

Hoechst 33258, un agent de reconnaissance du petit sillon de l'ADN

Silvana Frau, Jean Bernadou*, Bernard Meunier*

Laboratoire de chimie de coordination du CNRS, 205, route de Narbonne,
31077 Toulouse cedex, France

(Reçu le 12 juin 1996; accepté le 29 octobre 1996)

Summary — Hoechst 33258, a specific DNA minor groove binder. Following the presentation of the DNA minor groove binder Hoechst 33258, this review focuses on the recent advances in the understanding of its mode of interaction with DNA. On the basis of a large variety of techniques, it is shown that this chromosomal dye specifically binds to designated DNA sequences with a high affinity. Syntheses of analogs and hybrid molecules designed by coupling Hoechst 33258 with chemical nucleases allow the extension of the applications of these compounds as useful tools in molecular biology and as potential pharmaceuticals.

Hoechst 33258 / minor groove / DNA / recognition

Résumé — Après une présentation du colorant chromosomique Hoechst 33258, les données récentes de la littérature sur la nature, la force et la spécificité de son interaction avec l'ADN sont analysées au travers des apports de différentes techniques. La synthèse d'analogues et de molécules hybrides par couplage avec des nucléases chimiques permet d'étendre le champ des applications de ces composés comme outil de la biologie moléculaire ou comme agent thérapeutique potentiel.

Hoechst 33258 / petit sillon / ADN / reconnaissance

Introduction

La reconnaissance spécifique de séquences d'ADN est un point clé dans la conception de nouvelles molécules de synthèse à propriétés antivirales, antitumorales ou antibiotiques. L'étude de la liaison non covalente de petites molécules organiques avec une forme double brin de l'ADN contribue à une meilleure compréhension de ces phénomènes et permet une approche au niveau moléculaire de la relation structure–propriété de l'ADN.

Parmi ces petites molécules, le composé Hoechst 33258 (2'-(4-hydroxyphényl)-5-(4-méthylpipérazin-1-yl)-2,5'-bi-1*H*-benzimidazole); le sigle abrégé H258 sera utilisé pour la suite de l'article) a été largement étudié. Il n'existe pas de revue générale récente sur ce composé qui constitue un excellent exemple du large éventail de méthodes chimiques et physicochimiques dont dispose le chimiste ou le biologiste pour étudier l'interaction de telles molécules avec l'ADN.

Plusieurs molécules possédant un groupement pipérazine (fig 1) ont été utilisées dans les années 1930 en chimiothérapie antiparasitaire [1].

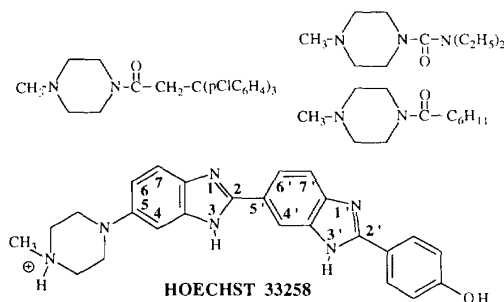


Fig 1. Molécules à groupement pipérazine possédant des propriétés anthelminthiques.

Coupler l'entité pipérazine à un seul groupement benzimidazole entraîne une perte de l'activité biologique. En revanche, si ce couplage se fait avec un groupement bisbenzimidazole, les propriétés chimiothérapeutiques sont retrouvées. On arrive ainsi à la structure du H258.

En 1968, Herzog et Schütze mentionnaient la première utilisation du H258 comme colorant des chromosomes [2] et dès 1970 cette propriété fut attribuée à

* Correspondance et tirés à part

l'interaction de H258 avec l'ADN [3]. H258 représente un assemblage de cycles aromatiques plans connectés par des liens flexibles et porteurs de charges positives et de groupements donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène. Il constitue ainsi un partenaire idéal pour l'interaction avec l'ADN. Aussi un large champ d'investigation s'est ouvert sur la nature de l'interaction H258-ADN qui a alors été étudiée par tous les moyens d'analyse dont disposaient chimistes et biologistes.

Synthèse du motif bisbenzimidazole et de quelques analogues

En général, les 2,5'-bi-1*H*-benzimidazolyles sont obtenus par couplage d'une diamine aromatique avec un iminoéther (fig 2) [1]. Cette méthodologie présente l'avantage de conduire à des composés portant à leurs extrémités une grande variété de substituants. Ainsi, Kelly et al [4] ont obtenu des analogues de H258 portant des groupements NO₂, NMe₂ ou encore NH₂, Br et I sur l'une des positions du cycle phényle. La pipérazine a également pu être remplacée par un groupement pyridinyle.

Bathini et al [5] et Singh et al [6] ont rapporté la synthèse d'analogues de H258 modifiés sur les groupements benzimidazoles suivant les schémas présentés dans les figures 3 et 4. On peut ainsi accéder à une grande variété de motifs bi-1*H*-benzimidazolyles et analogues. Chacun de ces composés pourra interagir avec l'ADN double brin (fig 5) avec des caractéristiques propres.

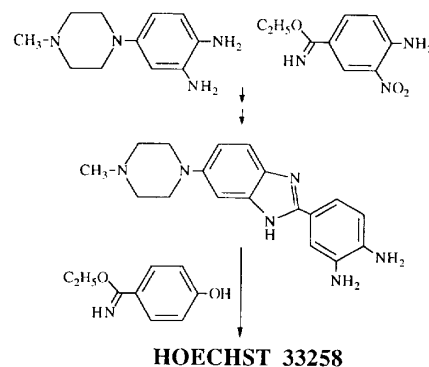


Fig 2. Schéma général de la synthèse de H258.

Interaction de H258 avec l'ADN

Généralités

Des études biologiques ayant démontré les propriétés de fluorescence du colorant H258 en présence d'ADN chromosomique, les physicochimistes ont essayé de définir les paramètres de l'interaction avec des polynucléotides. Il apparaît que la fluorescence est dépendante de la composition en bases au sein du double brin : le fluorochrome préfère les bases A et T aux bases G et C (A = adénine, T = thymine, G = guanine, C = cytosine) [7].

Mais il faut attendre le début des années 80 pour voir apparaître des données plus détaillées sur l'interaction

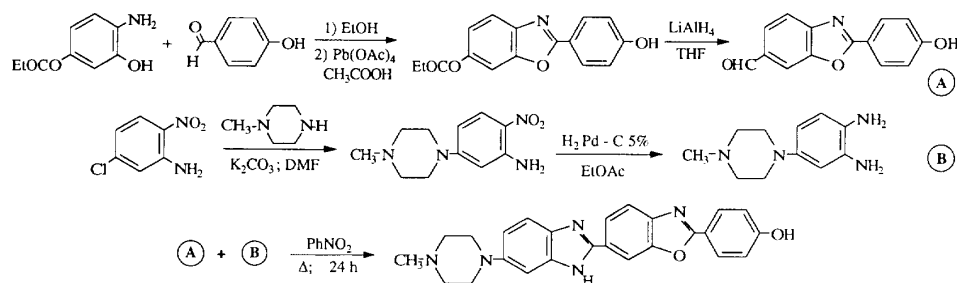


Fig 3. Schéma de synthèse d'un analogue benzoxazole du H258.

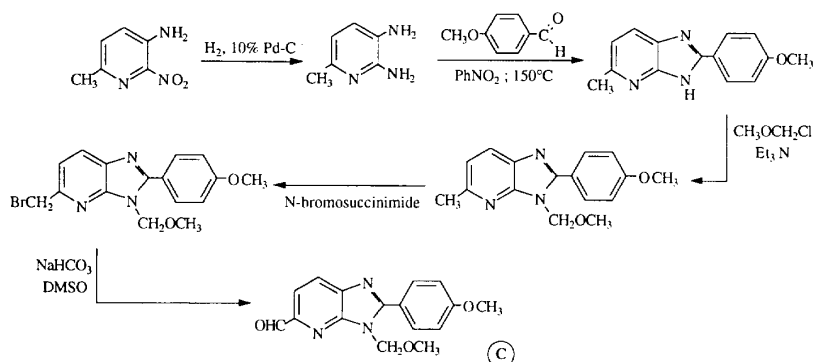


Fig 4. Schéma de synthèse d'un analogue *N*-alkylé du H258. La structure bi-benzimidazolyle est obtenue en faisant réagir ensemble les synthons B et C.

Tableau I. Intensité relative de la protection vis-à-vis d'une nucléase radiochimique, pour plusieurs arrangements des bases A et T [10].

Séquence de nucléotides protégée par H258 (intensité relative de la protection)							
aaTATTat	(+++++)	aaAAATaa	(+++++)	gtTATTgt	(+++)	acATTAac	(+)
caTATTtg	(+++++)	acAAATag	(+++++)	caTTATta	(+++)	tcTCATga	(+)
tgTATTta	(+++++)	caTTTAtc	(+++++)	acATTTcc	(+++)	taAGAAac	(+)
caATTTaa	(+++++)	ccTTTTtc	(+++++)	cgAAAAgt	(++)	ggGGTTcc	(+)
agATTTca	(+++++)	tgAATAct	(+++)	gaTAAAct	(+)		
ggAAATgt	(+++++)	taAAAAta	(+++)	gcATTAAa	(+)		

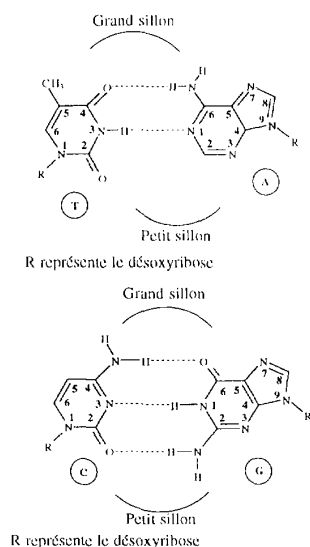


Fig 5. Quelques caractéristiques de l'ADN double brin. La structure de l'hélice d'ADN est non symétrique. Elle comporte un grand et un petit sillon de largeur et de profondeur différentes. Chaque brin est une suite de désoxyriboses porteuses d'une base purique (A et G) ou d'une base pyrimidique (C et T), et reliés entre eux par un lien phosphodiester. Les deux brins sont appariés de manière complémentaire par des liaisons hydrogène de type Watson-Crick. Certains atomes des bases pointent dans le petit sillon (O^2 des T, N^3 des A, par exemple) et représentent des sites donneurs d'électrons qui peuvent être impliqués dans la formation de liaisons hydrogène. Certains atomes d'hydrogène du désoxyribose se trouvent également orientés vers le petit sillon [9].

H258-ADN [8]. Par combinaison des informations fournies par le dichroïsme circulaire et les spectroscopies d'absorption et de fluorescence, Mikhailov et al ont pu décrire les principales caractéristiques de l'interaction colorant-ADN :

- (i) Au sein du complexe, l'ADN est sous la forme B. H258 ne se complexe pas sur un ADN-B converti en ADN-A dans une solution contenant 80 % d'éthanol. Le spectre de dichroïsme circulaire de l'ADN B ne change pas lors de l'interaction avec H258. La viscosité de l'ADN complexé n'augmente pas, ce qui permet d'écarter une interaction par intercalation du colorant.
- (ii) H258 interagit dans le petit sillon sur une longueur d'environ 20 Å, mais ne couvre vraiment qu'environ quatre paires de bases.
- (iii) L'angle α entre l'axe de l'hélice et celui du colorant est de 45° environ, ce qui est cohérent avec

une localisation dans le petit sillon. D'autre part, on retrouve les mêmes propriétés pour le complexe H258-poly(dA·dT)·poly(dA·dT) et H258-poly(dI·dC)·poly(dI·dC) où le petit sillon est accessible, alors que des changements importants sont observés avec le poly(dG·dC)·poly(dG·dC) où le petit sillon est encombré par les groupements NH_2 de la guanine (I = isosine).

Ce premier modèle, globalement correct, a été établi en considérant H258 comme une molécule tricationique, ce qui n'est pas le cas à pH physiologique. L'apport de techniques d'analyses physicochimiques variées a permis par la suite d'approfondir l'étude du complexe H258-ADN.

Étude de l'interaction H258-ADN par expériences d'empreinte (« footprinting »)

Cette technique permet de mettre en évidence la zone d'interaction d'un ligand sur l'ADN. En effet, une fois le complexe ADN-ligand formé, si l'on dégrade l'ADN à l'aide d'une nucléase chimique ou par digestion enzymatique, on va laisser intacte la partie du duplex « protégée » par le ligand. L'ADN est dégradé de part et d'autre du ligand, mais pas dans la zone de l'interaction. L'analyse des sites de coupure par gel d'électrophorèse permet de visualiser l'empreinte de la molécule.

Alors qu'aucune structure cristalline n'était encore réalisée, les résultats de Mikhailov et al [8] ont été confirmés par une expérience d'empreinte en électrophorèse [10] : un dérivé de H258 marqué à l'iode ^{125}I a permis par radiolyse de générer des dommages irréversibles sur l'ADN à l'extrémité du site d'interaction ligand-ADN et ainsi, de visualiser pour la première fois le site de reconnaissance de H258 sur des fragments de restriction du plasmide pBR322 d'une longueur de 176 à 346 paires de bases (tableau I).

Comme l'indique le tableau I, ce site doit inclure un quadruplet A-T. De plus, l'arrangement des bases dans le site ainsi que la nature des bases adjacentes en 3' ou en 5' ne sont pas innocents dans l'interaction. Des observations similaires sont faites à partir d'un gel d'empreinte utilisant le complexe Fe(II)-EDTA-propylméthidium comme nucléase chimique. La taille du site est ainsi estimée à 5 ± 1 paires de bases [11]. En accord avec Mikhailov et al, et Martin et Holmes, les auteurs expliquent l'interaction dans le petit sillon de l'ADN double brin par la formation de deux liaisons hydrogène, d'une part entre l'atome N^3 d'une adénine sur un brin et un NH de benzimidazole, et d'autre part entre l' O^2 d'une thymine du brin opposé et le groupement NH de l'autre

Tableau II. Concentration de H258 nécessaire pour réduire de 50 % l'activité de la DNase I (CI_{50}) sur différents oligonucléotides [13].

Quadruplet (A/T) ₄ CI_{50} (μM)	gAATTc CI_{50} (μM)	gTAATc CI_{50} (μM)	gATATc CI_{50} (μM)	gTATAc CI_{50} (μM)	gTTAAc CI_{50} (μM)
	0.04 ± 0.01	2.0 ± 0.8	4.5 ± 3.0	13 ± 7	15 ± 12

benzimidazole. Mais si ce phénomène est le seul mis en jeu dans la reconnaissance, on pourrait s'attendre à un site comptant trois paires de bases. Or, il semble que deux paires de bases supplémentaires soient impliquées. Deux explications sont possibles (et seront vérifiées par la suite) : (i) il existe plus d'un mode d'interaction (deux orientations différentes sont possibles pour H258 dans son site) et (ii) l'encombrement stérique dû à la pipérazine et au phénol permet la protection de deux paires de bases non directement impliquées dans l'interaction.

Par ailleurs, sur un duplex protégé par H258, les coupures générées par la DNase I sur un brin sont retrouvées décalées de trois paires de bases vers l'extrémité 3' sur l'autre brin, ce qui confirme l'interaction de H258 dans le petit sillon de la double hélice [12]. Il ressort également de cette étude sur un fragment du plasmide pBR322, que plusieurs paires de bases G-C peuvent être protégées de la digestion enzymatique par H258.

Une étude récente confirme que l'arrangement des bases A et T au sein du quadruplet (A/T)₄ peut entraîner une variation de la protection par H258 dans une gamme de 1 à 100 (tableau II) [13].

Cristallographie

Plusieurs structures cristallographiques du complexe ADN-H258 ont été décrites dans la littérature. Trois oligonucléotides autoccomplémentaires comptant chacun 12 paires de bases ont été étudiés :

- (A) : d(CGCGAATTCGCG)₂ (ref [14–16])
- (B) : d(CGCGATATCGCG)₂ (ref [17])
- (C) : d(CGCAAATTTGCG)₂ (ref [18])

Dans tous les cas, les auteurs observent des modifications mineures de la géométrie de l'hélice d'ADN, les caractéristiques locales du duplex n'étant pas altérées de façon significative.

Dans le cas de l'oligonucléotide (A), le premier site d'interaction observé est dissymétrique (...ATTc...), alors que les études menées en solution tendaient à proposer un site symétrique (...AATT...), comme dans le cas de la nétoprine, un autre agent de reconnaissance du petit sillon. Le cycle pipérazine, trop encombrant, est déplacé vers une partie de l'ADN où le petit sillon est plus large, ie, vers une paire de bases G-C. Le cycle phénolique recouvre alors un plateau de bases A-T sans pour autant créer une liaison hydrogène. La stabilisation du complexe peut être attribuée à la formation de liaisons hydrogène entre les atomes d'azote des groupements benzimidazole et les bases T19, T7, A18 et T8, mais aussi entre l'azote de la pipérazine et la base G16 [14] (Pjura et al, fig 6). Sur ce même oligonucléotide, Teng et al [15] ont mis en évidence le site d'interaction ...AATT... (fig 6).

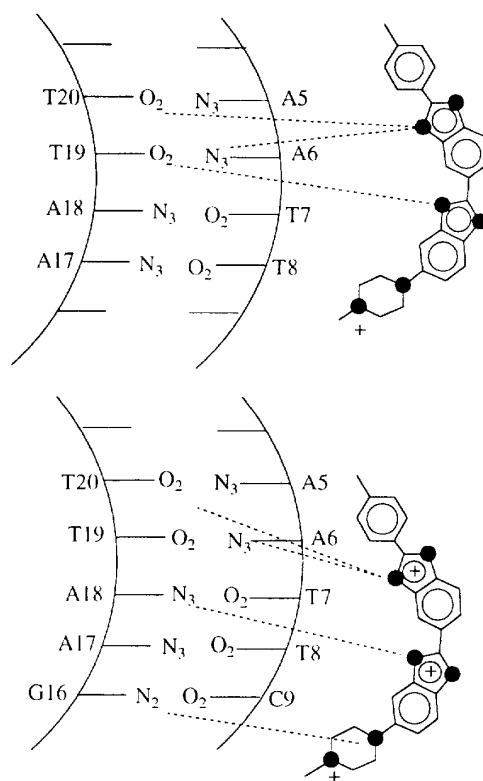


Fig 6. Comparaison des sites d'interaction de H258 observés par Teng [15] (en haut) et Pjura [14] (en bas).

On peut noter que les cristaux sont obtenus à partir d'une solution de pH 6,5–7,5, proche du pH physiologique où les atomes d'azote des benzimidazoles ne sont pas protonés ($pK_a = 5,5$) alors que celui de la pipérazine l'est ($pK_a = 8,5$). Teng et al [15] ont considéré H258 dans sa forme monocationique alors que Pjura et al [14] le considèrent comme étant tricationique.

Au travers des travaux de Teng et al, il apparaît que l'isogéométrie de H258 avec le petit sillon est à moduler. Une torsion non négligeable intervient pour permettre à la molécule de suivre parfaitement l'allure courbe du petit sillon : alors que les cycles phénolique et pipérazinique sont quasiment coplanaires avec le benzimidazole adjacent (on observe des angles dièdres respectivement de 8° et 14°), la torsion entre les deux benzimidazoles est de 32° .

Par ailleurs, outre la formation de liaisons hydrogène, ces données cristallographiques montrent l'existence de très nombreuses interactions de type Van der Waals (il existe 39 distances intermoléculaires inférieures à $3,5 \text{ \AA}$). Ces valeurs font apparaître des contacts rapprochés entre les atomes du colorant et les carbones

Tableau III. Variation des angles dièdres observés dans H258 en fonction de la température.

Température	<i>phe-bz1</i> β ($^{\circ}$)	<i>bz1-bz2</i> α ($^{\circ}$)	<i>bz2-pip</i> γ ($^{\circ}$)	Référence
Température ambiante	0	37	60	[14]
15 $^{\circ}$ C	8	32	14	[15]
0 $^{\circ}$ C (pip-up)*	8	20	9	[16]
0 $^{\circ}$ C (pip-down)*	8	15	3	[16]
-25 $^{\circ}$ C	10	12	8	[16]
-100 $^{\circ}$ C	30	2	6	[16]

α, β, γ : voir définition dans la figure 7; * voir définition ci-dessous [16].

C² des bases A (remarquons que sur la position équivalente d'une guanine il existe un groupement amine probablement responsable en partie du manque d'affinité pour les séquences G-C). De la même façon, si on mesure la largeur du petit sillon entre les atomes O^{4'} des désoxyriboses de chacun des brins, il devient évident que H258 a très peu d'espace pour se déplacer. De nouveaux contacts de Van der Waals sont alors créés entre l'ADN et le colorant. Ce dernier est, en quelque sorte, piégé par le double brin. De plus, n'oublions pas qu'un facteur important dans la stabilisation du complexe est représenté par l'interaction purement électrostatique entre la charge positive portée par H258 et la chaîne négative des phosphates de l'ADN.

Une étude de Dickerson et al sur des monocristaux obtenus avec le duplex (A), confirme le site ...AATT... comme site d'interaction [16] et permet de préciser la valeur des angles dièdres entre les benzimidazoles en fonction de la température (tableau III) : ces deux cycles sont de plus en plus coplanaires à mesure que la température diminue, en accord avec la stabilisation due à l'énergie de résonance délocalisée sur ces cycles aromatiques conjugués. À -100 $^{\circ}$ C, la molécule de colorant n'a plus assez d'énergie pour permettre les torsions conduisant à la formation de liaisons hydrogène avec l'ADN.

La seconde séquence étudiée (B), possède un site de reconnaissance alterné ...ATAT... [17]. On retrouve le même type de résultats que précédemment. Quelle que soit la séquence et les variations d'analyses, deux orientations semblent possibles pour H258 dans son site (de plus, dans chaque orientation les cycles terminaux phénolique et pipérazinique possèdent un degré de liberté particulier). On parlera d'une orientation pipérazine-5' pour laquelle ce cycle est du côté de l'extrémité 5' du duplex (« pip-up » dans le tableau III), et d'une orientation pipérazine-3' (« pip-down » pour laquelle il pointe vers l'extrémité 3'. Si l'on s'intéresse alors au troisième oligonucléotide (C), un élément nouveau apparaît, non pas dans le mode de liaison de H258 ou dans son manque de mobilité au sein du duplex, mais dans la composition en bases du site. Le colorant se lie sur la séquence ...ATTTG... avec une orientation unique « pipérazine-3' » [18].

Modélisation moléculaire

L'énergie d'interaction du complexe avec l'ADN est calculée à l'aide de l'équation suivante [19] :

$$E = E_{\text{ADN-colorant}} + \Delta E_{\text{ADN}} + \Delta E_{\text{drogue}}$$

($E_{\text{ADN-colorant}}$ est l'énergie d'interaction entre le colorant, et l'ADN et ΔE_{ADN} et $\Delta E_{\text{colorant}}$ sont respectivement les variations d'énergies du duplex et du colorant dues à la formation du complexe).

Cette approche permet de vérifier que l'arrivée de H258 ne perturbe pas la géométrie et la stabilité de l'hélice d'ADN car le terme ΔE_{ADN} ne représente que 0,2 % de l'énergie totale. D'autre part, si l'on compare les valeurs des énergies $E_{\text{ADN-colorant}}$ lors de la formation des complexes avec des séquences G-C et A-T, on retrouve une plus grande affinité de H258 pour les bases A-T.

$$E_{\text{ADN-colorant (A-T)}} = -127,7 \text{ kcal/mol}$$

$$E_{\text{ADN-colorant (G-C)}} = -115,0 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta E_{\text{ADN-colorant (A-T)-ADN-colorant (G-C)}} = -12,7 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta E_{\text{ADN (A-T)}} = 16,5 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta E_{\text{drogue (A-T)}} = 1,4 \text{ kcal/mol}$$

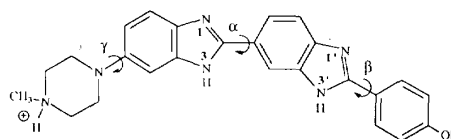
$$\Delta E_{\text{ADN (G-C)}} = 12,2 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta E_{\text{drogue (G-C)}} = 1,7 \text{ kcal/mol}$$

Plusieurs facteurs interviennent dans la valeur de cette énergie [20] : (i) les changements de perméabilité et de distribution des contre-ions induits par la présence du colorant sur l'ADN, (ii) le potentiel électrostatique qui représente l'interaction entre le champ électrostatique du petit sillon et le champ électrostatique du colorant, (iii) la polarisation, (iv) la formation de liaisons hydrogène et (v) les termes de torsion.

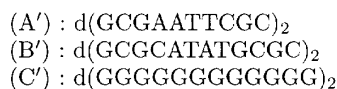
On peut s'interroger sur les contributions respectives de tous ces paramètres dans l'affinité et la spécificité de l'interaction pour le petit sillon de l'ADN. Le potentiel électrostatique est très négatif dans les régions riches en paires de bases A-T par comparaison avec les zones G-C, ce qui favorisera l'approche d'une molécule cationique [21].

Si α est l'angle de torsion entre les deux benzimidazoles, β l'angle de torsion phénol/benzimidazole et γ l'angle de torsion pipérazine/benzimidazole, la géométrie optimale pour H258 libre en solution est obtenue pour $\alpha = 180^{\circ}$, $\beta = 0^{\circ}$, $\gamma = 8^{\circ}$ (fig 7). Le coût énergétique pour que le colorant adopte la meilleure conformation pour se lier à l'ADN ($\alpha = \beta = \gamma = 0^{\circ}$) est inférieur à 2 kcal/mol [22]. De même, si les atomes

**Fig 7.** Angle dièdre entre les différents cycles de H258.

d'hydrogène sont sur les azotes N¹ et N^{1'} au lieu d'être sur les azotes N³ et N^{3'}, on retrouve une faible différence d'énergie entre la molécule libre et la molécule liée. Cela signifie que tous les cycles de H258 peuvent adopter, à coût énergétique réduit, la meilleure conformation pour l'interaction avec l'ADN.

Sapse et al [22], en considérant les deux orientations possibles pipérazine-5' et pipérazine-3' mises en évidence par radiocristallographie, ont également optimisé l'interaction d'interaction sur les oligonucléotides suivants :



La meilleure interaction est trouvée pour (B') (la succession des bases A-T étant alternée) avec le groupement pipérazine dans sa position haute et $\alpha = 60^\circ$. L'orientation dite pipérazine-3' sur ce même site ne diminue l'énergie d'interaction que de 2 %. Si l'on passe au site non alterné (A'), on perd 4 % dans la stabilisation du complexe. En revanche, la formation du complexe de H258 avec (C') est défavorisée de 30 % par rapport aux deux autres. L'énergie de liaison montre que le colorant est tout de même accepté par cette séquence, ce qui indique que son affinité pour les bases G-C n'est pas nulle.

Résonance magnétique nucléaire du ¹H

En l'absence de ligand, la symétrie C_{2v} de l'hélice d'ADN rend les deux brins magnétiquement équivalents. Si cette symétrie est perturbée par l'arrivée d'un ligand, les résonances des atomes d'hydrogène de l'ADN vont être dédoublées, et dans la zone précise d'interaction certains protons subiront un effet de blindage ou de déblindage en fonction de leur position dans le site.

Les atomes d'hydrogène non labiles des résidus A et T d'un site ...AATT... (C^{1'}-H de T, par exemple) seront plus blindés (déplacement des signaux vers les basses fréquences) dans la structure du complexe, car ils se trouvent dans un plan perpendiculaire à celui qui contient les cycles aromatiques du colorant. Dans les mêmes conditions, les protons labiles (amino, par exemple) et les protons C²-H des adénines seront plus déblindés car ils sont dans un plan parallèle à celui du colorant. D'autre part, on peut remarquer que les protons de l'ADN situés près du groupement phénol subiront le même effet d'anisotropie diamagnétique en raison de l'aromaticité de ce cycle. Au contraire, le cycle pipérazine ne produira pas ce genre de déplacement des pics de résonance.

Les protons pour lesquels on observe les plus grandes variations de déplacement chimique sont les C^{1'}-H qui pointent vers l'intérieur du petit sillon. Les signaux correspondant à ces protons sont déplacés de +1 ppm dans la région d'interaction ...AATT... Les protons C^{2'}-H et C^{2''}-H voient également leur résonance se déplacer de +0,5 ppm dans cette zone [23]. Il faut noter que les protons C⁶-H (thymine) et C⁸-H (adénine) des bases sont également affectés par l'arrivée du ligand bien qu'ils pointent dans le grand sillon. Ce phénomène reflète simplement des changements conformationnels

locaux qui influencent l'environnement des protons du grand sillon [24].

Donc, par comparaison des déplacements chimiques des protons du duplex libre et ceux du complexe H258-ADN, on retrouve une interaction dans le petit sillon au niveau de la zone centrale ...AATT... [23]. L'intégrité du duplex est vérifiée, d'une part, par la valeur classique des déplacements chimiques des protons imino et amino impliqués dans les associations en paires de bases de type Watson-Crick, et d'autre part, par l'existence, entre ces mêmes protons, d'effets Overhauser (NOE; fig 8). Des effets NOE intermoléculaires seront également observés entre certains protons du colorant et des protons du petit sillon de l'ADN, par exemple respectivement entre N^{3'}-H, N³-H et CH₃ de H258, et C²-H de A_{6'}, A₆ et A₅ (dans l'exemple de la séquence ci-après) [23, 24]. Le groupement phénol n'induit aucun NOE intermoléculaire [25]. D'après cette étude, il semble que le colorant adopte une seule orientation dans le complexe 1:1 H258-d(CGCGAATTTCGCG)₂, mais que le groupement phénol possède un certain degré de liberté.

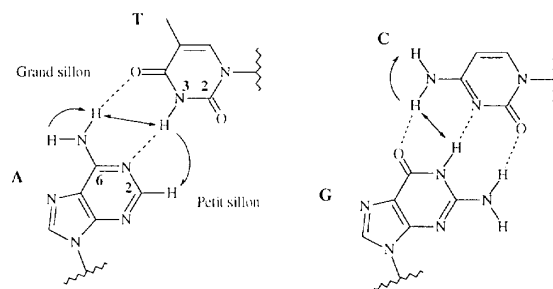


Fig 8. Relations spatiales entre les protons amino et imino des paires de bases A-T et G-C.

Ce résultat est similaire à celui obtenu dans une étude précédente [26] sur le complexe 2:1 avec l'oligonucléotide d(CTTTTGCAAAAG)₂, pour lequel la durée de résidence de H258 dans son site est estimée supérieure à 100 ms. Dans ce cas, H258 couvre les deux sites ...AAAA... avec les groupements pipérazine pointant vers le centre du duplex (ie, un ligand en position pipérazine-5' et l'autre en position pipérazine-3') mais ne recouvre pas les paires de bases G-C centrales. Les deux orientations du colorant sont donc observées, mais chacune sur un site différent. Fede et al [24] observent deux sites d'interaction équivalents sur le duplex d(GTGGAAATTCAC)₂. À 298 K, la constante de vitesse de l'échange (k_{ex}) entre les deux sites est de $2,2 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$, ce qui correspond à une durée de vie du complexe de $450 \pm 50 \text{ ms}$. À partir de la valeur de k_{ex} , les auteurs en déduisent que l'énergie libre d'activation (ΔG^*) est de l'ordre de 17 kcal/mol. Notons enfin que le degré de liberté du phénol est à nouveau observé, même à basse température.

Sur le décanucléotide d(GGTAATTACC)₂ il existe, compte tenu des données de la littérature, cinq sites potentiels pour l'interaction avec H258 : ggtAATTacc, ggTAATtacc, gGTAAttacc, ggtaATTacc et ggtaaTTacc. Dans ce cas, le dosage par RMN du proton pour des rapports colorant/ADN variant de 0:1 à 1:1 montre que la dissociation est suffisamment lente par

rapport à l'échelle de temps de la RMN, pour observer l'entité colorant-ADN. Il apparaît que H258 se lie avec une haute affinité sur le seul site ...AATT... [27].

Tous ces travaux de RMN arrivent aux mêmes conclusions que celles que nous avons décrites dans les paragraphes précédents, à savoir que H258 interagit préférentiellement dans le petit sillon au niveau d'un quadruplet de bases A-T.

Spectroscopies d'absorption et d'émission électroniques

Sous ce titre général, nous regrouperons les spectroscopies d'absorption UV-vis et de fluorescence, ainsi que les données de dichroïsme circulaire et linéaire.

Le spectre d'absorption de H258 présente deux maxima, l'un à 338 nm ($\varepsilon = 40\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), et l'autre à 260 nm ($\varepsilon = 7\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Dans un milieu tamponné à pH 7,0 et en l'absence de sels (NaCl ou KCl), l'addition progressive d'ADN (contenant environ 50 % de paires de bases A-T) entraîne, dans un premier temps, une diminution d'intensité et un déplacement vers 345 nm de la bande à 338 nm. Si le rapport entre la concentration en phosphate de l'ADN et la concentration de H258 (noté r) augmente encore, ie, si l'on arrive à une situation où l'ADN est en gros excès par rapport à H258, le maximum d'absorption est déplacé à 356 nm (fig 9), et l'intensité de la bande augmente sans toutefois revenir au niveau initial [28].

Lorsque le rapport r est faible, l'addition de NaCl ou de KCl dans la gamme de concentration 0,1–0,9 M entraîne une diminution de l'effet hypochrome à 338 nm et un retour progressif du maximum d'absorption vers cette longueur d'onde. Une augmentation de la force ionique permet ainsi au colorant de se libérer de l'ADN.

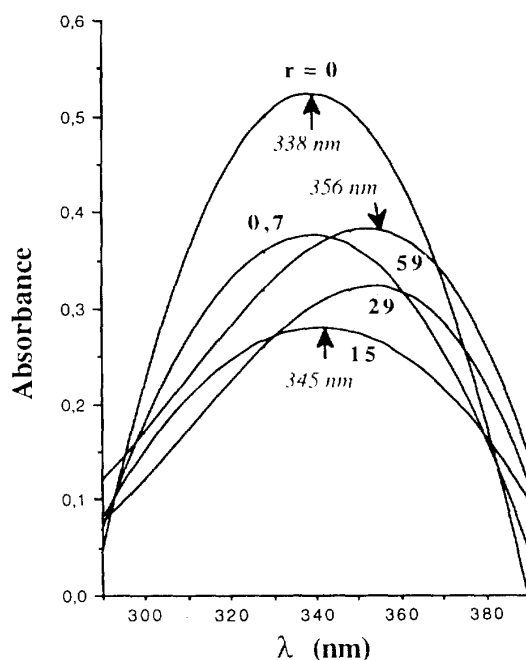


Fig 9. Spectres d'absorption du complexe H258-ADN pour différentes valeurs du rapport r [28].

Ces premiers travaux tendent à prouver l'existence de deux phénomènes d'interaction qui diffèrent selon les concentrations respectives en ADN et en colorant, et qui dépendent de la force ionique du milieu.

On peut également utiliser la spectroscopie UV-vis pour analyser la bande d'absorption de l'ADN située vers 260 nm. L'absorbance d'un ADN double brin varie en fonction de la température : si on chauffe le duplex jusqu'à arriver à sa température de dénaturation (appelée aussi température de fusion, T_m), on observe alors une variation brusque de l'absorbance. Si la structure double brin de l'ADN est stabilisée par interaction avec un ligand, sa température de fusion T_m augmente. C'est effectivement ce que l'on observe avec H258 [29]. Avec du poly(dA-dT), le gain de stabilité thermique peut atteindre 40 °C, alors qu'avec du poly (dG-dC) la meilleure stabilisation est de 12 °C.

Si un troisième brin d'acide nucléique vient s'hybrider sur le duplex d'ADN, on obtient une structure en « triple hélice » (par formation de liaisons hydrogène de type « Hoogsteen », H258 peut aussi se lier à ce genre de structure. Dans le cas d'une structure faisant intervenir des triplets T-AT, la stabilité thermique de la triple hélice est réduite en présence de H258 comme cela est indiqué sur la figure 10 [30].

Les résultats obtenus en remplaçant l'ADN par du poly(rA-rU), un ARN synthétique, sont analogues à ceux que nous venons de voir : la présence de H258 stabilise le duplex (T_m augmente de 17 °C environ) ; les variations observées sur le spectre d'absorption de H258 sont fonction du rapport r ; en présence de KCl, que le rapport r soit élevé ou non, on retrouve les caractéristiques d'absorption et de fluorescence du colorant non complexé et ainsi, l'hypothèse d'un effet dissociant dû à la force ionique peut être évoquée. Toutefois la nature

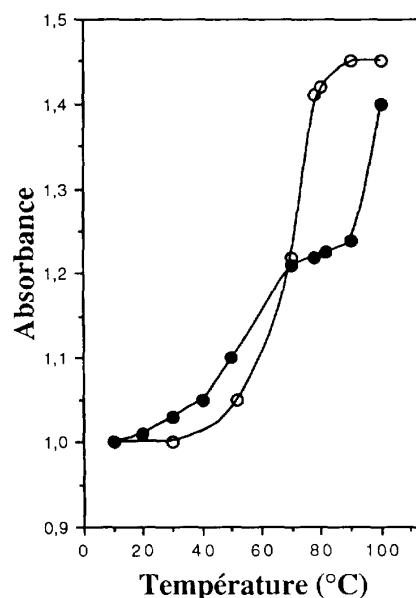


Fig 10. Température de fusion de la structure en triple hélice (dA)₁₂-X-(dT)₁₂-X-(dT)₁₂, en l'absence de H258 (ooo) et en présence de H258 (•••) [30].

même de l'interaction de H258 avec l'ARN diffère de celle avec l'ADN : il semblerait que le colorant s'empile dans le grand sillon de l'ARN [31].

Les propriétés de fluorescence de H258 ont probablement été les plus étudiées. Comings a montré que le spectre de fluorescence de H258 présente des maxima d'excitation et d'émission aux longueurs d'onde respectives de 370 et 500 nm [29]. Lors de la formation du complexe H258-poly (dA·dT) en présence d'un fort excès d'ADN et en l'absence de sel dans le milieu, l'intensité de ces bandes est multipliée par un facteur 20 et leur maximum est respectivement déplacé vers 360 et 460 nm. Ces variations sont fortement dépendantes du taux de paires de bases A-T contenues dans l'ADN (fig 11).

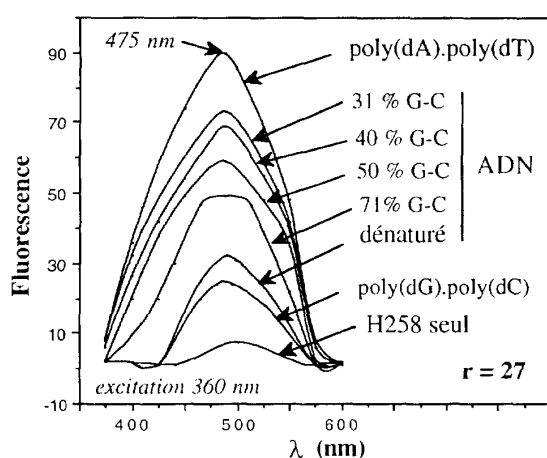


Fig 11. Spectres d'émission de fluorescence de H258 en présence de différents types d'ADN [29].

Si l'ADN est en défaut par rapport à H258, l'émission de fluorescence n'aura pas lieu. En revanche, en présence d'un large excès d'ADN, l'exaltation de fluorescence s'accroît et atteint un plateau, pour 50 équivalents d'ADN par molécule de H258 (fig 12).

Ce type d'expérience mené avec de la chromatine et des nucléosomes [32] a montré également une augmentation de la fluorescence (fonction de la force ionique du milieu), en présence d'un excès de matériel génétique. Alors que dans le cas de l'ADN nu excédentaire, la fluorescence varie peu avec la concentration saline, elle augmente pour la chromatine et le nucléosome.

Une première distinction entre un mode d'interaction fort et spécifique et un mode faible et non spécifique, dépendant du rapport ADN/colorant et réagissant différemment à la présence de sel dans le milieu, est décrite par Stokke et Steen [33]. En effet, quand le rapport r est grand (c'est-à-dire pour un excès d'ADN), on obtient un haut rendement quantique de fluorescence avec émission à 460 nm (fluorescence bleue). C'est le premier mode d'interaction (*mode 1* ou *mode spécifique*). Quand r est faible, c'est-à-dire lorsqu'on est en présence d'un faible excès d'ADN ou d'un excès de colorant, l'interaction non spécifique est prédominante. Le complexe H258-ADN présente une faible fluorescence verte avec

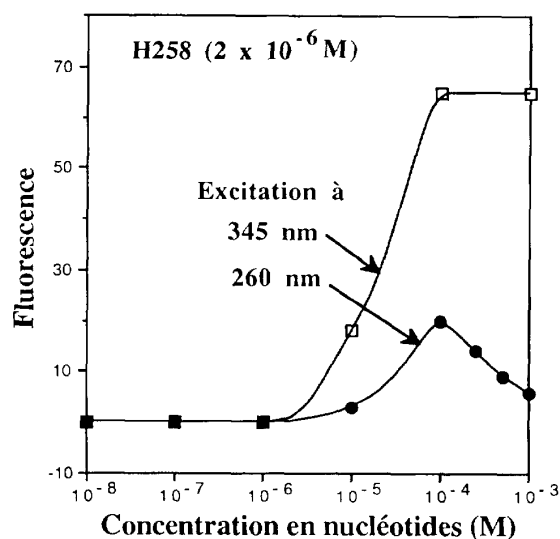


Fig 12. Effet de la concentration d'ADN de thymus de veau sur l'émission de fluorescence de H258 [29].

un maximum d'émission aux alentours de 480 nm. D'autre part, la fluorescence bleue des molécules déjà liées par le mode 1 est éteinte. Nous avons là le second mode d'interaction (*mode 2* ou *mode non spécifique*).

Afin de mieux comprendre les paramètres qui gouvernent ces deux comportements différents du colorant en solution, et déterminer la constante d'affinité de H258 pour différentes séquences de nucléotides, de multiples expériences de spectroscopie ont été menées par Jorgenson et al [34] et Loontjens et al [35]. Il faut tout d'abord noter la forte tendance à l'auto-aggrégation à pH neutre de H258 libre [35] : le coefficient d'extinction molaire à 338 nm diminue pour les concentrations supérieures à 30 μ M (alors qu'une nouvelle bande apparaît dans la zone 370-400 nm). Ces variations d'absorption disparaissent à pH acide ou en présence de 25 % d'éthanol. D'autre part, sur la base de différences dans les caractéristiques d'absorption et de fluorescence du complexe ADN-H258 en stœchiométrie variable, une nouvelle terminologie de l'interaction est proposée [35] où la classification « spécifique-non spécifique » est affinée par référence au mode d'interaction. Le tableau IV détaille les stœchiométries et ces modes d'interaction ; la figure 13 représente de manière schématique les différentes possibilités. On distingue ainsi les cas suivants :

(a) *Interaction spécifique de séquence*. L'interaction a lieu dans le petit sillon et nécessite un quadruplet (A-T)₄. Le complexe formé est très fluorescent (ex pour $\chi_{th} = 0,167$, fig 13).

(b) *Interaction de nature électrostatique (non spécifique)*. Il y a ici intervention d'interactions électrostatiques primaires entre la molécule H258 (monocationique à pH 7,0) et la chaîne des phosphates de l'ADN chargée négativement.

(c) *Interaction colorant/colorant (non spécifique)*. Une molécule de H258 est capable d'interagir avec une (ou plusieurs) molécule(s) de colorant déjà installée(s) sur son site, via le mode (a) ou le mode (b). Rappelons que

Tableau IV. Stœchiométries des complexes H258-poly(dA·dT) et données de spectroscopie de fluorescence et d'absorption UV-visible : classification des différents modes d'interaction.

Colorant/paires de bases			Domaine d'absorption (nm)	Mode d'interaction	Fluorescence
(1/r)	χ_{th}	χ_{obs}			
1/5	0,167	0,17	390–410	(a)	Intense Extinction partielle
2/5	0,285	0,30	350–360	(c) et (d)	
3/5	0,375	0,38	345–330	(c) et (d)	
4/5	0,444	0,45	375–395	(c) et (d)	Extinction forte
6/5	0,545	0,55	375–390	(c) et (d)	
10/5	0,667	0,67	375–420	(b)	
20/5	0,800	0,80	375–420	(c)	

Les valeurs χ_{th} et χ_{obs} sont les fractions molaires théoriques et observées de H258 au sein des différents complexes. χ_{obs} provient des études de spectroscopies d'absorption UV-visible [35].

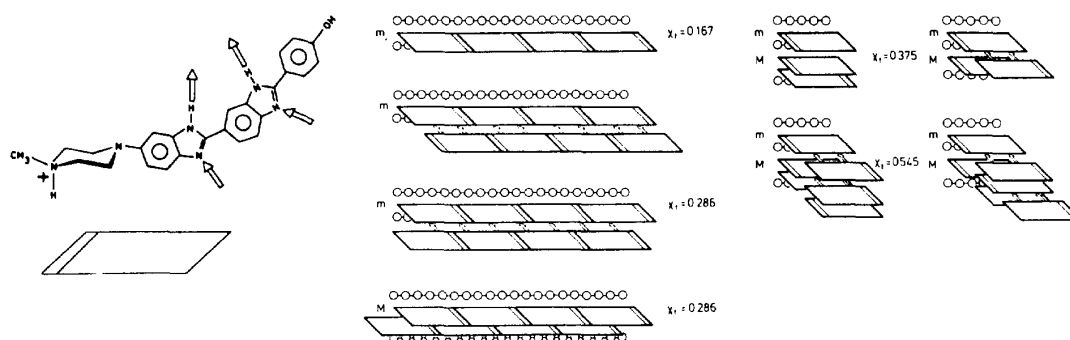


Fig 13. Schématisation des modes d'interactions possibles entre H258 et ADN, compte tenu des informations données dans le tableau IV (-o-o-o- représente la chaîne des phosphates; H258 est représenté par un rectangle; les flèches partant des groupements NH de H258 indiquent les liaisons hydrogène sur l'atome O² de la thymine et l'atome N³ de l'adénine; les flèches qui arrivent sur les atomes d'azote de H258, indiquent la possibilité de formation de liaisons hydrogène avec une seconde molécule de colorant; m : petit sillon; M : grand sillon) (d'après référence [34]; reproduit avec permission de l'éditeur).

lorsqu'il est en interaction avec l'ADN, H258 laisse les deux azotes N¹ et N^{1'} des benzimidazoles disponibles pour donner des liaisons hydrogène avec les NH (N³ et N^{3'}) d'une autre molécule de H258 (interaction bord à bord). D'autre part, on ne peut pas négliger, comme autre possibilité d'interaction, l'auto-aggrégation des molécules de H258 (empilement), avec une orientation probable tête-bêche susceptible de minimiser les répulsions électrostatiques entre pipérazines (ex de deux arrangements possibles pour $\chi_{th} = 0,286$, au centre de la fig 13).

(d) *Interaction de spécificité incertaine.* La région de localisation de H258 est influencée par des contraintes purement géométriques, comme la largeur du sillon. Ce phénomène expliquerait la tolérance pour les paires de bases G-C observée dans les structures radiocristallographiques (ex pour $\chi_{th} = 0,286$, en bas de la fig 13 : les dimères du colorant s'empilent comme des tuiles dans le grand sillon; possible avec le poly(dA·dT), ce type d'arrangement concernerait plus probablement le poly(dG·dC)).

La partie droite de la figure 13 représente des arrangements possibles pour expliquer, pour les rapports élevés colorant/paire de bases, l'extinction de fluorescence partielle (pour $\chi_{th} = 0,375$) ou quasi totale (pour $\chi_{th} = 0,545$) observée dans ces conditions.

Il faut souligner l'interaction non nulle de H258 avec le poly (dG·dC). Le mode (d) peut être considéré comme le principal responsable de cette tolérance car la seule stœchiométrie observée est de une à deux molécules de H258 pour cinq paires de bases G-C.

Les constantes d'affinité de H258 ont été déterminées à 25 °C avec des concentrations en ADN exprimées en paires de bases et pour une concentration en NaCl de 100 mM : $K_A = 7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (ADN de thymus de veau), $3,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (poly(dA·dT)), $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (d(CGCGAATTCGCG)₂), $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (d(CCGGAATTCGG)₂).

La stabilité du complexe a été également étudiée par fluorescence en présence de polyamines [36]. Aux faibles concentrations de NaCl, un très large excès de spermidine ne peut déplacer que 35 % du H258 lié sur de l'ADN de thymus de veau. Ce phénomène est amplifié aux fortes concentrations salines. D'autre part, ce déplacement varie aussi avec le rapport r (phosphate/colorant). Pour $r = 200$, où l'interaction H258-ADN est la plus forte et la plus spécifique, la spermidine déplace seulement 3 % du colorant, alors que pour $r = 20$ on obtient jusqu'à 35 % de déplacement. Il apparaît donc que les polyamines peuvent, tout comme NaCl, réduire l'interaction non spécifique mais n'ont que peu d'influence sur le mode d'interaction spécifique.

La spécificité de l'interaction a été également étudiée à partir de travaux conduits sur des polymères de synthèse contenant des bases modifiées comme celles présentées dans la figure 14 [34] : (I) désigne l'inosine, (DAP) représente une base purique modifiée avec deux groupements amine en position 2 et 6, Br-C et I-U sont des bases halogénées en position 5.

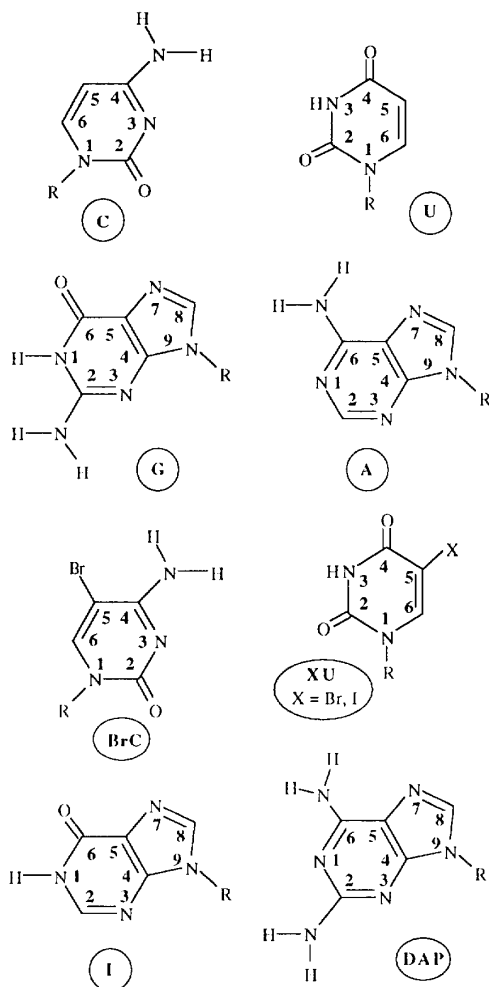


Fig 14. Structures de bases modifiées et de leurs précurseurs.

La fluorescence relative de H258 en fonction de la concentration d'ADN pour plusieurs types de séquences est représentée sur la figure 15. Les polymères en présence desquels H258 augmente peu sa fluorescence, sont ceux qui possèdent des groupements NH_2 dans le petit sillon et ceux qui portent des bases halogénées. En ce qui concerne ces derniers, pour lesquels l'halogène est situé dans le grand sillon, on peut imaginer que c'est le phénomène de fluorescence lui-même qui est affecté par la présence de l'halogène sans que cela ne gêne la liaison de H258 dans le petit sillon [34, 37]. Ce phénomène est à rapprocher de l'extinction de fluorescence observée lors de l'interaction de H258 avec des bases halogénées libres où la réaction photochimique conduit à une nouvelle

espèce, dont le rendement quantique de fluorescence est environ 14 fois inférieur à celui de H258, avec des caractéristiques d'absorption UV-vis différentes [37].

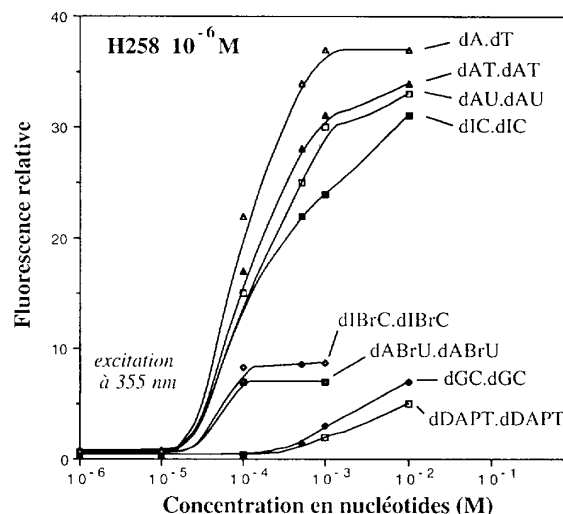


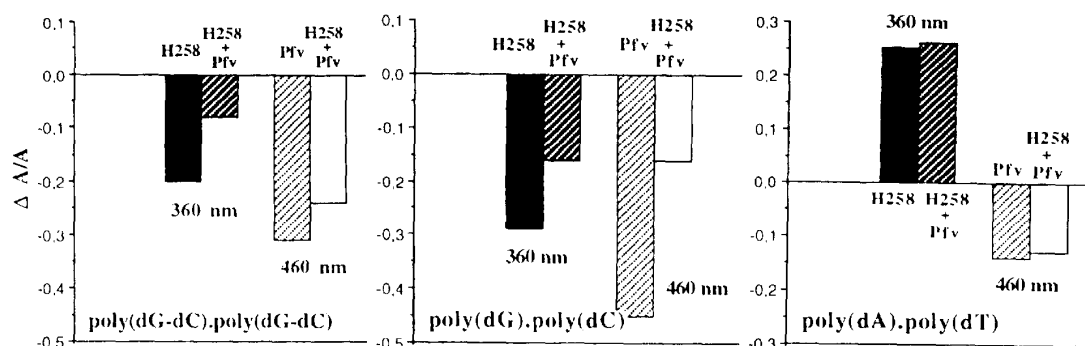
Fig 15. Fluorescence relative à 465 nm du complexe H258-ADN pour différentes séquences de bases [34].

Dans un travail voisin, Loontjens et al [38] ont mesuré la constante d'affinité de H258 pour le décimère d(CTGAATTCAG)_2 (de l'ordre de 10^9 M^{-1}), et neuf de ses dérivés pour lesquels les substituants exocycliques des six bases centrales ont été changés. Si l'une des adénines A4 ou A5 porte une fonction amine en position 2 (vers l'intérieur du petit sillon) et perd la fonction amine en position 6 (vers l'extérieur du petit sillon), la constante d'affinité est abaissée d'une à deux unités logarithmiques. Si l'on supprime uniquement le NH_2 de la position 6, ie, si l'on ne laisse qu'une seule possibilité de formation de liaison hydrogène avec la thymine du brin complémentaire, le complexe avec H258 existe mais n'est pas fluorescent. L'introduction d'une guanine alkylée en position 6 (O^6 -éthyl G ou e^6G) ne change pas le mode d'interaction de H258, qui se lie de façon « classique » par exemple sur le quadruplet central de l'oligonucléotide $\text{d(CGC[e}^6\text{G]AATTCGCG)}_2$, le groupement éthyle porté par la guanine pointant dans le grand sillon [39].

Le dichroïsme électrique linéaire (ELD) est également utilisé pour l'étude de l'interaction ADN-H258. Après quelques rappels théoriques, nous nous intéresserons aux informations que peut fournir cette technique. En présence d'un champ électrique, le dichroïsme linéaire, ΔA , est défini comme la différence d'absorbance de la lumière polarisée parallèlement au champ ($A_{//}$), et celle polarisée perpendiculairement au champ (A_{\perp}). Quand une solution d'ADN est exposée à un champ électrique, l'absorption de la lumière polarisée parallèlement au champ, à 260 nm, est inférieure à celle de la lumière polarisée perpendiculairement ($A_{//} < A_{\perp}$), ce qui induit un signal dichroïque négatif. On observera le même phénomène si l'ADN est en présence d'un intercalant. Par contre, si l'on recommence l'expérience avec un

Tableau V. Valeurs des rapports dichroïques (DR) pour des complexes H258-ADN [40].

ADN	DR	Polymère	DR
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> (72 % GC)	+0,90	Poly(dA·dT)·poly(dA·dT)	-0,74
		Poly(dG·dC)·poly(dG·dC)	+0,83
Foie de veau (42 % GC)	-0,56	Poly(dI·dC)·poly(dI·dC)	-0,55
		Poly(dA·dC)·poly(dG·dT)	+0,45
<i>Clostridium perfringens</i> (26 % GC)	-0,55	Poly(dA)·poly(dT)	-0,46
Coliphage T4 (50 % GC)	-0,69	Poly(dG)·poly(dC)	+0,67
		Poly(dI)·poly(dC)	-0,80

**Fig 16.** Interaction compétitive de H258 et de la proflavine avec l'ADN suivie par dichroïsme linéaire [40].

ligand lié dans le petit sillon, on aura $A_{//} > A_{\perp}$, c'est-à-dire un dichroïsme positif. On peut donc, grâce au signe et à l'amplitude du signal dichroïque, déterminer le mode de liaison d'un ligand sur l'ADN. Le dichroïsme réduit est le rapport de ΔA sur l'absorbance de l'échantillon, en l'absence de champ électrique (A). On peut alors raisonner sur le rapport dichroïque (DR) défini par :

$$DR = (\Delta A/A)^{cx \text{ ADN-colorant}} / (\Delta A/A)^{ADN}$$

$(\Delta A/A)^{cx \text{ ADN-colorant}}$ est mesuré au maximum de l'absorption du ligand, et $(\Delta A/A)^{ADN}$ est mesuré à 260 nm en l'absence de colorant.

De telles mesures ont été effectuées sur plusieurs ADN naturels et sur différents polymères nucléiques de synthèse [40]. Les résultats sont regroupés dans le tableau V.

Un DR positif signifie que le complexe ADN-colorant présente un signal ELD négatif, ie, que le colorant est plus ou moins perpendiculaire à la direction du champ électrique. Au contraire, un DR négatif implique un signal ELD positif pour le complexe et une direction parallèle. De plus, la valeur numérique de DR permet de retrouver la valeur de l'angle β entre le moment de transition du colorant et l'axe de l'hélice d'ADN ([40] et références citées). Par exemple, si $DR < 0$, on aura un angle $\beta < 55^\circ$ et une localisation dans le petit sillon. Ce qui correspond effectivement aux données cristallographiques [15, 17]. Une autre façon de vérifier que l'interaction a bien lieu dans le petit sillon, consiste à mesurer le DR de l'ADN de coliphage T4 dans lequel l'accès au grand sillon est bloqué par des résidus glycosylés. Comme cela est indiqué dans le tableau V, le DR

est effectivement négatif (-0,69). Concernant les polymères riches en paires de bases G-C, si la guanine est remplacée par une inosine, on retrouve des caractéristiques identiques à celles du poly(dA·dT), ie, un DR négatif. En revanche, on observe un signal dichroïque avec des DR positifs pour les poly(dG·dC) et pour les ADN natifs comptant 72 % de G-C, indiquant que l'interaction a bien lieu. Il faut alors envisager un mode d'interaction par le grand sillon, par intercalation, ou le long de la chaîne négative des phosphates (mode (b) dans la classification proposée par Loontjens et al, 1990, tableau IV). Pour vérifier l'une ou l'autre de ces hypothèses, Bailly et al ont mis H258 en compétition avec un agent intercalant, la proflavine. Des interférences apparaissent rapidement entre H258 et la proflavine lors de l'interaction avec des séquences poly(dG·dC), ce qui n'est pas le cas lors de l'interaction avec des séquences poly(dA·dT) (fig 16).

Le signal dichroïque du complexe proflavine-ADN, détecté à 460 nm, perd 60 % de son intensité en présence de H258. Cela peut signifier, soit que H258 déplace la proflavine de son site (et vient donc s'intercaler), soit que H258 détruit le parallélisme entre les paires de bases G-C et la proflavine. Ce problème n'est pas encore résolu [40]. Une autre étude [41] fait intervenir le dichroïsme linéaire pour montrer que H258 est capable de former un complexe avec une forme condensée de l'ADN (PSI(+)) conduisant à relaxer l'organisation suprahélicoïdale de l'ADN jusqu'à l'obtention d'une structure de type B.

Conclusion

Les différents moyens d'analyse cités ci-dessus ont permis d'établir définitivement que :

(i) H258 se lie de façon spécifique dans le petit sillon de l'ADN, à l'aide de liaisons hydrogène, et ceci sans modifier notablement la structure de l'hélice d'ADN.

(ii) La plus grande constante d'affinité est observée pour un quadruplet de paires de bases A-T (valeur moyenne $K_A = 10^8 \text{ M}^{-1}$). L'ordre des bases A et T au sein du quadruplet module l'intensité de l'affinité ($5' \text{AATT}3' > 5' \text{TAAT}3' > 5' \text{ATAT}3' > 5' \text{TATA}3' > 5' \text{TAA}3'$), ainsi que la nature des bases adjacentes à ce quadruplet.

(iii) Plusieurs orientations du colorant dans son site sont possibles et il existe des modes d'interactions secondaires gouvernés par des facteurs géométriques, électrostatiques ou d'aggrégation et très dépendants de la force ionique du milieu.

(iv) H258 admet une tolérance non négligeable pour les paires de bases G-C, probablement à cause des modes d'interactions secondaires.

Toute une série de modifications chimiques sur H258 ont alors été développées afin de conférer de nouvelles propriétés à H258. Ces analogues de H258 sont présentés ci-après.

Analogues de H258 et modifications de l'interaction avec l'ADN

Nous venons de voir que les groupements benzimidazoles sont très impliqués dans le mécanisme de reconnaissance spécifique de H258. Ce sont donc ces deux groupes qui ont fait l'objet des principales modifications. La position de l'hydroxyle porté par le phényle ainsi que le remplacement de la pipérazine par des amines ont également été étudiés.

Modification de la partie pipérazine

Quelques substituants utilisés sont regroupés dans la figure 17.

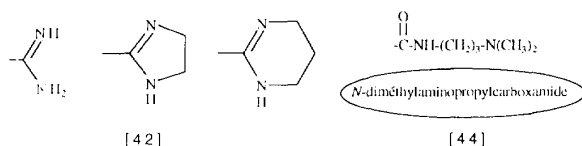


Fig 17. Groupements de substitution de la pipérazine.

Des mesures de température de fusion de poly(dA-dT) ou de l'oligomère $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ en présence de ces H258 modifiés, indiquent, comme dans le cas du composé parent, une excellente stabilisation de la forme double brin (augmentation respective des T_m de 30 et 24 °C) [42].

Une structure cristalline a été obtenue pour le produit portant un groupement imidazole à la place de la pipérazine [43]. Ce dernier, moins encombrant que la pipérazine, se loge plus facilement dans le petit sillon. Il cause très peu de perturbation sur la structure de l'ADN. D'autre part, bien qu'aucune liaison hydrogène nouvelle ne soit créée par ce groupement, le complexe est plus stable grâce à de meilleurs contacts de Van der Waals [42]. En revanche, aucune interaction avec l'ARN

n'a pu être détectée. La présence du *N*-[3-(diméthylamino)propyl]carboxamide sur H258 augmente la spécificité pour les bases A et T [44].

Modifications du noyau phénolique

Elles portent principalement sur la position du groupement hydroxyle. S'il est en position *meta* (*meta*-H258) plutôt qu'en position *para* (*para*-H258), la RMN du proton, les gels d'empreinte et les études de température de fusion montrent que l'interaction est similaire à celle du composé parent H258 [45]. Une représentation graphique de cet analogue dans son site sur $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ (fig 18) laisse supposer que de nouvelles liaisons hydrogène peuvent être formées entre l'hydroxyle en *meta* d'une part et le carbonyle de la cytosine C⁹ et l'amine de la guanine G^{4'} d'autre part. Ceci peut expliquer le gain de 2 à 3 °C dans les T_m du poly(dA-dT) et du poly(dG-dC) mesurés en présence de H258. Les gels d'empreinte mettent en évidence des sites de protection identiques à ceux de H258 (ie, un quadruplet de bases A-T). À l'aide des effets NOE intermoléculaires impliquant les protons aromatiques du cycle hydroxyphényle de *meta*-H258, Parkinson et al [46] ont montré que le groupement phénol n'est plus libre de tourner dans le petit sillon à l'échelle de temps de la RMN, comme c'était le cas pour H258, et que le groupement hydroxyle est tourné vers le fond du petit sillon créant ainsi une nouvelle possibilité de liaison hydrogène.

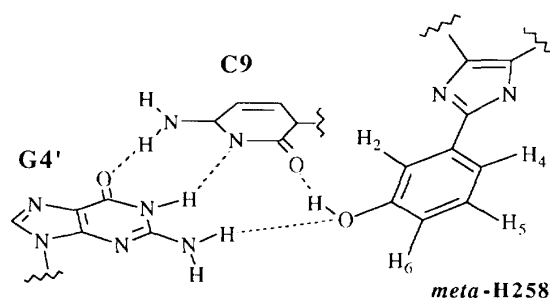


Fig 18. Interaction de l'analogue *meta*-H258 dans son site [45].

Leupin et al [47] ont mené des travaux de modélisation, d'empreinte et de détermination de constante d'affinité sur *meta*-H258 et sur l'analogue de H258 portant le groupement hydroxyle en *ortho* (*ortho*-H258) en interaction avec un fragment du plasmide pBR322 et avec le dodécamère $d(\text{GTGGAATTCAC})_2$. Dans l'étude sur le dodécamère, le dérivé *meta* semble pouvoir former deux liaisons hydrogène en agissant comme donneur avec l'atome d'oxygène O^{4'} du déoxyribose de la guanine, et comme accepteur avec le groupement NH₂ de la guanine appariée. Avec l'hydroxyle en *ortho*, une seule liaison hydrogène intermoléculaire est envisagée avec l'oxygène O² de T8. Des constantes d'affinité ont été déterminées par la méthode du déplacement du bromure d'éthidium. Le rendement quantique de fluorescence du bromure d'éthidium est diminué de 50 % (CI_{50}) pour des valeurs de concentration sensiblement plus élevées

Tableau VI. Concentration de H258 et des analogues de position de l'hydroxyle nécessaires pour réduire de 50 % (CI_{50}) ou de 100 % (CI_{100}) l'activité de la DNase I sur l'ADN de thymus de veau (CT-DNA), le poly(dA·dT) et différents sites [47].

Site	CI_{50} (μM)		CI_{100} (μM)					
	CT-DNA	poly(dA·dT)	GAATTC	GATATC	TTTAAA	GTCGAC	ATTAAT	TCGCGA
para-H258	14	6,3	70	700	70	300	70	300
meta-H258	37,3	14,5	70	70	7	300	30	300
ortho-H258	30,2	17,1	300	700	30	700	100	700

dans les cas de *ortho*-H258 et *meta*-H258 en comparaison avec *para*-H258 (tableau VI).

Le composé parent, *para*-H258, garde la meilleure affinité pour les séquences riches en A-T. Les expériences d'empreinte sur le plasmide pBR322, en utilisant différentes enzymes de restriction, révèlent à nouveau une préférence pour les bases A et T. Les valeurs trouvées sont regroupées dans le tableau VI et indiquent que le comportement des trois analogues est globalement le même [47]. Il faut noter que l'ordre des bases A et T au sein du site n'est négligeable dans aucun cas.

D'autre part, en vue d'utiliser H258 comme agent d'alkylation de l'ADN, d'autres modifications du phénol ont été décrites (fig 19) [48]. Pour cette famille, les tests ont montré que l'activité antitumorale et l'effet cytotoxique sont notablement améliorés par rapport au composé parent H258.

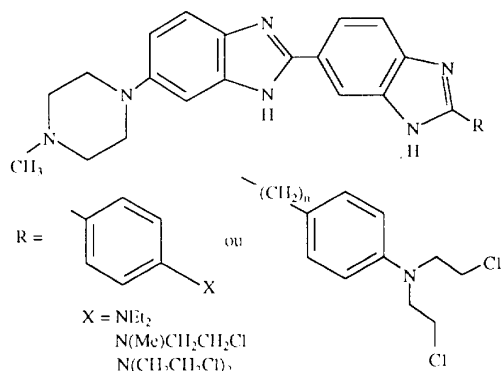


Fig 19. Modification du cycle phénolique de H258.

Enfin, la synthèse d'un produit comportant deux groupements pipérazines encadrant un motif bis-benzimidazole où les deux benzimidazoles sont séparés par un groupement phényle, est décrite dans la littérature [49] (fig 20). Les données obtenues grâce aux techniques usuelles (absorption UV-vis, dichroïsme, fluorescence, ...) indiquent que ce composé se comporte de façon très similaire à H258 mais avec une affinité moindre pour les séquences de bases A-T. Son comportement vis-à-vis des séquences de bases G-C est identique à celui de H258. Cela permet donc d'écarter l'hypothèse selon laquelle le motif pipérazine serait responsable de la reconnaissance des bases G-C, comme cela avait été évoqué par les cristallographes [14].

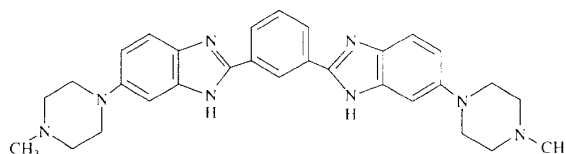


Fig 20. Remplacement du cycle phénolique de H258 et espacement des deux noyaux benzimidazoles.

Modification des cycles benzimidazoles

Tous les ligands présentent les mêmes caractéristiques UV-vis que le composé parent H258 lors de l'interaction avec l'ADN. Les différentes techniques d'analyse physicochimique permettent néanmoins de distinguer plusieurs modes d'interaction. Les atomes d'azote N^3 et $N^{3'}$ des deux benzimidazoles sont nécessaires à l'interaction. En effet, le composé **4** (fig 21) montre une affinité quasiment nulle pour du poly(dA·dT) [49]. D'autre part, lorsqu'on remplace uniquement l'atome $N^{3'}$ par un atome d'oxygène (composé **3**), la tolérance pour les bases G et C est annulée [49]. L'affinité pour du poly(dA·dT) devient à nouveau négligeable lorsque l'atome $N^{1'}$ est remplacé par un atome d'oxygène (composé **2**). La structure qui, tout en gardant une excellente affinité, tolère bien les paires G-C est le produit **8** où les atomes de carbone C^4 et $C^{4'}$ sont remplacés par des atomes d'azote [49].

L'interaction du composé **1** avec d(CATGGCCATG)₂ a été étudiée par RMN du proton. La possibilité de rotation autour de la liaison entre les deux benzimidazoles est à la base de l'existence de deux formes différentes d'association. De plus, des liaisons hydrogène permettent de localiser le colorant sur le site 5'...CCAT... [50]. Pour le produit **6** le complexe avec l'ADN se fait toujours par l'intermédiaire du petit sillon, mais avec une constante d'affinité inférieure de deux unités logarithmiques par rapport à celle de H258. En revanche, l'affinité pour les bases G-C est améliorée [51]. De même, par des études d'empreinte, Bathini et al [5] ont montré que l'analogue **5** permet d'augmenter l'affinité pour des sites tels que 5' ACCCTG, 5' GATGC, 5' AAATCT ou encore 5' ACAAT. Il semblerait, d'autre part, que le composé **1** ait besoin d'une paire de bases G-C dans son site d'interaction.

Les autres nouveaux ligands offrent peu de changements dans l'interaction. L'affinité de ces analogues pour l'ADN ou des polymères de synthèse a pu être comparée grâce à la détermination des CI_{50} de dépla-

ement du bromure d'éthidium et des valeurs de T_m (tableau VII).

Le complexe résultant de l'interaction de **5** avec le polymère d(GATGGCCATG)₂ a un temps de vie suffisamment long pour être étudié par RMN du proton [6]. Pour un complexe 1:1, le site d'interaction est 5'...CCAT..., ce qui traduit une reconnaissance partielle des bases G-C.

La famille de composés alkylés **9** a été étudiée par les techniques de déplacement du bromure d'éthidium et de gel d'empreinte [52]. Les chaînes carbonées sont dirigées soit vers l'intérieur, soit vers l'extérieur du petit sillon. Les Cl_{50} (μM) observés sur du poly(dA-dT), poly(dG-dC) et CT-DNA sont indiqués dans le tableau VIII.

Ces valeurs montrent à nouveau que l'affinité de ces analogues est globalement équivalente à celle de

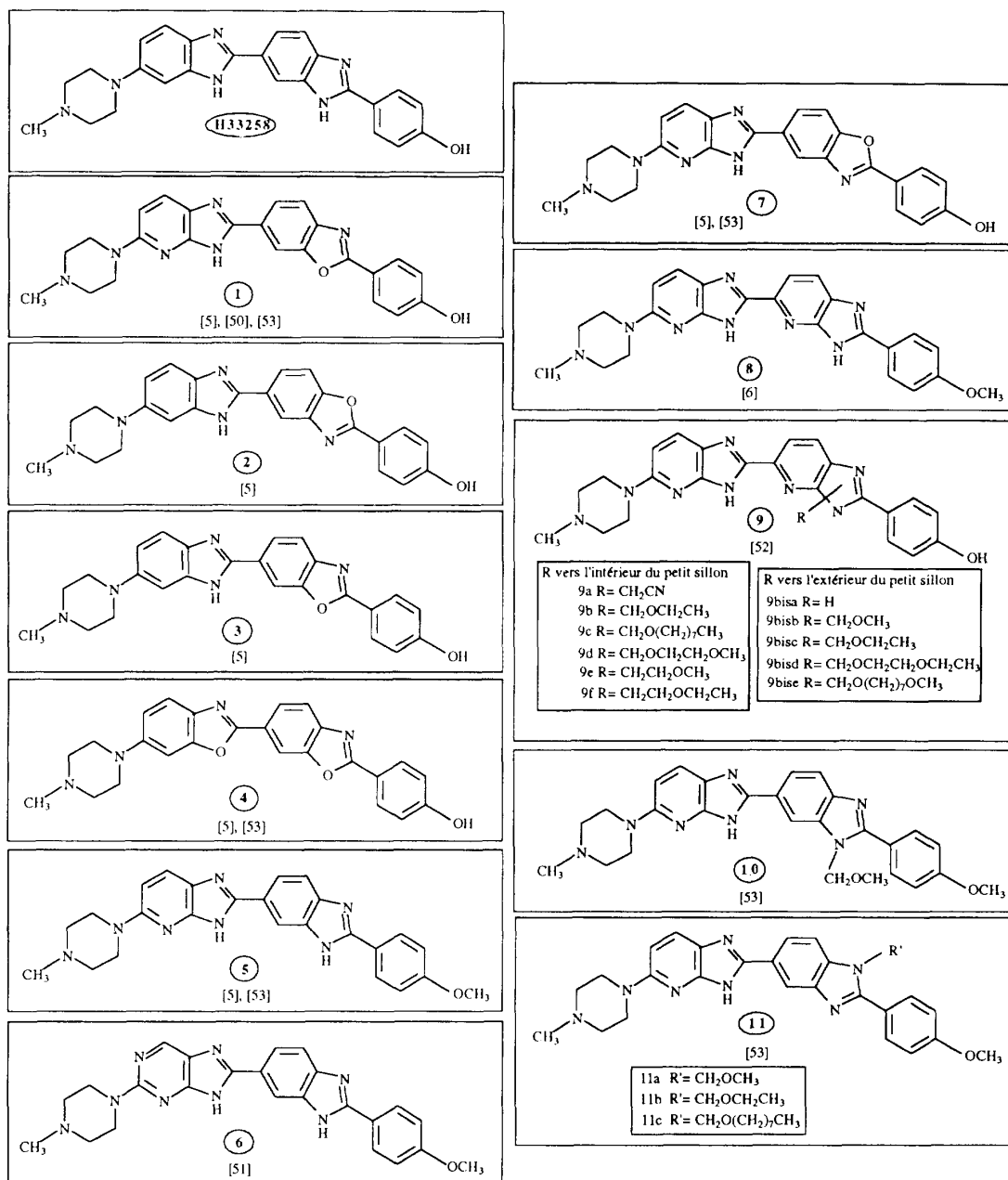


Fig 21. Analogues de H258 modifiés sur les groupements benzimidazoles.

Tableau VII. Valeurs des CI_{50} de déplacement du bromure d'éthidium sur du poly(dA-dT) et stabilisation de différents duplex (mesure des ΔT_m par H258 et ses analogues [5].

	H258	Produit					
		1	2	3	4	5	6
CI_{50} (μM)							
Poly(dA-dT)	0,75	2,00	5,00	1,80	8,90	1,20	4,00
ΔT_m ($^{\circ}C$)							
Poly(dA-dT)	34	12	5	11	3	15,5	10
CT-DNA	19	10	3	8	0	14	7
Poly(dG-dC)	3,5	3	2	3	0	4	2,5
T4DNA	22	8	3	6	2	7	6,5

Tableau VIII. Valeurs des CI_{50} (μM) de déplacement du bromure d'éthidium pour la famille des composés **9** et **9bis**.

Ligands	CI_{50} (μM)		
	poly(dA.dT)	CT-DNA	poly(dG.dC)
H258	0,66	4,00	3,63
9a ^a	—	—	—
9b	0,62	1,93	3,37
9c	0,45	2,24	2,45
9d	0,86	3,73	4,74
9e	14,2	54,2	69,3
9f	6,65	42,1	50,9
9bisa	1,17	2,94	3,80
9bisb	0,78	2,58	2,45
9bisc	1,03	2,18	8,30
9bisd	1,48	12,6	9,10
9bise	0,91	2,29	5,55

^a Le composé **9a** ne déplace pas le bromure d'éthidium [52].

H258, quelle que soit la direction de la chaîne et la séquence d'ADN utilisée. Ce résultat suggère donc des interactions spécifiques additionnelles ou des réactions chimiques avec le sillon qui pourraient compenser l'augmentation de l'encombrement stérique. Les gels d'empreinte montrent tout de même que la série **9bis** (chaîne vers l'extérieur du petit sillon) possède une affinité supérieure pour les bases G-C. Les différences de comportement des analogues **2-4**, **8** et **10** ont été étudiées par dichroïsme électrique linéaire en fonction de la composition en bases du duplex [53]. Cette étude montre que le produit **8** est celui qui accepte le mieux les bases G-C et son mode d'interaction apparaît encore comme très dépendant de la séquence.

Au travers de tous ces travaux, le modèle de Mikhailov et al [8] est donc confirmé et affiné.

Activité biologique de H258

Lésions induites sur l'ADN en présence de H258

Le caractère photosensible des cellules ayant incorporé de la 5-bromodésoxyuridine (BudR) dans leur ADN est accru en présence de H258 [54]. Il est donc possible de produire un effet léthal sur la cellule par action combinée de H258, de BudR et d'une irradiation à 365 nm [55], cet effet paraissant résulter de l'induction

de coupures simple brin de l'ADN ainsi que de « cross-link » ADN-protéine [56].

H258, inhibiteur de topoisomérase

Les contraintes topologiques de l'ADN sont importantes pour le maintien de la fonctionnalité du matériel génétique. Des organismes unicellulaires aux cellules humaines, la topologie de l'ADN est gouvernée par une famille d'enzymes appelées topoisomérases. Ces enzymes sont nécessaires à la viabilité de tous les organismes. Elles modifient les conformations de l'ADN en induisant une étape de coupure simple brin (cas de la topoisomérase de type I) ou double brin (type II) suivie d'une étape de ligation à un nouveau brin (I) ou à un nouveau duplex (II) (fig 22).

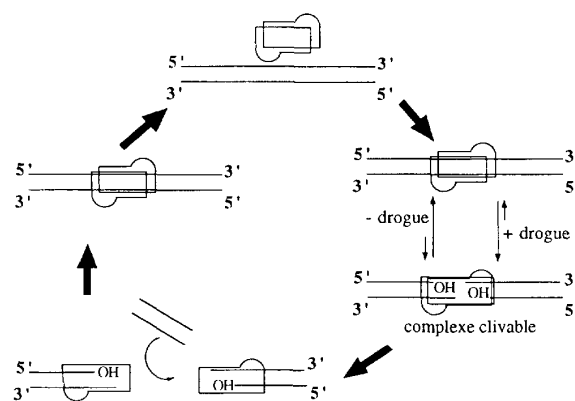


Fig 22. Représentation schématique du cycle catalytique d'une topoisomérase II.

Ce schéma illustre non seulement le cycle de la topoisomérase, mais permet aussi de commenter l'intervention de H258 comme agent antitumoral. Le colorant stabilise l'étape intermédiaire du cycle où la coupure est effective (complexe clivable), et où la protéine est encore liée de façon covalente au duplex. Le colorant se comporte comme un agent déclenchant la coupure et un inhibiteur de l'étape de religation. C'est probablement cette propriété qui est à la base de l'activité antitumorale de H258 [57].

Les modulations de l'activité catalytique des topoisomérases I et II par H258 ont été largement étudiées [58-62]. Il apparaît que H258 provoque une inhibition dose-dépendante de la relaxation du plasmide super-enroulé pBR322 produite par la topoisomérase II [58]. D'autre part, une étude menée sur les cellules entières et sur les noyaux, a montré que le nombre de lésions induites par des agents antitumoraux utilisant la topoisomérase II comme cible était diminué par H258 [59].

La topoisomérase I permet de passer de la forme super-enroulée du plasmide, à une forme relaxée circulaire (et non linéaire, comme c'était le cas avec la topoisomérase II). Dans ce cas, l'intervention de H258 entraîne une augmentation réversible des dommages causés par le complexe clivable. En effet, avec une étape supplémentaire de traitement par NaCl 0,5 M, les lésions disparaissent par rapport au témoin [61]. Le mécanisme mis en jeu ici n'est pas encore connu.

H258, interaction avec les protéines

D'une façon générale, il a été montré que H258 pouvait interagir avec les protéines [62, 63]. H258 est couramment utilisé en biologie moléculaire pour visualiser l'ADN dans un mélange contenant du matériel génétique. Les protéines et l'ARN ne sont pourtant pas complètement inertes vis-à-vis de H258. Nous avons déjà évoqué le cas de l'ARN dans les paragraphes précédents. En ce qui concerne les protéines, H258 peut interférer à deux niveaux [63] :

- (i) H258 peut se lier sur la protéine plutôt que sur l'ADN.
- (ii) H258 peut entrer en compétition avec la protéine dans son interaction avec l'ADN. Ainsi H258 possède un pouvoir inhibiteur sur la formation du complexe ADN/TBP (TBP, « TATA box binding protein », est une protéine nécessaire à l'initiation de la transcription d'un gène par la RNA polymérase II. Cette protéine possède une affinité particulière pour les bases A-T) [62].

Ces phénomènes ne sont tout de même observés que pour de fortes concentrations en protéines (100 $\mu\text{g/mL}$ de protéines de type BSA pour 0 à 10 $\mu\text{g/mL}$ d'ADN).

H258 et dégradation chimique de l'ADN

Récemment, l'équipe de Sigman s'est intéressée à la vectorisation par H258 du complexe 1,10-phénantroline-Cu(I) connu pour ses propriétés de coupure de l'ADN (fig 23) [64]. L'activité nucléase de ce nouveau conjugué montre qu'il interagit dans le petit sillon de l'ADN où les coupures peuvent être observées à partir d'une concentration en complexe de 10 nM [64].

Un dérivé 3,4,5-trihydroxylé de H258, capable de complexer l'ion cuivrique, permet l'accès à une nouvelle classe de nucléase chimique [65, 66].

Enfin, la vectorisation d'une métalloporphyrine cationique de manganèse III par H258 [67] conduit à une molécule (fig 24) présentant une haute affinité, voisine de celle de H258, pour les séquences d'ADN riche en paires de bases A-T. Ce composé hybride est capable

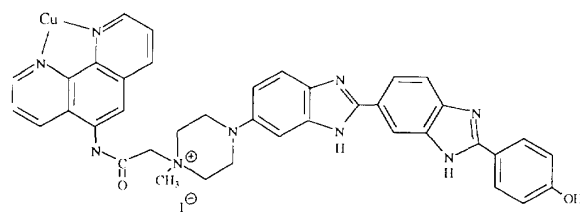


Fig 23. Molécule hybride 1,10-phénantroline-Cu(I)-H258 [64].

de dégrader sélectivement sa cible de part et d'autre du site d'interaction [68].

L'activité nucléase de cette molécule hybride est observable après activation de l'entité porphyrinique par un donneur d'atome d'oxygène (comme KHSO_5). Elle a été étudiée sur des oligonucléotides synthétiques contenant les sites de haute affinité AAATTT (H258) et TAT (métalloporphyrine). Des gels d'empreinte à la DNase I indiquent que la molécule hybride protège ces mêmes cibles d'ADN à partir d'une concentration de l'ordre de 100 nM. Ces expériences montrent également que, pour une concentration élevée en molécule hybride, la protection vis-à-vis de l'enzyme de digestion devient totale (et donc non spécifique). Par ailleurs, une étude par spectroscopie d'absorption UV-vis sur des polymères modèles d'ADN [68] confirme l'existence de plusieurs modes d'interaction (spécifique et non spécifique) de la molécule hybride.

Conclusion générale

Nous pouvons maintenant revenir au modèle de Mikhailov et al présenté au début de cet article. Les études ultérieures ont confirmé que H258 interagissait bien dans le petit sillon de l'ADN-B, au niveau d'un quadruplet de paires de bases adénine-thymine (A-T)₄, grâce à la formation de liaisons hydrogène. Mais ces liaisons hydrogène ne font intervenir que les atomes d'azote des groupements benzimidazole. Cette interaction peut

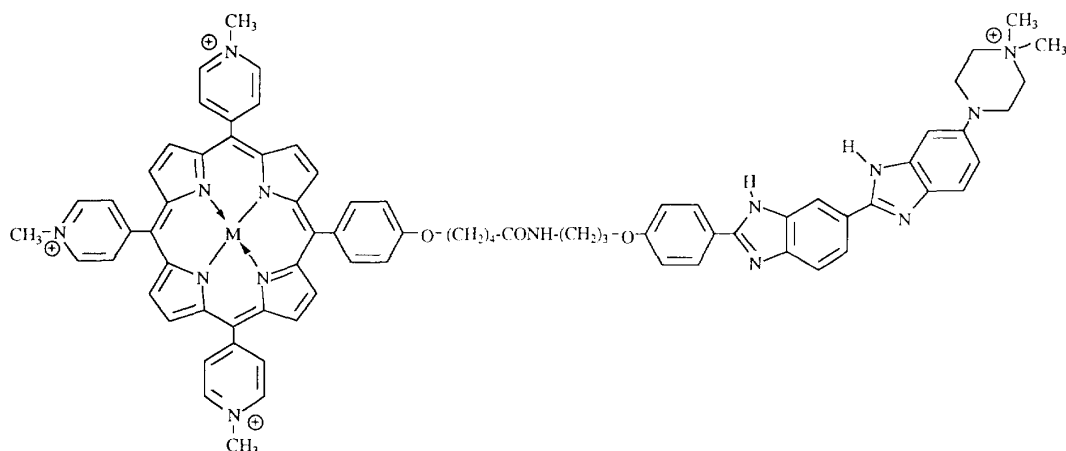


Fig 24. Molécule hybride « porphyrine cationique de Mn(III)-H258 » [67].

être visualisée par l'amplification de la fluorescence de H258, lorsque le complexe H258-ADN est formé.

Il faut également noter que la constante d'affinité de H258 pour son site spécifique peut varier d'un facteur 100 en fonction de l'arrangement des bases A et T au sein de la séquence et de la nature des bases adjacentes à ce site (valeur moyenne de $K_{\text{aff}} \approx 10^8 \text{ M}^{-1}$). Ce colorant tolère des paires de bases G-C dans le site d'interaction, son affinité pour ce type de séquence n'étant pas négligeable. Nous pouvons également remarquer que l'équilibre qui régit l'interaction est dépendant du rapport colorant/ADN ainsi que de la concentration en sel du milieu.

Enfin, à côté de ses propriétés de colorant chromosomique, H258 présente un intérêt en biologie moléculaire (puisque'il peut améliorer la sélectivité de coupures de nucléases chimiques par vectorisation), et probablement également dans la conception de nouvelles molécules à activité antitumorale.

Références

- Loewe VH, Urbanietz J, *Arzneimittel-Forschung* (1974) 24, 1927
- Herzog A, Schutze HR, *Deut Tierärztl Wschr* (1968) 75, 476
- Hilwig I, *Z Zellforsch* (1970) 104, 127
- Kelly DP, Bateman SA, Hook RJ, Martin RF, Reum ME, Rose M, Whittaker ARD, *Aust J Chem* (1994) 47, 1751
- Bathini Y, Rao KE, Shea RG, Lown JW, *Chem Res Toxicol* (1990) 3, 268
- Singh MP, Joseph T, Kumar S, Bathini Y, Lown JW, *Chem Res Toxicol* (1992) 5, 597
- Weisblum B, Haensler E, *Chromosoma* (1975) 46, 255
- Mikhailov MV, Zasedatelev AS, Krylov AS, Gurskii GV, *Mol Biol* (1981) 15, 541
- Pratviel G, Bernadou J, Meunier B, *Angew Chem Int Ed Engl* (1995) 34, 746
- Martin RF, Holmes N, *Nature* (1983) 302, 452
- Harshman KD, Dervan PB, *Nucleic Acids Res* (1985) 13, 4825
- Portugal J, Waring MJ, *Biochim Biophys Acta* (1988) 949, 158
- Abu-Daya A, Brown PM, Fox KR, *Nucleic Acids Res* (1995) 23, 3385
- Pjura PE, Grzeskowiak K, Dickerson RE, *J Mol Biol* (1987) 197, 257
- Teng MK, Usman N, Frederick CA, Wang AHJ, *Nucleic Acids Res* (1988) 16, 2671
- Quintana JR, Lipanov AA, Dickerson RE, *Biochemistry* (1991) 30, 10294
- Carrondo MAAFdeCT, Coll M, Aymami J, Wang AHJ, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A, *Biochemistry* (1989) 28, 7849
- Spink N, Brown DG, Skelly JV, Neidle S, *Nucleic Acids Res* (1994) 22, 1607
- Gago F, Reynolds CA, Richards WG, *Mol Pharmacol* (1989) 35, 232
- Gopalakrishna K, Kalia A, Royyuru AK, Atreyi MM, Rao MVR, Kothekar V, *FEBS Lett* (1987) 215, 95
- Weiner PK, Langridge R, Blaney JM, Schaefer R, Kollman PA, *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) 79, 3754
- Sapse AM, Sapse D, Jain DC, Lown JW, *J Biomol Struct Dyn* (1995) 12, 857
- Parkinson JA, Barber J, Douglas KT, Rosamond J, Sharples D, *Biochemistry* (1990) 29, 10181
- Fede A, Labhardt A, Bannwarth W, Leupin W, *Biochemistry* (1991) 30, 11377
- Parkinson JA, Barber J, Buckingham BA, Douglas KT, Morris GA, *Magn Reson Chem* (1992) 30, 1064
- Searle MS, Embrey KJ, *Nucleic Acids Res* (1990) 18, 3753
- Embrey KJ, Searle MS, Craik DJ, *J Chem Soc, Chem Commun* (1991) 1770
- Steiner RF, Sternberg H, *Arch Biochem Biophys* (1979) 197, 580
- Comings DE, *Chromosoma* (1975) 52, 229
- Durand M, Thuong NT, Maurizot JC, *Biochimie* (1994) 76, 181
- Wilson WD, Ratmeyer L, Zhao M, Strekowski L, Boykin D, *Biochemistry* (1993) 32, 4098
- Araki T, Tohno Y, Takakusu A, Yamada MO, *Cell Mol Biol* (1985) 31, 407
- Stokke T, Steen HB, *J Histochem Cytochem* (1985) 33, 333
- Jorgenson KF, Varshney U, van de Sande JH, *J Biomol Struct Dyn* (1988) 5, 1005
- Loontjens FG, Regenfuss P, Zechel A, Dumortier L, Clegg RM, *Biochemistry* (1990) 29, 9029
- Snyder RD, *Nucleosides & Nucleotides* (1993) 12, 31
- Härd T, Fan P, Kearns DR, *Photochem Photobiol* (1990) 51, 77
- Loontjens FG, McLaughlin LW, Diekmann S, Clegg RM, *Biochemistry* (1991) 30, 182
- Sriram M, van der Marel GA, Roelen HLPF, van Boom JH, Wang AHJ, *EMBO J* (1992) 11, 225
- Bailly C, Colson P, Hénichart JP, Houssier C, *Nucleic Acids Res* (1993) 21, 3705
- Krishna KG, Kumar TKS, Pandit MW, *Biopolymers* (1993) 33, 1415
- Czarny A, Boykin DW, Wood AA, Nunn CM, Neidle S, Zhao M, Wilson WD, *J Am Chem Soc* (1995) 117, 4716
- Wood AA, Nunn CM, Czarny A, Boykin DW, Neidle S, *Nucleic Acids Res* (1995) 23, 3678
- Vinogradov AE, Rosanov JM, *Biotech Histochem* (1993) 68, 265
- Ebrahimi SE, Parkinson JA, Fox KR, McKie JH, Barber J, Douglas KT, *J Chem Soc, Chem Commun* (1992) 1398
- Parkinson JA, Ebrahimi SE, McKie JH, Douglas KT, *Biochemistry* (1994) 33, 8442
- Leupin W, Bur D, Dorn A, Ji YH, Labhardt A, Fede A, Billeter M, Wuthrich K, *Actual Chim Thér-21è série*, 153
- Gravatt GL, Baguley BC, Wilson WR, Denny WA, *J Med Chem* (1994) 37, 4338
- Rao KE, Lown JW, *Chem Res Toxicol* (1991) 4, 661
- Kumar S, Yadagiri B, Zimmermann J, Pon RT, Lown JW, *J Biomol Struct Dyn* (1990) 8, 331
- Lee M, Spotts PH, Eckert J, Walker C, Nobles JA, *Heterocycles* (1991) 32, 2093
- Wang H, Gupta R, Lown JW, *Anti-Cancer Drug Design* (1994) 9, 153
- Bailly C, Colson P, Houssier C, Wang H, Bathini Y, Lown JW, *J Biomol Struct Dyn* (1994) 12, 173
- Maryanski JL, Cerottini JC, Brunner KT, *J Immunol* (1980) 124, 839
- Grætzner R, Deering RA, *Photochem Photobiol* (1983) 37, 239
- Xi-Cang G, Morgan WF, Cleaver JE, *Photochem Photobiol* (1986) 44, 131

- 57 Capranico G, Zunino F, *Curent Pharm Design* (1995) 1, 1
- 58 Woynarowski JM, McHugh M, Sigmund RD, Beerman TA, *Mol Pharmacol* (1989) 35, 177
- 59 Woynarowski JM, Sigmund RD, Beerman TA, *Biochemistry* (1989) 28, 3850
- 60 Chen AY, Yu C, Gatto B, Liu LF, *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90, 8131
- 61 Chen AY, Yu C, Bodley A, Peng LF, Liu LF, *Cancer Res* (1993) 53, 1332
- 62 Chiang SY, Welch J, Rauscher III FJ, Beerman TA, *Biochemistry* (1994) 33, 7033
- 63 Moe D, Garvarsch C, Kirkeby S, *J Biochem Biophys Methods* (1994) 28, 263
- 64 Chen CB, Mazumber A, Constant JF, Sigman DS, *Bioconjugate Chem* (1993) 4, 69
- 65 Wilton A, Ebrahimi SE, Parkinson JA, Andrews J, Douglas KT, In : *DNA and RNA Cleavers and Chemotherapy of Cancer and Viral Diseases*, Meunier B, ed, Kluwer, Dordrecht, NATO ASI Series, 1996, Vol 479, pp 177-193
- 66 Parkinson J, Ebrahimi SE, Wilton A, McKie JH, Andrews J, Douglas KT, *Biochemistry* (1995) 34, 16240
- 67 Frau S, Bernadou J, Meunier B, Delaunay JC, Vercauteren J, *New J Chem* (1995) 19, 873
- 68 Frau S, Bernadou J, Meunier B, soumis pour publication