

Arylamidation de la Guanosine par un Agent Cancérogène, le 2-Aminofluorène. Approche Intramoléculaire.

Eric DEFRANCQ, Anne LETERME, Nadia PELLOUX, Marie-France LHOMME,
Jean LHOMME*.

Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité, URA CNRS 332, Université J. Fourier, BP 53 X,
38041 Grenoble Cédex France

(Received in Belgium 12 April 1991)

Resumé Le composé modèle 3 dans lequel la guanosine protégée est reliée au cancérogène (N-acétyl-N-hydroxy)-2-aminofluorène a été étudié dans diverses conditions solvolytiques. La réaction intramoléculaire conduit notamment au produit d'arylamidation de la guanine par le cancérogène.

Abstract Model compound 3 in which the protected guanosine moiety is linked to the carcinogen (N-acetyl-N-hydroxy)-2-aminofluorene has been prepared and studied in various solvolytic conditions. The intramolecular reaction leads notably to the arylamidation of the guanine ring by the carcinogen.

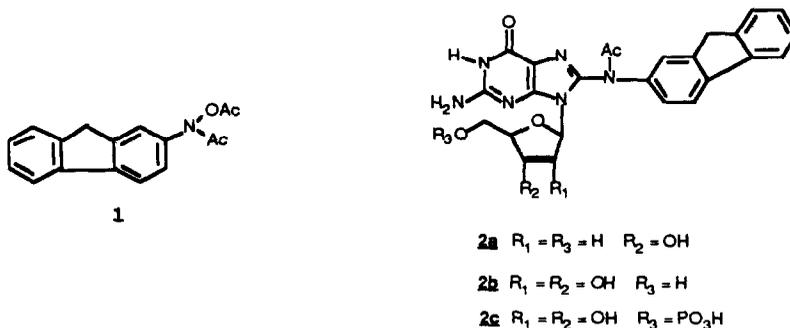
Introduction

De nombreuses amines et amides aromatiques polycycliques présentent un caractère mutagène et cancérogène chez l'animal (1) et chez l'homme (2). Il est généralement admis que l'activation de ces composés implique une N-hydroxylation (3-7) suivie d'une O-estérification (8), le métabolite ainsi formé est capable de réagir sur les macromolécules cellulaires et notamment sur les acides nucléiques. Le produit majeur obtenu résulte de la fixation du cancérogène sur l'atome de carbone C-8 de la guanine. L'intermédiaire postulé est un ion nitrenium (9-12) c'est le mécanisme généralement avancé dans le cas du (N-acétyl-N-acétoxy)-2-aminofluorène 1 qui figure parmi les cancérogènes les plus étudiés sur le plan biologique (13, 14).

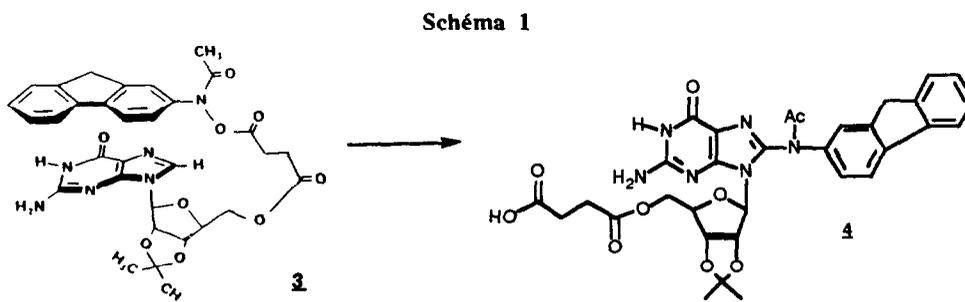
Ces mécanismes s'appuient sur une série de résultats d'études solvolytiques obtenus sur des composés modèles monocycliques, tels les N-acétoxyacétanilides (15) ou avec des modèles dans lesquels le groupe partant acétoxy est remplacé par un groupe pivaloyloxy (16), métyloxy (17), sulfonatoxy (18) pour éviter (ou limiter) la réaction d'hydrolyse correspondant à la rupture O-acyle.

On dispose de peu de données mécanistiques concernant la réaction entre le cancérogène ultime et les nucléosides. En traitant la désoxyguanosine (ou la guanosine) avec un fort excès de (N-acétyl-N-acétoxy)-2-aminofluorène 1 le produit 2a correspondant à "l'adduit" formé sur l'ADN (ou l'ARN) est obtenu avec un faible rendement (19, 20) la réaction majeure étant l'hydrolyse du cancérogène, ce qui limite toute étude mécanistique.

On peut remarquer, en outre, que la réaction du cancérigène sur un acide nucléique est vraisemblablement un processus en plusieurs étapes impliquant une étape de complexation par intercalation (21) suivie d'une étape de réaction



Ces diverses observations nous ont amenés à appliquer à la série des amines et amides aromatiques cancérigènes l'approche développée dans le laboratoire pour l'étude des interactions entre des substances actives intercalantes et les bases nucléiques (22, 23). Nous décrivons ici le premier exemple de la série, le composé modèle **3** dans lequel le cancérigène est relié à la guanine par une chaîne souple incluant un groupement succinoyloxy et le ribose (schéma 1).

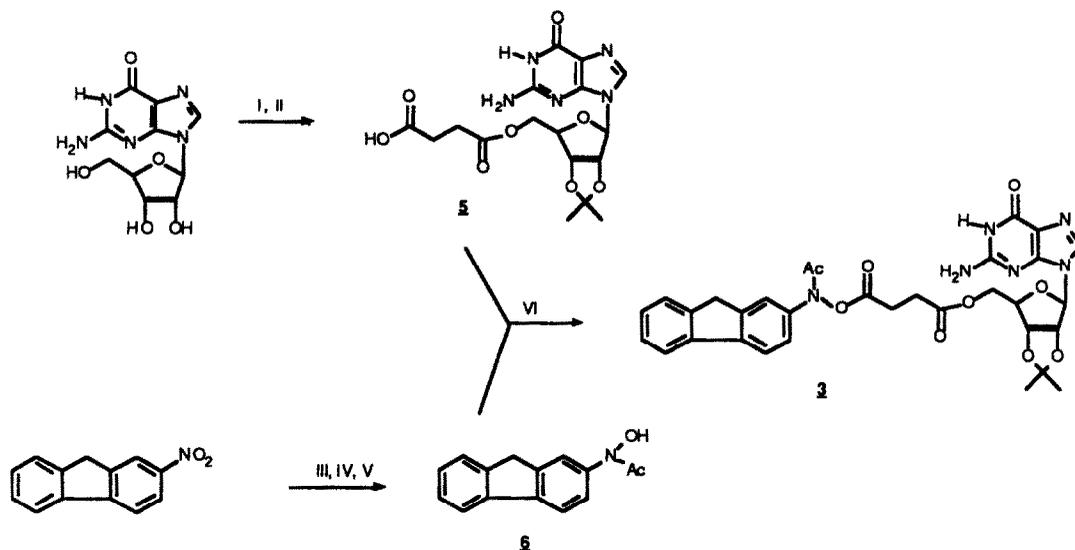


L'hypothèse sur laquelle repose cette approche est la suivante : 1/ le composé **3** peut être le siège d'un équilibre conformationnel entre formes "étendues" dans lesquelles les deux noyaux aromatiques sont écartés l'un de l'autre, et formes "repliées" dans lesquelles les noyaux de la guanine et du cancérigène sont emboîtés l'un sur l'autre, reproduisant la situation du cancérigène intercalé dans l'ADN ; 2/ le groupe partant (de type acétoxy dans le cancérigène activé **1**) est ici un groupe succinoyloxy faisant partie intégrante de la chaîne de jonction placée en conditions solvolytiques, le composé modèle **3** pourra donc réagir de façon telle que la réaction "intra-moléculaire" entre le fragment guanine et le cancérigène puisse se développer sans contrainte ; 3/ la présence du sucre et de la chaîne succinoyloxy hydrolysable peut permettre d'obtenir après réaction un précurseur direct **4** de l'adduit nucléoside-cancérigène **2b** (schéma 1). Dans son principe, une telle approche doit permettre d'étudier l'aspect mécanistique de la réaction cancérigène-base, elle devrait, en outre, présenter un intérêt synthétique pour l'obtention d'adduits "cancérigène-nucléoside". Remarquons que cette voie s'est révélée être fructueuse tant sur

l'aspect mécanistique que synthétique dans la série des dérivés photoactifs des psoralènes (24) Nous décrivons ici la synthèse du composé modèle **3** et son comportement solvolytique.

I - SYNTHÈSE DU COMPOSÉ MODÈLE **3**

Schéma 2



I TsOH, diméthoxypropane/acétone/25°C/5h, H₂O/NH₄OH , II DMAP/anhyd. succinique DMF/90°C , III Pd/C5%/NH₂NH₂,H₂O/THF/0°C ; IV : NEt₃/AcCl/ < 10°C , V · NaHCO₃ , VI Me-morpholine/ClCOO-t-Bu/DMF/-20°C

Ce composé est issu du couplage entre les "demi-molécules" **5** et **6** (schéma 2) Pour synthétiser la "demi-molécule" **5**, on fait réagir l'anhydride succinique dans de la diméthylformamide, en présence de diméthylaminopyridine (DMAP), avec la guanosine dont les fonctions alcool 2' et 3' sont protégées par un dioxolane (25) Le rendement de la réaction est de 65 à 70%.

Le (N-acétyl-N-hydroxy)-2-aminofluorène **6** s'obtient par réduction du 2-nitrofluorène par l'hydrate d'hydrazine en présence de palladium sur charbon (26) on forme ainsi d'une manière quantitative l'hydroxylamine qui est acétylée par le chlorure d'acétyl, cette réaction conduit à un mélange des dérivés mono- et bis-acétylés **6** et **1** Un traitement basique contrôlé du mélange permet de désacétyler sélectivement le composé **1** On obtient ainsi l'acide hydroxamique **6** avec un rendement global supérieur à 80% à partir du nitrofluorène

Pour accéder au produit modèle **3** on effectue le couplage des deux molécules **5** et **6** par une méthode adaptée de la synthèse peptidique (27, 28) qui consiste à former un anhydride mixte entre un chloroformiate d'alkyle et le composé **5**, suivie d'une condensation avec l'acide hydroxamique **6** Le produit **3** est isolé par cristallisation Les rendements varient entre 60 et 70%

II - REACTIVITE DU COMPOSE 3

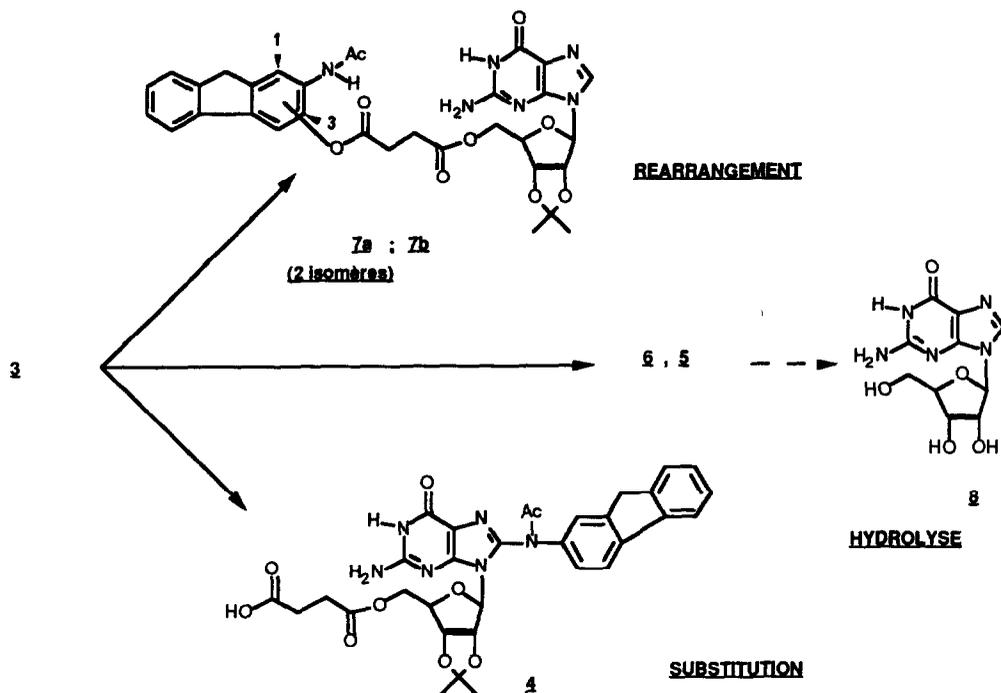
La réactivité du composé modèle **3** a été étudiée dans une série de solvants de polarité, de nucléophilie et de pH variables dichlorométhane, acétonitrile, trifluoroéthanol, mélanges acétone-eau (60/40) à divers pH Les études ont été menées à faible concentration ($1,2$ à $1,3 \times 10^{-3}M$) sous azote, et en bain thermostaté à $40^{\circ}C$, à l'exception des études dans le dichlorométhane et l'acétonitrile qui ont dû être effectuées à reflux en raison de la faible réactivité de **3** dans ces milieux Dans tous les cas la nature des produits de réaction a été établie (schéma 3) En outre pour les mélanges aqueux, les cinétiques de solvolysse ont été déterminées avec précision

1 - Structure des produits de réaction Trois types de produits sont formés en proportions variables selon les solvants utilisés produits d'hydrolyse, l'acide carboxylique **5** et l'acide hydroxamique **6**, produits de réarrangement **7a** et **7b**, produit de substitution **4** Ces composés ont été isolés et caractérisés dans certaines conditions typiques où ils sont formés de façon majoritaire Dans les autres cas, ils ont été identifiés aux produits authentiques par chromatographie liquide haute performance (CLHP), par leurs temps de rétention et leurs rapports d'absorption à 254 et 280 nm

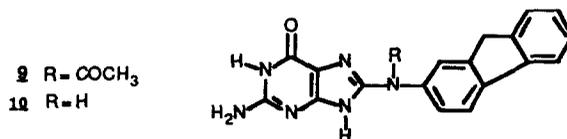
* Produits d'hydrolyse 5 et 6 L'hydrolyse de la fonction anhydride mixte du composé **3** fournit les deux "demi-molécules" correspondantes l'acide hydroxamique **6** et l'acide carboxylique **5** Dans les divers milieux réactionnels l'acide hydroxamique **6** est peu stable aucun essai d'isolement n'a été réalisé, seul a été isolé et caractérisé l'acide **5** à partir duquel le taux d'hydrolyse a été mesuré ce composé est stable dans tous les milieux et à $pH < 9,2$ où l'on obtient alors le composé **8** qui a été identifié par ses caractéristiques chromatographiques

* Produits de réarrangement 7a et 7b Il s'agit d'un mélange de deux produits qui sont tous deux isomères du produit de départ **3** ce sont deux isomères de position sur le carbone 1 et le carbone 3 du fluorène Ils existent dans la proportion 1/1 et sont formés quantitativement par chauffage de **3** dans le dichlorométhane à reflux pendant 27 h Le mélange a été isolé, puis caractérisé par l'analyse élémentaire et par techniques spectroscopiques sans que l'on s'efforce de séparer les deux isomères qui présentent des caractéristiques physiques extrêmement proches Le spectre de RMN du proton montre très clairement que l'on se trouve en présence de deux produits voisins la majorité des signaux est dédoublée (méthyles du groupement isopropylidène, méthylène du noyau fluorène et méthylènes de la chaîne succinyle), ou sont élargis (protons du sucre), le multiplet complexe existant entre 8,07 et 7,28 ppm et correspondant aux protons aromatiques intègre pour six protons, au lieu de sept dans le cas du composé de départ **3** La présence dans ce spectre de quatre signaux entre 9,23 et 9,55 ppm intégrant pour un proton et correspondant au N-H de l'acétamide conduit à penser que chaque isomère existe sous forme de deux conformères cis et trans (rotation autour de la liaison acétamide (29)) Le spectre de masse du mélange d'isomères **7a** et **7b** est identique à celui de **3** ce résultat est conforme aux observations faites par IORIO et Coll (30) dans la série de référence du (N-acétyl-N-acétoxy)-2-aminofluorène **1** qui par thermolyse fournit les produits de transposition sur les carbones 1 et 3 De même les points de fusion du composé **3** et du mélange d'isomères **7a** et **7b** sont identiques, l'isomérisation se faisant au cours de la fusion comme l'ont montré GALLIANI et RINDONE (31) dans la série du (N-acétyl-N-acétoxy)-2-aminofluorène **1** Ces produits sont instables à un $pH > 7$.

Schéma 3



* Produit de substitution 4 Ce composé 4 est isolé de la manière la plus commode quand on réalise la solvolysse de 3 dans un mélange eau-acétone à pH 9,2. On le caractérise essentiellement par son analyse et son spectre de RMN du proton : on note la disparition du signal à 7,98 ppm correspondant au proton porté par le carbone 8 de la guanine, le restant du spectre ne présente pas de différence notable avec le spectre du produit de départ 3. Ce spectre est tout à fait comparable à celui publié par F E EVANS (32, 33) pour le produit décrit sous l'abréviation de GMP-C8-AFF 2c. Comme ces auteurs, nous notons l'existence de problèmes conformationnels liés à la présence de l'acétamide (rotation réduite et conjugaison de la fonction amide). 4 existe en fait sous forme de quatre rotamères. Traité par l'acide chlorhydrique 0,1N à température ambiante pendant quinze minutes, ce composé 4 est déglycosylé et conduit au produit 9. Dans une solution d'acide chlorhydrique concentré-méthanol (1/1) à température ordinaire durant douze heures 4 est déglycosylé et désacétylé : on obtient alors le composé 10. Ceci est une confirmation de la structure attribuée au produit 4. Notons que le composé 4 est stable dans toutes les conditions de solvolysse que nous avons utilisées : sa vitesse d'apparition a donc pu être étudiée directement par CLHP.



2 - **Cinétique** Dans tous les cas les études solvolytiques ont été réalisées en suivant l'évolution de la réaction par CLHP en observant la disparition du produit de départ **3** et la formation des produits de réaction **4**, **5**, **6**, et **7a**, **7b**

* Dans le dichlorométhane et l'acétonitrile à reflux la réaction est lente les demi-durées de vie de **3** sont de l'ordre de 10 heures et les seuls produits formés sont les produits de réarrangement **7a** et **7b**

* Dans les milieux aqueux (acétone-eau 60/40) les cinétiques ont été étudiées avec précision afin de comparer le comportement du composé modèle **3** à celui du dérivé di-acétylé **1** décrit par UNDERWOOD (35,36) à pH 4 et pH 7, à 40°C Les cinétiques sont du pseudo-premier ordre comme attendu dans tous les cas on obtient le produit de substitution **4**, les produits de réarrangement **7a** et **7b** et les produits d'hydrolyse **5** et **6** La nature des produits formés et les cinétiques de solvolyses sont reportées dans le tableau 1

Tableau 1

	CH ₂ Cl ₂	CF ₃ CH ₂ OH	CH ₃ COCH ₃ -H ₂ O (60/40) 40°C		
	CH ₃ CN	5% H ₂ O			
	reflux	40°C	pH 4	pH 7	pH 9,2
% Hydrolyse	0	50	45	55	32
% Réarrangement	100	20	35	22	25
% Substitution	0	10	18	19	30
k s ⁻¹			8,83 10 ⁻⁵	8,83 10 ⁻⁵	

Réactivité du composé **3** bilan et constantes de vitesse, concentrations $\approx 10^{-3}$ M

Discussion

Les résultats indiqués dans le tableau 1 appellent les commentaires suivants le composé **3** est le siège de trois réactions compétitives

1 - En milieu polaire et nucléophile (trifluoroéthanol-eau, acétone-eau), la réaction conduit aux produits d'hydrolyse **5** et **6** de la fonction ester d'hydroxylamine (ou anhydride mixte) Notons que dans ces conditions l'ester de succinyle du composé **4** n'est pas affecté

2 - En milieu non nucléophile (acétonitrile, dichlorométhane) seuls sont obtenus les produits de réarrangement **7a** et **7b**, de type réarrangement de BAMBERGER (37) Ils sont également formés dans les autres solvants mais en proportions plus faibles Cette réaction a été observée aussi dans le cas du (N-acétyl-N-acétoxy)-2-aminofluorène **1** (35, 36) Elle a été largement étudiée (31, 38) sur le plan mécanistique dans la série monocyclique des O-N-diarylphényl hydroxylamines substituées Des mécanismes radicalaires et ioniques ont été proposés, dépendant à la fois de la nature du substrat et du milieu de solvolyses

3 - Le résultat le plus intéressant concerne la réaction d'arylamidation de la guanine en position C-8, qui conduit à l'obtention du composé **4** Cette réaction est observée dans tous les milieux étudiés à l'exception du dichlorométhane et de l'acétonitrile le rendement est maximum en milieu aqueux en conditions basiques Notons

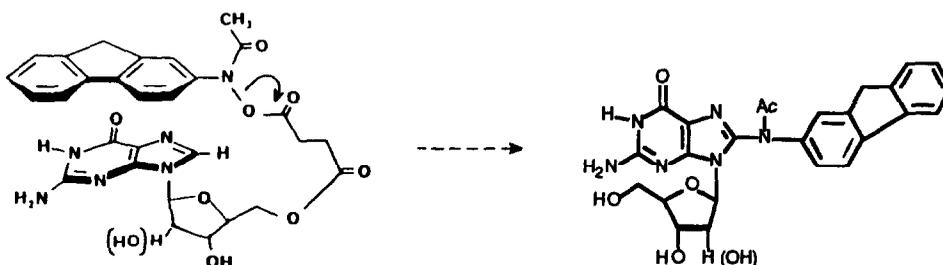
que dans les mêmes conditions de dilution ($10^{-3}M$) la réaction intermoléculaire entre la guanosine (ou la désoxyguanosine) et le dérivé diacétylé **1**, pris en proportions stoechiométriques fournit un mélange complexe dans lequel le produit de substitution sur le carbone C-8 de la guanine n'est pas décelable par CLHP. Seuls sont observés les produits d'hydrolyse et de dégradation du (N-acétyl-N-acétoxy)-2-aminofluorène **1**.

4 - Les résultats cinétiques en milieu acétone-eau peuvent être directement comparés à ceux décrits par UNDERWOOD sur le (N-acétyl-N-acétoxy)-2-aminofluorène **1** (35, 36) Les valeurs trouvées sont identiques pour les pH étudiés

Conclusion

Le composé **3** a été préparé dans le but d'étudier la réaction entre un métabolite du 2-aminofluorène et le noyau de la guanine, en modélisant la situation du cancérigène intercalé dans l'ADN. Les résultats solvolytiques obtenus montrent clairement que le modèle présente une réactivité très comparable à celle du composé de référence **1**. En effet à l'exception du résultat concernant le taux élevé de la réaction de substitution, les mêmes types de produits sont obtenus dans les deux cas, produits d'hydrolyse et produits de réarrangement, mais surtout les vitesses de solvolyses sont rigoureusement identiques elles aussi dans les deux cas. Les mécanismes proposés pour le composé **1** peuvent donc être étendus au produit modèle **3**. Le mécanisme faisant intervenir une rupture hétérolytique de la liaison N-O en milieu aqueux est particulièrement attractif pour l'interprétation de nos résultats. Comme pour le produit de référence il peut rendre compte de la formation (totale ou partielle) des produits d'hydrolyse **5**, **6** et de l'obtention des produits de réarrangement **7a**, **7b**, mais surtout il rend compte de l'accroissement du taux de réaction de substitution en milieu aqueux. L'ion nitrenium (vraisemblablement sous forme de paire d'ions) formé par rupture de la liaison N-O peut être piégé de façon intramoléculaire par la guanine nucléophile. Ce processus est favorisé en milieu basique, à pH 9,2 où le nucléophile est l'anion de la guanine. En outre, du fait du caractère aromatique des molécules mises en jeu dans la réaction, les centres réactifs, respectivement l'ion acylnitrenium et le site carboné de la guanine, se trouvent situés dans deux plans parallèles, selon une géométrie proche de celle de l'état de transition de la substitution électrophile de la guanine en C-8 par l'ion nitrenium (schéma 4)

Schéma 4



Notons que c'est bien une géométrie de ce type que l'on trouve quand le cancérigène est intercalé dans l'ADN. En outre, pour le modèle **3**, le milieu aqueux devrait favoriser une telle géométrie à l'état fondamental en raison des interactions "d'empilement" ("stacking") de type hydrophobe entre les noyaux guanine et fluorène. L'existence dans l'eau de telles interactions noyau-noyau a été largement démontrée dans une série de systèmes

Ar₁-(CH₂)_n-Ar₂ dans lesquels deux noyaux aromatiques Ar₁ et Ar₂, respectivement une base nucléique et un intercalant de l'ADN, sont reliés par une chaîne souple polyméthylénique (22-24)

L'observation selon laquelle le rendement de la réaction de substitution est maximum dans le mélange eau-acétone 60/40 est en accord avec cette hypothèse. Pour des raisons de solubilité, l'étude solvolytique du modèle n'a pas pu être menée dans des mélanges plus riches en eau. Des études sont actuellement en cours pour confirmer cette hypothèse qui permettrait d'établir une corrélation directe entre l'empilement guanine-fluorène tel qu'on le trouve dans le processus d'intercalation et la sélectivité de la fixation du cancérigène sur l'atome de carbone C-8 de la guanine (39)

Partie expérimentale .

Procédés d'analyse

Les spectres de RMN (¹H et ¹³C) ont été enregistrés sur un Bruker NP 60 et un Bruker XM 400 à transformée de Fourier, les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport à l'hexaméthylsiloxane. Les spectres de masse ont été enregistrés sur les spectromètres Riber Mag 10-10 et Varian Mat 311. Les spectres infra-rouge ont été enregistrés sur les spectromètres Perkin-Elmer 237 et 1320 et les spectres ultra-violet sur Beckman DB-Gt et Perkin-Lambda 15 UV/VIS.

Les analyses par CLHP ont été faites à l'aide d'une colonne analytique phase inverse (μ Bondapak C₁₈), sur un appareil Waters équipé d'un programmeur 660 et de deux pompes M-6000. On a utilisé un gradient de solvants allant de 20% à 100% de méthanol dans l'eau pH 2,5 (acide phosphorique) durant 10 min avec un flot de 2 ml/min.

Etude cinétique

Les études cinétiques ont été réalisées sous azote à 40°C ± 0,5°C dans un bain thermostaté. La concentration était de 1,2 à 1,3 · 10⁻³M. La composition du milieu réactionnel a été étudiée par CLHP tout au long de la solvolysse jusqu'à disparition totale du produit de départ. La stabilité de tous les produits de solvolysse a été vérifiée pour chaque type de réaction. Chaque réaction a été recommencée trois fois. Dans tous les cas nous avons utilisé un étalon interne, le fluorène, pour vérifier la répétitivité des injections en CLHP et calculer le pourcentage des différents produits formés. Le fluorène est inerte et son temps de rétention n'interfère pas avec ceux des produits de réaction.

2', 3'-isopropylidène guanosine 8 Un mélange de guanosine sèche (7,31 g, 25,8 mmol), d'acide p-toluène sulfonique (5,37 g, 30,9 mmol) en suspension dans de l'acétone (300 cm³) et du diméthoxypropane (25,3 cm³, 206 mmol) est fortement agité à température ambiante jusqu'à ce que la solution devienne limpide (5 h). Celle-ci est alors concentrée et versée dans de l'eau (200 cm³) contenant de l'ammoniaque (2 cm³). Après une nuit à 4°C on filtre le produit précipité. On obtient ainsi le produit sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 80% (6,25 g). F 200°C (décomposition) IR (KBr) 3410, 3340, 3000, 2950, 2880, 1730, 1700, 1640, 1600, 1540, 1490 cm⁻¹ UV (éthanol) λ_{max} (ε) 254 (11300) nm SM (impact électronique), M = 323 m/z = 323 (M⁺), 151, 135 RMN¹H (DMSO-d₆) δppm = 10,7 (s, N₁-H), 7,9 (s, C8-H), 6,5 (s, NH₂), 5,9 (d, H₁'), 5,0 (m, H₂' H₃'), 4,1 (m, H₄'); 3,5 (t, H₅'), 1,4 (s, CH₃), 1,2 (s, CH₃) RMN¹³C (DMSO-d₆) δppm = 154,7 (C₆), 151,7 (C₂), 148,7 (C₄), 133,9 (C₈), 114,7 (C₅), 111,0 ((CH₃)₂-C), 86,5 (C₁'), 84,6 (C₃'), 72,0 (C₄'), 59,6 (C₅'), 25,0 (CH₃) 23,2 (CH₃)

5'-[[(2-carboxy)éthyl]carbonyl] 2',3'-isopropylidène guanosine 5. On solubilise **8** (2 g, 6,2 mmol) dans de la diméthylformamide (180 cm³), on ajoute l'anhydride succinique (1,23 g, 12,4 mmol) et de la diméthyl-4 aminopyridine (1,13 g, 9,3 mmol) La solution est agitée pendant 4 h sous atmosphère d'azote à 90°C, puis elle est concentrée ; l'huile obtenue est précipitée par addition de dichlorométhane Après une nuit d'agitation à température ambiante, le précipité est filtré Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice (dichlorométhane-méthanol 85/15 + 1% d'acide acétique) Le rendement est de 60% (1,5 g) F 150-155°C IR (KBr) 3410, 3330, 3000, 2950, 1730, 1695, 1685, 1600, 1530, 1485 cm⁻¹ UV (éthanol) λ_{max} (ε) 255 (12800) nm SM FAB(+), M = 423 m/z = 446 (M+Na)⁺, 424, FAB(-), M = 423 m/z = 422 (M-H)⁺, 322 RMN¹H (DMSO-d₆) δppm = 10,45 (s, N1-H) ; 7,81 (s, C8-H) , 6,60 (s, NH₂) , 5,96 (d, H1') , 5,19 (dd, H2') , 5,07 (dd, H3') , 4,21 (m, 2H5') , 4,09 (m, H4') , 2,45 (m, CH₂)₂ ; 1,46 (s, CH₃) , 1,26 (s, CH₃) RMN¹³C (DMSO-d₆) δppm = 171,1 (O-CO) , 170,0 (OCO) , 154,8 (C₆) ; 151,8 (C₂) , 148,5 (C₄) , 134,1 (C₈) , 119,9 (C₅) , 111,8 ((CH₃)₂-C) , 86,3 (C1') , 82,2 (C4') , 81,6 (C3') , 79,0 (C2') , 62,1 (C5') , 27,0 (CH₂) , 26,8 (CH₂) , 25,0 (CH₃) , 23,3 (CH₃) Analyse C₁₇H₂₁N₅O₈, 1H₂O Calc % C 46,26 - H 5,25 - N 15,87, Tr % C 46,12 - H 4,97 - N 15,97

(N-acétyl-N-hydroxy)-2-aminofluorène 6 Le 2-nitrofluorène (1 g, 4,7 mmol) est solubilisé dans le tétrahydrofurane (120 cm³) La solution est refroidie dans un bain de glace On ajoute alors du palladium sur charbon à 5% (0,235 g) puis goutte à goutte de l'hydrate d'hydrazine (94 cm³) Après 1 h d'agitation dans le bain réfrigérant, on ajoute de la triéthylamine (1,4 cm³) puis une solution de chlorure d'acétyle (7 cm³) dans du tétrahydrofurane (25 cm³) , la température du milieu ne doit pas dépasser 10°C La solution est ensuite agitée pendant 30 min à température ambiante puis filtrée sur célite Le précipité est lavé avec de l'éther éthylique On ajoute au filtrat une solution saturée de bicarbonate de sodium et le mélange est agité 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière On récupère la phase organique et on extrait le produit **6** avec une solution de soude 0,1N La phase aqueuse est ensuite acidifiée par addition d'acide chlorhydrique 1N (le pH de la solution = 3) On extrait le produit avec du dichlorométhane La phase organique est séchée, concentrée et on fait précipiter le produit **6** avec de l'éther de pétrole (0,921 g, rendement 82%) F 148-149°C IR (KBr) 3160-3140, 2900, 1640, 1620, 1485 cm⁻¹ UV (éthanol) λ_{max} (ε) 281 (24100), 290 (24400), 302 (20700), 314 (15300) nm SM (impact électronique), M = 239 m/z = 239 (M⁺), 223, 197, 181, 165 RMN¹H (DMSO-d₆) δppm = 10,6 (s, OH) , 7,9-7,2 (m, HAr) , 3,9 (s, 2C9H) , 2,2 (s, CH₃) RMN¹³C (DMSO-d₆) δppm = 168,0 (CH₃) , 141,2 (C₁₀) , 141,1 (C₁₃) , 138,7 (C₁₁, C₁₂) , 135,6 (C₂) , 124,8 (C₆) , 124,4 (C₇) , 123,0 (C₈) , 117,8 (C₃) , 117,6 (C₄, C₅) , 115,7 (C₁) , 34,6 (C₉) , 20,5 (CH₃)

[N-acétyl-N-[(2',3'-isopropylidène-5'-guanosinyl)-3-carbonyl] propanoyloxy]] 2-amino-fluorène 3 On solubilise le produit **5** (0,211 g, 0,5 mmol) dans de la diméthylformamide (5 cm³) La solution maintenue sous atmosphère d'azote est refroidie dans un bain glace-sel à -20°C On ajoute de la N-méthyl morpholine (0,109 cm³, 1 mmol) et après 5 min du chloroformate d'isobutyle (0,129 cm³, 1 mmol) , 10 à 15 min plus tard on ajoute l'acide hydroxamique **6** (0,109 g, 0,5 mmol) On laisse réagir 5 min à -20°C puis 15 min à température ambiante On évapore à sec sous pression réduite. L'huile obtenue est solubilisée dans du dichlorométhane (10 cm³) La phase organique est lavée successivement avec une solution de soude 0,1N, une solution d'acide chlorhydrique 1N et de l'eau Elle est ensuite séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous vide On fait précipiter le produit **3** par addition d'éther éthylique (0,210 g, rendement 65%) F 176-180°C IR

(KBr) 3420, 3130, 2940, 1785, 1730, 1690, 1600, 1530, 1490 cm^{-1} UV (éthanol) λ_{max} (ϵ) 274 (35500), 302 (18800) nm SM FAB(+), M = 644 m/z = 667 (M+Na)⁺, 645, 424. RMN¹H (DMSO-d₆) δ ppm = 10,78 (s, N₁-H) ; 7,88 (s, C₈-H) , 7,86 (m, H₄) , 7,61 (s, H₁) , 7,54 (d, H₈) , 7,40 (d, H₃) , 7,34 (t, H₆) , 7,28 (t, H₇) , 6,60 (s, NH₂) , 5,91 (s, H₁') , 5,20 (m, H₂') , 5,07 (m, H₃') , 4,20 (m, 2H₅') , 4,10 (m, H₄') , 3,92 (s, 2C₉H) , 2,60 (m, (CH₂)₂) , 2,00 (s, CO-CH₃) , 1,45 (s, CH₃) , 1,25 (s, CH₃) Analyse C₃₂H₃₂N₆O₉, 3,5H₂O Calc % C 54,31 - H 5,55 - N 11,88, Tr % C 54,56 - H 5,58 - N 11,75

Mélange des isomères en position 1 et 3 du 2-acétamido [((2',3'-isopropylidène-5'-guanosinyl)-3-carbonyl) propanoyloxy] fluorène **7a, **7b**** : Le produit **3** (0,13 g, 0,2 mmol) est dissous dans du dichlorométhane (10 cm^3) La solution est mise à reflux sous atmosphère d'azote pendant 27 h On évapore alors le solvant et le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (dichlorométhane-éthanol 94/6) On obtient ainsi le mélange **7** sous forme de poudre blanche avec un rendement de 40% F 176-180°C IR (KBr) 3340, 3000, 2950, 1740, 1690, 1605, 1535, 1490 cm^{-1} UV (éthanol) λ_{max} (ϵ) 275 (38100), 302 (18600) nm SM FAB(+), M = 644 m/z = 667 (M+Na)⁺, 645 RMN¹H (DMSO-d₆) δ ppm = 10,73 (s, N₁-H) , 9,55, 9, 48, 9, 33, 9,23 (4s, NH-COCH₃) , 7,93 (s, C₈H) , 8,07-7,28 (m, H_{Ar}) , 6,55 (s, NH₂) , 6,01 (m, H₁') , 5,23 (m, H₂') ; 5, 14 (m, H₃') , 4,29 (m, 2H₅') , 4,19 (m, H₄') , 3,88, 3,70 (2s, 2C₉H) , 2,91, 2,72, 2,65, 2,60 (4m,(CH₂)₂) , 2,37, 2,30, 2,07 (3s, COCH₃) , 1,49 , (m, CH₃) , 1,28 (m, CH₃) Analyse C₃₂H₃₂N₆O₉, 3,5 H₂O Calc % C 54,31 - H 5,55 - N 11,88, Tr % C 54,14 - H 5,54 - N 11,86

8-[N-acétyl [N-(2-aminofluorényl)] 5'-((2-carboxyéthyl)carbonyl)]] 2',3'-isopropylidène guanosine **4** Le produit **3** (0,4 g, 0,6 mmol) est solubilisé dans un mélange acétone (350 cm^3) - tampon carbonate pH 9,2 (230 cm^3) La solution maintenue sous atmosphère d'azote est agitée à 40°C pendant 8 h On évapore alors l'acétone et on lave la phase aqueuse avec du dichlorométhane La phase aqueuse est ensuite acidifiée jusqu'à un pH < 3 , on extrait **4** avec du dichlorométhane La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous vide On fait précipiter **4** par addition d'éther éthylique Le rendement de la réaction déterminé par CLHP est de 30% F 190-194°C IR (KBr) 3300-3100, 2940, 1740, 1700, 1650, 1540, 1490 cm^{-1} UV (éthanol) λ_{max} (ϵ) 277 (39500), 302 (20900) nm. SM FAB(+), M = 644 m/z = 645 (M+H)⁺, 602, 373, 330 SM haute résolution FAB (+) (M+Na)⁺ C₃₂H₃₂N₆O₉Na Calc % 667, 2128, Tr % 667, 2380 (M+H)⁺ C₃₂H₃₃N₆O₉ Calc % 645, 2309 Tr % 645, 2478 RMN¹H (DMSO-d₆) δ ppm = 10,73 (s, N₁-H) , 7,83 (d, H₄) , 7,80 (d, H₅) , 7,54 (s, H₁) , 7,50 (d, H₈) , 7,33 (d, H₃) , 7,31 (t, H₆) , 7,24 (t, H₇) , 6,47 (s, NH₂) , 5,76 (d, H₁') , 5,35 (d, H₂') , 5,16 (dd, H₃') , 4,21 (m, 2H₅') , 4,07 (m, H₄') , 3,87 (s, 2C₉H) , 2,41 (m, (CH₂)₂) , 1,98 (s, COCH₃) , 1,42 (s, CH₃) , 1,23 (s, CH₃)

8-[N-acétyl [N-(2-aminofluorényl)]] guanine **2** : Le composé **4** (0,05 g, 0,07 mmol) est dissous dans une solution d'acide chlorhydrique 1N-méthanol (50/50, 20 cm^3) Le mélange est agité à température ambiante jusqu'à la disparition totale du produit de départ **4** On neutralise alors la solution et on extrait **9** par de l'acétate d'éthyle La phase organique est ensuite concentrée et on fait précipiter le composé **9** par addition d'éther éthylique UV (éthanol) λ_{max} (ϵ) 262 (28000) , 302 (16000) nm SM FAB(+), M = 372 m/z = 373 (M+H)⁺, 330, 152 RMN¹H (DMSO-d₆) δ ppm = 10,65 (s, N₁-H) , 8,44 (s, N₉-H) , 7,93 (d, H₄) , 7,88 (d, H₅) , 7,58 (d, H₈) , 7,53 (s, H₁) , 7,41-7,29 (m, H₃, H₆, H₇) , 6,34 (s, NH₂) , 3,93 (s, 2C₉H) , 2,02 (s, COCH₃)

8-[N-(2-aminofluorényl)] guanine 10 Le composé **4** (0,05 g, 0,07 mmol) est dissous dans une solution d'acide chlorhydrique concentré-méthanol (50/50, 20 cm³) Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante sous atmosphère d'azote La solution est ensuite neutralisée et évaporée sous pression réduite Le résidu obtenu est dissous dans le méthanol et le produit **10** précipite par addition d'éther éthylique UV (éthanol) λ_{\max} (e) 285 (15000), 332 (21000) nm SM FAB(+), M = 330 m/z = 331 (M+H)⁺, 169 RMN¹H (DMSOd₆) δ ppm = 10,85 (s, N₁-H), 9,70 (s, N₉-H), 7,91 (s, H₁), 7,70 (d, H₄, H₅), 7,46 (m, H₈, H₃); 7,27 (t, H₆), 7,16 (t, H₇) 6,59 (s, NH₂), 6,54 (s, C₈-NH), 3,84 (s, 2C₉H)

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce aux supports financiers de la Ligue Française Nationale contre le Cancer et de l'Association pour la Recherche sur le Cancer

Bibliographie

- 1 Garner, R C , Martin, C N , Claysson, D B *Chemical Carcinogens* , Searle, C E , Washington, D C **1984**, *1*, 175-276
- 2 Parkes H G , Evans, A E J *Chemical Carcinogens* , Searle, C E Washington, D C **1984**, *1*, 277-290
- 3 Anderson, R A , Enomoto, M , Miller, J A *Cancer Res* **1964**, *24*, 128-143
- 4 Miller, E C , Miller, J A , Hartmann, H A *Cancer Res* **1961**, *21*, 815-821
- 5 Cramer, J W , Miller, J A , Miller, E C *J Biol Chem* **1960**, *235*, 885-888
- 6 Kadlubar, F F , Unruh, C E , Flammang, T J , Sparks, D , Mitchum, R K , Mudler, G J *Chem Biol Interactions* **1981**, *33*, 129-147
- 7 Kadlubar, F F , Miller, J A , Miller, E C *Cancer Res* **1978**, *38*, 3628-3638
- 8 Miller, E C *Cancer Res*. **1978**, *38*, 1479-1496
- 9 Miller, J A , Miller, E C *Prog Exp Tumor Res* **1969**, *11*, 273-301 , *Cancer*, **1981**, *47*, 1055-1064
- 10 Scribner, J D , Miller, J A , Miller, E C *Cancer Res* **1970**, *30*, 1570-1579
- 11 Bartsch, H , Dworkin, C , Miller, E.C , Miller, J A. *Biochim Biophys Acta* **1975**, *304*, 42-55
- 12 Demeunynck, M , Tohme, N , Lhomme, M F , Mellor, J M , Lhomme, J. , *J Am Chem Soc* **1986**, *108*, 3539-3541 , Demeunynck, M , Lhomme, M F , Mellor, J M , Lhomme, J *J Org Chem* **1989**, *54*, 395-405 , Demeunynck, M , Thome, N , Lhomme, M F , Lhomme, J *J Org Chem* , **1989**, *54*, 405-410.
- 13 Kriek, E , Westra, J G. *Chemical Carcinogen and DNA* , Grover, P L CRC Press, **1979**, *2*, 2-27
- 14 Beland, F A , Kadlubar, F F *Environ Health Perspect* **1985**, *62*, 19-30
- 15 Novak, M , Roy, A K *J Org Chem* **1985**, *50*, 571-580 , 4884-4888
- 16 Novak, M , Martin, K A , Heinrich, J L *J Org Chem* **1989**, *54*, 5430-5431
- 17 Gassman, P G , Granub, J E *J Am Chem Soc* **1984**, *106*, 1498-1499 , 2448-2449
- 18 Endo, Y , Shudo, K , Okamoto, T *J Am Chem Soc* **1982**, *104*, 6393-6397
- 19 Kriek, E , Miller, J A , Juhl, W Miller, E C *Biochemistry* **1967**, *6*, 177-182
- 20 Saint Ruf, G , Loukaou, P E , Sponheim-Maurizot, M. *Cancer Biochem Biophys* **1984**, *7*, 89-99

21. Hong, S J ; Piette, L H *Cancer Res.* **1976**, *36*, 1159-1179
22. Constant, J.F , Laugaa, P , Roques, B P , Lhomme, J *Biochemistry*, **1988**, *27*, 3997-4003
23. Constant , J.F. , Fahy, J ; Lhomme, J *Tetrahedron Lett* **1987**, *28*, 1777-1780
24. Decout, J L , Lhomme, J *NATO ASJ series, Photosensinsation* , Springer-Verlag, Berlin, **1988**, *H15*, 293-295
25. Gaffney, B L. , Marky, L A. , Jones, R A. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3-13
26. Westra, J G *Carcinogenesis* **1981**, *105*, 4863-4864
27. Anderson, G W , Zimmerman, J E , Callahan, F M *J Am Chem Soc* **1967**, *89*, 5012-5017
28. Fieser, M , Fieser, L F *Reagents for Organic Synthesis* , Wiley Inter Sciences, New-York, **1977**, *6*, 307
29. Kessler, H. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 1857-1867
30. Iorio, M A , Mazzeo-Farina, A ; Seneca, L , Bonifortu, L *Biomed Mass Spectrum* **1985**, *12*, 30-37
31. Galliani, G , Rindone, B *Nouv J Chum* **1983**, *7*, 151-154
32. Evans, F E , Miller, D W , Levine, R A *J Am Chem Soc* **1984**, *108*, 396-401 , *J Biomol Struct Dyn* **1986**, *3*, 935-948
33. Evans, F E , Levine, R A *J Biomol Struct Dyn* **1986**, *3*, 923-935
34. Neidle, S , Kuroda, R , Broyde, S Hingerty, B E , Levine, R A , Miller, D W , Evans, F E *Nucleic Acids Res* **1984**, *12*, 8219-8233
35. Underwood, G R , Kirsh, R B *J Chem Soc , Chem Commun* **1985**, pp 136-138 , 555-556 , *Tetrahedron Lett* **1985**, *26*, 147-150
36. Nicolaou, C , Underwood, G R *Tetrahedron Lett* **1989**, *30*, 1479-1482
37. Bamberger, E *Chem Ber* **1894**, *27*, 1347-1350 , 1548-1557 , **1900**, *33*, 3600-3622 , *Annalen* **1921**, *424*, 233-321
38. Horner, L , Steppan, M *Annalen* **1957**, *606*, 24-55
39. Defrancq, E , Pelloux, N , Lhomme, M F , Lhomme, J *Eigth symposium on the Chemistry of nucleic acid components* , Bechyne, Tchecoslovaque , 17-21 septembre **1990**