PBN en présence de cuivre et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On obtient un spectre caractéristique du PBN-OH lié à une faible production d'espèces radicalaires par action des métaux sur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les constantes de couplage sont :  $a^{\text{N}} = 15,25 \text{ G}$  ;  $a_{\beta} = 3 \text{ G}$  ces valeurs sont en accord avec celles obtenues par Harbour et coll., (1974). La surface des pics, qui est proportionnelle à la quantité de radicaux libres produite, est à son maximum au bout de 10 mn (12,5 en unité arbitraire calculée à partir de la hauteur des pics).

□ un témoin (3) en présence de DETAPAC, qui est un complexant, afin de vérifier que la production de radicaux libres est bien due au système Cu/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans ce cas on n'observe aucun signal.

Nous avons ensuite testé notre modèle. Les spectres (fig 63) montrent sans ambiguïté la production de radicaux libres dont on a suivi l'évolution au cours du temps. Le tableau 6 relate les résultats obtenus.



**Figure 63 :** Spectres RPE enregistrés à 5 mn (a), 10 mn (b) et 15 mn (c) (gain =  $6,3 \cdot 10^3$ ).

temps (mn)	5	10	15
surface (en unité arbitraire)	36	84,6	136,6

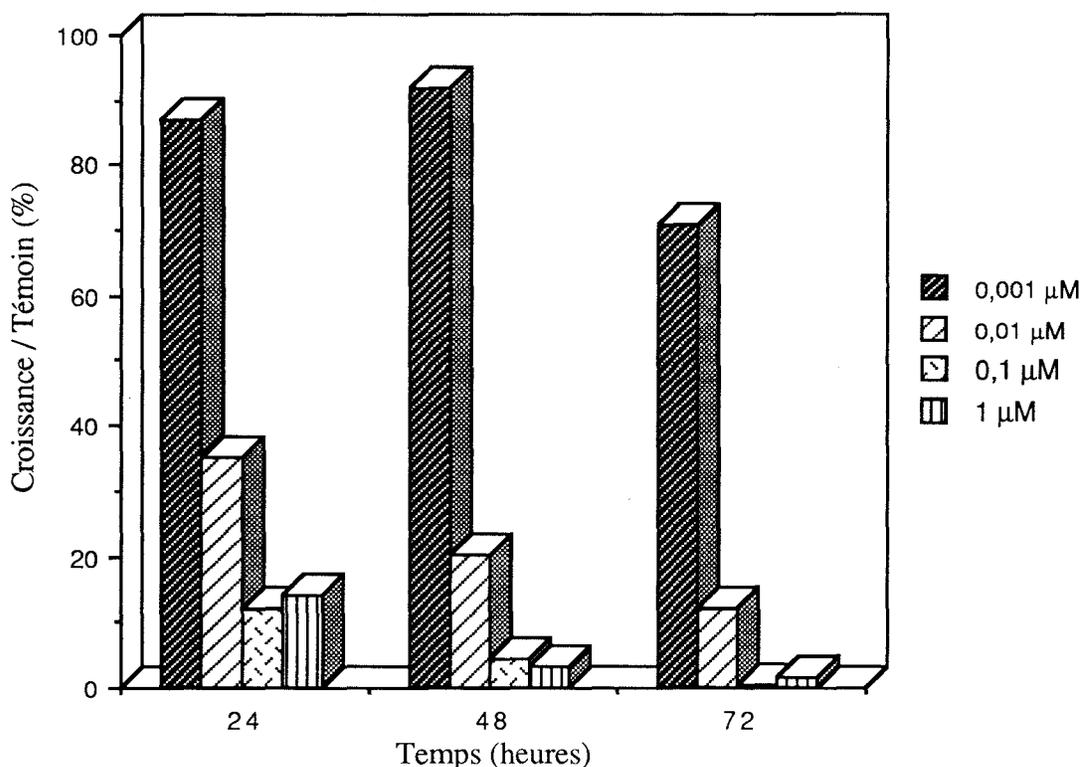
**Tableau 6 :** Evolution de la production des radicaux libres par le complexe (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ/Cu au cours du temps. Le rapport Cu/P = 1,8.

La production de radicaux libres est dix fois supérieure à celle du témoin (2). La complexation du cuivre par (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ augmente aussi la production de radicaux libres au cours du temps. Cependant, aucune coupure d'ADN n'a pu être mise en évidence.

### III-3-6 Activité biologique

#### III-3-6-1 Etude de l'activité cytotoxique *in vitro*

Les propriétés cytotoxiques et d'inhibition de croissance de la molécule (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ ont été déterminées sur des cellules leucémiques L1210 de souris et sur des cellules de tumeur mammaire MCF7 par le Dr. N. POMMERY en comparaison avec la molécule modèle. Les histogrammes d'inhibition de croissance et de dose-survie pour les deux composés vis-à-vis des deux souches sont représentées (fig 64 à 67).



**Figure 64 :** Histogramme d'inhibition de croissance des cellules L1210 en présence de concentrations variables de la mitoxantrone.

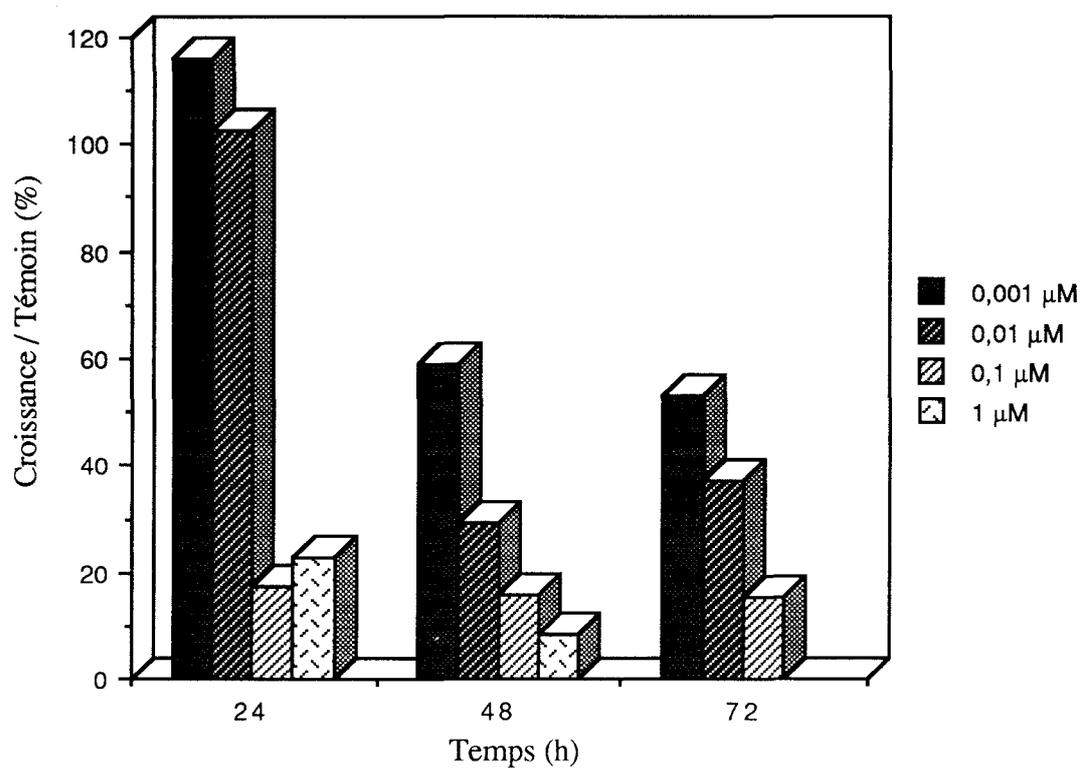


Figure 65 : Histogramme d'inhibition de croissance des cellules L1210 en présence de concentrations variables de (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ.

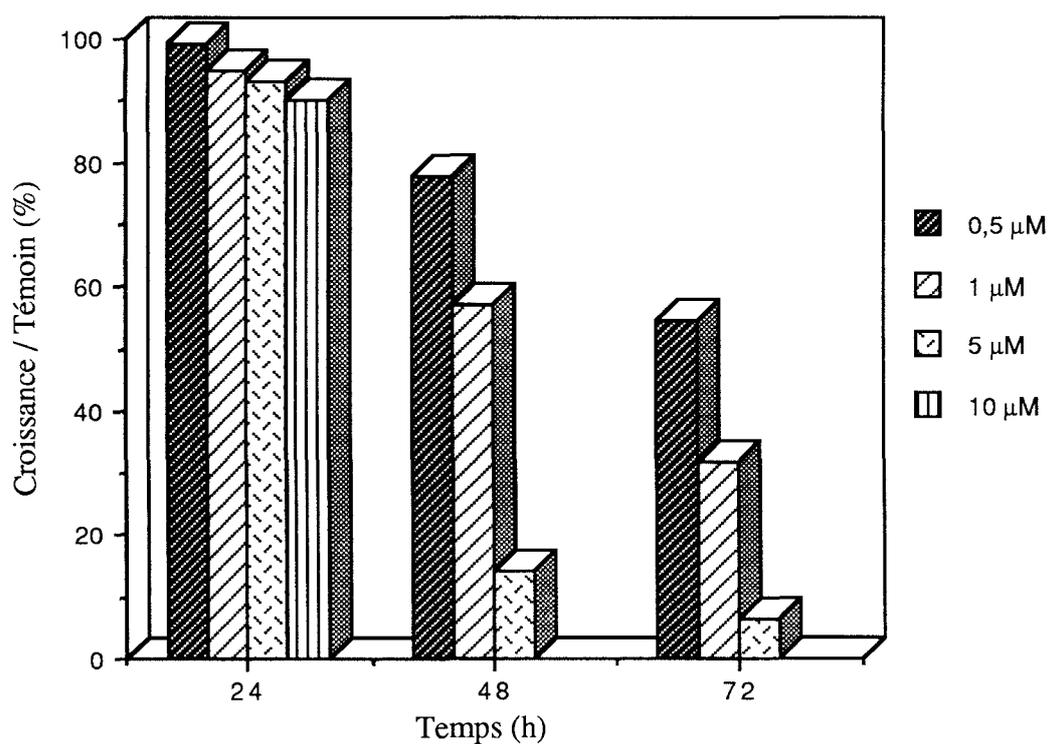


Figure 66 : Histogramme d'inhibition de croissance des cellules MCF7 en présence de concentrations variables de (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ.

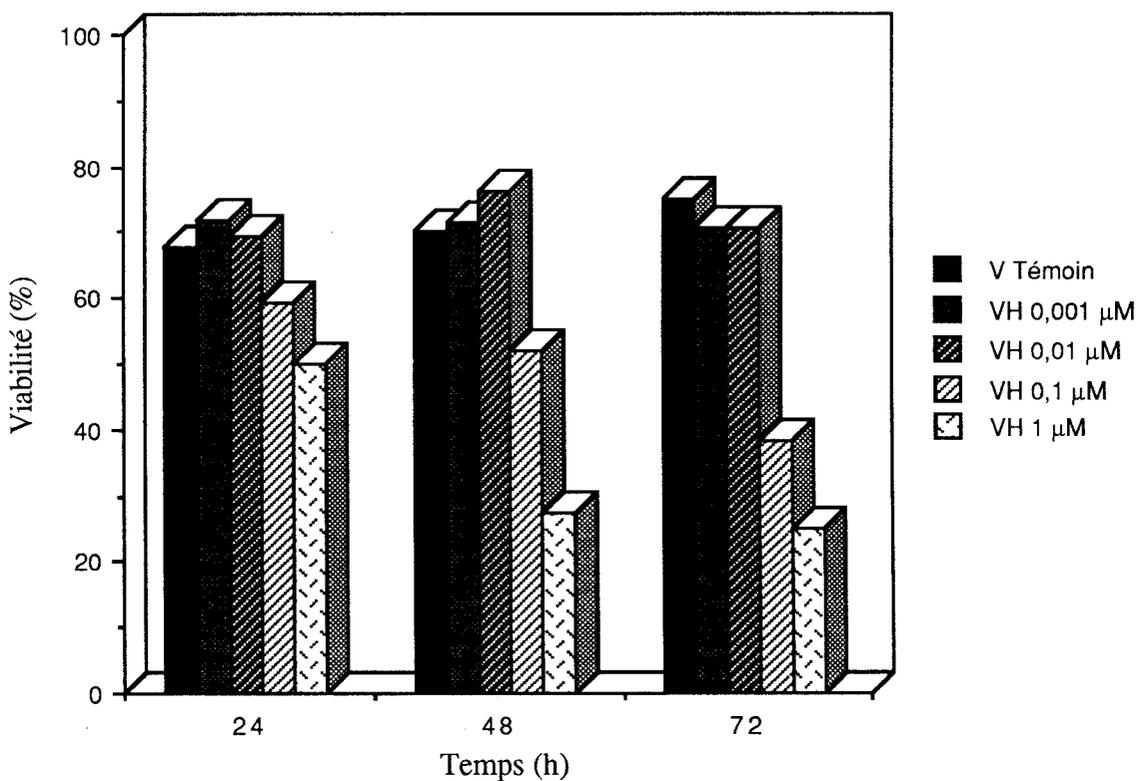
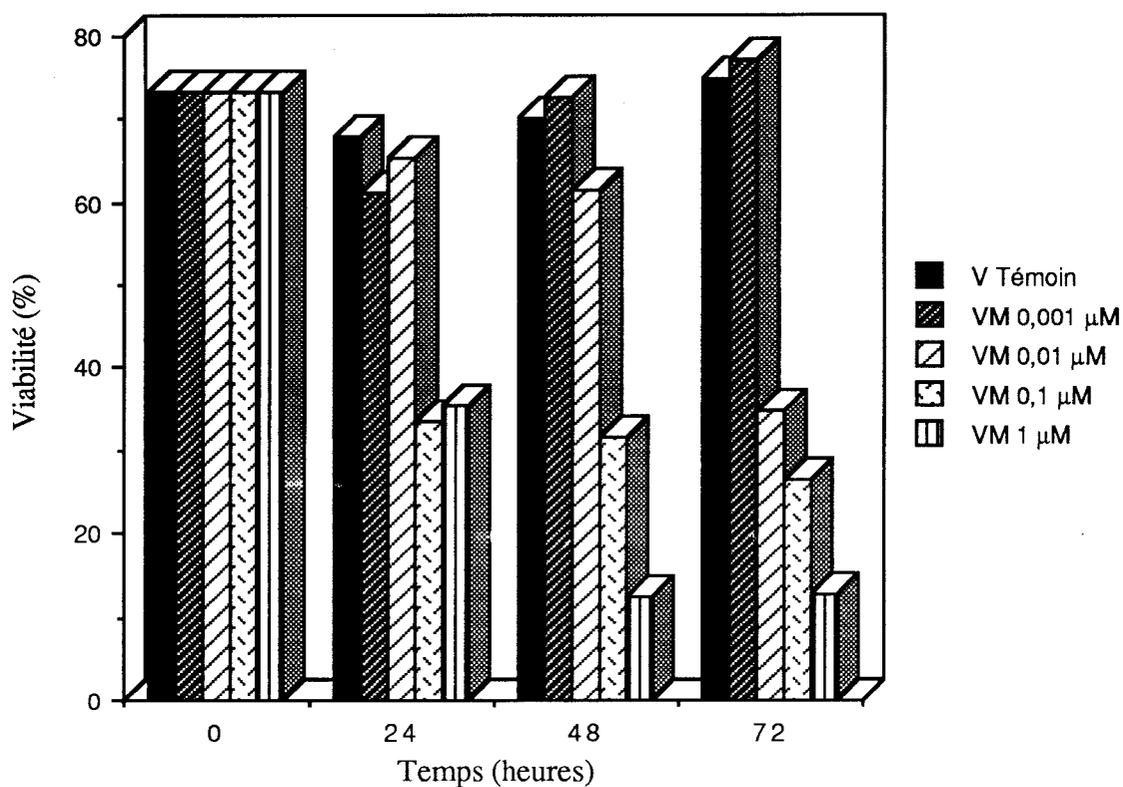


Figure 67 : Histogrammes dose-survie des cellules L1210 traitées par des concentrations variables de l'hybride (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ (VH) et de la mitoxantrone (VM).

La mitoxantrone ainsi que (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ présentent une activité antileucémique et antitumorale sur les lignées L1210 et MCF7. Les valeurs des CI<sub>50</sub> sont regroupées dans le tableau 7.

Type cellulaire	mitoxantrone	(Gly-Gly-L-His-DAE) <sub>2</sub> -DHQ
L1210	7 10 <sup>-9</sup>	5 10 <sup>-8</sup>
MCF7	2,7 10 <sup>-7</sup>	8 10 <sup>-7</sup>

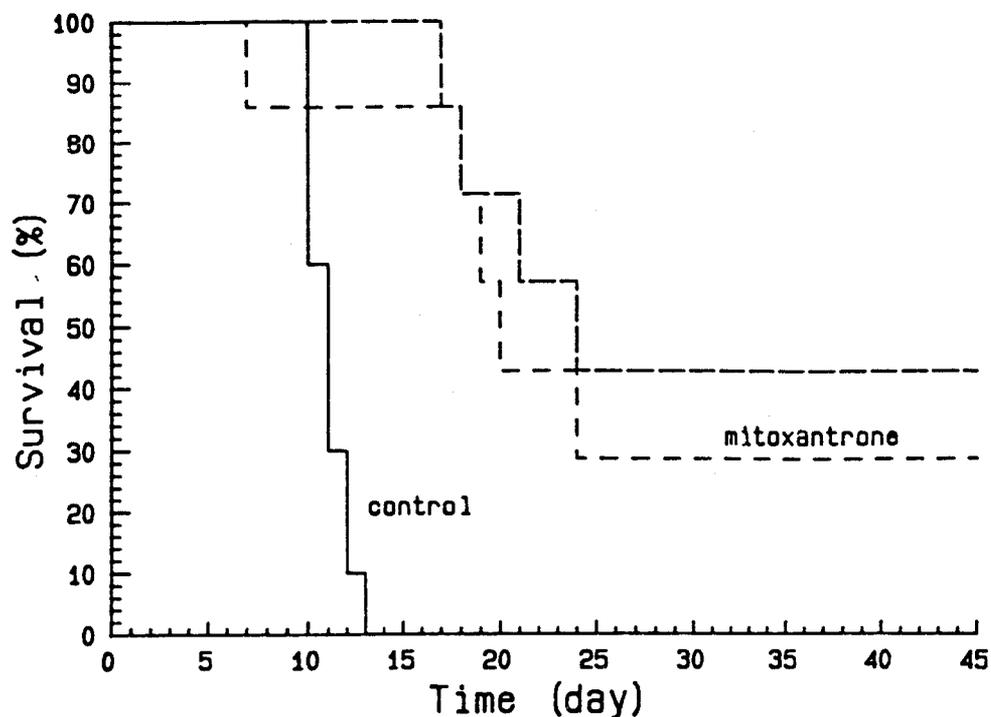
**Tableau 7 :** Comparaison des valeurs CI<sub>50</sub> des molécules mitoxantrone et (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ.

(Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ a une activité inhibitrice moins élevée que celle de la mitoxantrone (DHAQ). Mais il est important de noter qu'il est moins cytotoxique (LD<sub>50</sub> = 7 x 10<sup>-8</sup> pour (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ et 7 x 10<sup>-9</sup> pour la mitoxantrone). L'activité vis-à-vis des cellules de tumeur mammaire MCF7 reflète aussi une activité équivalente à celle de DHAQ pour le nouvel hybride et confirme sa moindre toxicité.

### III-3-6-2 Etude de l'activité antitumorale *in vivo*

Cette étude a été réalisée par les Dr. Ch. FOURNIER et B. HECQUET au centre anticancéreux O. Lambret de Lille. Pour tester l'activité anticancéreuse potentielle de (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ, des cellules leucémiques P388 ont été inoculées i.p. à des souris DBA/2. La leucémie P388, de par sa sensibilité à de nombreuses classes de molécules étudiées en phase clinique, constitue un test significatif pour le NCI (National Cancer Institute).

La courbe (fig 68) représente le pourcentage de survie en fonction du temps. Il est à noter que toutes les souris de contrôle sont mortes après le 12<sup>ème</sup> jour. Cette courbe illustre aussi la sensibilité de la lignée P388 à (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ comparée à celle de la mitoxantrone.



**Figure 68 :** Courbe de survie (en %) en fonction du temps. (—) groupe de contrôle ; (---) groupe traité par (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ ; (- - -) groupe traité par la mitoxantrone.

Le tableau 8 indique l'effet thérapeutique obtenu pour plusieurs doses différentes de (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ comparativement à celui de la mitoxantrone administrée à sa dose optimale.

Molécule testée	Dose (mg/Kg)	Jours d'administration	T/C (%)
(GGH-DAE) <sub>2</sub> -DHQ	5	1, 5, 9	140
(GGH-DAE) <sub>2</sub> -DHQ	10	1, 5, 9	150
(GGH-DAE) <sub>2</sub> -DHQ	25	1, 5, 9	230
mitoxantrone	1,6	1, 5, 9	190

**Tableau 8 :** Tableau comparatif de la survie médiane T/C (%) entre animaux traités (T) et non traités (C) des deux composés (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ et de la mitoxantrone. L'administration s'effectue pendant le 1<sup>er</sup>, 5<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> jour suivant l'inoculation de la tumeur aux souris.

A 25 mg/kg/jour de (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ (dose administrée par injection pour les jours 1, 5 et 9) une augmentation notable de la durée de survie est observée exprimée par un T/C de 230 % (l'activité antitumorale est évaluée en calculant le T/C % = temps de survie médian du groupe testé / temps de survie médian du groupe contrôle). Avec la mitoxantrone, utilisée comme référence, un T/C de 190 % a été mesuré

et valide l'essai. De plus trois souris sur sept ont été guéries. Pour des doses inférieures, l'activité est modérée (T/C = 150 % à 10 mg/kg et 140 % à 5 mg/kg).

Au vu des rapports T/C obtenus, l'hybride (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**25**) montre une activité antitumorale aussi grande que celle de la mitoxantrone (230% et 190% respectivement). Mais la comparaison des courbes de survie ne permet pas d'établir une différence significative. On peut aussi noter que cette activité est obtenue avec une dose beaucoup plus grande (25 mg/kg) par rapport à la mitoxantrone (1,6 mg/kg)

Aucune perte de poids chez les souris n'a été observée après l'administration de ce dérivé, même à la dose la plus forte (25 mg/kg). On peut ainsi conclure que l'activité, aux doses testées, ne s'accompagne pas de toxicité immédiate.

## Discussion

Le but de cette étude était d'explorer l'effet sur l'affinité et l'activité biologique des 5,8-dihydroxy-9,10-anthracènediones substituées en 1, 4 par des peptides chélateurs par l'intermédiaire d'un bras espaceur diaminoéthyle à la place du groupement aminoéthylaminoéthanol de la mitoxantrone. L'activité des anthracènediones, semblables à celle étudiée, est basée sur la présence des deux parties de la molécule. D'une part, le squelette anthracènedione qui agit en tant qu'intercalant de la double hélice d'ADN, d'autre part, les chaînes latérales en positions 1 et 4 qui peuvent jouer plusieurs rôles : solubilité, stabilisation de l'intercalation et/ou production d'espèces radicalaires.

L'intercalation du chromophore anthraquinonique a été mise en évidence par un ensemble de techniques physicochimiques variées : dénaturation thermique ( $\Delta T_m$ ), quenching de fluorescence ( $Q_{50}$ ) et viscosimétrie. Les études de dénaturation thermique démontrent clairement le rôle joué par le noyau anthraquinonique dans la stabilisation de la double hélice. Cet effet est du même ordre de grandeur que celui de la mitoxantrone ( $\Delta T_m = 15^\circ 9$  contre  $17^\circ 1$ ). Le degré de quenching de fluorescence est aussi similaire à celui de la molécule modèle ( $Q_{50} = 0,1 \mu\text{M}$  contre  $0,23 \mu\text{M}$ ). Ces résultats confirment ceux obtenus lors d'études antérieures sur les anthraquinones disubstituées en 1, 4. Le quenching est une technique très utile pour estimer l'affinité, mais il s'avère qu'elle n'est pas seulement sensible aux liaisons par intercalation. De ce fait, le recours à la technique de viscosimétrie, essentielle pour caractériser les intercalations classiques, a été nécessaire. L'angle de détorsion obtenu avec l'hybride (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ ( $10^\circ 97$ ) est faible, mais des angles aussi petits ont été décrits pour la doxorubicine ( $12^\circ$  ; Waring, 1981) et la daunorubicine ( $10^\circ$  ; Saucier et coll., 1971) ; ils reflètent à la fois les fortes influences changeant l'interaction entre le ligand intercalé et les deux paires de bases adjacentes ou bien l'existence de plusieurs types de site de liaison à l'ADN. Saucier et coll., (1971) rapportent que la daunorubicine induit une augmentation de la viscosité correspondant à une extension théorique de l'hélice de  $3,4 \text{ \AA}$ . Une valeur presque identique a été obtenue pour la mitoxantrone ( $3,26 \text{ \AA}$ ) mais pas pour (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ ( $2,45 \text{ \AA}$ ).

La complexation des métaux, en particulier le cuivre, est indispensable à la production de radicaux libres et à la coupure d'ADN qui en résulte. L'aptitude de (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ à complexer le cuivre a été vérifiée par RPE, ainsi que la production de radicaux libres hydroxyle qui s'ensuit. Mais, aucune coupure d'ADN n'a été décelée *in vitro* en présence de cuivre, eau oxygénée et ascorbate de sodium en tant qu'agent réducteur. Ce résultat est contradictoire avec ceux rapportés sur l'aptitude du tripeptide Gly-Gly-His à cliver l'ADN (Chiou, 1983 ; Mack et coll., 1988 ; Liang et coll.,

1995). L'introduction de chaînes latérales peptidiques encombrantes pouvait a priori gêner l'intercalation du chromophore mitoxantrone. Cette gêne est sans doute compensée par la formation probable de liaisons salines entre les lysines et les phosphates. On pouvait espérer générer les radicaux libres nécessaires à la coupure de l'ADN, ce qui n'a pas pu être démontré. L'apport des groupements peptidiques est en revanche vraisemblable pour justifier de l'activité des hybrides *in vivo*, les fractions Gly-Gly-L-His intervenant sans doute dans les processus de transport plasmatique et de transfert intramembranaires et de pénétration cellulaire.

Dans cette famille, une bonne activité biologique exige la présence d'un substituant éthylènediamine à la fois en position 1 et 4, l'hydroxylation du noyau aromatique en 5 et 8 potentialise cette activité. Les analogues ayant une seule chaîne latérale sont moins actifs, c'est le cas notamment du premier hybride de cette série GHK-DHQ. La faible activité de cet hybride *in vivo* peut aussi être expliquée soit par une dégradation rapide du peptide soit par une faible pénétration cellulaire. Il faut aussi noter que, suivant les relations structure-activité, l'augmentation de la chaîne carbonée entre les deux azotes basiques des chaînes latérales ou la substitution de l'azote terminal par des groupements volumineux aliphatiques ou aromatiques diminue l'activité antitumorale ou la supprime (Murdock et coll., 1979) car cet atome est très important pour l'activité. (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ possède une chaîne latérale éthylènediamine en 1 et 4 nécessaire à l'activité antitumorale (Cheng et Zee Cheng, 1983), en plus d'une chaîne peptidique Gly-Gly-His, plus lipophile, complètement différente par rapport au résidu aminoéthanol de la mitoxantrone. Malgré la taille du substituant sur l'azote, l'activité est maintenue comme le montrent les résultats obtenus lors des tests de l'activité cytotoxique *in vitro* et des tests de l'activité antitumorale *in vivo*. En effet, (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ est actif vis-à-vis de la leucémie P388 chez la souris. Néanmoins, son activité requiert des doses élevées. La valeur du rapport T/C atteint 230% pour une dose de 25 mg/kg qui est seulement obtenue avec la mitoxantrone ou avec des dérivés ayant au moins une chaîne aminoéthylaminoéthanol (T/C = 300 à 10 et 20 mg/kg ; Stefanska et coll., 1989) (T/C = 244 à 25 mg/kg ; Krapcho et al. 1991), ce qui suggérerait la nécessité d'une telle chaîne pour avoir des produits efficaces. Dans ce nouvel hybride, l'atome d'azote terminal n'est pas impliqué dans une liaison amine secondaire mais dans une liaison amide ce qui devrait empêcher la cyclisation de la chaîne latérale et ainsi empêcher la formation du métabolite car la molécule ne subira pas d'oxydation enzymatique.

L'ensemble de ces résultats a donné lieu à une publication (Morier-Teissier et coll., 1993).

## CHAPITRE IV

### *ANTHRAQUINONE-LIGAND DU PETIT SILLON*

## IV-1 Les antibiotiques de type pyrrole amidine : nétropsine et distamycine

Ce groupe d'antibiotiques interagissant avec l'ADN a pour chefs de file la nétropsine (Nt) et la distamycine-A (Dst) (fig 69). La Nt a été isolée à partir de *Streptomyces netropsis* (Finlay et coll., 1951). La Dst, quant à elle, est le produit essentiel de fermentation de *Streptomyces distallicus* (Arcamone et coll., 1958). Tous ces antibiotiques de type pyrrole amidine possèdent des activités antibactériennes et antivirales.

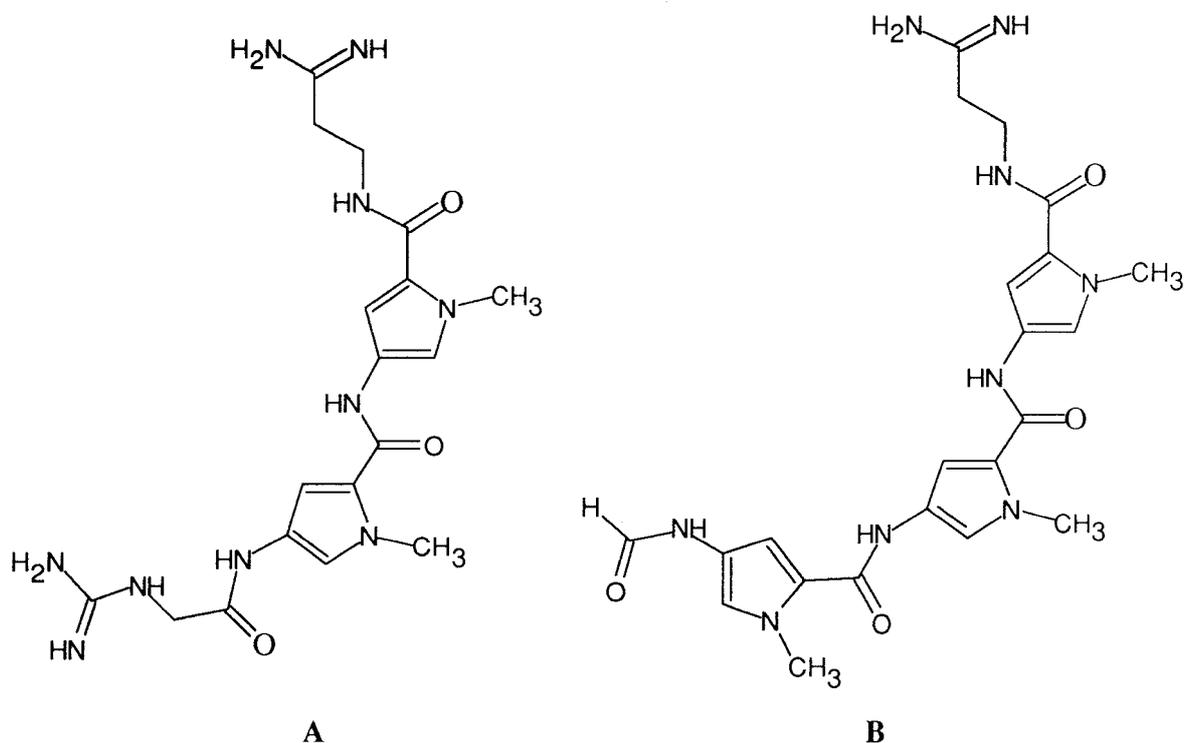


Figure 69 : Structures chimiques de la nétropsine (A) et de la distamycine (B).

### IV-1-1 Structures chimiques et propriétés physiques :

La Nt présente la structure indiquée (fig 69), définitivement confirmée par analyse chimique et synthèse totale (Lown et Krowicki, 1985). La structure chimique de la Dst a été établie par dégradation chimique (Arcamone et coll., 1964, 1967), puis par synthèse totale (Grehn et Ragnarsson, 1981 ; Lown et Krowicki, 1985). Ces deux structures sont très proches et comportent :

- une partie centrale composée de noyaux N-méthylpyrrole (deux pour la Nt et trois pour la Dst) reliés entre eux par des liaisons peptidiques,

- d'un côté des noyaux N-méthylpyrrole centraux une chaîne propionamidinium,
- de l'autre côté une chaîne à fonction guanidinium pour la Nt et un groupement formamide pour la Dst.

Du point de vue stéréochimique, une étude en RMN-<sup>1</sup>H de la Dst (Turchin et coll., 1977) a permis de montrer que l'enchaînement N-méthylpyrrole carboxamide possède une conformation trans pour les liaisons conjuguées C(3)=C(2)-C=O alors que l'ensemble CO-NH-C(4)=C(5) adopte une conformation cisoïde (fig 69). Il existe cependant quelques degrés de liberté rotationnelle au niveau des liaisons entre les noyaux N-méthylpyrrole qui favorisent la liaison de la molécule à l'ADN.

D'intéressantes informations sur les facteurs nécessaires à la liaison de ces molécules à la double hélice d'ADN ont été obtenues par diffraction de rayons X (Berman et coll., 1979) et par dichroïsme linéaire (Forni et coll., 1989). Ainsi, on constate que l'ensemble bispyrrolcarboxamide n'est pas plan, les deux noyaux pyrrole formant un angle dièdre de 20°. La stéréochimie de la Nt confère au squelette oligopeptidique une forme incurvée présentant une face concave avec les groupes amides liés à des molécules d'eau par des liaisons hydrogène et une face convexe constituée par les résidus carbonyles et méthyles (fig 69). Cette disposition permet la formation de zones hydrophobes (groupes carbonyles et méthyles) et de zones hydrophiles (atomes d'azote des groupements amides) ; une telle conformation s'est avérée indispensable à la fixation de la molécule sur l'ADN (Manning et Woody, 1986). Alors que la fonction guanidinium est dans le plan du noyau pyrrole voisin, l'amidinium est presque perpendiculaire au plan général de la molécule. Il est donc concevable que la Nt plane et courbée puisse se glisser dans le petit sillon étroit et profond.

## IV-1-2 Interaction avec l'ADN

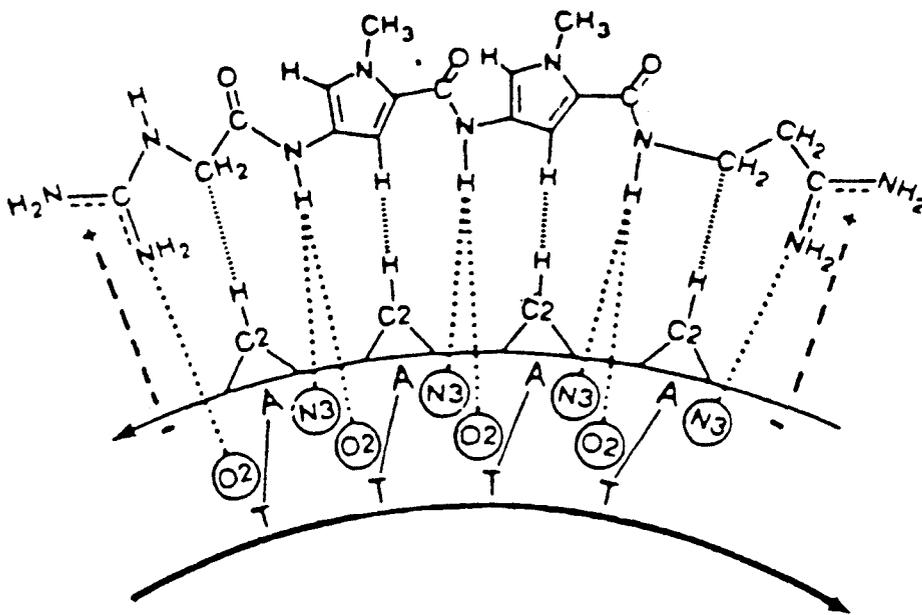
### IV-1-2-1 Spécificité de liaison et mode d'interaction

Les spécificités de fixation de la Nt et de la Dst ont fait l'objet de nombreuses études théoriques, de diffraction de rayons X, de RMN, de fluorescence et de spectroscopie IR et UV qui ont montré les modalités de liaisons entre ces composés et le biopolymère.

La Nt et la Dst se lient dans le petit sillon de l'ADN double brin en conformation B avec une préférence pour les régions riches en séquences adénine-thymine

de l'ADN (Zimmer et coll., 1970, 1971 ; Chandra et coll., 1971 ; Luck et coll., 1974). La très faible fixation sur les conformères A et Z (Luck et Zimmer, 1973) s'accompagne d'une réversion de la forme A vers B et de la forme Z vers B (Ivanov et coll., 1974 ; Michenkova et Zimmer, 1980 ; Zimmer et coll., 1982). Il n'y a fixation ni sur un ADN simple brin ni sur les ARN double brin (Zimmer et Luck 1970).

L'utilisation d'oligonucléotides de synthèse ou de fragments nucléotidiques issus d'un ADN natif clivé par des enzymes de restriction en des sites prédéterminés a permis de mieux définir le type d'interaction Nt-ADN et Dst-ADN sur le plan moléculaire. Le rôle exact des différents groupements a pu être établi (fig 70, Lown et coll., 1986b).



**Figure 70 :** Représentation des liaisons impliquées dans la reconnaissance moléculaire de la Nt vis-à-vis de la séquence 3'-AAAA-5'

- (.....) liaisons hydrogène
- (|||||) contacts de Van der Waals
- (----) interactions électrostatiques

On constate l'existence de trois types d'interactions :

□ L'intervention d'interactions **électrostatiques** (interactions ioniques) entre un résidu phosphate de l'ADN et un groupement amidine ou guanidine chargé positivement a été mise en évidence. Cependant, la nétropsine-D (Nt-D) (fig 71), c'est-à-dire le fragment bispyrrole de la Nt dépourvu de chaînes latérales cationiques, est également capable de se lier à l'ADN avec toutefois une affinité moindre que la Nt

(Zimmer et coll., 1972). Les chaînes latérales ne sont donc pas indispensables à la fixation, mais permettent de consolider celle-ci et jouent un rôle dans la spécificité de liaison. Par ailleurs, dans d'autres séries chimiques sans liaisons amides, les molécules qui ont une spécificité AT pour le petit sillon sont des molécules biscationiques (Baguley, 1982).

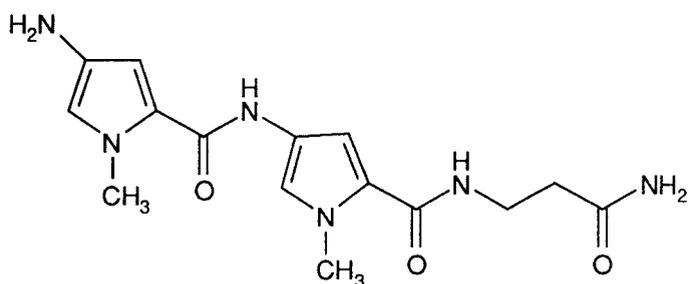


Figure 71 : Structure de la nétropsine-D (Nt-D)

Ce résultat a été confirmé par Debart et coll., (1989) lors d'études réalisées sur des composés analogues de la Nt (fig 72,  $\text{NO}_2\text{-(Py)}_n\text{-spermidine}$  (A) et guanidine( $\text{Py}$ ) $_n\text{-spermidine}$  (B)). Tous ces composés, possédant une chaîne spermidine, gardent la même capacité de liaison que la Nt au poly(dA-dT).poly(dA-dT) mais avec une moindre affinité. Les constantes d'association sont élevées pour les composés B ayant une fonction guanidinium. Ainsi, la disparition de la fonction guanidinium s'accompagne d'une perte d'affinité pour poly(dA-dT). D'autres composés de cette série, différant de la Nt par le changement de la fonction amidine, n'ont qu'une faible capacité de liaison. Ceci souligne l'importance de l'intégrité de la structure de la Nt pour sa spécificité de liaison A-T (Debart et coll., 1989).

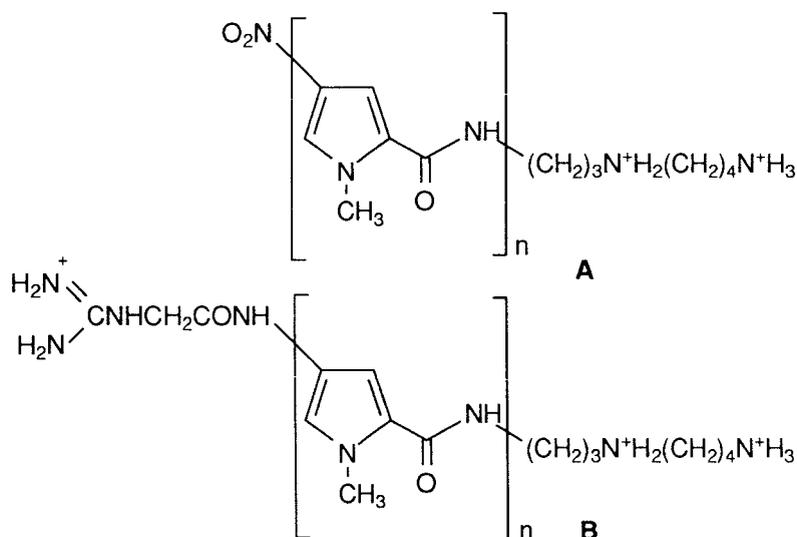


Figure 72 : Structures chimiques de quelques analogues de la Nt (Debart et coll., 1989).

$\text{NO}_2\text{-(Py)}_n\text{-spermidine}$  (A) ; guanidine( $\text{Py}$ ) $_n\text{-spermidine}$  (B) ;  $n = 1$  ou  $2$ .

□ L'intervention de **liaisons hydrogène**, s'est révélée d'une grande importance pour la stabilisation des complexes Nt-ADN et Dst-ADN (Luck et coll., 1974). Ces liaisons s'établissent entre les atomes d'azote des liaisons pseudopeptidiques et des fonctions cationiques d'une part, et les atomes O2 des résidus thymidine et l'azote N3 des résidus adénosine d'autre part. Outre leur rôle de stabilisateurs énergétiques, elles permettent dans une certaine mesure le bon positionnement de la Nt et de la Dst vis-à-vis du petit sillon (Kopka et coll., 1985 a,b ; Coll et coll., 1987 ; Rhee et coll., 1993). Il est intéressant de noter à ce sujet que la Nt et la Dst se fixent dans le petit sillon dans des régions riches en résidus AT en mimant le réseau des molécules d'eau du petit sillon : les NH amidiques en pontant les bases adjacentes par des liaisons hydrogène à trois centres, jouent le rôle de première couche d'hydratation tandis que le squelette pyrrolique, en connectant ces fonctions amides, simule le rôle de la seconde couche d'hydratation (Marky et coll., 1983). Ce réseau est très important pour la stabilisation de la double hélice d'ADN en conformation B. Son déplacement constitue le premier processus dans la formation du complexe ADN-Nt (Kopka et coll., 1985 a,b).

□ L'intervention de **contacts de Van der Waals** (liaisons de faible énergie) est aussi à noter. Sont mis en jeu des protons hétérocycliques ou des résidus éthylène terminaux de la Nt ou de la Dst et les protons hétérocycliques des bases (le CH<sub>2</sub> de l'adénine). C'est ce second processus qui est considéré comme l'élément gouvernant la spécificité de ces deux molécules (Kopka et coll., 1985 a,b ; Lee et coll., 1988).

Il a été suggéré que la spécificité de liaison A-T était principalement due à l'encombrement stérique du groupement amino en C2 d'une guanine qui empêche l'établissement de contacts avec l'hydrogène en C2 du pyrrole (Patel et coll., 1982 ; Kopka et coll., 1985 a,b ; Klevit et coll., 1986 ; Coll et coll., 1989). L'importance du groupement amino en C2 en tant qu'élément de reconnaissance pour les petites molécules dans le petit sillon de l'ADN a été clairement établi (Marchand et coll., 1992 ; Bailly et coll., 1993a, Bailly et Waring, 1995). Des molécules d'ADN dans lesquelles des résidus inosine (I) et/ou 2,6-diaminopurine (DAP) remplacent les résidus guanine (G) et/ou adénine (A) respectivement ont été utilisées pour étudier la spécificité de liaison de différents antibiotiques incluant la Nt. Pour tous les ligands du petit sillon étudiés, le processus de reconnaissance est altéré par le déplacement de ce groupement amino. Enfin, des études en IR à transformée de Fourier (Liquier et coll., 1989) et en RMN 2D (Pelton et Wemmer, 1988) de complexes Nt-polynucléotides révèlent une interaction de type **stacking** (empilement) entre les hétérocycles pyrrole et l'atome d'oxygène O1' du désoxyribose de l'ADN. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une interaction de la Nt et de la Dst avec le petit sillon (Wartell et coll., 1974).

Des travaux en biologie moléculaire ont montré que des ligands intercalants ou non intercalants se liant spécifiquement à l'ADN peuvent altérer la coupure de l'ADN par des agents de scission ou des enzymes telles que la DNase-I et II (Portugal, 1989). Ainsi, la technique des empreintes (ou footprinting) a été appliquée à la Nt (Portugal et Waring, 1987) et à la Dst (Fox et Waring, 1984 ; Taylor et coll., 1984 ; Churchill et coll., 1990). Ces antibiotiques protègent respectivement 4 et 5 paires de bases avec une spécificité pour les séquences dA-dT. Une étude récente de "footprinting" (Abu-Daya et coll., 1995) a examiné l'interaction de la Dst, la Nt, le bérénil et Hoechst 33258 avec des fragments synthétiques d'ADN contenant différents arrangements (A/T)<sub>4</sub>. L'analyse quantitative du footprinting à la DNAase I montre que les arrangements AATT et AAAA sont des meilleurs sites de liaison par rapport aux TTAA et TATA. Cette différence de liaison est interprétée en terme de largeur du petit sillon et suggère que les dispositions TpA à l'intérieur des enchaînements AT diminue l'affinité de ces ligands (Abu-Daya et coll., 1995).

#### VI-1-2-2 Géométrie et dynamique

La liaison de la Nt et de la Dst-A à la double hélice nécessite un ADN en conformation B. Il a été montré qu'à un taux d'hydratation relativement faible (23%), conditions favorables à une forme A dans laquelle les bases sont inclinées par rapport au plan perpendiculaire à l'axe de l'hélice, la conformation B est stabilisée grâce à l'interaction avec la molécule de Nt (Luck et Zimmer, 1973 ; Michenkova et Zimmer, 1980). La Nt induit une augmentation de la longueur apparente de la double hélice pour de courts segments d'ADN de thymus de veau (14 Å par molécule de Nt liée à 20-30 paires de bases) à faible force ionique (Hogan et coll., 1979 ; Dattagupta et coll., 1980). L'augmentation de la longueur apparente de l'ADN pourrait résulter de l'induction d'une conversion entre deux conformations d'ADN induite par le Nt et due à des effets sur certaines séquences de l'ADN de thymus de veau. L'interaction Nt-petit sillon de l'ADN a des effets, d'une part sur l'ADN, la Nt forçant l'ouverture du petit sillon (passage de 0,5 à 2 Å) ; d'autre part, sur la Nt elle-même, l'angle entre les plans des deux noyaux pyrrole passant de 20° dans la Nt seule (Berman et coll., 1979) à 33° dans son complexe avec l'ADN (Kopka et coll., 1985 a,b). Ce changement d'orientation des deux cycles pyrrole plans est dû à des rotations des liaisons C pyrrole-CO et C pyrrole-NH. Ces résultats proviennent d'analyses par rayons X du complexe Nt-d(CGCGA ATTCGCG)<sub>2</sub> et ne tiennent pas compte de l'aspect dynamique de l'interaction. Des études en solution ont révélé que la Nt ne provoque pas de modifications conformationnelles importantes au niveau de la zone centrale de fixation AATT mais induit des altérations de la conformation des régions adjacentes (Patel et coll., 1982).

## IV-1-2-3 Constantes d'association et aspects thermodynamiques

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

	ADN	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	Références
Nt	Thymus de veau	$2,9 \times 10^5$	Luck et coll., 1974
	poly(dA)-poly(dT)	$4,9 \times 10^5$	Wartell et coll., 1974
	poly(dA-dT)-poly(dA-dT)	$4,0 \times 10^5$	Wartell et coll., 1974
Dst	Thymus de veau	$1,2 \times 10^6$	Luck et coll., 1974

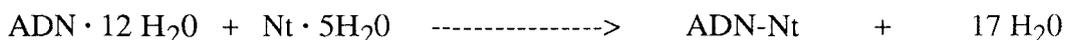
Cependant, la sélectivité n'est pas absolue, une fixation sur les régions dG-dC est observée à forte concentration. Mais par exemple, l'étude de l'interaction Nt-d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> par RMN-<sup>1</sup>H révèle que la Nt se fixe sur les séquences centrales AATT sans induire de déplacement des protons des bases G ou C (Patel et coll., 1982 ; Klevit et coll., 1986). D'une manière générale, plus la portion nucléotidique dA-dT est longue, plus la fixation est intense. La sélectivité peut être schématisée de la manière suivante :



L'étude par "footprinting" à la DNAase I de l'interaction de la Nt et de la Dst avec le nucléotide (GCCG(A/T)<sub>4</sub>GCCG) a permis la mise en évidence de la préférence de ces deux molécules pour les différents enchaînements (A/T)<sub>4</sub> (Abu-Daya et coll., 1995) :



La multiplicité et la nature des liaisons mises en jeu assurent la formation d'un complexe très stable. Le schéma réactionnel suivant a été proposé (Kopka et coll., 1985 a, b) basé sur des analyses aux rayons X :



La Nt, comme la Dst, se fixe à l'ADN en conformation B (les plateaux de bases sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice) en déplaçant le réseau de molécules d'eau stabilisant dans le petit sillon la séquence dA-dT. De cette fixation, 17 molécules d'eau sont libérées par résidu de Nt lié, ce qui explique l'importante variation d'entropie ( $\Delta S^\circ = +33,6 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) (Marky et coll., 1983 ; Marky et Breslauer, 1987 ; Chalikian et coll., 1994).

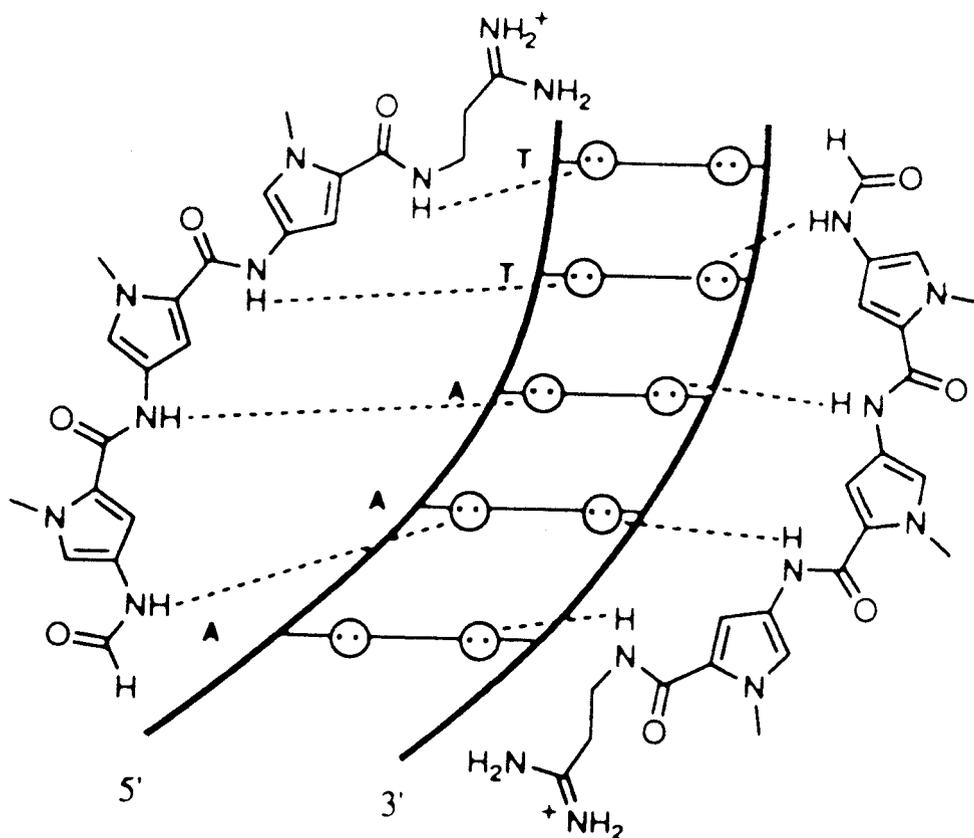
#### IV-1-2-4 Stoechiométrie

Du point de vue stoechiométrique, la Nt et la Dst couvrent respectivement quatre et cinq paires de bases (Kopka et coll., 1985 a,b ; Coll et coll., 1989). Cependant, une étude récente de diffraction aux rayons X de l'interaction entre la Nt et l'oligonucléotide d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub>, contenant une séquence AT plus longue (Taberero et coll., 1993 ; Goodsell et coll., 1995) montre que la Nt se lie dans le petit sillon de ce fragment en couvrant cinq des six paires de bases au lieu de quatre lors de son interaction avec l'oligonucléotide d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (Kopka et coll., 1985a, b). Ainsi, cette séquence AT plus longue permet à la Nt de se lier dans une position qui optimise ses contacts avec l'ADN. Par ailleurs, la molécule n'est plus courbée au niveau de l'azote central N6, distant de 2,7 et 3,7 Å de deux thymine contre 3,54 et 3,86 Å pour la séquence AATT (Kopka et coll., 1985a). De plus, la fonction amidinium n'interagit plus avec les bases de l'ADN car elle est légèrement en dehors du petit sillon. Ainsi, lors de son interaction avec cet oligonucléotide, la fonction amidinium de la Nt semble moins impliquée dans la liaison avec l'ADN que la fonction guanidinium.

Par ailleurs, un complexe mettant en jeu deux molécules de Dst pour une séquence nucléotidique de type AT (complexe 2:1) a été mis en évidence par RMN-2D (Pelton et Wemmer, 1990) puis par dichroïsme circulaire (Capobianco et coll., 1991). Ce même type de complexe a été observé récemment lors d'études RMN-2D effectuées sur des analogues de la Dst (Animati et coll., 1995). En effet, Pelton et Wemmer ont montré par RMN-2D que seul un complexe 2:1 existe entre la Dst et l'oligonucléotide d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub> pour un rapport Dst/ADN=2. Fagan et Wemmer (1992), en étudiant la liaison de la Dst avec l'oligonucléotide d(CGCAATATATGCG)<sub>2</sub> ont remarqué que le complexe 2:1 se formait pour un rapport Dst/ADN=0,25, c'est-à-dire avec un rapport inférieur au précédent. Selon les auteurs, cette différence s'explique par le fait que ce mode de liaison nécessite un élargissement du petit sillon d'environ 3,5 Å afin de pouvoir lier la seconde molécule. Or, le petit sillon de la séquence ATATAT est plus large

2:1 qu'un complexe 1:1. Dans ce complexe 2:1 les deux molécules sont placées l'une en face de l'autre dans une orientation "tête-bêche".

A partir de ces résultats Mrksich et Dervan (1993) ont proposé un modèle structural dans lequel chaque Dst forme des liaisons hydrogène avec un seul brin de l'oligonucléotide (fig 73).



**Figure 73 :** Structure supposée du complexe 2:1 Dst:5'-AAATT-3' (Mrksich et Dervan, 1993). Les cercles représentent les atomes O<sup>2</sup> de T ou C ou N<sup>3</sup> de A et (----) les liaisons hydrogène.

### IV-1-3 Activité biologique

La Nt et la Dst ont un spectre d'activité très large. Ces composés ont essentiellement des propriétés antivirales et antibactériennes très marquées (Fournel et coll., 1965). La Dst possède également des propriétés antimitotiques et antitumorales très faibles. Cependant, la toxicité de ces deux molécules empêche leur utilisation en clinique, la Dst induisant notamment des altérations chromosomiques (Schmid et coll., 1980 ; Ochi et coll., 1988).

Elles exercent leurs effets *in vivo* en interférant avec les fonctions de régulation de l'ADN et le mécanisme de synthèse de l'ADN (Baguley, 1982 ; Bruzik et coll., 1987). Les protéines qui se lient à l'ADN se fixent en général dans le grand sillon (Takeda et coll., 1983 ; Ollis et White, 1987) alors que la Nt et la Dst-A sont spécifiques du petit sillon. La perturbation des fonctions de régulation de la biosynthèse des acides nucléiques n'est donc pas due au masquage direct des sites de fixation des protéines mais aux modifications de conformation spatiale de l'ADN induites par la fixation du ligand dans le petit sillon (Neidle et coll., 1987). Ainsi, il a été montré que la fixation de la Dst pouvait empêcher celle d'un facteur de transcription (Chiang et coll., 1994 ; Feriotta et coll., 1994, 1995). La Nt et la Dst sont aussi capables d'entraver l'activité des topoisomérases I et II (Bailly et Hénichart, 1991, 1994) et celle de l'ADN-gyrase (Simon et coll., 1994).

L'ADN est la cible indispensable pour que l'effet cytostatique de ces molécules s'exerce. Cependant, l'activité biologique est parfois totalement indépendante de la capacité de la molécule à se lier à l'ADN ; ainsi la Dst-A empêche la pénétration de constituants indispensables au métabolisme de la bactérie *Bacillus subtilis* en se fixant sur la paroi au niveau de récepteurs spécifiques. La Dst ne pénètre pas dans la cellule et n'interagit pas avec l'ADN (Mazza et coll., 1973 ; Siccardi et coll., 1975). Ceci illustre bien la difficulté à établir des relations entre la capacité de liaison à l'ADN et l'activité biologique.

### IV-2 Design de nouveaux ligands séquence-spécifiques

Les modalités d'interaction de la Nt et de la Dst responsables de leur haute reconnaissance spécifique à l'ADN ont constitué des bases solides pour la conception de nouvelles molécules séquence-spécifiques.

Une certaine spécificité GC a été recherchée en modifiant les structures de la Nt et de la Dst. A ce propos on peut citer les travaux de l'équipe de Lown qui ont mené à l'élaboration

de "lexitropsines" ou "sequence reading oligopeptides". Ces molécules diffèrent du modèle naturel Nt par le remplacement d'un ou deux noyaux pyrrole par d'autres hétérocycles : imidazole, thiazole ou triazole (susceptibles par leur doublets libres d'établir des liaisons hydrogène avec le groupement NH<sub>2</sub> d'une guanine), par la suppression du guanidinium N-terminal ou par la suppression d'un méthylène à proximité de l'amidinium C-terminal (Lown, 1988, 1995). Les trois classes de lexitropsines ont révélé une spécificité de liaison altérée comparativement à celle de la Nt. Une évolution vers la reconnaissance de sites GC a été observée ; néanmoins leur liaison a lieu en de très nombreux sites de séquences variables sans mettre en évidence aucun site de fixation largement préférentiel. De plus l'affinité globale pour l'ADN devient faible. Ainsi l'approche "lexitropsines" s'avère limitée.

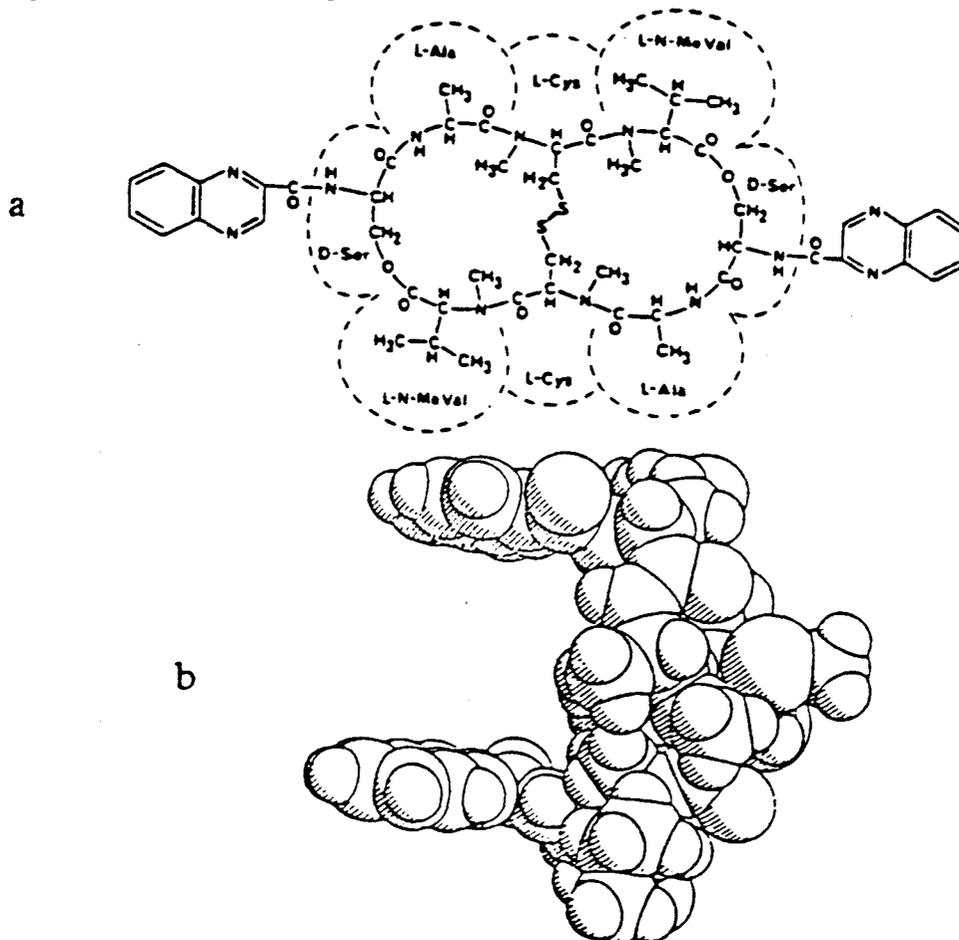
La Dst est capable de former un complexe 2:1 avec des oligonucléotides courts (Pelton et Wemmer, 1990 ; Fagan et Wemmer, 1992). Cette découverte a immédiatement inspiré la conception de ligands homo ou hétérodimériques. Des lexitropsines contenant des noyaux imidazole et pyridine ont été couplées afin de permettre une interaction directe avec les bases GC par l'intermédiaire de liaisons hydrogène avec le groupement amino en 2 de la guanine (Wade et coll., 1993 ; Geierstanger et coll., 1993, 1994 ; Mrksich et Dervan, 1995). La sélectivité, l'affinité et la géométrie des complexes 2:1 peuvent être optimisées par un choix judicieux de deux ligands ayant des propriétés de reconnaissance complémentaires puis leur jonction par l'intermédiaire d'une liaison covalente (Mrksich et Dervan, 1993, 1994 ; Mrksich et coll., 1994).

De même, des analogues du modèle Nt ont été synthétisés pour augmenter la taille du site de fixation. Le nombre de motifs N-méthylpyrrole (le plus petit élément de reconnaissance AT spécifique) a été augmenté (Debart et coll., 1989) ; il a ainsi été démontré qu'un nombre de six motifs est la limite supérieure à ne pas dépasser pour conserver une structure adaptée à la géométrie du petit sillon (Youngquist et Dervan, 1985a ; Goodsell et Dickerson, 1986). De ce fait, il s'est avéré nécessaire de garder la structure de la Nt ou de la Dst intacte et de coupler plusieurs motifs par des bras espaceurs adéquats. Ainsi, un bras espaceur hydrocarboné en C8 favorise la liaison simultanée de deux motifs Nt adjacents, l'acide fumarique (sous forme de diamide) celle de deux motifs Dst (Youngquist et Dervan, 1985b). Cependant, la flexibilité des connecteurs aliphatiques n'empêche pas la liaison d'un seul motif Nt. Des connecteurs plus rigides (Rao et coll., 1991) permettent aux dérivés bis-nétoprine de se fixer sur des séquences contenant 8 à 10 paires de bases AT consécutives.

## IV-3 Les hybrides ligands du petit sillon-intercalants

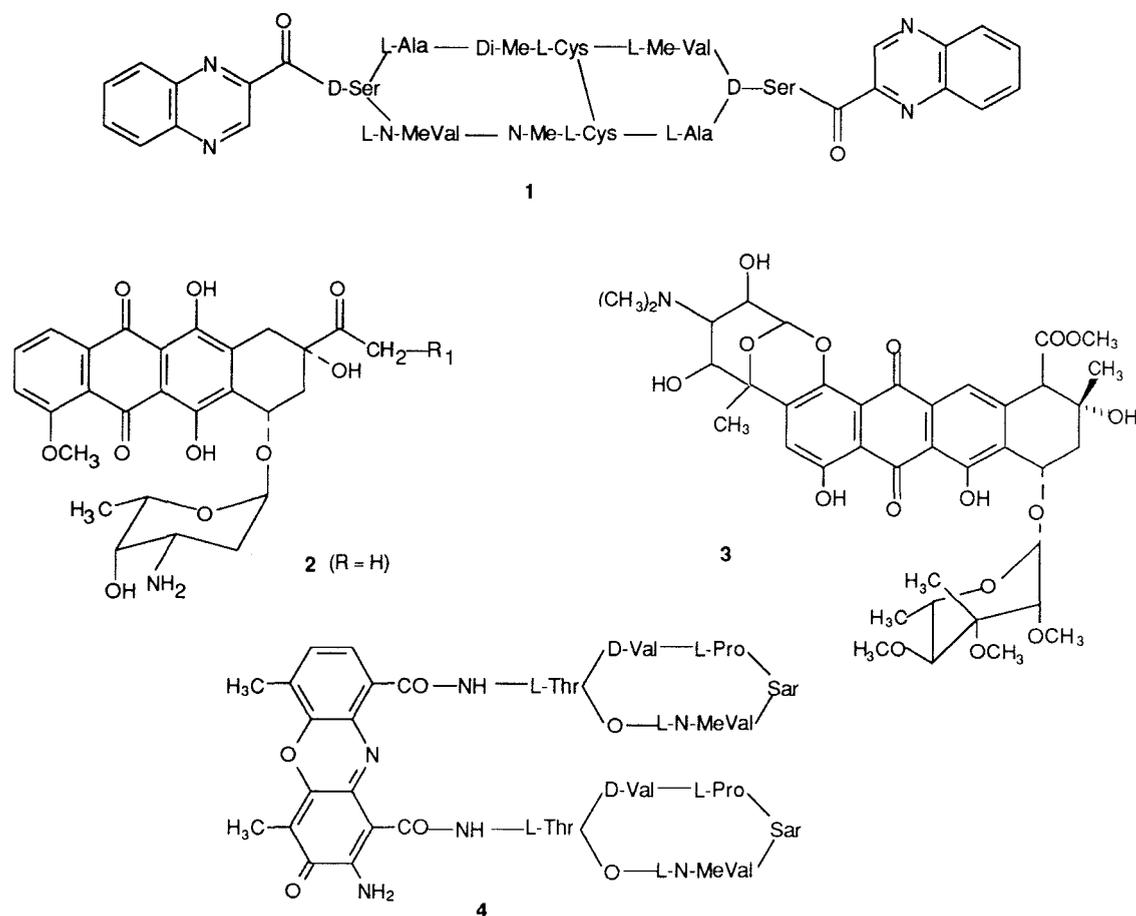
### IV-3-1 Les modèles naturels

C'est à partir de substances naturelles comme la triostine A (fig 74) et l'échinomycine (fig 75) que le concept intercalant-ligand du petit sillon a été développé. En effet, ces deux molécules sont deux antibiotiques antitumoraux capables de se lier à l'ADN à la fois par bis-intercalation de leur chromophore quinoxaline entre deux plateaux de bases G-C et par fixation dans le petit sillon du cyclodepsipeptide rigide au moyen de liaisons hydrogène et de contacts de Van der Waals (Wakelin, 1986 ; Waring, 1986, 1990). L'hexanucléotide GCATGC constitue la séquence spécifique de liaison de ces deux antibiotiques, spécificité directement induite par leur conformation en forme de pince (Wang et coll., 1984 ; Waring, 1986).



**Figure 74 :** Structure (a) et représentation moléculaire (b) de la triostine A.

La daunomycine et la nogalamycine sont deux représentants de la famille des anthracyclines (fig 75). Les études de l'interaction de la daunomycine avec l'ADN ont montré que la molécule reconnaissait préférentiellement les séquences 5'-ACG et 5'-TCG, avec le chromophore intercalé entre la paire GC et la partie glycanne liée dans le petit sillon par l'intermédiaire de liaisons hydrogène avec une base A ou une base T (Wang et coll., 1987 ; Gresh et coll., 1989 ; Chaires et coll., 1990).



**Figure 75 :** Structures spatiales de l'échinomycine 1, la daunomycine 2, la nogalamycine 3 et l'actinomycine D : 4.

La nogalamycine (fig75) se caractérisant par la présence de deux groupements glycanne attachés au chromophore interagit avec l'ADN d'une part par intercalation de la partie tétracyclique, d'autre part par liaison des glycannes au niveau du petit sillon et du grand sillon (Liaw et coll., 1989 ; Gao et coll., 1990 ; Williams et coll., 1990).

Un autre exemple est celui de l'actinomycine D (fig 75), agent antitumoral, constitué d'un noyau phénoxazone disubstitué par des pentapeptides cycliques et qui s'intercale grâce à son noyau phénoxazone (Takusagawa et coll., 1982 ; Brown et coll.,

1984 ; Van Dycke et coll., 1982). Les peptides cycliques se placent dans le petit sillon de part et d'autre du noyau intercalant, recouvrant chacun 3 paires de bases (Willkins, 1982 ; Lane et coll., 1983). Ces peptides concourent à la spécificité par le biais de liaisons hydrogène entre les fonctions amide de leurs résidus thréonine et les atomes N3 ainsi que les groupements amino des guanines. L'intercalation du noyau phénoxazone se produit de façon préférentielle au niveau de séquences 5'-GC.

Ainsi, cette dualité de fixation à l'ADN existe au sein de molécules naturelles à savoir :

- intercalation d'une partie hétérocyclique plane,
- fixation dans le petit sillon d'un fragment glycanique ou peptidique capable de former des liaisons hydrogène avec les bases nucléiques (Wakelin, 1986 ; Waring, 1990).

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

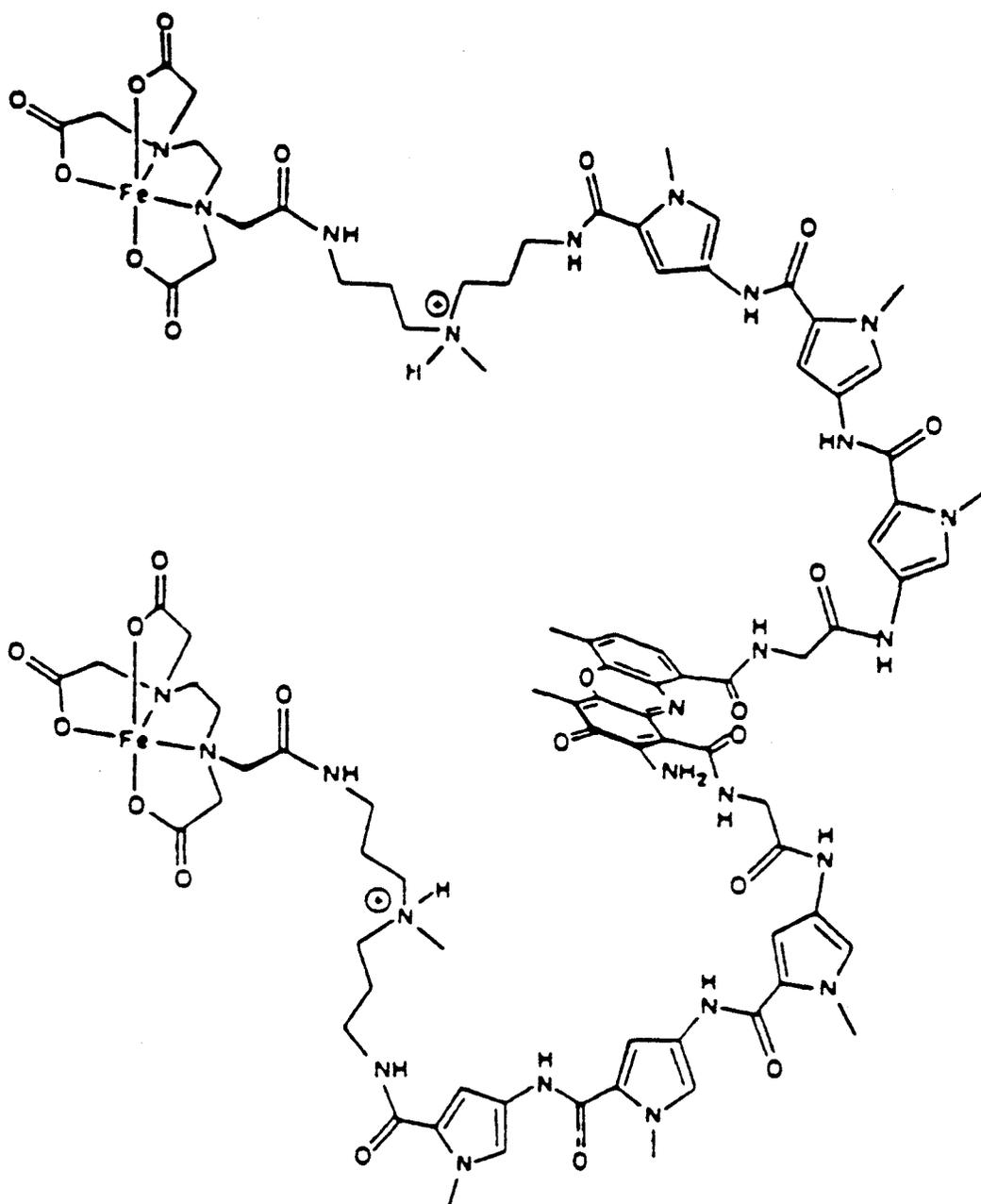
#### IV-3-2 Les premiers hybrides de synthèse

Les modèles naturels décrits précédemment ainsi que les études sur le mode d'interaction de l'actinomycine-D et de la Nt à l'ADN (Wartell et coll., 1975 ; Patel et coll., 1982 ; Lane et coll., 1983) ont permis de montrer que l'ADN peut accepter deux types de liaisons relativement proches l'un de l'autre malgré les différences de modifications de la conformation de l'ADN observées pour les intercalants et les ligands du petit sillon ; à savoir un écartement des plateaux de paires de bases (Neidle et coll., 1987) et élargissement du petit sillon (Klevit et coll., 1986 ; Carrando et coll., 1989). De plus, si de nombreux ligands du petit sillon (Nt, Dst, berénil, DAPI, Hoechst 33258) se fixent, par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, avec une très grande spécificité pour les enchaînements AT (Lane et coll., 1983 ; Portugal et Waring., 1987, 1988), des intercalants tels que les acridines, l'éthidium, les ellipticines ou les anthracènediones ont une préférence pour les enchaînements GC (Feigon et coll., 1984 ; Fox et Waring, 1987 ; Bailly et coll., 1990a, 1992b ; Baguley, 1991). Il semble intéressant pour le design de ligands séquence-spécifiques de lier de façon covalente deux entités de ce type :

- les hybrides obtenus devraient posséder une affinité pour l'ADN supérieure à celle des deux molécules modèles,

- ❑ la présence de l'intercalant pourrait apporter une contribution GC (Bailly et coll., 1990a ; 1992b) à la spécificité AT caractéristique des ligands du petit sillon,
- ❑ selon ces deux critères on est en droit de s'attendre à une activité biologique plus marquée des molécules hybrides.

Les premiers travaux réalisés dans cette optique sont dus à Krivstora et coll., (1984) et Dervan (1986). Les deux cyclopentapeptides de l'actinomycine D (fig 75) ont été remplacés par la fraction pseudopeptidique de la Dst sur laquelle a été attaché un agent de coupure EDTA-Fe(II) (fig 76). Les deux résidus EDTA en position N-terminal permettent de définir la séquence de fixation spécifique sur l'ADN par la technique de "DNA-affinity cleaving". Cette molécule peut se fixer sur un segment nucléotidique de 10 paires de bases (5'-TATAGGTTAA-3') ce qui témoigne d'une fixation totale de la molécule (Dervan, 1986). Mais la fixation principale a lieu sur des sites plus courts de 4 à 6 paires de bases en accord avec une intercalation et une fixation d'un seul résidu Dst sur l'ADN. Le dérivé dépourvu de bras espaceur glycyle ne présente aucune propriété d'intercalation (Krivstora et coll., 1984). Ceci montre l'importance de ces connecteurs reliant les fractions de tels hybrides dans la conformation de l'ensemble de ces molécules. Leur choix doit être judicieux afin de permettre la fixation simultanée des différents fragments.



**Figure 76 :** Structure de la bis[Fe(II).EDTA-distamycine]phénoxazone [BEDP.Fe(II)].

Compte tenu des observations relatives à la dualité de fixation des hybrides ligands du petit sillon-intercalants précédemment décrits, de tels hybrides reliant le pseudopeptide de type poly(N-méthylpyrrole carboxamide) à différents intercalants ont été élaborés au sein du laboratoire (Bailly et Hénichart, 1991 ; 1994 et références citées).

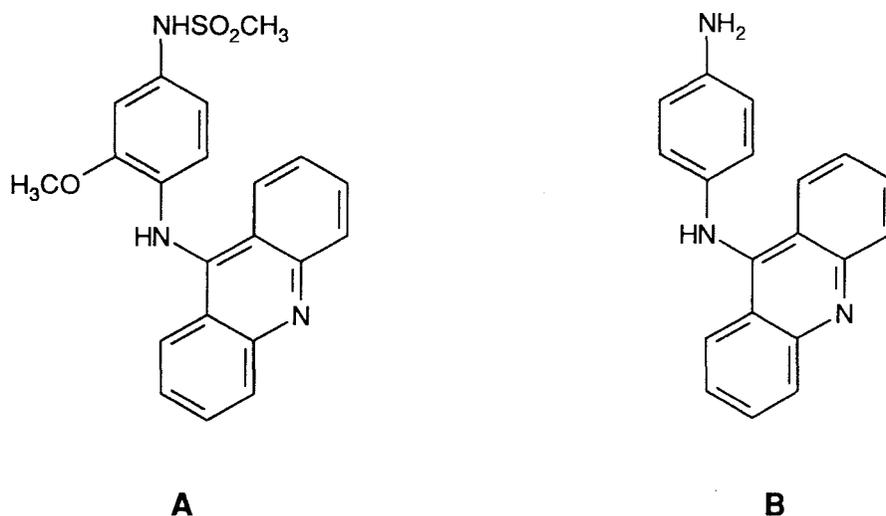
## IV-4 Les hybrides Nt/Dst-intercalants

### IV-4-1 Les dérivés acridiniques de la Nt et de la Dst

#### IV-4-1-1 L'hybride NetGA

Les premiers hybrides synthétisés (Eliadis et coll., 1988 ; Bailly et coll., 1989b) relient l' amino-9-acridine à la Nt et à la Dst par l'intermédiaire de bras espaceurs de nature et de longueur variable. Une série suivante correspond à des molécules composées d'un chromophore N-(p-anilino)-9-aminoacridine (fig 77, B) lié de façon covalente à un pseudopeptide à 1, 2 ou 3 résidus (N-méthylpyrrolecarboxamide) analogues de la Nt ou de la Dst (Bailly et coll., 1989b). Le chromophore N-(p-anilino)-9-aminoacridine a été choisi à plusieurs titres :

- ❑ l'acridine est un intercalant vrai (Waring, 1976) ;
- ❑ il est décrit comme étant GC spécifique (Feigon et coll., 1984) ;
- ❑ il se caractérise par l'intercalation du noyau acridine alors que le cycle aniline adjacent se loge dans le petit sillon (Wilson et coll., 1981) ;
- ❑ il est structurellement proche de l'amsacrine (fig 77, A) ; médicament antitumoral utilisé dans le traitement de certaines leucémies (Cassileth et Gale, 1986)
- ❑ il est capable de pénétrer rapidement dans la cellule et de se concentrer au niveau du noyau (Lemay et coll., 1983).



**Figure 77 :** Structures de l'amsacrine (A) et de la N-(p-anilino)-9-aminoacridine (B).

Les modèles CPK (Corey, Pauling, Koltun) ont montré que la fixation directe de la Nt sur l'aniline est défavorable pour la liaison à l'ADN et que la présence d'un bras espaceur est nécessaire. Le choix du bras espaceur s'est porté sur le même résidu glycine adopté par Dervan (1986) pour le dérivé Dst-phénoxazone-Dst. Ce connecteur devrait permettre l'ancrage dans le petit sillon selon une bonne orientation.

Les propriétés de liaison à l'ADN ont été étudiées en utilisant plusieurs techniques physico-chimiques et biochimiques (Bailly et coll., 1989b, 1990b). Les résultats de ces études démontrent la présence simultanée des deux mécanismes de liaison.

L'étude de l'interaction de NetGA (pour nétropsine-glycyl-anilinoamino-9 acridine) (fig 78), en particulier, révèle une intercalation partielle du noyau acridinique (Bailly et coll., 1990b) ce qui traduit l'influence de la partie Nt sur la liaison de l'acridine à l'ADN. NetGA se lie préférentiellement à la séquence 5'-AAAT-3'. Sur l'unique base de la spécificité de liaison à l'ADN, la partie intercalante peut paraître inutile puisque l'hybride est AT spécifique comme la Nt. Cependant, le chromophore intercalant permet un meilleur ancrage au niveau de la double hélice d'ADN. En effet, à faible rapport NetGA/ADN l'affinité de NetGA pour l'ADN ( $K_a = 9,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) est approximativement trois fois plus grande que celle de la Nt ( $K_a = 2,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) (Bailly et coll., 1990b). Ainsi la partie intercalante de NetGA compense efficacement l'absence de chaînes amidine et guanidine de la Nt. Les mêmes modalités de liaisons sont observées lors de l'interaction avec la chromatine (Bailly et coll., 1992a).

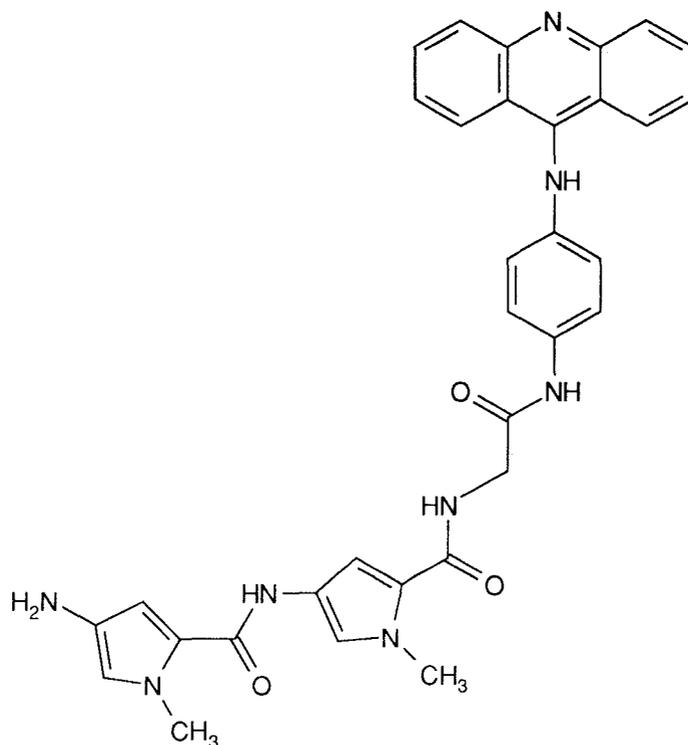


Figure 78 : Structure de l'hybride NetGA

Enfin, le composé NetGA possède un tropisme nucléaire marqué qui a été mis en évidence par l'étude en résonance paramagnétique électronique (RPE) de l'analogue porteur d'un marqueur de spin comme traceur (Bailly et Hénichart, 1990). Cette pénétration obéit à une cinétique intermédiaire entre celle de l'amino-9 acridine (pénétration rapide ; Lemay et coll., 1983) et de la Nt (processus lentement évolutif ; Bailly et coll., 1989a). NetGA inhibe l'activité catalytique de la topoisomérase II (enzyme impliquée dans la formation de structures chromatiniennes d'ordre supérieur) (Bailly et coll., 1992a). Sa capacité d'inhibition, voisine de celle de l'amsacrine, est tributaire de la fraction nétropsine. Ce composé présente aussi un bon pouvoir d'inhibition de croissance des cellules leucémiques *in vitro* ( $IC_{50} = 0,5 \mu M$  après quatre jours d'incubation) alors que son pouvoir cytotoxique est très faible (95% des cellules restent viables à  $0,5 \mu M$ ). Son activité *in vivo* reste assez modérée (Bailly et coll., 1992a).

#### IV-4-1-2 L'hybride NetAmsa

Afin d'améliorer le premier modèle NetGA, d'autres hybrides ont été conçus et étudiés au laboratoire. L'association des résidus pyrrole et acridine de l'amsacrine a lieu cette fois-ci par l'intermédiaire d'un bras espaceur aliphatique plus long et plus flexible que le résidu glycyle original (fig 79). L'ancrage de la fraction oligopeptidique est effectué en position 4 sur le noyau de l'acridine et non plus sur le groupement amino de l'aniline.

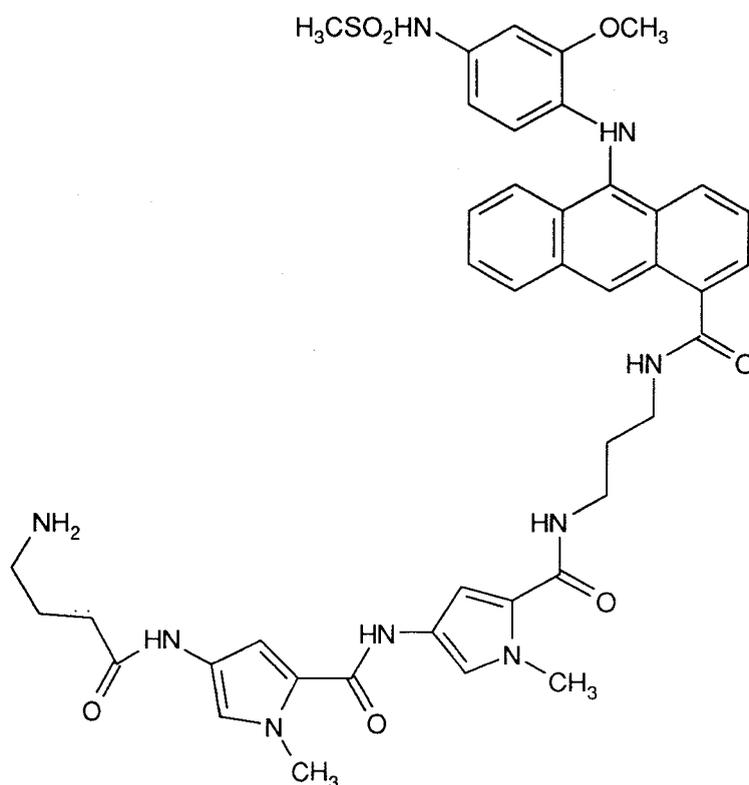


Figure 79 : Structure de l'hybride NetAmsa.

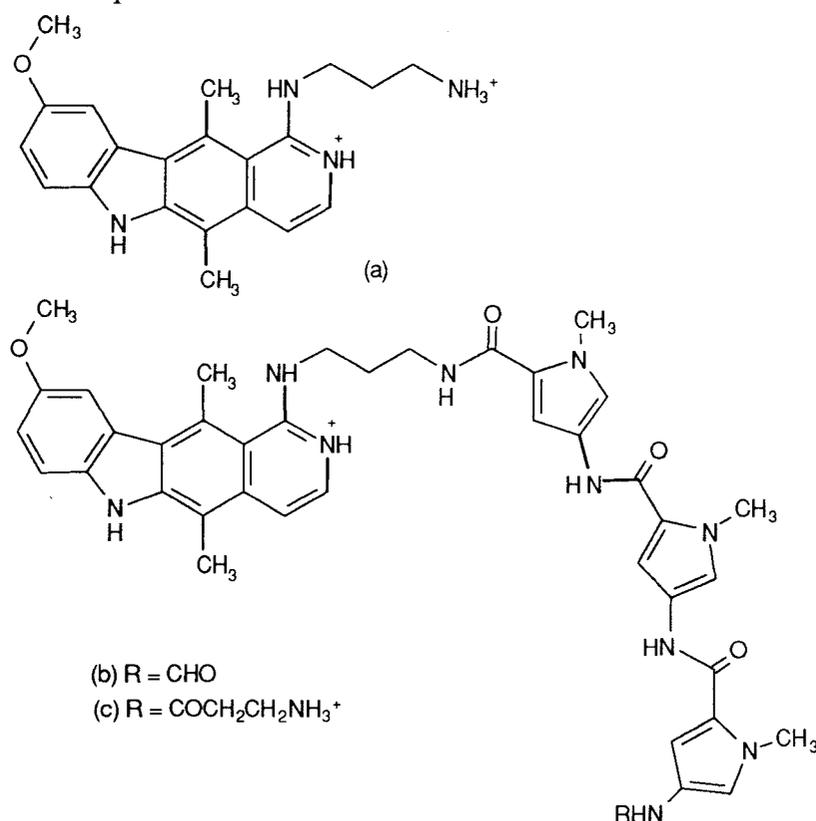
Une association de ces deux types de ligands a été réalisée dans le but d'obtenir un dérivé ayant plus d'affinité pour l'ADN doué d'une spécificité de liaison mais surtout capable d'induire des coupures oxydatives de l'ADN. En effet, la conservation de tout le résidu amsacrine notamment celle des substituants méthoxy ( $\text{OCH}_3$ ) et méthanesulfonamide ( $\text{NHSO}_2\text{CH}_3$ ) de l'aniline devrait apporter à ces hybrides les fonctions oxydatives caractéristiques de l'amsacrine. Ces fonctions sont responsables de la capacité de coupure de l'ADN par le biais de radicaux libres oxygénés produits en présence de cuivre (Wong et coll., 1984 a,b).

L'utilisation de différentes techniques physicochimiques (spectroscopie d'absorption, UV, fluorescence et dichroïsme linéaire électrique) et biochimiques (méthode des empreintes ou "footprinting") ont permis de mettre en évidence le caractère bimodal de l'interaction de NetAmsa avec l'ADN. Une nette amélioration par rapport à l'hybride précédent (NetGA) à été observée puisque le processus d'intercalation est quasi parfait, alors que pour NetGA l'intercalation n'était que partielle et la fixation incomplète. Le bras espaceur court de type propyle permet une interaction optimale avec l'ADN comparativement à celle obtenue avec le bras espaceur plus long de type hexyle. La méthode de "footprinting" a permis de mettre en évidence une rétention de la spécificité AT encore plus marquée que celle présentée par l'hybride NetGA.

L'oxydation de l'amsacrine en présence de cuivre a été confirmée expérimentalement chez l'hybride NetAmsa et reliée à un pouvoir de coupure de l'ADN. Enfin sur le plan pharmacologique, le dérivé NetAmsa selon les tests préliminaires est pratiquement inactif vis-à-vis des cellules leucémiques L1210 (Klupsch, 1991). Un autre type d'hybrides associant cette fois-ci le chromophore photoactivable isoalloxazine (flavine) lié à résidus bis- ou tris-(pyrrolecarboxamide) analogues de la Nt et de la Dst, par l'intermédiaire de connecteurs polyméthyléniques, sont aussi capables à la fois de reconnaître des séquences spécifiques et de cliver l'ADN (Herfeld et coll., 1994 ; Bouziane et coll., 1995).

#### IV-4-2 Les dérivés de l'ellipticine

Dans cette série, le choix de l'intercalant s'est porté sur un dérivé de l'ellipticine, 1-aminopropylamino ellipticine (fig 80, a), beaucoup plus cytotoxique que l'ellipticine naturelle vis-à-vis de plusieurs types de cellules tumorales (Ducrocq et coll., 1980). Ce dérivé s'intercale entre les paires de bases de l'ADN avec une spécificité GC (Bailly et coll., 1990a). Ainsi, la présence de cette chaîne alkylamine protonée potentialise l'affinité d'une part et offre l'opportunité d'introduire un groupement fonctionnel sur le chromophore de l'ellipticine d'autre part.



**Figure 80 :** Structure chimique du dérivé 1-aminopropylamino ellipticine (a) et des deux hybrides Distel (1+) (b) et Distel (2+) (c).

La Dst et l'ellipticine ont été liées par l'intermédiaire d'une fonction amide offrant de cette façon le premier hybride monocationique Distel (1+) (fig 80, b). Distel (1+) est capable de se lier à l'ADN selon les deux modes de liaison : intercalation et liaison dans le petit sillon (Bailly et coll., 1990a). Des études biochimiques et spectroscopiques complémentaires montrent que la liaison de l'hybride avec l'ADN est principalement guidée par la partie ellipticine (Bourdouxhe et coll., 1992). De plus, le degré d'intercalation du chromophore ellipticine varie avec la nature de la séquence cible (Bailly et coll., 1993a,b). Ainsi, Distel (1+) possède peu ou pas de sélectivité de séquence. Le chromophore ellipticine renforce l'affinité pour l'ADN aux dépens de la spécificité.

Des études de modélisation moléculaire ont permis la conception d'un nouvel hybride ellipticine-distamycine pourvu de propriétés de reconnaissance supérieures. Ces études avaient suggéré que l'addition d'une nouvelle charge positive sur le groupement terminal de la Dst devrait favoriser la liaison à des séquences AT (Bourdouxhe et coll., 1992).

L'hybride Distel (2+), dérivé bicationique (fig 80, c), a été étudié par plusieurs méthodes physicochimiques incluant la viscosimétrie, le dichroïsme linéaire et circulaire. Ces études démontrent le caractère bimodal de sa liaison à l'ADN, intercalation du chromophore plan d'une part et liaison dans le petit sillon de la partie Dst d'autre part. Les études de "footprinting" révèlent une grande spécificité AT (Bailly et al. 1994).

Des deux hybrides Distel (1+) et Distel (2+), seul le dérivé monocationique est capable d'inhiber l'activité des topoisomérases I et II. Le dérivé bicationique n'exerce aucun effet sur les topoisomérases I et II malgré ses propriétés de liaison à l'ADN supérieures à celles de son homologue monocationique (Riou et coll., 1995). De plus, Distel (1+) est très cytotoxique vis-à-vis des cellules leucémiques P388 alors que la Dst et Distel (2+) sont complètement inactifs. Cette différence de cytotoxicité n'est nullement due à une différence de pénétration à l'intérieur de la cellule, les deux hybrides étant capables de pénétrer dans la cellule et de s'accumuler dans le noyau (Bailly et coll., 1993b). La toxicité de Distel (1+) est attribuée à son activité sur la topoisomérase I puisque les cellules P388CPT5 résistantes à la camptothécine (inhibiteur puissant de la topoisomérase I) sont aussi résistantes à Distel (1+) (Riou et coll., 1995).

En conclusion, ces résultats suggèrent que :

- la force et la spécificité de liaison à l'ADN n'est pas nécessairement corrélée avec une inhibition de l'activité des topoisomérases, `

- des deux effets, liaison à l'ADN d'une part, et interaction sur les fonctions des topoisomérases d'autre part, c'est ce dernier effet qui semble important pour l'activité biologique,
  
- les molécules hybrides ligands du petit sillon-intercalants "combilexines" peuvent conduire à une nouvelle classe d'inhibiteurs des topoisomérases.

#### IV-5 Hybride anthraquinonique de la nétropsine : travaux réalisés

Etant donné l'intérêt de la mitoxantrone au regard de ses propriétés de liaisons à l'ADN et de son activité biologique (voir Chapitre I), nous avons réalisé la synthèse d'un nouvel hybride de la Nt (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ **43** combinant le noyau anthraquinonique de la mitoxantrone et le pseudopeptide dans le but de renforcer l'affinité de cette portion pseudopeptidique (fig 81).

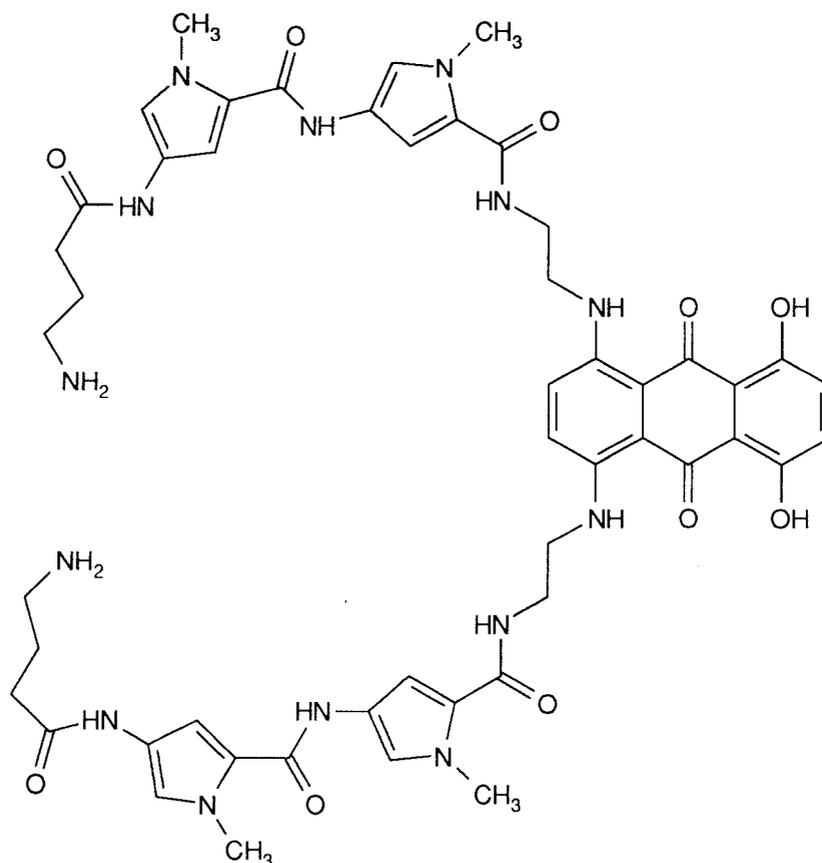


Figure 81 : Structure de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**43**).

La liaison de ces deux fragments se fait à l'aide d'un bras espaceur éthylène diamine dans lequel les deux atomes d'azote sont séparés par deux carbones comme dans la mitoxantrone. Les chaînes latérales amidine et guanidine de la Nt sont remplacées par un groupement aminopropyle. Ce choix se justifie par les résultats obtenus lors d'une étude ultérieure réalisée au laboratoire. Cette étude avait pour but d'évaluer le rôle des chaînes latérales amidine et guanidine dont on sait l'importance considérable (Zimmer et coll., 1971), notamment en ce qui concerne l'affinité vis-à-vis de l'ADN. Un analogue de la Nt

(Pseudo-Nt) dans lequel les chaînes latérales sont remplacées par des chaînes aminopropyle avait été synthétisé (Plouvier et coll., 1991) (fig 82).

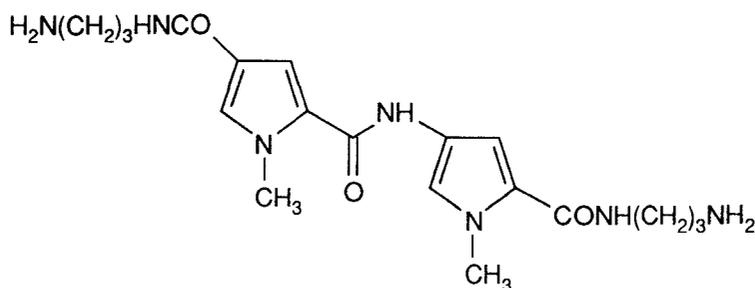


Figure 82: Structure de Pseudo-Nt.

Le remplacement de ces groupements fortement basiques par des groupes amines primaires entraîne une baisse sensible de l'affinité ( $K_a = 1,17 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  pour Pseudo-Nt au lieu de  $K_a = 2,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  pour la Nt) mais n'altère pas la spécificité.

#### IV-5-1 Stratégie de synthèse

L'acide N-méthyl-2-pyrrole carboxylique est estérifié par l'iodure de méthyle (fig 83). L'ester **31** est ensuite nitré par  $\text{HNO}_3$  (65%) dans l'anhydride acétique à froid (température  $\leq -15^\circ\text{C}$ ) (Grehn et Ragnarsson, 1981). Il se forme plusieurs isomères lors de cette réaction. Un contrôle strict de température durant l'addition de l'acide est nécessaire pour permettre d'obtenir le produit désiré avec un bon rendement. Plusieurs essais ont été réalisés en faisant varier le nombre d'équivalents  $\text{HNO}_3$  ajoutés. Le passage de 3,5 à 1,5 puis 1,2 équivalents n'a pas influé sur les rendements qui restent inférieurs à 30% mais diminue fortement le temps d'addition de l'acide nitrique qui doit s'effectuer très lentement (1 à 2 gouttes toutes les 10 minutes) afin de contrôler la température. La séparation des différents isomères se fait par chromatographie sur gel de silice (Bialer et coll., 1975).

Le nitro-ester **32** est réduit par hydrogénation catalytique pour donner l'amine **33** soit en présence de Nickel de Raney dans l'EtOH soit en présence de charbon palladié dans le MeOH. L'amine **33** extrêmement instable est protégée immédiatement sans isolement par un groupement Boc (tert-butyloxycarbonyle). La saponification de l'ester **34** en présence de soude méthanolique fournit l'acide **35** après acidification. La déprotection de l'amine se fait à l'aide de l'acide trifluoroacétique (TFA) et donne l'amine salifiée **36** stable contrairement à l'amine libre.

Le couplage de l'amine **36** avec l'acide **35** est réalisé avec le dicyclohexyl carbodiimide (DCC) ou le 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl] carbodiimide (EDC) (Grehn et coll., 1983, 1986) en présence d'une quantité catalytique de diméthylaminopyridine (DMAP) et de triéthylamine (Et<sub>3</sub>N). L'avantage de l'EDC réside dans l'hydrosolubilité de l'urée correspondante contrairement à la DCU. Les rendements des deux méthodes sont presque identiques (80% pour le DCC ; 76% pour l'EDC). Le groupement protecteur Boc du dimère **37** est clivé par le TFA pour donner l'amine salifiée **38** (Bailly et coll., 1989b) (fig 83).

L'acide 4-aminobutyrique protégé sur sa fonction amine par un groupement Boc (**39**) est couplé à l'amine salifiée **38** en présence de triéthylamine (Et<sub>3</sub>N) selon les mêmes protocoles décrits précédemment. L'ester **40** ainsi obtenu est saponifié en présence de soude pour fournir l'acide **41**. Ce dernier est couplé à l'amine **18** (DAE)<sub>2</sub>-DHQ par la méthode DCC/HOBt. Le composé **42** ainsi obtenu est alors traité par l'acide formique (à 98% dans l'eau) pour fournir le composé **43**. Le recours à l'acidolyse finale par l'acide formique pour la déprotection du composé **42** se justifie par le fait qu'un traitement en milieu acide plus fort (HBr/AcOH ou bien HCl/AcOH) entraîne la formation d'un mélange de produits de dégradation.

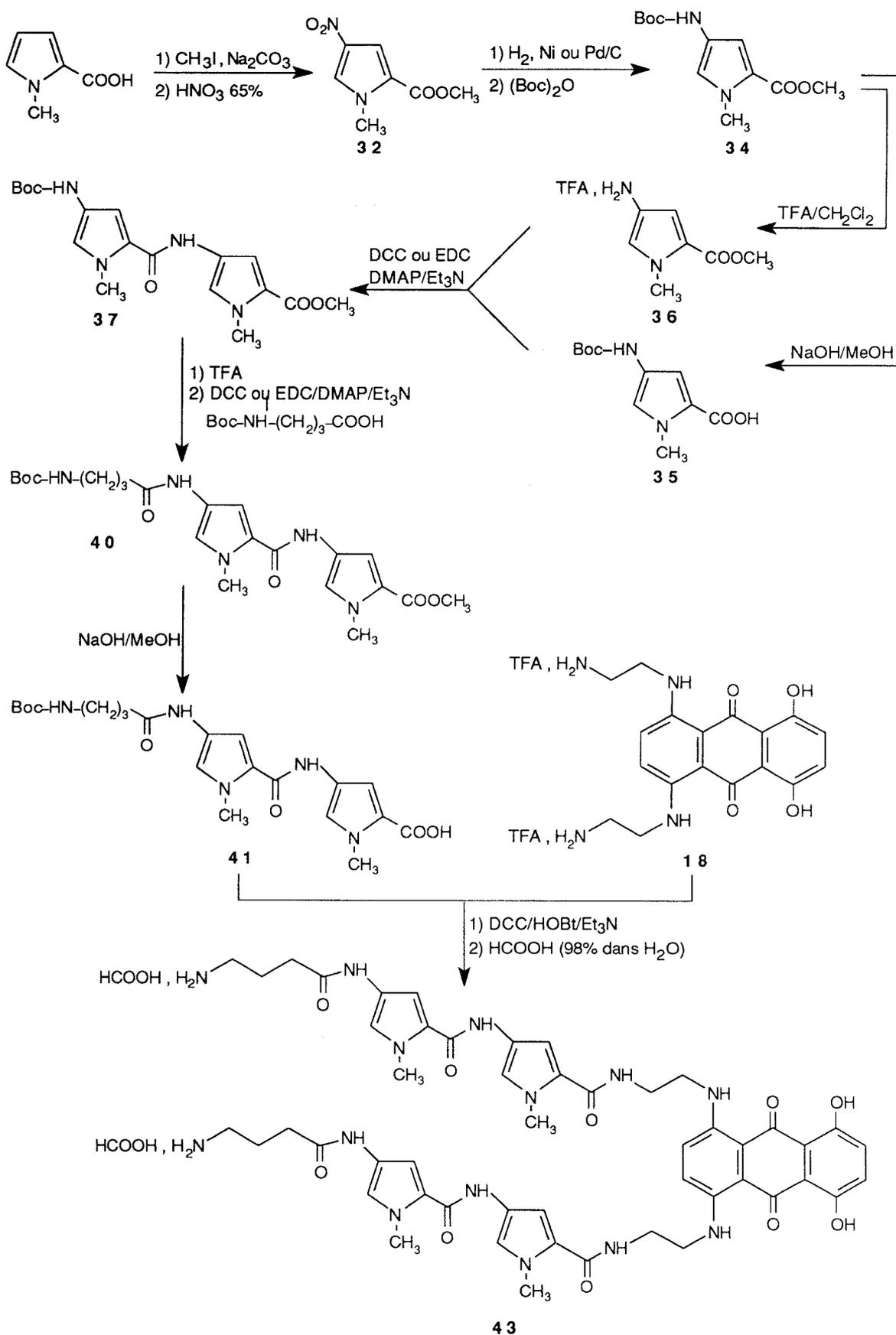


Figure 83 : Schéma de synthèse de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ (43).

En associant le chromophore anthraquinonique de la mitoxantrone avec deux entités Nt, on a aussi associé la sélectivité AT de la Nt à la préférence GC souvent observée avec des agents intercalants. Ainsi on devrait s'attendre à une spécificité de séquence de liaison bien précise. L'affinité devrait aussi être potentialisée par une telle association. Un tel complexe évoque le composé hybride appelé "distactine" qui consiste en une molécule d'actinomycine D dans laquelle deux résidus Dst sont liés de part et d'autre du noyau phénoxazone. Cet hybride, sous certaines conditions est capable de couvrir 10 paires de bases (Krivstora et coll., 1984 ; Dervan, 1986).

Avec le nouvel hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ plusieurs questions peuvent se poser :

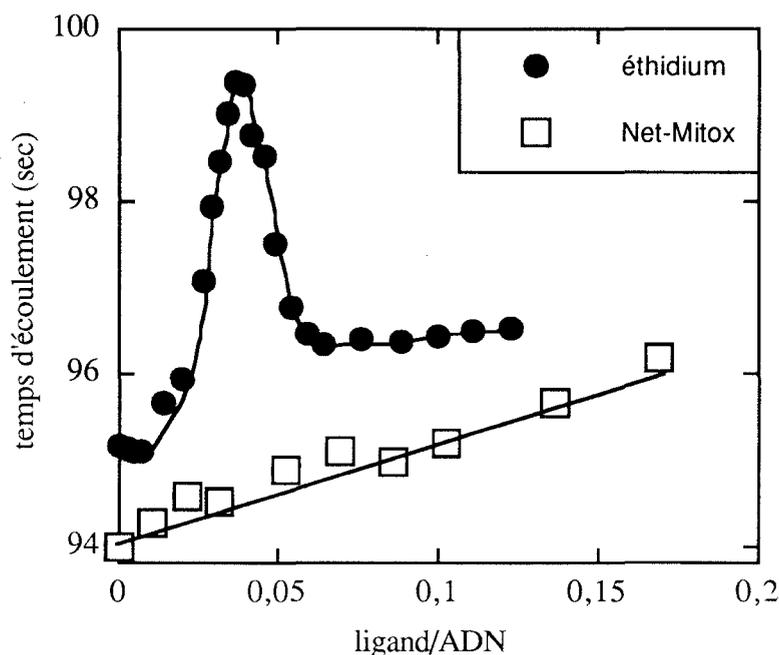
- l'une des deux parties de la molécule va-t-elle gouverner la liaison à l'ADN?
- dans quel sillon de l'ADN vont se positionner les deux résidus Nt après l'intercalation de la partie anthraquinonique? (si intercalation il y a)
- que sera la sélectivité de liaison de cet hybride vis-à-vis de l'ADN?

Afin de répondre à ces différentes questions, quatre techniques physico-chimiques et biochimiques complémentaires ont été utilisées, à savoir la viscosimétrie, les dichroïsmes linéaire et circulaire ainsi que la méthode des empreintes, pour étudier la liaison de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ à l'ADN. Ces expériences ont été réalisées par le Dr Christian BAILLY (INSERM, U124 Lille).

#### IV-5-2 Mode d'interaction avec l'ADN

##### \* Viscosimétrie

La courbe (fig 84) montre les variations de la superhélicité d'un ADN circulaire induites par l'addition de concentrations croissantes d'éthidium et de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ. Avec l'hybride, la courbe ne montre aucun changement du superenroulement de l'ADN plasmidique alors que l'éthidium, intercalant de référence, induit des variations significatives de la viscosité d'une solution d'ADN.



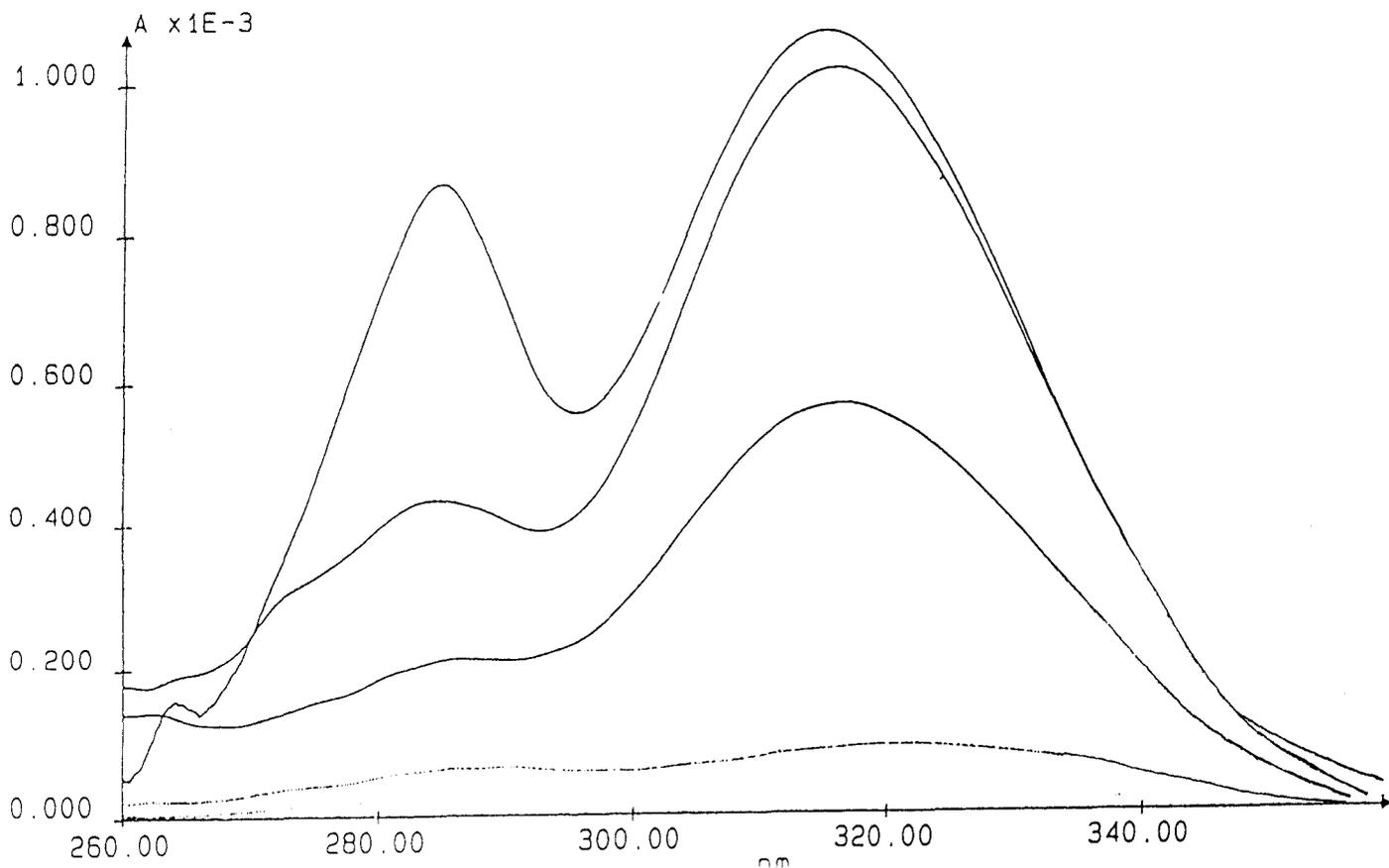
**Figure 84 :** Courbes de titration de la viscosité de l'ADN circulaire superenroulé avec l'éthidium (cercles) et l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ (carrés). La concentration en ADN est de 400  $\mu$ M. Les expériences sont réalisées à 25°C dans le tampon Tris 10 mM, NaCl 10 mM, pH7.

Ainsi, l'addition de cet hybride à un ADN plasmidique superenroulé ne provoque aucune détorsion de la double hélice contrairement aux intercalants et aux hybrides précédents [NetGA (Bailly et al. 1990b), NetAmsa (Klupsch, 1991) et Distel (1+) et (2+) (Bailly et coll., 1994)]. Ce résultat surprenant, nous laisse penser que l'hypothèse d'un processus d'intercalation pour l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ par l'intermédiaire de son chromophore anthraquinonique n'est vraisemblablement pas envisageable. Les deux entités, à savoir le noyau anthraquinonique et les deux résidus bispyrroliques de la Nt sont liés par bras espaceur éthylènediamine. Le composé (DAE)<sub>2</sub>-DHQ (**18**), étudié par viscosimétrie, s'est montré capable d'induire un angle de détorsion de 16°, valeur compatible avec une monointercalation (cf Chapitre II). L'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ ne semble pas s'intercaler, cette intercalation est sûrement gênée par les deux bras étendus présents de chaque côté du noyau plan.

Dans le but de mieux appréhender le processus d'interaction de cet hybride avec l'ADN des études de dichroïsme circulaire ont été réalisées.

\* Dichroïsme circulaire

Le ligand étudié n'a pas d'activité optique intrinsèque mais il devient optiquement actif lors de sa liaison avec l'ADN. Les mesures de dichroïsme circulaire de l'interaction de (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ avec l'ADN sont présentées par les courbes (fig 85).



**Figure 85:** Dichroïsme circulaire. Courbes de titration du dérivé (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ avec l'ADN de thymus de veau. Les rapport ligand/ADN sont de 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 et 10 (du bas vers le haut).

Ces courbes présentent deux bandes positives. Ces deux bandes, centrées sur 285 nm et 315 nm, résultent de l'activité optique induite par l'interaction hybride /ADN (dichroïsme circulaire extrinsèque). L'intensité de ces deux bandes augmente rapidement lorsque le rapport ligand/ADN augmente puis se stabilise lorsque ce rapport est élevé (fig 86).

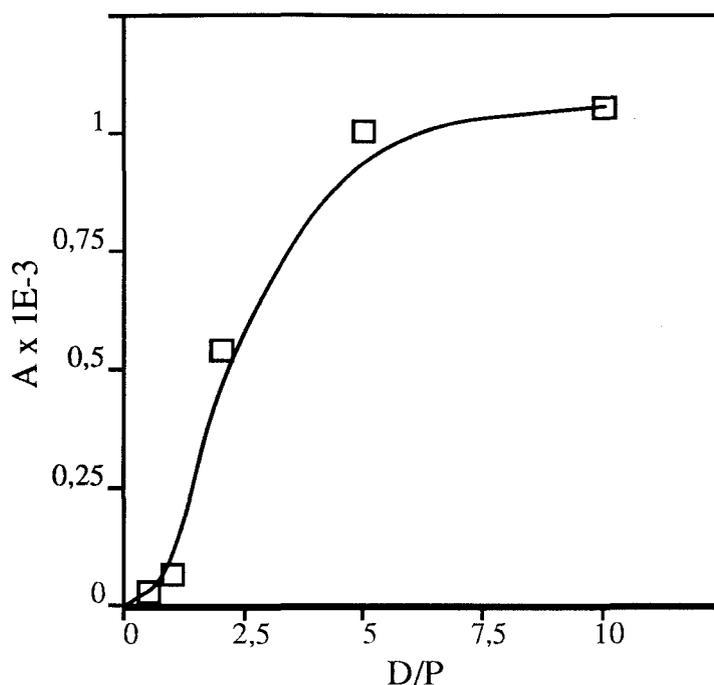


Figure 86: Variations du dichroïsme circulaire en fonction du rapport ligand/ADN (D/P).

Cette évolution est compatible avec celles de la Nt et de la Dst. En effet, le signal de dichroïsme augmente rapidement quand l'ADN est ajouté à des solutions de la Nt et de la Dst jusqu'à ce que la liaison totale à l'ADN soit obtenue (Zimmer et coll., 1970 ; Bourdouxhe et coll., 1994). Ceci témoigne donc de la liaison de la partie Nt de cet hybride avec l'ADN. Les signaux de dichroïsme circulaire sont détectés dans la bande entre 270-350 nm, région dans laquelle seule la partie Nt absorbe (la mitoxantrone absorbe entre 500 et 700 nm) ce qui simplifie l'interprétation. Aucun dichroïsme négatif n'a été détecté dans la bande d'absorption de la mitoxantrone. A partir de ces résultats, on peut dire que la liaison de cet hybride est dominée par la partie bispyrrolique de la Nt. Un tel résultat a été rapporté pour l'hybride Distel (2+) (Bailly et coll., 1994).

Pour avoir plus de détails quant à la formation du complexe (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ/ADN, nous avons fait appel à la technique de dichroïsme linéaire.

#### \* Dichroïsme linéaire électrique

Cette technique électro-optique est parfaitement adaptée à la détermination du mode de liaison de ligands hybrides de l'ADN. C'est un outil très intéressant pour définir l'orientation des ligands liés à l'ADN (Norden et Kurucsev, 1992 ; Colson et coll., 1995).

Le dichroïsme ( $\Delta A$ ) est défini comme une absorption différentielle observée quand un faisceau de lumière polarisée linéairement traverse un milieu anisotrope. Lorsqu'une solution d'ADN (milieu isotrope) est soumise à l'action d'un champ électrique, les molécules d'ADN s'orientent dans ce champ. Le grand axe de l'ADN se trouve (plus ou moins) parallèle à la direction du champ électrique. Une telle solution constitue un milieu anisotrope susceptible de fournir un dichroïsme ( $\Delta A$ ) mesuré à une longueur d'onde donnée et l'absorbance  $A$  de la solution en l'absence de champ électrique à la même longueur d'onde. Les ligands en interaction avec l'ADN suivent l'effet d'orientation du support macromoléculaire auquel ils sont fixés. Il s'ensuit 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. De façon schématique, on retiendra simplement qu'un dichroïsme négatif ( $\Delta A < 0$ ) témoigne d'une orientation du chromophore, plus ou moins perpendiculaire à l'axe de l'hélice d'ADN (c'est le cas des agents intercalants) alors qu'un dichroïsme positif ( $\Delta A > 0$ ) témoigne d'une fixation en périphérie de l'ADN, plus ou moins parallèle à l'axe (c'est le cas des composés se plaçant dans le petit sillon). Il faut noter également que seule la fraction de ligand liée à l'ADN s'oriente dans le champ électrique et contribue au signal.

Les spectres de dichroïsme linéaire électrique du composé hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ ainsi que celui de l'ADN et ceux des deux molécules parentes, la Nt et la mitoxantrone, ont été mesurés dans la bande caractéristique de chaque ligand et sont présentés fig 87.

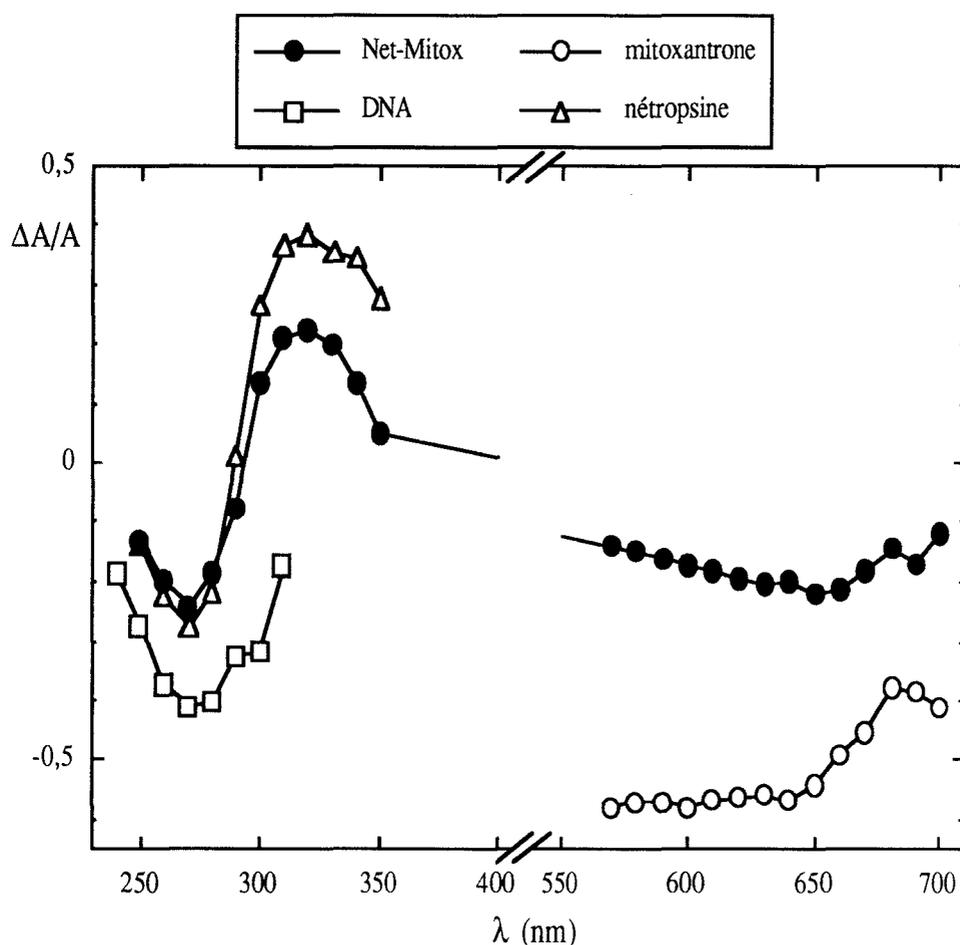


Figure 87 : Dichroïsme linéaire réduit  $\Delta A/A$  en fonction de la longueur d'onde (nm) de l'ADN seul et des complexes mitoxantrone/ADN; nétropsine/ADN et  $(\text{Net-DAE})_2\text{-DHQ/ADN}$  (Net-Mitox).

La mitoxantrone présente un dichroïsme négatif intense dans la région 570-640 nm en accord avec une orientation du chromophore anthraquinonique parallèle aux paires de bases de l'ADN, configuration compatible avec un mode de liaison par intercalation. La Nt quant à elle, présente un dichroïsme positif à 310 nm. Le spectre de dichroïsme linéaire du complexe  $(\text{Net-DAE})_2\text{-DHQ/ADN}$  présente une région négative (570-640), reflétant la position du chromophore anthraquinonique dans une région du complexe hybride/ADN où il n'y a pas de contribution de la partie bispyrrolique de la Nt. Le dichroïsme positif dans la région 300-350 nm est attribué à la partie bispyrrolique. Ainsi pour  $(\text{Net-DAE})_2\text{-DHQ}$ , il existe deux longueurs d'onde différentes (310 nm et 630 nm) qui permettent de distinguer les modes de liaison adoptés par les deux parties de la

molécule, la partie bispyrrolique (potentiellement ligand du petit sillon) et le chromophore anthraquinonique (potentiellement intercalant).

Cependant, le composé (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ se caractérise par un dichroïsme beaucoup moins négatif que celui de la mitoxantrone. La liaison de cet hybride dans la double hélice d'ADN par un processus d'intercalation semble très peu probable. Ce résultat corrobore celui de la viscosimétrie où aucune détorsion de la double hélice n'a pu être observée ainsi que celui du dichroïsme circulaire où aucun signal n'a été détecté au niveau de la bande d'absorption du chromophore anthraquinonique.

L'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ présente un dichroïsme positif dans la région 300-350 nm, légèrement moins positif que celui de la Nt. Il est vraisemblable que cet hybride et la Nt, qui présentent le même spectre de dichroïsme réduit, adoptent la même géométrie de liaison au niveau du petit sillon.

#### IV-5-3 Sélectivité de liaison

Dans le but de déterminer une sélectivité de liaison éventuelle le ligand hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ a été étudié par deux techniques différentes : le dichroïsme linéaire et la méthode des empreintes à l'aide d'un agent de coupure enzymatique la DNAase I.

##### \* Dichroïsme linéaire électrique

Il a été montré récemment que la technique de dichroïsme linéaire pouvait être utilisée pour avoir des informations concernant la sélectivité de séquences des ligands de l'ADN (Bailly et coll., 1993b ; 1994 ; Colson et coll., 1995). En effet, il est possible de comparer les valeurs de dichroïsme réduit pour chaque complexe en utilisant le rapport de dichroïsmes réduits (RD) :  $RD = [(\Delta A/A)^{\text{ligand-ADN}}] / [(\Delta A/A)^{\text{ADN}}]$ . Un rapport RD positif indique que l'ADN libre et le complexe ligand/ADN ont des signaux de même signe c'est-à-dire que le ligand est plus ou moins perpendiculaire au plan des paires de bases. A l'inverse, un rapport RD négatif indique que le complexe ligand/ADN présente un dichroïsme négatif.

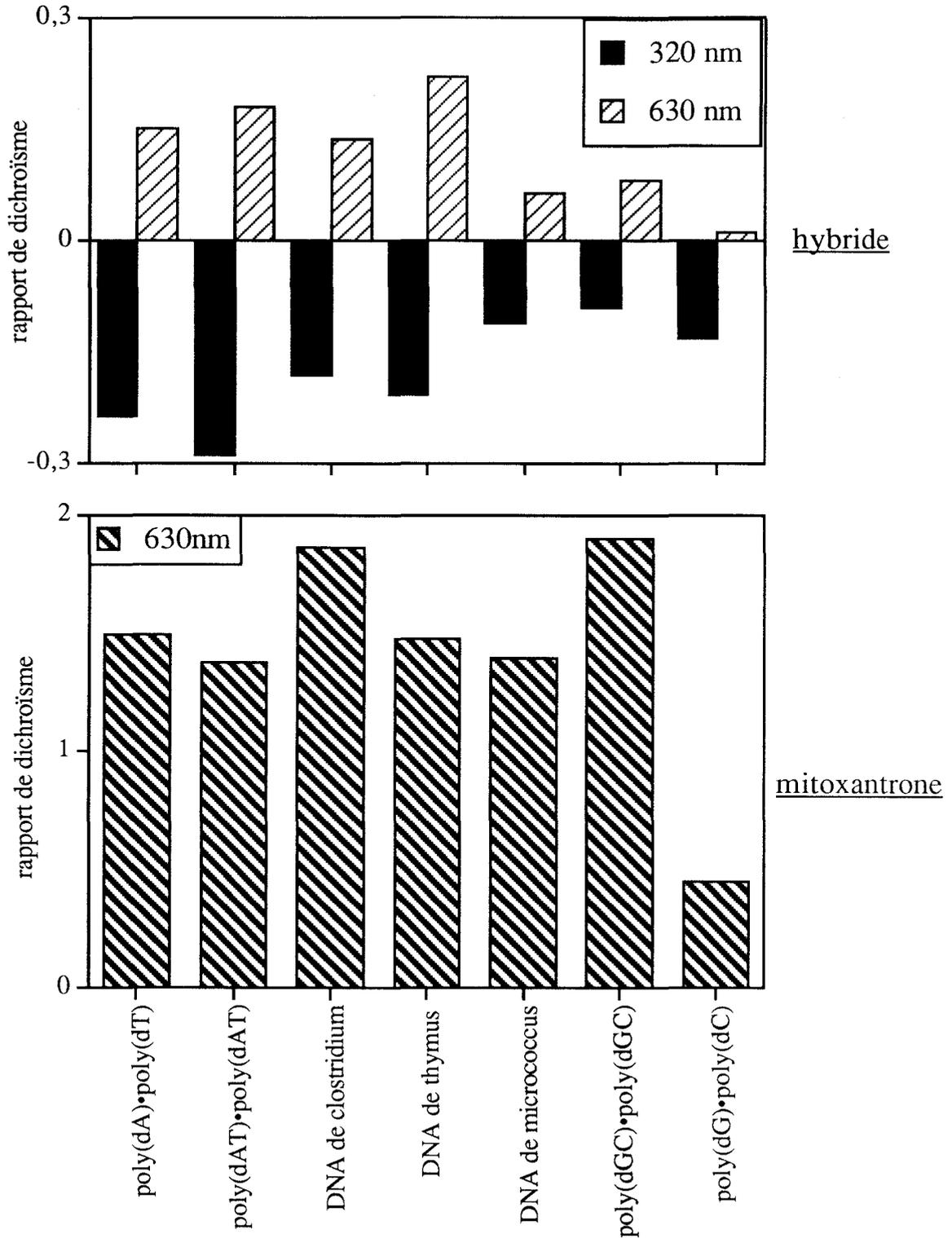
L'évolution, en fonction de la composition en bases des ADN, du dichroïsme réduit du chromophore anthraquinonique à 630 nm et de la Nt à 320 nm par rapport à celui de l'ADN à 260 nm a été suivie. Les résultats obtenus sont regroupés (fig 88) sous forme d'histogrammes. Trois ADN naturels ont été utilisés : ADN Thymus de veau (42% GC), ADN de *Clostridium perfringens* (26% GC) et l'ADN de *Micrococcus*

*lysodeikticus* (72% GC) ainsi que quatre oligonucléotides avec une composition et/ou un arrangement des paires de bases différents. Les valeurs des rapports RD pour les complexes ligand/ADN ou ligand/polynucléotide peuvent être comparés mutuellement, indépendamment de la taille du polymère et sont représentatives de la géométrie du complexe.

Selon les valeurs des rapports RD, la mitoxantrone présente une sélectivité pour les séquences alternées, en particulier les séquences alternées GC, sans pour autant exclure la fixation aux polynucléotides riches en résidus AT. Ceci est en accord avec les résultats de Krishnamoorthy et coll., (1986).

Avec l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ, les paramètres RD, mesurés à 630 nm, longueur d'onde représentative de la liaison du chromophore anthraquinonique, varient de façon irrégulière avec le contenu GC des différents ADNs. On remarquera aussi que les valeurs RD à 630 nm pour l'hybride sont toujours inférieures à celles mesurées pour la mitoxantrone à la même longueur d'onde. Ainsi, la présence des deux résidus Nt entrave l'intercalation du chromophore anthraquinonique.

Les rapports RD mesurés à 320 nm pour les différents complexes ligand/ADNs, varient aussi considérablement en fonction de la composition en paires de bases GC et AT des polymères. Ce résultat montre sans ambiguïté que l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ retient la sélectivité AT de la Nt. En effet, les valeurs RD les plus importantes sont obtenues avec les polymères poly(dA).poly(dT) et poly(dAT).poly(dAT). C'est pour ce dernier que la valeur du rapport RD est la plus importante. Par conséquent on peut déduire que l'hybride se fixe mieux aux séquences AT alternées par rapport aux séquences homopolymériques (A)<sub>n</sub>-(T)<sub>n</sub>.



**Figure 88 :** Rapports de dichroïsmes réduits (RD) de l'hybride  $(\text{Net-DAE})_2\text{-DHQ}$  et du composé de référence mitoxantrone pour des ADNs naturels et des polynucléotides de compositions variées. Les expériences ont été effectuées à un rapport ligand/ADN = 0,1 ; à un champ électrique de 13kV/cm et à deux longueurs différentes 320 nm et 630 nm.

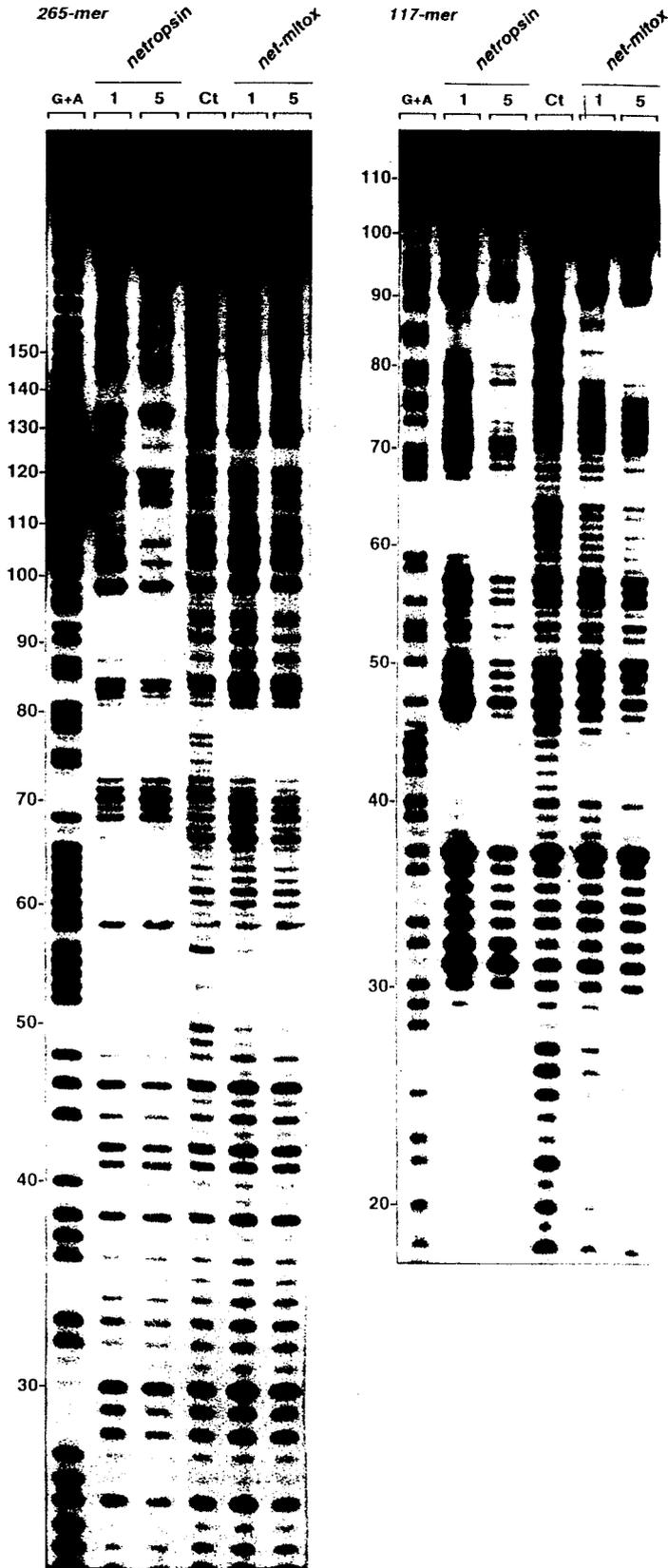
Les rapports très peu négatifs obtenus pour les deux oligonucléotides GC indiquent que les résidus Nt de l'hybride ne se logent pas dans le petit sillon des ADN GC, sans doute à cause des contraintes produites par les résidus amine en 2 de la guanine. Effectivement, comme nous l'avons déjà signalé ces groupements représentent l'élément critique de reconnaissance qui gouverne la sélectivité de séquence de ligands tels la Nt et la Dst (Bailly et coll., 1993a ; Waring et Bailly, 1994 ; Bailly et Waring, 1995).

Cette étude montre clairement que l'interaction de l'hybride avec la double hélice d'ADN dépend de la nature des séquences. La sélectivité AT de la Nt est retenue. Une étude par "footprinting" de ce ligand permet de corroborer ce résultat.

#### \* Etudes de "footprinting" à la DNAase I

L'étude par "footprinting" du composé (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ a été réalisée par l'intermédiaire d'un agent de coupure enzymatique la DNAase I sur deux fragments d'ADN de façon à obtenir le plus grand nombre d'informations. La figure 89 présente deux autoradiogrammes des gels de footprint obtenus avec des fragments 265 mer et 117 mer obtenus à partir du plasmide pBS. En présence de la Nt et du ligand, plusieurs zones protégées de la coupure par la DNAase I sont observées au niveau du gel. Les concentrations requises pour obtenir un footprint avec le nouvel hybride sont similaires à celles de la Nt. Ceci témoigne d'une affinité de cet hybride comparable à celle de la Nt.

La figure 90 montre une analyse densitométrique de la coupure par la DNAase I des deux fragments (265 et 117 mer) incubés en présence de la Nt et du composé (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ. Ces profils sont dérivés des gels présentés figure 89. De façon générale le nouvel hybride se comporte comme la Nt et reconnaît aussi des séquences riches en résidus AT mais l'amplitude est légèrement plus faible pour certains sites. Ceci peut s'illustrer par leur protection similaire des séquences : 5'ATAATGTTAA (20-29) ; AAAAT (42-46) ; TTTT (63-66) ; AATTA (84-86) sur le fragment 117 mer et les séquences TTCGAAAACA (49-57) ; CAATTA (73-78) et CATTA (91-95) sur le fragment 265 mer. On remarquera au niveau du fragment 265 mer la présence de sites non protégés par l'hybride mais reconnus par la Nt (positions 60-66 ; 105-110 ; 125-129). Ceci peut être expliqué par une gêne créée par le chromophore anthraquinonique qui empêcherait la partie Nt d'accéder à tous les sites. A l'inverse, la position 119-124 sur le fragment 265 mer est reconnue par l'hybride et pas par la Nt. Par conséquent, on pourrait suggérer la participation de la partie anthraquinonique dans la reconnaissance.



**Figure 89 :** Footprinting à la DNAse I avec les fragments 265 et 117-mer du plasmide pBS en présence de la nétropsine et de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ (net-mitox) à des concentrations de 1 et 5 μM.

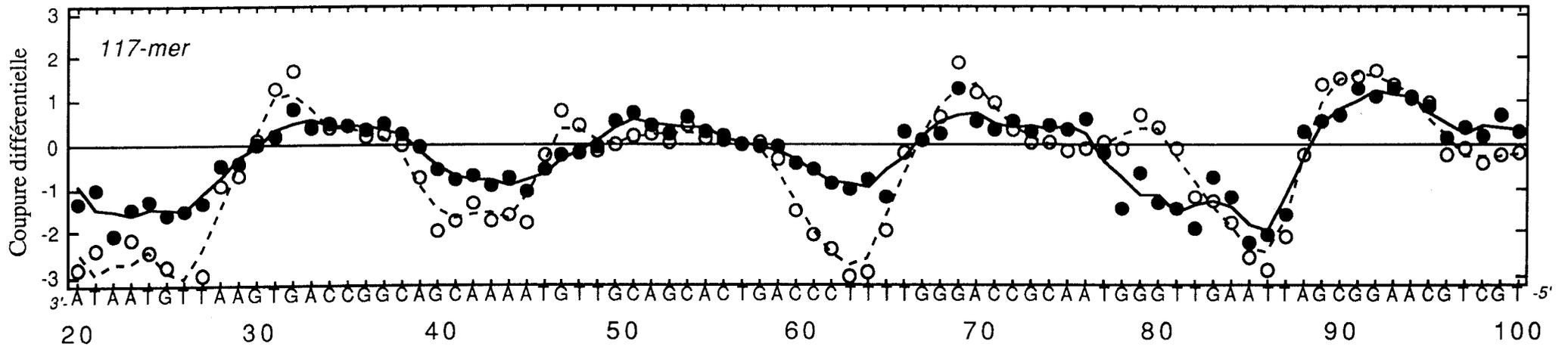
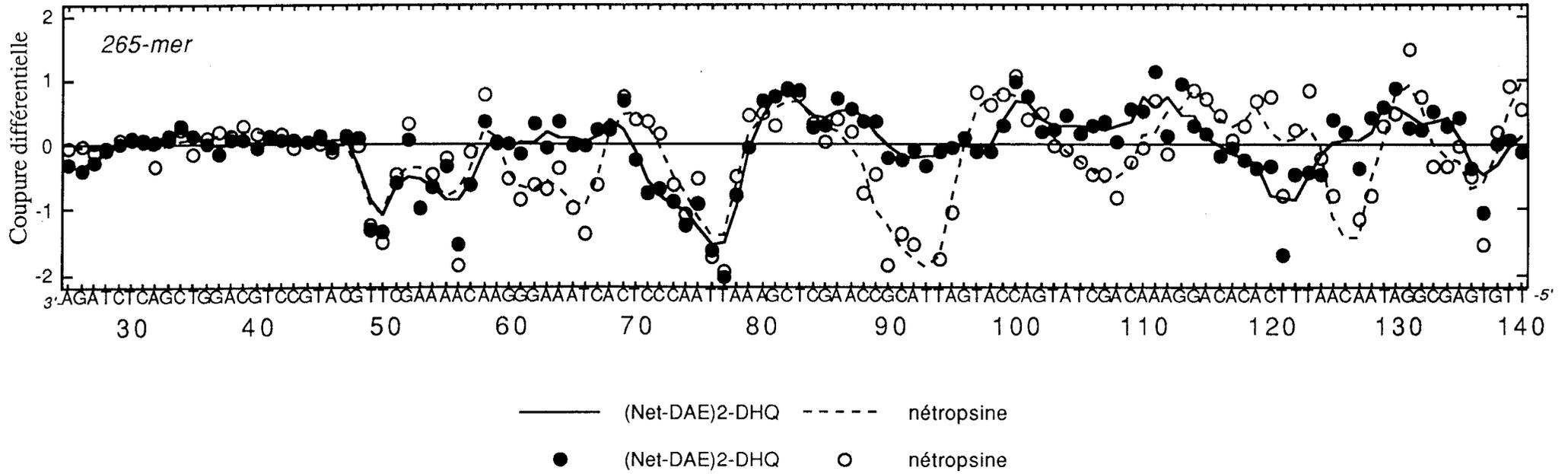


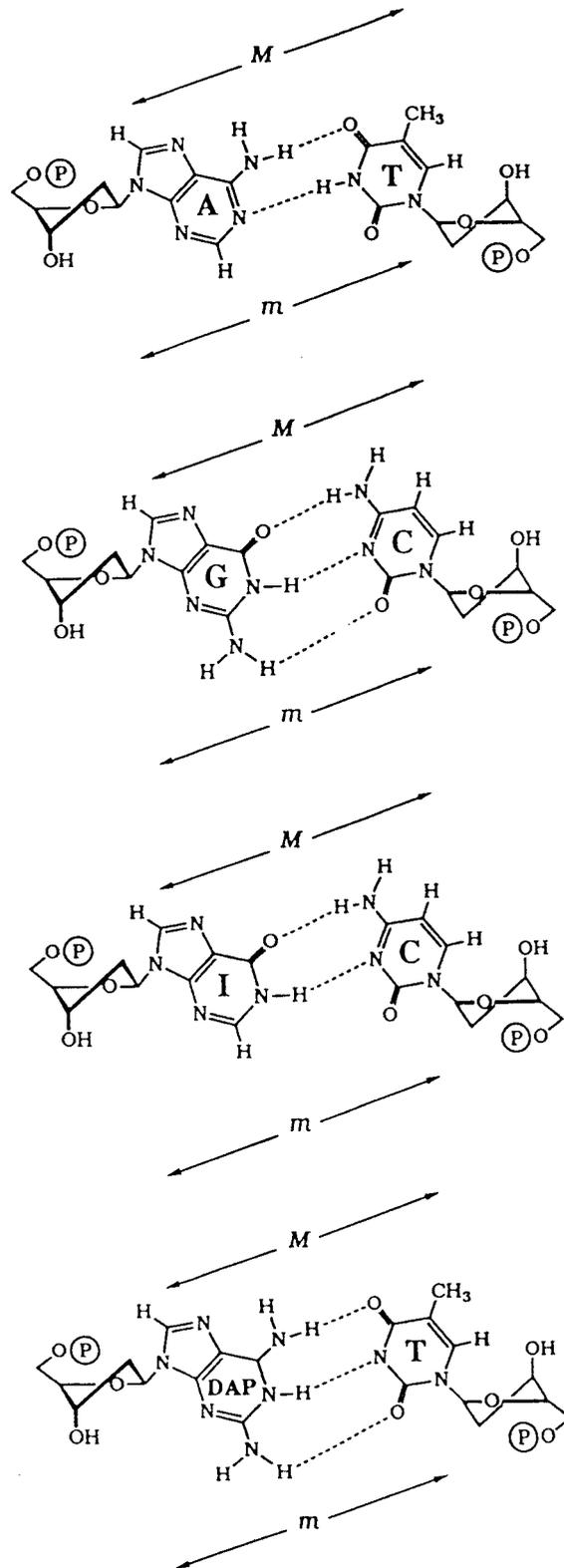
Figure 90: Coupures différentielles des fragments 265 et 117-mer induites par la DNAase I en présence de la nétropsine (5  $\mu$ M) et de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ (5  $\mu$ M). Les zones d'intensité de coupure négative correspondent aux sites de liaison des deux dérivés et les zones d'intensité positive à des sites rendus plus accessibles à l'enzyme.

Par ailleurs, les sites reconnus par le composé (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ sont de la même taille que ceux reconnus par la Nt alors que l'hybride comporte deux résidus bispyrroliques analogues de la Nt. Ceci corrobore les résultats de dichroïsme circulaire qui suggéraient la liaison d'un seul résidu dans le petit sillon de l'ADN.

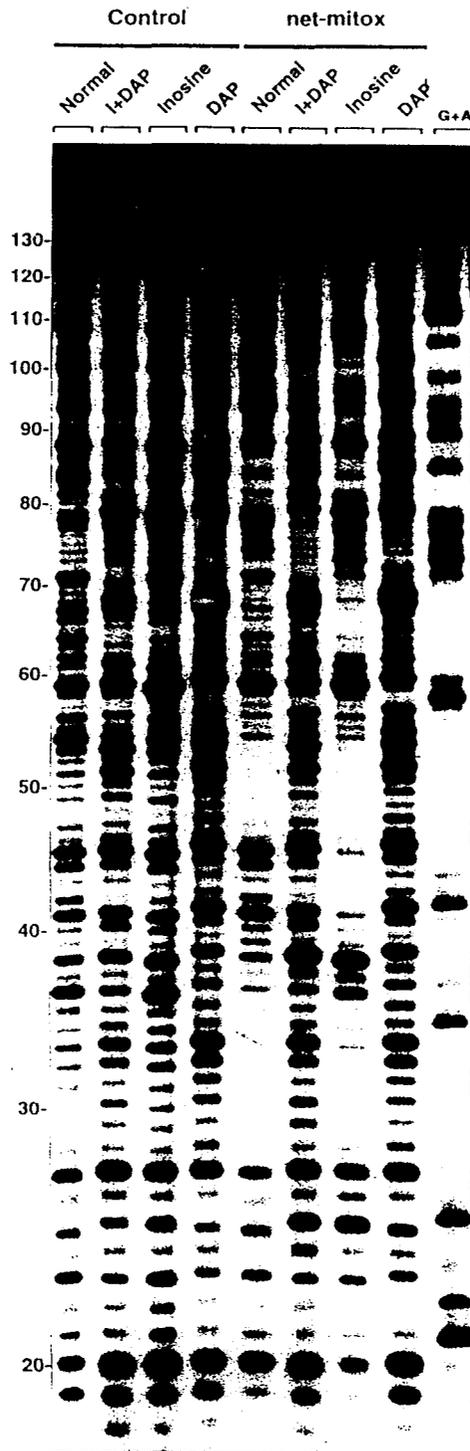
Les résultats présentés ici sont en accord avec le modèle dans lequel un seul résidu bispyrrolique est dans le petit sillon de l'ADN et le chromophore anthraquinonique ainsi que le deuxième résidu Nt sont à l'extérieur du sillon.

Comme nous l'avons déjà signalé, le groupement amino en 2 des guanines (seul groupement donneur de liaison hydrogène au niveau du petit sillon) constitue l'élément essentiel de reconnaissance dans le petit sillon de l'ADN (Bailly et Waring, 1995), dans lequel se lie la plupart des petites molécules comme la Nt et la Dst. Ces molécules se lient à la double hélice d'ADN sur des séquences spécifiques par l'intermédiaire de liaisons hydrogène et de contacts de Van der Waals. L'importance de ce groupement en tant qu'élément déterminant dans la reconnaissance a été testée en le transférant des résidus guanines vers les résidus adénines. En effet, le remplacement des bases adénine (A) par des résidus 2,6-diaminopurine (DAP) permet la relocalisation du groupement amino et la création d'une liaison hydrogène supplémentaire NH---CO par rapport aux paires de bases AT normales. A l'inverse, le remplacement des résidus guanine (G) par des résidus inosine (I) supprime une liaison hydrogène par rapport aux paires de bases GC normales (fig 91).

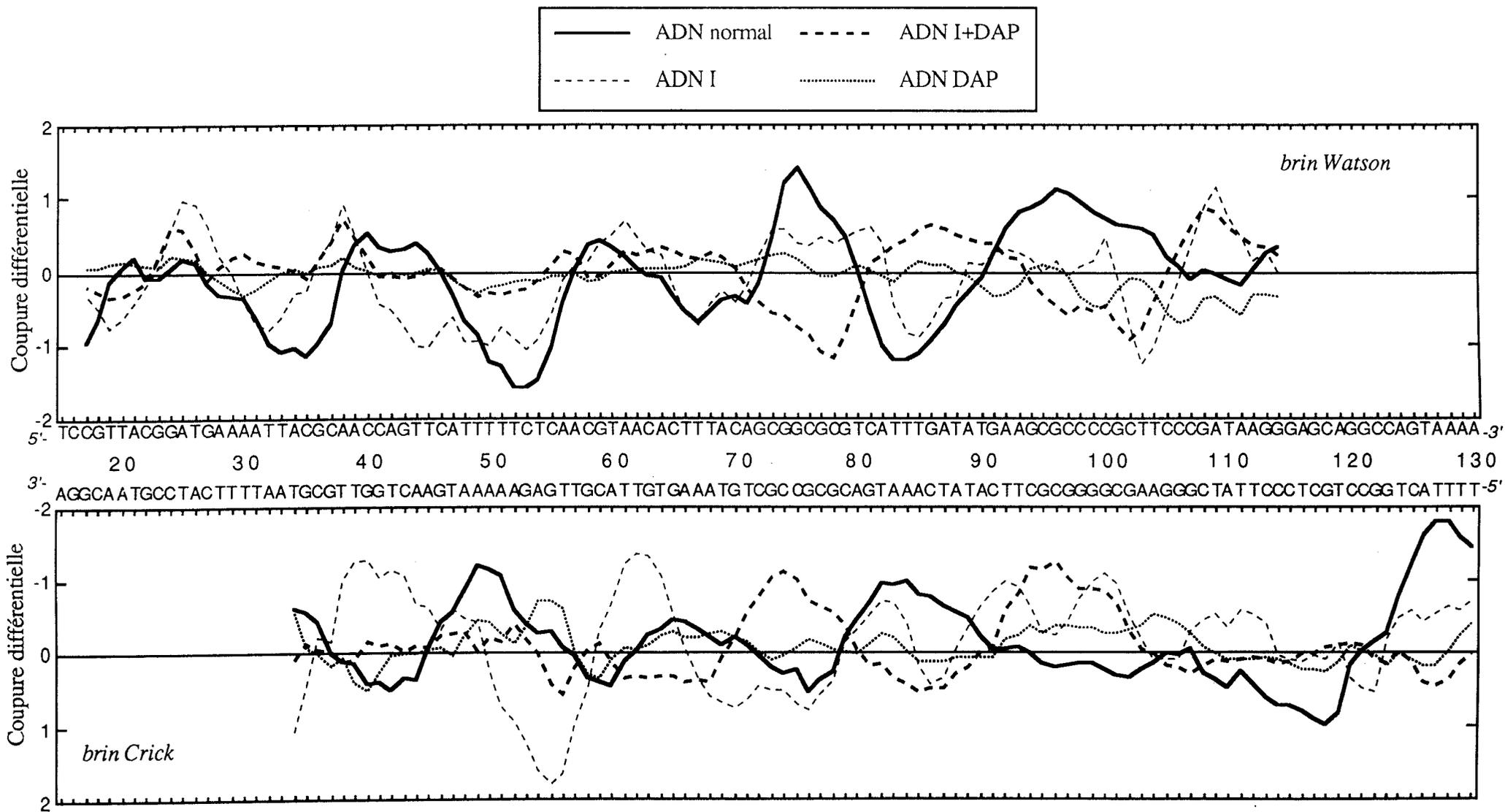
Des expériences de "footprinting" utilisant des ADNs modifiés dans lesquels des résidus I et/ou DAP remplacent des résidus G et/ou C ont été réalisées. Par simplification nous les appellerons : ADN I, ADN DAP et ADN I+DAP. Les figures (92 et 93) montrent les autoradiogrammes des gels de footprinting obtenus ainsi que les profils densitométriques de la coupure à la DNAase I des fragments d'ADN *tyr T* de *E. Coli* normal et modifié incubés en présence de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ. Pour l'ADN normal, les sites de liaisons les plus protégés de la coupure à la DNAase I se situent autour des positions 32, 53 et 84. Les deux brins (brin Crick et brin Watson) sont en bonne concordance. Les séquences protégées sont : 3'AAAATTA (28-34) ; 3'ATTTTTCTCA (47-56) et 3'ATTT (82-85). Il s'agit de séquences riches en résidus AT et ceci confirme la spécificité AT de cet hybride.



**Figure 91** : Structure des liaisons hydrogène des bases purine-pyrimidine. (----) représente les liaisons hydrogène. I = inosine, DAP = 2,6-diaminopurine (2-aminopurine). M et m indiquent le grand sillon et le petit sillon respectivement.



**Figure 92:** Autoradiogrammes de digestion à la DNAse I des fragment *tyr T* normal et modifié (I + DAP ; inosine et DAP) en absence (control) et en présence de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ (net-mitox) à une concentration de 20 μM.



**Figure 93 :** Coupures différentielles de l' ADN normal et des ADNs modifiés induites par la DNAase I en présence de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ à une concentration de 20 μM.

En examinant les profils de "footprinting" obtenus avec les différents ADNs, on remarque une altération notable qui se caractérise par une inversion presque totale en particulier pour la séquence s'étendant entre 60 et 110 du fragment *Tyr* T et surtout pour l'ADN I+DAP. L'hybride est déplacé de ses sites de liaison préférentiels (positions 28-34 ; 47-56 : et 82-84) pour se lier à des séquences riches en résidus IC. Des résultats identiques ont été obtenus avec la Dst et la Nt (Bailly et Waring, 1995). Par ailleurs, avec l'ADN DAP on obtient presque pas de protection, l'hybride étant gêné par la présence du groupement amino en 2 à la fois sur les bases G et les résidus DAP.

En conclusion, cette étude constitue une preuve supplémentaire de l'importance du groupement amino en 2 des bases guanine en tant qu'élément essentiel à la reconnaissance au niveau du petit sillon.

#### IV-5-4 Activité biologique

Les propriétés cytotoxiques et d'inhibition de croissance de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ ont été déterminées sur les cellules leucémiques L1210 de souris et sur les cellules de tumeur mammaire MCF7 *in vitro* par le Dr Nicole POMMERY.

Les cellules sont incubées en présence de différentes concentrations (0,01 à 10  $\mu$ M) de ligand, puis la croissance est suivie durant trois jours. Les histogrammes d'inhibition de croissance et de dose-survie pour ce composé vis-à-vis des deux souches sont représentés figures (94, 95, 96).

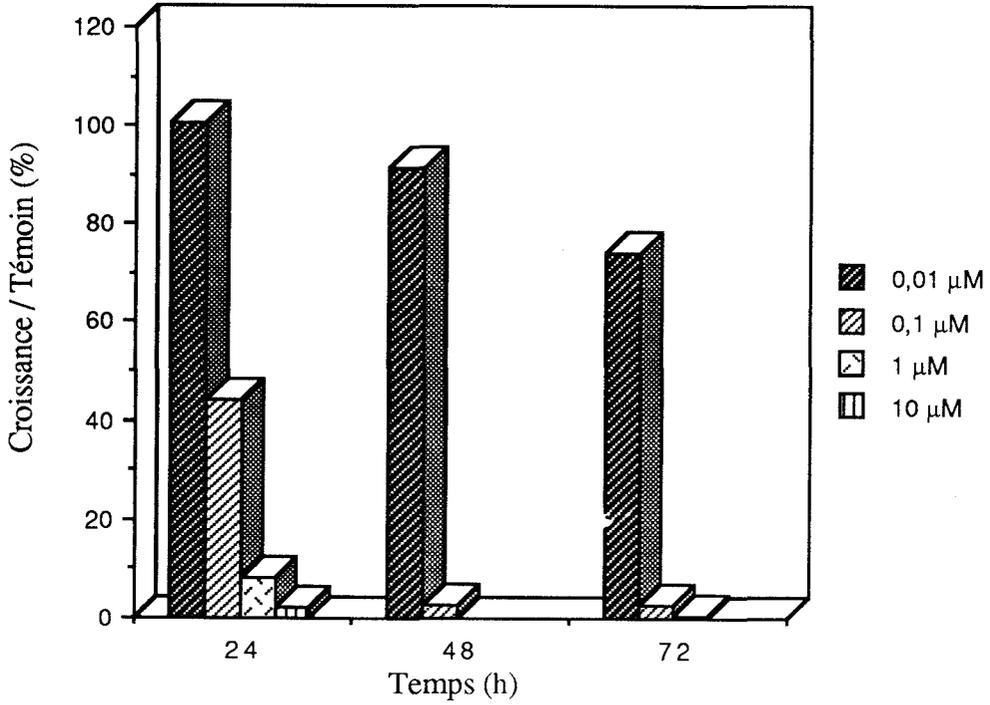


Figure 94 : Histogrammes d'inhibition de croissance des cellules L1210 en présence de concentrations variables du composé (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ.

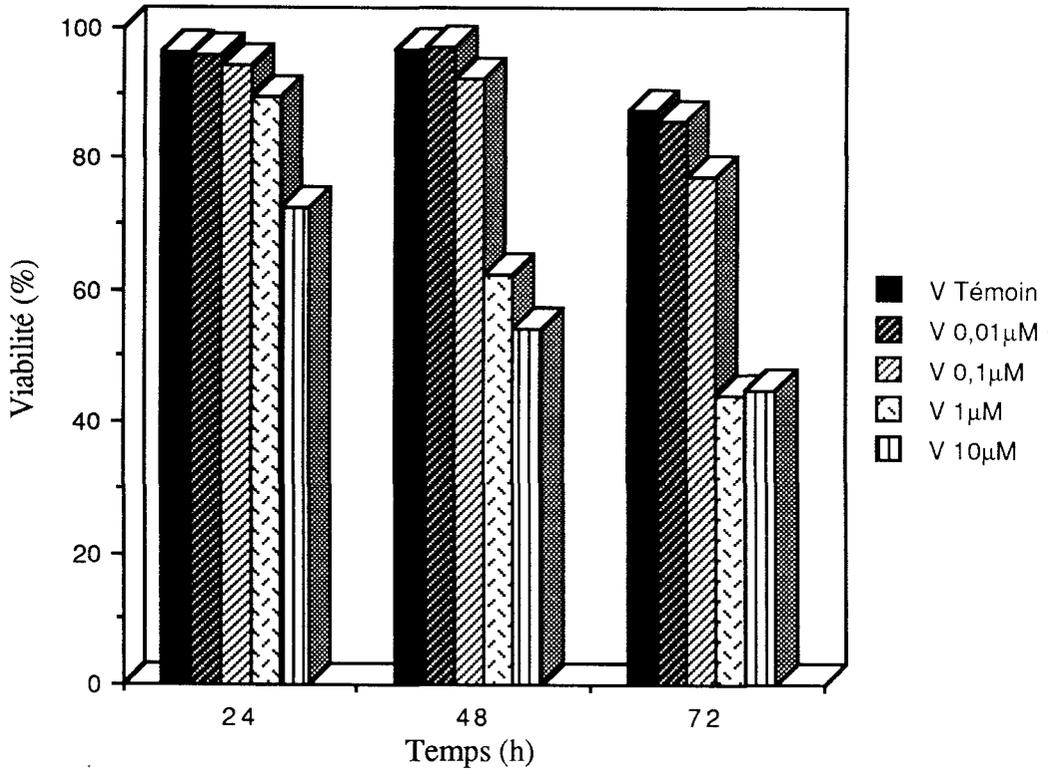


Figure 95 : Histogrammes de dose-survie des cellules L1210 en présence de concentrations variables du composé (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ.

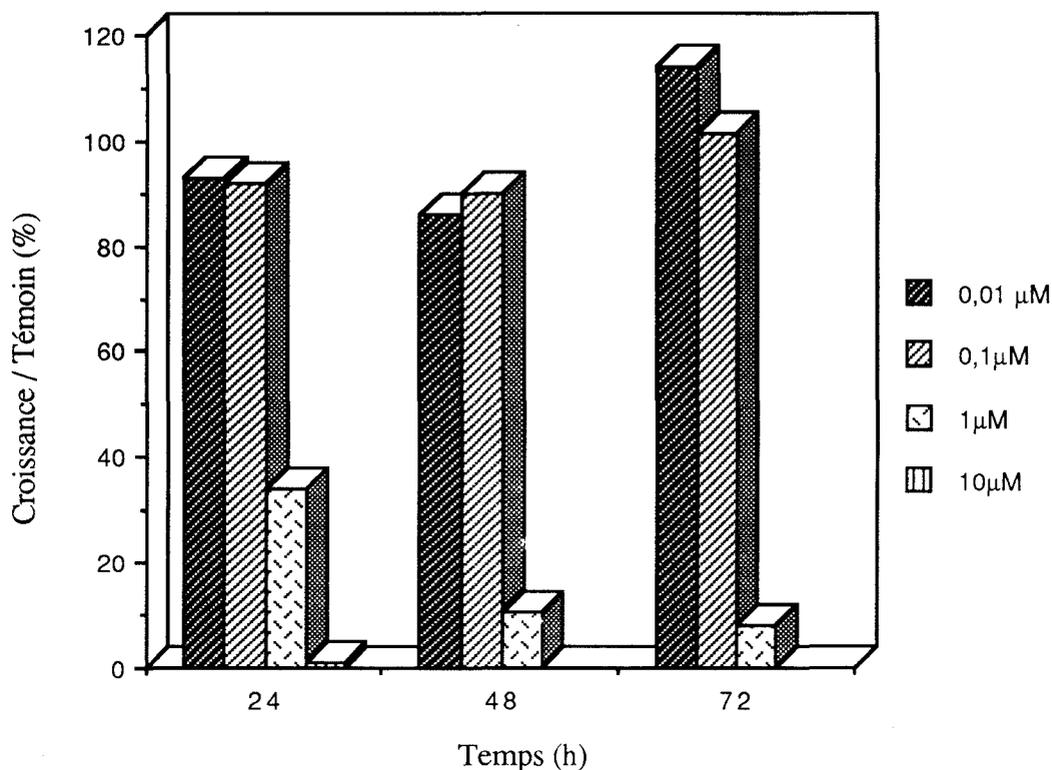


Figure 96: Histogrammes d'inhibition de croissance des cellules MCF7 en présence de concentrations variables du composé (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ.

Au bout de 24 heures d'incubation, en présence de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ, une inhibition de croissance très significative des cellules leucémiques L1210 est observée à partir d'une concentration de 0,1 µM (fig 94). La croissance est complètement inhibée au bout de 48 heures à cette même concentration. Une concentration de 1 µM arrête presque totalement la croissance après 24 heures d'incubation. Pour la souche MCF7, une concentration de 1 µM est nécessaire pour inhiber la croissance (fig 96). Par ailleurs, l'hybride démontre un pouvoir cytotoxique très faible. En effet, à une concentration de 0,1 µM, la viabilité cellulaire après trois jours d'incubation est supérieure à 80%.

Ainsi l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ possède un pouvoir cytostatique notable vis-à-vis des deux lignées cellulaires et un pouvoir cytotoxique faible. Dans les deux cas cet hybride présente une activité bien meilleure que celles obtenues avec les hybrides ligands du petit sillon-intercalant sur les cellules leucémiques L1210 : CI<sub>50</sub> NetGA = 0,5 µM (Bailly et coll., 1989b) ; CI<sub>50</sub> Distel (1+) = 2 µM (Bailly et al; 1993b) ; CI<sub>50</sub> NetAmsa = 50 µM (Klupsch, 1991). Néanmoins, cette activité reste en-deçà de celle de la mitoxantrone. Les valeurs CI<sub>50</sub> sont regroupées dans le tableau 9 en comparaison avec celles obtenues pour la molécule modèle mitoxantrone.

Type cellulaire	mitoxantrone	(Net-DAE) <sub>2</sub> -DHQ
L1210	0,007	0,04
MCF7	0,3	0,6

Tableau 9 : Valeurs CI<sub>50</sub> (μM) obtenues avec la mitoxantrone et l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ.

L'hybride est six fois moins actif que la mitoxantrone vis-à-vis des cellules leucémiques L1210 mais seulement deux fois moins actif sur les cellules MCF7. La mitoxantrone est très toxique (DL<sub>50</sub> = 0,007 μM sur les cellules L1210) et la Nt est pratiquement inactive sur cette lignée. De cette façon, la combinaison des deux molécules confère une activité biologique à la partie Nt et diminue la toxicité de la partie mitoxantrone.

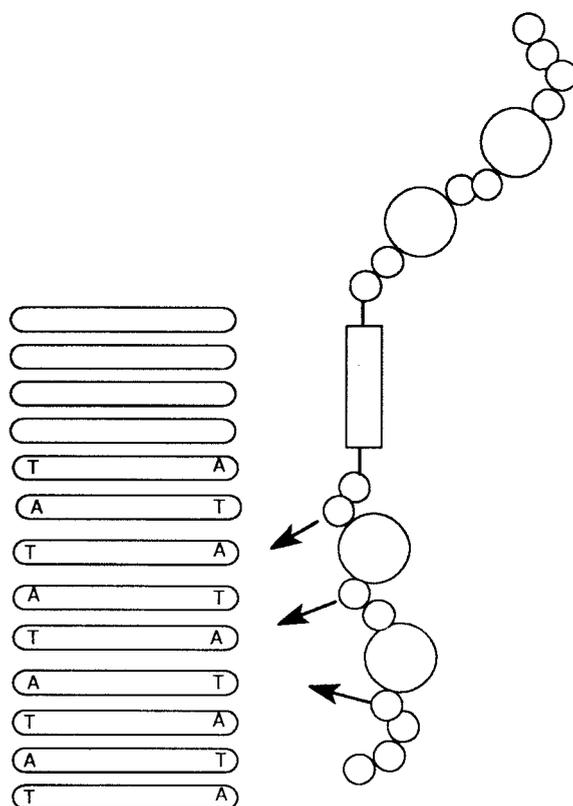
## Discussion

L'interaction du nouvel hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ avec l'ADN a été étudiée par des techniques physicochimiques variées. Grâce aux résultats obtenus, on est en mesure de répondre aux questions posées quant à son mode d'interaction et sa sélectivité de liaison.

En effet, les mesures de viscosimétrie montrent que l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ ne s'intercale pas entre les plateaux de paires de bases de l'ADN puisqu'aucune détorsion de l'hélice n'est observée, alors que pour les hybrides réalisés précédemment (NetGA, NetAmsa et Distel) le processus de liaison par intercalation existait même s'il n'était pas toujours complet. Un autre argument en faveur de la non-intercalation du noyau anthraquinonique est que l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ n'a aucun effet sur la topoisomérase II contrairement à la mitoxantrone (Riou, communication personnelle). Les mesures de dichroïsme linéaire et circulaire montrent que le mode d'interaction de cet hybride est dominé par la Nt. Comme la Nt, l'hybride se lie dans le petit sillon de l'ADN au niveau de régions riches en résidus AT. Sa spécificité de liaison a été mise en évidence par dichroïsme linéaire et par la technique de "footprinting". Néanmoins, le noyau anthraquinonique perturbe la liaison de la partie Nt puisque certains sites reconnus par la Nt ne le sont pas par l'hybride. (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ ne possède pas un caractère de liaison bimodale (intercalation et liaison dans le petit sillon). La non-intercalation du chromophore anthraquinonique est peut être due à la petite taille du connecteur (HN(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH). L'utilisation d'un bras espaceur plus long et plus flexible pourrait permettre la liaison simultanée du noyau anthraquinonique et des résidus bispyrroliques de la Nt.

Compte tenu de ces résultats, nous proposons le modèle suivant (fig 97) pour l'interaction de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ avec l'ADN où seul un résidu de la Nt interagit dans le petit sillon en reconnaissant des enchaînements AT.

Quant à l'activité cytotoxique *in vitro*, elle a été réalisée sur deux modèles cellulaires (les lignées L1210 et MCF7). L'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ possède une activité cytostatique supérieure à celles de tous les hybrides réalisés jusqu'à présent au sein du laboratoire. Bien que l'hybride ne s'intercale pas au niveau de l'ADN par l'intermédiaire de son chromophore anthraquinonique plan, ce dernier doit apporter une contribution non négligeable à son activité biologique en terme de stabilisation du complexe ligand-ADN.



**Figure 97 :** Illustration schématique représentant l'interaction de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ avec les paires de bases de l'ADN. Le chromophore anthraquinonique est représenté par le rectangle et les résidus bispyrroliques de la Nt par les cercles dont les plus grands représentent les noyaux N-méthylpyrrole. L'ADN est représentée par la série de rectangles arrondis et superposés représentant les paires de bases AT. Les flèches indiquent les liaisons hydrogène entre le pseudopeptide et l'ADN.

## *CONCLUSION*

Beaucoup d'intérêt est porté actuellement aux mécanismes de reconnaissance moléculaire de l'ADN en vue d'une régulation artificielle de l'expression génétique. L'une des approches complémentaires aux stratégies antigène, antisens et lexitropsines, pour la conception de ligands à haute affinité et spécificité pour l'ADN, est le design de ligands ayant un mode de liaison mixte. Beaucoup de ligands du petit sillon, comme la Nt et la Dst, se lient à l'ADN avec une spécificité AT, alors qu'un manque de liaison aux séquences AT est observé avec la plupart des intercalants qui seraient plutôt GC spécifiques. Par conséquent, l'une des voies pour associer la spécificité AT et GC consiste dans le design d'hybrides associant à la fois un noyau hétéropolyaromatique potentiellement intercalant et une entité peptidique ou pseudopeptidique ligand des sillons de l'ADN. De tels hybrides, appelés "combilexines" par analogie aux "lexitropsines", ont fait l'objet de plusieurs travaux au sein du laboratoire.

Nous avons réalisé au cours de ce travail, une pharmacomodulation de la mitoxantrone, basée essentiellement sur la nature des chaînes latérales. En effet, le noyau anthraquinonique plan de la mitoxantrone -potentiellement intercalant- a été associé à des bras polyaminés, à un peptide chélateur et à un pseudopeptide. L'utilisation de techniques physicochimiques variées nous a permis d'approcher le mode d'interaction de ces molécules avec l'ADN et l'étude de l'activité cytotoxique *in vitro* et *in vivo* pour l'un d'entre eux nous a permis l'évaluation d'une certaine efficacité biologique. Ces résultats ont été comparés à ceux disponibles pour les autres hybrides élaborés précédemment au laboratoire.

L'un des paramètres disponibles pour tous les composés synthétisés au cours de cette étude est l'angle de détorsion mesuré par la technique de viscosimétrie (tableau 10). La comparaison des valeurs obtenues, montre que plus les chaînes latérales sont encombrantes plus l'intercalation du noyau anthraquinonique de la mitoxantrone est difficile puisque l'hybride (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ ne s'intercale que partiellement et (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ ne s'intercale pas entre les plateaux de paires de bases.

L'activité cytotoxique *in vitro* est assez importante pour tous les composés (tableau 10). Les hybrides (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ et (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ qui ont perdu soit partiellement soit totalement la capacité de s'intercaler au niveau de la double hélice d'ADN gardent une activité cytostatique significative (CI<sub>50</sub> = 0,051 et 0,04 μM respectivement vis-à-vis des cellules leucémiques L1210). Ceci met en évidence le rôle joué par les parties peptidiques et pseudopeptidiques dans l'activité biologique.

	CI <sub>50</sub>		détorsion (°)	
	L1210	MCF7		
(DAE) <sub>2</sub> -DHQ	1,5 10 <sup>-11</sup>	2 10 <sup>-12</sup>	16°	intercalant
<b>19</b>	5,1 10 <sup>-7</sup>	1,8 10 <sup>-8</sup>	16°	intercalant
<b>20</b>	1 10 <sup>-6</sup>	6 10 <sup>-9</sup>	16°	intercalant
(GGH-DAE) <sub>2</sub> -DHQ	5 10 <sup>-8</sup>	8 10 <sup>-7</sup>	10,9°	intercalant partiel
(Net-DAE) <sub>2</sub> -DHQ	4 10 <sup>-8</sup>	6 10 <sup>-7</sup>	---	non intercalant
mitoxantrone	7 10 <sup>-9</sup>	3 10 <sup>-7</sup>	17,5°	intercalant

**Tableau 10** : Tableau comparatif des CI<sub>50</sub> et des angles de détorsion obtenus pour les différents composés réalisés au cours de cette étude.

Des études complémentaires des interactions de l'hybride (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHQ avec la double hélice d'ADN devraient nous permettre d'établir son mécanisme exact de liaison et de mieux expliquer son activité biologique qui est non négligeable.

Le choix du noyau anthraquinonique de la mitoxantrone s'avère intéressant au vu des activités biologiques obtenues. Les étapes ultérieures consisteraient d'une part, à associer ce noyau à des molécules alkylantes, en particulier le cis-Pt, de façon à réaliser une liaison irréversible à l'ADN. D'autre part, à synthétiser l'hybride anthraquinone-spermidine qui devrait constituer une sonde très intéressante pour l'étude des interactions polyamines-ADN et surtout leur spécificité de liaison qui est encore controversée.

## *PARTIE EXPERIMENTALE*

## Remarques générales

### Chromatographie sur colonne

Les chromatographies sur colonne sont réalisées avec le gel de silice 60Å (70-230 mesh), référence 28, 862-4 Aldrich.

### Chromatographie sur couche mince (CCM)

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

- support : gel de silice 60 F 254 d'épaisseur 0,20 mm, référence 5735 Merck
- révélation : UV (254 et 366) et iode ou ninhydrine,
- systèmes de solvants utilisés (SS) : SS 1: MeOH

SS 2: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9 : 1)

SS 3: BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 1)

SS 4: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (8 : 2)

SS 5: THF/AcOH/H<sub>2</sub>O (8 : 1 : 2)

SS 6: CHCl<sub>3</sub>/éther de pétrole (7 : 3)

SS 7: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95 : 5)

SS 8: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (9 : 1)

SS 9: acétone/cyclohexane/toluène (2 : 3 : 5)

SS 10: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (8 : 2)

SS 11: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

SS 12: BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O (3 : 5 : 2)

SS 13: HCOOH/H<sub>2</sub>O (1 : 1)

### Point de fusion

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

### Spectrométrie infra-rouge (IR)

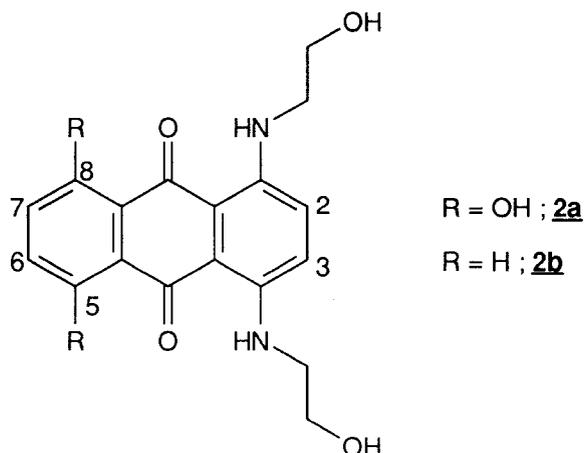
Les spectres IR sont réalisés sur un spectrographe Perkin-Elmer 297, sous forme de film pour les liquides ou en dispersion dans le KBr pour les solides. Les fréquences d'absorption sont exprimées en nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>).

## Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  sont enregistrés sur un appareil Brüker WP80SY (à 80 MHz), Brüker AC300 (à 300 MHz) ou Brüker AM400WB (à 400 MHz), avec le tétraméthylsilane (TMS) pour référence interne. Chaque signal est repéré par son déplacement chimique  $\delta$  (exprimé en ppm), sa morphologie (s : singulet ; d : doublet ; t : triplet ; q : quadruplet ; m : massif), son éventuelle constante de couplage (J en Hz) et son intensité.

## Spectrométrie de masse (SM)

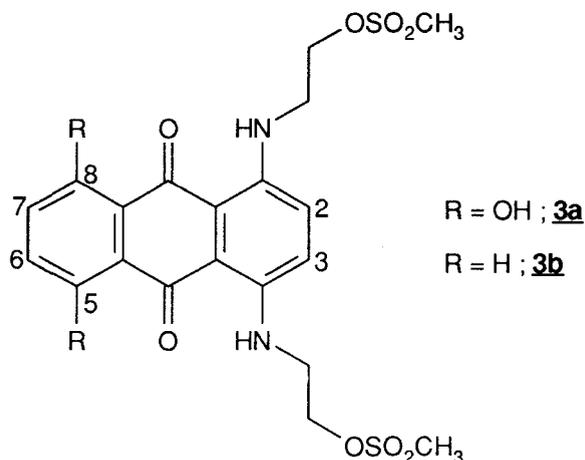
Les spectres de masse sont réalisés sur un spectromètre quadripolaire Ribermag R-10-10 (couplé à un système informatique Riber 400) fonctionnant à 70 eV (introduction directe) par impact électronique (IE) ou sur un spectromètre Kratos MS50RF (FAB : Fast Atom Bombardment).

**1.4-Bis-[(hydroxyéthyl)aminol]-5.8-dihydroxvanthracène-9.10-dione 2a****1.4-Bis-[(hydroxyéthyl)aminol]-anthracène-9.10-dione 2b**

1 g (3,65 mmoles) de 2,3-dihydro-1,4-dihydroxyquinizarine (LDHQ) 1,05 g (4,37 mmoles) 2,3-dihydroquinizarine (LQ) sont dissous dans 80 cm<sup>3</sup> de MeOH sous barbotage d'azote. L'éthanolamine en large excès (10 équivalents), préalablement dissoute dans MeOH, est additionnée goutte à goutte à chacune des deux solutions précédentes. Les mélanges réactionnels sont placés dans des ballons surmontés d'un réfrigérant et portés à ébullition douce (50°C), sous barbotage d'azote, pendant 3 h. Le barbotage est ensuite supprimé et la couleur évolue du vert au bleu durant l'oxydation par agitation à l'air pendant une nuit.

Après évaporation de MeOH, les produits 2a et 2b sont purifiés par chromatographies sur colonne de silice éluées par un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9 : 1).

	<u>2a</u>	<u>2b</u>
Rdt :	29,5%	28%
Rf (SS2) :	0,61	0,63
F (°C) :	218-220°	236-238°
SM (FAB+) :	359 (M+1)	327 (M+1)
RMN (DMSO, 300 MHz) :	3,55 (m, 2H, N-CH <sub>2</sub> -C) 3,67 (m, 2H, -CH <sub>2</sub> -OH) 5,02 (t, 2H, C-OH) 7,13 (s, 2H, CH-6,7) 7,50 (s, 2H, CH-2,3) 10,72 (t, 2H, NH-aryle) 13,48 (s échangeable au D <sub>2</sub> O, 2H, OH)	3,50 (m, 2H, N-CH <sub>2</sub> -C) 3,70 (m, 2H, -CH <sub>2</sub> -OH) 5,00 (t, 2H, C-OH) 7,50 (s, 2H, CH-2,3) 7,78-8,25 (2m, 4H, CH-5,8 et CH-6,7) 10,93 (t, 2H, NH-aryle)
UV (MeOH) :	619 ; 672 nm	590 ; 637 nm

**1,4-Bis-(((méthanesulfonyl)éthyl)aminol)-5,8-dihydroxvanthracène-9,10-dione 3a****1,4-Bis-(((méthanesulfonyl)éthyl)aminol)-anthracène-9,10-dione 3b**

1,85 mmole des dérivés 2a et 2b est dissoute dans 25 cm<sup>3</sup> de pyridine. A chacune des deux solutions sont ajoutées 4,07 mmoles de chlorure de mésyle (CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>Cl) goutte à goutte. Après 3h d'agitation à température ambiante, l'addition de 30 cm<sup>3</sup> d'eau permet de faire précipiter les deux dérivés. Les deux précipités sont essorés puis recristallisés dans MeOH.

	<u>3a</u>	<u>3b</u>
Rdt :	40%	49,5%
Rf (SS2) :	0,80	0,83
F (°C) :	135-136°	147-148°
SM (FAB+) :	515 (M+1)	483 (M+1)
RMN (DMSO, 300 MHz) :	3,20 (s, 6H, OSO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ) 3,82 (m, 4H, N-CH <sub>2</sub> -C) 4,40 (m, 4H, CH <sub>2</sub> -OSO <sub>2</sub> ) 7,21 (s, 2H, CH-6,7) 7,55 (s, 2H, CH-2,3) 10,75 (t, 2H, NH-aryle) 13,50 (s échangeable au D <sub>2</sub> O, 2H, OH)	3,22 (s, 6H, OSO <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ) 3,85 (m, 4H, N-CH <sub>2</sub> -C) 4,45 (m, 4H, CH <sub>2</sub> -OSO <sub>2</sub> ) 7,55 (s, 2H, CH-6,7) 7,81-8,25 (2m, 4H, CH-5,8 ; CH-6,7) 10,90 (t, 2H, NH-aryle)
UV (MeOH) :	620 ; 672 nm	590 ; 637 nm

**N-[(tert-butyloxy)carbonyl]aminolacétonitrile 5**

Une suspension de 12,1 g (130 mmoles) de chlorhydrate d'aminolacétonitrile dans 60 cm<sup>3</sup> de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est mise en contact, sous agitation, avec 100 cm<sup>3</sup> de Et<sub>3</sub>N ; sont alors ajoutés 28,5 g (130 mmoles) de dicarbonate de di-ter-butyle dissous dans 60 cm<sup>3</sup> de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le mélange est porté à reflux du solvant pendant 24 h. Après filtration de Et<sub>3</sub>N, HCl et lavage par HCl 1N pour éliminer l'excès de Et<sub>3</sub>N, la phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Le solvant est alors évaporé et l'huile sirupeuse prend en masse par trituration dans de l'éther de pétrole. Le précipité est filtré puis séché.

Rdt :	80% (huile)
	68% (après traitement dans l'éther de pétrole)
Rf (SS 8) :	0,73
F (°C) :	35°
IR :	3380 (NH amide)
	2220 (nitrile)
	1700 (C=O Boc)
RMN (CDCl <sub>3</sub> , 80 MHz) :	1,4 (s, 9H, CH <sub>3</sub> Boc)
	4,1 (d, 2H, CH <sub>2</sub> )
	5,2 (pic large, 1H, NH Boc)

**N-[(tert-butyloxy)carbonyl]amino]-éthylamine 6**

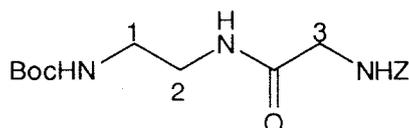
Une solution éthanolique, saturée en ammoniac, de 11,4 g (73 mmoles) de **5** est versée dans un autoclave. Après addition d'une quantité catalytique de nickel de Raney et admission d'hydrogène sous 50 atmosphères, le mélange est chauffé à 60°C pendant 8 h sous agitation. Le milieu réactionnel est filtré pour éliminer le catalyseur, puis le solvant est évaporé. L'huile obtenue est alors distillée.

Rdt :	71%
Rf (SS 10) :	0,18
E (°C ; 1 mm Hg) :	35°
IR :	1680 (C=O Boc)
	3350-3380 (NH <sub>2</sub> amine primaire ; NH amide)
	Disparition de la bande caractéristique des nitriles à 2250 cm <sup>-1</sup> .
RMN (CDCl <sub>3</sub> , 80 MHz) :	1,3 (s, 9H, CH <sub>3</sub> Boc)
	1,7 (pic large échangeable au D <sub>2</sub> O, 2H, NH <sub>2</sub> )
	2,6 (m, 2H, CH <sub>2</sub> )
	2,9 (m, 2H, CH <sub>2</sub> )
	6,7 (pic large, 1H, NH Boc)

**N-[(benzyloxycarbonylamino]-2-bromoéthane 7****N-[(benzyloxycarbonylamino]-3-bromopropane 8**

0,1 mole de bromhydrate de 2-bromoéthylamine ou 3-bromopropylamine est mise en suspension dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre en présence de  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,2 mole) afin de déplacer l'amine de son sel. Les solutions sont ensuite refroidies à  $0^\circ\text{C}$  dans un bain de glace et 0,12 mole de chloroformiate de benzyle est ajoutée goutte à goutte. Les mélanges réactionnels sont agités une nuit à température ambiante. Les phases organiques sont lavées successivement par  $\text{HCl}$  1N, puis  $\text{H}_2\text{O}$ . Après séchage sur  $\text{CaCl}_2$  le solvant est évaporé. Les résidus obtenus sont chromatographiés sur colonne de silice éluée par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Le dérivé **7** est précipité dans l'heptane ; le dérivé **8** est une huile.

	<b>7</b>	<b>8</b>
Rdt :	74%	77%
Rf (SS 8) :	0,87	0,85
(SS 11) :	0,52	0,50
F ( $^\circ\text{C}$ ) :	39-41 $^\circ$	—
IR :	3290 (NH) 1680 (CO-Z)	3310 (NH) 1690 (CO-Z)
RMN (DMSO, 300 MHz) :	3,35 (q, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$ ) 3,45 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-Br}$ ) 5,04 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{ Z}$ ) 7,33 (s 5H, CH Z) 7,54 (t, 1H, NH Z)	1,94 (m, 2H, C- $\text{CH}_2\text{-C}$ ) 3,15 (q, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$ ) 3,50 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-Br}$ ) 5,04 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{ Z}$ ) 7,33 (s, 5H, CH Z) 7,45 (t, 1H, NH Z)

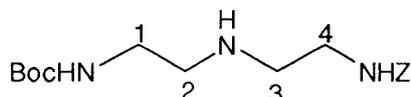
**N-[(benzyloxycarbonyl)glycyl]-N'-(tert-butylloxycarbonyl)éthylènediamine 7'**

La benzyloxycarbonylglycine (2 g ; 9,5 mmoles) est dissoute dans  $50\text{ cm}^3$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et refroidie à  $0^\circ\text{C}$  dans un bain de glace. On ajoute ensuite la DMAP (4-diméthylaminopyridine) (0,95 mmole ; 116mg),  $\text{Et}_3\text{N}$  (14,6 mmoles ;  $2\text{ cm}^3$ ) et l'EDC [1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide] (14,6 mmoles ; 2,8 g). Au mélange agité durant 2 h à  $0^\circ\text{C}$ , on additionne le dérivé **6** (9,5 mmoles ; 1,51 g) préalablement dissous dans  $20\text{ cm}^3$  de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Après 24h d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est lavé par  $\text{HCl}$  1N,  $\text{H}_2\text{O}$ , puis  $\text{NaHCO}_3$  1N. La phase organique est ensuite

séchée sur CaCl<sub>2</sub> puis évaporée à sec. Le produit est précipité par l'éther, filtré et rincé plusieurs fois à l'éther.

Rdt :	77,5%
Rf (SS 4) :	0,82
F (°C) :	116-117°
IR :	3300-3320 (NH Boc et amide) 1680-1690 (CO Z et Boc) 1640 (CO amide)
RMN (DMSO, 80 MHz) :	1,40 (s, 9H, CH <sub>3</sub> Boc) 3,01 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 1 et 2) 3,58 (d, 2H, CH <sub>2</sub> 3) 5,17 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Z) 6,78 (pic large, 1H, NH Boc) 7,31 (s, 5H, CH Z) 7,50 (pic large, 1H, NH Z) 8,00 (pic large, 1H, NH amide)

**1-[(Benzyloxycarbonyl)amino]-5-[(tert-butyloxycarbonyl)amino]-3-azapentane, bromhydrate 2**



**Première méthode :**

A une solution de NaBH<sub>4</sub> (2,15 g, 56,9 mmoles) dans 40 cm<sup>3</sup> de THF anhydre, refroidie préalablement à 0°C, est ajouté le TFA (4,4 cm<sup>3</sup> ; 56,9 mmoles) dans 5 cm<sup>3</sup> de THF. Après 30 min d'agitation l'amide **7'** (2 g ; 5,7 mmoles) dissous dans 10 cm<sup>3</sup> de THF est ajouté goutte à goutte. La réaction est suivie par CCM jusqu'à disparition totale de la matière première. Après évaporation du THF l'huile résiduelle est solubilisée dans l'eau. La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH = 2 par addition de HCl 1N puis extraite par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur CaCl<sub>2</sub>. Le résidu de l'évaporation est repris par CH<sub>3</sub>CN et le précipité blanc obtenu filtré, puis recristallisé dans AcOEt.

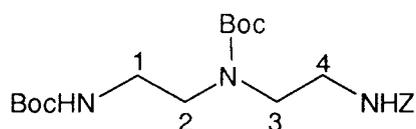
**Deuxième méthode :**

3,2 g (20,1 mmoles) de **6** dissous dans 50 cm<sup>3</sup> de CH<sub>3</sub>CN, sont placés dans un ballon bicol surmonté d'un réfrigérant. A cette solution sont ajoutés goutte à goutte 4,3 g (16,7 mmoles) du dérivé **7** dans 20 cm<sup>3</sup> de CH<sub>3</sub>CN. Le mélange réactionnel est chauffé à 55-60°C durant 48 h. Le précipité obtenu est essoré puis recristallisé dans AcOEt.

Rdt :	10% (première méthode) 38,7% (deuxième méthode)
Rf (SS 4) :	0,52
F (°C) :	181-183°
IR :	3320 (NH amide , NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> ) 1680-1690 (CO Z et Boc)
RMN (DMSO, 80 MHz) :	1,40 (s,9H, CH <sub>3</sub> Boc) 3,05 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 1 et 4) 3,35 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 2 et 3) 5,10 (s, 2H, CH Z) 7,10 (t large, 1H, NH Boc) 7,50 (s large, 6H, CH Z et NH Z) 9,30 (pic échangeable au D <sub>2</sub> O, 2H, NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> )

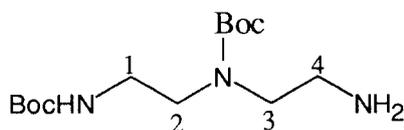
**1-[ (Benzyloxycarbonyl)amino]-3,5-[di-(tert-butylloxycarbonyl)amino]-3-azapentane**

**11**



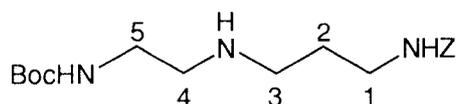
Le dicarbonate de di-tert-butyle (2,08 g ; 9,56 mmoles) est additionné goutte à goutte à température ambiante à une solution du dérivé **2** (4 g ; 9,56 mmoles) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Après 4 h d'agitation, la phase organique est lavée successivement par HCl 1N et H<sub>2</sub>O, séchée sur CaCl<sub>2</sub> et ensuite évaporée à sec. Le composé **11** est obtenu pur par précipitation dans un mélange éther/éther de pétrole.

Rdt :	95,5%
Rf (SS 10) :	0,88
F (°C) :	84-85°
IR :	3330-3380 (NH amide) 1670-1700 (CO Z et Boc)
RMN (DMSO, 300 MHz) :	1,40 (s, 18H, CH <sub>3</sub> Boc) 3 et 3,13 (2m, 8H, CH <sub>2</sub> ) 5,00 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Z) 6,82 (t large, 1H, NH Boc) 7,35 (s large, 6H, CH Z et NH Z)

**5-(Amino)-1,3-[di-(tert-butyloxycarbonyl)aminol]-3-azapentane 13**

3,2 g (73,14 mmoles) du composé **11** dissous dans 80 cm<sup>3</sup> d'EtOH sont placés sous hydrogène en présence de charbon palladié. Après 3 h d'agitation, la suspension est filtrée pour éliminer le catalyseur. Le solide obtenu après évaporation du solvant et recristallisation dans l'hexane correspond au dérivé **13**.

Rdt :	80%
Rf (SS 1 + NH <sub>3</sub> ) :	0,76
F (°C) :	79-80°
IR :	3320 (NH amide) 3180-3280 (NH <sub>2</sub> ) 1680 (CO Boc)
RMN (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) :	1,35-1,40 (2s, 18H, CH <sub>3</sub> Boc) 2,33 (pic échangeable au D <sub>2</sub> O, 2H, NH <sub>2</sub> ) 2,90 (m, 2H, CH <sub>2</sub> 4) 3,35 (m, 6H, CH <sub>2</sub> 1, 2, 3) 5,50 (t large, 1H, NH Boc)

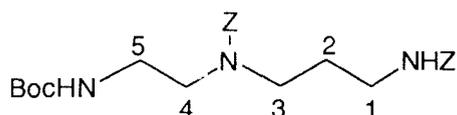
**6-[(Benzoyloxycarbonyl)aminol]-1-[(tert-butyloxycarbonyl)amino]-3-azahexane, bromhydrate 10**

Une solution du dérivé **8** (5,7 g ; 20,95 mmoles) dans 80 cm<sup>3</sup> de CH<sub>3</sub>CN est ajoutée goutte à goutte à 5,4 g (33,90 mmoles) de **6** dans le même solvant. Le mélange est porté à reflux (55-60°C) durant 48 h. Le précipité formé après refroidissement est essoré, puis recristallisé dans CH<sub>3</sub>CN ou dans l'acétone.

Rdt :	37%
Rf (SS 10) :	0,49
F (°C)	145-148°
IR :	3320 (NH amide, NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> ) 1680-1690 (CO Z et Boc)

RMN (DMSO, 300 MHz) : 1,40 (s, 9H, CH<sub>3</sub> Boc)  
 1,74 (m, 2H, CH<sub>2</sub> 4)  
 2,87 (m, 4H, CH<sub>2</sub> 1, 5)  
 3,05 (m, 2H, CH<sub>2</sub> 3)  
 3,22 (m, 2H, CH<sub>2</sub> 2)  
 5,05 (s, 2H, CH<sub>2</sub> Z)  
 7,00 (t large, 1H, NH Boc)  
 7,34 (s large, 6H, CH Z et NH Z)  
 8,50 (pic échangeable au D<sub>2</sub>O, 2H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)

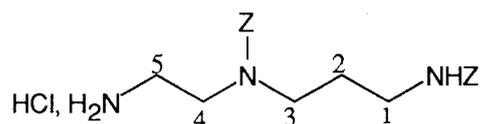
**3,6-[Di-(benzyloxycarbonyl)amino]-1-[(tert-butylloxycarbonyl)amino]-3-azahexane 12**



Au dérivé **10** (4 g ; 9,25 mmoles), en suspension dans 75 cm<sup>3</sup> de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, on ajoute 3,9 cm<sup>3</sup> (27,75 mmoles) d'Et<sub>3</sub>N. Ce mélange est refroidi à 0°C sous agitation puis additionné de chloroformiate de benzyle goutte à goutte. L'agitation est poursuivie jusqu'au retour à température ambiante puis, une nuit. La phase organique est lavée par une solution HCl 1N, puis par H<sub>2</sub>O. Elle est ensuite séchée sur CaCl<sub>2</sub> et évaporée à sec. Après une chromatographie sur silice avec l'éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (9 : 1), le composé **12** est obtenu sous forme d'une huile.

Rdt : 89%  
 Rf (SS 8) : 0,82  
 IR : 3310 (NH amide)  
 1670-1680 (CO Z et Boc)  
 RMN (DMSO, 300 MHz) : 1,40 (s, 9H, CH<sub>3</sub> Boc)  
 1,62 (m, 2H, CH<sub>2</sub> 4)  
 2,98 (m, 4H, CH<sub>2</sub> 1, 5)  
 3,05 (m, 4H, CH<sub>2</sub> 2, 3)  
 5,01-5,06 (2s, 4H, CH<sub>2</sub> Z)  
 6,90 (t large, 1H, NH Boc)  
 7,33 (s large, 11H, CH Z et NH Z)

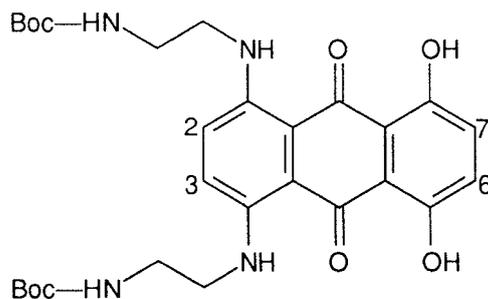
**1-(Amino)-3,6-[di-(benzyloxycarbonyl)amino]-3-azahexane, chlorhydrate 14**



Une solution éthanolique (EtOH absolu) de l'amine protégée **12** (5,5 g ; 11,63 mmoles) est soumise à l'action de l'acide chlorhydrique gazeux. Après 3 h d'agitation à température ambiante, le produit précipite dans EtOH. Il est essoré puis recristallisé dans le même solvant.

Rdt :	72%
Rf (SS 1 + NH <sub>3</sub> ) :	0,62
F (°C) :	140-141°
IR :	3300 (NH amide, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) 1670 (CO)
RMN (DMSO, 300 MHz) :	1,66 (m, 2H, CH <sub>2</sub> 4) 2,66 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 2, 3) 3,27 (m, 2H, CH <sub>2</sub> 5) 3,47 (m, 2H, CH <sub>2</sub> 1) 5,02-5,10 (2s, 4H, CH <sub>2</sub> Z) 7,35 (s large, 10H, CH Z) 8,16 (pic échangeable au D <sub>2</sub> O, 3H, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )

**1,4-Bis[[(tert-butyloxycarbonyl)amino]éthylamino]-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione 15**

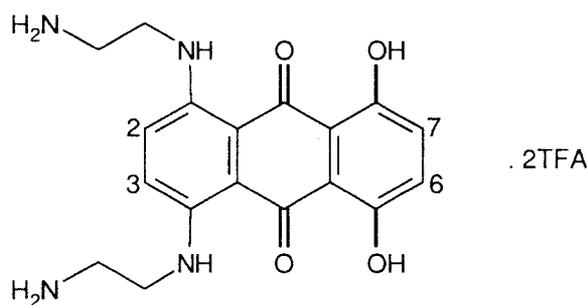


730 mg (2,66 mmoles) de LDHQ (leucodérivé de la DHQ) et 4,27 g (26,6 mmoles) de **6** sont dissous séparément dans du MeOH sous barbotage d'azote. Le mélange est placé dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, puis chauffé à reflux du solvant (50-55°C) pendant 3 h sous atmosphère non oxydante (N<sub>2</sub>). Le barbotage d'azote est supprimé et la couleur évolue du violet au bleu durant l'oxydation à l'air libre.

Après évaporation du MeOH, le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice. Les impuretés sont éliminées successivement par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexane (20,10, 5 et 0%). Le produit pur est élué avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (95 : 5).

Rdt :	27%
Rf (SS 1) :	0,90
F (°C) :	204°
IR :	3340 (NH amide) 1680 (CO)
RMN (DMSO, 80 MHz) :	1,3 (s, 18 H, CH <sub>3</sub> ) 3,4 (m, 8H, CH <sub>2</sub> ) 7,2 (s, 2H, CH-6,7) 7,5 (s, 2H, CH-2,3) 10,4 (pic large, 2H, NH-aryle) 13,5 (s échangeable au D <sub>2</sub> O, 2H, OH)
UV (MeOH) :	619 ; 672 nm
SM (FAB+) :	557 (M+1)

**1,4-Bis-(aminoéthylamino)-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione, ditrifluoroacétate :**  
**(DAE)<sub>2</sub>-DHO, 2TFA 18**

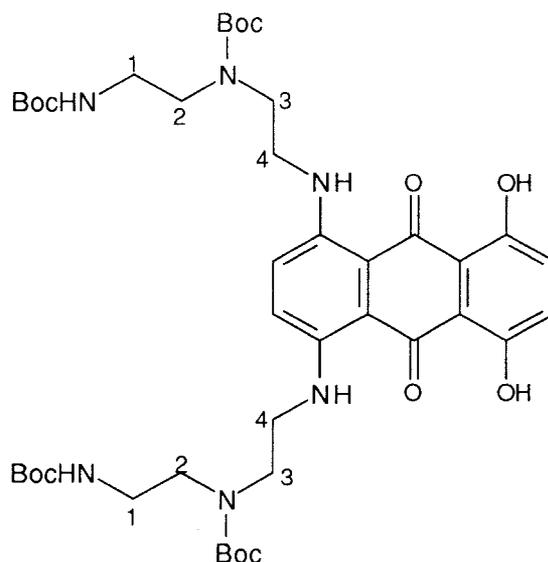


Les cristaux de **15** sont dissous dans 10 cm<sup>3</sup> de TFA. Après 30 min d'agitation le TFA est évaporé. Le résidu est repris plusieurs fois par le MeOH afin d'éliminer le TFA. La poudre bleue obtenue est triturée par l'éther, essorée puis lavée à l'éther.

Rdt :	95%
F(°C)	>270°
Rf (SS 5)	0,15

RMN (DMSO, 400 MHz) :	3,10 (m, 4H, CH <sub>2</sub> )
	3,82 (m, 4H, CH <sub>2</sub> )
	7,21 (s, 2H, CH-6,7)
	7,62 (s, 2H, CH-2,3)
	8 (pic large échangeable au D <sub>2</sub> O, 6H, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )
	10,45 (pic large, 2H, NH-aryle)
	13,50 (s échangeable au D <sub>2</sub> O, 2H, OH)
UV (MeOH) :	613 ; 664 nm
SM (FAB+) :	357 (M+1)

**1,4-Bis-[[[3,6-di-(tert-butyloxycarbonyl)amino]-3,6-diazahexyl]amino]-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione 17**

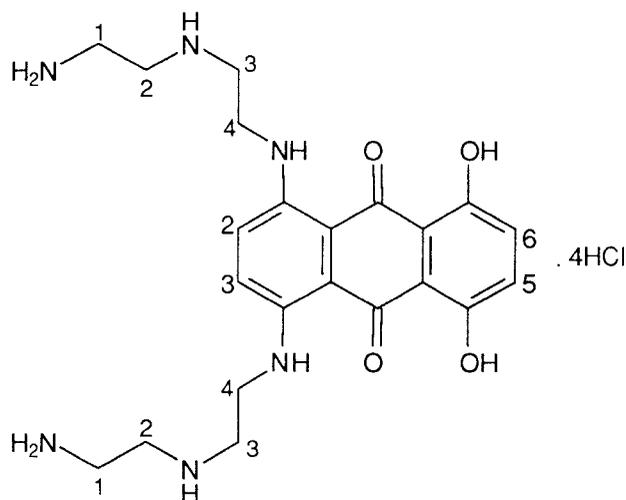


0,3 g (1,095 mmoles) de LDHQ et 2 g (6,570 mmoles) de **13** sont dissous séparément dans MeOH sous barbotage d'azote. Le mélange est chauffé à 50-55°C durant 5 h sous atmosphère non oxydante (N<sub>2</sub>). Le barbotage d'azote est ensuite supprimé et l'agitation à l'air libre durant une nuit permet l'oxydation. Le milieu réactionnel est porté à sec puis dissous dans AcOEt. La phase organique est ensuite lavée par HCl 1N, NaOH 1N et H<sub>2</sub>O. Après séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, l'évaporation à sec fournit un précipité qui est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice (solvant : acétone/toluène/cyclohexane (2 : 3 : 5)). Les fractions pures sont rassemblées, évaporées et le précipité obtenu est trituré dans l'éther puis filtré.

Rdt :	54%
Rf (SS 9) :	0,14

F (°C) :	170-171°
RMN (DMSO, 300MHz) :	1,35-1,40 (2s, 36 H, CH <sub>3</sub> Boc)
	3,00 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 4)
	3,18 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 3)
	3,41 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 2)
	3,52 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 1)
	6,82 (t large, 2H, NH Boc)
	7,18 (s, 2H, CH-6,7)
	7,62 (s, 2H, CH-2,3)
	10,58 (t large, 2H, NH-aryle)
	13,50 (s échangeable au D <sub>2</sub> O, 2H, OH)
SM (FAB+) :	843 (M + 1)
UV (MeOH) :	672 ; 619 nm

**1,4-Bis-[2-(2-aminoéthylamino)éthylamino]-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione, tétrachlorhydrate 20**



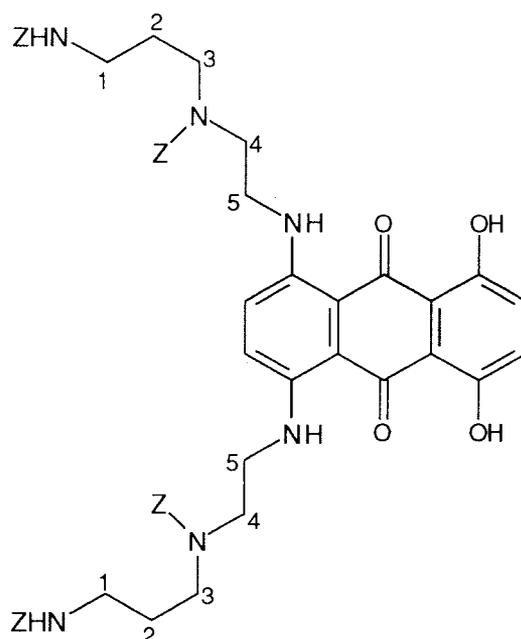
0,550 g ( 0,652 mmole) du dérivé **17** est mis en suspension dans MeOH et dissous par addition lente d'HCl gazeux. Le mélange réactionnel est agité 1 h à température ambiante. Le précipité formé est filtré et rincé plusieurs fois avec MeOH et Et<sub>2</sub>O.

Rdt :	90%
Rf (SS 12) :	0,10
F (°C) :	>270°

RMN (DMSO, 300MHz) : 3,18 (m, 12H, CH<sub>2</sub> 2, 3 et 4)  
 3,85 (m, 4H, CH<sub>2</sub> 1)  
 7,18 (s, 2H, CH-6,7)  
 7,62 (s, 2H, CH-2,3)  
 8,46 (t large échangeable au D<sub>2</sub>O, 6H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)  
 9,80 (t large échangeable au D<sub>2</sub>O, 6H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)  
 10,32 (t large, 2H, NH-aryle)  
 13,40 (s échangeable au D<sub>2</sub>O, 2H, OH)

SM (FAB+) : 443 (M + 1)  
 UV (MeOH) : 674 ; 621 nm

**1,4-Bis-[[[3,7-di-(benzyloxycarbonyl)amino]-3,7-diazaheptyl]amino]-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione 16**

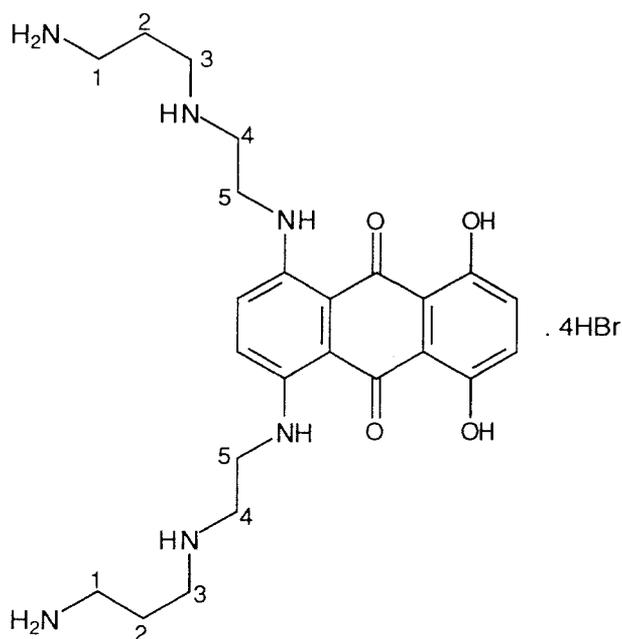


2,5 g (5,925 mmoles) du dérivé **14** et 270 mg (0,987 mmole) du leucodérivé de la DHQ (LDHQ) sont traités selon le protocole expérimental utilisé pour l'élaboration du dérivé **17**. La purification est réalisée par chromatographie sur silice avec un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (8 : 2) comme éluant.

Rdt : 45%  
 Rf (SS 2) : 0,88  
 F (°C) : 99-100°

RMN (DMSO, 300MHz) :	1,70 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 2)
	3,02 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 5)
	3,33 (m, 8H, CH <sub>2</sub> 3 et 4)
	3,52 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 1)
	5,05-5,10 (2s, 8H, CH <sub>2</sub> Z)
	7,20 (s, 2H, CH-6,7)
	7,35 (m, 24H, CH Z, NH Z, CH-2,3)
	10,48 (t large, 2H, NH-aryle)
	13,50 (s échangeable au D <sub>2</sub> O, 2H, OH)
SM (FAB+)	1008 (M+1)
UV (MeOH) :	672 ; 619 nm

**1,4-Bis-[2-(3-aminopropylamino)éthylamino]5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione, tétrabromhydrate **19****



L'acidolyse en milieu HBr/AcOH du composé **16** (150 mg ; 0,15 mmole) est effectuée à température ambiante pendant 50 min. La solution est alors évaporée à sec et le résidu est repris par l'éther puis filtré et rincé. On obtient le composé **19** sous forme d'une poudre bleue.

Rdt :	80,5%
Rf (SS 12) :	0,12
F (°C) :	>270°

RMN (DMSO, 300MHz) :	2,03 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 2)
	2,92 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 5)
	3,13(m, 8H, CH <sub>2</sub> 3 et 4)
	3,90 (m, 4H, CH <sub>2</sub> 1)
	7,26 (s, 2H, CH-6,7)
	7,70 (s, 2H, CH-2,3)
	7,92 (t large échangeable au D <sub>2</sub> O, 6H, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )
	8,87 (t large échangeable au D <sub>2</sub> O, 4H, NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> )
	10,42 (t large, 2H, NH-aryle)
	13,45 (s échangeable au D <sub>2</sub> O, 2H, OH)
SM (FAB+)	471 (M+1)
UV (MeOH) :	673 ; 621 nm

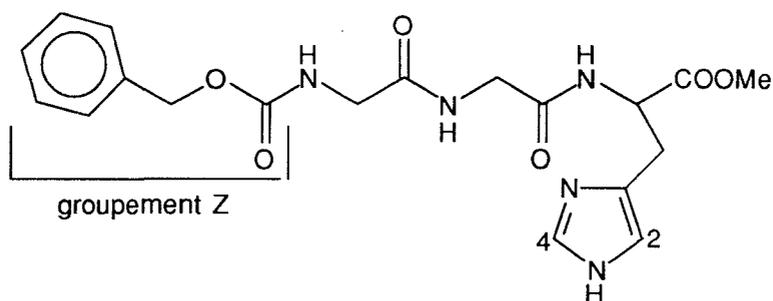
### N-(benzyloxycarbonyl)-glycyl-glycine 21

A une solution de 12 g (0,1 mole) de glycyl-glycine dans 50 cm<sup>3</sup> de NaOH 2N, refroidie à 0°C sous agitation, sont additionnés simultanément et goutte à goutte 17 g (0,1 mole) de chloroformiate de benzyle et 25 cm<sup>3</sup> de NaOH 4N en 30 min. Durant l'addition le pH doit rester basique.

La solution aqueuse est refroidie dans un bain de glace et acidifiée lentement à pH: 4-5. Le précipité formé est filtré, lavé avec de l'eau froide, puis séché.

Rdt :	88%
Rf (SS 4) :	0,11
F (°C) :	174°
IR :	3240 (NH amide)
	1735 (C=O Z)
	1650 (C=O amide)
	1560 (COOH)
RMN (DMSO, 80 MHz) :	3,50 (d, 2H, CH <sub>2</sub> Gly)
	3,70 (d, 2H, CH <sub>2</sub> Gly)
	5,05 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Z)
	7,35 (s, 5H, CH Z)
	8,12 (t, 2H, NH Gly)

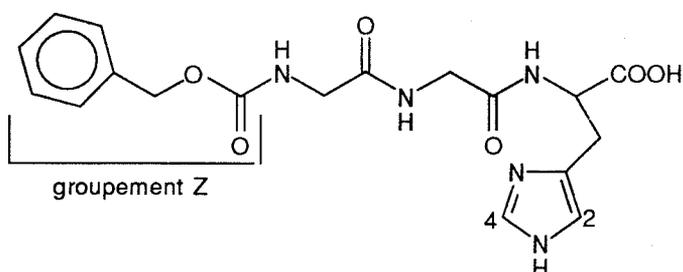
**Ester méthylique de N-(benzyloxycarbonyl)-glycyl-glycyl-L-histidine 22**



A une solution de **21** (5,32 g ; 20 mmoles), de N-hydroxybenzotriazole (HOBt) (3,12 g, 20 mmoles) et de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (4,12 g ; 20 mmoles) dans le DMF (100 cm<sup>3</sup>) est ajoutée une solution d'ester méthylique de la L-histidine (4,84g, 20 mmoles) et de Et<sub>3</sub>N (4 g ; 40 mmoles) dans 50 cm<sup>3</sup> de DMF. Le mélange réactionnel est agité durant 1 h à 0°C, puis à température ambiante toute une nuit.

Les précipités de DCU et de Et<sub>3</sub>N, HCl sont filtrés et le DMF évaporé. L'huile résiduelle est dissoute dans H<sub>2</sub>O, additionnée de quelques gouttes de HCl (pH = 2). La DCU formée, HOBt et Z-Gly-Gly-OH sont séparés par filtration. Le filtrat est refroidi puis additionné d'une solution de soude froide. A partir de pH 8-9 le composé **21** précipite. Il est essoré et ensuite séché.

Rdt :	78%
Rf (SS 5) :	0,80
F (°C) :	170-171°
IR :	3320 (NH) 1730 (CO-Z) 1700 (COOMe) 1650 (CO amide)
RMN (DMSO, 80 MHz) :	2,86 (m, 2H, CH <sub>2</sub> His) 3,32 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ester) 3,59 (d, 2H, CH <sub>2</sub> Gly) 3,70 (d, 2H, CH <sub>2</sub> Gly) 4,48 (m, 1H, CH <sub>α</sub> His) 5,04 (s, 2H, CH <sub>2</sub> Z) 6,82 (s, 1H, CH-4 His) 7,36 (s, 5H, CH Z) 7,55 (s, 1H, CH-2 His) 7,97 (d échangeable au D <sub>2</sub> O, 1H, NH His) 8,25 (t large, 1H, NH Gly)

**Acide N-(benzyloxycarbonyl)-glycyl-glycyl-L-histidine 23**

A une solution de 2 g (4,8 mmoles) de 22 dans MeOH sont ajoutés 5 cm<sup>3</sup> de NaOH 1N sous agitation. Après 1 h, la fin de la réaction est contrôlée par CCM et le pH ajusté à 5 par une solution d'HCl 1N, puis la solution est évaporée à sec. Le résidu est repris par un minimum de MeOH et la partie insoluble est filtrée (NaCl). L'addition d'éther entraîne la précipitation de l'acide.

Rdt : 98%

Rf (SS 5) : 0,62

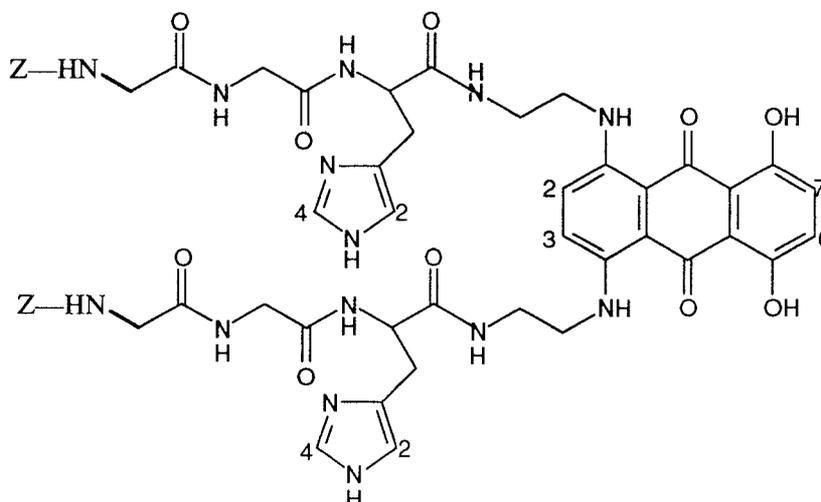
F (°C) : 178°

IR : 3320 (NH)  
1730 (CO-Z)  
1650 (CO amide)

SM (FAB+) : 404 (M+1)

RMN (DMSO, 80 MHz) : Le spectre de l'acide 23 est identique à celui de l'ester 22, la seule différence étant l'absence du pic correspondant à OCH<sub>3</sub> et les déplacements des pics caractéristiques des CH de l'histidine.

**1,4-Bis[[2-[[[(benzyloxycarbonyl)]-glycyl-glycyl-L-histidyl]amino]éthyl]amino]-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione : (Z-Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ 24**

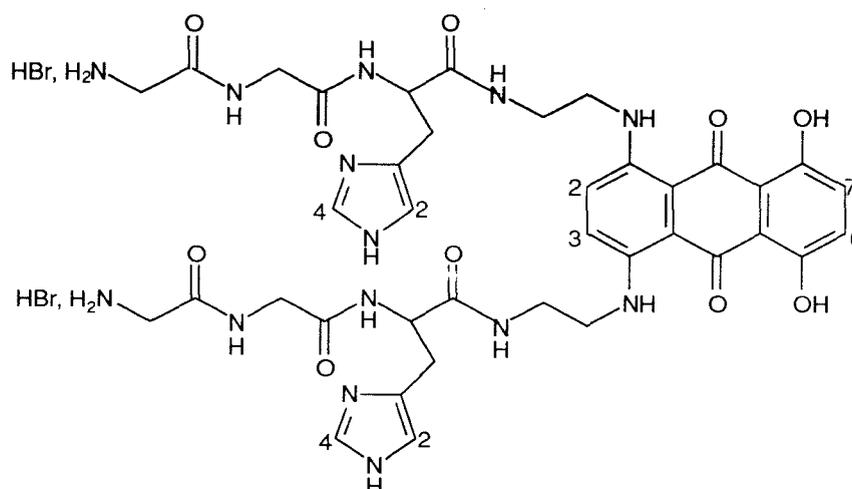


320 mg (0,79 mmole) de l'acide **23** et 70 mg (0,19 mmole) de l'amine **18** en présence de  $\text{Et}_3\text{N}$  sont traités dans les conditions exposées pour le produit **22**. Une fois le précipité de DCU filtré et le solvant évaporé, le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice éluée par un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (7 : 3).

Rdt	55%
Rf (SS 5)	0,70
F °C)	>270°
RMN (DMSO, 400 MHz) :	2,80 (d, 4H, $\text{CH}_2$ His)
	3,10 (m, 4H, $\text{CH}_2$ DAE)
	3,45 (d, 4H, $\text{CH}_2$ Gly)
	3,60 (m, 4H, $\text{CH}_2$ DAE)
	4,10 (d, 4H, $\text{CH}_2$ Gly)
	4,45 (m, 2H, $\text{CH}_\alpha$ His)
	5,10 (s, 4H, $\text{OCH}_2$ Z)
	6,80 (s, 2H, CH-4 His)
	7,20 (s, 2H, CH-6,7 DHQ)
	7,30 (s large, 10 H, CH Z)
	7,50 (m échangeable au $\text{D}_2\text{O}$ , 2H, CH-2 His)
	7,65 (s, 2H, CH-2,3 DHQ)
	8 (m , 6H, NH-CO)
	10,50 (t large, 2H, NH-aryle)
	11,7 (pic large , 2H, NH-bras)
	13,6 (s échangeable au $\text{D}_2\text{O}$ , 2H, OH)

SM (FAB+) :	1211 (M+1 ; produit di-acétylé)
	1169 (M+1 ; produit monoacétylé)
	1127 (M+1)
UV (MeOH) :	669 ; 617 nm

**1,4-Bis-[[2-[[glycyl-glycyl-L-histidyl]amino]éthyl]amino]-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione, dibromhydrate : (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHO, 2HBr 25**



100 mg (0,088 mmole) de **24** sont mis en contact avec 10 cm<sup>3</sup> d'acide acétique saturé en HBr gazeux sous agitation pendant 15 min à température ambiante. Le solvant est évaporé et le résidu repris plusieurs fois par de l'éthanol afin d'éliminer le maximum d'acide. Le résidu final est dissous dans l'eau et lavé par de l'éther (2 x 5 cm<sup>3</sup>). La phase aqueuse est lyophilisée et fournit une poudre bleue hygroscopique.

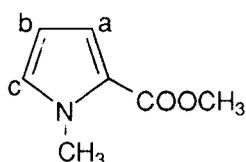
Rdt :	80%
Rf (SS 12) :	0,13
RMN (DMSO, 400 MHz) :	2,9 (m, 4H, CH <sub>2</sub> His)
	3,3 (m, 4H, CH <sub>2</sub> bras)
	3,6 (d, 4H, CH <sub>2</sub> Gly)
	3,8 (m, 4H, CH <sub>2</sub> bras)
	4,3 (d, 4H, CH <sub>2</sub> Gly)
	4,45 (m, 2H, CH <sub>α</sub> His)
	6,9 (s, 2H, CH-4 His)
	7,15 (s, 2H, CH-6,7 DHQ)
	7,65 (s, 2H, CH-2,3 DHQ)
	8 (m, 4H, NH Gly)
	8,3 (m, 2H, NH His)

8,6 (s, 2H, CH-2 His)  
 9,1 (s, 2H, NH aryle)  
 10,6 (pic large, 2H, NH bras)  
 13,5 (s échangeable au D<sub>2</sub>O, 2H, OH)  
 14 (d échangeable au D<sub>2</sub>O, 4H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)

UV(MeOH) : 667 ; 613 nm

SM (FAB+) : 859 (M+1)

### N-méthylpyrrole-2-carboxylate de méthyle 31



12,5 g (99,8 mmoles) d'acide N-méthyl-2-pyrrole carboxylique sont dissous dans 500 cm<sup>3</sup> d'acétone, puis additionnés de 55 g (0,5 mole) de carbonate de sodium et de 10 cm<sup>3</sup> d'iodure de méthyle. Le tout est porté à reflux pendant une journée. Après filtration de NaI, pratiquement insoluble dans l'acétone, le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est repris dans l'éther pour éliminer le maximum de NaI, puis le solvant évaporé. Le composé **31** est une huile.

Rdt : 94%

Rf (SS 4) : 0,95

IR : 1710 (COOCH<sub>3</sub>)

RMN (DMSO, 80MHz) : 3,80 (s, 3H, CH<sub>3</sub> ester)

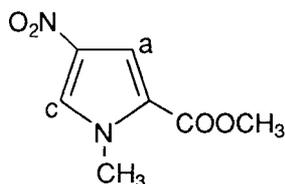
3,90 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>)

6,10 (q, 1H, H<sub>b</sub>)

6,80 (q, 1H, H<sub>c</sub>)

7 (q, 1H, H<sub>a</sub>)

### 4-Nitro-1-méthylpyrrole-2-carboxylate de méthyle 32



Trois essais ont été effectués en faisant varier le nombre d'équivalents d'acide nitrique. 6 g (43 mmoles) de **31** sont dissous dans l'anhydride acétique puis refroidis à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans un bain de MeOH. L'acide nitrique (65 %,  $2,3\text{ cm}^3$  (1,2 éq),  $2,9\text{ cm}^3$  (1,5 éq)  $6,7\text{ cm}^3$  (3,5 éq)) est ajouté lentement pour éviter toute élévation rapide de température. Ce contrôle de température est indispensable pour obtenir un produit pur avec un bon rendement. Le mélange est agité une nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé et le solide obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice éluée par un mélange  $\text{CHCl}_3$ /éther de pétrole (7 : 3). Le produit est enfin recristallisé dans EtOH.

Rdts :	29% (3,5 éq)
	28% (1,5 éq)
	22% (1,2 éq)
Rf (SS 6) :	0,36
F ( $^{\circ}\text{C}$ ) :	115-117 $^{\circ}$
IR :	3120 (CH)
	1700 ( $\text{COOCH}_3$ )
	1480 ( $\text{NO}_2$ )
RMN (DMSO, 80 MHz) :	3,80 (s, 3H, $\text{COOCH}_3$ )
	3,90 (s, 3H, $\text{NCH}_3$ )
	7,25 (d, 1H, $\text{H}_c$ )
	8,15 (d, 1H, $\text{H}_a$ )

### 4-Amino-1-méthylpyrrole-2-carboxylate de méthyle 33

#### Pemière méthode :

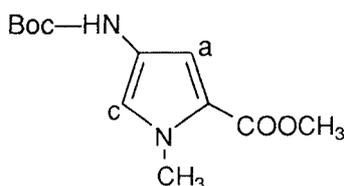
Une solution éthanolique de 6,5 g (35 mmoles) de **32** est versée dans un autoclave. Après addition d'une quantité catalytique de nickel de Raney et admission d'hydrogène sous pression (50 atmosphères), le mélange est chauffé à  $60^{\circ}\text{C}$  sous agitation pendant 8 h.

Le milieu réactionnel est filtré pour éliminer le catalyseur, puis le solvant évaporé. Le dérivé aminé, étant très instable à l'air, n'est pas isolé. Il est immédiatement utilisé pour l'étape suivante.

Deuxième méthode :

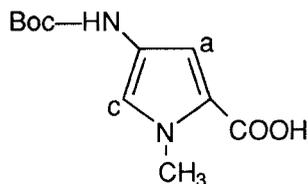
3,25 g ( 17,5 mmoles) du dérivé nitré **32** sont solubilisés dans 150 cm<sup>3</sup> de MeOH en présence de charbon palladié et placés sous atmosphère d'hydrogène. Lorsque ce dernier n'est plus absorbé, après 6 h, le catalyseur est éliminé par filtration et MeOH évaporé. L'amine est utilisée immédiatement pour l'étape suivante.

**4-[(tert-butylloxycarbonyl)amino]-1-méthylpyrrole-2-carboxylate de méthyle 34**



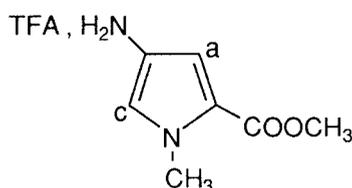
Une solution de dicarbonate de di-tert-butyle dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est additionnée à une solution de **33** dans le même solvant. Le mélange est porté à reflux durant 4 à 5 h. La solution est lavée par H<sub>2</sub>O (2 x 50 cm<sup>3</sup>) puis par HCl 1N (2 x 50 cm<sup>3</sup>). La phase organique est ensuite séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, puis le solvant évaporé. Le résidu obtenu est dissous dans l'éther et le produit précipite par l'ajout d'un grand excès d'éther de pétrole.

Rdt :	74%
Rf (SS 7) :	0,85
F (°C) :	111°-113°
IR :	3340 (NH) 1715 (COOCH <sub>3</sub> ) 1675 (CO Boc)
RMN (DMSO, 80 MHz) :	1,40 (s, 9H, CH <sub>3</sub> Boc) 3,70 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ) 3,80 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ) 6,60 (d, 1H, H <sub>c</sub> ) 7,10 (d, 1H, H <sub>a</sub> ) 9,10 (pic large , 1H. NH)

**Acide 4-[(tert-butyloxycarbonyl)amino]-1-méthylpyrrole-2-carboxylique 35**

Une solution de **34** (1,2 g ; 4,7 mmoles) et de NaOH (0,75 g ; 18,9 mmoles) dans MeOH est portée à reflux sous agitation. L'avancement de la réaction est suivi par CCM dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (9 : 1). La réaction est considérée comme étant complète au bout de 20 h. Après évaporation du MeOH, le résidu est repris par H<sub>2</sub>O et la solution acidifiée à pH 3,0 par HCl 1N. La phase aqueuse est ensuite extraite par AcOEt. Le produit est isolé par précipitation dans un mélange éther/éther de pétrole.

Rdt :	96%
Rf (SS 2) :	0,62
F (°C) :	150°-152°
IR :	3330 (NH) 1690 (OCO Boc) 1665 (COOH)
RMN (DMSO, 80 MHz) :	1,40 (s, 9H, CH <sub>3</sub> ) 3,75 (s, 3H, NCH <sub>3</sub> ) 6,55 (d, 1H, Hc) 7 (d, 1H, Ha) 9 (pic large, 1H, NH)

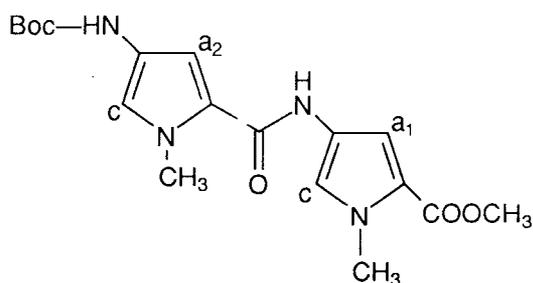
**4-Amino-1-méthylpyrrole-2-carboxylate de méthyle, trifluoroacétate 16**

A 1,1 g (4,3 mmoles) de **34** dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont ajoutés lentement 7,5 cm<sup>3</sup> d'acide trifluoroacétique. Le mélange est agité durant 15 min. Après évaporation du solvant le résidu est repris par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, précipité par l'éther puis filtré et rincé plusieurs fois avec l'éther.

Rdt :	97,5%
Rf (SS 2) :	0,40

F (°C) :	150°-152°
IR :	2900-3100 (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) 1730 (COOCH <sub>3</sub> )
RMN (DMSO, 80 MHz) :	3,73 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ) 3,86 (s, 3H, NHCH <sub>3</sub> ) 6,78 (d, 1H, H <sub>c</sub> ) 7,21 (d, 1H, H <sub>a</sub> ) 9,70 (pic large échangeable au D <sub>2</sub> O, 3H, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )

**4-[[[4-(tert-butyloxycarbonylamino)-1-méthylpyrrol-2-yl]carbonyl-amino]-1-méthylpyrrole-2-carboxylate de méthyle 37**



**Utilisation de la DMAP et de le DCC :**

0,96 g (4 mmoles) de l'acide **35** et 0,05 g (0,4 mmole) de DMAP sont dissous dans 20 cm<sup>3</sup> de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Par ailleurs, 1,072 g (4 mmoles) de l'amine **36** sont également dissous dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 cm<sup>3</sup>) en présence d'un léger excès de Et<sub>3</sub>N (0,7 cm<sup>3</sup> ; 5 mmoles), afin de déplacer l'amine de son sel. Cette solution est additionnée à la précédente en même temps que 0,92 g (4,6 mmoles) de DCC. Le tout est agité à température ambiante durant 4 à 6 h. Le précipité de DCU est filtré et le solvant évaporé. Le produit brut obtenu est repris par un minimum d'acétone afin d'éliminer le reste de DCU. Le filtrat est évaporé à sec et le résidu redissous dans l'éther. La phase étherée est lavée successivement par HCl 1N (2 x 50 cm<sup>3</sup>), H<sub>2</sub>O (2 x 50 cm<sup>3</sup>), NaHCO<sub>3</sub> 1N (2 x 50 cm<sup>3</sup>), puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'évaporation du solvant donne des cristaux jaunâtres qui sont redissous dans l'éther et reprécipités par l'ajout d'un excès d'éther de pétrole.

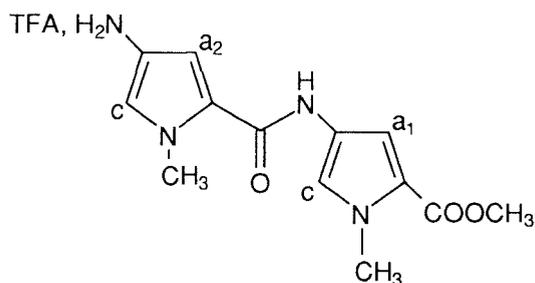
**Utilisation de la DMAP et de l'EDC :**

A une solution de l'acide **35** (0,5 g ; 2,1 mmoles) dans 20 cm<sup>3</sup> de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, on ajoute la DMAP (25 mg ; 0,21 mmole), Et<sub>3</sub>N (0,45 cm<sup>3</sup> ; 3,1 mmoles) et l'EDC (0,590 g ; 2,46 mmoles). Le mélange est refroidi dans un bain de glace. Au mélange réactionnel précédent

est ajoutée une solution de l'amine **36** dans 20 cm<sup>3</sup> de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,550 g ; 2,1 mmoles) additionnée d'Et<sub>3</sub>N (0,35 cm<sup>3</sup> ; 2,5 mmoles). Le tout est agité à température ambiante durant 4 à 6 h. Après lavage de la phase organique par HCl 1N (2 x 50 cm<sup>3</sup>), H<sub>2</sub>O (2 x 50 cm<sup>3</sup>), NaHCO<sub>3</sub> 1N (2 x 50 cm<sup>3</sup>) et séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le solvant est évaporé à sec. Le composé **37** est précipité comme précédemment par un mélange éther/éther de pétrole.

Rdt :	80% (DCC et DMAP) 76% (EDC et DMAP)
Rf (SS 2) :	0,77
F (°C) :	124°-125°
IR :	3320 (NH) 1750 (COOCH <sub>3</sub> ) 1700 (CO Boc) 1660 (CONH)
RMN (DMSO, 80 MHz) :	1,40 (s, 9H, CH <sub>3</sub> ) 3,70 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> ) 3,75 ; 3,80 (2s, 6H, NCH <sub>3</sub> ) 6,80 (d, 2H, H <sub>c</sub> ) 6,90 (d, 1H, H <sub>a2</sub> ) 7,40 (d, 1H, H <sub>a1</sub> ) 8,88 (s, 1H, NHCO) 9,70 (s, 1H, NHCO)

**4-[[[1-méthylpyrrol-2-yl)-carbonylamino]-1-méthylpyrrole-2-carboxylate de méthyle, trifluoroacétate 38**

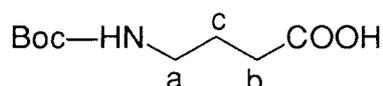


La déprotection de l'amine **37** (1,059 g ; 2,81 mmoles) est accomplie dans des conditions identiques à celles utilisées pour la déprotection du composé **35**.

Rdt :	83,7%
Rf (SS 2) :	0,58
F (°C) :	113°-114°

IR :	2900-3100 (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )
	1730 (COOCH <sub>3</sub> )
	1670 (CONH)
RMN (DMSO, 80 MHz) :	3,70 (s, 3H, COOCH <sub>3</sub> )
	3,80-3,88 (2s, 6H, NCH <sub>3</sub> )
	6,90 (d, 2H, H <sub>c</sub> )
	7,13 (d, 1H, H <sub>a2</sub> )
	7,45 (d, 1H, H <sub>a1</sub> )
	9,78 (pic large échangeable au D <sub>2</sub> O, 3H, NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )
	10 (s, 1H, NHCO)

### Acide 4-[(tert-butyloxycarbonyl)aminobutyrique 39

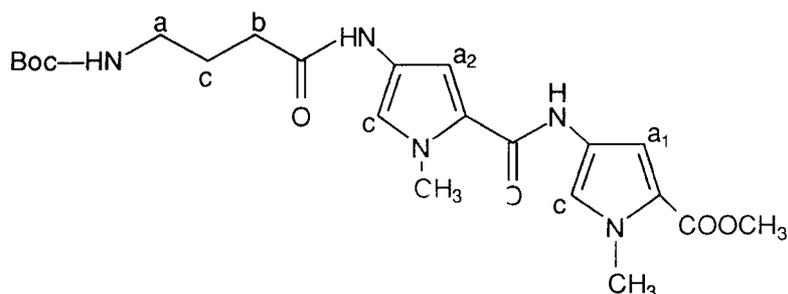


Après dissolution dans 150 cm<sup>3</sup> d'un mélange dioxanne/eau (2 : 1) de l'acide 4-aminobutyrique (10 g ; 97 mmoles), la solution est ramenée à pH 10 par addition de NaOH 3N. Le mélange est ramené à 0°C, puis additionné lentement de 23,3 g (106 mmoles) de dicarbonate de di-tert-butyle en solution dans le même mélange dioxanne/eau en maintenant le pH à 8-9 par addition d'une solution de soude. L'addition terminée, le milieu réactionnel est ramené à température ambiante et l'agitation maintenue durant 6 h. Les solvants sont ensuite évaporés et le résidu repris par l'eau (150 cm<sup>3</sup>). La solution est lavée avec AcOEt (2 x 50 cm<sup>3</sup>), puis acidifiée à pH 3,5 en prenant garde de ne pas dépasser cette valeur afin d'éviter la déprotection. Le produit est isolé de la phase aqueuse par extraction par AcOEt (2 x 50 cm<sup>3</sup>). Après séchage de la phase organique sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le solvant est évaporé sous vide. L'huile résiduelle obtenue est précipitée par AcOEt pour donner le composé **39**.

Rdt :	88,5%
Rf (SS 2) :	0,68
F (°C) :	49°-50°
IR :	3350 (NH)
	2985 (CH <sub>2</sub> )
	1700 (OCO Boc)
	1520 (CO acide)

RMN (CDCl<sub>3</sub>, 80 MHz) : 1,4 (s, 9H, CH<sub>3</sub>)  
 1,80 (m, 2H, CH<sub>2c</sub>)  
 2,36 (m, 2H, CH<sub>2b</sub>)  
 3,15 (m, 2H, CH<sub>2a</sub>)  
 9,09 (pic large, 1H, NH)

**4-[[[4'-[(tert-butyloxycarbonyl)aminobutyril]amino]-1'-méthylpyrrole-2'-carboxamido]-1-méthylpyrrole-2-carboxylate de méthyle 40**

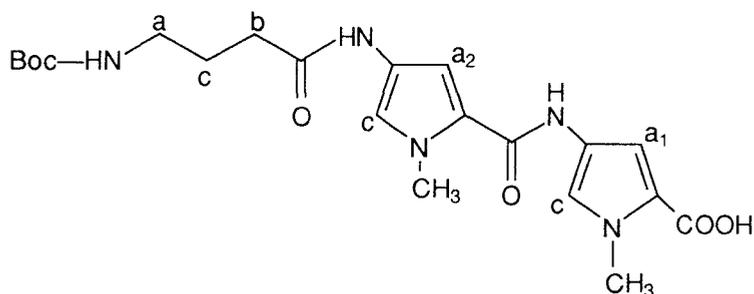


L'acide **39** (444,5 mg ; 2,2 mmoles) dans 25 cm<sup>3</sup> de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est couplé à l'amine **38** (853 mg ; 2,2 mmoles), en présence d'Et<sub>3</sub>N, selon deux protocoles identiques à ceux utilisés pour élaborer le produit **37**. Le produit est précipité par un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/éther de pétrole.

Rdt : 88% (DCC et DMAP)  
 80% (EDC et DMAP)  
 Rf (SS 2) : 0,72  
 F (°C) : 108°-110°  
 IR : 2290 (NH)  
 1730 (COOCH<sub>3</sub>)  
 1690 (CO Boc)  
 1650 (CO NH)

RMN (DMSO, 80 MHz) : 1,4 (s, 9H, CH<sub>3</sub> Boc)  
 1,80 (m, 2H, CH<sub>2c</sub>)  
 2,32 (m, 2H, CH<sub>2b</sub>)  
 3,21 (m, 2H, CH<sub>2a</sub>)  
 3,81 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>)  
 3,90 (2s, 6H, N-CH<sub>3</sub>)  
 6,75 (d, 1H, H<sub>a1</sub>)  
 7,12 (d, 1H, H<sub>a2</sub>)  
 7,44 (d, 2H, H<sub>c</sub>)  
 9,31 (s, 1H, CONH)  
 9,92 (s, 1H, CONH)

**Acide 4-[[[4'-[4-(tert-butyloxycarbonyl)amino]butyryl]amino]-1'-méthylpyrrole-2'-carboxamido]-1-méthylpyrrole-2-carboxylique : 41**

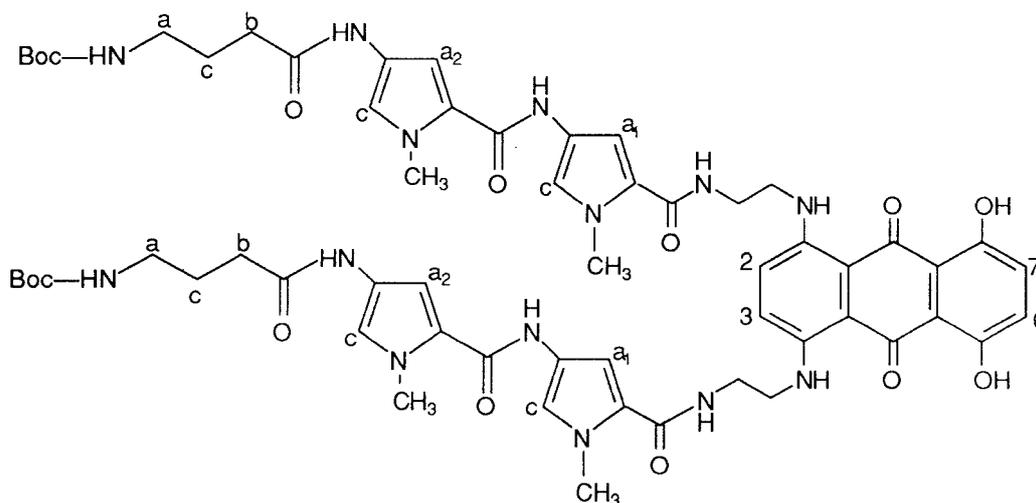


Une solution de l'ester **40** (1 g ; 2,16 mmoles) et de soude aqueuse 4N (2,5 cm<sup>3</sup>, 10 mmoles) dans 50 cm<sup>3</sup> de MeOH est portée à reflux une journée. Les solvants sont évaporés, puis le résidu repris par H<sub>2</sub>O. Après acidification de la phase aqueuse par HCl 3N, jusqu'à pH = 3, l'extraction par AcOEt fournit le produit désiré. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, puis évaporées à sec. Le composé **41** est précipité dans un mélange AcOEt/éther de pétrole, essoré puis rincé abondamment avec l'éther de pétrole.

Rdt : 90%  
 Rf (SS 2) : 0,28  
 F (°C) : 90-91°  
 IR : 3300 (NH)  
 2900 (CH)  
 1700 (CO BOC)  
 1680 (COOH)  
 1650 (CONH)

RMN DMSO, 300 MHz) : 1,4 (s, 9H, CH<sub>3</sub> Boc)  
 1,61 (m, 2H, CH<sub>2c</sub>)  
 2,22 (m, 2H, CH<sub>2b</sub>)  
 2,94 (m, 2H, CH<sub>2a</sub>)  
 3,80 (s, 6H, N-CH<sub>3</sub>)  
 6,83 (m, 3H, H<sub>c</sub> et NH Boc)  
 7,16 (m, 1H, H<sub>a2</sub>)  
 7,41 (m, 1H, H<sub>a1</sub>)  
 9,77 (s, 1H, CONH)  
 9,86 (s, 1H, CONH)  
 12,05 (pic large échangeable au D<sub>2</sub>O, 1H, OH)

**1,4-Bis-[[4-[[[4'-[4-(tert-butyloxycarbonyl)aminobutyl]amino]-1'-méthylpyrrole-2'-carboxamidol]-1-méthylpyrrole-2-carboxamidoléthylamino]-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione (Boc-Net-DAE)]<sub>2</sub>-DHQ 42**

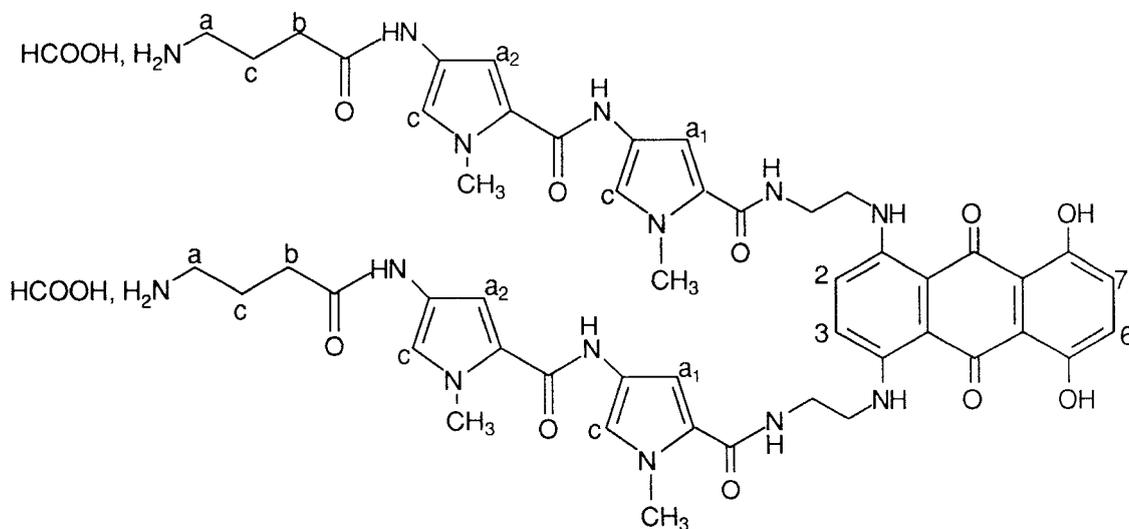


Une solution de l'acide **41** (223 mg, 0,489 mmole) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 cm<sup>3</sup>) à 0°C est ajoutée à une solution d'HOBt (114 mg, 0,747 mmole) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 cm<sup>3</sup>). Après refroidissement à 0°C, 154 mg (0,747 mmoles) de DCC sont ajoutés ; l'agitation à 0°C est maintenue pendant 1 h. Par ailleurs, 72,7 mg (0,125 mmole) de l'amine **18** sont dissous dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 cm<sup>3</sup>), additionnés au mélange précédent et agités pendant 1h à 0°C et 48 h à température ambiante. Après élimination des solvants, le composé **42** est purifié par chromatographie sur colonne de silice éluée par un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. Le produit est élué par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95 : 5).

Rdt : 65%  
 Rf (SS2) : 0,58

F (°C) :	>270°
SM (FAB+)	1215 (M+1)
RMN (DMSO, 300 MHz) :	1,4 (s, 18H, CH <sub>3</sub> Boc)
	1,68 (m, 4H, CH <sub>2c</sub> )
	2,20 (m, 4H, CH <sub>2b</sub> )
	2,95 ( ( m, 4H, CH <sub>2</sub> -NH bras)
	3,48 (m, 4H, CH <sub>2</sub> NHCO bras)
	3,65 (m, 4H, CH <sub>2a</sub> )
	3,80 (s, 12H, NCH <sub>3</sub> )
	6,80 (m, 6H, NH Boc-H <sub>c</sub> )
	7,18 (m, 6H, H <sub>a1</sub> , a <sub>2</sub> et CH-6,7)
	7,69 (s, 2H, CH-2,3)
	8,29 (m, 2H, NH bras)
	9,85 -9,75 (2s, 4H, NH amide)
	10,63 (t large, 2H, NH-aryle)
	13,50 (s échangeable au D <sub>2</sub> O, 2H, OH)
UV (MeOH) :	618 ; 671 nm

**1,4-Bis-[[4-[[4'-(4-aminobutyl)amino]-1'-méthylpyrrole-2'-carboxamido]-1-méthylpyrrole-2-carboxamidoléthylamino]-5,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione, diformiate (Net-DAE)<sub>2</sub>-DHO, 2HCOOH 43**



La coupure des groupements carbamates du composé **42** (40 mg ; 0,033 mmole) est effectuée par un traitement à l'acide formique (à 98% dans l'eau) pendant 1 h à température ambiante. L'acide est alors évaporé sous vide, le résidu repris par l'éther fournit un insoluble qui est filtré et lavé par l'éther.

Rdt : 77,7%  
Rf (SS 13) : 0,52  
F (°C) : >270°  
SM (FAB+) 1015 (M+1)  
RMN (DMSO, 250 MHz) : 1,86 (m, 4H, CH<sub>2c</sub>)  
2,38 (m, 4H, CH<sub>2b</sub>)  
2,80 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-NH bras)  
3,47 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-NHCO bras)  
3,63 (m, 4H, CH<sub>2a</sub>)  
3,82 (s, 12H, NCH<sub>3</sub>)  
6,88 (d, 4H, H<sub>C</sub>)  
7,17 (m, 4H, H<sub>a2,a1</sub> et CH-6,7)  
7,68 (m, 2H, CH-2,3)  
8,20 (m, 2H, NH bras)  
8,38 (pic large échangeable au D<sub>2</sub>O, 6H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)  
9,78, 9,95 (2s larges, 4H, NH amide)  
10,55 (t large, 2H, NH-aryle)  
13,50 (s échangeable au D<sub>2</sub>O, 2H, OH)  
UV (MeOH) : 618 ; 669 nm

### *Dénaturation thermique*

Les mesures des coefficients d'absorption sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Kontron Uvikon 810/820 couplé à un enregistreur Uvikon 21 et à une imprimante Uvikon 48. Les cuves de 3 cm<sup>3</sup> en quartz (trajet optique 10 mm) sont chauffées par une unité programmable Haack P 620 ; l'absorbance à 260 nm est enregistrée en continu et corrigée des effets de solvant grâce à une cuve de référence compensatrice. Une solution d'ADN de thymus de veau 2 x 10<sup>-4</sup> M est préparée dans un tampon SSC 0,1 M (NaCl 15 mM, citrate trisodique 1,5 mM, pH 7,0) et additionnée du produit à tester de manière à ce que le rapport P/ADN soit égal à 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1. L'absorbance est enregistrée toutes les minutes entre 53° et 95°C, à raison de 1°C par minute. La température de dénaturation de l'ADN (T<sub>m</sub>) correspond au point d'inflexion de la sigmoïde de transition hyperchrome.

### *Quenching de fluorescence*

Les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz (trajet optique 10 mm) à 20°C à l'aide d'un spectrofluorimètre Jobin-Yvon JY 3 (excitation à 546 nm et mesure à 593 nm). A une solution d'ADN 20 mM dans un tampon de force ionique 0,01 M (9,3 mM NaCl, 2 mM NaOAc, pH 7,0) sont ajoutés 3 cm<sup>3</sup> de bromure d'éthidium 2 mM de façon à avoir un minimum de déplacement pour l'éthidium et un maximum de quenching pour le produit à tester (Baguley et al., 1981). Le produit 10<sup>-3</sup> M dans H<sub>2</sub>O est ajouté par fractions de 3 cm<sup>3</sup>. La valeur Q<sub>50</sub> correspond à la concentration du produit à tester nécessaire pour réduire de 50% la fluorescence initiale du complexe ADN-bromure d'éthidium.

### *Viscosimétrie*

Les mesures de viscosimétrie sont réalisées à l'aide d'un viscosimètre Ubbelohde semi-microdilution, couplé à un détecteur électronique Schott type ABS/G avec une précision de 0,1 s. La température est maintenue à 27±0,1 °C à l'aide d'un bain-marie thermostaté.

Pour l'élongation, l'ADN de thymus de veau est coupé en courts bâtonnets selon le protocole établi par Wakelin et Waring (1976). Les solutions d'ADN 848,5 mM sont préparées dans un tampon SHE 0,01 M [NaCl 9,4 mM, HEPES 2 mM (acide (N-(2-hydroxyéthyle) pipérazine-N'-2-éthanesulfonique), EDTA 10 mM (acide éthylènediamine tétraacétique), pH 7,0]. Elles sont ensuite filtrées à l'aide d'un filtre Millipore 0,45 µm.

Les études de détorsion utilisent des solutions d'ADN circulaire superenroulé dans un tampon SHE 0,01 M pour l'hybride (Gly-Gly-L-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ ou Tris,HCl 10 mM, NaCl 10mM, pH 7 pour les autres hybrides et sont réalisées selon les protocoles établis par Saucier et al., (1971) et Revet et al., (1971) sur l'appareil décrit précédemment. Le bromure d'éthidium utilisé comme référence induit un angle de détorsion de 26° conformément à Wang (1974).

### ***Dichroïsme circulaire***

Les expériences sont effectuées à 20°C sur un dichrographe Jobin-Yvon Mark V. A une concentration fixe d'ADN (100 µM) dans le tampon cacodylate de sodium (1mM, pH 6,5) sont ajoutées des quantités croissantes de ligand. Les courbes présentent l'ellipticité molaire par nucléotide  $[\theta]$  en fonction de la longueur d'onde.

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

$$[\theta] = 3300 \Delta\epsilon = 3300 \Delta A/lc = 3300 ((A_g - A_d))/lc$$

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

### ***Dichroïsme linéaire électrique***

Les mesures de dichroïsme linéaire électrique sont effectuées avec une instrumentation informatisée utilisant le procédé décrit par Houssier et O'Konski (1981). La cellule de mesure, équipée d'un polariseur Glan, est utilisée dans les conditions suivantes : largeur de bande 3 nm, limite de sensibilité 0,001 pour  $\Delta A/A$ , temps de réponse 3 µs. Les résultats de dichroïsme sont exprimés sous la forme de dichroïsme réduit  $\Delta A/A = (A_{//} - A_{\perp})/A$  ( $\Delta A$  est obtenu à partir des mesures de  $\Delta A_{//} = A_{//} - A$  en utilisant la relation  $\Delta A = 1,5 (A_{//} - A)$ ), où  $A$  est l'absorbance en l'absence de champ, mesurée dans la même cellule (10 mm), avec un spectromètre Perkin-Elmer Lambda 5. Les équations utilisées pour le calcul des différents paramètres sont décrites par Houssier (1981). Toutes les expériences ont été réalisées à 20°C dans le tampon cacodylate de sodium (1 mM, pH 6,5) à un rapport D/P de 0,1 (concentration molaire du ligand sur concentration molaire du mononucléotide) et un champ électrique de 13 kV/cm.

Afin de définir la sélectivité de séquence par le dichroïsme linéaire, le dichroïsme réduit  $\Delta A/A$  du complexe ligand/ADN mesuré dans la bande d'absorption du ligand est analysé en tenant compte du dichroïsme réduit mesuré pour le même ADN ou polynucléotide à 260 nm en absence de ligand. Le rapport  $RD = [(\Delta A/A)_{\text{ligand.ADN}}]/[(\Delta A/A)_{\text{ADN}}]$ . Le numérateur correspond au dichroïsme réduit du complexe ligand/ADN mesuré au maximum d'absorption du ligand lié à l'ADN. Le dénominateur est toujours négatif sous les conditions expérimentales utilisées. Le rapport  $RD$  est supposé égal à 1 si le moment de transition du chromophore du ligand est parallèle aux plans des bases comme dans le cas d'une intercalation complète. Pour les ligands des sillons de l'ADN, le rapport  $RD$  est négatif. Les polynucléotides utilisés sont : poly(dA).poly(dT), poly(dAT).poly(dAT), l'ADN de *Clostridium perfringens* (26% GC), l'ADN de thymus de veau (42% GC), l'ADN de *Micrococcus lysodeikticus* (72% GC), poly(dGC).poly(dGC) et poly(dG).poly(dC). Les mesures sont effectuées selon le protocole expérimental décrit précédemment.

### ***Technique des empreintes ou "footprinting"***

- Les fragments de restriction utilisés :

Trois fragments d'ADN de compositions différentes : 117- et 265-mer du plasmide pBS et 160-mer de l'ADN *tyrT* contenant le promoteur tyrosine tRNA, ont été utilisés. Le fragment *tyrT* est obtenu par la digestion du plasmide pKMA-98 à l'aide des endonucléases de restriction *EcoRI* et *AvaI* afin de générer des extrémités cohésives d'une séquence unique. Le brin Watson est ensuite marqué en 3' avec du  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  et le brin Crick avec du  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  en présence de la transcriptase reverse. Les fragments 117- et 265-mer sont obtenus à partir du plasmide pBS digéré par les endonucléases de restriction *PvuII/EcoRI*. Cette digestion permet d'avoir les fragments qui sont ensuite marqués en 3' par la transcriptase reverse. Les détails des procédures d'isolation, de purification et de marquage de ces fragments sont décrits par Bailly et coll., (1990a ; 1992b).

- Les fragments d'ADNs modifiés :

Le fragment *tyrT* est obtenu à partir du plasmide pKMp27, isolé d'*E. coli*, au moyen de sa digestion par les enzymes de restriction *EcoRI* et *AvaI*. Le protocole de PCR (polymerase Chain restriction) utilisé pour incorporer l'inosine (I) et/ou la 2,6-diaminopurine (DAP) est conforme à celui décrit (Bailly et Waring, 1995). Les produits de PCR obtenus sont ensuite marqués sur leur extrémité 5' avec du  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , purifiés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 6% non dénaturant, puis enfin mis en

solution dans un tampon Tris-HCl 10mM, pH 7 contenant du NaCl 10mM (Bailly et Waring, 1995).

- Footprinting à la DNAase I :

Les essais de footprinting à la DNAase I sont réalisés selon les protocoles décrits par Fox et Waring (1984). Les digestions des fragments d'ADN sont effectuées à 37°C dans un tampon Tris 10mM, pH 7 contenant NaCl 10mM. La concentration en DNAase I est soigneusement ajustée pour que seule une petite fraction des molécules d'ADN totale soit coupée. Après 4 min de réaction, la digestion est arrêtée par l'addition de formamide. Les échantillons sont chauffés à 90°C pendant 4 min, plongés directement dans un bain de glace pour éviter la renaturation puis déposés sur un gel de séquençage (0,3 mm d'épaisseur, 8% acrylamide contenant de l'urée 8M). Après 2h de migration à 1500 V, les gels sont fixés dans un bain d'acide acétique à 10% pendant 15 min avant d'être séchés à 80°C. L'autoradiographie est effectuée en présence d'écran intensificateur à -70°C. Les analyses densitométriques sont réalisées à l'aide d'un phosphorimager (Bailly et coll., 1992b ; Bailly et Waring, 1995).

***Résonance paramagnétique électronique (RPE)***

Les spectres RPE sont enregistrés sur le spectromètre Varian E-109-band, dans les conditions suivantes :

Pour la production de radicaux libres :

Une modulation haute fréquence de 100 KHz avec un maximum d'amplitude de 8 G et une puissance micro-onde de 10 mW sont utilisées. Les échantillons sont examinés dans une cellule plate en quartz insérée dans une cavité E 238 opérant en mode TM<sub>110</sub>. La N-phényle-t-butyle nitron (PBN) en solution éthanolique  $8 \times 10^{-2}$  M est utilisée pour détecter la production des OH<sup>•</sup>. Le mélange réactionnel pour ces expériences de spin-trapping est constitué de :

250 µl	PBN	80 mM
100 µl	Pdt	25 mM
40 µl	CuSO <sub>4</sub>	5mM
20 µl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25 mM
40 µl	DMSO	
60 µl	eau	

### Pour les complexes cuivriques:

Les spectres RPE ont été réalisés à 77°K avec un maximum d'amplitude modulée de 8 G dans la même cavité et en mode TE<sub>104</sub>. L'addition d'une petite quantité de glycérol conduit à la formation d'une bonne surface vitreuse à 77°K. Les échantillons sont congelés à l'aide d'azote liquide dans des tubes en quartz de diamètre 4 mm. Ils sont constitués de :

50µl	Pdt	10 mM
90 µl	CuSO <sub>4</sub>	10 mM
450 µl	tampon	pH 5, 6 ou 8

Le rapport Cu/Pdt = 1,8.

### *Activité biologique*

#### *a- Activité cytotoxique in vitro*

Les cellules leucémiques L1210 et de tumeur mammaire MCF7 sont cultivées dans les milieux RPMI-1640 (GIBCO) et MEM (DULBECCO) respectivement, additionnés de 10% de sérum de veau foetal. Les essais sont réalisés dans les mêmes milieux.

Les cultures utilisées pour visualiser les effets de ces composés sont en croissance exponentielle et l'activité cytotoxique est déterminée durant une période de trois jours. Les cellules L1210 sont incubées dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> (Corning). Les cellules MCF7 sont incubées dans des plaques six puits.

La croissance cellulaire et la viabilité sont estimées par numération des cellules après dilution avec une solution de bleu trypan. Les effets de la toxicité sur la croissance cellulaire sont exprimés en fonction de la concentration du produit testé. Les données sur l'inhibition de croissance sont utilisées pour calculer les valeurs de CI<sub>50</sub> (concentration en produit nécessaire pour inhiber de 50% la croissance du témoin).

#### *b- Activité antitumorale in vivo*

Elle a été évaluée chez la souris femelle DBA/2 à laquelle on a inoculé la tumeur leucémique P 388. Les souris sont au nombre de 7 par cage pour les groupes traités

et 10 pour le groupe témoin. L'inoculation consiste en 0,1 ml de fluide ascitique dilué contenant  $10^6$  cellules leucémiques.

Le jour de l'inoculation de la tumeur, par voie i.p, est désigné comme jour 0 (J0). Le dérivé (G-G-H-DAE)<sub>2</sub>-DHQ est administré i.p aux doses suivantes : 5, 10 et 25 mg/kg aux jours J1, J5 et J9. Afin de comparer les effets de (Gly-Gly-His-DAE)<sub>2</sub>-DHQ à ceux de la mitoxantrone, cette dernière a été administrée à un groupe de 7 souris selon le même protocole à une dose de 1,6 mg/kg.

L'expérience est terminée au jour J45. Les souris sont pesées chaque jour. L'activité antitumorale est évaluée à partir du rapport T/C exprimé en pourcentage [T/C = (temps de survie médian du groupe traité/temps de survie médian du groupe témoin) x 100].

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

ABU-DAYA A., BROWN P. M., FOX K. R. (1995) DNA sequence preferences of several AT-selective minor groove binding ligands. *Nucl. Acids Res.* **23**, 3385-3392.

ADAMSON R. H. (1974) Daunomycin (NSC-82151) and adriamycin (NSC-123127) : A hypothesis concerning antitumor activity and cardiotoxicity. *Cancer Chemother. Rep.* **58**, 293-294.

ADLAM G., BLAGBROUGH I. S., TAYLOR S., LATHAM H. C., HAWORTH I. S., RODGER A. (1994) Multiple binding modes with DNA of anthracene-9-carbonyl-N<sup>1</sup>-sperminen probed by LD, CD, normal absorption, and molecular modelling compared with those of spermidine and spermine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **4**, 2435-2440.

AGBANDJE M., JENKINS T. C., McKENNA R., RESZKA A. P., NEIDLE S. (1992) Anthracene-9,10-diones as potential anticancer agents. Synthesis, DNA-binding, and biological studies on a series of 2,6-disubstituted derivatives. *J. Med. Chem.* **35**, 1418-1429.

ALLEN C. F. H., FRAHE G. F., WILSON C. V. (1941) The structure of the so-called toluidine blue. *J. Org. Chem.* **6**, 732-749.

ALLEN E. D., NATALE R. B. (1986) Effect  $\alpha$ -difluoromethylornithine alone and in combination with doxorubicin hydrochloride, cis-diamminedichloroplatinium(II), and vinblastine sulfate on the growth of P3J cells *in vitro*. *Cancer Res.* **46**, 3550-3555.

ALMEIDA M. L. S., GREHN L., RAGNARSSON U. (1988) Selective protection of polyamines : synthesis of model compounds and spermidine derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 1905- 1911.

ANIMATI F., ARCAMONE F. M., CONTE M. R., FELICETTI P., GALEONE A., LOMBARDI P., MAYOL L., PALOMA L. G., ROSSI C. (1995) Synthesis of two distamycin analogues and their binding mode to d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub> IN THE 2 : 1 solution complexes as determined by two-dimensional <sup>1</sup>H-NMR. *J. Med. Chem.* **38**, 1140-1149.

ANNE A., MOIROUX J. (1985) One-electron and two electron reductions of daunomycin. *Nouv. J. Chim.* **9**, 83-89.

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

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

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

BACHUR N. R., GORDON S. L., GEE M. V. (1978) A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Cancer Res.* **38**, 1745-1750.

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

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

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

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

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

BAILLY C., DENNY W. A., MELLOR L. E., WAKELIN L. P. G., WARING M. J. (1992b) Sequence specificity of the binding of antitumor amsacrine-4-carboxamides to DNA studied by DNAase I footprinting. *Biochemistry* **31**, 3514-3524.

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

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

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

BAILLY C., HENICHART J. P. (1994) Molecular pharmacology of intercalator-minor groove binder hybrid molecules. In : *Molecular Aspects of anticancer-DNA Interactions* (Vol 2) (Eds. Neidle S., Waring M. J.) pp 162-196.

BAILLY C., LECLERE V., POMMERY N., COLSON P., HOUSSEIER C., RIVALLE C., BISAGNI E., HENICHART J.P. (1993b) Binding to DNA, cellular uptake and biological activity of distamycin-ellipticine hybride molecule. *Anti-Cancer Drug Design* **8**, 145-164.

BAILLY C., MARCHAND C., WARING M. J. (1993a) New binding sites for antitumor antibiotics created by relocating the purine 2-amino group in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3784-3785.

BAILLY C., MICHAUX C., COLSON P., HOUSSEIER C., SUN J-S., GARESTIER T., HELENE C., HENICHART J.P., RIVALLE C., BISAGNI E., WARING M. J. (1994) Reaction of a biscationic distamycin-ellipticine hybrid ligand with DNA. Mode and sequence specificity of binding. *Biochemistry* **33**, 15348-15364.

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

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

BAILLY C., WARING M. J. (1995) Transferring the purine 2-amino group from guanines to adenines in DNA changes the sequence-specific binding of antibiotics. *Nucl. Acids Res.* **23**, 885-892.

BANK B. B., KANGANIS D., LIEBS L. F., SILBER R. (1989) Chlorambucil pharmacokinetics and DNA binding in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *Cancer Res.* **49**, 554-559.

BASRA J., BROWN J. R., PATTERSON L. H. (1984) Free radical formation in vitro by cytotoxic anthraquinone derivatives ; comparaisn with doxorubicin. *Investigational New Drugs* **2**, 117.

BASRA J., WOLF C. R., BROWN J. R., PATTERSON L. H. (1985) Evidence for human liver mediated free-radical formation by doxorubicin and mitoxantrone. *Anti-Cancer Drug Design* **1**, 45-52.

BASU H. S., FEUERSTEIN B. G., DEEN D. F., LUBICH W. P., BERGERON R. J., SAMEJIMA K., MARTON L. J. (1989) Correlation between the effects of polyamine analogues on DNA conformation and cell growth. *Cancer Res.* **49**, 5591-5597.

BASU H. S., FEUERSTEIN B. G., ZARLING D. A., SHAFER R. H., MARTON L. J. (1988) Recognition of Z-RNA and Z-DNA determinants polyamines in solution : experimental and theoretical studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **6**, 299-309.

BASU H. S., MARTON L. J., PELLARIN M., DEEN D. F., McMANIS J. S., LIU C. Z., BERGERON R. J., FEUERSTEIN B. G. (1994) Design and testing of novel cytotoxic polyamine analogues. *Cancer Res.* **54**, 6210-6214.

BASU H. S., PELLARIN M., FEUERSTEIN B. G., DEEN D. F., BERGERON R. J., MARTON L. J. (1990b) Effect of N<sup>1</sup>,N<sup>14</sup>-bis(ethyl)homospermine on the growth of U-87 and SF-126 human brain tumor cells. *Cancer Res.* **50**, 3137-3140.

BASU H. S., PELLARIN M., FEUERSTEIN B. G., SHIRAHATA A., SAMEJIMA K., DEEN D. F., MARTON L. J. (1993b) Interaction of a polyamine analogue, 1,19-bis-(ethylamino)-5,10,15-triazanonadecane (BE-4-4-4-4), with DNA and effect on growth, survival, and polyamine levels in seven human brain tumor cell lines. *Cancer Res.* **53**, 3948-3955.

BASU H. S., SCHWIETERT H. C. A., FEUERSTEIN B. G., MARTON L. J. (1990a) Effects of variation in the structure of spermine on the association with DNA and the induction of DNA conformational changes. *Biochem. J.* **269**, 329-334.

BASU H. S., SHAFER R. H., MARTON L. J. (1987) A stopped-flow H-D exchange study of spermine-poly nucleotide interaction. *Nucl. Acids Res.* **15**, 5873-5886.

BASU H. S., STURKENBOOM M. C. J. M., DELCROS J. G., CSOKAN P. P., SZÖLLÖSI J., FEUERSTEIN B. G., MARTON L. J. (1992) Effect of polyamine depletion on chromatin in U-87 MG human brain tumor cells. *Biochem. J.* **282**, 723-727.

BASU H. S., WRIGHT W. D., DEEN D. F., ROTI-ROTI J., MARTON L. J. (1993b) Treatment with polyamine analog alters DNA-matrix association in HeLa cell nuclei : a nucleoid halo essay. *Biochemistry* **32**, 4073-4076.

BENJAMIN R. S. (1995) Rationale for the use of mitoxantrone in the older patient cardiac toxicity. *Seminars in Oncology* **22**, 11-13.

BERGERON R. J., HAWTHORNE T. R., VINSON J. R. T., BECK D. V. J. R., INGENO M. J. (1989) Role of the methylene backbone in the antiproliferative activity of polyamine analogues on L1210 cells. *Cancer Res.* **49**, 2959-2964.

BERGERON R. J., McMANIS J. S., LIU C. Z., FENG Y., WEIMAR W., LUCHETTA G. R., WU Q., ORTIZ-OCASIO J., VINSON J. R. T., KRAMER D., PORTER C. (1994)

Antiproliferative properties of polyamines analogues : a structure-activity study. *J. Med. Chem.* **37**, 3464-3476.

BERGERON R. J., McMANIS J. S., WEIMAR W., SCHREIER K. M., GAO F., WU Q., ORTIZ-OCASIO J., LUCHETTA G. R., PORTER C., VINSON J. R. T., (1995) The role of charge in polyamine analogue recognition. *J. Med. Chem.* **38**, 2278-2285.

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

BIALER M., YAGEN B., MECHOULAM R. (1975) A total synthesis of distamycin A, an antiviral antibiotic. *Tetrahedron* **34**, 2389-2391.

BINASCHI M., ZUNINO F., CAPRANICO G. (1995) Mechanism of action of DNA topoisomerase inhibitors. *Stem Cell.* **13**, 369-379.

BOSSU F. P., MARGERUM D. W. (1976) The stabilization of trivalent nickel in deprotonated-peptide complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 4003-4004.

BOSSU F. P., PANIAGO E. B., MARGERUM D. W., KIRKSEY S. T., KURTZ J. (1978) Trivalent nickel catalysis of the autoxidation of nickel(II) tetraglycine. *Inorg. Chem.* **17**, 1034-1042.

BOURDOUXHE C., COLSON P., HOUSSEIER C., SUN J-S., MONTENAY-GARESTIER T., HELENE C., RIVALLE C., BISAGNI E., WARING M. J., HENICHART J.P., BAILLY C. (1992) Binding of a distamycin-ellipticine hybrid molecule to DNA and chromatine : spectroscopic, biochemical and molecular modeling investigations. *Biochemistry* **31**, 12385-12396.

BOUZIANE M., KETTERLE C., HELISSEY P., HERFELD P., LE BRET M., GIORGI-RENAULT S., AUCLAIR C. (1995) Sequence-directed single strand cleavage of DNA by a netropsin-flavin hybrid molecule. *Biochemistry* **34**, 14051-14058.

BRAND G., HOSSEINI M. W., RUPPERT R. (1994) Cyclopolyamines : synthesis of cyclospemidines and cyclospemines, analogues of spermidine and spermine. *Tetrahedron Lett.* **35**, 8609-8612.

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

BRUCE D. B., THOMSON R. H. (1952) Aromatic keto-enols. Part II. Some New 2,3-dihydro-1,4-naphthoquinones and anthraquinones. *J. Chem. Soc.* 2759-2766.

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

BURKE Jr. T. R. (1994) Protein-tyrosine kinases : potential targets for anticancer drug development. *Stem Cell.* **12**, 1-6.

BYERS T. L., LAKANEN J. R., COWARD J. K., PEGG A. E. (1994b) The role of hypusine depletion in cytostasis induced by S-adenosyl-L-methionine decarboxylase inhibition : new evidence provided by 1-methylspermidine and 1,12-dimethylspermine. *Biochem. J.* **303**, 363-368.

BYERS T. L., WECHTER R. S., HU R. H., PEGG A. E. (1994a) Effects of the S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor, 5'-{[(Z)-4-amino-2-butenyl]methylamino}-5'-deoxyadenosine, on cell growth and polyamine metabolism, and transport in chinese hamster ovary cell cultures. *Biochem. J.* **303**, 89-96.

CAMERMAN N., CAMERMAN A., SARKAR B. (1976) Molecular design to mimic the copper(II) transport site of human albumine. The crystal and molecular structure of copper(II)-glycylglycyl-L-histidine-N-methyl amide complex. *Can. J. Chem.* **54**, 1309-1316.

CAPOBIANCO M. L., COLONNA F. P., FORNI A., GARBESI A., LOTTI S., MORETTI I., SAMORI B., TONDELLI L. (1991) Interactions of nucleic acids with distamycins. Binding of Dst-3 to d(CGTTTAAACG)<sub>2</sub> and d(CGTACGTACG)<sub>2</sub>. *Nucl. Acids Res.* **19**, 1095-1098.

CAPRANICO G., DE ISABELLA P., TINELLI S., BIGIONI M., ZUNINO F. (1993) Similar sequence specificity of mitoxantrone and VM-26 stimulation of in vitro DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II. *Biochemistry* **32**, 3038-3046.

CAPRANICO G., KOHN K. W., POMMIER Y. (1990b) Local sequence requirements for DNA cleavage by mammalian topoisomerases II in the presence of doxorubicin. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6611-6619.

CAPRANICO G., ZUNINO F. (1995) Antitumor inhibitors of DNA topoisomerases. *Curr. Pharm. Design* **1**, 1-14.

CAPRANICO G., ZUNINO F., KOHN K. W., POMMIER Y. (1990a) Sequence-selective topoisomerase II inhibition by anthracycline derivatives in SV40DNA : relationship with DNA binding affinity and cytotoxicity. *Biochemistry* **29**, 562-569.

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

CASARA P., MARCHAL P., WAGNER J., DANZINC. (1989) 5'-{[(Z)-4-Amino-2-butenyl]methylamino}-5'-deoxyadenosine : a potent enzyme-activated irreversible inhibitor of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase from *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 9111-9113.

CASERO R. A. J. R., GABRIELSON E. W., PEGG A. E. (1994) Immunohistochemical staining of human spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase superinduced in response to treatment with antitumor polyamine analogues. *Cancer Res.* **54**, 3955-3958.

CASERO R. A. J. R., MANK A. R., SAAB N. H., WU R., DYER W. J., WOSTER. (1995) Growth and biochemical effects of unsymmetrically substituted polyamine analogues in human lung tumor cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **36**, 69-74.

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

CERA C., PLUMBO M. (1990) Anti-cancer activity of anthracycline antibiotics and DNA condensation. *Anti-Cancer Drug Design* **5**, 265-271.

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

- CHAIRES J. B., HERRERA J. E., WARING M. J. (1990) Preferential binding of daunomycin to 5' (A/T)CG and 5' (A/T)GC sequences revealed by footprinting titration experiments. *Biochemistry* **29**, 6145-6153.
- CHALIKIAN T. V., PLUM G. E., SAZVAZYAN A. P., BRESLAUER K. J. (1994) Influence of drug on DNA hydration : acoustic and densimetric characterizations of netropsin binding to the poly(dAdT)-poly(dAdT) and poly(dA)-poly(dT) duplexes and poly(dT)-poly(dA)poly(dT) triplex at 25°C. *Biochemistry* **33**, 8629-8640.
- CHANDRA P., GOTZ A., WACKLER A., VERINI M. A., CASAZZA A. M., FIORETTI A., ARCAMONE F., GHIONE M. (1971) Some structural requirements for the antibiotic action of distamycins. *FEBS Lett.* **16**, 249-252.
- CHANG B. K., BLACK O. J. R., GUTMAN R. (1984) Inhibition of growth of human or hamster pancreatic cancer cell lines by  $\alpha$ -difluoromethylornithine alone and combined with cis-diamminedichloroplatinium(II). *Cancer Res.* **44**, 5100-5104.
- CHEN K.-X., GRESH N., PULLMAN B. (1986) A theoretical investigation on the sequence selective binding of mitoxantrone to double-stranded tetranucleotides. *Nucl. Acids Res.* **14**, 3799-3812.
- CHENG C. C., ZBINDEN G., ZEE-CHENG R. K. Y. (1979) Comparison of antineoplastic activity of aminoethylaminoanthraquinones and anthracycline antibiotics. *J. Pharm. Sci.* **68**, 393-396.
- CHENG C. C., ZEE CHENG R. K. Y., NARAYANAN V.L., ING R. B., PAULL K. D. (1981) The collaborative development of a new family of antineoplastic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **3**, 223-224.
- CHENG C. C., ZEE-CHENG R. K. Y. (1983) The design, synthesis and development of a new class of potent antineoplastic anthraquinones. *Prog. Med. Chem.* **20**, 83-118.
- CHIANG S.-Y., WELCH J., RAUSCHER F. J., BEERMAN T. A. (1994) Effects of minor groove binding drugs on the interaction of TATA box binding protein and TFIIA with DNA. *Biochemistry* **33**, 7033-7040.
- CHICCARELLI F. S., MORRISON J. A., COSULICH D. B., PERKINSON N. A., RIDGE D. N., SUM F. W., MURDOCK K. C., WOODWARD D. L., ARNOLD E. T. (1986) Identification of human urinary mitoxantrone metabolites. *Cancer Res.* **46**, 4858-4861.
- CHIOU S. H. (1988) DNA and protein-scission activities of ascorbate in the presence of copper ion and a copper-peptide complex. *J. Biochem.* **94**, 1259-1267.
- CHURCHILL M. E. A., HAYES J. J., TULLIUS T. D. (1990) Detection of drug binding to DNA by hydroxyl radical footprinting. Relationship of distamycin binding sites to DNA structure and positioned nucleosomes on 5S RNA genes of *Xenopus*. *Biochemistry* **29**, 6043-6050.
- CIMOLI G., NOVIELLO E., MAZZONI A., DESSESSA F., VALENTI M., PARODI S., ROVINI E., RUSSO P. (1995) "Atypical" multidrug resistance in human ovarian cancer line A2780 selected for resistance to doxorubicin (A2780 DX3). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **121**, 155-163.
- CLARK E., SWANK R. A., MORGAN J. M., BASU H., MATTHEWS H. R. (1991) Two new photoaffinity to alter the helical twist of DNA in nucleosomes core particles. *Biochemistry* **30**, 4009-4020.

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

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

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

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

COLLIER D. A., NEIDLE S. (1988) Synthesis, molecular modelling, DNA binding and antitumor properties of some substituted amidoanthraquinones. *J. Med. Chem.* **31**, 847-857.

COLOMA F., LACARELLE B., POITOU P., FILLEUL A., CATALIN J. (1994) Transport hépatique de la mitoxantrone en relation avec le phénomène de résistance multiple. *Bull. Cancer* **81**, 425-430.

COLSON P., BAILLY C., HOUSIER C. (1995) Electric linear dichroism as a new tool to study sequence preference in drug binding to DNA. *Biophys. Chem.* (sous presse)

CORBETT A. H., OSHEROFF N. (1993) When good enzymes go bad : conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 585-597.

CRESPI M. D., IVANIER S. E., GENOVESE J., BALDI A. (1986) Mitoxantrone affects topoisomerase activities in human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**, 521-528.

CULLIS P. M., GREEN R. E., MALONE M. E., MERSON-DAVIES L., WEAVER R. (1994) Targeting of tumor cells with polyamine-drug conjugates. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 402S.

CULLIS P. M., MERSON-DAVIES L., WEAVER R. (1995) Conjugation of a polyamine to the bifunctional alkylating agent chlorambucil does not alter the preferred cross-linking site in duplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8033-8034.

DAENEN S., LÖWENBERG B., SONNEVELD P., VAN PUTTEN W. L. J., VERHOEF G., VERDONCK L. F., VAN VELDHoven M., HUIJGENS P. C. (1994) Efficacy of etoposide and mitoxantrone in patients with acute myelogenous leukemia refractory to standard induction therapy and intermediate-dose cytarabine with amsidine. *Leukemia* **8**, 6-10.

DALTON W. S., CRESS E. A., ALBERTS D. S., TRENT J. M. (1988) Cytogenetic and phenotypic analysis of a human colon carcinoma cell line resistant to mitoxantrone. *Cancer Res.* **48**, 1882-1888.

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

DE ISABELLA P., CAPRANICO G., PALUMBO M., SISSI C., KRAPCHO P., ZUNINO F. (1993) Sequence selectivity of topoisomerase II DNA cleavage stimulated by

mitoxantrone derivatives : relationship to drug DNA binding and cellular effects. *Mol. Pharmacol.* **43**, 715-721.

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. (1995) Topoisomerase II DNA cleavage stimulation, DNA binding activity, cytotoxicity, and physico-chemical properties of 2-aza and 2-aza-oxide-anthracenedione derivatives. *Mol. Pharmacol.* **30**, 30-38.

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

DECASTRO S., CARTONI D., MILLEFIORINI E., FUNARO S., MORINO S., TALLARICO D., BENI S. (1995) Noninvasive assessment of mitoxantrone cardiotoxicity in relapsing remitting multiple sclerosis. *J. Clin. Pharmacol.* **35**, 627-632.

DELCROS J. G., STURKENBOOM M. C. J. M., BASU H. S., SHAFER R. H., SZÔLLÔSI J., FEUERSTEIN B. G., MARTON L. J. (1993) Differential effects of spermine and its analogues on the structure of polynucleotides complexed ethidium bromide. *Biochem. J.* **291**, 269-274.

DENNY W. A., WAKELIN L. P. G. (1990) Kinetics of the binding of mitoxantrone, ametantrone and analogues to DNA : relationship with binding mode and anti-tumor activity. *Anti-Cancer Drug Design* **5**, 189-200.

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

DESIDERIO M. A., BARDELLA L. (1995) Polyamine acetylation in normal and neoplastic growth processes. *Amino Acids* **8**, 59-68.

DREDAR S.A., BLANKENSHIP J. W., MARCHANT P.E., MANNEH V., FRIES D. S. (1989) Design and synthesis of inhibitors of N<sup>8</sup>-acetylspermidine deacetylase. *J. Med. Chem.* **32**, 984-989.

DREW H. R. (1984) Les doubles hélices d'ADN et les informations génétiques. *Pour la Science* 20-37.

DREW H. R., DICKERSON R. E. (1981) Structure of B-DNA dodecamer. III. Geometry of hydration. *J. Mol. Biol.* **151**, 5535-556.

DUCROCQ C., WENDLING F., TOURBEZ-PERRIN M., RIVALLE C., TAMBOURIN P., POCHON F., BISAGNI E. (1980) Structure-activity relationships in a series of newly synthesized 1-amino-substituted ellipticine derivatives. *J. Med. Chem.* **23**, 1212-1216.

DUTHIE S. J., GRANT M. H. (1989) The role of reductive and oxidative metabolism in the toxicity of mitoxantrone, Adriamycin and menadione in human liver derived HepG2 hepatoma cells. *Br. J. Cancer* **60**, 566-571.

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

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

FAULDS D., BALFOUR J. A., CHRISP P., LANGTRY H. D. (1991) Mitoxantrone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetics properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs* **41**, 400-449.

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

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

FERIOTTO G., CIUCCI A., MISCHIATI C., ANIMATI F., LOMBARDI P., GIACOMINI P., ARCAMONE F., GAMBARI R. (1994) Binding of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 to DNA : inhibition by distamycin and two novel distamycin analogues. *Eur. J. Pharmacol.* **267**, 143-149.

FERIOTTO G., MISCHIATI C., BIANCHI N., GAMBARI R. (1995) Binding of distamycin and chromomycin to human immunodeficiency type 1 DNA : a non-radioactive automated footprinting study. *Eur. J. Pharmacol.* **290**, 85-93.

FERRERO J. M., PIVOT X., NAMER M., WENDLING J. L., FRENAY M., HOCH M., TEISSIER E. (1995) Mitoxantrone-vinorelbine as first line chemotherapy in metastatic breast cancer. *Bull. Cancer* **82**, 202-207.

FEUERSTEIN B. G., PATTABIRAMAN N., MARTON L. J. (1989) Molecular dynamics of spermine-DNA interactions : sequence specificity and DNA bending for a simple ligand. *Nucl. Acids Res.* **17**, 6883-6892.

FEUERSTEIN B. G., PATTABIRAMAN N., MARTON L. J. (1990) Molecular mechanics of interactions of spermine with DNA : DNA bending as a result of ligand binding. *Nucl. Acids Res.* **18**, 1271-1282.

FEUERSTEIN B. G., WILLIAMS L. D., BASU H. S., MARTON L. J. (1991) Implication and concepts of polyamines-nucleic acid interactions. *J. Cell. Biochem.* **46**, 37-47.

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

FISHER G. R., GUTIERREZ P. L., OLDCORNE M. A., PATTERSON L. (1992) NAD(P)H (quinone acceptor) oxidoreductase (DT-diaphorase)-mediated two-electron reduction of anthraquinone-based antitumor agents and generation of hydroxyl radicals. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 575-585.

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

FOX K. R., POLUCCI P., JENKINS T. C., NEIDLE S. (1995) A molecular anchor for stabilizing triple-helical DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 7887-7891.

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

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

FOX K. R., WARING M. J., BROWN J. R., NEIDLE S. (1986) DNA sequence preferences for the anti-cancer drug mitoxantrone and related anthraquinones revealed by DNAase I footprinting. *FEBS Lett.* **202**, 289-294.

FOX M. E., SMITH P. J. (1990) 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.* **50**, 5813-5818.

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

GANDOLFI C. A., BEGGIOLIN G., MENTA E., PALUMBO M., SISSI C., SPINELLI S., JOHNSON F. (1995) Chromophore-modified antitumor anthracenediones : synthesis, DNA binding, and cytotoxic activity of 1,4-bis[(aminoalkyl)amino]benzo[g]phtalazine-5,10-diones. *J. Med. Chem.* **38**, 526-536.

GANEM B., CHANTRAPROMMA K. (1983) Preparation of thermospermine. *Methods Enzymol.* **94**, 416-418.

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

GEIERSTANGER B. H., DWYER T. J., BATHINI Y., LOWN J. W., WEMMER D. E. (1993) NMR characterization of a heterocomplex formed by distamycin and its analogue 2-ImD with d(CGCAAGTTGGC) : d(GCCAACTTGCG) : preference for the 1:1:1 2-ImD:Dst:DNA complex over the 2:1 2-ImD:DNA and the 2:1 Dst:DNA complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4474-4482.

GEIERSTANGER B. H., JACOBSEN J. P., MRKSICH M., DERVAN P. B., WEMMER D. (1994) Structural and dynamic characterization of the heterodimeric and homodimeric complexes of distamycin and 1-methylimidazole-2-carboxamide-netropsin bound to the minor groove of DNA. *Biochemistry* **33**, 3055-3062.

GIANNI L., CORDEN B. G., MYERS C. E. (1982) The biochemical basis of anthracycline toxicity and antitumor activity. *Rev. Biochem. Toxicol.* **5**, 1-82.

GIBSON D., GEAN K. F., BEN-SHOSHAN R., RAMU A., RINGEL I., KATZHENDLER J. (1991) Preparation, characterization, and anticancer activity of a series of cis-PtCl<sub>2</sub> complexes linked to anthraquinone intercalators. *J. Med. Chem.* **34**, 414-420.

GOODSELL D. S., DICKERSON R. E. (1986) Isohelical analysis of drug-DNA groove binding drugs. *J. Med. Chem.* **29**, 727-733.

GOODSELL D. S., KOPKA M. L., DICKERSON R. E. (1995) Refinement of netropsin bound to DNA and feedback in electron density map interpretation. *Biochemistry* **34**, 4983-4993.

GREENHALGH C. W., HUGHES N. (1968) The reaction of leucoquinizarines with alkylenediamines. *J. Chem. Soc.* **31**, 1284-1288.

GREHN L., ERIKSSON B., ÖBERG B. (1983) Synthesis and antiviral activity of distamycin A analogues : substitutions on different pyrrole nitrogens and the amidine function. *J. Med. Chem.* **26**, 1042-1049.

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

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

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

GRILLO M. A., COLOMBATTO S. (1994) Polyamine transport in cells. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 894-898.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1-14.

HARBOUR J.R., CHOW V., BOLTON J. R. (1974) An ESR study of the spin adducts of OH and OH<sub>2</sub> radicals with nitrones in the ultraviolet photolysis of aqueous hydrogen peroxide solutions. *Can. J. Chem.* **52**, 3549-3555.

HARKER W. G., SLADE D. L., DALTON W. S., MELTZER P. S., TRENT J. M. (1989) Multidrug resistance in mitoxantrone-selected HL-60 leukemia cells in the absence of P-glycoprotein overexpression. *Cancer Res.* **49**, 4542-4549.

HARKER W. G., SLADE D. L., DRAKEF. H., PARR R. L. (1991) Mitoxantrone resistance in HL-60 leukemia cells : reduced nuclear topoisomerase II catalytic activity and drug-induced DNA cleavage in association with reduced expression of the topoisomerase II  $\beta$  isoform. *Biochemistry* **30**, 9953-9961.

HARKER W. G., SLADE D. L., PARR R. L., FELDHOFF P. W., SULLIVAN D. M., HOLGUIN M. H. (1995) Alterations in the topoisomerase II $\alpha$  gene, messenger RNA, and subcellular protein distribution as well reduced expression of the DNA topoisomerase II $\beta$  enzyme in a mitoxantrone-resistant HL-60 human leukemia cell line. *Cancer Res.* **55**, 1707-1716.

HAZELHURST L. A., KRAPCHO A. P., HACKER M. P. (1995a) Correlation of DNA reactivity and cytotoxicity of a new class of anticancer agents : aza-anthracenediones. *Cancer Lett.* **91**, 115-124.

HAZELHURST L. A., KRAPCHO A. P., HACKER M. P. (1995b) Comparison of aza-anthracenedione-induced DNA damage and cytotoxicity in experimental tumor cells. *Biol. Pharmacol.* **50**, 1087-1094.

HELENE C. (1991) The anti-gene strategy : control of gene expression by triplex-forming-oligonucleotides. *Anti-Cancer Drug Design* **6**, 569-584.

HELENE C., TOULME J. J. (1990) Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1049**, 99-125.

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

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

HENICHART J. P., HOUSSIN, R., BERNIER, J.L., CATTEAU, J.P. (1985a) Copper(II)- and iron(II)- complexes of methyl 2-(2-aminoethyl)-aminoethyl-pyridine-6-carboxyl-histidinate (AMPHIS), a peptide mimicking the metal-chelating moiety of bleomycin. An ESR investigation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 1036-1041.

HERFELD P., HELISSEY P., GIORGI-RENAULT S., GOULAOUIC H., PAGER J., AUCLAIR C. (1994) Poly(pyrrrolecarboxamides) linked to photoactivable chromophore isoalloxazine. Synthesis, selective binding, and DNA cleaving properties. *Bioconjugate Chem.* **5**, 67-76.

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

HOUBEN-WEYL. (1979) Anthrachinone. Georg Thieme Verlag, (Ed) Stuttgart 7/3c, 170.

HOUSIER C. (1981) Investigating nucleic acids, nucleoproteins, polynucleotides, and their interactions with small ligands by electro-optical systems. In *Molecular Electro-Optics*. Krause, S. (ed.), pp. 363. Series B64, Nato Advanced Study Institute : New York.

HOUSIER C., O'KONSKI C. T. (1981) Electro-optical instrumentation systems with their data acquisition and treatment. In *Molecular Electro-Optics*. Krause, S. (ed.), pp. 309. Series B64, Nato Advanced Study Institute : New York.

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

HUANG H., LINARES P. N., ADOLPHE M., VILLANUEVA V. R. (1994) Simultaneous inhibition of spermidine and spermine and cell division. *Biogenic Amines* **10**, 259-271.

HUANG T. L., DREDAR S. A., MANNEH V., BLANKENSHIP J. W., FRIES D. S. (1992) Inhibition of N<sup>8</sup>-acetylspermidine deacetylase by active-site-directed metal coordinating inhibitors. *J. Med. Chem.* **35**, 2414-2418.

HURLEY L. H., BOYD F. L. (1988) DNA as target for drug action. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**, 402-407.

INOUE S., KAWANISHI S. (1989) ESR evidence for superoxyde, hydroxyl radicals and singlet oxygen produced from hydrogen peroxide and nickel complex of glycylglycyl-L-histidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 445-451.

ISLAM S. A., NEIDLE S., GANDECHA B. M., PARTRIDGE M., PATTERSON L. H., BROWN J. R. (1985). Comparative computer graphics and solution studies of the DNA interaction of substituted anthraquinones based on Doxorubicin and Mitoxantrone. *J. Med. Chem.* **28**, 857-864.

ISRAEL M., ZOLL E. C., MUHAMMAD N., MODEST E. J. (1973) Synthesis and antitumor evaluation of the presumed cytotoxic metabolites of spermine and N,N'-bis(3-aminopropyl)nonane-1,9-diamine. *J. Med. Chem.* **16**, 1-5.

IVANOV V.I., MINCHENKOVA L. A., MINYAT E. E., FRANK-KAMENETSKII M. D., SCHYOLKINA A. K. (1974) The B to A DNA transition in solution. *J. Mol. Biol.* **87**, 817-833.

JOHNSON R. K., ZEE-CHENG R. K. Y., LE W. W., ACTON E. M., HENRY D. W., CHENG C. C. (1979) Experimental antitumor activity of aminoanthraquinones. *Cancer Treat. Rep.* **63**, 425-439.

KAHNE D. (1995) Strategies for the design of minor groove binders : a re-evaluation based on the emergence of site-selective carbohydrate binders. *Curr. Biol.* **2**, 7-12.

KALYANARAMAN B., MOREHOUSE K. M., MASON R. P. (1991) An electron paramagnetic resonance study of the interaction between the adriamycin semiquinone,

hydrogen peroxide, iron-chelators, and radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**, 164-170.

KALYANARAMAN B., SEALY R. C., SINHA B. K. (1984) An electron spin resonance study of the reduction of peroxides by anthracyclines semiquinones. *Biochim. Biophys. Acta.* **799**, 270-275.

KAPPUS H. (1986) Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1-6.

KAPUSCINSKI J., DARZYNKIEWICZ Z. (1984) Condensation of nucleic acids by intercalating aromatic cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 7368-7372.

KAPUSCINSKI J., DARZYNKIEWICZ Z. (1986) Relationship between pharmacological activity of antitumor drugs ametantrone and mitoxantrone (Novantrone) and their ability to condense nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 6302-6306.

KAPUSCINSKI J., DARZYNKIEWICZ Z., TRAGANOS F., MELAMED M. R. (1981) 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.* **30**, 231-240.

KARUP G., MELDAL M., NIELSEN P. E., BUCHARDT O. (1988) 9-acridinylpeptides and 9-acridinyl-4-nitrophenylsulphonylpeptides. *Int. J. Peptide Protein Res.* **32**, 331-343.

KATZHENDLER J., GEAN K. F., BAR-AD G., TASHMA Z., BEN-SHOSHAN R., RINGEL I., BACHRACH U., RAMU A. (1991) Synthesis of aminoanthraquinone derivatives and their *in vitro* evaluation as anti-cancer drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **24**, 23-30.

KHAN N. A., FARDEL O., HAVOUIIS R., FAUCHET R., MOULINOX J. P. (1994) Transport and metabolism of polyamines in wild and multidrug resistant human leukemia (K562) cells. *Leukemia Res.* **18**, 283-291.

KHARASCH E. D., NOVAK R. F. (1983a) Bis(alkylamino)anthracenedione antineoplastic agent metabolic activation by NADPH-cytochrome P-450 reductase and NADH dehydrogenase : diminished activity relative to anthracyclines. *Arch. Biochem. Biophys.* **224**, 682-694.

KHARASCH E. D., NOVAK R. F. (1983b) Inhibitory effects of anthracenedione antineoplastic agents on hepatic and cardiac lipid peroxydation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**, 500-506.

KHARASCH E. D., NOVAK R. F. (1982) Inhibition of adriamycin-stimulated microsomal lipid peroxidation by mitoxantrone and ametantrone, two new anthracenedione antineoplastic agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 1346-1352.

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

KLEYER D. L., KOCH T. H. (1984) Mechanistic investigation of reduction of daunomycin and 7-deoxydaunomycinone with bi(3,5,5-trimethyl-2-oxomorpholin-3-yl). *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 2380-2387.

KLUMPER E., PIETERS R., DENBOER M. L., HUISMANS D. R., LOONEN A. H., VEERMAN A. J. P. (1995) In vitro anthracyclines cross-resistance pattern in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Br. J. Cancer* **71**, 1188-1193.

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

KOŁODZIEJCZYK P., RESZKA K., LOWN J.W. (1988) Enzymatic oxidative activation and transformation of the antitumor agent mitoxantrone. *Free Rad. Biol. Med.* **5**, 13-25.

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

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

KRAPCHO A. P., GETAHUM Z., AVERY K. L., VARGAS K. J., HACKER M. P., SPINELLI S., PEZZONI G., MANZOTTI C. (1991) Synthesis and antitumor evaluation of symmetrically and unsymmetrically substituted 1,4-bis[(aminoalkyl)amino]-5,8-dihydroxyanthracene-9,10-diones. *J. Med. Chem.* **34**, 2373-2380.

KRAPCHO A. P., LANDI J. J., SHAW K. J., PHINNEY D. G., HACKER M. P., McCORMACK J. J. (1986) Synthesis and antitumor activities of unsymmetrically substituted 1,4-bis[(aminoalkyl)amino]anthracene-9,10-diones and related systems. *J. Med. Chem.* **29**, 1370-1373.

KRAPCHO A. P., MARESCHE M. J., HACKER M. P., HAZELHURST L. A., MENTA E., OLIVA A., SPINELLI S., BEGGIOLIN G., GIULIANI F. C., PEZZONI G., TOGNETTA S. (1995) Anthracene-9,10-diones and aza bioisosteres as antitumor agents. *Curr. Med. Chem.* **2**, 83-824.

KRAPCHO A. P., PETRY M. E., GETAHUN Z., LANDI J. J., STALLMAN J., POLSENBERG J. F., GALLAGHER C. E., MARESCHE M. J., HACKER M. P. (1994) 6,9-Bis[(aminoalkyl)amino][g]isoquinoline-5,10-diones. A novel class of chromophore-modified antitumor anthracene-9,10-diones : synthesis and antitumor evaluations. *J. Med. Chem.* **37**, 828-837.

KRISHNAMOORTHY C. R., SHAU-FONG Y., SMITH J. C., LOWN J. W., WILSON W. D. (1986) Stopped-flow kinetic analysis of the interaction of anthraquinone anticancer drugs with calf thymus DNA, poly[d(G-C)].poly[d(G-C)], and poly[d(A-T)].poly[d(A-T)]. *Biochemistry* **25**, 5933-5940.

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

KURODA Y., AIBA H. (1979) Contribution of minor species to paramagnetic line broadening of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectra in peptide-copper(II) system. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 6837-6841.

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

LAPPIN A. G., MURRAY C. K., MARGERUM D. W. (1978) Electron paramagnetic resonance studies of nickel(III)-oligopeptide complexes. *Inorg. Chem.* **17**, 1630-1634.

LAU S. J., KRUCK T. P. A., STARKER B. (1974) A peptide molecule mimicking copper(III) transport site of human serum albumine. *J. Biol. Chem.* **249**, 5878-5884.

- LAUSSAC J. P., SARKAR B. (1984) Characterization of the copper(II)- and nickel(II)-transport site of human serum albumin. Studies of copper(II) and nickel(II) binding to peptides 1-24 of human serum albumin by  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR. *Biochemistry* **23**, 2838-2842.
- LEE M., KROWICKI K., HARTLEY J. A., PON R. T., LOWN J. W. (1988) Molecular recognition between oligopeptides and nucleic acids : influence of Van der Waals contacts in determining the 3'-terminus of DNA sequences read by monocationic lexitropsins. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3641-3649.
- LEMAY P., BERNIER J. L., HENICHART J. P. (1983) Subcellular distribution of nitroxide spin-labelled 9-aminoacridine in living KB cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**, 1074-1081.
- LEVCHINE I., RAJAN P., BORLOO M., BOLLAERT W., HAEMERS A., (1994) An efficient synthesis of selectively functionalized spermidine. *Synthesis* 37-39.
- LEVITZKI A., GAZIT A. (1995) Tyrosine kinase inhibition : an approach to drug development. *Science* **267**, 1782-1788.
- LIANG Q., EASON P. D., LONG E. C. (1995) Metallopeptide-DNA interactions : site-selectivity based on amino acid composition and chirality. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9625-9631.
- LIAW Y. C., GAO Y. G., ROBINSON H., VAN DER MAREL G. A., VAN BOOM J. H., WANG A. H. J. (1989) Antitumor drug nogalamycin binds DNA in both grooves simultaneously : molecular structure of nogalamycin-DNA complex. *Biochemistry* **28**, 9913-9918.
- LINARES P. N., HUANG H., ADOLPHE M., VILLANUEVA V. R. (1994) Inhibition of both spermidine and spermine is essential for blocking cell division. *Biogenic Amines* **10**, 365-374.
- LIQUIER J., Mc HAMI A., TAILLANDIER E. (1989) FITR study of netropsin binding to poly d(A-T) and polydA-polydT. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **7**, 119-126.
- LIQUORI A. M., COSTANTINO L., CRESCENZI V., ELIA V., GIGLIO E., PULITI R., DE SANTIS SAVINO M., VITAGLIANO V. (1967) Complexes between DNA and polyamines : a molecular model. *J. Mol. Biol.* **24**, 113-122.
- LOWN J. W. (1983) The mechanism of action of quinone antibiotics. *Molec. Cell. Biochem.* **55**, 17-40.
- LOWN J. W. (1988) Lexitropsins : rational design of DNA sequence reading agents as novel anticancer agents and potential cellular probes. *Anti-cancer Drug Design* **3**, 25-40.
- LOWN J. W. (1993) Discovery and development of anthracycline antitumor antibiotics. *Chem. Soc. Rev.* 165-176.
- LOWN J. W. (1995) Design and development of sequence selective lexitropsin DNA minor groove binders. *Drug Development Res.* **34**, 145-183.
- LOWN J. W., CHEN H.-H., PLAMBECK J. A., ACTON E. M. (1982) Further studies on the generation of reactive oxygen species from activated anthracyclines and the relationship to cytotoxic action and cardiotoxic effects. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 575-581.
- LOWN J. W., HANSTOCK C. C. (1985) High-field  $^1\text{H}$  NMR analysis of the 1:1 intercalation complex of the antitumor agent mitoxantrone and the DNA duplex d(CpGpCpGp)<sub>2</sub>. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2**, 1097-1106.

LOWN J. W., KROWICKI K. (1985) Efficient total synthesis of the oligopeptide antibiotics netropsin and distamycin. *J. Org. Chem.* **50**, 3774-3779.

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

LOWN J. W., MORGAN A. R., YEN S. F., WANG Y. H., WILSON W. D. (1985) Characteristics of the binding of the anticancer agents mitoxantrone and ametantrone and related structures to deoxyribonucleic acids. *Biochemistry* **24**, 4028-4035.

LOWN J. W., RESZKA K., KOLODZIEJCZYK P., WILSON W. D. (1986a) Molecular pharmacology of the anticancer agent mitoxantrone and related structures. In "*Working group on molecular mechanisms of carcinogenic and antitumor activity*". CHAGAS C. and PULLMAN B. (eds.) pp 243-270, Pontificiae Acadimiae Scientiarum Scripta Varia , Roma.

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

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

LUK G. D., BAYLIN S. B. (1986) Anchorage dependency effects on difluoromethyl ornithine cytotoxicity in human lung carcinoma cells. *Cancer Res.* **46**, 1844-1848.

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

MACK D. P., DERVAN P. B. (1990) Nickel-mediated sequence-specific oxidative cleavage of DNA by a designed metalloprotein. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4604-4606.

MACK D. P., DERVAN P. B. (1992) Sequence-specific oxidative cleavage of DNA by a designed metalloprotein, Ni(II)-GGH (Hin 139-190). *Biochemistry* **31**, 9399-9405.

MACK D. P., IVERSON B. L., DERVAN P. B. (1988) Design and chemical synthesis of a sequence-specific DNA cleaving protein. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7572-7574.

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

MARCHAND C., BAILLY C., Mc LEAN M. J., MORONEY S. E., WARING M. J. (1992) The 2-amino group of guanine is absolutely required for specific binding of the anti-cancer antibiotic echinomycin to DNA. *Nucl. Acids Res.* **20**, 5601-5606.

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

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

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

MARTELLI S., DZIEDUSZYCKA M., STEFANSKA B., BONTEMPS-GRACZ M., BOROWSKI E. (1988) Synthesis and antineoplastic evaluation of 1,4-bis(aminoalkanamido)-9,10-anthracenediones. *J. Med. Chem.* **31**, 1956-1959.

MARTON L. J., FEUERSTEIN B. G. (1986) Polyamine-DNA interactions : possible site of new cancer chemotherapeutic intervention. *Pharm. Res.* **3**, 311-317.

MATCALF B. W., BEY P., DANZIN C., JUNG M. J., CASARA P., VEVERT J. P. (1978) Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C. 4.1.1.17) by substrate and product analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 2551-2553.

MATSUI I., PEGG A. E. (1980) Increase in acetylation of spermidine in rat liver extracts brought about by treatment with carbon tetrachloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 1009-1015.

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

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

MEDEIROS M. G., TAKAHASHI C. S. (1994) Effects of treatment with mitoxantrone in combination with novobiocin, caffeine and ara-C on human lymphocytes in culture. *Mutation Res.* **307**, 285-292.

MESTDAGH N., POMMERY N., SAUCIER J. M., HECQUET B., FOURNIER C., SLOMIANNY C., TEISSIER E., HENICHART J. P. (1994) Chemoresistance to doxorubicin and cisplatin in a murine cell line. Analysis of P-glycoprotein, topoisomerase II activity, glutathione and related enzymes. *Anticancer Res.* **14**, 869-874.

MESTDAGH N., TEISSIER-MORIER E., HENICHART J. P. (1993) Effect of various chemosensitizers on chemoresistance to adriamycin in MIP-101 cell line, a colon carcinoma cell line : analysis of glutathione and related enzymes. *Anti-Cancer Drugs* **4**, 641-650.

MEWES K., BLANZ J., EHNINGER G., GEBHARDT R., ZELLER K. P. (1993) Cytochrome P-450-induced cytotoxicity of mitoxantrone by formation of electrophilic intermediates. *Cancer Res.* **53**, 5135-5142.

MEYSKENS L. F. J. R., EMERSON S. S., HOOSHANG-MESHKINPOUR D. P., SHASSETZ L. R., EINSPAHR J., ALBERTS D. S., GERNER E. W. (1994) Dose de-escalation chemoprevention trial of  $\alpha$ -difluoromethylornithine in patients with colon polyps. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 1122-1130.

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

MOORE H. W. (1977) Bioactivation as a model for drug design bioreductive alkylation. *Science* **197**, 527-532.

MORIER-TEISSIER E., BAILLY C., BERNIER J. L., HOUSSIN R., HELBECQUE, N., CATTEAU J. P., COLSON P., HOUSIER C., HENICHART J. P. (1989) Synthesis,

biological activity and DNA interaction of anilinoacridine and bithiazole peptide derivatives related to the anti-tumor drugs m-AMSA and bleomycin. *Anti-Cancer Drug Design* **4**, 37-52.

MORIER-TEISSIER E., BERNIER J. L., LOHEZ M., CATTEAU J. P., HENICHART J. P. (1990) Free radical production and DNA cleavage by copper chelating peptide-anthraquinones. *Anti-Cancer Drug Design* **5**, 291-305.

MORIER-TEISSIER E., BOITTE N., HELBECQUE N., BERNIER J. L., POMMERY N., DUVALET J. L., FOURNIER C., HECQUET B., CATTEAU J. P., HENICHART J. P. (1993) Synthesis and antitumor properties of an anthraquinone bisubstituted by the copper chelating peptide Gly-Gly-L-His. *J. Med. Chem.* **36**, 2084-2090.

MRKSICH M., DERVAN P. B. (1993) Antiparallel side-by-side heterodimer for sequence-specific recognition in the minor groove of DNA by a distamycin/1-methylimidazole-2-carboxamide-netropsin pair. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 2572-2576.

MRKSICH M., DERVAN P. B. (1995) Recognition in the minor groove of DNA at 5'-(A,T)GCGC(A,T)-3' by a four ring tripeptide dimer. Reversal of the specificity of the naturel product distamycin. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 3325-3332.

MRKSICH M., PARKS M. E., DERVAN P. B. (1994) Hairpin peptide motif. A new class of oligopeptides for sequence-specific recognition in the minor groove of double-helical DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7983-7988.

MURDOCK K. C., CHILD R. G., FABIO P. F., ANGIER R. B., WALLACE R. E., DURR F. E., CITARELLA R. V. (1979) Antitumor agent. 1,4-bis((aminoalkyl)amino)-9,10-anthracenediones. *J. Med. Chem.* **22**, 1024-1030.

MUSSER S. M., PAN S. S., EGORIN M. J., KYLE D. J., CALLERY P. S. (1992) Alkylating DNA with aziridine produced during the hydrolysis of N',N',N"-triethylenethiophosphoramidate. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 95-99.

NADLER S. G., TAKAHASHI M. T. (1985) Putrescine transport in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **812**, 345-352.

NAGARAJAN S., GANAM B. (1985) Chemistry of naturally occurring polyamines. 9. Synthesis of spermidine and spermine photoaffinity labeling reagents. *J. Org. Chem.* **50**, 5735-5737.

NAKAGAWA M., SCHNEIDER E., DIXON K. H., HORTON J., KELLEY K., MORROW C., COWAN K. H. (1992) Reduced intracellular drug accumulation in the absence of P-glycoprotein (*mdr 1*) overexpression in mitoxantrone-resistant human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* **52**, 6175-6181.

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

NIKOLAEV V. A., SUROVAYA A. N., SIDOROVA N. Y., GROKHOVSKII S. L., ZASEDATELEV A. S., GURSKII G. V., ZHUZE A. L. (1993) DNA-base-pair sequence-specific ligands. X. Synthesis and binding to DNA of netropsin analogs containing a copper-chelating peptide. *Mol. Biol.* **27**, 117-128.

NORDEN B., KURUCSEV T. (1994) Analysing DNA complexes by circular and linear dichroism. *J. Molec. Recognition* **7**, 141-156.

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

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

PALU G., PALUMBO M., ANTONELLO C., MELONI G. A., MAGNO S. M. (1986) A search for potential antitumor agents : biological effects and DNA binding of a series of anthraquinone derivatives. *Mol. Pharmacol.* **29**, 211-217.

PALUMBO M., ANTONELLO C., VIANO L., SANTIANO M., GIA O., GASTALDI S., MAGNO S. M. (1983) New anthracenediones derivatives : interaction with DNA and biological effects. *Chem.-Biol. Interact.* **44**, 207-218.

PALUMBO M., MAGNO S. M. (1983) Interaction of deoxyribonucleic acid with anthracenedione derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* **5**, 301-307.

PALUMBO M., PALU G., GIA O., FERRAZZI E., GASTALDI S., ANTONELLO C., MELONI G. (1987) Bis-substituted hydroxy-anthracenediones : DNA binding and biological activity. *Anti-Cancer Drug Design* **1**, 337-346.

PANOUSIS C., KETLLE A. J., PILLIPS D. R. (1994) Oxidative metabolism of mitoxantrone by the human neutrophil enzyme myeloperoxidase. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 2223-2230.

PANOUSIS C., PHILLIPS D. R. (1994) DNA sequence specificity of mitoxantrone. *Nucl. Acids Res.* **22**, 1342-1345.

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

PATHAK S. N., PORTER C. W., DAVE C. (1977) Morphological evidence for an antimitochondria action by methylglyoxal-bis(guanylhydrazone). *Cancer Res.* **37**, 2246-2249.

PAVESI L., PRETI P., DAPRADA G., PEDRAZZOLI P., POGGI G., DELLACUNE G. R. (1995) Epirubicin versus mitoxantrone in combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* **15**, 495-501.

PEGG A. E. (1988) Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.* **48**, 759-774.

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

PELTON J. G., WEMMER D. E. (1990) Binding modes of distamycin with d(CGCAAATTTGCG)<sub>2</sub> determined by two-dimensional NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1393-1399.

PICKART L., FREEDMAN J. H., LOKER W. J., PEISACH J., PERKINS C. M., STENKAMP R. E., WEINSTEIN B. (1980) Growth-modulating plasma tripeptide may function by facilitating copper uptake into cells. *Nature* **288**, 715-717.

PICKART L., LOVEJOY S. (1987) Biological activity of human plasma copper-binding growth factor glycyl-L-histidyl-L-lysine. *Methods in Enzymology* **147**, 314-328.

PICKART L., THALER L., THALER M.M. (1973) A synthetic tripeptide which increases survival of normal liver cells and stimulates growth in hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 562-566.

PICKART L., THALER M.M. (1973) Tripeptide in human serum which prolongs survival on normal cells and stimulates growth in neoplastic liver. *Nature New Biol.* **243**, 85-87.

PLOUVIER B., BAILLY C., HOUSSIN R., HENICHART J. P. (1991) Synthesis of two thiazole containing oligopeptides as potential DNA minor groove binding analogs of netropsin. *Heterocycles* **32**, 693-701.

PLUM G. E., BLOOMFIELD V. A. (1990a) Effects of spermidine and hexaamminecobalt(III) on thymine imino proton exchange. *Biochemistry* **29**, 5934-5940.

PLUM G. E., BLOOMFIELD V. A. (1990b) Structural and electrostatic effects on binding of trivalent cations to double-stranded and single-stranded poly[d(AT)]. *Biopolymers* **29**, 13-27.

PLUM G. E., BLOOMFIELD V. A. (1990c) Contribution of asymmetric ligand binding to the apparent permanent dipole moment of DNA. *Biopolymers* **29**, 1137-1146.

POCHON F., COHEN S. S. (1972) 4-Thiouridine and the conformation of *E. Coli* tRNA induced by spermidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 720-726.

PORSCHKE D. (1984) Dynamics of DNA condensation. *Biochemistry* **23**, 4821-4828.

PORTER C. W., BERGERON R. J., STOLOWICH N. J. (1982) Biological properties of N<sup>4</sup>-spermidine derivatives and their potential in anticancer chemotherapy. *Cancer Res.* **42**, 4072-4078.

PORTER C. W., BERNACKI R. J., MILLER J., BERGERON R. J. (1993) Antitumor activity of N<sup>1</sup>,N<sup>11</sup>-bis(ethyl)norspermine against human melanoma xenografts and possible biochemical correlates of drug action. *Cancer Res.* **53**, 581-586.

PORTER C. W., GANIS B., RUSTUM Y., WRZOSEK C., KRAMER D. L., BERGERON R. J. (1994) Collateral sensitivity of human melanoma multidrug-resistant variants to the polyamine analogue, N<sup>1</sup>,N<sup>11</sup>-diethylnorspermine. *Cancer Res.* **54**, 5917-5924.

PORTER C. W., McMANIS J., CASERO R. A., BERGERON R. J. (1987) Relative abilities of bis(ethyl) derivatives of putrescine, spermidine, and spermine to regulate polyamine biosynthesis and inhibit L1210 leukemia cell growth. *Cancer Res.* **47**, 2821-2825.

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

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

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

RAO G. M., LOWN J. W., PALAMBECK J. A. (1978) Electrochemical studies of antitumor antibiotics. III. Daunorubicin and Adriamycin. *J. Electrochem. Soc.* **125**, 534-539.

RAO K. E., ZIMMERMANN J., LOWN J. W. (1991) Sequence-selective DNA binding by linked bis-N-methylpyrrole dipeptides : an analysis by MPE footprinting and force field calculations. *J. Org. Chem.* **56**, 786-797.

- REJET B., SCHMIR M., VINOARD J. (1971) Direct determination of the superhelix density of closed circular DNA by viscometric titration. *Nature New Biol.* **229**, 10-13.
- RHEE Y., WANG C., GAFFNEY B. L., JONES R. A. (1993) Nitrogen-15-labeled oligodeoxynucleotides. 6. Use of  $^{15}\text{N}$  NMR to probe binding of netropsin and distamycin to  $\{d[\text{CGCGAATTCGCG}]\}_2$ . *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8742-8746.
- RIOU J. F., GRONDARD L., NAUDIN A., BAILLY C. (1995) Effects of two distamycin-ellipticin hybrid molecules on topoisomerase I and II mediated cleavage : relation to cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 424-428.
- RUIZ-HERRERA J., RUIZ-MEDRANO R., DOMINGUEZ A. (1995) Selective inhibition of cytosine-DNA methylase by polyamines. *FEBS Lett.* **357**, 192-196.
- SAAB N. H., WEST E. E., BIESZK N. C., PREUSS C. V., MANK A. R., CASERO R. A., WOSTER P. M. (1993) Synthesis and evaluation of unsymmetrically substituted polyamine analogues as modulators of human spermidine- $\text{N}^1$ -acetyltransferase (SSAT) and as potential antitumor agents. *J. Med. Chem.* **36**, 2998-3004.
- SAKURAI T., NAKAHARA A. (1979) Reaction of nickel(II)- glycyglycyl-L-histidine complex with molecular oxygen and formation of decarboxylated species. *Inorg. Chim. Acta* **34**, L243-L244.
- SANO Y., DEEN D. F., OREDSSON S. M., MARTON L. J. (1984) Effects of  $\alpha$ -difluoromethylornithine on the growth of 9L brain tumor multicellular spheroids and their response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res.* **144**, 577-581.
- SAUCIER J. M., FESTY B., LE PECQ J. B. (1971) The change of the torsion of the DNA helix caused by intercalation. II. Measurement of the relative change of torsion induced by various intercalating drugs. *Biochimie* **53**, 973-980.
- SCHMID M., KLETT C., NEIDERHOFER A. (1980) Demonstration of a heritable fragile site in human chromosome 16 with distamycin A. *Cytogenet. Cell Genet.* **28**, 87-94.
- SCHMID N., BEHR J. P. (1991) Location of spermine and other polyamines on DNA as revealed by photoaffinity cleavage with polyaminobenzediazonium salts. *Biochemistry* **30**, 4357-4361.
- SEIDENFELD J., BARNES D., BLOCK A. L., ERICKSON L. C (1987) Comparison of DNA interstrand cross-linking and strand breakage by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in polyamine-depleted and control human adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* **47**, 4538-4543.
- SEIDENFELD J., KOMAR K. A. (1985) Chemosensitization of cultured human carcinoma cells to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea by difluoromethylornithine-induced polyamine depletion. *Cancer Res.* **45**, 2132-2138.
- SELLASSIE C. D., HANSCH C., KHAWAJA T. A. (1990) Structure-activity relationships of antineoplastic agents in multidrug resistance. *J. Med. Chem.* **33**, 1914-1919.
- SHINDER G., GOLD M. (1989) Integration host factor (IHF) stimulates binding of the gpNu1 subunit of  $\lambda$  terminase to *cos* DNA. *Nucl. Acids Res.* **17**, 2005-2022.
- SICCARDI A. G., LANZA E., NIELSON E., GALLIZI A., MAZZA G. (1975) Genetic and physiological studies on the site of action of distamycin A. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **8**, 370-376.

- SIKORAV J. L., PELTA J., LIVOLANT F. (1994) A liquid crystalline phase in spermidine-condensed DNA. *Biophys. J.* **67**, 1387-1392.
- SIMON H., WITTIG B., ZIMMER. (1994) Effect of netropsin, distamycin A chromomycin A<sub>3</sub> on the binding and cleavage reaction of DNA gyrase. *FEBS Lett.* **353**, 79-83.
- SINHA B. K., MOTTEN A. G., HANK K. W. (1983) The electrochemical reduction of 1,4-bis 2-((2-hydroxyethyl)-amino)ethylamino)-anthracenedione and daunomycin : biochemical significance in superoxide formation. *Chem.- Biol. Interact.* **43**, 371-377.
- SINHA B. K., TRUSH M. A., KENNEDY K. A., MIMNAUGH E. G. (1984) Enzymatic activation and binding of adriamycin to nuclear DNA. *Cancer. Res.* **44**, 2892-2896.
- SRIVENUGOPAL K. S., WEMMER D., MORRIS D. R. (1987) Aggregation of DNA by analogs of spermidine ; enzymatic and structural studies. *Nucl. Acids Res.* **15**, 2563-2580.
- STANEK J., CARAVATTI G., CAPRARO H. G., FURET P., METT H., SCHNEIDER P., REGENASS U. (1993a) S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors : new aryl and heteroaryl analogues of methylglyoxal bis-(guanylhydrazone). *J. Med. Chem.* **36**, 46-54.
- STANEK J., CARAVATTI G., FREI J., FURET P., METT H., SCHNEIDER P., REGENASS U. (1993b) 4-Amidinoindan-1-one 2'-amidinohydrazone : a new potent and selective inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Med. Chem.* **36**, 2168-2171.
- STEFANSKA B., DZIEDUSZYCKA M., MARTELLI S., BOROWSKI E. (1989) Synthesis of unsymmetrically substituted 1,4-bis((aminoalkyl)amino)anthracene-9,10-diones as potential antileukemic agents. *J. Med. Chem.* **32**, 1724-1728.
- STIFF P. J., MCKENZIE R. S., ALBERTS D. S., SOSMAN J. A., DOLAN J. R., RAD N., McCLOSKEY T. (1994) Phase I clinical and pharmacokinetic study of high-dose mitoxantrone combined with carboplatin, cyclophosphamide, and autologous bone marrow rescue : high response rate for refractory ovarian carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **12**, 176-183.
- STUBBE J., KOSARICH J. W. (1987) Mechanisms of bleomycin-induced DNA degradation. *Chem. Rev.* **87**, 1107-1136.
- SUNDARAMOORTHY R., MARAZANO C., FOURREY J. L., DAS B. (1984) Synthesis of N4-acylspermidines. *Tetrahedron Lett.* **25**, 3191-3194.
- SUNKARA P. S., FOWLER S. K., NISHIOKA K., RAO P. N. (1980) Inhibition of polyamine biosynthesis by  $\alpha$ -difluoromethylornithine potentiates the cytotoxic effects of arabinosyl cytosine in HELA cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 423-430.
- SUNKARA P. S., PRAKASH N. J., MAYER G. D., SJOERDSMA A. (1983) Tumor suppression with a combination of  $\alpha$ -difluoromethylornithine and interferon. *Science* **219**, 851-853.
- SUWALSKY M., TRAUB M., SHMUELI U., SUBIRANA J. A. (1969) An X-ray study of the interaction of DNA with spermine. *J. Mol. Biol.* **42**, 363-373.
- SUZUKI H., IKEDA T., YAMAGISHI T., NAKAIKE S., NAKANE S., OHSAWA M. (1995) Efficient induction of chromosome-type aberrations by topoisomerases II inhibitors closely associated with stabilization of the cleavable complex in cultured fibroblastic cells. *Mutation Res.* **328**, 151-161.

TABERNERO L., VERDAGUER N., COLL M., FITA I., VAN DER MAREL G. A., VAN BOOM J. H., RICH A., AYMAMI J. (1993) Molecular structure of the A-tract DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) complexes with the minor groove binding drug netropsin. *Biochemistry* **32**, 8403-8410.

TABOR C. W., TABOR H. (1984) Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 749-790.

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

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

TANIOUS F. A., JENKINS T. C., NEIDLE S., WILSON W. D. (1992) Substituent position dictates the intercalative DNA-binding mode for anthracene-9,10-dione antitumor drugs. *Biochemistry* **31**, 11632-11640.

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

THOMAS T. J., BLOOMFIEL V. A. (1983) Collapse of DNA caused by trivalent cations : pH and ionic specificity effects. *Biopolymers* **22**, 1097-1106.

THOMAS T. J., BLOOMFIEL V. A. (1984) Ionic and structural effects on the thermal helix-coil transition of DNA complexed with natural and synthetic polyamines. *Biopolymers* **23**, 1295-1306.

THOMAS T. J., BLOOMFIEL V. A. (1985) Differential effects on the B-to-Z transition of poly(dG-me<sup>5</sup>dC).poly(dG-me<sup>5</sup>dC) produced by N<sup>1</sup>- and N<sup>8</sup>-acetylspermidine. *Biopolymers* **24**, 725-729.

THORNALLEY P. J., DODD N. J. F. (1985) Free radical production from normal and adriamycin-treated rat cardiac sarcosomes. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 669-674.

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

UYEKI E. M., NISHIO A., WITTEK P. J., CHENG C. C. (1981) Antiproliferative activity of doxorubicin and aminoanthraquinone derivatives on chinese hamster ovary cells. *J. Pharm. Sci.* **70**, 1011-1013.

VAN DER GRAAF W. T. A., DE VRIES E. G. E., TIMMER-BOSSCHA H., MEERSMA G. J., MESANDER G., VELLENGA E., MULDER N. H. (1994) Effects of amiodarone, cyclosporin A, and PSC 833 on the cytotoxicity of mitoxantrone, doxorubicin, and vincristine in non-glycoprotein human small cell lung cell lines. *Cancer Res.* **54**, 5368-5373.

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

VERSCHOYLE R. D., CARTHEW P., HOLLEY J. L., CULLIS P., COHEN G. M. (1994) The comparative toxicity of chlorambucil and chlorambucil-spermidine conjugate to BALB/c mice. *Cancer Lett.* **85**, 217-222.

- VERTINO M. P., CAVANAUGH P. F. J. R., PORTER C. W. (1987) Structural determinants of spermidine-DNA interactions. *Biopolymers* **26**, 691-703.
- VOGEL C. L. (1995) Combination chemotherapy with vinorelbine (Navelbine) and mitoxantrone for metastatic breast cancer. A review. *Seminars in Oncology* **22**, 61-65.
- WAKELIN L. P. G. (1986) Polyfunctionnal DNA intercalating agents. *Med. Res. Rev.* **6**, 275-340.
- WALDES H., CENTER M. S. (1981) The interaction of adriamycin with nuclear DNA : evidence for drug induced compaction of isolated chromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 95-101.
- WALDES H., CENTER M. S. (1982) Adriamycin-induced compaction of isolated chromatin. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 1057-1061.
- WALLACE R. E., MURDOCK K. C., ANGIER R. B., DURR F. E. (1979) Activity of a novel anthracenedione, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-amino]]-9,10-anthracenedione dihydrochloride, against experimental tumors in mice. *Cancer. Res.* **39**, 1570-1574.
- WANG A. H. J., UGHETTO G., QUIGLEY G. J., HAKOSHIMA T., VAN DER MAREL G. A., VAN BOOM J. H., RICH A. (1984) The molecular structure of a DNA-Triostin A complex. *Science* **225**, 1115-1121.
- WANG A. H. J., UGHETTO G., QUIGLEY G. J., RICH A. (1987) Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA : molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpGp) at 1.2-Å resolution. *Biochemistry* **26**, 1152-1163.
- WANG J. C. (1974) The degree of unwinding of the DNA helix by ethidium. I. Titration of twisted PM2 DNA molecules in alkaline cesium chloride density gradients. *J. Mol. Biol.* **89**, 783-801.
- WARING M. J. (1976) DNA-binding characteristics of acridinylmethanesulphonamide drugs : comparison with antitumor properties. *Eur. J. Cancer* **12**, 995-1001.
- WARING M. J. (1981) DNA modification and cancer. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 159-192.
- WARING M. J. (1986) Recognition of DNA by quinoxaline antibiotics. In " *Molecular mechanisms of carcinogenic and antitumor activity* " (C. CHAGAS and B. PULLMAN eds) pp. 317-337, Adenine Press, New York.
- WARING M. J. (1990) The molecular basis of specific recognition between echinomycin and DNA. In " *Molecular basis of specificity in nucleic acid-drug interactions* ". (B. PULLMAN and J. JORTNER eds) pp. 225-245, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- WARING M. J., BAILLY C. (1994) DNA recognition by intercalators and hybrid molecules. *J. Molec. Recognition* **7**, 109-122.
- WARTELL R. M., LARSON J. E., WELLS R. D. (1974) Netropsin : a specific probe for A-T regions duplex deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **249**, 6719-6731.
- WARTELL R. M., LARSON J. E., WELLS R. D. (1975) The compatibility of netropsin and actinomycin binding to natural deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **250**, 2698-2702.
- WATT P. M., HICKSON I. D. (1994) Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem. J.* **303**, 681-695.

- WEMMER D. E., SRIVENUGOPAL K. S., REID B. R., MORRIS D. R. (1985) Nuclear magnetic resonance studies of polyamine binding to defined DNA sequence. *J. Mol. Biol.* **185**, 457-459.
- WIGLEY D. B. (1995) Structure and mechanism of DNA topoisomerases. *Ann. Rev. Biomol. Struct.* **24**, 185-208.
- WILKINS R. J. (1982) Selective binding of actinomycin D and distamycin A to DNA. *Nucl. Acids Res.* **10**, 7273-7282.
- WILLIAMS L. D., EGLI M., GAO Q., BASH P., VAN DER MAREL G. A., VAN BOOM J. H., RICH A., FREDERICK C. A. (1990) Structure of nogalamycin bound to a DNA hexamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2225-2229.
- WILLIAMS-ASHMAN H. G., SCHENONE A. (1972) Methylglyoxal bis-(guanylhydrazone) as a potent inhibitor of mammalian and yeast S-adenosylmethionine decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 288-295.
- WILSON W. R., BAGULEY B. C., WAKELIN L. P. G., WARING M. J. (1981) Interaction of antitumor drug 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide and related acridines with nucleic acids. *Mol. Pharmacol.* **20**, 404-414.
- WONG A., HUANG C. H., CROOKE S. T. (1984a) Deoxyribonucleic acid breaks produced by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide and copper. *Biochemistry* **23**, 2939-2945.
- WONG A., HUANG C. H., CROOKE S. T. (1984b) Mechanism of deoxyribonucleic acid breakage induced by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide and copper : role for cuprous ion and oxygen free radicals. *Biochemistry* **23**, 2946-2952.
- WU Y., WOSTER P. M. (1992) S-(5'-deoxy-5'-adenosyl)1-ammonio-4-(methylsulfonio)-2-cyclopentene : a potent, enzyme-activated irreversible inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Med. Chem.* **36**, 3196-3201.
- YOKOYAMA A., AIBA H., TANAKA H. (1974). Acid dissociation constants of some histidine-containing peptides and formation constants of their metal complexes. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **47**, 112-117.
- YOUNG R. C., OZOLS R. F., MYERS C. E. (1981) Medical progress. The anthracycline antineoplastic drugs. *New Engl. J. Med.* **305**, 139-153.
- YOUNGQUIST R. S., DERVAN P. B. (1985a) Sequence specific recognition of B-DNA by oligo(N-methylpyrrolcarboxamides). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 2565-2569.
- YOUNGQUIST R. S., DERVAN P. B. (1985b) Sequence specific recognition of B-DNA by bis(EDTA-Dst)fumaramide. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 5528-5529.
- YUAN Z. M., EGORIN M. J., ROSEN D. M., SIMON M. A., CALLERY P. S. (1994) Cellular pharmacology of N<sup>1</sup>- and N<sup>8</sup>-aziridinyl analogues of spermidine. *Cancer Res.* **54**, 742-748.
- YUAN Z. M., ROSEN D. M., EGORIN M. J., SIMON M. A., FISHER S., SCHIFFER C., CALLERY P. S. (1993) Potent aziridinyl analogues of polyamines. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **34**, 380.
- ZEE-CHENG R. K. Y., CHENG C. C. (1978) Antineoplastic agents. Structure-activity relationship study of bis(substituted aminoalkylamino)anthraquinones. *J. Med. Chem.* **21**, 291-294.

ZEE-CHENG R. K. Y., CHENG C. C. (1982) Structure-activity relationship study of anthraquinones : 1,4-dihydroxy-5,8-bis-((2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)amino)-9,10-anthracenedione, an analog of an established antineoplastic agent. *J. Pharm. Sci.* **71**, 708-709.

ZEE-CHENG R. K. Y., MATHEW A. E., XU P., NORTHCUTT R. V., CHENG C. C. (1987) Structural modification study of mitoxantrone (DHAQ). Chloro-substituted mono- and bis[(aminoalkyl)amino]anthraquinones. *J. Med. Chem.* **30**, 1682-1686.

ZHURKIN V. B., LYSOV Y. P., IVANOV V. I. (1980) Interaction of spermine with different forms of DNA. A conformational study. *Biopolymers* **19**, 1415-1434.

ZIMMER C., KAKIUCHI N., GUSCHLBAUER W. (1982) Differential stabilization by netropsin of inducible B-like conformation in deoxyribo-, nitro- and 2'-deoxy-2'-fluoriboadenosine containing duplexes of (dA)<sub>n</sub>-(dT)<sub>n</sub> and (dA)<sub>n</sub>-(dU)<sub>n</sub>. *Nucl. Acids Res.* **10**, 1721-1732.

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

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

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

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

ZUNINO F., ANIMATI F., CAPRANICO G. (1995) DNA minor-groove binding drugs. *Curr. Pharm. Design* **1**, 83-94.

