



HAL
open science

SYNTHESE D'HETEROCYCLES AZOTES DERIVES D'ACRIDINE ET ETUDE DE LEUR INTERACTION AVEC L'ADN

Laurent Bouffier

► **To cite this version:**

Laurent Bouffier. SYNTHESE D'HETEROCYCLES AZOTES DERIVES D'ACRIDINE ET ETUDE DE LEUR INTERACTION AVEC L'ADN. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00011161

HAL Id: tel-00011161

<https://theses.hal.science/tel-00011161>

Submitted on 7 Dec 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Chimie Organique

Présentée et soutenue publiquement par

Laurent BOUFFIER

Le 4 Novembre 2005

**SYNTHÈSE D'HÉTÉROCYCLES AZOTES DÉRIVÉS D'ACRIDINE
ET ÉTUDE DE LEUR INTERACTION AVEC L'ADN**

Directeur de Thèse : **Dr. Martine DEMEUNYNCK**

Jury

Dr. Philippe BELMONT (UMR 5181, CPE, Lyon)	Rapporteur
Dr. Serge COSNIER (UMR 5630, LEOPR, Grenoble)	Examineur
Dr. Martine DEMEUNYNCK (UMR 5616, LEDSS, Grenoble)	Examineur
Pr. Pascal DUMY (UMR 5616, LEDSS, Grenoble)	Examineur
Pr. Andrée KIRSCH-DE MESMAEKER (ULB, Bruxelles)	Examineur
Dr. Marie-Paule TEULADE-FICHO (UPR 285, Collège de France, Paris)	Rapporteur

Thèse préparée au Laboratoire d'Études Dynamique et Structurale de la Sélectivité

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Chimie Organique

Présentée et soutenue publiquement par

Laurent BOUFFIER

Le 4 Novembre 2005

**SYNTHÈSE D'HÉTÉROCYCLES AZOTES DÉRIVÉS D'ACRIDINE
ET ÉTUDE DE LEUR INTERACTION AVEC L'ADN**

Directeur de Thèse : **Dr. Martine DEMEUNYNCK**

Jury

Dr. Philippe BELMONT (UMR 5181, CPE, Lyon)	Rapporteur
Dr. Serge COSNIER (UMR 5630, LEOPR, Grenoble)	Examinateur
Dr. Martine DEMEUNYNCK (UMR 5616, LEDSS, Grenoble)	Examinateur
Pr. Pascal DUMY (UMR 5616, LEDSS, Grenoble)	Examinateur
Pr. Andrée KIRSCH-DE MESMAEKER (ULB, Bruxelles)	Examinateur
Dr. Marie-Paule TEULADE-FICHO (UPR 285, Collège de France, Paris)	Rapporteur

Thèse préparée au Laboratoire d'Études Dynamique et Structurale de la Sélectivité

Quatre années déjà se sont écoulées depuis mon entrée dans le monde de la recherche en effectuant mon stage de DEA puis mes trois années de doctorat au sein du LEDSS. Pour moi, la seule évidence est qu'il s'agit de quatre années tout à fait remarquables et qui resteront dans ma mémoire comme une période d'apprentissage, d'échange et d'enrichissement sur le plan scientifique.

Plusieurs raisons expliquent le bon déroulement et la relative sérénité dans laquelle j'ai accompli ma thèse. D'abord, des raisons matérielles comme le choix du laboratoire d'accueil pour réaliser ce travail. Le LEDSS restera pour moi un laboratoire de premier ordre dans lequel il est probablement plus facile qu'ailleurs de réaliser une thèse dans de bonnes conditions. Egalement, pour la diversité des équipements d'analyse (techniques spectroscopiques et optiques, stations de travail dédiées au calcul théorique) et surtout pour la qualité du personnel scientifique qui travaille dans le bâtiment et que l'on peut côtoyer au quotidien.

Il faut également souligner le caractère pluridisciplinaire de notre UMR dans laquelle les thématiques de recherches couvrent presque tous les domaines de la chimie (organique, inorganique, analytique, médicinale, théorique). De plus, mon travail de chimiste organicien s'est complètement intégré ou plutôt interfacé avec plusieurs disciplines analytiques et instrumentales et cela à travers des collaborations majeures : Celle avec l'équipe d'électrochimie CREAB du CEA de Grenoble, et dans le cadre du LEA, l'échange avec le Service de Chimie Organique et Photochimie de l'Université Libre de Bruxelles.

Tout cet environnement de travail et la diversité des chercheurs que j'ai rencontré font que la liste des personnes que je souhaite remercier est longue.

Comment débiter autrement qu'en remerciant Martine Demeunynck pour la qualité de son encadrement, sa confiance et la liberté qu'elle m'a laissé durant cette thèse. Martine, tu m'as toujours laissé orienter ce travail dans les directions qui m'intéressaient en me laissant un maximum d'autonomie et tu étais également toujours là pour répondre à mes interrogations. Pour moi il s'agit de la seule méthode pour qu'un étudiant apprenne à réfléchir, commette des erreurs, en tire les conséquences et enrichisse ces connaissances. Je te remercie en tout.

Yannick Vallée, ancien directeur du LEDSS et actuel président de l'Université Joseph Fourier.

Pascal Dumy, actuel directeur du LEDSS et plus particulièrement de l'Équipe d'Ingénierie Moléculaire et Chimie Bioorganique pour m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail dans d'excellentes conditions au sein de son groupe et pour avoir soutenu ma formation à travers des collaborations et la participation à des congrès locaux, nationaux et internationaux.

Les membres du jury qui se sont déplacés pour cette soutenance et plus particulièrement les rapporteurs qui ont passé beaucoup de temps à lire le manuscrit et évaluer ce travail. Dans un ordre dicté par l'éloignement géographique décroissant et donc les kilomètres parcourus pour assister à cette soutenance: F. Kirsch-De Mesmaeker, M.-P. Teulade-Fichou, P. Belmont, S. Cosnier, P. Dumy et M. Demeunynck.

Toute l'équipe du LEDSS V ainsi que le personnel en charge des services d'analyses du laboratoire: Nathalie Berthet (Bio), Sylvette Beyne (RMN), Didier Boturyn (Peptide), Miguel Calin (Peptide), Sabine Chierici (Peptide, Sucre), Jeff Constant (Bio) pour nos nombreuses discussions et l'initiation au gel d'électrophorèse, Eric Defrancq (Oligo), Catherine Fontaine (RMN) qui m'a souvent aidé en réalisant des manips à haut champ, Julian Garcia (RMN) pour ces conseils avisés et nos nombreuses discussions autour d'un spectre, Pierre Gaude (SM) qui a réalisé pour moi de nombreuses analyses, Béatrice Gennaro (RMN), Cécile Jamet (SM) pour son enthousiasme et sa rapidité, Muriel Jourdan (RMN et Spectroscopie d'absorption/émission) pour m'avoir souvent aidé, Mitsuharu Kotera (Synthèse), Jean Lhomme (Ancien directeur du LEDSS et de l'équipe 6), Elisabeth Loire notre indispensable et irremplaçable technicienne, Josette (RPE) et Pierre Michon (Chimie Analytique) pour l'aide en chimie analytique et interaction avec l'ADN, William Moneta (L'encyclopédie de l'enseignement) pour sa bonne humeur et sa patience face à mes nombreuses sollicitations, Duc Claude Morat (RMN), Martin Rasmussen (Floralis), Olivier Renaudet (Sucres et Peptides) qui m'a fourni plusieurs sucres modifiés, Vincent Steinmetz (SM) et Dédé Jeunet (RPE) avec qui j'ai réalisé plusieurs manips.

Nos secrétaires Véronique Gineste, Gisèle Girolet et Régine Lopez pour leur investissement et leur rapidité.

Les étudiants présents et passés du groupe : Adil, Antoine, Audrey, Bianca, Bob, Caroline, Cécile, Christian, Damien, Elisabeth, Franck, Gesa, Gunnar, Jésus, Joséphine, Mathilde, Mélanie, Myriam, Nabil, Om Prakash, Rodica, Sarah, Saulius, Sébastien, Sophie, Sumana, Sreedavie, Stéphanie, Thierry, Vincent, Virginie, Walid, Yashveer et Yoann.

Marie Louise Dheu pour sa bonne humeur, sa disponibilité en modélisation moléculaire et son aide à l'utilisation des stations de travail Unix. Anne Milet pour les calculs de DFT réalisés sur nos structures et sa grande disponibilité. Pedro Vatton, Denis Charapoff et Régis Gras du service informatique du LEDSS. Didier Gaudé pour sa confiance et les enseignements qu'il m'a confiés dans l'UFR de chimie. Claude Roux pour m'avoir confiés des enseignements au sein de l'IUT de mesures physiques.

L'équipe du CEA :

Pascal Mailley, mon aîné de dix ans (jour pour jour) qui a encadré la partie électrochimie de ce travail, m'a permis d'entrer au CEA et s'est démené pour que l'on réalise cette collaboration dans les meilleures conditions. Quand je constate son approche de la chimie qui s'intéresse tant au phénomène observé qu'à sa signification physique et sa manière d'enseigner intuitive et pédagogique, je me dis que le métier d'enseignant chercheur prend avec lui tout son sens. Merci Pascal.

La structure du SI3M ayant évolué au fil du temps, il me faut remercier dans l'ordre chronologique, Gérard Bidan et Stéphane Guillerez (EMSI) puis Thierry Livache (CREAB) pour leur accueil au DRFMC/SI3M. Egalement André Roger pour la synthèse d'oligonucléotides modifiés, Bruno Corso pour sa disponibilité (imagerie de fluorescence et électrospotting) et nos nombreuses discussions professionnelles et amicales, Bingquan qui a initié cette thématique de recherche au cours de son stage post doctoral et Elodie ma camarade de thèse au CEA.

L'équipe de l'ULB :

Fanny Kirsch pour sa façon de diriger son équipe et de considérer ses étudiants comme de véritables collaborateurs en les responsabilisant et en privilégiant échanges et discussions.

Cécile Moucheron pour son enthousiasme, sa disponibilité et son implication dans le travail que j'ai réalisé. Un grand merci à toutes les deux pour votre accueil et la facilité de mon intégration dans votre laboratoire.

Kristin Bartik pour notre discussion sur les bases de Tröger et la microcalorimétrie, Michel Luhmer pour le temps qu'il m'a consacré et les réponses qu'il m'a apporté en ce qui concerne la RMN des complexes de ruthénium.

La famille Ottinger pour leur accueil chaleureux qui a d'autant facilité mes séjours à Bruxelles.

Les étudiants du P2 : Arnaud qui a réalisé avec moi des mesures de durées de luminescence, Benoît, Benjamin, Etienne, Gilles, Julien, Nicolas qui m'a fourni le produit de départ pour la synthèse inorganique, Olivier qui m'a encadré pendant quasiment deux semaines alors qu'il préparait sa défense de thèse, Romain et Stéphanie.

Nos collaborateurs :

Alain Croisy et Danièle Carrez (Institut Curie, Orsay) pour les tests de cytotoxicité sur lignées cellulaires. Amélie Lansiaux (Laboratoire de Pharmacologie Anti-tumorale, Lille) pour les tests d'inhibition d'enzymes et l'étude sur ADN. Elisabeth Davioud (Centre de Biochimie, Heidelberg) pour notre discussion suite à la conférence qu'elle a réalisée au LEDSS et les tests antipaludiques de nos composés. Serge Cosnier (Laboratoire d'Electrochimie LEOPR, Grenoble) pour notre discussion à la journée de printemps 2005 de la SFC qui marque le début d'une collaboration. Jérôme Lacour et Richard Frantz (Département de Chimie Organique, Genève) qui m'ont reçu une journée dans leur équipe et fourni des produits pour les tentatives de séparations énantiosélectives.

Comment finir sans remercier ma famille, mes parents et surtout mon épouse qui m'ont toujours soutenu et aidé, et sans qui je n'en serais probablement pas là aujourd'hui.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I.	Le Cancer : Généralités – Chimiothérapie.	1
1.	Généralités sur le Cancer.	1
2.	Modes d'action des principaux médicaments.	3
2.1	Les antimétabolites.	3
2.2	Les Alkylants.	5
2.3	Interactions non covalentes avec l'ADN : Inhibiteurs de processus enzymatiques.	6
2.4	Les agents intercalants.	9
2.5	Agents de coupure de l'ADN.	10
2.6	Poisons du fuseau cellulaire.	10
3.	La chimio-résistance.	11
3.1	Mécanismes pharmacocinétiques.	11
3.2	Mécanismes pharmacodynamiques.	11
3.3	Résistance MDR (MultiDrug Resistance).	12
II.	Les pyridoacridines.	13
1.	Activité biologique des pyridoacridines.	14
1.1.	Activité antibactérienne & anti-fongique.	14
1.2.	Activité antivirale.	15
1.3.	Activité anti-parasitaire.	16
1.4.	Activité insecticide.	17
1.5.	Activité antitumorale.	17
2.	Mécanisme d'action.	19
2.1.	Interaction avec l'ADN.	20
2.2.	Inhibition de la synthèse de macromolécules.	20
2.3.	Inhibition des topoisomérases.	21
2.4.	Inhibition de Télomérase.	22
2.5.	ROS (Reactive Oxygen Species).	23
2.6.	Autres activités.	24
3.	Biosynthèse.	24
4.	Synthèse des pyridoacridines.	25
4.1.	Cystodamine.	25

4.2.	Ascididémine.	26
4.3.	Arnoamines.	27
5.	Isomérisation de position.	28
6.	Objectifs du travail.	30
6.1.	Réactivité et fonctionnalisation des pyridoacridines.	30
6.2.	Synthèse de structures polycycliques aromatiques.	30
6.3.	Etude des propriétés physicochimiques et biologiques.	31
6.4.	Utilisation de marqueurs rédox pour la détection de l'hybridation de l'ADN.	31
6.5.	Utilisation des ligands heptacycliques pour la chélation du ruthénium (II).	32
7.	Bibliographie.	32

PARTIE SYNTHÈSE ORGANIQUE

I.	Travaux antérieurs.	37
II.	Synthèse en série 9-Chloro-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one.	39
1.	Addition de thiols.	39
2.	Addition d'amines.	44
	Approche théorique.	
3.	Synthèse de Bis-pyridoacridone.	47
4.	Addition d'oxy-amine.	48
5.	Réduction de la fonction quinone.	49
III.	Synthèse en série 9-Chloro-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine.	51
1.	N-Alkylation.	51
2.	Formylation.	53
	Approche théorique.	
3.	Fonctionnalisation de l'aldéhyde.	54
3.1	Réduction de l'aldéhyde.	55
	Autoxydation de l'alcool 26.	
3.2	Lien imine et amine.	59
3.3	Lien oxime.	60

4.	Réactivité des oxyiminopyridoacridines.	63
IV.	Synthèse en série 9-Amino-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine.	64
V.	Synthèse de dérivés polycycliques polyazotés plans étendus.	66
1.	Contexte.	66
2.	Première stratégie.	68
3.	Seconde stratégie : Intermédiaire Diaminopyridoacridine.	76
	Utilisation du Polymethylhydrosiloxane (PMHS) en présence de Pd/C.	
	Réduction au dithionite de sodium.	
VI.	Bibliographie.	82

PARTIE PROPRIETES ET APPLICATIONS

I.	Propriétés biologiques et physicochimiques des pyridoacridines.	85
1.	Cytotoxicité.	85
1.1.	Résultats en série pyridoacridone.	85
1.2.	Résultats en série pyridoacridine.	87
2.	Spectroscopie d'absorption électronique.	88
2.1.	Caractérisation de la pyridoacridine 3 et des pyridoacridones.	88
2.2.	Caractérisation des bis-intercalants 17 et 18.	91
3.	Caractérisation en Spectroscopie d'émission.	93
4.	Mesure de pKa.	94
5.	Mesure de la constante d'association Drogue-ADN.	96
6.	Propriétés de l'octacycle 61.	99
7.	Activité anti-parasitaire.	101
II.	Electrochimie des Pyridoacridones et élaboration d'un biocapteur à ADN.	103
1.	Introduction.	103
1.1.	Contexte de l'étude.	103
1.2.	Généralités sur les biocapteurs.	103
1.2.1.	Principe de fonctionnement.	104
1.2.2.	Elaboration des biocapteurs à ADN.	106

1.2.3.	Différents modes de transduction.	108
1.3.	La détection électrochimique.	109
2.	Caractérisation électrochimique des nouveaux intercalants.	111
2.1.	Cellule électrochimique.	111
2.2.	Caractérisation électrochimique de 12 en solvant organique.	112
2.3.	Caractérisation par voltamétrie cyclique de 12 dans H ₂ O.	114
2.3.1.	Influence du pH.	114
2.3.2.	Adsorption.	115
2.4.	Electrolyse quantitative et spectroscopie d'absorption de 12.	116
2.5.	Caractérisation des autres intercalants.	117
2.5.1.	Caractérisation par voltamétrie cyclique des intercalants.	118
2.5.2.	Etude électrochimique du dérivé soufré 7.	120
2.6.	Etude des limites de détection.	121
3.	Essais préliminaires à l'application biocapteur (faisabilité).	123
3.1.	Interaction de l'intercalant avec l'ADN.	123
3.2.	Etude des cinétiques d'interaction.	125
3.3.	Comparaison avec la Doxorubicine.	127
3.4.	Influence de la concentration en intercalant.	129
4.	Elaboration du Biocapteur et détection de l'hybridation de l'ADN.	130
4.1.	Immobilisation des sondes oligonucléotidiques.	130
4.1.1.	Electropolymérisation du pyrrole.	130
4.1.2.	Immobilisation des oligonucléotides dans le polypyrrole.	132
4.2.	Procédure expérimentale.	132
4.2.1.	Synthèse des oligonucléotides.	132
4.2.2.	Cellule électrochimique.	134
4.2.3.	Electrosynthèse de films copolymères de py et py-ODN (électrode ADNsb).	134
4.2.4.	Adsorption de 12 pour obtenir le courant de fond (électrode ADNsb/12).	135
4.2.5.	Hybridation et dénaturation (électrode ADNdb).	135
4.2.6.	Intercalation de 12 sur la surface de l'électrode (électrode ADN db/12).	135
4.2.7.	Mesures électrochimiques.	135
4.2.8.	Expériences de fluorescence.	136

4.3.	Résultats et discussion.	136
5.	Du macrocapteur au microcapteur, vers la miniturisation.	145
6.	Conclusion.	148
III.	Complexes de ruthénium.	150
1.	Introduction.	150
1.1.	Généralités.	150
1.2.	L'ADN et les complexes du Ruthénium (II).	151
1.3.	Objectif.	153
2.	Résultats et discussion.	154
2.1.	Synthèse et caractérisation.	154
2.2.	Electrochimie.	156
2.3.	Propriétés en absorption et émission radiatives.	158
2.4.	Affinité pour l'ADN.	165
2.5.	Interaction avec l'ADN sous illumination.	166
IV.	Bibliographie.	169

CONCLUSION

PARTIE EXPERIMENTALE

I.	Partie synthèse organique.	183
II.	Partie Complexes de ruthénium.	217
III.	Bibliographie.	222

ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénosine TriPhosphate
Aux : électrode Auxiliaire ou contre-électrode
AZT : AZidoThymidine
Bet : Bromure d'éthidium
bpy : 2,2'-bipyridine
c : concentration
CAN : Cerium Ammonium Nitrate
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CEA : Centre de l'Energie Atomique
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
COSY : COrelated SpectroscopY
CV : Cyclic Voltametry
CVFF : Consistent-Valence Forcefield
db : double brin
DCI : Desorption Chemical Ionisation
déc. : décomposition
DEPT : Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfert
DFT : Density Functional Theory
DMF : DiMéthylFormamide
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
dppz : dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phénazine
dpq : dipyrido-[3,2-d:2',3'-f]-quinoxaline
DPV : Differential Pulse Voltametry
DTT : DiThioThreitol
E : Potentiel
E. coli : *Escherichia coli*
ECS : Electrode au Calomel Saturé
EDTA : Ethylene Diamine Tetra-Acetic
ESH : Electrode Standard à Hydrogène
ESMS : ElectroSpray Mass Spectrometry
eV : électron Volt
F : températures de Fusion

G2/M : Phases G2 et M du cycle cellulaire
HAT : 1,4,5,8,9,12-HexaAzaTriphénylène
HIV : Human Immunodeficiency Virus
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSAB : Hard Soft Acid Base
HSV : Herpes Simplex Virus
I : Intensité
IC : Ionisation Chimique
IC₍₅₀₎ : Inhibition de Cytotoxicité (de 50%)
IE : Impact Electronique
IES : Ionisation ElectroSpray
LC : Lethal Concentration / Ligand Centred
LEA : Laboratoire Européen Associé
LEDSS : Laboratoire d'Etudes Dynamique et Structurale de la Sélectivité
LEMSI : Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire et des Structures aux Interfaces
LLCT : Ligand to Ligand Centred Transition
LRP : Lung Resistance Protein
MDR : MultiDrug Resistance
MICAM : Micro Capteurs pour l'Analyse Médicale
MLCT : Metal to Ligand Centred Transition
MM2 : Molecular Mechanics version 2
MRP : Multidrug Resistance-associated Protein
NOE : Nuclear Overhauser Effect
NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ODN : OligoDésoxuriboNucléotide
OGM : Organisme Génétiquement Modifié
OM : Orbitales Moléculaires
OM BV : Orbitale Moléculaire la plus Basse Vacante
OM HO : Orbitale Moléculaire la plus Haute Occupée
PBS : Phosphate Buffer Salt
PHEHAT : 1,10-Phénantrolino[5,6-b]-1,4,5,8,9,12-HexaAzaTriphénylène
phen : 1,10-phénantroline
PMHS : PolyMethylHydroSiloxane

Ppy : Polypyrrole
py : pyrrole
Rend. : Rendement
Ref : électrode de Référence
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS : Reactive Oxygen Species
RPE : Résonance Paramagnétique Electronique
RRE : Rev-Response-Element
sb : simple brin
SM : Spectrométrie de Masse
SPC : Single Photon Counting
SPRi : imagerie de Résonance des Plasmons de Surface
TAP : 1,4,5,8-TetraAzaPhénanthrène
TAPTP : 4,5,9,18-TétraAzaPhénanthréno[9,10-b]TriPhénylène
TBAP : TétraButylAmmonium hexafluoroPhosphate
TFA : TriFluoroacétique Acid
THF : TétraHydroFuranne
™ : Trade Mark
TOCSY : Total COrrrelation SpectroscopY
Topo : Topoisomérase
TP : Tampon Phosphate
tpphz : tétrapyrindophénazine
TRIS : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
SE_{Ar} : Substitution Electrophile Aromatique
SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficiency humaine Acquis
sp. : sponge
SWV : Square Wave Voltametry
ULB : Université Libre de Bruxelles
UV : UltraViolet
VC : Voltamétrie Cyclique
W : électrode de travail

INTRODUCTION

I. Le Cancer : Généralités – Chimiothérapie.

1. Généralités sur le Cancer.

Le cancer est le résultat de la prolifération anarchique de cellules anormales de l'un de nos organes ou tissus. Les tumeurs qui en résultent sont dites malignes quand ces cellules peuvent essaimer dans l'organisme. Quand une telle cellule arrive dans un organe à distance, elle peut : Soit être acceptée et se multiplier en donnant une tumeur « fille », cette tumeur secondaire est appelée métastase de la tumeur de départ, dite primitive ; soit être détruite par le système de défense immunitaire.

Pour devenir cancéreuse, une cellule doit subir des transformations successives, et chaque division cellulaire peut entraîner la mort de la cellule anormale, et par conséquent l'arrêt du processus cancéreux.

Quand une cellule anormale se divise, elle est l'origine d'un clone tumoral, qui peut encore être éliminé par le système immunitaire. Si rien n'arrête la prolifération de la cellule cancéreuse, elle va se diviser avec un rythme de doublement moyen compris entre 60 et 100 jours. La longue « vie cachée » du cancer et la diminution des défenses immunitaires avec le temps expliquent l'augmentation statistique de l'incidence des cancers au cours de la vie. C'est pourquoi la cancérologie se trouve aujourd'hui confrontée à un double enjeu : D'une part, le diagnostic doit gagner en précocité et de nouveaux outils doivent être développés dans ce sens ; et d'autre part, l'arsenal thérapeutique dont nous disposons doit gagner en potentialité, diversité et spécificité tout en limitant les effets secondaires liés à l'utilisation de produits toxiques pour l'organisme.

Selon de nouvelles estimations parues dans un rapport publié en février 2005¹, l'Europe totalisait l'année dernière 2,9 millions de nouveaux cas de cancer et plus de 1,7 millions de décès par cancer. Les auteurs avertissent que le vieillissement de la population européenne se traduira inévitablement par une augmentation de ces chiffres, même si les taux d'incidence et de mortalité pour les différentes classes d'âge demeurent constants.

Les hommes représentaient 54 % des nouveaux cas (1 534 700) et 56 % des décès (962 600). En dépit du recul du cancer de l'estomac et des progrès réalisés par le dépistage et

¹ P. Boyle, J. Ferlay. *Annals of Oncology*, **2005**, 16, 481-488.

les traitements, le cancer demeure donc un important problème de santé publique dans l'ensemble de l'Europe.

Globalement, le cancer du poumon était la forme la plus fréquente de cancer diagnostiquée (13,2 %) et de décès par cancer (20 %). Bien que le cancer colorectal soit presque aussi fréquent (13 %), il entraîne une plus petite proportion de décès (11,9 %).

Chez les femmes, le cancer du sein était de loin le plus fréquent, avec 27,4 % de tous les cas et le tueur N°1, avec presque 130 000 décès, soit 17,4 % du total. Un cancer sur huit en Europe était un cancer du sein : ce cancer représentait 7,6 % de tous les décès par cancer. Le cancer de l'estomac recule dans tous les pays, mais il représente toujours 5,9 % des nouveaux cas et 8,1 % des décès par cancer.

Chez les hommes, le cancer du poumon était le plus fréquent, suivi du cancer de la prostate (238 000 nouveaux cas, soit 15,5 % des cancers diagnostiqués chez les hommes).

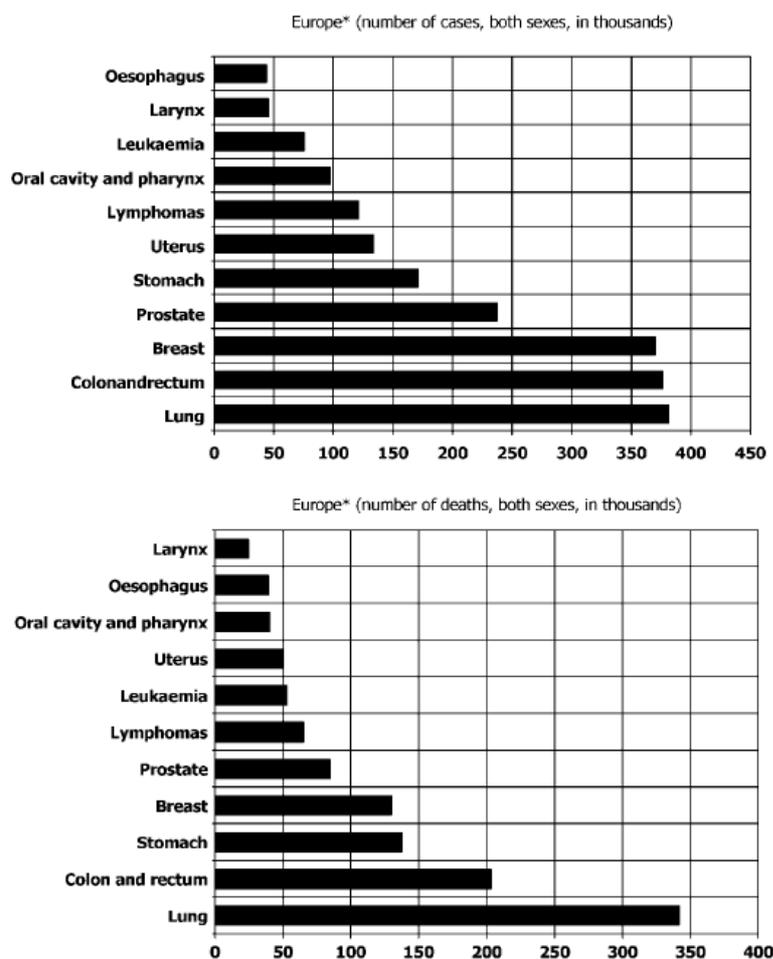


Figure 1 : Statistiques en Europe sur le nombre de cancers déclarés et la mortalité associée ¹.

Il faut signaler que les perspectives sont encourageantes pour ce qui concerne le dépistage du cancer du sein en termes de réduction de la mortalité, les progrès sont en revanche trop lents pour ce qui est de la prévention du cancer colorectal.

Une large majorité des cancers du poumon est provoquée par le tabagisme et la lutte contre le tabac est manifestement une priorité, avec pour cible non seulement les hommes, mais également de plus en plus les femmes.

2. Modes d'action des principaux médicaments.

On distingue plusieurs classes de médicaments utilisés en chimiothérapie anticancéreuse, selon leurs mécanismes d'action et leur cible cellulaire. Nous allons présenter les classes les plus importantes.

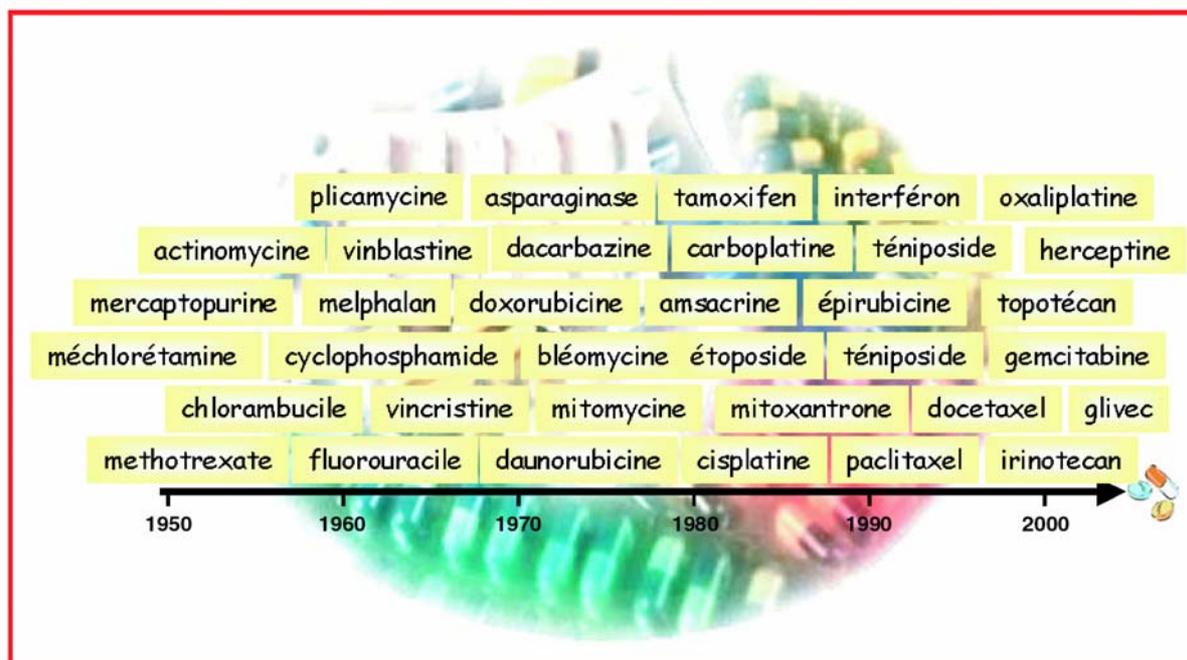


Figure 2 : L'arsenal thérapeutique du chimiothérapeute².

2.1. Les antimétabolites.

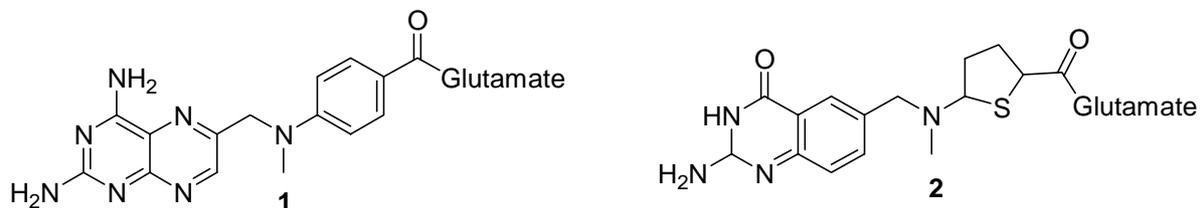
Ils inhibent la synthèse des acides nucléiques, première étape nécessaire à toute multiplication cellulaire. On peut classer ces antimétabolites en deux sous classes :

2.1.1. Les inhibiteurs d'enzymes indispensables à la vie cellulaire, dont le prototype est le Méthotrexate **1**. Ce dernier inhibe la synthèse de l'acide folinique indispensable pour la

² C. Bailly. *L'actualité chimique*, 2003, nov.-déc., 118-122.

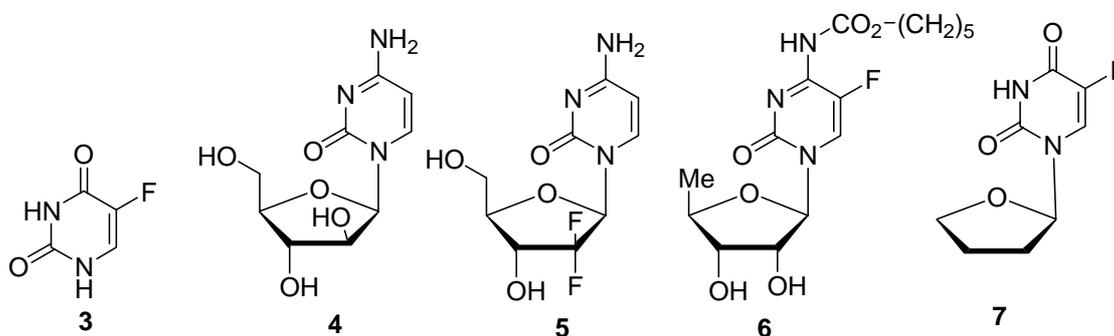
synthèse des bases nucléiques (uridine et thymidine) en se recombinaut à la dihydrofolate réductase.

Pour information, il existe aujourd'hui un analogue antifolique du Méthotrexate, le Raltitrexed **2** (TomudexTM) dont l'indication principale est constituée par les tumeurs digestives.



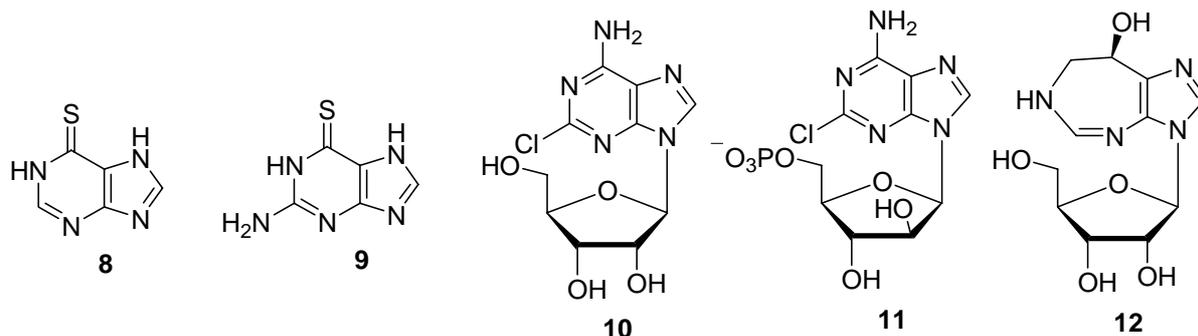
2.1.2. Les substances leurre qui en raison d'une structure chimique semblable à celle de composants métaboliques intermédiaires, sont acceptées comme substrats, et inhibent la biosynthèse des acides nucléiques.

Les anti-pyrimidiques sont des médicaments dont la structure ressemble à celle de la cytosine, la thymine ou l'uracile. Nous pouvons citer la 5-Fluoro-Uracile **3** et le Cytosine Arabinoside **4**, et d'autres molécules plus récentes (Gemcitabine **5**, Capécitabine **6** et Tégafur **7**).



Les anti-puriques vont ressembler à la guanine ou à l'adénine. Les plus classiques sont la 6-Mercapto-Purine **8** et la Thio-Guanine **9** mais on peut également citer d'autres produits découverts plus récemment et d'activité plus variée (Cladribine **10**, Fludarabine **11** et Pentostatine **12**).

La limitation de cette stratégie découle du niveau de dosage indispensable pour saturer les métabolites cellulaires.

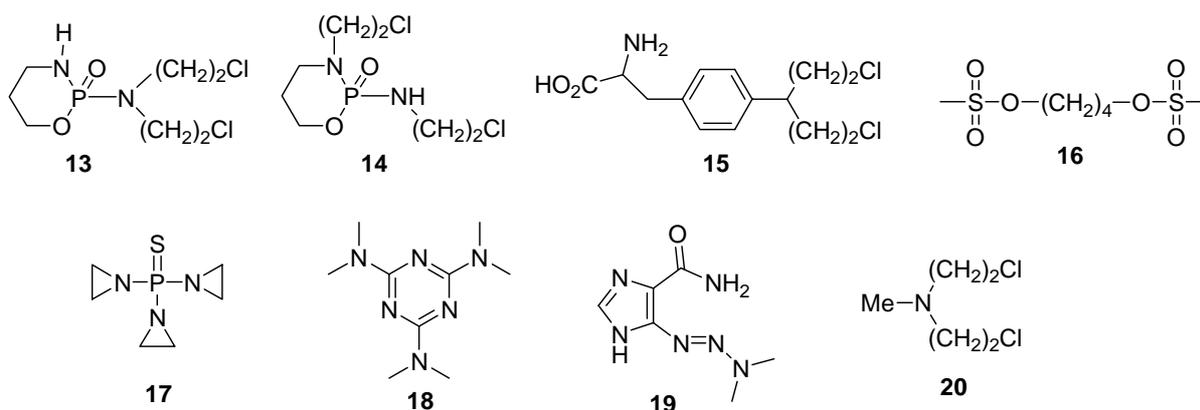


2.2. Les Alkylants.

Ces substances créent un lien chimique covalent fort avec un ou plusieurs groupements d'un acide nucléique. Lors de la division cellulaire, le dédoublement des deux brins d'ADN devient difficile, et surtout, la transcription est arrêtée au niveau de l'agent alkylant, aboutissant au blocage de la division cellulaire.

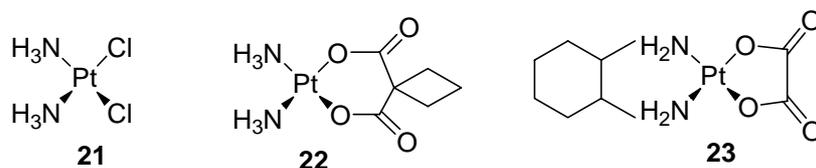
On distingue des agents alkylants mono-fonctionnels, c'est à dire n'ayant qu'un seul lien chimique avec l'ADN, et les agents bi-fonctionnels qui créent des ponts intra- ou inter-brins au sein de l'ADN (agents réticulants).

2.2.1. Les alkylants mono-fonctionnels : Nous pouvons citer à titre d'exemples le cyclophosphamide (EndoxanTM) **13**, l'ifosfamide (HoloخانTM) **14**, le melphalan (AlkérانTM) **15**, le busulfan (MisultanTM) **16**, le triphosphoramine (ThiotépaTM) **17**, l'hexaméthyl-mélanine (HexastatTM) **18**, la dacarbazine (DéticèneTM) **19** et la chlorométhine (CaryolysineTM) **20**. Certains de ces produits ont souvent en plus une action anti-enzymatique, plus ou moins bien définie, élargissant leur mode d'action probable.

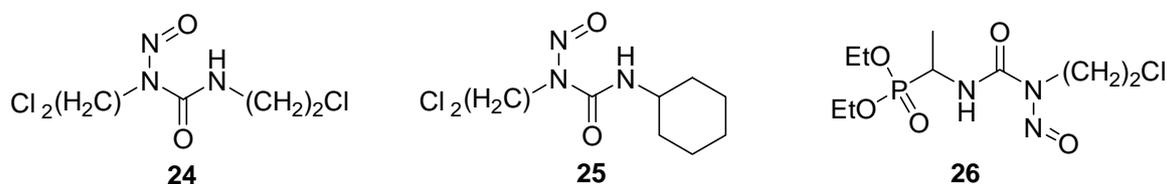


2.2.2. Les sels de platine se fixent essentiellement par leurs atomes de chlore au niveau de l'azote N-7 des guanines et forment des ponts entre les brins d'ADN. L'effet toxique est corrélé au nombre de ponts inter-brins observés, qui peuvent demander plusieurs heures à être

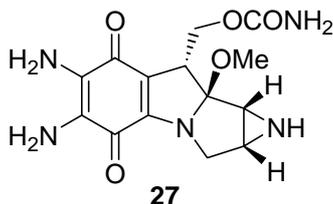
formés et sont ensuite réparés très lentement. Les trois sels de platine utilisés couramment sont le cisplatine (CisplatylTM) **21**, le paraplatine (CarboplatineTM) **22** et l'oxaliplatine (EloxatineTM) **23**.



2.2.3. Les nitrosourées sont des molécules liposolubles qui pourraient pénétrer le système nerveux central, et ont une petite activité sur les tumeurs cérébrales. Les principaux médicaments utilisés en clinique sont : la carmustine (BICNUTM) **24**, la lomustine (BélustineTM) **25** et la fotémustine (MuphoranTM) **26**.



2.2.4. La mitomycine (AmétycineTM) exerce probablement son action par une activité alkylante. Elle est capable de former des ponts intra- ou inter-brins dans l'ADN.



2.3. Interactions non covalentes avec l'ADN : Inhibiteurs de processus enzymatiques.

L'ADN présente une topologie bien particulière. D'abord, une structure primaire constituée par l'enchaînement de ses bases nucléiques. Ensuite, une structure secondaire constituée des ponts par liaisons hydrogènes entre ses deux chaînes. Et finalement, un enroulement sur lui-même assez spécifique et mobile, constituant la structure tertiaire, et dont la configuration et l'intégrité sont indispensables à la transcription. Cette structure tertiaire est contrôlée par des enzymes de régulation : Les topoisomérases ³.

³ J. J. Champoux. *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, 70, 369-413.

2.3.1. Topoisomérase I : Les topoisomérases de type I, qui sont ATP indépendantes, coupent un seul brin d'ADN qui peut alors tourner autour du second brin comme illustré ci dessous. Ce processus permet le relâchement des brins d'ADN.

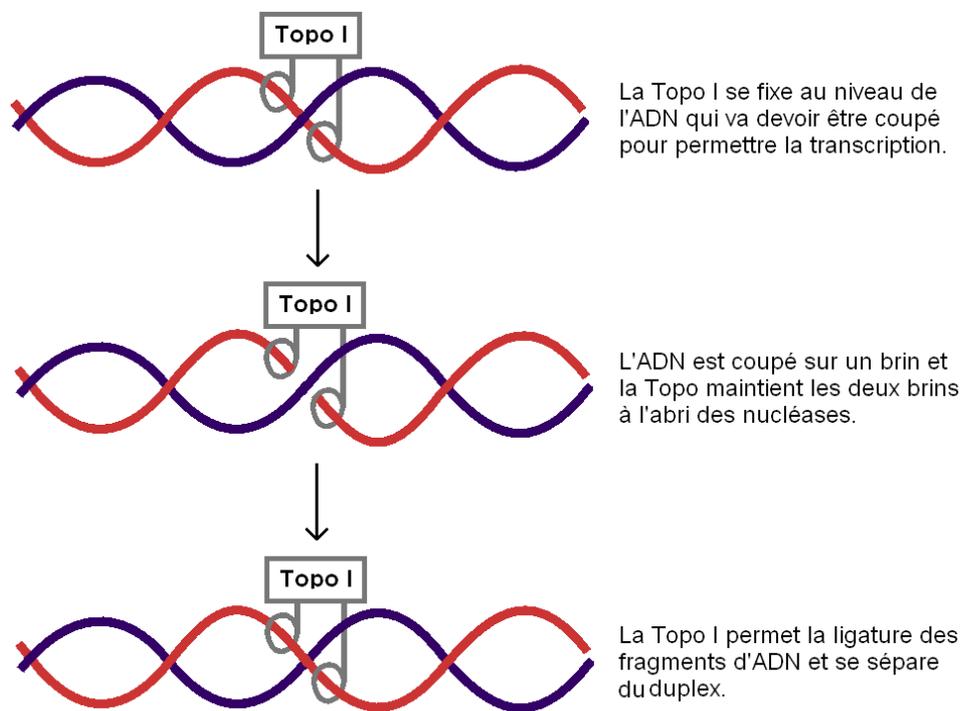
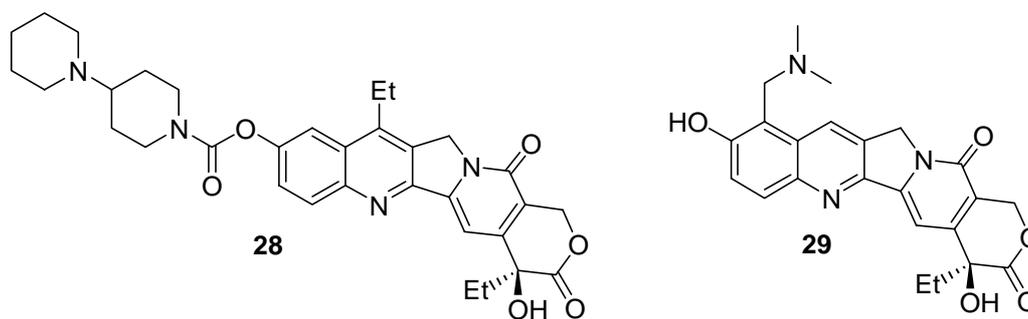


Figure 3 : Mécanisme de la Topoisomérase I.

Il existe actuellement deux médicaments capables d'interférer avec ce processus, l'Irinotécan (Campto™) **28** et le Topotécan (Hycamtin™) **29**. L'action des anti-topoisomérases de type I consiste à empêcher la reconstitution du brin d'ADN après la coupure, inhibant ainsi la synthèse correcte d'ADN.



2.3.2. Topoisomérase II : Les topoisomérases de type II, qui sont ATP dépendantes, catalysent la coupure simultanée des deux brins d'ADN et le passage d'une hélice d'ADN à

travers l'autre, ce qui assure le désenroulement de la double hélice d'ADN comme on peut le voir dans la figure suivante.

La présence d'une molécule agissant sur la topoisomérase II aboutit à la rupture des brins d'ADN, puisque ceux-ci ne peuvent plus être ressoudés (Figure 4).

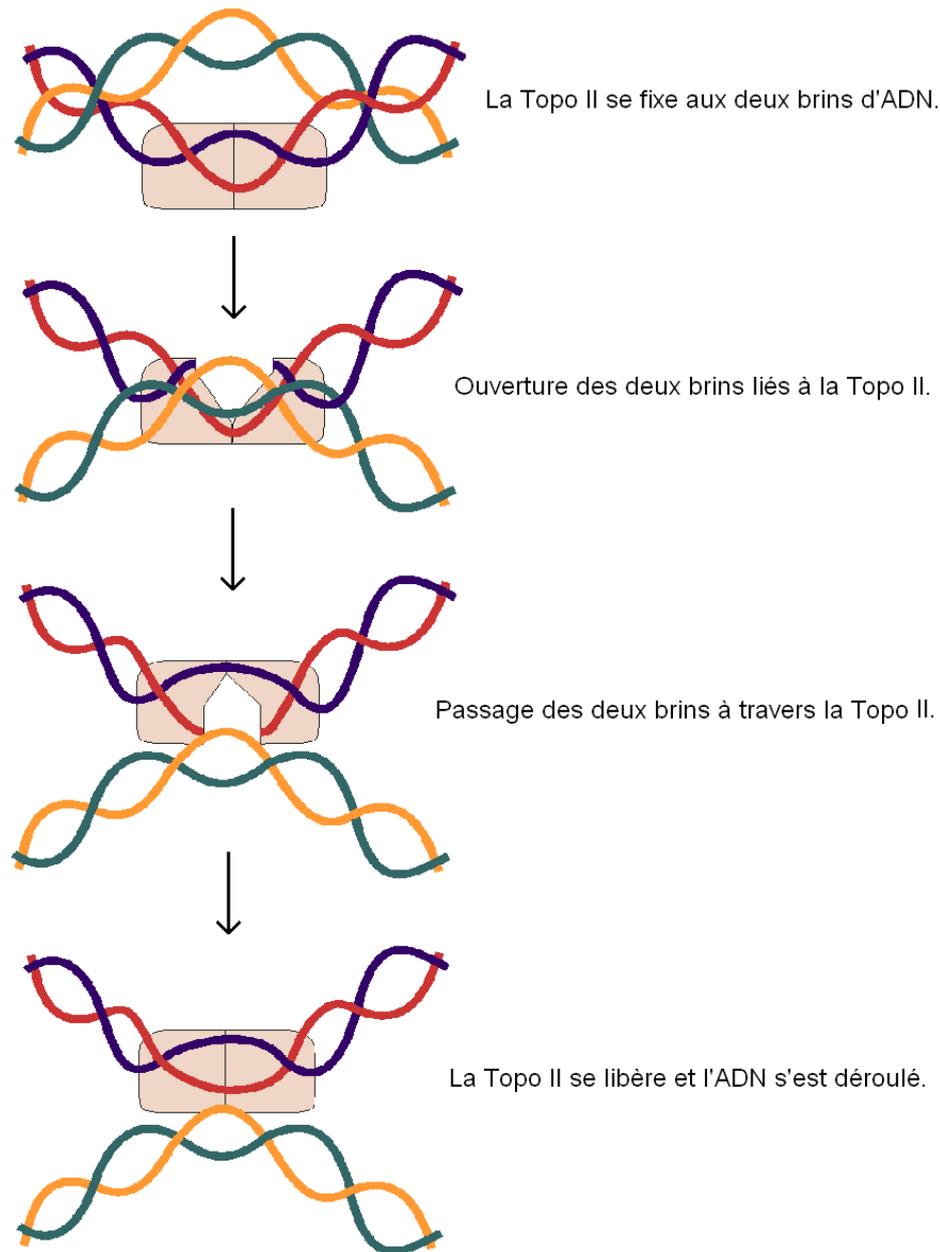
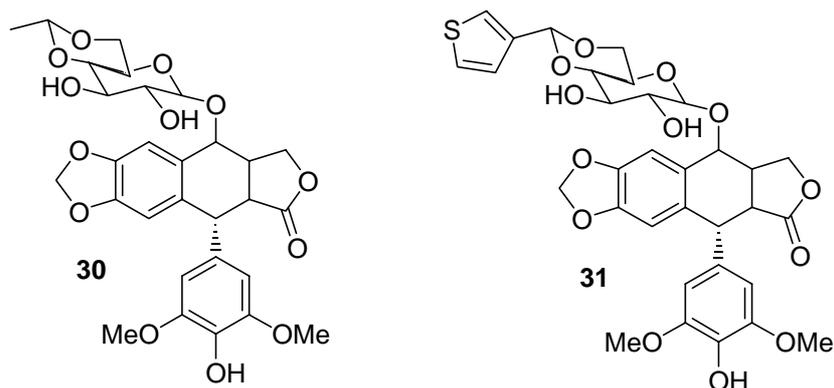


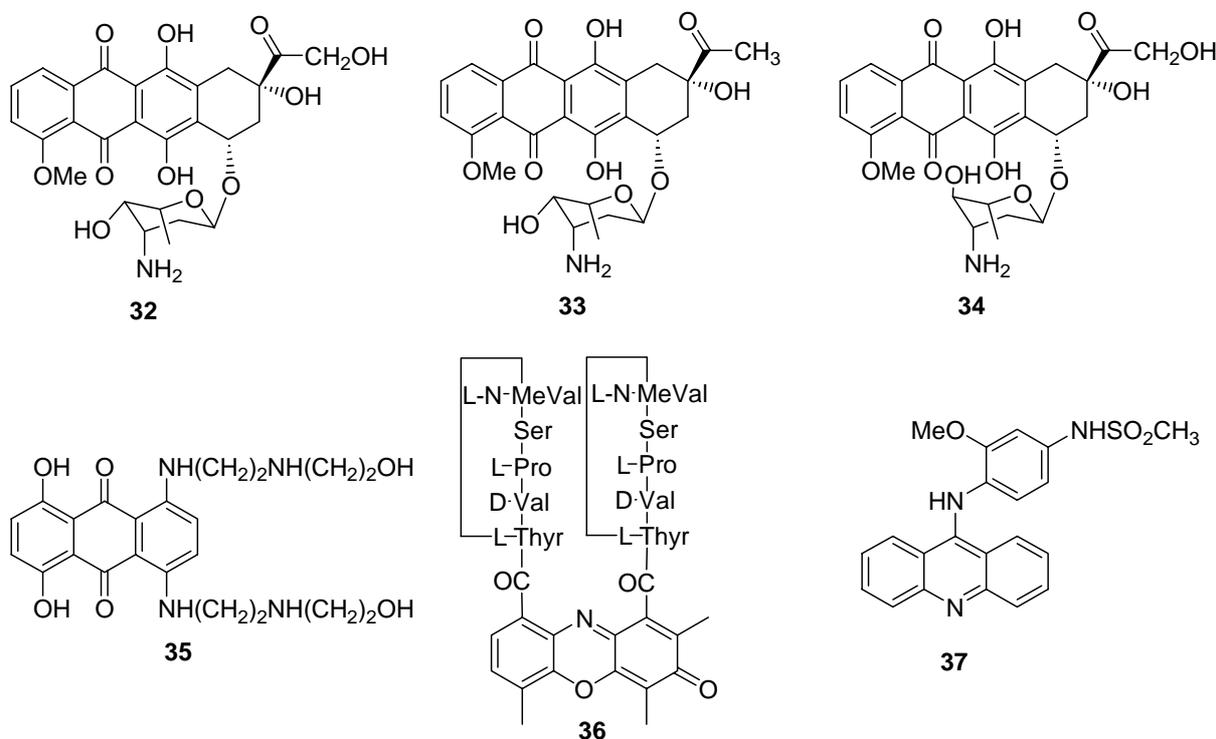
Figure 4 : Mécanisme de la Topoisomérase II.

Parmi les nombreuses molécules agissant sur la Topo II, le VP-16 ou étoposide (Vepeside[®]) **30** et le VM-26 ou téniposide (Vehem[®]) **31**. Ces deux composés sont des alcaloïdes dérivés des podophyllotoxines de la mandragore. Le VP-16 est un des médicaments les plus utilisés en chimiothérapie cancérologique.



2.4. Les agents intercalants.

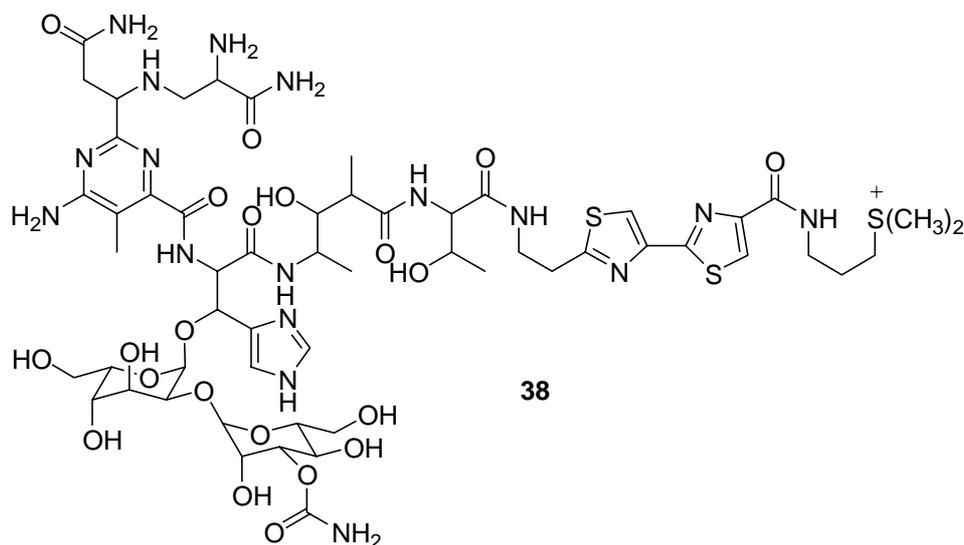
Le mécanisme supposé initial de cette famille de produits est une intercalation entre les brins d'ADN du fait de leur structure plane. Certains produits sont des dérivés de la famille des anthracyclines comme la doxorubicine (AdriamycineTM) **32**, la daunomycine (CerubidineTM) **33** ou l'épirubicine (FarmorubicineTM) **34**. Le mitoxantrone (NovantroneTM) **35**, l'actinomycine D (DactinomycineTM) **36** et l'amsacrine (AmsidineTM) **37** appartiennent aussi à cette classe des composés intercalants.



En fait, il semble que l'intercalation seule ne puisse pas rendre compte de l'activité biologique de ces molécules. Le mécanisme d'action le plus probable des intercalants implique probablement des enzymes comme par exemple les topoisomérases.

2.5. Agents de coupure de l'ADN.

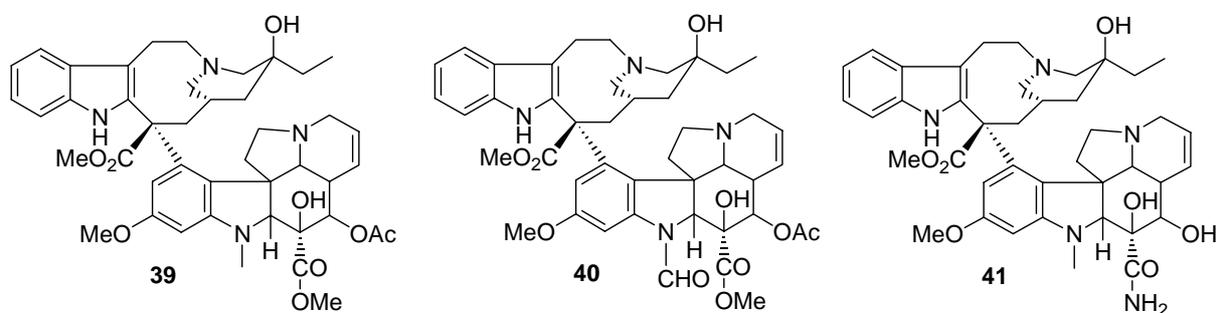
Le seul médicament qui semble avoir une action destructive directe sur l'ADN est la bléomycine (BléomycineTM) **38**. Son mode d'action met en jeu des coupures dans l'ADN qui sont formées selon un mécanisme radicalaire.



A côté des molécules agissant directement ou indirectement sur les acides nucléiques, on trouve des molécules actives sur d'autres processus biologiques.

2.6. Poisons du fuseau cellulaire.

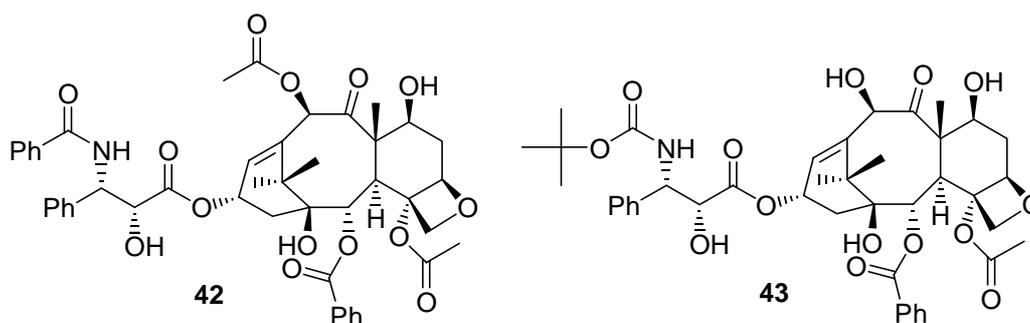
Ces substances agissent pendant la mitose elle-même, quand les chromosomes dédoublés doivent migrer le long des tubules du fuseau cellulaire vers un de ces pôles, avant la séparation des cellules filles. On peut citer la vincalécoblastine (Velbé[®]) **39**, la vincristine (Oncovin[®]) **40**, la vindésine (Eldésine[®]) **41**.



Les taxanes présentent un mécanisme d'action différent : ils entraînent un rassemblement et une stabilisation des microtubules cellulaires, normalement en équilibre avec la tubuline

soluble. Un certain nombre de fonctions cellulaires vitales sont ainsi perturbées : Mitose, maintenance de la morphologie cellulaire, formation des neurones. Les cellules sont arrêtées dans leur division en G2 + M.

Deux drogues sont aujourd'hui à la disposition des cliniciens : Le paclitaxel (TaxolTM) **42** et le docétaxel (TaxotèreTM) **43**.



3. Chimiorésistance.

L'efficacité de la chimiothérapie est limitée par les phénomènes de résistance. Les cellules cancéreuses possèdent ou acquièrent la possibilité de contourner les mécanismes d'action des médicaments utilisés en chimiothérapie.

Certains types de cancers sont naturellement résistants à de nombreux médicaments comme par exemple les cancers du rein ou de la thyroïde. D'autres cancers sont dans un premier temps sensibles mais développent des capacités de résistance en cours de traitement. Plusieurs mécanismes peuvent rendre compte de ce phénomène de résistance.

3.1. Mécanismes pharmacocinétiques.

Le médicament pour être efficace doit atteindre la tumeur en quantités suffisantes. Cette pharmacocinétique dépend de multiples facteurs tels que les caractéristiques du produit, de la tumeur ou de l'organe atteint, ou encore la variabilité individuelle du patient.

3.2. Mécanismes pharmacodynamiques.

Plusieurs mécanismes sont évoqués.

Diminution de l'entrée : Certains médicaments ont besoin d'un transporteur pour pénétrer dans la cellule, et la perte d'activité d'un transporteur entraîne une résistance vis à vis de l'activité anti-tumorale.

Augmentation de la sortie : Plusieurs transporteurs membranaires vont expulser le médicament de la cellule comme la glycoprotéine P ou les protéines MRP et LRP.

3.3. Résistance MDR (MultiDrug Resistance).

Elle concerne les médicaments d'origine naturelle comme les anthracyclines, alcaloïdes de vinca, taxanes, épipodophylotoxines. Le principal transporteur de ces médicaments est la glycoprotéine P, codée par le gène MDR1. Certaines tumeurs présentent des taux naturellement élevés de glycoprotéine P, notamment celles du côlon, pancréas, sein et les hépatocarcinomes. D'autres expriment des taux initialement faibles qui augmentent en cours de traitement : Estomac, ovaire, poumon, sarcomes, lymphomes.

Métabolisme intracellulaire du médicament : Le médicament une fois arrivé dans la cellule doit être transformé pour devenir actif puis pour être éliminé par la cellule. La modification de ces mécanismes entraîne une résistance cellulaire.

Réduction de l'activation du médicament : La réduction ou la perte d'activité de systèmes enzymatiques ou métaboliques provoque l'apparition de résistances à la chimiothérapie. Par exemple, le polyglutamation qui transforme le méthotrexate **1** en forme active ou les cytochromes P-450 hépatiques qui activent le cyclophosphamide **13**.

Inactivation spécifique par hyperactivité enzymatique : La fluorouracile **3** est inactivée par la dihydropyrimidine déshydrogénase. La bléomycine **38** est inactivée par les hydrolases.

Accroissement de la réparation des lésions de l'ADN : Les anomalies induites par le médicament sont réparées par amplification des mécanismes de réparation (cas du cisplatine **21**).

Le phénomène de chimio-résistance minimise l'action des médicaments utilisés en chimiothérapie et oblige les chercheurs à trouver en permanence de nouveaux produits actifs et/ou de nouvelles cibles cellulaires.

II. Les pyridoacridines.

Durant les trente dernières années, l'intérêt accru des biochimistes pour les produits naturels d'origine marine a entraîné la découverte de nombreux nouveaux composés.

Les études ont prouvé que certains organismes marins, en particulier les invertébrés tels que les éponges, les coraux, les anémones et les mollusques produisent beaucoup de métabolites secondaires inconnus en dehors de la biosphère marine.

Le premier alcaloïde de type pyridoacridine, l'amphimédine **44**, a été isolé en 1983 de l'*Amphimédon* sp., une éponge du Pacifique par Schmitz, Shoolery et collaborateurs⁴. La structure, et en particulier la connectivité des atomes de carbone a été déterminée sans ambiguïté grâce à des expériences de RMN 2D INADEQUATE (couplage ¹³C-¹³C en J₁).

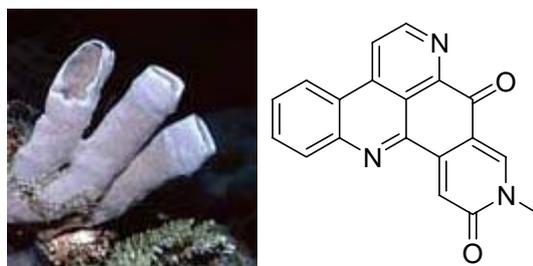


Figure 5 : Photographie de l'éponge *Amphimédon* sp. et structure de l'amphimédine **44**.

Les Pyridoacridines sont extraites de mollusques marins, d'éponges et d'ascidies. Actuellement, plus d'une centaine de composés hétéroaromatiques polycycliques appartenant à cette famille sont connus⁵.

Les pyridoacridines naturelles sont basés sur le squelette pyrido[2,3,4-kl]acridine. La structure de base est donc un tétracycle aromatique plan. Plusieurs composés de cette famille dérivent de l'imino-quinone correspondante représentée ci-dessous.

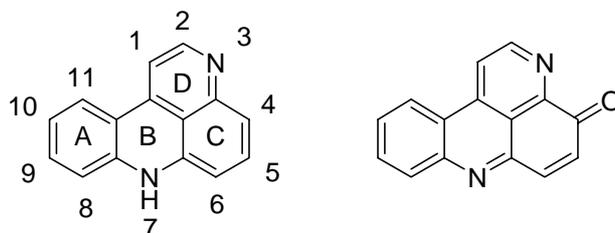


Figure 6 : Squelettes des alcaloïdes marins pyrido[2,3,4-kl]acridine.

⁴ F. J. Schmitz, S. K. Agarwal, S. P. Gunasekera, P. G. Schmidt, J. N. Shoolery. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 4835-4836.

⁵ D. Skyler, C. H. Heathcock. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65(11), 1573-1581.

Même si ils sont basés sur ce squelette commun, ces alcaloïdes présentent une grande variété structurale notamment par l'ajout de cycles aromatiques supplémentaires et/ou de chaînes aliphatiques possédant des fonctions amines, amides, acides,...

Quelques exemples issus de la littérature⁶⁻¹¹ sont donnés dans la figure ci dessous.

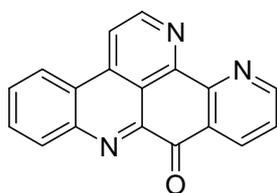
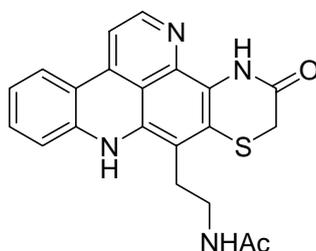
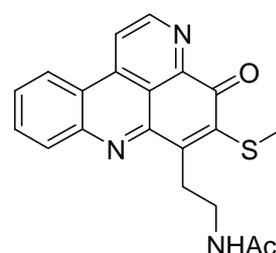
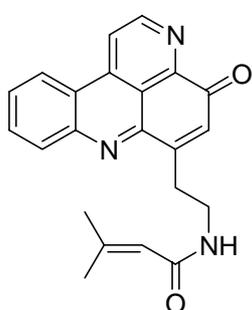
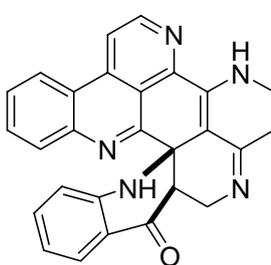
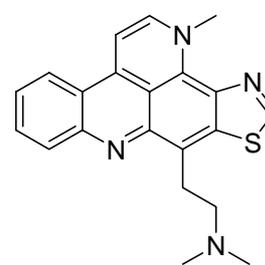
Ascidiémine **45**Shermilamine B **46**Diplamine **47**Cystodytine A **48**Biemnadinine **49**Dercitine **50**

Figure 7 : Exemples de pyridoacridines.

L'intérêt porté à la famille des pyridoacridines résulte de leurs nombreuses propriétés biologiques. En effet, ces produits présentent généralement une importante cytotoxicité mais aussi des propriétés biologiques plus spécifiques (inhibition de systèmes enzymatiques, activité antitumorale, antivirale, anti-inflammatoire).

1. Activité biologique des pyridoacridines.

1.1. Activité antibactérienne & anti-fongique.

⁶ J. Kobayashi, J.-F. Cheng, H. Nakamura, Y. Ohizumi. *Tetrahedron. Lett.*, **1988**, 29 (10), 1177-1180.

⁷ A. R. Carroll, N. M. Cooray, A. Poiner, P. J. Scheue. *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 4231-4232.

⁸ G. A. Charyulu, T. C. McKee, C. M. Ireland. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30 (32), 4201-4202.

⁹ J. Kobayashi, J.-F. Cheng, M. R. Wälchli, H. Nakamura, Y. Hirata, T. Sasaki, Y. Ohizumi. *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 1800-1804.

¹⁰ S. Aoki, H. Wei, K. Matsui, R. Rachmat, M. Kobayashi. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11 (9), 1969-73.

¹¹ G. P. Gunwardana, S. Kohmoto, S. P. Gunasekera, O. J. McConnell, F. E. Koehn. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 4856-4858.

Les propriétés anti-microbiennes sont généralement déterminées en mesurant l'activité contre des cellules microbiennes en croissance. Cette méthode a permis de mettre en évidence l'activité de l'ascididémine **45** et de la déazaascididémine **51** contre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida* et *Cladisporium resinae*¹².

De même, une activité anti-microbienne a été identifiée pour la diplamine **47** contre *E. coli* et *Staphylococcus aureus*⁸. Une étude approfondie de l'activité anti-microbienne de la méridine **56**, exploitant notamment des méthodes quantitatives de mesure d'activité, a été conduite en 1992¹³. Ces résultats mettent en évidence des concentrations minimums d'inhibition relativement intéressants (3,1 µg/mL contre *Bacillus subtilis*, 6,2 µg/mL contre *Trichophyton mentagrophytes* et 0,8 µg/mL contre *Cryptococcus neoformans*).

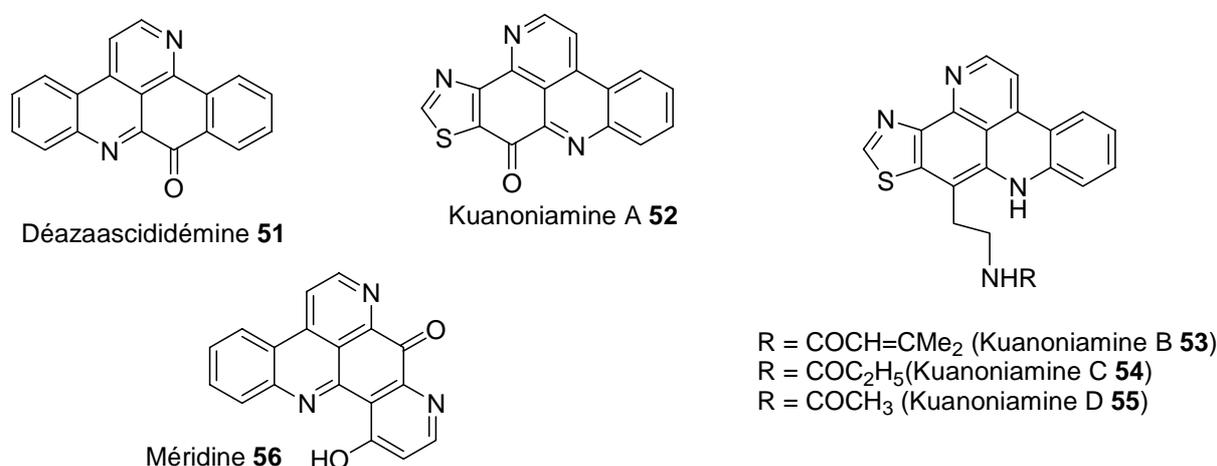


Figure 8 : Structures des pyridoacridines **51-56**.

1.2. Activité antivirale.

Depuis l'émergence du SIDA associé au HIV (human immunodeficiency virus), la découverte de nouveaux composés antiviraux est devenue une priorité pour la recherche. Dans cette optique, la molécule idéale devra inhiber la reproduction virale à des concentrations non toxiques pour les cellules hôtes ou l'organisme.

Dans ce cadre, la dercitine **50** qui a été isolée d'une éponge *Dercitus* des Bahamas, possède une bonne capacité d'inhibition du virus HSV-1 (Herpes Simplex Virus) à 5 µg/mL avec une cytotoxicité modérée et elle est également active contre le coronavirus à 1 µg/mL (ce qui

¹² B. S. Lindsay, L. R. Barrows, B. R. Copp. *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, 5 (7), 739-742.

¹³ P. J. McCarthy, T. P. Pitts, G. P. Gunawardana, M. Kelly-Borges, S. A. Pomponi. *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55 (11), 1664-1668.

correspond à 100% d'inhibition à 3 μ M)¹⁴. La déazaascididémine **51** présente également de nombreuses propriétés antivirales. En effet, ce produit est actif contre le virus de la poliomyélite de type 1 (inhibition partielle à 80 μ g/mL sans toxicité détectable), et contre le HIV-1 (protection de 46% à 0,7 μ M, mais avec une toxicité pour la cellule hôte à 10 μ M)¹⁵. Une activité anti-HIV considérable a été mesurée pour la dercitine **50** et la kuanoniamine A **52** qui présentent le même squelette pentacyclique. Cependant, cette activité ne s'est pas révélée meilleure que dans le cas de l'azidothymidine (AZT)¹⁶.

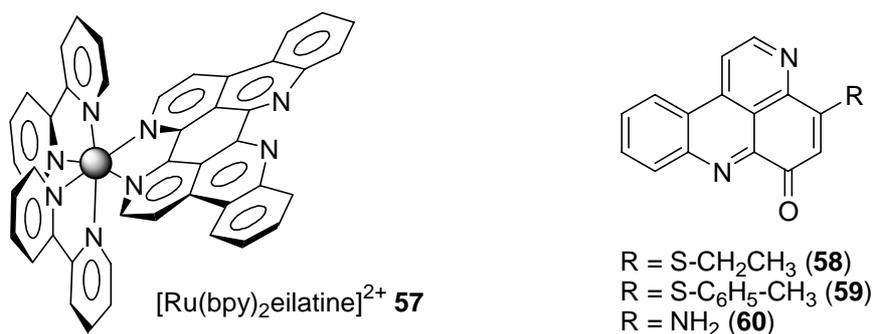


Figure 9 : Structures des pyridoacridines **57-60**.

L'équipe de Tor^{17,18} a montré que Δ -[Ru(bpy)₂(eilatine)]²⁺ **57** est un inhibiteur potentiel du complexe Rev-RRE impliqué dans le mécanisme d'action du virus du sida. La réplication du HIV-1 dépend de l'association entre Rev, une protéine de régulation du virus essentielle et son site d'interaction sur l'ARN, le RRE (Rev-Response-element). Ainsi, le RRE est nécessaire à l'expression du génome ARN viral ; ce qui fait du complexe Rev-RRE, une cible attractive pour une thérapeutique antivirale.

1.3. Activité anti-parasitaire.

Les infections liées à des parasites sont responsables de millions de morts chaque année dans les pays en voie de développement. Parmi les plus meurtrières, la malaria cause à elle seule plus de 2,7 millions de décès par an. C'est pourquoi la découverte de drogues visant les parasites est actuellement primordiale.

¹⁴ M. J. Bishop, M. A. Ciufolini. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 10081-10082.

¹⁵ B. S. Lindsay, A. N. Pearce, B. R. Copp. *Synthetic Commun.*, **1997**, 27 (15), 2587-2592.

¹⁶ I. B. Taraporewala, J. W. Cessac, T. C. Chanh, A. V. Delgado, R. F. Schinazi. *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 2744-2752.

¹⁷ N. W. Luedtke, Y. Tor. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39 (10), 1788-1790.

¹⁸ N. W. Luedtke, J. S. Hwang, E. C. Glazer, D. Gut, M. Kol, Y. Tor. *ChemBioChem*, **2002**, 3, 766-771.

Dans ce contexte, plusieurs pyridoacridines ont montré un potentiel intéressant lorsque l'on a testé leur activité anti-plasmodique contre les *Plasmodium falciparum* NF54 (normal) et K1 (résistant à la chloroquine et la pyriméthamine)¹⁹. Les valeurs correspondant à la concentration nécessaire à 50% d'inhibition (en µg/mL) sont rassemblées dans le tableau suivant.

	IC ₅₀ /K1	IC ₅₀ /NF54
Ascididémine 45	0,022	0,020
Déazaascididémine 51	0,016	0,029
58	0,024	0,034
59	4,410	7,160
60	0,480	0,970

Tableau 1 : Activité anti-parasitaire de quelques pyridoacridines (IC₅₀ exprimées en µg/mL).

L'ascididémine **45** est l'une des pyridoacridines les plus actives parmi les 18 molécules testées pour la malaria, et les produits testés (**45**, **51**, **58-60**) présentent également une activité non négligeable sur *Leishmanial donovani* et *Trypanosomal cruzi*.

1.4. Activité insecticide.

Dans la littérature, les informations concernant l'activité insecticide des pyridoacridines est relativement limitée. La famille des kuanoniamines a été étudiée sur des larves *Spodoptera littoralis* néonatales²⁰. Les produits ont été mélangés à la nourriture des larves pendant six jours et les LC₅₀ obtenues pour les deux meilleurs candidats (Kuanoniamine C **54** et D **55**) sont respectivement de 156 et 59 ppm.

1.5. Activité antitumorale.

¹⁹ B. R. Copp, O. Kayser, R. Brun, A. F. Kiderlen. *Planta med.*, **2003**, 69, 527-531.

²⁰ C. Eder, P. Schupp, P. Proksch, V. Wray, K. Steube, C. E. Müller, W. Frobenius, M. Herderich, R. W. M. V. Soest. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 301-305.

De nombreuses pyridoacridines présentent une cytotoxicité *in vitro* sur des lignées cellulaires tumorales murines et humaines. On peut trouver dans la littérature plusieurs revues rassemblant les résultats biologiques obtenus lors de l'évaluation des pyridoacridines^{21,22}.

	A-549	P-388	HT-29	MEL-28
Ascididémine 45	0,02	0,35	0,35	0,004
Shermilamines D 62	0,27	0,53	2,66	0,53
Dercitine 50	0,075	0,081	-	-
Méridine 56	4,5	2,0	0,2	-

Tableau 2 : Cytotoxicité des pyridoacridines contre divers lignées cellulaires (IC₅₀ en µM).

L'amphimédine **44** avait été décrite comme cytotoxique *in vitro*, cependant, aucune donnée *in vivo* n'avait été publiée jusqu'à récemment^{23,24}. La 2-bromoleptoclinidinone (analogue bromé de l'ascididémine **45**) malgré son excellent comportement *in vitro*, s'est révélée trop toxique dans les modèles de xénogreffes testés pour obtenir une réponse antitumorale satisfaisante²⁵. Même si l'ascididémine **45** montrait à la fois une cytotoxicité intéressante *in vitro* ainsi que sur le premier modèle *in vivo* testé (hollow fiber assay), les modèles de xénogreffes expérimentés se sont révélés décevants et la meilleure réponse obtenue avec le modèle HCT 116 (colon) correspond seulement à un rapport T/C (rapport de viabilité des animaux traités sur celle des animaux contrôles) de 58% pour un dosage de 8 mg/kg en intra-péritonéal aux jours 5 et 9²⁶.

Par contre, l'équipe de L. R. Barrows a démontré l'activité *in vivo* de la néoamphimédine **63** sur deux modèles de xénogreffes²³ soulignant ainsi une différence significative d'activité en comparaison avec l'amphimédine **44** et la déoxyamphimédine **64**. De plus, aucune toxicité n'a été observée sur la souris « nude » traitée avec **63** jusqu'à une dose de 50 mg/kg.

²¹ E. Delfourne, J. Bastide. *Med. Res. Rev.*, **2003**, 23(2), 234-252.

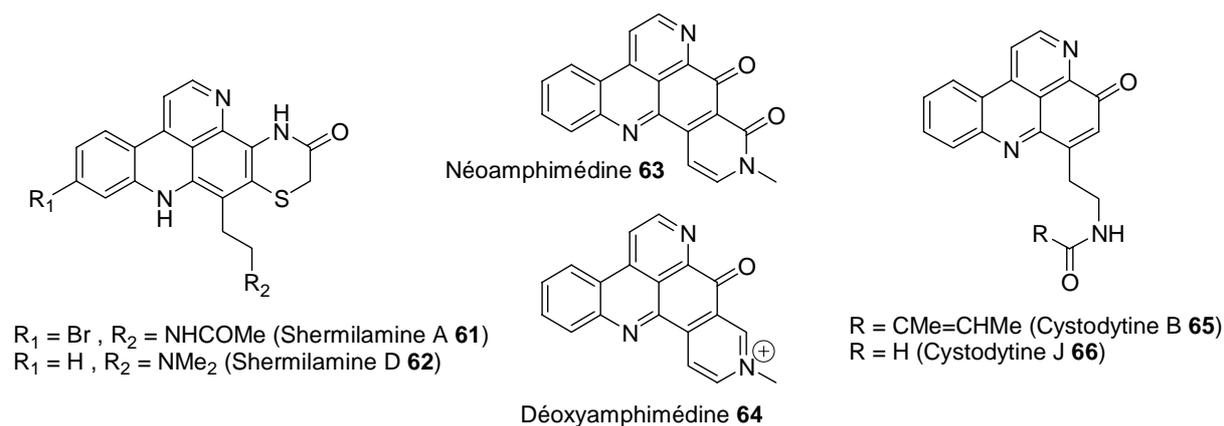
²² K. M. Marshall, L. R. Barrows. *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, 21 (6), 731-51.

²³ K. M. Marshall, S. S. Matsumoto, J. A. Holden, G. P. Concepción, D. Tasdemir, C. M. Ireland, L. R. Barrows. *Biochem. Pharm.*, **2003**, 66(3), 447-458

²⁴ F. S. de Guzman, B. Carte, N. Troupe, D. J. Faulkner, M. K. Harper, G. P. Concepción, G. C. Mangalindan, S. S. Matsumoto, L. R. Barrows, C. M. Ireland. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 1400-1402.

²⁵ F. Bracher. *Pharmazie*, **1997**, 52(1), 57-60.

²⁶ S. S. Matsumoto, J. Biggs, B. R. Copp, J. A. Holden, L. R. Barrows. *Chem. Res. Toxicol.*, **2003**, 16(2), 113-122.

Figure 10 : Structures des pyridoacridines **61-66**.

2. Mécanisme d'action.

La propriété fondamentale des pyridoacridines du fait de leur structure aromatique plane est leur capacité à s'intercaler entre les paires de bases nucléiques de l'ADN. En fait, Ireland et coll.⁸ avaient suggéré cette intercalation en comparant la structure des pyridoacridines à celle des acridines, intercalants de l'ADN bien connus et largement étudiés dans la littérature^{27,28}. Cette intercalation peut altérer la topologie de l'ADN et modifier ou interrompre les processus enzymatiques comme par exemple la réplication. De plus, l'intercalation des pyridoacridines peut également être à l'origine de la génération des espèces réactives de l'oxygène moléculaire (ROS) qui engendreront des dommages oxydatifs dans l'ADN²⁶.

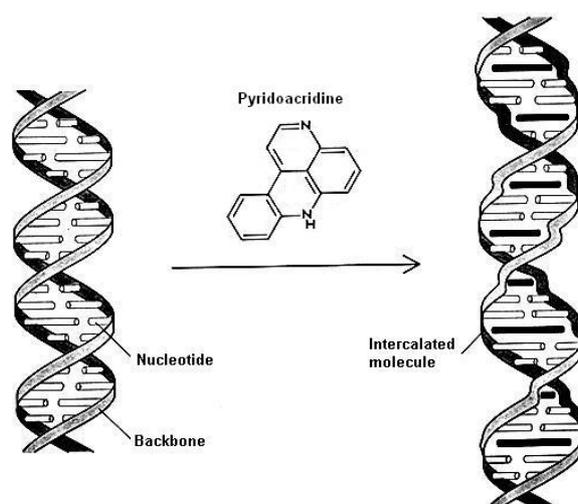


Figure 11 : Schéma représentant l'intercalation d'une pyridoacridine dans l'ADN.

²⁷ M. Demeunynck, F. Charmantray, A. Martelli. *Cur. Pharm. Design*, **2001**, 7 (17), 1703-1724.

²⁸ M. Demeunynck. *Expert Opin. Ther. Patents*, **2004**, 14 (1), 55-70.

2.1. Interaction avec l'ADN.

Les données comparatives rassemblées dans le tableau ci-dessous montrent que la structure du produit a une grande influence sur l'affinité pour le double brin d'ADN.

	Concentration (μM) ^a	Réf.
	ADN thymus de veau	
Cystodytine J 66	54	32
Déhydrokuanoniamine B	> 100	32
Dercitine 50	3,1	30
Diplamine 47	21	32
Eilatine	> 100	32
Eilatine-Ru(II) ^b 57	0,1 et 0,4	18
Kuanoniamine D 55	62	32
Shermilamine B 46	> 100	32
Adriamycine	16,5	30
	ADN sperme de saumon	
Labuanine A	1,59	c
Déazaascididémine 51	20 et 70,8	29, c
Désoyamphimédine 64	1,5	c
Néoamphimédine 63	100	c

^a Concentration nécessaire pour déplacer 50% du Bromure d'éthidium.
^b Complexes $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{eilatine}]^{2+}$ (config. Λ et Δ respectivement).
^c Données non publiées du groupe de Barrow.

Tableau 3 : Concentration nécessaire pour déplacer 50% du bromure d'éthidium au cours d'une compétition. (mesure indirecte de l'affinité pour l'ADN).

Plusieurs pyridoacridines présentent des interactions fortes avec l'ADN qui sont de l'ordre du micromolaire, et le composé le plus affiné est le complexe eilatine-Ru(II) **57** (concentration comprise entre 100 et 400 nM pour déplacer 50% du Bet).

Finalement, lorsque des études de relation structure/activité sont réalisées au sein d'une famille de composés, il apparaît que dans certains cas, l'intercalation corrèle bien avec le potentiel cytotoxique^{19,23} tandis que dans d'autres exemples, ces deux paramètres sont complètement indépendants²⁹.

2.2. Inhibition de la synthèse de macromolécules.

²⁹K. M. Marshall, J. A. Holden, A. Koller, Y. Kashman, B. R. Copp, L. R. Barrows. *Anticancer Drugs*, **2004**, 15 (9), 907-13.

La capacité des pyridoacridines à inhiber la synthèse de macromolécules (ADN, ARN et protéines) a été examinée en utilisant le radiomarquage des précurseurs synthétiques (Thymidine pour l'ADN, uridine pour l'ARN et leucine pour les protéines).

Ces travaux³⁰ ont montrés que la dercitine **50** affecte la synthèse de toutes les macromolécules, et en particulier celle de l'ARN (83% d'inhibition à 0,4 µM) et d'ADN (61% d'inhibition pour la même concentration). Par contre, ni la cystodytine J **66**, ni la diplamine **47** n'ont d'effet sur la synthèse des protéines même si elles inhibent à la fois la synthèse d'ADN et d'ARN de 50% à un concentration de 10 µg/mL (entre 28 et 31 µM).

2.3. Inhibition des topoisomérases.

Comme nous l'avons précisé dans la première partie de l'introduction (**I.2.3**), les topoisomérases³ sont des enzymes de régulation de la topologie de l'ADN. Les coupures transitoires créées dans l'ADN par les topoisomérases peuvent être stabilisées par des drogues, ce qui entraîne des coupures permanentes de l'ADN, et éventuellement provoque la mort cellulaire.

Plusieurs pyridoacridines inhibent l'activité catalytique de la topoisomérase II. La quantification de cette inhibition peut être réalisée par des expériences de relâchement d'ADN super-enroulé (supercoiling) en ADN relaxé. Ces deux formes d'ADN sont facilement séparables par électrophorèse sur gel d'agarose.

Dans une étude publiée en 1991³¹, il a été indiqué que l'ascididémine **45** et la shermilamine B **46** ont la capacité d'inhiber la topoisomérase II, tandis que l'amphimédine **44** et la shermilamine A **61** sont inactives.

En fait, si de nombreuses pyridoacridines inhibent l'activité catalytique de la topoisomérase II, seuls quelques unes (cystodytine J **66** et diplamine **47**) sont réellement aussi efficaces que les produits de références servant de contrôle positif (m-AMSA et Mitoxantrone)³².

³⁰ N. S. Burres, S. Sazesh, G. P. Gunwardana, J. J. Clement. *Cancer Res.*, **1989**, 49, 5267-5274.

³¹ F. J. Schmitz, F. S. DeGuzman, M. B. Hossain, D. van der Helm. *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 804-808.

³² L. A. McDonald, G. S. Eldredge, L. R. Barrows, C. M. Ireland. *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 3819-3827.

	IC ₅₀ (μM)		Réf.
	Topo. 2	Topo. 1	
Amphimédine 44	– ^a	–	23, 31
Arnoamine A	+ > 90		
Arnoamine B	+ > 90		
Ascididémine 45	140	140	33
Ascididémine 45	75		31
Déazaascididémine 51	+	+	29
Méridin-12(13H)-one	–		31
Néoamphimédine 63	–	–	23
Shermilamine A 61	–		31
Shermilamine B 46	30		31
	Topo. 2 (IC ₉₀) ^b		
Cystodytine J 66	8,4		32
Diplamine 47	9,2		32
Etoposide	68		32
Kuanoniamine D 55	127		32
m-AMSA	33		32
Mitoxantrone	1,1		32
Shermilamine B 46	118		32

^a Inhibition observée (+) ou non (–). ^b Concentration nécessaire pour inhiber 90% de l'activité de la topoisomérase.

Tableau 4 : Inhibition des topoisomérases.

L'ascididémine **45** est capable d'inhiber à la fois la catalyse par les topoisomérase I et II, mais les travaux de Bonnard et coll.³³ ont mis en évidence que la « coupure » de l'ADN par **45** en présence de topo. I ou II était seulement partielle et cela à des concentrations importantes en drogue (140 μM). Les auteurs ont donc conclu que c'était l'ADN plutôt que les topoisomérase qui était la cible cellulaire première de cette molécule.

La déazaascididémine **51** a également été identifiée comme un poison de la topo I à des concentrations comprises entre 2,5 et 5 μM²⁹ ; en comparaison, la camptothécine présente la même activité à 1 μM³⁴.

2.4. Inhibition de la Télomérase.

³³ I. Bonnard, N. Bontemps, S. Lahmy, B. Banaigs, G. Combaut, C. Francisco, P. Colson, C. Houssier, M. J. Waring, C. Bailly. *Anti-Cancer Drug Des.*, **1995**, 10, 333-346.

³⁴ J. A. Holden, M. E. Wall, M. C. Wani, G. Manikumar. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1999**, 370 (1), 66-76.

Searle, Stevens et collaborateurs^{35,36} ont montré par une étude RMN-2D complétée par la modélisation moléculaire que le cation pentacyclique **RHPS4** (isomère de position des pyridoacridines naturelles) reconnaissait et stabilisait par stacking un quadruplexe d'ADN. Cette structure particulière de l'ADN se trouve dans les télomères (extrémités des chromosomes) et constitue une nouvelle cible dans la recherche d'anticancéreux. En effet, il a été démontré que la formation des quadruplexes de guanines (G-4) inhibait l'activité télomérase *in vitro*, ce qui pouvait conduire à la mort de la cellule. Ainsi une molécule qui stabiliserait les G-4 pourrait interférer avec le processus enzymatique et posséderait par conséquent des propriétés antitumorales.

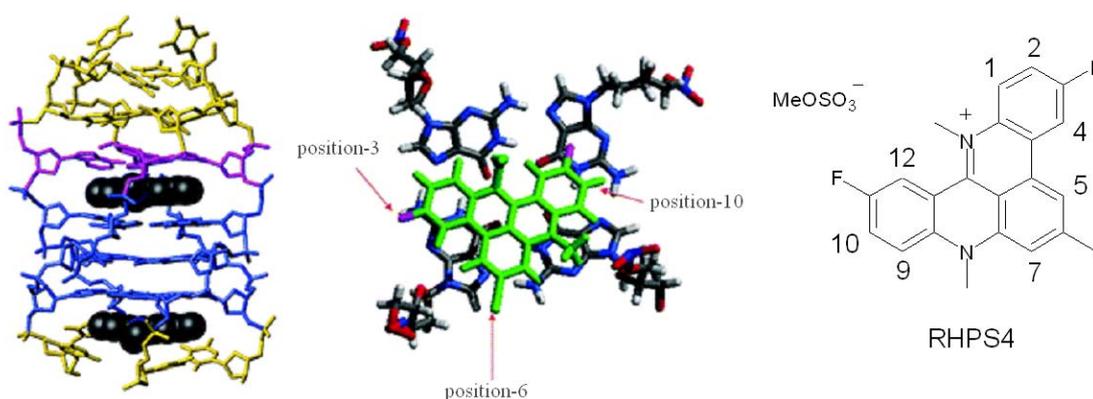


Figure 12 : Structure déterminée par RMN³⁶ de **RHPS4** lié à la séquence d(TTAGGGT)₄.

Le **RHPS4** est actuellement en cours d'essais cliniques.

En ce qui concerne les pyridoacridines naturelles, la méridine **56** et de l'ascididémine **45** se sont révélées moins actives sur la télomérase ($IC_{50} = 11$ et $87 \mu M$ respectivement)³⁷ que l'acridinium cationique synthétisé par Stevens ($IC_{50} = 0,33 \mu M$).

2.5. ROS (Reactive Oxygen Species).

Les espèces réactives de l'oxygène se forment naturellement dans une cellule au cours de la respiration anaérobie. Ainsi, quand l'oxygène moléculaire est réduit à un électron, un ion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) ou un radical hydroperoxyde (HO_2^{\bullet}) est produit de manière pH-dépendante. Le superoxyde peut à son tour subir une réduction et former du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , qui peut lui aussi conduire spontanément à un radical hydroxyle (HO^{\bullet}). Ces espèces

³⁵ E. Gavathiotis, R. A. Heald, M. F. G. Stevens, M. S. Searle. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40 (24), 4749-4751.

³⁶ E. Gavathiotis, R. A. Heald, M. F. Stevens, M. S. Searle. *J. Mol. Biol.*, **2003**, 334 (1), 25-36.

³⁷ L. Guittat, A. De Cian, F. Rosu, V. Gabelica, E. De Pauw, E. Delfourne, J.-L. Mergny. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects*, **2005**, 1724 (3), 375-384.

radicalaires, qui produisent des dommages directs sur les nucléotides de l'ADN peuvent également être générés via des réactions rédox de quinones ou semiquinones, et c'est par cette voie que certaines pyridoacridines peuvent endommager l'ADN. C'est le cas de l'ascididémine **45**³⁸ et de la déoxyamphimédine **64**³⁹.

Plusieurs pyridoacridines possèdent un motif de type 1,10-phénanthroline et de fait, sont capables de chélater les métaux de transition. En particulier, la famille des kuanoniamines peut former des complexes avec les ions Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} et Zn^{2+} et ces métaux en interaction avec les pyridoacridines sont également capables de produire des ROS. Les constantes de stabilité des complexes,⁴⁰ déterminées par spectroscopie de fluorescence sont de l'ordre de $1-3.10^{10} \text{ M}^{-1}$.

2.6. Autres activités.

Quelques autres activités particulières ont été reportées dans la littérature.

Certains produits comme les cystodytines A **48** et B **65**⁹ facilitent la libération du calcium dans le réticulum sarcoplasmique ce qui conduit à un dérèglement au sein de la cellule.

Aoki et coll. ont démontré la capacité des pyridoacridines à induire une différenciation neuronale¹⁰. En particulier, le produit **67** s'est montré le plus actif sur les cellules murines neuroblastoma (Neuro-2A), et cette différenciation induite cause un arrêt cellulaire dans la phase G₂, de la même façon que l'étoposide.

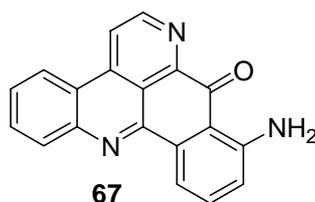


Figure 13 : Structure de la pyridoacridine **67** (analogue de la cystodamine).

3. Biosynthèse.

³⁸ S. S. Matsumoto, M. H. Sidford, J. A. Holden, L. R. Barrows, B. R. Copp. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 1667-1670.

³⁹ D. Tasdemir, K. M. Marshall, G. C. Barrows, M. K. Harper, C. M. Ireland. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 3246-3248.

⁴⁰ G. P. Gunawardana, F. E. Koehn, A. Y. Lee, J. Clardy, H.-Y. He, D. J. Faulkner. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 1523-1526.

Les études biosynthétiques consistent à identifier quels sont les précurseurs des produits naturels. Des expériences menées sur des organismes marins *in situ* par marquage isotopique ont montré que les acides aminés étaient à la base de la biosynthèse des pyridoacridines.

Ceci est illustré par l'exemple de la shermilamine **46**⁴¹ dont on trouve à l'origine, la Cystéine, le Tryptophane et la Tyrosine.

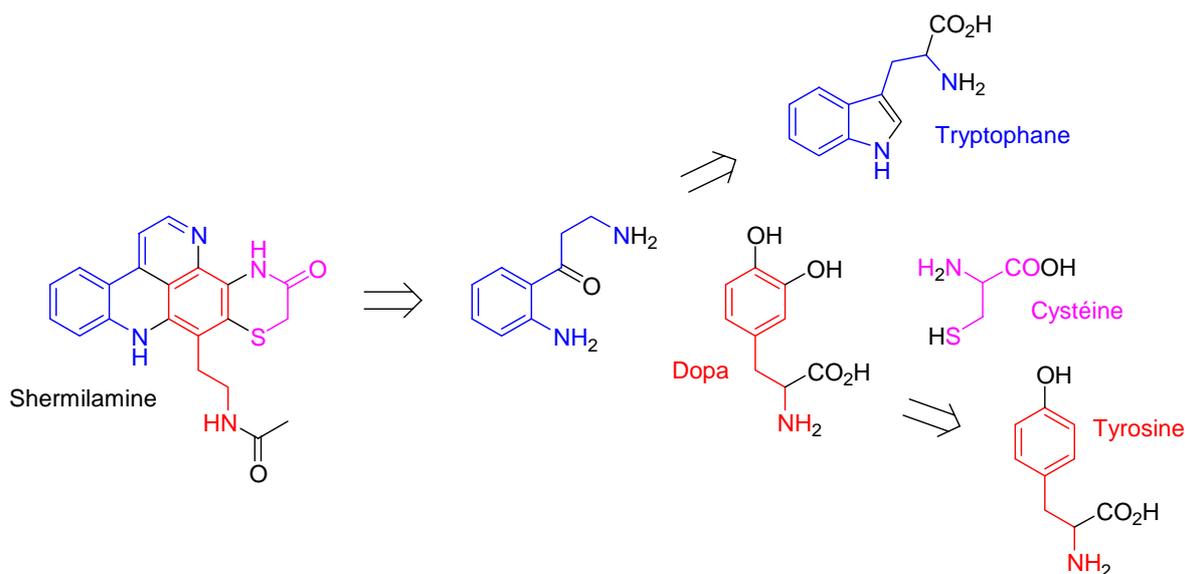


Figure 14 : Schéma rétrosynthétique de la Biosynthèse de la shermilamine B **46**.

4. Synthèse des pyridoacridines.

Concernant la synthèse des pyridoacridines par voie chimique, plusieurs revues rassemblent les diverses approches envisagées^{21,42,43}. En général, les auteurs réalisent des cyclisations au niveau des cycles B et/ou D du chromophore aromatique.

Les trois exemples choisis sont la synthèse de la cystodamine par Kubo et collaborateurs⁴⁴, celle de l'ascididémine **45**⁴⁵ par Bracher, et la première synthèse des arnoamines de l'équipe de Delfourne⁴⁶.

4.1. Cystodamine.

⁴¹ B. Steffan, K. Brix, W. Pütz. *Tetrahedron*, **1993**, 49 (28), 6223-6228.

⁴² T. F. Molinski. *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1825-1838.

⁴³ Q. Ding, K. Chichak, J. W. Lown. *Curr. Med. Chem.*, **1999**, 6, 1-27.

⁴⁴ Y. Kitahara, F. Tamura, M. Nishimura, A. Kubo. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 8421-8432.

⁴⁵ F. Bracher. *Heterocycles*, **1989**, 29 (11), 2093-2095.

⁴⁶ E. Delfourne, C. Roubin, J. Bastide. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 5476-5479.

La stratégie repose sur une réaction d'hétéro Diels-Alder de la 7-bromo-4-chloro-5,8-quinoline avec la *o*-nitrocinnamaldéhyde diméthylhydrazone. Cette réaction est réalisée dans le chloroforme contenant de l'anhydride acétique en maintenant un chauffage à 50°C pendant deux jours et demi. Le composé minoritaire contenant le cycle dihydropyridine est déshydrogéné en utilisant 10% de palladium sur charbon dans le toluène à reflux pour obtenir avec 69% de rendement la pyridine correspondante (le rendement global sur les deux étapes est de 48,5%).

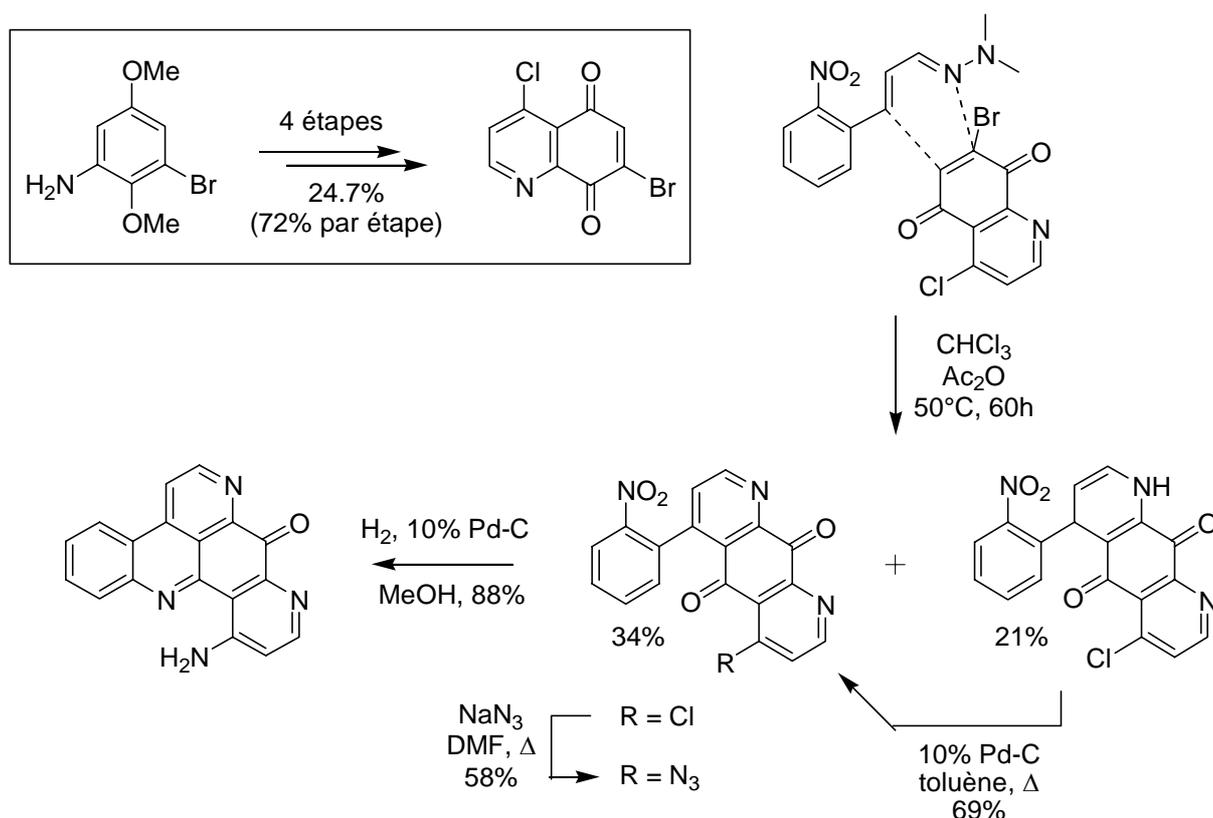
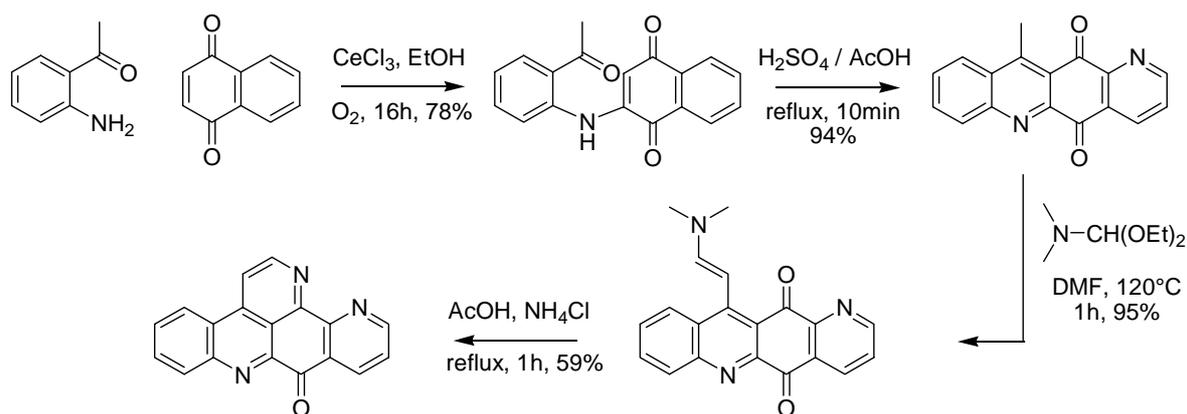


Schéma 1 : Synthèse de la cystodamine par Kubo et coll.

Un traitement à l'azoture de sodium dans le DMF aqueux permet d'accéder à l'aminoquinone, et finalement, une hydrogénation catalytique dans le méthanol en utilisant 10% de Pd/C suivie d'une cyclisation *in situ* permet d'accéder à la cystodamine (Rendement = 88% pour cette dernière étape de fermeture du cycle B).

4.2. Ascididémine 45.

Schéma 2 : Synthèse de l'ascididemine **45** par Bracher.

Cette deuxième synthèse commence par une amination oxydative de l'*ortho*-aminoacétophénone sur la quinoline-5,8-quinone en présence de CeCl_3 et d'air. Cette étape est réalisée dans l'éthanol pendant 16 heures et l'auteur obtient l'amine secondaire correspondante avec 78% de rendement. La fermeture du cycle B est réalisée en milieu acide (10% d'acide sulfurique dans l'acide acétique). La réaction est rapide et son rendement de 94% est quasiment quantitatif. Bracher utilise ensuite le diméthylformamide diéthylacétal pour fonctionnaliser le cycle B et obtenir une énamine. Enfin, un traitement avec du chlorure d'ammonium dans l'acide acétique à reflux permet de réaliser l'annélation du cycle D.

4.3. Arnoamines.

L'étape clé de la synthèse est le couplage d'une quinoléine halogénée avec l'acide *ortho*-fluoro phényl boronique via la réaction de Suzuki⁴⁷. La chloroquinoléine de départ est obtenue en trois étapes à partir de la 2-méthoxy-5-nitroaniline avec un rendement global de 52%. La réaction de Suzuki qui est un couplage catalysé au palladium entre un organoborane et un électrophile, est réalisée avec 78% de rendement. La fonction nitro est réduite par hydrogénation catalytique (le donneur d'hydrogène étant le cyclohexène) pour accéder à l'amine qui est transformée en sel de diazonium. Celui-ci est directement engagé dans la réaction de Japp-Klingemann pour accéder à une hydrazone avec 86% de rendement. La cyclisation du noyau indolique est accomplie dans l'acide polyphosphorique en chauffant à 100°C pendant six heures (58% de rendement). La formation du dernier cycle pyridine (cycle B) est réalisée par un traitement au fluorure de potassium, d'alumine, et un éther couronne en quantité catalytique dans le DMSO.

⁴⁷ N. Miyaura, A. Suzuki. *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 2457-2483.

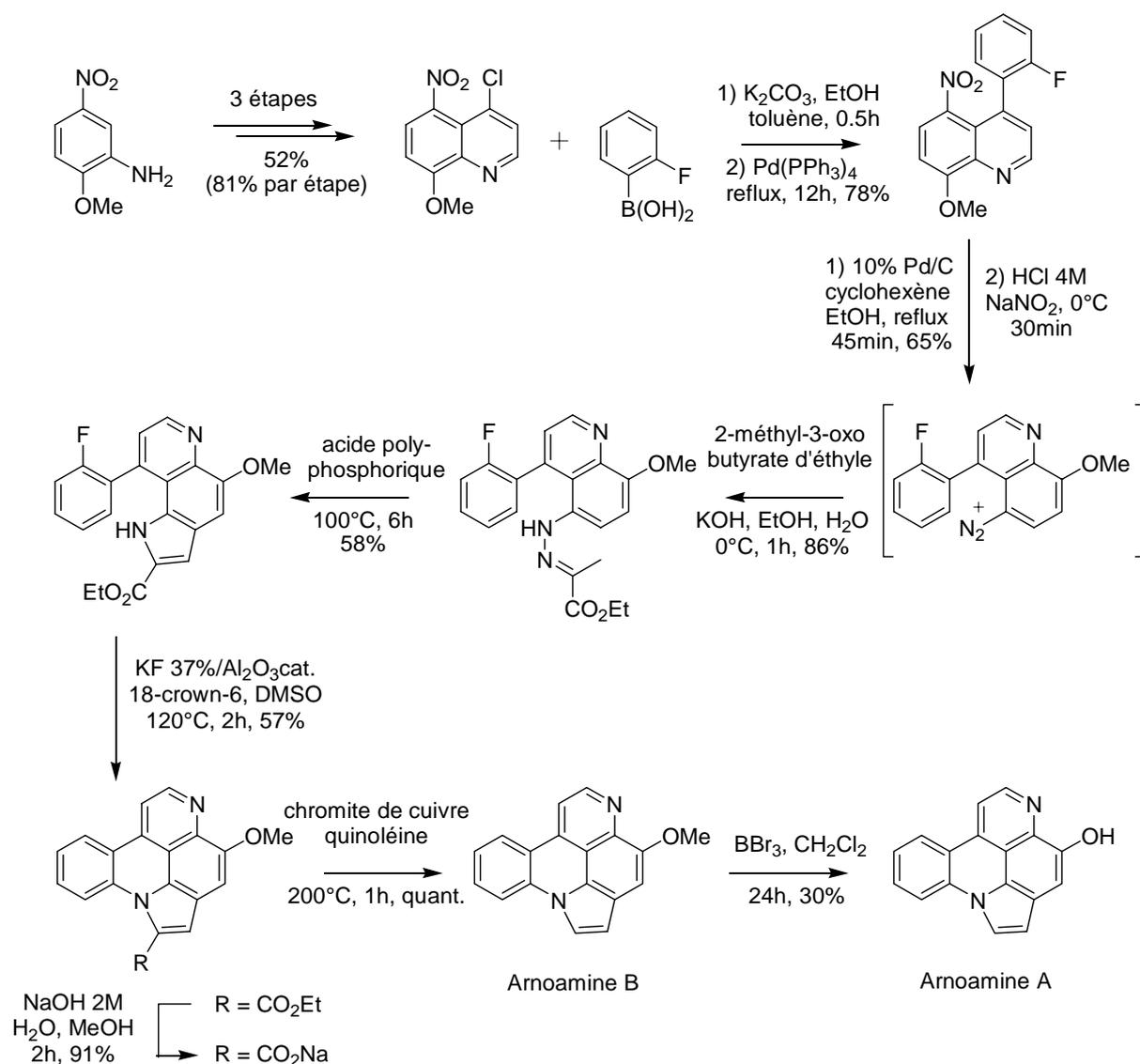


Schéma 3 : Synthèse des arnoamines A et B par Delfourne et coll.

La synthèse se termine par une hydrolyse basique de la fonction ester et une décarboxylation au chromite de cuivre ($2CuO-Cr_2O_3$) dans la quinoléine. Les auteurs accèdent ainsi à l'arnoamine B (91% pour les deux dernières étapes), laquelle est déméthylée par le tribromure de bore dans le dichlorométhane pour conduire avec 30% de rendement à l'arnoamine A.

5. Isomérisation de position.

En général, dans la plupart des pyridoacridines naturelles, les hétéroatomes d'azote se trouvent en position 3 et 7. Toutefois, dans quelques rares cas, on trouve des isomères dans lesquels les azotes se retrouvent en position 1 et 7 comme par exemple la necatorone⁴⁸.

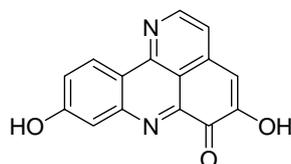


Figure 15 : Structure de la necatorone.

L'équipe de Stevens⁴⁹ a mis au point une synthèse efficace et versatile des pyridoacridines présentant la même isomérisie que celle de la necatorone.

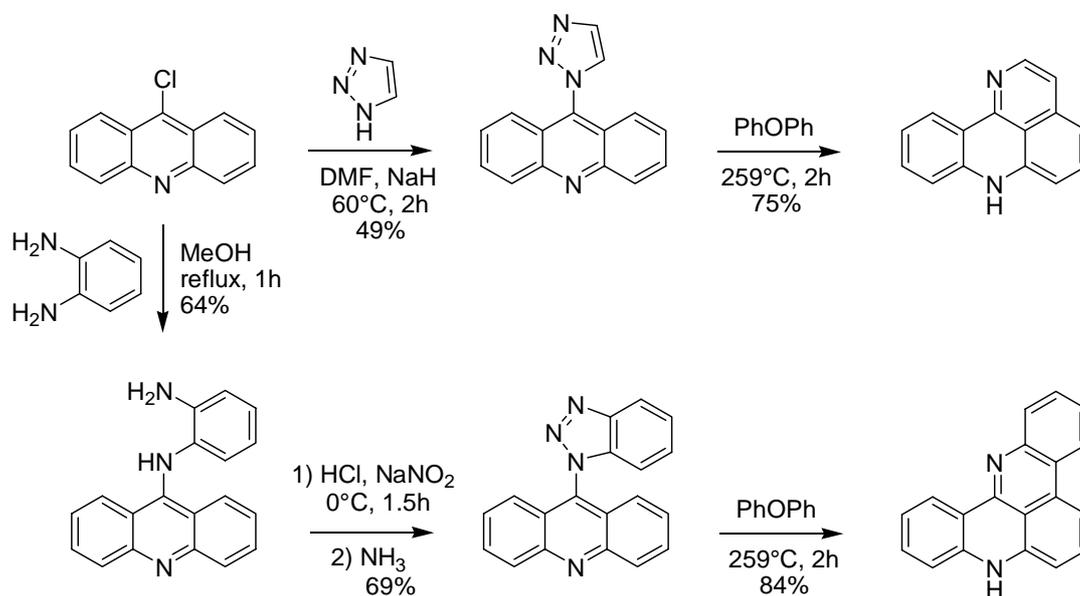


Schéma 4 : Synthèse des pyridoacridines de Stevens et coll.

L'étape clé de la synthèse est la fermeture du cycle D par thermolyse à 259°C dans le diphényl-éther. Il s'agit formellement d'une élimination de diazote par décomposition thermique. La réaction est rapide (5-20 minutes en général) et son avancement facile à suivre (on constate visuellement le dégagement gazeux d'azote). Le mécanisme proposé par les auteurs met en jeu un intermédiaire bi-radical.

⁴⁸ B. Fugmann, B. Steffan, W. Steglich. *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25 (33), 3575-3578.

⁴⁹ D. J. Hagan, E. Giménez-Arnau, C. H. Schwalbe, M. F. G. Stevens. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1997**, 2739-2746.

6. Objectif de travail.

6.1. Réactivité et fonctionnalisation des pyridoacridines.

Nous avons mis au point au laboratoire une synthèse courte et efficace de cet hétérocycle (cf. partie synthèse organique, paragraphe I.).

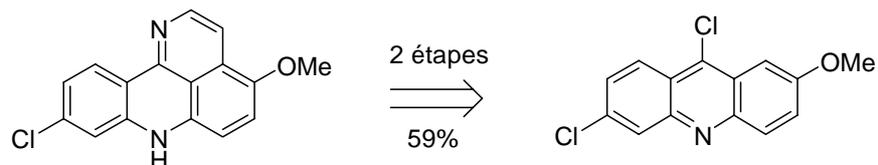


Figure 16 : Synthèse de pyridoacridine.

Une partie de ce travail de thèse concerne la fonctionnalisation régiosélective de cet hétérocycle ainsi que celle de son analogue en série pyridoacridone.

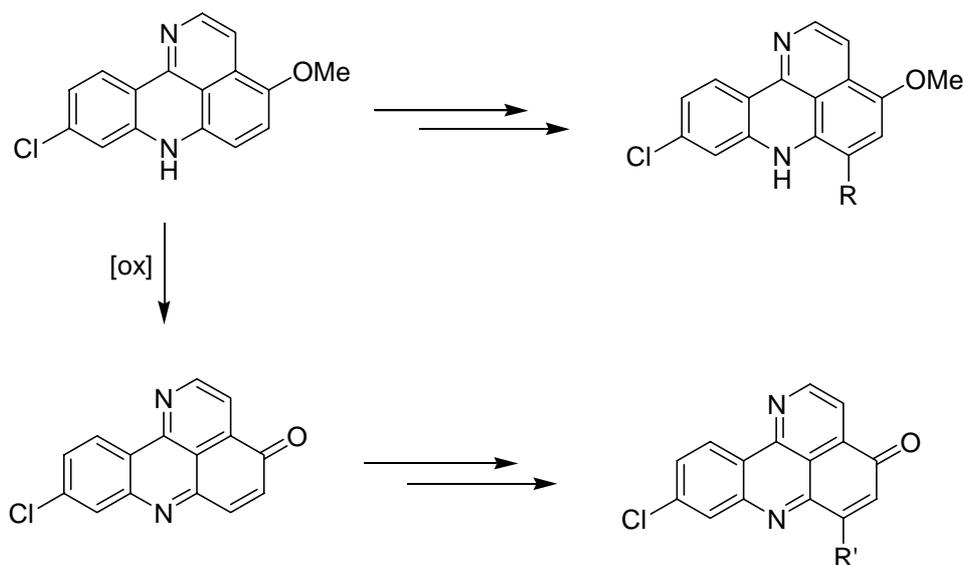


Figure 17 : Fonctionnalisation régiosélective.

Ce travail sera présenté dans le chapitre Synthèse organique, parties I-III.

6.2. Synthèse de structures polycycliques aromatiques.

Nous avons également étendu la synthèse à des composés polycycliques polyazotés. Aussi, dans les parties IV et V du chapitre synthèse organique, nous décrivons une stratégie de

synthèse permettent d'accéder à des structures étendues présentant respectivement 7 et 8 cycles aromatiques conjugués.

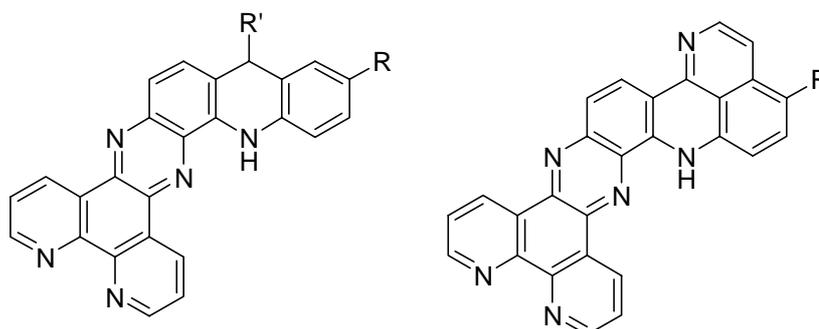


Figure 18 : Heptacycle (à gauche) et octacycle (à droite).

6.3. Etudes des propriétés physicochimiques et biologiques.

Dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, consacré aux propriétés des nouvelles molécules synthétisées, nous décrirons d'une part, les résultats des tests biologiques qui ont été réalisés, mais également une série de caractérisations physico-chimiques (spectroscopie d'absorption et d'émission, mesure de l'interaction avec l'ADN,...).

6.4. Utilisation de marqueurs rédox pour la détection de l'hybridation de l'ADN.

Les deux dernières parties du second chapitre correspondent à des applications que nous avons développé en collaboration avec d'autres équipes de recherche.

La première concerne l'électroactivité de systèmes quinone-imines que nous avons synthétisé et utilisation pour détecter par voie électrochimique l'hybridation de l'ADN. Nous décrirons notamment toutes les étapes successives dans l'élaboration d'un biocapteur à ADN.

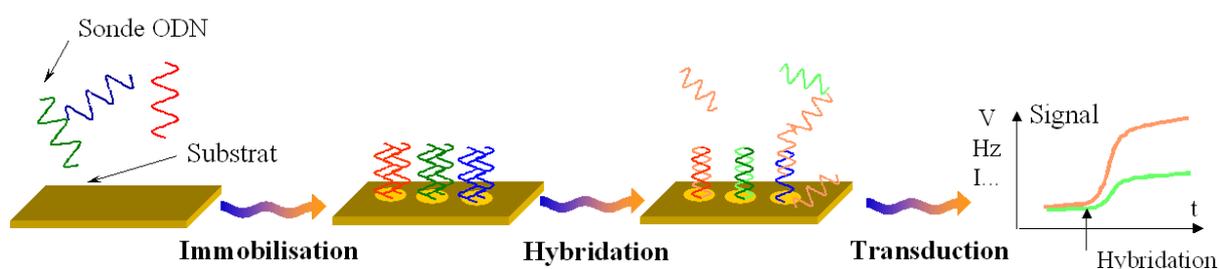


Figure 19 : Transduction du phénomène d'hybridation de l'ADN.

6.5. Utilisation des ligands heptacycliques pour la chélation du ruthénium (II).

La seconde application décrite est l'utilisation des ligands heptacycliques pour la complexation de métaux de transition. Nous présenterons dans ce contexte, la synthèse et la caractérisation de complexes de ruthénium (II), leur étude spectroscopique et électrochimique ainsi que l'interaction avec l'ADN.

7. Bibliographie.

1. P. Boyle, J. Ferlay. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of Oncology*, **2005**, 16, 481-488.
2. C. Bailly. Lutte contre le cancer : Un arsenal thérapeutique progressivement renouvelé. *L'actualité chimique*, **2003**, nov.-déc., 118-122.
3. J. J. Champoux. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, 70, 369-413.
4. F. J. Schmitz, S. K. Agarwal, S. P. Gunasekera, P. G. Schmidt, J. N. Shoolery. Amphimedine, New Aromatic Alkaloid from a Pacific Sponge, *Amphimedon* sp. Carbon Connectivity Determination from Natural Abundance ^{13}C - ^{13}C Coupling Constants. *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 4835-4836.
5. D. Skyler, C. H. Heathcock. The Pyridoacridine Family Tree: A Useful Scheme for Designing Synthesis and Predicting Undiscovered Natural Products. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65(11), 1573-1581.
6. J. Kobayashi, J.-F. Cheng, H. Nakamura, Y. Ohizumi. Ascidiidemin, A Novel Pentacyclic Aromatic Alkaloid with Potent Antileukemic Activity from the Okinawan Tunicate *Didemnum* sp. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29 (10), 1177-1180.
7. A. R. Carroll, N. M. Cooray, A. Poiner, P. J. Scheue. A Second Shermilamine Alkaloid from a Tunicate *Trididemnum* sp. *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 4231-4232.
8. G. A. Charyulu, T. C. McKee, C. M. Ireland. Diplamine, A Cytotoxic Polyaromatic Alkaloid from the Tunicate *Diplosoma* sp. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30 (32), 4201-4202.
9. J. Kobayashi, J.-F. Cheng, M. R. Wälchli, H. Nakamura, Y. Hirata, T. Sasaki, Y. Ohizumi. Cystodytins A, B, and C, Novel Tetracyclic Aromatic Alkaloids with Potent Antineoplastic Activity from the Okinawan Tunicate *Cystodytes dellechiajei*. *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 1800-1804.

10. S. Aoki, H. Wei, K. Matsui, R. Rachmat, M. Kobayashi. Pyridoacridine alkaloids inducing neuronal differentiation in a neuroblastoma cell line, from marine sponge *Biemna fortis*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11 (9), 1969-73.
11. G. P. Gunwardana, S. Kohmoto, S. P. Gunasekera, O. J. McConnell, F. E. Koehn. Dercitin, a New Biologically Active Acridine Alkaloid from a Deep Water Marine Sponge, *Dercitus* sp. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 4856-4858.
12. B. S. Lindsay, L. R. Barrows, B. R. Copp. Structural Requirements for Biological Activity of the Marine Alkaloid Ascidiemin. *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, 5 (7), 739-742.
13. P. J. McCarthy, T. P. Pitts, G. P. Gunawardana, M. Kelly-Borges, S. A. Pomponi. Antifungal Activity of Meridine, A Natural Product from the Marine Sponge *corticium* sp. *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55 (11), 1664-1668.
14. M. J. Bishop, M. A. Ciufolini. Total Synthesis of Kuanoniamines and Dercitins. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 10081-10082.
15. B. S. Lindsay, A. N. Pearce, B. R. Copp. Efficient and Convenient Pyridine Ring-E Formation of the Cytotoxic Marine Alkaloid Ascidiemin and Related Analogues. *Synthetic Commun.*, **1997**, 27 (15), 2587-2592.
16. I. B. Taraporewala, J. W. Cessac, T. C. Chanh, A. V. Delgado, R. F. Schinazi. HIV-1 Neutralization and Tumor Cell Proliferation Inhibition in Vitro by Simplified Analogues of Pyrido[4,3,2-mn]thiazolo[5,4-b]acridine Marine Alkaloids. *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 2744-2752.
17. N. W. Luedtke, Y. Tor. A Novel Solid-Phase Assembly for Identifying Potent and Selective RNA Ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39 (10), 1788-1790.
18. N. W. Luedtke, J. S. Hwang, E. C. Glazer, D. Gut, M. Kol, Y. Tor. Eilatin Ru(II) Complexes Display Anti-HIV Activity and Enantiomeric Diversity in the Binding of RNA. *ChemBioChem*, **2002**, 3, 766-771.
19. B. R. Copp, O. Kayser, R. Brun, A. F. Kiderlen. Antiparasitic Activity of Marine Pyridoacridone Alkaloids Related to the Ascidiemins. *Planta med.*, **2003**, 69, 527-531.
20. C. Eder, P. Schupp, P. Proksch, V. Wray, K. Steube, C. E. Müller, W. Frobenius, M. Herderich, R. W. M. V. Soest. Bioactive Pyridoacridine Alkaloids from the Micronesian Sponge *Oceanapia* sp. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 301-305.
21. E. Delfourne, J. Bastide. Marine Pyridoacridine Alkaloids and Synthetic Analogues as Antitumor Agents. *Med. Res. Rev.*, **2003**, 23(2), 234-252.
22. K. M. Marshall, L. R. Barrows. Biological activities of pyridoacridines. *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, 21 (6), 731-51.

23. K. M. Marshall, S. S. Matsumoto, J. A. Holden, G. P. Concepción, D. Tasdemir, C. M. Ireland, L. R. Barrows. The anti-neoplastic and novel topoisomerase II-mediated cytotoxicity of neoamphimedine, a marine pyridoacridine. *Biochem. Pharm.*, **2003**, 66(3), 447-458.
24. F. S. d. Guzman, B. Carte, N. Troupe, D. J. Faulkner, M. K. Harper, G. P. Concepcion, G. C. Mangalindan, S. S. Matsumoto, L. R. Barrows, C. M. Ireland. Neoamphimedine: A New Pyridoacridine Topoisomerase II Inhibitor Which Catenates DNA. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 1400-1402.
25. F. Bracher. Polycyclic aromatic alkaloids. Part 12. *In vitro*- and *in vivo*-investigations of the cytotoxic marine alkaloid 2-bromoleptoclinidinone. *Pharmazie*, **1997**, 52(1), 57-60.
26. S. S. Matsumoto, J. Biggs, B. R. Copp, J. A. Holden, L. R. Barrows. Mechanism of Ascidiemin-Induced Cytotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **2003**, 16(2), 113-122.
27. M. Demeunynck, F. Charmantray, A. Martelli. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. *Cur. Pharm. Design*, **2001**, 7 (17), 1703-1724.
28. M. Demeunynck. Antitumour acridines. *Expert Opin. Ther. Patents*, **2004**, 14 (1), 55-70.
29. K. M. Marshall, J. A. Holden, A. Koller, Y. Kashman, B. R. Copp, L. R. Barrows. AK37: the first pyridoacridine described capable of stabilizing the topoisomerase I cleavable complex. *Anticancer Drugs*, **2004**, 15 (9), 907-13.
30. N. S. Burres, S. Sazesh, G. P. Gunwardana, J. J. Clement. Antitumor Activity and Nucleic Acid Binding Properties of Dercitin, a New Acridine Alkaloid Isolated from a Marine *Dercitus* Species Sponge. *Cancer Res.*, **1989**, 49, 5267-5274.
31. F. J. Schmitz, F. S. DeGuzman, M. B. Hossain, D. van der Helm. Cytotoxic Aromatic Alkaloids from the Ascidian *Amphicarpa meridiana* and *Leptoclinides* sp: Meridine and 11-Hydroxyascidiemin. *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 804-808.
32. L. A. McDonald, G. S. Eldredge, L. R. Barrows, C. M. Ireland. Inhibition of Topoisomerase II Catalytic Activity by Pyridoacridine Alkaloids from a *Cystodytes* sp. Ascidian: A Mechanism for the Apparent Intercalator-Induced Inhibition of Topoisomerase II. *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 3819-3827.
33. I. Bonnard, N. Bontemps, S. Lahmy, B. Banaigs, G. Combaut, C. Francisco, P. Colson, C. Houssier, M. J. Waring, C. Bailly. Binding to DNA and Cytotoxic Evaluation of Ascidiemin, the Major Alkaloid from the Mediterranean Ascidian *Cystodytes Dellechiajei*. *Anti-Cancer Drug Des.*, **1995**, 10, 333-346.
34. J. A. Holden, M. E. Wall, M. C. Wani, G. Manikumar. Human DNA Topoisomerase I: Quantitative Analysis of the Effects of Camptothecin Analogs and the Benzophenanthridine

Alkaloids Nitidine and 6-Ethoxydihydronitidine on DNA Topoisomerase I-Induced DNA Strand Breakage. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1999**, 370 (1), 66-76.

35. E. Gavathiotis, R. A. Healg, M. F. G. Stevens, M. S. Searle. Recognition and Stabilization of Quadruplex DNA by a Potent New Inhibitor: NMR Studies of the 2:1 Complex of a Pentacyclic Methylacridinium Cation with d(TTAGGGT)₄. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40 (24), 4749-4751.

36. E. Gavathiotis, R. A. Heald, M. F. Stevens, M. S. Searle. Drug recognition and stabilisation of the parallel-stranded DNA quadruplex d(TTAGGGT)₄ containing the human telomeric repeat. *J. Mol. Biol.*, **2003**, 334 (1), 25-36.

37. L. Guittat, A. De Cian, F. Rosu, V. Gabelica, E. De Pauw, E. Delfourne, J.-L. Mergny. Ascidiemin and meridine stabilise G-quadruplexes and inhibit telomerase in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects*, **2005**, 1724 (3), 375-384.

38. S. S. Matsumoto, M. H. Sidford, J. A. Holden, L. R. Barrows, B. R. Copp. Mechanism of action studies of cytotoxic marine alkaloids: ascidiemin exhibits thiol-dependent oxidative DNA cleavage. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 1667-1670.

39. D. Tasdemir, K. M. Marshall, G. C. Barrows, M. K. Harper, C. M. Ireland. Deoxyamphimedine, a New Pyridoacridine Alkaloid from Two Tropical *Xestospongia* Sponges. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 3246-3248.

40. G. P. Gunawardana, F. E. Koehn, A. Y. Lee, J. Clardy, H.-Y. He, D. J. Faulkner. Pyridoacridine Alkaloids from Deep-Water Marine Sponges of the Family *Pachastrelliudae*: Structure Revision of Dercitin and Related Compounds and Correlation with the Kuanoniamines. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 1523-1526.

41. B. Steffan, K. Brix, W. Pütz. Biosynthesis of Shermilamine B. *Tetrahedron*, **1993**, 49 (28), 6223-6228.

42. T. F. Molinski. Marine Pyridoacridine Alkaloids: Structure, Synthesis and Biological Chemistry. *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1825-1838.

43. Q. Ding, K. Chichak, J. W. Lown. Pyrroloquinoline and Pyridoacridine Alkaloids from Marine Sources. *Curr. Med. Chem.*, **1999**, 6, 1-27.

44. Y. Kitahara, F. Tamura, M. Nishimura, A. Kubo. Synthesis of Meridine, Cystodamine, and Related Compounds Including Iminoquinolinequinone Structure. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 8421-8432.

45. F. Bracher. Total Synthesis of the Pentacyclic Alkaloid Ascidiemin. *Heterocycles*, **1989**, 29 (11), 2093-2095.

46. E. Delfourne, C. Roubin, J. Bastide. The First Synthesis of the Pentacyclic Pyridoacridine Marine Alkaloids: Arnoamines A and B. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 5476-5479.
47. N. Miyaura, A. Suzuki. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 2457-2483.
48. B. Fugmann, B. Steffan, W. Steglich. Necatorone, An Alkaloid Pigment from the gilled Toadstool *Lactarius Necator* (Agaricales). *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25 (33), 3575-3578.
49. D. J. Hagan, E. Giménez-Arnau, C. H. Schwalbe, M. F. G. Stevens. Antitumor Polycyclic Acridines. Part 1. Synthesis of 7H-Pyrido- and 8H-Quino-[4,3,2-kl]Acridines by Graebe-Ullmann Thermolysis of 9-(1,2,3-triazol-1-yl)Acridines: Application of Differential Scanning Calorimetry to Predict Optimum Cyclisation Conditions. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1997**, 2739-2746.

SYNTHESE ORGANIQUE

I. Travaux antérieurs.

Au laboratoire, une synthèse d'un analogue des pyridoacridines naturelles a été réalisée par Fixler¹ pendant sa thèse. Il s'agit d'une synthèse rapide et efficace du chromophore pyridoacridine en deux étapes à partir de la 6,9-dichloro-2-méthoxyacridine **1** disponible commercialement. La première étape met en jeu une réaction de substitution nucléophile aromatique du chlore en position 9 de l'acridine par une amine judicieusement substituée. La réaction est menée dans le phénol à 80°C pendant deux heures, et le diméthylacétal **2** est recueilli par simple précipitation dans l'éther éthylique et filtration.

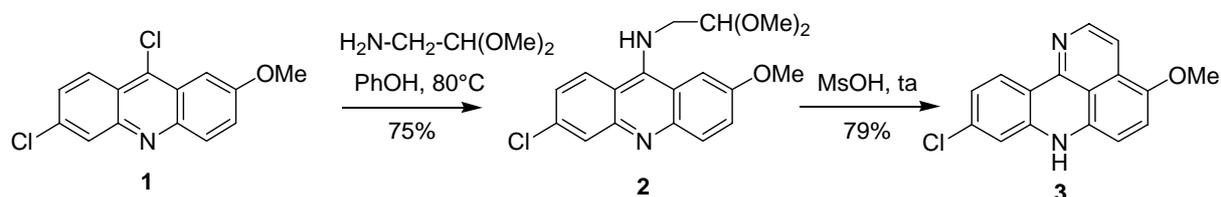


Schéma 1 : Synthèse des pyridoacridines de Fixler et coll.

La seconde étape qui correspond à la fermeture du cycle D est une réaction de substitution électrophile aromatique intramoléculaire. Cette cyclisation effectuée à température ambiante dans l'acide méthane sulfonique, qui joue à la fois le rôle de catalyseur et de solvant, est complètement régiosélective. En effet, la présence du groupement méthoxy, par effet donneur mésomère sur le cycle C contrôle la régiochimie de la cyclisation en accroissant la densité électronique sur le carbone en position 1 de l'acridine. On peut accéder ainsi à la 9-chloro-4-méthoxy-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine **3** en deux étapes avec un rendement de 59%.

Les sels de Cérium IV (CAN pour Nitrate de Cérium et d'Ammonium : $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$) sont connus pour oxyder les dérivés de *para*-diméthoxybenzène en quinones², cette réactivité a été mise à profit pour obtenir la 9-chloro-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one **4**³. Le précurseur **3** placé dans un mélange acétonitrile/eau (5 / 1) en présence de CAN subit, avec 61% de rendement, la réaction de déméthylation oxydative.

La structure de la pyridoacridone **4** présente un motif quinone imine qui peut jouer le rôle d'accepteur de Michael dans une réaction d'addition nucléophile. Cette réactivité a été

¹ N. Fixler, M. Demeunynck, J. Lhomme. *Synthetic Commun.*, **1997**, 27 (13), 2311-2324.

² P. Jacob, 3rd, P. S. Callery, A. T. Shulgin, N. Castagnoli, Jr. *J Org. Chem.*, **1976**, 41 (22), 3627-9.

³ N. Fixler, M. Demeunynck, M. C. Brochier, J. Garcia, J. Lhomme. *Magn. Reson. Chem.*, **1997**, 35, 697-700.

exploitée en réalisant l'addition d'aniline. La réaction se déroule lentement en chauffant à 50°C une solution de pyridoacridone **4** dans l'éthanol, en présence d'un excès d'aniline (15 équivalents) et d'un catalyseur acide de Lewis, le chlorure de cérium. Le produit d'addition **5** a été isolé après trente heures avec 56% de rendement.

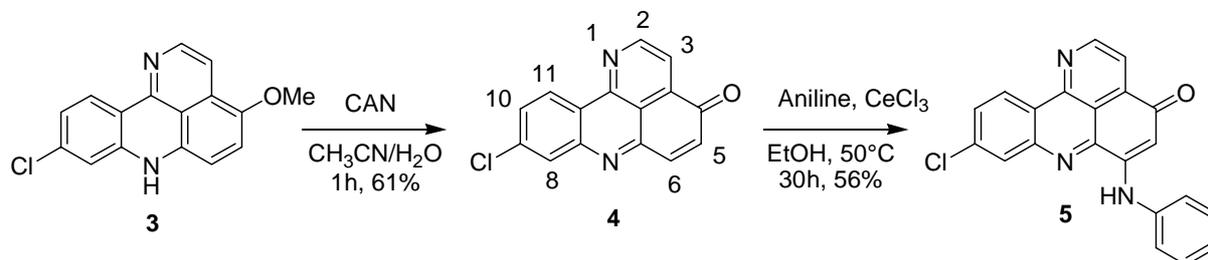


Schéma 2 : Oxydation de la pyridoacridine et fonctionnalisation de la pyridoacridone.

La structure du motif quinone-imine permettait de prévoir deux produits d'addition possibles du résidu aniline en position 5 ou 6 respectivement. Les techniques de caractérisation par RMN (expériences ^{13}C , ^1H DEPT, HMQC et HMBC) ont permis de proposer la structure du produit **5**. Cependant, afin de confirmer l'attribution, un des deux hydrogènes du cycle C du composé **4** a été remplacé par un deutérium. L'introduction du deutérium a été effectuée par substitution électrophile aromatique sur le composé **3**. Pour cela, la 9-chloro-4-méthoxy-7H-pyrido[4,3,2-k]acridine **3** a été dissoute en milieu acide dans l'acide trifluoroacétique deutéré.

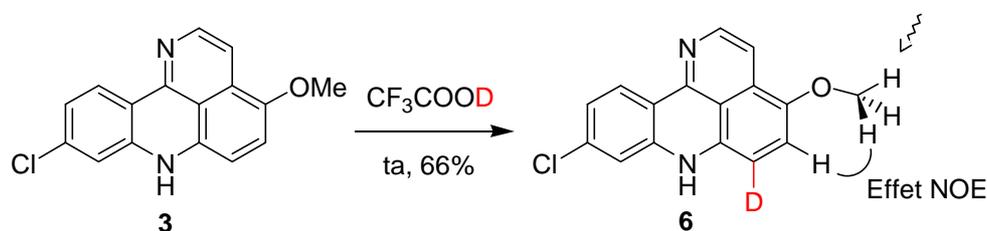


Schéma 3 : Deutériation régiosélective de la pyridoacridine.

L'avancement de la réaction a été suivi par RMN du proton. L'échange H-D suit une cinétique de pseudo premier ordre ($t_{1/2} \approx 40$ heures). Après neutralisation, le produit **6** a été isolé avec un rendement de 66%. Si l'on compare les données de RMN enregistrées dans le DMSO- d_6 , le produit de départ **3** présente deux doublets correspondant aux protons du cycle C ($\delta_{\text{H-5}} = 7,15$ ppm et $\delta_{\text{H-6}} = 6,73$ ppm) couplés entre eux avec $J_{5-6} = 8,5$ Hz, par contre, le produit de deutériation **6** présente un singulet H-5 à 7,15 ppm. La régiosélectivité est totale et la structure a été confirmée par une expériences de NOE différence dans laquelle l'irradiation sélective des protons du groupement méthoxy ($\delta = 3,87$ ppm) fait apparaître un pic à 7,15 ppm correspondant à H-5.

La même séquence de synthèse (oxydation par le CAN et addition nucléophile d'aniline) a été appliquée à l'intermédiaire deutéré **6** et la structure du produit déterminée par RMN. La présence du singulet H-5 à 6,48 ppm a permis de confirmer la régiosélectivité de l'addition de l'aniline en position 6.

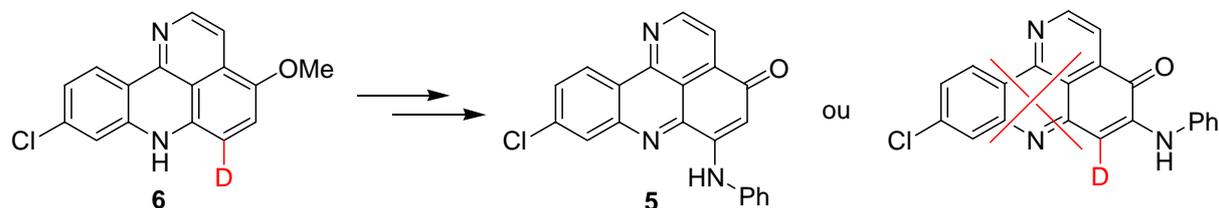


Figure 1 : Détermination de la régiosélectivité de l'addition nucléophile d'aniline.

Les études antérieures ont donc mis en évidence une réactivité de la pyridoacridine **3** vis à vis de la substitution électrophile et de la pyridoacridone **4** vis à vis de l'addition nucléophile d'amine. Les deux réactions sont régiosélectives.

II. Synthèse en série 9-Chloro-4H-pyrido[4,3,2-kl] acridin-4-one.

La fonctionnalisation de la pyridoacridone par l'aniline s'est donc révélée concluante et nous avons voulu poursuivre dans cette voie en étudiant la réactivité de ce chromophore avec différents types de nucléophiles.

1. Addition de thiols.

Nous avons choisi le 2-mercaptoéthanol (HS-(CH₂)₂-OH) comme nucléophile modèle, et nous avons effectué la réaction en faisant varier les conditions de catalyse (acide ou basique) et le solvant utilisé. Nous pouvons envisager une régiosélectivité différente de l'addition nucléophile sur l'accepteur de Michael selon la nature du catalyseur acide.

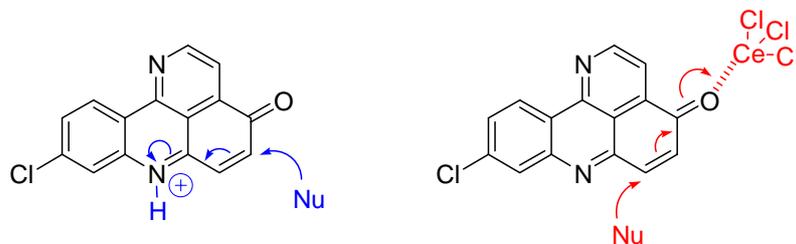


Figure 2 : Catalyse par un acide de Brønsted (à gauche) ou de Lewis (à droite).

La catalyse basique permet de déplacer l'équilibre acido-basique entre la forme thiol (R-SH) et la forme thiolate (R-S⁻) en faveur de l'espèce déprotonée qui est plus nucléophile et par conséquent plus réactive. Les conditions opératoires testées sont rassemblées dans le tableau suivant.

Catalyse	Catalyseur	Solvant
acide	AcOH	EtOH
acide	CeCl ₃	EtOH
acide	MsOH	EtOH
acide	MsOH	DMF
acide	MsOH	DMSO
-	-	EtOH
basique	Cs ₂ CO ₃	EtOH
basique	NEt ₃	EtOH
basique	NaHCO ₃	EtOH

Tableau 1 : Conditions opératoires.

Les réactions ont été suivies par CLHP. La catalyse en milieu acide ne s'est pas montrée satisfaisante car quel que soit le catalyseur, le composé majoritaire obtenu présentait après analyse par CLHP le spectre d'absorption caractéristique d'une forme réduite. Il semblerait que la réaction d'addition nucléophile prévue soit en compétition avec une réaction de type redox dans laquelle le thiol joue le rôle du réducteur tandis que l'imino-quinone est l'accepteur d'électrons.

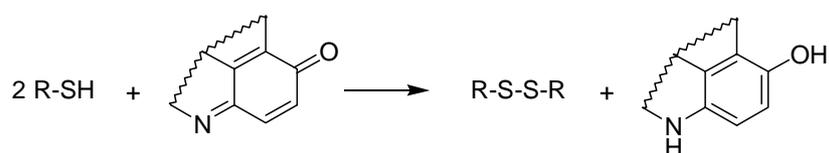


Schéma 4 : Réaction redox entre le thiol et la quinone-imine.

De plus, le taux de conversion n'est jamais total car la dihydroquinone-imine se réoxyde lentement en présence du dioxygène contenu dans l'air. Au bilan, le réactif nucléophile (thiol) est consommé par cette réaction.

En milieu basique, la réaction est lente et toute tentative de chauffage pour accélérer la cinétique de réaction est vaine et conduit à la formation de produits secondaires.

Finalement, c'est en l'absence de tout catalyseur que nous avons obtenu la meilleure réactivité. Après évaporation de l'éthanol et extraction dans l'acétate d'éthyle, le produit **7** est isolé avec un rendement de 50%.

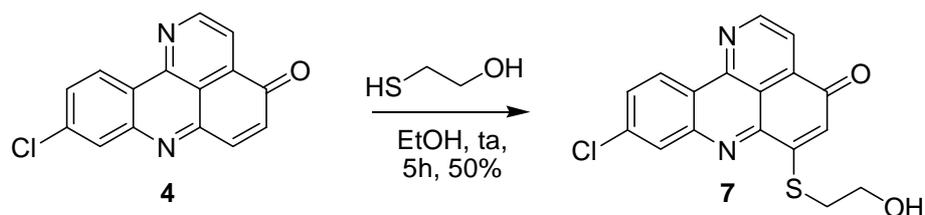


Schéma 5 : Fonctionnalisation par le mercaptoéthanol.

Le spectre de masse réalisé en mode Impact Electronique présente un pic moléculaire M^{+} à $m/z = 342,0$ tandis que sur le spectre de RMN 1H enregistré dans le chloroforme deutéré, on note la disparition des deux doublets H-5 et H-6 et l'apparition d'un singulet H-5 à $\delta=6,76$ ppm et des deux triplets correspondants aux quatre protons de la chaîne hydroxyéthyle.

Nous avons ensuite appliqué cette réactivité à un nucléophile plus complexe. Le docteur A. Tatiboüet de l'université d'Orléans (Institut de Chimie Organique et Analytique) avec qui nous collaborons, nous a fourni un échantillon de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-1-thio- β -D-glucopyranose⁴. Le thiosucre a été mis en réaction avec **4** dans l'éthanol à température ambiante.

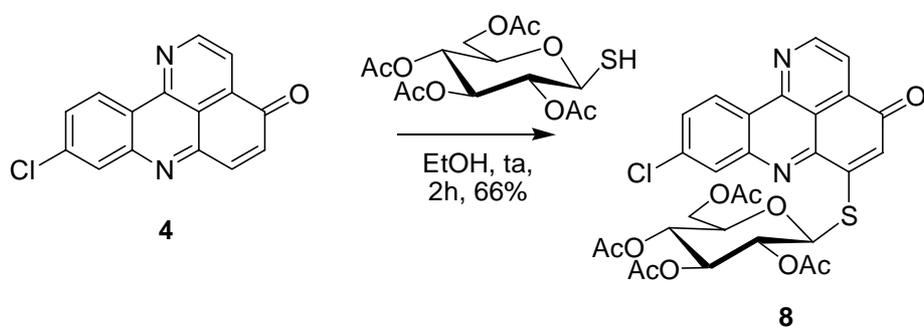
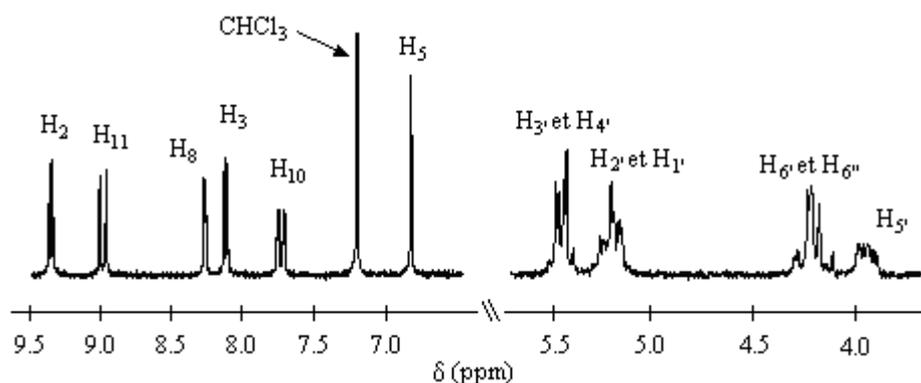


Schéma 6 : Addition nucléophile du thioglucose.

Le conjugué **8** a été caractérisé par spectrométrie de masse en mode DCI(+) et présente un pic caractéristique $m/z = 630,3$; en RMN du proton, l'attribution complète des signaux aromatiques et aliphatiques a été réalisée grâce à des expériences multi-dimensionnelles COSY et TOCSY.

⁴ D, Horton. *Methods Carbohydr. Chem.*, **1963**, 2, 433-437.

Figure 3 : Spectre RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) du composé **8**.

Nous avons essayé d'introduire le thiosucre non protégé sur la pyridoacridone en utilisant comme réactif le 1-Thio- β -D-glucose, sous forme de sel de sodium hydraté.

Le suivi de cette réaction par CLHP a mis en évidence la formation d'un produit **9** présentant un spectre UV différent de celui du produit de départ. Nous avons travaillé dans plusieurs solvants ; la pyridine dans un premier temps, le DMF ensuite. Nous obtenons le même produit en déprotégeant le dérivé tétraacétylé **8** (hydrolyse basique des fonctions esters).

Le spectre de RMN ^1H a été enregistré à 300 MHz dans le méthanol- d_4 . Il est caractérisé par la présence de 5 protons aromatiques (le signal correspondant à H-5 est absent). De plus, les protons de la partie sucre présentent des signaux inhabituels, notamment en terme de déplacement chimique. Les données obtenues ne nous ont pas permis d'identifier la structure du produit formé.

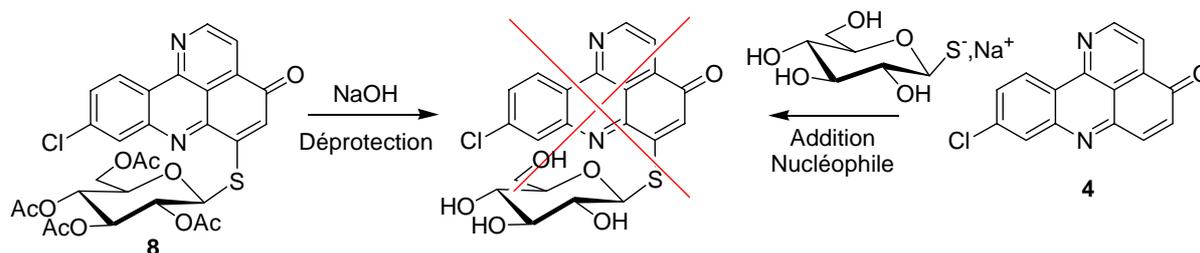


Schéma 7 : Conjugué avec le glucose déprotégé.

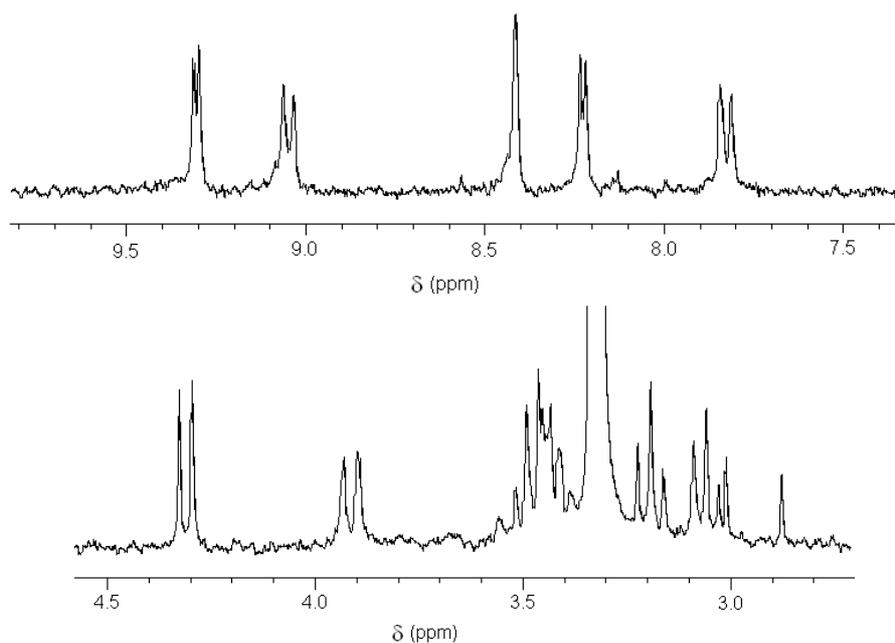


Figure 4 : Spectre RMN1H du produit **9** enregistré à 300 MHz.

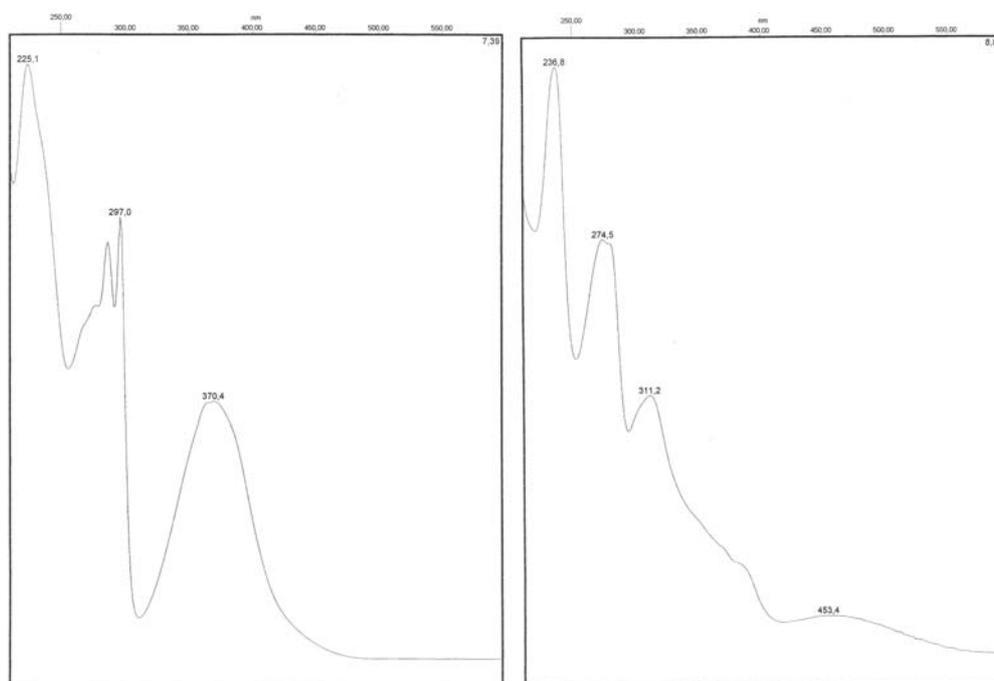


Figure 5 : Spectres d'absorption des produits **8** (à gauche) et **9** (à droite).

La comparaison des spectres d'absorption dans l'UV-Visible peut faire penser à la formation d'une forme réduite de la quinone (disparition de la bande caractéristique du chromophore pyridoacridone à 370 nm), mais cela n'a pas pu être prouvé sans ambiguïté.

2. Addition d'amines.

Les rendements modestes obtenus lors de l'addition nucléophile des thiols s'expliquent en partie par la consommation de l'espèce nucléophile via la formation de dimères par pont disulfure. Aussi, nous avons changé la nature du nucléophile et étudié l'addition d'amines sur le motif quinone-imine.

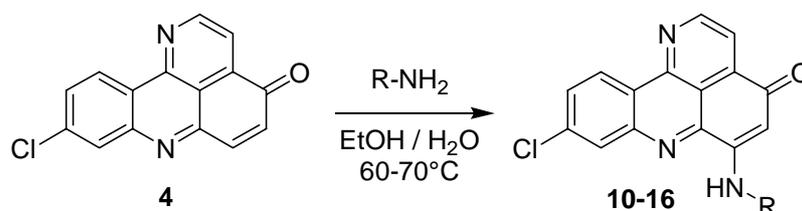


Schéma 8 : Fonctionnalisation par les amines.

La réaction a été réalisée dans un mélange eau / éthanol (4/1) en chauffant à 60-70°C et l'amine a été utilisée en large excès (25-50 équivalents).

Rappelons que pendant son travail de thèse, Fixler avait utilisé en large excès un catalyseur acide de Lewis (CeCl_3) pour réaliser l'addition d'aniline sur la pyridoacridone. Après une nuit de réaction, le produit d'addition est isolé avec 56% de rendement.

Chaîne latérale	Produit	Temps de réaction	Rendement
	5	10 jours	79%
	10	2 heures	77%
	11	24 heures	35%
	12	15 minutes	64%
	13	3 heures	49%
	14	1 heure	70%
	15	90 minutes	72%
	16	75 minutes	61%

Tableau 2 : Addition des amines sur la pyridoacridone.

Nous avons reproduit la réaction avec l'aniline sans utiliser de catalyseur et en présence de 25 équivalents d'amine, le produit d'addition est isolé au bout de dix jours avec un rendement de 79%.

Si l'on utilise des amines plus réactives que l'aniline, les cinétiques d'addition sont beaucoup plus rapides (de 15 minutes à une journée) et les rendements oscillent entre 35 et 77%.

Tous les produits d'addition ont été caractérisés par RMN, et spectrométrie de masse.

La RMN du proton est caractérisée par la présence du singulet H-5 vers 5,95-5,70 ppm et par les signaux des méthylènes dans la partie aliphatique du spectre. A titre d'exemple, le spectre du produit **12** est illustré sur la figure 6.

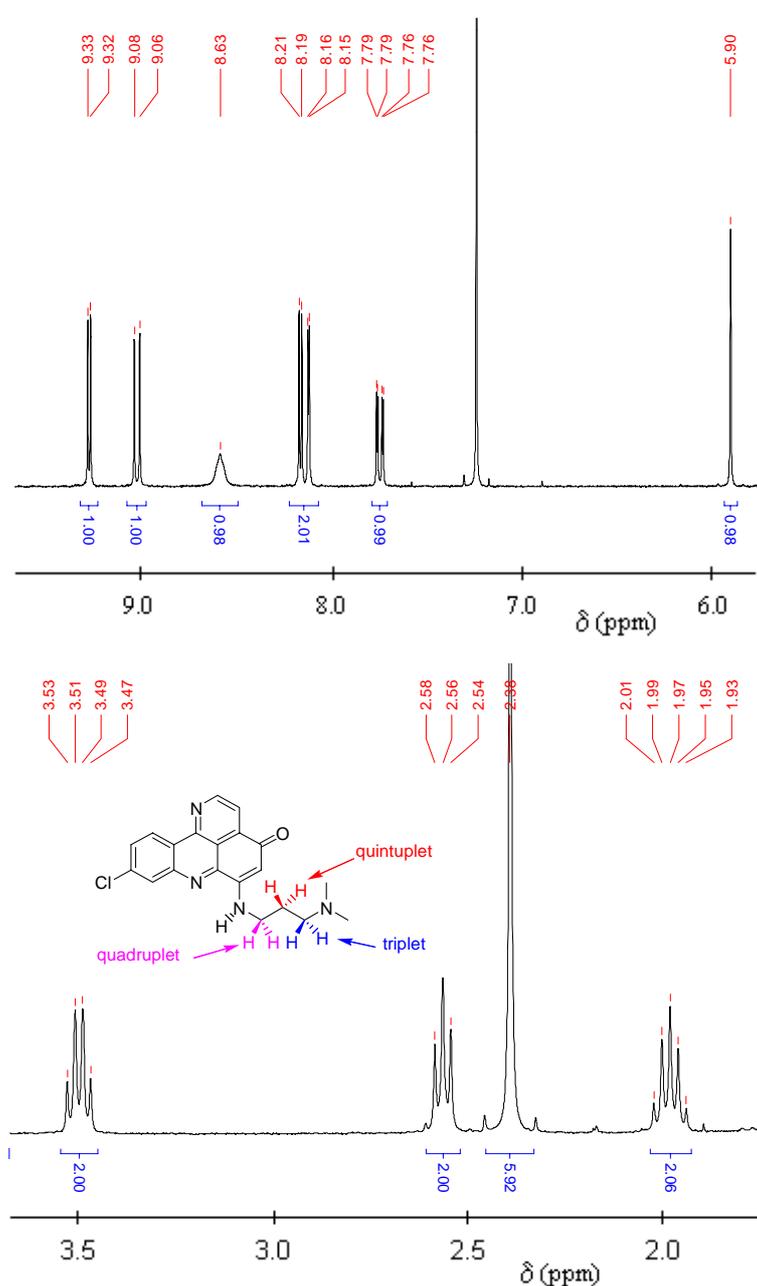


Figure 6 : Spectre de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) du produit **12**.

Les conjugués entre le chromophore pyridoacridone et les amines ont également été caractérisés par diverses techniques de spectrométrie de masse, les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant.

Produit	Masse exacte théorique (M)	IC (+) (M+H) ⁺	IES (+) (M+H) ⁺
10	352,1091	353,2	
11	325,0618	326,1	
12	366,1247	367,1320	
13	338,0934	339,0	
14	395,1513	396,2	396,1597
15	408,1717	409,2	
16	464,2071	465,0	

Tableau 3 : Données de spectrométrie de masse.

Approche théorique.

Nous avons vu que la pyridoacridone **4** présentait la réactivité d'un accepteur de Michael vis à vis des nucléophiles thiols et amines, et subissait une addition 1-4 régiosélective en position 6.

Pour expliquer cette réactivité, la structure de la 9-chloro-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one a été optimisée au niveau B3LYP/6-31G* avec le progiciel Gaussian98. Les orbitales moléculaires ainsi que la population de charge ont été analysées au même niveau de calcul.



Figure 7 : Représentation des coefficients de l'orbitale moléculaire BV de **4**.

Ces calculs montrent que le carbone C-6 présente un caractère plus électrophile avec un déficit de $0,10^{eV}$ en comparaison avec celui de C-5. De même, le coefficient orbitalaire de la BV sur C-6 plus marqué que sur C-5 est en accord avec la réactivité observée. La régiosélectivité peut donc à la fois s'expliquer par un contrôle de charge et un contrôle orbitalaire.

3. Synthèse de Bis-pyridoacridone.

La fonctionnalisation par des diamines permet d'envisager la formation de structures présentant deux chromophores pyridoacridones. Les conjugués **14** et **16** sont mis en réaction avec la pyridoacridone **4** dans un mélange éthanol / eau (4/1) dont la température est maintenue à 60°C pendant trois à quatre jours. Les produits **17** et **18** précipitent lentement au cours de leur formation et sont isolés par simple filtration. Les bis chromophores sont ensuite purifiés par recristallisation dans CH_2Cl_2 ; les rendements sont de 51% pour **17** et 91% pour **18**.

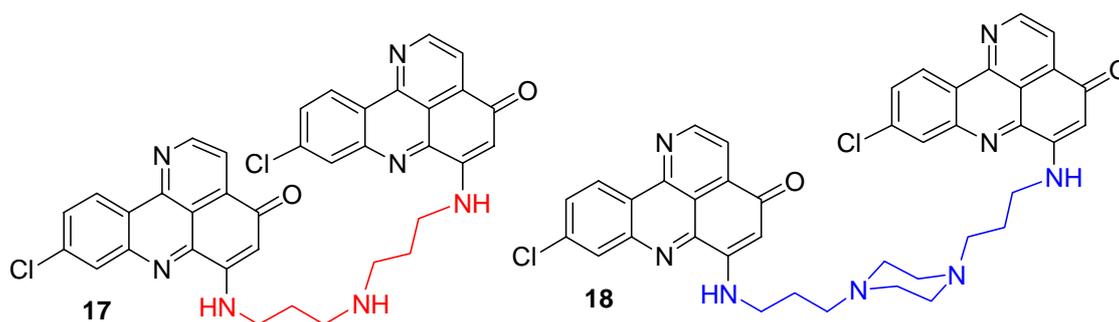
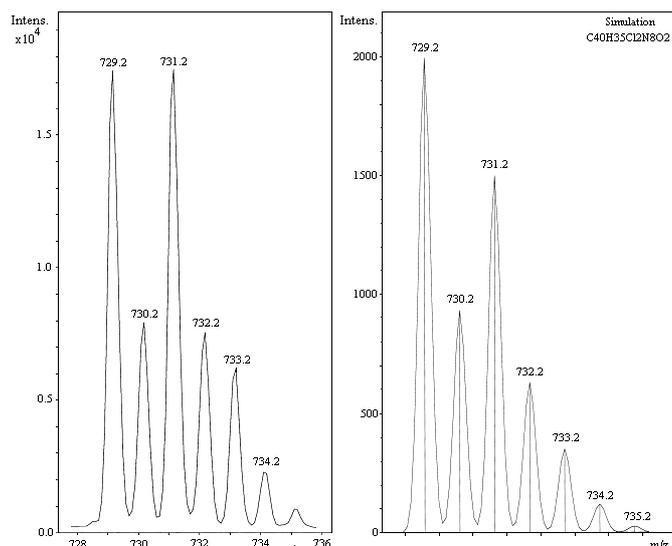


Figure 8 : Structure des Bis-pyridoacridones.

Les composés **17** et **18** ont été caractérisés par RMN du proton. On retrouve dans les spectres les six signaux correspondants aux protons aromatiques et les signaux aliphatiques des méthylènes. En spectrométrie de masse, le produit **17** présente un ion moléculaire caractéristique en mode IC (-) correspondant à $M^{\bullet-} = 659,3$, tandis que le produit **18** a été analysé en mode électrospray où l'on observe $(M+H)^+ = 729,2$.

Figure 9 : Spectre de masse (IES) de **18** (à gauche) et simulation isotopique (à droite)

4. Addition d'oxy-amine.

Pour savoir s'il était possible de changer la régiosélectivité de la réaction, nous avons utilisé un nucléophile plus dur selon la théorie HSAB : la méthoxyamine. Dans les mêmes conditions que précédemment (éthanol/eau, 60°C), le nucléophile ne s'additionne plus en 1-4 (position 6) mais en 1-2 (position 4) et le produit **19** a été isolé avec un rendement de 47%.

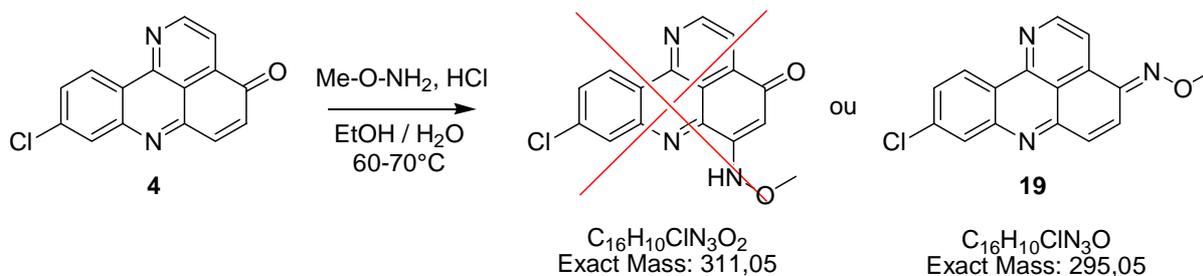


Schéma 9 : Addition 1-2 sur la pyridoacridone.

Les données de RMN et de spectrométrie de masse sont en accord avec la structure de droite (schéma 9). Contrairement aux produits d'addition 1-4 caractérisés par un singulet H-5, le spectre RMN ^1H du produit **19** enregistré dans CDCl_3 présente deux doublets pour H-5 et H-6 à 7,60 et 7,28 respectivement couplés entre eux avec la constante $J = 10,1$ Hertz. Le spectre de masse enregistré en mode IC (-) présente un pic $\text{M}^{\bullet-}$ à $m/z = 295,1$.

La spectroscopie de RMN a mis en évidence la présence de deux isomères au niveau du lien oxime. L'intégration du signal correspondant aux trois protons du groupement méthoxy a permis la quantification de ces deux isomères. L'isomère majoritaire E est présent à 84%.

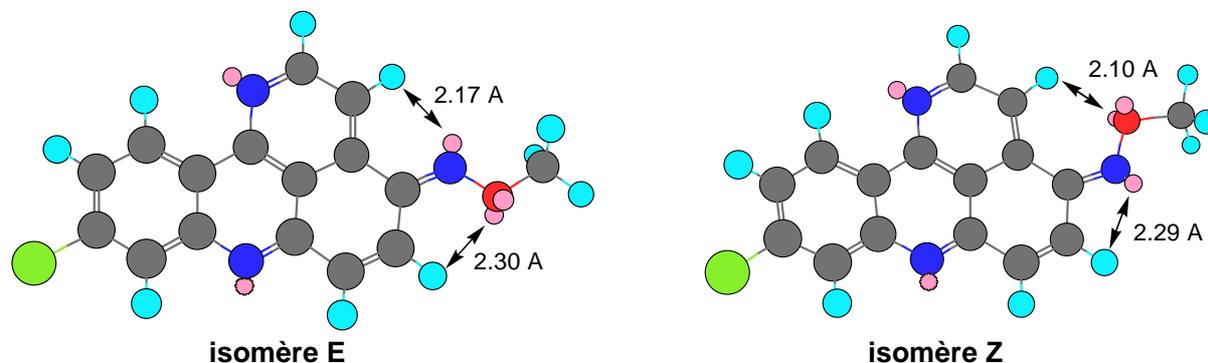


Figure 10 : Structures minimisées des isomères E et Z de l'oxime **19**.

Les structures des deux isomères ont été minimisées dans le vide en utilisant le logiciel CHEMDRAW-3D avec le champ de force MM2. Les résultats montrent que la différence de stabilité entre les deux isomères s'explique exclusivement par la géométrie au niveau de l'oxime. En effet, aucune contrainte stérique entre le substituant introduit en position 4 et les protons aromatiques les plus proches n'influencent la stabilité d'un isomère par rapport à l'autre.

5. Réduction de la fonction quinone.

Afin de préparer des analogues réduits des composés **5** et **10-16**, nous avons essayé de mettre au point une méthode de réduction sélective de la quinone ; et pour cela, nous avons testé différentes conditions de réduction⁵ sur le composé **12**.

Quel que soit le réducteur employé, il faut utiliser un agent d'alkylation pour piéger la forme réduite étant donné que l'intermédiaire hydroquinone se réoxyde spontanément en présence d'oxygène moléculaire.

- Réduction par un hydrure puis réaction avec un donneur de méthyle : LiAlH_4 / MeI . Nous avons effectué cette réaction dans le THF. La cinétique de réduction est rapide, après dix minutes, on quenche la réaction au méthanol et on ajoute l'iodure de méthyle. Le taux de méthylation est seulement de l'ordre de 10%.

⁵ M. B. Smith, J. March. *March's Advanced Organic Chemistry*, 5th edition., Wiley ed., **2001**, 1197-1198.

- Réduction par le dithionite de sodium ⁶ puis agent de méthylation : Na₂S₂O₄/ MeI.

La réduction est réalisée avec le dithionite en conditions de catalyse par transfert de phase : Et₄NBr, Na₂S₂O₄, THF et H₂O, puis la forme réduite est quenchée par MeI en présence de KOH_{aq}. Dans ces conditions, nous obtenons un mélange de deux produits réduits (spectres d'absorption UV-visible caractéristiques) qui l'on ne parvient pas à isoler.

- Réduction par le zinc ^{7,8} puis réaction avec l'anhydride acétique : Zn / Ac₂O.

En général, dans ces conditions, la pyridine est utilisée comme base. Cependant, avec la pyridoacridone **12** qui est elle-même basique, l'ajout de pyridine s'est révélé inutile. Un produit unique de réduction a été isolé avec 46% de rendement. L'identification de la structure du produit de réduction de **20** a été réalisée en couplant plusieurs techniques d'analyse.

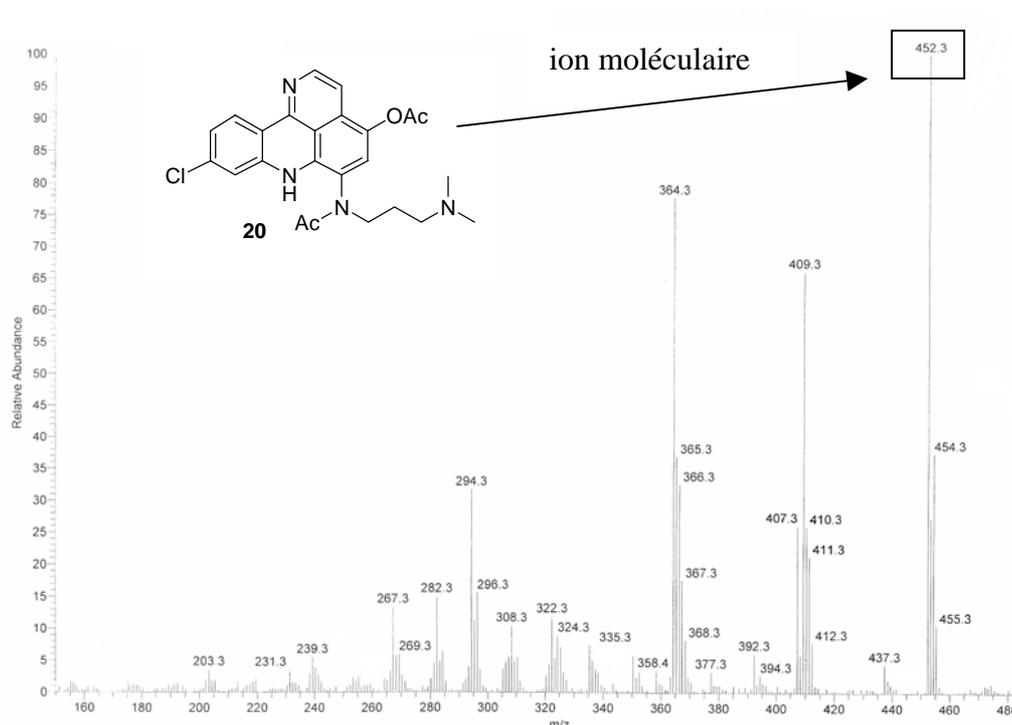


Figure 11 : Spectre de masse de **20** en mode IE.

Les données de RMN ¹H et de spectrométrie de masse indiquent la présence de deux groupes acétyles sur le produit de réduction. L'analyse détaillée des fragmentations obtenus en IE ont permis d'identifier les deux sites d'acétylation (O-acétylation et N-acétylation sur l'amine de la chaîne latérale).

⁶ G. A. Kraus, T. On Man. *Synthetic Commun.* **1986**, 16(9), 1037-1042.

⁷ K. Tsuda, E. Ohki, S. Nozoe. *J. Org. Chem.* **1963**, 28, 783-785.

⁸ D. Passerieux, L. Lepage, Y. Lepage. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1989**, 5, 708-710.

Les positions des deux groupes acétylés ont été confirmées par l'étude des fragmentations observées en spectrométrie de masse (Figure 12).

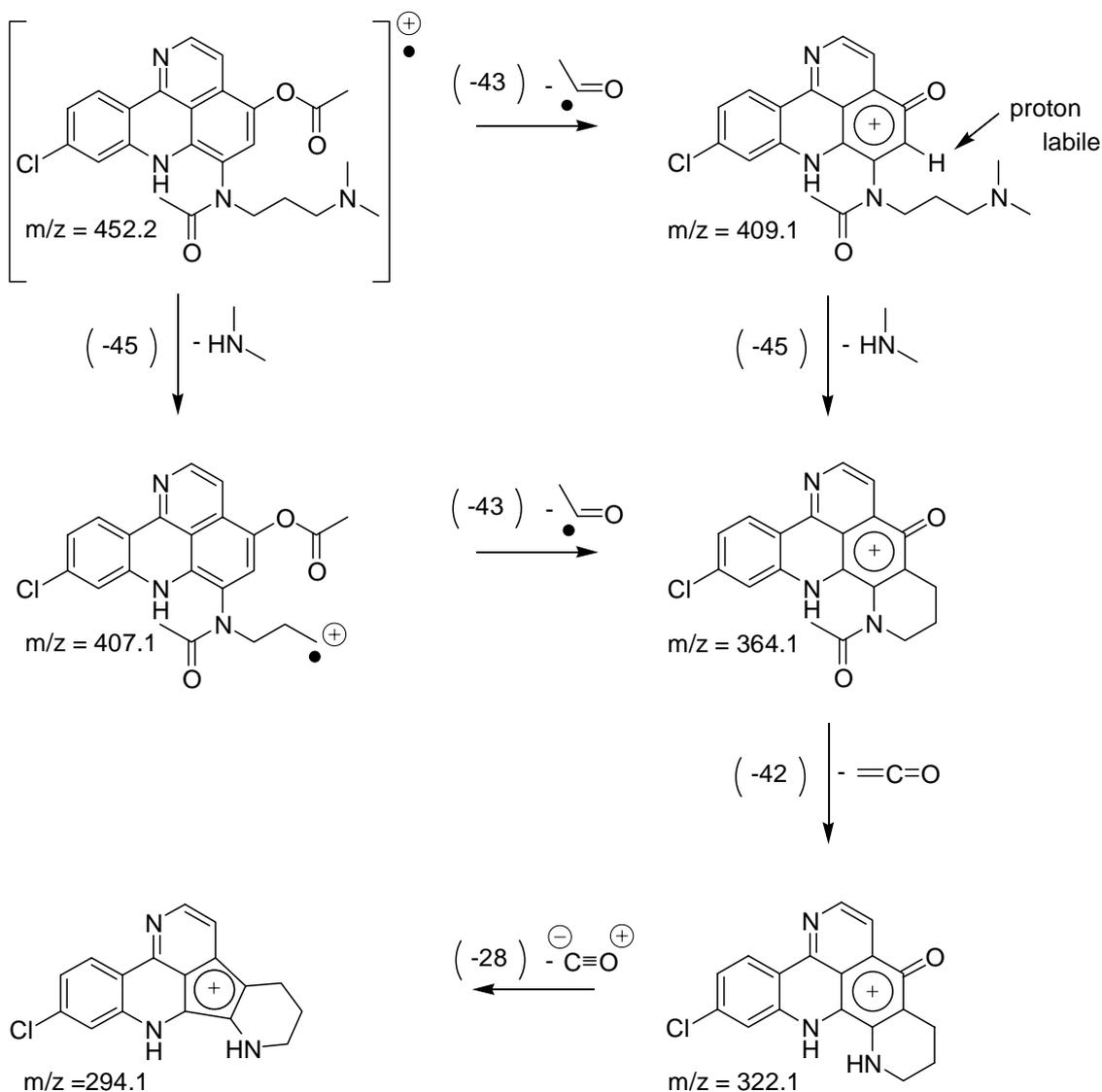


Figure 12 : Analyse de la fragmentation de **20** en phase gaz.

III. Synthèse en série 9-Chloro-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine.

La chimie de ce type de structure est relativement peu documentée dans la littérature aussi, nous avons exploré la réactivité correspondante.

1. N-Alkylation.

En raison de son caractère acide, le proton N7-H du composé **3** peut facilement être arraché. Nous avons réalisé la N-alkylation en présence d'iodure de méthyle et d'hydrure de sodium et obtenu le composé **21** avec 76% de rendement.

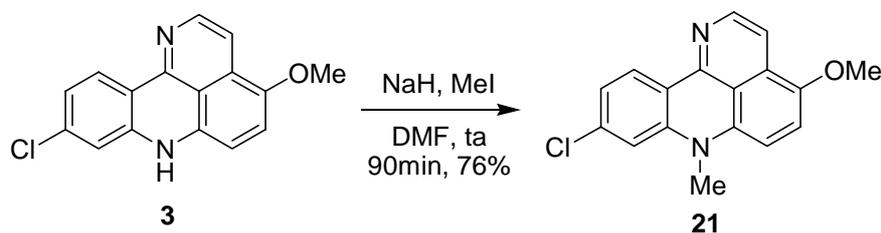


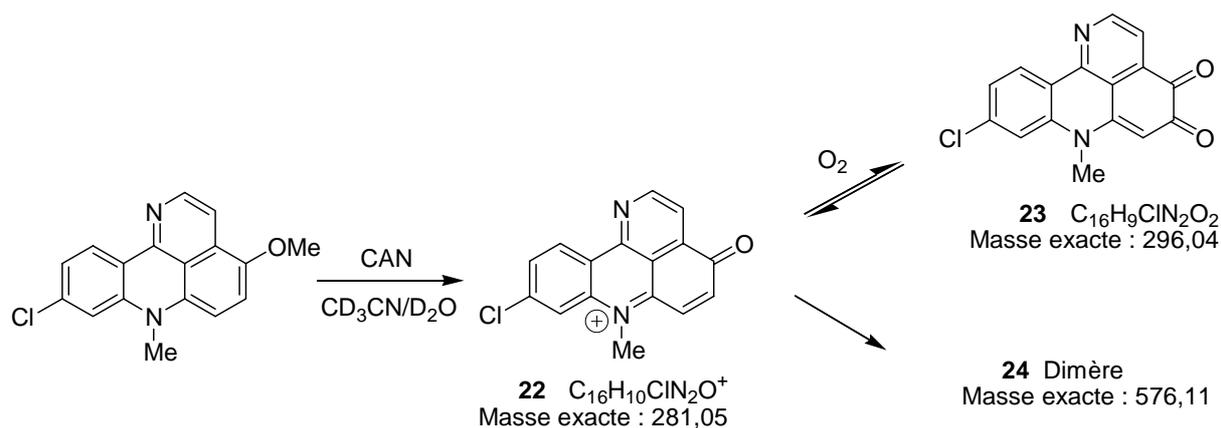
Schéma 10 : N-alkylation de la pyridoacridine.

Le groupement N-méthyle est caractérisé en RMN ^1H par un singulet intégrant pour trois protons à 3,47 ppm et en RMN ^{13}C par le signal du carbone primaire à 33,3 ppm. La prédiction du déplacement chimique réalisée avec le logiciel ACD qui donne $37,52 \pm 4,45$ ppm pour ce carbone est en bon accord. De plus, des expériences NOE-1D ont confirmé la position de l'alkylation. En effet, l'irradiation sélective de ce singulet met en évidence un couplage NOE avec les protons à 6,65 et 7,12 ppm (H-6 et H-8 respectivement).

Nous avons soumis le composé **21** aux conditions de déméthylation oxydative par les sels de CAN. La réaction a été étudiée dans un mélange $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$ (2/1) et suivie par analyse CLHP et RMN ^1H . On observe la formation rapide d'un produit identifié en RMN comme étant le N-méthylacridinium **22** caractérisé par un singulet intégrant pour trois protons à 4,74 ppm. Cette valeur de déplacement chimique est classique des N-méthylacridinium⁹ ($\delta = 4,68\text{-}4,71$ ppm dans CD_3CN). Toutefois, ce produit n'est pas stable en solution et se dégrade rapidement. On observe à la fois par RMN et CLHP un mélange de produits parmi lesquels deux structures peuvent être proposées d'après les données de spectrométrie de masse en mode IC(-) : L'*ortho*-quinone **23** à $m/z = 296,2$ (M^{\bullet}) ainsi qu'une structure dimérique **24** dont le massif isotopique est caractéristique d'une molécule possédant deux chlores ($m/z = 576,0$ pour deux ^{35}Cl). La formation de dimères sur des systèmes quinoniques avait déjà été observée par d'autres auteurs¹⁰.

⁹ D. Zhu, J. K. Kochi. *Organometallics*, **1999**, 18(2), 161-172.

¹⁰ T. Tanaka, C. Mine, S. Watarumi, T. Fujioka, K. Mihashi, Y. J. Zhang, I. Kouno. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65 (11), 1582-1587.

Schéma 11 : structures proposées pour l'oxydation de **21**.

2. Formylation.

Pour introduire un carbone en position 6, nous avons exploité la réactivité de C-6 vis à vis des substitutions électrophiles mise en évidence par deutériation régiosélective³. Nous avons ainsi appliqué la réaction de Vilsmeier-Haack¹¹ qui consiste à générer in situ un équivalent formaldéhyde à partir de DMF et de POCl_3 .

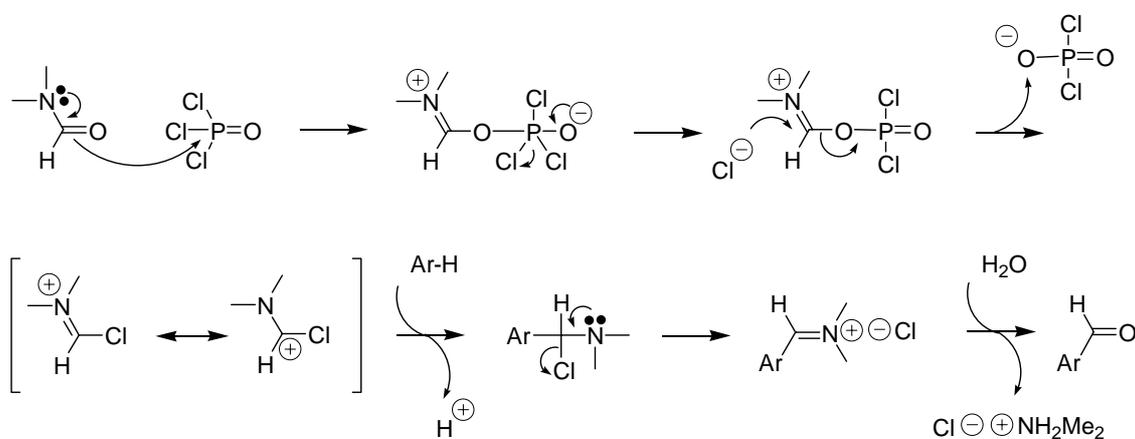


Figure 13 : Mécanisme de la réaction de Vilsmeier-Haack.

La réaction se déroule lentement dans le dichlorométhane et l'aldéhyde **25** est isolé après 24 heures avec 84% de rendement. Le produit est caractérisé par deux singulets en RMN du proton à 6,99 (H-5) et 9,80 ppm (CHO). La conformation privilégiée par cet aldéhyde est celle pour laquelle une liaison hydrogène entre le N-H et l'oxygène du groupement carbonyle stabilise la structure. Les données de modélisation moléculaire réalisée dans le vide (logiciel

¹¹ C. Jutz. *Adv. Org. Chem.* **1976**, 9(2), 225-243.

Insight Discover II, champ de force CVFF) et la RMN en solution qui met en évidence un effet NOE entre H-5 et le proton aldéhydique corroborent cette conformation préférentielle.

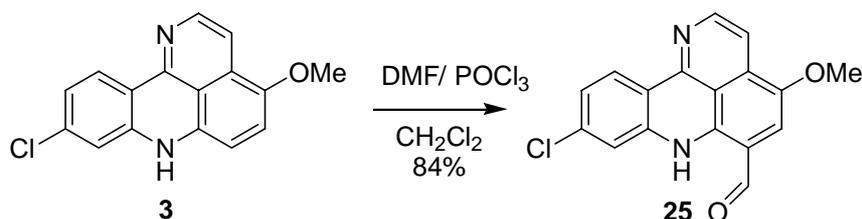


Schéma 12 : Formation de l'aldéhyde **25**.

Approche théorique.

Comme la deutériation exposée précédemment, la réaction de Vilsmeier-Haack est 100% régiosélective en position 6. Pour expliquer cette réactivité, la structure de la 9-chloro-7H-4-méthoxypyrido[4,3,2-kl] acridine **3** a été optimisée au niveau B3LYP/6-31G* avec le progiciel Gaussian98. Les orbitales moléculaires ainsi que la population de charge ont été analysées au même niveau de calcul.

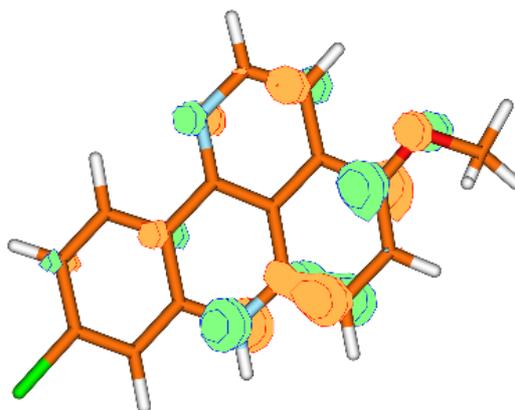


Figure 14 : Représentation des coefficients de l'orbitale moléculaire HO.

La comparaison des populations de charge des carbones pouvant réagir, à savoir C-5, C-6 et C-8, ne montre pas de différence ($-0,29^{eV}$ pour chacun des trois carbones). Ainsi, un contrôle de charge ne peut en aucun cas expliquer la régiosélectivité observée expérimentalement. En fait, c'est le contrôle orbitalaire qui rationalise les observations expérimentales. Le coefficient sur p_z , l'orbitale la plus haute occupée (HO) présente un poids plus élevé sur le carbone C-6 en comparaison de C-5 et C-8.

3. Fonctionnalisation de l'aldéhyde.

Afin de compléter la série de dérivés de pyridoacridine déjà synthétisés, nous avons décidé de fonctionnaliser le motif pyridoacridine en utilisant l'aldéhyde **25** comme intermédiaire de synthèse.

3.1 Réduction de l'aldéhyde.

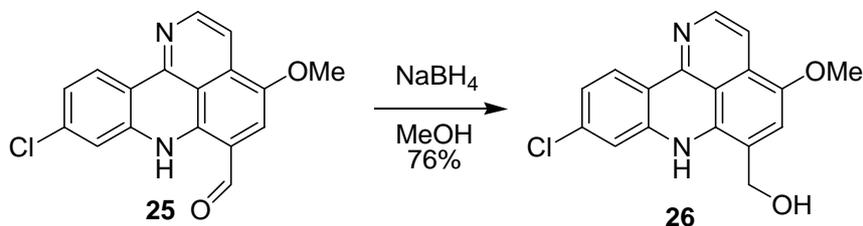


Schéma 13 : Réduction de l'aldéhyde **25** en alcool primaire **26**.

La réduction de la fonction carbonyle avec le borohydrure de sodium permet d'accéder au dérivé hydroxyméthylé avec un rendement de 76%. Le produit **26** est caractérisé en RMN dans le DMSO-d₆ par un doublet intégrant pour deux protons à 4,66 ppm (CH₂) et un triplet d'intensité 1 à 5,28 ppm (OH). L'analyse en masse haute résolution confirme la structure de l'alcool avec un pic (M+H)⁺ à m/z = 313,0745 (le calcul pour la formule brute C₁₇H₁₄N₂O₂³⁵Cl prévoit 313,0744). Ce composé présente une réactivité particulière en solution qui est exposée ci dessous.

Autoxydation de l'alcool **26**.

Lors de l'analyse des nouveaux composés par spectrométrie de masse haute résolution, l'alcool benzylique **26** a présenté un comportement inhabituel. En effet, la spectrométrie de masse après ionisation chimique était en accord avec la structure de l'aldéhyde **25**. Par contre, l'échantillon analysé en mode électrospray, qui constitue une technique d'ionisation beaucoup plus douce était en accord avec la masse de l'alcool. Intrigués par cette oxydation apparente *in situ* en phase gaz, nous avons étudié la réactivité de **26** en solution.

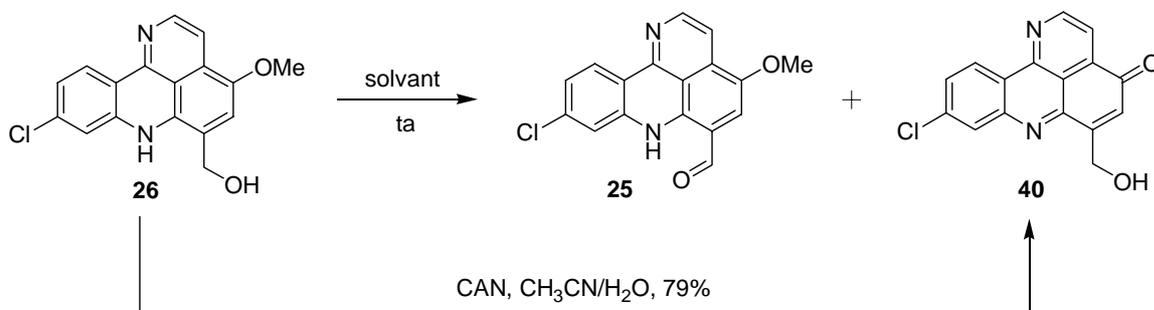


Schéma 14 : Autoxydation de l'alcool **26**.

La stabilité de l'alcool **26** dans différents solvants a été étudiée par RMN ^1H . La réaction est suivie à la fois en solvant protique (CD_3OD) et en conditions aprotiques (DMF-d_7 , DMSO-d_6 et CDCl_3). Nous avons observé la formation de deux composés majoritaires, l'aldéhyde **25** et la 6-hydroxyméthylpyrido[4,3,2-kl]acridone **40**.

Les caractérisations RMN des produits **25**, **26** et **40** sont présentées dans les trois tableaux suivants.

	DMSO-d ₆		DMF-d ₇		CD ₃ OD		CDCl ₃	
	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)
H2 (d)	8,16	5,9	8,22	5,9	8,07	6,0	8,27	6,0
H3 (d)	7,32	5,9	7,38	5,9	7,41	6,0	7,43	5,9
H5 (s)	7,28		7,32		7,20		6,79	
H8 (d)	7,45	1,9	7,52	2,0	7,26	2,1	6,94	1,7
H10 (dd)	6,99	8,3 et 2,0	7,03	8,5 et 2,0	6,98	8,7 et 2,1	7,00	8,6 et 2,0
H11 (d)	8,27	8,3	8,38	8,4	8,23	8,6	8,38	8,6
CH ₂	4,66 (d)	5,3	4,80 (s)		4,53 (s)		4,89 (s)	
CH ₃ (s)	3,91		3,97		3,96		3,93	
OH	5,28 (t)	5,3	5,28 (s)		-		nd	
NH (s)	9,46		9,61		-		nd	

Tableau 4 : Données RMN ^1H de l'alcool **26**.

	DMSO-d6		DMF-d7		CD ₃ OD		CDCl ₃	
	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)
H2 (d)	8,65	5,7	8,70	5,6	8,52	5,8	8,59	5,8
H3 (d)	7,58	5,7	7,64	5,6	7,59	5,8	7,57	5,8
H5 (s)	7,54		7,60		7,31		6,99	
H8 (d)	7,92	2,0	7,96	1,9	7,47	1,9	7,24	1,8
H10 (dd)	7,32	8,6 et 2,0	7,37	8,7 et 2,0	7,25	8,7 et 1,9	7,19	8,6 et 1,9
H11 (d)	8,54	8,6	8,64	8,7	8,47	8,7	8,57	8,3
CHO (s)	10,00		10,06		9,87		9,80	
CH ₃ (s)	3,99		4,07		4,02		3,94	
NH (s)	12.11						12.29	

Tableau 5 : Données RMN ¹H de l'aldéhyde **25**.

	DMSO-d6		DMF-d7		CD ₃ OD		CDCl ₃	
	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)
H2 (d)	9,48	4,7	9,55	4,6	9,44	4,7	9,43	4,6
H3 (d)	8,17	4,7	8,24	4,6	8,23	4,7	8,21	4,6
H5 (t)	6,98	1,9	7,10	2,0	7,10	1,9	6,91	
H8 (d)	8,22	2,2	8,25	2,2	8,26	1,9	8,25	2,0
H10 (dd)	7,90	8,7 et 2,2	7,97	8,7 et 2,2	7,85	8,7 et 1,9	7,80	9,0 et 2,0
H11 (d)	8,97	8,7	9,09	8,7	9,10	8,7	9,09	9,0
CH ₂ (dd)	4,98	5,3 et 1,9	5,15	5,3 et 2,0	5,16	1,9	5,11	6,2
OH (t)	5,60	5,3	5,73	5,3			6,35	

Tableau 6 : Données RMN ¹H de l'alcool oxydé **40**.

L'alcool oxydé **40** a été préparé de façon indépendante en traitant **26** par le CAN (déméthylation oxydative). Le produit est caractérisé en spectrométrie de masse par un ion moléculaire M⁺ à m/z = 296,0 en impact électronique. On peut remarquer en RMN la multiplicité atypique du groupement méthylène (doublet de doublet) qui est couplé en J³ avec le OH et en J⁴ avec le proton H-5. Ce même proton H-5 apparaît comme un triplet avec J⁴_(CH₂/H5) = 2 Hz .

Les rendements ont été estimés par RMN ^1H en intégrant les signaux caractéristiques de chaque composé et les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant.

	Durée (jours)	% 26	% 25	% 40
DMSO-d6	26	70	16	6.5
	96	14.5	53	15.5
DMF-d7	23	65	15	2
CD ₃ OD	14	0	30	39
CDCl ₃	7	0	44	22

Tableau 7 : Avancement de l'autoxydation en fonction du temps et du solvant.

La dégradation apparaît plus rapide dans le chloroforme ou le méthanol que dans les solvants plus polaires (DMSO et DMF). Les proportions des différents produits dépendent fortement du solvant et aucune corrélation avec la polarité ou le pouvoir ionisant ne peut être effectuée.

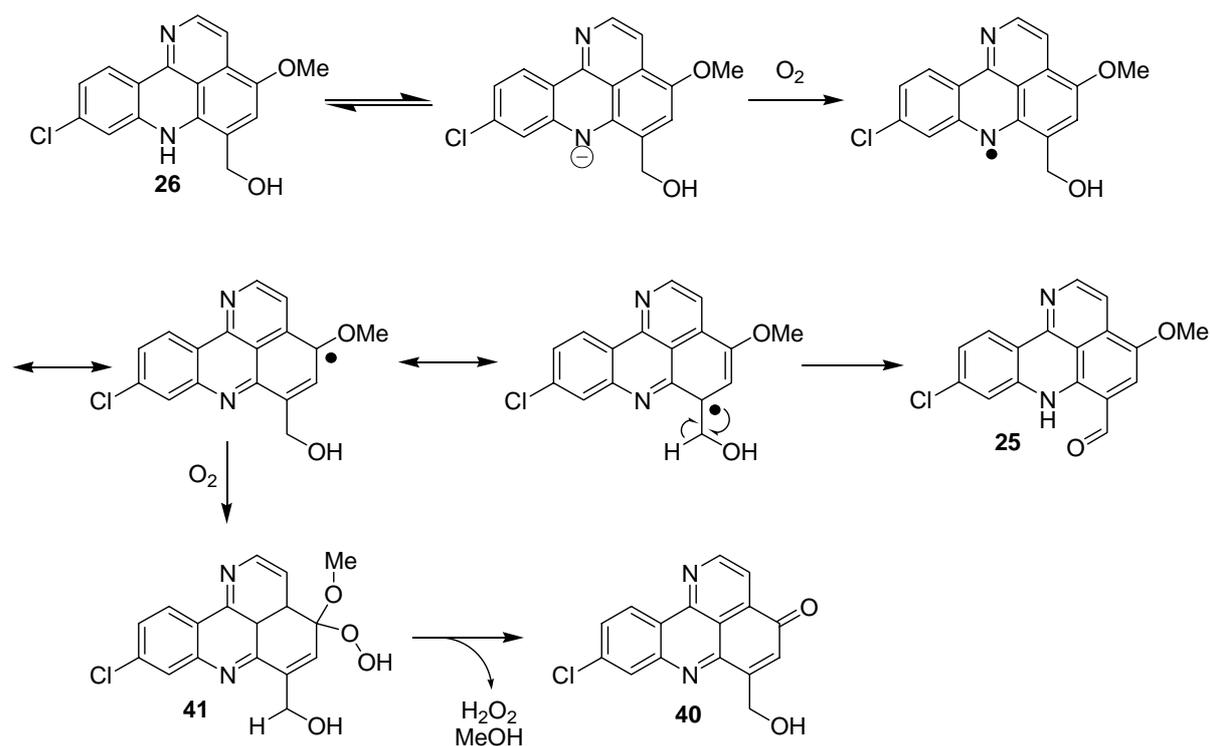


Figure 15 : Mécanisme de dégradation radicalaire proposé.

Une telle dégradation avait déjà été observée par Ireland¹² au cours d'un travail concernant l'isolation de la Styelsamine A. Aucun mécanisme n'avait été proposé par les auteurs.

¹² B. R. Copp, J. Jompa, A. Tahir, C. M. Ireland. *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 8024-8026.

Considérant le caractère acide du proton N-H ($pK_a = 5,56$) et la facilité de l'oxydation, nous proposons un mécanisme radicalaire basé sur la délocalisation du radical et la réaction avec l'oxygène moléculaire (figure 15). Nous n'avons pas prouvé ce mécanisme, toutefois, des intermédiaires tels que **41** ont déjà été isolés au cours de l'autoxydation du 9-amino-10-méthoxyanthracène¹³ qui est connu pour son instabilité.

3.2. Lien imine et amine.

La réaction de formation de l'imine consiste à faire réagir une amine primaire, par exemple la N,N-diméthylamino-propylamine, sur l'aldéhyde **25**. Il faut piéger l'eau qui se forme au cours de cette étape car la réaction est réversible et l'équilibre est déplacé dans le sens de formation de l'aldéhyde. Ceci est réalisé en ajoutant du sulfate de sodium dans le milieu. Nous avons ainsi obtenu l'imine **27** avec 77% de rendement.

Nous n'avons pas réduit l'imine **27** car elle est instable. Par contre, nous avons effectué une réaction d'amination réductrice "one pot" afin d'obtenir l'amine **28** correspondante.

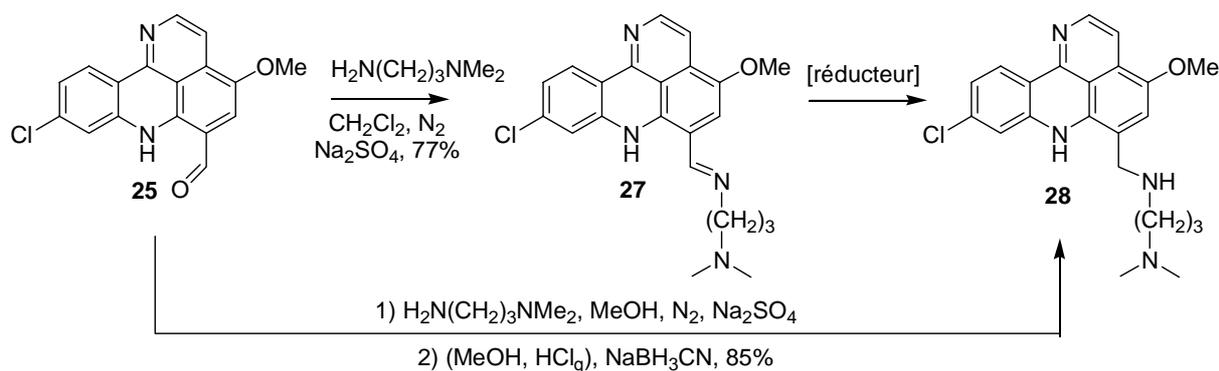


Schéma 15 : Réactivité de l'aldéhyde avec une amine primaire.

Le réducteur de choix pour ce type de réaction est le cyanoborohydrure de sodium¹⁴ avec lequel on peut contrôler le nombre d'équivalent d'hydrure. De plus, il est nécessaire d'ajuster le pH du milieu réactionnel vers 6-7 avec une solution de MeOH/ HCl_{gaz} avant de rajouter NaBH_3CN . La cinétique de la réduction est lente, et nous avons isolé l'amine **28** avec un rendement de 85%.

Les composés **27** et **28** ont caractérisés en RMN ^1H dans le chloroforme deutéré et en spectrométrie de masse (mode IE).

¹³ J. Rigaudy, J. Barcelo, C. Igier. *Bull. Chem. Soc. Fr.*, **1974**, 1151-1154.

¹⁴ C. F. Lane. *Synthesis*, **1975**, 135-146.

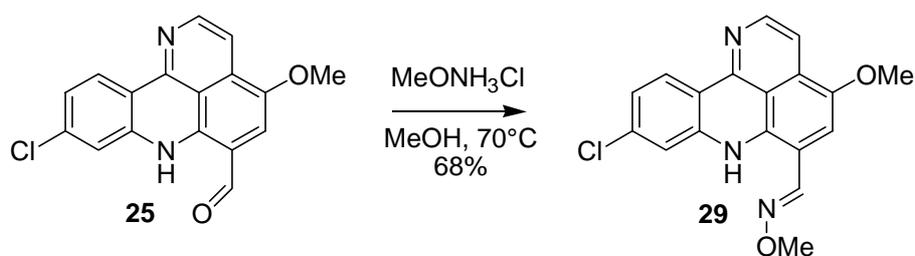
		Imine 27	Amine 28
Masse exacte M^{+} (^{35}Cl)	M théorique	394,1	396,2
	M trouvée	393,9	396,2
RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ ppm	H-5	6,94	6,80
	H-C=N	8,44	-
	Ar- CH₂ -NH-	-	4,05

Tableau 8 : Caractérisation de l'imine **27** et de l'amine **28**.

La réactivité de l'aldéhyde **25** vis à vis des amines a donc été étudiée et a permis d'isoler deux produits présentant respectivement une fonction imine et amine avec de bons rendements. Nous avons ensuite envisagé d'utiliser une autre classe de nucléophiles : les O-alkyle oxyamines.

3.3. Lien oxime.

L'aldéhyde **25** réagit avec la méthoxyamine dans le méthanol à 70°C pour former l'oxime **29** avec un rendement de 68%. Des expériences NOE ont indiqué la formation exclusive de l'isomère E. En effet, on observe un effet NOE fort entre le singulet H-5 à 6,74 ppm et le proton de l'oxime à 8,20 ppm.

Schéma 16 : Formation du lien oxime **29**.

La modélisation moléculaire dans le vide (Insight Discover II, champ de force CVFF) confirme cette configuration privilégiée dans laquelle une liaison hydrogène s'établit entre le doublet de l'azote de l'oxime et le proton hétérocyclique N7-H.

Il existe de nombreux produits naturels actifs dont la structure présente une partie saccharidique comme par exemple certaines anthracyclines. Aussi, notre laboratoire disposant d'une bibliothèque d'oligosaccharides modifiés par un groupe oxyamine¹⁵, nous avons utilisé la réactivité décrite ci-dessus pour élaborer des glycoconjugués pyridoacridine-sucre. Les conditions expérimentales sont analogues à celles utilisées dans la synthèse d'imine : Il est nécessaire de contrôler le pH par ajout de MeOH, HCl_g pour augmenter la vitesse de réaction (la cinétique est très lente en milieu basique, elle est optimale pour pH = 4-5, tandis qu'un pH trop acide peut conduire à une dégradation du sucre).

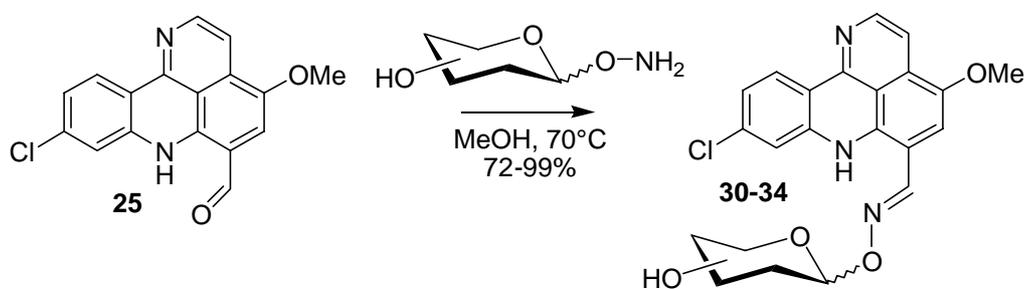


Schéma 17 : Conjugués entre la pyridoacridine et des oligosaccharides par lien oxime.

Motif saccharidique	Produit	Rend. brut	Masse exacte
	30	99%	487,1
	31	93%	487,1
	32	72%	487,1
	33	89%	649,2
	34	83%	811,2

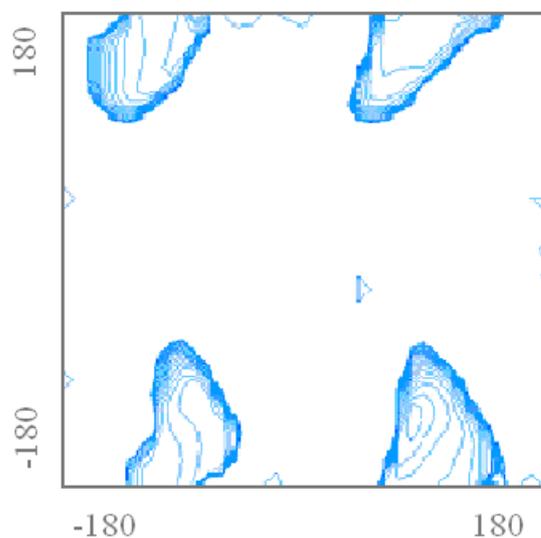
Tableau 9 : Résultats expérimentaux pour les conjugués **30-34**.

¹⁵ O. Renaudet, P. Dumy. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 7575-7578.

Nous avons réalisé ce couplage avec cinq sucres modifiés : Le glucose α et β , le galactose β , le lactose β et le maltotriose β . Les conjugués ont été obtenus avec de très bons rendements bruts. Nous avons effectué la réaction avec un léger excès de sucre (1,1 équivalents) et nous avons réalisé une purification par CLHP semi-préparative avant de tester l'activité de ces produits. Les rendements de l'étape de purification sont en général supérieurs à 60%.

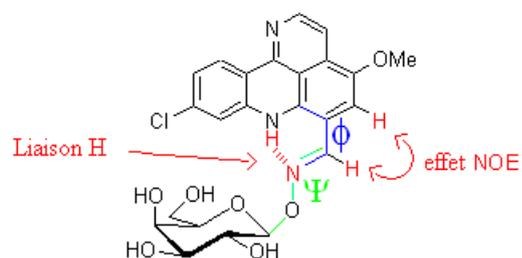
Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés dans le DMSO- d_6 et les spectres de masse ont été réalisés en mode d'ionisation électrospray où l'on observe l'ion moléculaire $(\text{M}+\text{H})^+$. Les données de RMN indiquent la présence du seul isomère E de l'oxime, caractérisé par le singulet H-5 ($\delta\text{ppm} = 7,61\text{-}7,46$) et le singulet du proton de l'oxime ($\delta\text{ppm} = 8,80\text{-}8,74$).

Nous avons modélisé l'oxime **32** (correspondant au conjugué avec le galactose) afin de mieux comprendre quel type de conformation est privilégiée chez ce conjugué. La structure a d'abord été minimisée dans le vide sur Insight Discover II puis nous avons effectué une analyse conformationnelle en faisant varier deux angles de torsion.

ANALYSE CONFORMATIONNELLE DE **32**

Deux minima d'énergie

$$\begin{cases} E_1 = 190,28 \text{ kJ/mol, } \phi_1 = -70^\circ \text{ et } \psi_1 = -170^\circ \\ E_2 = 188,29 \text{ kJ/mol, } \phi_2 = 80^\circ \text{ et } \psi_2 = -130^\circ \end{cases}$$

Distance $\text{H}_5\text{-CHN}$ 3\AA \Rightarrow Mise en évidence par NOEDistance N-H_7 $= 3\text{\AA}$ \Rightarrow Liaison HydrogèneFigure 16 : Résultats de l'analyse conformationnelle du conjugué **32**.

Les résultats montrent que deux conformations symétriques par rapport au plan aromatique de l'intercalant sont privilégiées. En fait, le motif saccharidique est positionné de façon quasiment orthogonale par rapport au chromophore pyridoacridine.

4. Réactivité des oxyiminopyridoacridines.

A basse température (-20 à 0°C), le CAN est connu pour catalyser la coupure rapide des oximes et des semicarbazones¹⁶ pour donner les composés carbonylés parents. Nous avons tout de même voulu vérifier s'il était possible de réaliser l'étape de déméthylation oxydative avec les conjugués pyridoacridine-sucre. Pour cela, nous mis en réaction l'oxime modèle **29** à température ambiante en présence de 3 équivalents de CAN. La réaction de déméthylation oxydative est rapide (5 minutes), aucune coupure du lien oxime n'a été observée et la pyridoacridone correspondante a été isolée avec 61% de rendement. Nous avons ensuite pu appliquer cette méthodologie aux conjugués avec les sucres.

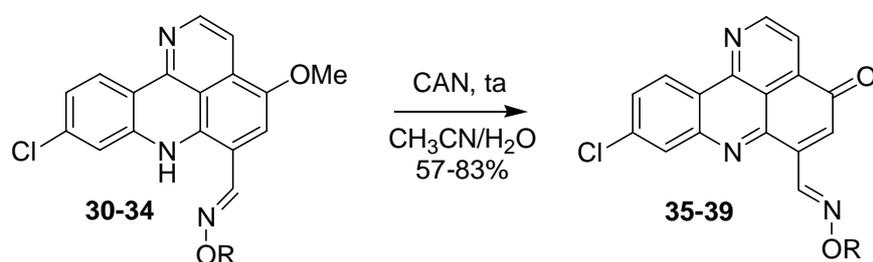


Schéma 18 : Déméthylation oxydative par le CAN.

Les résultats expérimentaux sont rassemblés dans le tableau suivant.

Groupement -OR	Produit	Rend. brut	(M+H) ⁺
-OMe	35	61%	324,0
	36	83%	472,1
	37	78%	472,1
	38	80%	634,1
	39	57%	796,2

Tableau 10 : Résultats expérimentaux pour les conjugués **35-39**.

¹⁶ T.-L. Ho. *Synthesis*, **1973**, 347-354.

Les rendements obtenus sont bons excepté pour le conjugué avec le maltotriose **39** qui présente une solubilité dans l'eau plus importante (les produits sont isolés par précipitation puis filtration).

De plus, la RMN en solution des conjugués montre la présence d'un seul isomère de l'oxime (vraisemblablement la configuration E).

IV. Synthèse en série 9-Amino-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine.

Nous nous sommes donné comme but la synthèse d'une pyridoacridine présentant une fonction amine primaire. La présence de cette fonction amine nous permettrait d'accéder à des molécules dont la structure est plus complexe (par exemple des oxazines ou des bases de tröger). Pour cela nous avons choisi comme matériel de départ une acridine commerciale possédant cette fonction et notre schéma de rétrosynthèse est présenté dans la figure suivante.

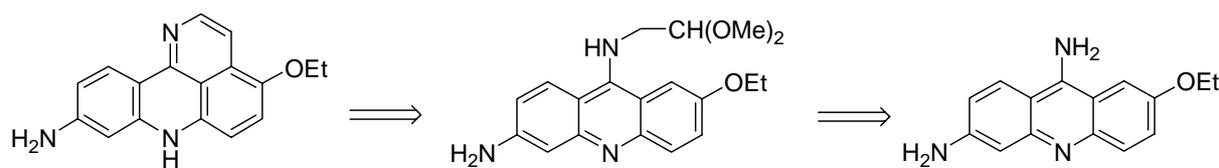


Figure 17: Rétrosynthèse de la préparation de l'amino-pyridoacridine.

Le produit de départ est donc la 6,9-diamino-2-éthoxy-acridine **42** qui est disponible commercialement. L'hydrolyse de l'amine en position 9 a été développée par Fixler¹⁷.

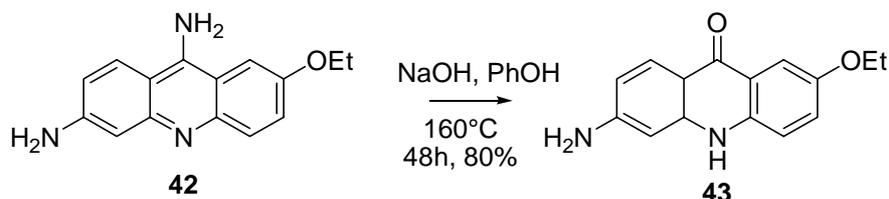
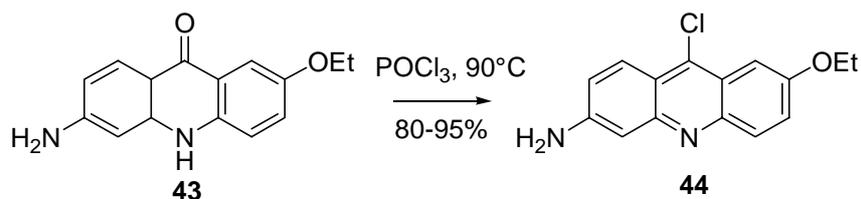


Schéma 18 : Synthèse de l'acridone **43**.

La réaction est effectuée dans le phénol en présence de soude et en chauffant à 160°C. L'acridone **43** est isolée par précipitation avec un rendement de 80%.

¹⁷ N. Fixler. *Thèse de 3^{ème} cycle*, Grenoble, **1994**.

Schéma 20 : Accès à la 6-amino-9-chloro-2-éthoxy-acridine **44**.

A partir de l'acridone **43**, la chloration¹⁸ en position 9 est réalisée par chauffage dans l'oxychlorure de phosphore. Le produit **44** est obtenu après traitement (hydrolyse puis neutralisation) avec des rendements compris entre 80 et 95%. La caractérisation par RMN dans le chloroforme met en évidence les six protons aromatiques non équivalents et l'on observe l'amine aromatique sous forme de singulet à $\delta = 4,18$ ppm. La spectrométrie de masse en mode DCI(+) confirme la structure avec l'ion moléculaire $(M+H)^+$ à 273,0 et un massif isotopique caractéristique d'une molécule possédant un atome de chlore (ratio $^{35}\text{Cl} / ^{37}\text{Cl} = 3$).

La 9-chloro-acridine **44** peut être fonctionnalisée par une amine par substitution nucléophile du chlore¹⁹. Comme précédemment, nous avons choisi comme nucléophile la 2,2-diméthoxy-éthane-1-amine. La substitution est réalisée dans l'éthanol à reflux pendant 24h et on isole le produit **45** avec un rendement de 89%.

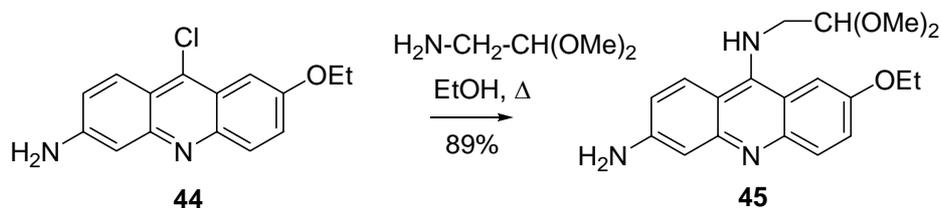


Schéma 21 : Substitution nucléophile du chlore.

La caractérisation par RMN met en évidence les protons aromatiques du noyau acridine et l'intégralité des protons aliphatiques. En ce qui concerne les protons échangeables, le NH sort sous forme de singulet à $\delta = 7,61$ ppm tandis que le NH_2 apparaît également comme un singulet à 5,47 ppm. La spectrométrie de masse enregistrée en mode DCI(+) confirme la structure avec un ion moléculaire $(M+H)^+$ à $m/z = 342,0$ (La masse exacte théorique étant 341,2).

¹⁸ A. Albert. *The Acridines*, **1966**, 2nd Ed., Chap. 7, 114-130.

¹⁹ S. Skonieczny. *Heterocycles*, **1977**, 6, 987-1060.

Pour accéder au motif amino-pyridoacridine, il restait à effectuer la cyclisation intramoléculaire, ce que nous avons réalisé dans l'acide trifluoroacétique à température ambiante. Deux structures pouvaient être envisagées (cyclisation du côté éthoxy ou du côté amino) et après 12h de réaction, nous avons obtenu un seul produit avec un rendement de 92% correspondant à la masse $m/z = 278,1$ en mode DCI(+).

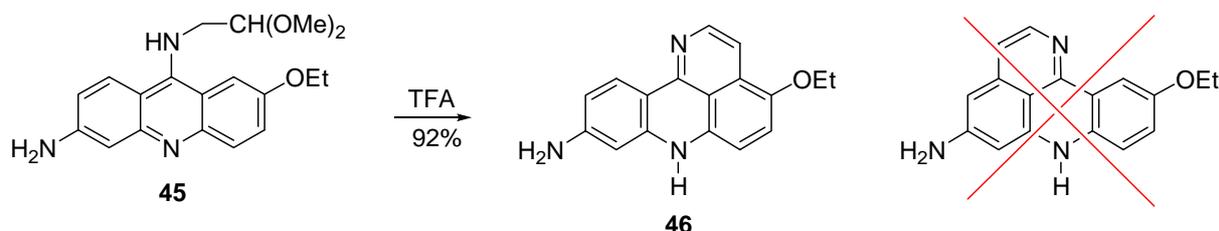


Schéma 22 : Etape de cyclisation.

La RMN a une dimension a permis de résoudre la structure sans aucune ambiguïté. D'une part, la multiplicité des signaux aromatiques est en accord avec la structure **46** : On note la présence de deux doublets couplés entre eux par une constante de 8,0 Hz qui correspondent à H-6 et H-5. D'autre part, nous avons réalisé l'attribution complète des protons de **46** en utilisant la séquence d'impulsion cycloNOE sur un spectromètre de RMN à 500 MHz.

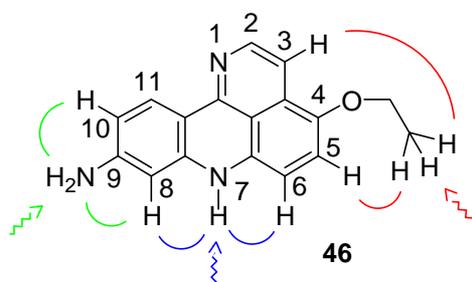


Figure 18 : Effets NOE pertinents.

En irradiant sélectivement les signaux, nous avons observé des corrélations NOE entre le CH_3 et H-5/H-3, le N-H et H-6/H-8 et finalement, le NH_2 et H8/H10.

V. Synthèse de dérivés polycycliques polyazotés plans étendus.

1. Contexte.

L'intérêt des systèmes polyaromatiques réside dans leur potentiel d'interaction avec l'ADN. En effet, leur structure aromatique plane favorise l'interaction avec les bases nucléiques par un processus d'intercalation. L'avantage des structures polyazotés vient de la capacité des doublets non liants des atomes d'azote à être engagée dans des liaisons de coordination avec des cations de métaux de transition, tels que le fer, le cobalt, le cuivre, le cuivre, le ruthénium, le rhodium, l'osmium ou l'iridium...

L'une des méthodes de choix concernant la synthèse de ligands hétéroaromatiques (dérivés notamment de la phénantroline), est la condensation entre une *ortho*-diamine et une *ortho*-dicétone aromatique permettant d'accéder au motif phénazine.

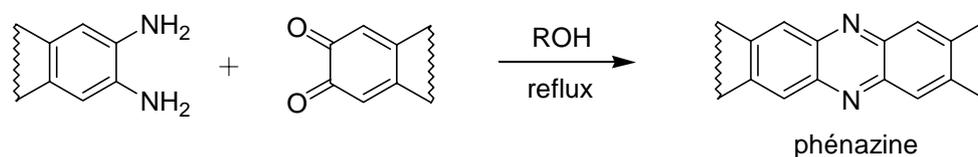


Figure 19 : Condensation d'une diamine et d'une dicétone.

Cette méthodologie est souvent utilisée dans le cadre de l'élaboration des structures polyazaaromatiques et on peut citer à titre d'exemples les ligands dipyridophénazine (dppz)²⁰, tétrapyridophénazine (tpphz)²¹, et dipyridoquinoxaline (dpq)²².

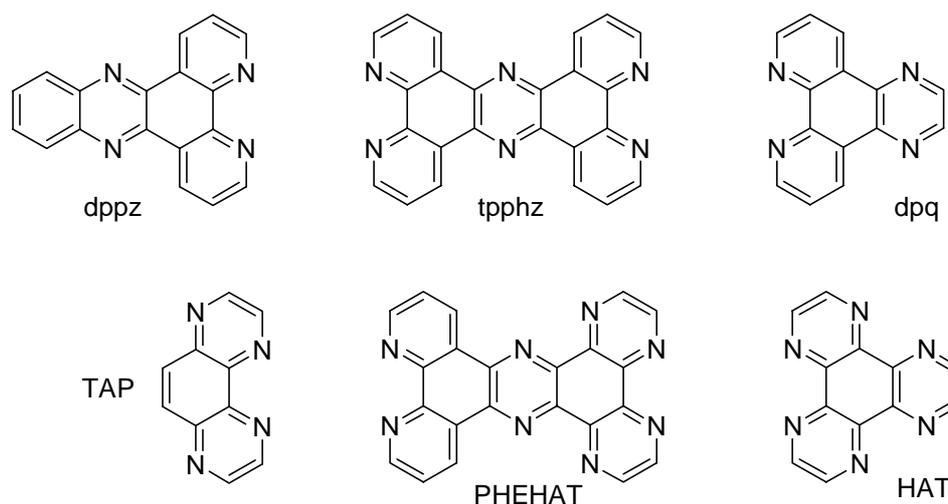


Figure 20 : Structure des ligands polycycliques polyazotés.

²⁰ M. Yamada, Y. Tanaka, Y. Yoshimoto, S. Kuroda, I. Shimao. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1992**, 65 (4), 1006-1011.

²¹ J. Bolger, A. Gourdon, E. Ishow, J.-P. Launay. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, (17), 1799-1800.

²² K. O'Donoghue, J. C. Penedo, J. M. Kelly, P. E. Kruger. *Dalton Trans.*, **2005**, (6), 1123-1128.

2. Première stratégie.

Une stratégie de synthèse de ligands plans étendus présentant sept cycles aromatiques accolés (heptacycles) a été mise au point au laboratoire²³.

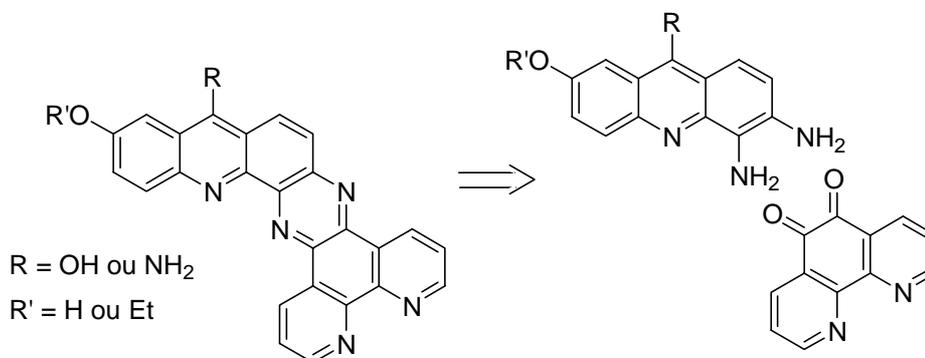


Figure 21 : Structure des heptacycles.

L'étape clé de la synthèse repose sur la condensation d'une 3,4-*ortho*-diaminoacridine avec la phen-5,6-dione. L'accès au motif bis nucléophile est réalisé en deux étapes : Tout d'abord, un précurseur d'amine est introduit sous forme de groupement azo via une réaction de substitution électrophile aromatique régiosélective impliquant un sel de diazonium **48**.

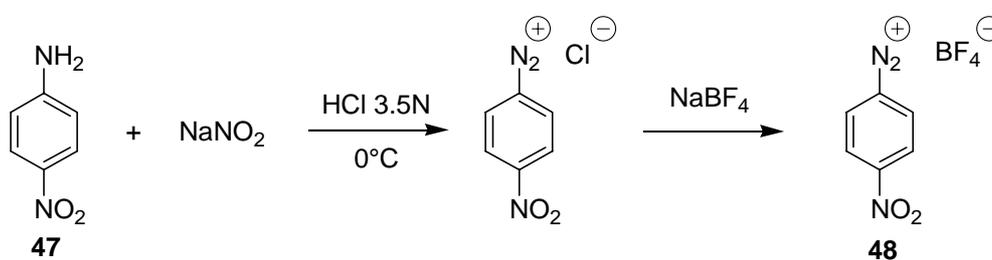


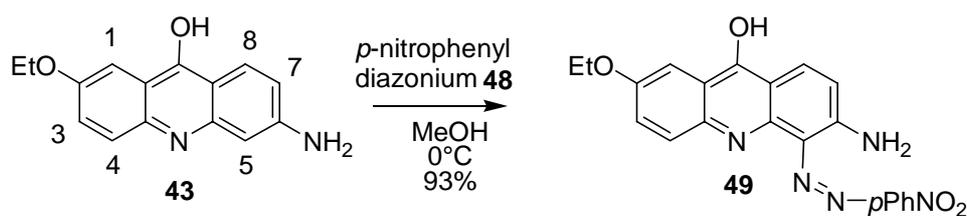
Schéma 23 : Formation du diazonium **48** à partir de la *para*-nitroaniline.

Le sel de diazonium utilisé dans cette réaction est préparé directement à partir de la *para*-nitroaniline **47** commerciale par traitement au nitrite de sodium en milieu acide, et il est isolé sous forme de tétrafluoroborate²⁴.

La réaction de SE_{Ar} utilisant un sel de diazonium avait déjà été décrite dans la littérature pour d'autres acridines (éthacridine et proflavine)²⁵ et a été étendue à l'analogue de l'éthacridine modifiée en position 9 par un groupement hydroxyle.

²³ R. Dinica, F. Charmantray, M. Demeunynck, P. Dumy. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 7883-7885.

²⁴ S. R. Sandler, W. Karo. *Organic functional group preparations*, **1968**, 401-403.

Schéma 24 : Introduction du groupe azo sur l'acridine **43**.

Pour expliquer le caractère hautement régiosélectif de cette réaction, nous avons comme précédemment réalisé des calculs au niveau DFT (fonctionnelle B3LYP et base 6-31G*).

L'analyse de la densité de charge sur les atomes de carbone potentiellement réactifs envers un électrophile montre que la réaction n'est pas sous contrôle de charge.

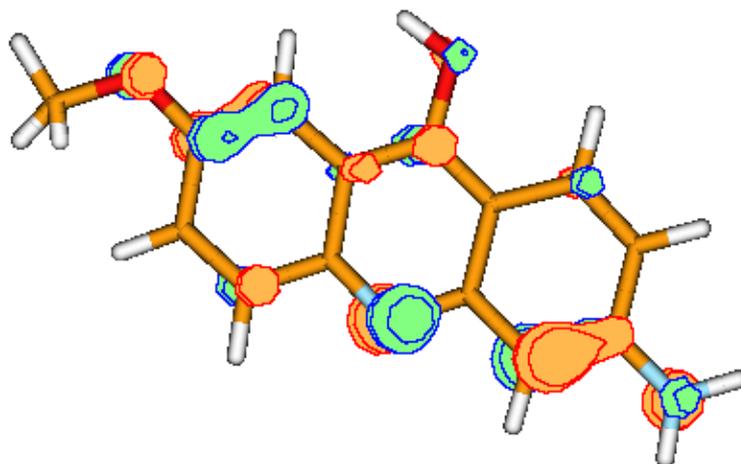
N° carbone	Charge (eV)
1	- 0,27825
3	- 0,29566
4	- 0,19725
5	- 0,29486
7	- 0,26308
8	- 0,18801

Tableau 11 : Densité électronique sur les carbones de **43**.

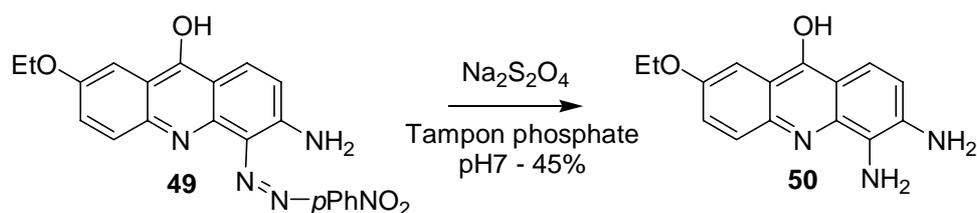
En effet, plusieurs atomes de carbones présentent la même charge formelle ($-0,295^{\text{eV}}$ pour C-3 et C-5) et si l'on compare les atomes 1, 4 et 5 qui sont susceptibles de réagir, la différence de densité électronique entre les carbones dont la charge est élevée ($-0,278^{\text{eV}}$ pour C-1 et $-0,295^{\text{eV}}$ pour C-5) est trop ténue pour qu'un contrôle électrostatique puisse expliquer à lui seul la régiosélectivité totale observée expérimentalement.

En fait, l'analyse des orbitales moléculaires permet de justifier la régiosélectivité observée expérimentalement (figure 22). Le contrôle orbitalaire oriente la SE en position 5 car ce carbone présente le coefficient le plus élevé.

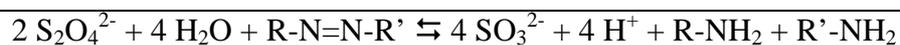
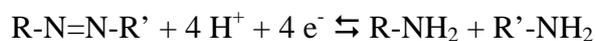
²⁵ H. Möhrle, U. Von der Lieck-Waldheim, H. D. Martin, N. Possberg, S. Beutner. *Pharmazie*, **1997**, 52 (8), 603-611.

Figure 22 : Représentation des coefficients de l'orbitale frontière HO de **43**.

Ensuite, la double liaison N=N dans l'intermédiaire **49** subit une coupure réductrice en présence de dithionite de sodium.

Schéma 25 : Etape de réduction de **49** par le dithionite de sodium.

En effet, le dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) est connu pour réduire les composés azo aromatiques²⁶. Les équations rédox associées sont les suivantes :



Le rendement global sur les deux étapes de 42% est acceptable pour continuer dans cette voie de synthèse.

²⁶ M.-H. Hung, L. M. Stock. *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 448-453.

La méthode d'accès au synthon bis-électrophile **52** est une oxydation de la phénantroline commerciale **51** dans un mélange $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ en présence d'ions bromures^{20,28}.

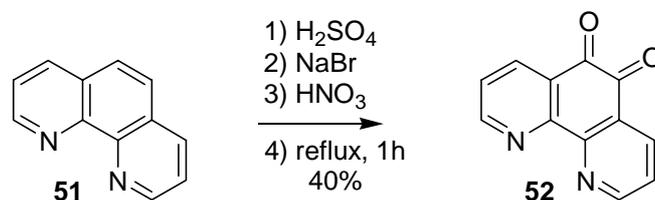


Schéma 26 : Synthèse de la phendione **52**.

Nous avons obtenu un rendement de 40% (après purification par recristallisation dans le toluène puis dans l'acétate d'éthyle) qui est conforme aux données de la littérature.

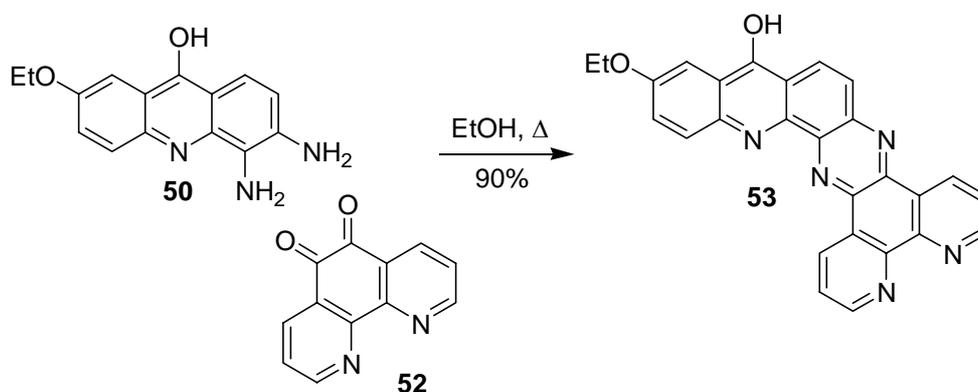


Schéma 27 : Condensation dans l'éthanol à reflux.

La synthèse de l'heptacycle **53** (12-hydroxy-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phenazine) est réalisée en mettant en présence des quantités stoechiométriques d'*ortho*-diamine **50** et de phendione **52** dans l'éthanol à reflux. Le produit de condensation est isolé par simple filtration avec un excellent rendement de 90%.

²⁸ W. Paw, R. Eisenberg. *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 2287-2293.

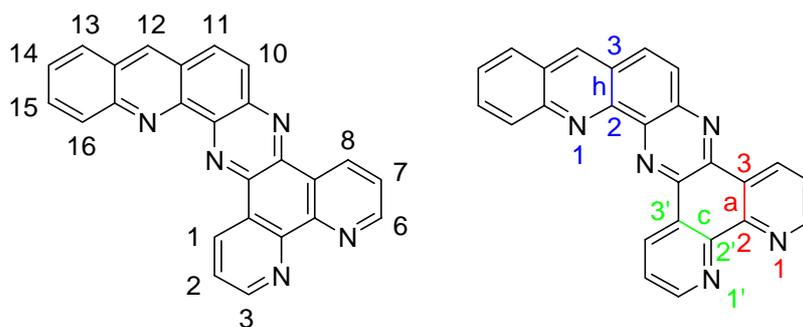


Figure 23 : Numérotation des dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phenazine.

Afin d'activer la position 12 vis à vis des réactions de substitution nucléophile aromatique, l'hydroxy-heptacycle **53** a été engagé dans une réaction de chloration. Pour cela, le produit est solubilisé dans l'oxychlorure de phosphore puis le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant une nuit. Le 12-chloro-heptacycle **54** est isolé après hydrolyse du réactif et neutralisation du brut de réaction avec un rendement de 75%.

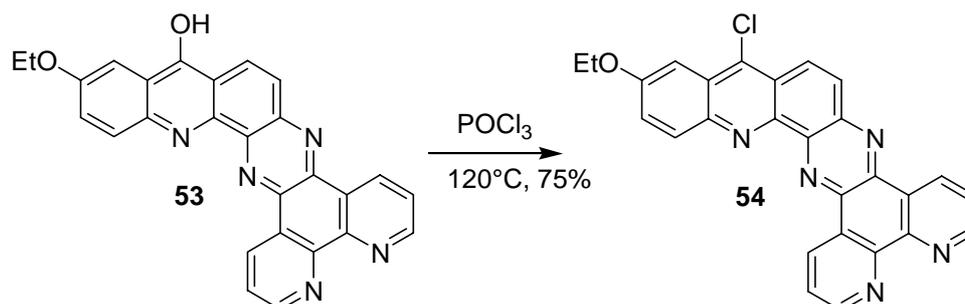


Schéma 28 : Réaction de chloration en série heptacycle.

Le produit **54** (masse exacte = 461,1) a été caractérisé par spectrométrie de masse en mode d'ionisation EI par un ion moléculaire M^{+} à $m/z = 461,0$ ainsi qu'en mode DCI(-) où l'on détecte M^{-} à $m/z = 461,1$. Les massifs isotopiques sont caractéristiques d'une molécule possédant un atome de chlore (75% ^{35}Cl - 25% ^{37}Cl).

Le composé **54** a également été caractérisé par RMN dans le TFA-d. La structure possède 11 protons aromatiques non équivalents et la multiplicité des signaux permet de faire une attribution complète. En fait, la seule difficulté réside dans la distinction entre les deux systèmes AMX de la partie phénantroline. On peut supposer que H-1 résonne à champ plus faible que H-8 car il se trouve influencé par le déblindage dû aux deux atomes d'azote. Nous

avons démontré cela par RMN NOE à une dimension et réalisé ainsi l'attribution complète des protons de la structure **54**.

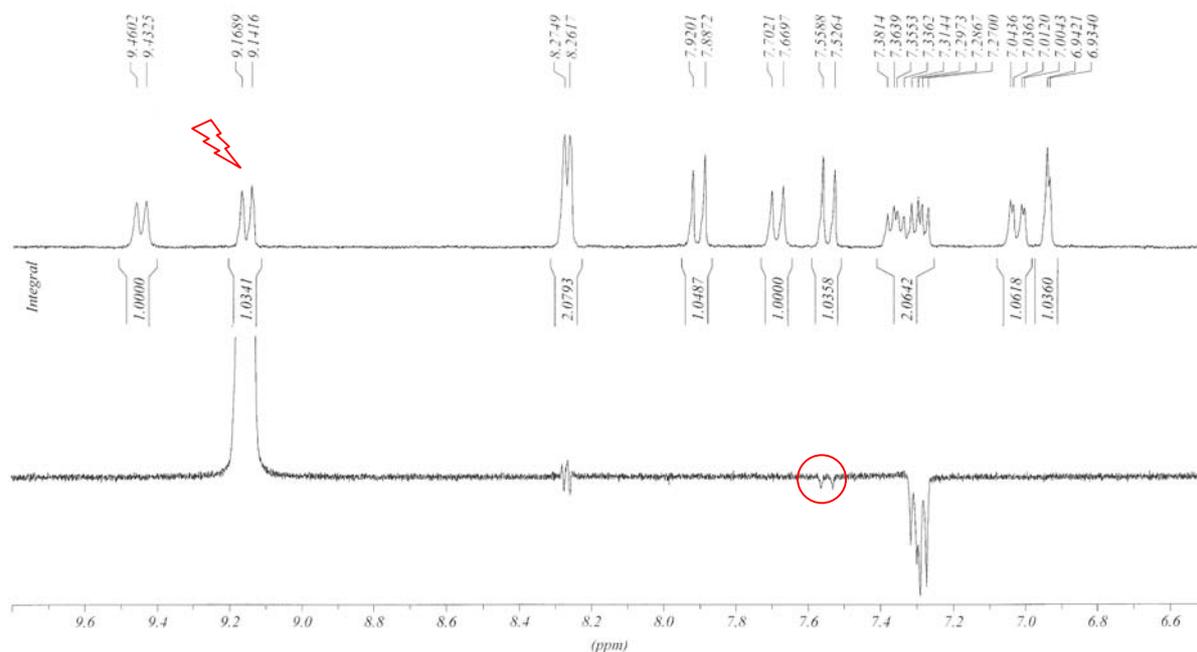


Figure 24 : Expérience de NOE1D réalisée sur le composé **54**.

En effet, lorsque l'on irradie sélectivement les protons 1 ou 8 de la partie phénantroline, les effets NOE observés sont différents. L'irradiation de H-8 permet d'observer un couplage spatial avec H-10 (car la distance entre les deux noyaux de 4,01 Å, calculée par modélisation moléculaire est compatible avec l'observation d'un effet NOE). Par contre, si l'on irradie H-1 dans les mêmes conditions, aucun effet NOE n'est observé avec H-16 car la distance qui les sépare est trop importante (4,68 Å).

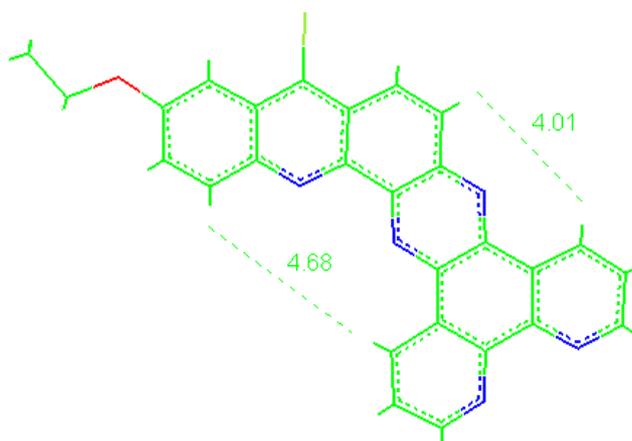


Figure 25 : Structure minimisée de **54** et distances inter-protons mises en évidence.

A partir du dérivé chloré **54**, nous avons constitué une famille de 12-alkylamino-heptacycles en exploitant la même réactivité qu'en série acridine ; c'est à dire la substitution nucléophile aromatique du chlore par une amine primaire.

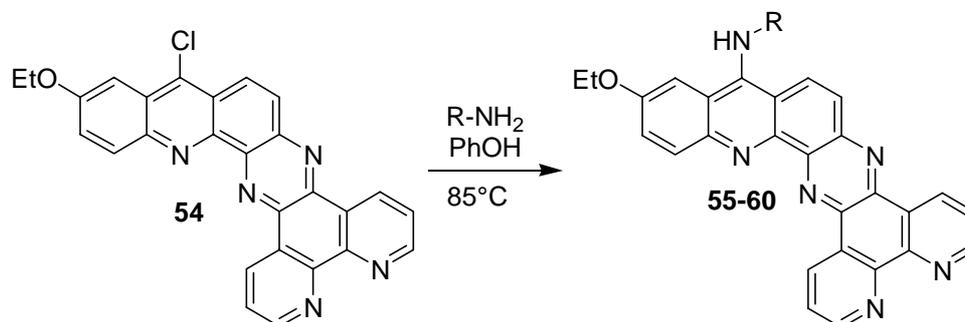


Schéma 29 : Fonctionnalisation du chromophore heptacycle par des amines.

La réaction est réalisée en chauffant à 85°C dans le phénol un excès d'amine primaire avec le produit **63** pendant une nuit. Les rendements sont compris entre 60% et 99%. On peut noter que la présence d'une ou de plusieurs fonctions amines sur la chaîne introduite en position 12 entraîne une baisse de rendement lorsque l'on isole les produits. Il s'agit d'une perte de matériel lors de l'étape de lavage du précipité obtenu.

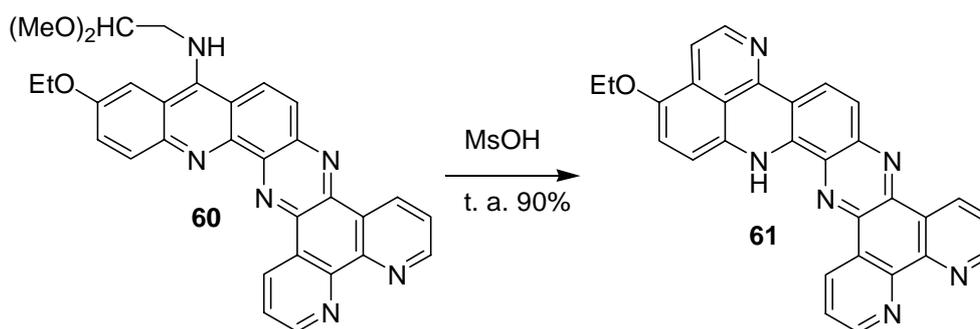
Chaîne latérale	Produit	Rendement	SM : (M+H) ⁺ ou M ⁺	
			calculé	trouvé
	55	85%	485,2	485,1
	56	70%	500,2	500,2
	57	99%	584,3	584,1
	58	82%	556,2	556,1
	59	60%	599,3	599,2
	60	90%	531,2	531,3

Tableau 12 : Caractérisation de la famille des heptacycles.

Tous les composés **55** à **60** ont été caractérisés par spectrométrie de masse (DCI positive ou négative) ainsi qu'en RMN du proton dans le DMSO-d₆ auquel on a parfois ajouté

quelques gouttes de TFA-d. Les spectres de tous les produits font apparaître les 11 protons aromatiques de l'heptacycle, les protons aliphatiques du groupement éthoxy qui corrélient entre eux sur les spectres COSY ainsi que les protons caractéristiques de chaque chaîne aliphatique introduite en position 12.

A partir du conjugué **60** qui possède une fonction aldéhyde protégée sous forme de diméthylacétal, nous avons réalisé l'étape de cyclisation intramoléculaire via une substitution aromatique. Pour cela, nous avons solubilisé **60** en milieu acide (TFA ou MsOH).



L'avancement de la réaction est suivi par CLHP et l'on voit progressivement disparaître le pic attribué à l'acétal de départ au profit de la formation de l'octacycle **61**. Le taux de conversion ainsi que la cinétique sont équivalents pour les deux conditions acides testées et on isole le produit désiré avec un excellent rendement de 90%.

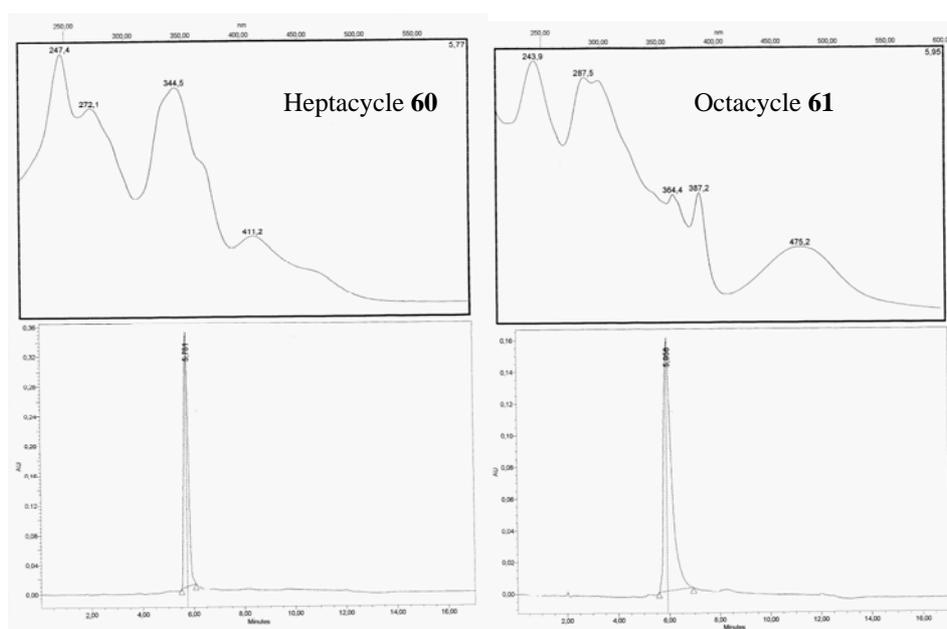


Figure 26 : Chromatogramme CLHP avec détection en absorption UV-Vis de **60** et **61**.

Le produit **61** a été caractérisé par RMN du proton dans le TFA-d. Le spectre montre une distribution des 12 protons aromatiques de la structure présentant huit cycles conjugués. On peut noter la présence de trois systèmes AB attribués respectivement à H10/H11, H13/H14 et H16/H17. La distinction entre les deux systèmes AMX de la partie phénantroline n'a pas pu être réalisée et les protons H1 et H8 sortent presque au même déplacement chimique ($\Delta\delta = 0,08 \text{ ppm} = 24 \text{ Hz}$). La spectrométrie de masse enregistrée avec deux modes différents d'analyse confirme la structure du produit avec des ions moléculaires $(M+H)^+ = 467,2$ en DCI(+) et $M^+ = 466,3$ en DCI(-) ; la masse exacte de **61** valant 466,2.

3. Seconde stratégie : Intermédiaire Diaminopyridoacridine.

Nous avons également envisagé une seconde voie de synthèse du ligand octacyclique **61** dans laquelle l'intermédiaire clé est le motif *ortho*-diamino pyridoacridine.

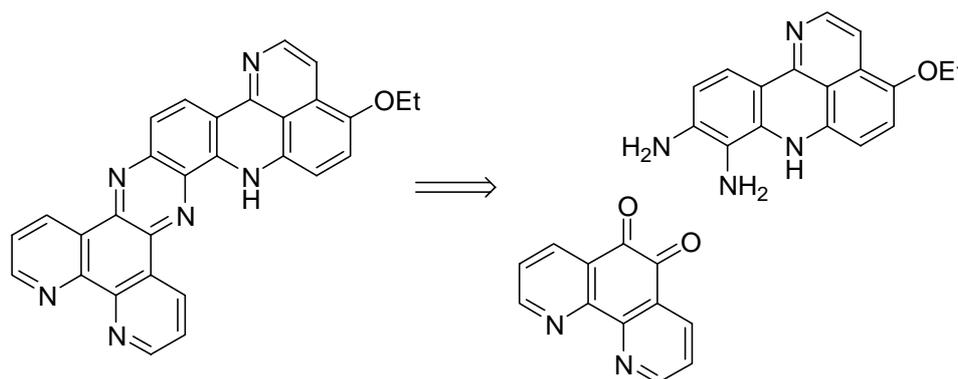


Figure 27 : Rétrosynthèse de la seconde voie d'accès à l'octacycle **61**.

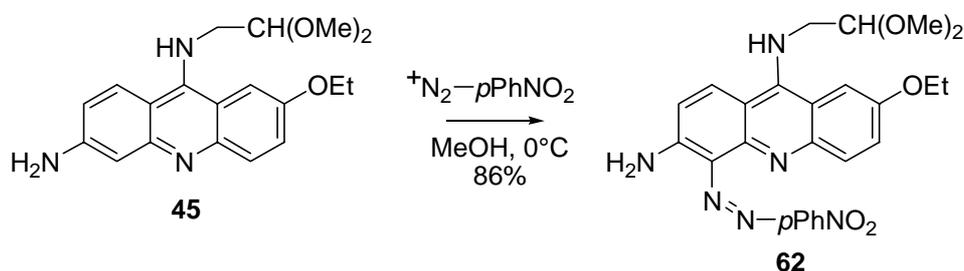


Schéma 31 : Diazotation régiosélective de **45**.

Pour synthétiser le synthon diaminopyridoacridine, nous avons commencé par introduire le précurseur de fonction amine en utilisant comme précédemment un sel de diazonium (cf. p68-69). La réaction s'effectue dans le méthanol à froid par ajouts progressifs

d'une solution de diazonium, et le produit est isolé avec un bon rendement de 86%. Le produit a été caractérisé en spectrométrie de masse à la fois en mode DCI(+) avec $m/z = 491,0$ et en DCI(-) avec $m/z = 490,0$. Le spectre de RMN enregistré dans le DMSO- d_6 est en parfait accord avec l'introduction régiosélective de l'électrophile en position 4 (présence de deux doublets attribués à H-7 et H-8 et couplés par $J = 9,8$ Hz).

Nous avons ensuite réalisé à ce stade l'étape de cyclisation. En effet, pour des raisons de contrôle électronique, la présence du groupement azo électroattracteur mésomère défavorise la réactivité sur le cycle gauche de la molécule **62**.

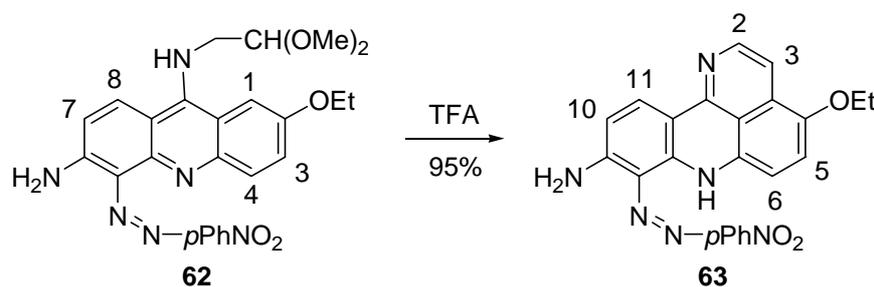


Schéma 32 : Cyclisation via une substitution électrophile aromatique intramoléculaire.

La réaction est mise en œuvre comme précédemment en utilisant l'acide trifluoroacétique qui joue simultanément le rôle de solvant et de catalyseur. Le produit **63** a été caractérisé par RMN du proton. On observe notamment la disparition du proton correspondant à H-1 dans la structure **62** et de façon concomitante, l'apparition des deux protons aromatiques H-2 et H-3 qui sortent sous forme d'un système AB caractérisé par $\delta_A = 7,73$ ppm, $\delta_B = 7,64$ ppm et $J_{AB} = 8,8$ Hz. La spectrométrie de masse confirme la structure de **63** avec un ion moléculaire M^+ à $m/z = 425,9$ en mode DCI(-).

Pour accéder au motif *ortho*-diaminopyridoacridine, il reste à réduire le groupement azo en amine primaire. Pour cela, nous avons envisagé deux méthodes en parallèle, la réduction classique par le dithionite de sodium et une stratégie en deux étapes utilisant la conversion directe d'une double liaison N=N en fonction N-(*tert*-butyloxy)-cabamate.

- **Utilisation du Polymethylhydrosiloxane (PMHS) en présence de Pd/C.**

Récemment, la conversion directe d'hydrazines aromatiques et de composés azo en amines protégées par le groupement Boc a été décrite²⁸. Il s'agit d'une coupure réductrice des

²⁸ S. Chandrasekhar, C. R. Reddy, R. J. Rao. *Synlett.*, **2001**, 10, 1561-1562.

liaisons N-N et N=N via l'utilisation de PMHS comme source d'hydrure, de di-tert-butyl-dicarbonat (Boc_2O) et d'une quantité catalytique de palladium sur charbon.

Cette voie de synthèse offrait l'avantage, grâce à la présence du groupement Boc, de conduire à des *ortho*-diamines moins polaires.

Nous avons soumis le composé azo **63** aux conditions opératoires décrites par les auteurs.

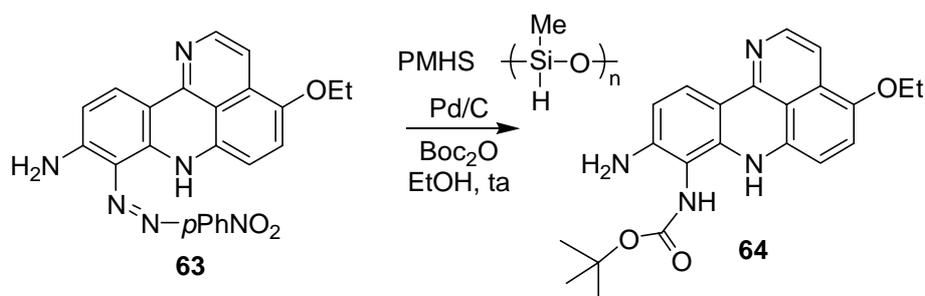


Schéma 33 : Transformation directe d'une liaison N=N en NHBoc.

Nous avons suivi l'avancement de la réaction par CLHP. On observe la formation de l'*ortho*-diaminopyridoacridine désirée et de façon concomitante la disparition du composé azo **63**. Avant d'obtenir un taux de conversion de 100%, plusieurs nouveaux produits se forment. Nous avons chromatographié le brut réactionnel sur gel de silice.

Le produit **64** est isolé avec 18% de rendement seulement. En effet, plusieurs produits secondaires expliquent ce rendement et certaines structures peuvent être proposées d'après les données de spectrométrie de masse (mode d'ionisation électrospray).

Produit	Masse exacte	Masse exp.	Ion exp.
64	392,2	393,0	(M+H) ⁺
65	390,2	413,1	(M+Na) ⁺
66	316,1	317,0	(M+H) ⁺

Tableau 13 : Identification des produits.

Le mécanisme proposé pour expliquer la formation des produits secondaires repose sur l'attaque nucléophile de l'amine primaire du dérivé **64** sur la fonction carbonyle du carbamate. Le faible rendement en produit désiré ne nous a pas permis de continuer dans cette voie.

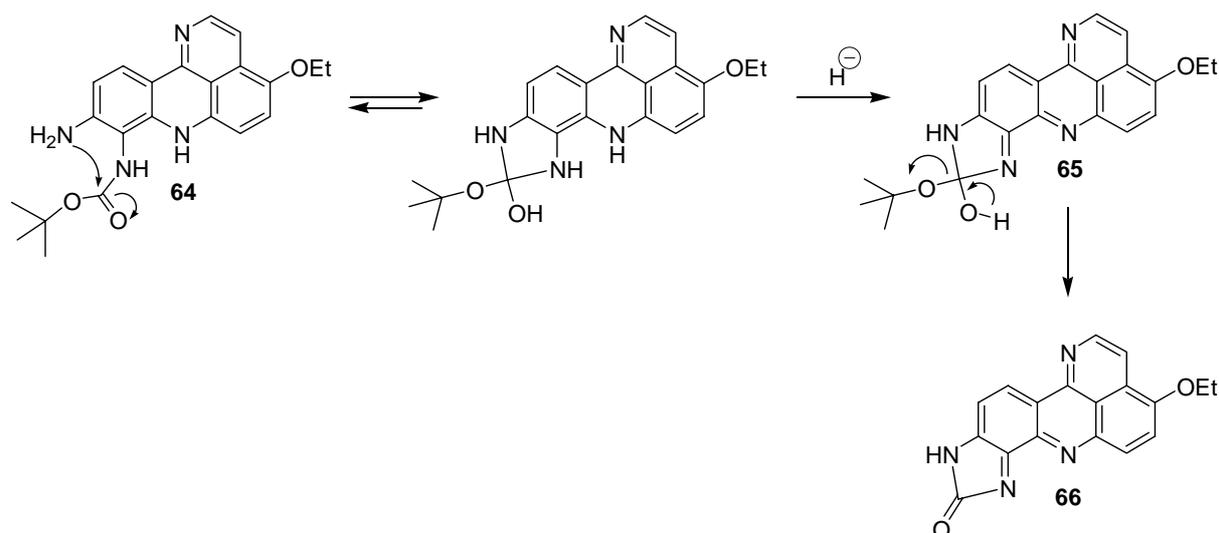


Figure 28 : Mécanisme supposé de formation des produits secondaires à partir du composé **64**.

- **Réduction au dithionite de sodium.**

La réaction a été réalisée en parallèle dans le DMF et le méthanol ; le taux de conversion était comparable mais l'utilisation de MeOH facilite le traitement de la réaction.

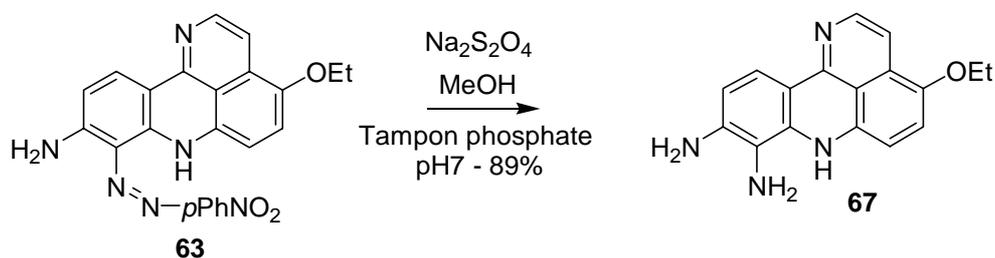
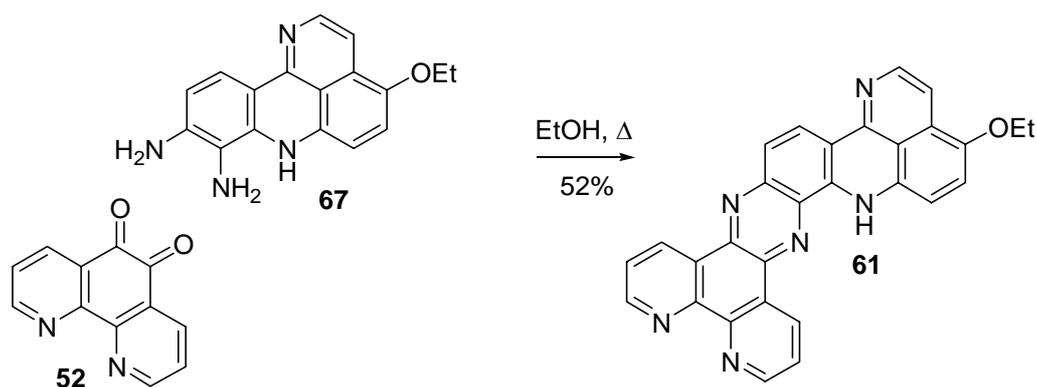


Schéma 34 : Obtention du motif *ortho*-diamine **67**.

Le produit **67** est caractérisé en RMN dans le DMSO- d_6 par six doublets avec des constantes de couplages $J_{2-3} = 7,3$ Hz et $J_{5-6} = J_{10-11} = 9,0$ Hz. La spectrométrie de masse est en accord avec la structure et l'on détecte un ion moléculaire à $m/z = 293,2$ en mode DCI(+) qui correspond au motif $(M+H)^+$.

Schéma 35 : Formation du ligand plan octacyclique **59**.

Nous avons finalement engagé les deux synthons dans une réaction de couplage. Un mélange équimolaire des produits **52** et **67** est dissous à froid dans l'éthanol absolu. La solution est alors portée à reflux de l'éthanol pendant deux heures. L'octacycle **61** précipite dans le ballon de réaction au cours de sa formation et il est isolé par filtration et lavage avec un rendement de 52%.

En conclusion, nous avons synthétisé un nouveau ligand plan étendu présentant huit cycles aromatiques accolés par deux méthodologies différentes à partir de l'acridine commerciale **42** (Figure 30). Pour la première méthode, l'étape clé est la condensation de la diamino-acridine **50** sur la phendione **52**. Le produit cible a été préparé par cette voie en 7 étapes avec un rendement de 18,3% et l'étape limitante est la réduction de la fonction azo en amine sur le substrat **49** (rendement de 45%).

La seconde voie a également permis d'accéder à l'octacycle **61** en sept étapes. L'étape limitante en terme de rendement est la condensation de l'intermédiaire clé diamino-pyridoacridine **67** sur la phendione **52** et le rendement global de cette stratégie est de 25,5%.

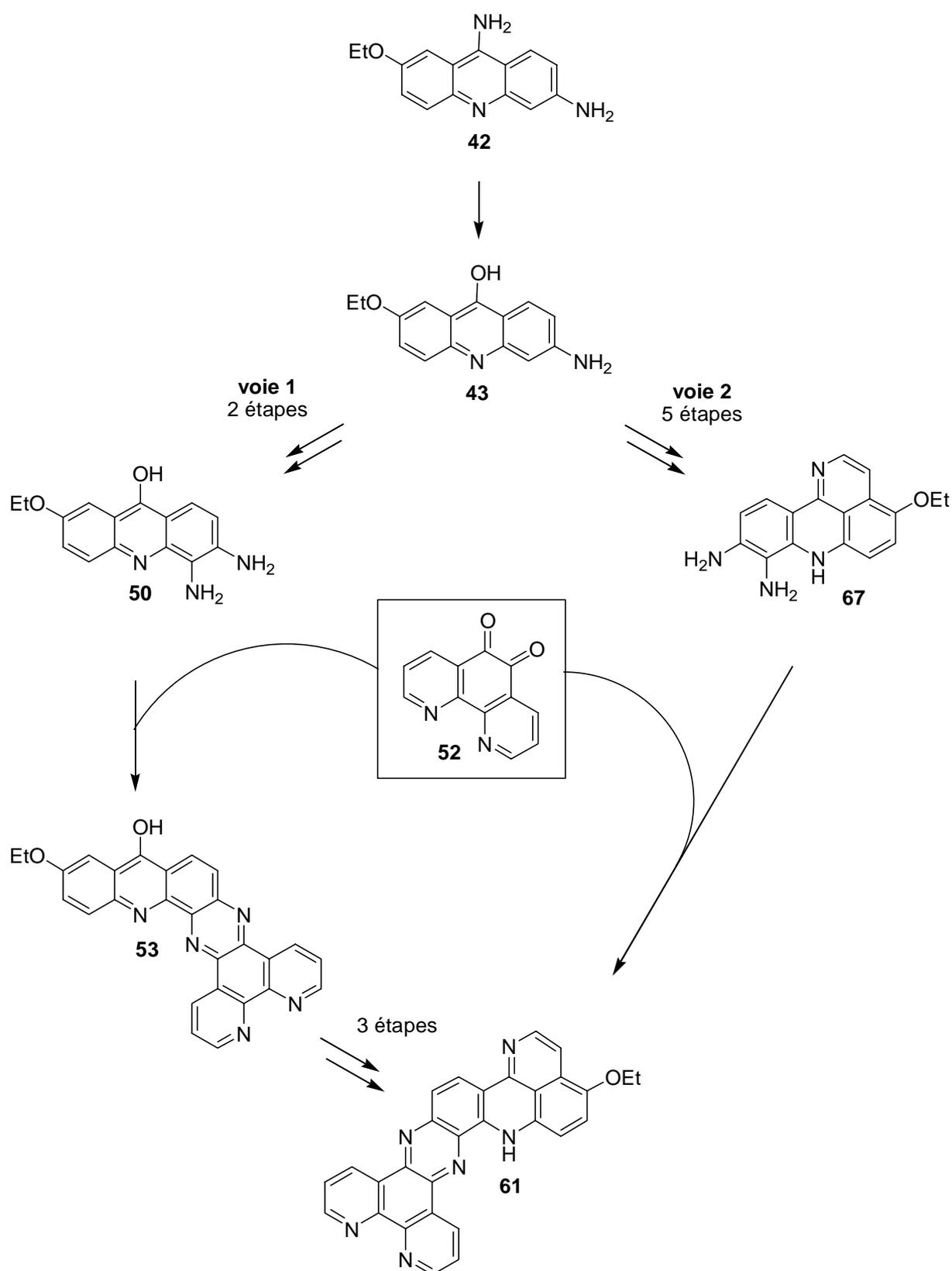


Figure 30 : Résumé des deux voies de synthèse de l'octacycle **61**.

VI. Bibliographie.

1. N. Fixler, M. Demeunynck, J. Lhomme. Regioselective Electrophilic Substitution of 2-Hydroxy and 2-Methoxy Substituted acridines. Application to the Synthesis of Pyrido[2,3,4-mn]acridine. *Synthetic Commun.*, **1997**, 27 (13), 2311-2324.
2. P. Jacob, 3rd, P. S. Callery, A. T. Shulgin, N. Castagnoli, Jr. A convenient synthesis of quinones from hydroquinone dimethyl ethers. Oxidative demethylation with ceric ammonium nitrate. *J. Org. Chem.*, **1976**, 41 (22), 3627-9.
3. N. Fixler, M. Demeunynck, M. C. Brochier, J. Garcia, J. Lhomme. Regioselective Addition of Aniline to 8H-Pyrido[2,3,4-mn]acridone: Structure Determination of The Reaction Product. *Magn. Reson. Chem.*, **1997**, 35, 697-700.
4. D. Horton. 1-Thio-D-glucose. *Methods Carbohydr. Chem.*, **1963**, 2, 433-437.
5. M. B. Smith, J. March. *March's Advanced Organic Chemistry, 5th edition.*, Wiley ed., **2001**, 1197-1198.
6. G. A. Kraus, T. On Man. An Improved Reductive Methylation Procedure For Quinones. *Synthetic Commun.*, **1986**, 16(9), 1037-1042.
7. K. Tsuda, E. Ohki, S. Nozoe. An Aromatization Reaction of a Cross-conjugated Dienone System with Zinc. II. Aromatization of Steroidal 1,4-Dien-3-one and 1,4,6-Trien-3-one System with Zinc. *J. Org. Chem.*, **1963**, 28, 783-785.
8. D. Passerieux, L. Lepage, Y. Lepage. Action régiosélective du nitrate d'ammonium et de cérium(IV) sur quelques isobenzofurannequinones et sur le diméthoxy-4,7 diphényl-1,3 benzo[c]thiophène. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1989**, 5, 708-710.
9. D. Zhu, J. K. Kochi. Alkylation of Pyridinium Acceptors via Thermal and Photo-induced Electron Transfer in Charge-Transfer Salts with Organoborates. *Organometallics*, **1999**, 18(2), 161-172.
10. T. Tanaka, C. Mine, S. Watarumi, T. Fujioka, K. Mihashi, Y. J. Zhang, I. Kouno. Accumulation of epigallocatechin quinone dimers during tea fermentation and formation of theasinensins. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65 (11), 1582-1587.
11. C. Jutz. The Vilsmeier-Haack-Arnold Acylations. C-C Bond-Forming Reactions of Chloromethyleniminium ions. *Adv. Org. Chem.*, **1976**, 9(2), 225-243.
12. B. R. Copp, J. Jompa, A. Tahir, C. M. Ireland. Stylesamines A-D: New Tetracyclic Pyridoacridine Alkaloids from the Indonesian Ascidian *Eusynstyela lactericus*. *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 8024-8026.

13. J. Rigaudy, J. Barcelo, C. Igier. Etudes sur les amino-9 anthracènes. VII. L'amino-9 méthoxy-10 anthracène : autoxydation, oxydation et action de l'oxyde azotique. *Bull. Chem. Soc. Fr.*, **1974**, 1151-1154.
14. C. F. Lane. Sodium Cyanoborohydride - A Highly Slective Reducing Agent for Organic Functional Groups. *Synthesis*, **1975**, 135-146.
15. O. Renaudet, P. Dumy. Expedient Synthesis of Aminooxylated-Carbohydrates for chemoselective access of glycoconjugates. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 7575-7578.
16. T.-L. Ho. Ceric Ion Oxidation in Organic Chemistry. *Synthesis*, **1973**, 347-354.
17. N. Fixler. Recherche de nouveaux agents anticancéreux dérivés d'acridine et de Benzo[b][1,7]Phénanthroline. Synthèse et étude de réactivité. *Thèse de 3^{ème} cycle*, Grenoble, **1994**.
18. A. Albert. The Acridines. Their preparation, physical, chemical, and biological properties and uses. Edward Arnold, London, **1966**, 2nd Ed., Chap. 7, 114-130.
19. S. Skonieczny. A review on the synthesis of the 9-substituted acridines. *Heterocycles*, **1977**, 6, 987-1060.
20. M. Yamada, Y. Tanaka, Y. Yoshimoto, S. Kuroda, I. Shimao. Synthesis and Properties of Diamino-Substituted Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1992**, 65 (4), 1006-1011.
21. J. Bolger, A. Gourdon, E. Ishow, J.-P. Launay. Stepwise syntheses of mono- and di-nuclear Ruthenium tpphz complexes $[(bpy)_2Ru(tpphz)]^{2+}$ and $[(bpy)_2Ru(tpphz)Ru(bpy)_2]^{4+}$ {tpphz = tetrapyrido[3,2-a:2',3'-c:3'',2''-h:2''',3'''-j]phenazine}. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, (17), 1799-1800.
22. K. O'Donoghue, J. C. Penedo, J. M. Kelly, P. E. Kruger. Photophysical study of a family of $[Ru(phen)_2(Me_n dpq)]^{2+}$ complexes in different solvents and DNA: a specific water effect promoted by methyl substitution. *Dalton Trans.*, **2005**, (6), 1123-1128.
23. R. Dinica, F. Charmantray, M. Demeunynck, P. Dumy. Regioselective synthesis of angular nitrogen polyheterocycles : dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phenazines. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 7883-7885.
24. S. R. Sandler, W. Karo. Aromatic diazonium salts. *Organic functional group preparations*, **1968**, Academic Press, New York and London, 401-403.
25. H. Möhrle, U. Von der Lieck-Waldheim, H. D. Martin, N. Possberg, S. Beutner. Analytics of ethacridine lactate. Part 3. Reaction of ethacridine lactate with nitrous acid and the color-structure relationships of acridine derivatives. *Pharmazie*, **1997**, 52 (8), 603-611.

26. M.-H. Hung, L. M. Stock. Reactions of Benzenediazonium Ions with Guanine and Its Derivatives. *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 448-453.
27. W. Paw, R. Eisenberg. Characterization, and spectroscopy of dipyridocatecholate complexes of Platinum. *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 2287-2293.
28. S. Chandrasekhar, C. R. Reddy, R. J. Rao. Unprecedented Direct Conversion of N-N and N=N bonds to N-(*tert*-Butyloxy)-Carbamates. *Synlett.*, **2001**, 10, 1561-1562.

PROPRIETES ET APPLICATIONS

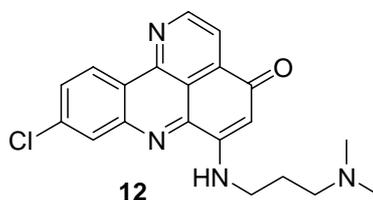
I. Propriétés biologiques et physicochimiques des pyridoacridines.

1. Cytotoxicité.

Les tests d'inhibition de croissance cellulaire sont réalisés chez A. Croisy de l'Institut Curie à Orsay et la méthode utilisée est celle publiée par T. Mosmann¹. Les résultats sont exprimés en IC₅₀, ce qui correspond à la concentration en drogue nécessaire pour inhiber la croissance cellulaire de 50%. Les mesures ont été effectuées sur les lignées cellulaires : L1210, A549, HT29 et KB.

La lignée cellulaire murine L1210 (ATC CCCL 219) provient d'une leucémie lymphocytaire induite chez la souris DBA/2 par badigeonnage avec le 20-méthyl-cholanthrène. La lignée A549 (ATC CCL 185) est une lignée cellulaire dérivant d'une tumeur humaine de type carcinome pulmonaire. La lignée HT29 est un adénocarcinome de colon humain (ATCC HTB 38). La lignée KB correspond à un carcinome humain du naso-pharynx.

A l'heure actuelle, un seul produit a été testé sur plusieurs lignées cellulaires et il s'agit du produit **12**, premier à avoir été synthétisé dans la série des conjugués pyridoacridone/amine.

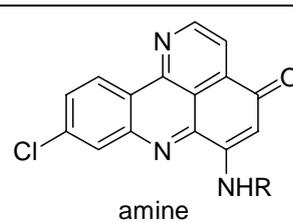
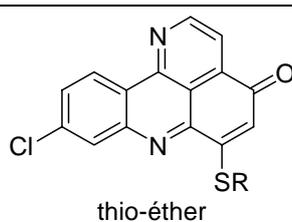
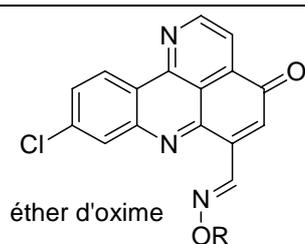


	IC ₅₀ / L1210	IC ₅₀ / A549	IC ₅₀ / HT29	IC ₅₀ / KB
conjugué 12	2,0 μM	1,85 μM	3,0 μM	14,3 μM

Tableau 1 : Données cytotoxiques pour le composé **12**.

1.1. Résultats en série pyridoacridone.

¹ T. Mosmann. *J. Immunol. Meth.*, **1983**, 65, 55-63.



	Produit	IC ₅₀ / HT29 (μM)	Note
<i>thio-éther</i>			
	7	inactif	
<i>amine</i>			
	5	> 100	
	10	1,8	
	11	16,5	
	12	3	
	13	4,7	
	14	1,9	
	15	21	
<i>oxime</i>			
-Me	35	100*	58% de survie à 50 μM
	36	inactif	
	37	128*	67% de survie à 50 μM
	38	inactif	
	39	inactif	

Tableau 2 : Données cytotoxiques en série pyridoacridone. * signifie que la valeur a été extrapolée à partir des courbes dose-réponse.

Premièrement, les conjugués entre la pyridoacridone et les polysaccharides par lien oxime (36-39) présentent une activité très faible, voire nulle dans les conditions de concentration testées (entre 0,1 et 50 μM). Ceci est peut-être dû à la géométrie peu flexible et à l'encombrement stérique généré par le lien oxime qui doit positionner les parties sucres de façon défavorable lorsque les molécules sont en interaction avec l'ADN.

En ce qui concerne les conjugués avec les amines, les résultats sont plus intéressants. À une exception près (substituant aryl trop encombrant), les cytotoxicités sont de l'ordre du micromolaire (entre 21 et 1,8 μM). Toutefois, on constate des différences notables en fonction de la nature et de la longueur de la chaîne amine utilisée. Les conjugués les plus actifs (IC_{50} entre 1,8 et 4,7 μM) présentent une fonction amine, dont l'ordre (primaire, secondaire ou tertiaire) n'a que peu d'importance, mais placée à une distance bien définie du chromophore aromatique (2 ou 3 atomes de carbone). Ceci s'explique probablement par une interaction privilégiée avec l'ADN de cette fonction amine protonnée à pH physiologique.

Par contre, on observe une chute de toxicité pour **15** (21 μM) qui présente une longue chaîne alkyle, et pour **11** (16,5 μM) qui possède une courte chaîne en éthylène terminée par une fonction hydroxyle.

1.2. Résultats en série pyridoacridine.

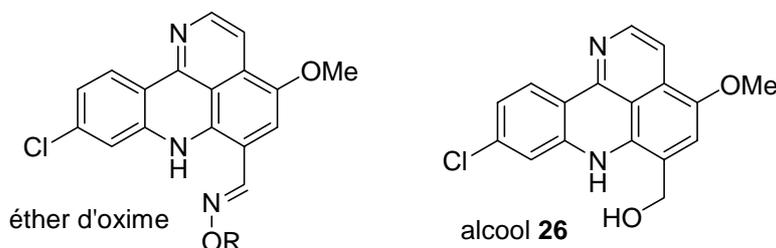


Figure 1 : Rappel des structures en série pyridoacridine.

Comme en série pyridoacridone, les conjugués entre le chromophore pyridoacridine et un (poly)saccharide par lien oxime présente des activités faibles (85 μM pour **30**) ou nulles (**31**, **33** et **34**). La cytotoxicité du composé **26** est peu significative (73 μM).

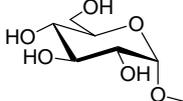
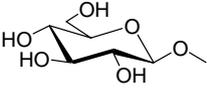
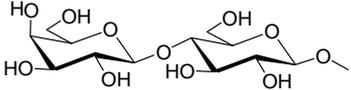
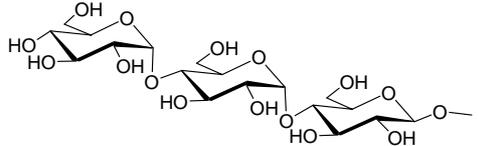
substituant	Produit	IC ₅₀ / HT29 (μM)	Note
-CH ₂ OH	26	73	
	30	85*	67% de survie à 50 μM
	31	inactif	
	33	inactif	
	34	inactif	

Tableau 3 : Données cytotoxiques en série pyridoacridine.

2. Spectroscopie d'absorption électronique.

2.1. Caractérisation de la pyridoacridine **3** et des pyridoacridones.

Nous avons enregistré les spectres d'absorption de nos produits sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 15 UV-Vis en travaillant sur des longueurs d'onde comprises entre 200 et 600 nm. Les solutions ont été préparées dans de l'éthanol à 95% à des concentrations analytiques de 5 à 100 micromoles par litre selon les composés.

Les spectres de la pyridoacridine **3** (figure 2), de la pyridoacridone **4** (figure 3), du produit d'addition du β-mercaptoéthanol **7** (figure 4), et de quelques conjugués drogue/amines (**10-14**, figure 5) sont représentés, ainsi qu'un tableau dans lequel les caractéristiques d'absorption UV-Visible des composés sont rassemblées (longueur d'onde des maxima et epsilon correspondant).

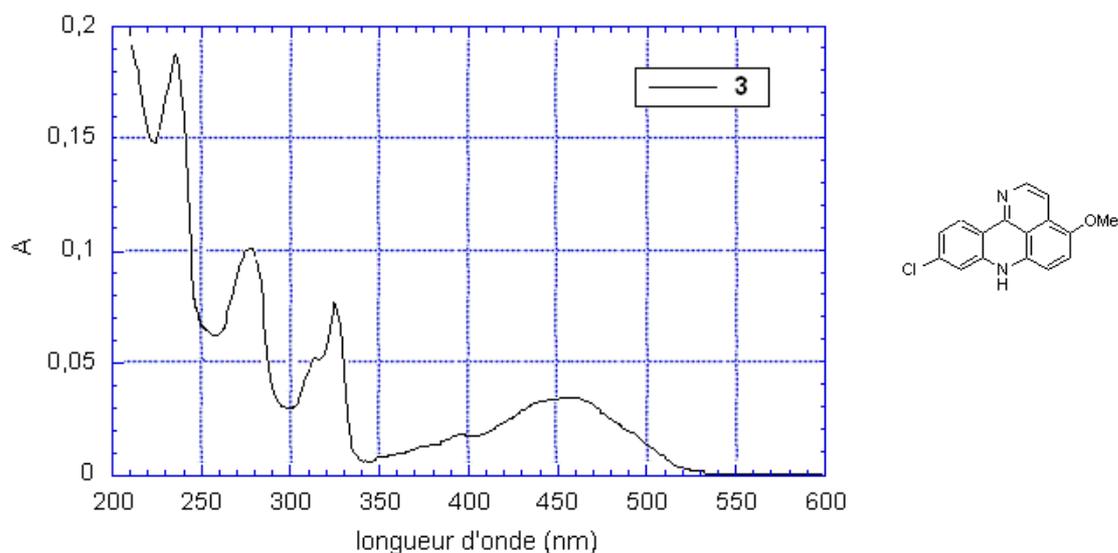


Figure 2 : Spectre d'absorption électronique de **3** ($c = 5.10^{-7}$ M).

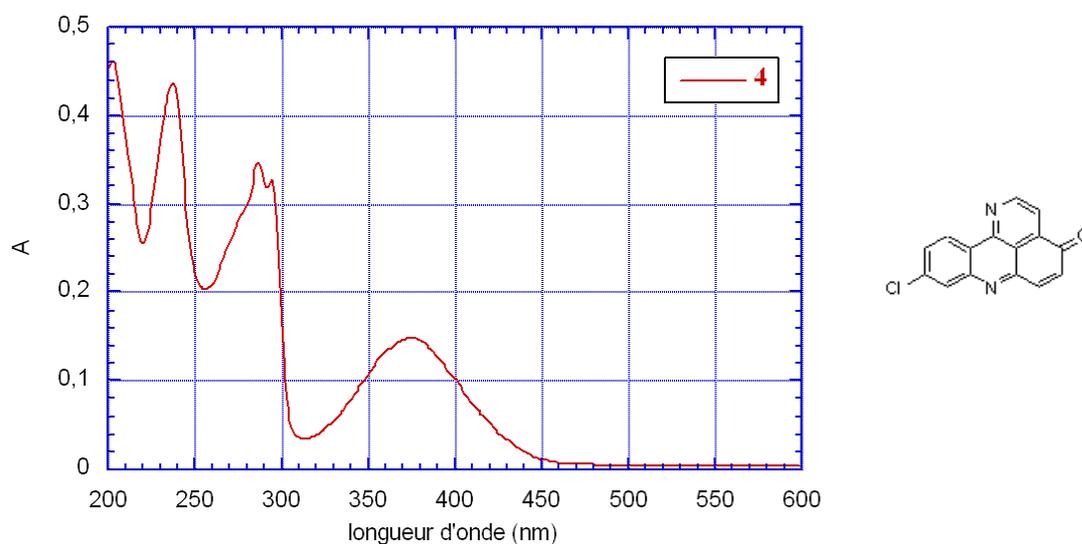


Figure 3 : Spectre d'absorption électronique de **4** ($c = 5.10^{-6}$ M).

Si l'on compare les spectres d'absorption électronique de la pyridoacridine **3** et de la pyridoacridone **4**, on constate que **3** (458 nm) absorbe plus loin dans le visible que **4** (375 nm). Les deux composés présentent des bandes caractéristiques centrées à 236-239 nm et 278-287 nm, cependant, les coefficients d'extinction molaire sont entre 3 et 4,5 fois supérieurs pour la pyridoacridine **3**. De plus, **3** présente une bande caractéristique supplémentaire à 326 nm ($\epsilon = 1,53.10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) par rapport à **4**.

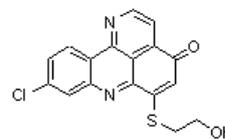
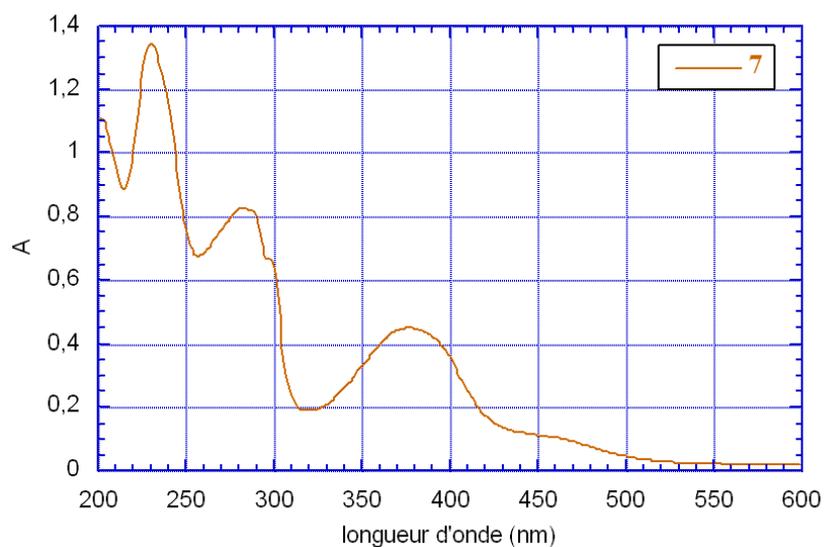


Figure 4 : Spectre d'absorption électronique **7** ($c = 1.10^{-4}$ M).

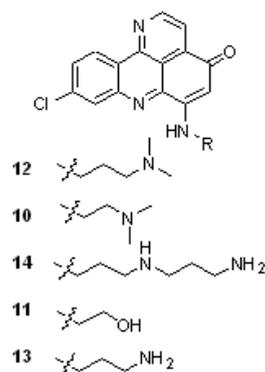
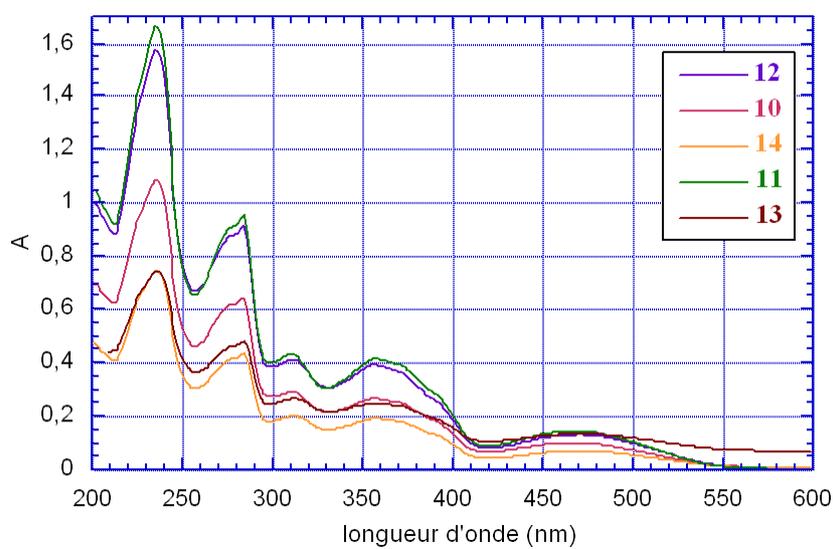


Figure 5 : Spectres d'adsorption électronique de **10**, **11**, **13** ($c = 5.10^{-5}$ M)
et **12**, **14** ($c = 2,5.10^{-5}$ M).

produit	3	4	7	12	10	14	11	13
C (mol/L)	5.10^{-7}	5.10^{-6}	1.10^{-4}	$2,5.10^{-5}$	5.10^{-5}	$2,5.10^{-5}$	5.10^{-5}	5.10^{-5}
λ_{\max} (ϵ)	236 nm (376000)	239 nm (87250)	230 nm (13450)	236 nm (29800)	236 nm (33300)	236 nm (29900)	236 nm (21700)	236 nm (31500)
	278 nm (210000)	287 nm (69400)	282 nm (8270)	284 nm (19200)	284 nm (19100)	284 nm (17500)	283 nm (12800)	284 nm (18300)
	326 nm (153000)			312 nm (10600)	310 nm (8650)	312 nm (8010)	310 nm (5820)	311 nm (8240)
		375 nm (29700)	377 nm (4510)	358 nm (9930)	357 nm (8280)	358 nm (7640)	357 nm (5320)	357 nm (7830)
	458 nm (69900)			473 nm (5320)	470 nm (2880)	473 nm (2890)	467 nm (2000)	470 nm (2610)

Tableau 4 : Données spectroscopiques.

Si l'on compare les spectres d'absorption en série pyridoacridone et en fonction des substituants introduits sur la quinone, la pyridoacridone **4** (qui n'est pas substituée) est le produit qui absorbe le plus. Elle présente trois bandes caractéristiques dont les ϵ sont relativement importants (87250 et 69400 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ respectivement pour les deux bandes les plus intenses).

C'est le produit **7** qui absorbe le moins. Par exemple, si l'on se place au niveau de la bande la plus intense vers $\lambda = 236-239$ nm, son ϵ est 6 fois plus faible que celui de la pyridoacridone. En outre, on peut noter l'apparition d'un épaulement situé vers 450-460 nm qui est en partie masqué par la bande large centrée sur 377 nm.

Tous les produits d'addition des diverses amines et polyamines présentent des spectres d'absorption UV-Visible comparables. Deux bandes supplémentaires sont caractéristiques de ces conjugués si on compare leurs spectres à celui du produit de départ. En effet, une bande de très faible intensité apparaît à 310-312 nm, ainsi qu'une nouvelle bande large et peu intense correspondant à des transitions moins énergétiques vers 470 nm. Globalement, les ϵ sont trois fois moins forts que pour la pyridoacridone **4**.

2.2. Caractérisation des bis-intercalants **17** et **18**.

Nous avons enregistré les spectres des bis-pyridoacridones **17** et **18** dans le DMSO et également ceux des pyridoacridones **4**, **14** et **16** dans les mêmes conditions de concentrations pour pouvoir les comparer.

On peut voir dans la figure suivante les spectres obtenus avec les deux séries de bras espaceurs (bis(3-aminopropyl)amine et bis(3-aminopropyl)pipérazine).

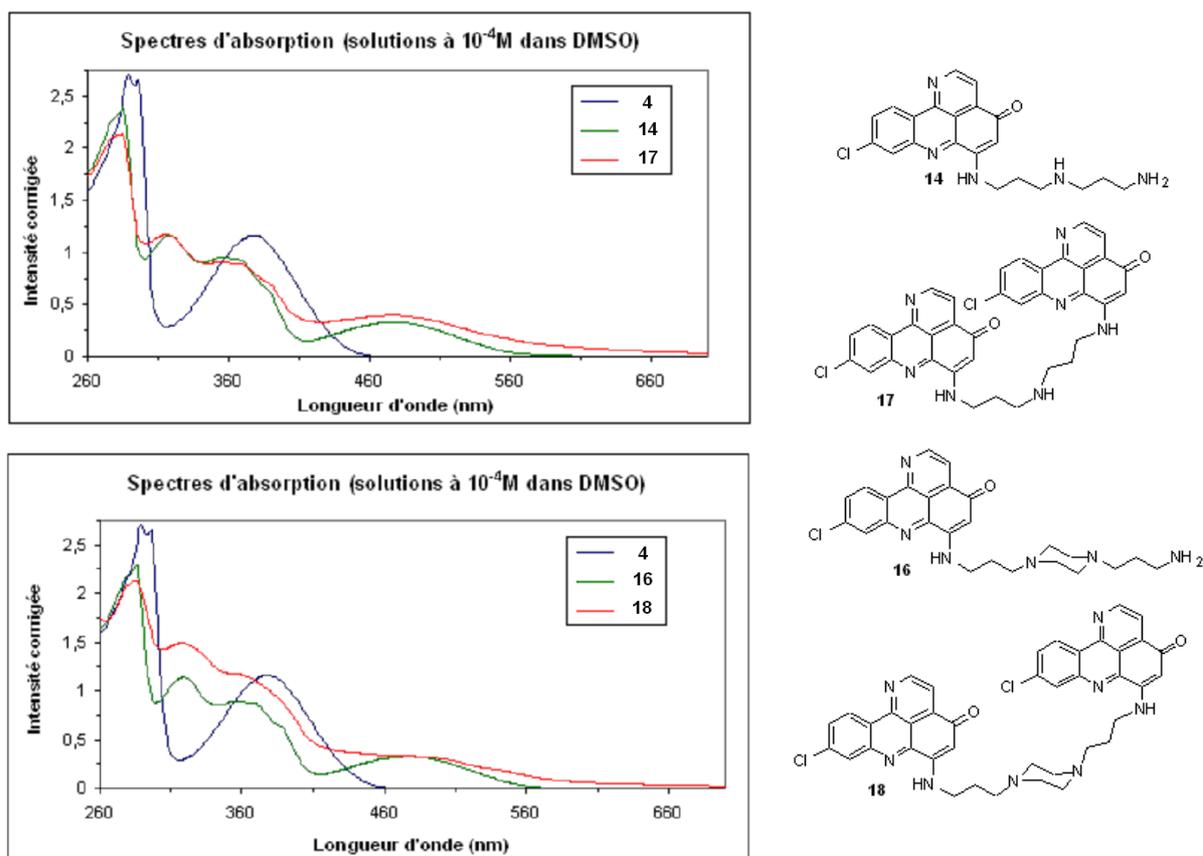


Figure 6 : Spectres d'absorption en série bis(3-aminopropyl)amine (en haut) et bis(3-aminopropyl)pipérazine (en bas). Le spectre de la pyridoacridone **4** est en bleu ($c = 1.10^{-4} \text{ M}$).

Les spectres des quatre produits dont la quinone est substituée (**14**, **16-18**) ont la même allure, caractérisée par une large bande bathochrome de faible intensité centrée à 480 nm.

La bande la plus hypsochrome du spectre enregistré entre 260 et 660 nm est centrée sur 285 nm et présente une intensité maximale chez **4** ($\epsilon = 26800 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Dans les deux séries, la bande à 480 nm est plus large et aplatie pour les bis-pyridoacridones en comparaison des mono-pyridoacridones mais le coefficient d'extinction molaire est sensiblement le même.

Par contre, en série bis(3-aminopropyl)pipérazine, les deux bandes centrées à 315 et 360 nm sont plus intenses pour le composé dimérique (rapport des ϵ égal à 1,3 dans toute cette région du spectre).

3. Caractérisation en Spectroscopie d'émission.

Certains composés en solution, lorsqu'ils sont excités par des radiations lumineuses du domaine du visible ou du proche ultraviolet, réémettent tout ou partie de l'énergie reçue sous forme de rayonnement. Après excitation pulsée, l'intensité de la lumière émise décroît de manière exponentielle selon l'expression $I_t = I_0 e^{-k.t}$ qui relie l'intensité instantanée au temps écoulé. Dans le cas de la fluorescence, la décroissance de l'intensité lumineuse émise est très rapide (quelques nanosecondes en général) ; les fluorimètres courants exigent donc que les mesures soient faites en maintenant l'excitation, c'est à dire en régime stationnaire.

Les acridines présentent souvent des émissions importantes en spectroscopie de fluorescence (avec en particulier de très bons rendements quantiques dans l'eau pour les acridiniums) et nous avons donc voulu étudier ces propriétés dans la famille des pyridoacridines que nous avons synthétiser. Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer LS50. Les solutions ont été préparées à des concentrations différentes ($10^{-3}M$, $2.10^{-3}M$ et $10^{-4}M$) dans l'éthanol à 95% (figures 7 et 8). Nous avons enregistré les spectres d'émission sur la fenêtre [480nm , 700nm] avec excitation au λ_{max} le plus loin dans le visible obtenu en absorption électronique.

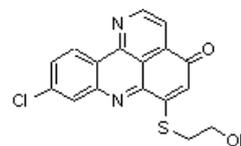
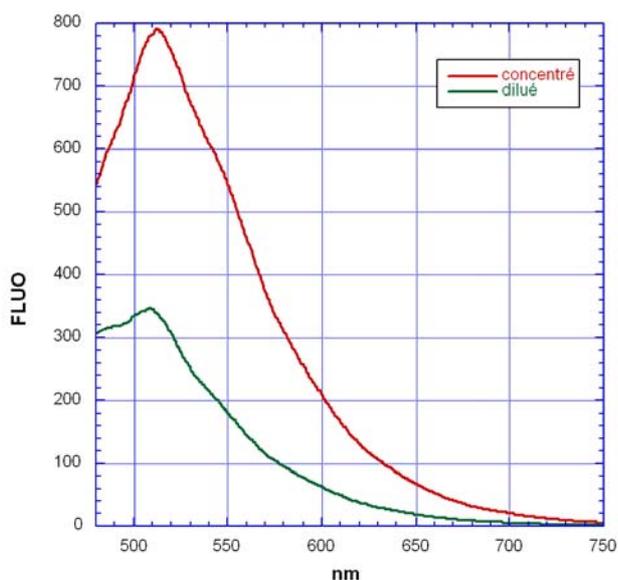


Figure 7 : Spectres d'émission de **7** avec $c = 10^{-3} M$ (en rouge) et $= 10^{-4} M$ (en vert).

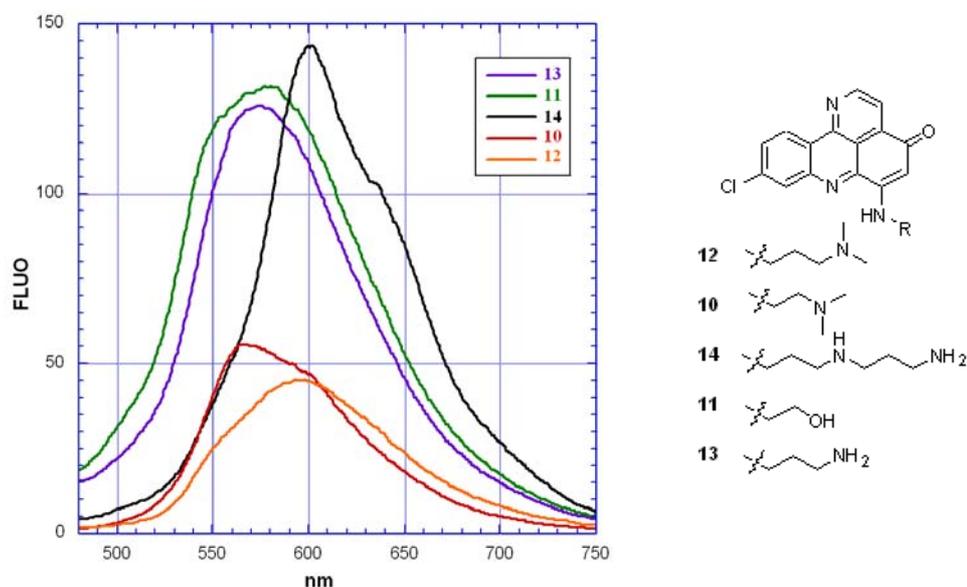


Figure 8 : Spectres d'émission des composés **10**, **13**, **14** ($c = 10^{-3}$ M) et **11**, **12** ($c = 2 \cdot 10^{-3}$ M).

Les longueurs d'onde des maxima des bandes d'émission sont rassemblées dans le tableau ci-dessous. L'intensité correspondant à l'émission est donnée en unité arbitraire et n'a pas été corrigée en fonction de la réponse du photomultiplicateur.

	C (mol/L)	λ_{\max} (nm)	C (mol/L)	λ_{\max} (nm)
7	0,001	512,5	0,0001	508,5
12	0,002	593,0	0,0001	588,5
10	0,001	567,0	0,0001	558
14	0,001	602,0	0,0001	598,5
11	0,002	577,0	0,0001	508,5
13	0,001	575,5	0,0001	560,0

Tableau 5 : Données de fluorescence.

Globalement, tous les produits analysés hormis le dérivé thiol **7** sont très peu fluorescents (ouvertures des fentes maximales sur le fluoromètre). Cette différence peut être expliquée par le fait que l'atome de soufre est plus donneur que celui d'azote.

4. Mesure de pKa.

Nous avons déterminé le pKa au niveau de l'azote du cycle acridine de deux conjugués drogue/amine (**10** et **12**) parmi les plus intéressants en terme de cytotoxicité, afin d'estimer leur état de protonation à pH physiologique. On réalise pour cela un dosage par spectrophotométrie UV-Visible en appliquant la méthode de G. Schwarzenbach^{2,3} décrite ci-dessous :

Soit un équilibre : $LH_n \leftrightarrow L^- + nH^+$ régit par la constante $K_a = \frac{[L^-][H^+]^n}{[LH]}$

$$A = A_{LH} + A_{L^-} = \varepsilon_{LH}lc_{LH} + \varepsilon_{L^-}lc_{L^-} = l(\varepsilon_{LH}c_{LH} + \varepsilon_{L^-}c_{L^-}) \text{ et } c = c_{LH} + c_{L^-} (*)$$

$$c_{LH} = \frac{c[H^+]^n}{K_a + [H^+]^n} \text{ et } c_{L^-} = \left[\frac{cK_a}{[H^+]^n + K_a} \right]. \text{ On réinjecte ces expressions dans l'équation (*) et}$$

on trouve : $A = A_{LH} + (A_{L^-} - A) \frac{K_a}{[H^+]^n} \Rightarrow$ On mesure A pour différentes valeurs de pH.

Le tracé de la courbe $A = f\left(\frac{A_{L^-} - A}{[H^+]^n}\right)$ donne accès à Ka (valeur de la pente).

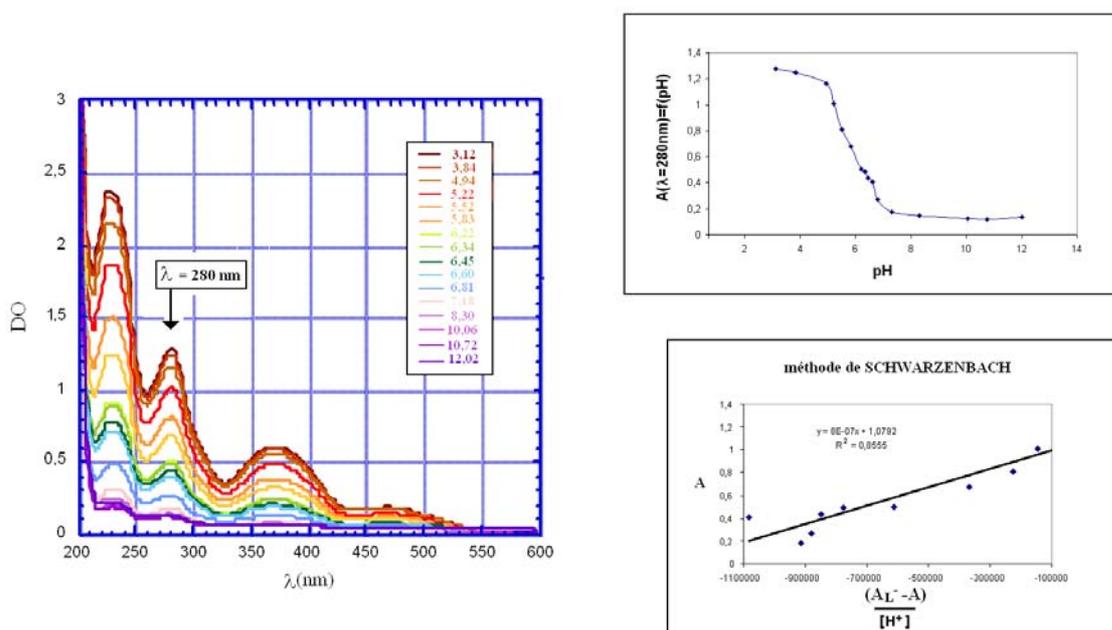


Figure 9 : Méthode avec la détermination du pKa de l'acridine de **10** (ici, n=1 et Ka = 6,1).

Les valeurs de pKa au niveau de l'acridine que nous avons obtenu sont respectivement de 6,1 pour le dérivé **10** (-NH-(CH₂)₂-NMe₂) et de 7,0 pour le produit **12** (-NH-(CH₂)₃-NMe₂).

² G. Schwarzenbach, K. Schwarzenbach. *Helv. Chim. Acta.*, **1963**, 46, 1393-1400.

³ G. Serratrice, H. Boukhalfa, C. Beguin, P. Baret, C. Caris, J.-L., Pierre. *Inorg. Chem.*, **1997**, 36 (18), 3898-3910.

Cela implique que les deux conjugués auront un état de protonation différent à pH physiologique (entre 6,5 et 7). Ainsi à pH = 7, l'hétérocycle acridine de **12** sera protoné à hauteur de 50% contre seulement 20% pour celui de **10**.

5. Mesure de la constante d'association Drogue-ADN.

Nous avons quantifié l'interaction de nos conjugués avec l'ADN. La méthode consiste à déterminer l'affinité d'un composé pour l'ADN par compétition avec un intercalant dont les paramètres d'intercalation sont bien connus : Le bromure d'éthidium ($K = 2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$; $n = 2$).

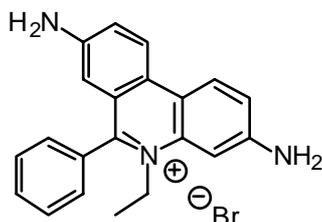


Figure 10 : structure du bromure d'éthidium (Bet)

Le composé à étudier est mis en solution avec de l'ADN de thymus de veau. On ajoute ensuite des quantités croissantes de bromure d'éthidium qui déplace progressivement le dérivé intercalé. Ce phénomène peut être analysé quantitativement. En effet, lorsque le Bet s'intercale, l'intensité de son spectre d'émission de fluorescence est considérablement exaltée (jusqu'à 17 fois) et la valeur mesurée rend compte directement de la quantité de Bet intercalé et donc de compétiteur déplacé.

Le cas général de plusieurs ligands i en compétition pour les mêmes sites d'interaction est décrit par l'équation établie par McGhee et Von Hippel⁴.

$$r_i = B \cdot K_i \cdot (r f_i - \sum_i r_i) \cdot \frac{(1 - \sum_i n_i r_i)^n}{(1 - \sum_i (n_i - 1) \cdot r_i)^{n-1}}$$

K_i est la constante d'affinité du composé i pour la macromolécule d'ADN, n_i le nombre de paires de bases couvertes, B la concentration molaire de l'ADN exprimée en paires de bases. r_i représente le rapport de la concentration en composé i lié sur la concentration en ADN et $r f_i$ le rapport de la concentration totale en composé i sur la concentration en ADN.

⁴ J. D. McGhee, P. H. Von Hippel. *J. Mol. Biol.*, **1974**, 86, 469-489 [Erratum, *J. Mol. Biol.*, **1976**, 103, 679].

Dans le cas qui nous intéresse, nous nous limitons à deux ligands en compétition (les paramètres d'interaction de l'un d'eux étant parfaitement connus).

En proposant différentes valeurs pour le couple (n,K), la courbe représentant r en fonction de rf simulée à l'aide de l'équation citée plus haut peut être ajustée aux points expérimentaux.

Il faut noter que cette méthode est applicable uniquement si les composés n'émettent pas à la même longueur d'onde que le Bet. Dans les conditions expérimentales utilisées, nous avons vérifié que la fluorescence des produits est parfaitement négligeable.

Les valeurs de la constante d'affinité pour l'ADN obtenues avec les divers produits testés sont rassemblées dans le tableau suivant :

	constante d'affinité K (M ⁻¹)
7	0,3.10 ⁵
12	2,8.10 ⁵
13	10.10 ⁵
10	2,2.10 ⁵
11	0,1.10 ⁵
15	7,5.10 ⁵
14	34.10 ⁵
17	faible

Tableau 6 : Valeur des constantes d'affinité pour l'ADN.

Les variations de la constante d'affinité pour l'ADN d'un intercalant à l'autre sont relativement importantes. Premièrement, la présence d'une fonction hydroxyle terminale engendre une plus faible affinité pour l'ADN, sans doute à cause d'interaction défavorable dans le sillon (produits **7** et **11**).

Ensuite, en position terminale, un groupement amine primaire (-NH₂) est favorable par rapport à un groupement amine tertiaire (-NMe₂) si l'on compare les valeurs pour les conjugués **12** et **13**.

De plus, le produit **14** avec sa longue chaîne polyamine favorisant les interactions dans le sillon, est celui qui présente la meilleure affinité pour l'ADN (K = 3,4.10⁶ M⁻¹)

Pour finir, la bis-pyridoacridine **17** présente une très faible affinité pour l'ADN. Ceci peut s'expliquer par la présence d'une chaîne polyamine trop courte pour permettre la double intercalation des chromophores aromatiques.

En effet, lorsque le bras espaceur a une taille adaptée, les deux parties planes peuvent s'intercaler entre les paires de bases nucléiques de l'ADN entre respectant le principe d'exclusion de Pauli⁵⁻⁷, comme l'illustre le schéma suivant (à gauche).

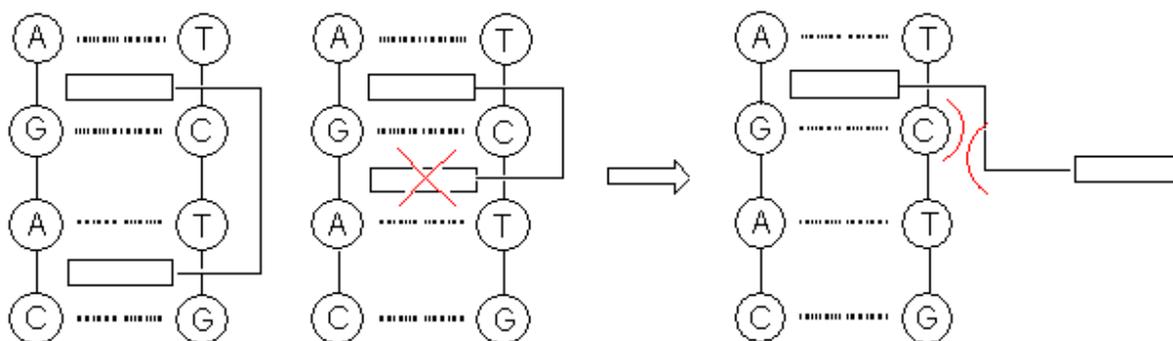


Figure 11 : représentation schématique de la bis-intercalation.

Par contre, si le bras espaceur est trop court, la bis-intercalation est rendue impossible et l'une des deux unités intercalantes est rejetée hors de la double hélice générant ainsi des répulsions stériques et/ou électrostatiques défavorables. (partie droite du schéma).

Pour mieux comprendre et expliquer la faible constante d'affinité de **17** vis à vis du double brin d'ADN, nous avons effectué des calculs de modélisation moléculaire (dans le vide). Nous avons dans un premier temps construit et minimisé la structure (champ de force Va09A), puis nous avons réalisé une dynamique moléculaire (figure 12).

Le minimum global d'énergie que nous avons obtenu correspond à une conformation dans laquelle les deux plans aromatiques sont en position parallèle et séparés d'une distance d'environ 6,7 Å.

De plus, si l'on réalise une dynamique moléculaire à partir d'une conformation de départ choisie de façon aléatoire, on observe rapidement une convergence vers cette même conformation. La force motrice est certainement l'interaction hydrophobe (π -stacking) entre les deux chromophores aromatiques.

⁵ D. M. Crothers. *Biopolymers*, **1968**, 6, 575-584.

⁶ W. Bauer, J. Vinograd. *J. Mol. Biol.*, **1970**, 47 (3), 419-435.

⁷ J.-B. Le Pecq, M. Le Bret, J. Barbet, B. Roques. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1975**, 72 (8), 2915-2919.

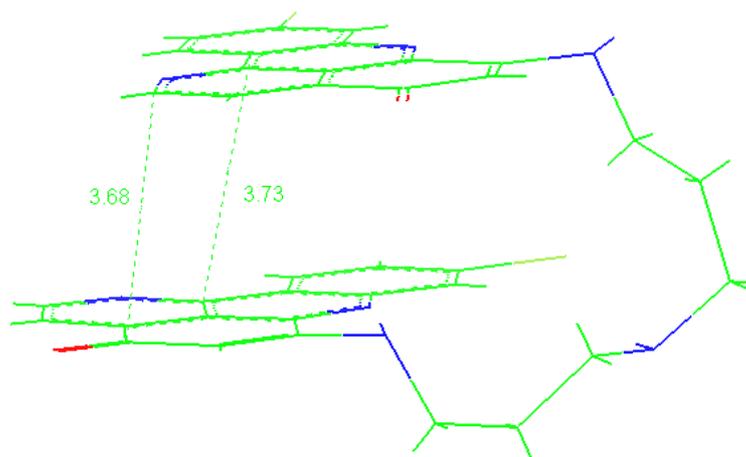


Figure 12 : Représentation de la conformation privilégiée de **17**. Les distances sont données en Å.

La distance moyenne entre les deux parties intercalantes, inférieure à 4 Å, explique pourquoi la bis intercalation de **17** n'est pas possible.

6. Propriétés de l'octacycle **61**.

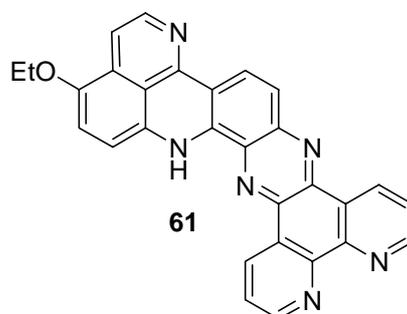


Figure 13 : Structure de l'octacycle **61**.

Les ligands plans étendus dans l'espace comme l'octacycle que nous avons synthétisé, de part leur caractère hautement conjugué présente parfois des caractéristiques électroniques originales. C'est pourquoi nous avons étudié les propriétés spectroscopiques de ce composé.

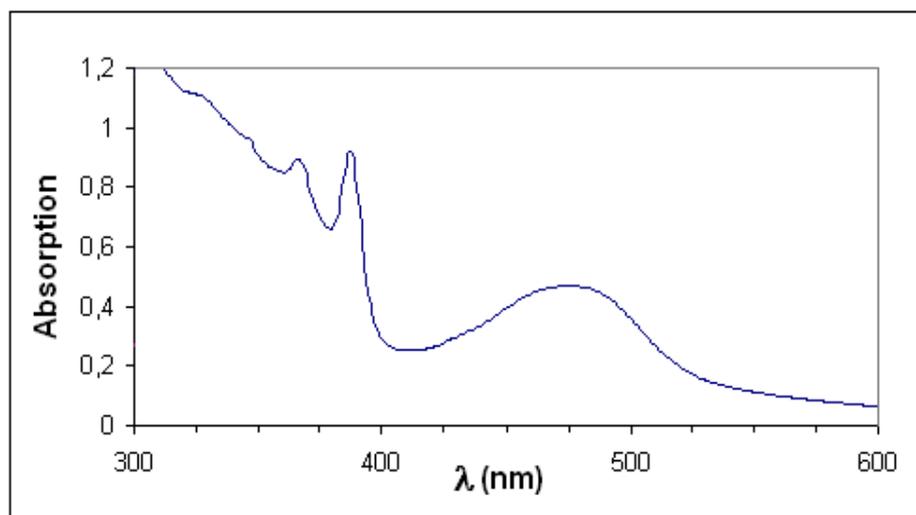


Figure 14 : Spectres d'absorption de l'octacycle **61** dans EtOH + 1% DMSO ($c = 6,4 \cdot 10^{-5}$ M).

Le spectre d'absorption électronique montre une bande large et peu intense à 475 nm ($\epsilon = 6950 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), tandis que la région comprise entre 300 et 400 nm est relativement complexe et présente plusieurs maxima.

Une partie de ces propriétés spectroscopiques de **61** sont rassemblées dans le tableau suivant.

		EtOH	H ₂ O
Absorption	λ_{max} , nm (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	475 (6950)	472 (3400)
		387 (13700)	
		366 (12200)	
		248 (21450)	
Emission	λ_{max} , nm	573	576
	Intensité (u.a.)	357,7	5,6

Tableau 7 : Caractérisation de l'octacycle **61** en absorption et en émission.

On peut remarquer que les spectres ont été enregistrés avec des solutions contenant 1% de DMSO. En spectroscopie d'absorption, les spectres de l'octacycle en solution dans l'éthanol et dans l'eau ont la même allure. Cependant les coefficients d'extinction molaire sont moindre en solution aqueuse. Par exemple, si on se place au maximum d'absorption le moins énergétique, c'est à dire environ 575 nm, on a un rapport $\epsilon_{\text{EtOH}}/\epsilon_{\text{H}_2\text{O}} = 2,04$.

En émission stationnaire, nous avons observé un phénomène intéressant. En effet, le composé présente un comportement classique en solution dans l'éthanol, c'est à dire une émission de forte intensité centrée sur $\lambda = 573$ nm. Par contre, en solution aqueuse, nous avons observé d'une part un léger shift bathochrome du maximum d'émission ($\Delta\lambda_{\max} = 3$ nm), mais surtout, une forte extinction de fluorescence (rapport $I_{\max}(\text{EtOH})/ I_{\max}(\text{H}_2\text{O}) = 64$).

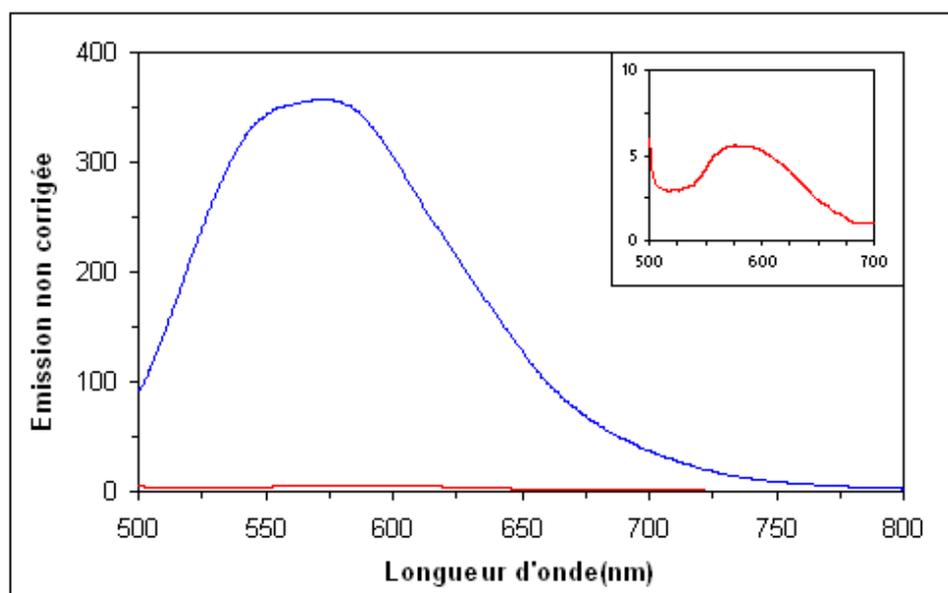


Figure 15 : Emission de l'octacycle dans l'éthanol et l'eau.

Nous avons également étudié la fluorescence de **61** dans l'eau en présence d'ADN double brin (thymus de veau) et en contrôlant la force ionique de la solution. Les conditions de concentrations utilisées sont les suivantes : $c_{61} = 6,4 \cdot 10^{-5}$ M, $c_{\text{ADN}} = 6,4 \cdot 10^{-3}$ M en équivalent paires de bases et $c_{\text{NaCl}} = 0,1$ M).

Nous avons observé une exaltation de la fluorescence du composé **61** (intensité multipliée par trois) lorsqu'il est placé en présence d'ADNdb. Cette exaltation même si elle est significative, est toutefois moins importante que dans le cas du Bet (17 fois). Ceci s'explique probablement par une intercalation partielle de l'octacycle **61** dans l'ADN double brin en raison de sa surface plane angulaire et très étendue.

7. Activité anti-parasitaire.

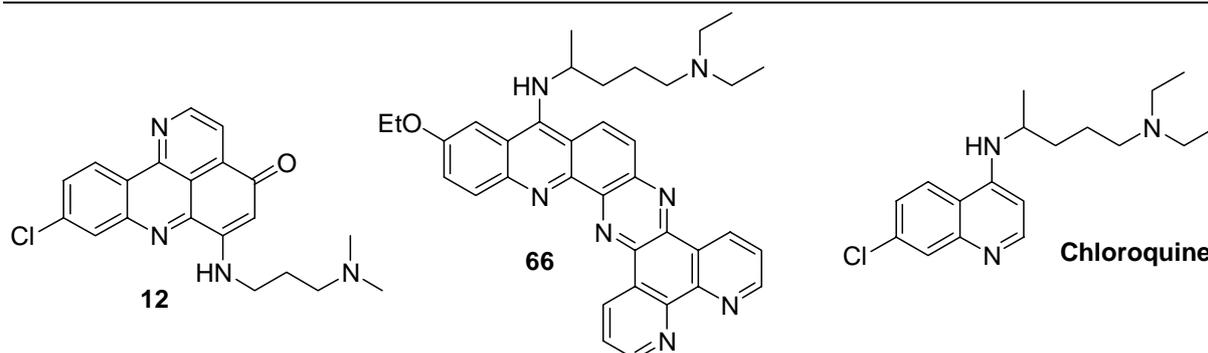


Figure 16 : Structure de la pyridoacridone **12**, de l'heptacycle **66** et de la chloroquine.

Nous avons fait tester l'activité de deux molécules (**12** et **66**) dans le cadre de la recherche de nouveaux agents anti-paludiques. Les premiers résultats obtenus sur les souches de *Plasmodium falciparum* sont rassemblés dans le tableau suivant.

	ED ₅₀ /3D7 (μM)	ED ₅₀ /K1 (μM)	ED ₅₀ /KB (μM)
12	3,01	3,01	14,3
66	0,170	0,085	13,4
Chloroquine	0,011 à 0,015	0,57	-

Tableau 8 : Résultats sur *P. falciparum*.

Les colonnes correspondent aux souches normales (3D7) et résistantes à la chloroquine (K1) de *Plasmodium falciparum*. La dernière colonne est une mesure de cytotoxicité réalisée sur la lignée cellulaire KB.

Le produit **66** exhibe une activité antipaludique puissante (170 et 85 nM sur 3D7 et K1 respectivement), pratiquement 7 fois supérieure à la chloroquine sur la souche résistante, tandis que **12** présente une activité moindre (3 μM). Ces deux substances vont prochainement être testées sur les enzymes cibles (Glutathion réductase et Thioredoxine réductase) dans le cadre d'une collaboration avec E. Davioud-Charvet (Heidelberg).

II. Electrochimie des Pyridoacridones et élaboration d'un biocapteur à ADN.

1. Introduction.

1.1. Contexte de l'étude.

Le biocapteur est une véritable plate-forme technologique à usages multiples. Son champ d'application est très vaste tant dans le domaine médical (diagnostic de pathologie, suivi thérapeutique, criblage de nouvelles molécules pharmaceutiques), que dans le domaine de la chimie analytique (contrôle qualité dans l'industrie agroalimentaire, traçabilité des OGM, mesure de la pollution), sans oublier son utilisation dans les secteurs de la bactériologie et de la criminalité (outil de la police scientifique). Les techniques classiques de reconnaissance d'objets biologiques nécessitent souvent des réactifs coûteux, des manipulations longues ou délicates. C'est pourquoi le développement de biocapteurs représente un challenge extrêmement intéressant et fait l'objet de travaux dans de nombreuses équipes de recherche. L'amélioration des substrats, de la sensibilité des systèmes de détection, la mise au point d'une technique de synthèse des sondes *in situ* qui permettrait de greffer un grand nombre de sondes sur une puce (haute complexité), sont autant d'axes de recherche qu'il est nécessaire d'explorer.

Notre travail concernant l'utilisation d'intercalants de l'ADN et en particulier l'exploitation de leur électroactivité pour la détection du phénomène d'hybridation de l'ADN sera présentée dans cette partie du manuscrit.

Je fixerai tout d'abord le contexte de cette étude en rappelant quelques généralités concernant les biocapteurs. Ensuite, la caractérisation électrochimique des différents produits sera exposée et je terminerai par l'utilisation de ces composés électroactifs dans l'élaboration d'un biocapteur à ADN.

1.2. Généralités sur les biocapteurs.

Par définition⁸, un capteur est « un dispositif qui délivre à partir d'une grandeur physique une autre grandeur, le plus souvent électrique, fonction de la première et directement utilisable pour la mesure et la commande ».

⁸ Le petit Larousse illustré, édition 2002, 176.

Et lorsque l'on parle de biocapteur, il s'agit d'un système hybride intégrant un élément biologique sensible et sélectif d'une composante intensive du milieu d'étude (le biorécepteur) et un transducteur, unité de signalisation capable de traduire la fonction sensorielle du biorécepteur en un signal interprétable de nature électrique.

Les tout premiers (bio)capteurs ont été réalisés par Clark & Lyons⁹ en 1962 (électrode polarographique de mesure du dioxygène) et Updike & Hicks¹⁰ en 1967 (dosage du glucose). Dès lors, de nombreux travaux de recherche ont été menés dans ce domaine. Mais, durant les vingt premières années, l'impact des biocapteurs n'a pas été celui souhaité en raison de leur coût élevé, de leur instabilité et de leur manque de reproductibilité. L'évolution des matériaux, l'essor de nouvelles technologies telles que la microélectronique et les techniques analytiques ont permis aujourd'hui de relancer cette recherche. De plus, celle-ci s'est diversifiée puisqu'il existe actuellement différents types de biocapteurs capables de détecter de nombreuses substances spécifiques. Par exemple, les interactions peuvent avoir lieu entre un brin d'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) et son brin complémentaire ou avec des séquences d'Acide RiboNucléique (ARN). D'autres biocapteurs sont capables de mettre en évidence des molécules organiques (neutres ou chargées), des hormones, des antigènes ou encore des anticorps.

1.2.1. Principe de fonctionnement.

Un biocapteur^{11,12} est donc la combinaison intime d'un composant biologique, le « biorécepteur », et d'un « transducteur » qui représente le mode de détection, afin d'assurer la transformation du phénomène biologique en un signal interprétable, généralement de type électrique.

Le biorécepteur sert à identifier spécifiquement l'espèce à détecter, ou espèce cible, grâce à son site de reconnaissance moléculaire particulièrement sélectif. S'il y a compatibilité entre le biorécepteur et le transducteur, ce dernier va exploiter la modification physico-chimique résultant du phénomène de reconnaissance biologique, afin d'obtenir un signal sensible, fiable et facilement interprétable.

⁹ L. C. Clark Jr., C. Lyons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1962**, 102, 29-45.

¹⁰ S. J. Updike, G. P. Hicks. *Nature*, **1967**, 214, 986-988.

¹¹ N. Jaffrezic, E. Souteyrand, C. Martelet, S. Cosnier, P. Labbe, C. Pijolat. *Les capteurs chimiques*, **1996**, 201-211.

¹² Tran Minh Canh. *Les biocapteurs : principes, construction et applications*. **1991**, édition Masson.

Le transducteur conditionne ainsi la qualité du signal, mais c'est l'interface fonctionnalisée du transducteur par des fonctions biologiques qui détermine la spécificité, le temps de réponse et la durée de vie du biocapteur.

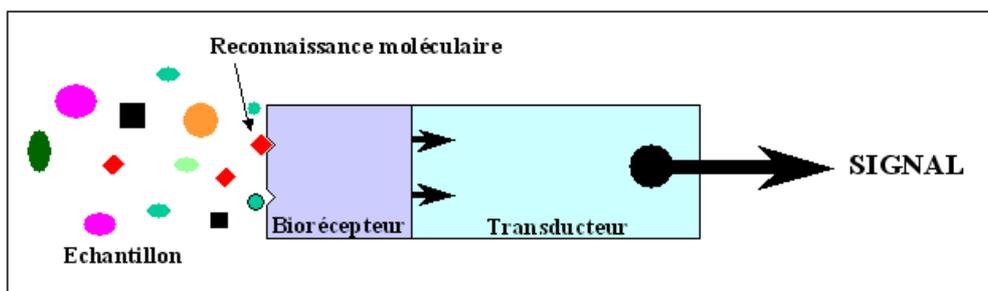


Figure 17 : Fonctionnement d'un biocapteur.

Pour élaborer un biocapteur, le biorécepteur doit être localisé au voisinage intime du transducteur afin de relayer l'information biologique de manière fiable, sélective, sensible et reproductible. Cette étape est donc le premier verrou technologique important du développement des biocapteurs. Ainsi, on peut imaginer différentes façons de confiner le biorécepteur : la localisation par voie microfluidique, l'immobilisation par adsorption physique, la chimisorption ou le greffage covalent du biorécepteur, le piégeage dans une structure macromoléculaire complexe (vésicules, liposomes, polymères conducteurs, membranes), la réticulation intermoléculaire, l'(électro)polymérisation d'un dérivé fonctionnel du biorécepteur ou encore l'utilisation d'agents de couplage moléculaire tels que le système avidine-biotine afin de réaliser un assemblage moléculaire plus ou moins complexe.

Comme nous l'avons déjà mentionné, un biocapteur, outre le biorécepteur, intègre un transducteur susceptible de convertir le phénomène de reconnaissance moléculaire en un signal exploitable. D'un point de vue littéral, le transducteur est un dispositif de conversion énergétique. La nature du transducteur est donc directement liée à l'action du biorécepteur, mais aussi de manière indirecte à la méthode d'immobilisation, et représente alors le deuxième verrou technologique des biocapteurs. Dans ce contexte, tout phénomène de reconnaissance basé sur une activité métabolique implique alors un transfert d'énergie couplé en règle générale à une modification chimique et/ou électronique de la cible qui explique l'utilisation quasi exclusive des méthodes électrochimiques. A l'opposé, les phénomènes de couplage sont basés sur des équilibres thermodynamiques et n'impliquent que des modulations physico-chimiques locales du milieu d'étude. Ceci nécessite alors, la plupart du

temps, l'introduction d'un relais d'information susceptible d'amplifier ces modifications locales. Aussi, la traduction en temps réel du processus biologique peut être perdue et on parlera alors de détection (lecture à posteriori du phénomène de couplage moléculaire) plutôt que de transduction (transcription en temps réel de l'événement biologique).

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à un type de biocapteurs, le capteur à ADN¹³. Le premier exemple décrit dans la littérature a été breveté en 1988 par le britannique E. Southern, son principe de fonctionnement repose sur la propriété d'hybridation de l'ADN, selon laquelle des brins complémentaires se reconnaissent et s'apparient pour former la double hélice.

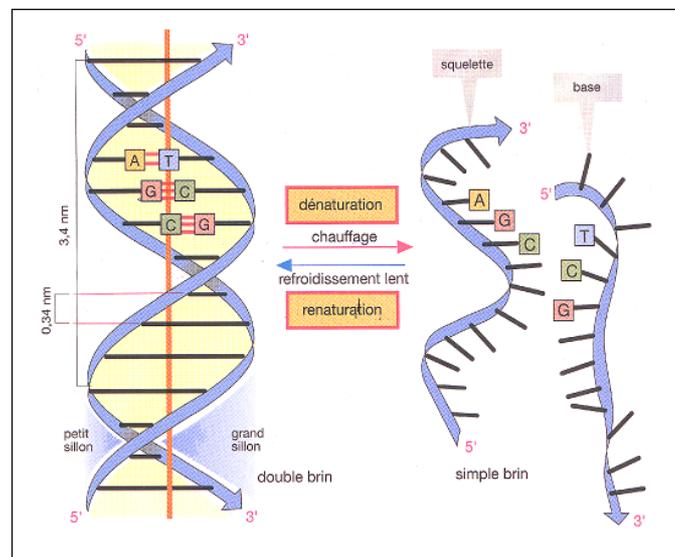


Figure 18 : Hybridation de l'ADN régi par la complémentarité des bases nucléiques.

1.2.2. Elaboration des biocapteurs à ADN.

Les deux étapes clés de la fabrication et de l'utilisation d'un biocapteur à ADN sont l'immobilisation des brins d'ADN, puis la transduction que nous étudierons dans la partie suivante.

- **Nature du support des biocapteurs :**

Le choix du matériau support utilisé est conditionné par ses propriétés physico-chimiques qui doivent être en adéquation avec la technique d'immobilisation des sondes ODN et le

¹³ http://www.industrie.gouv.fr/infopres/presse/si_tech4.htm#4

mode de transduction. Les matériaux inertes vis à vis des molécules biologiques tels que le verre, le silicium, les métaux^{14,15} et les polymères^{16,17} sont couramment utilisés.

- **Techniques d'immobilisation des oligonucléotides :**

Pour les biocapteurs à ADN, il existe différentes méthodes d'immobilisation des brins d'ADN sur un transducteur électrochimique, comme par exemple la physisorption, la chimisorption¹⁸, l'ancrage covalent, le piégeage dans un polymère conducteur électronique tel que le polypyrrole .

Les propriétés remarquables du polypyrrole sont à la base du procédé MICAM¹⁹, mis au point et breveté par la société Cis-Bio International en collaboration avec le CEA de Grenoble en 1993. Dans cette technique d'adressage électrochimique, les sondes sont préalablement fixées à des monomères de pyrrole, puis immobilisées sur un support de silicium recouvert de plots en or, par électropolymérisation des pyrroles. On obtient ainsi localement une couche stable porteuse des sondes, ce qui représente un atout majeur pour la technologie de détection. Les puces MICAM sont des puces actives portant 128 électrodes multiplexées de même dimension mesurant 10 mm² (Figure 19).



Figure 19 : Technique d'adressage électrochimique et photographie de la puce MICAM.

¹⁴ G. Bidan, M. Billon, T. Livache, G. Mathis, A. Roget, L.M. Torres-Rodriguez. *Synthetic Metals*, **1999**, 102, 1363-1365.

¹⁵ F. Garnier, H. Korry-Youssoufi, P. Srivastava, B. Mandrand. *Synthetic Metals*, **1999**, 100, 89-94.

¹⁶ R.S. Matson, J. B. Rampal, P. J. Coassin. *Anal. Biochem.*, **1994**, 217, 306-310. [Erratum, *Anal. Biochem.*, **1994**, 220, 225].

¹⁷ T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, R. Teoule. *Nucleic Acids Research*, **1994**, 22 (15), 2915-1921

¹⁸ H. Koji, I. Keiko, I. Yoshio. *Anal. Chem.*, **1994**, 66 (21), 3830-3833.

¹⁹ G. Bidan, M. Billon, K. Galasso, T. Livache, G. Mathis, A. Roget, L. M. Torres-Rodriguez, E. Vieil. *Applied Biochem. Biotech.*, **2000**, 89, 183-193.

1.2.3. Différents modes de transduction.

On distingue deux familles de transduction : la détection directe, sans utilisation de marqueur, et la détection indirecte qui incorpore l'utilisation d'un marqueur lié à la cible, lié à une sonde de détection ou présentant une spécificité pour le double brin (intercalants).

- **Détection indirecte :**

Il existe un nombre important de techniques indirectes, dont la détection optique par fluorescence et la transduction électrochimique.

La détection optique par fluorescence²⁰ est un mode largement employé dans le domaine des puces à ADN pour révéler l'hybridation. Elle est basée sur la détection d'un fluorophore, la R-phycoérythrine dans le cas de la technologie MICAM, greffé à la molécule biologique à détecter.

La détection électrochimique indirecte^{21,22} utilise des marqueurs rédox actifs tels que des enzymes²³, des billes d'or²⁴ ou plus particulièrement les intercalants qui sont des molécules électroactives qui vont interagir avec les ODN hybridés. La détection de l'hybridation est réalisée, le plus souvent, par des méthodes de DPV (Differential Pulse Voltametry) ou de CV (Cyclic Voltametry) qui mettent en évidence un changement de l'électroactivité en présence et en absence d'ODN complémentaire.

- **Détection directe :**

Les détections directes peuvent être de plusieurs types : optiques (ellipsométrie^{25,26}, résonance de plasmons de surface^{27,28}), gravimétriques (microbalance à quartz^{29,30}) ou encore électrochimiques. Nous développerons ici uniquement cette dernière catégorie de détection qui nous intéresse particulièrement.

²⁰ T. Livache, B. Fouque, A. Roget. *Anal. Biochem.*, **1998**, 255, 188-194.

²¹ S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo. *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 1334-1341.

²² T.M. Herne, M.J. Tarlov. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 8916-8920.

²³ F. Patolsky, Y. Weismann, I. Willner. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 770-772.

²⁴ L. Autier, C. Grossiord, P. Brossier, B. Limoges. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 4450-4456.

²⁵ S. Zangoie, R. Bjorklund, H. Arwin. *Thin Solid Films*, **1998**, 313-314, 825-830.

²⁶ T.M. Herne, M.J. Tarlov. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 8916-8920.

²⁷ P. Guedon, T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan, Y. Levy. *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 6003-6009.

²⁸ A.J. Thiel, A.G. Frutos, C.E. Jordan, R.M. Corn, L.M. Smith. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 4948-4956.

²⁹ N. Lassalle, P. Mailley, E. Vieil, T. Livache, A. Roget, J.P. Correia, L.M. Abrantes. *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 509, 48-57.

³⁰ Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa, Y. Ebara. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 1288-1296.

Garnier et Coll.^{15,31} se sont intéressés au polypyrrole en tant que matrice hôte, mais aussi en tant qu'élément de transduction du phénomène d'hybridation. La méthode Garnier consiste à mesurer la différence de réponse du polymère conducteur lorsqu'il y a ou non hybridation d'une cible ODN sur une sonde de capture fixée sur ce polymère. Il a aussi montré que la concentration en ODN complémentaire dans la solution d'hybridation influençait fortement l'intensité du signal enregistré par voltampérométrie cyclique.

La technique de J. Wang³² consiste à piéger des ODN cibles dans un film de polypyrrole. La détection de l'hybridation se fait alors par mesure ampérométrique.

Le Laboratoire LEMSIS a développé une méthode de détection directe et en temps réel de l'hybridation de l'ADN basée sur la spectroscopie de photocourant³³. Cette technique met ainsi en évidence la dépendance de la réponse photoélectrique du polypyrrole avec l'état d'hybridation des ODN immobilisés.

D'autres méthodes dites d'oxydation directe de l'ADN ont été développées. On distingue la mesure directe de l'oxydation de la guanine (E. Palecek³⁴) d'une méthode proposée par H. Thorp³⁵ consistant à détecter le transfert d'électrons entre un complexe métallique et la guanine.

Enfin, la spectroscopie d'impédance³⁶ a été employée pour caractériser des électrodes modifiées par de l'ADN. Cette technique a permis de montrer que l'ADN double brin s'adsorbe fortement sur des surfaces en or et que la quantité fixée est mesurable.

1.3. La détection électrochimique.

L'électrochimie est une technique simple et prometteuse pour la détection rapide de séquences spécifique d'ADN, combinant une haute sensibilité, un faible coût et la compatibilité avec les technologies de microfabrication de transducteurs.

Récemment, de nombreux biocapteurs électrochimiques à ADN ont été signalés et plusieurs revues sont apparues dans la littérature³⁷⁻⁴⁰.

³¹ H. Korri-Youssoufi, F. Garnier, P. Srivastava, P. Godillot, A. Yassar. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 7388-7389.

³² J. Wang, M. Jiang. *Langmuir*, **2000**, 16, 2269-2274.

³³ N. Lassalle, E. Vieil, J.P. Correia, L.M. Abrantes. *Synthetic Metals*, **2001**, 119, 407-408.

³⁴ E. Palecek. *Bioelectro-chemistry and Bioenergetics*, **1986**, 15, 275-295.

³⁵ N. D. Popovich, H. H. Thorp. *The Electrochemical Society Interface*, **2002**, 30-34.

³⁶ V. Vetterl, N. Papadopoulos, V. Drazan, L. Strasak, S. Hazon, J. Dvorak. *Electrochimica Acta*, **2000**, 45, 2961-2971.

³⁷ S. Takenaka. In *DNA and RNA Binders From Small Molecules to Drugs*. M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, Eds. (WILEY-VCH), **2003**, 1, 224-246.

En général, les signaux électriques de ces biocapteurs reposent sur les aspects suivants :

(1) La détection utilisant l'électroactivité intrinsèque de l'ADN ou les polymères conducteurs. Par exemple, Thorp exploite la variation induite sur le pic d'oxydation de la guanine par l'hybridation de l'ADN. Le groupe de Wang a fabriqué une électrode avec du polypyrrole modifié dans laquelle l'incorporation d'ADN joue le rôle d'anion dopant. Garnier a découvert un biocapteur électrochimique direct basé sur la fonctionnalisation de polypyrrole par des ODN³¹. Après hybridation avec l'ODN complémentaire, l'électroactivité intrinsèque du polypyrrole est modifiée et joue le rôle du transducteur.

(2) L'utilisation d'enzymes²³ présente des avantages en terme de gain de sensibilité du fait de la cinétique enzymatique. La peroxydase de Raifort (HRP)⁴¹ ou l'alcaline phosphatase (société Infinéon) ont été largement utilisées du fait de leur « turn-over » élevé). Heller a montré qu'un simple mésappariement de bases peut être détecté par ampérométrie avec un hydrogel rédox conducteur servant de microélectrode et en utilisant une peroxydase. Fang et collaborateurs fixent un ferrocène carboxaldéhyde sur l'ADN cible pour construire un biocapteur électrochimique colloïdal.

(3) L'utilisation d'un indicateur électrochimique ou d'un intercalant. Mikkelsen⁴² détecte de façon séquence spécifique l'absence d'une phénylalanine caractéristique de la mucovicirose grâce à l'utilisation d'un complexe de cobalt III décrit quelques années plus tôt. Wang⁴³ se sert de $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ comme indicateur dans un biocapteur à ADN de *Mycobacterium tuberculosis*. Le groupe de Mascini⁴⁴ a élaboré un capteur pour la détection d'organismes génétiquement modifiés (P35s et TNOS) qui utilise la daunomycine comme indicateur. Hashimoto⁴⁵ a développé un biocapteur à ADN pour la détection de gènes, séquence spécifique basé sur une électrode en or et utilisant Hoechst 33258 comme ligand du petit sillon de l'ADN. Ozsoz⁴⁶ utilise le bleu de méthylène pour la détection électrochimique d'oligonucléotides immobilisés sur de l'or grâce à un bras espaceur alkanethiol.

³⁸ J. Wang. *Anal. Chim. Acta.*, **2002**, 469, 63-71.

³⁹ M. Mascini, I. Palchetti, G. Marrazza. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2001**, 369, 15-22.

⁴⁰ A. Erdem, M. Ozsoz. *Electroanalysis*, **2002**, 14 (14), 965-974.

⁴¹ F. Azek, C. Grossiord, C. Joannes, B. Limoges, P. Brossier. *Anal. Biochem.*, **2000**, 284, 107-113.

⁴² K. M. Millan, S. R. Mikkelsen. *Anal. Chem.*, **1993**, 65 (17), 2317-2323.

⁴³ J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P. A. M. Farias, N. Dontha. *Anal. Chem.*, **1996**, 68 (15), 2629-2634.

⁴⁴ M. Minunni, S. Tombelli, E. Mariotti, M. Mascini, M. Mascini. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2001**, 369 (7/8), 589-593.

⁴⁵ K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori. *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 3830-3833.

⁴⁶ D. Ozkan, A. Erdem, P. Kara, K. Kagan, J. J. Gooding, E. P. Nielsen, M. Ozsoz. *Electrochemistry Communications*, **2002**, 4, 796-802.

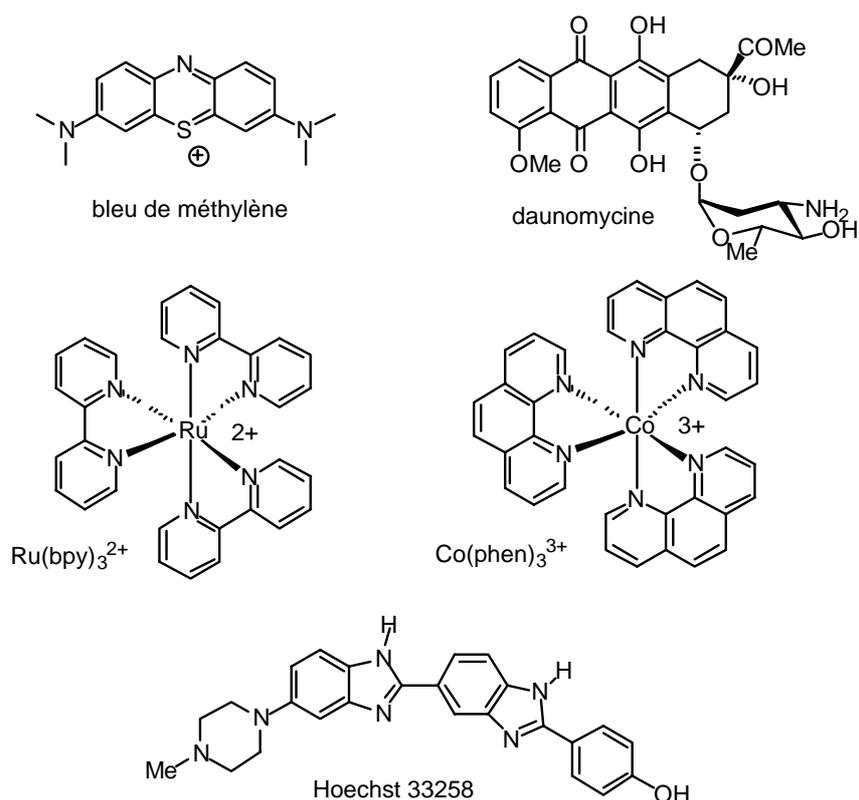


Figure 20: Exemples d'indicateurs électroactifs utilisés pour détecter l'hybridation de l'ADN.

Cependant, les exemples cités révèlent divers problèmes comme les propriétés pharmacologiques des complexes de métaux de transition. De plus, la daunomycine est facilement oxydable et sa stabilité n'est pas très bonne. C'est pourquoi la recherche de nouveaux intercalants présentant une électroactivité exploitable (réversibilité rédox, potentiel rédox adapté vis-à-vis de la sonde et du solvant) reste un enjeu important au cœur de la thématique des biocapteurs à ADN. Notre travail s'inscrit directement dans cette thématique de recherche.

2. Caractérisation électrochimique des nouveaux intercalants.

2.1. Cellule électrochimique.

La caractérisation électrochimique a été réalisée avec un potentiostat PAR 273 de EG&G Princeton Applied Research.

On utilise un montage classique à trois électrodes avec un fil de platine comme contre électrode. L'électrode de travail est soit une électrode de platine, soit une électrode de carbone

vitreux (3mm de diamètre) dont le potentiel est contrôlé par une électrode de référence (ECS ou Ag/AgCl).

2.2. Caractérisation électrochimique de **12** en solvant organique.

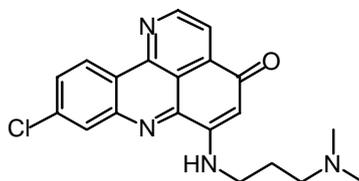


Figure 21 : Structure de l'intercalant **12**.

Sur la figure 22, on peut voir les voltamétries cycliques sur électrode de platine d'une solution de **12** dans l'acétonitrile contenant 0,1M de TBAP (électrolyte support) sous atmosphère contrôlée. Le voltamogramme présente deux couples de pics réversibles dans la partie cathodique et deux vagues d'oxydation irréversibles lors du balayage anodique sur la fenêtre de potentiel imposée (balayage entre -1,9 et +1,9 V vs. Ag/AgCl).

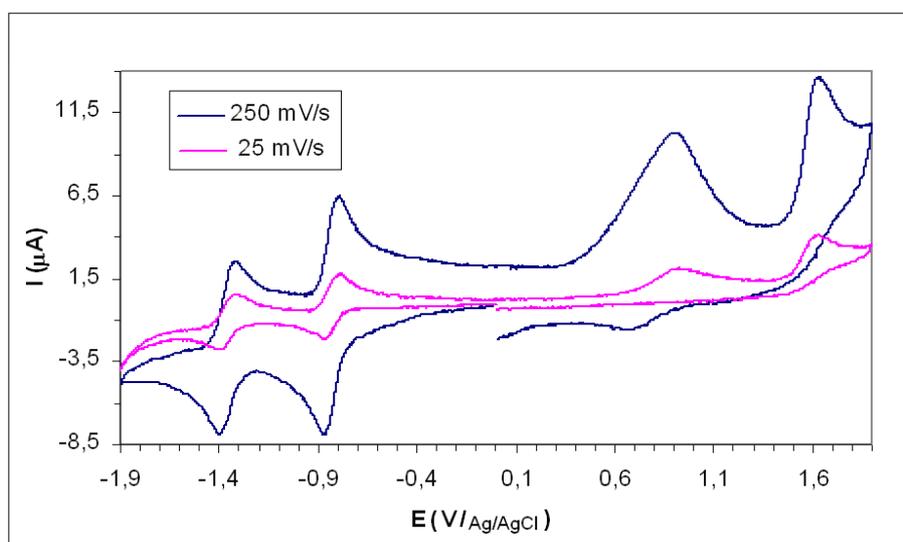


Figure 22 : Voltamétries cycliques de **12** dans CH₃CN (c = 1 mM) sur électrode de platine réalisée en atmosphère inerte (boîte à gants, N₂) à deux vitesses de balayage. Sel de fond : Bu₄NPF₆ 0,1M.

D'abord la caractérisation en réduction met en évidence deux couples réversibles. Le premier est centré à $E_{1/2} = -830$ mV avec une séparation de pic de 60 mV, le deuxième système étant observé à $E_{1/2} = -1360$ mV ($\Delta E_{pic} = 60$ mV). Les potentiels sont compatibles

avec les valeurs trouvées dans la littérature pour les systèmes quinone-imines^{47,48} et les deux pics de ce système peuvent être attribués respectivement aux couples rédox monoélectroniques quinone/semiquinone et semiquinone/dianion.

En ce qui concerne l'électrochimie des pyridoacridines, un seul exemple a été décrit dans la littérature ; celui de la diplamine⁴⁹ (figure 23). Les auteurs ont réalisé la voltamétrie cyclique de 1 mM de diplamine dans le DMF à température ambiante.

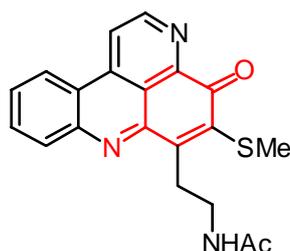


Figure 23 : Structure de la Diplamine.

De la même manière, deux systèmes ont été mis en évidence correspondant respectivement à la réduction de la quinone en semi-quinone à $E_{1/2} = -1092$ mV puis la réduction de la semi-quinone en dianion à $E_{1/2} = -1554$ mV. Ces valeurs sont tout à fait compatibles avec celles que nous avons obtenu avec la pyridoacridone **12**.

Entre 0 et 1,9 V/ $Ag/AgCl$, on observe sur le voltamogramme (figure 22) deux vagues anodiques irréversibles que nous n'avons pas cherchées à caractériser dans le détail mais qui sont sans doute liées à l'oxydation et/ou la dimérisation au niveau des carbones insaturés.

Pour vérifier le caractère monoélectronique de la première réduction en milieu organique, nous avons effectué une réduction chimique au zinc métallique à partir d'une solution de **12** à 10^{-2} M dans le DMSO. Nous avons alors enregistré le spectre RPE du produit de réduction obtenu et dont le signal est stable pendant plusieurs minutes. Le spectre met en évidence une espèce paramagnétique organique dont le signal centré à 3350 Gauss est caractérisé par une largeur de raie de 12 G et un g-facteur = $2,0040 \pm 10^{-4}$. Malheureusement,

⁴⁷ V. Glezer, B. Turovska, J. Stradins, J. Freimanis. *Electrochim. Acta*, **1990**, 35 (11/12), 1933-1940.

⁴⁸ M. W. Lehmann, D. H. Evans. *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 500, 12-20.

⁴⁹ P. W. Crawford, J. Gross, K. Lawson, C. C. Cheng, Q. Dong, D. F. Liu, Y. L. Luo, B. G. Szczepankiewicz, C. H. Heathcock. *J. Electrochem. Soc.*, **1997**, 144 (11), 3710-3715.

ce signal ne présente pas de structure hyperfine et nous n'avons donc pas pu déterminer si la réduction s'effectue du côté de l'oxygène ou de l'azote au niveau de la quinone imine.

2.3. Caractérisation par voltamétrie cyclique de **12** dans H₂O.

La figure 24 présente la voltamétrie cyclique de 1 mM de l'intercalant **12** à pH7 sur électrode de platine après dégazage de la solution électrolytique. Un système réversible parfaitement défini peut être observé dans 0,1 M de tampon phosphate (TP). La séparation des pics vaut environ 60 mV, ce qui montre qu'un seul électron participe à la réaction rédox. Le caractère monoélectronique de la réaction a d'ailleurs été confirmé par électrolyse quantitative sur feutre de carbone. Comme l'illustre la figure 8, les courants de pic varient linéairement avec la racine carrée de la vitesse de balayage, ce qui prouve que la réaction à l'électrode est due à la diffusion de **12** dans la solution électrolytique.

Pour s'affranchir de l'effet de l'électrode de platine (réduction de O₂ et de H⁺, signaux éventuels d'oxydes de platine), nous avons également étudié le comportement électrochimique sur électrode de graphite. La voltamétrie cyclique correspondante présente les deux mêmes pics caractéristiques centrés au même potentiel, ce qui prouve que la réponse en courant n'était pas imputable à la réduction d'oxygène de traces dissous mais bien à l'électroactivité de notre pyridoacridone.

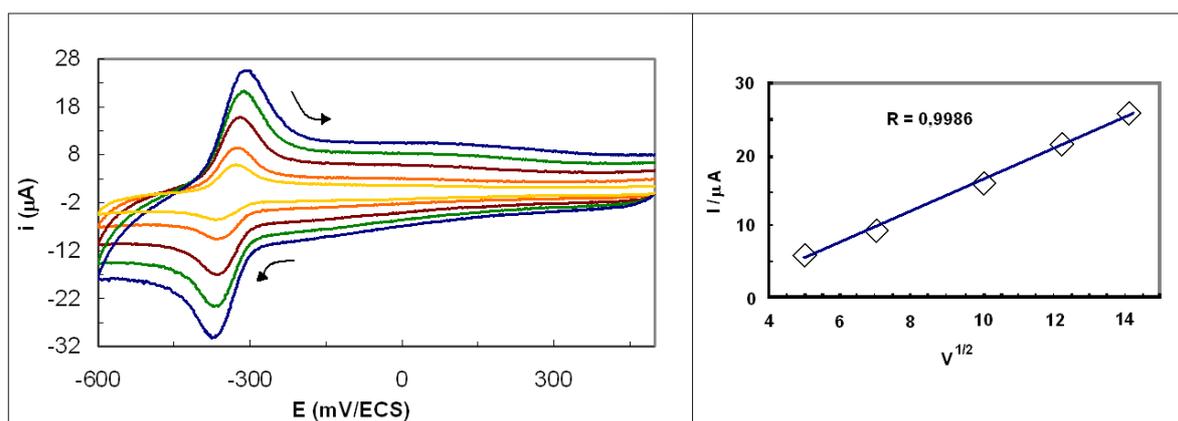


Figure 24 : Voltamétrie cyclique à différentes vitesses de balayage [25 – 200 mV/s] de **12** dans du tampon phosphate pH 7 ($c = 1$ mM).

2.3.1. Influence du pH.

Nous avons également étudié l'effet du pH sur le comportement électrochimique de **12**. La figure 25 montre les voltamétries cycliques pour différentes valeurs du pH. Lorsque le pH diminue, le potentiel formel $E_{1/2}$ du système est déplacé vers les potentiels positifs tandis que le courant de pic augmente de façon concomitante. Ainsi, le pH a un effet important sur les caractéristiques électrochimiques de **12** et le proton intervient directement dans la réaction à l'électrode.

L'évolution du courant de pic en fonction du pH est représentée sur la figure 25. Les potentiels des pics anodiques et cathodiques diminuent quand le pH augmente, et la différence entre les deux pics demeure égale à 60 mV. De plus, un seul proton est mis en jeu dans la réaction rédox car la pente de chacune des deux droites vaut 60 mV par unité de pH.

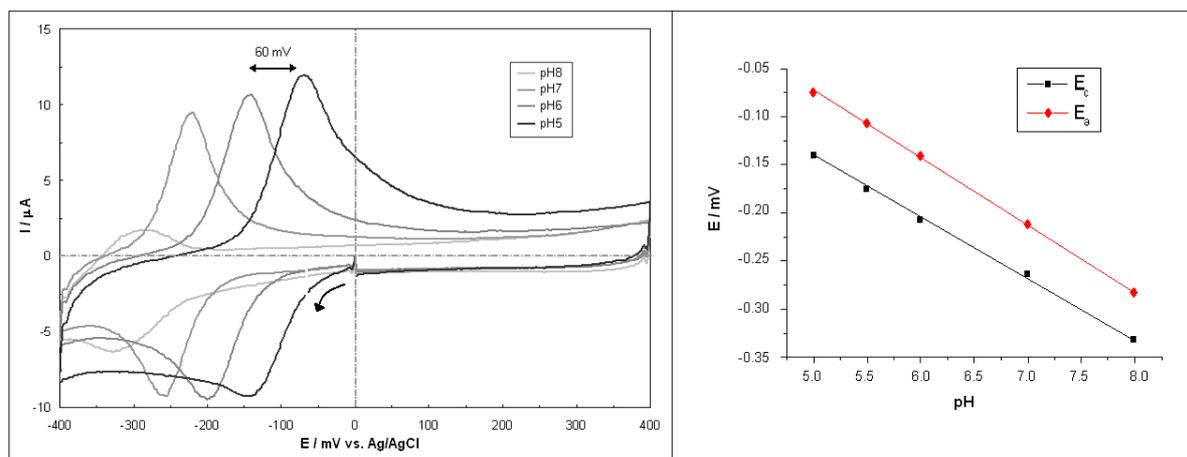


Figure 25 : Etude en fonction du pH. (Dans du tampon phosphate, avec électrodes de travail et auxiliaire en Pt, référence Ag/AgCl et vitesse de balayage à 50 mV/s).

Ce résultat est cohérent avec les mesures en milieu organique. Le système observé correspond alors à la réduction monoélectronique du système iminoquinone donnant lieu à la génération d'une espèce radicalaire stable sur la durée de la mesure (l'existence de cette espèce étant démontrée par nos mesures de RPE). Par ailleurs, on peut remarquer un effondrement du courant obtenu en milieu tampon pH 8. Ce comportement peut être expliqué par la déprotonation de l'azote hétérocyclique ($pK_a = 7,0$) qui s'accompagne de la précipitation de **12**.

2.3.2. Adsorption.

Quand le cyclage commence en réduction, un phénomène intéressant est observé. La figure 26 montre la voltamétrie cyclique enregistrée après polarisation de l'électrode à -400 mV pendant quelques secondes. En plus du système de pics réversibles observés sur les voltamogrammes précédents, réduction et oxydation de l'intercalant **12**, un pic étroit à 160 mV dont la variation d'intensité est proportionnelle à la vitesse de balayage apparaît. Celui-ci peut être relié à un phénomène d'adsorption. Si l'on rince l'électrode avec du tampon puis qu'on la place dans le TP, le pic à 0,16 V est toujours observé.

La cause directe de ce nouveau pic semble provenir de la polarisation de l'électrode au potentiel de -400 mV puisque il n'apparaît pas si le cyclage est réalisé à partir de 0 V. Afin de vérifier cette hypothèse, les voltamétries cycliques de 0,5 mM de **12** dans le tampon phosphate pH 5 avec des délais croissants (0 à 600 s) de polarisation à -400 mV entre les balayages aller (0,4 à -0,6V) et retour (-0,6 à 0,4 V) sont représentés sur la figure 26. On peut alors observer que l'intensité du pic d'adsorption varie linéairement par rapport au temps de polarisation de l'électrode comme le montre la régression linéaire. Ceci démontre l'adsorption importante sur l'électrode de la forme réduite de **12**.

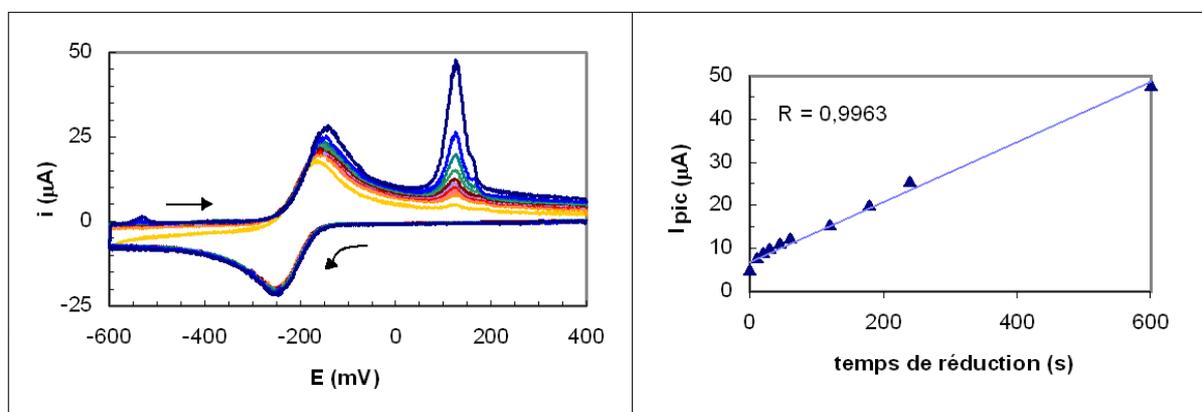


Figure 26 : Etude de l'adsorption à la surface de l'électrode. Solution de **12** à 0,5 mM dans tampon phosphate pH 5, W = Carbone vitreux, Aux = Pt, Ref = ECS.

2.4. Electrolyse quantitative et spectroscopie d'absorption de **12**.

Nous avons également réalisé l'électrolyse quantitative d'une solution de **12** (tampon phosphate, pH 5, concentration = 10^{-5} M) en vue de caractériser le produit de réduction à 1 électron par spectrométrie d'absorption dans l'UV-visible.

Pour cela, on réalise la réduction par chronoampérométrie en imposant un potentiel de -400 mV pendant 300 secondes. Les résultats sont représentés sur la figure suivante :

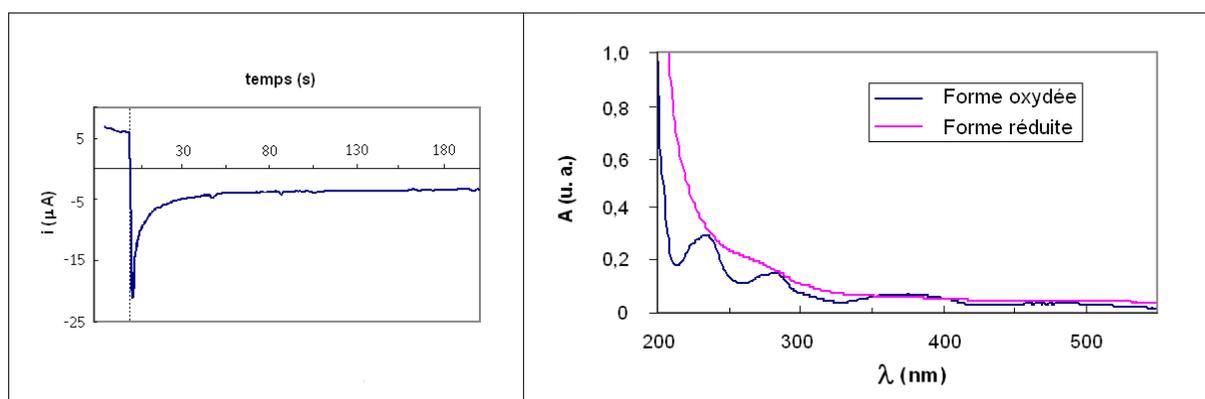


Figure 27 : Courbe de chronoampérométrie et spectres d'absorption électronique. Le spectre de la forme réduite a été obtenu dans une solution diluée afin de pouvoir superposer les spectres ($c_{\text{red}} = 10^{-6}$ M et $c_{\text{ox}} = 10^{-5}$ M).

On peut noter que l'allure générale du spectre d'absorption de la forme réduite à 1 électron obtenue par électrolyse est différente de celle de **12**. En effet, le changement d'état rédox a une forte influence sur les bandes caractéristiques en absorption dans l'UV-Visible, et on observe avec la forme réduite des bandes moins franches. Dans les longueurs d'ondes inférieures à 250 nm, le coefficient d'extinction molaire de **12** est moins grand que celui de sa forme réduite avec un écart maximum à $\lambda = 220$ nm ($\epsilon_{\text{réduit}}/\epsilon_{\text{oxydé}} = 5$). Toutefois, cet écart peut être largement sous-estimé compte tenu de l'adsorption potentielle (et non négligeable) de **12** sur le feutre de carbone. Il est à noter que les caractéristiques spectroscopiques de **12** sont intéressantes car elles pourraient être mise à profit afin de détecter l'hybridation par spectroscopie UV-Visible, la réponse en absorption étant susceptible d'être exaltée par simple réduction de l'intercalant après interaction avec le double brin.

2.5. Caractérisation des autres intercalants.

2.5.1. Caractérisation par voltamétrie cyclique des intercalants.

Nous avons également caractérisé en milieu aqueux un certain nombre de conjugués appartenants à la famille des pyridoacridines (figure 28).

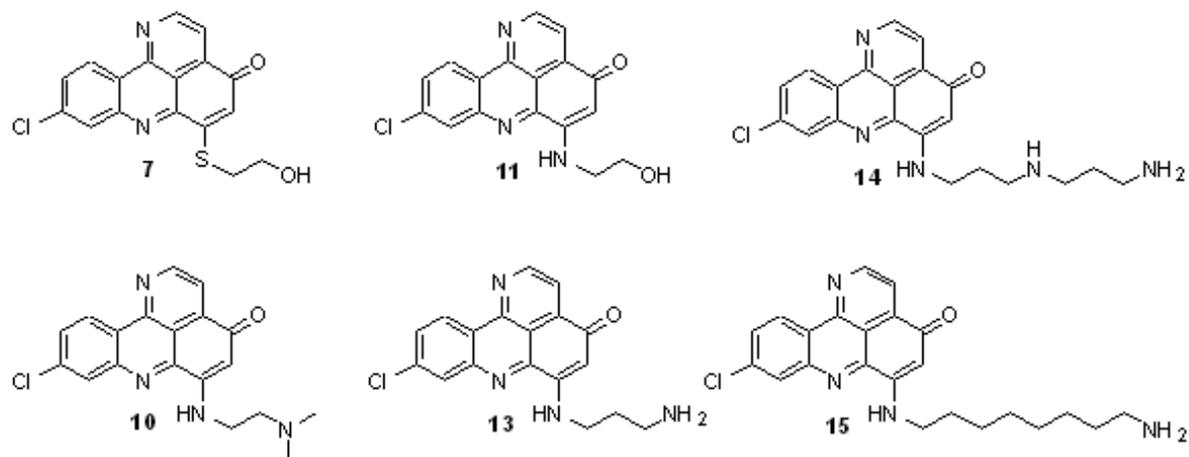


Figure 28 : Structures des molécules testées.

Le dérivé **7** possède une chaîne thio-éther terminée par une fonction alcool primaire. Tous les autres produits sont des conjugués par un lien amine secondaire entre le chromophore pyridoacridone et une chaîne aliphatique dont la longueur et le nombre d'hétéroatomes sont variables.

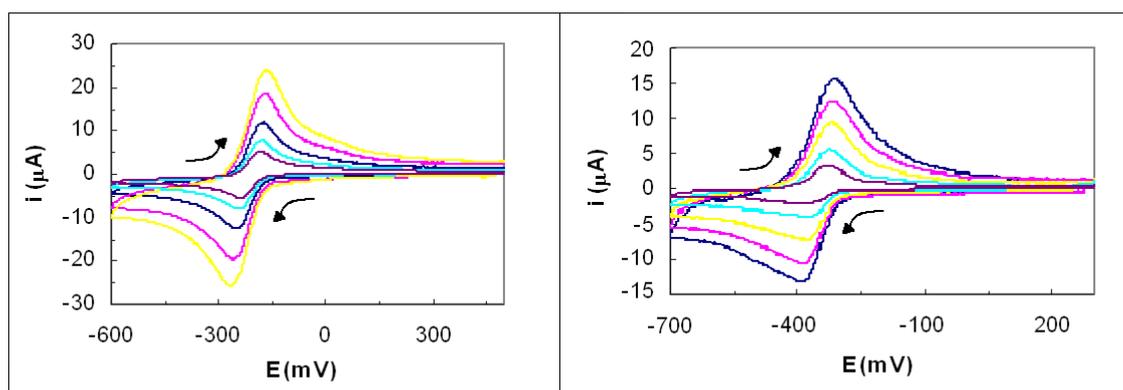
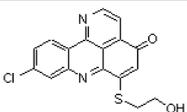
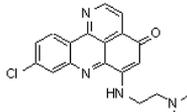
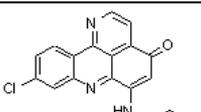
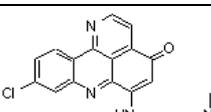
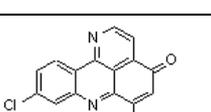
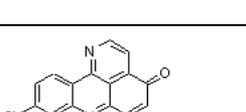
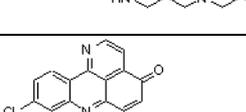


Figure 29 : VC de **10** dans le TP pH 5 (à gauche) et de **14** dans le TP pH 7 (à droite). $c_{10} = c_{14} = 1$ mM, W = Carbone vitreux, Aux = Platine, Ref = ECS.

L'allure générale des voltamétries cycliques des conjugués par lien amine sont toutes comparables (figure 29), par contre celle relative à **7** est plus complexe et présente deux systèmes distincts (figure 30) en milieu aqueux.

En ce qui concerne, la famille des pyridoacridines fonctionnalisées par des polyamines, leurs propriétés redox sont rassemblées dans le tableau suivant :

composé		Potentiel $E_{1/2}$ (mV/ Ag/AgCl)	
		pH = 5,8	pH = 7,0
	7	-124	-224
	10	-168	-240
	11	-232	-298
	12	-178	-254
	13	-168	-244
	14	-182	-248
	15	-174	-256

Presque tous les produits présentent un potentiel d'oxydoréduction comparable dont la valeur se situe dans la gamme [-256, -240] mV/Ag/AgCl à pH 7.

Par contre, les deux structures possédant une fonction hydroxyle primaire (**7** et **11**) présentent des valeurs de Potentiel $E_{1/2}$ légèrement différentes (-298 mV pour **11** et -224 mV pour **7**, toujours à pH 7).

On peut noter que les valeurs des potentiels rédox à pH 7 sont relativement basses. En fait, il faudrait que le design moléculaire et la fonctionnalisation de ces dérivés aboutissent à un potentiel $E_{1/2}$ plus proche de zéro volts pour s'affranchir complètement des restrictions liées au domaine d'électroactivité de l'eau.

2.5.2. Etude électrochimique du dérivé soufré 7.

- **Voltamétrie en escalier :**

La Voltamétrie en escalier (Square Wave Voltametry) permet d'obtenir une meilleure séparation des deux systèmes par rapport à la technique plus classique de voltamétrie cyclique. De plus, il s'agit d'une technique beaucoup plus sensible.

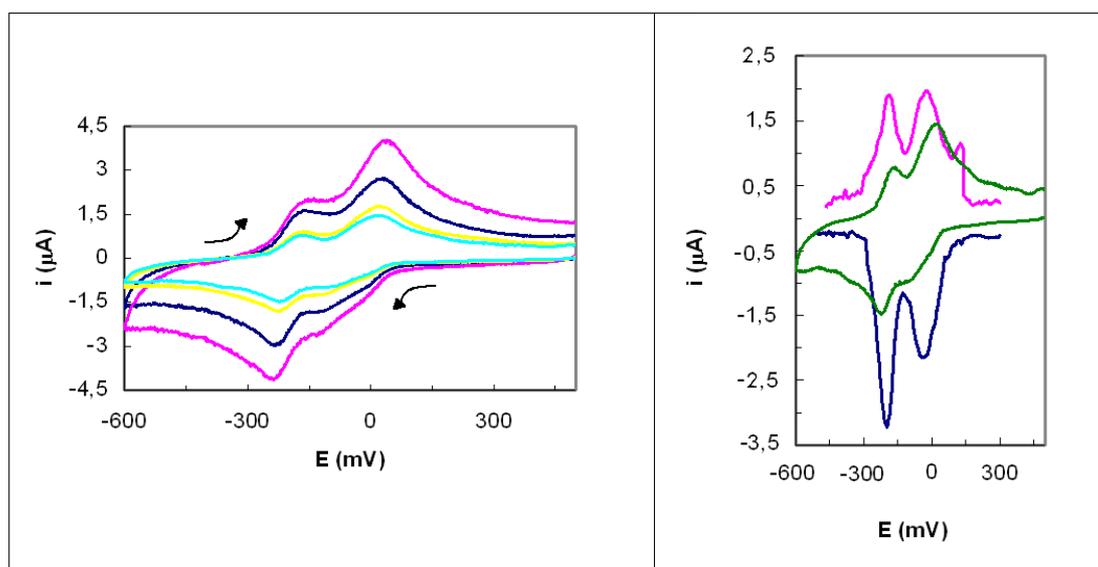


Figure 30 : Caractérisation par VC et SWV de 7 dans le TP pH 5. $c_7 = 0,5$ mM, vitesse de balayage en VC = [50 – 200 mV/s], paramètres SWV (fréquence = 10 Hz, incrément = 1 mV). Le même système d'électrode est utilisé (W = Carbone vitreux, Aux = Pt, Ref = ECS).

Lorsqu'on effectue l'intégration des deux pics de réduction, c'est à dire la mesure de la charge, on trouve la même valeur pour les deux systèmes. A priori, il s'agit donc de deux réductions successives à un électron ; l'une étant liée à l'électrochimie sur la quinone-imine et l'autre très probablement à la fonction thio-éther.

De plus, sur le SWV (figure 30, à droite), on observe également la présence d'un pic centré à 150 mV qui peut probablement être relié à un phénomène d'adsorption.

- **Electrolyse quantitative :**

Nous avons réalisé l'électrolyse quantitative du conjugué **7** par chronoampérométrie en imposant un potentiel fixe pendant 300 secondes. Nous avons ainsi formé le produit de réduction à 1 électron en appliquant $E = -100\text{mV}$ et celui à 2 électrons avec $E = -400\text{mV}$. Le suivi par spectrométrie d'absorption UV-Visible a nécessité une dilution des échantillons pour enregistrer les spectres car les produits ont des coefficients d'extinction molaires relativement importants.

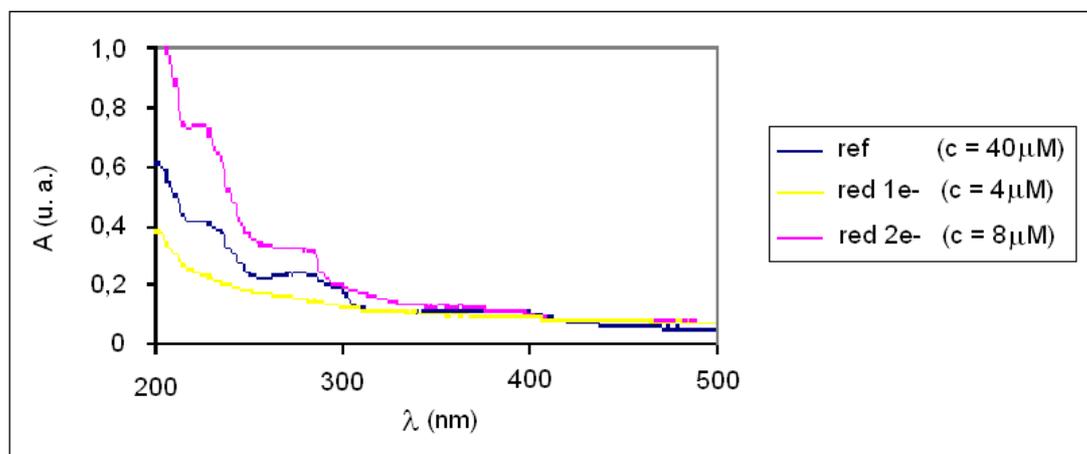


Figure 31 : Spectres d'absorption électronique des différents états rédox de **7**.

λ max (nm)	Coefficient d'extinction molaire ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)		
	7	réduction à 1 e^-	réduction à 2 e^-
225	10400	59500	93500
281	6100	38500	40500
375	3000	23500	15400

Lorsque l'on réduit l'espèce **7** à un ou deux électrons, on constate une augmentation du coefficient d'extinction molaire ϵ , lequel est très fortement dépendant de la délocalisation électronique sur les cycles aromatiques.

2.6. Etude des limites de détection.

Nous voulions connaître la limite de détection électrochimique du signal correspondant à nos produits, autrement dit, la concentration minimale à laquelle on enregistre un signal avec un rapport signal spécifique/signal de fond convenable.

Pour cela, nous avons choisi de mener cette étude avec le produit **14** qui présente la meilleure solubilité aqueuse dans la série de conjugués que nous avons synthétisé.

La première technique que nous avons utilisée est classiquement la voltamétrie cyclique à balayage ; cependant la détection à de faibles concentrations en intercalant est rapidement limitée par l'effet capacitif du système (lorsque $c < 25 \mu\text{M}$).

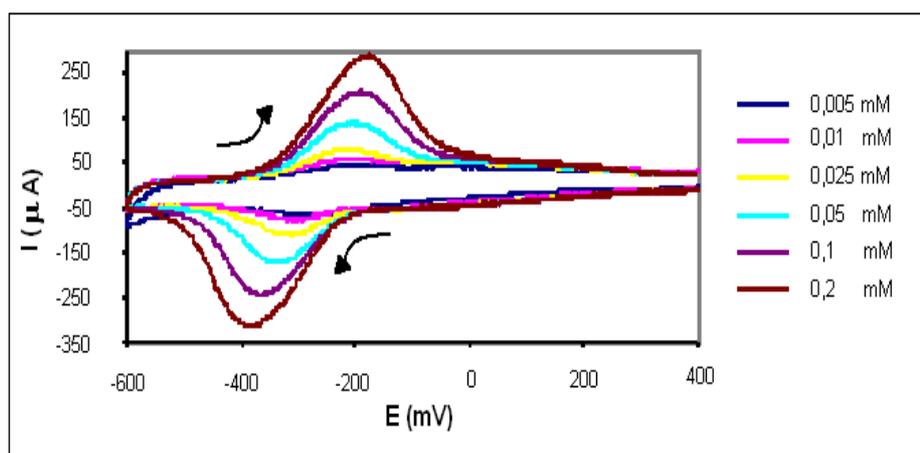


Figure 32 : VC enregistrées en fonction de la concentration en **14**. Solutions dans le tampon phosphate pH 7, balayage à 200 mV/s. Les dilutions sont réalisées à partir d'une solution mère à 1 mM.

Nous avons alors réalisé cette étude de la limite de détection par voltamétrie en escalier (SWV) et les résultats sont présentés dans la figure suivante.

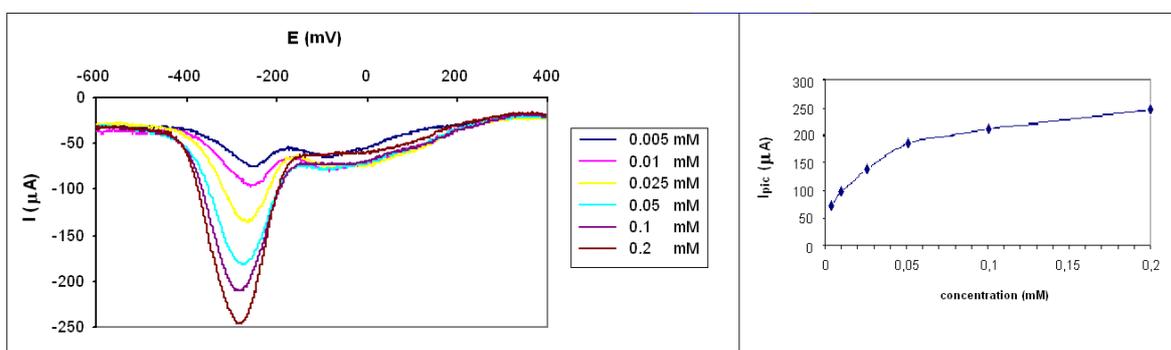


Figure 33 : SWV enregistrées en fonction de la concentration en **14** et courbe de réponse.

Dans tout la gamme de concentration testée, le produit **14** présente une bonne réponse électrochimique qui se démarque convenablement du courant de fond. Si l'on corrige la ligne de base avec la valeur du courant de fond, le signal enregistré pour une concentration de $5 \mu\text{M}$ est de $|I_{\text{pic}} - I_{\text{fond}}| = 45 \mu\text{A}$ pour une macroélectrode de diamètre 3 mm.

3. Essais préliminaires à l'application biocapteur (faisabilité).

3.1. Interaction de l'intercalant avec l'ADN.

Dans un premier temps, il a fallu étudier la cinétique des différents modes d'interaction de **12** avec l'ADN ; d'une part les interactions non spécifiques (adsorption et interaction avec l'ADN simple brin) et d'autre part les interactions spécifiques (interaction avec l'ADN double brin, notamment par intercalation).

La méthode de détection par DPV (Differential Pulse Voltametry) qui est relativement sensible, a été utilisée avec un montage classique à trois électrodes. La figure 34 montre les courbes obtenues en DPV en travaillant avec **12** seul dans la solution électrolytique (en rouge), **12** avec de l'ADN simple brin (en vert) et pour finir **12** avec du double brin (en jaune).

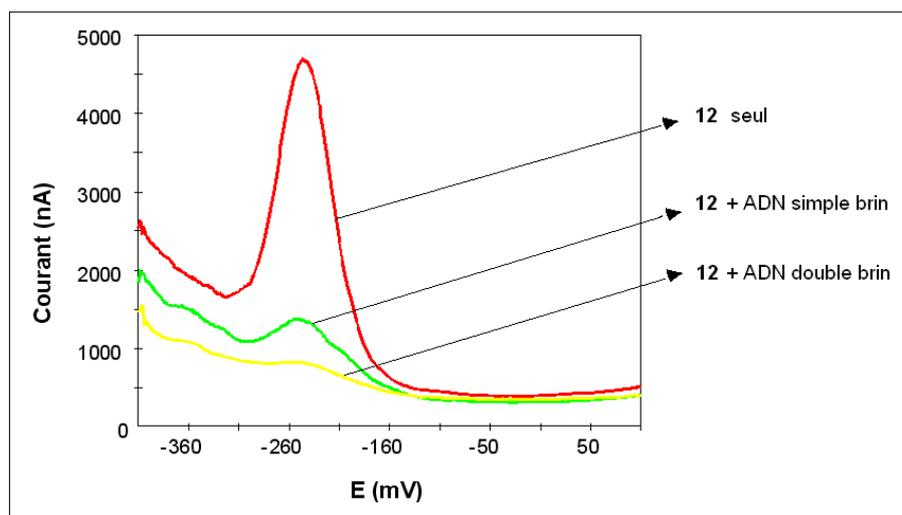


Figure 34 : DPV avec et sans ADN en solution. $c_{12} = 125 \mu\text{M}$ dans TP pH 7, $c_{\text{ADN}(\text{sb ou db})} = 0,5 \text{ mg/mL}$, DPV enregistrées en balayant le potentiel de $-0,45$ à $0,1 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl après stabilisation du potentiel à $-0,45 \text{ V}$ pendant 30 s. Paramètres DPV (amplitude de pulse = 50 mV et largeur de pulse = 30 mV).

On observe en présence d'ADN simple brin une diminution de l'intensité du signal dû à l'interaction de l'intercalant électroactif (en vert), et la quasi disparition de ce signal avec l'ADN double brin (en jaune).

En fait, l'interaction de la pyridoacridine avec l'ADN limite sa disponibilité au voisinage de l'électrode étant donné la faible mobilité de l'ADN en solution. (Il s'agit d'un ADN simple brin de thymus de veau et d'un ADN double brin de saumon). Il est clair que l'intercalation, mode d'interaction privilégié avec l'ADN hybridé monopolise plus notre marqueur électrochimique que l'interaction non spécifique avec le simple brin. On peut remarquer une interaction non spécifique relativement marquée qui peut être reliée aux interactions entre les bases non hybridées et l'intercalant, et/ou aux interactions électrostatiques entre l'ADN polyanionique et l'intercalant protoné au pH de l'étude, mais plus vraisemblablement à la présence non négligeable d'ADN hybridé dans l'échantillon de thymus de veau (60% de simple brin selon le fournisseur Sigma).

Les résultats sur la figure 34 vérifient par voie électrochimique la sélectivité du processus d'intercalation de **12**.

Ensuite, pour démontrer la faisabilité de l'élaboration d'un capteur à ADN basé sur l'utilisation de **12** comme marqueur rédox, nous avons vérifié l'existence d'un signal électrochimique lié à l'intercalation dans le cas d'un ADN simple ou double brin adsorbé sur une électrode modifiée par un film de Ppy.

Pour cela, nous avons choisi la technique d'immobilisation par voie polyélectrolyte (méthode fiable et reproductible du fait des interactions électrostatiques entre l'ADN polyanionique et le polypyrrole (Ppy) oxydé polycationique)⁵⁰ illustrée sur la figure 35. Le phénomène d'électropolymérisation du pyrrole sera présenté en détail dans la partie **II-4.1.1**.

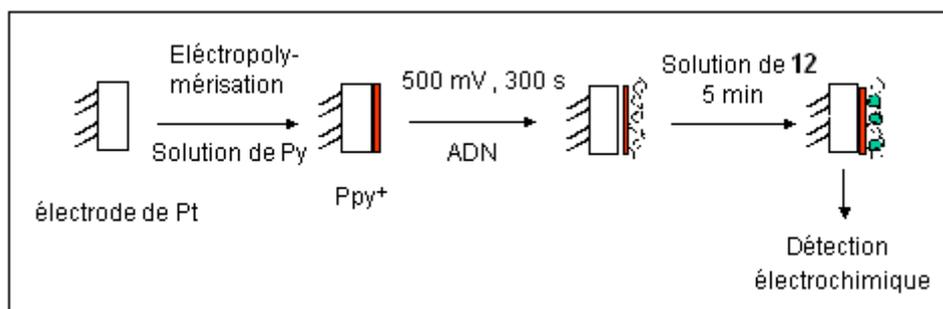


Figure 35 : Mode opératoire pour l'adsorption d'ADN.

⁵⁰ B. Saoudi, C. Despas, M. M. Chehimi, N. Jammul, M. Delamar, J. Bessière, A. Walcarius. *Sens. Actuators B*, **2000**, 62, 35-42.

La figure 36 présente la réponse de cette électrode après incubation dans une solution de **12** pour une surface recouverte d'ADN simple et double brin. Le signal lié à l'interaction spécifique d'intercalation présente une plus grande amplitude démontrant d'une part la sélectivité de la mesure, et d'autre part l'accessibilité de la sonde intercalée.

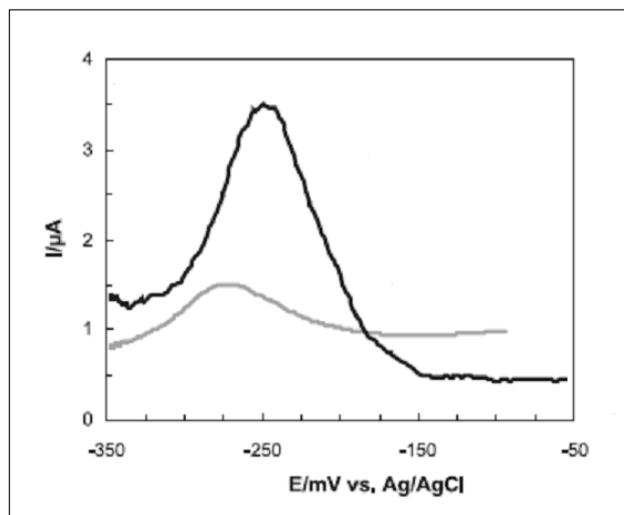


Figure 36 : Détection DPV de 125 μM de **12** dans du tampon phosphate désaéré (0,1 M, pH 7) après 90 minutes d'interaction avec de l'ADNsb (ligne grise) ou de l'ADNdb (ligne noire) immobilisé par adsorption sur une électrode de Pt modifiée par du Ppy.

L'existence d'un signal, malgré la présence du film de Ppy à l'état réduit, valide une approche capteur basée sur l'utilisation de la technologie développée pour le procédé MICAM qui repose sur l'élaboration d'un copolymère poly(py/py-ODN).

3.2. Etude des cinétiques d'interaction.

Si l'on s'intéresse à présent à la cinétique de ces divers modes d'interaction, on s'aperçoit que les vitesses sont très différentes.

La figure 37 illustre la cinétique d'adsorption (non spécifique) de **12** sur le polypyrrole. Il s'agit des DPV de l'électrode de platine modifiée par un film de polypyrrole (Pt/Ppy) et immergée pendant des temps croissants dans une solution de 125 μM de **12**.

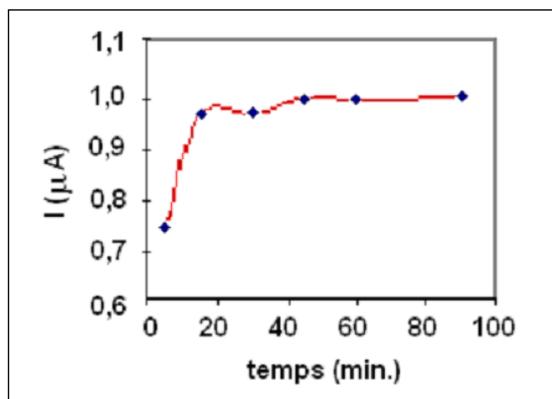


Figure 37 : Cinétique d'interaction non spécifique de **12** sur l'électrode modifiée Pt/Ppy.

Nous pouvons voir qu'il s'agit d'une cinétique relativement rapide, l'intensité augmente rapidement dans un premier temps puis atteint un palier à partir de 20 minutes.

Nous avons ensuite étudié la cinétique d'interaction spécifique en plongeant une électrode Pt/Ppy/ADNdb dans une solution de 125 μM de **12**. Cette fois ci, on observe une augmentation lente de l'intensité du signal, puis un saut centré sur 75 minutes et enfin le signal rejoint un plateau après 1h30 d'interaction (cf. figure 38).

Pour finir, nous avons étudié la cinétique d'interaction non spécifique en plongeant une électrode Pt/Ppy/ADNsb dans une solution de 125 μM de **12**. Comme pour l'interaction précédente, il faut environ 90 minutes pour rejoindre le plateau d'intensité de pic enregistré en DPV. On peut noter que cette complétion de l'interaction spécifique de **12** avec l'ADNdb adsorbé obtenue au bout de 1h30 est équivalente à celle donnée dans la littérature pour un autre intercalant rédox : L'adriamycine⁵¹.

⁵¹ A. M. Oliveira-Brett, M. Vivan, I. R. Fernandes, J. A. P. Piedade. *Talanta*, **2002**, 56, 959-970.

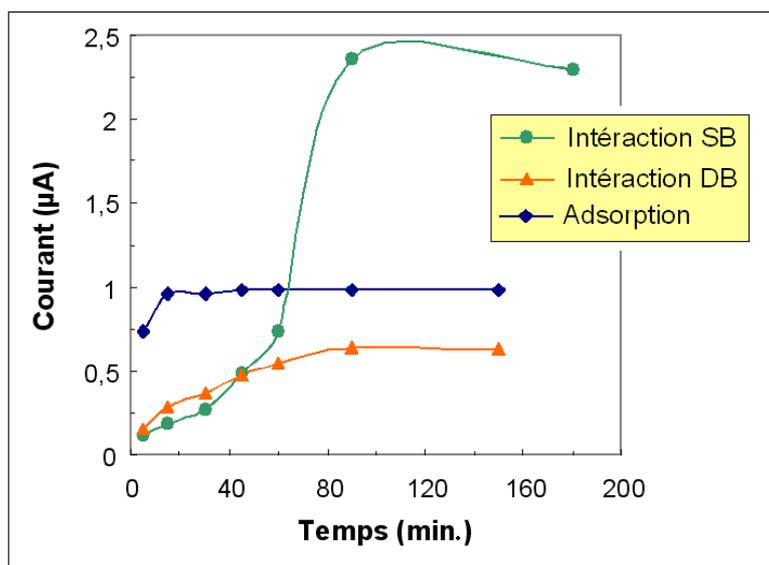


Figure 38 : Cinétiques des interactions spécifiques et non spécifiques.

Ainsi, l'adsorption sur le Ppy est l'interaction la plus rapide. Elle est quantitative au bout de 20 minutes. Par contre, l'interaction avec l'ADN simple brin et double brin est plus lente puisqu'il faut attendre environ 90 minutes pour obtenir un pallier.

De manière surprenante, si l'on compare les courants correspondants aux interactions non spécifiques, on se rend compte que la réponse associée à l'électrode Pt/Ppy/ADNsb (0,65 μA) est sensiblement inférieure à celle sur l'électrode simplement modifiée par un film de polypyrrole (1 μA avec Pt/Ppy). Ce comportement indique que **12** interagit fortement avec le polypyrrole, probablement à travers des interactions hydrophobes. Cette interaction non spécifique pourra certainement être minimisée en polarisant le polymère conducteur électronique afin d'obtenir sa forme polycationique oxydée qui génèrera des interactions électrostatiques répulsives avec l'intercalant **12** partiellement protoné à pH 6-7 (le pKa de l'azote hétérocyclique est égal à 7,0).

D'un autre côté, la réponse plus faible avec le simple brin peut s'expliquer par une saturation de la surface du film de polypyrrole par l'ADN, laquelle réduit l'interaction non spécifique entre **12** et le Ppy.

3.3. Comparaison avec la Doxorubicine.

Comme nous l'avons précisé dans l'introduction, plusieurs indicateurs rédox ont été décrits dans la littérature pour la détection de l'hybridation de l'ADN ³⁷. Les molécules

« marqueurs rédox » les plus étudiées à ce jour sont deux anthracyclines, la daunomycine et la doxorubicine.

Dans ce contexte, nous avons comparé la réponse électrochimique de **12** et de la doxorubicine en interaction avec de l'ADN double brin adsorbé sur une électrode Pt/Ppy. Les courbes obtenus en DPV (figure 39) ont été enregistrées après l'immersion pendant 90 minutes d'une électrode Pt/Ppy/ADNds dans des solutions tampons contenant 125 μM de chaque intercalant et transfert dans une nouvelle solution de tampon phosphate.

Tout comme le produit **12**, la doxorubicine présente une fonction quinone qui peut être réduite en milieu aqueux. Cette réduction est enregistrée à un potentiel plus négatif (-430 mV vs. Ag/AgCl, figure 39, ligne verte) que celui de **12** (même figure, ligne rose).

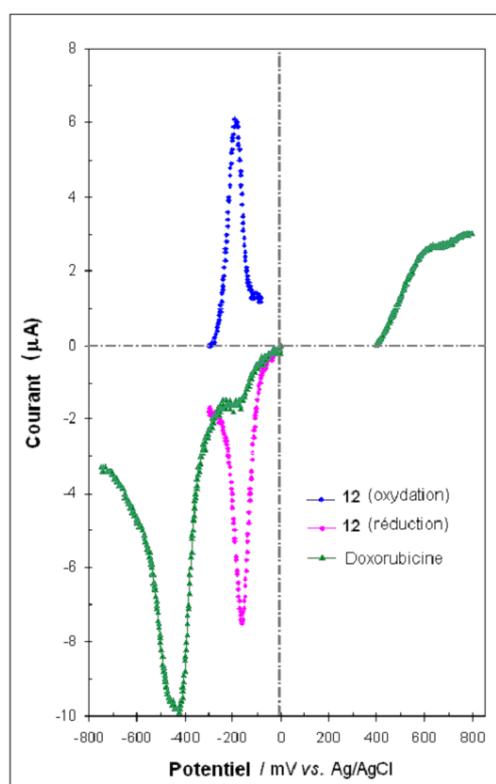


Figure 39 : Réponses de **12** et de la doxorubicine en interaction avec l'ADNdb adsorbé. $c_{12} = c_{\text{doxo}} = 125 \mu\text{M}$, durée intercalation = 90 min, paramètres DPV (amplitude de pulse = 50 mV, largeur de pulse = 70 mV et vitesse de balayage = 5 mV/s).

De plus, la réponse associée à la doxorubicine est plus importante que celle de **12** mais elle est centrée sur un potentiel où le courant spécifique s'additionne à un fort courant de fond.

L'oxydation de la doxorubicine à 600 mV vs. Ag/AgCl est un phénomène irréversible. Ce processus est utilisé pour l'élaboration de biocapteurs à usage unique⁵² car la détection est destructive (attaque de la guanine sur l'espèce réactive de la doxorubicine par transfert de charge à travers l'ADN). Par ailleurs, ce signal rédox est relativement mal résolu du fait de sa superposition avec des phénomènes d'oxydations électrochimiques des produits de la dégradation de la guanosine (8-oxo-G).

Par contre, l'oxydation de **12** dans le tampon phosphate est parfaitement réversible.

On peut également noter qu'en milieu aéré, la réduction de **12** se superpose à la réduction de l'oxygène dissous dans l'eau (signal centré à -170 mV) également visible dans la DPV correspondant à la doxorubicine. Ceci explique la différence de courant de pics respectivement attribués à l'oxydation ($i_a = 6,1 \mu\text{A}$) et la réduction ($i_c = 7,5 \mu\text{A}$) de **12**.

3.4. Influence de la concentration en intercalant.

Nous nous sommes également intéressés à l'influence de la concentration en intercalant sur le signal spécifique détecté par DPV. Pour cela on a fait varier la concentration en intercalant **12** de 1 à 200 micromoles par litre. Les résultats obtenus (courbes DPV et tracé de la réponse en courant en fonction de la concentration en **12**) sont présentés sur la figure 40.

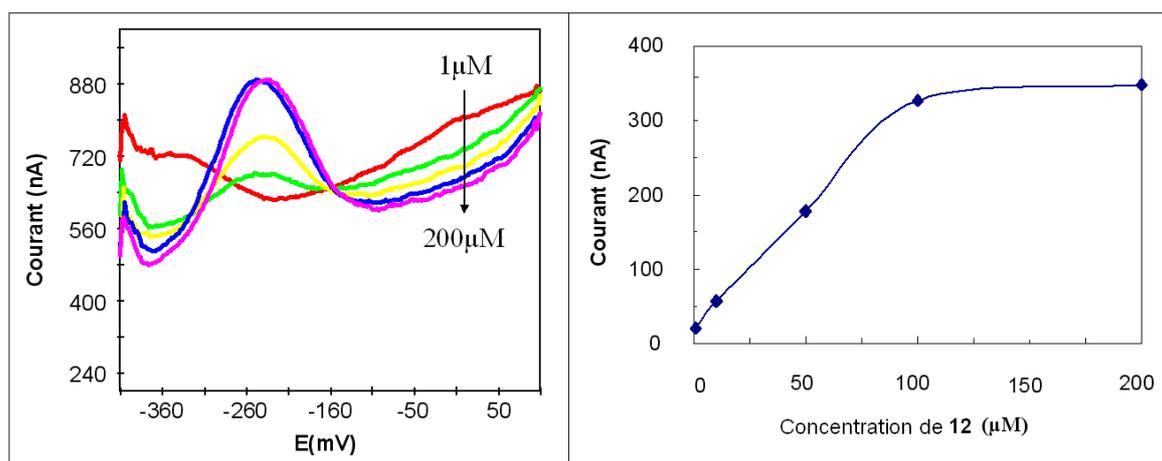


Figure 40 : Réponse sur électrode Pt/Ppy/ADNdb en fonction de la concentration en **12**.

⁵²G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini. *Biosens. Bioelec.*, **1999**, 14, 43-51.

Ces résultats montrent que l'intensité du courant enregistré dépend fortement de la concentration en intercalant et atteint un maximum à partir de 100 μM .

En conclusion, l'étude préliminaire de l'interaction avec d'une part l'ADN en solution, et d'autre part l'ADN adsorbé, a permis de mettre en évidence une interaction spécifique forte de **12** avec le double brin, mais aussi des effets non spécifiques (interaction entre **12** et le simple brin d'ADN ou avec le film de polypyrrole).

De plus, même si la cinétique d'interaction spécifique est lente (90 minutes pour arriver à complétion), le signal correspondant est intense. Finalement, la méthode de détection électrochimique différentielle par DPV semble parfaitement appropriée à notre système et la concentration optimale en intercalant est de 100 μM .

Dans la suite, nous nous placerons à une concentration en intercalant de 125 μM permettant d'obtenir une bonne répétabilité des mesures.

4. Elaboration du Biocapteur et détection de l'hybridation de l'ADN.

4.1. Immobilisation des sondes oligonucléotidiques.

4.1.1. Electropolymérisation du pyrrole.

Comme tous les polymères électroniques conducteurs, le polypyrrole (Ppy) est un semi-conducteur constitué de chaînes organiques conjuguées comportant une alternance de simple et doubles liaisons. Le recouvrement des orbitales π de chaque monomère entraîne la formation d'une super orbitale où les charges peuvent circuler dans la chaîne et ainsi assurer sa conductivité, qui peut atteindre celle des métaux (entre 10^{-2} et $10^2 \Omega^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Cependant cette conductivité n'apparaît que lorsque des dopants, espèces chimiques, sont insérés dans le Ppy. Ces derniers induisent un excédant ou un défaut de charge sur la chaîne. Ainsi le Ppy est conducteur à l'état oxydé où il est dopé et isolant à l'état neutre où il est dédopé. Sa neutralité est assurée par la présence de contre-anions ou d'anions dopants.

La figure 41 montre l'incorporation du dopant lors de l'électropolymérisation du pyrrole, n étant le nombre d'unité pyrrole et δ le taux de dopage, c'est à dire, le nombre

d'anion dopant pour n unités pyrrole. Généralement δ du ppy en milieu ClO_4^- est de 1/3 soit un ClO_4^- pour 3 unités pyrrole.

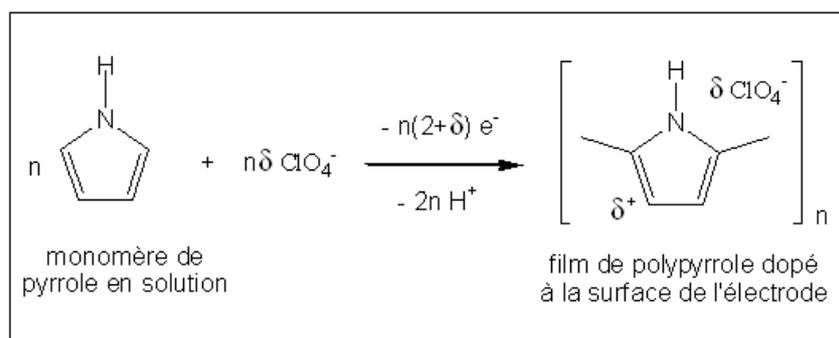


Figure 41 : Electropolymérisation du pyrrole.

La synthèse du Ppy par oxydation chimique ou électrochimique des monomères de pyrrole conduit à la formation d'un film électroactif à la surface du support. Plusieurs mécanismes d'électrosynthèse sont proposés mais le plus probable est celui faisant intervenir un radical lors du mécanisme de croissance. Le monomère est oxydé à la surface de l'électrode en un radical cation dont le couplage radicalaire suivi de l'élimination de 2H^+ conduit au dimère du pyrrole. Ce dimère s'oxyde selon le même mécanisme. Il y a alors élongation de la chaîne oligomérique de Ppy qui devient insoluble et précipite à l'interface de l'électrode sous forme d'un film.

La figure 42 montre la réponse voltampérométrique lors de l'électrosynthèse du Ppy. Au fur et à mesure des cycles, on observe la croissance de polymère électroactif à la surface de l'électrode.

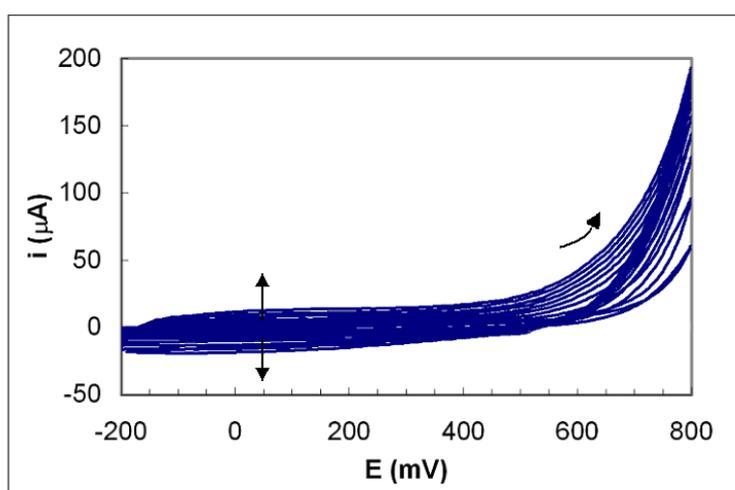


Figure 42 : Electrosynthèse du film de Ppy sur électrode de Pt, vitesse de balayage = 20 mV/s.

4.1.2. Immobilisation des oligonucléotides dans le polypyrrole.

La société CIS Biointernational et le CEA de Grenoble ont mis au point une méthode d'immobilisation directe d'ODN dans le Ppy par copolymérisation, schématisée par la figure 43.

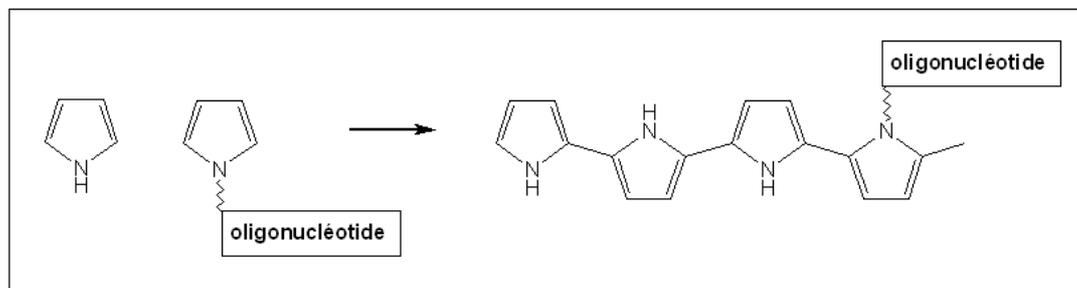


Figure 43 : Principe de la copolymérisation de py et py-ODN.

Elle consiste en la polymérisation simultanée par voie électrochimique en solution de monomères pyrrole et d'ODN portant un py séparé par une chaîne alkyle constituant un bras espaceur. L'ODN est substitué sur l'azote du pyrrole.

La copolymérisation réalisée en milieu aqueux permet non seulement d'immobiliser rapidement (une seule étape), simplement et solidement, dans des conditions biocompatibles, les ODN sur une électrode, mais elle permet également de constituer la couche sensible dans l'élaboration d'un biocapteur électrochimique. En effet, le Ppy est alors un relais d'électrons entre le lieu de la reconnaissance biologique et celui de la transduction assurée par l'électrode. De plus elle permet un adressage des ODN en localisant précisément le lieu de l'immobilisation des sondes biologiques.

4.2. Procédure expérimentale.

4.2.1. Synthèse des oligonucléotides.

Tous les oligonucléotides (ODN) ont été synthétisés en utilisant des réactifs spécifiques (Perkin Elmer) sur un synthétiseur automatique d'ADN 381A de chez Applied biosystems en suivant une procédure classique¹⁷. Un ODN sonde 40 mer a été fonctionnalisé avec un monomère pyrrole en utilisant un espaceur T5. La séquence correspond à un mutant

du protooncogène k-ras qui joue un rôle dans le développement de cancers. Les oligonucléotides cibles complémentaires de l'ODN sonde 40 mer sont respectivement des ODN 10, 20 et 40 mer.

Les oligonucléotides sont parfaitement stables dans l'acétonitrile, et ils ont été purifiés dans ce solvant en utilisant un système de chromatographie liquide Haute Performance (CLHP). Des solutions contenant les cibles ainsi qu'un oligonucléotide non complémentaire à des concentrations variables ont été préparées dans du tampon phosphate (PBS) et conservés au congélateur entre chaque utilisation. Les séquences de bases nucléotides de ces oligonucléotides sont les suivantes :

Pyr-40 mer ODN sonde (longueur 12,4 nm)

Pyr-T5-5' AG AGT GCC TTG ACG ATA CAG CTA ATT CAG AAT CAT TTT GT 3'

ODN cibles complémentaires

10 mer complémentaire (10c)

5' AA GGC ACT CT 3'

20 mer complémentaire (20c)

5' CTG TAT CGT CAA GGC ACT CT 3'

40 mer complémentaire (40c)

5' AC AAA ATG ATT CTG AAT TAG CTG TAT CGT CAA GGC ACT CT 3'

ODN 20 mer non complémentaire (20n)

5' GGG CAG GAC CGG GCA GGA CC 3'

Deux oligonucléotides biotinylés ont été utilisés pour tester la spécificité du senseur par des expériences de fluorescence, et leurs séquences sont les suivantes :

ODN complémentaire

5' biotin-GCT GTA TCG TCA AGG C 3'

ODN non complémentaire

5' biotin-GGG CAG GAC CGG GCA GGA CC 3'

4.2.2. Cellule électrochimique.

La synthèse et la caractérisation électrochimique ont été réalisées avec un potentiostat PAR 273 de chez EG&G Princeton Applied Research piloté par un ordinateur. L'électrode de travail est une électrode en carbone vitreux de 3 mm de diamètre dont le potentiel est contrôlé par une électrode de référence Ag/AgCl (dans KCl saturé). Toutes les expérimentations électrochimiques se sont déroulées dans une cellule de 5 mL possédant quatre cols.

4.2.3. Electrosynthèse de films copolymères de py et py-ODN (électrode ADNsb).

Préalablement à la déposition du copolymère, l'électrode de carbone vitreux est polie mécaniquement en utilisant une polisseuse automatique (PRESI, France) avec de la poudre de diamant (2 μm et 0,1 μm respectivement). L'électrode est rincée abondamment avec de l'eau de qualité Millipore entre chaque étape du polissage. Finalement, l'électrode est mise sous ultrasons dans de l'acétone et de l'eau successivement, puis laissée sécher à température ambiante.

Les films de copolymères sont déposés sur l'électrode de carbone vitreux en scannant son potentiel entre -0,3 et +0,7 V ; la vitesse de balayage étant 20 mV/s. L'électrode auxiliaire est un fil de platine tandis qu'une électrode Ag/AgCl saturée en KCl sert de référence. L'électrolyte support est une solution à 0,1 M de perchlorate de lithium (Fluka) contenant 24 mM de monomère pyrrole (Acros) prélevé dans une solution mère de py distillé et mis en solution (1M) dans l'acétonitrile (qualité HPLC, SDS) et de 5 à 35 μM (correspondant au ratios pyrrole-ODN sur pyrrole compris entre 1/4500 et 1/700) de monomère pyrrole fonctionnalisé par l'ODN 40 mer.

L'ajout en petite quantité d'acétonitrile (1% en volume) n'a pas d'influence sur la sonde biologique au cours de l'électropolymérisation. Après la synthèse, l'état de charge du copolymère obtenu est stabilisé pendant 10 minutes en scannant le potentiel de l'électrode entre -0,7 et +0,7 V à une vitesse de balayage de 50 mV/s dans du PBS. Ce dernier a été préparé en dissolvant une tablette de PBS (Sigma) dans 200 mL d'eau (qualité millipore) afin d'obtenir une solution de tampon phosphate à 0,01 M ; 0,0027 M de chlorure de potassium et 0,137 M de chlorure de sodium sont ajoutés et le pH de cette solution vaut 7,4 à 298 K.

4.2.4. Adsorption de **12 pour obtenir le courant de fond (électrode ADNsb/12).**

Dans le but d'obtenir un courant de fond stable, toutes les électrodes ADNsb nouvellement fabriquées sont plongées dans une solution contenant 125 μM de **12** pendant 40 minutes. Par cette méthode, on obtient une adsorption maximale de l'indicateur sur la surface de l'électrode et l'étape d'intercalation suivante n'aura aucun effet sur l'adsorption de **12** contre le substrat Ppy.

4.2.5. Hybridation et dénaturation (électrode ADNdb).

L'étape d'hybridation est réalisée par immersion de l'électrode ADNsb/intercalant **12** dans une solution de PBS (pH = 7,4) contenant 200 nM de cibles oligonucléotides complémentaires. Le test négatif utilise une solution d'oligonucléotide 25 mer non complémentaire à la même concentration. L'hybridation dure 20 minutes à température ambiante après quoi l'électrode est rincée trois fois dans le PBS afin d'éliminer l'ADN non apparié.

Après les expériences de caractérisation électrochimique, l'électrode hybridée est rincée à l'eau distillée puis trempée 30 secondes dans une solution de soude à 0,1 M pour dissocier le complexe d'ADN, c'est à dire pour dénaturer la double hélice afin de régénérer le substrat ODN. Pour finir, l'électrode est rincée trois fois dans du PBS.

4.2.6. Intercalation de **12 sur la surface de l'électrode (électrode ADN db/12).**

Après l'étape d'hybridation, l'électrode est trempée dans une solution de PBS (pH = 7,4) contenant 125 μM de la molécule **12** afin qu'elle s'intercale entre les paires de bases nucléiques de l'ADNdb. La procédure d'intercalation dure 90 minutes après quoi l'électrode est rincée avec du tampon PBS.

4.2.7. Mesures électrochimiques.

La DPV (Differential Pulse Voltametry) est réalisée à température ambiante dans une cellule électrochimique de 5 mL avec une configuration classique à trois électrodes. La voltamétrie est enregistrée avec un volume de 1 mL de PBS à pH6. La solution est désaérée avant toute expérimentation avec de l'argon et le flux de gaz inerte est maintenu pendant les

mesures. Suite à un conditionnement de l'électrode à $-0,4 \text{ V}/_{\text{Ag}/\text{AgCl}}$ pendant 90 secondes, la voltampérométrie est effectuée dans la gamme de potentiels $-0,4$ et $+0,1 \text{ V}$ par rapport à l'électrode Ag/AgCl et les paramètres d'acquisition sont les suivants : Amplitude = 30 mV et hauteur du pulse = 50 ms. Ce protocole permet de s'affranchir de la présence d'oxygène moléculaire dissous en solution comme nous l'avons discuté auparavant (figure 39).

4.2.8. Expériences de fluorescence.

Afin de valider la détection électrochimique de l'hybridation de la sonde ODN greffé sur le film de copolymère, des expériences de référence (détection par fluorescence) ont été menées en l'hybridant avec 100 nM d'ODN complémentaire biotinylé dans 200 μL de PBS contenant 1 équivalent de solution Denhart. Après l'étape d'hybridation, l'électrode est placée dans une solution de PBS contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptavidine-R-phycoérythrine (sonde moléculaire) pendant 10 minutes dans l'obscurité. La fluorescence est enregistrée sur un temps de 1 seconde avec un microscope d'épifluorescence (BX 60, Olympus) équipé d'une caméra CCD (Hamamatsu) et d'un logiciel de traitement d'images (Imagepro plus, Media Cybernetics).

4.3. Résultats et discussion.

Le schéma suivant représente le procédé de fabrication et de caractérisation du biocapteur à ADN par les interactions non spécifiques (1 et 2) et l'interaction spécifique (3).

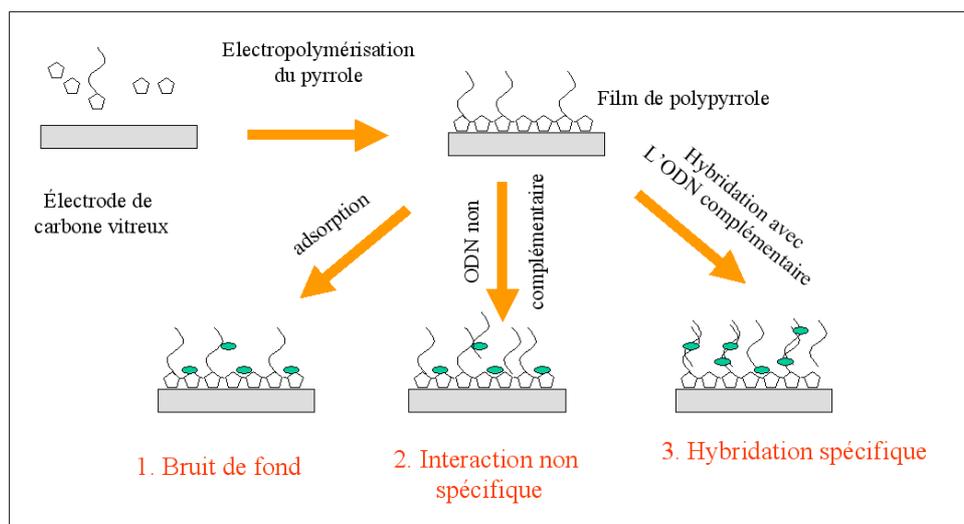


Figure 44 : Fabrication du capteur.

L'ODN sonde est immobilisé à la surface d'une électrode de carbone vitreux en une seule étape par électropolymérisation de pyrrole et de Py-ODN. Cette copolymérisation de Pyrrole avec du Py-ODN 40 mer a été réalisée par voltamétries cycliques. Nous pouvons noter que le monomère est oxydé à 0,55 V et que le film copolymère croît régulièrement avec le nombre de cycles réalisés. Toutefois, le monomère modifié par la sonde oligonucléotidique s'oxydant à un potentiel plus élevé, le potentiel supérieur du balayage a été fixé à 0,7 V vs. Ag/AgCl afin de permettre la copolymérisation. Afin d'obtenir des films dont la topologie est suffisamment contrôlée en termes d'épaisseur et de rugosité, le nombre de cycles d'électropolymérisation sera limité à 3. Ce qui correspond dans les conditions de synthèse décrites à l'obtention d'un film d'une épaisseur inférieure au micron⁵³.

Pour faciliter le processus d'échange d'ions du film polymère, l'électrode est stabilisée dans une solution de PBS en cyclant le potentiel entre -0,7 et +0,7 V. Un couple de pics centrés sur 0 V peut alors être observé, et ceux ci sont attribués à l'oxydation et la réduction du polypyrrole. Ces données montrent clairement que le polypyrrole a été immobilisé avec succès à la surface de notre électrode.

Pour prouver la présence de l'oligonucléotide 40 mer dans le film copolymère, et de manière concomitante son accessibilité vis à vis de la cible ADN complémentaire, nous avons entrepris une validation par des expériences de fluorescence grâce à un microscope d'épifluorescence.

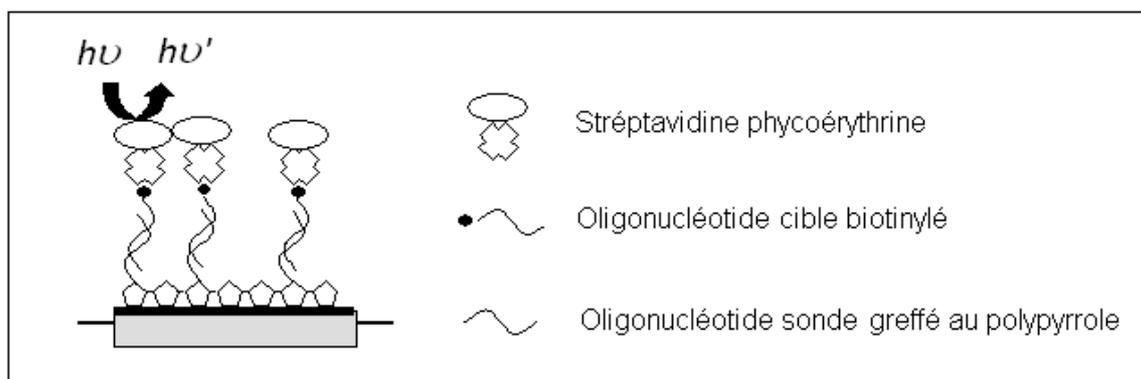


Figure 45 : Technique d'hybridation avec un ODN cible conjugué à un fluorochrome.

⁵³ N. Lassalle, P. Mailley, E. Vieil, T. Livache, A. Roget, J. P. Correia, L. M. Abrantes. *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 509, 48-57.

La figure 45 illustre la conjugaison de la R-phycoérythrine à la Stréptavidine. La complexation avec la biotine greffée à l'extrémité de la sonde oligonucléotidique complémentaire permet de détecter par fluorescence l'hybridation entre le brin immobilisé dans le Ppy et le brin complémentaire.

La figure 46 montre les images obtenues en fluorescence sur le film copolymère après incubation dans des solutions d'ODN complémentaire et non complémentaire biotinylés respectivement. Comme prévu, les deux images sont très différentes. L'intensité moyenne est d'environ 126 niveaux de gris sur une échelle de 256 après hybridation avec l'ODN complémentaire biotinylé, tandis qu'avec l'électrode mise en présence de l'ODN non complémentaire biotinylé, la valeur est seulement de 5,8. Ces résultats montrent clairement que l'ODN sonde a parfaitement été immobilisé dans le film copolymère au cours du processus d'électropolymérisation ; mais également qu'il est accessible et a conservé sa spécificité de reconnaissance moléculaire avec l'ODN complémentaire.

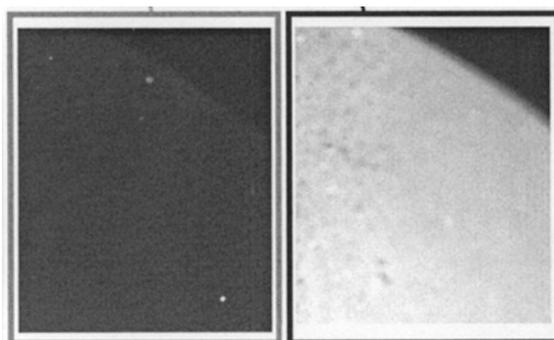


Figure 46 : Transduction par fluorescence de l'interaction non spécifique (à gauche) et spécifique (à droite).

De plus, nous pouvons voir sur cette figure que l'électropolymérisation a été relativement homogène sur la surface de l'électrode grâce à une vitesse de balayage lente (20 mV/s) appliquée durant le processus électrochimique.

La valeur de pH du tampon au cours des mesures électrochimiques a été optimisée car le pH joue justement un rôle important dans la réponse électrochimique du biocapteur. D'un côté, le pH a un effet considérable sur l'étape d'hybridation de l'ADN avec une activité optimum du processus pour des valeurs de pH entre 5,5 et 8. D'un autre côté, le pH influence également le potentiel électrochimique de **12**. En effet, la réduction de l'intercalant implique l'addition d'un électron ainsi que d'un proton, et d'après l'étude préliminaire, la pente de la

courbe représentant le potentiel de pic en fonction du pH vaut 60 mV par unité de pH. C'est pourquoi on ne peut pas s'affranchir de l'effet du pH comme l'illustre la figure suivante.

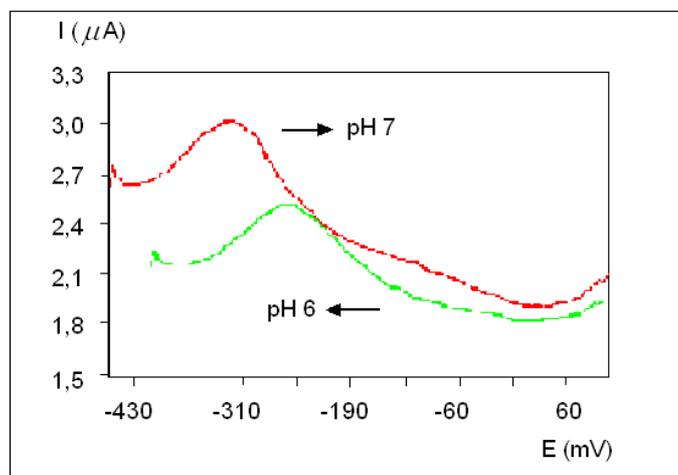


Figure 47 : Signal enregistré sur l'électrode modifiée par Ppy/ADNdb/**12** en fonction du pH.

A pH 7, le signal de l'électrode ADNdb exhibe en DPV un potentiel de pic d'environ – 310 mV. A ce potentiel relativement négatif, le système est facilement perturbé par la réduction du dioxygène. Quand l'électrode est étudiée à pH 6, un pic bien défini est observé à –250 mV. Aussi, dans le but de minimiser l'interférence avec le dioxygène, toutes les mesures ont été mises en œuvre dans le PBS tamponné à pH6.

Le courant de fond a été étudié dans un premier temps en plongeant l'électrode ADNsb dans une solution de 125 μM de **12**. Après immersion pendant des durées variables, l'électrode est rincée et transférée dans une solution de PBS à pH 6 et l'on enregistre la réponse électrochimique par DPV.

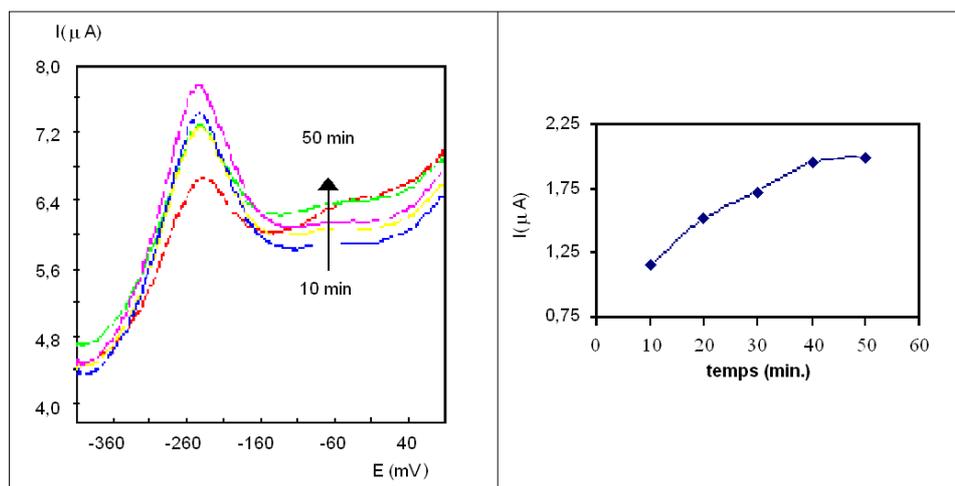


Figure 48 : Influence du temps d'interaction sur le courant de pic.

La figure 48 montre la variation du courant de pic en fonction du temps d'immersion dans la solution d'intercalant. Le courant de pic de l'électrode modifiée augmente rapidement quand le temps croît de 0 à 40 minutes puis on observe ensuite un plateau. Le courant observé est dû à l'adsorption de **12** sur la surface du film de Ppy-ODN, et la saturation du phénomène d'adsorption met 40 minutes. Pour obtenir un courant de fond stable et reproductible, toutes les nouvelles électrodes d'ADNsb sont plongées pendant 40 minutes dans la solution d'intercalant. Ce moyen permet d'assurer que l'augmentation du signal enregistré après l'étape d'hybridation n'est pas causé par l'adsorption de l'indicateur sur le substrat polypyrrole, mais bien par l'interaction spécifique entre l'intercalant et l'ADNdb.

Pour vérifier que l'ODN non complémentaire n'interagira pas avec le film copolymère et de fait n'influencera pas la réponse électrochimique, l'interaction non spécifique a été étudiée à l'aide d'un ODN 25 mer non complémentaire. L'électrode ADNsb/**12** est préalablement plongée dans une solution de 200 nM du 25 mer non complémentaire, puis transféré pendant 20 minutes dans une solution d'intercalant. Sur la figure 49, les signaux en DPV en présence (ligne verte) et en absence (ligne rouge) du 25 mer non complémentaire en interaction avec l'électrode Ppy/ADNsb/**12** sont présentés.

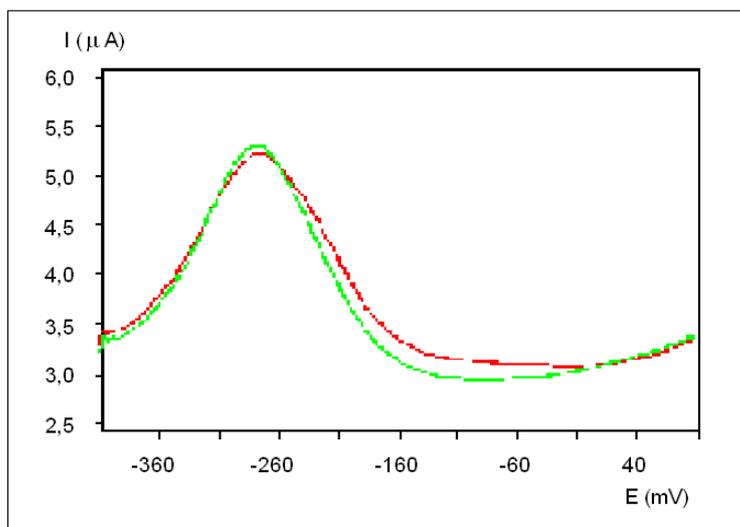


Figure 49 : Réponse avec et sans le contrôle positif (ODN non complémentaire).

En comparant avec le courant de fond (figure 49) cette DPV de l'interaction non spécifique, on note que les signaux sont pratiquement identiques avec toutefois une légère différence entre les deux valeurs du courant de pic (différence relative inférieure à 2%). Ceci montre que le signal non spécifique n'implique que l'interaction entre **12** et le copolymère sans intervention de la cible ODN au travers de son adsorption non spécifique éventuelle. Ce résultat permet d'envisager sur un multi-capteur, la détection différentielle de l'hybridation. De plus, pour la suite des expériences d'hybridation des ODN, aucune étape de « blocage » de la surface, parfois utile pour limiter l'adsorption non spécifique sur le film de Ppy n'est nécessaire contrairement à la détection classique par fluorescence.

La détection d'ADN séquence spécifique a alors été étudiée par hybridation avec les ODN cibles complémentaires. L'électrode ADNsb/**12** est immergée dans une solution de 10 mer complémentaire puis l'interaction avec l'intercalant électroactif peut être réalisée. Après enregistrement du comportement électrochimique dans du PBS pH6, l'électrode est alors dénaturée en présence de NaOH 0,1 M pour régénérer le substrat. La réponse des ODN complémentaires 20 mer et 40 mer est obtenue en répétant cette même procédure (mise à part le changement de longueur de la cible).

Nous pouvons noter que la reproductibilité du signal obtenu avec une même cible après la procédure de dénaturation a été vérifiée (p144-145). Par conséquent, les cycles d'hybridation/dénaturation n'influencent pas la réponse électrochimique de notre biocapteur.

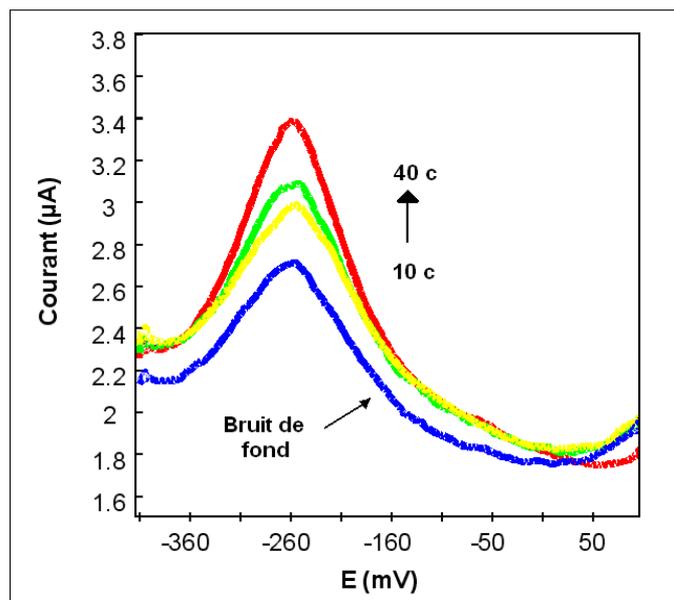


Figure 50 : Réponse électrochimique en fonction de la longueur du duplex formé.

La figure 50 montre les réponses en DPV du biocapteur avec les ODN complémentaires de longueur variable (10c en jaune, 20c en vert, 40c en rouge) et avec l'ODN non complémentaire en bleu.

L'électrode hybridée avec les cibles ODN complémentaires présente un pic de courant plus grand que celui du signal non spécifique. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'augmentation du courant avec l'électrode ADNdb hybridé n'est pas due à une adsorption plus grande de **12** sur le substrat polypyrrole mais bien à l'interaction spécifique entre l'intercalant et la double hélice d'ADN. Le composé **12** est un bon intercalant ($K_{\text{affinité}} = 2,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) et il interagit de manière forte avec l'ADNdb formé à la surface de l'électrode modifiée. D'après la figure 50, nous pouvons également voir que la réponse de l'électrode augmente linéairement avec la longueur de la cible ODN complémentaire (de 10 mer à 40 mer). Ceci s'explique par la différence de quantité d'intercalant en interaction avec l'ADNdb car plus la longueur de l'appariement est grande, plus le nombre de molécules **12** intercalées augmente. Ainsi, c'est avec l'ODN 40 mer complémentaire que la réponse et le pic de courant est le plus grand.

Notre méthode de mesure du courant présente plusieurs avantages par rapport aux autres modes de transduction de l'hybridation de l'ADN. D'abord, l'électrochimie avec un indicateur rédox en interaction spécifique avec l'ADN hybridé ne nécessite ni procédure complexe ni matériel coûteux, ce qui réduit largement le temps et le coût de la mesure. Ensuite, si l'on connaît la concentration en cible ODN complémentaire, on peut accéder à la

longueur de l'hybridation avec notre système basé sur l'interaction ADN/intercalant. Cela signifie que **12** peut éventuellement être employé comme sonde de dommages de l'ADN et de mésappariement.

La charge en ODN sur l'électrode, c'est à dire le rapport entre les unités py et py-ODN utilisé au cours de l'électropolymérisation a une influence sur la réponse de l'électrode, c'est pourquoi cet effet a été étudié en copolymérisant des films à différents ratios py-ODN/py.

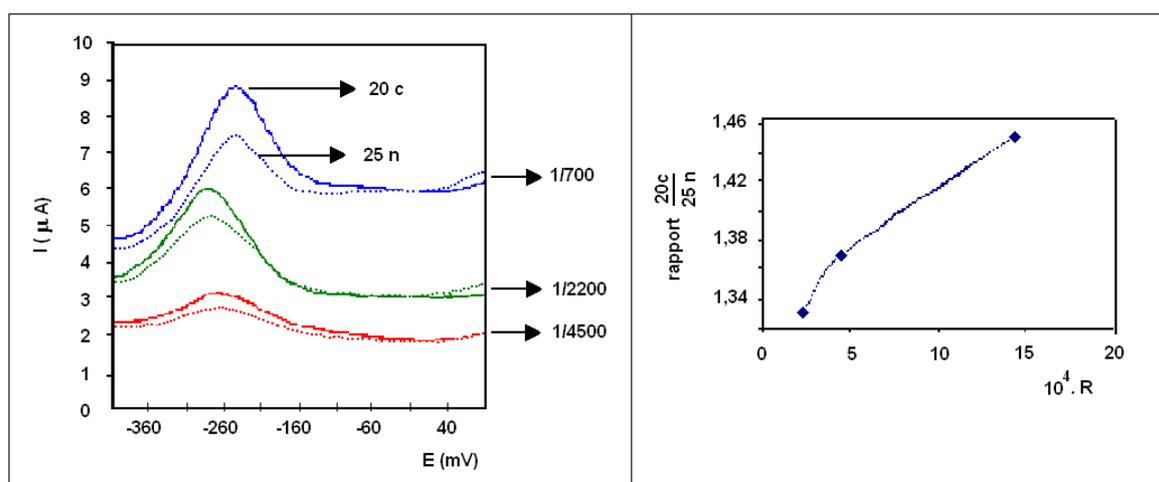


Figure 51 : Influence du ratio py-ODN/py sur la détection électrochimique. Les courbes en trait plein correspondent à l'interaction avec le 20 mer complémentaire et celles en pointillé au 25 mer non complémentaire.

La figure 51 montre le courant de fond ainsi que les réponses des différentes électrodes modifiées par l'ODN 20 mer complémentaire. Premièrement, on peut voir que le ratio py-ODN/py influence largement la réponse en DPV. En effet, avec un ratio de 1/4500, le différentiel entre les signaux spécifique et le non spécifique est relativement faible. Ceci s'explique par la présence de pyrrole en quantité dans le film copolymère qui induit une forte adsorption de **12** à sa surface, d'où un faible rapport 20c/25n (1,32) pour cette électrode. Quand le ratio vaut 1/2200, ce différentiel augmente significativement alors que l'on observe de manière concomitante une augmentation du courant de fond et de la réponse non spécifique. Afin d'obtenir un meilleur différentiel, nous avons fabriqué une nouvelle électrode avec un ratio py-ODN/py de 1/700. Comparée à l'électrode précédente (ratio 1/2200), celle-ci présente une réponse en courant élevée pour la cible (ODN 20 mer complémentaire), et la différence entre les signaux spécifique et non spécifique est plus importante (rapport 20c/25n

= 1,45). De nouveau, on observe une augmentation du courant de fond alors que le courant faradique associé au signal non spécifique n'a pas évolué. Pour la suite, le ratio 1/700 a été sélectionné comme la meilleure valeur pour la fabrication des électrodes nécessaires aux expériences suivantes.

La courbe de calibration du biocapteur à ODN a été tracée en travaillant avec des concentrations en ODN 20 mer complémentaire comprises dans la gamme 10 nM – 2 μ M (figure 52). La valeur choisi en abscisse correspond à la différence de courant entre la détection spécifique (20 mer complémentaire) et le signal enregistré pour le non spécifique (25 mer non complémentaire).

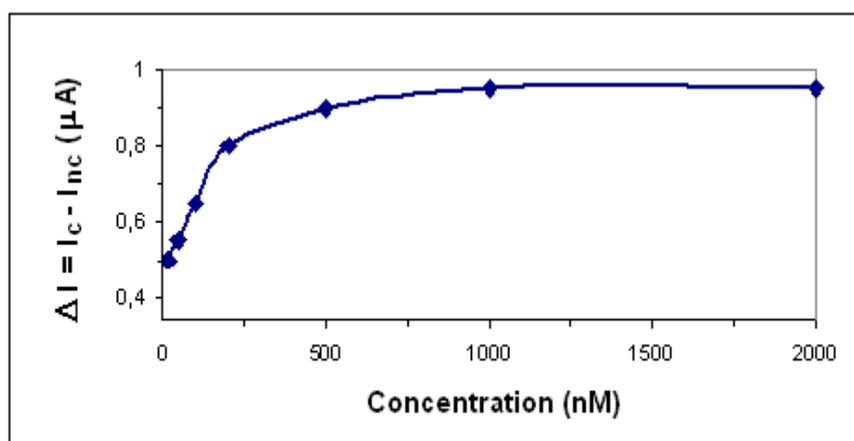


Figure 52 : Etude en fonction de la concentration en ODN cible.

Les pics de courant de l'électrode varient linéairement avec la concentration en ODN dans la gamme [10 – 250 nM] et la régression linéaire donne un coefficient de corrélation égal à 0,994. Ensuite, le courant atteint progressivement un palier (à partir de 1 μ M en ODN). Le point positif est la limite de détection du biocapteur puisque l'on arrive à observer l'hybridation de 10 nM d'ODN ($\Delta I = 500$ nA). Par contre, la courbe de calibration obtenue et notamment le faible domaine de linéarité de la réponse ne permettra pas de développer une mesure réellement quantitative (en terme de mesure de concentration en ODN).

Comme nous l'avons mentionné dans la paragraphe **4.2.5**, la procédure de dénaturation nécessite l'utilisation d'une solution de NaOH à 0,1 M laquelle peut avoir un effet sur l'électroactivité du Ppy. De fait, nous avons vérifié le caractère réutilisable du biocapteur en répétant plusieurs fois l'hybridation avec l'ODN 20 mer complémentaire puis la

dénaturation. Après plusieurs cycles appariement/dénaturation, le courant de la DPV enregistrée restait stable. La déviation standard relative calculée sur 7 mesures est égale à 5,8%. La nature réutilisable de notre biocapteur est donc clairement établie.

5. Du macrocapteur au microcapteur, vers la miniturisation.

Après avoir validé l'utilisation de la pyridoacridone **12** pour la transduction macroscopique de l'hybridation de l'ADN, nous avons changé d'échelle pour valider notre approche sur un microcapteur.

Le support que nous avons choisi est une micropuce de la société APIBIO (Biomérieux, France) qui consiste en un ensemble de huit plots en or de 200 μm de diamètre qui sont adressables individuellement. La topologie (symétrie circulaire) de la puce API T8 ainsi que le positionnement des plots de mesures par rapport à la contre électrode fait que les huit électrodes sont parfaitement équivalentes.



Figure 53 : La micropuce API T8 (8 plots de 200 μm de diamètre) de chez APIBIO.

Pour électropolymériser les plots de l'API T8, nous avons utilisé la méthode d'« electrospotting » développé au laboratoire^{27,54} qui est illustrée sur la figure 54. Il s'agit d'une technique initialement développée pour les prismes d'or utilisés en SPRi (Imagerie de Résonance des Plasmons de Surface), mais elle est parfaitement applicable sur n'importe quel matériau conducteur électrique. Un cône de pipette contenant un fil de platine en guise d'électrode auxiliaire est plongé dans une solution contenant le mélange de py et py-ODN qui doit être copolymérisé. Le cône est ensuite déplacé à un emplacement prédéfini de la surface conductrice qui joue le rôle d'électrode de travail. La goutte de mélange de py et de py-ODN

en contact avec la surface est copolymérisée en effectuant un pulse de 2,4 V pendant 0,5 s. Il est important de noter que nous travaillons ici à deux électrodes et que le paramètre qui est géré réside dans la différence de potentiel entre les deux électrodes. Dans ce contexte, il a été montré précédemment que le potentiel du plot à modifier se positionne spontanément à 0,6 V par rapport à Ag/AgCl, ce qui correspond au potentiel d'électropolymérisation⁵⁵.

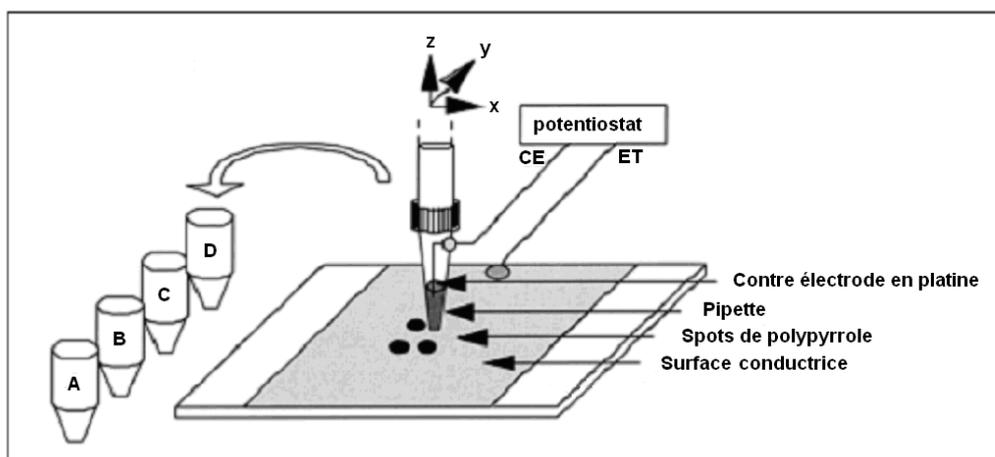


Figure 54 : Adressage des plots de Ppy-ODN par « electrospotting ».

Classiquement, sur une surface d'or plane, la taille des plots obtenus est de l'ordre de 500 μm de diamètre. Par contre, sur la puce API T8, la polymérisation est confinée spatialement sur les électrodes circulaires en or et l'on obtient en conséquence des plots de 200 μm de diamètre fonctionnalisés par un film de py-ODN.

L'intérêt du « spotting » réside dans la préparation de films très fins dont l'épaisseur est seulement de l'ordre de 8 nm. La diminution de l'épaisseur du film permet de limiter l'effet d'inhibition du transfert électronique à travers le polymère (résistivité).

De plus, réduire l'épaisseur du film revient à réduire le volume dans lequel l'intercalant pourra interagir avec le Ppy et par conséquent l'adsorption non spécifique devrait être minimisée.

Nous avons utilisé la même sonde ODN 40 mer que sur les macroélectrodes et la cible ODN 20 mer biotinylée en 5' et le même protocole expérimental (séquence d'hybridation, d'interaction avec l'intercalant en solution pendant 90 minutes et de détection). Sur les huit

⁵⁴ T. Livache, E. Maillart, N. Lassalle, P. Mailley, B. Corso, P. Guedon, A. Roget, G. Bidan, Y. Levy. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 32, 687-696.

⁵⁵ C. Brakha. *Mémoire, Diplôme d'ingénieur C.N.A.M.*, **2001**.

plots de la puce, la moitié sert de contrôle (dépôt d'un film de polypyrrole) et l'autre moitié a été fonctionnalisée par un film de Py-ODN. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 55 (transduction électrochimique) et 56 (fluorescence).

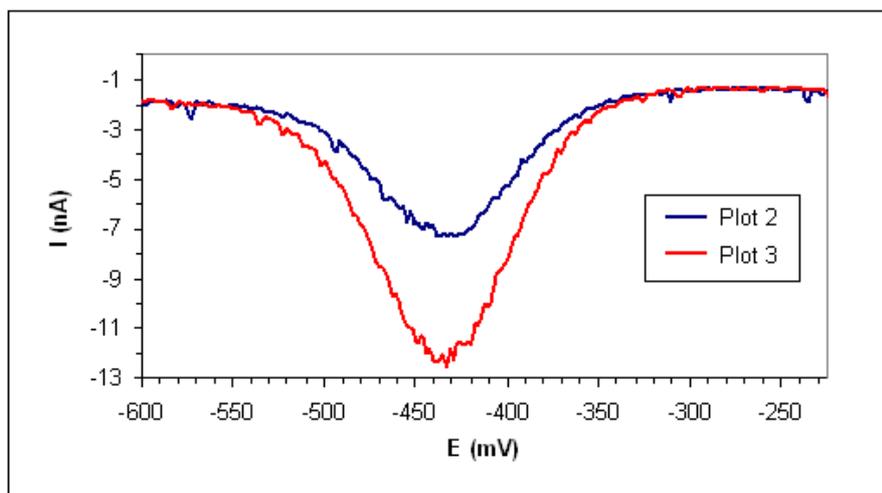


Figure 55 : Détection électrochimique de l'hybridation sur l'API T8.

La détection par DPV met en évidence un courant de pic relativement fort pour la détection spécifique de l'ODN complémentaire (plot 3, $i = 12,2$ nA) par contre comme précédemment sur la macroélectrode, on observe un signal non négligeable (plot 2, $i = 7,3$ nA) pour l'interaction non spécifique de **12** avec le Ppy, autrement dit, le rapport des intensités vaut seulement 1,7.

Par contre, on peut noter une exaltation du courant électrique enregistré sur la microélectrode par rapport à l'échelle macroscopique. En effet, en travaillant avec les mêmes concentrations surfaciques en sonde immobilisée, si l'on compare le rapport des surfaces d'électrodes $[(2,5 \text{ mm})^2 / (100 \text{ }\mu\text{m})^2 = 625]$ et le rapport des intensités de pics ($3,1 \text{ }\mu\text{A} / 12,2 \text{ nA} = 254$), on observe une intensité de pic 2,5 fois supérieure à l'échelle microscopique.

Sur le figure 56, on voit très clairement la différence entre les plots fonctionnalisés par les ODN sondes (en brillant) et les plots qui servent de contrôle négatif (en noir). Il faut noter que les plots non spécifiques correspondent simplement à des films de polypyrrole, et nous avons vu dans la paragraphe 3.2., que le signal correspondant était plus fort que celui d'une électrode Ppy-ODN (véritable non spécifique d'un biocapteur).

On peut également remarquer une légère inhomogénéité dans la fluorescence des 4 électrodes fonctionnalisées par le py-ODN.

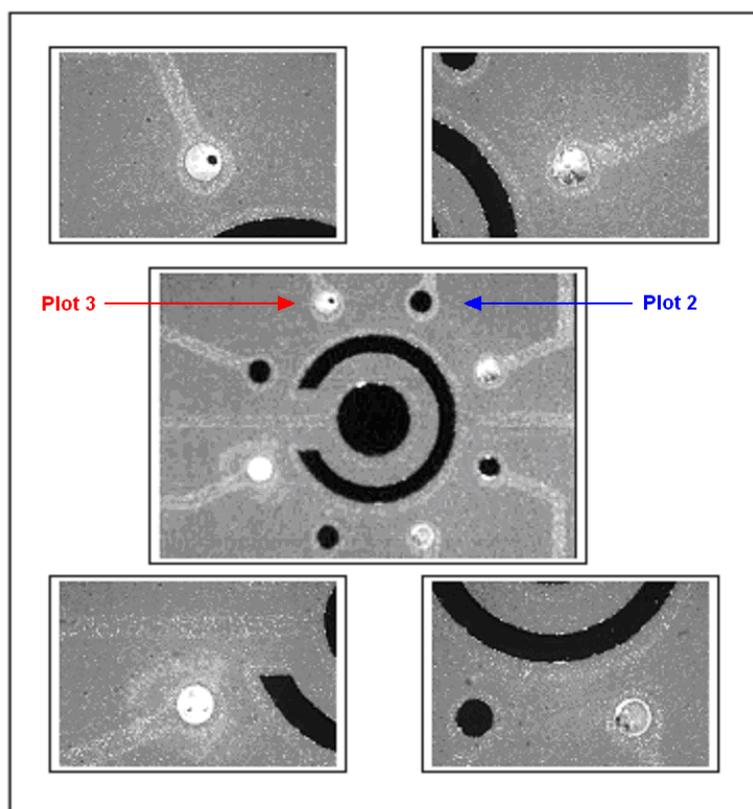


Figure 56 : Détection par fluorescence de l'hybridation sur l'API T8.

6. Conclusion.

Pour résumer, un nouvel intercalant pyridoacridine a été utilisé pour la première fois pour la fabrication de biocapteur à ODN. Nous avons démontré que la copolymérisation est un moyen simple et efficace pour immobiliser des ODN à la surface d'une électrode de carbone vitreux. La sonde ODN fixée maintient sa spécificité ce qui permet d'envisager une détection sélective de l'hybridation. Le composé **12** présente un bon comportement électrochimique et une interaction forte avec l'ADNdb par intercalation. L'intercalation de cet indicateur électroactif entre les paires de bases nucléiques permet la transduction de l'hybridation de l'ADN et nous avons fabriqué un biocapteur exploitant ce phénomène. Un ODN non complémentaire ne peut pas s'apparier avec la sonde immobilisée sur l'électrode et le signal DPV de l'interaction non spécifique est superposable au signal du courant de fond. Cela prouve que l'interaction non spécifique est relativement faible et que l'adsorption de l'ODN 25 mer non complémentaire sur l'électrode ADNsb/**12** est négligeable. L'interaction séquence spécifique exhibe un pic de courant plus grand que celui de l'interaction non spécifique, et la réponse de l'électrode augmente linéairement avec la longueur de la cible

ODN complémentaire (10 mer à 40 mer). Le biocapteur est donc sélectif et il est capable de mesurer la longueur d'une cible ODN complémentaire de concentration connue. Pour finir, le biocapteur à ODN présente un vaste domaine de comportement linéaire et une bonne reproductibilité, aussi il peut être utilisé pour des mesures répétées d'hybridation.

Les premiers essais réalisés sur microélectrodes API T8 se révèlent encourageants et la transposition de l'échelle macroscopique à l'échelle microscopique ne semble pas poser de problèmes pour notre méthode de transduction de l'hybridation de l'ADN.

Finalement, nous avons réalisé la plus grande partie de l'application biocapteur avec la pyridoacridone **12**, cependant nous avons vu lors de la caractérisation des autres intercalants de la famille que plusieurs produits présentaient la même électroactivité à des potentiels équivalents. Pour l'avenir, le produit **14**, qui possède une chaîne polyamine plus longue que celle de **12** et se révèle être le meilleur intercalant de l'ADN de la série ($K_{\text{affinité}} = 3,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$), nous paraît intéressant et à travers son utilisation, nous devrions aboutir à une minimisation notable du signal non spécifique (interaction avec ODN non complémentaire).

III. Complexes de ruthénium.

1. Introduction.

1.1. Généralités.

Le ruthénium, du latin *Ruthenia* (Russia) a été découvert en 1844 par Karl Klaus par un procédé d'extraction de minéraux (pyroxinite et pentlandite). Dans la classification périodique, il appartient à la famille des métaux de transition (groupe 8, période 5) et sa masse moléculaire vaut 101,1 g/mol. Son numéro atomique est $Z = 44$ et la configuration atomique correspondante est donc la suivante : $[\text{Kr}] 4d^7 5s^1$.

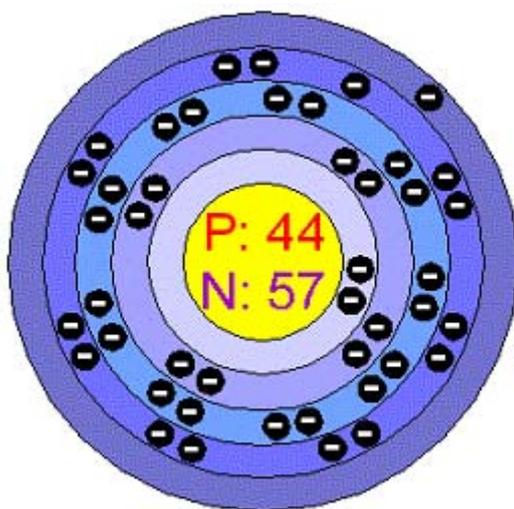


Figure 57 : Représentation schématique de la structure électronique de l'atome de ruthénium.

On peut trouver le ruthénium sous divers degrés d'oxydation (2, 3, 4, 6 et 8) et nous allons en particulier nous intéresser au cation ruthénium II dont la structure électronique est : $[\text{Kr}] 4d^6$.

Les ions ruthénium (II) peuvent être chélatés à six atomes possédant au moins un doublet libre dans leur couche de valence, et cette interaction conduit à la formation d'un complexe de coordination six dont la géométrie est octaédrique. Le recouvrement des six orbitales vides d_{2sp^3} du cation Ru^{2+} avec les six orbitales sp_2 contenant les doublets électroniques non liants des hétéroatomes des ligands engendre les liaisons de coordination. De plus, cette liaison est stabilisée par une composante dite de rétrocoordination qui implique la délocalisation partielle des électrons du métal dans les orbitales π^* des ligands.

Les orbitales moléculaires formées lors de la complexation peuvent être décrites par une combinaison linéaire des orbitales atomiques du métal et des orbitales moléculaires des ligands. L'état fondamental de la configuration électronique résultante est $(d\pi)^6$.

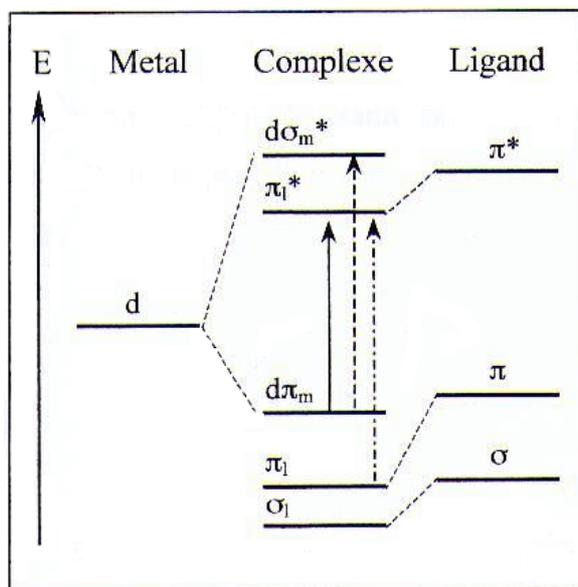


Figure 58 : Diagramme des niveaux d'énergie des OM d'un complexe de type $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.

1.2. L'ADN et les complexes du Ruthénium (II).

Au cours des dernières années, plusieurs groupes de recherche ont étudié l'interaction entre l'ADN et les complexes de ruthénium (II) présentant des ligands polypyridiniques⁵⁶⁻⁶¹. Généralement, trois modes d'association entre l'ADN et les complexes sont distingués⁶² : L'association externe, l'intercalation et l'adsorption dans un sillon.

L'association externe d'un complexe avec l'environnement ionique de l'ADN est une interaction de type électrostatique entre le cation Ru^{2+} doublement chargé positivement et la chaîne polyphosphate de l'ADN globalement chargée négativement. Ce mode d'association a été proposé pour $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ car l'exaltation de fluorescence de ce complexe lorsqu'il est en interaction avec l'ADN est fortement dépendante de la force ionique⁶³.

⁵⁶ P. Lincoln, A. Broo, B. Nordén. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2644-2653.

⁵⁷ R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton. *Inorg. Chem.*, **1998**, 37 (1), 29-34.

⁵⁸ A. Brodkorb, A. Kirsch-De Mesmaeker, T. J. Rutherford, F. R. Keene. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 2151-2160.

⁵⁹ C. Metcalfe, H. Adams, I. Haq, J. A. Thomas. *Chem. Comm.*, **2003**, 1152-1153.

⁶⁰ K. A. O'Donoghue, J. M. Kelly, P. E. Kruger. *Dalton Trans.* **2004**, 13-15.

⁶¹ I. Ortmans, B. Elias, J. M. Kelly, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker. *Dalton Trans.* **2004**, 668-676.

⁶² N. J. Turro, J. K. Barton, D. A. Tomalia. *Acc. Chem. Res.*, **1991**, 24, 332-340.

⁶³ J. M. Kelly, A. B. Tossi, D.J. McConnell, C. Oh Uigin. *Nucl. Acids Res.*, **1985**, 13, 6017-6034.

L'intercalation d'un ligand plan aromatique du complexe entre les paires de bases de l'ADN implique le recouvrement d'électrons π , c'est à dire des interactions de stacking. Ce mode d'interaction est généralement favorisé par les ligands étendus comme PHEHAT⁶⁴, dppz⁶⁵ ou peut être seulement partielle comme dans le cas de $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$.⁶⁶

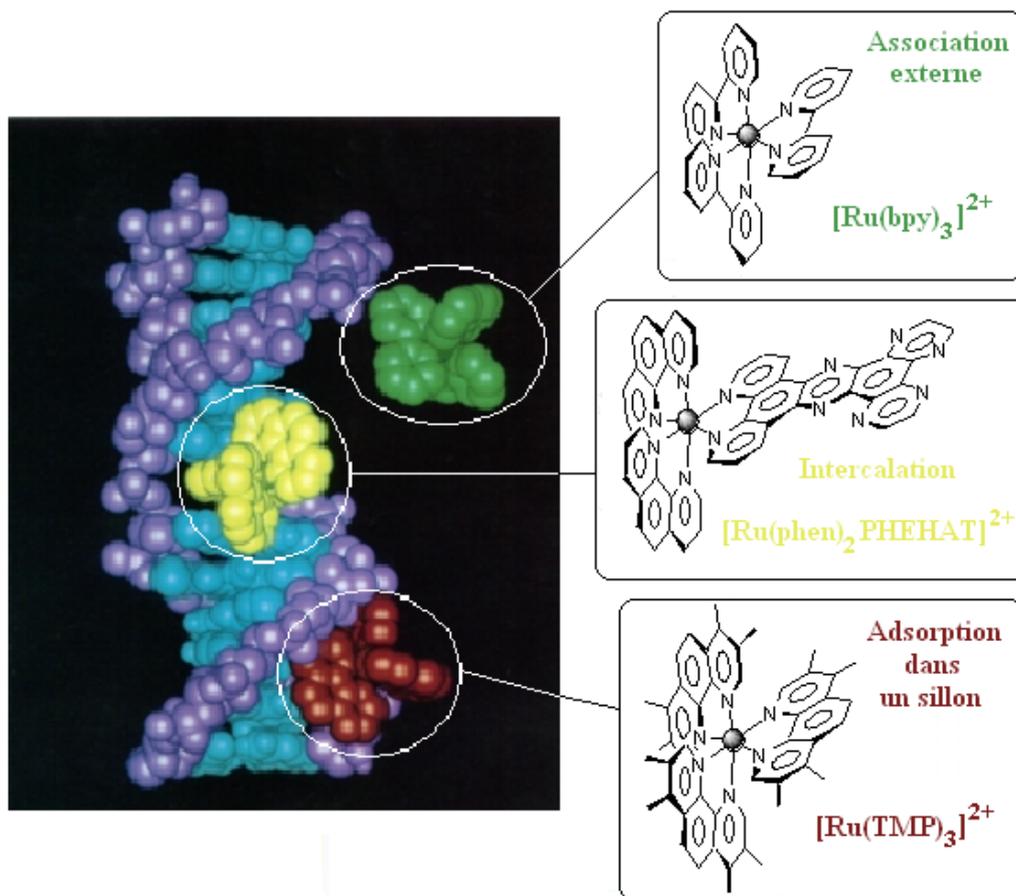


Figure 59 : Les trois modes d'interaction entre les complexes de ruthénium et l'ADN (figure reproduite d'après la référence 62.)

L'adsorption dans les sillons de l'ADN repose sur des interactions faibles de type contact de Van der Waals ou interactions hydrophobes, mais peut également impliquer des liaisons hydrogènes. Les facteurs géométriques et stériques jouent également un rôle comme dans le cas de $[\text{Ru}(\text{TMP})_3]^{2+}$,⁶⁷ où les groupements méthyles du ligand empêche l'intercalation et privilégie l'interaction dans les sillons.

⁶⁴ C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker. *J. Phys. Org. Chem.* **1998**, 11, 577-583.

⁶⁵ I. Haq, P. Lincoln, D. Suh, B. Norden, B. Z. Chowdhry, J. B. Chaires. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 4788-4796.

⁶⁶ P. Lincoln, B. Nordén. *J. Phys. Chem. B*, **1998**, 102, 9583-9594.

⁶⁷ H. Y. Mei, J. K. Barton. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 7414-7416.

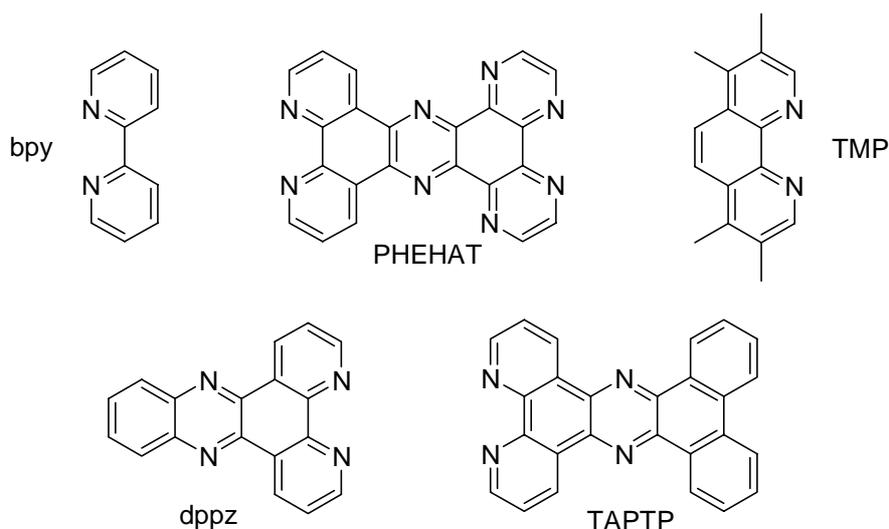


Figure 60 : Structures des ligands mentionnés ci dessus et dans la partie 2.

1.3. Objectif.

Au laboratoire, nous nous sommes intéressés aux ligands ployazaaromatiques étendus⁶⁸ principalement pour deux raisons. D'une part, comme nous l'avons précisé précédemment, la structure plane de ces ligands favorise l'intercalation partielle ou complète des complexes entre les paires de bases de l'ADN et améliore ainsi l'affinité pour la double hélice. Et, d'autre part, dans le cas de certains ligands comme le dppz, les complexes correspondants peuvent jouer un rôle d'interrupteurs moléculaires (« light switch ») car ils émettent de la fluorescence quand ils sont en interaction avec l'ADN alors qu'ils ne présentent pas d'émission radiative dans l'eau en son absence⁶⁹⁻⁷³. Ce phénomène à la fois particulier et intéressant souligne l'influence de la nature des ligands sur le comportement photophysique des complexes.

Nous avons donc utilisé la synthèse des heptacycles mise au point au laboratoire pour concevoir de nouveaux complexes et les caractériser par des techniques de choix comme la spectroscopie d'absorption ou d'émission et l'électrochimie.

⁶⁸ M. Demeunynck, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 261-264.

⁶⁹ E. J. C. Olson, D. Hu, A. Hörmann, A. M. Jonkman, M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, P. F. Barbara. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 11458-11467.

⁷⁰ M. K. Brennaman, J. H. Alstrum-Acevedo, C. N. Fleming, P. Jang, T. J. Meyer, J. M. Papanikolas. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 15094-15098.

⁷¹ G. Pourtois, D. Beljonne, C. Moucheron, S. Schumm, A. Kirsch-De Mesmaeker, R. Lazzaroni, J. L. Bredas. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 683-692.

⁷² E. R. Batista, R. L. Martin. *J. Phys. Chem. A*, **2005**, 109, 3128-3133.

⁷³ M. K. Brennaman, T. J. Meyer, J. M. Papanikolas. *J. Phys. Chem. A*, **2004**, 108, 9938-9944.

2. Résultats et discussion.

2.1. Synthèse et caractérisation.

Deux voies de synthèse se présentaient pour la préparation des complexes, soit à partir des ligands heptacycliques par complexation avec $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2$, soit en deux étapes par pré-complexation de la phendione puis formation du ligand heptacyclique directement sur le complexe métallique par condensation d'une diaminoacridine sur $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{phendione}]^{2+}$. Pour des raisons de faible solubilité des heptacycles et des problèmes éventuels de purification, nous avons choisi la seconde voie.

Le produit de départ est donc le complexe $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2$ **68** (Figure 61). Le ligand phendione **52** est chélaté au cation ruthénium(II) en plaçant pendant 4 heures à reflux un mélange composé de $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2$ **68** et d'1,2 équivalents de phendione **52**. Le produit est isolé par précipitation en ajoutant un sel d'hexafluorophosphate ⁷⁴.

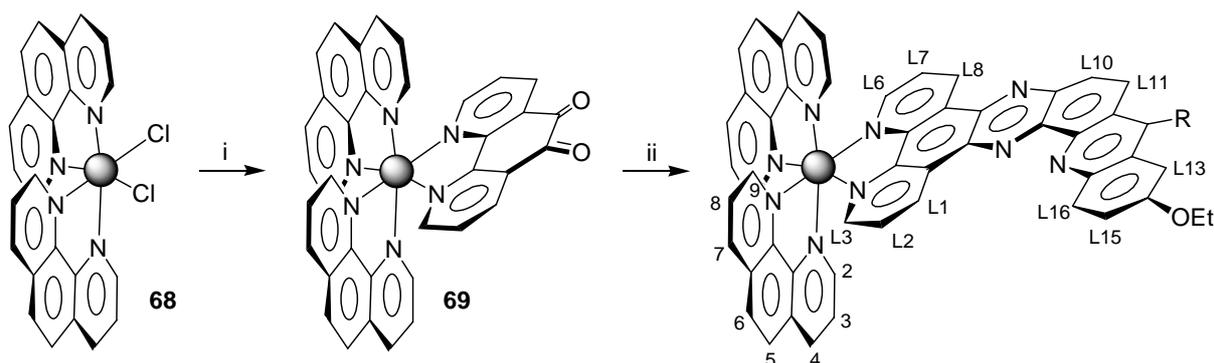


Figure 61 : Stratégie générale de synthèse de $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-R}^{2+}$ (**71** $\text{R} = \text{OH}$ ou **72** NH_2). i = phendione, H_2O , 100°C , 4 h. ii = *ortho*-diaminoacridine **50** ($\text{R} = \text{OH}$) ou **70** (NH_2) ⁷⁵, $\text{CH}_3\text{CN-EtOH}$, 85°C , 4-5 h.

La seconde étape est la condensation de l'*ortho*-diamino-acridine (**50** pour $\text{R} = \text{OH}$ et **70** pour $\text{R} = \text{NH}_2$) avec $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{phendione}^{2+}$. Les deux composés sont mis au reflux dans un mélange acétonitrile/éthanol (2/1) pendant 4 à 5 heures et la réaction est suivie par spectroscopie d'absorption électronique. On peut observer l'apparition de nouvelles bandes d'absorption à 300 et 350 nm pour $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-OH}^{2+}$ (**71**) et 325 nm pour $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-NH}_2^{2+}$ (**72**). Ces bandes correspondent aux valeurs énergétiques typiques des transitions

⁷⁴ R. H. Hartshorn, J. K. Barton. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5919-5925.

⁷⁵ R. Dinica, F. Charmantray, M. Demeunynck, P. Dumy. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 7883-7885.

électroniques centrées sur un ligand (LC). Pour les deux produits de condensation, le rendement brut est pratiquement le même (69-70%), et les produits bruts sont ensuite purifiés par cristallisations successives par diffusion lente d'éther diéthylique dans une solution initiale d'acétonitrile.

Les complexes ont été caractérisés par spectroscopie de RMN et par spectrométrie de masse ESMS. La Figure 62 montre la région aromatique entre 10,5 et 5,8 ppm dans le spectre de RMN ^1H du complexe **71** enregistré à 300 MHz. L'attribution des déplacements chimiques correspondant aux trois ligands bidentates dans les complexes $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp}^{2+}$, 2PF_6^- a été réalisée à partir d'expériences ^1H - ^1H COSY et NOESY. La structure est complètement asymétrique en raison de la géométrie angulaire du ligand heptacycle et par conséquent, les 27 protons aromatiques sont non équivalents.

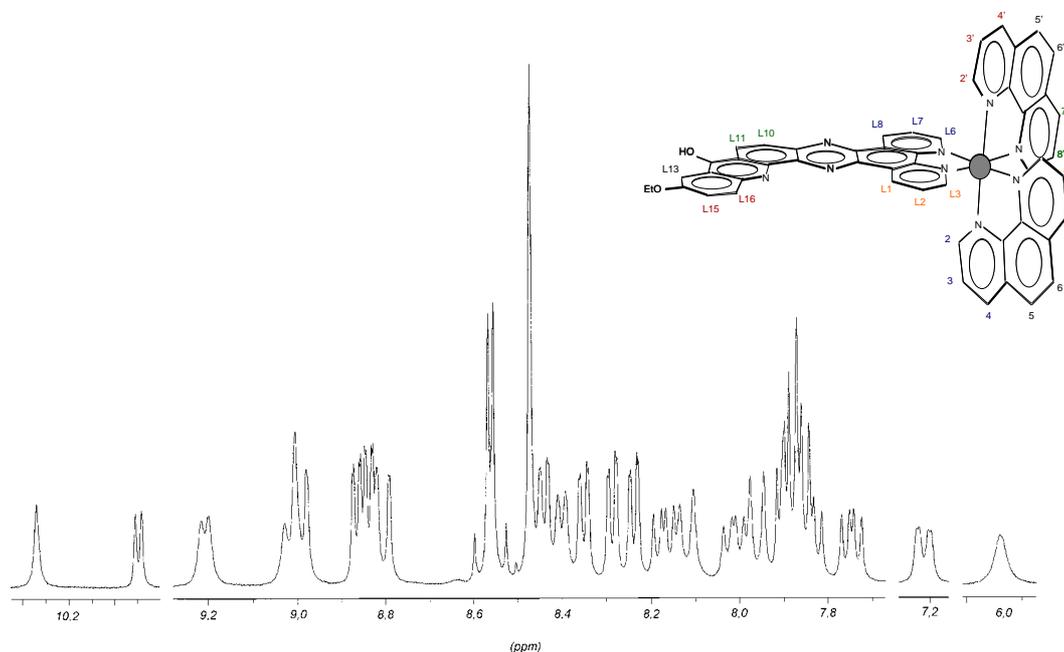


Figure 62 : Région aromatique du spectre de RMN ^1H (300 MHz, CD_3CN) de $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp}\text{-OH}^{2+}$, 2PF_6^- .

Les systèmes de spins classiques des deux unités phénantroline non équivalentes (AMX, AB, A'M'X') ont été attribués sur la base du spectre de corrélation COSY ^1H - ^1H en combinaison avec les valeurs des constantes de couplage. L'identification des protons le long de la structure des deux ligands phen ainsi que leur connectivité ($\text{H}_4 \Leftrightarrow \text{H}_5\text{-6} \Leftrightarrow \text{H}_7$) ont été établies grâce à un spectre NOESY.

Nous avons également comparé cette attribution à d'autres valeurs de déplacement chimique recueillies dans la littérature⁷⁶.

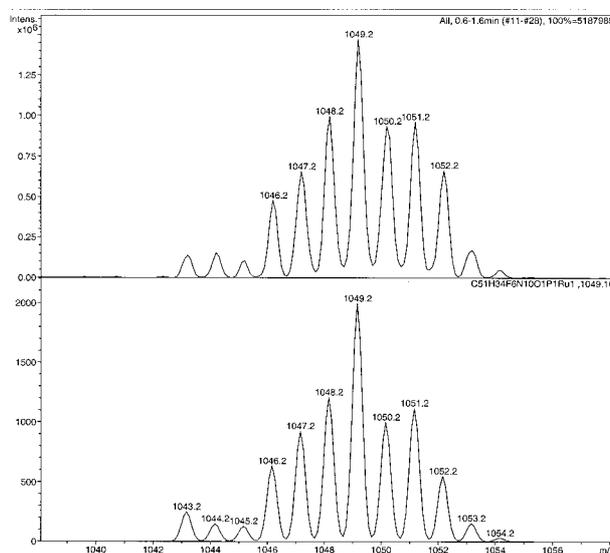


Figure 63 : Massif isotopique expérimental (haut) et simulé (bas) de $\text{Ru(phen)}_2\text{hp-OH}^{2+} + \text{PF}_6^-$ obtenu en électrospray ($\text{cc}=10^{-5}$ mol/L).

Les deux complexes ont aussi été caractérisés en spectrométrie de masse ESMS (mode d'ionisation électrospray). L'attribution des différents pics observés sur les spectres est donnée dans la partie expérimentale. Dans le spectre, nous observons respectivement les signaux correspondants à M^{2+} (pic de base), $[\text{M-H}]^+$ et $[\text{M}+\text{PF}_6]^+$. De plus, nous avons comparé la multiplicité théorique et expérimentale des signaux qui correspond à l'abondance des différents isotopes du ruthénium (Figure 63).

2.2. Electrochimie.

Les propriétés électrochimiques des deux complexes ont été étudiées dans l'acétonitrile (Tableau 9).

⁷⁶ C. Bresson, M. Luhmer, M. Demeunynck, A. Kirsch-De Mesmaeker, F. Pierard. *Tet. Lett.* **2004**, 45, 2863-2866.

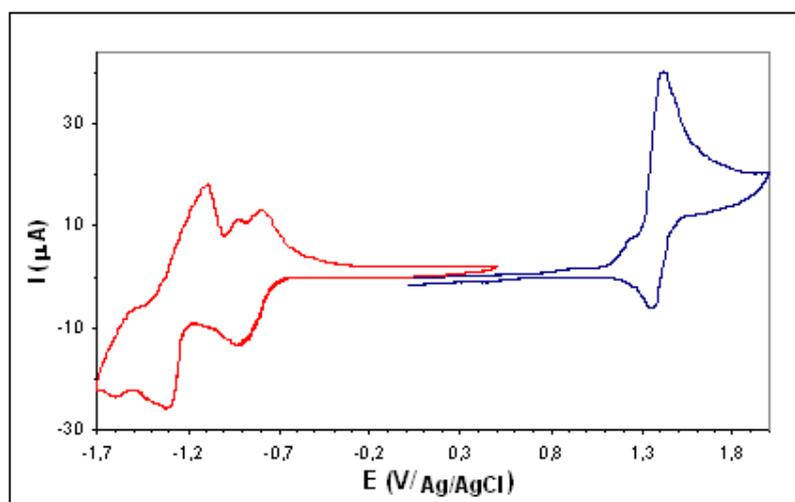


Figure 64 : Voltamétrie cyclique de $\text{Ru(phen)}_2\text{hp-OH}^{2+}$ **71** dans CH_3CN (balayage 100 mV/s).

Tableau 9 : Caractérisation électrochimique ^a.

Complexes	E_{ox} (V)	E_{red1} (V)	E_{red2} (V)	E_{red3} (V)	E_{red4} (V)
^b Ru(phen)_3^{2+}	+ 1,64	- 1,17			
^{c,d} $\text{Ru(phen)}_2\text{dppz}^{2+}$	+ 1,54	- 0,76			
^{d,e} $\text{Ru(phen)}_2\text{TATP}^{2+}$	+ 1,54	- 0,64	- 0,94	- 1,19	- 1,39
$\text{Ru(phen)}_2\text{hp-OH}^{2+}$ 71	+ 1,61	- 0,65	- 0,98	- 1,09	- 1,33
$\text{Ru(phen)}_2\text{hp-NH}_2^{2+}$ 72	+ 1,61	- 0,72		- 1,12	- 1,37

^a Sauf mention particulière, les potentiels en oxydation et réduction sont donnés par rapport à ESH dans CH_3CN ; l'électrolyte support est Bu_4NPF_6 à 0,1 M et la vitesse de balayage 100 mV/s. ^b D'après la référence ⁷⁷. ^c D'après la référence ⁷⁸. ^d Déterminé avec Bu_4NClO_4 0,1 M dans CH_3CN . ^e D'après la référence ⁷⁹.

Le voltampérogramme de chaque complexe présente une oxydation monoélectronique réversible et plusieurs ondes quasi-réversibles en réduction, dans la fenêtre comprise entre – 1,5 et + 1,8 V. Les potentiels en oxydation sont attribués à un processus centré sur l'ion métallique ruthénium (couple $\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+}$) et les valeurs sont très proches de celles d'autres complexes comme Ru(phen)_3^{2+} , ⁷⁷, $\text{Ru(phen)}_2\text{dppz}^{2+}$, ⁷⁸ ou $\text{Ru(phen)}_2\text{TATP}^{2+}$, ⁷⁹).

⁷⁷ N. E. Tokel-Takvoryan, R. E. Hemingway, A. J. Bard. *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 6582-6589.

⁷⁸ C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, S. Choua. *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 584-592.

⁷⁹ Q.-X. Zhen, B.-H. Ye, J.-G. Liu, Q.-L. Zhang, L.-N. Ji, L. Wang. *Inorg. Chim. Acta* **2000**, 303, 141-147.

Le premier et probablement le deuxième potentiels en réduction sont attribués à la réduction centrée sur l'heptacycle dont la valeur du potentiel est moins négative que celle de $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ mais très proche de celle des complexes possédants les ligands dppz ou TAPTP. Le caractère plus conjugué de l'heptacycle par rapport à la phénantroline, ou encore le caractère π accepteur plus important du ligand est en bon accord avec les potentiels observés (valeurs de - 0,65 et - 0,72 V comparé avec - 1,17 V pour $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$). Les autres vagues observées en réduction pourraient être attribuées aux réductions successives des ligands phen.

2.3. Propriétés en absorption et émission radiatives.

Tableau 10 : Caractérisation en absorption^a.

Complexes	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	
	CH_3CN	H_2O
$\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-OH}^{2+}$ (71)	221 (8,81), 263 (12,1), 274 large, 303 (6,90), 338 large, 353 (3,74), 416 (2,69), 442 large	221, 263, 302, 350 large, 421, 439 large
$\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-NH}_2^{2+}$ (72)	223 (6,21), 262 (8,66), 288 large, 324 (3,60), 339 large, 425 large, 448 (2,09)	223, 262, 297 large, 326, 341, 416, 435 large
$\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$	^b 262 (12,5), 446 (1,99)	^c 421, 447 (1,90)

^a Les mesures ont été réalisées à partir de solutions à $5.10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$ en complexes. ^b D'après la référence ⁸⁰. ^c D'après la référence ⁸¹.

Les résultats obtenus en spectroscopie d'absorption électronique pour les complexes **71-72** et pour $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ en guise de référence sont rassemblés dans le tableau 10. Les solutions dans l'acétonitrile ont été préparées à partir des sels d'hexafluorophosphate tandis que pour solubiliser les complexes dans l'eau, les contre anions ont été échangés par passage sur une résine échangeuse d'ions (Sephadex A25) afin d'obtenir les complexes sous forme de chlorures.

⁸⁰ R. J. Staniewicz, R. F. Sympson, D. G. Hendricker. *Inorg. Chem.*, **1977**, 16, 2166-2171.

⁸¹ C. T. Lin, W. Boettcher, M. Chou, C. Creutz, N. Sutin. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 6536-6544.

L'absorption la plus bathochrome dans le visible des complexes **71** et **72** (442-448 nm dans CH₃CN) correspond à des longueurs d'ondes similaires à celles de Ru(phen)₃²⁺ (446 nm dans le même solvant). Ainsi, la chélation de l'heptacycle n'induit pas un décalage vers le rouge de la bande dans le visible comme on aurait pu s'y attendre pour une transition MLCT dont l'orbitale π* est stabilisée par la conjugaison électronique. On peut remarquer qu'il en va de même pour le complexe de [Ru(phen)₂dppz]²⁺ qui présente aussi une absorption similaire (440 nm dans CH₃CN)⁸². Cela suggère que comme avec le ligand dppz, l'électron excité dans les complexes **71** et **72** est localisé, immédiatement après l'excitation, sur la partie phen des ligands hp-OH ou hp-NH₂, et n'est pas délocalisé sur l'ensemble du ligand.

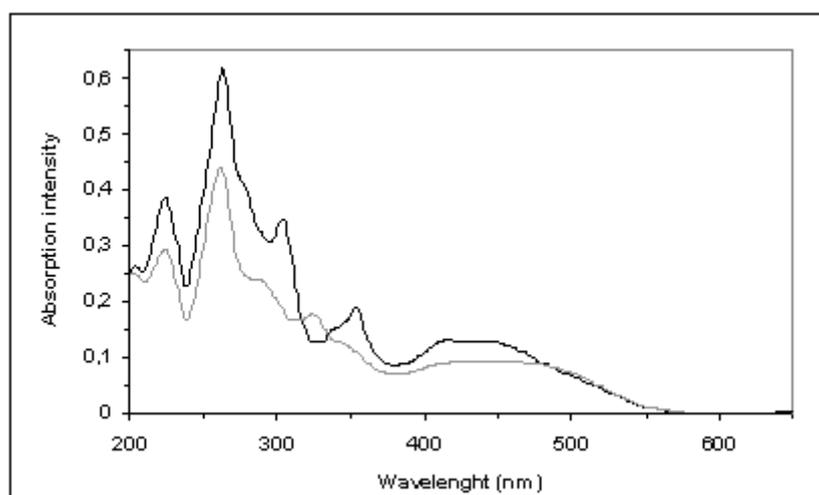


Figure 65 : Spectres d'absorption de Ru(phen)₂hp-OH²⁺ **71** (en foncé) et Ru(phen)₂hp-NH₂²⁺ **72** (en clair) enregistrés dans CH₃CN. $c_{71} = c_{72} = 5.10^{-6}$ M.

Les bandes d'absorption dans le visible (Tableau 10, Figure 65) sont attribuées aux transitions MLCT Ru → phen ou Ru → hp, alors que les bandes d'absorption dans la région UV correspondent aux transitions LC. En particulier, la bande caractéristique autour de 300-340 nm correspond aux transitions centrées sur le ligand heptacycle car elle n'est pas présente dans le spectre d'absorption de Ru(phen)₂phendione²⁺, lequel absorbe seulement jusqu'à 295 nm. On peut remarquer que le coefficient d'extinction molaire dans la transition MLCT de **72** (20900 M⁻¹.cm⁻¹) est légèrement inférieur à celui de **71** (26900 M⁻¹.cm⁻¹).

⁸² C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, J. M. Kelly. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* **1997**, 40, 91-106.

Tableau 11 : Caractérisation en émission^a

Complexes	$\lambda_{\max}/\text{nm}^b$ (τ/ns) à 298 K	$\lambda_{\max}/\text{nm}^b$ ($\tau/\mu\text{s}$) à 77 K
CH ₃ CN		
Ru(phen) ₂ hp-OH ²⁺ 71	676 (1,5 et 8,0)	
Ru(phen) ₂ hp-NH ₂ ²⁺ 72	561 (5,3 et 18,7)	
H ₂ O		
Ru(phen) ₂ hp-OH ²⁺ 71	678	
Ru(phen) ₂ hp-NH ₂ ²⁺ 72	563	
EtOH/MeOH (4/1)		
Ru(phen) ₂ hp-OH ²⁺ 71	662	621 (5,1)
Ru(phen) ₂ hp-NH ₂ ²⁺ 72	564	603 (2,2)

^a Les décroissances de la luminescence correspondent à des ajustements mono- ou bi-exponentiels. Les incertitudes expérimentales sur les durées de luminescence sont de $\pm 5\%$ à 298 K (SPC) et $\pm 10\%$ à 77 K (Excitation laser pulsée). ^b Les valeurs des λ_{\max} en émission ont été corrigées.

Les données des complexes **71-72** en spectroscopie d'émission sont rassemblées dans le Tableau 11. Les spectres à température ambiante ont été enregistrés dans plusieurs solvants (acétonitrile, eau et mélange éthanol (80%)-méthanol (20%)).

La valeur du maximum d'émission de Ru(phen)₂hp-OH²⁺ qui vaut 676 nm dans CH₃CN correspond à une gamme de longueurs d'onde qui est typique des complexes de Ru(II)⁸². Si l'on compare le maximum d'émission entre 298 K et 77 K dans le mélange EtOH/MeOH, on observe un déplacement hypsochromique ($\Delta\lambda_{\max} = 41$ nm) qui est souvent observé dans le cas d'une transition de type ³MLCT (état excité très polaire). Toutefois, on peut noter que l'intensité de l'émission est extrêmement faible en comparaison de celle d'autres complexes du ruthénium. Dans le cas du complexe **72**, la valeur du maximum d'émission est très différente de celle correspondant au complexe **71** (561 nm dans CH₃CN) et cette différence sera commentée un peu plus loin.

La mesure de la durée de vie de luminescence n'apportent pas d'informations sur le type de transition responsable de l'émission (³MLCT, ¹LC, ³LC).

Nous avons réalisé ces mesures à température ambiante par Single Photon Counting (SPC).

Cette méthode permet d'enregistrer la décroissance de luminescence d'un échantillon qu'il faut ensuite analyser en ajustant les points expérimentaux par un modèle mathématique (fonction multi-exponentielle). L'appréciation de la qualité de l'analyse est mesurée par un paramètre statistique χ dont la valeur doit être aussi proche que possible de l'unité.

Ru(phen) ₂ hpOH ²⁺ 71	Ru(phen) ₂ hpNH ₂ ²⁺ 72	
1,5 et 8,0	5,3 et 18,7	τ (ns)
1,138	1,098	χ^2

Tableau 12 : Durées de vie de luminescence (ns) mesurées dans l'acétonitrile à 283K.

L'ajustement des points expérimentaux a été réalisé avec le logiciel kaleidagraph. Les coefficients χ correspondants sont inférieurs à 1,2 et sont donc acceptables. A T = 283 K, les valeurs des durées de vie de luminescence des complexes sont très courtes, et cet ordre de grandeur n'est pas en bonne adéquation avec une transition classique de type ³MLCT pour laquelle on attend des τ de l'ordre de plusieurs centaines de ns. Ce type de durée d'émission a quelquefois été observé avec d'autres ligands de structures différentes mais reste relativement rare^{83, 84}.

Il faut également préciser que pour des durées de vie si courtes, nous sommes en limite d'utilisation de l'appareillage car le signal enregistré est presque superposable à celui de la lampe pour laquelle la largeur de l'impulsion à mi hauteur vaut 8 ns.

Nous avons déterminé les durées de vie de luminescence à 77 K avec un laser à excitation pulsée. Comme en SPC, le signal obtenu est une décroissance de l'émission dont on ajuste les points expérimentaux par une courbe mono-exponentielle.

L'avantage du laser par rapport au SPC est une mesure beaucoup plus rapide (une seconde contre quelques dizaines de minutes) mais en contrepartie, l'incertitude sur les résultats est beaucoup plus grande (de 5 à 10% d'incertitude pour une durée de vie au laser). Cette fois ci, la qualité de l'ajustement est estimée par un facteur de corrélation R qui doit être le plus proche possible de l'unité.

⁸³ M. Maestri, N. Armaroli, V. Balzani, E. C. Constable, A. M. W. Cargill Thompson. *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 2759-2767.

⁸⁴ M. Duati, S. Tasca, F. C. Lynch, H. Bohlen, J. G. Vos. *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 8377-8384.

Pour les deux produits, l'ajustement mono-exponentiel coïncide parfaitement avec les points expérimentaux et les corrélations R sont comprises entre les valeurs 0,998 et 1.

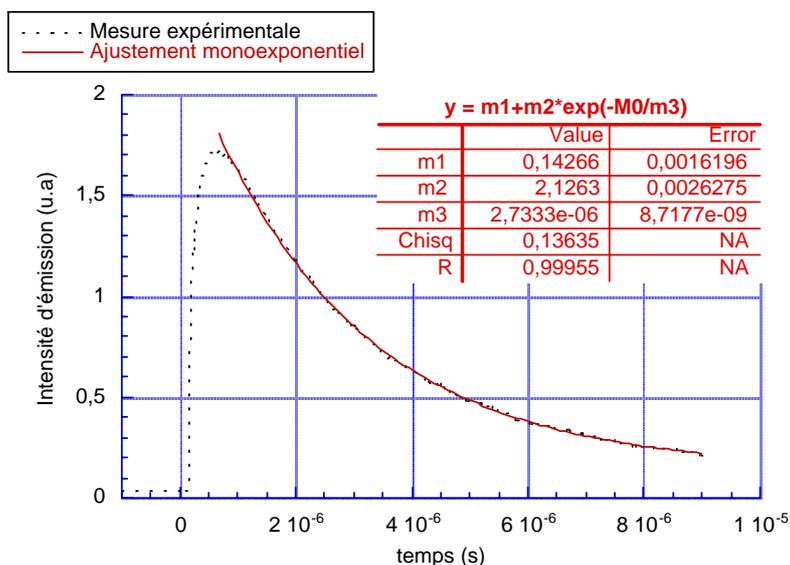


Figure 66 : Signal enregistré au laser et ajustement correspondant (pour **71**).

Les durées de vie sont plus longues à 77 K qu'à 283 K car en phase rigide, la désactivation non radiative de l'état émissif diminue fortement. Et, dans ce milieu rigide, nous avons observé des valeurs de durées de luminescence de l'ordre quelques microsecondes.

Nous avons également mesuré la durée de vie de luminescence en enregistrant l'émission à différentes longueurs d'onde afin de mettre en évidence une décroissance bi-exponentielle (contribution de deux états émissifs). Nous n'avons observé qu'une légère diminution de la durée de vie lorsque l'on détecte l'émission à $\lambda = 650\text{nm}$ plutôt qu'à 600nm . On rappelle que pour $T = 77\text{ K}$, le complexe émet à 603 nm .

λ_{EM} (nm)	600	610	620	630	640	650
τ (μs)	2,64	2,50	1,98	1,98	2,10	2,16

Tableau 13 : Durées de vie de luminescence de $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hpNH}_2^{2+}$ **72** en fonction de λ_{EM} .

Toujours avec le complexe $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hpNH}_2^{2+}$ **72**, on peut noter que lors de la mesure de la durée de vie de luminescence, l'émission ne revient à zéro que si l'on choisit une large fenêtre temporelle pour l'acquisition du signal. Il semble donc que l'on observe une contribution

longue dans la durée de vie (entre 1 et 10 ms) qui pourrait être la signature d'une transition de type ^3LC .

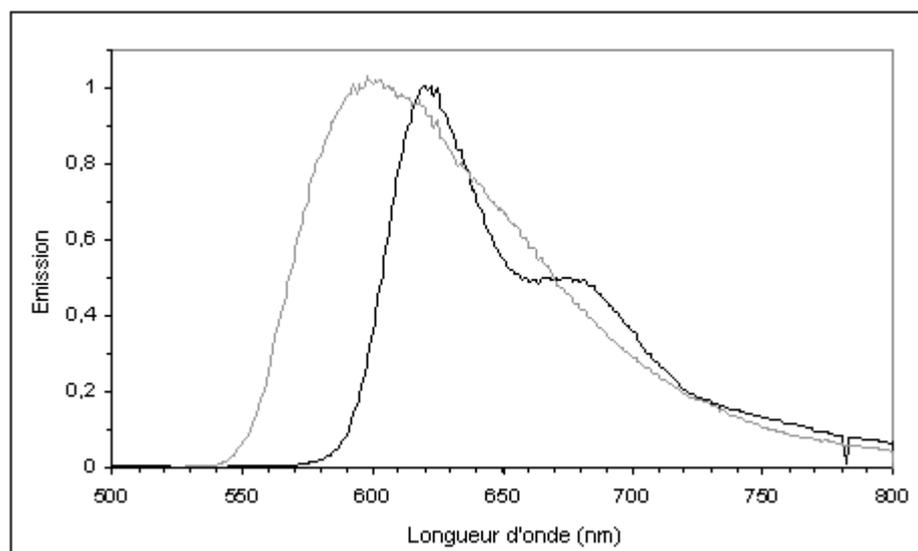


Figure 67 : Spectre d'émission de $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-OH}^{2+}$ **71** (en foncé) et de $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-NH}_2^{2+}$ **72** (en clair) dans EtOH/MeOH à 77 K.

Lorsque nous avons enregistré le spectre d'émission de $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-OH}^{2+}$ **71** (Figure 67) dans la matrice solide Ethanol/Méthanol à 77 K, nous avons observé une structuration vibronique avec un 'vibrational progression spacing' d'environ 1300 cm^{-1} caractéristique des vibrations $\nu_{\text{C=N}}$ des ligands à l'état fondamental (stretching modes). Ce type de structuration est fréquemment observée avec les complexes de ruthénium présentant des ligands polypyridyles⁸⁵⁻⁸⁶.

Finalement, dans le cas du complexe **72**, nous avons observé un phénomène intéressant lorsque nous avons étudié en détail les propriétés en spectroscopie d'émission de ce composé en fonction du temps (Figure 68).

⁸⁵ V. W.-W. Yam, C.-C. Ko, B. W.-K. Chu, N. Zhu. *Dalton Trans.* **2003**, 3914-3921.

⁸⁶ V. W.-W. Yam, K. M.-C. Wong, N. Zhu. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42 (12), 1400-1403.

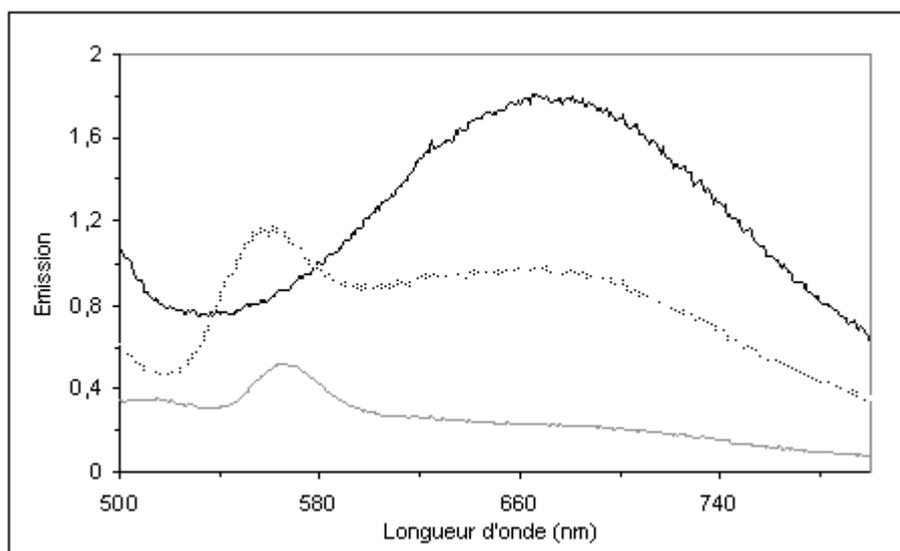
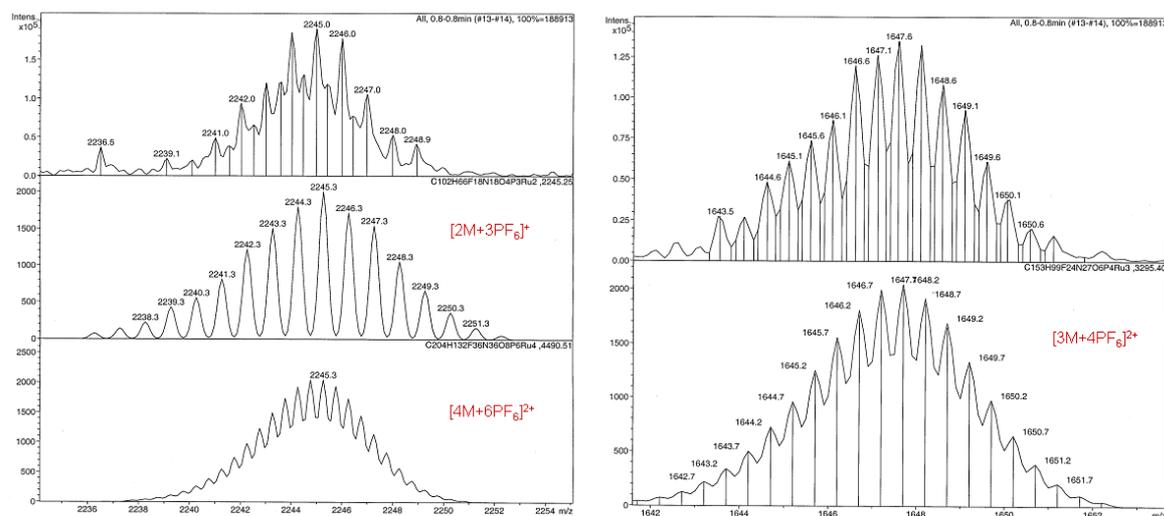


Figure 68 : Evolution du spectre d'émission de $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-NH}_2^{2+}$ **72**. Juste après dilution (ligne foncée, l. f. ex. = 10 nm, l. f. em. = 15 nm), cinq minutes après dilution (en pointillé, l. f. ex. = l. f. em. = 10 nm) et trente minutes après dilution (en clair, l. f. ex. = 5 nm, l. f. em. = 10 nm). L. f. ex/em. signifie largeur de fente en excitation/émission.

A partir d'une solution concentrée de $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hpNH}_2^{2+}$ **72** dans un mélange d'alcool, nous avons effectué une dilution puis enregistré immédiatement le spectre d'émission correspondant. Nous avons aussi enregistré un spectre cinq minutes et trente minutes après la dilution. Nous avons observé un comportement très inhabituel, en effet, l'émission centrée à 673 nm disparaît rapidement alors que l'on voit apparaître de façon concomitante un nouveau signal à 564 nm (figure 68). L'intensité relative des trois courbes sur la figure suivante ne doit pas être comparée directement car l'ouverture des fentes a été diminuée entre les enregistrements successifs.

Une interprétation possible est qu'il s'agit d'un phénomène d'agrégation dépendant de la concentration en solution. Pour étayer cette hypothèse, nous avons entrepris des études par spectrométrie de masse ESMS (c'est à dire en phase gaz) qui ont montré la formation importante d'agrégats, laquelle était très dépendante de la température (figure 69, tableau 14). Toutefois, une étude complémentaire par RMN en solution doit être menée avant toute conclusion sur la nature de cet échange.



Ratio m/z	ion cluster	2.10^{-5} M	2.10^{-4} M	2.10^{-3} M
452,2	M^{2+}	100	100	100
1050,0	$[M+PF_6]^+$	1,9	25	96
1448,5	$[4M+5PF_6]^{3+}$	-	0,19	1,4
1647,6	$[3M+4PF_6]^{2+}$	0,02	0,70	5,0
1846,4	$[5M+7PF_6]^{3+}$	0,01	0,28	2,3
2245,0	$[2M+3PF_6]^+ / [4M+6PF_6]^{2+}$	0,03	0,93	7,7
2643,2	$[7M+11PF_6]^{3+}$	-	0,13	0,96
2841,8	$[5M+8PF_6]^{2+}$	0,01	0,16	1,2

Figure 69 et tableau 14 : Identification des agrégats du complexe **71** à trois concentrations différentes en ESMS.

Nous avons entrepris une étude par spectroscopie d'émission des deux complexes mais celle ci est rendue très difficile en raison d'une très faible intensité d'émission. La seule conclusion que nous pouvons actuellement tirer est que le comportement photophysique des deux complexes est très différent de celui d'autres complexes du ruthénium. Nous pouvons supposer que la structure du ligand hp engendre une très forte stabilisation de l'état 3MLCT qui empêche une émission radiative importante. L'état excité de plus basse énergie peut également mettre en jeu un autre état de transfert de charge comme par exemple un transfert de charge entre deux ligands (LL'CT).

2.4. Affinité pour l'ADN.

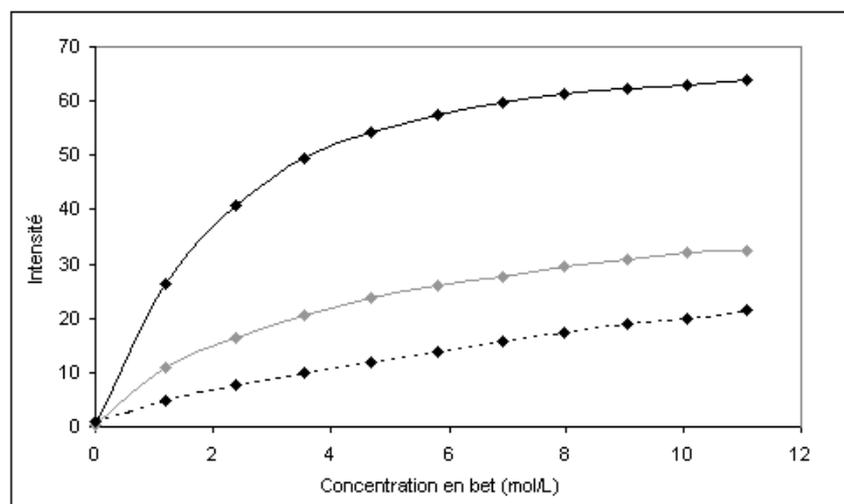


Figure 70 : Inhibition de la fluorescence du bromure d'éthidium lié à l'ADN par le complexe **71** (ligne claire) et **72** (ligne en pointillés). La courbe foncée représente la fluorescence du bromure d'éthidium lié à l'ADN en l'absence de compétiteur. L'émission de fluorescence a été mesurée à 605 nm après une excitation à 520 nm.

Afin de quantifier l'interaction des deux nouveaux complexes pour l'ADN double brin, nous avons déterminé la constante d'affinité apparente (K_{app}) en utilisant une technique de déplacement par compétition avec le bromure d'éthidium. Rappelons que ce composé est un intercalant de l'ADN dont on connaît la constante d'affinité, et dont la fluorescence augmente de façon notable lorsqu'il est intercalé dans l'ADN (le facteur d'exaltation est environ égal à vingt). Cette propriété est souvent exploitée directement ou indirectement pour évaluer des constantes d'association avec l'ADN. La méthode d'analyse des courbes de titration de McGhee et Von Hippel^{4,87} a permis de mesurer l'affinité des deux complexes pour l'ADN de thymus de veau ($3,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ pour $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-OH}^{2+}$ et $1,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ pour $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-NH}_2^{2+}$). A titre de comparaison, $K_{app} = 4,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ pour $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}^{2+}$,⁸⁸.

2.5. Photoréactivité avec l'ADN sous illumination.

D'après les résultats obtenus en électrochimie, le calcul des potentiels à l'état excité montre que thermodynamiquement les complexes ne devraient pas être capables d'oxyder la guanine. Toutefois, nous avons effectué l'étude de la photoréactivité sur l'ADN.

⁸⁷ B. C. Baguley, W. A. Denny, G. J. Atwell, B. F. Cain. *J. Med. Chem.* **1981**, 24, 170-177.

⁸⁸ J.-G. Liu, B.-H. Ye, H. Li, L.-N. Ji, R.-H. Li, J.-Y. Zhou. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, 73, 117-122.

L'interaction des complexes **71** et **72** avec l'ADN sous illumination a également été étudié. Dans la littérature, il a été montré que certains complexes de métaux de transition, et notamment du ruthénium sont capables d'induire sous irradiation lumineuse un transfert d'électron à partir d'une guanine de l'ADN sur le complexe à l'état excité. Ce photo-transfert d'électron aboutit à la formation de photoadduits entre le complexe et l'ADN ^{64, 82}.

Pour mener cette étude, nous avons choisi trois différentes séquences d'oligonucléotides (ODN) contenant respectivement 0, 1 et 3 guanines (Figure 71).

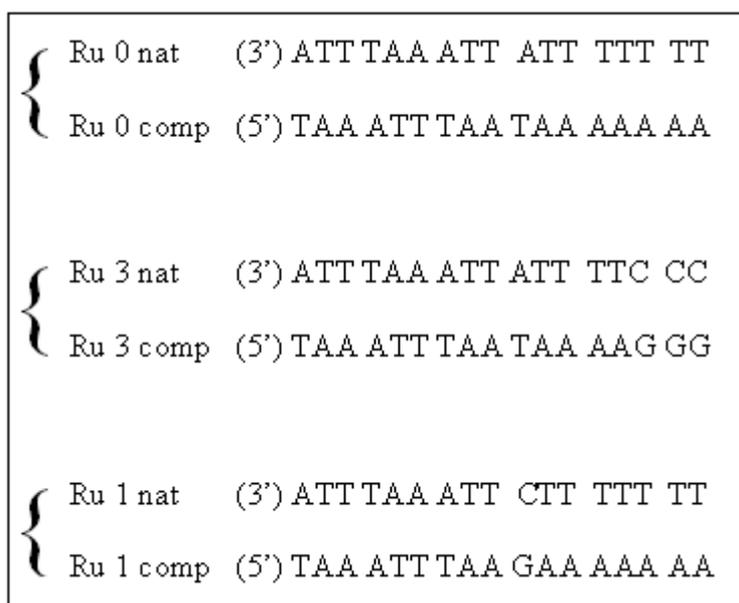


Figure 71 : Séquences des ODN utilisés.

Pour chaque échantillon, nous avons réalisé le marquage du brin complémentaire avec du ³²P, l'hybridation avec le brin naturel et l'interaction entre le double brin d'ADN et les complexes. Nous avons illuminé les échantillons pendant des temps croissants et examiné la photoréactivité par gel d'électrophorèse en condition dénaturante. Un gel représentatif est présenté figure 72.

Premièrement, pour les deux complexes, nous avons observé une coupure des oligonucléotides qui semble être indépendante de la séquence des bases nucléiques (cette coupure est visible avec les trois séquences). Nous voyons également sur le gel une bande qui correspond à la stabilisation du duplex par les complexes (et en particulier le complexe **71**) malgré les conditions dénaturantes utilisées.

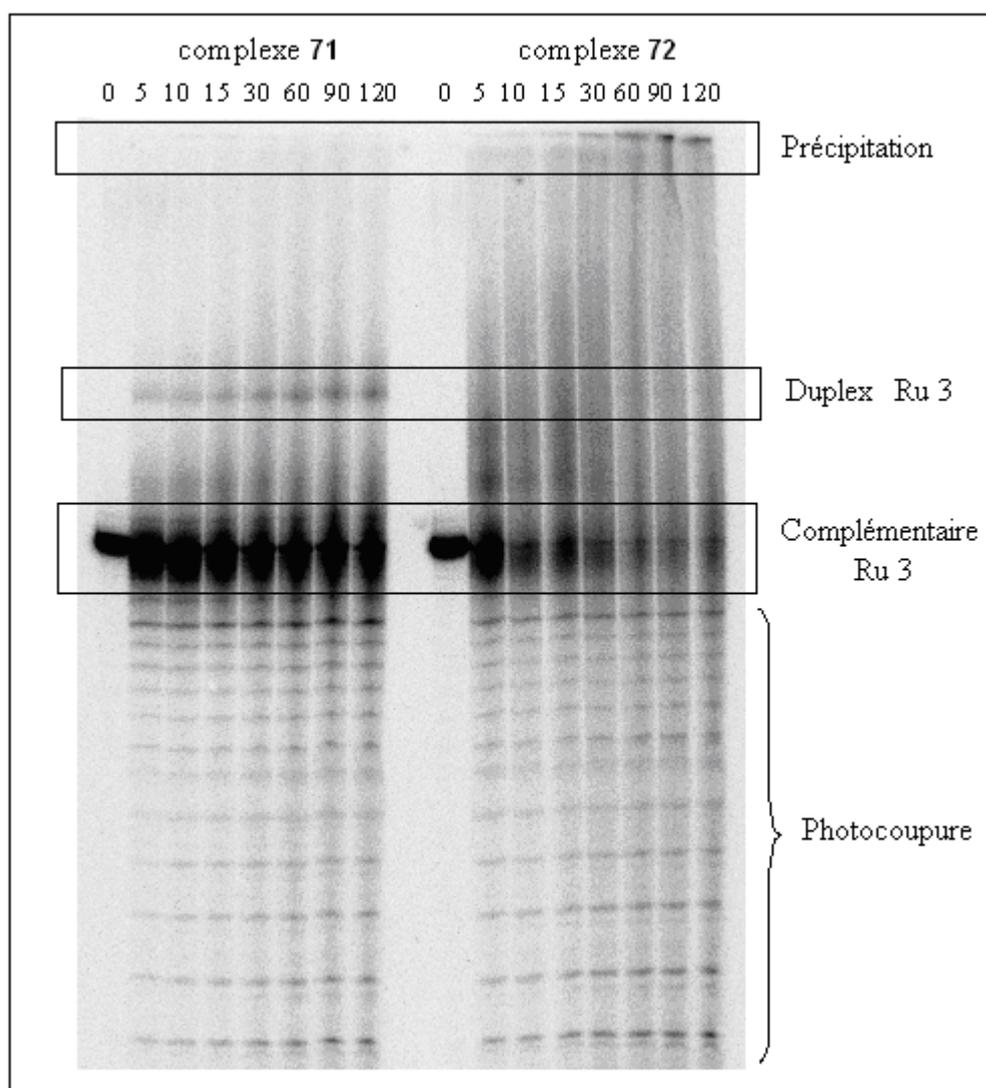


Figure 72 : Gel d'électrophorèse obtenu avec la séquence Ru 3. Temps d'illumination = [0-120 minutes].

De plus, dans le cas de $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-NH}_2^{2+}$ **72**, nous avons observé de façon concomitante une précipitation au sommet du gel, qui augmente en fonction du temps d'illumination et une diminution de l'intensité de la séquence complémentaire Ru 3 correspondante. Ceci peut s'expliquer par une interaction très forte entre l'ADN et le complexe qui peut conduire à une précipitation de l'ensemble.

En conclusion, ces deux nouveaux complexes présentent une bonne affinité pour l'ADN grâce au design des ligands plans étendus angulaires. Cependant, leur réactivité

observée sous illumination se réduit à une simple photocoupage non séquence sélective, et cela probablement en raison d'un potentiel rédox de l'état excité qui n'est pas suffisamment oxydant pour permettre la formation de photoadduit par lien covalent.

IV. Bibliographie.

1. T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, **1983**, 65, 55-63.
2. G. Schwarzenbach, K. Schwarzenbach. Properties of Desferrioxamine. *Helv. Chim. Acta.*, **1963**, 46, 1393-1400.
3. G. Serratrice, H. Boukhalifa, C. Beguin, P. Baret, C. Caris, J.-L., Pierre. O-TRENTOX, a New Tripodal Iron Chelator Based on 8-Hydroxyquinoline Subunits : Thermodynamic and Kinetic Studies. *Inorg. Chem.*, **1997**, 36 (18), 3898-3910.
4. J. D. McGhee, P. H. Von Hippel. Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions : Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. *J. Mol. Biol.*, **1974**, 86, 469-489. [Erratum, *J. Mol. Biol.*, **1976**, 103, 679].
5. D. M. Crothers. Calculation of Binding Isotherms for Heterogeneous Polymers. *Biopolymers*, **1968**, 6, 575-584.
6. W. Bauer, J. Vinograd. Interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. II. The free energy of superhelix formation in SV40 DNA. *J. Mol. Biol.*, **1970**, 47 (3), 419-435.
7. J.-B. Le Pecq, M. Le Bret, J. Barbet, B. Roques. DNA polyintercalating drugs : DNA binding of diacridine derivatives. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1975**, 72 (8), 2915-2919.
8. Le petit Larousse illustré, édition **2002**, 176.
9. L. C. Clark Jr., C. Lyons. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1962**, 102, 29-45.
10. S. J. Updike, G. P. Hicks. The enzyme electrode. *Nature*, **1967**, 214, 986-988.
11. N. Jaffrezic, E. Souteyrand, C. Martelet, S. Cosnier, P. Labbe, C. Pijolat. Les capteurs chimiques. Ecole thématique CNRS-CMC2, **1996**, 201-211.
12. Tran Minh Canh. Les biocapteurs : principes, construction et applications. **1991**, édition Masson.
13. Les biocapteurs : les instruments d'analyse de la prochaine décennie http://www.industrie.gouv.fr/infopres/presse/si_tech4.htm#4

14. G. Bidan, M. Billon, T. Livache, G. Mathis, A. Roget, L.M. Torres-Rodriguez. Conducting polymers as a link between biomolecules and microelectronics. *Synthetic Metals*, **1999**, 102, 1363-1365.
15. F. Garnier, H. Korry-Youssoufi, P. Srivastava, B. Mandrand. Toward intelligent polymers : DNA sensor based on oligonucleotide-functionalized polypyrroles. *Synthetic Metals*, **1999**, 100, 89-94.
16. R.S. Matson. J. B. Rampal, P. J. Coassin. Biopolymer synthesis on polypropylene support. I. Oligonucleotides. *Anal. Biochem.*, **1994**, 217, 306-310. [Erratum, *Anal. Biochem.*, **1994**, 220, 225].
17. T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, R. Teoule. Preparation of DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Research*, **1994**, 22 (15), 2915-1921.
18. H. Koji, I. Keiko, I. Yoshio. Sequence-specific gene detection with a gold electrode modified with DNA probes and electrochemically active dye. *Anal. Chem.*, **1994**, 66 (21), 3830-3833.
19. G. Bidan, M. Billon, K. Galasso, T. Livache, G. Mathis, A. Roget, L. M. Torres-Rodriguez, E. Vieil. Electropolymerisation as a Versatile Route for Immobilizing Biological Species onto Surfaces. *Applied Biochem. Biotech.*, **2000**, 89, 183-193.
20. T. Livache, B. Fouque, A. Roget. Polypyrrole DNA chip on a silicon device : example of hepatitis C virus genotyping. *Anal. Biochem.*, **1998**, 255, 188-194.
21. S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo. DNA sensing on a DNA probe-modified electrode using ferrocenylnaphthalene diimide as the electrochemically active ligand. *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 1334-1341.
22. K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori. Sequence-specific gene detection with a gold electrode modified with DNA probes and an electrochemically active dye. *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 3830-3833.
23. F. Patolsky, Y. Weismann, I. Willner. Redox-Active Nucleic-Acid Replica for the Amplified Bioelectrocatalytic Detection of Viral DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 770-772.
24. L. Autier, C. Grossiord, P. Brossier, B. Limoges. Gold Nanoparticle-Based Quantitative Electrochemical Detection of Amplified Human Cytomegalovirus DNA Using Disposable Microband Electrodes. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 4450-4456.

25. S. Zangoie, R. Bjorklund, H. Arwin. Protein adsorption in thermally oxidized porous silicon layers. *Thin Solid Films*, **1998**, 313-314, 825-830.
26. T.M. Herne, M.J. Tarlov. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 8916-8920.
27. P. Guedon, T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan, Y. Levy. Characterization and Optimization of a Real-Time, Parallel, Label-Free, Polypyrrole-Based DNA Sensor by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 6003-6009.
28. A.J. Thiel, A.G. Frutos, C.E. Jordan, R.M. Corn, L.M. Smith. In Situ Surface Plasmon Resonance Imaging Detection of DNA Hybridization to Oligonucleotide Arrays on Gold Surfaces. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 4948-4956.
29. N. Lassalle, P. Mailley, E. Vieil, T. Livache, A. Roget, J.P. Correia, L.M. Abrantes. Electronically conductive polymer grafted with oligonucleotides as electro-sensors of DNA : Preliminary study of real time monitoring by in situ techniques. *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 509, 48-57.
30. Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa, Y. Ebara. Kinetic Measurements of DNA Hybridization on an Oligonucleotide-Immobilized 27-MHz Quartz Crystal Microbalance. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 1288-1296.
31. H. Korri-Yousoufi, F. Garnier, P. Srivastava, P. Godillot, A. Yassar. Toward bioelectronics : specific DNA recognition based on an oligonucleotide-functionalized polypyrrole. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 7388-7389.
32. J. Wang, M. Jiang. Toward Genoelectronics : nucleic acid doped conducting polymers. *Langmuir*, **2000**, 16, 2269-2274.
33. N. Lassalle, E. Vieil, J.P. Correia, L.M. Abrantes. Study of DNA hybridization by photocurrent spectroscopy. *Synthetic Metals*, **2001**, 119, 407-408.
34. E. Palecek. Electrochemical behaviour of biological macromolecules. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **1986**, 15, 275-295.
35. N. D. Popovich, H. H. Thorp. New strategies for electrochemical nucleic acid detection. *The Electrochemical Society Interface*, **2002**, 30-34.
36. V. Vetterl, N. Papadopoulos, V. Drazan, L. Strasak, S. Hazon, J. Dvorak. Nucleic acid sensing by impedance measurements. *Electrochimica Acta*, **2000**, 45, 2961-2971.
37. S. Takenaka. Electrochemical Detection of DNA with Small Molecules. In *DNA and RNA Binders From Small Molecules to Drugs*. M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, Eds. (WILEY-VCH), **2003**, 1, 224-246.

-
38. J. Wang. Electrochemical Nucleic Acid Biosensors. *Anal. Chim. Acta.*, **2002**, 469, 63-71.
39. M. Mascini, I. Palchetti, G. Marrazza. DNA Electrochemical Biosensors. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2001**, 369, 15-22.
40. A. Erdem, M. Ozsoz. Electrochemical DNA Biosensors Based on DNA-Drug Interactions. *Electroanalysis*, **2002**, 14 (14), 965-974.
41. F. Azek, C. Grossiord, C. Joannes, B. Limoges, P. Brossier. Hybridization assay at a disposable biosensor for the attomole detection of the amplified cytomegalovirus DNA. *Anal. Biochem.*, **2000**, 284, 107-113.
42. K. M. Millan, S. R. Mikkelsen. Sequence-Selective Biosensor for DNA Based on Electroactive Hybridization Indicators. *Anal. Chem.*, **1993**, 65 (17), 2317-2323.
43. J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P. A. M. Farias, N. Dontha. DNA Electrochemical Biosensor for the Detection of Short DNA Sequences Related to the Human Immunodeficiency Virus. *Anal. Chem.*, **1996**, 68 (15), 2629-2634.
44. M. Minunni, S. Tombelli, E. Mariotti, M. Mascini, M. Mascini. Biosensors as new analytical tool for Genetically Modified Organism (GMOs). *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2001**, 369 (7/8), 589-593.
45. K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori. Sequence-specific gene detection with a gold electrode modified with DNA probes and an electrochemically active dye. *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 3830-3833.
46. D. Ozkan, A. Erdem, P. Kara, K. Kagan, J. J. Gooding, E. P. Nielsen, M. Ozsoz. Electrochemical detection of hybridization using peptide acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes. *Electrochemistry Communications*, **2002**, 4, 796-802.
47. V. Glezer, B. Turovska, J. Stradins, J. Freimanis. Electrochemical Reduction of N-Aryl- and N-Arylsulphonylbenzoquinonemonoimines in Acetonitrile – I. Electroreduction Mechanism and Effects of Proton Donors on Electrochemical Process. *Electrochim. Acta*, **1990**, 35 (11/12), 1933-1940.
48. M. W. Lehmann, D. H. Evans. Anomalous behavior in the two-step reduction of quinones in acetonitrile. *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 500, 12-20.
49. P. W. Crawford, J. Gross, K. Lawson, C. C. Cheng, Q. Dong, D. F. Liu, Y. L. Luo, B. G. Szczepankiewicz, C. H. Heathcock. Electrochemical Properties of Some Biologically

Active Quinone Derivatives: Furanquinones, Pyridoquinones, and Diplamine, a Cytotoxic Pyridoacridine Alkaloid. *J. Electrochem. Soc.*, **1997**, 144 (11), 3710-3715.

50. B. Saoudi, C. Despas, M. M. Chehimi, N. Jammul, M. Delamar, J. Bessière, A. Walcarius. Study of DNA adsorption on polypyrrole : Interest of dielectric monitoring. *Sens. Actuators B*, **2000**, 62, 35-42.

51. A. M. Oliveira-Brett, M. Vivan, I. R. Fernandes, J. A. P. Piedade. Electrochemical Detection of in Situ Adriamycin Oxidative Damage to DNA. *Talanta*, **2002**, 56, 959-970.

52. G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini. Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection. *Biosens. Bioelec.*, **1999**, 14, 43-51.

53. N. Lassalle, P. Mailley, E. Vieil, T. Livache, A. Roget, J. P. Correia, L. M. Abrantes. Electronically conductive polymer grafted with oligonucleotides as electrochemical sensors of DNA. Preliminary study of real time monitoring by in situ techniques. *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 509, 48-57.

54. T. Livache, E. Maillart, N. Lassalle, P. Mailley, B. Corso, P. Guedon, A. Roget, G. Bidan, Y. Levy. Polypyrrole based DNA hybridization assays : Study of label free detection processes versus fluorescence on microchips. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 32, 687-696.

55. C. Brakha. Elaboration et caractérisation électrochimique et physico-chimique de films conducteurs électropolymérisés ultra-minces portant des biomolécules. *Mémoire, Diplôme d'ingénieur C.N.A.M.*, **2001**.

56. P. Lincoln, A. Broo, B. Nordén. Diastereomeric DNA-Binding Geometries of Intercalated Ruthenium(II) Trischelates Probed by Linear Dichroism : $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DPPZ}]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{BDPPZ}]^{2+}$. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2644-2653.

57. R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton. $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}^{2+}$ Luminescence : Dependence on DNA Sequences and Groove-Binding Agents. *Inorg. Chem.*, **1998**, 37 (1), 29-34.

58. A. Brodkorb, A. Kirsch-De Mesmaeker, T. J. Rutherford, F. R. Keene. Stereoselective Interactions and Photo-Electron Transfers between Mononucleotides or DNA and the Stereoisomers of a HAT-Bridged Dinuclear Ru^{II} Complex (HAT = 1,4,5,8,9,12-hexaazatriphenylene). *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 2151-2160.

59. C. Metcalfe, H. Adams, I. Haq, J. A. Thomas. A Ruthenium Dipyridophenazine Complex that Binds Preferentially to GC Sequences. *Chem. Comm.*, **2003**, 1152-1153.

60. K. A. O'Donoghue, J. M. Kelly, P. E. Kruger. Unusual photophysical switching in a $\text{Ru}(\text{II})$ diimine DNA probe caused by amide functionalisation. *Dalton Trans.* **2004**, 13-15.

61. I. Ortmans, B. Elias, J. M. Kelly, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker. $[\text{Ru}(\text{TAP})_2(\text{dppz})]^{2+}$: a DNA intercalating complex, which luminesces strongly in water and undergoes photo-induced proton-coupled electron transfer with guanosone-5'-monophosphate. *Dalton Trans.* **2004**, 668-676.
62. N. J. Turro, J. K. Barton, D. A. Tomalia. Molecular recognition and chemistry in restricted reaction spaces. Photophysics and photoinduced electron transfer on the surfaces of micelles, dendrimers, and DNA. *Acc. Chem. Res.*, **1991**, 24, 332-340.
63. J. M. Kelly, A. B. Tossi, D.J. McConnell, C. Oh Uigin. A study of the interactions of some polypyridylruthenium (II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nucl. Acids Res.*, **1985**, 13, 6017-6034.
64. C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker. New DNA-binding ruthenium(II) complexes as photo-reagents for mononucleotides and DNA. *J. Phys. Org. Chem.* **1998**, 11, 577-583.
65. I. Haq, P. Lincoln, D. Suh, B. Norden, B. Z. Chowdhry, J. B. Chaires. Interaction of DELTA- and LAMBDA- $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DPPZ}]^{2+}$ with DNA : A Calorimetric and Equilibrium Binding Study. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 4788-4796.
66. P. Lincoln, B. Nordén. DNA Binding Geometries of Ruthenium(II) Complexes with 1,10-Phenanthroline and 2,2'-Bipyridine Ligands Studied with Linear Dichroism Spectroscopy. Borderline Cases of Intercalation. *J. Phys. Chem. B*, **1998**, 102, 9583-9594.
67. H. Y. Mei, J. K. Barton. Chiral probe for A-form helices of DNA and RNA : tris(tetramethylphenanthroline)ruthenium(II). *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 7414-7416.
68. M. Demeunynck, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker. Tetrapyrido[3,2-a:2',3'-c:3'',2''-h:2''',3'''-j]acridine (tpac): A New Extended Polycyclic Bis-Phenanthroline Ligand. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 261-264.
69. E. J. C. Olson, D. Hu, A. Hörmann, A. M. Jonkman, M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, P. F. Barbara. First Observation of the Key Intermediate in the "Light-Switch" Mechanism of $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 11458-11467.
70. M. K. Brennaman, J. H. Alstrum-Acevedo, C. N. Fleming, P. Jang, T. J. Meyer, J. M. Papanikolas. Turning the $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ Light-Switch On and Off with Temperature. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 15094-15098.
71. G. Pourtois, D. Beljonne, C. Moucheron, S. Schumm, A. Kirsch-De Mesmaeker, R. Lazzaroni, J. L. Bredas. Photophysical Properties of Ruthenium(II) Polyazaaromatic Compounds : A Theoretical Insight. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 683-692.

72. E. R. Batista, R. L. Martin. On the Excited States Involved in the Luminescent Probe $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$. *J. Phys. Chem. A*, **2005**, 109, 3128-3133.
73. M. K. Brennaman, T. J. Meyer, J. M. Papanikolas. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ Light-Switch Mechanism in Protic Solvents as Studied through Temperature-Dependent Lifetime Measurements. *J. Phys. Chem. A*, **2004**, 108, 9938-9944.
74. R. H. Hartshorn, J. K. Barton. Novel dipyridophenazine complexes of ruthenium(II) : exploring luminescent reporters of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5919-5925.
75. R. Dinica, F. Charmantray, M. Demeunynck, P. Dumy. Regioselective synthesis of angular nitrogen polyheterocycles : dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phenazines. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 7883-7885.
76. C. Bresson, M. Luhmer, M. Demeunynck, A. Kirsch-De Mesmaeker, F. Pierard. The diastereoisomeric forms of a mononuclear Ru(II) complex bearing a bis-phenanthroline Tröger's base. *Tet. Lett.* **2004**, 45, 2863-2866.
77. N. E. Tokel-Takvoryan, R. E. Hemingway, A. J. Bard. Electrogenerated chemiluminescence. XIII. Electrochemical and electrogenerated chemiluminescence studies of ruthenium chelates. *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 6582-6589.
78. C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, S. Choua. Photophysics of $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{PHEHAT})^{2+}$: A Novel "Light Switch" for DNA and Photo-oxidant for Mononucleotides. *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 584-592.
79. Q.-X. Zhen, B.-H. Ye, J.-G. Liu, Q.-L. Zhang, L.-N. Ji, L. Wang. Synthesis, characterization and DNA-binding properties of $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{tapt}]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dptat}]^{2+}$. *Inorg. Chim. Acta* **2000**, 303, 141-147.
80. R. J. Staniewicz, R. F. Sympton, D. G. Hendricker. Preparation and investigation of the spectral and electrochemical properties of mixed-ligand ruthenium(II) complexes containing 1,8-naphthyridines. *Inorg. Chem.*, **1977**, 16, 2166-2171.
81. C. T. Lin, W. Boettcher, M. Chou, C. Creutz, N. Sutin. Mechanism of the quenching of the emission of substituted polypyridineruthenium(II) complexes by iron(III), chromium(III), and europium(III) ions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 6536-6544.
82. C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, J. M. Kelly. Photoreactions of ruthenium (II) and osmium (II) complexes with deoxyribonucleic acid (DNA). *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* **1997**, 40, 91-106.
83. M. Maestri, N. Armaroli, V. Balzani, E. C. Constable, A. M. W. Cargill Thompson. Complexes of the ruthenium(II)-2,2':6'-2''-Terpyridine Family. Effect of Electron-Accepting

and -Donating Substituents on the Photophysical and Electrochemical Properties. *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 2759-2767.

84. M. Duati, S. Tasca, F. C. Lynch, H. Bohlen, J. G. Vos. Enhancement of Luminescence Lifetimes of Mononuclear Ruthenium(II)-Terpyridine complexes by Manipulation of the σ -Donor Strength of Ligands. *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 8377-8384.

85. V. W.-W. Yam, C.-C. Ko, B. W.-K. Chu, N. Zhu. Syntheses, crystal structures, photophysics and cation-binding studies of luminescent functionalized ruthenium polypyridine complexes with orthometallated aminocarbene ligands. *Dalton Trans.* **2003**, 3914-3921.

86. V. W.-W. Yam, K. M.-C. Wong, N. Zhu. Luminescent Platinum(II) Terpyridyl-Capped Carbon-Rich Molecular Rods – An Extension from Molecular- to Nanometer-Scale Dimensions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42 (12), 1400-1403.

87. B. C. Baguley, W. A. Denny, G. J. Atwell, B. F. Cain. Potential antitumor agents. 34. Quantitative relationships between DNA binding and molecular structure for 9-anilinoacridines substituted in the anilino ring. *J. Med. Chem.* **1981**, 24, 170-177.

88. J.-G. Liu, B.-H. Ye, H. Li, L.-N. Ji, R.-H. Li, J.-Y. Zhou. Synthesis, characterization and DNA-binding properties of novel dipyrrophenazine complex of ruthenium (II) : $[\text{Ru}(\text{IP})_2(\text{DPPZ})]^{2+}$. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, 73, 117-122.

CONCLUSION

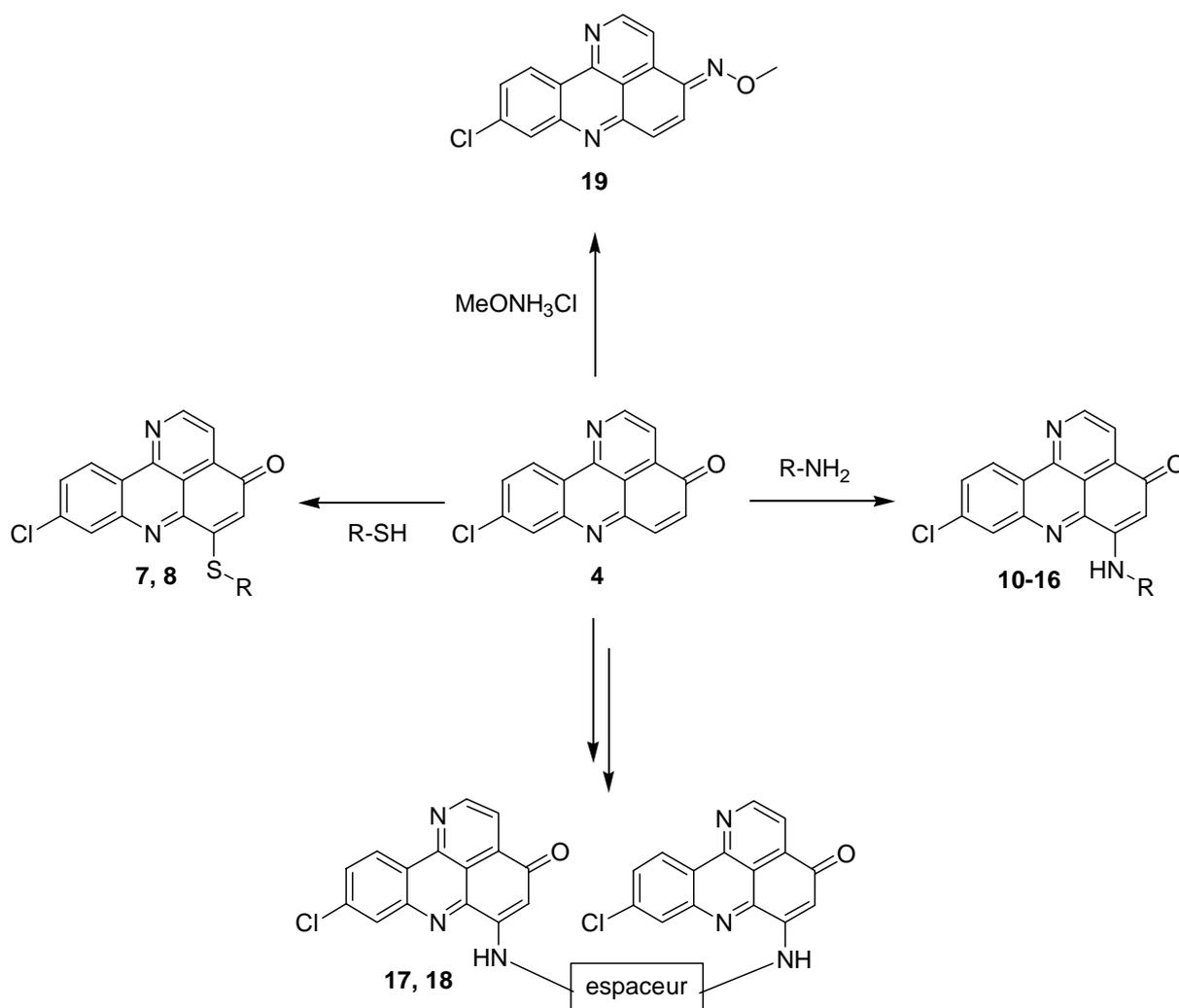
Conclusion

Lors de ce travail, nous nous sommes intéressés à deux classes de composés, les pyrido[4,3,2-kl]acridines et les polyhétérocycles azotés.

L'intérêt des pyrido[4,3,2-kl]acridines réside dans leur réactivité chimique, qui était peu connue au début de ce travail, et dans leur structures, puisqu'il s'agit d'isomères d'alcaloïdes marins possédant des propriétés biologiques variées.

Nous avons donc synthétisé une famille de dérivés de pyridoacridines, possédant des substituants variés (amines, thiols, sucres) et testé leurs propriétés biologiques.

Pour cela, nous avons tout d'abord étudié la réactivité de la quinone imine **4** vis à vis de plusieurs classes de nucléophiles. Nous avons ainsi mis en évidence une réactivité en addition 1-4 lorsque l'on utilise des thiols ou des amines comme nucléophile. Par contre, si l'on utilise des alkoxyamines, c'est une addition 1-2 qui est observée.

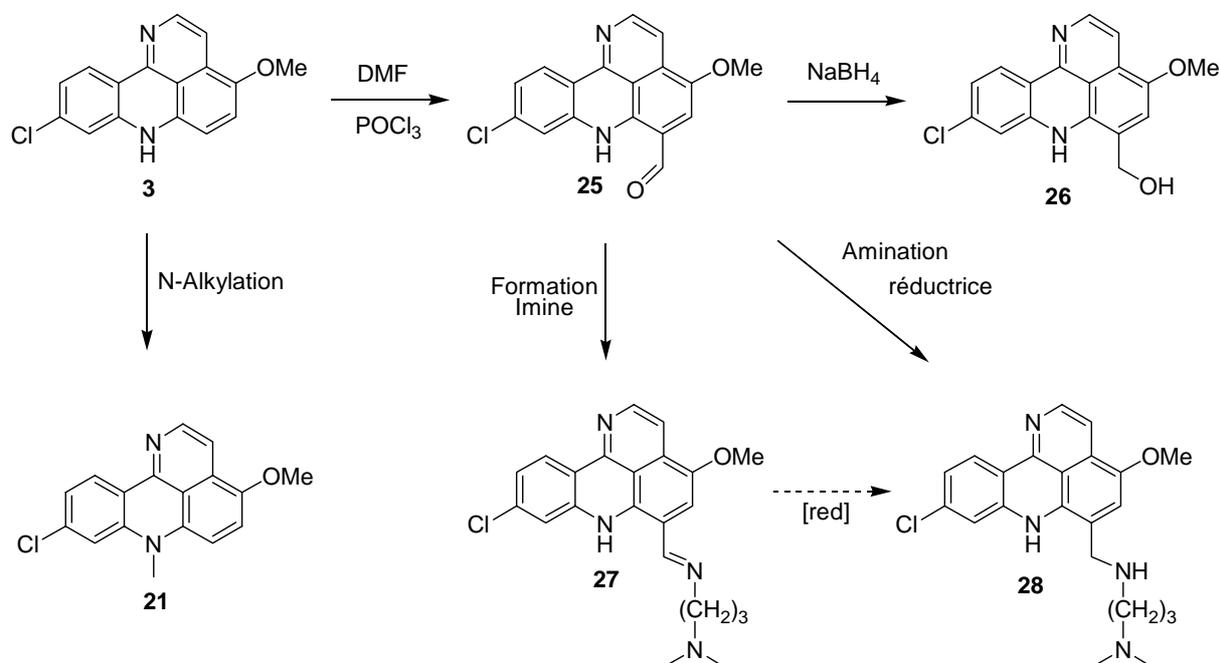


Conclusion

Nous avons également utilisé deux produits d'addition obtenus avec des diamines (**14** et **16**) pour élaborer une méthode de synthèse de bis-pyridoacridines symétriques (**17** et **18**).

Dans un deuxième temps, nous avons exploré la réactivité de la pyridoacridine **3**. Plusieurs réactions ont été effectuées avec succès.

- 1) La possibilité de fonctionnaliser ce substrat en position N-7 a été mise en évidence à travers une N-alkylation réalisée avec l'iodure de méthyle.
- 2) La réaction de Vilsmeier-Haack nous a permis d'introduire une fonction aldéhyde sur **3** et d'accéder ainsi à un intermédiaire clé (**25**) pouvant être engagé dans diverses réactions de couplage.



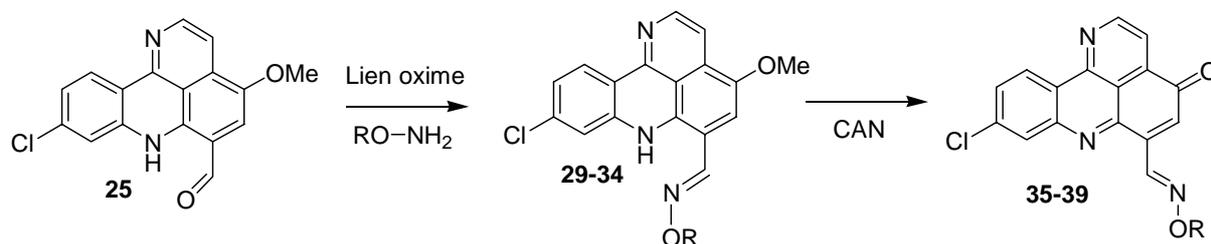
D'une part, l'aldéhyde **25** peut être conjugué à des amines par formation d'imine (**27**) ou par amination réductrice. Cette dernière réaction a permis d'obtenir en un seul pot le produit **28** avec un bon rendement.

D'autre part, l'aldéhyde **25** peut être réduit au NaBH₄ pour conduire à l'hydroxyméthylène correspondant **26**. Ce dernier composé a présenté un comportement particulier en solution que nous avons étudié par spectroscopie de RMN.

La réactivité de l'aldéhyde **25** avec les nucléophiles a enfin été mise à profit pour conjuguer le chromophore pyridoacridine à des oligosaccharides. Le lien chimique que nous

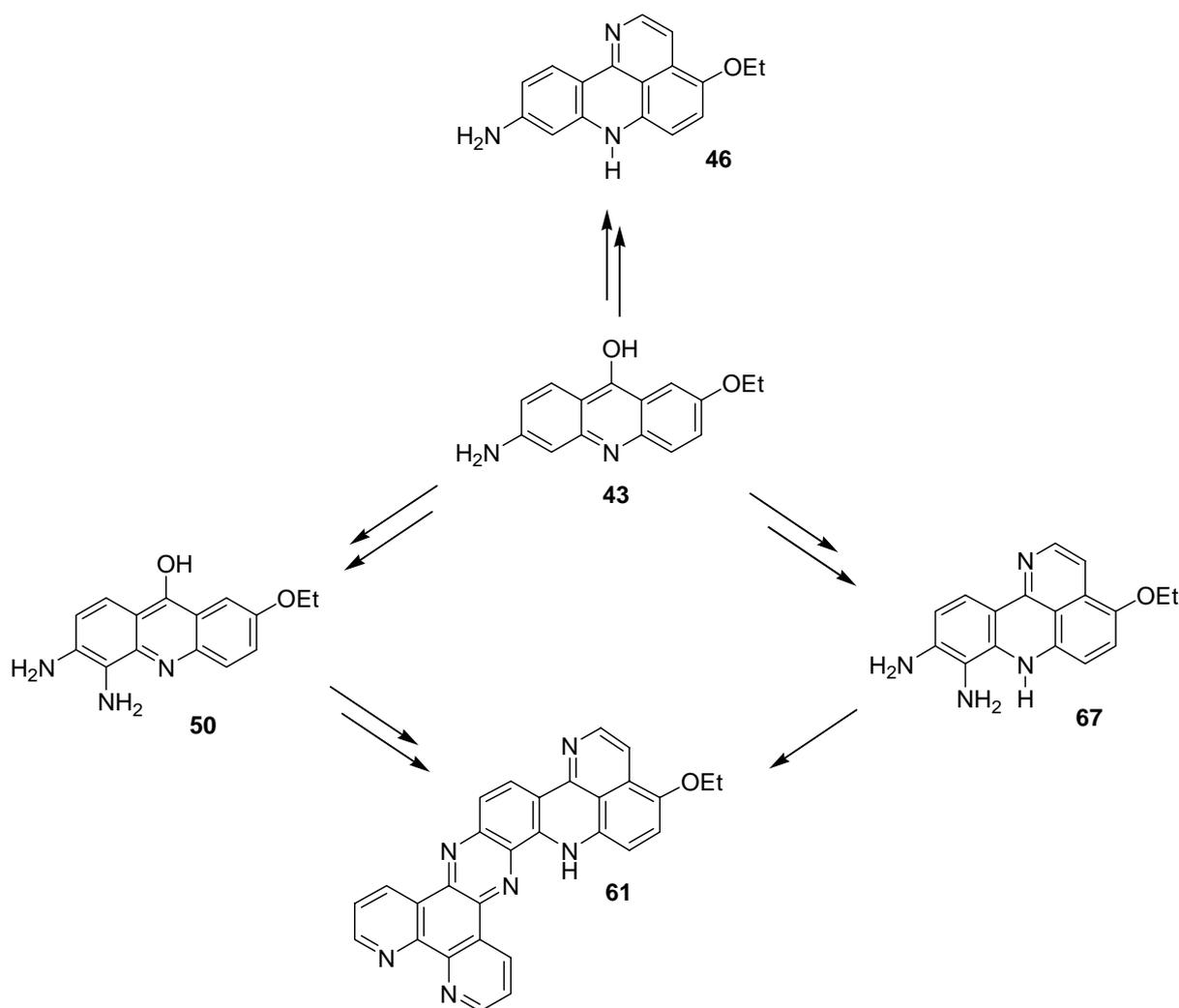
Conclusion

avons choisi est le lien éther d'oxime que l'on obtient par couplage d'une oxy-amine sur un composé carbonylé aldéhydique.



Le passage de la série pyridoacridine à celle des pyridoacridones a été réalisé par déméthylation oxydative au sels de CAN .

Dans une deuxième partie, nous avons appliqué la méthode de synthèse des pyridoacridines mise au point au laboratoire à une amino-acridine pour préparer en 4 étapes l' amino-pyridoacridine **46** à partir d'un produit commercial (l'éthacridine).

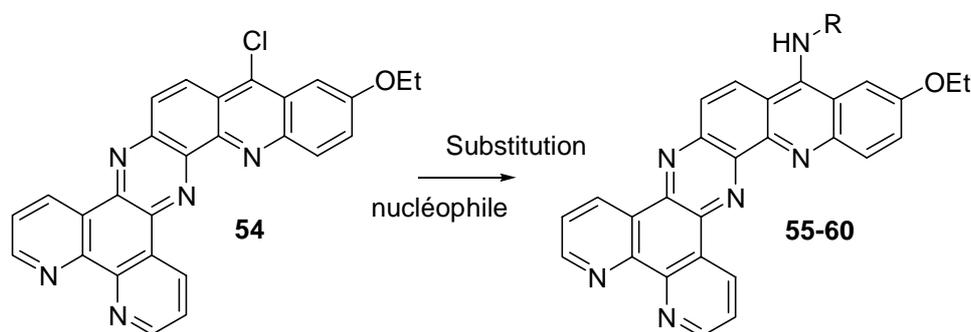


Conclusion

A partir de l'hydroxy-acridine **43**, deux stratégies ont été mises en œuvre pour préparer un composé polycyclique hétéroaromatique possédant huit cycles accolés (**61**). La première méthode est basée sur la condensation de l'*ortho*-diamino-acridine **50** sur la phendione **52** pour former un heptacycle. Le dernier cycle acridine est ensuite formé en 3 étapes afin d'accéder à **61**. Dans la seconde stratégie, l'intermédiaire clé est l'*ortho*-diaminopyridoacridine **67** qui est elle aussi condensée sur la phendione.

Nous avons étudié les propriétés du composé octacyclique **61** qui présente une large délocalisation électronique. En particulier, la caractérisation par spectroscopie d'absorption électronique et d'émission de fluorescence (avec et en absence d'ADN) a été réalisée.

Concernant la synthèse de composés polycycliques étendus, la préparation d'une famille de conjugués heptacycle/amine a été réalisée via une réaction de substitution nucléophile aromatique du chlore en position 12 de l'heptacycle. La synthèse de l'heptacycle-Cl avait été mise au point au laboratoire.

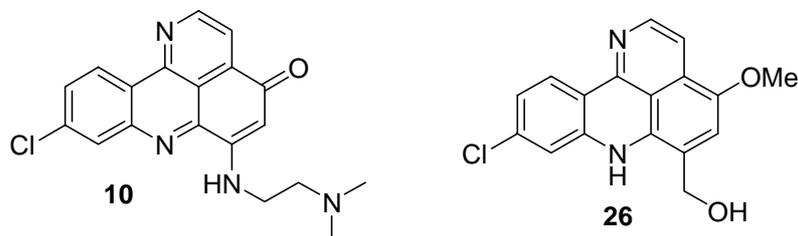


Outre leur intérêt en tant que ligands pour la synthèse de complexes métalliques, ces composés présentent une géométrie favorable pour l'interaction avec des conformations particulières des acides nucléiques (triplexes, quadruplexes). Par manque de temps, nous n'avons pas pu étudier ces interactions.

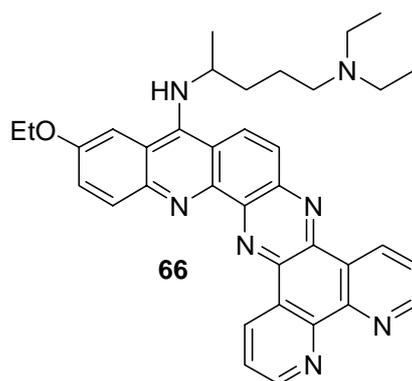
Dans le cadre d'un programme de recherche de molécules antitumorales, la cytotoxicité d'une partie des molécules préparées a été mesurée dans l'équipe de A. Croisy (Orsay). En série Pyridoacridine, 5 molécules ont été testées dont quatre conjugués avec des oligosaccharides, et les résultats se sont révélés relativement décevants avec la meilleure activité pour l'alcool **26** ($IC_{50} = 73 \mu\text{M}$ sur HT-29). Par contre, les résultats ont été meilleurs

Conclusion

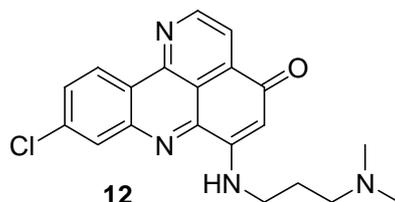
en série pyridoacridone avec plusieurs molécules exhibant des cytotoxicités dans la gamme du micromolaire. En particulier, le conjugué **10** possède une IC_{50} égale à $1,8 \mu\text{M}$ sur la lignée cellulaire HT-29.



Dans le cadre d'une recherche de nouveaux agents anti-parasitaires, deux molécules ont été testées contre *Plasmodium falciparum* (paludisme) et l'heptacycle **66** présente une puissante activité anti-paludique ($ED_{50} = 85 \text{ nm}$ contre la souche K1 qui est résistante à la chloroquine).



Dans le cadre d'une collaboration avec P. Mailley (CEA, Grenoble), l'électroactivité de plusieurs produits a été testée. Certains conjugués dont la pyridoacridone **12** ont présenté des systèmes électrochimiques réversibles qu'il a été possible d'utiliser pour réaliser un biocapteur à ADN.



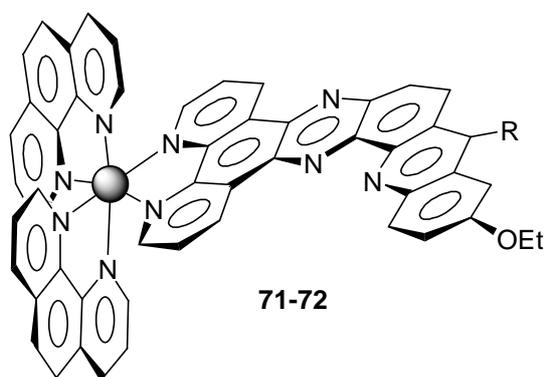
Pour cela, nous avons étudié l'électroactivité de la série des pyridoacridones, ainsi que l'interaction avec l'ADN en solution, puis immobilisé à la surface de l'électrode.

Conclusion

Finalement, une technique d'immobilisation de sondes ODN par copolymérisation de pyrrole et pyrrole-ODN a conduit dans un premier temps à l'élaboration d'un capteur macroscopique (diamètre = 5 mm) puis d'un microcapteur (puce API T8, diamètre = 200 μm).

Un échange entre le laboratoire LEDSS et l'université libre de Bruxelles (ULB), dans le cadre du Laboratoire Européen Associé (LEA) m'a permis de réaliser deux stages dans le laboratoire de A. Kirsch-De Mesmaeker. Au cours de cette collaboration, nous avons synthétisé deux nouveaux complexes de ruthénium II (**71**, R = OH et **72**, R = NH₂).

Les deux complexes ont été caractérisés par RMN ¹H et SM (électrospray), leurs propriétés en absorption électronique, émission et électrochimie ont été étudiées. La structure plane étendue des ligands heptacycliques utilisés a une influence forte sur le comportement de **71** et **72**.



Les deux complexes interagissent fortement avec le double brin d'ADN et présentent une réactivité (photocoupage) vis à vis de l'ADN sous illumination.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Partie synthèse organique.

Les analyses par chromatographie sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice 60F₂₅₄ Merck de 0,25 mm d'épaisseur, avec détection UV à 254 et 365 nm.

Les analyses par chromatographie liquide haute performance (CLHP) ont été effectuées sur un appareil Waters équipé de deux pompes M510, d'un injecteur universel U6K, d'un programmeur de gradient M680, d'un détecteur UV Waters à barrette de diode. Les analyses en phase inverse ont été réalisées avec une colonne μ -bondapack C₁₈ (3,9 x 300 mm, 10 μ m, Waters).

Les températures de fusion (F) ont été mesurées à l'aide d'un appareil de détermination microscopique du point de fusion Reichert ThermoVar muni d'un transformateur de réglage Reichert-Jung.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur les spectromètres Bruker AC 200 et Avance 300. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au pic du solvant pris comme référence interne (CDCl₃ : 7,24 ppm ; CD₃OD : 4,78 ppm ; DMSO : 2,50 ppm). Les spectres sont décrits avec les abréviations : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint = quintuplet, m = multiplet. Les constantes de couplage (J) sont données en Hertz.

Les spectres de RMN ¹³C ont été enregistrés en utilisant la séquence d'impulsions C13mult qui permet d'obtenir le déplacement chimique ainsi que la nature des noyaux de carbone (primaire, secondaire, tertiaire ou quaternaire). Il s'agit d'une séquence de type INADEQUAT.

Les spectres de masse (SM) ont été enregistrés sur un POLARISQ Thermo Finnigan à trappe à ions et traités avec le logiciel X Calibur.

Les spectres d'absorption électronique (UV-Visible) ont été réalisés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 15 UV/Vis.

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés sur un spectromètre de fluorescence Perkin-Elmer LS50.

Conditions de CLHP Analytique.

- **Colonne analytique** : Waters μ -bondapack, 3,9 x 300 mm², phase de polarité inverse C₁₈, 10 μ m de porosité.
- **Eluants** : **A** : H₂O, pH 2,5 (acide phosphorique).
B : MeOH / H₂O : 95/5, v/v.

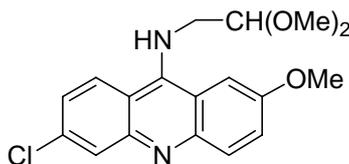
- **Gradient** : de 0 à 100 % de B en 5 minutes puis 100 % de B pendant 5 minutes.
- **Débit** : 2 mL/min.

Conditions de CLHP Semi-préparative.

- **Colonne semi-préparative** : Delta-Pak 300 Å, 25 x 200 mm², phase de polarité inverse C₁₈, 15 µm de porosité.
- **Eluants** : **A** : H₂O + 0,1% TFA.
B : CH₃CN / H₂O / TFA : 90/9,9/0,1, v/v/v.
- **Gradient** : de 5 à 100 % de B en 18 minutes.
- **Débit** : 22 mL/min.

Protocoles de synthèse.

6-Chloro-2-méthoxy-9-(2,2-diméthoxyéthyl)amino-acridine (2)

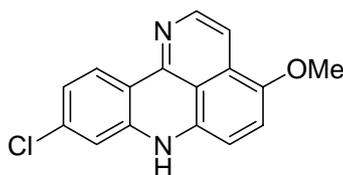


La 6,9-dichloro-2-méthoxyacridine **1** (2,001 g, 7,2 mmol) est solubilisée à 80°C dans le phénol (16 mL) avant d'ajouter 2,25 mL d'acétaldéhyde-diméthylacétal (7,8 mmol). Après 1h de réaction à 80°C, on coule le milieu réactionnel dans 200 mL d'éther éthylique. La précipitation est immédiate. On agite le milieu 30 min sous ultrasons avant de filtrer. Le solide est lavé à l'eau et à l'éther. On obtient le produit **2** (2,056 g, 5,88 mmol) avec un rendement de 75%.

F = 205-207°C¹. **RMN** ¹**H** (200 MHz, CDCl₃) : δppm = 8,06 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-5) ; 8,03 (1H, d, J = 9,4 Hz, H-8) ; 7,99 (1H, d, J = 9,4 Hz, H-4) ; 7,41 (1H, dd, J = 9,4 Hz et 2,5 Hz, H-3) ; 7,33 (1H, dd, J = 9,4 Hz et 2,0 Hz, H-7) ; 7,25 (1H, d, J = 2,5 Hz, H-1) ; 4,99 (1H, t, N-H) ; 4,40 (1H, t, J = 5,3 Hz, CH) ; 3,96 (3H, t, O-CH₃) ; 3,73 (2H, m, CH₂) ; 3,38 (6H, s, (O-CH₃)₂).

9-Chloro-4-méthoxy-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (3)

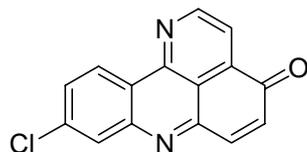
¹ N. Fixler, M. Demeunynck, J. Lhomme. *Synthetic Commun.*, **1997**, 27 (13), 2311-2324.



Le composé **2** (0,500 g, 1,41 mmol) est dissous dans l'acide méthane sulfonique (20 mL) ; la solution est rouge en milieu acide. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation 3 h à température ambiante. La solution est alors additionnée goutte à goutte à un mélange acétate d'éthyle/eau/ammoniaque (40/10/3, v/v/v). La neutralisation est très exothermique. On assiste à un changement de couleur du rouge au jaune fluorescent (en milieu neutre ou basique). La phase aqueuse est séparée et extraite deux fois par de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées à sec. Après reprise par l'éther éthylique puis filtration, on récupère le dérivé **3** (0,331 g, 1,16 mmol). La réaction a été effectuée avec un rendement de 79%.

F = 220-221°C¹. **RMN** ¹**H** (200 MHz, CDCl₃) : δppm = 8,34 (1H, d, J = 8,6 Hz, H-11) ; 8,25 (1H, d, J = 6,0 Hz, H-2) ; 7,41 (1H, d, J = 6,0 Hz, H-3) ; 6,95 (1H, dd, J = 8,6 Hz et 2,0 Hz, H-10) ; 6,91 (1H, d, J = 8,3 Hz, H-5) ; 6,80 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 6,53 (1H, d, J = 8,3 Hz, H-6) ; 5,05 (1H, s large, N-H) ; 3,92 (3H, s, O-CH₃). **UV-Visible (EtOH 95%)** : λ_{max}(ε) = 236 (375900) ; 278 (210000) ; 326 (153000) ; 458 (69900).

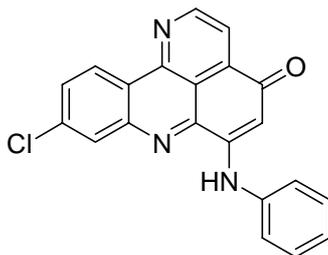
9-Chloro-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (**4**)



Le dérivé **3** (0,327 g, 1,14 mmol) est solubilisé dans un mélange acétonitrile/eau (2/1, v/v). On ajoute au milieu réactionnel sous agitation, un large excès de Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ : CAN (1,997 g, 3,64 mmol). Le milieu réactionnel, une suspension de couleur jaune, devient rapidement translucide quand on ajoute le CAN (phases homogènes). Puis on observe la formation d'un précipité jaune orangé (retour en phases hétérogènes). En fin de réaction, on verse la solution dans un mélange acétate d'éthyle/eau (5/1, v/v). La phase aqueuse est séparée et extraite trois fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies, lavées à l'eau, puis à l'eau saturée en NaCl, séchées et évaporées à sec. Le résidu solide est repris dans un peu d'éther éthylique, filtré puis séché. On recueille le dérivé **4** (0,258 g, 0,96 mmol) avec 80% de rendement.

F = 186-188°C (Litt.², 184-190°C). **RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃)** : δppm = 9,41 (1H, d, J = 4,6 Hz, H-2) ; 9,05 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-11) ; 8,23 (1H, d, J = 2 Hz, H-8) ; 8,19 (1H, d, J = 4,5 Hz, H-3) ; 7,87 (1H, d, J = 10,3 Hz, H-5) ; 7,76 (1H, dd, J = 8,7 Hz et 2 Hz, H-10) ; 6,96 (1H, d, J = 10,3 Hz, H-6). **UV-Visible (EtOH 95%)** : λ_{max}(ε) = 239 (87250) ; 287 (69400) ; 375 (29700).

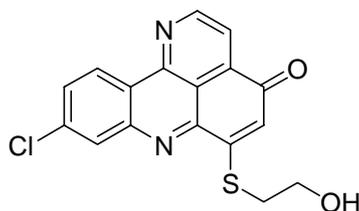
9-Chloro-6-anilino- 4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (5)



La pyridoacridone **4** (0,032 g, 0,120 mmol) est solubilisée dans 15 mL de mélange EtOH / H₂O (4/1). On ajoute un large excès d'aniline (250 μL, 3 mmol) et on chauffe à 60°C pendant 10 j. Après retour à température ambiante, le produit d'addition est extrait avec CH₂Cl₂, la phase organique est lavée à l'eau et séchée avec du sulfate de sodium. Après séchage au dessiccateur, on recueille le produit d'addition **5** (0,034 g, 0,095 mmol) avec un rendement de 79%.

F = 243-245°C. **RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃)** : δppm = 9,35 (1H, d, J = 4,5 Hz, H-2) ; 9,07 (1H, d, J = 8,9 Hz, H-11) ; 8,88 (1H, s, NH) ; 8,26 (1H, d, J = 2,1 Hz, H-8) ; 8,18 (1H, d, J = 4,5 Hz, H-3) ; 7,79 (1H, dd, J = 8,9 Hz et 2,2 Hz, H-10) ; 7,52-7,24 (5H, m, Ar) ; 6,48 (1H, s, H-5). **SM (EI)** : m/z = 357,0 (M⁺).

9-Chloro-6-(2-hydroxyéthylthio)- 4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (7)



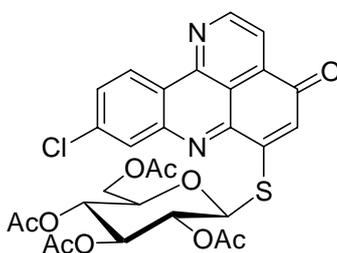
On place dans un ballon la pyridoacridone **4** (0,019 g, 0,075 mmol) partiellement solubilisée dans 5 mL d'éthanol ; puis on ajoute 11 μL (0,15 mmol) de β-mercaptoéthanol. On laisse le milieu réactionnel sous agitation 5 h. On extrait dans un mélange H₂O/AcOEt (10

² N. Fixler, M. Demeunynck, M. C. Brochier, J. Garcia, J. Lhomme. *Magn. Reson. Chem.*, **1997**, 35, 697-700.

mL /10 mL). On rince la phase aqueuse avec 3 fois 10 mL d'acétate d'éthyle ; on regroupe les phases organiques que l'on lave avec 3 fois 10 mL d'eau. Après évaporation du solvant, le précipité est repris dans un mélange Et₂O/Pentane et filtré. On obtient le produit **7** (0,013 g, 0,038 mmol) avec un rendement de 50%.

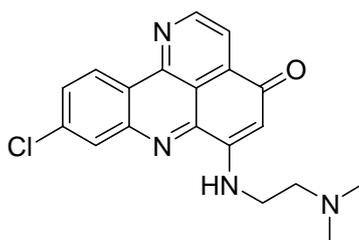
F = 223-225°C. **RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃)** : δppm = 9,38 (1H, d, J = 4,4 Hz, H-2) ; 9,05 (1H, d, J = 9,1 Hz, H-11) ; 8,29 (1H, d, J = 2 Hz, H-8) ; 8,18 (1H, d, J = 4,4 Hz, H-3) ; 7,8 (1H, dd, J = 9,1 Hz et 2,0 Hz, H-10) ; 6,76 (1H, s, H-5) ; 4,06 (2H, t, J = 6,2 Hz, H-1') ; 3,24 (2H, t, J = 6,2 Hz, H-2'). **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** : δppm = 180,1 (C=O) ; 157,6 (C) ; 155,8 (CH) ; 146,3 (C) ; 145,9 (C) ; 135,9 (C) ; 133,9 (C) ; 130,1 (CH) ; 128,9 (CH) ; 127,0 (C) ; 125,4 (CH) ; 123,8 (CH) ; 123,3 (C) ; 120,1 (C) ; 108,1 (C) ; 58,5 (CH₂), 33,2 (CH₂). **SM (EI)** : m/z = 342,0 (M⁺). **SMHR (EI)** : m/z calculée pour C₁₇H₁₁N₂O₂³⁵ClS 342,0229, trouvée 342,0234. **UV-Visible (EtOH 95%)** : λ_{max}(ε) = 230 (13450) ; 282 (8270) ; 377 (4510).

9-Chloro-6-(1-thio-β-D-glucosetétraacétate)- 4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (**8**)



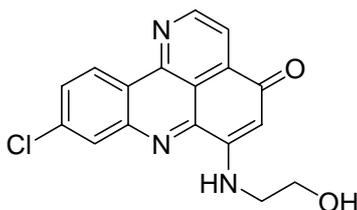
La pyridoacridone **4** (0,037 g, 0,137 mmol) est partiellement solubilisée dans 10 mL d'éthanol. On ajoute au milieu réactionnel le 1-Thio-β-D-Glucose tétraacétate (0,051 g, 0,137 mmol) et on laisse le milieu réactionnel 2 h à température ambiante. On évapore à sec ; le résidu est repris dans 10 mL d'eau, et extrait avec 2 fois 10 mL d'éther puis 3 fois 10 mL d'acétate d'éthyle. Après séchage, la phase AcOEt est évaporée. On reprend le précipité dans un mélange Et₂O-Pentane. On filtre et on obtient le produit d'addition **8** (0,030 g, 0,091 mmol) avec un rendement de 66%.

F = 285-288°C. **RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃)** : δppm = 9,38 (1H, d, J = 4,5 Hz, H-2) ; 9,04 (1H, d, J = 8,9 Hz, H-11) ; 8,31 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 8,17 (1H, d, J = 4,5 Hz, H-3) ; 7,78 (1H, dd, J = 7,2 Hz et 2,0 Hz, H-10) ; 6,76 (1H, s, H-5) ; 5,35 (2H, m, H-1' puis H-3') ; 5,14 (2H, m, H-4' puis H-2') ; 4,22 (2H, m, H-6' et H-6'') ; 3,95 (1H, m, H-5') ; 2,2-2,0 (12H, s, 4 OAc). **SM (DCI)** : m/z = 630,5 ((M+H)⁺).

9-Chloro-6-(2-diméthylamino-éthyl-1-amino)- 4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (10)

La pyridoacridone **4** (0,098 g, 0,367 mmol) est solubilisée dans 42 mL de mélange EtOH / H₂O (4/1). On ajoute un large excès de 2-diméthylamino-1-éthylamine (1,9 mL, 17,3 mmol) et on chauffe à 60°C pendant 1 h. Après évaporation du solvant, on extrait le produit de départ n'ayant pas réagi avec CH₂Cl₂ / H₂O / HCl puis le produit d'addition avec CH₂Cl₂ / H₂O / NaOH. Après séchage au dessiccateur, on recueille le produit d'addition **10** (0,100 g, 0,282 mmol) avec un rendement de 77%.

F = 213-216°C. **RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃)** : δppm = 9,24 (1H, d, J = 4,6 Hz, H-2) ; 8,95 (1H, d, J = 8,8 Hz, H-11) ; 8,18 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 8,10 (1H, d, J = 4,5 Hz, H-3) ; 7,69 (1H, dd, J = 8,8 Hz et 2,0 Hz, H-10) ; 7,65 (1H, t, N-H) ; 5,82 (1H, s, H-5) ; 3,44 (2H, q, J = 5,8 Hz, H-1') ; 2,76 (2H, t, J = 6,1 Hz, H-2') ; 2,38 (6H, s, 2 Me). **SM (DCI)** : m/z = 353,2 ((M+H)⁺). **UV-Visible (EtOH 95%)** : λ_{max}(ε) = 236 (33300) ; 284 (19100) ; 310 (8650) ; 357 (8280) ; 470 (2880).

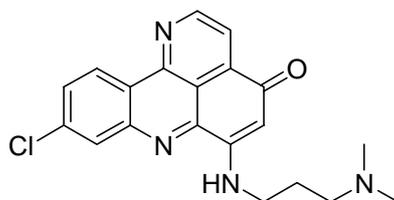
9-Chloro-6-(2-hydroxyéthylamino)- 4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (11)

La pyridoacridone **4** (0,101 g, 0,375 mmol) est solubilisée dans 50 mL de mélange EtOH / H₂O (4/1). On ajoute un large excès d'aminoéthanol (1,14 mL, 18,9 mmol) et on chauffe à 60°C pendant 24 h. On laisse refroidir puis on évapore à sec. On extrait le produit d'addition avec CH₂Cl₂ / H₂O / HCl. Après évaporation du solvant organique et séchage au dessiccateur, on recueille le produit **11** (0,031 g, 0,095 mmol) avec un rendement de 25%.

F = 232-236°C. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆)** : δppm = 9,44 (1H, d, J = 4,59 Hz, H-2) ; 9,05 (1H, d, J = 8,82 Hz, H-11) ; 8,31 (1H, d, J = 2,19 Hz, H-8) ; 8,11 (1H, d, J = 4,50 Hz, H-

3) ; 8,06 (1H, d large, $J = 6,02$ Hz, N-H) ; 7,97 (1H, dd, $J = 8,84$ Hz et 2,19 Hz, H-10) ; 5,93 (1H, s, H-5) ; 5,02 (1H, t, $J = 5,51$ Hz, OH) ; 3,74 (2H, q, $J = 5,63$ Hz, CH₂-OH) ; 3,49 (2H, q, $J \approx 5,9$ Hz, CH₂-NH). **SM (DCI)** : $m/z = 326,1$ ((M+H)⁺). **UV-Visible (EtOH 95%)** : $\lambda_{\max}(\epsilon) = 236$ (21700) ; 283 (12800) ; 310 (5820) ; 357 (5320) ; 467 (2000).

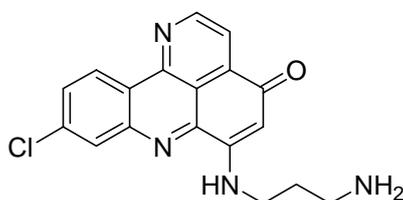
9-Chloro-6-(3-diméthylamino-propyl-1-amino)- 4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (12)



La pyridoacridone **4** (0,020 g, 0,075 mmol) est solubilisée dans 10 mL de mélange EtOH / H₂O (8/2). On ajoute un large excès de 3-diméthylamino-1-propylamine (0,5 mL, 3,97 mmol) et on chauffe à 60°C pendant 15 min. La solution initialement jaune et trouble devient rouge-brun et totalement limpide. On laisse refroidir puis on évapore à sec. On extrait le produit de départ n'ayant pas réagi avec CH₂Cl₂ / H₂O / HCl puis le produit d'addition avec CH₂Cl₂ / H₂O / NaOH. Après évaporation du solvant organique et séchage au dessiccateur, on recueille le produit **12** (0,017 g, 0,047 mmol) avec un rendement de 63%.

F = 225-228°C. **RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃)** : $\delta_{\text{ppm}} = 9,26$ (1H, d, $J = 4,4$ Hz, H-2) ; 8,97 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-11) ; 8,2-8,1 (3H, m, H-8, H-3 et N-H) ; 7,72 (1H, dd, $J = 8,7$ Hz et 2,0 Hz, H-10) ; 5,85 (1H, s, H-5) ; 3,57 (2H, q, $J = 6,2$ Hz, H-1') ; 2,89 (2H, t, $J = 6,2$ Hz, H-3') ; 2,63 (6H, s, 2 Me) ; 2,18 (2H, q, $J = 6,2$ Hz, H-2'). **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** : $\delta_{\text{ppm}} = 181,3$ (C=O) ; 155,7 (CH) ; 152,2 (C) ; 147,2 (C) ; 146,8 (C) ; 146,1 (C) ; 137,2 (C) ; 136,2 (C) ; 130,3 (CH) ; 129,7 (CH) ; 125,6 (CH) ; 124,4 (C) ; 119,8 (CH) ; 115,8 (C) ; 100,1 (CH) ; 56,4 (CH₂) ; 44,1 (CH₂) ; 40,6 (2 CH₃) ; 30,1 (CH₂). **SM (DCI)** : $m/z = 366,9$ ((M+H)⁺). **SMHR (LSIMS, Cs⁺, mNBA)** : m/z (M+H)⁺ calculée pour C₂₀H₂₀N₄O³⁵Cl 367,1326, trouvée 367,1320. **UV-Visible (EtOH 95%)** : $\lambda_{\max}(\epsilon) = 236$ (29800) ; 284 (19200) ; 312 (10600) ; 358 (9930) ; 473 (5320).

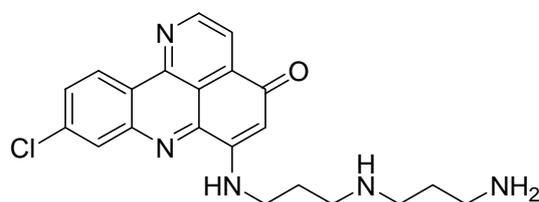
9-Chloro-6-(3-amino-propyl-1-amino)- 4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (13)



La pyridoacridone **4** (0,100 g, 0,375 mmol) est solubilisée dans 50 mL de mélange EtOH / H₂O (4/1). On ajoute un large excès de 1,3-diaminopropane (1,7 mL, 20,4 mmol) et on chauffe à 60°C pendant 3 h. La solution initialement jaune et trouble devient rouge et totalement limpide. On laisse refroidir puis on évapore à sec. On extrait le produit de départ n'ayant pas réagi avec CH₂Cl₂ / H₂O / HCl puis le produit d'addition avec CH₂Cl₂ / H₂O / NaOH. Après évaporation du solvant organique et séchage au dessiccateur, on recueille le produit **13** (0,061 g, 0,181 mmol) avec un rendement de 49%.

F = 169-174°C. **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)** : δppm = 9,33 (1H, d, J = 4,62 Hz, H-2) ; 9,06 (1H, d, J = 8,70 Hz, H-11) ; 8,21-8,19 (2H, m, H-8 et H-3) ; 7,86 (1H, m large, N-H) ; 7,77 (1H, dd, J = 8,70 Hz et 2,07 Hz, H-10) ; 5,93 (1H, s, H-5) ; 3,53 (2H, q, J = 6,36 Hz, H-1') ; 2,99 (2H, t, J = 6,53 Hz, H-3') ; 1,97 (2H, quint, J = 6,75 Hz, H-2'). **SM (DCI)** : m/z = 339,0 ((M+H)⁺). **UV-Visible (EtOH 95%)** : λ_{max}(ε) = 236 (31500) ; 284 (18300) ; 311 (8240) ; 357 (7830) ; 470 (2610).

9-Chloro-6-[(3-(amino-propylamino)-propyl)amino]-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one
(14)

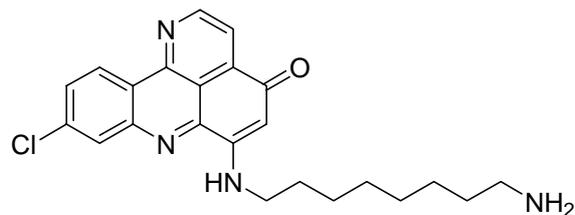


La pyridoacridone **4** (19,8 mg, 0,073 mmol) est solubilisée dans 15 mL de mélange EtOH / H₂O (4/1). On ajoute un large excès de bis(3-aminopropyl)amine (0,50 mL, 3,57 mmol) et on chauffe à 60°C pendant 1 h. On évapore à sec. On extrait avec CH₂Cl₂ / H₂O / HCl la pyridoacridone qui n'a pas réagi puis avec CH₂Cl₂ / H₂O / NaOH le produit d'addition. On filtre puis on lave avec de l'eau saturée. Après séchage au dessiccateur, on recueille le produit d'addition **14** (20,2 mg, 0,051 mmol) avec un rendement de 70%.

F = 75-78°C. **RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃)** : δppm = 9,32 (1H, d, J = 4,5 Hz, H-2) ; 9,06 (1H, d, J = 8,8 Hz, H-11) ; 8,20 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 8,19 (1H, d, J = 4,6 Hz, H-3) ; 8,09 (1H, N-H) ; 7,77 (1H, dd, J = 8,7 Hz et 2,0 Hz, H-10) ; 5,91 (1H, s, H-5) ; 3,56-3,47 (2H, m) ; 2,90-2,75 (6H, m) ; 1,99 (2H, quint, J = 6,3 Hz et 6,5 Hz) ; 1,76 (2H, quint, J = 6,9 Hz). **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** : δppm = 181,0 (C=O) ; 155,7 (CH) ; 147,2 (C) ; 147,0 (C) ; 146,8 (C)

; 146,3 (C) ; 136,9 (C) ; 136,5 (C) ; 129,9 (CH) ; 129,3 (CH) ; 125,7 (CH) ; 124,4 (C) ; 119,8 (CH) ; 115,8 (C) ; 99,7 (C) ; 48,7 (CH₂) ; 48,4 (CH₂) ; 42,1 (CH₂) ; 40,9 (CH₂) ; 34,1 (CH₂) ; 29,9 (CH₂). **SM (DCI)** : m/z = 396,2 ((M+H)⁺). **SMHR (électrospray)** : m/z (M+H)⁺ calculée pour C₂₁H₂₃N₅O³⁵Cl 396,1591, trouvée 396,1597. **UV-Visible (EtOH 95%)** : λ_{max}(ε) = 236 (29900) ; 284 (17500) ; 312 (8010) ; 358 (7640) ; 473 (2890).

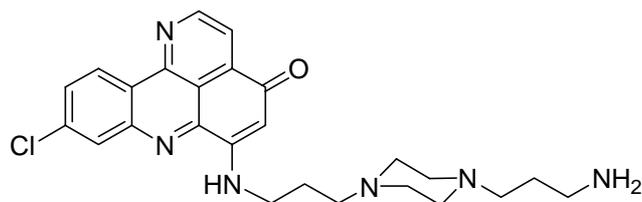
9-Chloro-6-[8-amino-octyl-1-amino]-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (15)



La pyridoacridone **4** (0,100 g, 0,375 mmol) est solubilisée dans 50 mL de mélange EtOH / H₂O (4/1). On ajoute un large excès de 1,8-diaminooctane (2,52 g, 17,4 mmol) et on chauffe à 60°C pendant 1h30. La solution initialement jaune et trouble devient rouge et totalement limpide. On laisse refroidir puis on évapore à sec. On extrait le produit de départ n'ayant pas réagi avec CH₂Cl₂ / H₂O / HCl puis le produit d'addition avec CH₂Cl₂ / H₂O / NaOH. Après évaporation du solvant organique et séchage au dessiccateur, on recueille le produit **15** (0,110 g, 0,268 mmol) avec un rendement de 72%.

F = 125-130°C. **RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD)** : δppm = 9,17 (1H, d, J = 4,47 Hz, H-2) ; 8,84 (1H, d, J = 8,70 Hz, H-11) ; 8,09 (1H, d, J = 2,16 Hz, H-8) ; 7,97 (1H, d, J = 4,47 Hz, H-3) ; 7,70 (1H, dd, J = 8,82 Hz et 2,16 Hz, H-10) ; 5,73 (1H, s, H-5) ; 3,35 (2H, t, J = 7,23 Hz, CH₂) ; 2,56 (4H, dt, J = 7,20 Hz et 1,83 Hz, 2 CH₂) ; 1,72 (2H, quint, J = 7,20 Hz, CH₂) ; 1,41-1,18 (10H, m, 5 CH₂). **SM (DCI)** : m/z = 409,2 ((M+H)⁺).

9-Chloro-6-[3-(4-(3-aminopropyl)pipérazin-1-yl)propylamino]-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (16)

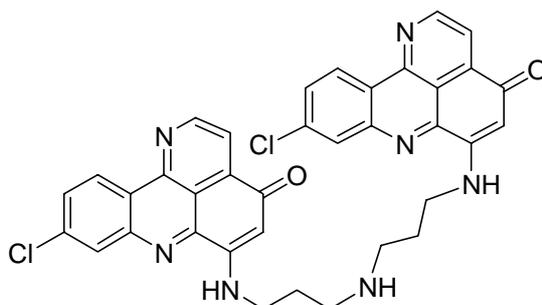


La pyridoacridone **4** (74,4 mg, 0,279 mmol) est solubilisée dans 50 mL de mélange EtOH / H₂O (4/1). On ajoute un large excès de N,N'-bis(3-aminopropyl)piperazine (1,4 mL,

6,80 mmol) et on chauffe à 60°C pendant 1h15. On évapore à sec. On extrait avec CH₂Cl₂ / H₂O / HCl la pyridoacridone qui n'a pas réagi puis avec CH₂Cl₂ / H₂O / NaOH le produit d'addition. On filtre puis on lave avec de l'eau saturée en NaCl. Après séchage au dessiccateur, on recueille le produit **16** (78,7 mg, 0,169 mmol) avec un rendement de 61%.

F = 129-132°C. **RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃)** : δppm = 9,33 (1H, d, J = 4,5 Hz, H-2) ; 9,07 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-11) ; 8,34 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 8,20 (1H, d, J = 4,5 Hz, H-3) ; 7,96 (1H, t déformé, N-H) ; 7,77 (1H, dd, J = 8,7 Hz et 2,0 Hz, H-10) ; 5,93 (1H, s, H-5) ; 3,50 (2H, q, J = 6,1 Hz, CH₂) ; 2,79 (2H, t, J = 7,0 Hz, CH₂) ; 2,63 (8H, s large, 4 CH₂ pipérazine) ; 2,58 (2H, t, J = 6,1 Hz, CH₂) ; 2,54 (2H, t, J = 7,0 Hz, CH₂) ; 1,98 (2H, quint, J = 6,1 Hz, CH₂) ; 1,68 (2H, quint, J = 7,0 Hz, CH₂). **SM (DCI)** : m/z = 465,0 ((M+H)⁺).

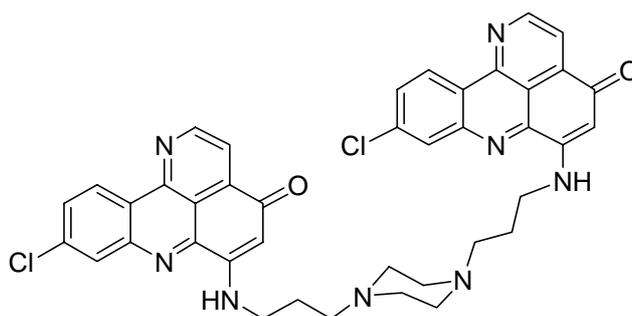
N,N-Bis-[3-(9-chloro-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one-6-yl)]aminopropyl]amine (17)



La pyridoacridone **4** (3,2 mg, 0,012 mmol) est solubilisée dans 6 mL de mélange EtOH / H₂O (5/1). On ajoute un équivalent de **14** (4,9 mg, 0,012 mmol) et on chauffe à 60°C pendant 4 j. On laisse la solution précipiter à 0°C. On filtre le précipité formé, qui est lavé avec de l'eau saturée en NaCl. Après séchage au dessiccateur, on recueille le produit **17** (4,0 mg, 0,006 mmol) avec un rendement de 51%.

F = 183-185°C. **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)** : δppm = 9,23 (2H, d, J = 4,5 Hz, H-2) ; 8,84 (2H, d, J = 8,7 Hz, H-11) ; 8,06 (2H, d, J = 4,5 Hz, H-3) ; 8,03 (2H, d, J = 1,8 Hz, H-8) ; 7,74 (2H, s, N-H) ; 7,57 (2H, dd, J = 8,7 Hz et 1,8 Hz, H-10) ; 5,78 (2H, s, H-5) ; 3,54 (4H, q, J = 5,9 Hz, CH₂) ; 2,98 (4H, t, J = 6,2 Hz, CH₂) ; 2,09 (4H, quint, J = 6,3 Hz, CH₂). **SM (EI)** : m/z = 659,3 (M⁺). **SMHR (electrospray)** : m/z (M+H)⁺ calculée pour C₃₆H₂₈N₇O₂³⁵Cl₂ 660,1682, trouvée 660,1681.

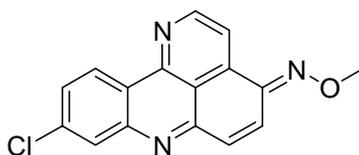
N-1,N-3-Bis-[3-(9-chloro-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one-6-yl)]aminopropyl]pipérazine (18)



La pyridoacridone **4** (20,3 mg, 0,076 mmol) est solubilisée dans 35 mL de mélange EtOH / H₂O (5/1). On ajoute un équivalent de **16** (35,5 mg, 0,076 mmol) et on chauffe à 60°C pendant 10 j. On laisse la solution précipiter à 0°C. On filtre le précipité formé, qui est lavé avec de l'eau saturée en NaCl. Le solide est ensuite recristallisé dans CHCl₃. Après séchage au dessiccateur, on recueille le produit **18** (50,8 mg, 0,070 mmol) avec un rendement de 91%.

RMN ¹H (300 MHz, TFA-d) : δppm = 9,55 (1H, d, J = 5,6 Hz, H-2) ; 8,89 (2H, d, J = 8,9 Hz, H-11) ; 8,82 (2H, d, J = 5,6 Hz, H-3) ; 8,45 (2H, s, H-8) ; 8,11 (2H, d, J = 8,7 Hz, H-10) ; 6,05 (2H, s, H-5) ; 4,13 (2H, CH₂ pipérazine) ; 3,98 (2H, CH₂) ; 3,78 (2H, CH₂ pipérazine) ; 3,31 (2H, CH₂) ; 2,53 (2H, CH₂). **SM (électrospray)** : m/z = 729,2 ((M+H)⁺).

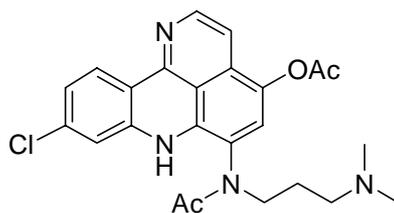
9-Chloro-4-méthoxyimino-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (**19**)



A une solution de pyridoacrine **4** (0,050 g, 0,187 mmol) dans 25 mL de mélange EtOH/H₂O (4/1), est ajouté un excès de chlorhydrate de méthoxyamine (1,5 g, 18,0 mmol). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à 60°C pendant une journée. L'éthanol est évaporé sous vide, le résidu est dilué dans l'eau et extrait avec du CH₂Cl₂. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et le solvant évaporée à sec. Le solide obtenu est repris dans du pentane puis filtré ; et le produit **19** (0,026 g, 0,088 mmol) est isolé avec 47% de rendement.

F = 214-216°C. **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)** : δppm = 9,09 (1H, d, J = 5,0 Hz, H-2) ; 8,94 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-11) ; 8,21 (1H, d, J = 5,0 Hz, H-3) ; 8,10 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 7,65 (1H, dd, J = 8,7 Hz et 2,0 Hz, H-10) ; 7,60 (1H, d, J = 10,1 Hz, H-5) ; 7,60 (1H, d, J = 10,1 Hz, H-6) ; 4,24 (3H, s, CH₃). **SM (DCI(-))** : m/z = 295,1 (M⁺). **HRMS (EI)** : m/z calculée pour C₁₆H₁₀N₃O³⁵Cl 295,0512, trouvée 295,0481.

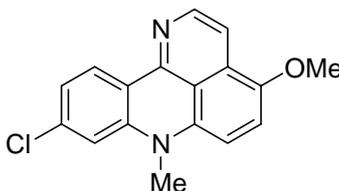
9-Chloro-4-acétoxy-6-[N-acétyl-N-(3-diméthylaminopropyl)amine]-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (20)



Le composé **12** (0,0224 g, 0,061 mmol) est mis en solution dans 5mL d'anhydride acétique puis on ajoute la poudre de zinc (0,082 g, 1,25 mmol). On laisse sous agitation 2 h puis on dilue le brut réactionnel avec 100 mL de CH₂Cl₂ et 30mL d'eau saturée en NaCl. La phase organique est séparée puis évaporée à sec. On reprend le solide avec du pentane et on filtre. On recueille 12,8 mg (0,028 mmol) de produit **20** avec un rendement de 46%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δppm = 8,42 (1H, d, J = 8,8 Hz, H-11) ; 8,32 (1H, d, J = 6,0 Hz, H-2) ; 7,54 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 7,43 (1H, s, H-5) ; 7,28 (1H, d, J = 5,9 Hz, H-3) ; 7,17 (1H, dd, J = 8,7 Hz et 2,0 Hz, H-10) ; 3,71-3,66 (2H, m, CH₂) ; 3,60-3,55 (2H, m, CH₂) ; 2,77 (2H, t, J = 7,9 Hz, CH₂) ; 2,53 (6H, s, 2 Me) ; 2,44 (3H, s, Ac) ; 1,95 (3H, s, Ac). **SM (EI)** : m/z = 452,2 (M⁺).

9-Chloro-4-méthoxy-7-méthyl-pyrido[4,3,2-kl]acridine (21)

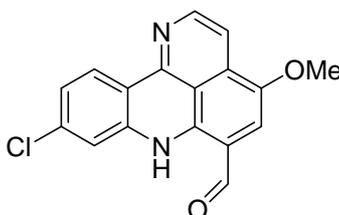


Un peu plus d'un équivalent de NaH (0,008 g, 0,20 mmol) est ajouté à une solution du composé **3** (0,054 g, 0,19 mmol) dans le DMF (5 mL). Après l'ajout de l'iodure de méthyle (24 μL, 0,38 mmol), le mélange est agité 1h30 à température ambiante. Le produit est précipité par addition de 200 mL de H₂O. Le solide formé est filtré puis lavé à l'eau. Le composé **21** (0,043 g, 0,145 mmol) est ainsi obtenu avec 76% de rendement.

F = 221-222°C. **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)** : δppm = 8,55 (1H, d, J = 8,5 Hz, H-11) ; 8,35 (1H, d, J = 5,8 Hz, H-2) ; 7,52 (1H, d, J = 5,8 Hz, H-3) ; 7,12 (1H, d, J = 1,7 Hz, H-8) ; 7,04 (1H, dd, J = 8,5 et 1,7 Hz, H-10) ; 7,01 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-5) ; 6,65 (1H, d, J = 8,6 Hz, H-6) ; 3,96 (3H, s, O-CH₃) ; 3,47 (3H, s, N-CH₃). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆)** : δppm =

149,0 (C) ; 144,9 (C) ; 143,9 (CH) ; 142,7 (C) ; 136,6 (C) ; 134,2 (C) ; 127,9 (C) ; 126,3 (CH) ; 120,2 (CH) ; 119,4 (C) ; 119,3 (C) ; 113,5 (CH) ; 111,1 (CH) ; 110,8 (CH) ; 104,7 (CH) ; 55,7 (CH₃) ; 33,3 (CH₃). **SMHR (electrospray)** : m/z (M+H)⁺ calculée pour C₁₇H₁₄N₂O³⁵Cl 297,0795, trouvée 297,0798.

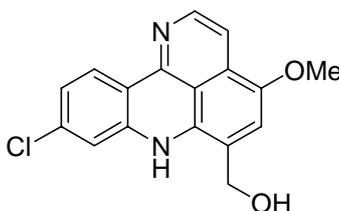
9-Chloro-6-formyl-4-méthoxy-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (25)



La pyridoacridine **3** (0,200 g, 0,72 mmol) est solubilisée dans 20 mL de CH₂Cl₂ et on ajoute un large excès de mélange DMF (8,2 mL, 105 mmol) – POCl₃ (9,9 mL, 106 mmol). On laisse à reflux (60°C) pendant 24 h puis on neutralise avec 38 mL de NaOH 10M dans de la glace. On porte à nouveau le milieu réactionnel à 60°C pendant 15 min puis on ajoute 30 mL d'eau et on extrait avec 1000 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, et évaporée à sec. Le résidu est repris dans du pentane et filtré. On obtient l'aldéhyde **25** (0,188 g, 0,605 mmol) pur avec un rendement de 84%.

F = 248-252°C. **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)** : δppm = 12,29 (1H, s, N-H) ; 9,80 (1H, s, ArCHO) ; 8,59 (1H, d, J = 5,8 Hz, H-2) ; 8,57 (1H, d, J = 8,3 Hz, H-11) ; 7,57 (1H, d, J = 5,8 Hz, H-3) ; 7,24 (1H, d, J = 1,8 Hz, H-8) ; 7,19 (1H, dd, J = 8,6 and 1,9 Hz, H-10) ; 6,99 (1H, s, H-5) ; 3,94 (3H, s, O-CH₃). **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** : δppm = 191,2 (CO) ; 151,1 (C) ; 149,2 (CH) ; 145,1 (C) ; 138,6 (C) ; 138,4 (C) ; 138,0 (C) ; 134,5 (C) ; 126,6 (CH) ; 124,0 (CH) ; 120,2 (C) ; 118,7 (C) ; 116,6 (CH) ; 112,2 (CH) ; 110,2 (CH) ; 109,7 (C) ; 56,1 (CH₃). **SM (FAB+)** : m/z = 310 (M+H⁺). **HRMS (EI)** : m/z calculée pour C₁₇H₁₁N₂O₂³⁵Cl 310,0509, trouvée 310,0498.

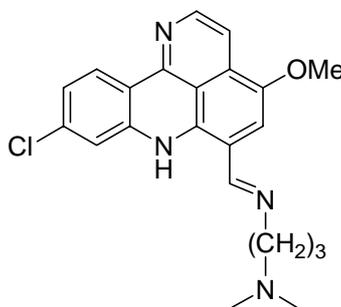
9-Chloro-6-hydroxyméthyl-4-méthoxy-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (26)



L'aldéhyde **25** (91,0 mg, 0,33 mmol) est solubilisé dans 85 mL de MeOH. On laisse sous agitation environ trente minutes puis on ajoute NaBH₄ (111 mg, 2,93 mmol). On laisse sous agitation 2h30 à température ambiante et on fait précipiter le produit de réaction par ajout de 120 mL d'eau. Le solide est filtré, lavé avec de l'eau puis séché au dessiccateur. On obtient le produit **26** (67,6 mg, 0,22 mmol) avec un rendement de 75%.

F = 190°C déc. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆)** : δppm = 9,46 (1H, s, N-H) ; 8,27 (1H, d, J = 8,3 Hz, H-11) ; 8,16 (1H, d, J = 5,9 Hz, H-2) ; 7,45 (1H, d, J = 1,9 Hz, H-8) ; 7,24 (1H, d, J = 5,9 Hz, H-3) ; 7,28 (1H, s, H-5) ; 6,99 (1H, dd, J = 8,3 et 2,0 Hz, H-10) ; 5,28 (1H, t, J = 5,3 Hz, OH) ; 4,66 (2H, d, J = 5,3 Hz, CH₂) ; 3,94 (3H, s, O-CH₃). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆)** : δppm = 150,2 (C) ; 144,1 (C) ; 143,3 (CH) ; 141,8 (C) ; 135,7 (C) ; 129,3 (C) ; 126,9 (C) ; 126,0 (CH) ; 120,3 (CH) ; 119,2 (C) ; 118,2 (C) ; 117,3 (C) ; 115,1 (CH) ; 111,4 (CH) ; 110,9 (CH) ; 59,5 (CH₂) ; 55,8 (CH₃). **SM (FAB+)** : m/z = 312 (M+H⁺). **SMHR (LSIMS, Cs⁺, mNBA)** : m/z (M+H)⁺ calculée pour C₁₇H₁₄N₂O₂³⁵Cl 313,0744, trouvée 313,0745.

9-Chloro-6-[(N,N-diméthylamino)propyl]imino-méthylène]-4-méthoxy-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (27**)**

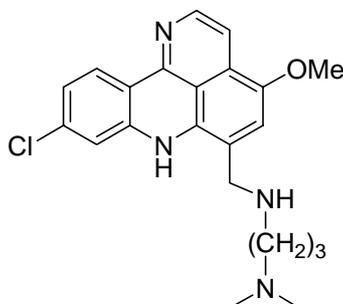


On solubilise l'aldéhyde **25** (46,9 mg, 0,151 mmol) dans 30 mL de dichlorométhane anhydre. On ajoute 15 équivalents de diméthylpropylamine (250 µL, 2,33 mmol) et du Na₂SO₄ (2 g, 14,1 mmol) pour piéger l'eau formée au cours de la formation de l'imine. La réaction se déroule sous azote pendant 30 h. On ajoute 100 mL de CH₂Cl₂ puis filtre le milieu réactionnel, on évapore à sec le filtrat et on recueille l'imine **27** (45,7 mg, 0,116 mmol) avec un rendement de 77%.

F = 125-126°C. **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)** : δppm = 8,55 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-11) ; 8,50 (1H, d, J = 5,8 Hz, H-2) ; 8,44 (1H, s, N=CH) ; 7,54 (1H, d, J = 5,8 Hz, H-3) ; 7,15 (1H, dd, J = 2,0 et 8,4 Hz, H-10) ; 7,11 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 6,94 (1H, s, H-5) ; 3,97 (3H, s, O-CH₃)

; 3,74 (2H, t, J = 6,7 Hz, CH₂-1') ; 2,50 (2H, t, J = 7,4 Hz, CH₂-3') ; 2,31 (6H, s, 2 Me) ; 1,98 (2H, quint, CH₂-2'). **SM (EI)** : m/z = 393,9 (M⁺).

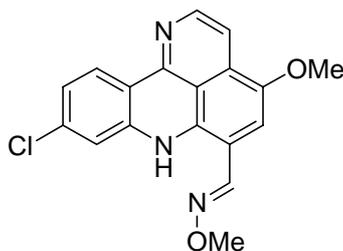
9-Chloro-6-(((N,N-diméthylamino)propyl)amino-méthyl)-4-méthoxy-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (28)



On solubilise l'aldéhyde **25** (52,0 mg, 0,167 mmol) dans 50 mL de méthanol anhydre. On place le ballon de réaction sous azote et on ajoute la diméthylaminopropylamine (1 mL, 9,32 mmol) et du Na₂SO₄ (2 g, 14,1 mmol). Au bout de 24 h, on ajoute du MeOH saturé en HCl(g) jusqu'à obtenir un pH = 6 après quoi on ajoute NaBH₃CN (0,212 g, 3,37 mmol). On traite la réaction après 24 h en ajoutant 400 mL d'eau. On évapore le méthanol et on extrait la phase aqueuse au CH₂Cl₂. Après lavage de la phase organique à l'eau et séchage au sulfate de sodium anhydre, on évapore à sec et on recueille l'amine **28** (56,8 mg, 0,143 mmol) avec 85% de rendement.

F = 175°C. **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)** : δppm = 8,36 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-11) ; 8,22 (1H, d, J = 5,9 Hz, H-2) ; 7,38 (1H, d, J = 6,0 Hz, H-3) ; 6,97 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 6,93 (1H, m, H-10) ; 6,80 (1H, s, H-5) ; 4,05 (2H, s, CH₂-4') ; 3,92 (3H, s, O-CH₃) ; 2,75 (2H, t, J = 6,7 Hz, CH₂-1') ; 2,40 (2H, t, J = 7,0 Hz, CH₂-3') ; 2,24 (6H, s, 2 Me) ; 1,75 (2H, quint, J = 6,9 Hz, CH₂-2'). **SM (EI)** : m/z = 396,2 (M⁺).

9-Chloro-4-méthoxy-6-(méthoxyimino-méthylène)- 7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (29)



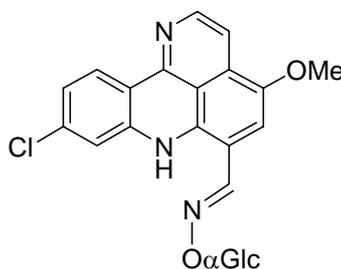
L'aldéhyde **25** (15,0 mg, 0,049 mmol) est solubilisé dans 2 mL de MeOH anhydre et on ajoute le chlorhydrate de méthoxyamine (4,2 mg, 0,049 mmol) . On place le mélange à

reflux (70°C) pendant 2 h puis on ajoute 10 mL d'eau et on extrait avec 50 mL de dichlorométhane. On évapore à sec et on filtre après trituration dans du pentane. On obtient le produit **29** (11,2 mg, 0,033 mmol) avec 68% de rendement.

F = 221-224°C. **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)** : δppm = 10,93 (1H, s, N-H) ; 8,51 (1H, d, J = 7,6 Hz, H-11) ; 8,33 (1H, d, J = 6,0 Hz, H-2) ; 8,20 (1H, s, ArCH=N) ; 7,44 (1H, d, J = 5,9 Hz, H-3) ; 7,07 (1H, dd, J = 8,6 et 1,9 Hz, H-10) ; 6,95 (1H, d, J = 1,9 Hz, H-8) ; 6,74 (1H, s, H-5) ; 4,04 (3H, s, O-CH₃) ; 3,88 (3H, s, N-O-CH₃). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆)** : δppm = 149,9 (C) ; 149,6 (CH) ; 145,7 (CH) ; 144,4 (C) ; 140,0 (C) ; 136,2 (C) ; 131,5 (C) ; 129,4 (C) ; 126,1 (CH) ; 122,0 (CH) ; 118,8 (C) ; 118,6 (C) ; 116,0 (CH) ; 111,3 (CH) ; 110,9 (CH) ; 105,5 (C) ; 62,1 (CH₃) ; 55,8 (CH₃). **SM (EI)** : m/z = 339,1 (M⁺). **SMHR (EI)** : m/z calculée pour C₁₈H₁₄N₃O₂³⁵Cl 339,0774, trouvée 339,0765.

Protocole de conjugaison Pyridoacridine – Sucre :

9-Chloro-4-méthoxy-6-(α-D-glucopyranosyliminométhylène)-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (**30**)



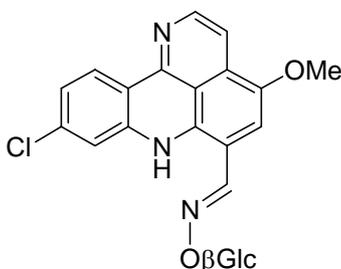
A un mélange d'aldéhyde **25** (0,0218 g, 0,070 mmol) et de α-D-glucopyranosyl-oxyamine³ (0,0157 g, 0,081 mmol) en solution dans 4 mL de MeOH anhydre, sont ajoutés 10 μL de MeOH/HCl(g) pour ajuster le pH à 4. Après 23 heures au reflux du méthanol, le solvant est évaporé sous vide et le brut réactionnel est purifié par CLHP semi-préparative. Le conjugué **30** (0,0321 g, 0,066 mmol) est obtenu après lyophilisation avec un rendement de 94%.

F = 213-216°C. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆)** : δppm = 11,10 (1H, s, NH) ; 8,80 (1H, s, ArCHN) ; 8,44 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-11) ; 8,28 (1H, d, J = 6,1 Hz, H-2) ; 7,66 (1H, s, H-8) ;

³ O. Renaudet, P. Dumy. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 7575-7578.

7,54 (1H, s, H-5) ; 7,47 (1H, d, J = 6,1 Hz, H-3) ; 7,25 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-10) ; 5,81 (1H, d, J = 8,0 Hz) ; 3,94 (3H, s, Me) ; 3,65-3,17 (6H, m). **SM (ESI)** : m/z = 488,1 (M+H)⁺.

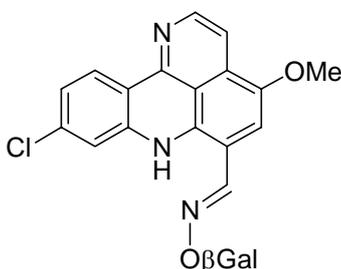
9-Chloro-4-méthoxy-6-(β-D-glucopyranosyliminométhylène)-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (31)



Nous avons suivi le même mode opératoire que pour le produit **30**. Nous avons mis en réaction l'aldéhyde **25** (0,0252 g, 0,081 mmol) et l'β-D-glucopyranosyl-oxyamine³ (0,0179 g, 0,092 mmol). La réaction a duré 19 heures et le conjugué **31** (0,0134 g, 0,028 mmol) a été obtenu avec un rendement de 32%.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) : δppm = 11,10 (1H, s, NH) ; 8,78 (1H, s, ArCHN) ; 8,29 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-11) ; 8,33 (1H, d, J = 6,1 Hz, H-2) ; 7,60 (1H, s, H-8) ; 7,54 (1H, s, H-5) ; 7,50 (1H, d, J = 6,1 Hz, H-3) ; 7,28 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-10) ; 5,23 (1H, d, J = 8,0 Hz) ; 3,96 (3H, s, Me) ; 3,75 (1H, d, J = 11,5 Hz) ; 3,55-3,15 (5H, m). **SM (ESI)** : m/z = 488,1 (M+H)⁺.

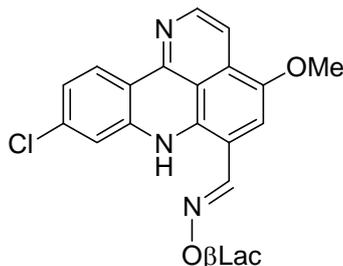
9-Chloro-4-méthoxy-6-(β-D-galactopyranosyliminométhylène)-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (32)



Nous avons suivi le même mode opératoire que pour le produit **30**. Nous avons mis en réaction l'aldéhyde **25** (0,0118 g, 0,038 mmol) et le β-D-galactopyranosyl-oxyamine³ (0,0086 g, 0,045 mmol). La réaction a duré 24 heures et le conjugué **32** (0,0133 g, 0,027 mmol) a été obtenu avec un rendement de 60%.

F = 179-181°C. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆)** : δppm = 8,74 (1H, s, ArCH=N) ; 8,41 (1H, d, J = 8,6 Hz, H-11) ; 8,29 (1H, d, J = 6,0 Hz, H-2) ; 7,61 (1H, s, H-5) ; 7,51 (1H, s, H-8) ; 7,48 (1H, d, J = 6,0 Hz, H-3) ; 7,26 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-10) ; 5,12 (1H, d, J = 8,1 Hz, H-1') ; 3,95 (4H, m, OMe et H-2') ; 3,77 (1H, d large, J = 3,2 Hz, H-4') ; 3,72-3,65 (3H, m, H-5', H-6' et H-6'') ; 3,50 (1H, m, H-3'). **SM (EI)** : m/z = 487,1 (M⁺).

9-Chloro-4-méthoxy-6-(β-D-lactosyliminométhylène)-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (33)

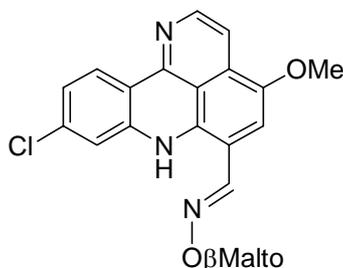


Nous avons suivi le même mode opératoire que pour le produit **30**. Nous avons mis en réaction l'aldéhyde **25** (0,0143 g, 0,046 mmol) et le β-D-lactosyl-oxyamine³ (0,0187 g, 0,052 mmol). La réaction a duré 25 heures et le conjugué **33** (0,0221 g, 0,030 mmol) a été obtenu avec un rendement de 66%.

F = 206-208°C. **RMN ¹H(300 MHz, DMSO-d₆)** : δppm = 11,01 (1H, s, NH) ; 8,79 (1H, s, ArCHN) ; 8,43 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-11) ; 8,37 (1H, d, J = 6,0 Hz, H-2) ; 7,60 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 7,51 (1H, d, J = 6,0 Hz, H-3) ; 7,50 (1H, s, H-5) ; 7,26 (1H, dd, J = 8,7 et 2,0 Hz, H-10) ; 5,32 (1H, d, J = 8,0 Hz) ; 4,26 (1H, d, J = 6,8 Hz) ; 3,95 (3H, s, Me) ; 3,82-3,20 (12H, m). **SM (ESI)** : m/z = 650,2 (M+H)⁺.

9-Chloro-4-méthoxy-6-(β-D-maltotriosyliminométhylène)-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine

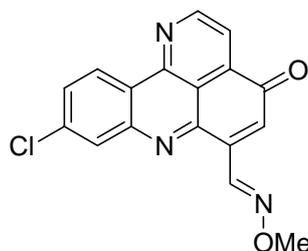
(34)



Nous avons suivi le même mode opératoire que pour le produit **30**. Nous avons mis en réaction l'aldéhyde **25** (0,0140 g, 0,045 mmol) et le β -D-maltotriosyl-oxyamine⁴ (0,0270 g, 0,052 mmol). La réaction a duré 19 heures et le conjugué **34** (0,0235 g, 0,024 mmol) a été obtenu avec un rendement de 53%.

F = 205-210°C. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆)** : δ ppm = 10,94 (1H, s, NH) ; 8,78 (1H, s, ArCHN) ; 8,44 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-11) ; 8,40 (1H, d, J = 5,9 Hz, H-2) ; 7,57 (1H, d, J = 1,8 Hz, H-8) ; 7,50 (1H, d, J = 5,9 Hz, H-3) ; 7,46 (1H, s, H-5) ; 7,24 (1H, dd, J = 8,7 et 1,8 Hz, H-10) ; 5,27 (1H, d, J = 8,2 Hz) ; 5,09 (1H, d, J = 4,0 Hz) ; 5,01 (1H, d, J = 3,7 Hz) ; 3,95 (3H, s, Me) ; 3,77-3,04 (18H, m). **SM (ESI)** : m/z = 812,2 (M+H)⁺.

9-Chloro-6-(méthoxyimino-méthylène)-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (35)



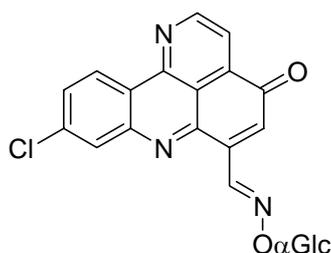
Le dérivé **29** (0,0232 g, 0,0683 mmol) est solubilisé dans 18 mL de mélange acétonitrile/eau (2/1, v/v). On ajoute au milieu réactionnel sous agitation le CAN (0,137 g, 0,250 mmol). Après cinq minutes, le produit est extrait au CH₂Cl₂, les phases organiques sont réunies, lavées à l'eau, séchées et évaporées à sec. Le résidu solide est repris dans du pentane, filtré puis séché au dessiccateur. On recueille le dérivé **35** (0,0135 g, 0,0436 mmol) avec 61% de rendement.

F = 235-240°C. **RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃)** : δ ppm = 9,41 (1H, d, J = 4,5 Hz, H-2) ; 9,09 (1H, s, HC=N) ; 9,06 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-11) ; 8,25 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 8,20 (1H, d, J = 4,5 Hz, H-3) ; 7,79 (1H, dd, J = 8,7 Hz et 2,0 Hz, H-10) ; 7,46 (1H, s, H-5) ; 4,13 (3H, s, Me). **SM (DCI)** : m/z = 324,0 (M+H)⁺.

Protocole de déméthylation oxydative des conjugués Pyridoacridine – Sucre :

9-Chloro-6-(α -D-glucopyranosyliminométhylène)-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (36)

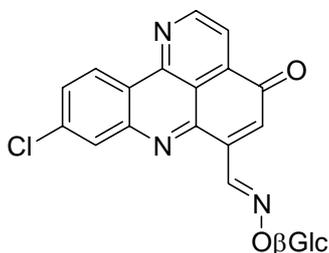
⁴ O. Renaudet, P. Dumy. Résultats non publiés.



Au conjugué **30** (0,0075 g, 0,0153 mmol), dissous dans 5 mL de mélange acétonitrile/eau (2/1) est ajouté le CAN (0,034 g, 0,062 mmol). La solution est laissée sous agitation à température ambiante pendant 15 minutes puis placée une heure à froid (2-4°C). Le précipité obtenu est collecté par filtration, lavé avec Et₂O et le produit **36** (0,006 g, 0,0127 mmol) est isolé avec un rendement de 83%.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) : δppm = 9,55 (1H, d, J = 4,6 Hz, H-2) ; 9,12 (1H, s, ArCHN) ; 9,04 (1H, d, J = 8,8 Hz, H-11) ; 8,43 (1H, d, J = 1,9 Hz, H-8) ; 8,23 (1H, d, J = 4,6 Hz, H-3) ; 7,98 (1H, dd, J = 8,8 et 1,9 Hz, H-10) ; 7,27 (1H, s, H-5) ; 5,56 (1H, d, J = 3,7 Hz) ; 3,64-3,19 (6H, m). **SM (ESI)** : m/z = 471,9 (M+H)⁺.

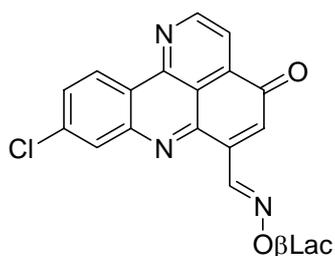
9-Chloro-6-(β-D-glucopyranosyliminométhylène)-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (**37**)



Nous avons suivi le même mode opératoire que pour **36**. Nous avons mis en réaction le produit **31** (0,0045 g, 0,0092 mmol) et le CAN (0,020 g, 0,037 mmol). Le conjugué **37** (0,0034 g, 0,0072 mmol) a été obtenu avec un rendement de 78%.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) : δppm = 9,57 (1H, d, J = 4,6 Hz, H-2) ; 9,12 (1H, s, ArCHN) ; 9,09 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-11) ; 8,44 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 8,25 (1H, d, J = 4,6 Hz, H-3) ; 8,00 (1H, dd, J = 8,7 et 2,0 Hz, H-10) ; 7,28 (1H, s, H-5) ; 5,07 (1H, d, J = 8,1 Hz) ; 3,73-3,17 (6H, m). **SM (ESI)** : m/z = 472,0 (M+H)⁺.

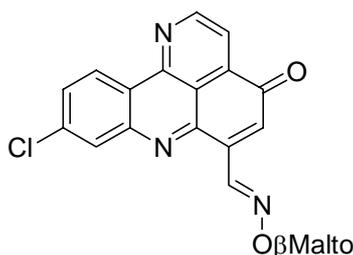
9-Chloro-6-(β-D-lactosyliminométhylène)-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (**38**)



Nous avons suivi le même mode opératoire que pour **36**. Nous avons mis en réaction le produit **33** (0,0075 g, 0,0152 mmol) et le CAN (0,036 g, 0,066 mmol). Le conjugué **38** (0,0077 g, 0,0122 mmol) a été obtenu avec un rendement de 80%.

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) : δ ppm = 9,56 (1H, d, $J = 4,6$ Hz, H-2) ; 9,12 (1H, s, ArCHN) ; 9,07 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-11) ; 8,43 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8) ; 8,24 (1H, d, $J = 4,6$ Hz, H-3) ; 7,99 (1H, dd, $J = 8,8$ et $2,0$ Hz, H-10) ; 7,27 (1H, s, H-5) ; 5,17 (1H, d, $J = 8,2$ Hz) ; 4,25 (1H, d, $J = 7,1$ Hz) ; 3,79-3,33 (14H, m). **SM (ESI)** : $m/z = 634,0$ (M+H) $^+$.

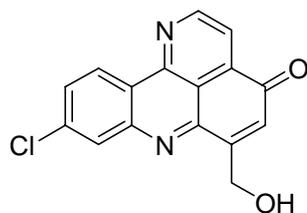
9-Chloro-6-(β -D-maltotriosyliminométhylène)-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (**39**)



Nous avons suivi le même mode opératoire que pour **36**. Nous avons mis en réaction le produit **34** (0,0125 g, 0,0154 mmol) et le CAN (0,034 g, 0,062 mmol). Le conjugué **39** (0,0070 g, 0,0088 mmol) a été obtenu avec un rendement de 57%.

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) : δ ppm = 9,57 (1H, d, $J = 4,6$ Hz, H-2) ; 9,12 (1H, s, ArCHN) ; 9,08 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-11) ; 8,43 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, H-8) ; 8,25 (1H, d, $J = 4,6$ Hz, H-3) ; 8,00 (1H, dd, $J = 8,7$ et $1,9$ Hz, H-10) ; 7,28 (1H, s, H-5) ; 5,13 (1H, d, $J = 8,2$ Hz) ; 5,08 (1H, d, $J = 3,7$ Hz) ; 5,01 (1H, d, $J = 3,7$ Hz) ; 3,74-3,07 (18H, m). **SM (ESI)** : $m/z = 796,1$ (M+H) $^+$.

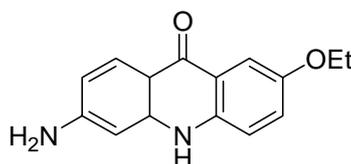
9-Chloro-6-(hydroxyméthyl)-4H-pyrido[4,3,2-kl]acridin-4-one (**40**)



Le composé **26** (0,0301 g, 0,096 mmol) est dissous dans 25 mL de mélange acétonitrile/eau (2/1). On ajoute le CAN (0,166 g, 0,303 mmol) en excès et la solution est agitée 30 minutes à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors versé dans un mélange chloroforme/eau. La phase aqueuse est séparée et extraite trois fois au chloroforme. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec de l'eau puis de la saumure et séchées sur sulfate de sodium anhydre. Après évaporation du solvant, le produit **40** (0,0226 g, 0,076 mmol) est obtenu avec un rendement de 79%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ ppm = 9,43 (1H, d, J = 4,6 Hz, H-2) ; 9,09 (1H, d, J = 9,0 Hz, H-11) ; 8,25 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-8) ; 8,21 (1H, d, J = 4,6 Hz, H-3) ; 7,80 (1H, dd, J = 9,0 Hz et 2,0 Hz, H-10) ; 6,91 (1H, s, H-5) ; 6,35 (1H, t large, OH) ; 5,11 (2H, d, J = 6,2 Hz, CH₂).
SM (EI) : m/z = 296,0 (M⁺).

10H-6-amino-2-éthoxy-9-acridone (**43**)



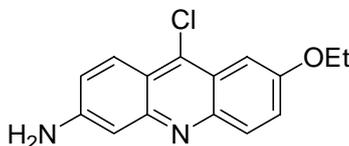
La 6,9-diamino-2-éthoxy-acridine **42** (7,00 g, 27,6 mmol) est dissoute dans 45 mL de phénol auquel on a ajouté des pastilles de soude (5,6 g, 140 mmol). La solution est chauffée à 160°C sous agitation pendant 2 j. Elle est ensuite coulée dans une solution aqueuse de soude (2M) et laissée sous agitation 4 h. Le précipité est récupéré par filtration, lavé avec 100 mL de soude (2M) et avec de l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un pH neutre dans le filtrat, puis avec de l'éther. Après séchage, le produit **43** (5,57 g, 21,7 mmol) est obtenu avec un rendement de 80%.

F = 275°C⁵. **RMN ¹H (200 MHz, DMSO-d₆)** : δ ppm = 11,0 (1H, s large, NH) ; 7,85 (2H, m, H-8 et H-1) ; 7,51 (1H, d, J = 8,9 Hz, H-4) ; 7,20 (1H, dd, J = 8,9 Hz et 2,7 Hz, H-3) ; 6,47

⁵ A. Tatibouët, M. Demeunynck, J. Lhomme. *Synthetic Commun.*, **1996**, 26 (23), 4375-4395.

(1H, dd, J = 9,7 Hz et 1,7 Hz, H-7) ; 6,30 (1H, d, J = 1,7 Hz, H-5) ; 5,97 (2H, s large, NH₂) ; 4,06 (2H, q, J = 7,0 Hz, CH₂) ; 1,33 (3H, t, J = 7,0 Hz, CH₃).

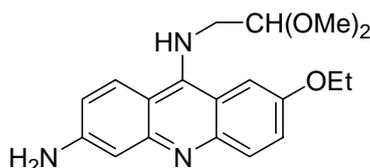
6-Amino-9-chloro-2-éthoxy-acridine (**44**)



La 10H-6-amino-2-éthoxy-9-acridone **43** (1,87 g, 7,36 mmol) est ajoutée par portions dans 50 mL de POCl₃ sous forte agitation. La solution est chauffée à 90°C pendant 2 h puis refroidie dans de la glace et hydrolysée par 100 mL d'eau distillée également refroidie. Elle est ensuite neutralisée par de la soude 1M. Le précipité formé est filtré, lavé à l'eau et à l'éther. L'acridine **44** (1,90 g, 7,00 mmol) est obtenue avec 95% de rendement.

F = 230-232°C. **RMN** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) : δppm = 8,20 (1H, d, J = 9,2 Hz, H-8) ; 7,98 (1H, d, J = 9,2 Hz, H-4) ; 7,46 (1H, d, J = 2,7 Hz, H-1) ; 7,41 (1H, dd, J = 9,2 Hz et 2,7 Hz, H-3) ; 7,22 (1H, d, J = 2,2 Hz, H-5) ; 7,10 (1H, dd, J = 9,2 Hz et 2,2 Hz, H-7) ; 4,23 (2H, q, J = 7,0 Hz, CH₂) ; 4,18 (2H, s, NH₂) ; 1,53 (3H, t, J = 7,0 Hz, CH₃). **SM (DCI)** : m/z = 273,0 ((M+H)⁺).

6-Amino-9-(2,2-diméthoxyéthyl)amino-2-éthoxy-acridine (**45**)

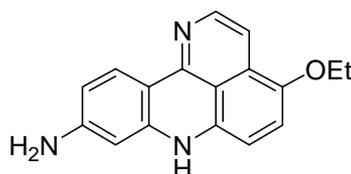


Une solution de 6-amino-9-chloro-2-éthoxy-acridine **44** (0,373 g, 1,37 mmol) et de 2,2 diméthoxyéthylamine (1,0 mL, 9,16 mmol) est maintenue à reflux dans l'éthanol (70 mL) pendant 1 heure. Après évaporation à sec, le résidu est trituré dans 50 mL d'eau saturée en NaHCO₃ et placé à 0°C une journée. Le solide formé est filtré et lavé à l'eau. Après séchage au dessiccateur, le produit **45** (0,417 g, 1,22 mmol) est obtenu avec un rendement de 89%.

F = 124-126°C. **RMN** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) : δppm = 7,96 (1H, d, J = 9,3 Hz, H-4) ; 7,80 (1H, d, J = 9,4 Hz, H-8) ; 7,61 (1H, s, N-H) ; 7,35 (1 H, d, J = 2,1 Hz, H-1) ; 7,13 (1H, dd, J =

9,3 et 2,1 Hz, H-3) ; 7,11 (1H, d, J = 2,2 Hz, H-5) ; 6,72 (1H, dd, J = 9,4 et 2,2 Hz, H-7) ; 5,47 (2H, s, NH₂) ; 4,95 (1H, t, J = 5,0 Hz, -CH-CH₂-) ; 4,14 (2H, q, J = 6,9 Hz, -CH₂-CH₃) ; 3,99 (2H, s large, -CH-CH₂-) ; 3,48 (6H, s, 2 OMe) ; 1,44 (3H, t, J = 6,9 Hz, -CH₂-CH₃). **SM (DCI(+))** : m/z = 342,0 ((M+H)⁺).

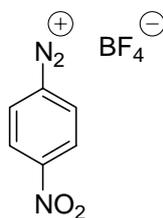
9-Amino-4-éthoxy-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (46)



Le composé **45** (0,267 g, 0,782 mmol) est agité dans 10 mL de TFA à température ambiante pendant 4h30. La solution est alors versée goutte à goutte dans une solution aqueuse d'hydroxyde d'ammonium refroidie à 0-2°C. Le mélange est extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau, séchées sur sulfate de sodium anhydre et le solvant évaporé à sec. Le produit **46** (0,175 g, 0,631 mmol) est ainsi obtenu avec 81% de rendement.

F = 170-172°C. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆)** : δppm = 10,10 (1H, s large, NH) ; 7,98 (1H, d, J = 6,1 Hz, H-2) ; 7,95 (1H, d, J = 8,6 Hz, H-11) ; 7,05 (1H, d, J = 8,6 Hz, H-5) ; 7,03 (1 H, d, J = 6,1 Hz, H-3) ; 6,63 (1H, d, J = 8,3 Hz, H-6) ; 6,28 (1H, dd, J = 8,4 et 2,2 Hz, H-10) ; 6,14 (1H, d, J = 2,2 Hz, H-8) ; 5,62 (2H, s large, NH₂) ; 4,06 (2H, q, J = 6,9 Hz, -CH₂-CH₃) ; 1,38 (3H, t, J = 6,9 Hz, -CH₂-CH₃). **SM (DCI(+))** : m/z = 278,1 ((M+H)⁺).

p-Nitrobenzène diazonium (48)⁶



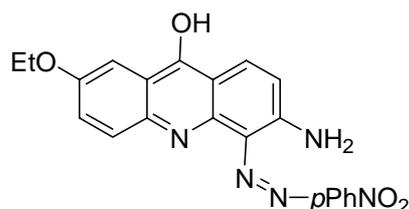
La nitroaniline **47** (4,05 g, 29,3 mmol) est solubilisée dans 40 mL de HCl 3,5 M et la température du milieu réactionnel est abaissée à 2°C. Le nitrite de sodium (9,0 g, 130 mmol) est ajouté par petites portions et le milieu réactionnel est agité pendant 20 minutes à 2°C. On ajoute ensuite NaBF₄ (17,6 g, 160 mmol) et la solution est maintenue sous agitation pendant 1

⁶ S. R. Sandler, W. Karo. *Organic functional group preparations*, **1968**, 401-403.

h. On filtre alors le précipité obtenu, que l'on lave avec de l'eau, de l'éthanol puis de l'acétone. Le sel de diazonium **48** (2,85 g, 12,0 mmol) est récupéré après séchage avec un rendement de 41%.

F = 169-170°C.

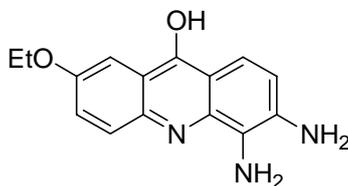
3-Amino-7-éthoxy-9-hydroxy-4-*p*-nitrophénylazo-acridine (**49**)



Le composé **43** (0,499 g, 1,96 mmol) est mis en solution dans 20 mL de MeOH est refroidi à 0°C. Puis on ajoute lentement une solution de sel de *p*-nitrobenzenediazonium **48** (0,800 g, 3,37 mmol) dans 25 mL de MeOH également refroidie. Après 3 heures à 0°C, la solution est basifiée par addition de 10 mL de soude 1M. Le solide résultant est filtré et lavé avec de l'eau chaude et du diéthyl-éther. Le produit **49** (0,512 g, 1,82 mmol) est isolé avec un rendement de 93%.

F = 291-292°C. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) : δppm = 12,01 (1H, s large, NH) ; 9,54 (2H, s large, NH₂) ; 8,44 (4H, m, Ar) ; 8,16 (1H, d, J = 9,0 Hz, H-8) ; 8,00 (1H, d, J = 9,0 Hz, H-4) ; 7,64 (1H, d, J = 3,0 Hz, H-1) ; 7,43 (1H, dd, J = 9,0 Hz et 3,0 Hz, H-3) ; 6,82 (1H, d, J = 9,0 Hz, H-7) ; 4,18 (2H, q, J = 7,0 Hz, CH₂) ; 1,35 (3H, t, J = 7,0 Hz, CH₃).

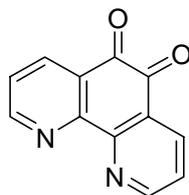
3,4-Diamino-9-hydroxy-7-éthoxy-acridine (**50**)



On prépare une solution du dérivé **49** (0,500 g, 1,78 mmol) dans 15 mL de DMF à laquelle on ajoute lentement 40 mL d'une solution de Na₂S₂O₄ (0,3 M dans du tampon phosphate pH 7, 12,0 mmol). Après 6 heures d'agitation à température ambiante, le mélange est versé dans 400 mL d'eau, basifié par ajout de NH₄OH jusqu'à pH 8 puis extrait avec AcOEt. Les phases organiques sont réunies, lavées à l'eau, séchées au sulfate de sodium et filtrées. On obtient l'*ortho*-diamine **50** (0,215 g, 0,80 mmol) avec un rendement de 45%.

F = 228-231°C. **RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆)** : δppm = 10,22 (1H, s large, NH) ; 7,59-7,52 (3H, m, H-8, H-1 et H-4) ; 7,27 (1H, dd, J = 8,9 et 2,9, H-3) ; 6,62 (1H, d, J = 8,7 Hz, H-7) ; 5,40 (2H, s large, NH₂) ; 4,47 (2H, s large, NH₂) ; 4,18 (2H, q, J = 6,9 Hz, CH₂) ; 1,35 (3H, t, J = 6,9 Hz, CH₃). **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆)** : δppm = 153,0 (C) ; 139,7 (C) ; 136,0 (C) ; 132,3 (C) ; 132,2 (C) ; 123,4 (CH) ; 120,6 (C) ; 119,1 (CH) ; 117,5 (CH) ; 116,7 (C) ; 113,2 (CH) ; 111,7 (C) ; 106,3 (CH) ; 63,7 (CH₂) ; 15,0 (CH₃). **SM (DCI(+))** : m/z = 270,2 ((M+H)⁺).

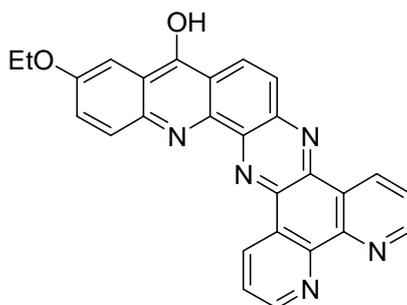
Phen-5,6-dione (52)⁷



La 1,10-phénantroline **51** (3,5 g, 19,5 mmol) est placée dans 20 mL de H₂SO₄ concentré auquel on ajoute successivement le NaBr (1,8 g, 17,5 mmol) et 11 mL de HNO₃. Le mélange est porté à reflux pendant 1 h. Après refroidissement, le mélange est versé dans 400 g de glace et neutralisé avec de la soude 10 M. Le produit est alors extrait trois fois à l'acétate d'éthyle et les phases organiques rassemblées et lavées à l'eau puis évaporées à sec. Le produit brut obtenu est recristallisé dans le toluène puis dans l'acétate d'éthyle, et la phendione **52** (1,64 g, 7,8 mmol) est obtenue avec un rendement de 40%.

F = 252-255°C. **RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)** : δppm = 8,81 (2H, dd, J = 5,1 et 1,6 Hz, H-3 et H-8) ; 8,00 (2H, dd, J = 7,6 et 1,6 Hz, H-2 et H-9) ; 7,36 (2H, dd, J = 7,6 et 5,1 Hz, H-4 et H-7).

12-Hydroxy-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phénazine (53)

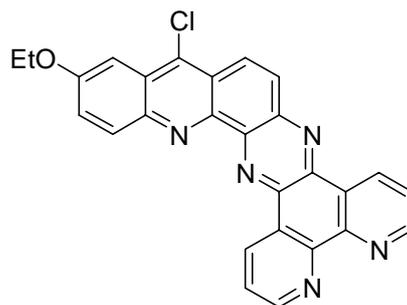


⁷ M. Yamada, Y. Tanaka, Y. Yoshimoto, S. Kuroda, I. Shimao. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1992**, 65 (4), 1006-1011.

Un mélange stoechiométrique de diamine **50** (42,7 mg, 0,158 mmol) et de 5,6-phenidione **52** (33,7 mg, 0,160 mmol) dans 30 mL d'éthanol absolu est porté à reflux pendant 3 h. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est précipité à 0°C. Le solide est filtré sous vide et lavé avec de l'éthanol. Après séchage au dessiccateur, on récupère le produit **53** (62,9 mg, 0,142 mmol) avec un rendement de 90%.

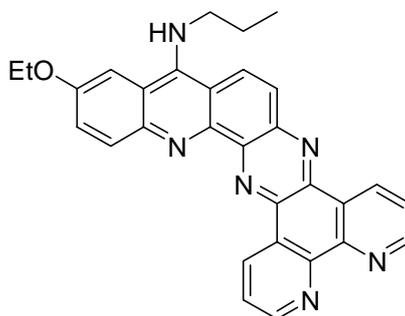
F > 350°C. **RMN ¹H (300 MHz, TFA-d)** : δppm = 10,45 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-1) ; 10,33 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-8) ; 9,41 (2H, d, J = 5,2 Hz, H-3 et H-6) ; 9,01 (1H, d, J = 9,7 Hz, H-11) ; 8,54 (1H, d, J = 9,7 Hz, H-10) ; 8,50 (1H, d, J = 10,0 Hz, H-10) ; 8,48 (1H, dd, J = 8,4 et 5,2 Hz, H-2) ; 8,45 (1H, dd, J = 8,4 et 5,2 Hz, H-7) ; 8,07 (1H, d, J = 2,6 Hz, H-13) ; 8,06 (1H, dd, J = 10,0 et 2,6 Hz, H-15) ; 4,40 (2H, q, J = 7,0 Hz, -CH₂-CH₃) ; 1,61 (3H, t, J = 7,0 Hz, -CH₂-CH₃). **SM (FAB(+), glycérol)** : m/z = 444,2 ((M+H)⁺).

12-Chloro-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phénazine (**54**)



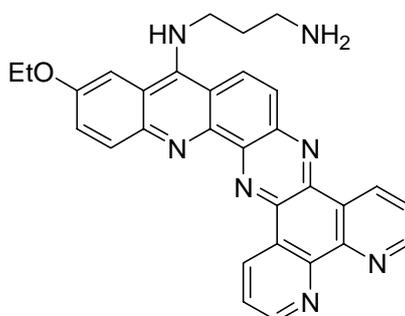
Une solution d'hydroxy-heptacycle **53** (0,180 g, 0,406 mmol) dans 10 mL de POCl₃ est agitée à 120°C pendant 12 heures. La solution est hydrolysée lentement avec de l'eau froide et basifiée par ajout de NaOH 1M. Le solide obtenu est filtré puis lavé à l'eau et à l'éther. On place une suspension du précipité correspondant au reflux de l'éthanol pendant 5 minutes et on le filtre. Le composé **54** (0,141 g, 0,305 mmol) est isolé avec un rendement de 75%.

F > 350°C. **RMN ¹H (300 MHz, TFA-d)** : δppm = 10,43 (1H, d, J = 8,3 Hz, H-1) ; 10,27 (1H, d, J = 8,4 Hz, H-8) ; 9,38 (2H, d, J = 5,1 Hz, H-3 et H-6) ; 9,03 (1H, d, J = 9,8 Hz, H-11) ; 8,71 (1H, d, J = 9,5 Hz, H-16) ; 8,67 (1H, d, J = 9,8 Hz, H-10) ; 8,45 (1H, dd, J = 8,3 et 5,1 Hz, H-2) ; 8,41 (1H, dd, J = 8,4 et 5,1 Hz, H-7) ; 8,15 (1H, dd, J = 9,5 et 2,5 Hz, H-15) ; 8,06 (1H, d, J = 2,5 Hz, H-13) ; 4,44 (2H, q, J = 6,9 Hz, -CH₂-CH₃) ; 1,61 (3H, t, J = 6,9 Hz, -CH₂-CH₃). **SM (EI)** : m/z = 461,0 (M⁺). **SM (DCI(-))** : m/z = 461,1 (M⁺).

Protocole de fonctionnalisation de l'heptacycle **54 par les amines :**
12-(propyl-1-amino)-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phénazine (55**)**

Une solution de **54** (0,020 g, 0,043 mmol) et de propylamine (40 μ L, 0,49 mmol) dans 2 mL de phénol est mise à reflux pendant une nuit. Le produit est précipité par ajout de 50 mL de NaOH 1M. Le solide formé est filtré, lavé à l'eau et à l'éther éthylique. Le produit **55** (0,018 g, 0,037 mmol) est isolé avec 85% de rendement.

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) : δ ppm = 9,83 (1H, dd, $J = 8,1$ Hz et 1,8 Hz, H-1) ; 9,63 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz et 1,8 Hz, H-8) ; 9,27 (2H, dd, $J = 4,5$ Hz et 1,8 Hz, H-3 et H-6) ; 8,63 (1H, d, $J = 9,7$ Hz, H-11) ; 8,27 (1H, d, $J = 9,1$ Hz, H-16) ; 8,07 (1H, dd, $J = 8,1$ et 4,5 Hz, H-2) ; 8,01 (1H, dd, $J = 8,1$ et 4,5 Hz, H-7) ; 7,94 (1H, d, $J = 9,7$ Hz, H-10) ; 7,86 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-13) ; 7,57 (1H, dd, $J = 9,1$ et 2,5 Hz, H-15) ; 4,30 (2H, q, $J = 7,0$ Hz, -O-CH₂-CH₃) ; 3,77 (2H, t, $J = 6,9$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-) ; 1,78 (2H, m, -CH₂-CH₂-CH₃) ; 1,48 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, -O-CH₂-CH₃) ; 0,93 (3H, t, $J = 7,3$ Hz, -CH₂-CH₂-CH₃). **SM (ESI) :** $m/z = 485,1$ ((M+H)⁺).

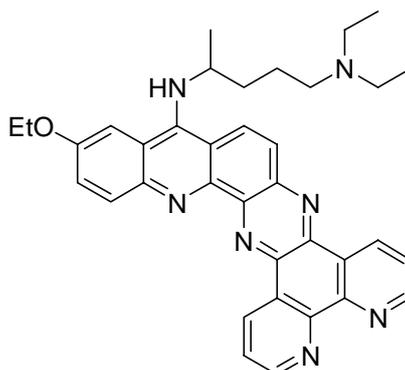
12-(3-amino-propyl-1-amino)-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phénazine (56**)**

Une solution de **54** (0,020 g, 0,043 mmol) et de 1,3-diaminopropane (40 μ L, 0,48 mmol) dans 2 mL de phénol est mise à reflux pendant une nuit. Le produit est précipité par

ajout de 50 mL de NaOH 1M. Le solide formé est filtré, lavé à l'eau et à l'éther éthylique. Le produit **56** (0,015 g, 0,030 mmol) est isolé avec 70% de rendement.

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , cinq gouttes TFA- d) : δ ppm = 10,63 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz et 1,7 Hz, H-1) ; 9,93 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz et 1,7 Hz, H-8) ; 9,46 (2H, dd, $J = 5,1$ Hz et 1,7 Hz, H-3 et H-6) ; 8,94 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-11) ; 8,53 (1H, dd, $J = 8,3$ et 5,1 Hz, H-2) ; 8,48 (1H, d, $J = 9,3$ Hz, H-16) ; 8,42 (1H, dd, $J = 8,3$ et 5,1 Hz, H-7) ; 8,35 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-10) ; 8,00 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-13) ; 7,75 (1H, dd, $J = 9,6$ et 2,4 Hz, H-15) ; 4,26 (2H, q, $J = 7,0$ Hz, -O-CH₂-CH₃) ; 3,63 (2H, CH₂) ; 3,01 (2H, CH₂) ; 1,95 (2H, CH₂) ; 1,45 (3H, t, $J = 6,9$ Hz, -O-CH₂-CH₃). **SM (ESI)** : $m/z = 500,2$ ((M+H)⁺).

12-(4-N,N-diéthylamino-pentyl-2-amino)-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phénazine (57)

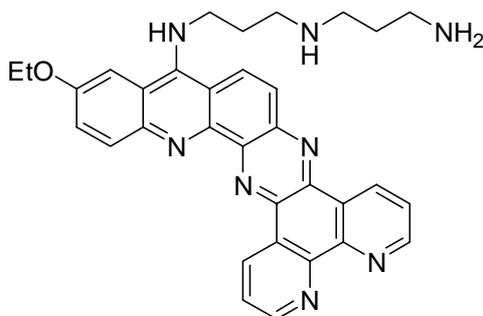


Une solution de **54** (0,0476 g, 0,103 mmol) et de 2-amino-5-diéthylaminopentane (200 μL , 1,03 mmol) dans 2 mL de phénol est mise à reflux pendant 48 h. Le produit est précipité par ajout de 50 mL de NaOH 1M. Le solide formé est filtré, lavé à l'eau et à l'éther éthylique. Le produit **56** (0,0681 g, 0,102 mmol) est isolé avec 99% de rendement.

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) : δ ppm = 9,81 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz et 1,8 Hz, H-1) ; 9,59 (1H, dd, $J = 8,1$ Hz et 1,8 Hz, H-8) ; 9,25 (2H, dd, $J = 4,4$ Hz et 1,8 Hz, H-3 et H-6) ; 8,56 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, H-11) ; 8,25 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, H-16) ; 8,05 (1H, dd, $J = 8,2$ et 4,4 Hz, H-2) ; 7,98 (1H, dd, $J = 8,1$ et 4,4 Hz, H-7) ; 7,95 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, H-10) ; 7,81 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-13) ; 7,56 (1H, dd, $J = 9,2$ et 2,4 Hz, H-15) ; 4,30 (2H, q, $J = 7,0$ Hz, -O-CH₂-CH₃) ; 3,98 (1H, m, C-H) ; 3,77 (2H, t, $J = 6,9$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-) ; 2,40 (2H, m, CH₂) ; 2,24 (4H, q, $J = 7,1$, -N-CH₂-CH₃) ; 1,78 (2H, m, -CH₂-CH₂-CH₃) ; 1,48 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, -O-

$\text{CH}_2\text{-CH}_3$) ; 1,42 (4H, m, 2 CH_2) ; 0,91 (3H, m, CH-CH_3) ; 0,76 (6H, t, $J = 7,1$ Hz, $-\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$). **SM (DCI(+))** : $m/z = 584,1$ ($(\text{M}+\text{H})^+$).

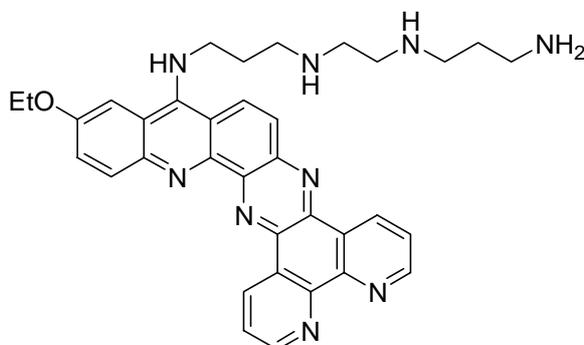
12-(3-(amino-propylamino)-propyl)amino)-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phénazine (58)



Une solution de **54** (0,0566 g, 0,123 mmol) et de bis(3-aminopropyl)amine (172 μL , 1,23 mmol) dans 2 mL de phénol est mise à reflux pendant 24 h. Le produit est précipité par ajout de 50 mL de NaOH 1M. Le solide formé est filtré, lavé à l'eau et à l'éther éthylique. Le produit **56** (0,0563 g, 0,101 mmol) est isolé avec 82% de rendement.

RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) : $\delta\text{ppm} = 9,69$ (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-1) ; 8,91-8,81 (3H, m, H-8, H-3 et H-6) ; 7,86 (1H, d, $J = 9,1$ Hz, H-11) ; 7,76 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H-16) ; 7,62 (1H, m, H-2) ; 7,41 (1H, m, H-7) ; 7,18 (1H, s large, H-13) ; 7,16 (1H, d, $J = 9,1$ Hz, H-10) ; 7,03 (1H, dd, $J = 8,9$ Hz, H-15) ; 4,11 (2H, q, $J = 7,0$ Hz, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$) ; 3,77 (2H, t, $J = 6,8$ Hz, CH_2) ; 2,80-2,73 (6H, m, 3 CH_2) ; 1,88 (2H, t, $J = 6,9$ Hz, CH_2) ; 1,75 (2H, t, $J = 6,9$ Hz, CH_2) ; 1,51 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$). **SM (DCI(-))** : $m/z = 556,1$ (M^+).

12-(3-((amino-propylamino)-éthyl)amino)-propyl)amino)-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phénazine (59)

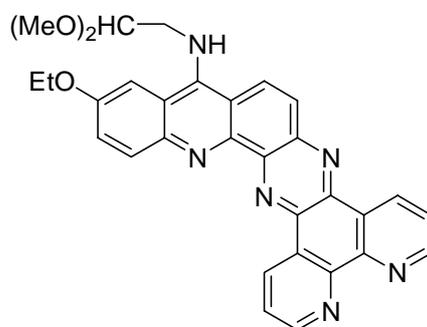


Une solution de **54** (0,0200 g, 0,043 mmol) et de N,N'-Bis-(3-aminopropyl)éthylène-diamine (100 μL , 0,546 mmol) dans 2 mL de phénol est mise à reflux pendant une nuit. Le

produit est précipité par ajout de 50 mL de NaOH 1M. Le solide formé est filtré, lavé à l'eau et à l'éther éthylique. Le produit **56** (0,0156 g, 0,026 mmol) est isolé avec 60% de rendement.

RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) : δppm = 10,27 (1H, H-1) ; 9,61 (1H, H-8) ; 9,21 (2H, H-3 et H-6) ; 8,53-8,40 (2H, H-11 et H-16) ; 8,09-7,90 (3H, H-2, H-7 et H-10) ; 7,81-7,70 (2H, H-13 et H-15) ; 4,43 (2H, -O-CH₂-CH₃) ; 3,64-3,54 (6H, 3 CH₂) ; 3,08 (2H, CH₂) ; 2,69 (2H, CH₂) ; 2,14 (2H, CH₂) ; 1,59 (4H, 2 CH₂) ; 1,29 (3H, -O-CH₂-CH₃). **SM (DCI(-)) :** m/z = 599,0 (M⁻).

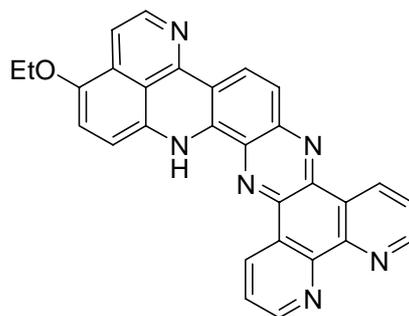
12-(2,2-Diméthoxyéthyl)amino-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phénazine (60)



Une solution de **54** (0,050 g, 0,108 mmol) et de 2,2-diméthoxyéthylamine (50 μL, 0,458 mmol) dans 2 mL de phénol est mise à reflux pendant une nuit. Le produit est précipité par ajout de 50 mL de NaOH 1M. Le solide formé est filtré, lavé à l'eau et à l'éther éthylique. Le produit **60** (0,052 g, 0,097 mmol) est isolé avec 90% de rendement.

F = 180°C déc. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, cinq gouttes TFA-d) : δppm = 10,45 (1H, d, J = 8,2 Hz, H-1) ; 9,41 (1H, d, J = 8,2 Hz, H-8) ; 9,41 (1H, d, J = 5,2 Hz, H-3) ; 9,40 (1H, d, J = 5,2 Hz, H-6) ; 8,85 (1H, d, J = 9,7 Hz, H-11) ; 8,45 (1H, dd, J = 8,2 et 5,2 Hz, H-2) ; 8,35 (1H, d, J = 9,3 Hz, H-16) ; 8,35 (1H, dd, J = 8,1 et 5,2 Hz, H-7) ; 8,09 (1H, d, J = 9,7 Hz, H-10) ; 7,94 (1H, d, J = 2,1 Hz, H-13) ; 7,66 (1H, dd, J = 9,3 et 2,1 Hz, H-15) ; 4,97 (1H, t, J = 5,1 Hz, -CH-CH₂-) ; 4,26 (2H, d, J = 5,1 Hz, -CH-CH₂-) ; 4,20 (2H, q, J = 6,9 Hz, -CH₂-CH₃) ; 3,43 (6H, s, 2 OMe) ; 1,45 (3H, t, J = 6,9 Hz, -CH₂-CH₃). **SM (DCI(+)) :** m/z = 531,3 ((M+H)⁺).

15-Ethoxy-dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]pyrido[2,3,4-jk]phénazine (61)

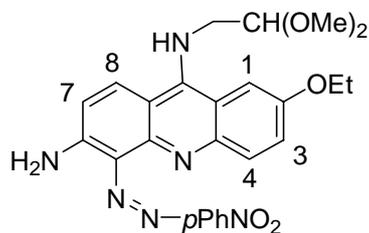


Méthode 1 : Le composé **60** (0,0355 g, 0,067 mmol) est placée dans 5 mL d'acide méthane sulfonique à température ambiante toute une nuit. La solution est versée dans un mélange d'eau et de glace puis basifiée par addition de NH_4OH . Le solide est filtré, lavé avec H_2O et séché. On isole ainsi l'octacycle **61** (0,0282 g, 0,060 mmol) avec 90% de rendement.

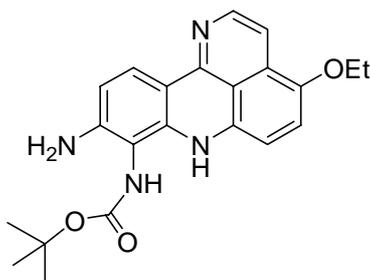
Méthode 2 : Un mélange stoechiométrique de diamine **67** (198,2 mg, 0,678 mmol) et de 5,6-phendione **52** (145,0 mg, 0,690 mmol) dans 50 mL d'éthanol absolu est porté à reflux pendant 2 j. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est précipité à 0°C . Le solide est filtré sous vide et lavé avec de l'éthanol. Après séchage au dessiccateur, on récupère le produit **61** (162,5 mg, 0,348 mmol) avec un rendement de 51%.

F > 350°C . **RMN ^1H (300 MHz, TFA-d)** : δppm = 10,38 (1H, dd, $J = 8,3$ et $1,5$ Hz) ; 10,31 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz et $1,5$) ; 9,42 (1H, dd, $J = 5,3$ et $1,5$ Hz) ; 9,40 (1H, dd, $J = 5,3$ et $1,5$ Hz) ; 8,57 (1H, d, $J = 9,6$ Hz) ; 8,48 (1H, dd, $J = 8,3$ et $5,3$ Hz) ; 8,46 (1H, dd, $J = 8,3$ et $5,3$ Hz) ; 8,32 (1H, d, $J = 9,6$ Hz) ; 7,90 (2H, s, système AB) ; 7,71 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, système AB) ; 7,60 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, système AB) ; 4,42 (2H, q, $J = 7,0$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ; 1,63 (3H, t, $J = 7,0$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$). **SM (DCI(+))** : $m/z = 467,2$ ($(\text{M}+\text{H})^+$). **SM (DCI(-))** : $m/z = 466,3$ (M^+).

3-Amino-9-(2,2-diméthoxyéthyl)amino-7-éthoxy-4-*p*-nitrophénylazo-acridine (**62**)



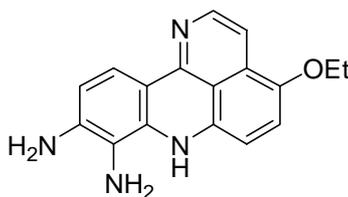
Le composé **45** (0,438 g, 1,28 mmol) est mis en solution dans 20 mL de MeOH et refroidi à 0°C . Puis on ajoute lentement une solution de sel de *p*-nitrobenzenediazonium **48** (0,528 g, 2,21 mmol) dans 25 mL de MeOH également refroidie. Après 3 heures à 0°C , la solution est basifiée par addition de 10 mL de soude 1M. Le solide résultant est filtré et lavé



La pyridoacridine **63** (46,9 mg, 0,110 mmol) est solubilisée dans 4 mL d'éthanol. On ajoute au milieu réactionnel le PMHS (56 μ L, 0,550 mmol), le Pd/C (20 mg, 0,01 mmol de Pd) et l'anhydride de Boc (150 mg, 0,726 mmol) et l'ensemble est agité à température ambiante pendant 5 jours. Après filtration sur célite, le brut de réaction est chromatographié sur gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 + gradient 5-20% EtOH) et le produit **64** (8,0 mg, 0,020 mmol) est isolé avec un rendement de 18%.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ ppm = 7,80 (1H, d, J = 8,8 Hz) ; 7,51 (1H, d, J = 8,8 Hz, système AB) ; 7,64 (1H, d, J = 8,8 Hz, système AB) ; 7,55 (1 H, d, J = 7,2 Hz) ; 7,10 (1H, d, J = 7,2 Hz) ; 6,31 (1H, d, J = 8,8 Hz) ; 4,34 (2H, s large, NH) ; 4,02 (2H, q, J = 6,9 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ; 1,53 (9H, s, *t*-butyl) ; 1,46 (3H, t, J = 6,9 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$). **SM (ESI)** : m/z = 393,0 ((M+H) $^+$).

8,9-Diamino-4-éthoxy-7H-pyrido[4,3,2-kl]acridine (**67**)



On prépare une solution du dérivé azo **63** (0,150 g, 0,352 mmol) dans 5 mL de DMF à laquelle on ajoute lentement 10 mL d'une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0,3 M dans du tampon phosphate pH 7, 2,65 mmol). Après 4 heures d'agitation à température ambiante, le mélange est versé dans 100 mL d'eau et filtré. On obtient l'*ortho*-diamine **67** (0,092 g, 0,313 mmol) avec un rendement de 89%.

RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ ppm = 8,34 (1H, s, N-H) ; 7,96 (1H, d, J = 9,0 Hz) ; 7,58 (1H, d, J = 9,0 Hz) ; 7,52 (1H, d, J = 7,3 Hz) ; 7,20 (1 H, d, J = 9,0 Hz) ; 7,06 (1H, d, J = 7,3 Hz) ; 6,74 (1H, d, J = 9,0 Hz) ; 4,15 (2H, q, J = 7,0 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ; 1,39 (3H, t, J = 7,0 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$). **SM (DCI(+))** : m/z = 293,2 ((M+H) $^+$).

II. Partie Complexes de ruthénium.

Instrumentation. Les spectres d'absorption ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda UV-vis. Les spectres d'émission ont été enregistrés sur un spectromètre Shimadzu RF-501 PC équipé d'un tube photomultiplicateur Hamamatsu R-928 avec comme source excitatrice une lampe au xénon de 250 W. Les spectres d'émission ont été corrigés en fonction de la réponse du phototube sauf indication sur les figures correspondantes. Les voltampérométries cycliques ont été enregistrées avec un potentiostat PAR 273 EGG de Princeton Applied Research piloté par un PC. Le système d'électrodes utilisées est le suivant : un disque de platine comme électrode de travail (5 mm de diamètre), un fil de platine en guide d'électrode auxiliaire et une électrode de référence Ag/AgCl fabriqué au laboratoire dont le potentiel a été calibré en utilisant le système Fc/Fc^{2+} ($E^\circ = +0,4 V_{/ENH}$). Les solutions électrochimiques ont été préparées dans de l'acétonitrile distillé avec 0,1 mol/L de l'hexafluorophosphate de tétrabutylammonium comme électrolyte support. La préparation des solutions ainsi que les mesures électrochimiques ont été réalisées sous atmosphère inerte (diazote). Les durées de vie en émission à température ambiante ont été mesurées par la technique de SPC (single-photon counting) avec un spectrofluoromètre FL-900 de Edinburgh Instruments.

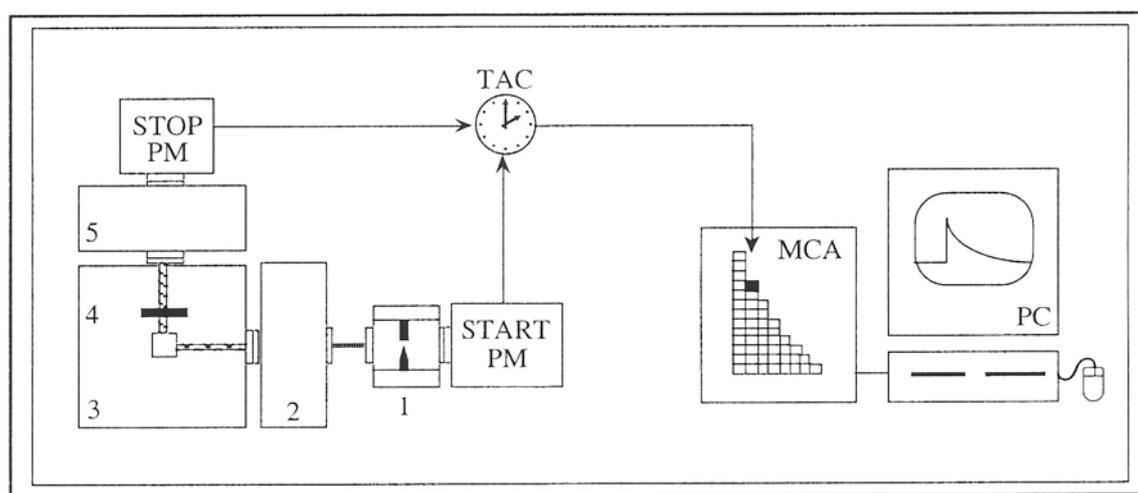


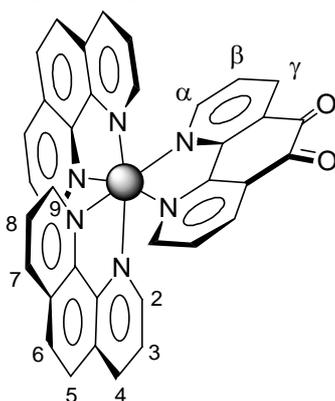
Figure 1 : Descriptif de Système de SPC. (1) Lampe à arc remplie de N_2 , (2) monochromateur, (3) compartiment accueillant l'échantillon, (4) filtre UV, (5) monochromateur.

La source excitatrice est une lampe à arc pulsée qui provoque l'émission d'un gaz (N_2) sous basse pression (environ 0,4 bars). Les arcs électriques entre les deux électrodes de tungstène

sont caractérisés par une tension comprise entre 5,0 et 5,5 kV ainsi qu'une fréquence de 30 kHz. Un monochromateur permet de sélectionner une longueur d'onde à laquelle l'émission du diazote est intense (379 nm). Un total de 10^4 coups est collecté dans le canal de pic pour construire l'histogramme du nombre de photons observés en fonction du temps. Les profils d'émission sont analysés avec le logiciel de Edinburgh Instruments (version 3.0) en déconvoluant la réponse propre à la lampe. Pour l'ajustement des valeurs expérimentales, un ordre croissant de la fonction exponentielle est utilisé jusqu'à obtenir une concordance statistique acceptable, laquelle est évaluée par le test du χ^2 (valeur proche de 1). Les durées de luminescence et les spectres d'émission à basse température sont obtenus en utilisant un cryostat au diazote liquide DN 1704 de chez Oxford Instruments piloté par un contrôleur de température ITC 4 du même fournisseur. Le signal transitoire est détecté avec un spectromètre de cinétique laser modifié de Applied Photophysics équipé d'un monochromateur (Applied Photophysics f/3.4) et d'un tube photomultiplicateur sensible au rouge (Hamamatsu R928) connecté à un oscilloscope HP 5248. Une longueur d'onde harmonique de celle du laser pulsé Nd:YAG est utilisée comme source excitatrice (NY 61-10, $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm, 10 mJ par impulsion). Les données sont transférées à un PC et les points expérimentaux ajustés en utilisant le logiciel Kaleidagraph afin de déterminer les durées de luminescence.

Synthèse.

Ru(phen)₂phendione²⁺ (69).

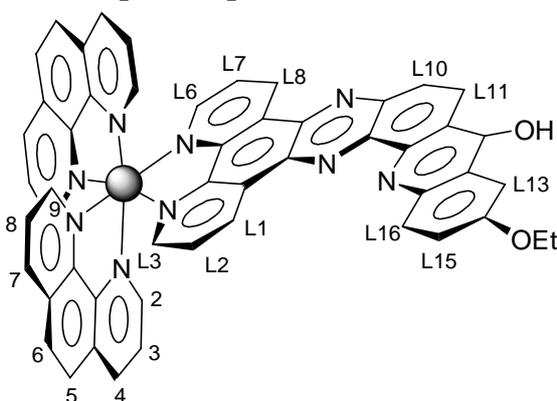


Une solution de Ru(phen)₂Cl₂ **68** (0,240 g, 0,45 mmol) est préparée dans 7 mL de H₂O et la phendione **52** (0,118 g, 0,56 mmol) est mise en suspension dans cette solution. Le milieu réactionnel est porté à ébullition pendant 3h30. Après retour à température ambiante, la solution est placée dans un tube de centrifugeuse et un excès de NH₄PF₆ est ajouté afin de faire précipiter le complexe. Après une série de lavages (H₂O, EtOH puis Et₂O) et

centrifugations, le produit **69** est séché au dessiccateur et récupéré avec un rendement quantitatif (0,432 g, 0,45 mmol).

RMN ^1H (300 MHz, CD_3CN) : $\delta/\text{ppm} = 8,70$ (1H, dd, $J = 8,0$ et $1,2$ Hz, H-4), $8,58$ (1H, dd, $J = 8,3$ et $1,1$ Hz, H-7), $8,48$ (1H, dd, $J = 8,0$ et $1,3$ Hz, H- γ), $8,33$ (1H, dd, $J = 5,3$ et $1,2$ Hz, H-2), $8,26$ (2H, système AB, $J = 9,2$ Hz, H-5 et H-6), $7,91$ (2H, 2 dd imbriqués, H-9 et H- α), $7,82$ (1H, dd, $J = 8,0$ et $5,3$ Hz, H-3), $7,59$ (1H, dd, $J = 8,3$ et $5,7$ Hz, H-8), $7,49$ (1H, dd, $J = 8,0$ et $5,7$ Hz, H- β).

$\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hp-OH}^{2+}$, 2 PF_6^- (71**).**

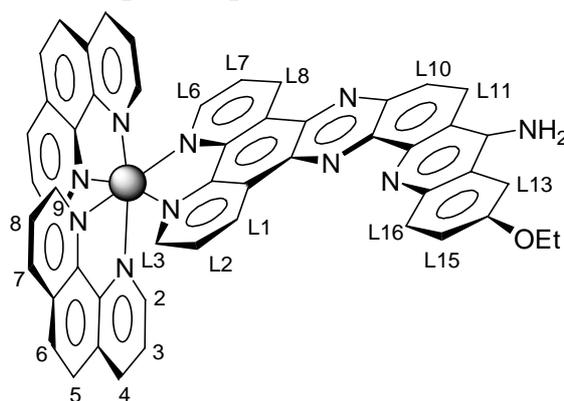


Un mélange de $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{phendione}^{2+}$ **69** (0,291 g, 0,303 mmol) et d'*ortho*-diamine **50** (0,083 g, 0,308 mmol) est mise à reflux dans 18 mL d' $\text{EtOH-CH}_3\text{CN}$ (1-2) pendant 4h30. A la fin de la réaction, 20 mL de CH_3CN sont ajoutés. La solution résultante est concentrée sous vide, et le produit est précipité par ajout d'eau et d'un excès d'hexafluorophosphate d'ammonium. Le solide est lavé trois fois avec respectivement de l'eau, un mélange $\text{EtOH-Et}_2\text{O}$ et de l' Et_2O . Le complexe **71** (0,250 g, 0,210 mmol) est ainsi obtenu sous la forme d'un solide rouge avec 69% de rendement. Le solide brut (pureté > 90%) est ensuite purifié par cristallisation à partir d'une solution dans l'acétonitrile et par lente diffusion de vapeurs d'éther.

RMN ^1H (300 MHz, CD_3CN) : $\delta/\text{ppm} = 10,15$ (1H, s, OH), $9,71$ (1H, d, $J = 8,2$ Hz, L1), $9,02$ (1H, d, $J = 5,4$ Hz, H2' ou H9'), $8,82$ (2H, m, H4' et H7'), $8,68$ (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H4 ou H7), $8,66$ (1H, d, $J = 8,3$ Hz, L8), $8,62$ (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H4 ou H7), $8,38$ (2H, système AB, H5' et H6'), $8,29$ (2H, système AB, H5 et H6), $8,26$ (1H, d, $J = 5,4$ Hz, L3), $8,22$ (1H, d, $J = 5,2$ Hz, H2 ou H9), $8,17$ (1H, d, $J = 5,3$ Hz, H2' ou H9'), $8,10$ (1H, d, $J = 5,2$ Hz, L6), $8,06$ (1H, d, $J = 5,3$ Hz, H2 ou H9), $7,99$ (1H, dd, $J = 8,2$ et $5,4$ Hz, H3' ou H8'), $7,94$ (1H, d,

J = 9,2 Hz, L11), 7,83 (1H, dd, J = 8,2 et 5,4 Hz, L2), 7,78 (1H, d, J = 9,1 Hz, L16), 7,71 (1H, dd, J = 8,3 et 5,2 Hz, L7), 7,70 (1H, d, J = 9,2 Hz, L10), 7,68 (1H, dd, J = 8,3 et 5,3 Hz, H3 ou H8), 7,65 (1H, dd, J = 8,3 et 5,2 Hz, H3 ou H8), 7,56 (1H, dd, J = 8,2 et 5,3 Hz, H3' ou H8'), 7,03 (1H, d, J = 9,1 Hz, L15), 5,83 (1H, s, L13), 2,83 (2H, q, J = 6,5 Hz, CH₂), 0,70 (3H, t, J = 6,5 Hz, CH₃). **SM (ESI)** : m/z = 1050,0 (M²⁺ + PF₆⁻)⁺, 1,9%, 904,1 (M²⁺ - H⁺)⁺, 4,9%, 452,5 (M²⁺), 100%. **Microanalyse** : Trouvée : C-49,13, N-10,21, H-3,01 ; calculée pour C₅₁H₃₃N₉O₂RuP₂F₁₂ + 3 H₂O : C-49,05, N-10,09, H-3,15.

Ru(phen)₂hp-NH₂²⁺, 2 PF₆⁻ (72).



En engageant en réaction le complexe Ru(phen)₂phendione²⁺ **69** (0,259 g, 0,269 mmol) et l'*ortho*-diamine **70**⁸ (0,074 g, 0,276 mmol) et en suivant la même procédure que pour **71**, le complexe correspondant **72** (0,224 g, 0,188 mmol) est obtenu sous forme de solide rouge-brun avec 70% de rendement. Le brut est purifié selon la même méthode.

RMN ¹H (300 MHz, CD₃CN) : δ/ppm = 10,13 (1H, d, J = 8,2 Hz, L1), 9,66 (1H, d, J = 8,2 Hz, L8), 8,63 (2H, d, J = 8,2 Hz, phen), 8,62 (1H, d, J = 8,2 Hz, phen), 8,59 (1H, d, J = 9,8 Hz, L11), 8,44 (1H, d, J = 9,3 Hz, L16), 8,32 (1H, d, J = 9,8 Hz, L10), 8,31-8,26 (6H, m, phen), 8,24 (1H, d, J = 5,3 Hz, phen), 8,20 (1H, d, J = 5,4 Hz, L3), 8,19 (1H, d, J = 5,4 Hz, L6), 8,04 (1H, d, J = 5,3 Hz, phen), 8,02 (1H, d, J = 5,3 Hz, phen), 7,89 (1H, dd, J = 8,2 et 5,4 Hz, L2), 7,83 (1H, dd, J = 8,2 et 5,4 Hz, L7), 7,79 (1H, dd, J = 9,3 et 2,4 Hz, L15), 7,68 (1H, dd, J = 8,2 et 5,3 Hz, phen), 7,67 (1H, dd, J = 8,2 et 5,3 Hz, phen), 7,65 (1H, dd, J = 8,2 et 5,3 Hz, phen), 7,60 (1H, d, J = 2,4 Hz, L13), 7,60 (1H, dd, J = 8,2 et 5,3 Hz, phen), 4,32 (2H, q, J = 6,8 Hz, CH₂), 1,53 (3H, t, J = 6,8 Hz, CH₃). **SM (ESI)** : m/z = 1049,1 (M²⁺ + PF₆⁻)⁺, 5,3%, 903,1 (M²⁺ - H⁺)⁺, 1,2%, 452,1 (M²⁺), 100%. **Microanalyse** : Trouvée : C-46,14, N-10,72, H-3,10 ; calculée pour C₅₁H₃₄N₁₀ORuP₂F₁₂ + 7 H₂O : C-46,41, N-10,61, H-3,67.

⁸ R. Dinica, F. Charmantray, M. Demeunynck, P. Dumy. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 7883-7885.

Mesure des constantes d'affinité. Les études d'affinité ont été menées par une méthode fluorométrique de compétition à partir d'ADN en interaction avec les complexes de ruthénium. La fluorescence a été enregistrée à température ambiante. L'excitation a été réalisée à 520 nm et l'émission de fluorescence enregistrée sur la gamme 540-750 nm. Les expériences ont été réalisées avec un ratio molaire [complexe]/[DNA] de 4,9/10 et une concentration en bromure d'éthidium entre 0 et 10 mM dans du tampon TRIS (25 mM TRIS pH 7 et 0,1 M de NaCl). Les constantes d'affinité apparentes (K_{app}) ont été calculées avec un programme d'ajustement réalisé au laboratoire.

Electrophorèse. Chaque brin complémentaire a été marqué à son extrémité 5' par traitement avec de l'ATP- $[\gamma^{32}\text{P}]$ et de la T4 polynucléotide kinase à 37°C pendant 30 minutes. L'étape d'hybridation des ODN radiomarqués correspondants consiste à incuber le brin naturel avec le brin complémentaire pendant 5 minutes à 70°C. Pour l'étape d'interaction avec les complexes, une solution contenant 1 pmol/mL du duplex marqué au ^{32}P dans un tampon kinase (composé de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6, MgCl_2 10 mM, DTT 5 mM, spermidine 0,1 mM et EDTA 0,1 mM) et 20 mM de complexes de ruthénium est incubée à 25°C pendant 1 h. Le mélange est alors illuminé entre 0 et 2 h avec une lampe mercure/xénon (Oriol 200 W). Les longueurs d'onde inférieures à 320 nm sont coupées par un filtre KNO_3 2M. Chaque échantillon est mélangé à un tampon de charge (95% formamide, EDTA 20 mM, 0,1% xylène cyanole, 0,1% bleu de bromophénol). Les produits de réaction sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (ratio 19:1 entre l'acrylamide et le bisacrylamide) en utilisant du tampon TBE (Tris-borate 90 mM, pH 8, EDTA 2 mM) et en milieu dénaturant (7 M urée). Les fragments d'ADN sont visualisés par radiographie avec des films Kodak X-OMAT AR et la radioactivité comptée sur un imageur Amersham Biosciences Typhoon 9410.

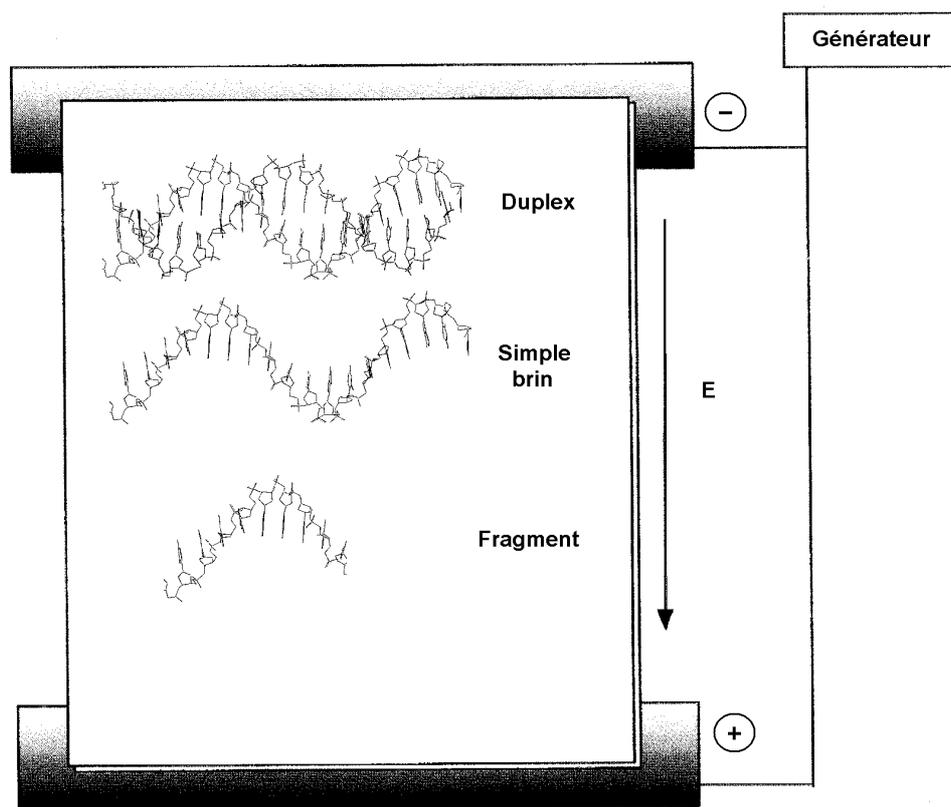


Figure 2 : Illustration de l'électrophorèse sur gel.

III. Bibliographie.

1. N. Fixler, M. Demeunynck, J. Lhomme. Regioselective Electrophilic Substitution of 2-Hydroxy and 2-Methoxy Substituted acridines. Application to the Synthesis of Pyrido[2,3,4-mn]acridine. *Synthetic Commun.*, **1997**, 27 (13), 2311-2324.
2. N. Fixler, M. Demeunynck, M. C. Brochier, J. Garcia, J. Lhomme. Regioselective Addition of Aniline to 8H-Pyrido[2,3,4-mn]acridone: Structure Determination of The Reaction Product. *Magn. Reson. Chem.*, **1997**, 35, 697-700.
3. O. Renaudet, P. Dumy. Expedient Synthesis of Aminoxyated-Carbohydrates for chemoselective access of glycoconjugates. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 7575-7578.
4. O. Renaudet, P. Dumy. Résultats non publiés.
5. A. Tatibouët, M. Demeunynck, J. Lhomme. Synthesis of polyfunctionalized Troeger's base analogs derived from ethacridine (6,9-diamino-2-ethoxyacridine). *Synthetic Commun.*, **1996**, 26 (23), 4375-4395.

6. S. R. Sandler, W. Karo. Aromatic diazonium salts. *Organic functional group preparations*, **1968**, Academic Press, New York and London, 401-403.
7. M. Yamada, Y. Tanaka, Y. Yoshimoto, S. Kuroda, I. Shima. Synthesis and Properties of Diamino-Substituted Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1992**, 65 (4), 1006-1011.
8. R. Dinica, F. Charmantray, M. Demeunynck, P. Dumy. Regioselective synthesis of angular nitrogen polyheterocycles : dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phenazines. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 7883-7885.

Résumé : Nous avons développé la synthèse de pyridoacridines, analogues d'alcaloïdes naturels et évalué leurs propriétés (physico-chimiques et biologiques). D'une part, nous avons préparé des conjugués entre le motif pyridoacridone et des amines par addition de Michael sur une fonction quinone, ainsi que des conjugués entre le chromophore pyridoacridine et des sucres par lien oxime. Dans un deuxième temps, nous avons élaboré deux voies de synthèse pour accéder à une structure octacyclique. L'étape clé est la condensation d'*ortho*-diamines sur un bis-électrophile, la phendione. Cette même condensation a été utilisée pour élaborer une nouvelles famille de composés polycycliques fonctionnalisés par des amines (heptacycles). Les propriétés des produits ont été étudiées : D'abord la cytotoxicité des pyridoacridines (ones) avec une IC₅₀ de l'ordre du micromolaire pour les plus actifs. Ensuite, l'électroactivité de certaines pyridoacridones a servi à élaborer un biocapteur (détection de l'hybridation de l'ADN). Finalement, deux complexes de ruthénium (II) ont été préparés et caractérisés. Les ligands heptacycliques introduits dans ces complexes modifient fortement l'émission de fluorescence des complexes. De plus, ils interagissent fortement avec le double brin d'ADN et produisent des photocoupures sous illumination.

Mots clés : Chimie hétérocycliques, Pyridoacridines, Biocapteur électrochimique à ADN, Photochimie, Complexes de Ru (II).

Summary : We have prepared new pyridoacridines, analogues of natural alkaloids and evaluate their properties (physico-chemical and biological). Firstly, we have prepared conjugates between the pyridoacridone moiety and amines by Michael addition onto a quinone function. Conjugates between pyridoacridine chromophore and sugars have also been prepared using oxime bond formation. Secondly, a new octacyclic structure has been made and the key step is the condensation of *ortho*-diamines with the bis-electrophile phendione. The same condensation has been used to prepared a new family of amino functionalized heptacycles. The properties of the products have been investigated : Cytotoxicity of pyridoacridines (ones) with an IC₅₀ in the micromolar scale for the most active compounds. Further more, pyridoacridones electroactivity has been used to build a biosensor (DNA hybridisation detection). Finally, two Ru (II) complexes have been prepared and characterized. The heptacyclic ligand has a strong influence on the emission behaviour of the complexes. Its interact strongly with double strand DNA et are responsible of photocleavage under illumination.

Key words : Heterocyclic chemistry, Pyridoacridines, Electrochemical DNA Biosensor, Photochemistry, Ru (II) complexes.