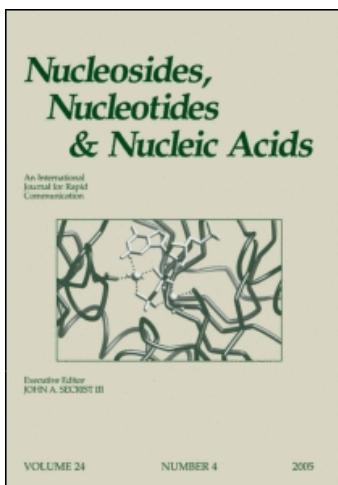


This article was downloaded by:  
On: 27 January 2011  
Access details: Access Details: Free Access  
Publisher Taylor & Francis  
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids

Publication details, including instructions for authors and subscription information:  
<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597286>

### Oligothymidylates Substitues Par Un Derive De L'Acridine en Position 5', A La Fois En Position 5' et 3' Ou Sur Un Phosphate Internucleotidique

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

<sup>a</sup> Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans Cedex, France

**To cite this Article** Asseline, U. and Thuong, N. T.(1988) 'Oligothymidylates Substitutes Par Un Derive De L'Acridine en Position 5', A La Fois En Position 5' et 3' Ou Sur Un Phosphate Internucleotidique', Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 7: 4, 431 — 455

**To link to this Article:** DOI: 10.1080/07328318808075389

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/07328318808075389>

## PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

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

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

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

OLIGOTHYMYDYLATES SUBSTITUES PAR UN DERIVE DE L'ACRIDINE  
EN POSITION 5', A LA FOIS EN POSITION 5' et 3'  
OU SUR UN PHOSPHATE INTERNUCLEOTIDIQUE

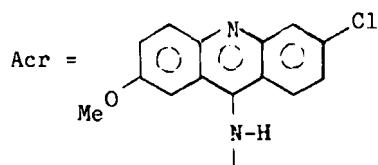
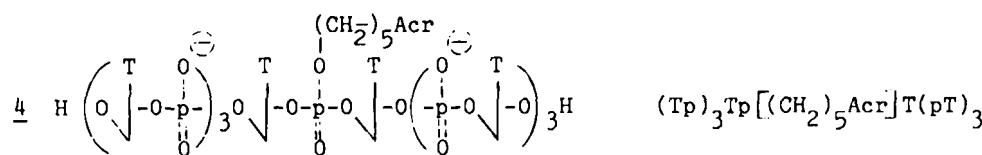
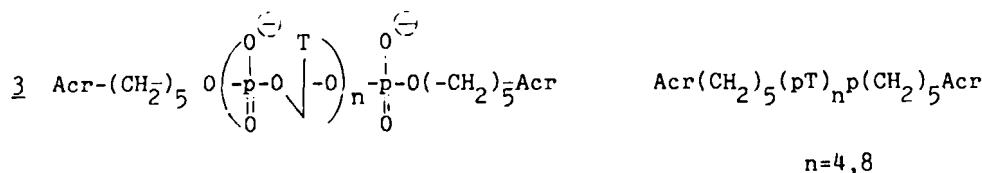
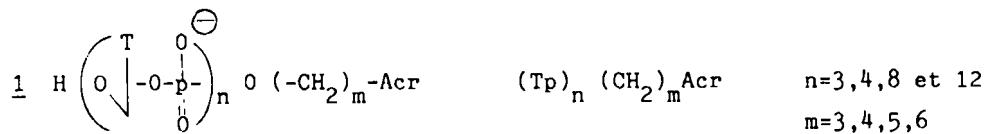
U. Asseline et N.T. Thuong

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, 45071 Orléans Cedex 2, France

**Abstract :** Oligothymidylates covalently linked to an acridine derivative (2-methoxy-6-chloro-9-aminoacridine) have been synthesized by the phosphotriester method in solution. The substitution has been carried out at the 5' position, both at the 5' and 3' positions or on an internucleotidic phosphate. A polymethylene linker was used to tether the acridine derivative via its 9-amino group to the terminal or internucleotidic phosphate.

**INTRODUCTION**

Afin d'obtenir des substances possédant à la fois une forte affinité et une haute spécificité vis-à-vis d'une séquence d'acides nucléiques en vue de les utiliser pour réguler l'expression d'un gène préalablement choisi, nous avons synthétisé (1) des oligothymidylates 1 dont le phosphate en position 3' terminale est lié à la méthoxy-2 chloro-6 amino-9 acridine par l'intermédiaire d'une chaîne polyméthylène de longueur variable. Les résultats des études physico-chimiques (2) ont permis de montrer que ces composés forment des complexes spécifiques avec les séquences nucléiques complémentaires et que la présence de l'intercalant stabilise les complexes formés. Afin de déterminer la position de la substitution par l'intercalant conduisant à la stabilisation optimum nous avons greffé le groupe méthoxy-2 chloro-6 amino-9 acridine (Acr) sur des oligothymidylates en position 5' 2 à la fois en position 5' et 3' 3 et également par l'intermédiaire d'un phosphate internucléotidique 4.




---

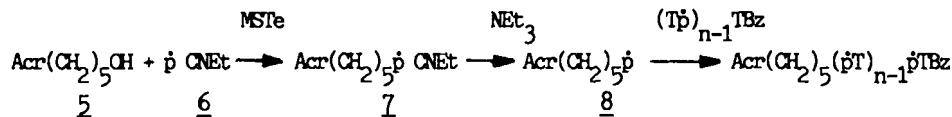
$\ddot{\rho}$ CNET=(p-chlorophényl  $\beta$ -cyanoéthyl)phosphodiester ;  $\ddot{\rho}$ =p-chlorophényl-phosphoester ; T=thymidine, TBz= O-benzoyl-3' thymidine, DMTrT= O-diméthoxytrityl-5' thymidine, DMTrTp= O-diméthoxytrityl-5' thymidine 3'-phosphomonoester, MSTe= mésitylène sulfonyltétrazolide ; Py= ; ABH-DBU = acide benzohydroxamique diaza-1,8 bicyclo [5,4,0] undécène-7.

RESULTATS ET DISCUSSION1) Oligothymidylates substitués par le groupe "intercalant" en position 5'

Pour relier l'intercalant à l'oligonucléotide en position 5' nous avons choisi un "bras" de couplage comportant cinq méthylènes. Ce choix a été dicté par les informations données par le modèle moléculaire CPK.

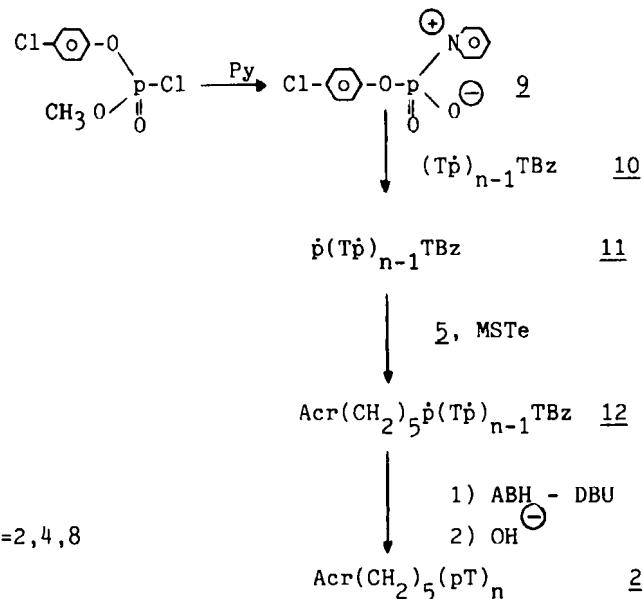
Pour accéder aux oligothymidylates porteurs du groupe Acr en position 5' 2, le schéma de synthèse le plus simple en théorie (schéma I) consistait à coupler la fonction hydroxyle 5' d'un oligonucléotide avec le phosphodiester porteur du groupe intercalant 8.

Schéma I



Ce dernier a été facilement obtenu par couplage de l'agent intercalant 5 (1) avec le (p-chlorophényl 2-cyanoéthyl)phosphate 6 (3) suivi de la décyanoéthylation du triester obtenu 7. Cependant la très faible solubilité du composé 8 dans les solvants organiques, y compris la pyridine, n'a pas permis de poursuivre la synthèse. Ce fait nous conduit donc à préparer un oligonucléotide comportant un groupe arylphosphodiester en 5' puis à le coupler avec l'agent intercalant (schéma II). L'introduction du groupe arylphosphodiester en 5' d'oligothymidylate a été réalisée en une seule étape par action du p-chlorophényl-phosphopyridinium 9 (4) (obtenu par addition du (méthyl p-chlorophényl)chlorophosphate sur la pyridine) en excès sur l'hydroxyle 5' d'un oligonucléotide protégé 10 (3). La réaction est rapide et conduit quantitativement aux oligonucléotide 5'-phosphodiesters correspondants 11. Ces composés qui sont isolés par simple extraction sont suffisamment purs pour être utilisés tels quels dans l'étape suivante. Le couplage des oligonucléotide 5'-phosphodiester 3'-benzoylés 11 ( $n=2,4$  et 8) avec le composé intercalant 5 (1) conduit aux oligonucléotides totalement protégés porteurs du groupe intercalant en position 5' 12.

## Schéma II



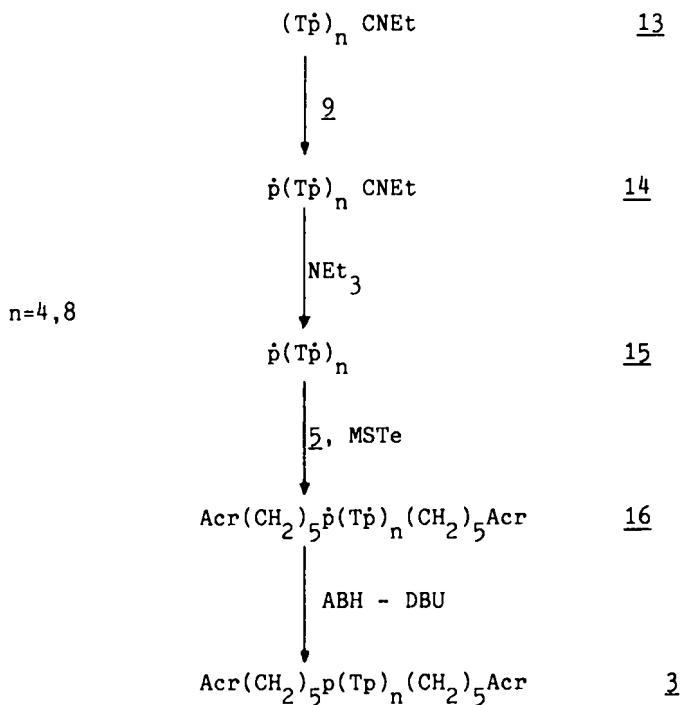
2) Oligothymidylates bisubstitués par le groupe "intercalant" en position 5' et 3'

Par analogie avec les travaux de Le Pecq, Roques et al. (5,6) qui ont montré que les bisintercalants forment des complexes avec les ADN en double hélice beaucoup plus stables que les monointercalants nous avons greffé deux groupes acridines aux extrémités 3' et 5' d'oligothymidylates. La synthèse a été réalisée selon le schéma III qui consiste à introduire dans une première étape le groupe p-chlorophénylphosphodiester en 5' d'oligothymidylate 3'-cyanoéthylphosphotriester 13. L'élimination du groupe cyanoéthyle des composés 14 obtenus conduit aux dérivés 3',5'-bisphosphodiesters 15. Le couplage de chacun des bisdiesters 15 avec un excès de méthoxy-2 chloro-6( $\omega$ -hydroxypentylamino)-9-acridine 5 conduit aux triesters bissubstitués 16.

3) Octathymidylate substitué sur le quatrième phosphate par la méthoxy-2 chloro-6 (pentylamino)-9 acridine 24

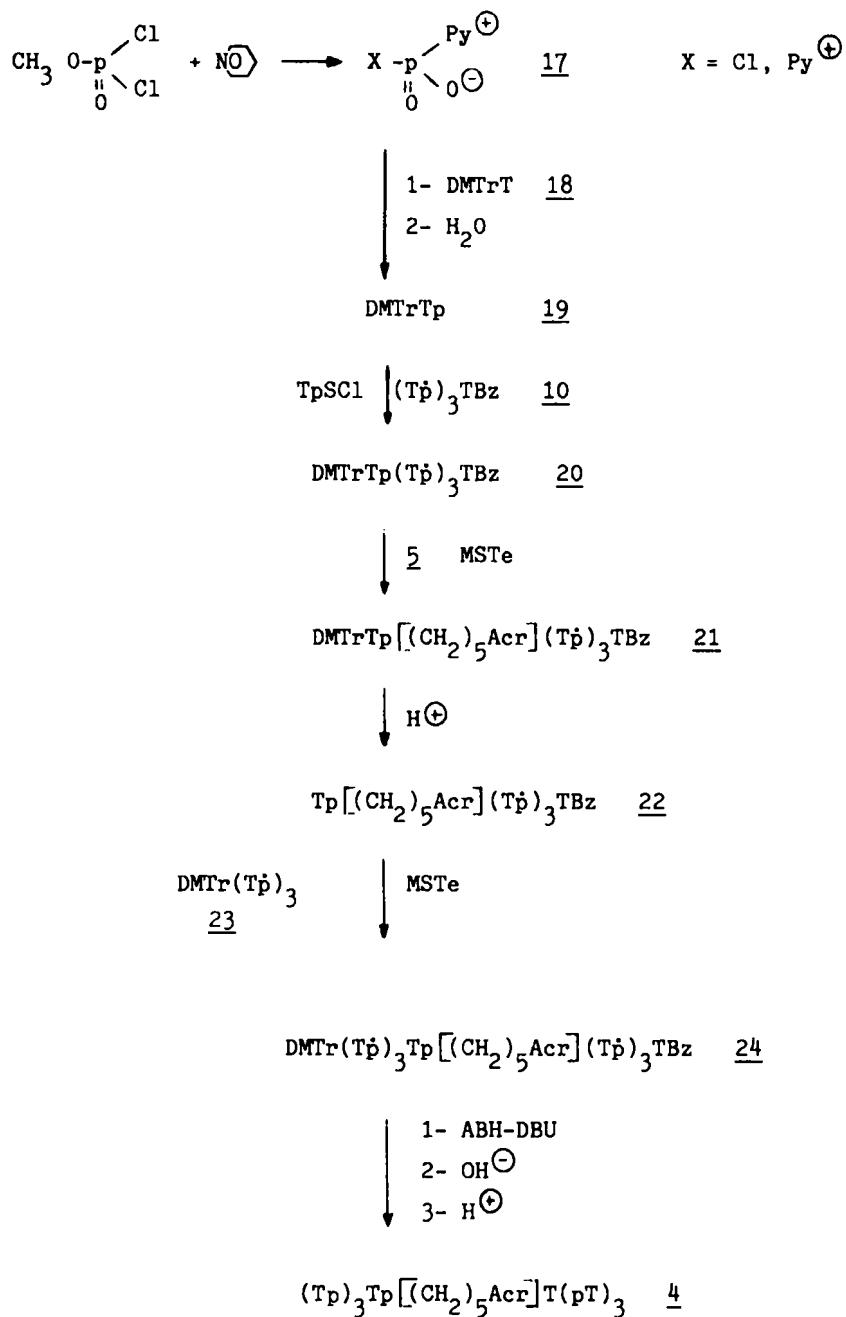
Cette synthèse est plus complexe que celle des composés précédents. En effet, il faut préparer un oligonucléotide dont les fonctions hydroxyles en 5' en 3' sont protégées et qui possède un groupe phospho-

Schéma III



diester internucléotidique. L'intermédiaire clé de cette synthèse qui est le composé 20 a été préparé selon le schéma IV. Par action du phosphopyridinium 17 (7)(obtenu par dissolution du méthyldichlorophosphate dans la pyridine) sur la O-diméthoxytrityl-5'thymidine 18 on obtient après un traitement avec de l'eau le 5'-diméthoxytritylthymidine 3'-phosphomonoester 19 avec un rendement voisin de 80 % après purification. Le composé 19 soumis à l'action des monophosphatasées alcalines libère un composé identique à la O-diméthoxytrityl-5' thymidine. Ce qui confirme la présence d'un groupe phosphomonoester en position 3' du composé 19. Le couplage du mononucléotide phosphomonoester 19 avec l'hydroxyle 5' du téranucléotide 3'-benzoyle 10 en présence de chlorure de triisopropylbenzène sulfonyle ( $TpSCl$ ) dans la pyridine conduit au pentanucléotide 20 dont le premier phosphate internucléotidique est sous forme diester. Le  $TpSCl$  a été utilisé à la place du MSTe pour limiter la formation de l'oligonucléotide ramifié DMTrTp

Schéma IV

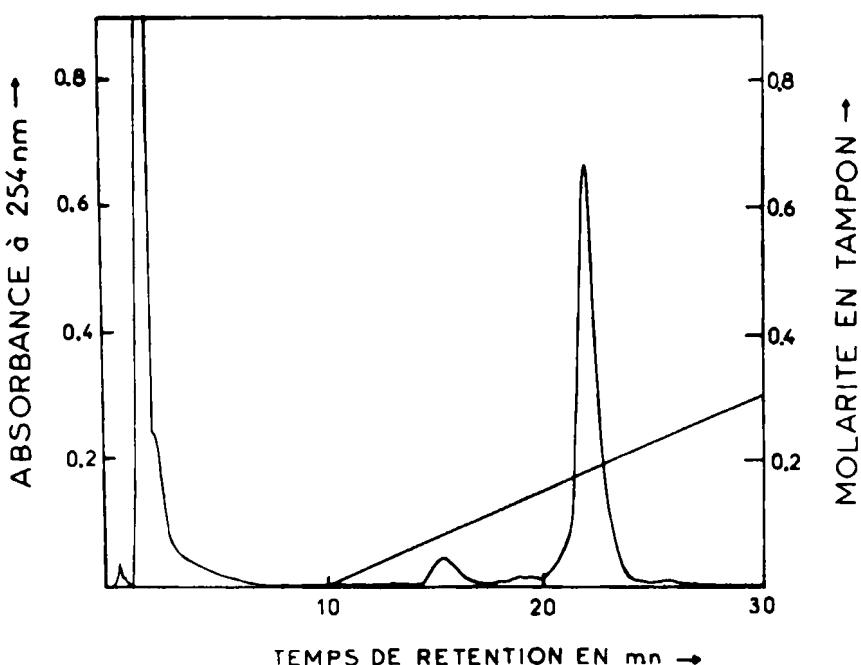


$\left[ (\text{Tp})_3\text{TBz} \right]_2$ . Après purification sur silice le pentanucléotide 20 a été isolé avec un rendement de 65 %. Le couplage de ce dernier avec un excès de composé 5 donne le pentanucléotide triester 21 porteur du groupe intercalant sur le premier phosphate internucléotidique. Cette réaction de couplage qui est très lente conduit à la formation d'une quantité importante du sulfonate du composé bras-intercalant. Cependant le rendement du couplage peut être amélioré en ajoutant au cours de la réaction des quantités supplémentaires de réactif de couplage et de composé bras-intercalant 5. Enfin, le couplage du pentanucléotide triester détritylé 22 (obtenu par détritylation du composé 21) et du trinucléotide 3'-phosphodiester 23 conduit à l'octanucléotide triester totalement protégé 24.

La déprotection des oligothymidylates 12, 16 et 24 comporte une étape commune qui est la désarylation des groupes phosphates par le système acide benzohydroxamique-DBU (1). Les oligonucléotides 16 comportant le groupe acridine en 5' et en 3' donnent directement les dérivés déprotégés 3. La déprotection totale des composés 12 substitués par le groupe intercalant en position 5' nécessite après la désarylation des groupes phosphates de débloquer (débenzoylation) la fonction hydroxyle en position 3' par un traitement fortement alcalin (1) pour éviter la rupture de la liaison  $\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}=\text{N}_2$  du groupe "bras-acridine". Après désarylation et débenzoylation l'octathymidylate 24 substitué sur le 4ème phosphate par le groupe acridine est détritylé par l'acide acétique.

#### 4) Caractéristiques chromatographiques des produits synthétisés

L'utilisation du couple acide benzohydroxamique-DBU en milieu aprotique permet la désarylation sélective des trois types de composés décrits sans dégradation appréciable de ces molécules. A titre d'exemple le chromatogramme du mélange brut obtenu après déprotection totale (désarylation puis débenzoylation) (fig. 1) de l'octanucléotide 12 ( $n=8$ ) montre un pic principal ( $\approx 90\%$  quantifiés par intégration) qui correspond à l'octathymidylate 2 ( $n=8$ ) et un pic d'intensité beaucoup plus faible ( $<7\%$ ) qui correspond à un composé moins ionique. Ce produit



**Figure 1 :** Chromatogramme du mélange brut obtenu après déprotection de l'octanucléotide 12 ( $n=8$ ). Colonne polyanion HR 5/5 (Pharmacia). Eluant :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $10^{-3}$  M, pH 6 pendant 10 minutes puis gradient de  $10^{-3}$  M à 0,3 M en 20 minutes.

secondaire qui comporte à la fois de la thymidine et l'acridine a un temps de rétention identique à celui du tétranucléotide  $\text{Acr}(\text{CH}_2)_5(\text{pT})_4$ . Ce composé provient probablement de la fraction de tétranucléotide 10 ( $\text{Tp}_3$ )<sub>2</sub> TBz n'ayant pas réagi au cours de la préparation de l'octanucléotide 10 DMTr ( $\text{Tp}_7$ )<sub>2</sub> TBz.

Après purification par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions puis en phase inverse la pureté et la structure des composés 2, 3 et 4 ont été confirmées par la chromatographie à haute performance, et par les résultats des dégradations enzymatiques. Les analyses par chromatographie liquide à haute performance par échange d'ions et en phase inverse réalisées à deux longueurs d'onde (254 nm et 425 nm) ont confirmé l'homogénéité des composés 2 et 3 (tableau I). Les temps de rétention obtenus par échange d'ions (figure 2) augmentent avec le nombre de phosphodiesters de l'oligonucléotide.

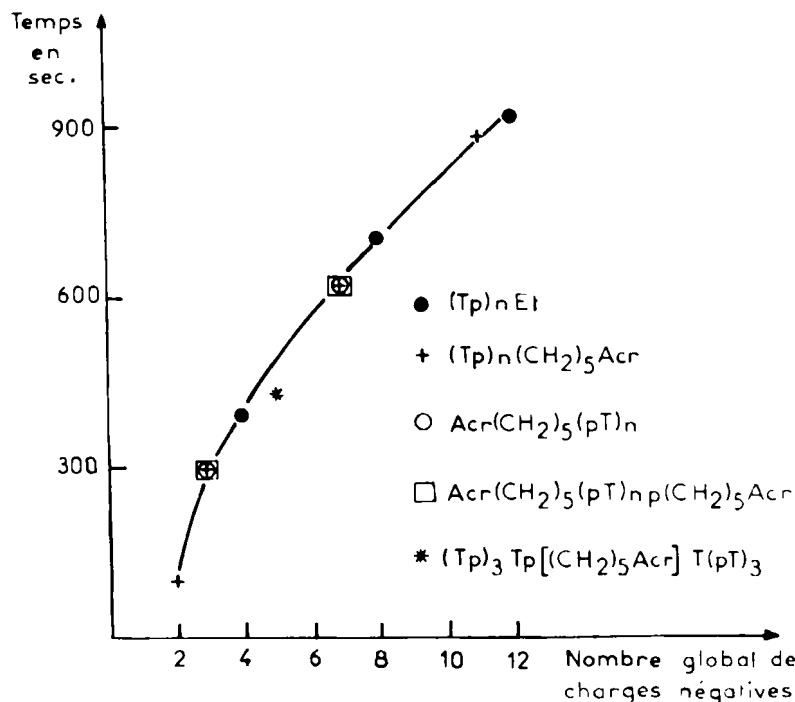
Tableau I : Caractéristiques chromatographiques des oligothymidylates liés au dérivé de l'acridine

Oligonucléotides	OCM(RF)*		FPLC		HPLC	
	SystG, SystH		SystX1	SystX2	SystY1	SystY2
		(1)		(1)		(1)
Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> (pT) <sub>2</sub>	0,53	-	-	120 sec	437 sec	
Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> (pT) <sub>4</sub>	0,40	-	301 sec	-	-	240 sec
Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> (pT) <sub>8</sub>	0,13	0,45	624 sec	-	-	162 sec
Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> p(Tp) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr	0,39	-	304 sec	-	244 sec	506 sec
Acr(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> p(Tp) <sub>8</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr	0,12	0,42	624 sec	-	-	195 sec
(Tp) <sub>3</sub> Tp[(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr](Tp) <sub>3</sub> T	0,31	-	420 sec	-	-	166 sec

\*gel de silice

La comparaison des temps de rétention des composés "oligonucléotide-bras-intercalant" 2 et 3 avec ceux des oligothymidylates possédant le même nombre de phosphodiester et dans lesquels le groupe "acridine" est remplacé par un groupe éthyle non intercalant (Tp)<sub>n</sub> Et (n=4,8,12) (8) (figure 2) montrent que les composés 2 et 3 se comportent comme des oligothymidylates portant une ou deux charges négatives en moins.

Ce résultat peut être expliqué par le fait que dans les conditions de pH utilisées en échange d'ions (pH 6) l'acridine est protonée. Le nombre global de charges négatives apparent de la molécule détermine le temps de rétention. Il est égal au nombre total de groupes phosphodiesters diminué du nombre de "groupes acridines". Ainsi les composés 3 porteurs de deux groupes acridines ont des temps de rétention identiques (en échange d'ion) à ceux des oligothymidylates monosubstitués par l'acridine de structure 1 et 2 ayant la même valeur de l'indice n.



**Figure 2 :** Temps de rétention sur colonne échangeuse d'anions des composés  $\text{+} (\text{Tp})_n(\text{CH}_2)_5\text{Acr}$  ;  $\circ \text{Acr}(\text{CH}_2)_5(\text{pT})_n$  ;  $\square \text{Acr}(\text{CH}_2)_5\text{p}(\text{Tp})_n(\text{CH}_2)_5\text{Acr}$   $\star (\text{Tp})_3\text{Tp}[(\text{CH}_2)_5\text{Acr}] \text{T}(\text{pT})_3$  et  $\bullet (\text{Tp})_n \text{Et}$  en fonction de leur nombre global de charges négatives. Colonne polyanion HR 5/5 (Pharmacia) (SystX1).

Les deux diastéréoisomères 4 ne sont pas séparés par ces analyses HPLC. Les résultats obtenus par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions montrent qu'ils se comportent comme un composé comportant environ 4,5 charges négatives (au lieu de 5 calculées)

La structure du tétranucléotide porteur de l'intercalant en position 5' 2 ( $n=4$ ) a été vérifiée par RMN (9).

### 5) Hydrolyses enzymatiques

Les études d'hydrolyse enzymatique ont été réalisées avec deux exonucléases (une exonucléase 5' extraite de la rate de veau et une

exonucléase 3' extraite du venin de serpent) et par l'endonucléase P<sub>1</sub>. (Schéma V).

Les composés 2 sont stables vis-à-vis de l'exonucléase 5' du fait du blocage de l'hydroxyle 5' terminal alors qu'ils sont totalement dégradés par l'exonucléase 3' extraite du venin de serpent en thymidine 5'-phosphate et en un composé identique au "bras-intercalant" 5.

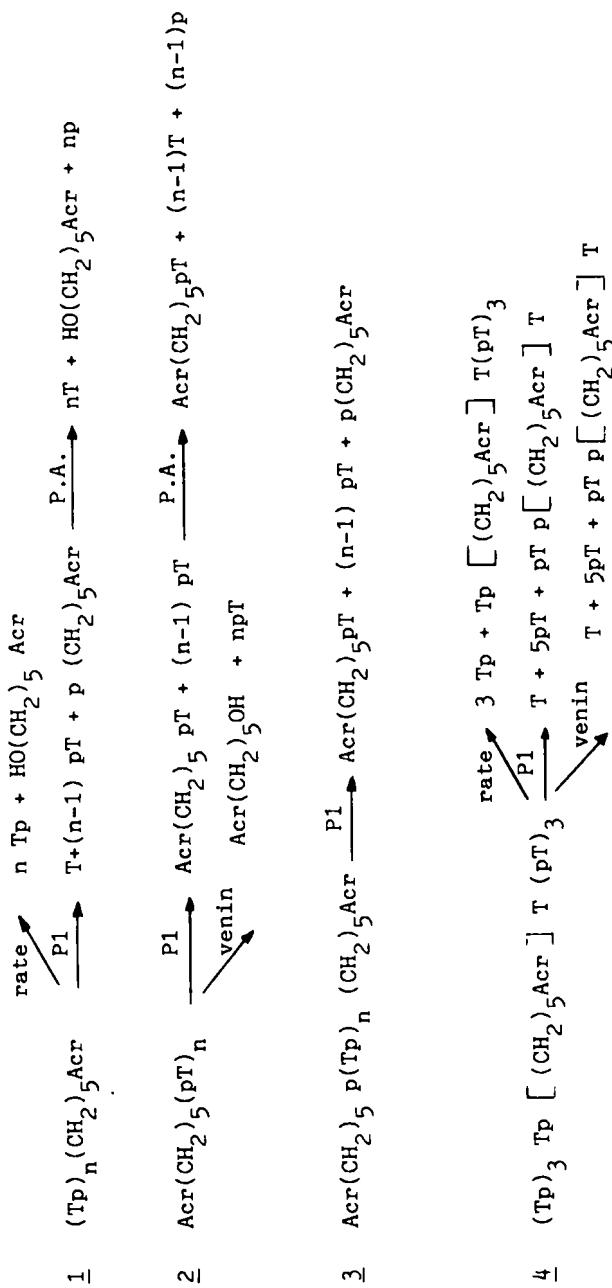
L'action de l'endonucléase P<sub>1</sub> suivie de celle des phosphatases alcalines libère la thymidine et le composé Acr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>pT. Ces résultats confirment la déprotection totale de la chaîne nucléotidique, l'enchaînement 3'-5' des thymidines ainsi que la position du groupe intercalant en 5'.

Les composés 3 sont stables à la fois vis-à-vis de l'exonucléase 5' extraite de la rate de veau et de l'exonucléase 3' extraite du venin de serpent.

L'action de l'endonucléase P<sub>1</sub> conduit en plus de la thymidine 5'-phosphate à deux composés fluorescents, différents du composé bras-intercalant 5. Ces deux produits renfermant le chromophore de l'acridine sont identiques à ceux obtenus lors de l'hydrolyse par l'endonucléase P<sub>1</sub> des oligothymidylates porteurs de l'intercalant d'une part en 3' 1 et d'autre part en 5' 2. Après traitement de l'hydrolysat de l'endonucléase P<sub>1</sub> par les phosphatases alcalines nous obtenons d'une part deux composés comportant l'intercalant et d'autre part la thymidine. L'un des composés fluorescents est identique au composé "bras intercalant" 5 le second, non dégradé par l'action des phosphatases alcalines, est hydrolysé par l'exonucléase 3' extraite du venin de serpent pour conduire au composé "bras intercalant" 5 et à la thymidine 5'-phosphate. Ces résultats montrent que les composés 3 sont bien porteurs de deux groupes intercalants à la fois en 5' et en 3'.

Dans le cas de l'octathymidylate 4 porteur du groupe intercalant sur le quatrième phosphate internucléotidique les hydroxyles 5' et 3' terminaux sont libres. De ce fait on observe une certaine activité des exonucléases. L'exonucléase extraite de la rate de veau coupe les liaisons 5'-phosphodiester en amont du phosphotriester porteur de l'in-

## SCHEMIA V



tercalant pour conduire à la thymidine 3'-phosphate et à un oligomère renfermant le chromophore de l'acridine, stable vis-à-vis des phosphatasées alcalines et qui possède un Rf identique à celui du pentanucléotide  $Tp[(CH_2)_5Acr](Tp)_3T$ . Par contre avec l'exonucléase 3' de venin de serpent la dégradation de la molécule est plus importante. Nous observons la formation des mêmes produits de dégradation que par action de l'endonucléase  $P_1$ . Nous obtenons en plus de la thymidine et de la thymidine 5'-phosphate un composé renfermant le chromophore de l'acridine. Après traitement par les phosphatasées alcalines, celui-ci est transformé en un produit dépourvu de groupe phosphodiester (CCM : syst A,  $Rf=0,10$  ; syst C,  $Rf=0,33$ ) et renfermant l'intercalant et de la thymidine. Ce composé qui est différent du "bras-intercalant" 5 (CCM : syst C,  $Rf=0,43$ ) est vraisemblablement le dinucléoside  $Tp[(CH_2)_5Acr]T$ . Cette dégradation en aval du groupe phosphotriester obtenue par l'action de l'exonucléase 3' du venin de serpent a déjà été signalée dans le cas de composés comportant la structure alternée méthylphosphonate-phospho-ester (10).

#### 6) Interactions intramoléculaires

Nous avons déjà observé au cours de la préparation des composés porteurs de "l'intercalant" en position 3' 1 (1) que le couplage du groupe "bras-acridine" 5 à l'oligonucléotide provoque des modifications spectrales dans le domaine visible de l'acridine. Les effets observés varient avec la longueur de l'oligonucléotide. De la même manière la substitution du groupe "bras-acridine" en d'autres positions de l'oligothymidylate induit également des variations spectrales (notamment un déplacement bathochrome du spectre de l'acridine). Ces variations spectrales traduisent des interactions intramoléculaires (empilement du groupe intercalant avec les bases). Afin de pouvoir les quantifier et ainsi déterminer les coefficients d'extinction molaire des composés préparés nous les avons dégradés par les nucléases appropriées permettant la libération du composé bras-intercalant. Ainsi nous avons étudié les modifications spectrales obtenues au cours de l'hydrolyse totale d'une part du tétranucléotide 2 ( $n=4$ ) par l'action de l'exonucléase 3' de venin de serpent (fig. 3) et d'autre part du tétranucléotide bisubstitué 3 ( $n=4$ ) par l'action successive de l'endonucléase  $P_1$  des phos-

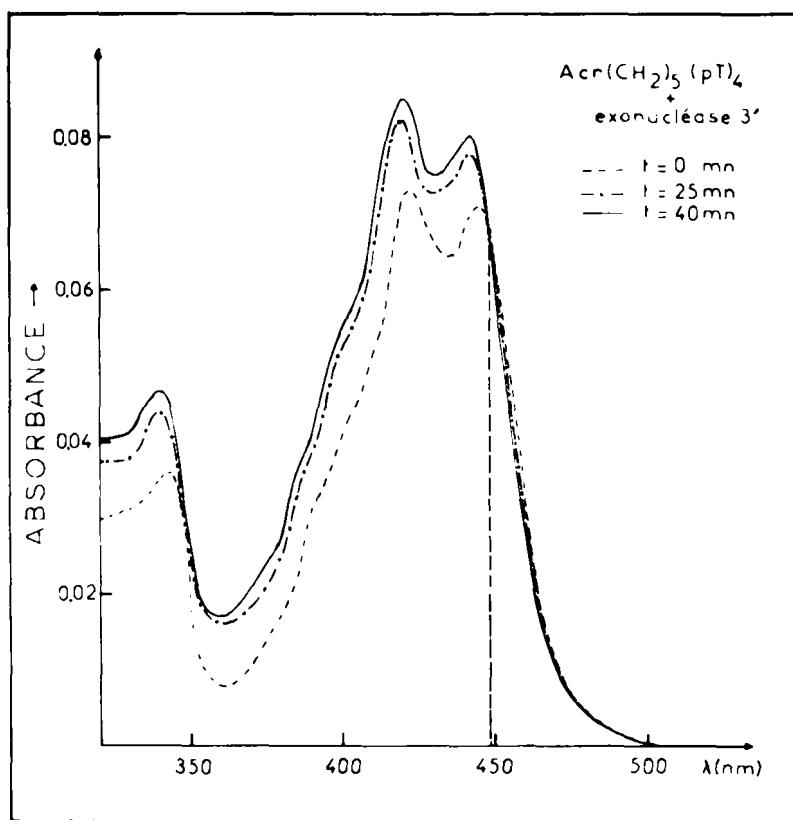
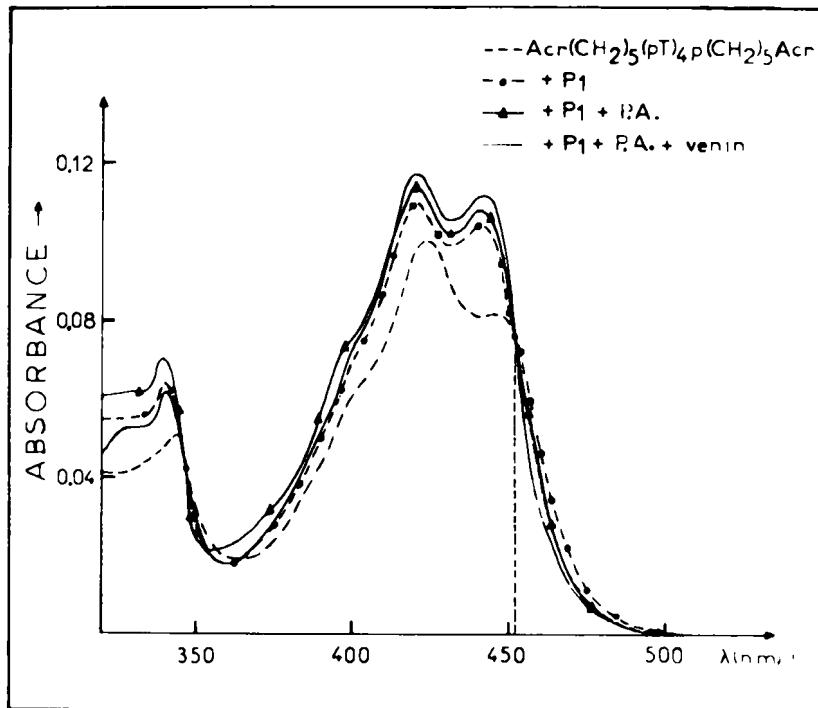


Figure 3 : Variations du spectre d'absorption dans le visible et le proche UV d'une solution de tétranucléotide  $\text{Acr}(\text{CH}_2)_5(\text{pT})_4$  ( $n=4$ ) après addition (à  $t=0$ ) d'exonucléase 3' de venin de serpent.

phatasées alcalines et d'une exonucléase 3' (fig. 4). Nous observons la formation d'un point isobestique à  $\lambda = 448,5 \text{ nm}$  dans le cas du tétranucléotide 2 ( $n=4$ ) et à  $\lambda = 452 \text{ nm}$  dans celui du dérivé bisintercalant 3 ( $n=4$ ) ainsi qu'un hyperchromisme et un déplacement hypsochrome du spectre de l'acridine. Dans les deux cas le spectre final après digestion totale est identique à celui de l'agent intercalant 5. A partir de ces observations, en prenant comme référence  $\lambda 423 \text{ nm} : 9750 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  pour le composé "bras-intercalant" (valeur de  $\epsilon$  déterminée pour la quinacrine (11) qui possède le même chromophore) nous avons déterminé une valeur de  $\epsilon 425$  pour chacun des composés 2 et 3 (tableau II).



**Figure 4 :** Variations du spectre d'absorption dans le visible et le proche U.V. de l'acridine au cours de la dégradation enzymatique d'une solution de tétranucléotide bisubstitué  $\underline{3}$  ( $n=4$ ) par additions successives de l'endonucléase  $\text{P}_1$  (-●-) des phosphatases alcalines (-▲-) et de l'exonucléase 3' de venin de serpent (—). Les spectres enregistrés correspondent au mélange final des produits obtenus après action complète de chaque nucléase.

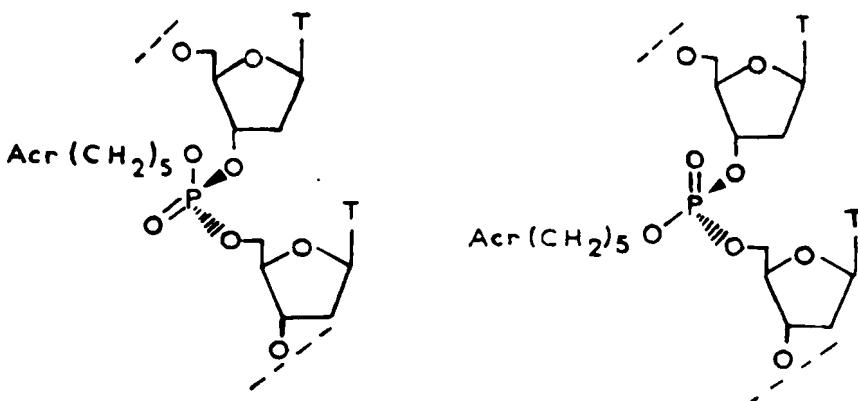
TABLEAU II

Composés	$\lambda_{\text{max}}$ nm	$\epsilon_{425}$
Acr $(\text{CH}_2)_5\text{OH}$	421,25	9750
<u>1</u> $(\text{Tp})_4(\text{CH}_2)_5\text{Acr}$	422,9	9050
<u>1</u> $(\text{Tp})_8(\text{CH}_2)_5\text{Acr}$	424,35	8855
<u>1</u> $(\text{Tp})_{12}(\text{CH}_2)_5\text{Acr}$	425	8835
<u>2</u> Acr $(\text{CH}_2)_5(\text{pT})_4$	423,2	8350
<u>2</u> Acr $(\text{CH}_2)_5(\text{pT})_8$	424,5	8285
<u>3</u> Acr $(\text{CH}_2)_5\text{p}(\text{Tp})_4(\text{CH}_2)_5\text{Acr}$	423,5	8490
<u>3</u> Acr $(\text{CH}_2)_5\text{p}(\text{Tp})_8(\text{CH}_2)_5\text{Acr}$	425	8125

### 7) Interactions des oligothymidylates modifiés avec le poly r(A)

Les études d'interaction des composés "oligothymidylate-bras-intercalant" 2, 3 et 4 avec les polynucléotides ont été réalisées par spectroscopie d'absorption (12). Les concentrations des solutions d'oligonucléotides pour les composés 2 et 3 ont été calculées en utilisant les valeurs de  $\epsilon$  décrites précédemment. Dans le cas de l'octathymidylate 4 porteur du groupe intercalant sur le quatrième phosphate internucléotidique nous avons utilisé  $\epsilon_{425} = 8570$  (13). L'interaction des composés "oligonucléotide-bras intercalant" avec le poly r(A) est suivie en étudiant les modifications spectrales obtenues dans le domaine visible de l'acridine entre 530 et 320 nm en présence de quantités croissantes de poly r(A), à basse température (2°C) (2). Ces modifications spectrales se traduisent d'une façon générale par un hypochromisme et un déplacement bathochrome du spectre de l'acridine (plus ou moins importants selon les composés). Les résultats obtenus ont montré que pour les trois types de composés étudiés 2, 3 et 4 elle atteignent une limite lorsque le rapport adenine/thymine dans la solution est voisin de un [stoechiométrie voisine de 1(A:T) 1:1]. Ce qui confirme le nombre de thymines de chacun des composés préparés. En présence de poly d(T) le spectre de l'acridine ne varie pas. Ce qui montre que les

composés oligonucléotide-bras-intercalant forment des complexes spécifiques avec le poly r(A). Une élévation progressive de la température dissocie le complexe formé, ce qui se traduit par un hyperchromisme et un déplacement hypsochrome du spectre de l'acridine. Lorsque la température est suffisamment élevée pour permettre la dissociation totale du complexe, le spectre obtenu est identique à celui du composé oligonucléotide-bras-acridine avant addition de poly r(A). L'étude des variations spectrales en fonction de la température permet de déterminer la température de demi-transition ( $T_m$ ) (valeur pour laquelle la moitié du composé oligonucléotide-bras-intercalant est associée au poly r(A)). L'étude comparative des valeurs de  $T_m$  obtenues pour chacun des composés permet de déterminer ceux qui conduisent à la formation des hybrides les plus stables. Ces résultats ont montré que pour des oligonucléotides comportant un même nombre de thymines la substitution par le groupe intercalant en position 5' de l'oligonucléotide est légèrement moins favorable que celle en position 3' et que la présence d'un deuxième groupe intercalant ne stabilise pas plus le complexe d'hybridation (peut être à cause de l'empilement des groupes intercalants) (12). Enfin la substitution sur le quatrième phosphate internucléotidique par le groupe intercalant conduit à la formation de complexes moins stables que ceux obtenus à partir des composés 1, 2 et 3. Il convient de remarquer que les deux diastéréoisomères 4 possèdent les deux configurations stériques suivantes :



#### CONFIGURATIONS

Des résultats antérieurs (14) ont montré que la stabilité des hybrides formés dépend de la configuration des groupes phosphotriesters. Nous avons en effet mis en évidence une différence de stabilité voisine de 25° entre les complexes formés à partir de chacun des stéréoisomères  $[Tp^*(R)Tp]_2(CH_2)_5Acr$  [R=Et ou  $(CH_3)_3C-CH_2-$ ] avec le poly r(A).

### Conclusion

Nous avons préparé plusieurs types de composés "oligothymidylate-bras-intercalant" dans lesquels le groupe intercalant dérivé de la méthoxy-2 chloro-6 amino-9 acridine est substitué d'abord en position 5' de l'oligonucléotide 2 ( $n=2,4,8$ ) puis à la fois en position 5' et 3' de l'oligonucléotide 3 ( $n=4,8$ ) et enfin sur le quatrième phosphate internucléotidique d'un octathymidylate. Pour relier le groupe intercalant à l'oligonucléotide nous avons utilisé une chaîne pentaméthylène. La synthèse de ces composés a été réalisée selon la méthode au phosphotriester en solution. La désarylation des phosphates a été réalisée par le couple acide benzohydroxamique-DBU en milieu polaire aprotique. Après vérification de la structure et de la pureté des composés préparés par HPLC et par dégradations enzymatiques nous avons déterminé le coefficient d'extinction molaire à 425 nm des oligothymidylates de structure 2 et 3. Comme dans le cas des composés de structure 1 la valeur de  $\epsilon$  425 diminue lorsque la longueur de l'oligonucléotide augmente. De même cet hypochromisme est associé à un déplacement bathochrome des spectres d'absorption de l'acridine.

### PARTIE EXPERIMENTALE

#### A) Matériel et Méthodes

Les chromatographies sur couche mince de silice (Merck 60 F 25<sup>4</sup>) ont été développées dans différents systèmes de solvants-  
 A :  $CH_2Cl_2/MeOH$ , 90:10 V/V ; B:  $CH_2Cl_2/MeOH$ , 85:15 V/V ;  
 C :  $CH_2Cl_2/MeOH$ , 80:20 V/V ; D:  $CH_2Cl_2/MeOH$ , 75:25 V/V ;  
 E :  $CH_2Cl_2/MeOH$ , 70:30 V/V ; F:  $iPrOH/NH_4OH/H_2O$ , 70:20:10 V/V ;  
 G :  $iPrOH$ ,  $NH_4OH/H_2O$ , 65:9:15 V/V ; H:  $iPrOH/NH_4OH/H_2O$ , 85:10:25 V/V ;  
 puis révélées sous irradiation U.V. à 254 nm (et à 350 nm pour les composés comportant le chromophore de l'acridine).

Les sucres et le groupement diméthoxytrityle ont été révélés par carbonisation après pulvérisation avec une solution d'acide perchlorique à 10 %. Les groupements phosphates d'aryle ont été mis en évidence par pulvérisation d'une solution à 0,5 % de dibromo-2,6 parabenoquinone-N-chloroimine (DBPNC) dans le méthanol en milieu basique.

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

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

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

#### B) Synthèses

- I) Composés méthoxy-2 chloro-6 ( $\omega$ -hydroxypentylamino)-9 acridine 5 (1)
- II) Oligothymidylates substitués en 5' 12 (tableau III) et bisubstitués à la fois en 5' et en 3' par l'intercalant 16 (tableau IV)

##### 1) Oligothymidylates 5'-phosphodiesters 11 et 14

On ajoute à -20°C sous agitation  $3 \cdot 10^{-4}$  mole de (méthyl p-chlorophényl) chlorophosphate dans la pyridine anhydre (2 ml). On laisse le mélange revenir à la température ambiante. Après 45 minutes on ajoute une solution d'oligonucléotide 5'-hydroxyle 3'-benzoyle 10 ( $n=2,4,8$ ) ou 3'(-p-chlorophénylecyanoethyl) phosphate 13 ( $n=4,8$ ) ( $10^{-4}$  mole) (préalablement séché par coévaporation avec la pyridine) dans la pyridine anhydre (2 ml). Quarante minutes après l'addition du triester 10, la réaction est terminée ( $R_f=0$ , syst A). L'excès de réactif de phosphorylation est détruit par addition d'eau glacée. L'oligonucléotide 5'-phosphodiester 11 ou 14 est extrait avec du chloroforme.

TABLEAU III

$\dot{p}(\text{Tp})_{n-1} \text{ TBz } \underline{11}$						$\text{Acr}(\text{CH}_2)\dot{p}(\text{Tp})_{n-1} \text{ TBz } \underline{12}$					
n	Intermédiaires utilisés	COM				n	Intermédiaires utilisés				COM
		Syst A	Syst B	Syst C	Syst D		Syst A	Syst B	Syst C	Syst D	Syst A
2	2 et <u>10</u> (n=2)	0	-	0,39	0,47	2	<u>5(1,5eq)</u> et <u>11(n=2)1eq</u>	0,26	-	-	-
4	2 et <u>10</u> (n=4)	0	-	0,54	0,58	4	<u>5(1,5eq)</u> et <u>11(n=4)1eq</u>	0,21	0,44	-	-
8	2 et <u>10</u> (n=8)	0,05	0,14	0,63	0,69	8	<u>5(1,5eq)</u> et <u>11(n=8)1eq</u>	-	0,38	-	-

TABLEAU IV

$\dot{p}(\text{Tp})_n \text{ COMET } \underline{14}$						$\dot{p}(\text{Tp})_n \text{ } \underline{15}$						$\text{Acr}(\text{CH}_2)\dot{p}(\text{Tp})_n (\text{CH}_2)\text{Acr } \underline{16}$					
n	Intermédiaires utilisés	COM				n	COM				n	Intermédiaires utilisés				COM	
		Syst A	Syst C	Syst D	Syst E		Syst A	Syst C	Syst D	Syst E		Syst A	Syst B	Syst C	Syst A	Syst B	Syst C
4	2 et <u>13</u> (n=4)	0	0,38	0,45	4	0,27	-	-	-	-	4	<u>2(3eq)</u> + <u>15(n=4)</u>	0,33	0,41	-	-	-
8	2 et <u>13</u> (n=8)	0	0,54	0,61	8	-	0,15	0,83	8	<u>2(3eq)</u> + <u>15(n=4)</u>	0,31	-	-	-	-	-	-

La phase organique est lavée avec une solution de bicarbonate de sodium à 5 % puis avec de l'eau et enfin séchée et concentrée. Le résidu obtenu précipite sous forme de solide blanc après agitation dans l'éther. Les rendements sont voisins de 90 %.

## 2) Oligothymidylates bisdiesters 15

Les oligonucléotides bisdiesters 15 ( $n=4,8$ ) ont été obtenus par traitement des oligonucléotides 5'-phosphodiesters 3'- $\beta$ -cyanoéthyl-phosphotriester 14 ( $n=4,8$ ) par la triethylamine. Après une heure à la température ambiante, la triethylamine est chassée sous vide et les oligonucléotides bisdiesters 15 ( $n=4,8$ ) sont isolés sous forme de solide blanc après précipitation dans l'éther avec des rendements supérieurs à 90 %.

## 3) Oligothymidylates porteurs du groupe "acridine" en position 5' 12 et à la fois en position 5' et 3' 16

Par couplage des oligonucléotide 5'-phosphodiesters 11 (1éq) d'une part et bisphosphodiesters 15 (1éq) d'autre part avec un excès de composé "bras intercalant" 5 (respectivement 1,5 éq. et 3 éq.) et en opérant comme dans le cas de la préparation des oligothymidylates porteurs du groupe "intercalant" en position 3'(1) on accède respectivement aux oligonucléotides porteurs de l'intercalant en position 5' 12 et bisubstitués 16. Les rendements sont voisins de 75 %.

## III Octathymidylate substitué par le groupe intercalant sur le quatrième phosphate internucléotidique 24

### 1) Diméthoxytritylthymidine 3'-phosphate 19

On ajoute à -30°C et sous vive agitation le méthyldichlorophosphate ( $1,16 \cdot 10^{-3}$  mole) dans la pyridine (5 ml). Nous observons la formation instantanée d'un précipité blanc. L'addition terminée, on laisse le mélange réactionnel revenir à la température ambiante puis on ajoute  $3,89 \cdot 10^{-4}$  mole d'une solution de diméthoxytritylthymidine 18 dans la pyridine (1 ml). Après 20 minutes de réaction, l'excès de chlorure d'acide est détruite par addition d'eau glacée.

Le produit de la réaction est extrait par du chloroforme ( $3 \times 15$  ml). La phase organique est lavée avec de l'eau glacée ( $3 \times 3$  ml), séchée et concentrée. Le résidu obtenu est purifié sur plaque de gel de silice de chromatographie préparative (éluant :  $i\text{PrOH}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ , 70:20:10 V/V). Rdt 80 %,  $R_f=0,67$  syst F.

### 2) Pentanucléotide phosphodiester 20

Le couplage du téranucléotide 3'-benzoylé 10 ( $5 \cdot 10^{-5}$  mole) et du diméthoxytritylthymidine 3'-phosphate 19 ( $10^{-4}$  mole) en présence de triisopropylbenzènesulfonylchlorure ( $2 \cdot 10^{-4}$  mole) dans la pyridine anhydre (2 ml) conduit au pentanucléotide 20. Après deux heures et trente minutes de réaction, l'excès de réactif de couplage est détruit par addition d'eau glacée. Le mélange réactionnel est extrait avec du chloroforme. La phase organique est lavée avec une solution de bicarbonate de sodium à 5 % et avec de l'eau, séchée et concentrée, puis purifiée sur plaque de gel de silice de chromatographie préparative (éluant :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 85:15, V/V, puis 80:20, V/V). Le pentanucléotide 20 a été isolé sous forme de solide blanc avec un rendement de 65 % (syst B :  $R_f=0,14$  ; syst C :  $R_f=0,30$ ).

### 3) Pentanucléotide phosphotriester 21

Il a été obtenu par couplage du pentanucléotide phosphodiester 20 ( $3,87 \cdot 10^{-5}$  mole) et du méthoxy-2 chloro-6( $\omega$ -hydroxypentylamino)-9 acridine 5 ( $11,61 \cdot 10^{-5}$  mole) en présence de MSTe ( $11,61 \cdot 10^{-5}$  mole) dans la pyridine anhydre (1,5 ml). Après 12 heures de réaction on rajoute du composé intercalant 5 ( $5,8 \cdot 10^{-5}$  mole) et du réactif de couplage ( $5,8 \cdot 10^{-5}$  mole). Après une journée de réaction à la température ambiante, l'excès de réactif de couplage est détruit par addition d'eau glacée. Le mélange réactionnel est extrait avec du chloroforme. La phase organique est lavée avec une solution de bicarbonate de sodium à 5 % et avec de l'eau, puis séchée et concentrée, puis purifiée sur plaque de gel de silice de chromatographie préparative (éluant :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 85:15, V/V) le pentanucléotide 21 a été isolé avec un rendement de 65 % (syst B :  $R_f=0,33$ ).

#### 4) Octanucléotide 24

Le couplage du trinucléotide 3'-phosphodiester 23 (4) ( $1,2 \cdot 10^{-5}$  mole) et du pentanucléotide détritylé 22 ( $10^{-5}$  mole) (obtenu par détritylation du pentanucléotide 21) en présence de MSTe ( $3 \cdot 10^{-5}$  mole) dans la pyridine anhydre, conduit à l'octanucléotide 24. Après une heure de réaction, le composé 24 est isolé et purifié par chromatographie comme le pentanucléotide 21. L'octanucléotide a été obtenu sous forme de solide jaune avec un rendement de 60 % (CCM : syst A  $R_f=0,20$ , syst B  $R_f=0,41$ ).

#### IV Déprotection et purification

La désaryloration et la détritylation ont été réalisées selon les méthodes déjà décrites (1).

La débenzylation des composés porteurs de l'intercalant en position 5' 12 et sur un phosphate internucléotidique 24 a été réalisée de la façon suivante. Le résidu obtenu après désaryloration est traité à la température ambiante avec une solution de soude aqueuse (2 équivalents par rapport à la quantité d'acide benzohydroxamique). Après 2h30 le mélange réactionnel est neutralisé avec de la résine DOWEX 50 (forme pyridinium).

Après déprotection totale les composés 2, 3 et 4 ont été purifiés par échange d'ions sur une colonne préparative polyanion SI-17  $\mu\text{m}$  Pharmacia Fine Chemicals HR 10/10 en utilisant des gradients appropriés en tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à pH 6. Après dessalage sur une colonne Lichroprep RP - 18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) (Merck) les oligothymidylates ont ensuite été purifiés en phase inverse sur une colonne préparative Lichrosorb RP - 18 (7  $\mu\text{m}$ ) (Merck). Solvant  $Z_1$  : Acétate d'ammonium 0,12 M dans  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ , 2:98 V/V, pH 5,9. Solvant  $Z_2$  : acétate d'ammonium 0,12 M dans  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ , 24:76 V/V, pH 5,9, débit 8 ml/mn, gradient 30 à 70 % de  $Z_2$  en 30 mn.

V) Détermination de la pureté et de la structure

1) Chromatographie en phase liquide

Nous avons utilisé les méthodes et les conditions décrites précédemment (1).

2) Dégradations exzymatiques

Elles ont été réalisées dans les conditions déjà décrites (1).

VI) Détermination des coefficients d'extinction molaire

Elles ont été réalisées comme précédemment (1) en remplaçant l'exonucléase extraite de la rate de veau par celle du venin de serpent dans le cas du composé 2 ( $n=4$ ) et par l'endonucléase  $P_1$ , les monophosphatasées alcalines et l'exonucléase du venin de serpent dans le cas du dérivé bisubstitué 3 ( $n=4$ ).

Remerciements

Nous remercions la Ligue Nationale Française Contre le Cancer (Comité du Loiret), la Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer et Rhône Poulenc Santé pour l'aide financière apportée à la réalisation de ce travail.

REFERENCES

- 1) U. Asseline, N.T. Thuong et C. Hélène. Nucléosides-Nucléotides, 5 (1), 45-63 (1986).
- 2) U. Asseline, M. Delarue, G. Lancelot, F. Toulmé, N.T. Thuong, T. Montenay-Garestier et C. Hélène. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3297-3301 (1984).

- 3) N.T. Thuong, M. Chassignol, G. Lancelot, R. Mayer, B. Hartmann, M. Leng et C. Hélène. Biochimie, 63, 775-784 (1981).
- 4) N.T. Thuong, C. Barbier and U. Asseline. Phosphorus and sulfur, vol 14, 357-365 (1983).
- 5) J.B. Le Pecq, M. Le Bret, J. Barbet et B.P. Roques. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 2915-2919 (1975).
- 6) B. Gaugain, J. Barbet, N. Capelle, B.P. Roques, J.B. Le Pecq & Le Bret. Biochemistry, 17, 5079-5088 (1978).
- 7) U. Asseline, Thèse de doctorat d'Etat, Université d'Orléans (1983).
- 8) Ces composés ont été préparés comme "témoins" pour les études d'interaction des composés 1 avec les polynucléotides.
- 9) G. Lancelot. Résultats non publiés.
- 10) P.S. Miller, N. Dréon, S.M. Pulford and B. Mc. Parland. The Journal of Biological Chemistry, 255, 9659-9665 (1980).
- 11) W.D. Wilson and I. G. Lopp, Biopolymers, 18, 3025-3041 (1979).
- 12) U. Asseline, F. Toulmé, N.T. Thuong, M. Delarue, T. Montenay-Garestier et C. Hélène, EMBO J., 3, 795-800 (1984).
- 13) Cette valeur de  $\epsilon$  a été choisie arbitrairement, intermédiaire entre celle des octanucléotides  $(Tp)_8(CH_2)_5 Acr (\epsilon_{425} = 8855)$  et  $Acr (CH_2)_5 (pT)_8 (\epsilon_{425} = 8285)$  car contrairement aux autres octathymidylates le composé de structure 4 ne peut pas être complètement dégradé pour libérer le composé bras-intercalant 5.
- 14) U. Asseline, C. Barbier et N.T. Thuong. Phosphorus and sulfur, vol 26, 63-73 (1986).

Received April 6, 1987.