

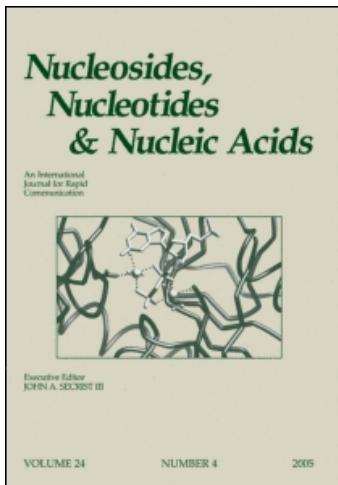
This article was downloaded by:

On: 27 January 2011

Access details: *Access Details: Free Access*

Publisher *Taylor & Francis*

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597286>

### Oligothymidylates Substituents en Position 3' Par un Dérivé De L'Acridine

U. Asseline<sup>a</sup>; N. T. Thuong<sup>a</sup>; C. Hélène<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans, Cedex, France <sup>b</sup> Laboratoire de Biophysique, INSERM U. 201, CNRS U.A 481, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

**To cite this Article** Asseline, U. , Thuong, N. T. and Hélène, C.(1986) 'Oligothymidylates Substituents en Position 3' Par un Dérivé De L'Acridine', *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 5: 1, 45 — 63

**To link to this Article: DOI:** 10.1080/07328318608081905

**URL:** <http://dx.doi.org/10.1080/07328318608081905>

## PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

OLIGOTHYMYDYLATES SUBSTITUES EN POSITION 3'  
PAR UN DERIVE DE L'ACRIDINE

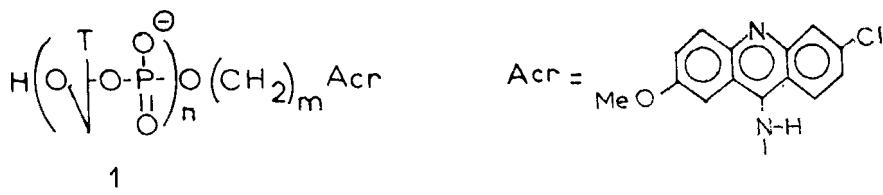
U. Asseline<sup>+</sup>, N.T. Thuong<sup>+</sup> et C. Hélène<sup>x</sup>

<sup>+</sup>Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orléans Cedex, France  
<sup>x</sup>Laboratoire de Biophysique, INSERM U.201,  
CNRS U.A 481, Muséum National d'Histoire Naturelle,  
61, Rue Buffon, 75005 Paris, France

Abstract : Oligothymidylates covalently linked at the 3' position to an acridine dye derivative via a polymethylene bridge have been synthesized by the phosphotriester method in solution.

INTRODUCTION

Un contrôle sélectif de l'expression de certains gènes et de la réplication des virus peut être envisagé si l'on dispose de molécules possédant à la fois une forte affinité et une haute spécificité vis à vis d'une séquence d'acides nucléiques. Dans le but d'accéder à de telles molécules nous avons choisi d'utiliser un oligonucléotide complémentaire d'une séquence nucléique cible et d'augmenter son affinité en lui associant de façon covalente un agent intercalant qui apporte une énergie supplémentaire par son interaction non spécifique avec les paires de bases nucléiques. Pour réaliser la mise au point d'un tel système nous avons choisi des oligothymidylates 1 dont le phosphate en position 3' terminale est lié à la méthoxy-2 chloro-6 amino-9-acridine par l'intermédiaire d'une chaîne polyméthylène de longueur variable. Nous décrivons ici la synthèse et quelques propriétés de ces oligonucléotides 1.



### RESULTATS ET DISCUSSION

Parmi les composés d'intercalation connus nous avons retenu la méthoxy-2 chloro-6 amino-9 acridine (1-4) car elle ne possède pas de spécificité vis à vis de la séquence de bases nucléiques, elle est facilement accessible à partir de la méthoxy-2 dichloro 6-9 acridine 2 et possède des propriétés de fluorescence qui permettent une détection aisée au cours de la synthèse et une étude facile des interactions avec les acides nucléiques. Pour relier le groupe intercalant à l'oligothymidylate nous avons utilisé une chaîne alkylée non ramifiée et substituée sur le groupe amino-9 de l'acridine. Ce choix permet d'obtenir un "bras" souple qui confère à l'intercalant un grand nombre de degrés de liberté. De plus les études d'interactions des dérivés de l'amino-9 acridine (4-6) avec les acides nucléiques montrent que la substitution sur ce site ne perturbe pas l'intercalation.

Enfin le greffage du groupe "intercalant-bras" à l'oligodesoxynucléotide se fait par l'intermédiaire d'une liaison "phosphodiester" compatible avec les conditions de synthèse des oligothymidylates. Cette synthèse nécessite donc la présence d'un groupe hydroxyle en  $\omega$  de la chaîne latérale. Toutes ces considérations nous ont amenés à porter notre choix sur les composés du type méthoxy-2 chloro-6 ( $\omega$ -hydroxyalkylamino)-9 acridine 4. Ces derniers ont été préparés selon une méthode analogue à celle décrite par Dupré et Robinson (7) qui consiste à faire réagir un excès d'aminoalcool 3 avec la méthoxy-2 dichloro-6,9 acridine 2 dans le phénol à 115-120°C (schéma I). Nous avons observé qu'il n'est pas possible d'obtenir les composés 4 purs par simple recristallisation. En effet les analyses des composés

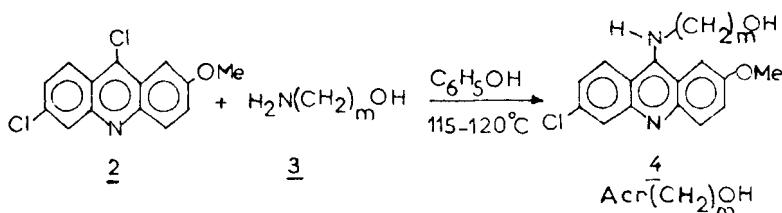


Schéma I

méthoxy-2 chloro-6 ( $\omega$ -hydroxyalkylamino)-9 acridine 4 isolés selon cette méthode, réalisées en chromatographie sur couche mince (solvant A) et par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse montrent la présence de trois produits secondaires évalués à environ 5 % (8). Deux de ces impuretés ont été identifiées (par comparaison avec des échantillons de référence) l'une à la méthoxy-2-dichloro-6,9 acridine 2 ( $T_R = 400$  sec syst.  $Y_3$ ) l'autre au dérivé amino-9 correspondant ( $T_R = 340$  sec syst.  $Y_4$ ). La troisième impureté possède un temps de rétention identique à celui du produit de dégradation obtenu en traitant la méthoxy-2 dichloro-6,9 acridine par la soude ou par l'acide chlorhydrique (9) ( $T_R = 242$  sec syst.  $Y_4$ ). Il s'agit de la méthoxy-2 chloro-6 acridone-9. [ $T_R$  4 ( $m=5$ ) = 320 sec syst.  $Y_3$ ]. La purification totale des composés 4 peut être réalisée par chromatographie sur gel de silice. Les résultats des chromatographies sur couche mince (gel de silice) et en phase liquide à haute performance (phase inverse) (Tableau I) montrent que les  $R_f$  et les temps de rétention des composés 4 augmentent avec la longueur de la chaîne polyméthylène. La substitution du chlore en position 9 de l'acridine par le groupe amino-alcool se traduit par des modifications spectrales importantes dans le domaine visible de l'acridine (figure 1). Nous pouvons observer un déplacement bathochrome important avec, d'une part, la disparition de la bande à  $\lambda = 353$  nm et, d'autre part, la transformation des deux bandes à  $\lambda = 385$  nm et  $\lambda = 404$  nm en trois bandes à  $\lambda = 400$  nm,  $\lambda = 421$  nm et  $\lambda = 438$  nm.

La structure du composé 4 ( $m=5$ ) a été confirmée par le résultat de l'analyse élémentaire et par la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire protonique (10).

Tableau I

<u>4</u> Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>m</sub> OH	Rdt %	F°C	CCM(RF)	HPLC(T <sub>R</sub> ) en phase inverse **	
				syst. Y <sub>1</sub>	syst. Y <sub>2</sub>
m = 3	60	147	0,36	350 sec	555 sec
m = 4	70	145	0,38	357 sec	627 sec
m = 5	70	145	0,41	407 sec	
m = 6	75	143	0,44	502 sec	

\* Chromatographie sur couche mince : support gel de silice 60, éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 80:20 V/V.

\*\* Chromatographie liquide à haute performance. Colonne Lichrosorb RP-8(diam 7 μm) solvant acétate d'ammonium 0,3 M dans H<sub>2</sub>O/MeOH (44:56 V/V pour Y<sub>1</sub> et H<sub>2</sub>O/MeOH 52:48 V/V pour Y<sub>2</sub>) débit 1,2 ml/mn (pH 7).

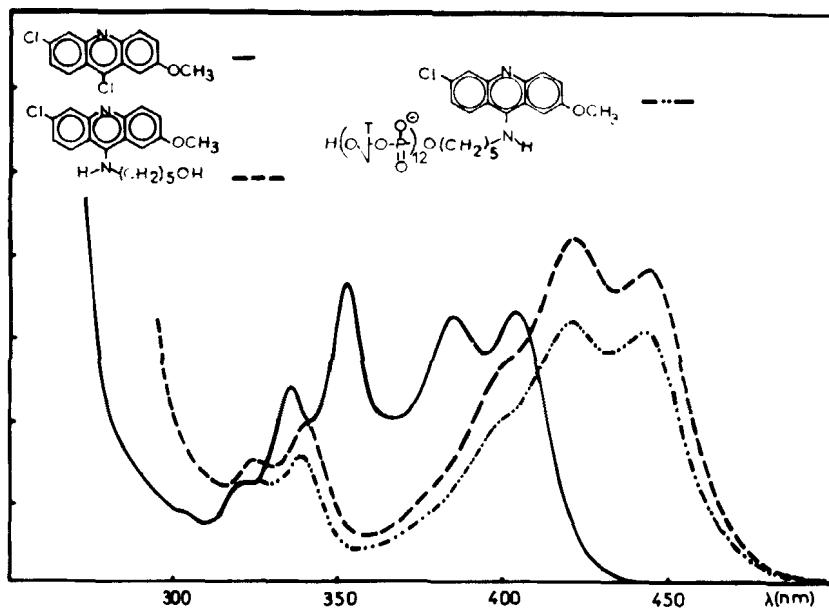
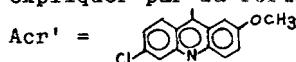


Figure 1 : Spectres d'absorption des composés méthoxy-2 dichloro-6,9 acridine 2(-), méthoxy-2 chloro-6 ( $\omega$ -hydroxypentylamino) -9 acridine 4 (---) et oligothymidylate-bras-intercalant 1 (n=12, m=5) (-...- en solution dans le cacodylate de sodium 8  $10^{-4}$  M dans H<sub>2</sub>O /MeOH 80:20 V/V (pH 7).

Avant d'entreprendre la synthèse des composés "oligothymidylate-bras-intercalant" 1 nous avons, d'une part, étudié la stabilité des composés méthoxy-2 chloro-6 ( $\omega$ -hydroxyalkylamino)-9 acridine 4 dans les conditions de synthèse et de déprotection des oligothymidylates et, d'autre part, nous avons testé la réactivité de la fonction amine secondaire en position 9 de l'acridine dans les conditions de couplage des oligonucléotides. Les résultats obtenus montrent que les composés 4 sont stables en milieu acide (acide benzène sulfonique) et basique (amine tertiaire) non aqueux. Ils sont également stables en milieu aqueux en présence d'acide acétique ou très fortement basique (NaOH). Par contre, à pH faiblement basique (pH entre 8 et 10) en présence d'ammoniaque nous observons la formation d'un produit de dégradation identifié à la méthoxy-2 chloro-6 amino-9 acridine. La stabilité des composés "bras-intercalant" 4 à pH fortement basique en présence de soude pourrait s'expliquer par la formation de l'anion  $\text{HO}(\text{CH}_2)_m\text{N}^{\ominus}\text{-Acr}'$



qui stabilise la liaison C-N en position 9 de l'acridine contre l'attaque nucléophile de l'ion hydroxyle. En effet il a été montré que les dérivés d'amine tertiaire  $\text{R}'\text{N}^{\oplus}\text{-Acr}'$  sont beaucoup plus instables en milieu basique que leurs analogues  $\text{R}-\text{N}^{\oplus}\text{-Acr}'$  (11-12).

Dans le but de déterminer la réactivité de la fonction N-H en position 9 nous avons phosphorylé la méthoxy-2 chloro-6 (butylamino)-9 acridine dans les conditions habituelles de couplage des oligodesoxy-nucléotides (en utilisant deux équivalents de mononucléotide 3'-phosphodiester 5 et un équivalent de méthoxy-2 chloro-6 butylamino-9 acridine en présence de mesitylène sulfonyl tetrazolide (MSTe) (13-14) (3 équivalents). Les résultats obtenus (8) montrent que la réaction de phosphorylation du groupe N-H en position 9 est beaucoup plus lente (<5%) que la réaction de couplage d'un nucléotide 3'-phosphodiester avec l'hydroxyle-5' d'un nucléoside ou nucléotide. Compte tenu de ces différences de réactivité entre le  $\text{N}_9\text{-H}$  et l'hydroxyle-5' et de l'élimination facile des produits secondaires de type phosphoramido par chromatographie sur silice, d'une part, et du manque de stabilité des dérivés  $\text{RR}'\text{N}^{\oplus}\text{-Acr}'$ , d'autre part, nous avons entrepris la synthèse des composés "oligothymidylate-bras-intercalant" 1 en utilisant les dérivés d'amine primaire 4.

La synthèse des composés de structure 1 a été réalisée, en solution selon la méthode au phosphotriester (13-14) qui consiste à préparer dans une première étape des composés "oligothymidylate-bras-intercalant" totalement protégés 6 (CCM Tableau II) puis à éliminer les différents groupements protecteurs dans la seconde étape. Les oligothymidylates totalement protégés 6 ont été obtenus par couplage direct d'un oligothymidylate 3'-phosphodiester 5 (13-14) avec un excès de composé 4 en présence de MSTe dans la pyridine anhydre (méthode I) schéma II. Cette réaction de couplage est rapide et conduit aux composés totalement protégés 6 avec des rendements de l'ordre de 60-70 % après purification sur silice. Nous avons observé que la purification des composés 6 par chromatographie sur silice est facile lorsque la chaîne nucléotidique est relativement courte ( $n=1,3,4,8$ ). Par contre cette purification devient difficile quand le nombre de thymines est égal ou supérieur à douze du fait que les composés totalement protégés 6 et les nucléotides 3'-phosphodiesters 5 correspondants possèdent des Rf voisins ( $Rf$  6 ( $n=12$ ,  $m=5$ ) = 0,34 syst C et  $Rf$  5 ( $n=12$ ) = 0,30 syst C)). Ce fait nous a conduits à utiliser la méthode de couplage des blocs (méthode II, schéma II), qui consiste à coupler un léger excès d'oligothymidylate 3'-phosphodiester 5 avec l'hydroxyle-5' d'un oligo-

Tableau II

Composés <u>6</u>		Intermédiaires utilisés	CCM gel de silice 60	
<u>n</u>	<u>m</u>		syst A $CH_2Cl_2/MeOH$ 90:10 V/V	syst C $CH_2Cl_2/MeOH$ 85:15 V/V
1	3	<u>5</u> ( $n=1$ ) et <u>4</u> ( $m=3$ )	0,26	-
1	5	<u>5</u> ( $n=1$ ) et <u>4</u> ( $m=5$ )	0,26	-
3	5	<u>5</u> ( $n=3$ ) et <u>4</u> ( $m=5$ )	0,21	-
4	3	<u>5</u> ( $n=4$ ) et <u>4</u> ( $m=3$ )	0,18	-
4	4	<u>5</u> ( $n=4$ ) et <u>4</u> ( $m=4$ )	0,18	-
4	5	<u>5</u> ( $n=4$ ) et <u>4</u> ( $m=5$ )	0,18	-
8	5	<u>5</u> ( $n=4$ ) et <u>7</u> ( $n=4, m=5$ )	-	0,37
8	6	<u>5</u> ( $n=8$ ) et <u>4</u> ( $m=6$ )	-	0,38
12	5	<u>5</u> ( $n=8$ ) et <u>7</u> ( $n=4, m=5$ )	-	0,42

thymidylate porteur d'un groupe "bras-intercalant" en position 3' 7 pour synthétiser l'octamère 6 ( $n=8$ ,  $m=5$ ) et le dodécamère 6 ( $n=12$ ,  $m=5$ ), ces composés après déprotection totale conduisent aux oligothymidylates 1 ( $n=8$  et  $n=12$ ,  $m=5$ ) qui peuvent être facilement séparés des oligonucléotides 3'-arylphosphodiester ( $T_p$ )  $_{n-1}^{\bullet} T_p$  plus courts.

La déprotection totale a été réalisée en deux étapes en éliminant d'abord les groupes p-chlorophényle des phosphates puis en libérant ensuite l'hydroxyle 5' par l'acide acétique à 80 %.

La désaryloration des composés "oligothymidylate-bras-intercalant"1 a été réalisée par le couple acide benzohydroxamique-diaza-1,8 bicyclo (5,4,0 undec-7ène) (DBU) dans la pyridine anhydre (15). Nous avons choisi d'opérer en milieu aprotique afin de limiter la dégradation au niveau de la liaison  $C_9$ -NH de l'acridine qui est peu stable en milieu aqueux faiblement basique (8). Le chromatogramme du mélange brut obtenu après déprotection (fig. 2) de l'octanucléotide 6 ( $n=8$ ,  $m=5$ ) préparé par couplage de deux tétranucléotides montre essentiellement un pic principal 95 % qui correspond à l'octathymidylate 1 ( $n=8$ ,  $m=5$ ) et un pic d'intensité beaucoup plus faible 3 % qui correspond à

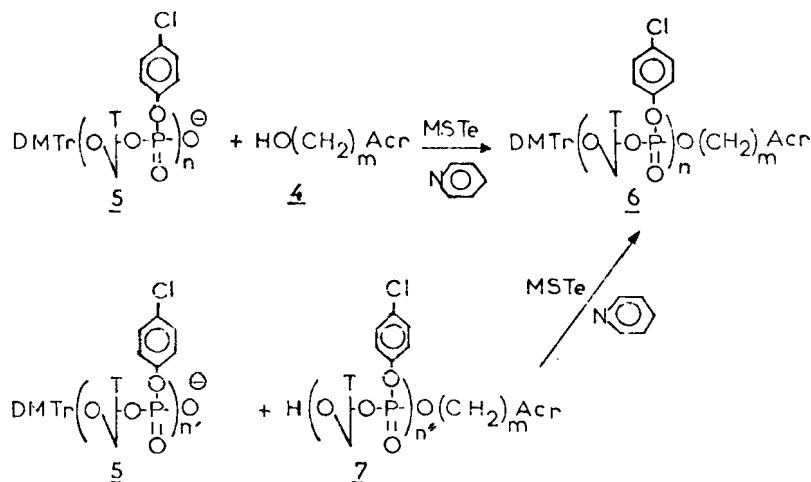
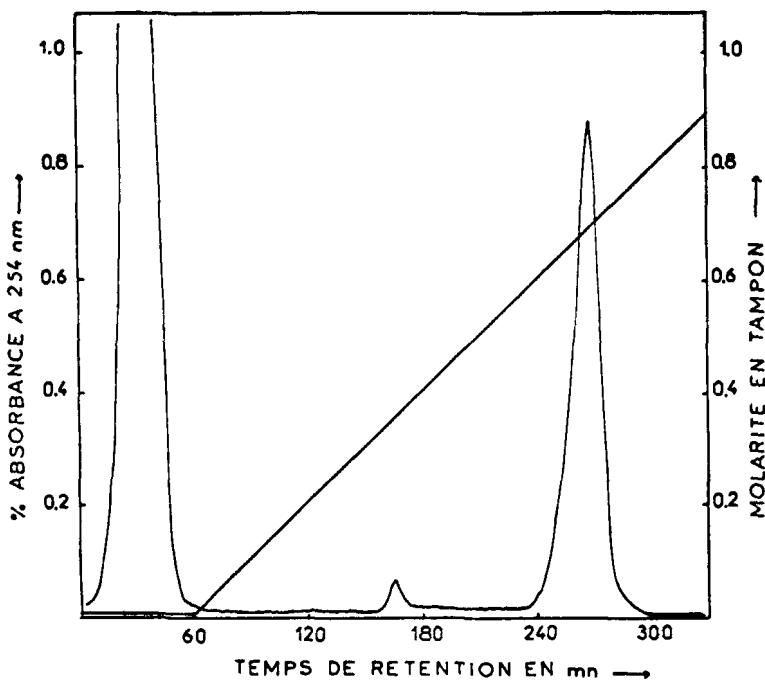


Schéma II



**Figure 2 :** Chromatogramme du mélange brut obtenu après déprotection de l'octanucléotide 6 ( $n=8$ ,  $m=5$ ). Colonne échangeuse d'ions D.E.A.E. séphacel. Eluant  $\text{NH}_4^+$   $\text{HCO}_3^-$  dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  75:25 V/V : 0,01 M pendant 60 minutes puis 0,01 M à 0,9 M en 270 mn.

un composé moins ionique comportant à la fois de la thymidine et le chromophore de l'acridine et dont le temps de rétention est identique à celui du tétranucléotide 1 ( $n=4$ ,  $m=5$ ). Ce produit secondaire provient probablement du tétranucléotide porteur de l'intercalant 7 ( $n=4$ ,  $m=5$ ) n'ayant pas réagi. Ces résultats montrent que le couple acide benzohydroxamique-DBU peut être utilisé pour désaryler les composés "oligothymidylate-bras-intercalant" 1 sans dégradations décelables ni au niveau de la chaîne nucléotidique ni au niveau du groupe "bras-intercalant".

Après purification par échange d'ions la pureté et la structure des composés 1 ont été vérifiées par différentes méthodes : La chroma-

tographie à haute performance, les dégradations enzymatiques et la RMN (10).

Les analyses FPLC par échange d'ions et HPLC en phase inverse réalisées à deux longueurs d'ondes 254 nm et 425 nm ont confirmé que nous avons un produit unique (tableau III).

Les temps de rétention obtenus par échange d'ions (fig. 3) augmentent avec le nombre de phosphodiesters de l'oligonucléotide. Ils diminuent quand la longueur de l'oligonucléotide augmente, lorsque l'analyse est réalisée en phase inverse (tableau III). Il convient de remarquer que dans les conditions de pH utilisées en échange d'ions (pH=6) l'acridine est protonée. Ce qui est confirmé par la comparaison des temps de rétention des composés "oligonucléotide-bras-intercalant" 1 avec ceux des oligothymidylates possédant le même nombre de thymines et dans lesquels le groupe "bras-intercalant" est remplacé par un groupe éthyle non chargé (Tp)<sub>n</sub>. Et n=4,8,12 (16). Les résultats de la figure 3 montrent que les composés 1 se comportent comme des oligonucléotides portant une charge négative en moins.

Les études de dégradation enzymatique ont été réalisées avec deux exonucléases (une exonucléase 5' extraite de rate de veau et une exonucléase 3' extraite du venin de serpent) et une endonucléase P<sub>1</sub>. Les composés 1 sont stables vis à vis de l'exonucléase 3' du fait du blocage de l'hydroxyle 3'-terminal. L'exonucléase 5' extraite de la rate de veau dégrade les dérivés 1 en thymidine 3'-phosphate et en un composé identifié au groupe "bras-intercalant" 4. L'action de l'endonucléase P<sub>1</sub> suivie de celle des phosphatases alcalines libère la thymidine et le composé 4. Ces résultats confirment la déprotection totale de la chaîne nucléotidique, l'enchaînement 3'-5' des thymidines ainsi que la présence et la position du groupe intercalant en 3'.

Le greffage de la chaîne hydroxyalkylène en position 9 de l'acridine se traduit par des modifications spectrales importantes (fig. 1), le couplage du groupe "bras-acridine" 4 à l'oligonucléotide provoque également d'autres variations spectrales dans le domaine visible de l'acridine (fig. 1). Une étude comparative des spectres

Tableau III

$(\tau_p)_n$ $(\text{CH}_2)_m$ acr	CCM ( $R_f$ ) <sup>*</sup>	PPLC		MPLC	
	Syst. D	Syst. E	Syst. x <sub>1</sub>	Syst. x <sub>2</sub>	Syst. Y <sub>1</sub>
n= 1, m=3	0,72	-	-	-	240 sec
n= 1, m=5	0,72	-	-	-	290 sec
n= 3, m=5	0,51	-	97 sec	403 sec	293 sec
n= 4, m=3	0,40	-	297 sec	-	151 sec
n= 4, m=4	0,40	-	282 sec	-	158 sec
n= 4, m=5	0,40	-	301 sec	-	170 sec
n= 8, m=5	0,13	0,45	627 sec	-	162 sec
n= 8, m=6	0,13	0,45	645 sec	-	181 sec
n=12, m=5	0	0,16	896 sec	-	144 sec

\* gel de silice 60

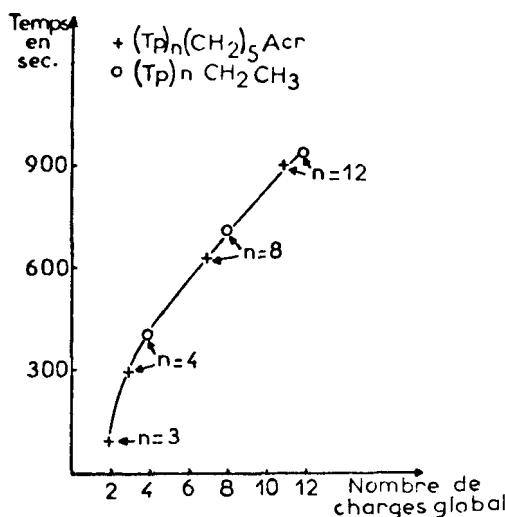


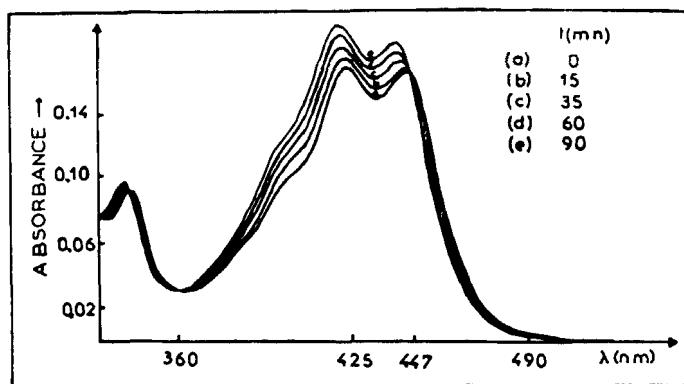
Figure 3 : Temps de rétention sur colonne échangeuse d'anions des composés  $(Tp)_n (CH_2)_5 Acr$  1 et  $(Tp)_n CH_2 CH_3$  en fonction de leur nombre de charges global. Colonne polyanion HR 5/5 (Pharmacia) (syst.  $x_1$ ).

d'absorption des composés 1 montre que les modifications spectrales observées varient avec la longueur de l'oligonucléotide. L'allongement de la chaîne nucléotidique se traduit par un léger déplacement bathochrome des  $\lambda_{max}$ . (Tableau IV).

Les dégradations enzymatiques, par l'exonucléase 5' extraite de la rate de veau, d'une solution d'octanucléotide  $(Tp)_8 (CH_2)_6 Acr$  (fig. 4) et de tétranucléotide  $(Tp)_4 (CH_2)_5 Acr$  ont été réalisées dans une cuve de spectrophotomètre. Les modifications spectrales observées confirment le déplacement du  $\lambda_{max}$  en fonction de la longueur de l'oligonucléotide et révèlent en plus un hyperchromisme non négligeable qui augmente avec la taille de l'oligonucléotide (7 % dans le cas du tétranucléotide et 9 % pour l'octanucléotide). Dans les deux cas, le spectre obtenu après digestion totale est identique à celui du composé "bras-intercalant" 4 et les modifications spectrales enregistrées au cours des temps laissent apparaître un point isobestique à 447 nm.

Tableau IV

Composés	$\lambda$ max nm	$\epsilon$ 425
$\text{Acr}(\text{CH}_2)_5 \text{ OH}$	421,25	9750
$(\text{Tp})_3 (\text{CH}_2)_5 \text{ Acr}$	421,67	9275
$(\text{Tp})_4 (\text{CH}_2)_3 \text{ Acr}$		9175
$(\text{Tp})_4 (\text{CH}_2)_4 \text{ Acr}$		9060
$(\text{Tp})_4 (\text{CH}_2)_5 \text{ Acr}$	422,92	9050
$(\text{Tp})_8 (\text{CH}_2)_5 \text{ Acr}$	424,35	8855
$(\text{Tp})_8 (\text{CH}_2)_6 \text{ Acr}$		8845
$(\text{Tp})_{12} (\text{CH}_2)_5 \text{ Acr}$	425	8835



**Figure 4** : Variations spectrales au cours de la digestion enzymatique d'une solution d'octanucléotide  $(\text{Tp})_8 (\text{CH}_2)_6 \text{ Acr}$  par l'extrait de rate de veau (exonucléase 5'). a) Spectre initial  $(\text{Tp})_8 (\text{CH}_2)_6 \text{ Acr}$ , e) Spectre final : identique à celui du composé 4  $\text{Acr}(\text{CH}_2)_6 \text{ OH}$ .

A partir de ces observations, en prenant comme référence  $\epsilon_{423}=9750$  pour le composé "bras-intercalant" (valeur de  $\epsilon$  déterminée pour la quinacrine (17) qui possède le même noyau aromatique) et après avoir vérifié que le rapport des absorbances à 425 et à 447 nm ne dépend pas de la force ionique utilisée et qu'il dépend peu de la concentration et de la température nous avons déterminé une valeur de  $\epsilon_{425}$  pour chaque oligothymidylate 1 (Tableau IV).

Les études d'interaction des composés "oligo( thymidylate -bras-intercalant" 1 avec les polynucléotides ont été réalisées par spectroscopie d'absorption (18). Les concentrations des solutions d'oligo-nucléotides ont été déterminées en utilisant les valeurs de déterminées précédemment. Les résultats obtenus ont montré que les composés 1 donnent des interactions spécifiques avec l'acide polyadénylique et que les complexes formés ont une stoechiométrie voisine de 1 (A:T, 1:1) pour tous les composés 1 ce qui confirme le nombre de thymines de chaque composé "oligo( thymidylate-bras-intercalant" synthétisé. Ces résultats ont également montré que les complexes formés possèdent une stabilité maximale ( $T_m$  plus élevés) lorsque le "bras" reliant l'oligo-nucléotide au groupe intercalant possède une longueur supérieure ou égale à cinq méthylènes ( $m=5$  ou  $6$ ). (18)

#### CONCLUSION

Nous avons préparé une série de composés "oligo( thymidylate-bras-intercalant" 1 dans lesquels le groupe intercalant dérivé de la méthoxy-2 chloro-6 amino-9 acridine est relié en position 3' de l'oligo-désoxynucléotide par l'intermédiaire d'une chaîne alkylée  $-(CH_2)_m-$ . Nous avons fait varier la longueur de l'oligo( thymidylate de 1 à 12 thymines et celle de la chaîne alkylée de 3 à 6 méthylènes. La synthèse de ces substances a été réalisée selon la méthode au phosphotriester au solution. La désarylation des phosphates a été réalisée par le couple acide benzohydroxamique-DBU en milieu polaire aprotique qui provoque très peu de dégradation au niveau des liaisons internucléotidiques et au niveau de la liaison C(9)-NH de l'acridine. Après vérification de la structure et de la pureté des composés préparés par HPLC, RMN (10) et par dégradations enzymatiques nous avons déterminé

pour chacun d'eux le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$  à 425 nm. Celui-ci diminue lorsque la longueur de l'oligothymidylate augmente. A cet hypochromisme est associé un déplacement bathochrome des spectres d'absorption de l'acridine.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

##### A) Matériel et Méthodes

Les chromatographies sur couche mince de silice (Merck 60 F 254) ont été développées dans différents systèmes de solvants A:-  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 90:10 V/V; B: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 80:20 V/V; C: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  85:15 V/V; D:iPrOH/  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  65:9:15 V/V; E:iPrOH/ $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ , 85:15:25 V/V puis révélées sous irradiation U.V. à 254 nm (et à 350 nm pour les composés comportant le chromophore de l'acridine) et par carbonisation après pulvérisation avec une solution d'acide perchlorique à 10 % (pour révéler les sucres et le groupement dimethoxytrityle) ou une solution à 0,5 % de dibromo-2,6 parabenoquinone-N-chloroimine (DBPNC) dans le méthanol en milieu basique (pour révéler les groupements phosphates d'aryle).

Les études FPLC ont été réalisées sur un appareil PHARMACIA Fine Chemicals équipé d'un détecteur à longueur d'onde variable U.V 50 (VARIAN) et d'un intégrateur VISTA CDS 401.

Les études HPLC ont été réalisées sur un appareil VARIAN modèle 5000 équipé d'un détecteur à longueur d'onde variable U.V 50 (VARIAN) et d'un intégrateur VISTA CDS 401.

Les spectres d'absorption ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Cary 218 dans des cellules thermorégulées de 1 cm ou de 1 mm de trajet optique.

Les points de fusion des solides ont été déterminés en tube capillaire avec un appareil Buchi-Tottali.

Les aminoalcools, la méthoxy-2 dichloro-6,9 acridine, sont des produits commerciaux (Aldrich). Les solvants utilisés ont été séchés ou distillés et conservés sur déshydratants appropriés.

B) SYNTHESES

I) Composés méthoxy-2 chloro-6 ( $\omega$ -hydroxyalkylamino)-9 acridine 4.

A une solution de méthoxy-2 dichloro-6,9 acridine 2 ( $3,59 \cdot 10^{-3}$  mole) dans 2,5 g de phénol à 80°C on ajoute deux équivalents d'aminoalcool  $H_2N(CH_2)_mOH$  3 ( $m=3,4,5$  et 6) ( $7,18 \cdot 10^{-3}$  mole). La température est portée à 110°C et maintenue pendant une heure et trente minutes. L'avancement de la réaction est suivi par chromatographie sur couche mince dans le solvant A (2  $R_f=0,9$ , 4  $R_f=0,15$ ). Lorsque la réaction est terminée, le mélange réactionnel est dilué avec 3 ml de méthanol et versé goutte à goutte et sous agitation dans une solution de soude aqueuse 2N (20 ml) à 0°C. Le précipité est essoré et lavé à l'eau jusqu'à pH neutre. Le solide jaune obtenu est récrystallisé dans un mélange  $H_2O/MeOH$  20:80, V/V. On vérifie l'élimination totale du phénol par le test avec la DBPNC. La purification totale nécessite une chromatographie sur gel de silice en utilisant le solvant  $CHCl_3-MeOH$  100:0, V/V à 70:30, V/V.

II Composés "oligonucléotide-bras-intercalant "totalement protégés 6

Méthode I

A une solution de nucléotide 3'-phosphodiester 5 (14) ( $n=1,3,4,8$ ) ( $3,07 \cdot 10^{-4}$  mole) et de méthoxy-2 chloro-6 ( $\omega$ -hydroxyalkylamino)-9 acridine 4 ( $m=3,4,5$  ou 6) ( $3,99 \cdot 10^{-4}$  mole) (préalablement séchés par coévaporation avec la pyridine) dans la pyridine anhydre (2 ml) maintenue sous agitation on ajoute le mésitylène sulfonyltétrazolide ( $7,64 \cdot 10^{-4}$  moles) à la température ambiante. Lorsque la réaction n'évolue plus (au bout de quarante minutes) l'excès de réactif de couplage est détruit par addition d'eau glacée. Le mélange réactionnel est extrait avec du chloroforme. La phase organique est lavée avec une solution de bicarbonate de sodium à 5 % et avec de l'eau, puis séchée et concentrée.

Le produit obtenu est purifié sur colonne de gel de silice (éluant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Pyridine}$  94:5,5:0,5 V/V ou éluant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{acétone}$  43:2:55 V/V). La purification peut également être effectuée sur plaque de chromatographie préparative (éluant :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Pyridine}$ , 90:10:0,5, V/V, puis  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Pyridine}$ , 88:15:0,5 V/V). Après évaporation du solvant dans le premier cas, extraction et évaporation du solvant dans le second cas, le produit obtenu précipite sous forme de poudre jaune par agitation dans un mélange éther-cyclohexane 50/50 V/V. Les rendements des oligonucléotides triesters 6 sont voisins de 60-70 %.

### Méthode II

L'octamère 6 ( $n=8$ ,  $m=5$ ) et le dodécamère 6 ( $n=12$ ,  $m=5$ ) ont été obtenus en réalisant le couplage du tétranucléotide 7 ( $n''=4$ ,  $m=5$ ) (1 équivalent) avec le tétranucléotide 3'-phosphodiester 5 ( $n'=4$ ) (1,3 équivalents) ou l'octanucléotide 5 ( $n'=8$ ) (1,3 équivalents) et en opérant ensuite comme précédemment. Après purification sur colonne de gel de silice (éluant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{acétone}$  43:2:55 ou 38:2:60 V/V) l'octanucléotide et le dodécanucléotide ont été isolés avec des rendements voisins de 65 %.

### III) Déprotection et purification

On fait réagir à la température ambiante et sous agitation l'oligonucléotide totalement protégé 6 avec une solution molaire en acide benzohydroxamique et en DBU dans la pyridine anhydre en utilisant 10 équivalents du couple  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CNHOH-DBU}$  par équivalent de phosphotriester arylé à déprotéger. La fin de la déprotection peut être suivie en contrôlant l'absence du groupe p-chlorophénylphosphotriester par le test à la DEPNC\*. Lorsque la désaryloration est terminée, le mélange réactionnel est neutralisé avec la résine pyridinium (DOWEX 50). Après filtration et lavage de la résine avec un mélange  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  70:30, V/V, le solvant est chassé par évaporation sous pression réduite.

---

\*La durée de la désaryloration est égale à 1 h 30 dans le cas d'un mononucléotide et à environ 36 heures pour un dodécanucléotide.

Les oligonucléotides désarylés sont traités par l'acide acétique à 80 % pendant 1 à 2 heures à la température ambiante. L'acide acétique est ensuite chassé par coévaporation avec de l'éthanol sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris avec de l'eau et la phase aqueuse est ensuite lavée avec de l'éther.

Après déprotection totale les oligonucléotides sont purifiés sur DEAE séphacel en utilisant des gradients appropriés en hydrogénocarbonate d'ammonium  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ , 80:20 V/V en fonction du nombre de charges de l'oligonucléotide (gradients :  $10^{-2}$  M à 0,2 M pour un mononucléotide et  $10^{-2}$  M à 0,9 M pour un dodécanucléotide).

#### IV Détermination de la pureté et de la structure

##### 1) Chromatographie en phase liquide

###### a) Analyses sur colonnes échangeuses d'ions

Elles ont été réalisées sur une colonne polyanion HR 5/5 (Pharmacia) à 254 et à 425 nm en utilisant différents gradients en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH6)  $x_1$ :solvant I= $10^{-2}$  M, solvant II=1 M en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  débit 1 ml/mn ; gradient 0 à 40 % II en 20 mn,  $x_2$ :solvant I= $10^{-3}$  M, solvant II= $10^{-2}$  M en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , débit:1 ml mn; gradient 0 à 100 % II en 10 mn.

###### b) Analyses en phase inverse

Elles ont été réalisées sur une colonne Lichrosorb RP-8 (diam 7  $\mu\text{m}$ ) Merck L 250 mm, diam 4 mm, à 254 et à 425 nm en utilisant les systèmes de solvant suivants ( $Y_1$ :solvant=acétate de triétylammonium 0,3 M dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  44:56 V/V (pH7), débit 1,2 ml/mn.  $Y_2$ :solvant=acétate de triétylammonium 0,3 M dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  52:48 V/V (pH7), débit 1,2 ml/mn.  $Y_3$ :solvant=acétate de triéthylammonium 0,3 M dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  20:80 V/V (pH7), débit 1,2 ml/mn.  $Y_4$ :solvant=acétate de triéthylammonium 0,3 M dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  32:68 V/V (pH7) débit 1,2 ml/mn.

##### 2) Dégredations enzymatiques

Nous avons utilisé les exonucléases extraites de la rate de veau et du venin de serpent dans les conditions décrites par Miller (19)

l'endonucléase  $P_1$  et les phosphatasées alcalines dans celles décrites par Furuichi (20).

#### V Détermination du coefficient d'extinction molaire

Nous avons réalisé la dégradation complète du tétranucléotide  $(Tp)_4(CH_2)_5Acr$  et de l'octanucléotide  $(Tp)_8(CH_2)_6Acr$  par l'exonucléase extraite de la rate de veau en présence d'une solution tampon  $10^{-2}$  M en cacodylate de sodium pH7 dans une cuve de spectrophotomètre et nous avons enregistré les modifications spectrales observées au cours du temps entre 320 et 530 nm. Le spectre limite obtenu est identique à celui du composé  $Acr(CH_2)_mOH$ .

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions la Ligue Nationale Française contre le cancer (Comité du Loiret) et la Fédération Nationale des centre de Lutte contre le cancer pour l'aide financière apportée à la réalisation de ce travail.

#### REFERENCES

- 1 - B. Weisblum and P.L. de Haseth, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 629 (1972).
- 2 - U. Pachmann and R. Rigler, Exp. cell Res., 72, 602 (1972).
- 3 - D.J. Arndt-Jovin, S.A. Latt, G. Striker and T.M. Jovin, J. Histo-chem. cytochem., 27, 87, (1979).
- 4 - a) B. Gaugain, J. Markovits, J.B. Le Pecq and J.B. Roques, Biochemistry, 20, 3035-3042 (1981).  
b) J. Markovits, B. Gaugain, J. Barbet, J.B. Roques and J.B. Le Pecq, Biochemistry, 20, 3042-3048 (1981).
- 5 - C.C. Tsai, S.C. Jain and H.M. Sobell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 628-632 (1975).
- 6 - J. Barbet, Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences Physiques, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6ème.

- 7 - D.J. Dupré and F.M. Robinson, J. Chem. Soc., 549-551 (1945).
- 8 - U. Asseline Thèse de Doctorat d'Etat Université d'Orléans (1983).
- 9 - A. Albert "The acridines" Second Edition, Edward Arnold, Ltd., London (1966) p29.
- 10 - G. Lancelot, U. Asseline, N.T. Thuong and C. Hélène Biochemistry 24, 2521-2529 (1985).
- 11 - A. Albert "The acridines" Second Edition, Edward. Arnold, Ltd., London (1966) p 293.
- 12 - R.M. Peck, J. Am. Chem. Soc., 28, 1998-2000 (1962).
- 13 - J. Stawinsky, T. Hozumi, S.A. Narang, C.P. Bahl and R. Wa, Nucleic. Acids. Res., 4, 353-371 (1977).
- 14 - N.T. Thuong, M. Chassignol, G. Lancelot, R. Mayer, B. Hartmann, M. Leng et C. Hélène, Biochimie, 63, 775-784 (1981).
- 15 - U. Asseline et N.T. Thuong Tetrahedron Letters, 26, 1005-1008 (1985).
- 16 - Ces composés ont été préparés comme "témoins" pour les études d'interaction des composés 1 avec les polynucléotides.
- 17 - W.D. Wilson and I.G. Lopp Biopolymers, 18, 3025-3041 (1979)
- 18 - U. Asseline, M. Delarue, G. Lancelot, F. Toulmé, N.T. Thuong, T. Montenay-garestier et C. Hélène, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3297-3301 (1984).
- 19 - P.S. Miller, N. Dreon, S.M. Pulford et B. Mc Parland, the J. of Biol. Chem., 225, 9659 (1980).
- 20 - Y. Furuichi, M. Morgan, S. Muthukrishnan and A.J. Shatkin, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 362-366 (1975).

Received September 23, 1985.