HAL
open science

SYNTHÈSE ET ÉTUDES DE SONDES OLIGONUCLÉOTIDIQUES DONT LE SIGNAL FLUORESCENT EST MODIFIÉ AU COURS DE L'HYBRIDATION

Rémy Lartia

To cite this version:

Rémy Lartia. SYNTHÈSE ET ÉTUDES DE SONDES OLIGONUCLÉOTIDIQUES DONT LE SIGNAL FLUORESCENT EST MODIFIÉ AU COURS DE L'HYBRIDATION. domain_other. Université d'Orléans, 2004. Français. NNT : . tel-00009318v3

HAL Id: tel-00009318

https://theses.hal.science/tel-00009318v3

Submitted on 11 Aug 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.

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE D'ORLEANS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

Discipline: Chimie Organique

Par

Rémy LARTIA

Synthèse et études de sondes oligonucléotidiques dont le signal fluorescent est modifié au cours de l'hybridation

Soutenue publiquement le 26 novembre 2004

Membres du Jury:

Rapporteurs	**P. Clivio** Directrice de Recherches. CNRS. ICSN Gif sur Yvette **(Présidente)** **A. Boutorine** Professeur. Muséum d'Histoire Naturelle. Paris
Directrice de thèse	**U. Asseline** Directrice de Recherches. CNRS. CBM Orléans
Examinateur	**M.-P. Teulade-Fichou** Directrice de Recherches. CNRS. Collège de France. Paris

Liste des abréviations

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
BET	Bromure d'Ethidium
C	Cytosine
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDI	Carbonylediimidazole
CPG	Controlled Pore Glass (*Verre à porosité contrôlée)*
CTAB	Bromure de Cétyltrimétylammonium
DIEA	DiIsopropylEthylAmine
DBU	1,8-DiazaBicyclo[4.3.0]Undéc-7-ene
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMTr	Diméthoxytrityle
DS	Déplacement de Stockes
DTT	Dithiothréitol
FLU	Radical thioamidofluorescéine
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	Guanine
HPA	Hydrocarbure Polycyclique Aromatique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography *(Chromatographie Liquide Haute performance)*
I	Inosine
MMTr	Monométhoxytrityle
NBS	*N*-BromoSuccinimide
NHS	*N*-HydroSuccinimide
ODN	Oligo-2'-désoxyribonucléotide
***p*(S)ODN**	Oligo-2'-désoxyribonucléotide comportant un groupe thiophosphate 5'-terminal
PCR	Polymerase Chain Reaction
PER	Radical pérylèn-3-yle
PIC	PseudoIsoCyanine
PNA	Peptidic Nucleic acid
***p*ODN**	Oligo-2'-désoxyribonucléotide comportant un groupe phosphate 5'-terminal
***o*TO**	*ortho*Thiazole Orange
pu	Purine
PYR	Radical pyrèn-1-yle
pyr	Pyrimidine
q	Quinocyanine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SM	Spectrométrie de Masse
T	Thymine
t.a.	Température ambiante
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBD	1,5,7-TriazaBicyclo[4.4.0]Décane
TCEP	Tricarboxyéthylphosphine
TEAA	Acétate de triéthylammonium
Th	Thiocyanine
Tm	Température de demi-dissociation
Tr	Trityle
t_R	Temps de rétention
TO	Thiazole Orange (Bras de liaison fixé sur le quinolinium)
TO'	Thiazole Orange (Bras de liaison fixé sur le benzothiazole)
TOTO	Homodimère du TO
U	Uracile
YO	Oxazole Yellow
YOYO	Homodimère du YO

Les termes français *coiffage, inhibiteur*, *empilement* et *bras de liaison* ont été préférés aux termes anglais *capping, quencher*, *stacking* et *linker*.

Table des Matières

	Page
Introduction générale	**6**
A: Généralités sur la synthèse et l'utilisation de sondes oligonucléotidiques pour l'analyse des acides nucléiques	7
1. Composition et structure de l'ADN	**8**
1.1. Composition de l'ADN	8
1.2. Le duplex (Liaisons Watson-Crick)	8
1.3. Le triplex (Liaisons Hoogsteen)	9
1.4. Le quadruplex (Tétrades de guanines)	10
2. Conception de sondes oligonucléotidiques	**11**
3. La synthèse d'oligonucléotides	**12**
3.1. Synthèse en solution	13
3.1.1. Méthode au "phosphodiester"	
3.1.2. Méthode au "phosphotriester"	
3.1.3. Méthode phosphite triester	
3.2. Synthèse automatisée	14
3.2.1. Méthode aux "phosphoramidites"	
3.2.1.1. Nature du support	
3.2.1.2. Nature des synthons	
3.2.1.3. Cycle de synthèse	
3.2.2. La méthode aux "H-phosphonates"	
4. Méthode d'introduction des groupes réactifs et de marqueurs sur les ODNs	**19**
4.1. Incorporation directe du marqueur à l'ODN lié au support	20
4.1.1. Au cours de l'assemblage	
4.1.2. A la fin de l'assemblage	
4.1.2.1. Couplage alcyne	
4.1.2.2. Utilisation de groupes photolabiles	
4.1.2.3. Utilisation des 5'-iodo-ODNs	
4.2. Introduction d'une fonction réactive sur l'ODN et couplage d'un marqueur avec l'ODN déprotégé	23
4.2.1. Par réaction entre une amine et un composé carbonylé	
4.2.2. Par réaction S_N2 entre un thiol et un halogénure d'alkyle	
4.2.3. Par activation d'un phosphate terminal	
4.2.4. Par clivage du diol des riboses	
4.2.5. Après libération d'une fonction à l'extrémité 3' lors de la déprotection	
5. Aperçu des petites molécules capables de se fixer aux acides nucléiques	**28**
5.1. Les intercalants	28
5.2. Les ligands des sillons	29
6. Présentation des méthodes de détection de l'ADN	**30**
6.1. Techniques employées ne faisant pas appel à la fluorescence	30
6.1.1. Utilisation d'isotopes radioactifs.	
6.1.2. Reconnaissance enzymatique	
6.2. Techniques employées faisant appel à la fluorescence	30
6.2.1. Signal non modifié	
6.2.2. Signal modifié	
6.2.2.1. Technique du FRET	
6.2.2.2. ODN lié à un seul marqueur dont les propriétés de fluorescence varient au cours de l'hybridation	

B: Synthèses et propriétés de nouveaux conjugués ODN cyanines 34

Introduction

1. Synthèse d'un nouveau réactif d'introduction du groupe thiophosphate en position 5' **35**
1.1. Présentation des réactifs de phosphorylation en position 5' des ODNs 36
1.2. Synthèse et utilisation du nouveau réactif 39
1.2.1. Synthèse du nouveau réactif
1.2.2. Utilisations en conditions classiques de synthèse oligonucléotidique
1.2.3. Application à la fonctionnalisation d'ODNs sensibles en milieu alcalin
1.2.3.1. Synthèse d'ODNs 5'-thiophosphate 3'-OH (support oxalate)
1.2.3.2. Synthèse d'ODNs bifonctionnels 3'-(thio)phosphate,5'-(thio)phosphate
1.2.3.3. Synthèse d'ODNs bifonctionnels 5'-thiophosphate, 3'-aminohexyle

2. Cyanines et conjugués cyanines: Rappels bibliographiques **46**
2.1. Les cyanines libres utilisées pour la détection des acides nucléiques 47
2.1.1. Présentation de la famille des cyanines
2.1.2. Synthèse des cyanines monométhines
2.1.2.1. Schéma synthétique général
2.1.2.2. Synthèse du TO, du YO et de leurs dimères: le TOTO et le YOYO
2.1.3. Interactions des cyanines libres (TO et YO) avec l'ADN
2.1.3.1. Interaction du TO avec l'ADN
2.1.3.2. Interaction du YO avec l'ADN
2.1.4. Interactions des cyanines homodimériques avec l'ADN simple et double brin
2.1.4.1. Avantages du caractère dimèrique du marqueur
2.1.4.2. Structure des complexes TOTO / ADN et sélectivité du TOTO envers les différents sites possibles
2.1.5. Autres familles de cyanines monométhines
2.1.5.1. Quinocyanines
2.1.5.2. Thiocyanines
2.2. PNAs et ODNs comportant un motif thiazole orange 55
2.2.1. Conjugués PNAs-TO
2.2.1.1. Influence de la température sur la fluorescence des sondes libres
2.2.1.2. Augmentation de la fluorescence lors de l'hybridation
2.2.1.3. Détection de duplex parfaits
2.2.1.4. Reconnaissance des mesappariements
2.2.2. Conjugués ODNs-TO
2.2.2.1 Etudes par spectroscopie d'absorption et détermination des stabilités des duplex
2.2.2.2. Propriétés de fluorescence des sondes ODNs-TO
2.2.3. Utilisation des sondes PNAs-TO
2.2.4. Autres biomolécules conjuguées au TO
2.2.5. Conjugués ODNs-YO

3. Synthèse et propriétés des nouveaux conjugués ODN-cyanine **63**
3.1. Choix des séquences 64
3.2. Choix des cyanines 64
3.3. Synthèse des cyanines 66
3.3.1. Benzothiazole portant le groupe déprotonable (2-méthyle)
3.3.2. Benzothiazole portant le groupe partant (2-thiométhyle)
3.3.3. Quinoline portant le groupe déprotonable (2- ou 4-méthyle)
3.3.4. Quinoline portant le groupe partant (2- ou 4-iodo)
3.3.5. Couplage des hétérocycles, réactions secondaires, contrôle de la pureté
3.4. Synthèse des conjugués 69
3.4.1. Couplage des cyanines en position 5' des ODNs
3.4.2. Caractérisation des conjugués marqués en position 5'
3.4.3. Couplage des cyanines en position internucléotidique des ODNs
3.4.3.1. Choix du modèle
3.4.3.2. Préparation de l'ODN comportant la fonction thiol protégée
3.4.3.3. Détermination de la stéréochimie des deux isomères

3.4.3.4. Couplage des cyanines aux ODNs
3.4.4. Caractérisation des conjugués marqués en position internucléotidique
3.5. Etudes des propriétés des conjugués synthétisés 77
3.5.1. Coefficients d'extinction molaire
3.5.2. Stabilité des duplex
3.5.2.1. Conjugués marqués en position 5'
3.5.2.2. Conjugués marqués en position internucléotidique
3.5.3. Propriétés spectrales avant et après hybridation
3.5.3.1. En spectrométrie d'absorption UV-visible
3.5.3.2. En fluorescence
3.5.3.2.1. Sondes non hybridées
3.5.3.2.2. Sondes hybridées

Conclusion

C: Synthèse et propriétés d'ODNs liés à deux marqueurs identiques en position 5' 87

Introduction

1. Présentation des marqueurs HPAs: Rappels bibliographiques 88
1.1 Le pyrène 89
1.1.1. Propriétés du pyrène: interaction avec l'ADN et formation d'excimères
1.1.2. Présentation des conjugués ODNs *bis*-pyrène
1.1.2.1. Hybridation de conjugués 3'-pyrène et 5'-pyrène sur une cible unique
1.1.2.2. Conjugués comportant deux pyrènes adjacents en position internucléotidique
1.1.2.3. Dérivés *bis*-pyrène liés à l'extrémité 5' d'ODNs
1.2. Le pérylène 94
1.2.1. Propriétés du pérylène: interaction avec l'ADN
1.2.2. Présentation des synthons pérylènes de la littérature
1.2.3. Présentation des conjugués ODNs-pérylène
1.3. Utilisation conjointe de conjugués du pérylène ou du pyrène et d'autres conjugués 99

2. Synthèse et études des nouveaux conjugués 100
2.1. Synthèse du bras espaceur et de l'ODN 5'-*bis*-amino 101
2.2. Synthèse des marqueurs 102
2.2.1. 4-(3-Pérylènyl)butanoate de succinimidyle
2.2.2. Synthèse de l'ester actif du TO
2.3. Synthèse et caractérisation des conjugués 104
2.4. Etudes par spetcroscopie d'absorption, sondes libres 107
2.4.1 Dérivés du pyrène et du pérylène
2.4.2 Dérivés du thiazole orange
2.4.3 Dérivés de la fluorescéine
2.5. Etudes par spectroscopie d'absorption, sondes hybridées 113
2.5.1. Coefficients d'extinction molaire
2.5.2. Etude de la stabilité des duplex
2.5.3. Evolution spectrale lors de la fusion du duplex
2.6 Etudes par spectroscopie de fluorescence 117
2.6.1. Conjugué ODN *bis*-fluorescéine
2.6.2. Conjugué ODN *bis*-pyrène
2.6.3. Conjugué ODN *bis*-pérylène
2.6.4. Conjugué ODN *bis*-thiazole orange

Conclusion générale et perspectives 123

Partie expérimentale 125
1. Materiel employé 126
2. Protocoles expérimentaux 130

Bibliographie 150

Introduction générale

L'achèvement du séquençage du génome humain et de ceux d'un nombre sans cesse grandissant d'organismes du monde animal et végétal ouvre l'accès à une meilleure compréhension du fonctionnement de la cellule et de ses disfonctionnements. L'étude systématique de l'information génétique contenue dans les génomes devrait permettre de mieux comprendre le développement de certaines maladies et de concevoir de nouvelles thérapies. Cette étude nécessite le développement d'outils performants permettant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons avec une grande spécificité et une grande sensibilité.

L'une des techniques d'analyse des acides nucléiques, basée sur leurs propriétés d'hybridation, fait appel à l'utilisation (en solution ou sur support: puces à ADN) de sondes oligonucléotidiques. Les sondes oligonucléotidiques sont des petits fragments d'acides nucléiques de séquence définie, obtenus par synthèse chimique, complémentaire de la séquence à détecter sur les acides nucléiques. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines: en recherche fondamentale pour l'étude de la structure et de la fonction des gènes, pour le diagnostic et le pronostic en médecine (détection d'organismes pathogènes, diagnostic pré- ou post-natal de maladies génétiques, détermination de la prédisposition à certaines maladies et aide au traitement), en médecine légale, et dans le domaine agroalimentaire (détection d'organismes pathogènes ou génétiquement modifiés..).

Le greffage de marqueurs, tels que les fluorophores, aux oligonucléotides ainsi que les avancées réalisées dans le domaine de l'instrumentation ont permis de diminuer leur seuil de détection à quelques molécules. Cependant, le plus souvent les marqueurs utilisés produisent des signaux peu modifiés en présence des séquences cibles. La détection des sondes hybridées sur leurs cibles nécessite donc l'élimination des sondes non hybridées. Afin de remédier à ce problème, le développement de sondes oligonucléotidiques liées à des marqueurs produisant des signaux modifiés en présence des séquences cibles a été entrepris par de nombreux laboratoires. Le but de ce travail était de contribuer au développement de ce type de sondes.

Après un rappel de généralités sur la synthèse et l'utilisation de sondes oligonucléotidiques pour l'analyse des acides nucléiques, nous présenterons les résultats obtenus sous forme de deux chapitres. Le premier est consacré à la synthèse et à l'étude des propriétés spectroscopiques de conjugués ODN-cyanines. Le deuxième décrit la synthèse et les propriétés d'ODNs liés par leur extrémité 5' à deux marqueurs identiques.

A: Généralités sur la synthèse et l'utilisation de sondes oligonucléotidiques pour l'analyse des acides nucléiques

A.1. Composition et structure de l'ADN
A.2. Conception de sondes oligonucléotidiques
A.3. La synthèse d'oligonucléotides
A.4. Méthode d'introduction des groupes réactifs et de groupes réactifs sur les ODNs
A.5. Aperçu des petites molécules capables de se fixer aux acides nucléiques
A.6. Présentation des méthodes de détection de l'ADN

1. Composition et structure de l'ADN

1.1 Composition de l'ADN

L'ADN est une longue molécule présente dans les cellules de l'ensemble des êtres vivants: bactérie, animal ou végétal. Elle prend l'aspect de deux brins entremêlés sous forme d'une structure communément appelée double-hélice, mais peut adopter de nombreuses autres structures plus complexes brièvement résumées ci-dessous.

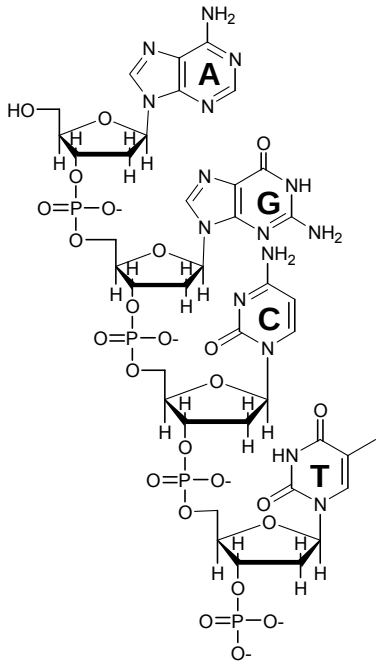


Figure 1: Structure d'un brin d'ADN $^{5'}$AGCT$^{3'}$

D'un point de vue chimique chacun des deux brins est constitué d'un enchaînement de quatre nucléosides (Figure 1): deux en série purique, la 2'-désoxyadénosine (A) et la 2'-désoxyguanosine (G) et deux en série pyrimidique, la thymidine (T) et la 2'-désoxycytidine (C). Chacun des nucléosides est lui même composé d'un 2'-désoxyribose substitué en position anomérique par une base hétérocyclique en configuration β. Les nucléosides sont liés les uns aux autres *via* une liaison phosphodiester qui ponte l'hydroxyle en position 3' du cycle 2'-désoxyribose de l'un à l'hydroxyle en position 5' de l'autre. La présence des phosphates fait que la molécule est globalement chargée négativement.

1.2. Le duplex (Liaisons Watson – Crick)

Les deux brins s'hybrident selon des règles précises [1]:

- Ils s'hybrident de manière antiparallèle (en descendant la double hélice, un brin est de type 5'→3' et l'autre de type 3'→5'.

- Une base A sur un brin fait face à une base T
- Une base G sur un brin fait face à une base C

En effet deux bases puriques ne peuvent se faire face, car du fait de leur grande taille, il y aurait gêne stérique; de même deux bases pyrimidiques sont trop petites et donc trop éloignées pour qu'il y ait interaction. Enfin, la présence de fonctions donneuses et acceptrices d'électrons sur chacune des quatre bases donne naissance à des liaisons hydrogène (Figure 2) qui expliquent la cohésion de la structure en double hélice ainsi que les règles de l'hybridation. Le fait que la paire GC soit liée par trois liaisons hydrogène contre deux pour la paire AT est à l'origine de sa plus grande stabilité.

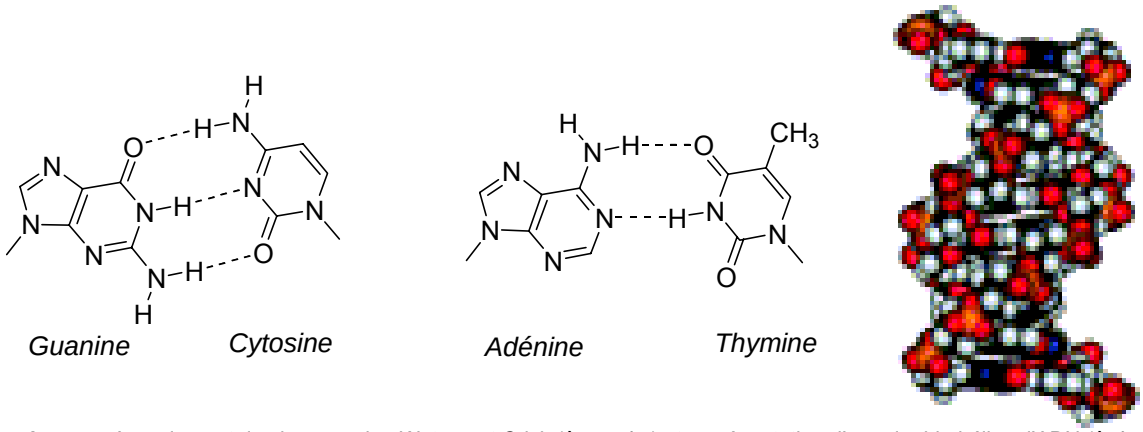


Figure 2: Appariement des bases selon Watson et Crick (*à gauche*) et représentation d'une double hélice d'ADN (*à droite*)

La cohésion de la double hélice est également due aux forces d'empilement (*stacking)* entre les bases. Les interactions entre les nuages d'électrons π des cycles purines et pyrimidines donnent naissance à des interactions de type $\pi-\pi$ stacking. Le cœur de la double-hélice est donc hydrophobe alors que l'extérieur est hydrophile.

L'ARN se différencie chimiquement de l'ADN par la présence d'un sucre ribose à la place du désoxyribose et par le remplacement de la thymine par l'uracile (U) qui ne possède pas de méthyle en position 5.

Les règles d'hybridation sont les mêmes pour les hélices ADN•ADN, ADN•ARN et ARN•ARN. La structure de la double hélice est représentée en figure 2.

En plus de la double hélice, l'ADN peut former des ensembles de molécularité supérieure.

1.3. <u>Le triplex (Liaisons Hoogsteen)</u>

L'aptitude des séquences d'acides nucléiques à former des triple hélices a été postulée en 1953 [1] et prouvée en 1957 [2]. L'équipe de Felsenfeld démontra qu'un brin poly(dA) était capable de s'hybrider *in vitro* avec un duplex poly(dA)/poly(U) pour former une structure en triple hélice notée A•UA. Par la suite, il a également démontré que d'autres triplex peuvent se former entre des séquences homooligonucléotiques, tels I•AI, G•GC à pH=6 , I•IC, T•AT, C^+•GC et C•IC.

Cette capacité à former des triples hélices a également été observée avec des séquences homopuriques et homopyrimidiques tel le triplex poly[d(TC)•polyd(GA) polyd(UC^+)], ainsi qu'avec des ODNs.

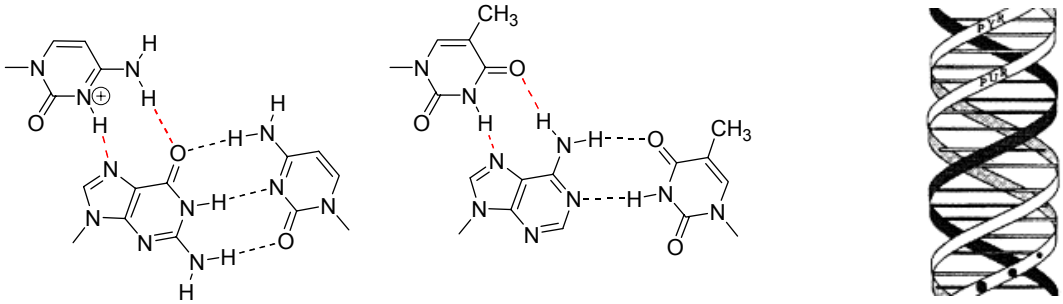


Figure 3: Association des bases dans un triplex C^{+}•GC (*à gauche*) et T•AT *(au milieu)* et représentation schématique d'une triple hélice (*à droite*). Liaisons Watson-Crick (---) et Hoogsteen (---)

Il découle de l'accumulation de ces observations que la formation d'une triple hélice requiert un brin homopurique et deux brins homopyrimidiques ou bien deux brins homopuriques et un homopyrimidique. Deux de ces trois brins forment la double hélice selon un schéma classique d'hybridation de type Watson-Crick, tandis que le troisième brin s'y associe par des liaisons Hoogsteen comme indiqué sur la figure 3.

1.4. Le quadruplex (tétrades de guanines)

Lorsque la séquence nucléique est riche en G contiguës, on note l'apparition de structures d'ordre supérieur nommées quadruplex et formées par des quartets de guanines (Figure 4, à gauche) maintenus par des liaisons hydrogènes qu'engagent l'azote 7 et le groupe carbonyle en position 6 d'une guanine avec, respectivement, les protons des azotes 1 et 2 d'une deuxième guanine [3]. Les oligonucléotides dont les G sont remplacées par des 7-déaza-G ou des 7-chlorodéaza-G forment des tétrades moins stables que ceux comportant des G naturelles. La présence d'ions sodium (Na^{+}) ou potassium (K^{+}) est indispensable à leur formation. Ces ions sont complexés par les groupes carbonyles dans le « tunnel » du quadruplex, au milieu de deux plans de la tétrade. La séquence oligonucléotidique doit comporter au moins trois guanines contiguës.

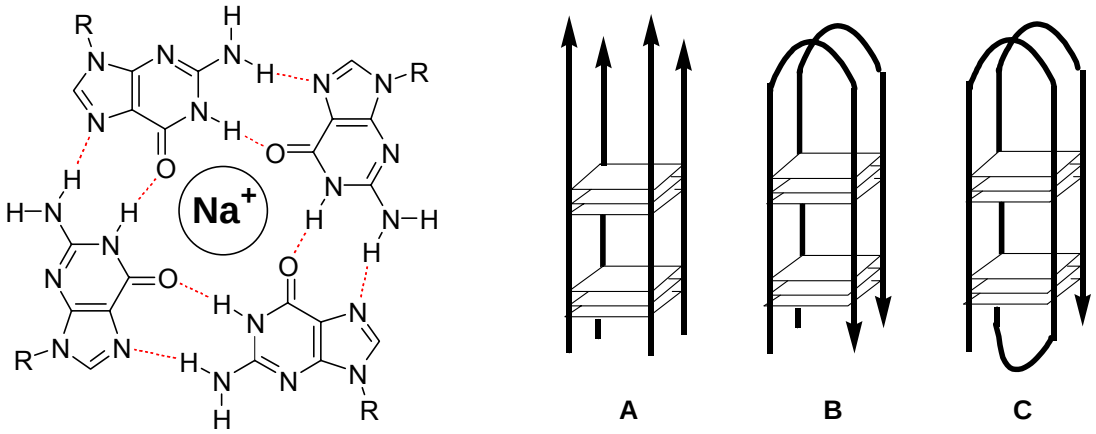


Figure 4: *(à gauche)* Association des bases dans une tétrade de guanines. Liaisons Hoogsteen (---). *(à droite)*: illustration de quelques quadruplex possibles. Les brins d'oligonucléotides sont présentés sous la forme de flèches noires dirigées dans le sens 3'→ 5' et les quartets par des carrés aux angles desquels figurent les guanines.

Plusieurs quadruplex, de diverses molécularités sont possibles. Un oligonucléotide contenant au moins une séquence GGG peut former un quadruplex tétramérique, mettant donc en jeu quatre brins parallèles (Figure 4A). Lorsqu'un oligonucléotide présente, au sein de sa séquence, plusieurs motifs GGG, d'autres structures peuvent apparaître, à condition que chacune des

séquences GGG soit suffisamment séparée de sa voisine pour pouvoir former une boucle. Ainsi un oligonucléotide comportant au moins deux séquences GGG, peut former, outre un quadruplex tétramérique, un quadruplex dimérique antiparallèle dont l'un des isomères possibles est présenté en figure 4B. Enfin, une séquence comportant au moins quatre motifs GGG peut se replier sur elle-même pour former, outre les structures vues ci-dessus, un quadruplex monomérique (Figure 4C). Ces structures sont d'une grande importance biologique. Chez la plupart des vertébrés (et donc chez l'homme), l'extrémité des chromosomes, nommée télomère, est composée de la séquence répétitive $(TTAGGG)_n$ où n=1000~3000. A chaque cycle de division, cette extrémité se raccourcit, aboutissant à la mort programmée de la cellule. Les télomères servent en quelque sorte d'horloge biologique. Ce processus est contré chez les cellules cancéreuses rendues ainsi immortelles. Elles peuvent alors proliférer. L'origine en est l'activation chez elles d'une enzyme, la télomérase, capable de reconstituer le télomère. L'activité maximale de la télomérase nécessite que le brin télomérique soit en simple brin.

Une fois les caractéristiques des acides nucléiques rappelées, il est important d'en déduire des règles pour la conception de sondes oligonucléotidiques.

2. Conception de sondes oligonucléotidiques

La sonde oligonucléotidique reconnaît sa séquence complémentaire par formation de liaisons hydrogène de type Watson-Crick et forme alors un duplex. Une caractéristique importante d'un duplex est sa température de demi-dissociation, souvent nommée température de fusion (T_M) [4,5], et qui détermine la température à laquelle 50% des duplex sont dissociés. En effet, les liaisons hydrogène qui lient les deux brins du duplex peuvent être rompues à haute température. On peut alors établir une courbe d'allure sigmoïdale donnant la fraction de duplex dissociés en fonction de la température. Les paires GC étant liées par trois liaisons tandis que les paires AT ne le sont que par deux (§ A.1.2), une séquence riche en G ou C formera, à longueur égale, des hybrides plus stables que des séquences riches en A ou T. De plus, l'adjonction de marqueurs ou groupes sur l'un des brins du duplex peut fortement modifier la valeur de T_M. Outre la taille du duplex et sa composition relative en bases, des paramètres tels sa concentration, son degré de complémentarité, la force ionique et le pH du milieu influencent le T_M. De ce fait, quelle que soit la méthode utilisée, la longueur de la sonde est un élément important. Si celle-ci est trop courte les deux risques encourus sont l'impossibilité de la sonde de s'hybrider à la température de travail, car son T_M serait trop bas, et l'absence de sélectivité puisque, statistiquement, la séquence complémentaire correspondante serait présente dans un très grand nombre de cibles biologiques, en plus de celle recherchée. Inversement, si la taille de la sonde est trop importante, d'autres inconvénients apparaissent. Premièrement un coût financier supérieur pour sa synthèse. Deuxièmement, son absence de sélectivité vis-à-vis des séquences de structure très proche de celle de la cible (par exemple une séquence qui ne différerait que d'un nucléotide sur une quarantaine en tout). En effet, si le degré de similitude est très fort, l'appariement se fera tout de même et l'expérimentateur observera un faux positif. Enfin, le risque est plus important de voir l'apparition de structures intramoléculaires qui empêcheront l'hybridation de la sonde avec la séquence à détecter.

Des calculs statistiques ont révélé qu'une sonde comportant entre 12 et 15 nucléosides (soit entre 16 millions et un milliard de possibilités) était suffisamment longue pour que, statistiquement, le génome humain ne présente qu'une seule fois la cible correspondante [6]. En outre, une étude a montré qu'un oligonucléotide long de 17 nucléotides forme avec sa cible un hybride de stabilité suffisamment différente de celle de l'hybride formé avec ce même oligonucléotide et une séquence comportant une base modifiée [7].

Une séquence de 15 à 20 nucléotides semble un bon compromis pour le choix de la longueur d'une sonde.

La synthèse de sondes s'effectue en plusieurs étapes. Premièrement, la synthèse de la partie oligonucléotidique comportant une fonction réactive. Puis la synthèse de marqueurs capables d'émettre un signal lumineux qui varie en fonction de l'hybridation et aptes à réagir sur la fonction portée par la sonde. Dernièrement, une méthode permettant le lier ces deux parties de manière covalente. Nous nous attacherons en premier lieu à rappeler les différentes méthodes de synthèse d'ODNs.

3. La synthèse d'oligonucléotides

La synthèse chimique permet la conception d' oligonucléotides de longueur et de séquence définies, mais également d'incorporer des nucléosides non-naturels, ainsi que diverses fonctionnalités (pontages de brins, bras de nature variée etc…). Les premières méthodes employées vers la fin des années 50 s'appuyaient sur des réactions effectuées en milieu homogène (couplages en solution). Dès le début des années 80, la synthèse d'oligonucléotides est réalisée sur support solide.

Toutes les techniques développées s'appuient sur des réactions effectuées au niveau de l'atome de phosphore. Le sucre et la base nucléique sont protégés. Les difficultés principales sont l'absolue nécessité de mettre au point des réactions de couplage ayant d'excellents rendements (>98%) sous peine de voir le rendement global de synthèse de l'ODN chuter, ainsi que de disposer de techniques de purifications poussées afin de séparer l'ODN désiré des diverses séquences tronquées.

La fonction alcool en 5' étant plus réactive que celle en 3', du fait de son encombrement stérique moindre, la synthèse est réalisée le plus souvent dans le sens 3'→ 5', c'est à dire que la séquence en cours d'élongation réagit par son hydroxyle 5' sur un nucléoside modifié portant, en 3', un groupe réactif phosphoré. Quatre principales familles de composés phosphorés ont été utilisées: les phosphates monoesters et les phosphates diesters, en synthèse en solution, puis, les phosphoramidites et les H-phosphonates, tous deux donnant de meilleurs rendements de couplage et qui sont de nos jours couramment utilisés en synthèse automatisée sur support, laquelle a remplacé la synthèse en solution.

3.1. Synthèse en solution

3.1.1. Méthode au "phosphodiester"

Cette réaction s'effectue entre un nucléoside protégé comportant un groupe phosphate monoester en 5' et un second nucléoside dont l'hydroxyle 3' est déprotégé [8]. Le groupe phosphate est activé par un chlorure de sulfonyle (chlorure de triisopropylsulfonyle ou de mésityle) pour donner un anhydride mixte activé vis-à-vis de la nucléophilie de la fonction alcool du second nucléoside (Figure 5).

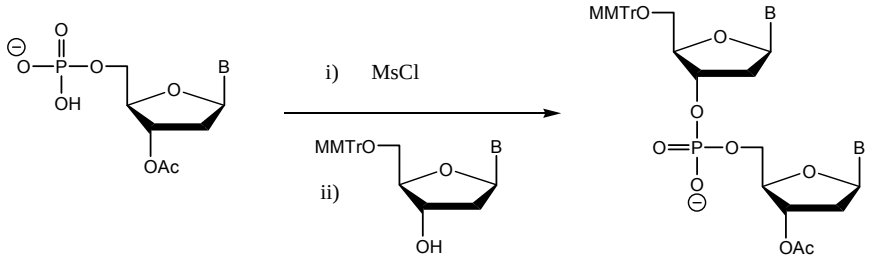


Figure 5: Méthode au "phosphodiester"

Le dinucléoside obtenu comporte alors une liaison phosphodiester d'où la méthode tire son nom. L'hydroxyle 3'-acétylé peut être déprotégé en conditions basiques et phosphorylé à son tour. La formation d'espèces chargées rend particulièrement difficiles les étapes de purification.

3.1.2. Méthode au "phosphotriester"

A l'inverse, la méthode au phosphotriester aboutit à la formation d'espèces non chargées grâce à l'utilisation de synthons dont l'atome de phosphore est protégé, entre autre, par un groupe *o*-chlorophényle [9]. Un nucléoside 3'-phosphodiester est activé par un chlorure de sulfonyle. L'anhydride mixte résultant réagit sur l'alcool porté en 5' par un second nucléoside. Le dinucléotide final comporte alors une liaison phosphotriester (Figure 6). La déprotection du groupe o-chlorophényle est effectuée par un traitement par des oximates.

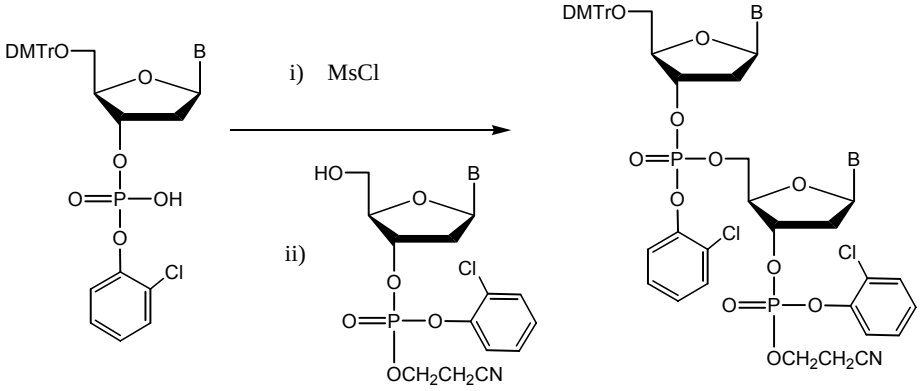


Figure 6: Méthode au "phosphotriester"

3.1.3 Méthode phosphite triester

La mise au point de nucléosides comportant une fonction chlorophosphite (Figure 7) a ouvert la voie à l'automatisation de la synthèse d'ODNs car ces réactifs réagissent avec des temps de couplage très courts [10].

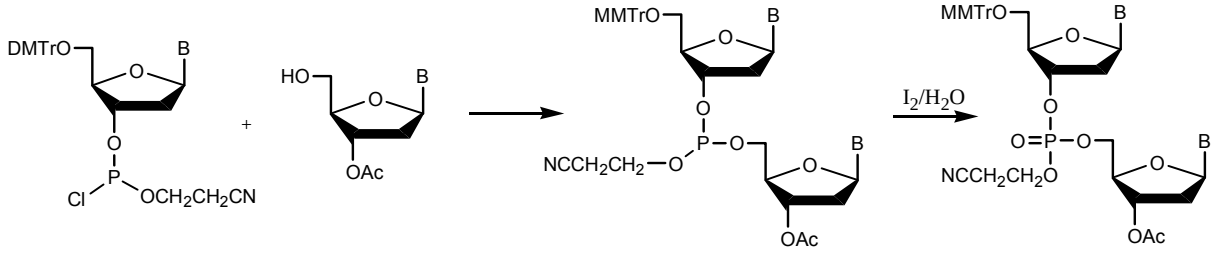


Figure 7: Méthode au "chlorophosphite"

Toutefois, ce réactif présente l' inconvénient d'être extrémement sensible à l'humidité. La réaction devant être menée à –78°C et conduisant à de nombreux produits secondaires, la mise au point de dérivés *phosphoramidites* plus commodes d'utilisation leva les derniers obstacles pour la conception de synthétiseurs automatisés.

3.2. Synthèse automatisée

L'automatisation de la synthèse d'oligonucléotides a permis d'accéder à un grand nombre de séquences variées utilisables dans de nombreux domaines (outils pour la recherche fondamentale, en diagnostic, agents thérapeutiques potentiels). La synthèse est réalisée sur support solide et l'élongation est effectuée dans le sens 3'→ 5'. Les bases, le phosphate ainsi que l'extrémité 5' du nucléotide ajouté sont protégés .

3.2.1. Méthode aux "phosphoramidites"

3.2.1.1. Nature du support

Bien que des supports dits "universels" aient été préparés [11], ils ne sont pas commercialisés. De ce fait, plusieurs supports sont disponibles, selon la nature de la base que l'on désire avoir en position 3' de l'ODN à synthétiser. Le support utilisé est à base de verre à porosité contrôlée (CPG : Controled Porosity Glass) ou de polymère. La porosité habituellement utilisée dépend de la taille de l'ODN à synthétiser. Le verre est fonctionnalisé en faisant réagir les résidus hydroxyles présents à sa surface avec le dérivé silylé $EtO_3Si(CH_2)_3NH_2$. Le premier nucléoside est ensuite introduit par réaction entre des résidus amines à la surface du support et un succinate diester (Figure 8).

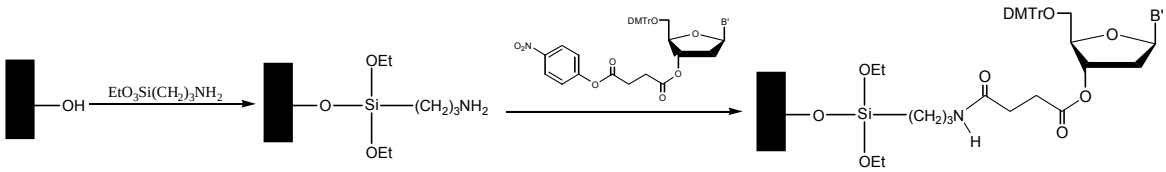


Figure 8: Synthèse des supports

Une fois l'élongation terminée, l'oligonucléotide synthétisé sera donc lié au support par une liaison ester de type succinate.

3.2.1.2. Nature des synthons

Les travaux de Beaucage et Caruthers ont permis la mise au point de synthons couplant rapidement et avec de bons rendements [12]

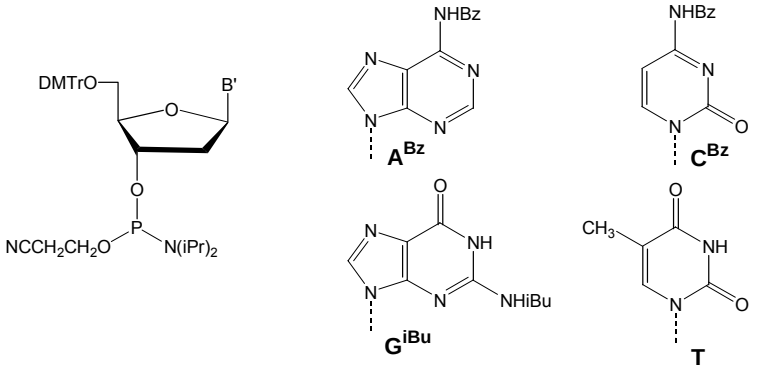


Figure 9: Structure générale des synthons phosphoramidites *(à gauche)* et des bases protégées A^{Bz}, C^{Bz} et G^{iBu} et non protégée T *(à droite)*

Les bases nucléiques sont introduites sous forme de dérivés phosphoramidites (Figure 9), dont, l'hydroxyle 5' est protégé par un groupe diméthoxytrityle et le phosphore (précurseur de la liaison phosphodiester) est introduit sous la forme d'une fonction *N,N'*-diisopropyl-cyanoéthylphosphoramidite. Les groupes NH_2 des bases sont protégés par des groupes benzoyle (adénine et cytosine), ou isobutyryle (guanine). La thymine n'est pas protégée.

3.2.1.3 Cycle de synthèse

Le cycle de synthèse tel qu'il est effectué par un synthétiseur automatisé, est présenté en figure 10.

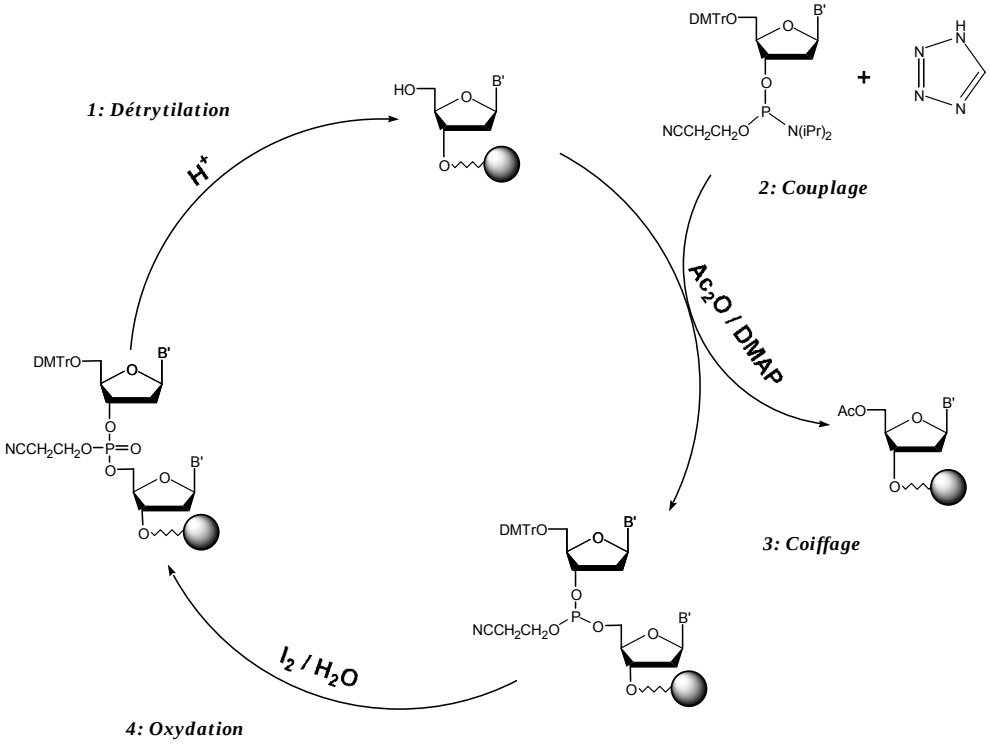


Figure 10: Les différentes étapes d'un cycle de synthèse automatisée

Etape 1 : Détritylation

Au début du premier cycle de couplage, la réaction de détritylation a lieu sur le support choisi. Au début de chacun de tous les autres cycles, elle a lieu sur l'extrémité 5' du dernier nucléotide introduit. En présence d'acide, l'alcool primaire en 5' est déprotégé et le dichloroacétate de diméthoxytritylium libéré est éliminé par lavage à l'acétonitrile. L'acide habituellement utilisé est l'acide dichloroacétique à 2% dans le dichlorométhane. Le couple acide dichloroacétique/alcool tritylé constitue un bon compromis puisque la détritylation se déroule en quelques secondes. Pour autant, l'acidité reste suffisamment faible pour minimiser les phénomènes de dépurination (Figure 11). Un autre avantage de ce groupe protecteur est que le cation tritylium libéré, de couleur rouge foncé, permet un dosage aisé du rendement de couplage.

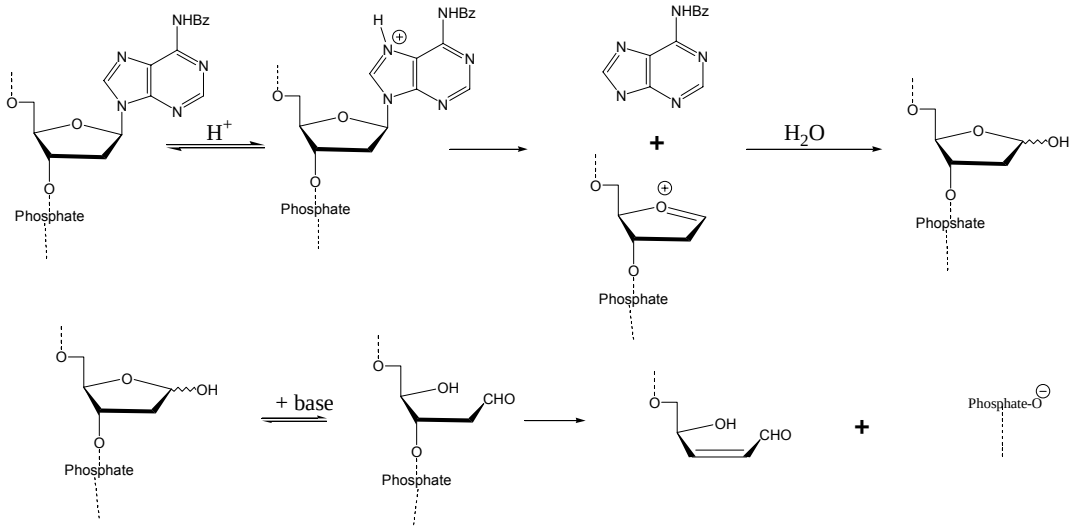


Figure 11: Réaction de dépurination. En présence d'acide, les nucléosides puriques, et plus particulièrement l'adénosine, subissent une coupure de la liaison anomérique suivie d'une rupture du squelette ribose/phosphate.

Etape 2 : Couplage

Dans une seconde étape, la résine ainsi déprotégée en 5' est mise à réagir avec le dérivé phosphoramidite du nucléoside voulu en présence d'un acide faible, classiquement le tétrazole. Ce dernier est un activateur. Il agit par protonation du groupe diisopropylamino suivie de la substitution de ce groupe par l'ion tetrazolure. L'espèce ainsi formée est très réactive vis-à-vis de l' hydroxyle 5' nucléophile. Après le couplage, on obtient un phosphite triester (Figure 12). Les rendements de couplages effectués dans des conditions classiques sont en général de l'ordre de 98%. Ce rendement conduit, pour la synthèse d'un 20-mère par exemple, à un rendement total qui n'est plus que de 67% environ. Si le rendement chute à 90% (phosphoramidite modifié, solvant de réaction non anhydre etc…) le rendement global n'est plus que de l'ordre de 15% et le produit ne peut plus être convenablement séparé par chromatographie des séquences tronquées.

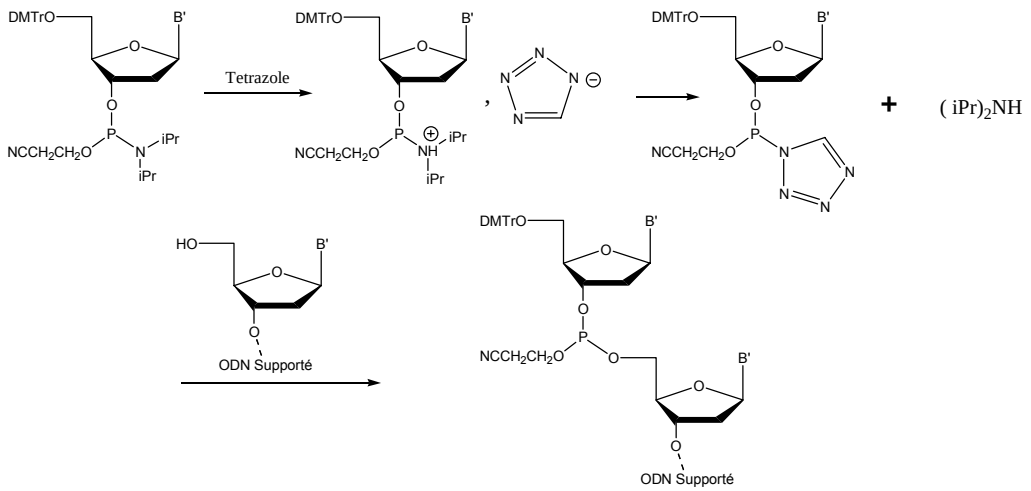


Figure 12: Schéma réactionnel du couplage au phosphoramidite

Etape 3: Coiffage

Dans l'hypothèse où le couplage précédent est réalisé avec un rendement de 98%, il reste alors 2% d'oligonucléotide sur support dont l'hydroxyle 5' est libre. Pour éviter qu'ils ne réagissent lors du couplage suivant, la fonction alcool primaire est acétylée par l'anhydride acétique. Si cette précaution n'était pas prise, on recueillerait de nombreuses séquences, plus courte d'un nucléotide que la séquence voulue. Ces séquences tronquées seraient alors malaisées à séparer de la séquence souhaitée.

Etape 4: Oxydation

Dans cette dernière étape, le phosphite triester est oxydé pour conduire au phosphate triester. Le réactif couramment employé est une solution d'iode dans un mélange pyridine/eau. On peut également obtenir des ODNs thiophosphates en employant à la place une solution de soufre dans un mélange CS_2/pyridine [13] ou le réactif de Beaucage [14].

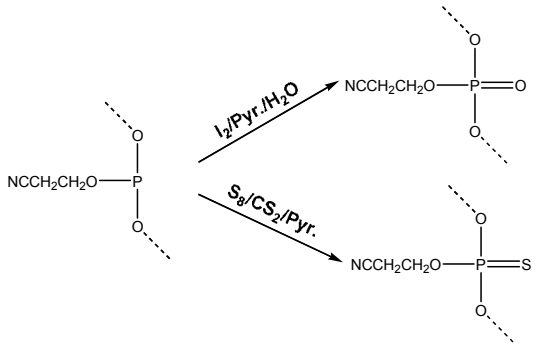


Figure 13: Oxydation d'un phosphite triester en phosphate triester *(en haut)* et thiophosphate triester *(en bas)*

Excepté dans le cas où l'oxydation est la dernière de la synthèse de l'ODN, le cycle reprend à l'étape numéro 1.

Etape 5 : Déprotection

Après élongation, les groupements phosphates de l'oligonucléotide sur support sont protégés par le groupe cyanoéthyle tandis que les bases nucléiques le sont par des groupes benzoyle ou isobutyryle. De plus l'oligonucléotide est lié au support par une liaison ester de type succinate. Classiquement, l'ODN est décroché et déprotégé du support par l'ammoniaque concentrée à 28% à

50°C pendant 15 heures. Le groupe cyanoéthyle subit une β-élimination qui libère la fonction phosphate diester et de l'acrylonitrile. La liaison succinate est hydrolysée rapidement. La déprotection des bases nécessite des conditions plus vigoureuses [dans le cas d'un oligo(T) la déprotection peut être effectuée à t.a.]. On peut choisir de conserver le groupement trityle en 5' de l'oligonucléotide pour une meilleure séparation en chromatographie phase inverse. Dans ce cas là, on peut détrityler l'oligonucléotide par un traitement par l'acide acétique à 80% en 30 minutes et à t.a.

3.2.2 La méthode aux "H-phosphonates"

Les travaux de Todd ont conduit à l'élaboration de nucléotides H-phosphonate dont la structure générale est présentée en figure 14. [15].

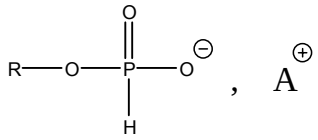


Figure 14: Structure générale d'un H-phosphonate

Ces synthons peuvent être couplés sur un oligonucléotide sur support. En présence d'un chlorure d'acide, classiquement le chlorure de pivaloyle, le H-phosphonate forme un anhydride mixte, réactif vis-à-vis de la nucléophilie de l'hydroxyle 5' de l'oligonucléotide sur support (Figure 15).

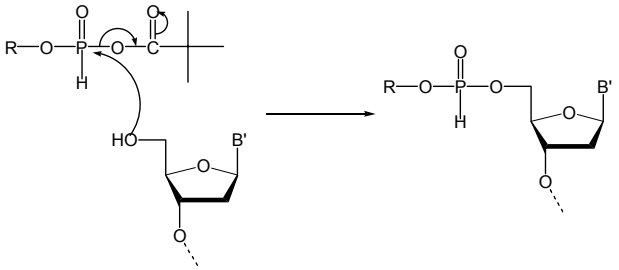


Figure 15: Mécanisme réactionnel du couplage au H-phosphonate

Dans une deuxième étape le H-phosphonate, après activation par une entité fortement électrophile (X = I^+, CCl_3^+), peut réagir sur un nucléophile (alcool, amine, eau etc…) pour former un large éventail de produits possibles : phosphate triester, phosphate diester, thiophosphate, phosphoramide.

La méthode du couplage au H-phosphonate peut être utilisée sur synthétiseur. Les seules différences sont l'utilisation du chlorure de pivaloyle comme activateur en lieu et place du tétrazole, et l'oxydation de toutes les liaisons H-phosphonates internucléotidiques qui est réalisée en une seule étape lorsque l'assemblage de la séquence est terminé.

La réactivité de la liaison H-phosphonate internucléotidique vis-à-vis des nucléophiles permet d'obtenir des liaisons internucléotidiques modifiées [13]. Cela constitue une voie d'accès intéressante à des ODNs comportant une fonction réactive protégée en vue de leur couplage ultérieur avec des marqueurs.

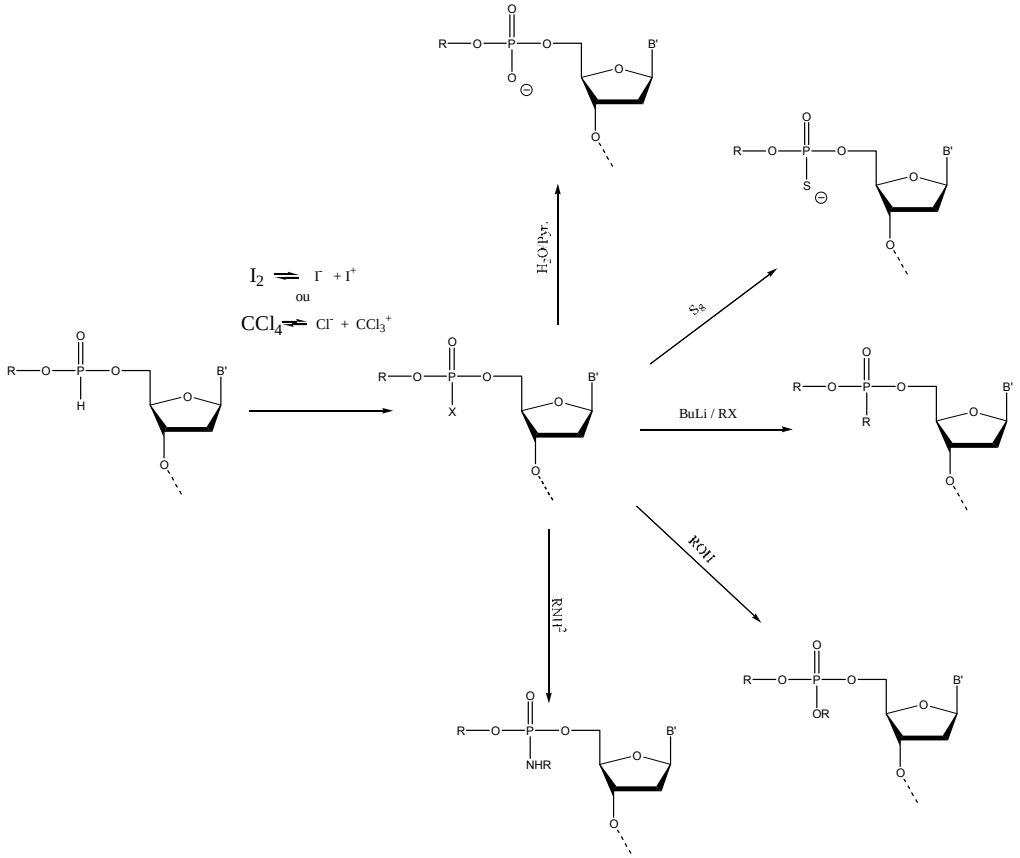


Figure 16: Fonctionnalisation du dialkylphosphonate

Cette stratégie peut être utilisée pour incorporer des liaisons internucléotidiques modifiées au cours de l'assemblage des ODNs sur support synthétisés par la méthode aux "phosphoramidites"

4. Méthode d'introduction de groupes réactifs et de marqueurs sur les ODNs

La synthèse d'une sonde oligonucléotidique nécessite le choix d'une méthode de couplage ou d'incorporation du marqueur à l'ODN. Nous présenterons ici quelques unes des méthodes existantes.

Deux stratégies sont utilisables: l'incorporation avant décrochage de la séquence de son support, ou le couplage en solution sur l'ODN déprotégé. Les fonctions réactives peuvent être généralement introduites à diverses positions de la chaîne oligonucléotidique (extrémité 3' ou 5', phosphate internucléotidique, sur une base modifiée etc…). Pour le chimiste, le choix de la technique d'incorporation la plus rapide et la plus efficace s'imposera. Toutefois, pour une séquence et un marqueur donnés, les propriétés du conjugué résultant peuvent considérablement varier selon que le marqueur a été greffé aux extrémités 3' ou 5', en milieu de séquence, sur une base etc…

Aussi la technique d'incorporation la plus simple d'utilisation ne produira-t'elle pas nécessairement un conjugué aux propriétés aussi intéressantes qu'un conjugué synthétisé par une méthode plus fastidieuse, et ceci même si la séquence en bases et le marqueur employé restent les mêmes.

4.1. Incorporation directe du marqueur à l'ODN lié au support

4.1.1. Au cours de l'assemblage

En premier lieu, cette méthode n'est utilisable que si le marqueur introduit résiste aux conditions d'assemblage puis de déprotection de la séquence oligonucléotidique. Deuxièment, le synthon doit être soluble et disponible en quantités suffisantes, puisqu'un très large excès doit être utilisé. Enfin, l'introduction du marqueur ne doit pas perturber le couplage du phosphoramidite suivant.

Une fois ces critères remplis, plusieurs méthodes d'incorporation directe existent: l'utilisation de supports modifiés comportant le marqueur, l'utilisation de phosphoramidites ou de H-phosphonates du marqueur ou d'un nucléoside modifié lié au marqueur (positions 4 et 5 des pyrimidines, positions 2 et 7 des guanines, position 6 et 7 des adénines, position 2' du sucre).

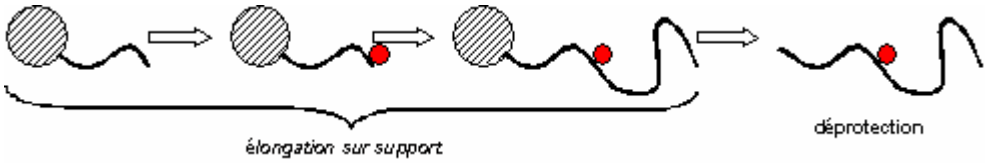


Figure 17: Le marqueur est directement introduit sur l'ODN au cours de son élongation

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HPA) peuvent être introduits de cette manière. Ainsi le pyrène a pu être incorporé sur une base nucléique naturelle (Figure 18, à gauche) [16], en position anomérique d'un 2'-désoxyribose (Figure 18, au milieu) [17] ou bien encore par l'intermédiaire d'un squelette modifié (Figure 18, à droite) où un propylèneglycol remplace le 2'-désoxyribose naturel [18].

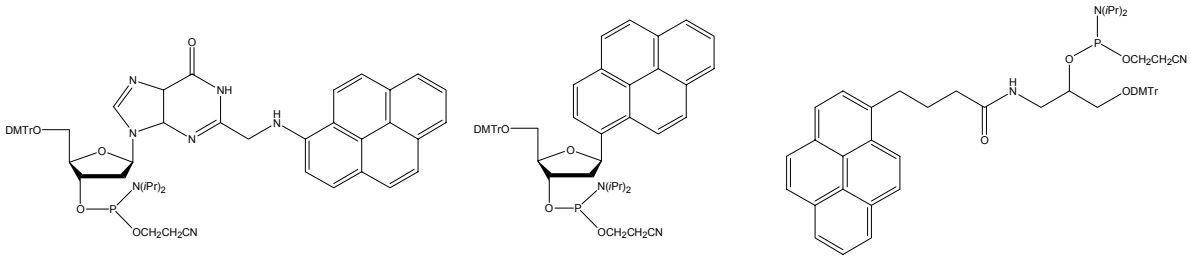


Figure 18: Réactifs permettant l'incorporation d'un groupe pyrène au cours de la synthèse de la séquence oligonucléotidique.

Une méthode d'incorporation du marqueur lors de l'assemblage de la chaîne a été développée plus récemment et s'appuie sur la chimie du palladium [19]. Après incorporation d'une 2'-desoxy-5-iodouridine par la chimie au phosphoramidite, le couplage est effectué sur résine en présence de $Pd^{(0)}$ et d'une propargylamine (voir figure 19) soit protégée (R=TFA-, Boc-) soit portant un marqueur (R=biotine, $Ru(bpy)_3^{2+}$). Le couplage du phosphoramidite et celui de l'alcyne sont réalisés avec de bons rendements (>85%). La méthode peut être généralisée au couplage de n'importe quel marqueur et permet d'éviter la préparation de dérivés phosphoramidites de ceux-ci. En effet, les phosphoramidites de marqueur, en plus d'être parfois difficiles à préparer, peuvent donner de faibles rendements de couplage. Les inconvénients de la méthode sont l'obligation d'introduire une 2-désoxyuridine dans la séquence ainsi que le risque d'obtenir un rendement de couplage du phosphoramidite suivant assez faible à cause du marqueur introduit.

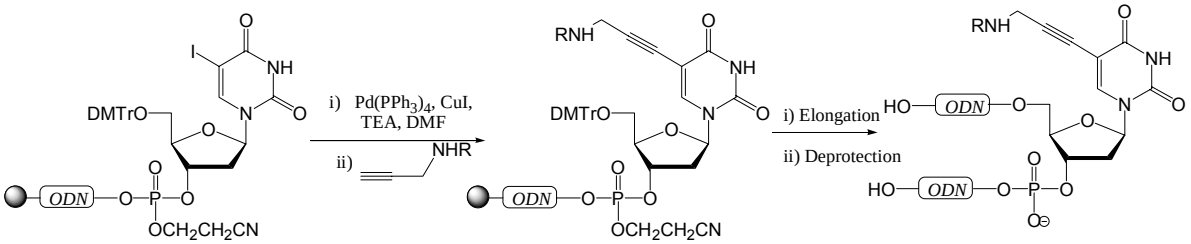


Figure 19: Incorporation du marqueur par couplage de Sonogashira

4.1.2. A la fin de l'assemblage

Plusieurs équipes ont mis au point des réactifs permettant l'incorporation du marqueur directement sur colonne *après* l'élongation de la séquence sur support, et non *pendant* comme c'est le cas avec les phosphoramidites modifiés présentés en exemple (Figure 18). Bien que nécessitant l'incorporation de marqueurs stables aux conditions de déprotection, la méthode permet d'obtenir des conjugués possédant plusieurs types de marqueur à partir d'une séquence unique.

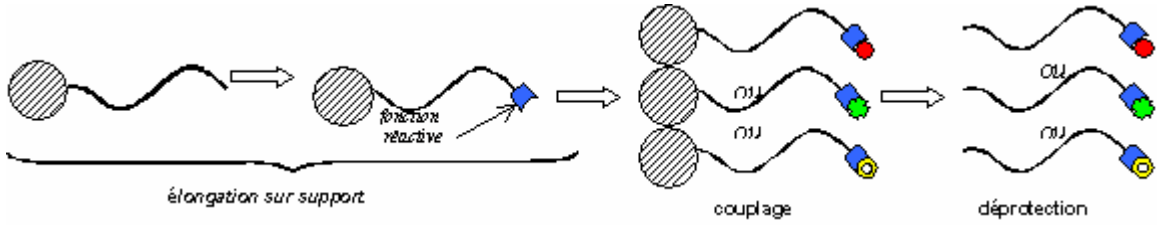


Figure 20: Une fonction réactive est introduite sur l'ODN au cours de son élongation et permet le couplage d'une multitude de marqueurs après déprotection.

4.1.2.1. Couplage alcyne

Minakawa *et al.* ont synthétisé les dérivés de la 2'-désoxy-5-éthynyluridine (Figure 21) et les ont incorporés en position 3' ou 5' de séquences oligo(T) ou comportant les quatre bases. En présence d'un catalyseur au cuivre, l'ODN sur support ainsi obtenu réagit sur un marqueur comportant une fonction alcyne vrai* tout en conservant un taux très faible de *cross coupling* [20].

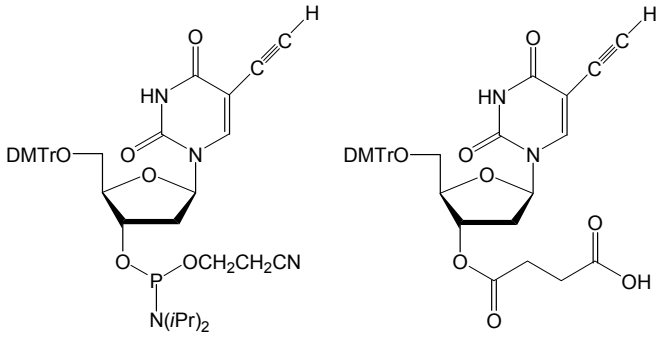


Figure 21: Réactif d'introduction d'une 5-éthynyluridine en 5' (*gauche*) et en 3' (*droite*)

Le complexe organométallique utilisé (CuCl-TetraMEthyleneDiAmine) permet de coupler directement sur la colonne le marqueur désiré (Figure 22) après l'élongation de la chaîne sur le support avec de bons rendements. Toutefois la méthode comporte de nombreux inconvénients : le marqueur doit être stable dans les conditions de déprotection, le couplage n'a été effectué qu'en 3' et 5', le marqueur doit posséder une fonction alcyne vrai, le conjugué obtenu comporte une liaison extrémement rigide phénylbut-1,3-diynyle.

* Le terme *alcyne vrai* désigne les alcynes de tyope RCCH, contrairement aux alcynes disubstitués RCCR'

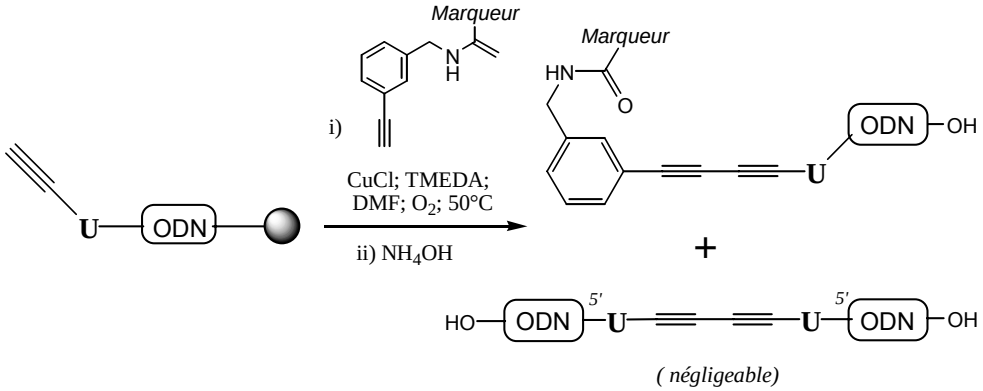


Figure 22: Couplage acétylénique entre l'ODN et un marqueur

4.1.2.2. Utilisation de groupes photolabiles

Greenberg et son équipe ont développé des nucléosides dont une fonction réactive, une amine, est protégée par un groupe photolabile [21]. Ces nucléosides sont incorporés lors de l'assemblage de l'ODN protégé sur le support. Par irradiation, la fonction réactive est sélectivement libérée tandis que l'ODN reste lié au support. L'ODN peut être par la suite fonctionnalisé sur résine par un marqueur.

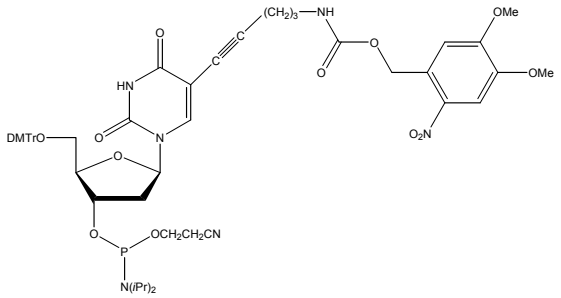


Figure 23: 2'-Désoxyuridine modifiée comportant une amine protégée par un groupe photolabile

Le nucléoside introduit est une 2'-désoxyuridine portant en position 5, une amine primaire protégée par un groupe 2-nitro, 4,5-diméthoxybenzyloxycarbonyle. Une fois la chaîne ODN assemblée, la résine est irradiée à 365 nm et le (ou les) groupe amine est déprotégé sélectivement. On peut alors le fonctionnaliser sur résine (Figure 24).

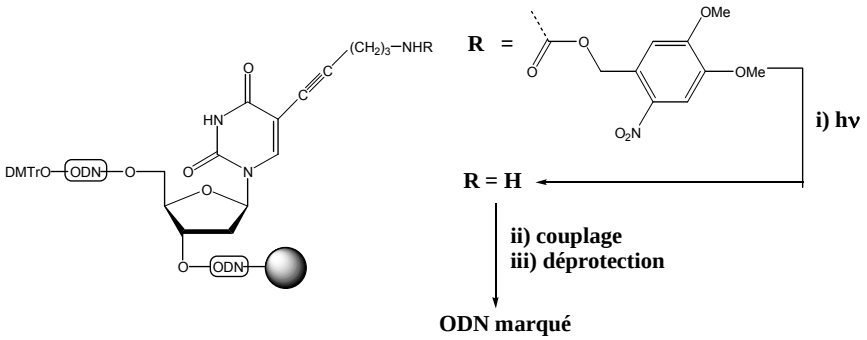


Figure 24: Incorporation d'un marqueur sur un ODN par la technique des groupes photolabiles

Il est également possible de déprotéger l'ensemble de l'ODN et de procéder à un couplage en solution (méthode 2). Le plus intéressant étant que cette méthode permet également d'introduire plusieurs marqueurs différents sur une même séquence. Les groupes protecteurs étant orthogonaux, on peut, grâce à n séquences irradiation/couplage/élongation introduire n marqueurs différents en n sites.

4.1.2.3. Utilisation des 5'-iodo-ODNs

L'équipe de Kool a utilisé l'iodure de méthyltriphénoxyphosphonium dans le DMF pour convertir sur support et par des procédures automatisées l'hydroxyle 5'-terminal en iodure [22] rapidement (5 minutes) et avec de bons rendements (environ 95%). Cet oligonucléotide peut être par la suite fonctionnalisé de diverses manières par des protocoles automatisés et avant la déprotection finale [23].

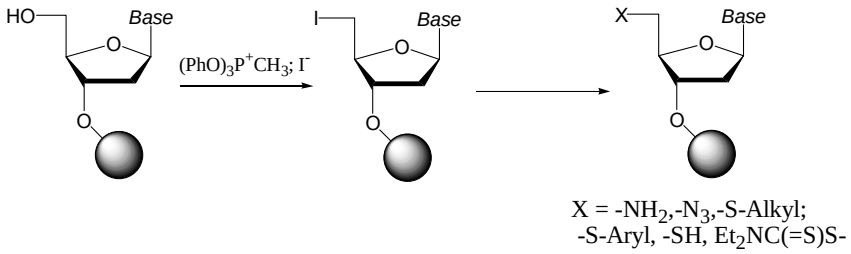


Figure 25: Fonctionnalisation en 5'-*C* de l'ODN 5'-iodo

4.2. Introduction d'une fonction réactive sur l'ODN et couplage d'un marqueur avec l'ODN déprotégé

Toutefois de nombreux marqueurs ne résistent pas aux conditions de déprotection requises pour la déprotection des ODNs, ne sont pas assez solubles ou ne peuvent être obtenus en grandes quantités, c'est pourquoi il s'avère souvent préférable d'introduire le marqueur par des réactions en solution *après* déprotection de l'ODN. Malheureusement, les oligonucléotides non modifiés ne présentent pas de fonctions susceptibles de réagir sélectivement et efficacement avec un marqueur donné. C'est pourquoi la synthèse d'un conjugué ODN-marqueur se décompose en plusieurs étapes. Tout d'abord la synthèse d'un marqueur doté d'un premier groupe fonctionnel, puis d'un ODN comportant un second groupe fonctionnel. Enfin, dans une dernière étape, le marqueur est couplé à l'ODN par la réaction du premier groupe sur le second. Dans la grande majorité des cas, un bras de liaison est utilisé pour relier le marqueur à l'ODN. Ce bras peut être incorporé, soit au marqueur, soit à l'ODN (avant couplage du marqueur), soit une partie sur l'un et une seconde sur l'autre.

Parmi les nombreuses méthodes les plus employées, se trouvent les réactions entre un ODN comportant un groupe phosphate terminal et un marqueur portant une fonction amine, un ODN portant une fonction amine (ou thiol) et un marqueur comportant un groupe électrophile ou bien un ODN portant un groupe thiophosphate et un marqueur portant un groupe partant.

Une fonction protégée est introduite au cours de la synthèse. Après déprotection finale, cette fonction est mise à réagir avec un marqueur convenablement fonctionnalisé. Il s'agit là de couplage en milieu homogène.

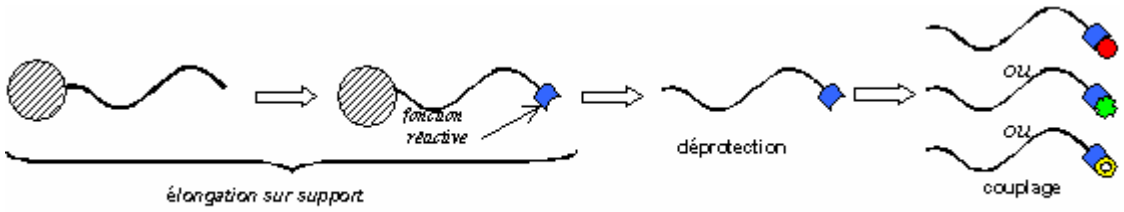


Figure 26: Une fonction réactive est introduite sur l'ODN au cours de son élongation et permet le couplage de différents marqueurs après déprotection.

4.2.1 Par réaction entre une amine et un composé carbonylé

Une fonction amine primaire peut être introduite sous forme protégée sur l'oligonucléotide encore sur support par couplage en 5' du phosphoramidite présenté en figure 27 [24].

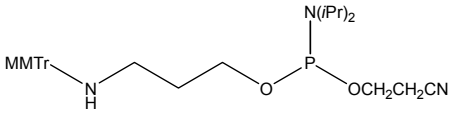


Figure 27: Phosphoramidite permettant l'introduction d'une amine primaire en 5' de l'ODN.

L'emploi de bases modifiées telles les uridines substituées en position 5 (Figure 28) [25] permet d'introduire une fonction amine primaire dans la chaîne. Les bases ainsi utilisées ne peuvent être modifiées qu'à des positions qui ne perturbent pas l'hybridation, classiquement la position 5 des pyrimidines et 7 des purines.

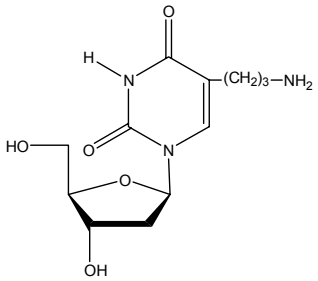


Figure 28: Thymine modifiée en 5 par un bras aminopropyle.

La fonction amine peut également être introduite en position internucléotidique grâce à la chimie aux H-phosphonates (Figure 29, § A.3.2.4). Au cours de l'élongation, une base comportant un H-phosphonate est couplée sur la résine. Après réaction sur une diamine monoprotégée (R = CF_3CO-) on obtient une liaison phosphoramidate internucléotidique [26]. L'élongation sur support est poursuivie puis l'ODN est déprotégé dans les conditions classiques (R = H).

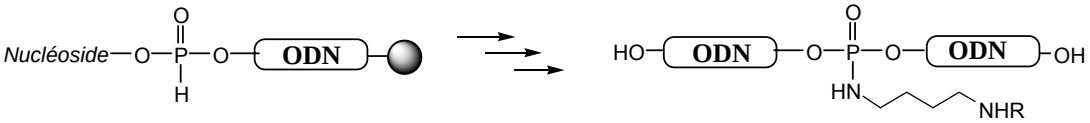


Figure 29: Introduction d'une fonction amine primaire en position internucléotidique.

La fonction amine peut être fonctionnalisée de diverses manière [27]. Un ODN comportant une fonction ester activée peut être préparé *in situ* par réaction entre un ODN comportant une fonction amine et un diester aliphatique activé ou un anhydride cyclique (Figure 30).

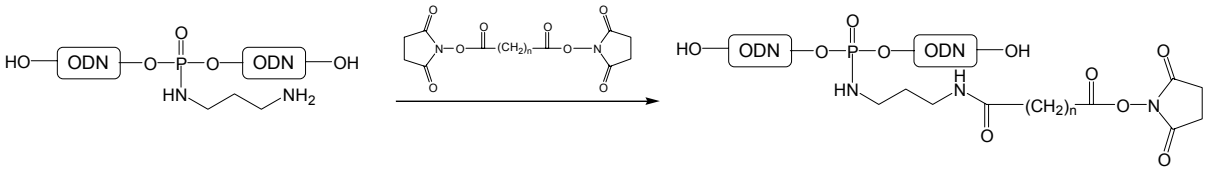


Figure 30: Formation d'un ODN portant un alkylcarboxylate de succinimidyle

En lieu et place d'un dérivé de diacide, l'emploi du CDI permet d'obtenir un conjugué comportant une liaison de type urée par couplage entre un marqueur et un ODN contenant tous les deux une fonction amine (Figure 31).

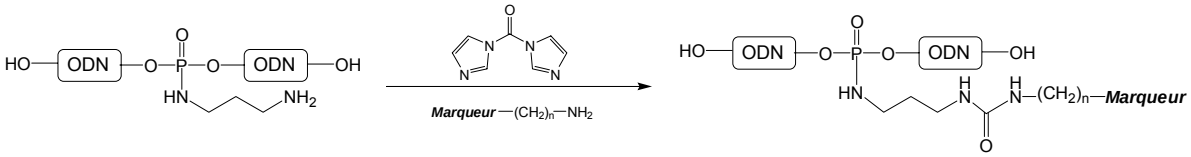


Figure 31: Couplage au CDI (CarbonylDiImidazole)

L'utilisation de support modifié (§ B.1.2.3.3) permet également de libérer une fonction alkylamine primaire en 3' de l'ODN. Une fois la fonction amine déprotégée, l'ODN peut être fonctionnalisé par un marqueur comportant un groupe électrophile (isothiocyanate, aldéhyde, anhydride, chlorure de sulfonyle, ester actif de succinymidyle, de paranitrophényle, de pentachloro- ou pentafluorophényle).

Une méthode voisine consiste à synthétiser un oligonucléotide portant une fonction alkyloxyamine. La nucléophilie accrue des oxyamines, comparées à celle des amines, en font des réactifs de choix pour le couplage sur des dérivés de cétones ou d'aldéhydes. Différents phosphoramidites permettant l'introduction d'une fonction oxyamine, protégée sous forme d'un phtalimide, ont été synthétisés par l'équipe de Lönnberg [28]. Le composé **A** (Figure 32) permet par exemple d'introduire la fonction oxyamine à l'extrémité 5'. Des nucléosides modifiés permettent également d'incorporer une fonction oxyamine portée soit en 2', *via* le phosphoramidite d'une uracile modifiée, ou en N^4 d'une cytosine modifiée. Le pyrènecarboxaldéhyde et le rétinal ont pu être couplés avec succès à des oligonucléotides ainsi modifiés. Les conjugués comportent alors une liaison oxime.

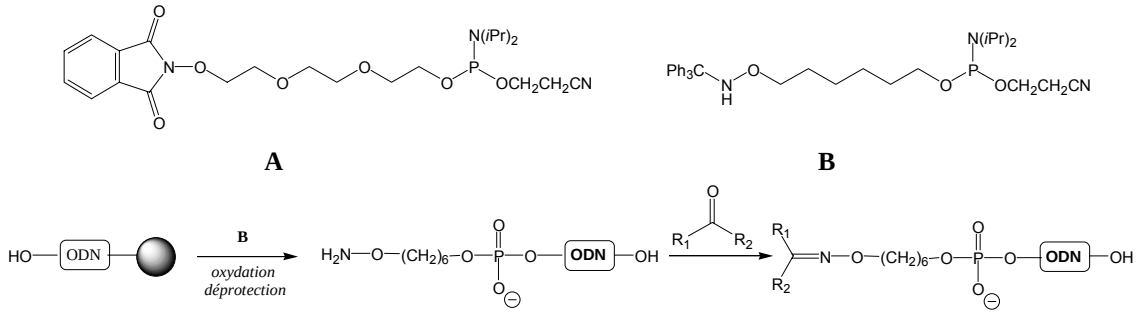


Figure 32: Structure du phosphoramidite permettant l'introduction d'une fonction oxyamine (*haut)* et couplage d'une cétone sur l'oligonucléotide-oxyamine (*bas*)

Le remplacement du phtalimide par le trityle en tant que groupe protecteur (composé **B**) [29] a amélioré cette technique en rendant possible le dosage de l'ajout d'une part et, d'autre part, la séparation en CLHP de l'ODN 5'-oxyamine de l'ODN 5'-OH puisque le groupe trityle est, contrairement au phtalimide, orthogonal aux groupes protecteurs utilisés classiquement en synthèse oligonucléotidique.

4.2.2. <u>Par réaction S_N2 entre un thiol et un halogénure d'alkyle</u>

Une réaction de couplage couramment utilisée est la S_N2 entre un thiol et un halogénure d'alkyle. Bien qu'une limitation majeure de la méthode soit l'oxydation du thiol en disulfure, de bons rendements de couplage peuvent être obtenus. De manière similaire à l'introduction d'une amine, la fonction thiol peut être introduite *via* le couplage en 5' d'un phosphoramidite adéquat (Figure 33), [30,31] ou l'incorporation au cours de l'élongation de la chaîne d'une base modifiée.

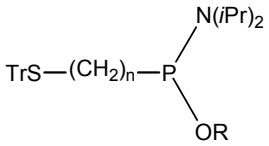


Figure 33: Phosphoramidite permettant l'introduction d'un thiol en 5' (n > 2; R=-CH_2CH_2CN; morpholino)

La fonction thiol peut être introduite sous la forme protégée d'un disulfure *via* la chimie du "H-phosphonate" en position internucléotidique [32]. Une fois l'élongation de la chaîne terminée, le thiol est libéré par l'emploi d'un réducteur, classiquement le TCEP [33] (tricarboxyéthylphosphine). Pour plus de détail voir § B.3.4.3.4.

4.2.3. Par activation d'un phosphate terminal

Cette méthode consiste à coupler un marqueur comportant une fonction nucléophile sur un phosphate terminal activé *in situ* par un mélange DMAP, pyridine disulfure et triphénylphosphine. Les phosphates terminaux, du fait de leur plus faible encombrement stérique, sont beaucoup plus réactifs que leurs homologues internucléotidiques. Le phosphate activé peut être couplé avec une large gamme d'amines, d'hydrazides ou de thiol mono- ou bifonctionnels: diamines aliphatiques ou aromatiques, acides aminés, aminethiols, aminoalcools, thioacides ou hydrazines [34]. S'il reste une fonction libre , elle peut être à son tour engagée dans une raction avec un marqueur portant un groupe adéquat (amine, acide, thiol, iodure d'alkyle, isothiocyanate, etc…). Cette méthode a permis l'obtention d'oligonucléotides *bis*-pyrene [35, 36].

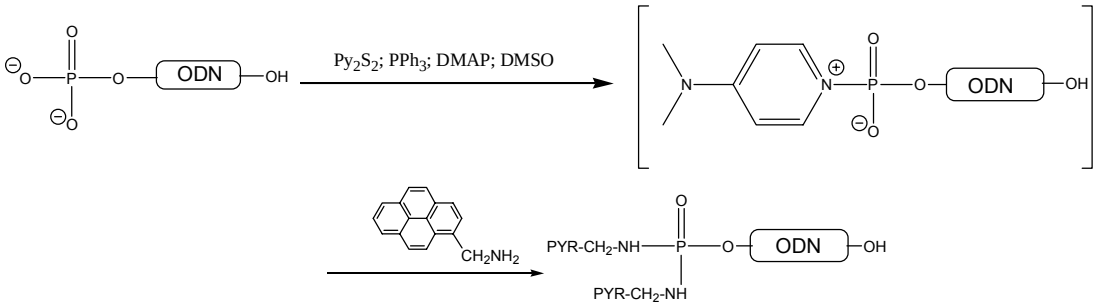


Figure 34: Activation et couplage d'un ODN 5'-phosphate [35]

4.2.4. Par clivage du diol des riboses

Par un couplage 5',5', un ribonucléoside est introduit sur la chaîne oligonucléotidique. L'oxydation par le periodate de sodium aboutit à la rupture de la liaison C-C du diol vicinal et conduit à la formation du produit à cycle ouvert comportant deux fonctions aldéhydes. On peut alors introduire un marqueur comportant une fonction amine (R-NH_2) [37]. Une double réaction de Schiff aboutit à la fermeture d'un cycle morpholine. En plaçant le ribonucléoside en position 3' terminale, on peut, par cette méthode, obtenir un ODN fonctionnalisé à son extrémité 3' [38].

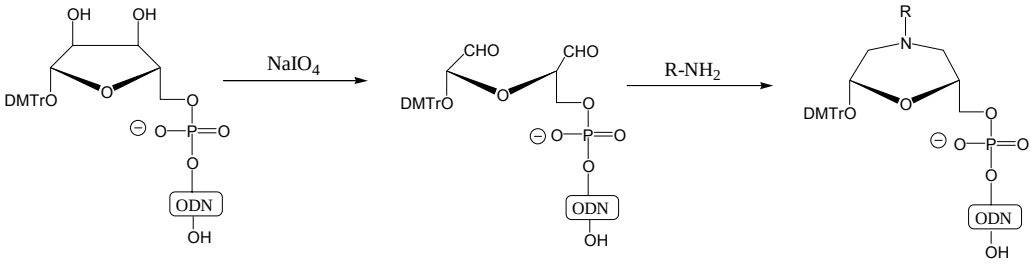


Figure 35: Rupture puis fermeture du cycle ribose permettant l'introduction d'un marqueur

4.2.5. Après libération d'une fonction en 3' lors de la déprotection

Du fait que l'élongation des oligonucléotides procède généralement dans le sens 3'→5', l'hydroxyle 3' de l'oligonucléotide est lié au support par une fonction ester. La faible réactivité de l'alcool secondaire et la présence d'une multitude de fonctions sur les bases nucléiques empêchent sa fonctionnalisation après la déprotection de l'ODN. C'est pourquoi de nombreux supports modifiés ont été mis au point qui permettent le relargage, après déprotection, d'un ODN dont l'hydroxyle en position 3'-terminale est fonctionnalisé.

Par réaction entre le support CPG aminopropyle et le chlorure de l'anhydride trimellitique, l'équipe de Lyttle a obtenu un support comportant une fonction anhydride [39]. Par réaction sur un alcool tritylé $DMTrO(CH_2)_nXH$, on introduit la fonction désirée en 3' (X = O, NH ou S), et on obtient un support lié à l'ODN par une liaison ester, amide ou thioester. Après élongation et déprotection, la fonction voulue est libérée.

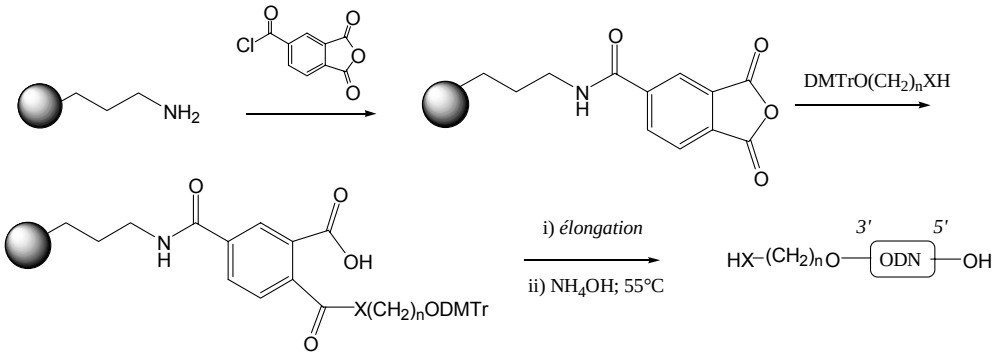


Figure 36: Synthèse, fonctionnalisation et déprotection du support anhydride trimellitique

Un autre support développé par Guzaev *et al.* comporte une fonction ester très sensible aux nucléophiles [40]. Après élongation, la résine peut être traitée par une solution aqueuse de diamine. L'aminolyse de la liaison support-ODN, de type α-hydroxyacétate d'α-hydroxyacétamide aboutit à la formation d'environ 90% d'ODN fonctionnalisé $3'–CH_2CONH(CH_2)_nNH_2$ et environ 10% du produit d'hydrolyse aqueuse $3'–CH_2COOH$. La cystamine peut également être introduite de cette manière ce qui rend possible la synthèse d'ODN 3'-thioalkyle.

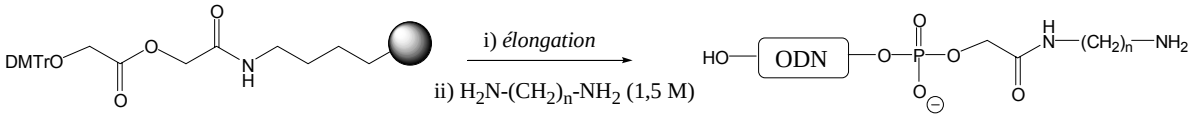


Figure 37: Déprotection du support hydroxyacétate d'hydroxyacétamide par des diamines.

Enfin, il existe une dernière méthode, basée sur la réaction entre un groupement thiophosphate porté par l'ODN et un marqueur comportant un groupe électrophile. Cette méthode ayant fait l'objet d'études au cours de nos travaux, elle sera présentée plus en détail par la suite.

4.2.6. Par réaction entre un ODN thiophosphate et un halogénure d'alkyle

Il existe une méthode de couplage qui s'appuie sur une réaction de substituion nucléophile entre un ODN comportant une fonction thiophosphate et un marqueur comportant un halogénure d'alkyle. Cette méthode ayant fait l'objet de nos travaux, nous la présenterons plus en détail au § B.1.

5. Aperçu des petites molécules capables de se fixer à l'ADN

Par le terme "petite molécule", on désigne des composés souvent d'origine synthétique et de masse inférieure à 2000 daltons. En sont donc exclues les biomolécules naturelles qui se fixent sur l'ADN dans le cadre de la vie cellulaire (histones, agents de transcription etc…).

Etant donnée l'importance fondamentale de l'ADN dans nombre d'évènements biologiques dont la conservation du patrimoine génétique, les acides nucléiques constituent une cible de choix pour le chimiste désireux de mettre au point des thérapies. Aussi de nombreuses équipes ont elles mis au point diverses molécules capables d'interagir avec la double hélice d'ADN et d'interférer avec de nombreux processus biologiques [41].

5.1. Les intercalants

Les molécules intercalantes sont généralement des molécules polyaromatiques comportant de trois à quatre cycles fusionnés et, le plus souvent, un ou plusieurs hétéroatomes. Ces composés se placent entre deux paires de bases, parallèlement à elles, et, à saturation, occupent alternativement un site sur deux du duplex. L'insertion de ces molécules polycycliques se traduit par un allongement et un déroulement de la double hélice. Outre les forces d'empilement (*stacking*) qui contribuent à la cohésion du complexe, les chaînes latérales influent également sur la stabilité de l'ensemble [42]. Certaines molécules, d'origine naturelle, s'intercalent entre les paires de bases de l'ADN comme l'ellipticine et l'actinomycine D (Figure 38)

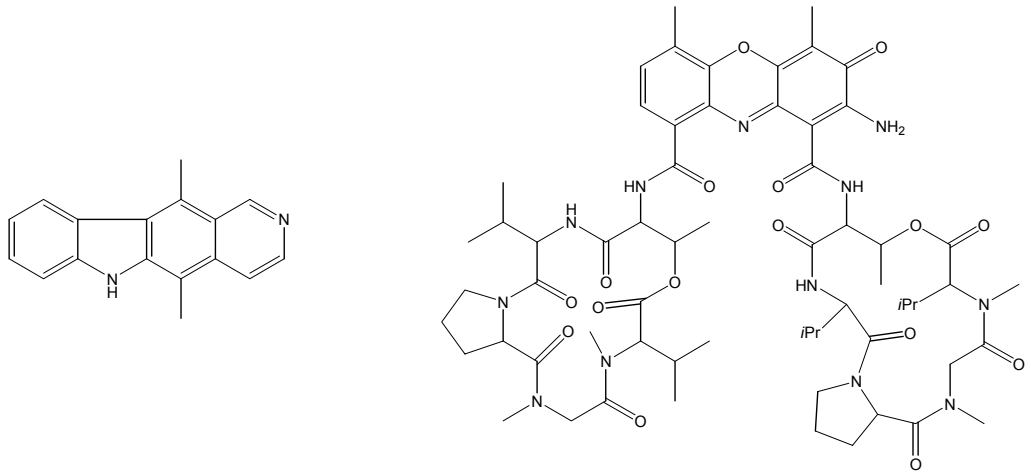


Figure 38: Structure de l'ellipticine *(à gauche)* et de l'actinomycine D *(à droite)*

De nombreux auteurs ont synthétisé des molécules polycycliques dotées de propriétés d'intercalation dans le duplex d'ADN [43]. La plupart de ces molécules possède un noyau polyaromatique capable de s'intercaler entre les paires de bases ainsi qu'une chaîne latérale basique (Figure 39).

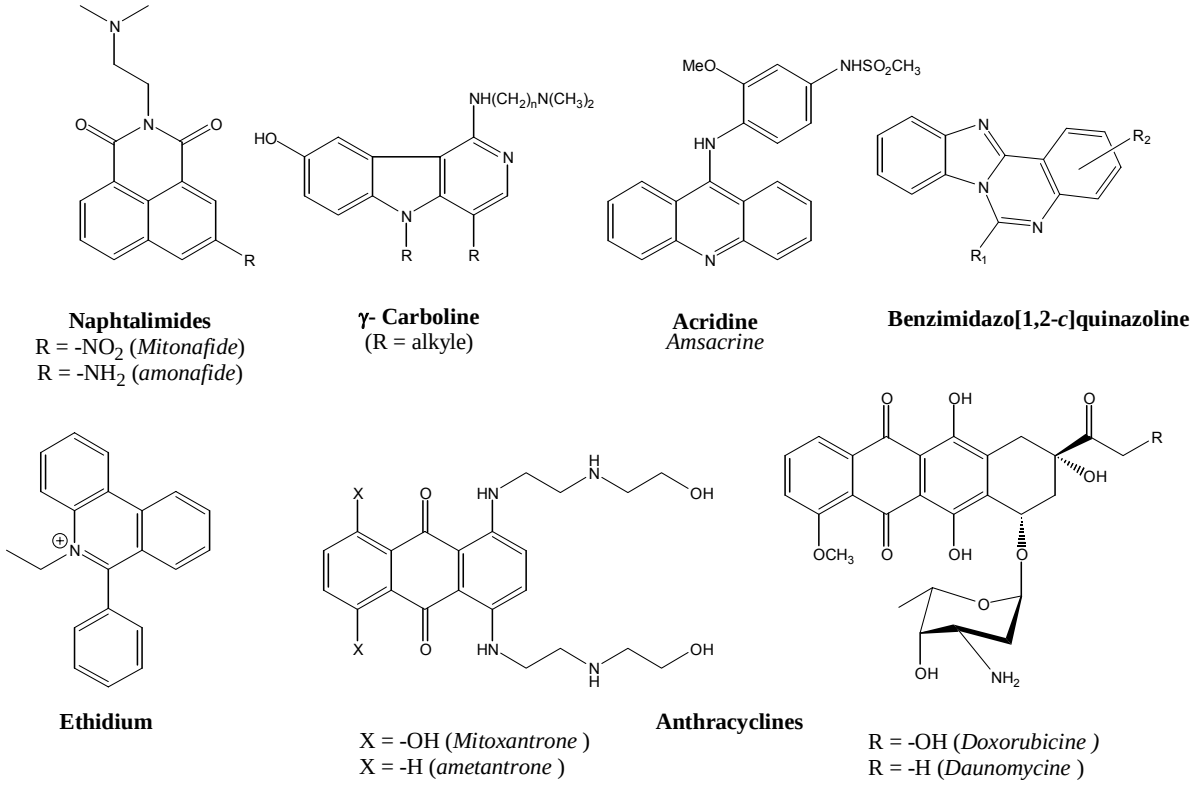


Figure 39: Présentation des principales familles d'intercalants *(en gras)* et de molécules représentatives de la famille *(en italique)*

5.2. Les ligands des sillons

Certaines molécules sont capables de se placer dans le petit sillon du duplex d'ADN. Les liaisons hydrogène que ces composés engagent avec les résidus hydroxyle et amino du cœur du duplex sont responsables de la cohésion de ces structures. Leur forme de croissant leur permet également d'épouser la courbure intérieure du petit sillon (Figure 40) [44]. En s'y lovant, ces composés interfèrent avec certaines fonctions de l'ADN comme la réplication ou la fixation de facteurs de transcription.

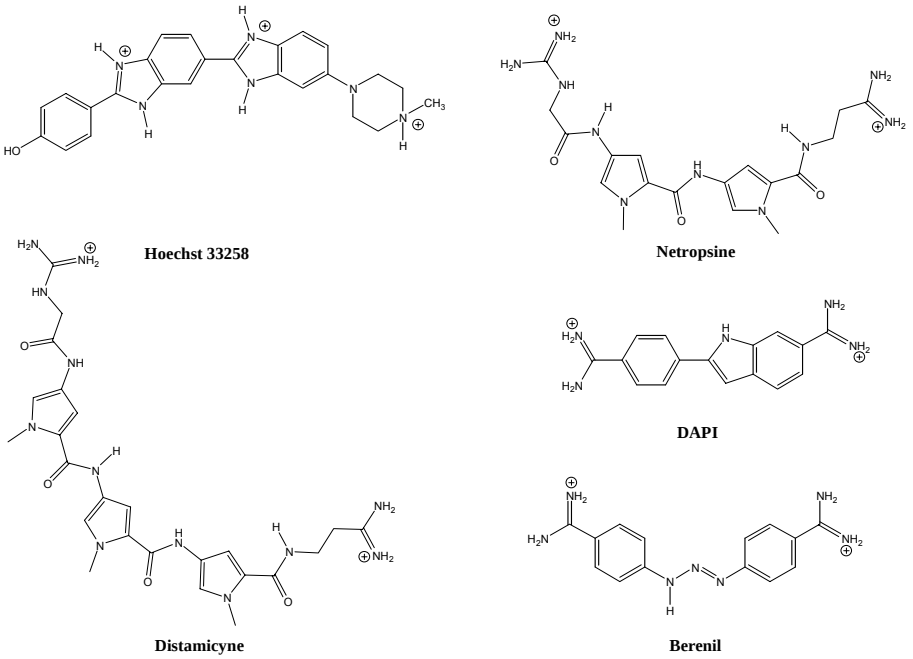


Figure 40: Structure de ligands du petit sillon

Ces différentes familles de molécules ont été développées à but thérapeutique[41,42]. Mais il est également possible d'utiliser ces composés pour le diagnostic ou pour l'analyse quantitative ou qualitative de l'ADN. Une grande variété de molécules a été développée [45] dans ce sens. Nous aborderons donc dans le chapitre suivant quelques unes des méthodes employées permettant de détecter des acides nucléiques et nous présenterons plus en détail celles qui s'appuient sur l'utilisation de molécules présentant un signal lumineux modifié en présence d'acides nucléiques.

6. Présentation des méthodes de détection de l'ADN

6.1. Techniques employées ne faisant pas appel à la fluorescence

6.1.1. Utilisation d'isotopes radioactifs.

L'incorporation d'un isotope radioactif comme le ^{32}P, ^{35}S, ^{3}H ou ^{125}I permet la détection de la sonde au moyen d'un compteur. Le phosphore 32 peut être introduit dans une séquence oligonucléotidique par réaction enzymatique en utilisant par exemple de l'ATP marquée. Les limitations de cette méthode sont les problèmes de sécurité liés à la manipulation de matière radioactive ainsi que le temps de demi-vie court de cet isotope.

6.1.2. Reconnaissance enzymatique.

Une molécule telle que la biotine est incorporée chimiquement ou enzymatiquement à la sonde. Une fois que celle-ci s'hybride avec sa cible, le duplex formé est reconnu par l'avidine qui se lie fortement à la biotine. Dans une dernière étape, une enzyme liée à l'avidine permet la dégradation d'un substrat en composés colorés.

6.2 Techniques employées faisant appel à la fluorescence *(voir annexe en page 149)*

Le développement de techniques de détection et d'analyse des acides nucléiques a bénéficié de l'émergence d'une grande variété de colorants et marqueurs fluorescents [46]. Nous présentons brièvement les différentes stratégies développées [47].

6.2.1 Signal non modifié

Certaines sondes contiennent un marqueur dont le rendement quantique de fluorescence est élevé mais qui varie peu au cours de l'hybridation, comme la fluorescéine ou la rhodamine. Il devient alors obligatoire de séparer, par lavage, les hybrides éventuellement formés de l'excès de sondes libres afin d'écarter la possibilité que le signal fluorescent observé soit dû à la sonde non hybridée. Toutefois cette opération se révèle délicate car un lavage insuffisant fausse aisément le résultat.

6.2.2 Signal modifié

Afin de remédier à ce problème, des sondes capables d'émettre un signal modifié lors de l'hybridation ont été développées. On peut envisager aussi bien une variation de l'intensité (le signal augmente considérablement ou bien disparaît) qu'une variation de sa nature (déplacement du

spectre qui se traduit par un changement de couleur). L'emploi de telles molécules ne nécessite plus d'étapes de lavage. Cette technique peut donc être aussi bien appliquée à la détection homogène (cible et sonde en solution) qu'en milieu hétérogène tel le principe des puces (cible en solution, sonde en surface)

6.2.2.1 Technique du FRET

Le double marquage d'un ODN permet d'utiliser la technique du FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer)* pour la détection d'un évènement biologique. Couramment utilisée dans l'étude des peptides dès les années 70, c'est plus tard que cette technique fut appliquée au domaine des acides nucléiques. La technique s'appuie sur l'utilisation d'une paire de marqueurs dont l'un est un donneur (D) et l'autre l'accepteur (A), le spectre d'émission du premier devant recouvrir le spectre d'absorption du second. En absence de A, l'irradiation de D à son λ_{Max} aboutit à un signal correspondant à l'émission de D. Par contre, en présence de A, un transfert se produit de D vers A et on observe l'émission de A (voir figure 41). Cette technique permet d'obtenir un signal d'émission nettement décalé par rapport à celui de l'émission de l'accepteur seul, levant ainsi les incertitudes quant à la lecture des résultats.

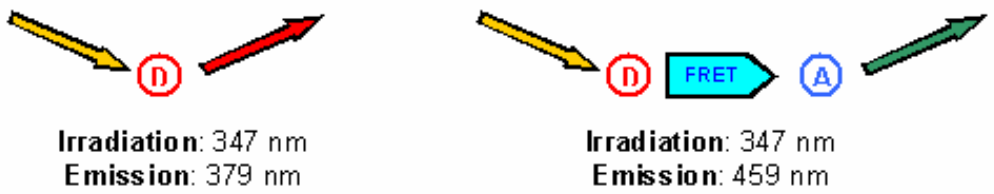


Figure 41: Représentation schématique de l'irradiation d'un donneur (D) seul et de son émission *(à gauche)* et de l'irradiation du couple accepteur (A) / donneur (D) mettant en jeu le phénomène de FRET avec émission de l'accepteur *(à droite).* Les couleurs sont utilisées à titre indicatif. Les longueurs d'onde mentionnées sont celles du couple pyrène (D) / pérylène (A) tel qu'il fut utilisé dans une expérience de FRET appliquée aux acides nucléiques [50]

Selon la manière dont la molécule émettrice, la séquence qui la supporte, la cible et un éventuel inhibiteur sont disposés les uns par rapport aux autres on peut identifier plusieurs "formats" d'hybridation [48].

- Deux sondes, l'une marquée en position 3' l'autre en position 5', l'une portant l'accepteur, l'autre le donneur, sont capables de s'hybrider sur une cible commune. Une fois le complexe formé, le donneur et l'accepteur se trouvent à proximité l'un de l'autre, rendant le transfert de fluorescence possible [49,50].

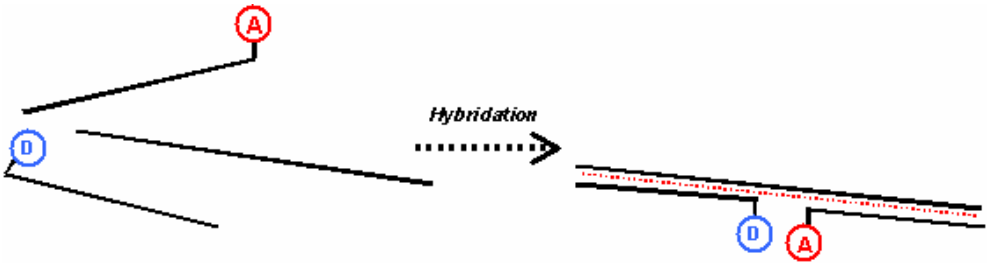


Figure 42: Hybridation de deux sondes sur une cible commune

- Une autre technique consiste à utiliser un conjugué comportant une molécule donneuse et un composé accepteur. Ce dernier est introduit sous forme libre (non conjugué) et présente des

propriétés d'intercalation. Une fois le duplex formé, l'accepteur s'intercale dans la double hélice et conduit à une forte décroissance du signal fluorescent du donneur [49].

Figure 43: Intercalation d'accepteurs non conjugués dans un duplex dont l'un des brins est marqué par un donneur

• Un progrès dans la conception des sondes a été réalisé grâce à la mise au point des *molecular beacon* (MB, balises moléculaires) [51]. Ces sondes sont constituées d'une séquence oligonucléotidique portant à chacune de ses deux extrémités un accepteur de fluorescence et un inhibiteur (Q, *quencher*), capable d'inhiber la fluorescence de l'accepteur. La partie centrale de la séquence est capable de s'hybrider à la cible, tandis que les deux parties extrémes sont autocomplémentaires. De ce fait, en absence de cible, le *molecular beacon* adopte une conformation bouclée dite en "épingle à cheveux" où l'accepteur et le quencheur se trouvent au voisinage l'un de l'autre. La fluorescence de l'accepteur est donc inhibée. Par contre, en présence de cible, le *molecular beacon* se déploie et s'y hybride du fait de la plus forte stabilité du duplex *MB*/cible que du duplex des parties terminales

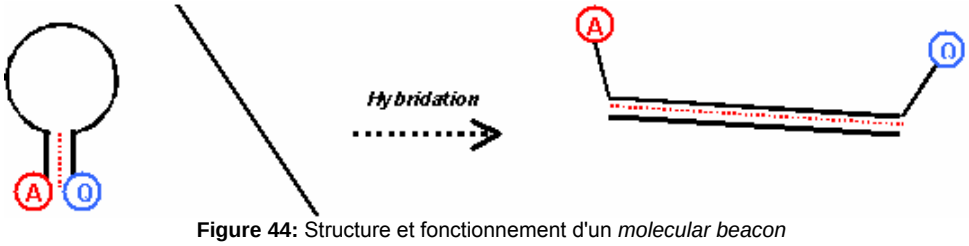


Figure 44: Structure et fonctionnement d'un *molecular beacon*

Afin d'automatiser les tests de reconnaissances de séquences ADN, la constitution de biopuces (ou *chips*) permet de rechercher simultanément des milliers de séquences dans un même échantillon. Pour cela, la fixation des sondes ADN sur des supports solides (verre, graphite, polymère) a été réalisée [52].

6.2.2.2 ODN lié à un seul marqueur dont les propriétés de fluorescence varient au cours de l'hybridation

Une des méthodes employées pour la détection des acides nucléique consiste en un oligonucléotide lié de manière covalente à un unique marqueur (et non deux comme dans les expériences de transfert d'énergie). L'hybridation de la sonde avec sa cible s'accompagne d'une modification de l'environnement du marqueur (réduction de son degré de liberté, modification de la solvatation, interaction avec les plans des bases nucléiques, inhibition de la fluorescence causée par les bases nucléiques environnantes), qui, à son tour, entraîne une variation de la nature du signal spectral (en absorption et/ou en émission de fluorescence) qui peut se traduire par un hypochromisme, un hyperchromisme, déplacement des maxima d'absorption, modification des intensités relatives des bandes… Plusieurs familles de composés ont ainsi été liées à des ODNs, nous en présentons ici quelques unes à titre d'exemples.

Un ligand du petit sillon, le Hoechst 33258, a été fixé en position internucléotidique de séquences poly d(A) et poly d(T) [53]. Ce marqueur stabilise fortement le duplex et, en spectrométrie de fluorescence, émet un signal à λ=450 nm. En présence de séquence complémentaire, une forte augmentation de l'intensité du signal fluorescent (jusqu'à un facteur 23) a été constatée. L'influence de nombreux paramètres, tels l'isomérie, la longueur du bras de liaison ou la nature des bases adjacentes, a également été démontrée. L'inconvénient de ce marqueur est qu'il ne se fixe que dans les séquences dA-dT. Des flavines et des déazaflavines ont également été liées à l'extrémité 5' d'ODNs comportant les quatre bases nucléiques. Ces molécules polycycliques, émettent un signal fluorescent à, respectivement, 530 et 455 nm environ et ne modifient pas la stabilité du duplex. En présence de séquence complémentaire, la fluorescence des sondes ODNs-flavine diminue fortement (jusqu'à un facteur 20). Cette diminution est d'autant plus importante que la longueur de la séquence complémentaire est grande [54]. Des complexes du ruthénium ont également été couplés à des ODNs. Les duplex formés par hybridation des conjugués obtenus avec leur cible sont nettement plus stables que le duplex non modifié correspondant [55]. L'augmentation du signal fluorescent (vers 600 nm) observée en présence de séquence complémentaire est causée par l'intercalation d'un des ligands du complexe de Ru^{2+} dans la double hélice. La géométrie du complexe de ruthénium (isomère Δ ou Λ) influe sur cette variation de signal. Le pyrène a également été lié de manière covalente à des ODNs par la position 2' d'une uridine [56,57]. Des sondes oligothymidylates ainsi fonctionnalisées présentent un signal fluorescent à 378 nm augmenté jusque d'un facteur 15 lorsqu'elles s'hybrident à une cible poly r(A). Le groupe pyrène est supposé s'intercaler entre les bases du duplex.

Des membres de la famille des cyanines ont également été couplés à diverses positions sur des ODNs. Les propriétés de ces conjugués seront décrites en détail dans la partie § B.2.2. de ce manuscrit.

B: Synthèse de nouveaux conjugués ODN cyanines

B.1. Synthèse d'un nouveau réactif d'introduction du groupe thiophosphate en position 5' des ODNs

B.2. Cyanines et conjugués de cyanines: Rappels bibliographiques

B.3. Synthèses et propriétés de nouveaux conjugués ODNs-cyanines

B: Synthèse de nouveaux conjugués ODNs-cyanines

Introduction

Notre objectif consistait à préparer des sondes oligonucléotidiques comportant un marqueur fluorescent émettant un signal modifié au cours de l'hybridation. Dans le prolongement des travaux déjà effectués au laboratoire nous avons choisi d'utiliser des marqueurs appartenant à la famille des cyanines. Les résultats décrits dans la littérature montrent que d'une façon générale les propriétés des oligonucléotides liés à différents ligands dépendent fortement des paramètres de la liaison entre les deux entités. Nous avons donc choisi de fixer les cyanines en position 5'- ou sur un phosphate internucléotidique d'ODNs comportant les quatre bases nucléiques (les travaux antérieurs développés au laboratoire concernaient uniquement des oligothymidylates et des oligo-2'-désoxyriboadénylates). Des résultats obtenus au laboratoire ayant montré que le Thiazole Orange (TO), un représentant de la famille des cyanines, est peu stable en milieu fortement basique (dans les conditions utilisées pour la déprotection des oligonucléotides: traitement à l'ammoniaque concentrée à 25 % pendant 8 h à 55 °C) nous avons choisi de coupler les cyanines aux ODNs déprotégés.

Parmi les méthodes permettant la liaison covalente d'un marqueur en position 5' d'un ODN déprotégé (décrites au chapitre A) nous avons choisi la méthode au « thiophosphate ». Le principe consiste à incorporer une fonction thiophosphate en position 5' de l'ODN et une fonction halogénure d'alkyle au marqueur. Le couplage entre les deux entités peut ensuite être réalisé dans des solvants ou des mélanges de solvants variés en présence d'éther couronne. La liaison des cyanines en position internucléotidique des ODNs sera réalisée *via* une liaison phosphoramidate selon la stratégie déjà utilisée au laboratoire pour la préparation de conjugués oligothymidylate-TO et oligo-2'-désoxyriboadénylate-TO.

Les réactifs commerciaux permettant l'incorporation d'un groupe thiophosphate en position 5' des ODNs présentant un certain nombre d'inconvénients, nous avons mis au point un nouveau réactif dont la synthèse ainsi que certaines de ses propriétés seront décrites dans la première partie de ce chapitre. Dans la deuxième partie de ce chapitre nous ferons un rappel des résultats de la littérature concernant les cyanines et les conjugués de cyanines. Dans la troisième partie de ce chapitre nous décrirons la synthèse et les propriétés, étudiées par spectroscopies d'absorption et de fluorescence, de nouveaux conjugués ODN-cyanines.

1. Synthèse d'un nouveau réactif d'introduction du groupe thiophosphate en position 5' des ODNs

Le groupe thiophosphate (Figure 45) peut être introduit en différentes positions d'une séquence oligonucléotidique: en position internucléotidique (où il remplace un groupe phosphodiester), et en position terminale 3' *ou* 5'.

Figure 45: Structure du groupe thiophosphate (*gauche*) et du réactif de Beaucage (*droite*)

Comme dans de nombreuses autres méthodes de synthèse de conjugués, le couplage 5'-terminal est celui qui présente, comparé à celui des thiophosphates internucléotidiques, le plus d'avantages pratiques. En effet, les thiophosphates internucléotidiques présentent une réactivité moindre vis-à-vis des électrophiles. La réaction nécessite alors l'emploi de marqueurs dont le méthylène portant l'halogénure est activé en α par un groupe attracteur (carbonyle, sulfone...). D'autre part, cette réaction aboutit à la synthèse de deux isomères dont les propriétés sont généralement différentes. L' utilisation d'oligonucléotides portant un groupe 3'-thiophosphate présente également des inconvénients par rapport à celle des ODN 5'-thiophosphate: l'élongation de la chaîne oligonucléotidique sur support étant réalisée dans le sens 3'→ 5', toutes les séquences tronquées et coiffées comportent la fonction thiophosphate et sont donc capables de réagir avec le marqueur. Une purification, souvent fastidieuse, de l'oligonucléotide est donc impérative avant la réaction de couplage avec le marqueur. De plus, la synthèse d'ODNs 3'-thiophosphate requiert l'emploi de support modifié. Les oligonucléotides 5'-thiophosphates représentent donc un synthon d'intérêt pour la synthèse de sondes oligonucléotidiques [58]. Avant de décrire notre nouveau réactif, nous présenterons l'ensemble des réactifs existants, leurs avantages et leurs inconvénients.

1.1. Présentation des réactifs de phosphorylation des ODNs en position 5'

Tous les réactifs décrits dans la littérature sont des dérivés phosphoramidites, selon le mode d'oxydation retenu du phosphite intermédiaire, on peut donc obtenir des ODNs 5'-phosphate ou 5'-thiophosphate.

Le groupe thiophosphate peut être introduit en position 5' d'une chaîne oligonucléotidique, protégée et liée au support, par réaction de l'hydroxyle 5' terminal avec le *N*-diisopropyl,bis-cyanoéthylphosphoramidite **1** [59] (Tableau 1 et figure 46). Le phosphite obtenu est oxydé, par exemple, par le soufre colloïdal (S_8 dans CS_2/Pyr.) ou par le réactif de Beaucage (Figure 45), le thiophosphate triester résultant est déprotégé dans les conditions classiques. Bien que de mise en oeuvre aisée, cette méthode présente plusieurs inconvénients :

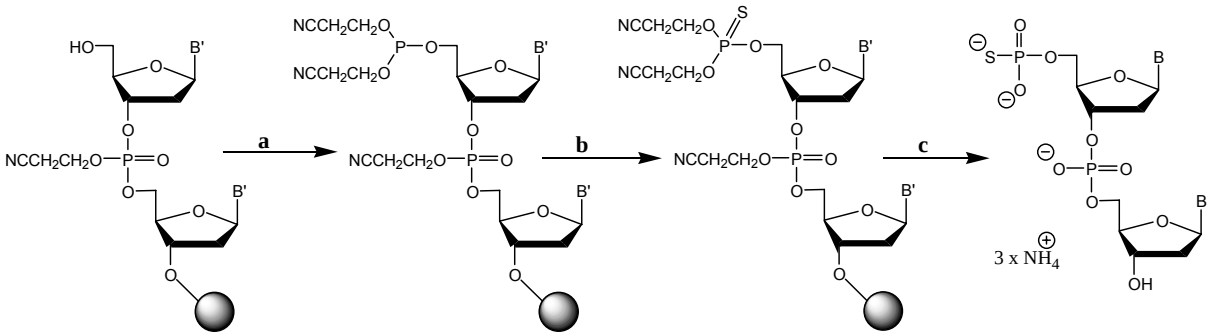


Figure 46 : Séquence réactionnelle de l'incorporation d'un groupe thiophosphate en 5' d'une chaîne oligonucléotidique (B=A, T, C ou G ; B'=base protégée). a) 1, tétrazole ; b) Réactif de Beaucage / CH_3CN ; c) NH_4OH conc., 50°C, 16h.

- Il n'est pas possible d'évaluer aisément le rendement de la réaction. Dans le cas des séquences courtes il est possible de déprotéger une partie de la résine, l'analyser par chromatographie et comparer les temps de rétention, ce qui est long et fastidieux.

- Les produits de départ et d'arrivée sont difficilement séparables (voire inséparables pour des séquences longues) en CLHP car la différence de lipophilie entre les deux produits (5'-hydroxyle et

5'-thiophosphate) est négligeable. Par chromatographie d'échange d'ions, la séparation reste malaisée dans le cas d'ODNs longs.

- La déprotection du thiophosphate triester est réalisée dans des conditions sévères (ammoniaque concentrée à chaud), l'élimination du deuxième groupe cyanoéthyle nécessite obligatoirement ces conditions. Cela rend ce réactif inutilisable pour la fonctionnalisation de séquences sensibles en milieu alcalin, comportant un marqueur sensible ou certaines bases modifiées.

- Enfin les phosphoramidites constituent une famille de réactifs sensibles à l'humidité et dont l'excès utilisé est non recyclable (on utilise environ 15 équivalents de réactif par équivalent d'ODN à fonctionnaliser). Voir Tableau 1.

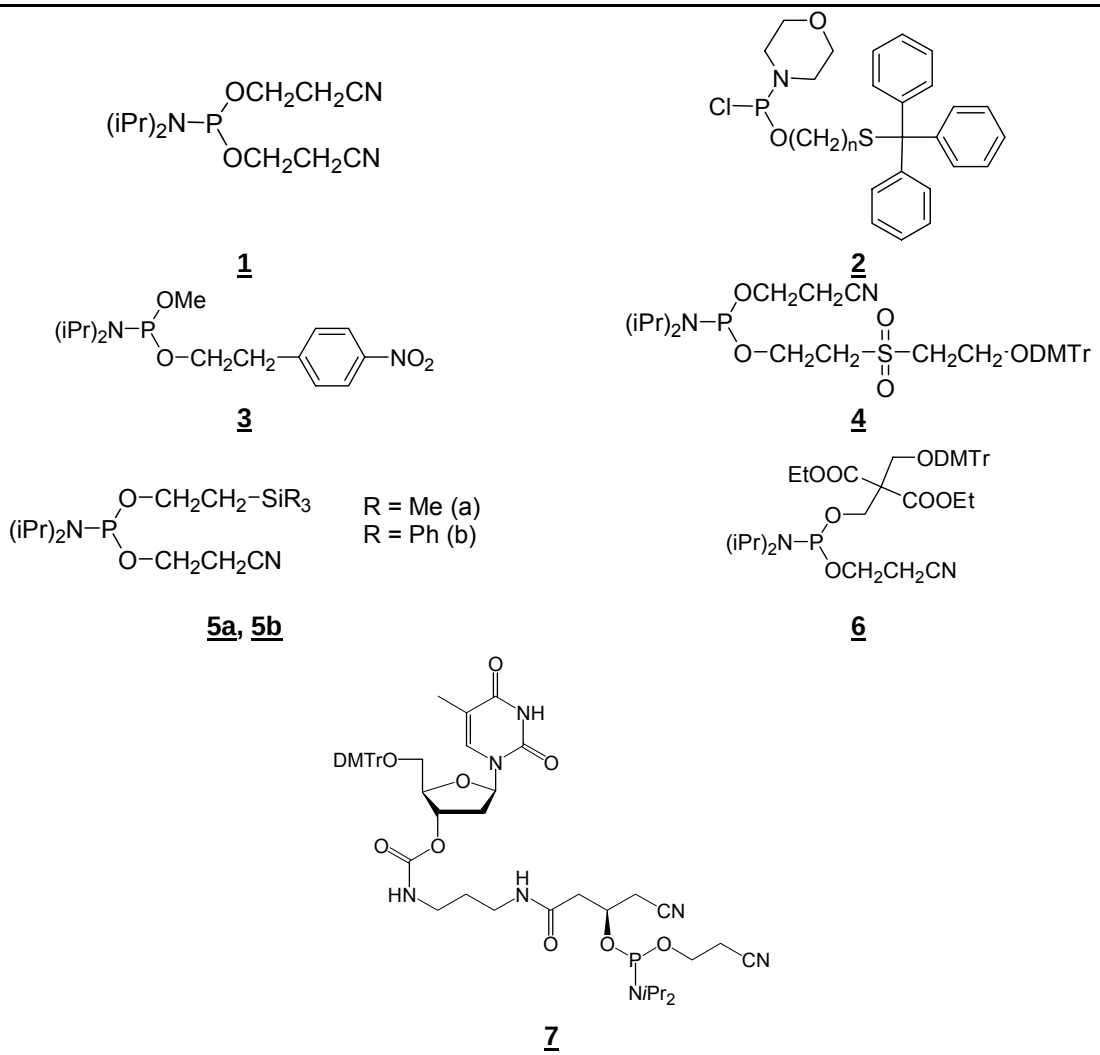


Tableau 1: Structures des réactifs d'introduction du groupe thiophosphate en position 5' décrits dans la littérature.

Le phosphoramidite **2** (n=2) permet l'introduction d'un groupe 5'-phosphate [31]. Après couplage et oxydation par l'iode, les bases et les phosphates sont déprotégés par les méthodes habituelles.

La liaison soufre-trityle est coupée soit en présence de $AgNO_3$, soit par action de l'iode dans un tampon TEAA pH=6,5 (contenant 50% MeOH dans le cas de l'iode). Par la première méthode on recueille le dérivé 5'-mercaptoéthylphosphatediester, par la seconde on obtient le disulfure

correspondant. Dans les deux cas, la déprotection doit être complétée par l'ajout de DTT à pH=8,5 [30]. Le DTT permet la complexation et l'élimination des ions Ag^+ dans la première méthode, et permet la réduction de la liaison –SS- dans la seconde. Dans les deux cas le milieu basique permet la β-élimination du groupe thioépoxyde (Figure 47).

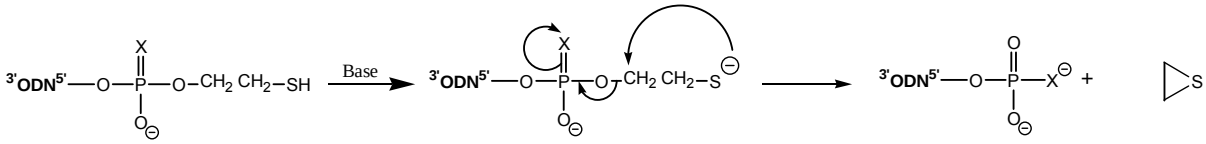


Figure 47: Réaction de β-élimination du groupe mercaptoéthyle (X = O *ou* S selon le réactif d'oxydation)

Grâce à la lipophilie importante du groupe 2-(tritylthio)ethylphosphate, l'oligonucléotide obtenu peut être facilement séparé de l'oligonucléotide n'ayant pas réagi. Toutefois ce réactif comporte deux inconvénients: comme le groupe tritylthio se clive difficilement en milieu acide, le dosage de Tr^+ semble impossible par la méthode classique ($HClO_4$/MeOH). De plus le nitrate d'argent est un réactif coûteux et le traitement au DTT constitue une étape supplémentaire lors de la purification de l'oligonucléotide 5'-thiophosphate.

D'autres réactifs sont des dérivés de **1** dont le groupe cyano a été remplacé par un autre activateur de méthylène. Un phosphoramidite dérivé du *p*-nitrophényléthanol **3** a été synthétisé [59], il est couplé puis oxydé classiquement. Après déprotection à l'ammoniaque il est facilement séparable par CLHP de l'oligonucléotide de départ grâce à l'hydrophobie induite par le groupe *p*-nitrophenéthyle. Toutefois, deux inconvénients subsistent: il n'est pas possible d'estimer le rendement de la réaction. En outre, l'ODN 5'-phosphate (ou thiophosphate) est libéré par action d'une base forte diluée (DBU, TBD) ce qui rend impossible l'application de cette méthode aux oligonucléotides sensibles en milieu alcalin.

L'utilisation du réactif **4** (l'activateur de méthylène est ici une sulfone) permet d'estimer le rendement du couplage (en dosant le cation trityle libéré par action d'un acide fort sur un échantillon de résine) [60]. La séparation en CLHP du produit de l'oligonucléotide de départ est toutefois impossible car le groupe lipophile est perdu lors de la déprotection à l'ammoniaque. Il est également impossible de travailler dans des conditions douces de déprotection (la déprotection nécessite l'emploi de NH_4OH concentrée à 60°C pendant 18h.).

Des réactifs silylés ont également été utilisés [61]. Les étapes de couplage, d'oxydation et de déprotection de l'oligonucléotide sont réalisées dans les conditions classiques. Alors qu'en CLHP les oligonucléotides fonctionalisés par **5a** sont difficiles à séparer de l'oligonucléotide de départ, ceux par **5b** sont suffisamment hydrophobes pour permettre une bonne séparation. Toutefois, cette modification ne permet pas d'estimer le rendement du couplage. De plus l'élimination du groupe silyle requiert l'action de TBAF dans le DMSO à 70°C. Cela nécessite donc une étape de traitement supplémentaire ainsi que l'utilisation de conditions sévères.

Le phosphoramidite dérivé du bis(hydroxyméthyl)malonate de diéthyle **6** permet la séparation en CLHP ainsi que le calcul du rendement de couplage par dosage du cation tritylium [62]. Toutefois la déprotection par l'ammoniaque doit être suivie d'un traitement acide (pour détrityler l'oligonucléotide), puis d'un autre traitement à l'ammoniaque (pour retirer le groupe malonate), ce qui

accroît la durée du traitement nécessaire pour récupérer l'oligonucléotide désiré. De plus son application à des séquences sensibles en milieu alcalin reste impossible.

Plus récemment, le réactif **7** a été développé [63]. Ce réactif permet également l'évaluation du rendement de couplage (par le dosage du cation trityle). D'autre part, sa présentation sous forme d'un solide facilite sa manipulation. Par contre les conditions de déprotection restent les mêmes que celles utilisées pour la déprotection des ODNs sur support fonctionnalisés par **1**

Malgré le nombre de réactifs d'introduction du groupe thiophosphate en 5' de la chaîne oligonucléotidique développés, aucun ne remédie simultanément aux quatre principaux inconvénients du réactif commercial, le *N*-diisopropyl, bis-cyanoéthylphosphoramidite **1**. Les avantages et inconvénients des principales méthodes sont résumés dans le tableau 2 ci-dessous :

Phosphoramidite	Séparation aisée en CLHP [1]	Calcul du rendement de couplage	Traitement de l'ODN [2]	
			+ long	+ sévère [3]
1	Non	Non	-	-
2	Oui	Non	Oui	Non
3	Oui	Non	Oui	Oui
4	Non	Oui	Idem	Idem
5a	Non	Non	Oui	Oui
5b	Oui	Non	Oui	Oui
6	Oui	Oui	Oui	Non
7	Oui	Oui	Idem	Idem

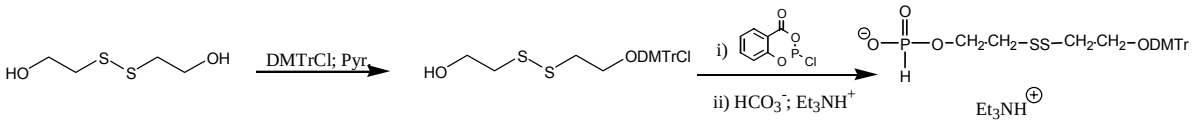
[1] Il est possible de conserver temporairement un groupe protecteur dont la lipophilie facilite la purification.
[2] Par rapport au N-diisopropyl, bis-cyanoéthylphosphoramidite
[3] La température utilisée est plus élevée ou bien une base plus forte est employée.

Tableau 2: Avantages et inconvénients des réactifs de phosphorylation

1.2. Synthèse et utilisation du nouveau réactif **10**

1.2.1. Synthèse du nouveau réactif

Le réactif mis au point au laboratoire a été obtenu en deux étapes à partir du 2,2'-dithiodiéthanol commercial **8**. Un excès de disulfure est mis à réagir avec le chlorure de diméthoxytrityle (DMTrCl) dans la pyridine. Le dialcool monotritylé **9** est purifié et dans une seconde réaction, le deuxième groupe hydroxyle réagit avec le 2-chloro-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one [64] pour donner un phosphite cyclique intermédiaire qui est ensuite hydrolysé pour obtenir le dérivé H-phosphonate **10** qui se présente sous la forme d'une huile jaune [65].



8 **9** **10**

Figure 48: Séquence réactionnelle de la synthèse du réactif de 5'-phosphorylation **10** développé au laboratoire

1.2.2. Utilisation en conditions classiques de synthèse oligonucléotidique

Initialement, l'utilisation du réactif **10** a été étudiée dans les conditions classiques de déprotection utilisée en synthèse oligonucléotidique (NH_4OH 28% à 55°C pendant une nuit). Pour

cela, le couplage de **10** en présence de chlorure de pivaloyle (PivCl) a été réalisé sur la séquence protégée $^{3'}$GCAT$^{5'}$-OH liée par une liaison succinate à un support CPG **11**. Après environ 3 minutes, le support est lavé et partagé en deux lots. Le premier est oxydé par l'iode, le deuxième par le soufre colloïdal. Après 1 h., le support est lavé et déprotégé par NH_4OH conc. une nuit à 50°C, conditions nécessaires à la déprotection des bases nucléiques. La courte taille de la séquence retenue permet de séparer aisément les différents produits de réaction (Figure 49). Quel que soit le mode d'oxydation employé, l'analyse CLHP de chacun des mélanges bruts réactionnels montre l'apparition d'un produit largement majoritaire, différent dans les deux types d'oxydation. L'analyse par spectrométrie de masse montre que l'oligonucléotide 5'-phosphate (pTACG) **12** a été obtenu après oxydation par l'iode et l'ODN 5'-thiophosphate (p(S)TACG) **13** après oxydation par le soufre (voir tableau 3).

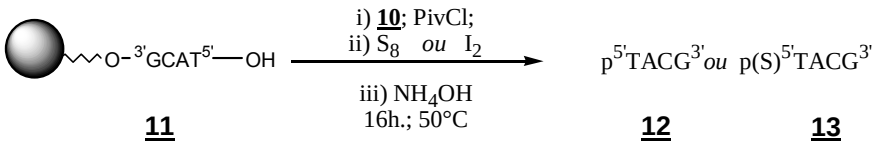


Figure 49: Synthèse d'ODNs 5'-phosphate *ou* 5'-thiophosphate

La réaction est presque quantitative. Comme l'indique le chromatogramme de la figure 50, seuls 6% de l'ODN greffé **11** n'ont pas été fonctionnalisés pour produire, après déprotection, l'ODN non modifié $^{5'}$TACG$^{3'}$ **14**.

ODN	t_R En phase inverse [1]	t_R En échange d'ions [2]	SM	
			théorique	observée
$^{5'}$TACG^{3} *(référence)* **14**	20,7 min	12,1 min	1173,84	1173,29±0,66
p$^{5'}$TACG^{3} 12	15,9 min	20,6 min	1253,82	1253,71±0,17
ps$^{5'}$TACG^{3} 13	16,5 min	24,1 min	1269.87	1269,21±0,73

[1] Gradient d'acétonitrile : 0 à 8% en 8 minutes, puis 8 à 18% en 40 minutes.
[2] Gradient de NaCl : 0 M. à 0,3 M en 30 minutes.

Tableau 3: Caractérisations par chromatographie et spectrométrie de masse des oligonucléotides fonctionnalisés à l'aide du réactif **10**

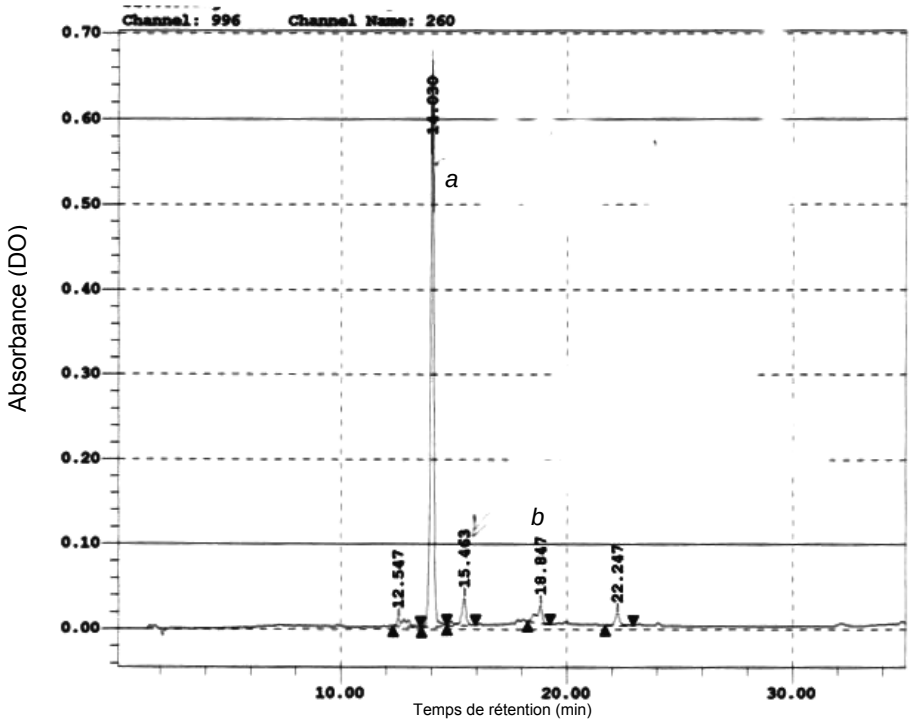


Figure 50: Chromatogramme en phase inverse du mélange brut obtenu après déprotection du tétramère fixé sur support **11** , fonctionnalisé par le nouveau réactif **10** puis sulfuré *a*: ODN **13**, *b*: ODN **14**
Gradient d'acétonitrile : 0 à 24% en 30 minutes

L'analyse chromatographique montre, en outre, qu'aucun coproduit n'est formé. En particulier, les oligonucléotides **15a** ou **15b** (Figure 51) ne sont pas présents en quantité appréciables. Ceci est en accord avec des travaux antérieurs [66] démontrant que la réduction du groupe disulfure peut survenir en milieu fortement basique.

$$ROCH_2CH_2SSCH_2CH_2—p(S)—^{5'}TACG^{3'}$$

Figure 51: Structure de **15a** (R=H) et **15b** (R=DMTr-)

1.2.3. Application à la fonctionnalisation d'ODNs sensibles en milieu alcalin

La déprotection du groupe thiophosphate ou phosphate en position 5' de l'ODN peut être réalisée en utilisant des conditions de déprotection moins sévères. Cela rend donc possible la fonctionnalisation d'ODNs sensibles en milieu alcalin. Comme modèle de séquences sensibles, nous avons utilisé des oligothymidylates. L'emploi d'un support **16** comportant une liaison de type oxalate permet la synthèse d'ODNs 5'-thiophosphate et 3'-OH tandis que l'emploi de deux autres supports **17** et **18** comportant des liaisons disulfures permet d'obtenir des ODNs 3',5'-*bis* fonctionnalisés. En effet, l'utilisation d'un agent réducteur permet en une seule étape de libérer l'ODN du support (en coupant la liaison –SS- du coté 3') et, simultanément, de libérer le groupe thiophosphate (en coupant la liaison –SS- du coté 5'). Les structures des supports modifiés employés sont présentées dans le tableau 4.

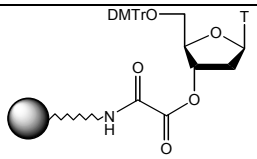
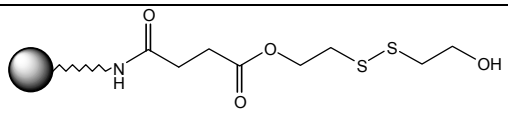
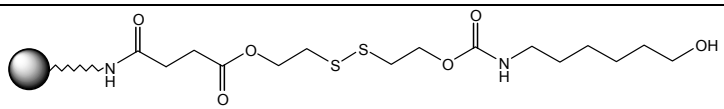
Support 16	
Support 17	
Support 18	

Tableau 4: Structure des supports modifiés **16** à **18**.

1.2.3.1. Synthèse d'ODNs 5'-thiophosphate 3'-OH (support oxalate)

Le support **16** a été développé par l'équipe de Letsinger [67] et comporte une liaison de type oxalate nettement plus sensible aux bases que la liaison succinyle classique [68]. La liaison ester est hydrolysée dans des conditions basiques douces. Le traitement du support **16** par 5% NH_4OH dans le méthanol, un mélange propylamine/CH_2Cl_2 (1:5, v/v) ou bien par la TEA humide libère la thymidine 5'-tritylée quantitativement en moins de 5 minutes.

On procède à l'élongation de la séquence T_{12} puis au couplage de **10** en 5' et finalement à l'étape de sulfuration, on obtient un support greffé **16a** (Figure 52). En moins d'une heure, le support **16a**, traité par NH_3/MeOH 10 M libère quantitativement l'ODN **19** comportant en position 5' un bras $-CH_2CH_2SSCH_2CH_2OH$ (Figure 53, chromatogramme a). La lipophilie du bras en 5' facilite la purification de l'ODN et sa séparation des séquences tronquées. Lorsque **19** est mis à réagir 30 minutes avec une solution de DTT (5 mg dans 1mL de DIEA aqueuse à 0,5%) on obtient quantitativement l'ODN déprotégé **20** (Figure 53, chromatogramme b). L'ODN **20** peut également être obtenu directement par le traitement du support **16a** par une solution de DTT dans NH_3/MeOH 10M (voir figure 52).

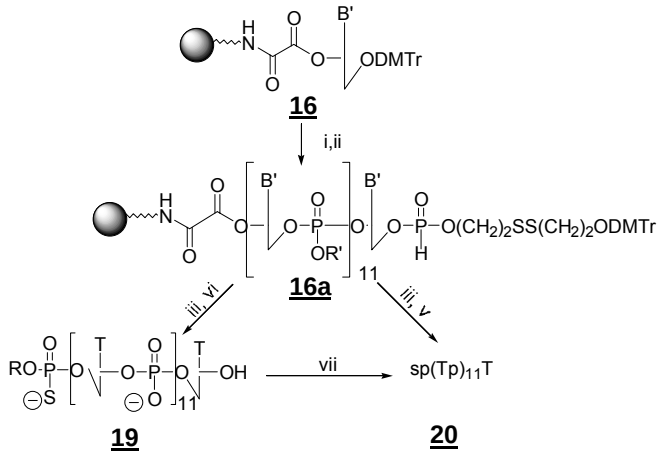


Figure 52: Synthèse et déprotection de **19** et **20** à partir du support de type oxalyle **16**. Réactifs employés : i : élongation de l'ODN. ; ii : **10**, PivCl, 2,5 min. ; iii : S_8, CS_2/Pyr, 20 min. iv : I_2, Pyr/H_2O (98:2) 2h. ; v: NH_4OH_{conc}, 1 nuit, 50°C. ; vi : NH_3/MeOH 10M., 1h., t.a. ; vii : 5mg DTT dans $DIEA_{aq}$ 0,5%, 30 min.

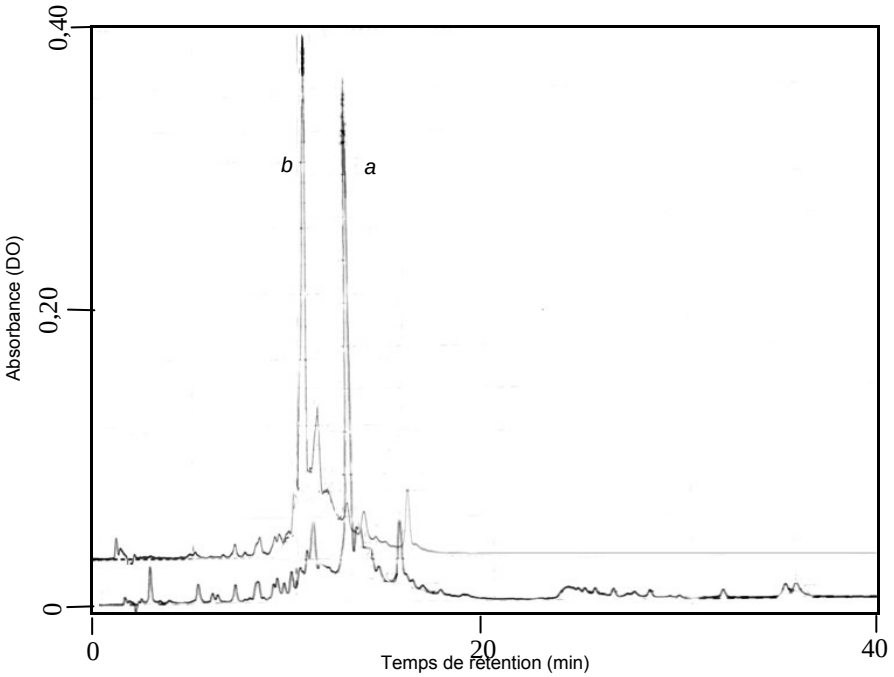
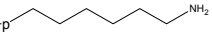


Figure 53: Profils CLHP du mélange brut obtenu après déprotection d'un dodécathymidylate 5'-thiophosphate synthétisé sur le support **16.** *chromatogramme a:* déprotégé par l'ammoniac méthanolique (10 M), 1h. à t.a. en absence de réducteur, *chromatogramme b:* après traitement subséquent par une solution de DTT dans la DIEA aqueuse à 0,5%. Gradient d'acétonitrile: 8 à 32% en 40 minutes.

Type de support traité	Méthode de déprotection [1]		t_R (min)		Produit principal (R=-$CH_2CH_2SSCH_2CH_2OH$)	SM	
			Phase inverse [2]	Échange d'ions [4]		Théorique	Observé
Support **16**	A		10,1	19,5	p(S)$(Tp)_{11}$T **20**	3684,45	3684,98±1,40
	B		12,6	nd	R—p(S)—$(Tp)_{11}$T **19**	3820,68	3820,68±0,89
Support **17**	A	*Seq. 1*	10,0	21,0	p(S)$(Tp)_{11}$Tp **22**	3764,43	3765,05±0,60
		Seq. 2	20,1 [3]	24,8	p(S)$(Tp)_{14}$Tp(S) **21**	4693,08	4692,63±1,48
	B		13,8	nd	R–p(S)–$(Tp)_{11}$T—p—R **23**	4036,90	4036,42±0,80
Support **18**	A		10,1	20,6	p(S)$(Tp)_{11}$T—p  **24**	3863,60	3863,69±1,33

[1] Méthode A : 4mL NH_40H conc. 1nuit à t.a. ou bien méthode B avec DTT. Méthode B : 1mL NH_3 méthanolique (10M), 1 heure à t.a.
[2] Gradient d'acétonitrile: 8 à 24% en 20 minutes.
[3] Gradient d'acétonitrile: 0 à 24% en 30 minutes.
[4] Gradient de NaCl : 0,2M à 0,5M en 30 minutes.

Tableau 5: Caractérisation par chromatographie et spectrométrie de masse des oligonucléotides **19** à **24**

1.2.3.2. Synthèse d'ODNs 3'-(thio)phosphate, 5'-(thio)phosphate

Les ODNs assemblés sur le support **17** peuvent être libérés par l'emploi d'un réducteur (tel le DTT), car celui-ci comporte une liaison disulfure. En milieu basique la réduction de la liaison –SS- est suivie d'une β-élimination du groupe mercaptoéthyle (voir figure 47 pour le mécanisme général) qui libère donc un ODN 3'-phosphate. Si, lors du premier couplage sur machine, l'oxydation du phosphite a été réalisée à l'aide de S_8/CS_2 ou du réactif de Beaucage on relarguera donc un ODN fonctionnalisé à son extrémité 3' par un groupe thiophosphate [69]. Un pentadécathymidylate 3',5'-*bis* thiophosphate **21** a ainsi été synthétisé: après assemblage sur machine de la séquence T_{15} sur

le support **17**, puis couplage du H-phosphonate **10** et oxydation par le soufre, le support greffé **17a** (Figure 54 ; n = 14 et X = S) a été obtenu puis traité par NH_4OH concentrée 50°C, 1 nuit en présence de DTT (5mg dans 4mL).

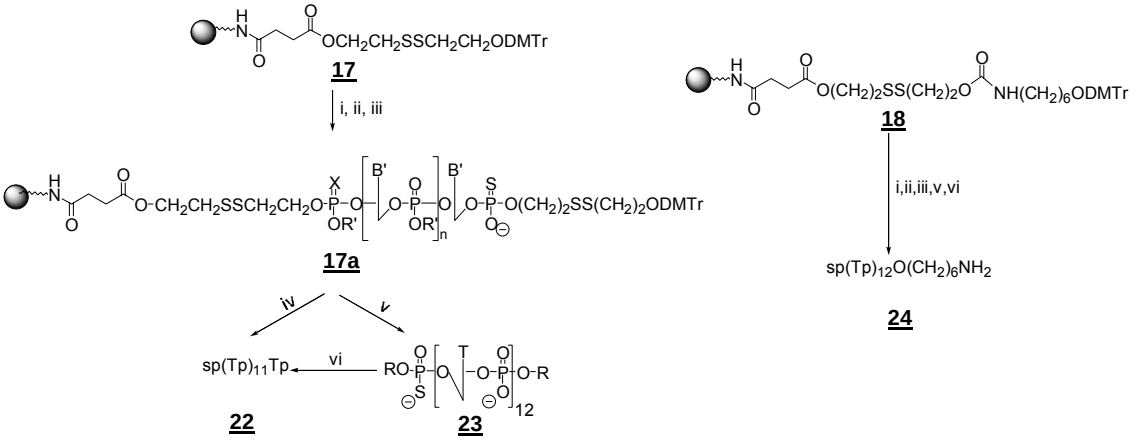


Figure 54: Synthèses des ODNs bifonctionnalisés **22**, **23** et **24**.
i: assemblage sur machine; ii: **10**, PivCl, CH_3CN/Pyr (1:1, v/v) 2.5 min.; iii: S_8, CS_2/Pyr (3:2, v/v) 20 min.; iv: conc NH_4OH, 1 nuit, 50°C. v: NH_3/MeOH (10 M) 4h., t.a..; vi: DTT (0.5%) dans 0.5% $DIEA_{aq}$, 30 min.

Dans un deuxième temps, la recherche de conditions plus douces de déprotection a été menée sur un dodécathymidylate fixé sur support, protégé et fonctionnalisé **17b** (Figure 54 ; n = 11 et X = O). En présence de NH_4OH concentré, 1 nuit à t.a. et sans DTT, l'ODN est totalement décroché du support [68]. Par contre la déprotection est partielle et l'on sépare en chromatographie phase inverse l'ODN portant en position 5' le bras diméthoxytritylé (on distingue les deux isomères générés au niveau du groupe thiophosphate diester chiral) ainsi que les ODNs portant aucun, un ou deux bras -$CH_2CH_2SSCH_2CH_2OH$ en 3' et/ou 5' qui sont élués avec des temps de rétention plus faibles. Lorsque chacune de ces fractions est retraitée par une solution de DTT (5 mg dans DIEA aqueuse 0,5%), on obtient, dans tous les cas, un seul produit **22** (structure mentionnée en tableau 5).

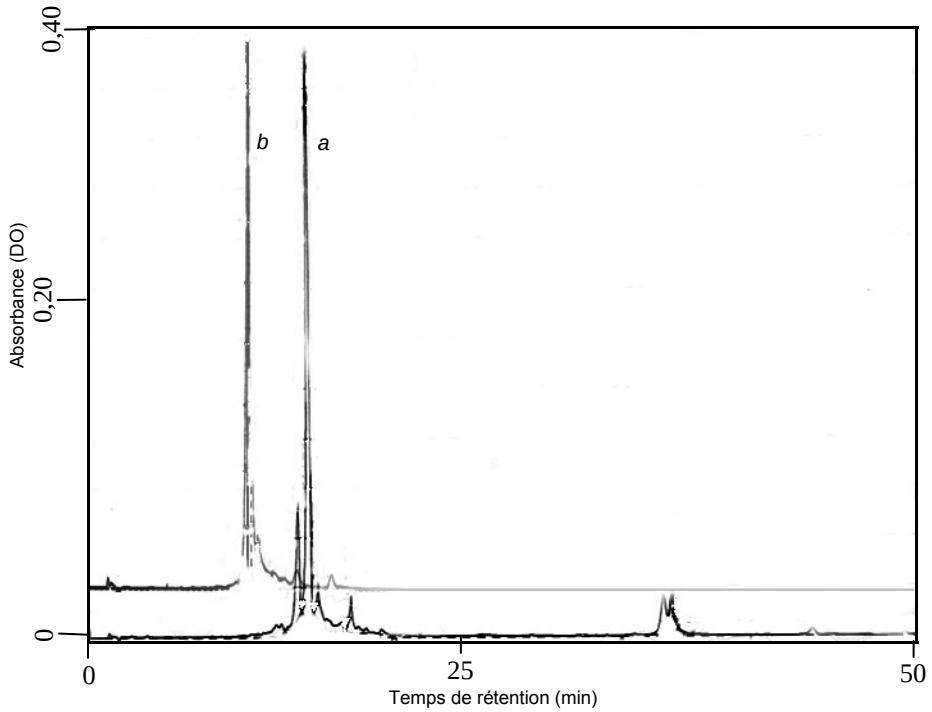


Figure 55: Profils CLHP du mélange brut obtenu après déprotection d'un dodécathymidylate sur support **17b** *chromatogramme a:* déprotégé par l'ammoniac méthanolique (10 M), 1h. à t.a. en absence de réducteur, *chromatogramme b:*

après traitement subséquent par une solution de DTT (5 mg) dans la DIEA aqueuse à 0,5%. Gradient d'acétonitrile: 8 à 24% en 20 minutes.

En traitant le support greffé **17b** par l'ammoniac méthanolique (10 M.), sans DTT et à t.a. pendant quatre heures on recueille le produit **23** majoritairement et, comme coproduit principal (10%), le dérivé 5'-diméthoxytritylé à un temps de rétention plus élevé (Figure 55, chromatogramme a). Dans les conditions utilisées, **23** est élué avec un retard de 4 minutes par rapport à l'ODN totalement déprotégé **22**, ce qui rend possible sa séparation des séquences tronquées et facilite donc la purification (voir tableau 5). Le composé **23** comporte en 3' et 5' deux groupes -$CH_2CH_2SSCH_2CH_2OH$. En retraitant cette fraction par une solution de DTT dans la DIEA diluée, on recueille majoritairement l'ODN 3'-phosphate, 5'-thiophosphate **22** (Figure 55, chromatogramme *b*).

1.2.3.3. Synthèse d'ODNs bifonctionnels 3'-aminohexyle, 5'-thiophosphate

Le support **18** a été conçu dans le but d'obtenir des ODNs comportant, à leur extrémité 3', un groupe alkylamine [70]. Après élongation de la séquence T_{12} sur le support **18**, couplage de **10** en 5' et sulfuration, l'ODN sur support résultant **18a** peut être déprotégé selon deux voies (Figure 54). En présence d'une solution de DTT dans un mélange NH_3/MeOH 10M à t.a pendant une heure, l'ODN 5'-thiophosphate, 3'-hexylamine **24** est totalement libéré du support et déprotégé. Après purification par chromatographie d'échange d'ions, cet ODN a été caractérisé (tableau 5) puis engagé dans deux réactions successives pour illustrer la possibilité d'obtenir des ODN 3',5'-*bis* marqués. Pour cela, l'extrémité 3'-amino a été mise à réagir avec un ester actif du Dabsyl, puis le groupe 5'-thiophosphate avec le dérivé iodoacétamidate de la fluorescéïne (voir figure 56). Les ODNs **25** et **26** ont été ainsi obtenus.

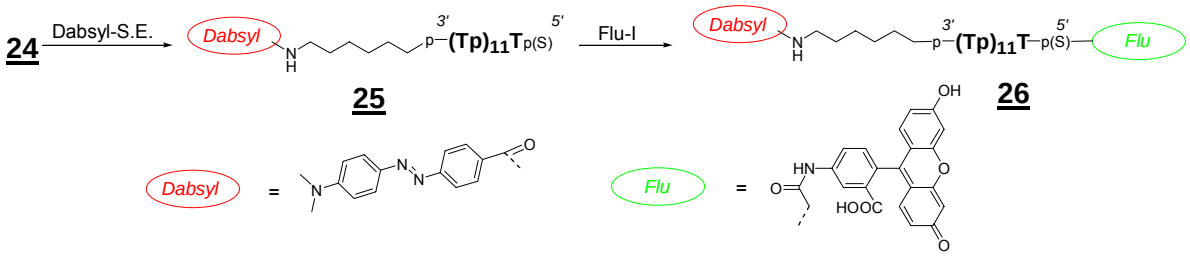


Figure 56: Séquence réactionnelle de la bis-fonctionnalisation de l'ODN **24**

Les caractéristiques de ces composés sont résumées dans le tableau 6 et leurs spectres dans la figure 57.

Marqueurs	Formule brute	SM Théorique	SM Observée	t_R [1]	λ_{MAX} [2]
3'-Dabsyl	$C_{141}H_{185}O_{88}N_{28}P_{13}S$ **25**	4114,09	4113,36	14 min 03 sec	467
3'-Dabsyl 5'-Fluorescéïne	$C_{163}H_{198}O_{94}N_{29}P_{13}S$ **26**	4502,24	4508,30	15 min 10 sec	496

[1] Gradient d'acétonitrile: 20 à 28% en 30 minutes.
[2] En visible, dans tampon TEAA 0,1M, pH = 7 à t.a.

Tableau 6: Caractéristiques des produits de couplage de l'ODN **24**

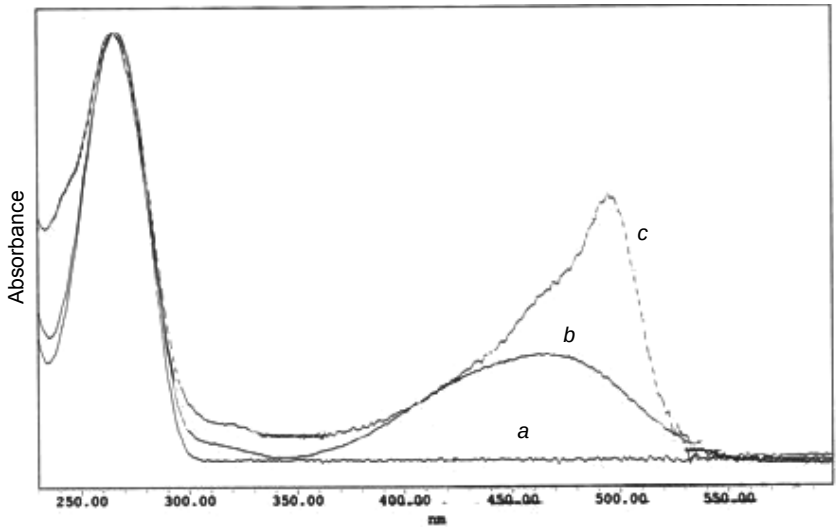


Figure 57: Spectres UV des ODNs normalisés à 260 nm (*a* : ODN **24** ; *b* : ODN **25** et *c* : ODN **26**)

Conclusion

Le réactif **10** développé au laboratoire permet d'obtenir des oligonucléotides possédant un groupe thiophosphate 5' terminal, avec de bons rendements, et présente plusieurs avantages. Tout d'abord il est facile à synthétiser, se conserve aisément et l'excès de réactif, utilisé lors de la fonctionnalisation des ODNs, peut être recyclé dans le cadre d'une utilisation à grande échelle. Tandis que l'usage des réactifs commerciaux nécessite des conditions de déprotection sévères, l'emploi de **10** comme réactif de fonctionnalisation des ODNs fixés sur support peut être suivi de l'utilisation de conditions de déprotection relativement douces. Ce qui permpet d'utiliser ce réactif pour fonctionnaliser des ODNs sensibles en milieu alcalin

Le nouveau réactif développé au laboratoire **10** a été utilisé au cours de la synthèse de différents conjugués ODNs comportant les cyanines en position 5'. Après avoir décrit la synthèse et les propriétés de diverses cyanines et de conjugués comportant des cyanines existants, nous présenterons les conjugués cyanines originaux que nous avons préparés ainsi que plusieurs de leurs propriétés.

2. Cyanines et conjugués de cyanines: rappels bibliographiques

Les cyanines constituent une classe de molécules longtemps employées comme pigments. Récemment, elles ont trouvé d'intéressantes applications dans la détection et le marquage des acides nucléiques. Nous décrirons, dans un premier temps, les avantages que comportent ces molécules et, plus particulièrement, les plus étudiées d'entre elles: le thiazole orange (TO), l'oxazole yellow (YO) et leurs dimères le TOTO et le YOYO. Nous exposerons ainsi les raisons qui nous ont conduit à employer les cyanines comme marqueurs de nos sondes. Par la suite, nous exposerons nos travaux.

2.1. Les cyanines libres utilisées pour la détection des acides nucléiques

2.1.1 Présentation de la famille des cyanines

Les cyanines constituent un groupe de composés ioniques dans lequel deux noyaux hétérocycliques contenant un atome d'azote sont reliés par un certain nombre de méthines de telle manière qu'on observe un phénomène de résonance électronique entre l'atome d'azote tertiaire et l'azote quaternaire. Selon qu'aucun, un seul ou les deux atomes d'azotes sont endocycliques, on parle respectivement de streptocyanine, d'hémicyanine ou de cyanine (voir figure 58). Selon la valeur de *n*, on parle de cyanine monométhine, triméthine, pentaméthine etc... Selon que les deux hétérocycles sont identiques ou différents, on parle de cyanines symétrique ou dissymétrique.

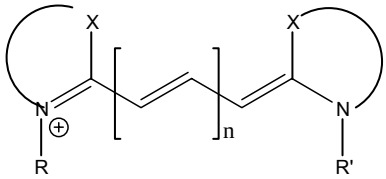


Figure 58: Structure générale des cyanines

De nombreux représentants de cette classe ont été synthétisés [71,72]. Les études les plus approfondies sur les interactions entre les cyanines et les acides nucléiques ont été menées sur deux cyanines monométhines monomériques, le Thiazole Orange (TO) et l'Oxazole Yellow (YO) ainsi que leurs dimères respectifs, le TOTO et le YOYO (Figure 59).

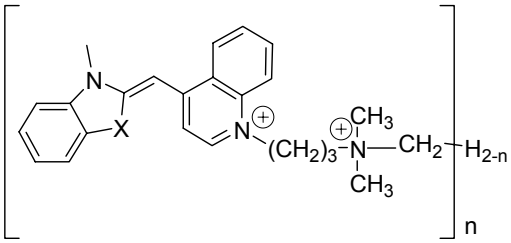


Figure 59: Structure du TO (X=S, n=1), du YO (X=O, n=1), du TOTO (X=S, n=2) et du YOYO (X=O, n=2)

Le TO est un composé faiblement basique, de pKa= 2,71 [73], dont l'espèce dicationique acide, protonée sur l'azote du cycle benzothiazole, est incolore (Figure 60). De plus il se conserve longtemps à basse température [74] et il n'est pas mutagène [75], ce qui n'en limite pas l'utilisation *in vivo*.

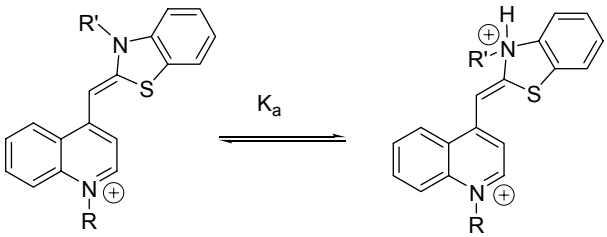


Figure 60: Equilibre du TO entre l'espèce basique (*à gauche)* de couleur rouge en solution et acide *(à droite)*, incolore

2.1.2 Synthèse des cyanines monométhines

2.1.2.1. Schéma synthétique général

Les cyanines monométhines sont obtenues par un couplage entre deux hétérocycles cationiques. Dans le cas du YO et du TO les hétérocycles employés sont des dérivés des noyaux quinoline, benzoxazole (YO) ou benzothiazole (TO). Un des hétérocycles comporte un groupe méthyle susceptible d'être déprotoné en conditions douces et dont l'espèce résultante est stabilisée par résonance (Figure 61). C'est le cas des sels de lépidinium (ainsi que ceux de picolinium, de 2-méthylbenzoxazolium et de 2-méthybenzothiazolium) dont le pKa est voisin de 10.

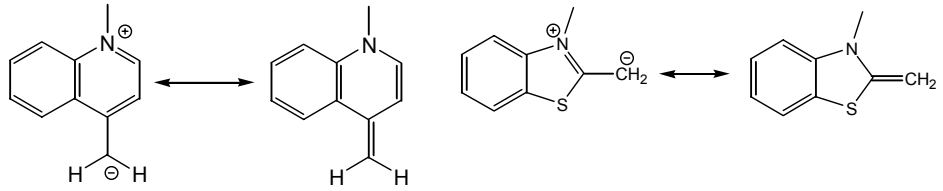


Figure 61: Sels de lépidinium et de 2-méthylbenzothiazolium déprotonés et stabilisation par résonance

Le deuxième hétérocycle (Figure 62) comporte un groupe partant porté par un carbone ayant un caractère électrophile.

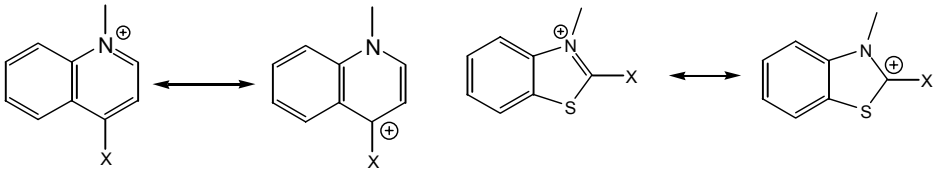


Figure 62: Formes mésomères des noyaux quinolinium et benzothiazolium (X = -I, -SMe)

Le couplage a lieu entre ces deux espèces (Figure 63) en présence de quantité stoechiométrique de base (Et_3N, DIEA, NaOH) si le substituant (groupe partant, GP) en position 2 du benzothiazole est non-basique (Cl^-, Br^-, I^-, TsO^-) et en quantité catalytique s'il l'est (PhS^-, MeS^-).

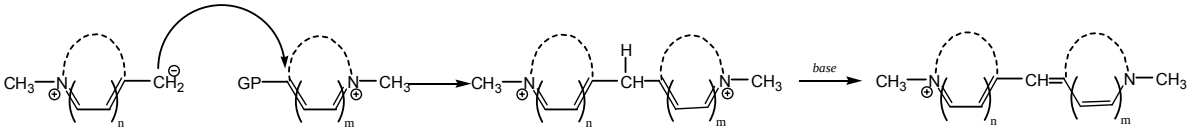


Figure 63: Mécanisme réactionnel de la formation des cyanines monométhines

De très nombreuses cyanines de structures voisines ont été synthétisées selon cette méthode par Brooker [76,77] et Zhou [78]. Toutefois, les inconvénients de cette voie de synthèse tels que le dégagement de CH_3SH toxique, la difficulté d'obtenir certains benzothiazoles subsitués, l'échange des deux groupes *N*-alkyle et *S*-alkyle du sel de benzothiazolium, mais surtout le besoin en cyanines diverses pour les études de reconnaissance d'ADN, ont abouti à l'élaboration d'autres voies de synthèse. La simple fusion d'un mélange de 2-iminobenzothiazole en présence d'un sel de N-méthyllépidinium donne une cyanine avec dégagement d'ammoniac [79], la limitation de cette réaction étant qu'elle est difficilement extensible aux sels de quinaldinium. Selon le même procédé, on peut remplacer l'iminobenzothiazole par une sulfobétaïne [80]. Il est également possible de déprotoner un 2-méthylbenzothiazolium pour le faire réagir sur un 2-haloquinoléinium [81]. Enfin, un

procédé de synthèse en phase solide, permet d'obtenir facilement des dérivés du TO portant des groupes ω-carboxyalkyle [82,83].

2.1.2.2 Synthèse du TO, du YO et de leurs dimères: le TOTO et le YOYO

Les études de ces cyanines se déroulent dans l'eau ou des solutions aqueuses. De ce fait, afin d'accroître la solubilité de ces composés, des dérivés comportant des groupes ammoniums ont été préparés afin d'augmenter leur hydrophilie. Les groupes ammoniums présentent également l'avantage d'accroître les interactions du colorant avec les résidus phosphates chargés négativement des acides nucléiques. Les quatre cyanines étudiées ici sont obtenues par le couplage, en milieu basique, d'un *N*-(ω-haloalkyl)lépidinium et d'un *N*-alkyl-2-alkylthiobenzothiazolium ou *N*-alkyl-2-alkylthiobenzoxazolium. Dans une deuxième étape, les réactifs TO et TOTO commerciaux sont obtenus par réaction du bras iodé sur la triméthylamine pour former le monomère ou sur une diamine pour former les dimères (Figure 64) [84].

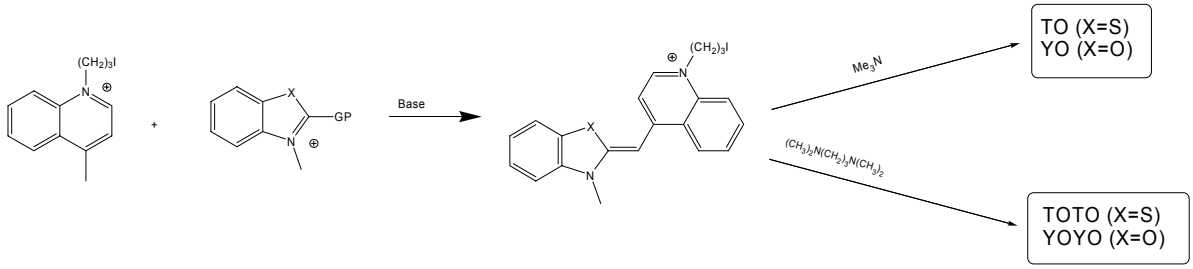


Figure 64: Schéma de synthèse générale de TO, TOTO, YO et YOYO

2.1.3 Interactions des cyanines libres (TO et YO) avec l'ADN

2.1.3.1 Interaction du TO avec l'ADN.

Les interactions du TO avec les acides nucléiques ont été étudiées par spectroscopie d'absorption et de fluorescence. En solution aqueuse extrémement diluée à chaud, le TO est présent sous forme monomérique caractérisée en spectrométrie UV-visible par une bande d'absorption à 500 nm avec un épaulement à 480 nm. A concentration plus élevée, le TO s'agrège partiellement sous forme dimérique (λ_{abs}=471 nm, épaulement 495 nm, point isobestique 476 nm) ou d'ordre supérieur [73]. S'il est substitué par des groupes donneurs d'électrons, son spectre est décalé vers le rouge (≈ 15 nm) [75]. En présence d'ADN on observe une hypochromicité ainsi qu'un déplacement du maximum vers le rouge à 510 nm. Le TO s'intercale dans l'ADN double brin avec la chaîne latérale dans le petit sillon et les hétérocycles empilés entre les bases [85]. Des études ont également montré que la superstructure de l'ADN (linéaire, enroulée…) modifiait le déplacement de Stockes [75]. L'interprétation des spectres UV suggère que le TO se lie comme un monomère à l'ADN double brin et au poly(dA) en s'empilant entre les bases, et en tant que dimère avec les polypyrimidines. La constante d'association de l'équilibre TO_{libre} + ADN ⇆ [TO•ADN] au cours duquel se forme le complexe est de 5 à 10 fois moins élevée lorsque l'ADN est un simple brin polypurine que lorsqu'il s'agit d'un double brin, et de 10 à 1000 fois moins élevée lorsqu'il s'agit d'un simple brin polypyrimidine [73,85]. Il ne semble pas exister de séquence préférentielle pour la fixation du TO, plusieurs complexes sont observés en présence d'un duplex court [74].

En solution, le TO libre n'est pratiquement pas fluorescent ($\Phi=2\times10^{-4}$), mais il se lie à l'ADN par monointercalation jusqu'à un taux maximum d'une molécule de colorant pour deux paires de bases conduisant à une augmentation de fluorescence d'un facteur 3000 [86]. La fluorescence du TO augmente en présence d'ADN double brin, de poly(dA) et de poly(dG) et, de manière plus faible, en présence de poly(dC) et de poly(dT), la nature de la chaîne latérale influe peu [85]. La fluorescence décroît avec l'augmentation de température selon une loi:

$$T^{-1}=\ln[(1-\Phi)/\Phi].$$

Après excitation, le TO peut se désexciter selon deux processus. Le premier est non-radiatif. Le TO cède au milieu son énergie sous forme d'énergie de rotation, élongation, vibration des liaisons qui le composent et dégage donc de la chaleur. Le second consiste en une émission de fluorescence.

Comme les complexes TO/polypyrimidines sont peu fluorescents, le dimère ne doit pas entraver la libre rotation autour de la liaison méthine. Les auteurs postulent qu'un des TO est empilé entre les bases tandis que le second est à l'extérieur [73]. D'autres études affirment que le TO peut se lier à la fois par intercalation et en tant que ligand du petit sillon [75] à l'ADN double brin comme tendent à le prouver les expériences faites dans des tampons de diverses forces ioniques, et par interactions électrostatiques avec l'ADN simple brin. De manière générale, des études soulignent que les cyanines peuvent former avec l'ADN double brin, une grande variété de complexes [87,88]
Le TO se révèle être une molécule de choix pour le marquage d'ADN en FID (*Fluorescent Intercalator Displacement)* notamment par sa sensiblité supérieure à celle du bromure d'éthidium (BET) [89].

2.1.3.2. Interaction du YO avec l'ADN

En dépit d'une très forte ressemblance structurale, le YO présente certaines caractéristiques spectrales différentes de celles du TO. Son spectre UV dans l'eau présente une bande possédant un pic à 481 nm et un épaulement aux environs de 460 nm, ainsi que deux bandes nettement moins intenses à 278 et 299 nm. En présence d'ADN on observe une hypochromicité ainsi qu'un déplacement du maximum vers le rouge à 490 nm. En dessous de 0,2 YO par base d'ADN, l'intercalation est le mode d'interaction prédominant, au dessus, le YO se lierait sous forme dimérique à la surface de l'ADN, peut-être par interaction avec le petit sillon [90] et sans spécificité de séquence [88]. La fluorescence du YO augmente avec la viscosité du milieu. Bien que les dérivés oxazole, dont le YO, soient plus fluorescents que leurs homologues de type benzothiazole (comme le TO), leur augmentation de fluorescence en présence d'ADN double brin est moins importante [87]. Ce phénomène est supposé être la conséquence de la diminution du degré de liberté de la rotation autour de la liaison quinoline-oxazole qui conduit, par voie de conséquence, le YO à se désexciter par fluorescence plutôt que par voie thermique [91]. Le YO est également capable, sous irradiation, d'effectuer des coupures monobrin d'ADN double brin [92].

2.1.4. Interactions des cyanines homodimériques avec l'ADN simple et double brin

2.1.4.1. Avantages du caractère dimèrique du marqueur

Le dimère du bromure d'éthidium (BET) stabilise plus fortement un double brin d'ADN que ne le feraient deux monomères non liés l'un à l'autre; les deux polycycles du dimère de BET s'intercalent dans deux sites distants d'une paire de bases [93]. Etant donné que le TO libre occupe, à saturation et en présence d'ADN double brin, un site sur deux du duplex, l'équipe de Glazer a travaillé sur le TOTO et le YOYO [84].

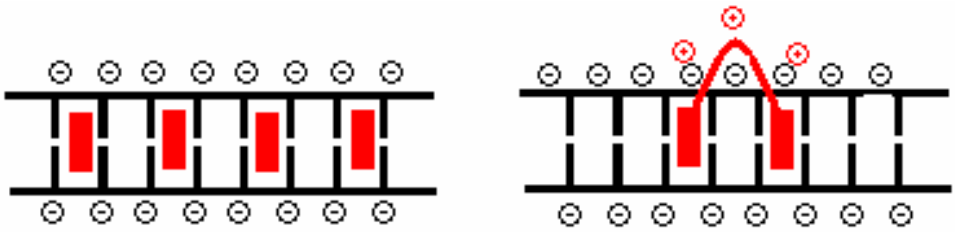


Figure 65: Représentation schématique de l'intercalation du TO (▇) à saturation dans le double brin d'ADN (▌) *(à gauche)* et du dimère cationique TOTO *(à droite)*Les charges cationiques présentes sur le bras de liaison interagissent avec les anions phosphates du squelette ADN et contribuent à la stabilité au complexe formé [94].

Par analogie, les auteurs ont en effet supposé que les deux unités TO du TOTO s'intercaleraient dans l'ADN double brin de la même manière que le feraient deux molécules de TO (Figure 65). De manière similaire à ce qui est observé entre le BET et son dimère, de meilleures propriétés de stabilisation et une forte augmentation de fluorescence lors de la formation du complexe [TOTO•DNA] ont été obtenues [74]. Les charges cationiques présentes sur le bras de liaison interagissent avec les anions phosphates du squelette ADN et contribuent à la stabilité du complexe formé [94]

Cyanine	λ_{abs} (nm) libre	λ_{abs} (nm) lié	λ_{abs} (nm) lié	Augmentation [1]
TO	501	509	527	3000 [2]
YO	475	486	505	700
TOTO	481	513	532	1100
YOYO	458	489	509	3200

[1] Augmentation de l'intensité du signal fluorescent en présence d'ADN double brin
[2] La valeur de 18900 a galement été rapportée

Tableau 7: Données de fluorescence du TO, du YO et de leurs dimères.

2.1.4.2. Structure des complexes TOTO / ADN et sélectivité du TOTO envers les différents sites possibles.

Des études RMN ont été réalisées afin d'étudier la structure en solution du complexe TOTO•DNA. En présence de la séquence d($^{5'}$-CGCTAGCG-$^{3'}$)$_2$ elles montrent que le TOTO se lie préférentiellement à la séquence $^{5'}$CTAG$^{3'}$/$^{5'}$CTAG$^{3'}$ par *bis*-intercalation avec une affinité 100 fois supérieure à celles des autres sites possibles [95]. L'analyse des connectivités en RMN 2D entre les signaux du TOTO et ceux des bases montrent que les deux noyaux quinoléïniums s'empilent entre les bases purines, tandis que les noyaux benzothiazolium s'empilent entre les bases pyrimidines [95,96], et que le bras de liaison polyammonium traverse le petit sillon [95,97] tandis que le *N*-méthyle du benzothiazole pointe dans le grand sillon. D'ailleurs, les études faites sur le TOTOEt (TOTO dont le noyau benzothiazole est *N*-éthylé) montrent que le complexe TOTOEt/ADN présente la même structure [98], à ceci près que l'intercalation est davantage sélective grâce à une meilleure interaction entre le groupe éthyle et le grand sillon. Ce positionnement favorise des interactions

hydrophobes entre le méthyle des thymidines et le noyau benzothiazole du TO. D'ailleurs la modification (T→U) conduit à une diminution de la stabilité du complexe [99].

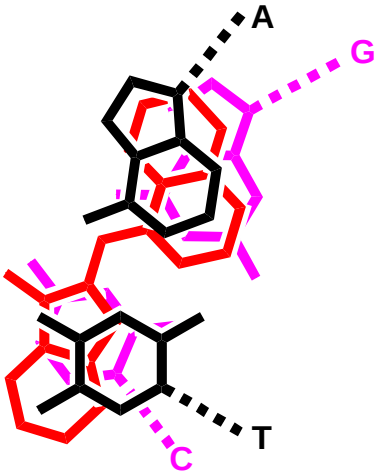


Figure 66: Schéma simplifié de l'empilement d'une unité TO *(rouge)* entre une paire de base AT *(noire)* et GC *(mauve)*

De même en présence de la séquence d($^{5'}$-CGCCGGCG-$^{3'}$)$_2$ le TOTO se fixe dans le site $^{5'}$CCGG$^{3'}$•$^{5'}$GGCC$^{3'}$ avec une affinité 50 fois supérieure par rapport aux autre sites présents [99,100]. De manière plus générale, chacun des deux chromophores s'intercale préférentiellement dans les séquences ($^{5'}$-pyr-pyr-$^{3'}$:$^{5'}$- pu-pu-$^{3'}$) et, parmi les huit séquences possibles, les séquences $^{5'}$TTAA$^{3'}$, $^{5'}$GGCC$^{3'}$, $^{5'}$CCGG$^{3'}$ et $^{5'}$CTAG$^{3'}$ sont celles pour lesquelles les études RMN montrent qu'il y a peu de migrations du TOTO de ces sites vers d'autres présents sur la séquence (qui est de la forme $^{5'}$-CG-*[site]*-CG-$^{3'}$), les deux premiers étant faiblement séléctifs [74,101]. La séléctivité est donc particulièrement élevée pour les sites $^{5'}$CCGG$^{3'}$ et $^{5'}$CTAG$^{3'}$ avec une préférence accrue d'un facteur 2,7 pour le second sur le premier, vraisemblablement dû à l'interaction stabilisante du méthyle de la thymidine avec le cycle benzothiazole [99]. Les séquences $^{5'}$-pyr-pyr-pu-pu-$^{3'}$ fixent plus spécifiquement le TOTO que ne le font les séquences $^{5'}$-pu-pu-pyr-pyr-$^{3'}$ car dans ces dernières, le bras de liaison ne peut traverser le petit sillon.

D'autres études ont été menées sur des séquences $^{5'}$-CGXYY'X'CG-$^{3'}$ (avec X :X', bases périphériques et Y :Y' bases centrales) comportant des bases non naturelles : l'inosine (I) et la 5-méthylcytosine (^{Me}C) [97]. Les résultats montrent que les paires de bases constitutives des meilleurs sites d'intercalation du TOTO sont :

Paire de bases périphériques : ^{Me}CG > CG > CI > TA

Paire de bases centrales : ^{Me}CI > CI > TA > CG > UA

Un autre dérivé du TOTO, le TOTOBIPY, a été obtenu en remplaçant le motif polyamine du bras de liaison du TOTO par un dérivé du viologène (Figure 67). Le viologène est connu pour être un ligand du petit sillon. De plus, sa structure rigidifie le marqueur et accroît la distance séparant les deux chromophores. Le TOTOBIPY [102] se bis-intercale dans deux sites distincts séparés par deux sites inoccupés (et non un seul comme dans le TOTO). Les chromophores s'intercalent selon les mêmes préférences que dans le cas du TOTO, et le bras de liaison réside bien dans le petit sillon. Toutefois, selon la séquence de l'ODN cible, plusieurs complexes peuvent se former : le bras de liaison accroît la tendance à l'insertion dans des sites distants de trois bases, tandis que les motifs benzothiazoles, de par leur préférence pour les sites $^{5'}$-PyPyPuPu-$^{3'}$ accroissent la proportion de complexe DNA :TOTOBIPY dont les sites d'intercalation sont distants de deux bases.

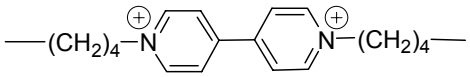


Figure 67: Bras de liaison du TOTOBIPY comportant un motif viologène.

Il apparaît que le TOTO et certains de ses dérivés sont des molécules de choix pour la détection d'ADN [103,104,105] et qu'elles peuvent remplacer les méthodes de marquages

radioactifs ou l'utilisation du dimère du BET. Le TOTO aurait également une faible capacité, comparé au YOYO, à effectuer des coupures monobrins dans des duplex ADN [92]. Bien que les interactions du TOTO aient été majoritairement étudiées avec l'ADN double brin, Glazer et Rye ont observé qu'il formait également des complexes de stabilité similaire avec l'ADN simple brin. L'augmentation de l'intensité de fluorescence qui survient lors de la complexation du TOTO avec l'ADN simple brin est cependant nettement inférieure à celle observée en présence d'ADN double brin [106].

2.1.5. Autres familles de cyanines monométhines

Tandis que le thiazole orange est constitué de deux types d'hétérocycles (quinoline et benzothiazole), les quinocyanines sont formées de deux cycles de type quinoline et les thiocyanines de deux cycles de type benzothiazole. Les systèmes hétérocycliques de ces familles de cyanines sont pour la plupart connus depuis longtemps [71,76]. Toutefois peu d'entre eux ont fait l'objet d'études d'interaction avec l'ADN et aucune de couplage à des oligonucléotides. Cependant, depuis l'utilisation du thiazole orange comme marqueur de l'ADN, une très grande variété de dérivés ont été synthétisés en vue d'applications industrielles [107].

Avant d'exposer la synthèse des conjugués originaux développés au laboratoire, nous décrirons brièvement les résultats des études d'interactions de ces familles de cyanines avec les acides nucléiques.

2.1.5.1. Quinocyanines (Structure générale présentée en figure 68)

Plusieurs synthèses de molécules comportant le système conjugué de la 2,2'-quinocyanine ont été effectuées [108] avec de faibles rendements, tandis qu'une étude plus générale des mécanismes réactionnels a été menée par Metzger *et al.* [109] . D'autres synthèses et études RMN ont été menées sur des dérivés portant de longues chaînes *N*-alkyles [110]. Les interactions de la 1,1'-diéthyl-2,2'-quinocyanine (PIC) avec l'ADN ont été étudiées [111]. Le PIC possède en effet la propriété de s'agréger à des concentrations aqueuses supérieures à 1mM selon une structure appelée *polymère de Scheibe* dans laquelle les monomères se lient les uns les autres par superposition des unités quinolines (Figure 68) et qui émet fortement en UV. Cette émission, appelée bande-*J*, est décalée vers le rouge par rapport à celle du monomère (λ=573 nm et 528 nm respectivement) et dépend fortement des sels dissous [112,113]. Les études montrent qu'à faibles concentrations ($C_{PIC}/C_{bp}<5\cdot10^{-3}$) le PIC se lie en tant que monomère à l'ADN double brin [111].

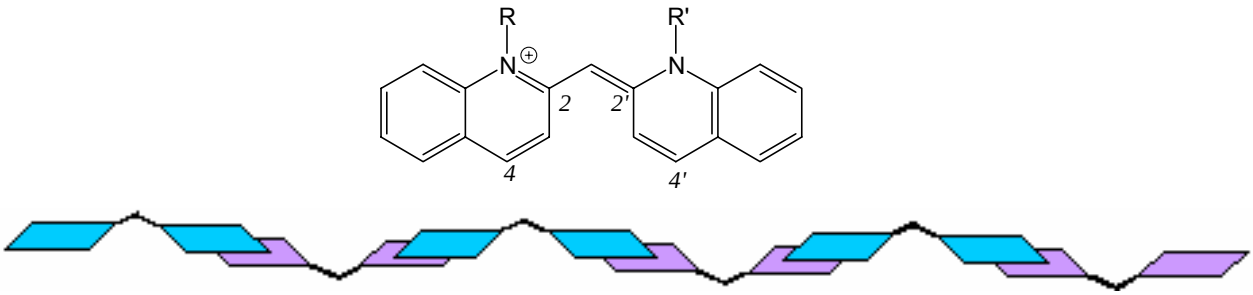


Figure 68: *En haut:* Structure d'une quinocyanine monométhine (ici la 2,2'-quinocyanine; PIC: R=R'=Et). *En bas:* Structure schématique du polymère de Scheibe. (Les losanges colorés représentent les unités quinolines des PICs)

La synthèse des dérivés de type 4,4'-quinocyanine, de couleur bleue intense, a été réalisée par plusieurs équipes [76,80,81,109,114]. En présence d'ADN une augmentation de la fluorescence serait observée [81,114]. Les 2,4'-quinocyanines ont fait l'objet de synthèses [108, 109] mais n'ont pas fait l'objet d'études d'interactions avec l'ADN.

2.1.5.2. Thiocyanines (Structure générale présentée en figure 70)

Plusieurs représentants de la famille des thiocyanines ont été synthétisés [76,80,115] et leurs propriétés de fluorescence ont été étudiées [116,117]. Les interactions du Cyan 13 (Figure 69) et de la thiocyanine (Figure 70) avec l'ADN ont été étudiées [116]. Le spectre du Cyan13 consiste en deux bandes, à 417 et 440 nm, dont l'intensité de la première croît en fonction de la concentration, indiquant qu'elle est due à la formation d'espèces agrégées, probablement des dimères [117].

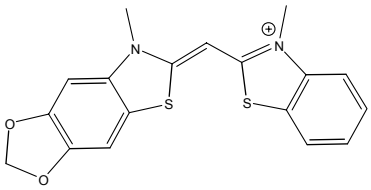


Figure 69: Structure du Cyan13

Toutefois, d'autres auteurs ont expliqué l'existence de deux bandes spectrales par des considérations d'isomérisation de la cyanine en deux formes *syn* et *anti*. L'étude de la fluorescence des thiocyanines démontre l'importance de deux rotamères principaux dont les propriétés de fluorescence sont différentes [118] et qui coexistent dans un équilibre dynamique (Figure 70).

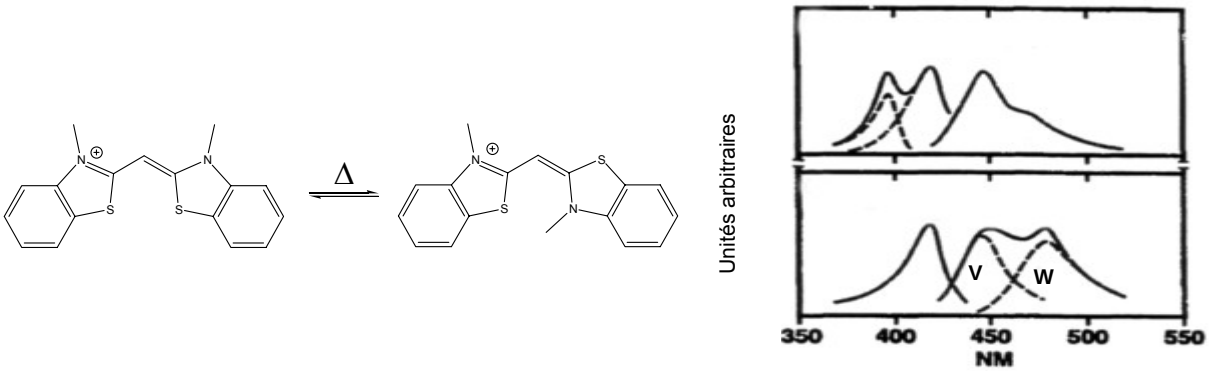


Figure 70A: Isomères syn (à gauche) et anti (à droite) des thiocyanines
Figure 70B : Spectres de fluorescence (excitation à 420nm, *en bas* et à 395 nm, *en haut*)

En excitant la thiocyanine à λ_{Max}= 420 nm, on obtient un spectre d'émission structuré en deux bandes et non symétrique du spectre d'absorption (figure 70B). Deux bandes d'émission d'intensité proche contribuent au spectre : une bande V vers 440 nm et une bande W vers 480 nm. Par contre, par excitation à 395 nm, la bande V est très majoritaire. Le spectre d'excitation (λ_{Em}= 440 nm) est proche du spectre d'absorption, bien que la bande soit plus fine, tandis qu' à λ_{Em}= 480 nm, le spectre d'excitation laisse apparaître une bande décomposable en deux contributions à 395 et 422 nm. L'observation de bande V après excitation au maximum d'absorption de la bande W s'explique par une isomérisation, dans l'état excité, de la forme responsable de l'apparition de la bande W vers celle responsable de la bande V. Les auteurs déduisent également que le spectre d'absorption du colorant est constitué de deux composantes : une bande W majoritaire attribuée au rotamère *syn* majoritaire (λ_{Max}= 420 nm) et une bande V attribuée au rotamère *anti* minoritaire (λ_{Max}= 395 nm). Les

auteurs postulent donc que les deux bandes observées en UV sont causées par les deux formes isomères possibles de la thiocyanine. Au contraire, dans le cas du TO, ces deux pics sont attribués à un phénomène d'agrégation (pic du monomère, pic de dimère), alors qu'il existe également dans le cas du TO deux isomère possibles. Cette dernière hypothèse se heurte à deux observations: premièrement, dans le cas du TO, même à très haute dilution, l'épaulement à 490 nm reste toujours visible et, en dessous d'un certain seuil en concentration, son intensité relative ne varie plus. Deuxièmement, les spectres du TO libre et d'un conjugué ODN-TO (dont l'encombrement stérique est extrémement important au voisinage du TO) sont exactement superposables. Cela va à l'encontre de l'hypothèse mettant en cause les phénomènes d'agrégation en tant qu'unique explication de l'origine de l'épaulement observé à un λ inférieur au pic principal. Pour autant, l'observation d'une augmentation d'intensité de cet épaulement à haute concentration ne peut être expliquée par le phénomène d'isomérie seul.

2.2. ODNs et PNAs comportant un motif thiazole orange

Le TO présente une forte augmentation de fluorescence en présence d'ADN, ce qui en fait une molécule intéressante pour la détection des acides nucléiques [120-126]. Toutefois, sa sélectivité reste médiocre car il ne peut distinguer que l'ADN double brin, les oligopurines et les oligopyrimidines. Afin d'accroître sa sélectivité, plusieurs équipes l'ont lié de manière covalente à des PNAs ou des ODNs.

Les PNAs sont des mimiques de l'ADN naturel dans lequel le squelette phosphate/ribose est remplacé par un polymère de type peptidique (Figure 71) [119]. Ils sont capables de former des duplex PNA•DNA qui s'hybrident en parallèle selon les règles de Watson-Crick, ainsi que des triplex 2 PNA•DNA.

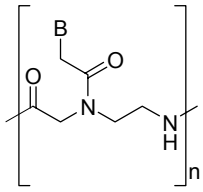


Figure 71: Motif monomérique d'un PNA, B=base nucléique

Deux types de conjugués ont été étudiés. L'un où le colorant est lié en position *N*-terminale de la chaîne PNA (Figure 72 à gauche, Type A) l'autre où il remplace l'une des bases nucléiques de la séquence (Figure 72 à droite, Type B)

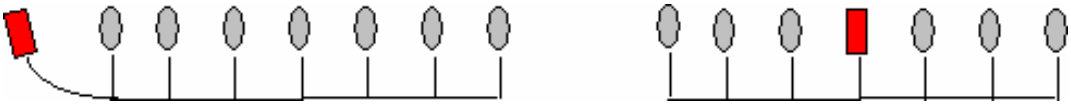


Figure 72: Conjugués TO/PNA Type A *(gauche)* et Type B *(droite).* Ovales gris: bases nucléiques, rectangle rouge: TO

Des conjugués ODN-TO ont été synthétisés. Le marqueur a été introduit par une liaison phosphoramidate en position internucléotidique d'oligo-2'-desoxythymidylates et d'oligo-2'-desoxyadénylates en série α et β [128]. La chiralité du phosphore ainsi que l'anomérie du C_1 du ribose conduisent chacun à l'existence d'isomères, alors que le squelette peptidique du PNA est totalement achiral. Cela implique donc l'existence de deux paires d'isomères générées au niveau du phosphore ou du carbone anomère (Figure 73 A et B).

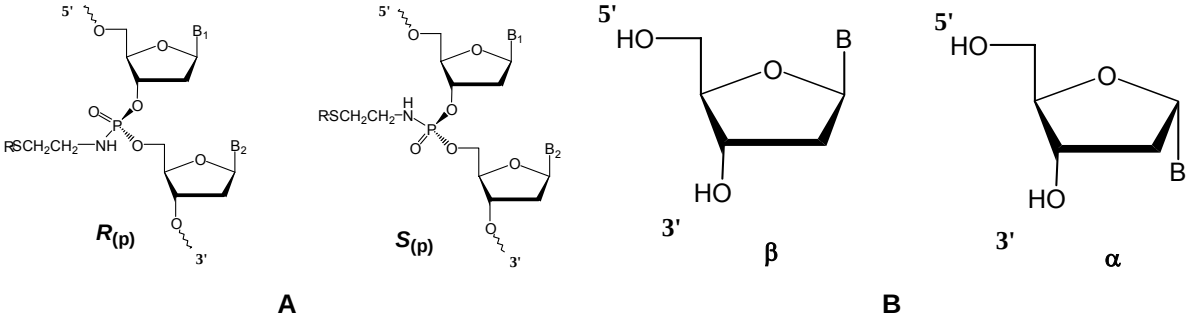


Figure 73 : Structure générale des deux conjugué ODN-TO isomères au niveau du phosphore chiral.
Encadré A: isomère R_P et isomère S_P.(R = TO-X-; TO = Thiazole orange lié par l'azote du cycle quinoline. X = $-(CH_2)_{10}-$ ou $-(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2-$)
Encadré B : Structure des deux anomères des nucléosides: anomères α et β

Les observations faites sur des conjugués PNA-TO et ADN-TO en solution et non-hybridés montrent que leur rendement quantique de fluorescence est toujours plus élevé que celui du TO libre (Φ_{TO}=2x10^{-4}) et que leur absorption est décalée davantage vers le rouge (λ_{TO}=501nm). Il semblerait donc que le comportement du TO lié de manière covalente à un PNA ou un ODN ne peut être réduit à celui du TO libre. Le déplacement spectral observé laisse plutôt supposer qu'il y a intercalation du TO. De plus, après irradiation à 265 nm (absorption des bases nucléiques), on observe une émission de fluorescence vers 510 nm, preuve d'un transfert de fluorescence entre les bases et le marqueur, ce qui atteste de l'hypothèse du voisinage du TO aux abords de la séquence en base [121].

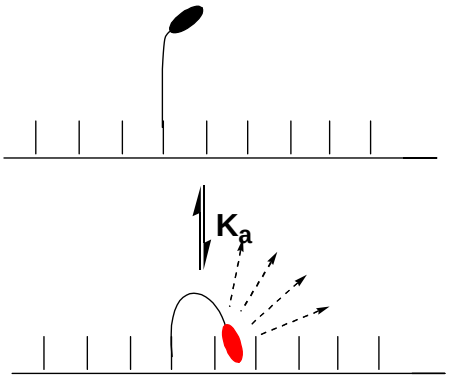


Figure 74: Représentation schématique du phénomène de « Back-binding »

On peut en déduire que, dans les sondes non-hybridées, le marqueur TO n'est pas totalement libre et ne peut pas être considéré comme une molécule de TO en solution. En effet, le marqueur interagit avec le brin auquel il est lié. Ce phénomène est nommé « *back-binding* » (Figure 74) et est responsable de la fluorescence résiduelle observée sur les sondes libres. La sonde est en équilibre entre une forme libre et une forme repliée, selon une constante de dissociation K_a. La fraction de sondes à l'état replié varie selon la température (Figure 75). Ce phénomène a été observé tout d'abord sur les PNA-TO libres [121,122] dont les rendements quantiques de fluorescence sont de 7 à 415 fois supérieurs à ceux du TO, le phénomène est très nettement moins marqué pour les sondes homopyrimidines que pour les homopurines ou les mixtes (Pour une séquence mixte Lys^+Lys^+ATCAACACTGCATGT-TO à 30°C, 96% des sondes sont en conformation repliée). Cela est aussi vrai pour les conjugués ODN-TO, avec des fluorescences 7 à 10 fois supérieure à celle du TO libre pour des sondes poly(αT) [123] et 200 à 350 fois pour des poly(A) [124].

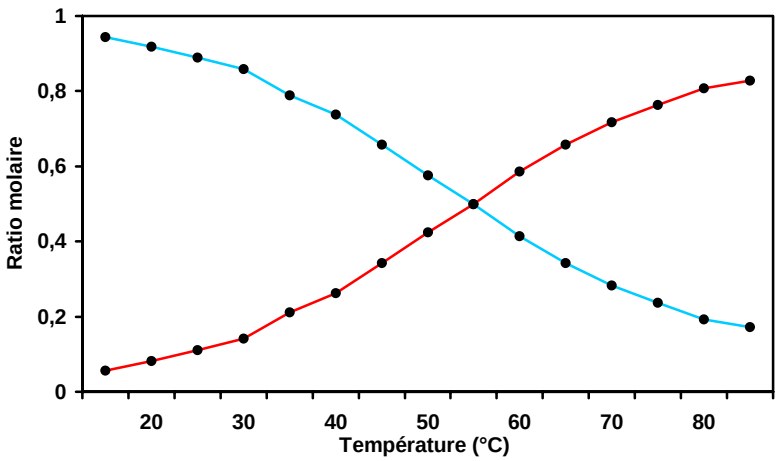


Figure 75: Fraction de la sonde Lys+CTTCTCCGAT-TO sous les formes libre *(en rouge)* et repliée *(en bleu)* en fonction de la température [121].

Cela rappelle le comportement du TO libre en présence de chacun des quatre différents brins homonucléotidiques [125]. Le fait que, dans le cas des sondes, le marqueur soit lié de manière covalente avec le brin, et ne peut donc s'en éloigner, peut fortement déplacer l'équilibre en faveur de l'interaction. Cela est aussi vrai pour les sondes PNA [121,122], même si l'interaction entre les intercalants cationiques libres et les PNA est très faible. La fluorescence plus élevée observée dans le cas de brin polypurines peut s'expliquer par la meilleure interaction entre le TO et le système bicyclique des purines, en comparaison de l'unique cycle des pyrimidines.

2.2.1. Conjugués PNAs-TO

2.2.1.1. Influence de la température sur la fluorescence des sondes libres

La fluorescence d'une sonde libre décroît en fonction de la température, comme cela a été constaté sur des conjugués PNA [122], avec lesqfuels la fluorescence de la sonde libre décroît d'un facteur 2,2 à 6,0 entre 25°C et 50°C et atteint la fluorescence du TO libre a haute température. Les études plus poussées [121] menées par Svanvik *et al.* montrent que la décroissance de la fluorescence de la sonde libre lors de la montée de température est causée par deux phénomènes distincts : la diminution de la fraction des sondes présentes sous formes repliées (Figure 75) et, deuxièmement, la diminution du rendement quantique de fluorescence de la sonde repliée (Figure 76). L'existence de ce deuxième paramètre a été émise suite à l'observation suivante : à 30°C, 96% des sondes sont repliées or, à une température moindre (15°C), la fluorescence est nettement plus élevée. Ce n'est donc pas l'accroissement supplémentaire de la fraction de sonde repliée (qui ne peut être que très limitée) qui est responsable de cette élévation. Les auteurs postulent que la raison en est une rotation interne plus restreinte de la molécule autour des liaisons du méthine à basse température, ce qui modifie le Φ_F de la molécule.

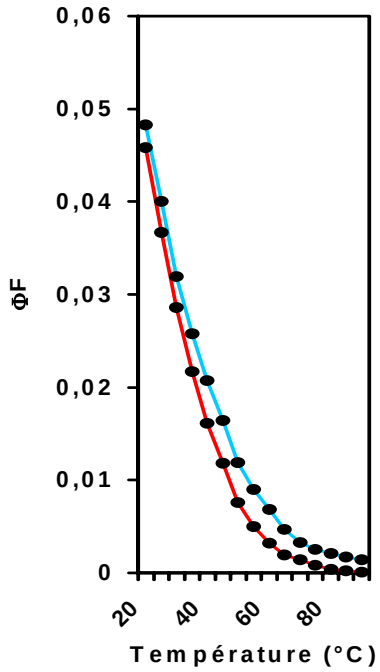


Figure 76: Variation du rendement quantique de fluorescence d'une sonde Lys+CTTCTCCGAT-TO libre (bleu) et repliée (rouge) en fonction de la température [121].

2.2.1.2. Augmentation de la fluorescence lors de l'hybridation

Les paramètres gouvernant l'augmentation de fluorescence lors de l'hybridation sont moins bien connus. Les auteurs ont étudié huit sondes de séquences différentes. Alors que les différents rendements quantiques de fluorescence relevés varient peu pour les sondes hybridées (Φ_{Hyb}=0,042 à 0,14), ceux des huit sondes libres s'étalent sur une plus grande gamme de valeurs (Φ_{Lib}=0,0015 à 0,083), que ce soit à 25°C ou 50°C. Il en résulte que la valeur de l'augmentation de fluorescence lors de l'hybridation (Φ_{Hyb} / Φ_{Lib}) dépend davantage de la fluorescence de la sonde libre que de celle de son hybride. Dans tous les cas le maximum d'absorption de l'hybride est déplacé vers le rouge, attestant de la modification de l'environnement électronique du TO, résultant de son interaction avec le duplex (λ_{Max} = 507 à 512 nm → λ'_{Max} = 512 à 514 nm). La température a également une influence sur la fluorescence par le biais de la stabilité thermique des duplex. Lorsque la température est supérieure au T_M du duplex, celui-ci se dissocie et l'intensité du signal fluorescent du milieu décroît pour se rapprocher de celui de la sonde libre. Ce phénomène simple peut être utilisé pour améliorer la discrimination d'une séquence cible non mutée par rapport à une séquence mutée grâce à une sonde PNA-TO. Il faut pour cela travailler à une température proche du T_M du duplex imparfait. Dans l'expérience effectuée [120], l'hybride parfait se dissocie à 69°C tandis que la cible mutée à un T_M de 60°C seulement. En travaillant à température ambiante l'émission de fluorescence est environ 3,5 fois supérieure pour le duplex parfait comparé au duplex comportant un mesappariement. Par contre, à 61°C ce rapport est de 11 (bien que les fluorescences absolues de ces deux duplex soient inférieures à celles observée à 25°C, voir ci-dessous). A cette température le duplex imparfait est fortement dissocié tandis que le duplex parfait ne l'est que très peu. La plus grande mobilité des unités TO dans le premier cas conduit à une très nette diminution de leur fluorescence. Ces observations sont valables pour les duplex de type A [122].

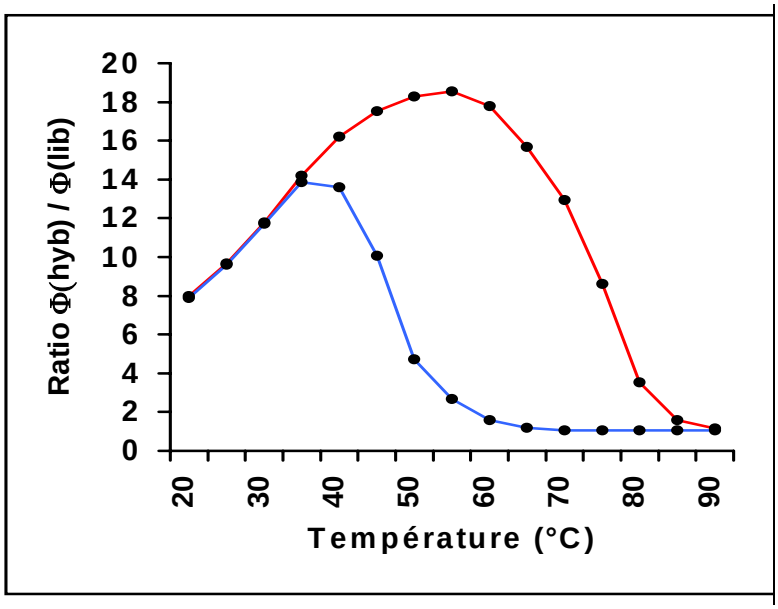


Figure 77: Augmentation de la fluorescence d'un conjugué PNA-TO de structure TTTTCTTCTT-C(=O)-$(CH_2)_5$-NH(C=O)-$(CH_2)_5$-TO en présence de cible AGCGGTCGACAGAANAAGAAAA où N=G (*En rouge:* cible non mutée) ou N=T (*En bleu:* cible mutée)

Pour autant la fluorescence d'un PNA hybridé décroît en fonction de la température, même si celle-ci est inférieure au T_m [121,122]. La raison invoquée est que la montée en température accroît les mouvements des bases nucléïques (rotation, élongation…), permettant ainsi au TO de se mouvoir plus facilement dans sa cavité et de transferer son énergie au milieu de manière non-radiative (rotation), et donc, sans émission de fluorescence. Ainsi les rendements quantiques de fluorescence de différents PNAs-TO, libres ou hybridés, décroissent d'un facteur 2 à 4, lorsqu'on passe de 25 à 50°C. Toutefois la décroissance est plus forte pour la sonde libre que pour le complexe d'hybridation, de telle manière que le rapport $\Phi_{(hyb)}/\Phi_{(lib)}$ s'accroit avec la température (Figure 77), jusqu'à la fin de la fusion où la dissociation du complexe ramène la fluorescence à celle de la sonde libre.

2.2.1.3 Détection de duplex parfaits avec des sondes PNAs-TO

L'équipe de Seitz a synthétisé et étudié des conjugués de type B. Le remplacement d'une base nucléique par le TO s'accompagne d'une faible altération des propriétés de stabilisation des duplex quelle que soit la nature de la base opposée au TO lors de l'hybridation [120]. Le TO peut donc servir de base universelle dans les duplex PNA/DNA de type B. L'hybridation d'un PNA-TO de type B s'accompagne d'une augmentation de fluorescence [126], de plus, selon la nature de la base qui fait face au TO, cette augmentation est d'un facteur variable [120], allant de 11 (pour A) à 19 (pour T) sans qu'on puisse en expliquer la cause. On remarque également que la guanine n'agit pas comme inhibiteur de fluorescence. Cette augmentation de fluorescence est expliquée [86] par la restriction du degré de liberté du TO dans le duplex comparé à la sonde libre. La désexcitation du colorant se fait alors principalement par fluorescence plutôt que par transfert de chaleur au milieu.

2.2.1.4. Reconnaissance des mésappariements

D'autres PNA-TO de type B ont été utilisés pour détecter des mesappariements adjacents au site de fixation du TO.

PNA-TO: *C*-Gly- TATCCCCGT**OA**ACCACCAGA-*N*
Cible non-mutée: $^{5'}$-Dig-ATAGGGGCA**TT**TGGTGGTCT-$^{3'}$
Cible mutée: $^{5'}$-Dig-ATAGGGGCA**TA**TGGTGGTCT-^{3}

Figure 78: Structure du PNA-TO de type B et des deux cibles utilsées par Seitz *et al* .[126]

Seitz *et al.* ont synthétisé un PNA 20-mère dans lequel le TO est opposé à T lors de l'hybridation [126] (Figure 78). La formation du duplex entre cette sonde et sa séquence cible conduit à une augmentation de l'intensité de fluorescence du marqueur TO d'un facteur 2,3. Par contre, le duplex formé avec un brin contenant un mesappariement à la position 10 (T→ A), conduit à une diminution inexpliquée de fluorescence d'environ 15%. D'autres études réalisées avec un PNA-TO 13-mère [120] montrent que l'hybridation de la sonde avec sa cible non mutée s'accompagne d'une forte augmentation de l'intensité de fluorescence (18 fois), tandis que celle avec la cible mutée au niveau de la position adjacente à la base faisant face au TO n'entraîne qu'une augmentation modérée (5 fois à 25°C). Dans tous les cas, on observe un léger déplacement du maximum d'absorption vers le rouge, plus important dans le cas de l'appariement parfait, attestant du changement d'environnement du TO.

Des conjugués PNAs-TO de type A comportant le TO lié par l'azote, soit du cycle quinoléïne, soit du cycle benzothiazole, à l'extrémité *N*-terminale du PNA par un bras de liaison hexanoyle ou undécanoyle ont également permis de détecter des mésapariements [122]. Un PNA-10mère, comportant un marqueur TO lié par un linker C_6 à l'extrémité 5' présente une augmentation de l'intensité du signal fluorescent d'un facteur 18 en présence de séquence cible, tandis qu'en présence d'une cible comportant un mesappariement (G→T, à la 3ème base à partir du marqueur), elle n'est que d'un facteur 3.

2.2.2. Conjugués ODNs-TO

2.2.2.1. Etudes par spectroscopie d'absorption et détermination des stabilités des duplex

Les spectres d'absorption UV-visible des quatre isomères possibles d'un conjugué oligothymidylate (β-$^{5'}$d-$(T_{20})^{3'}$- (P_{10},R_P)-TO.;β-$^{5'}$d-$(T_{20})^{3'}$- (P_{10},S_P)-TO ; α-$^{5'}$d-$(T_{20})^{3'}$- (P_{10},R_P)-TO et α-$^{5'}$d-$(T_{20})^{3'}$- (P_{10},S_P)-TO) (Structures en figure 73) sont tous identiques. En présence de cible poly r(A), on n'observe, dans les quatre cas, que peu ou pas de variation du spectre dans le domaine visible. De plus, les études de stabilité des duplex formés montrent que l'adjonction du TO a un effet stabilisateur faible, voire nul.

En ce qui concerne les sondes d'anomérie α, on peut noter que jusqu'à présent aucun exemple d'intercalation dans des duplex d$(\alpha T)_n$ /poly r(A) (qui sont de type α/β antiparallèles) n'a été décrit [6], ce qui pourrait expliquer que l'adjonction d'un TO à l'oligonucléotide d$(\alpha T)_n$ ne modifie pas

la stabilité du duplex. D'autre part, dans le cas des sondes β, le mauvais positionnement du TO pourrait expliquer le très faible Δ_{TM} (de +1,5 à +2°C), par le fait que les études par RMN menées sur le TOTO (§ B.2.1.4.) montrent que les cycles quinoliniums se placent préférentiellement entre les purines. Or dans la structure de la sonde étudiée, le TO est lié, *via* le cycle quinoline, à une pyrimidine. On peut donc envisager que l'impossibilité du TO à se placer de manière optimale à cause des contraintes stériques introduites par le bras diminue fortement son pouvoir stabilisateur.

D'autres études ont été menées sur des conjugués oligo-β-2'-désoxyadenylates comportant un TO lié en position internucléotidique *via* un bras espaceur de nature variable [128]. Le marqueur est en effet relié soit par un bras lipophile ($-(CH_2)_{10}-$) ou relativement hydrophile ($-[(CH_2)_2O]_3(CH_2)_2-$) (Figure 73A) et de longueur voisine. Dans les deux cas, les isomères R_P et S_P ont été séparés.
Les spectre d'absorption UV des quatre conjugués sont identiques et, en présence de cible d-$^{5'}CACT_{15}CAC^{3'}$, présentent un déplacement du maximum d'absorption de la bande en visible de l'ordre de 3 à 4 nm vers le bleu. Les duplex que forment les conjugués avec la cible ADN ou ARN (poly r(U)) sont nettement plus stables que celui formé par la séquence non modifiée correspondante (Δ_{TM}= +5,5°C à +8,5°C ; cible ADN). Les conjugués d'isomérie R_P forment des duplex plus stables que ceux d'isomérie S_P. Ceci est en accord avec les conclusions des études RMN réalisées sur les complexes TOTO•ADN double brin [99] dont les résultats RMN montrent que le bras de liaison se place dans le petit sillon. Or, cela n'est possible, dans le cas d'un conjugué ODN-TO, qu'avec une isomérie R_P qui oriente le TO vers le petit sillon. Toutefois, l'ajout de 2 eq. de poly r(U) à 1 eq. d'isomère S_P se traduit par la formation d'un triplex. La présence du TO orienté vers le grand sillon n'empêche pas l'approche du troisième brin purique. On peut donc en déduire que soit le TO est intercalé, soit que le bras de liaison, bien que *dirigé* vers le grand sillon, se *replie* vers le petit sillon et permet une intercalation partielle du TO et donc, moins stabilisante.

La nature des bras de liaison a peu d'influence, et le faible gain de stabilisation obtenu dans le cas de l'utilisation du bras hydrophile peut s'expliquer davantage par des considérations de longueur (Bras hydrophobe : 9 liaisons C-C soit 1386pm ; bras hydrophile 4 liaisons C-C et 6 C-O soit 1474pm) que de polarité.

Le positionnement du TO dans le duplex semble être un facteur important pour la stabilisation de ce dernier. La comparaison entre les duplex D_1 et D_2 (Figure 79) de structures très proches montre que le positionnement du TO, selon qu'il soit fixé sur un phosphate du brin polypyrimidique (D_1) ou polypurique (D_2), influe notablement sur le T_M. En effet l'ajout du marqueur thiazole orange n'apporte que peu de stabilisation dans le cas de D_1 (Δ_{TM}= + 1,5 °C ; T_M=34°C pour le duplex non modifié), tandis qu'il s'accompagne d'une forte stabilisation dans le cas de D_2 (Δ_{TM}= + 8,5°C ; T_M=35 pour le duplex non modifié).

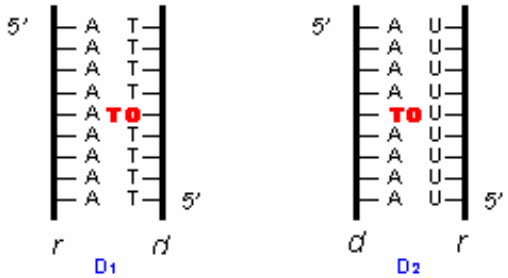


Figure 79: Structure comparée de deux duplex formés entre*(A gauche)* : un β-d-(T_{20}) modifié et du poly r(A) (D_1)*(A droite)* : un β-d-(A_{15}) modifié et du poly r(U) (D_2)

2.2.2.2. Propriétés de fluorescences de sondes ODNs-TO

Les conjugués oligonucléotidiques du TO présentent un signal fluorescent dont l'intensité est supérieure à celle du TO libre et dépend de la composition en base de la séquence oligonucléotidique. En présence de la séquence complémentaire, l'intensité de la bande d'émission de fluorescence (λ_{Em}=530 nm; épaulement: λ_{Em}=570 nm) augmente, ce qui fait de ces conjugués des composés interessants pour l'analyse des acides nucléiques [129] . Plusieurs paramètres ont été étudiés. Le TO a été greffé en position internucléotidique d'un pentadéca-2'-desoxyriboadénylate *via* des bras de liaisons hydrophobe ou hydrophile et les deux paires d'isomères ont été isolées. L'intensité de fluorescence des sondes libres reste voisine dans les quatre cas, mais l'augmentation de fluorescence observée après ajout d'un ODN de séquence complémentaire est plus intense dans le cas de conjugués comportant le bras hydrophobe (d'un facteur 4,5 environ) que le bras hydrophile (facteur 2 environ). Pour chacun des deux types de bras, le conjugué d'isomérie $R_{(P)}$ présente, après hybridation, une augmentation de l'intensité de fluorescence supérieure à celle observée avec le conjugué d'isomérie $S_{(P)}$ [124]. Des eicosa-α-thymidylates (résistants aux nucléases) comportant un thiazole orange en position internucléotidique ont été synthétisés et leurs isomères $S_{(P)}$ et $R_{(P)}$ séparés. En présence de cible poly r(A), une augmentation importante de l'intensité de fluorescence est observée, plus marquée dans le cas de l'isomère $R_{(P)}$ (facteur 15,5) que $S_{(P)}$ (facteur 8,5). Ces sondes ont pu être utilisées pour la détection en milieu cellulaire des extrémités poly r(A) des ARN(m) de cellules de mammifères [123].

2.2.3. Utilisation des sondes PNAs-TO

Plusieurs conjugués PNAs-TO, nommés *Light-Up Probe* ont été utilisés pour la détection de produits d'amplification par PCR [127]. Ces sondes tolèrent une large gamme de conditions opératoires et leur emploi conduit à un taux de faux positifs négligeables [130]. Ainsi un conjugué PNA/TO a été utilisé pour suivre l'amplification en PCR d'un fragment de gène de trois espèces de *Salmonella*, [131] et d'un gène d'*Escherichia coli* utilisés dans les recherches en transgénose [132]. Enfin, les PNA-TO ont été utilisées pour la détection des séquences codant pour deux types de chaînes légères constituant l'immunoglobuline humaine et dont le rapport des taux peut être utilisé comme marqueur tumoral [133]

2.2.4. Autres biomolécules conjuguées au TO

Les fortes interactions que le TO engage avec les acides nucléiques ont poussé certaines équipes à le lier de manière covalente à diverses biomolécules dans le but d'augmenter leurs interactions avec l'ADN ou l'ARN.

Ainsi la paromomycine, un aminoglycoside, agit comme un agent antibactérien en se liant à une zone particulière de l'ARN procaryote. En lui adjoignant le TO, l'affinité du bioconjugué est 40 fois supérieure à celle de la paromomycine seule [134]. En augmentant la taille du bras de liaison (de 2 à 6 méthylènes) l'affinité décroît d'un facteur 10, démontrant l'importance de ce paramètre.

Le TO a été également conjugué à un peptide comportant un motif en doigt à zinc [135]. La séquence peptidique choisie est celle du domaine d'un récepteur à glucocorticoïde capable de se lier à l'ADN; et cela dans le but de créer une mime de cette protéine. La présence de la cyanine

améliore d'un facteur 50 l'affinité du peptide pour la séquence cible. De plus, le bioconjugué présente des propriétés de photocoupure et de photooxydation.

Dernièrement, le thiazole orange a été lié de manière covalente à une protéine, un histone de drosophile, par un résidu cystéine [136]. La forte augmentation de fluorescence du conjugué en présence d'ADN reflète la capacité du colorant à interagir avec les acides nucléiques. La fluorescence du conjugué est également sensible à la longueur et à la composition en bases de l'ADN .

L'équipe de Kelley a également fixé le thiazole orange *via* une liaison covalente de type alkylamide de 11 carbones sur l'amine de la chaîne latérale d'une lysine N-terminale de plusieurs peptides [137]. Le chromophore est lié par l'azote du motif quinoline (TO) ou benzothiazole (TO'). L'adjonction de la cyanine, aux fortes propriétés intercalantes vis-à-vis de l'ADN, a pour but d'accroître fortement l'affinité. En présence d'ADN, la fluorescence des sondes peptidiques augmentent d'un facteur 80 à 1300. Les résultats obtenus avec des conjugués de séquences voisines montrent qu'une augmentation de stabilité ne s'accompagne pas nécessairement d'une augmentation de fluorescence. Les dérivés du TO' présentent une fluorescence moindre que ceux du TO et les études de fluorescence menées sur les conjugués du TO' tendent à démontrer qu'ils présentent une plus faible capacité d'empilement, le chromophore se situant plutôt dans le *grand* sillon. Des dipeptides liés au TO présentent une activité de coupure de l'ADN monobrin [138], la présence d'acide aminé aromatique et d'oxygène dissous est nécessaire. Des conjugués oligonucléotidiques du thiazole orange ont également été fixés à l'extrémité de fibres optiques [139] dans le but de développer des biosenseurs réutilisables.

2.3.5. Conjugués ODNs-YO

Le YO a également été lié de manière covalente aux ODNs en position internucléotidique [140,141]. De manière similaire à ce qui a été observé avec les conjugués TO, la fluorescence des conjugués YO libres est faible, due aux interactions intramoléculaire entre le YO et les bases nucléiques [141] et diminue fortement avec l'augmentation de température [140]. La fluorescence du conjugué YO est fortement augmentée en présence de séquence complémentaire lors de la formation de duplex [140,141] ou de triplex [141]. De manière similaire à ce qui a été observé avec le YO libre [92], les conjugués YO promeuvent, en présence de spermine, la photocoupure de la double hélice d'ADN au niveau des guanines [141].

3. Synthèse et propriétés des nouveaux conjugués ODN-cyanine

L'étude bibliographique des cyanines employées dans la détection d'acides nucléiques montre que cette famille de molécules présente de nombreux avantages: facilité de synthèse, stabilité chimique satisfaisante, absence de perturbation de l'hybridation, fluorescence des sondes libres faibles, nette augmentation en présence de cible, signal fluorescent à de grandes longueurs d'onde. Nous avons donc retenu cette classe de composés comme marqueurs de nos sondes.

Jusqu'à présent, seules deux cyanines (TO et YO) ont été liées de manière covalente à des acides nucléiques ou leurs dérivés. De plus les conjugués ODNs-TO synthétisés étaient des homooligonucléotides (oligo-T ou oligo-d(A)) et, bien que des conjugués PNAs comportant les

quatre bases nucléiques aient été synthétisés, ce type de sonde reste très coûteux. Nous avons donc entrepris d'effectuer les synthèses de chromophores originaux et de conjugués oligonucléotidiques comportant les quatre bases nucléiques.

L'ensemble des études effectuées sur les interactions cyanines/ADN et conjugués-cyanines/ADN met en exergue la sensibilité des propriétés spectrales des sondes à plusieurs facteurs structuraux. Bien que des critères tels que la longueur du bras de liaison, la nature de la séquence en bases ou le point d'ancrage du colorant à l'oligonucléotide soient fortement pressentis comme ayant une importance, de nombreuses études restent à fournir pour la compréhension puis l'amélioration des propriétés des sondes oligonucléotidiques.

Nous avons donc entrepris une étude plus poussée de l'influence de la structure des conjugués sur leurs propriétés spectrales: structure des chromophores, nature en bases de la séquence, position d'ancrage, isomérie. Nous avons, à ces fins, synthétisé neuf cyanines qui n'ont, pour la plupart, jamais été utilisées comme marqueurs de sondes oligonucléotidiques. Ces chromophores ont été couplés à l'extrémité 5' de deux types de séquence afin d'étudier l'influence de la nature des bases adjacentes. Pour l'une de ces séquences, nous avons également synthétisé des conjugués dont le marqueur est fixé en position internucléotidique. Outre l'influence du site de fixation, l'étude de ces conjugués nous a également permis d'étudier l'influence de l'isomérie générée au niveau du phosphate modifié sur les propriétés spectrales de la sonde.

3.1 Choix des séquences

Les deux séquences choisies pour greffer les cyanines sont les 14-mères non modifiés **30** (séquence 1) et **31** (séquence 2) comportant les quatre bases nucléiques naturelles. Ils s'hybrident sur une séquence cible 27-mère **32** (présente dans le génôme proviral de HIV1) qui leur est commune.

30 Seq. 1 : 3' A G T C A T A A T T C G C C 5'
32 Cible : 5' G C G T C A G T A T T A A G C G G G G G A G A A T T A 3'
31 Seq. 2 : 3' A T T C G C C C C C T C T T 5'

Figure 80: Séquences des sondes, des ODNs non modifiés **30** et **31** et de la cible **32**.

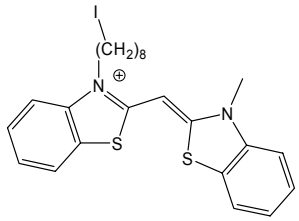
Cela permettra d'étudier l'influence de la composition en base sur le signal fluorescent. En effet, la séquence 1 est $^{5'}$CC- terminale tandis que la 2 est $^{5'}$TT- terminale. On peut noter également que dans les deux cas, la cible **32** est plus longue que l'ODN qui s'y hybride de 3 ou 10 bases du coté de son extrémité 5'. Dans le cas de la séquence 1, l'extrémité 5' est toujours dans un environnement GC (le brin pendant de la cible est -$^{5'}$GGG$^{3'}$-; figure 80 en rose) tandis que l'extrémité 5' de la séquence 2 reste au voisinage d'un environnement AT (le brin pendant étant –$^{5'}$TTA$^{3'}$; figure 80 en bleu)

3.2. Choix des cyanines

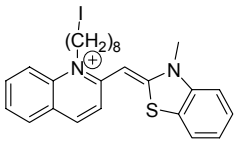
Nous avons choisi d'étudier l'influence de la structure de cyanines monomethines voisines du TO sur les propriétés des conjugués correspondants. Les études menées sur des conjugués TO' [121,122,129,137] ont montré que ceux-ci présentent des propriétés différentes de celles du TO alors que les deux chromophores ne se distinguent que par leur position d'ancrage au bras de

liaison. Etant donné, qu'il a été prouvé que dans l'espèce dimérique TOTO, les résidus benzothiazoles et quinolines s'empilent repectivement et de manière préférentielle entre les pyrimidines et les purines [95,96], il serait interéssant d'étudier l'influence de la modification de la nature des hétérocycles constitutifs de la cyanines sur les propriétés de fluorescence et de stabilisation des duplex. Les paramètres étudiés sont la nature des hétérocycles constitutifs de la cyanine, ainsi que les positions du bras de liaison et de la liaison méthine liant les deux cycles. Cela conduit à la synthèse de cyanines comportant chacune deux hétérocycles bicycliques du type suivant : benzothiazol-2-yle, quinolin-2-yle et/ou quinolyn-4-yle. Le bras de liaison est, dans chaque cas, un 8-iodoctyle situé sur l'un des deux azotes hétérocycliques. Le second azote est substitué par un groupe méthyle.

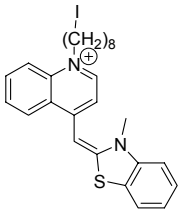
Les neufs cyanines comportant un bras 8-iodooctyle **33** - **41** synthétisées sont présentées dans la figure 81 ci-après.



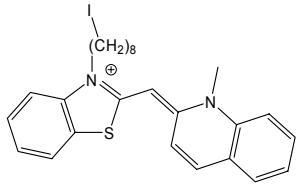
Thiocyanine 33
(Th)



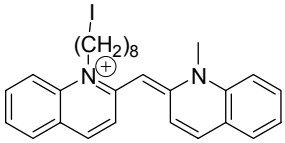
Ortho-Thiazole orange 34
(*o*TO)



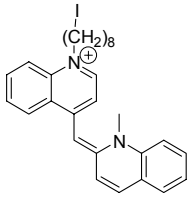
Thiazole orange 35
(TO)



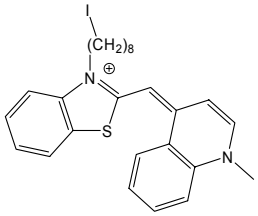
Ortho-Thiazole orange 36
(*o*TO')



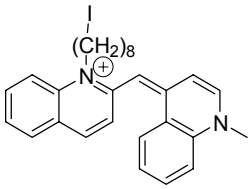
2,2'-quinocyanine 37
(22q)



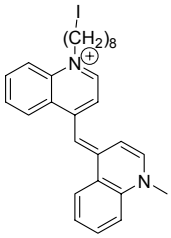
4,2'-quinocyanine 38
(42q)



Thiazole orange 39
(TO')



2,4'-quinocyanine 40
(24q)



4,4'-quinocyanine 41
(44q)

Figures 81: Structure des 9 cyanines synthétisées **33** à **41**.
Les lettres entre parenthèses font référence à la nature du système hétérocyclique, selon qu'il est apparenté à la famille des thiocyanines (Th), du thiazole orange (TO) ou des quinocyanines (q)

Système conjugué apparenté	λ_{Max} (nm)	Conditions		Références bibliographiques
		Solvant	Substituants	
Th	425	$CH_3OCH_2CH_2OH$	*N*-Me, *N'*-Me	[80]
	422,5 - 423	MeOH	*N*-Et, *N'*-Et	[76,118]
***o*TO/*o*TO'**	484		*N*-Et, *N'*-Et	[109]
	486		*N*-Et, *N'*-Et	[71]
TO/TO'	502,5	MeOH	*N*-Et, *N'*-Et	[76]
	500,6	Eau	*N*-Me, *N'*-Me	[125]
22q	523		*N*-Me, *N'*-Me	[109]
	529	CH_2Cl_2	*N*-Et, *N'*-C_{10}	[110]
24q/42q	555		*N*-Et, *N'*-Et	[109]
44q	591	MeOH	*N*-Et, *N'*-Et	[76,109]
	590	MeOH	*N*-Me, *N'*-$CH_2CH(OH)CH_2Br$	[114]

Tableau 8: Maxima d'absorption UV de dérivés des cyanines étudiées rapportés dans la littérature.

Les cyanines décrites ici sont toutes obtenues selon les méthodes classiques décrites plus haut. La thiocyanine est connue depuis longtemps [115] et de nombreux dérivés (R, R' = Me, Et…) ont été synthétisés. De même les cyanines 22q, 24q, *o*TO [108], ainsi que 44q et TO [108,109] ont été décrites et caractérisées, leur première synthèse datant parfois du XIXème siècle. Pourtant, seul le TO a été greffé à des oligonucléotides [123,124,128] et des PNA [122,126] tandis que le TO' a été gréffé uniquement sur des PNAs [121,122,129]. Aucun autre des cinq systèmes aromatiques de type cyanine (Th, 22q, 24q/42q, 44q, *o*TO/*o*TO') décrits ici n'a été greffé sur des oligonucléotides. Les propriétés de fluorescence en solution de deux dérivés du 44q ont été briévement étudiées, libre et en présence d'ADN double brin [81,114], démontrant que, comme le TO, ce composé n'est quasiment pas fluorescent en solution, mais qu'en présence d'ADN double brin sa fluorescence est fortement augmentée.

3.3. Synthèse des cyanines

La synthèse de ces colorants est effectuée selon la méthode de Brooker. L'un des hétérocycles doit comporter un groupement méthyle déprotonable en conditions douces, tandis que le second porte un groupement partant de type thioalkyle ou halogénure (Figure 82).

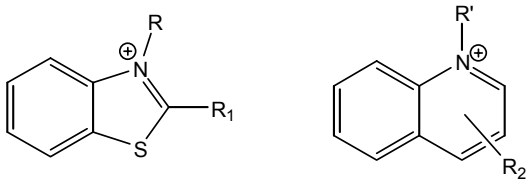


Figure 82: Structure des synthons utilisés pour la synthèse des cyanines
Synthons comportant un groupe méthyle acide (R = R' = -$(CH_2)_8I$; R_1 = R_2 = -Me)
Synthons comportant un groupe partant (R = R' = -Me ; R_1 = -SMe ; R_2 = -I)
(R_2 en position 2 ou 4 du cycle quinoline)

Les cyanines à synthétiser étant toutes asymétriques, plusieurs voies de synthèse sont donc possibles faisant appel à quatre synthons

3.3.1. Benzothiazole portant le groupe déprotonable (2-méthyle)

Dans le cas où le couplage utilise un dérivé benzothiazole portant un groupe méthyle déprotonable, deux espèces sont envisageables : le 2,3-diméthylbenzothiazolium (Figure 83 ; R=-CH_3) **42** ou le *N*-(8-iodooctyl)-2-méthylbenzothiazolium (R=-$(CH_2)_8I$) **43** selon que le synthon porte ou non le bras de liaison.

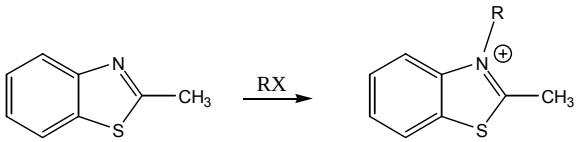


Figure 83: Synthèse générale de **42** et **43**.

Pour des groupes R de petite taille, comme le méthyle, la réaction est quantitative en présence de iodométhane au reflux du méthanol. Pour des groupes plus encombrants comme le groupe 8-iodoalkyle recherchés, la réaction échoue dans les solvants utilisés (dioxanne, DMSO). En absence de solvant, la réaction est réalisée avec des rendements mediocres.

3.3.2. Benzothiazole portant le groupe partant (2-thiométhyle)

Les 2-méthylthio-3-alkylbenzothiazolium peuvent être obtenus par alkylation d'une *N*-alkylbenzothiazole-2-thione par l'action du iodométhane ou du sulfate de diméthyle dans le méthanol.

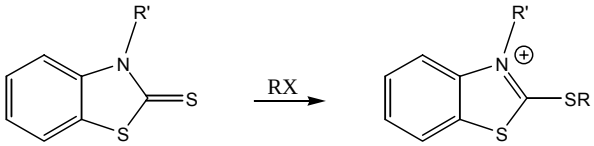


Figure 84: Synthèse du noyau 2-alkylthiobenzothiazolium (**44**)

Toutefois, par chauffage, les 3-alkyl,2-methylthiolbenzothiazolium subissent des migrations des groupes alkyles conduisant, si R' $\neq$ CH_3, à un mélange de quatre composés [78]. Dans notre cas, seul le 2,3-diméthylbenzothiazolium **44** peut donc être obtenu par cette méthode.

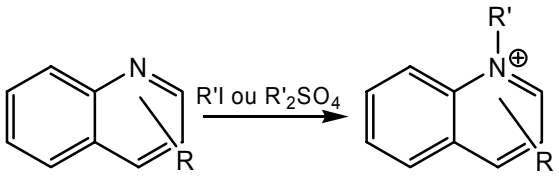
3.3.3. Quinoline portant le groupe déprotonable (2- ou 4-méthyle)

La 2-méthylquinoline (quinaldine) ainsi que la 4-méthylquinoline (lépidine) sont aisément converties en leurs dérivés **45** [iodure de *N*-(8-iodooctyl),2-méthylquinolinium] et **46** [iodure de *N*-(8-iodooctyl),4-méthylquinolinium] désirés par action de l'halogénure correspondant dans le dioxanne au reflux (Figure 85). L'emploi de α,ω-dihaloalkyle tend, malgré l'excès utilisé (5 fois), à former un produit de *bis*-substitution qui limite le rendement à 55~70%. La quinaldine est moins réactive. La réactivité des dihaloalkyle décroît avec la longueur de leur chaîne.

3.3.4. Quinoline portant le groupe partant (2- ou 4-iodo)

La quinoline est quantitativement méthylée en présence d'iodométhane dans le méthanol pour donner l'iodure de *N*-méthylquinolinium **47**. La 2-chloroquinoline ainsi que la 4-chloroquinoline réagissent partiellement dans les conditons de méthylation utilisées pour la quinoline. L'utilisation de sulfate de diméthyle suivie d'un traitement par une solution de iodure de potassium donne

quantitativement l'iodure de *N*-méthyl-2-iodoquinolinium **48** ou *N*-méthyl-4-iodoquinolinium **49** (Figure 85). Ces composés, très électrophiles, ne sont pas isolés.



45: R = 2-méthyle, R' = (8-Iodooctyle)-
46: R = 4- méthyle, R' = (8-Iodooctyle)-
47: R = H; R' = méthyle
48: R = 2-iodo; R' = méthyle
49: R = 4-iodo; R' = méthyle

Figure 85: Synthèses de *N*-méthylquinolinium substitués

3.3.5. Couplage des hétérocycles, réactions secondaires, contrôle de la pureté

Les cyanines sont obtenues par couplage entre un équivalent d'un hétérocycle portant un groupe partant et un équivalent portant un groupe méthyle, en présence de base (DIEA) à température ambiante une nuit [81].

Lors de la synthèse des quinocyanines, il convient de prendre en compte que le carbone 4 du 2-iodoquinolinium **48** et le carbone 2 du iodure de 4-iodoquinolinium **49** bien que moins réactifs vis-à-vis des nucléophiles sont toutefois capables de réagir sur les sels de lépidinium **46** ou de quinaldinium **45** en présence de base. Par voie de conséquence, on obtient, par cette réaction, outre le composé désiré (Figure 86, A), des cyanines isomères de positions (Figure 86, B) et donc de couleurs différentes. En milieu basique, on note que la réaction entre le sel de lépidinium **46** (ou de quinaldinium **45**) et l'iodure de *N*-méthylquinolinium **47** conduit à la formation d'un mélange inexploitable comportant une dizaine de composés de coloration variée. En effet, il faut prendre en compte que le carbone 2 des sels de lépidiniums **46**, le 4 de ceux de quinaldinium **45** et les carbones 2 et 4 des sels de quinoliniums **47** constituent également des sites électrophiles et que, par conséquent, deux noyaux lépidiniums **46** (ou deux quinaldiniums **45**) peuvent réagir l'un sur l'autre (Figure 86, C). Seule l'utilisation d'un hétérocycle comportant un groupe partant meilleur que le proton (comme le thiométhylbenzothiazolium **44** ou les iodoquinoliniums **48** et **49**) réduisent cette réaction parasite à un seuil acceptable. Une autre réaction parasite aboutit à la formation de triquinoline [71]. En effet, lors de la dernière étape de la formation des cyanines (Figure 63) le méthylène déprotoné peut réagir *via* une réaction d'élimination pour donner la cyanine désirée, mais également engager une attaque nucléophile sur un troisième hétérocycle selon le même mécanisme que les premières étapes de la réaction (Figure 86, D).

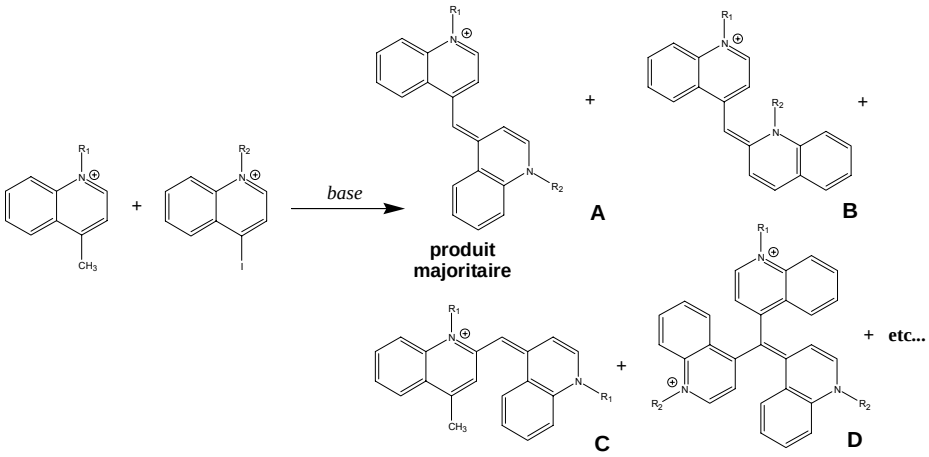


Figure 86: Synthèse de quinocyanines A , aperçu des coproduits de réactions B, C et D.

Bien que les produits secondaires de la réaction (voir figure 86) soient obtenus en quantités faibles, une purification poussée s'impose. En effet, chacun d'entre eux comporte au moins un bras iodooctyle et est donc susceptible de réagir sur un oligonucléotide 5'-thiophosphate (ou thiol) lors de la réaction de couplage suivante. Or, la purification par CLHP ne permet pas toujours, surtout pour des séquences longues, la séparation de deux conjugués de structures très voisines qui ne se différencient que par une isomérie de position. Deux colorants, même de structures proches, peuvent présenter des propriétés de fluorescence extrémement différentes (en présence d'ADN le TO présente une augmentation de fluorescence environ 3 fois supérieure à celle du YO, mais celle du YOYO est par contre environ trois fois plus élevée que celle du TOTO [84,105,125]). Ainsi un conjugué pollué par la présence d'une trace d'un conjugué isomère de position peut voir son signal fluorescent fortement perturbé, voire "écrasé", par la fluorescence de l'impureté en particulier si celle-ci présente un rendement quantique de fluorescence plus important que celui du conjugué principal.

La purification par chromatographie sur colonne de silice, éventuellement suivie d'une purification par chromatographie sur plaque préparative permet d'isoler les colorants avec une bonne pureté. L'analyse RMN permet de détecter facilement la présence de cyanines isomères de position non désirées. En effet, le proton du groupe méthine, situé entre les deux hétérocycles et donc soumis à l'anisotropie de ceux-ci, présente un déplacement chimique variable selon la nature des hétérocycles adjacents. Ainsi la cyanine **40** (noyau 24q; δ_{CH}=6,14 ppm) se distingue t-elle facilement de ses isomères de position, les cyanine **37** (noyau 22q; δ_{CH}=5,28 ppm) et **41** (noyau 44q; δ_{CH}=7,02 ppm), voir tableau 9.

Marqueur (noyau)		Rendement (%)	Synthons couplés	λ_{MAX} [1]	Couleur [2]	$\delta_{METHINE}$ (ppm) [3]
33	(Th)	94	**43** et **44**	423	Jaune	7,09
35	(TO)	67	**44** et **46**	502,5	Rouge	6,70
39	(TO')	62	**43** et **47**	*id*	Rouge	6,93
34	(*o*TO)	72	**44** et **45**	484	Ocre	6,34
36	(*o*TO')	80	**43** et **45**	*id*	Ocre	6,52
37	(22q)	19	**45** et **48**	529	Rosé	5,28
40	(24q)	90	**45** et **49**	555	Violet	6,14
38	(42q)	52	**46** et **48**	*id*	Violet	6,24
41	(44q)	26	**46** et **49**	591	bleu	7,02

[1] Cyanines libres. Pour les détails, voir étude bibliographique
[2] Aspect visuel du colorant pur.
[3] Dans le $CDCl_3$, référence TMS.

Tableau 9 : Propriétés des marqueurs **33** à **41**

Du fait de l'insolubilité des cyanines **33**-**41**, leurs spectres d'absorption UV-visible dans l'eau ne peuvent être enregistrés.

3.4. Synthèse des conjugués

3.4.1. Couplage des cyanines en position 5' des oligonucléotides

Après élongation par synthèse automatisée sur support solide, les oligonucléotides de séquence 1 et 2 sont fonctionnalisés en 5' à l'aide du réactif **10** selon la méthode décrite au § B.1.2.1. [65], puis sulfurés.

Après déprotection, les oligonucléotides 5'-thiophosphate de séquence 1 et 2 (respectivement **50** et **51**) sont obtenus sous forme de sels d'ammonium non purifiés (Figure 87). On

les solubilise dans le méthanol en présence d'éther couronne (18-crown-6). La cyanine en excès (parmi **33** à **41**) est ajoutée en solution dans le méthanol. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation durant 8 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière.

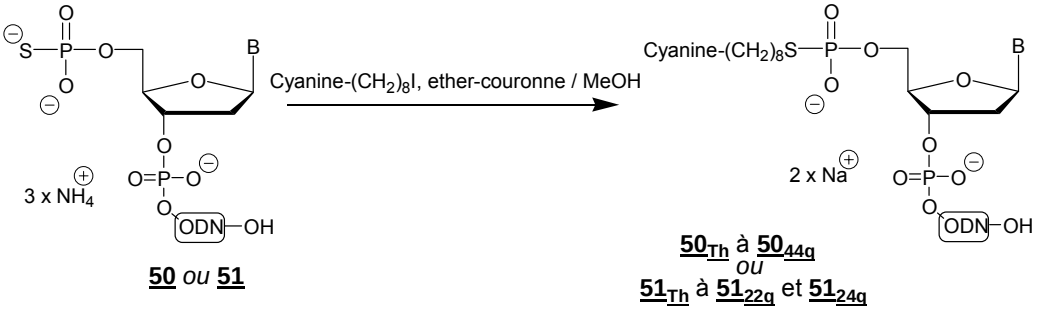


Figure 87: Couplage d'un marqueur sur un ODN par la méthode thiophosphate

Après traitement du mélange réactionnel (voir conditions expérimentales), les conjugués sont purifiés par chromatographie en phase inverse (exemple en figure 88). Les neufs cyanines **33** à **41** sont greffées sur l'ODN de séquence 1 **50** avec des rendements globaux (réactions et purifications) variant de 7 à 60%. Neuf conjugués sont obtenus, dénommés $\mathbf{50_{Th}}$, $\mathbf{50_{TO}}$, $\mathbf{50_{TO'}}$, $\mathbf{50_{oTO}}$, $\mathbf{50_{oTO'}}$, $\mathbf{50_{22q}}$, $\mathbf{50_{24q}}$, $\mathbf{50_{42q}}$ et $\mathbf{50_{44q}}$, tandis que les six cyanines **33**, **34**, **35**, **36**, **37** et **40** (qui comportent respectivement les noyaux de type: Th, TO, oTO, oTO', 22q et 24q) sont couplées à l'ODN **51** de séquence 2 avec des rendements allant de 2 à 32 %. Six autres conjugués $\mathbf{51_{Th}}$, $\mathbf{51_{TO}}$, $\mathbf{51_{oTO}}$, $\mathbf{51_{oTO'}}$, $\mathbf{51_{22q}}$ et $\mathbf{51_{24q}}$ sont alors obtenus.

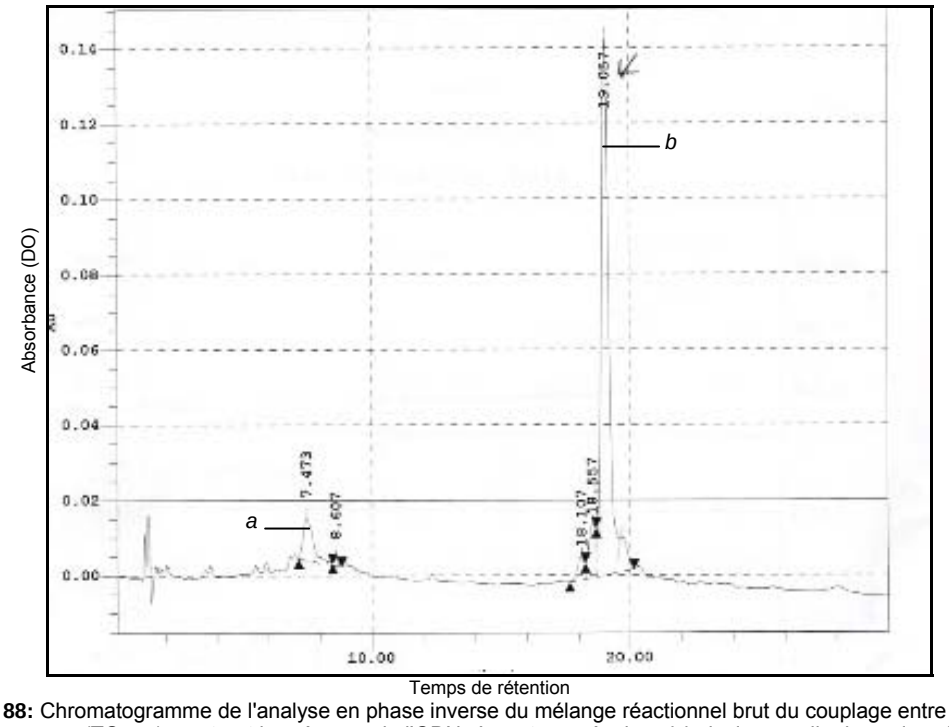


Figure 88: Chromatogramme de l'analyse en phase inverse du mélange réactionnel brut du couplage entre l'ODN **50** et le thiazole orange (TO, **35**) montrant la présence de l'ODN n'ayant pas réagi **50** *(a)* ainsi que celle du conjugué $\mathbf{50_{TO}}$ *(b)*.

La structure des conjugués obtenus est explicité dans l'exemple fourni à la figure 89. Leur dénomination comporte un numéro (selon l'ODN thiophosphate dont ils proviennent, figure 80) et, en indice, la référence du système hétérocyclique qu'ils contiennent (Figure 81). Ainsi le conjugué obtenu par réaction entre l'ODN **50** et la cyanine **40** comportant le système quinocyanine 24q est

nommé **50$_{24q}$**. Les structures de tous les conjugués synthétisés sont présentées sur la feuille fournie en supplément.

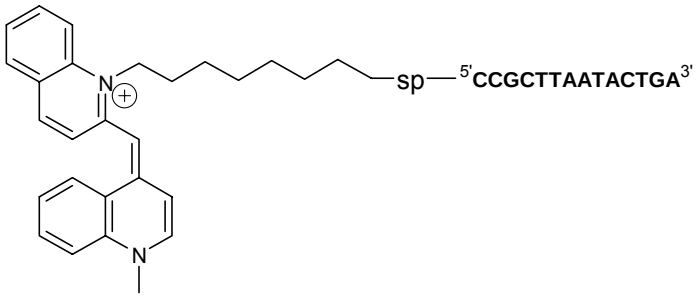


Figure 89: Exemple de structure des conjugués étudiés. Ici le conjugué **50$_{24q}$**

3.4.2. Caractérisation des conjugués marqués en position 5'

Les conjugués sont purifiés par CLHP en phase inverse, la présence de noyaux quinolines augmente le temps de rétention davantage que celle de noyaux benzothiazoles.

Marqueurs	t_R (min) [1]		SM			
	Séquence 1	Séquence 2	Séquence 1		Séquence 2	
			Th.	Exp.	Th.	Exp.
Th	11 min 28 sec	15 min 04 sec	4725,46	4725,39±1,70	4628,38	4627,74±1,19
TO	11 min 28 sec	16 min 42 sec	4719,46	4718,84±0,33	4622,38	4622,02±1,72
TO'	12 min 07 sec	-	4719,46	4718,05±0,85	-	-
***o*-TO**	11 min 22 sec	15 min 28 sec	4719,46	4719,11±0,85	4622,38	4622,84±1,04
***o*-TO'**	11 min 58 sec	15 min 36 sec	4719,46	4719,02±1,19	4622,38	4622,03±0,84
22-qq	13 min 17 sec	17 min 12 sec	4713,42	4712,72±1,12	4616,34	4616,11±0,98
24-qq	13 min 26 sec	17 min 21 sec	4713,42	4713,17±1,27	4616,34	4615,74±1,14
42-qq	12 min 53 sec	-	4713,42	4712,23±0,51	-	-
44-qq	12 min 48 sec	-	4713,42	4712,32±0,91	-	-

[1] Gradient d'acétonitrile: 16 à 40% en 30 minutes.

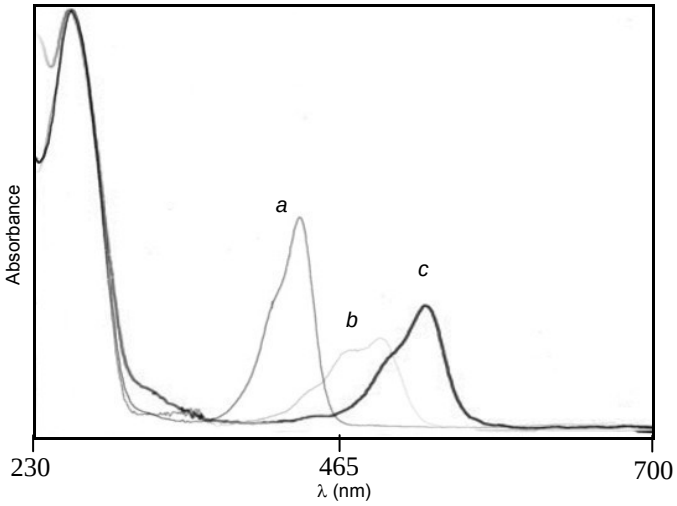
Tableau 10: Caractérisation des conjugués comportant un marqueur lié à l'extrémité 5'.

Les analyses par spectroscopie d'absorption UV-visible (Figure 90 et tableau 11) montrent que tous les conjugués présentent un spectre structuré en deux parties, l'une vers 260 nm correspondant à l'absorption des bases nucléiques et des cyanines, la seconde, dans le visible, attribuée au marqueur. Le λ_{MAX} UV des conjugués est peu différent de celui des ODNs non modifiés **30** et **31**. Par contre le λ_{MAX} en visible (des marqueurs) dépend de la composition en base de l'ODN. Après conjugaison avec les ODNs, le λ_{MAX} des chromophores est fortement déplacé vers le rouge de 5 à 12 nm (tableaux 9 et 11). Les conjugués de séquence 2 ($^{5'}$TT-) possèdent un λ_{MAX} visible décalé de 1,3 à 4,9 nm vers le bleu par rapport à ceux de la séquence 1 ($^{5'}$CC-). On a donc: λ_{MAX}(eau) < λ_{MAX}(séq. 2) < λ_{MAX}(séq.1) < λ_{MAX}(CH_2Cl_2). Cela atteste du fait que les interactions du chromophore avec les bases nucléiques des deux séquences sont différentes. Cette observation corrobore l'existence du phénomène de *back-binding* du marqueur avec sa séquence conjuguée. Les valeurs des coefficients d'extinction molaires sont déterminées comme indiqué en partie expérimentale.

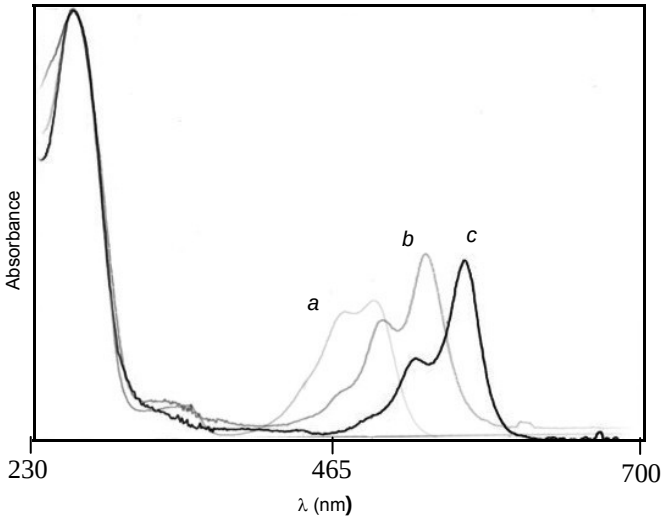
Cyanine couplée	Séquence 1 UV (nm)	Séquence 1 Vis. (nm) bande n° 1	Séquence 1 Vis. (nm) bande n° 2	Séquence 2 UV (nm)	Séquence 2 Vis. (nm) bande n° 1	Séquence 2 Vis. (nm) bande n° 2	ε_{260} [1] (×10^{-3})	ε_{Max} [2] (×10^{-3})
Sans cyanine [3]	261	-	-	269	-	-	-	-
Th	260	430,3	*ep*	268	429,0	410	15,5	79,0
TO	262	514,6	*ep*	267	511	*ep*	9,5	73,5
TO'	259	513,7	*ep*	-	-	-	36,5	51,7
***o*TO**	259	494,9	468,4	267	490	466	40,2	57,1
***o*TO'**	259	491,7	468,4	268	487,5	465,6	13,4	34,5
22q	259	527,9	493,7	266	525,0	490	2,5	56,2
24q	258	563,4	525,8	266	562	524	3,5	60,0
42q	259	562,7	525,8	-	-	-	2,3	67,0
44q	259	595,4	*ep*	-	-	-	3,2	46,0

ep : épaulement
[1] Contribution de l'absorption de la partie cyanine du conjugué à 260 nm.
[2] Au maximum d'absorption du colorant
[3] Référence: ODNs **30** ou **31**

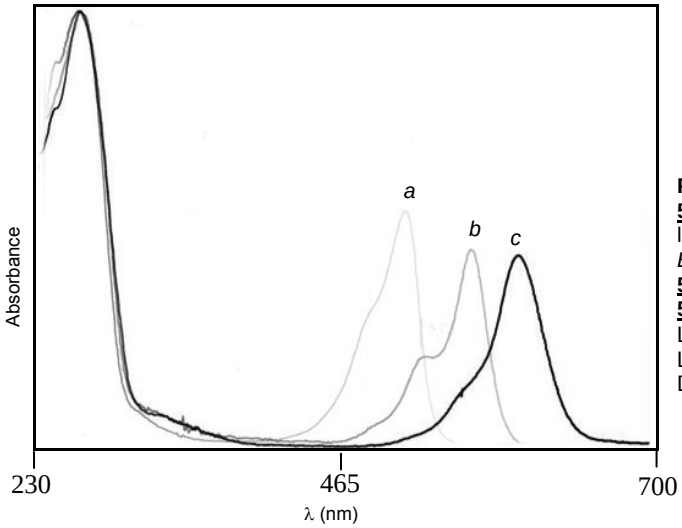
Tableau 11: Maxima d'absorption en UV et visible des conjugués



1



2



3

Figure 90: Spectres d'absorption UV-visible des conjugués **50**$_{Th}$ à **50**$_{44q}$. *Encadré 1*: spectres des conjugués dont le chromophore est lié à l'ODN *via* un motif benzothiazole (*a*: **50**$_{Th}$, *b*: **50**$_{oTO'}$ et *c*: **50**$_{TO'}$). *Encadré 2*: *idem* lié *via* le motif quinolin-2-yle (*a*: **50**$_{oTO}$, *b*: **50**$_{22q}$ et *c*: **50**$_{24q}$) et *Encadré 3*: *idem* lié *via* le motif quinolin-4-yle (*a*: **50**$_{TO}$, *b*: **50**$_{42q}$ et *c*: **50**$_{44q}$)
Les spectres sont normalisés à l'absorbance observée à λ=260 nm. Les spectres ont été enregistrés à des concentrations telles que $DO_{260} < 0,5$.

En spectrométrie d'absorption UV-visible, les intensités relatives des bandes semblent dépendantes du milieu dans lequel le spectre est enregistré. Par exemple, le spectre du conjugué **51**$_{Th}$ présente

deux bandes distinctes dans l'eau tandis que l'intensité de la première de ces bandes est nettement diminuée dans un milieu tamponné (Figure 91). L'origine de ces deux bandes étant attribuée aux deux isomères *syn* et *anti* de la cyanine [118], on peut supposer qu'un milieu à force ionique élevée déplace l'équilibre *syn*⇆*anti* ou que le "*back binding"* de la cyanine Th avec l'ODN est davantage favorisé avec l'isomère *syn*.

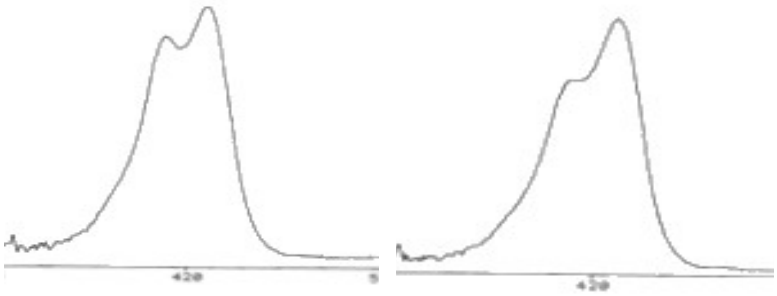


Figure 91: Partie visible du spectre UV du conjugué **51**$_{Th}$ dans l'eau (*à gauche*) et dans le tampon cacodylate 10mM, NaCl 100mM, pH=7 (*à droite*) .

3.4.3. Couplage des cyanines en position internucléotidique des ODNs

3.4.3.1 Choix du modèle

Les études précédemment menées sur des conjugués pentadéca-2'-désoxyriboadénylates, eicosa-α-thymidylates et eicosa-β-thymidylates porteurs du thiazole orange lié en position internucléotidique [123,124] ont montré que ceux-ci, en présence de cible, présentent une forte augmentation de fluorescence. Le colorant étant au voisinage des paires A/T dans ces expériences, nous avons choisi, comme site d'ancrage des marqueurs, le groupe phosphate ApA de la séquence 1 (§ B.3.1.)
Dans le cas de conjugués ODNs-acridine [142,143] il a été montré que la meilleure stabilisation est obtenue lorsque la molécule intercalante est fixée sur un phosphate internucléotidique. Dans ce cas, la taille du bras de liaison utilisé pour relier l'intercalant à l'ODN (11 atomes) doit être supérieure à celle qui permet une stabilisation maximale (6 atomes) lorsque l'intercalant est lié à l'extrémité 5'. Nous avons donc choisi un bras de liaison à 11 atomes, plus long que celui utilisé pour lier les cyanines à l'extrémité 5' (8 atomes). Nous avons choisi de lier les quatre cyanines **33**, **35**, **39** et **41** comportant les motifs benzothiazole et quinolin-4-yle (c'est à dire les systèmes de type Th, TO, TO' et 44q) à l'ODN par le moyen d'un couplage thiol / iodure d'alkyle. La fonction thiol a été introduite en position internucléotidique sous la forme protégée d'un disulfure par le couplage de la cystamine (2,2'-diaminoéthyldisulfure) sur un H-phosphonate internucléotidique. La fonction disulfure de la cystamine résiste en effet aux différentes conditions d'assemblage et de déprotection de l'ODN et peut être coupée en traîtant l'ODN par un réducteur, tel le TCEP [33], libérant ainsi la fonction thiol. Nous présenterons en premier lieu la synthèse de l'ODN comportant la fonction disulfure puis celle des conjugués.

3.4.3.2. Préparation de l'ODN comportant la fonction thiol protégée.

L'incorporation du bras cystamine acétylé a été réalisée comme suit (Figure 92): après élongation sur synthétiseur de la séquence d$^{5'}$TACTGA$^{3'}$ protégée, le dérivé H-phosphonate de la 2'-

desoxyriboadénosine a été couplé manuellement après activation par le chlorure de pivaloyle. Le groupe H-phosphonate internucléotidique est alors activé par le CCl_4 pour permettre l'attaque nucléophile du groupe amino de la cystamine [32]. Le second groupe amine est acétylé par Ac_2O en présence de DMAP. L'assemblage de la séquence est terminée par $d^{5'}CCGCTT^{3'}$, on obtient donc des oligonucléotides modifiés $d^{5'}CCGCTTAp^{*}ATACTGA^{3'}$ dont l'un des phosphates *p** a été remplacé par un phosphoramidate lié à un bras cystamine acétylé en mélange avec des séquences tronquées ou n'ayant pas réagies (Figure 93).

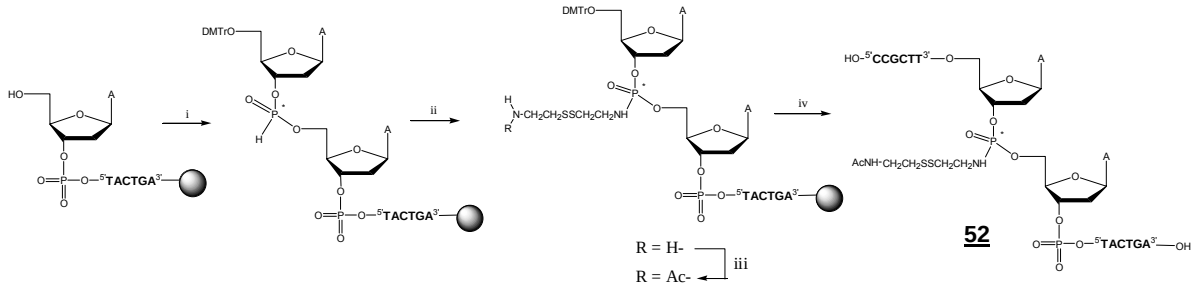


Figure 92: Synthèse de l'ODN comportant un bras cystamine acétylé en position internucléotidique **52**.
i) 5'-*O*-diméthoxytrityle, 3'-*O*-H-phosphonate, *N*-benzoyle-2'-désoxyadénosine, $(CH_3)_3CCOCl$, C_5H_5N, CH_3CN; ii) CCl_4, $H_2NCH_2CH_2SSCH_2CH_2NH_2$, C_5H_5N; iii) Ac_2O; DMAP; C_5H_5N, THF; iv) Elongation de la chaîne; NH_4OH 16h., 50°C.

L'oligonucléotide est décroché du support et déprotégé par l'action de l'ammoniaque concentrée à 55°C pendant 8 heures. Le mélange réactionnel est analysé par CLHP en phase inverse.

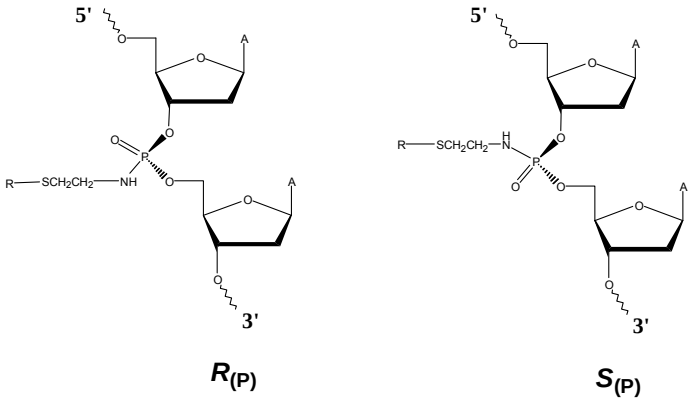


Figure 93: Structure des deux isomères d'un ODN comportant un marqueur en position internucléotidique

Comme attendu, on observe la présence de deux pics majoritaires d'intensités voisines qui correspondent aux deux ODNs isomères **52**$_{(R)}$ et **52**$_{(S)}$ (Figure 93) comportant un phosphore chiral.

Après évaporation de l'ammoniaque et purification partielle des mélanges d'ODNs (extraction et purification sur colonne d'exclusion stérique), le mélange réactionnel est filtré et les deux isomères sont purifiés par CLHP en phase inverse (Figure 94, encadré 2, chromatogrammes *a* et *b)*.

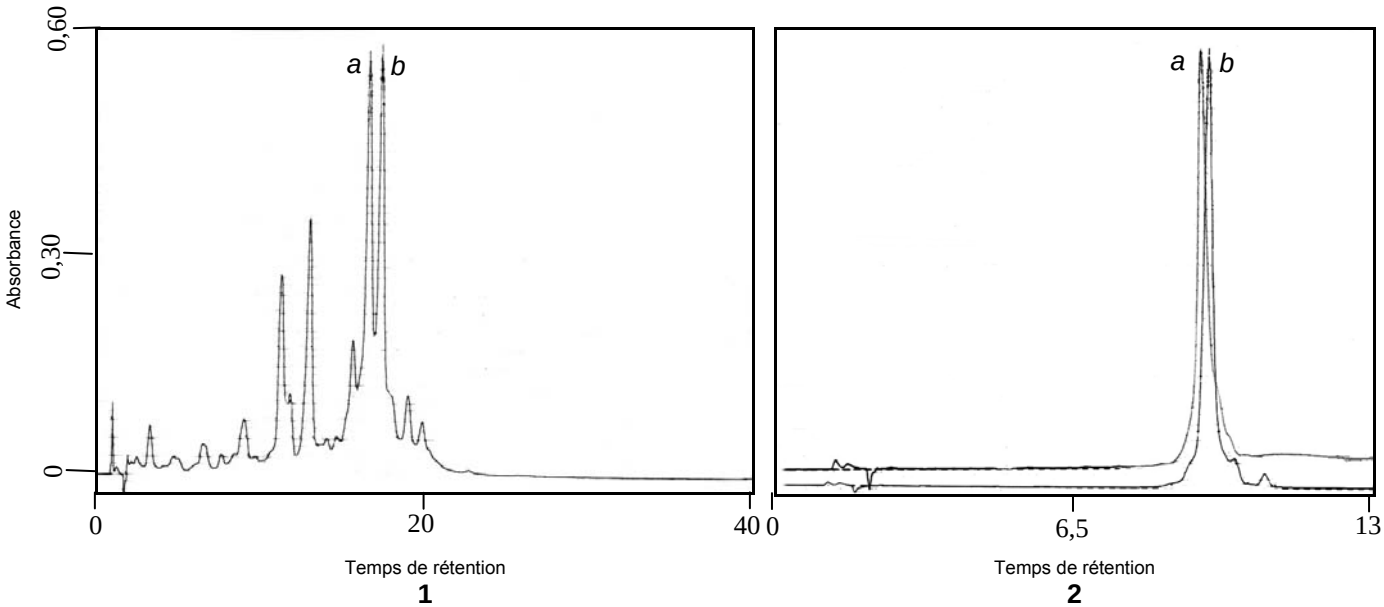


Figure 94: Profils chromatographiques du mélange brut obtenu après déprotection de l'ODN **52**$_{(R+P)}$ (*encadré 1*) et des isomères purifiés **52**$_{(R)}$ (*encadré 2, pic a)* et **52**$_{(S)}$ *(encadré 2, pic b)* obtenus sur colonne en phase inverse.
Gradient d'acétonitrile: 8% à 24% en 40 minutes *(encadré 1)*
Gradient d'acétonitrile: 9,6% à 20% en 13 minutes *(encadré 2, chromatogrammes* a *et* b*)*.

3.4.3.3. Détermination de la stéréochimie des deux isomères

Une méthode précédemment appliquée [128] a été utilisée afin d'assigner la configuration de chacun des deux isomères. Après digestion enzymatique par des nucléases de chacun des deux isomères portant le bras cystamine acétylé, il a été démontré que l'ODN portant le bras cystamine acétylé élué le premier est celui de configuration $R_{(P)}$ (ODN **52**$_{(S)}$), tandis que le second correspond à l'isomère $S_{(P)}$ (ODN **52**$_{(S)}$).

3.4.3.4. Couplage des cyanines aux ODNs **52**$_{(R)}$ et **52**$_{(S)}$

L'oligonucléotide **52** est solubilisé dans un tampon 1% de bicarbonate de sodium et pH=9, (une trop forte concentration en sels peut entraîner la précipitation des ODNs, tandis que le pH de la solution influence la cinétique d'hydrolyse des iodures d'alkyles, la déprotonation des thiols, l'oxydation des thiols en disulfure). De même le contrôle du rapport eau / DMF permet d'éviter, soit la précipitation de l'ODN, soit celle des marqueurs le plus souvent peu hydrosolubles, notamment les quinocyanines. Le TCEP, est ajouté dans le milieu. La réduction de la liaison SS conduit à la formation d'ODNs **53** comportant en position internucléotidique, et aux conditions de pH employées, une fonction thiolate. Le marqueur **33**, **35**, **39** ou **41** est ajouté en excès en solution dans le DMF (Figure 95).

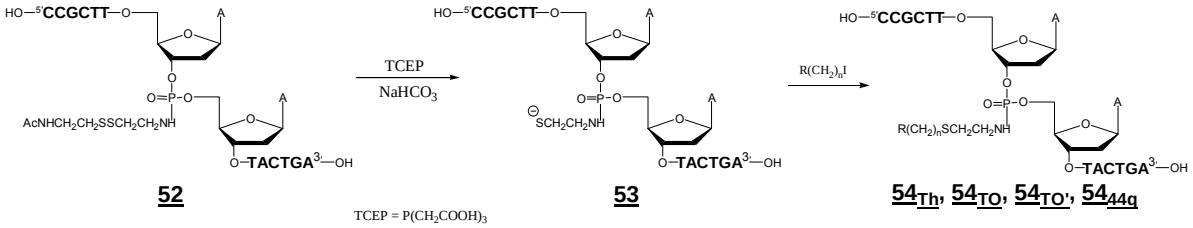


Figure 95: Couplage du marqueur en position internucléotidique par la méthode thiol/iodoalkyle

Les conjugués **54** obtenus ont été purifiés par CLHP en phase inverse (Figure 96). Du fait de la présence des marqueurs, l'élution des conjugués est retardée par rapport à celles des ODNs cystamines **52**, des ODNs thiols **53** et des ODNs dimérisés par formation de ponts disulfures. Les rendements varient entre 8 et 35%

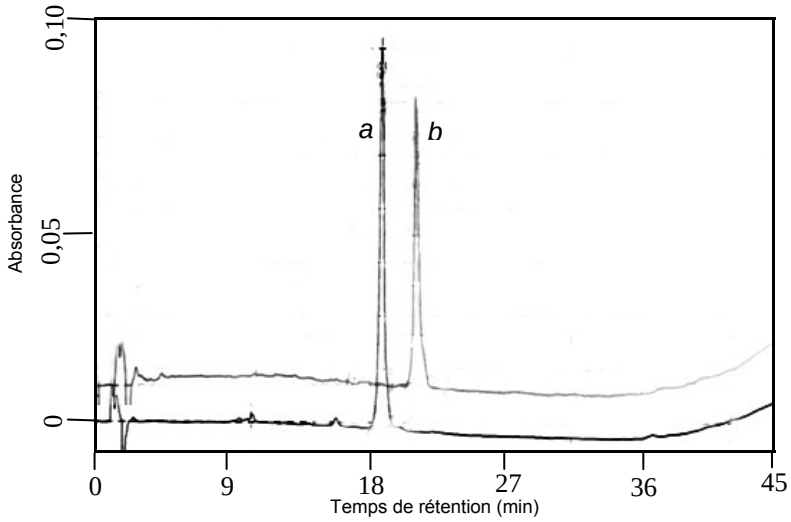


Figure 96: Profils chromatographiques des deux isomères purifiés du conjugué internucléotidique obtenu après réaction de **52**$_{(R)}$ et **52**$_{(S)}$ avec la cyanine **33** (Th). *a*: Isomère $R_{(P)}$ (ODN **54**$_{Th(R)}$) et *b*: Isomère $S_{(P)}$ (ODN **54**$_{Th(S)}$).
Gradient d'acétonitrile: 8% à 28% en 25 minutes puis de 28% à 64% en 20 minutes.

Les analyses CLHP confirment que l'attachement covalent aux diverses cyanines ne modifie pas l'ordre d'élution de chacun des deux isomères des conjugués.

3.4.4. Caractérisation des conjugués marqués en position internucléotidique

Les caractéristiques des quatre paires d'isomères de conjugués portant une cyanine en position internucléotidiques **54**$_{Th(R)}$/**54**$_{Th(S)}$, **54**$_{TO(R)}$/**54**$_{TO(S)}$, **54**$_{TO'(R)}$/**54**$_{TO'(S)}$ et **54**$_{44q(R)}$/**54**$_{44q(S)}$ sont reportées dans le tableau 12. Les caractéristiques de leurs spectres UV-visible, ainsi que les propriétés de fluorescence, discutées ci-dessous, seront portées respectivement dans les tableaux 14 et 16.

ODN	Isomère	t_R (min) [2]	SM Th.	SM Exp. [3]
52 [1]	$R_{(P)}$	10 min 54 sec	4399,02	*n.d*
	$S_{(P)}$	11 min 45 sec	4399,02	4398,64
54$_{Th}$	$R_{(P)}$	18 min 09 sec	4689,02	4703,93
	$S_{(P)}$	20 min 03 sec	4689,57	4687,92
54$_{TO}$	$R_{(P)}$	16 min 40 sec	4683,55	4699,26
	$S_{(P)}$	19 min 18 sec	4683,55	4698,56
54$_{TO'}$	$R_{(P)}$	17 min 19 sec	4683,55	4698,48
	$S_{(P)}$	21 min 18 sec	4683,55	4696,32
54$_{44q}$	$R_{(P)}$	18 min 22 sec	4677,53	4676,95
	$S_{(P)}$	21 min 43 sec	4677,43	4676,67

[1] Référence
[2] Gradient d'acétonitrile: 8% à 28% en 25 minutes.
[3] Certains échantillons présentent des pics de masse supérieure de 14 à 16 à celle attendue sans qu'une explication ait pu être fournie

Tableau 12: Caractérisation des conjugués comportant un marqueur lié *via* une liaison phosphoramidate internucléotidique.

3.5 Etudes des propriétés des conjugués synthétisés

3.5.1. Coefficients d'extinction molaire

Pour les conjugués **54**, les valeurs de ε utilisés sont les mêmes que celles déterminées pour les conjugués de même séquence comportant les cyanines en position 5' (**50_{Th}** à **50_{44q}**) et indiquées en tableau 11.

3.5.2 Etude de la stabilité des duplex par spectroscopie d'absorption

3.5.2.1 Conjugués marqués en position 5'

Tous les duplex formés par hybridation des conjugués synthétisés et de leur cible 27-mère **32** présentent une température de demi-dissociation supérieure à celle des duplex de référence (**30•32** et **31•32**). Ce gain de stabilité varie de +4°C à +10,5°C pour les conjugués de la séquence 1 et de +4 à +6,5°C pour ceux de la séquence 2. Le thiazole orange (TO), seule cyanine de la série à avoir déjà été liée de manière covalente aux ODNs, est l'un des moins bons stabilisants (ODN **50_{TO}**).

Marqueur	Séq.	T_m (°C)	Δ_{Tm} (°C)
-	**50**	43,5	-
	51	51,5	-
Th	**50**	51,2	+7,7
	51	57	+5,5
TO	**50**	48	+ 4,5
	51	55,5	+4
TO'	**50**	51	+7,5
	51		
*o*TO	**50**	54	+ 10,5
	51	58	+6,5
*o*TO'	**50**	50,5	+7
	51	56	+4,5
22q	**50**	53	+9,5
	51	56,5	+5
24q	**50**	52	+8,5
	51	57	+5,5
42q	**50**	49	+5,5
	51		
44q	**50**	47,5	+ 4
	51		

Tableau 13: Températures de fusions des duplex
Les Tm sont determinés avec des concentrations 1µM en duplex dans le tampon cacodylate 10mM, pH=7 contenant 100mM de NaCl qui sera noté "tampon cacodylate" pour la suite de la présentation des résultats.

Plusieurs observations peuvent être faites. Premièrement, le classement des cyanines selon le gain de stabilité qu'elles confèrent au duplex est similaire dans les deux séries.

L'*o*-TO est le meilleur dans les deux cas (ODN **50_{oTO}** et **51_{oTO}**), et le TO le moins bon parmi les six colorants couplés sur les deux séquences (ODN **50_{TO}** et **51_{TO}**). Entre les deux, les autres cyanines s'échelonnent selon un ordre conservé.

Deuxièmement, les augmentations de températures de fusion des duplex (Δ_{Tm}) sont sensibles aux variations structurales des colorants, puisque des modifications mineures de la géométrie des cyanines entraînent de fortes disparité de Δ_{Tm} . Ainsi les paires **50$_{TO}$ / 50$_{oTO}$, 51$_{TO}$ / 51$_{oTO}$** et **50$_{24q}$ / 50$_{44q}$** ne diffèrent que par la position de substitution du noyau quinoline portant le bras octaméthylène.

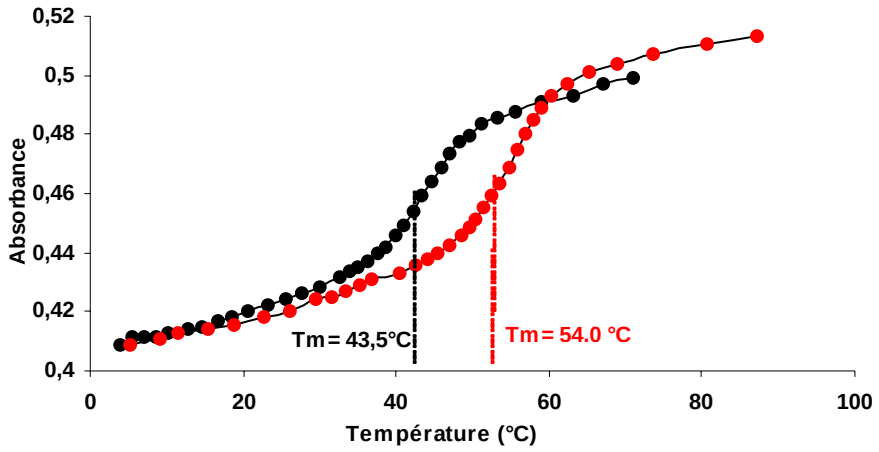


Figure 97: Courbe de fusion du duplex de référence **30** (points noirs) et du conjugué **50$_{oTO}$**. (points rouges) en présence de cible **32** à 1µM dans le "tampon cacodylate". Courbes normalisées à l'absorbance mesurée à 5°C.

Cependant, les valeurs de T_m observées diffèrent de 5~6°C entre chacune des paires de conjugués. Cela conduit à une troisième observation qui consiste à établir une corrélation entre la structure des cyanines et le Δ_{Tm} obtenu du duplex. Les trois cyanines qui apportent la plus grande stabilisation, oTO (Figure 97), 22q et 24q, comportent le motif quinolin-2-yle comme hétérocycle porteur du bras de liaison, les trois intermédiaires (Th, TO' et oTO') le motif benzothiazol-2-yle et les trois qui stabilisent le moins (TO, 42q et 44q) le noyau quinolin-4-yle. Les critères de densité électronique ou de forces d'empilement $\pi-\pi$ ne peuvent qu'être difficilement pris en compte car les cyanines du premier et troisième groupe mentionnées ci-dessus présentent le même noyau (quinolinique) substitué par les mêmes groupes hétérocycliques, seule la position diffère. Un paramètre plus important semble être l'orientation relative des deux résidus hétérocycliques l'un par rapport à l'autre. Lorsque l'on considère les trois types d'hétérocycles, les liaisons azote-bras de liaison d'une part et carbone-méthine d'autre part forment des angles dièdres de 60° pour le premier groupe, 72° pour le second et 180° pour le dernier (Figure 98). Il existe donc un parallèle entre l'angle de cette liaison et la stabilité observée. On peut postuler que l'interaction du second hétérocycle avec le double brin est favorisée par un angle dièdre plus aigü tandis qu'un angle dièdre obtus l'éloigne davantage du duplex et diminue ainsi les possibilités d'interaction.

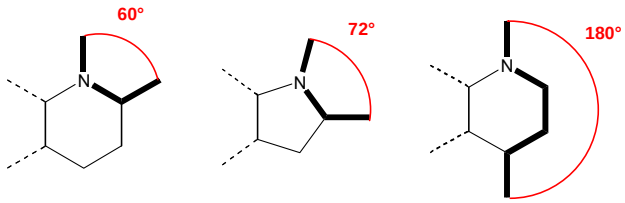


Figure 98: Comparaison des angles formés entre les liaisons N-$(CH_2)_8$ et C-(CH=) des composés comportant un motif quinolin-2-yle (*gauche*), benzothiazol-2-yle (*milieu*) et quinolin-4-yle (*droite*).

3.5.2.2. Conjugués marqués en position internucléotidique

Les quatre cyanines retenues **33**, **35**, **39** et **41** pour le couplage en position internucléotidique sont constituées de toutes les combinaisons possibles qu'on puisse former avec les motifs quinolin-4-yle et benzothiazol-2-yle, c'est à dire les systèmes hétérocycliques de type Th, TO, TO' et 44q. L'isomérie du phosphore conduit à l'existence de quatre paires de conjugués différents dont les propriétés de stabilisation sont portées dans le tableau 14.

ODN	Isomère	T_m (°C)	Δ_{Tm} (°C)
54$_{Th}$	$R_{(P)}$	44,5	+ 1
	$S_{(P)}$	46,5	+ 3
54$_{TO}$	$R_{(P)}$	47,5	+ 4
	$S_{(P)}$	45	+ 1,5
54$_{TO'}$	$R_{(P)}$	44	+ 0,5
	$S_{(P)}$	50	+ 6,5
54$_{44q}$	$R_{(P)}$	*47,5*	*+ 4*
	$S_{(P)}$	43,5	0

Tableau 14: Températures de fusion des duplex

On peut noter que, pour chaque colorant, une différence de stabilisation allant de 2 à 6°C est observée pour chacun des deux isomères. De manière similaire avec ce qui est observé avec les conjugués comportant des cyanines en position 5', la nature de l'hétérocycle lié à l'ODN semble être le paramètre important. En effet, les conjugués dont le marqueur est lié à l'ODN par le noyau benzothiazole (**54**$_{Th}$ et **54**$_{TO'}$) forment des duplex plus stables lorsqu'ils sont d'isomérie $S_{(P)}$ (c'est à dire les ODNs **54**$_{Th(S)}$ et **54**$_{TO'(S)}$) à l'inverse, ceux liés par une quinoline (**54**$_{TO}$ et **54**$_{44q}$) forment des hybrides plus stables lorsqu'ils sont d'isomérie $R_{(P)}$) (c'est à dire les ODNs **54**$_{TO(R)}$ et **54**$_{44q(R)}$). Le cas le plus marquant est le couple de conjugués **54**$_{TO(R+S)}$ et **54**$_{TO'(R+S)}$ pour lesquels le marqueur est le même: les considérations de polarisabilité ou de lipophilie, par exemple, ne peuvent pas être mises en cause. On peut supposer que le groupe quinoline, lorsqu'il est lié au bras de liaison (cas des ODNs **54**$_{TO(R+S)}$ et **54**$_{44q(R+S)}$) stabilise plus fortement les duplex en se logeant dans le petit sillon, vers lequel l'isomérie $R_{(P)}$ le dirige et que, inversement, les conjugués internucléotidiques liés par un benzothiazole, tels les couples **54**$_{Th(R+S)}$ et **54**$_{TO'(R+S)}$ stabilisent davantage les duplex par des interactions avec le grand sillon plutôt que le petit.

3.5.3. Modification spectrales au cours de l'hybridation

3.5.3.1 En spectroscopie d'absorption UV-visible

En présence d'un équivalent de séquence complémentaire, on observe de légères modifications spectrales pour l'ensemble des colorants: un léger hypochromisme de l'ordre de 10%, ainsi que, dans certains cas, un déplacement du maximum d'absorption vers le bleu.

	Séquence 1 [1]						Séquence 2 [1]				
	λ_{Max} (libre) (nm)		λ_{Max} (Hyb) (nm)		Modifications spectrales [3]		λ_{Max} (libre) (nm)		λ_{Max} (Hyb) (nm)		Modifications spectrales [3]
	Numérotation des bandes UV [2]						Numérotation des bandes UV [2]				
	1	2	1	2			1	2	1	2	
50$_{Th}$	430,3	*~410*	429,1	*~410*	1: -13 %	**51**$_{Th}$	429,0	410	428,8	410,0	1: +14%
50$_{TO}$	514,6	*~485*	510,7	*~485*	1: -13 %	**51**$_{TO}$	511	*~485*	511	*~485*	-
50$_{TO'}$	513,7	*~485*	512,2	*~485*	1: -13 % 2: -12%	**51**$_{TO'}$	-	-	-	-	-
50$_{oTO}$	494,9	468,4	492,2	468,4	1: -8%	**51**$_{oTO}$	490	466	490,0	466	1: +15%
50$_{oTO'}$	491,7	468,4	491,7	468,4	1: -19 % 2: -12%	**51**$_{oTO'}$	487,5	465,6	488,0	465,6	1: +10%
50$_{22q}$	527,9	493,7	526,0	490,6	1: - 6 % 2: - 8%	**51**$_{22q}$	525,0	490	524,5	491	1: +5%
50$_{24q}$	563,4	525,8	563,4	523,3	1: -10 % 2: +6%	**51**$_{24q}$	562	524	561,4	523,5	1 : -10% 2 : -6%
50$_{42q}$	562,7	525,8	562,7	525,8	1: -15 % 2: +2%	**51**$_{42q}$	-	-	-	-	-
50$_{44q}$	595,4	*~560*	590,1	*~560*	1: -50 %	**51**$_{44q}$	-	-	-	-	-

[1] Voir séquence au § B.3.1.
[2] La bande 1 fait référence au pic de plus forte intensité, la bande 2 à l'épaulement situé à plus faible longueur d'onde et d'intensité inférieure.
[3] Les chiffres "1" et "2" font référence à la numérotation des bandes comme expliqué en référence [2].

Tableau 15: Variations spectrales des chromophores des conjugués marqués en position 5' au cours de l'hybridation

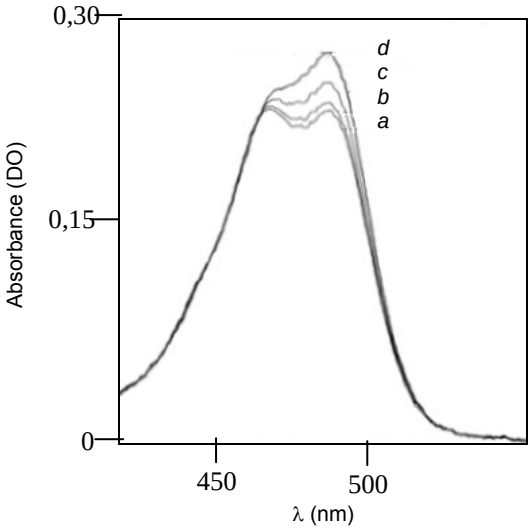


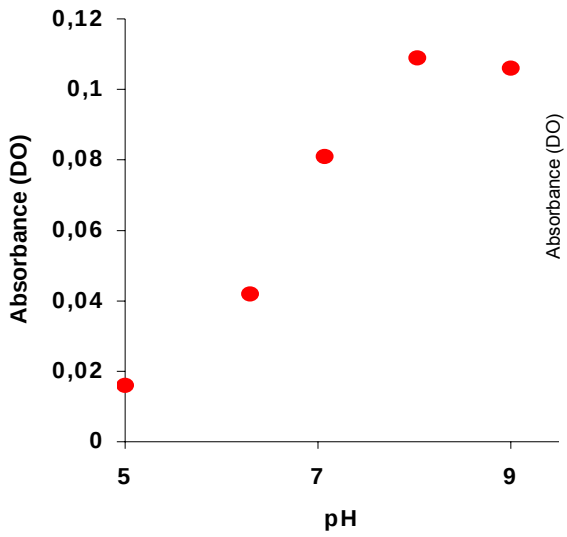
Figure 99: *à gauche:* Partie visible du spectre d'absorption du duplex **51**$_{oTO}$•**32** en fonction de la température (*a*: 29,7°C; *b*: 33,9°C, *c*: 36,7 °C, *d*: 40,2°C). Tm=58°C).

On peut noter, par exemple, la diminution de l'intensité de la bande principale du conjugué **51**$_{oTO}$ au cours de l'hybridation, tandis que l'intensité de la bande secondaire reste constante (Figure 99).

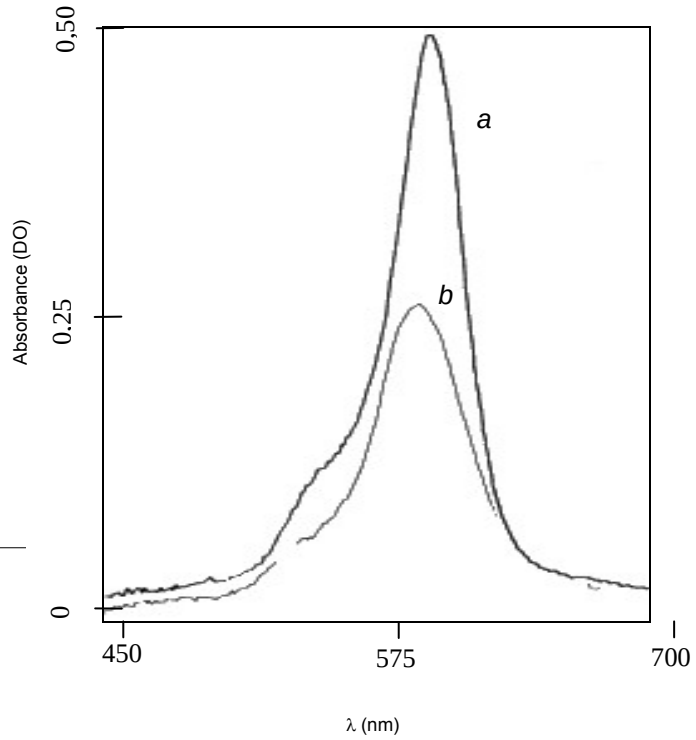
Une exception notable concerne le conjugué **50**$_{44q}$, de couleur bleue intense. Le déplacement vers le bleu est légèrement plus marqué (5,3 nm) mais, surtout, associé à un fort hypochromisme.

Les quinocyanines présentent des pKa proches du pH physiologique [113]. Nous avons constaté ce phénomène avec l'ODN **50**$_{44q}$ qui comporte une acidité dont le pKa est voisin de 8. Tout comme dans le cas du le TO, l'azote endocyclique tertiaire est susceptible d'être protoné et de

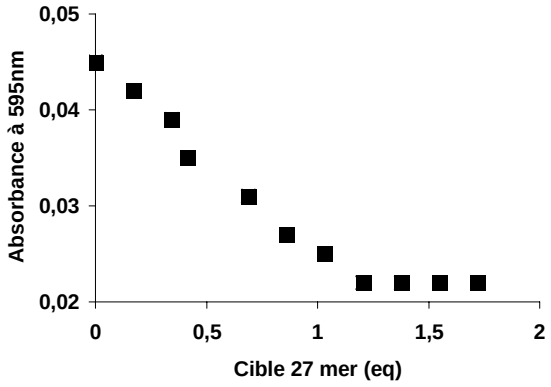
conduire à une décoloration de la solution à pH acide (Figure 100, encadré 1), aussi toutes les mesures sont-elles effectuées dans des solutions tamponnées.



1



2



3

Figures 100: *(Encadré 1)* Absorbance d'une solution de conjugué **50**$_{44q}$ en fonction du pH.
(Encadré 2) Partie du spectre d'absorption en visible du conjugué **54**$_{44q(S)}$. Courbe *a*: seul, courbe *b*: hybridé; (1µM, Tampon cacodylate; cible 1,05µM).
(Encadré 3) Evolution de l'absorbance à 595 nm du conjugué **50**$_{44q}$ en fonction de l'ajout en cible **32**. Mesures effectuées à 5°C dans le tampon cacodylate. Concentration en ODN: 1µM par brin

L' hypochromisme constaté est voisin de 50% aussi bien dans le cas où la cyanine est greffée en position internucléotidique (ODNs **54**$_{44q(R)}$ et **54**$_{44q(S)}$; Figure 100, encadré 2) que dans le cas du greffage en position 5'-terminale (ODN **50**$_{44q}$; Figure 100, encadré 3).

On peut supposer qu'un changement local de pH lors de l'hybridation du aux pK_a différents des bases qui s'hybrident à la sonde est responsable de cet hypochromisme. Une seconde possibilité est la formation d'une liaison hydrogène entre le doublet d'électrons de l'azote non chargé de la cyanine et un proton du duplex qui se traduirait par une délocalisation moindre du doublet et donc, tout comme dans le cas de la protonation, d'une coloration moins intense.

Dans le cas des conjugués marqués en position internucléotidique, on peut remarquer le léger déplacement vers le bleu des λ_{Max} des spectres des conjugués d'isomérie $R_{(P)}$ par rapport à ceux

d'isomérie $S_{(P)}$ et, de manière plus générale, de ceux des conjugués porteurs des marqueurs en position internucléotidiques par rapports aux conjugués marqués en 5'. Enfin on peut remarquer les λ_{Max} différents des conjugués contenant des cyanines TO et TO' (ODNs: **50**$_{TO}$ et **50**$_{TO'}$, **54**$_{TO(R)}$ et **54**$_{TO'(R)}$ ainsi que le couple **54**$_{TO(S)}$ et **54**$_{TO'(S)}$) comportant pourtant le même chromophore, ce qui laisse supposer qu'ils interagissent de manière différente avec la séquence selon la position par laquelle ils lui sont liés. Enfin, de manière analogue à ce qui a été constaté avec les conjugués marqués en 5', l'hybridation avec la cible **32** conduit à un léger hypochromisme (de – 7% à – 20%) plus accentué dans le cas des conjugués **54**$_{44q(R)}$ et **54**$_{44q(S)}$ (- 44%).

ODN	Isomère		λ_{Max} Libre		λ_{Max} Hybridé	Variation d'intensité [1]
52 (Ref.)	$R_{(P)}$		260		-	-
		$S_{(P)}$	260		-	-
54$_{Th}$	$R_{(P)}$		261	430	428	- 11%
		$S_{(P)}$	261	430	430	- 19%
54$_{TO}$	$R_{(P)}$		261	512	507	- 7%
		$S_{(P)}$	261	514	509	- 20%
54$_{TO'}$	$R_{(P)}$		259	512	511	- 18%
		$S_{(P)}$	258	512	511	- 8 %
54$_{44q}$	$R_{(P)}$		258	595	588	- *21%*
		$S_{(P)}$	258	595	594	- 44 %

[1] Du λ_{MAX} de la bande principale du domaine visible après ajout de la séquence complémentaire à 6°C.

Tableau 16: Caractéristiques UV-visible des conjugués internucléotidiques

3.5.3.2. En fluorescence

3.5.3.2.1 Sondes non hybridées

Comme cela a été remarqué par Svanvik [121], la fluorescence des sondes comportant des cyanines diminue fortement avec l'augmentation de température suite à la rotation plus importante de la liaison méthine. Cela est également observé dans le cas des conjugués marqués en position internucléotidique (Figure 101). De ce fait, les études de fluorescence sont effectuées à basse température.

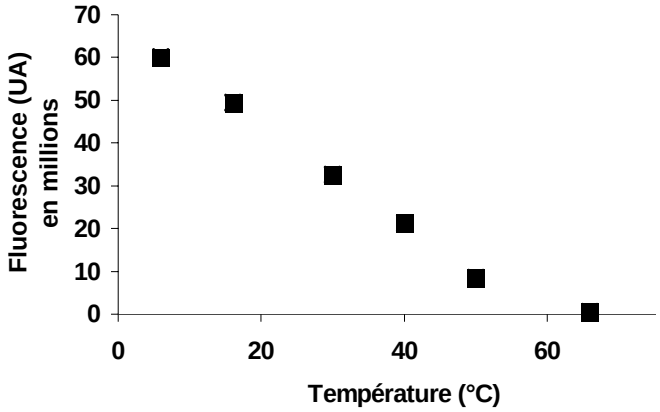


Figure 101: Variation de la fluorescence de l'hybride **54**$_{TO(R)}$•**32** en fonction de la température. λ_{em}=530 nm.

Les études par spectroscopie de fluorescence des différents conjugués marqués en position 5' (tableau 17) et internucléotidiques (tableau 18) sont reportées ci-après. La fluorescence des

sondes non hybridées varie d'un facteur 350 selon la nature de la cyanine monométhine qui lui est liée. En effet, de manière générale, la présence d'un noyau benzothiazole dans la structure du colorant s'assortit d'une fluorescence élevée de la sonde, tandis que les noyaux quinolines sont constitutifs de conjugués peu fluorescents. Les conjugués de la thiocyanine (deux benzothiazoles) **50**$_{Th}$, **51**$_{Th}$, **54**$_{Th(R)}$ et **54**$_{Th(S)}$ sont les plus fluorescents des séries étudiées avec des fluorescences relatives allant de 41,9 à 71,4 selon le mode de fonctionnalisation. A l'opposé, les sondes quinocyanines **50**$_{22q}$, **50**$_{24q}$, **50**$_{42q}$, **50**$_{44q}$, **51**$_{22q}$, **51**$_{24q}$, **54**$_{44q(R)}$ et **54**$_{44q(S)}$ sont peu fluorescentes (fluorescence comprise entre 0,2 à 13,4). Entre les deux, les sondes comportants des colorants de type TO et *o*-TO (un benzothiazole + un quinoline) présentent des fluorescences intermédiaires s'échelonnant entre 3,8 à 51,2. Ces paramètres sont importants pour la conception de sondes fluorescentes. En effet, il ne suffit pas que l'intensité de leur signal fluorescent augmentent fortement au cours de l'hybridation. Il est également nécessaire que la fluorescence observée soit suffisamment élevée pour se distinguer du bruit de fond et ainsi lever des ambiguités sur l'interprétation du résultat. Une autre caractéristique est le déplacement de Stockes (DS) du colorant, c'est à dire la différence entre la longueur d'onde du maximum d'émission de fluorescence de la sonde et celle du maximum d'absorption en visible. Plus ce déplacement est élevé, plus le résultat observé pourra être distingué d'artefacts de lecture. Même si les déplacements observés restent modestes, une corrélation similaire à celle effectuée précédemment peut être établie entre la structure de la cyanine et le DS. La thiocyanine présente le DS le plus élevé (22 à 32 nm selon les séquences et le mode d'ancrage à la séquence), tandis que les quinocyanines présentent un DS faible (de 7 à 19 nm) et les autres colorants, comme précémment, affichent des valeurs intermédiaires (de 13 à 30 nm).

Séq.	Fluorescence							
	λ_{Max} [1] (nm)			λ Em_{Max} Hybride (nm)	Intensité			
	Exc.	Em.	Δ_{Stokes}		Lib. [2]	Hyb. [2]	Ratio Hyb/Lib	Ratio CC/TT [3]
50$_{Th}$	431	453	22	455	59,1	28,5	0,48	1,41
51Th	430	462	32	466	41,9	26,9	0,64	
50$_{TO}$	516	529	13	529	23,2	8,7	0,39	0,62
51$_{TO}$	513	528	15	528	37,6	27,0	0,72	
50$_{TO'}$	517	532	15	530	8,8	7,1	0,82	-
	-	-	-	-	-	-	-	
50$_{oTO}$	497	521	24	523	13,7	5,6	0,41	1,73
51$_{oTO}$	494	524	30	528	7,9	4,2	0,53	
50$_{oTO'}$	493	523	30	nd	6,6	1,8	0,28	1,74
51$_{oTO'}$	492	nd	nd	nd	3,8	2,5	0,64	
50$_{22q}$	525	nd	nd	nd	0,48	0,45	0,93	-
	-	-	-	-	-	-	-	
50$_{24q}$	562	569	7	570	1,6	1,2	0,75	0,30
51$_{24q}$	563	573	10	573	5,4	4,3	0,80	
50$_{42q}$	560	570	10	571	2,1	0,8	0,39	-
	-	-	-	-	-	-	-	
50$_{44q}$	595	610	15	608	1,2	0,6	0,53	-
	-	-		-	-	-	-	

nd: non déterminé, le spectre présente une bande principale trop large pour pouvoir en déterminer précisément le maximum.
[1] De la sonde libre
[2] Unités arbitraires (en million)
[3] Rapport entre les fluorescences des sondes libres CC terminale (seq 1) et TT terminale (seq 2)

Tableau 17: Propriétés de fluorescence des conjugués 5'

La comparaison des spectres de fluorescence des sondes libres comportant une séquence $^{5'}$TT terminale (séquence 1: **50$_{Th}$** à **50$_{44q}$**) et $^{5'}$CC-terminales (sequence 2: **51$_{Th}$** à **51$_{24q}$**) montre que les maxima des sondes $^{5'}$TT terminales **50$_{Th}$**-**50$_{44q}$** sont généralement déplacés vers le rouge comparés à ceux des sondes $^{5'}$CC terminales **51$_{Th}$**-**51$_{24q}$**. Par contre on ne note pas de correlations avec l'intensité de fluorescence puisque le rapport de fluorescence entre des conjugués comportant le même marqueur mais ayant des séquences différentes varie de 0,30 à 1,74.

La comparaison des spectres de fluorescence des trois paires de conjugués suivantes: **50$_{TO}$** / **50$_{TO'}$**, **50$_{oTO}$** / **50$_{oTO'}$** et **50$_{24q}$** / **50$_{42q}$** (qui contiennent chacune le même chromophore, la seule distinction étant la position du bras d'ancrage qui les lie au squelette phosphate/ribose), montre des différences très importantes entre chacun des membres de ces paires allant d'un facteur 1,3 à 2,6. Pour la paire *o*-TO / *o*-TO', le rapport obtenu (2,08) est identique à celui observé pour la paire d'ODNs de séquence 2: **51$_{oTO}$** / **51$_{oTO'}$**.

Chaque paramètre structural exerce une influence sur les propriétés de fluorescence. Ainsi, les conjugués marqués en position internucléotidique présentent un maximum d'émission supérieur de 2 à 5 nm à celui des conjugués marqués en 5'. De plus les conjugués internucléotidiques présentent des intensités de fluorescence supérieures à celles des conjugués marqués en 5', particulièrement dans le cas du composé **54$_{44q(R)}$** (10 fois plus fluorescent) et les DS observés sont supérieurs de 2 à 6 nm. Enfin, les isomères $R_{(P)}$ sont davantage fluorescents que les $S_{(P)}$, de 25 à 46%.

ODN	Isomère	Fluorescence [a]								Fluorescence comparée des isomères[h]
		λ Max (libre) (nm)				Intensité [b]		Ratio[f]		
		Exc.	Em.	$\Delta_{Stockes}$	Hyb. (Em.)	Libre	Hyb[c].	A[d]	B[e]	
54$_{Th}$	$R_{(P)}$	430	458	28	461	57,6	72,0	1,26	1,24	1,25
	$S_{(P)}$	431	456	25	447	71,4	75,6	1,06	1,17	
54$_{TO}$	$R_{(P)}$	513	531	18	521	32,7	65,0	1,98	2,60	1,45
	$S_{(P)}$	516	531	15	523	51,2	37,4	0,73	0,90[g]	
54$_{TO'}$	$R_{(P)}$	514	532	18	527	10,6	13,2	1,25	1,31	1,46
	$S_{(P)}$	516	533	17	526	17,3	37,7	2,18	2,48	
54$_{44q}$	$R_{(P)}$	594	611	17	601	0.5	0.2	0,40	0,40	nd
	$S_{(P)}$	595	614	19	605	13,8	1,7	0,12	0,15	

[a]: Conditions expérimentales: 1µM sonde dans 600µL tampon cacodylate à 7°C. Hybride: 1,05 µM de cible **32**. Les bandes étudiées sont celles présentes dans le domaine visible, émise par le colorant.
[b]: (× 10^6) Exprimée en unités arbitraires au maximum de fluorescence
[c]: Après correction par le facteur de dilution (× 1,07)
[d]: Des intensités mesurées aux maxima de fluorescence de chacune des deux espèces
[e]: Des intensités mesurées au λ max de fluorescence de l'hybride
[f]: Variation observée après hybridation (I_{hyb} / I_{libre})
[g]: Des intensités mesurées au λ max de la sonde libre: 0,66
[h]: Fluorescence relative des isomères $R_{(P)}$ et $R_{(S)}$ ($R_{(S)}/R_{(P)}$). Corrections des écarts de concentrations incluses (<5%)

Tableau 18: Propriétés de fluorescence des conjugués marqués en position internucléotidique

3.5.3.2.2 Sondes hybridées

Après hybridation, les intensités de fluorescences des sondes marquées en 5' diminuent toutes de 7 à 72%, le conjugué **50$_{oTO'}$** étant celui pour lequel la diminution est la plus marquée (Figure 102)

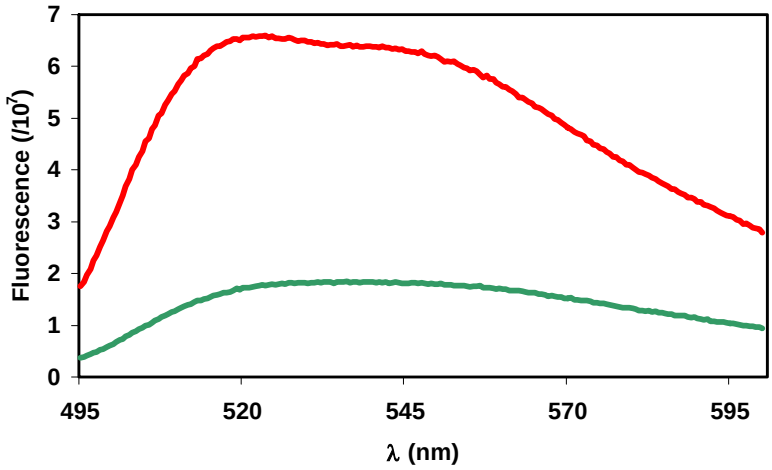


Figure 102: Fluorescence du conjugué **50**$_{oTO'}$ seul *(courbe rouge)* et en présence de cible **32** *(courbe verte)*.

Toutefois aucune corrélation n'a pu être établie entre la structure des cyanines liées aux ODNs et les variations d'intensités de fluorescence constatées. L'ordre classant les cyanines des conjugués **50**$_{Th}$ à **50**$_{44q}$ selon les variation de fluorescence qu'elles induisent après hybridation du conjugué qui les porte avec la cible **32** n'est pas le même que celui qu'on peut établir avec les conjugués de séquence 2, **51**$_{Th}$ à **51**$_{44q}$.

Les variations d'intensité de fluorescence observées lors de l'hybridation des conjugués internucléotidiques sont davantage variées, allant d'une diminution (-85%) à une augmentation (+160% dans le cas de **54**$_{TO(R)}$). La variation la plus importante est celle reportée avec le conjugué **54**$_{44q(S)}$ (Figure 103), une forte diminution avait déjà été constatée dans le cas du conjugué **50**$_{44q}$ marqué en 5' par ce même colorant.

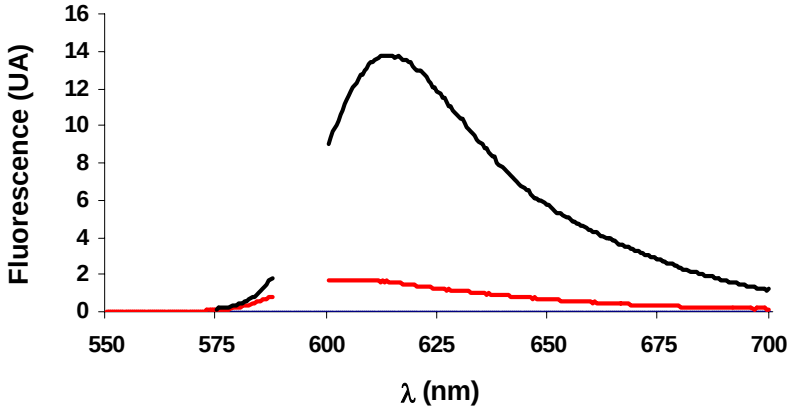


Figure 103: Emission de fluorescence du conjugué **54**$_{44q(S)}$ comportant la cyanine 44q en position internucléotidique avant *(courbe noire)* et après *(courbe rouge)* hybridation avec la cible **32**. (Pic de diffusion à 590-600nm effacé).

L'étude des ODNs liés aux cyanines de type thiazole orange (TO et TO') met en évidence l'influence de la géométrie des cyanines sur les variations des signaux fluorescents émis par les conjugués. En effet, les conjugués **54**$_{TO(R,S)}$ et **54**$_{TO'(R,S)}$ ne diffèrent que par la position d'ancrage du bras qui lie la cyanine au squelette phosphate/ribose. Toutefois des comportements différents sont observés: l'intensité du signal émis par le conjugué **54**$_{TO(R)}$ augmente en présence de cible, tandis

que, dans les mêmes conditions, la fluorescence de l'autre isomère (**54**$_{TO(S)}$) décroit, comme observé avec d'autres conjugués marqués en position internucléotidique par le TO [124]. Inversement, dans le cas de l'isomère $S_{(P)}$ du conjugué TO' **54**$_{TO'(S)}$ l'intensité du signal fluorescent augmente tandis que celle de l'isomère $R_{(P)}$ (**54**$_{TO'(R)}$) stagne (Figure 104).

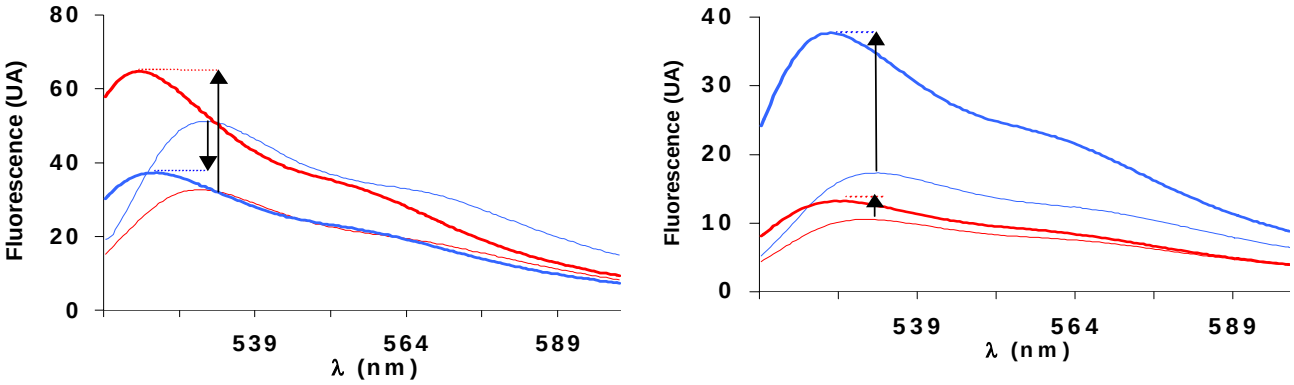


Figure 104: Fluorescence des conjugués TO (à gauche) et TO' (à droite), des isomères 1 (en rouge) et 2 (en bleu), libres (traits fins) puis hybridés (traits gras)

Conclusion

Nous souhaitions synthétiser des conjugués originaux émettant un signal fluorescent modifié au cours de l'hybriation. De plus nous cherchions à mettre en évidence quelques-uns des paramètres qui gouvernent la stabilité des duplex formé avec ces sondes ainsi que ceux qui influent sur les variations de fluorescence.

Nous avons pour cela synthétiser de nouveaux chromophores qui n'avaient jamais été couplés à des ODNs auparavant. Les conjugués obtenus émettent un signal fluorescent modifié au cours de l'hybridation: on observe de fortes diminutions de l'intensité (-85%) ainsi que des augmentations (×2,6). De plus, certaines corrélations ont pu être établies entre la structure des cyanines et certaines propriétés des conjugués correspondants tels le gain de stabilité des duplex formés avec les conjugués marqués à l'extrémité 5' et en position internucléotidique et les variations de fluorescence des conjugués internucléotidiques.

C: Synthèse et propriétés d'ODNs liés à deux marqueurs identiques

C.1. Présentation des marqueurs HPAs: Rappels bibliographiques

C.2. Synthèse et études des conjugués originaux préparés au laboratoire

C: Synthèse et propriétés d'ODNs liés à deux marqueurs identiques

Introduction

Les résultats décrits dans le premier chapitre concernant la synthèse et les propriétés des ODNs liés à différentes cyanines, soit à l'extrémité 5', soit en position internucléotidique, montrent que les conjugués obtenus possèdent un signal fluorescent dont l'intensité varie en fonction de nombreux paramètres. Lors de l'hybridation, une diminution de l'intensité du signal fluorescent est observée pour tous les conjugués marqués à l'extrémité 5', tandis que les conjugués comportant un marqueur en position internucléotidique présentent une augmentation ou une diminution de l'intensité du signal fluorescent. Dans tous les cas, les variations restent modestes (rapports allant de 0,15 à 2,6 entre les sondes libres et leurs hybrides) et plus faibles que celles observées avec des oligothymidylates [128].

Dans le but d'obtenir une plus grande variation de l'intensité du signal fluorescent, nous avons envisagé une autre stratégie basée sur les propriétés d'agrégation du thiazole orange. Le spectre d'absorption dans le visible du dimére du TO, le TOTO, présente un maximum vers 481 nm attribué à l'espèce dimérique, tandis que le TO monomérique comporte un maximum vers 501 nm. Nous avons donc envisagé de synthétiser un conjugué original comportant deux thiazoles oranges liés *via* un bras de liaison souple à l'extrémité 5' de l'ODN de séquence 1 **30**. La stratégie consiste à jouer sur l'équilibre entre les formes monomérique et dimérique du TO et sur le fait que l'hybridation et la dissociation sont chacun des phénomènes capables de déplacer l'équilibre en sens inverse. On peut par exemple tenter d'obtenir un conjugué qui, sous forme libre, aurait l'un de ses chromophores en interaction avec les bases nucléiques et le second rejeté vers l'extérieur (forme monomérique) et qui, en présence de cible complémentaire, aurait les deux chromophores empilés (forme dimérique).

Par analogie, nous nous sommes interéssés aux hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPAs) dont l'un d'eux, le pyrène, présente des propriétés spectrales différentes selon qu'il se présente sous forme monomérique ou dimérique et a déjà été greffé à des ODNs [35,36]. En effet, le dimère excité du pyrène, appelé excimère, présente un signal très différent de celui du pyrène excité monomérique. Nous avons donc synthétisé un conjugué comportant un motif *bis*-pyrène à son extrémité 5'. Par extension, nous avons également travaillé sur des conjugués comportant un motif *bis*-pérylène. Cet autre HPA a été étudié dans notre laboratoire et présente également des propriétés d'agrégation et de formation d'excimères qui n'ont jamais été exploitées pour le marquage de sondes oligonucléotidiques. Enfin, un conjugué *bis*-fluorescéine a été synthétisé afin de servir de témoin. Contrairement aux autres marqueurs, la fluorescéine n'est pas un intercalant.

1. Présentation des marqueurs HPAs et rappels bibliographiques

Les propriétés du thiazole orange ayant été étudiées au paragraphe B.2.1.3.1. et celles de son dimère, le TOTO, au paragraphe B.2.1.4.2. nous étudierons ici les propriétés des HPAs employés: le pyrène et le pérylène.

1.1 Le pyrène

1.1.1 Propriétés du pyrène: interaction avec l'ADN et formation d'excimères

Le pyrène est un composé qui présente une faible solubilité (165 μgL^{-1}) dans l'eau [144] et qui augmente d'un facteur 1000 en présence d'ADN double brin. En effet, cette molécule s'intercale entre les deux plans formés par deux paires de bases adjacentes [145,146,147] de préférence dans les séquences dA-dT [148] ce qui conduit à une diminution de sa fluorescence [149].

Le pyrène est connu pour former des excimères [150]. Le phénomène peut être résumé comme suit. Lorsqu'on excite par un rayonnement lumineux une molécule de pyrène P_1 à son maximum d'absorption, on crée l'espèce excitée P_1*. Cette espèce peut engager des interactions stabilisantes (composées d'interactions électrostatiques, interactions de transfert de charge, forces de recouvrement etc…) avec une deuxième molécule de pyrène P_2 non excitée. On est alors en présence d'un complexe [P_1 P_2]*.

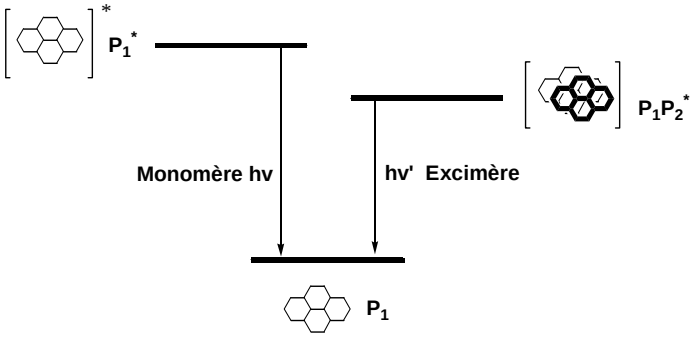


Figure 105: Représentation schématique des niveaux énergétiques du pyrène

La molécule excitée P_1* isolée aussi bien que le complexe [P_1 P_2]* peuvent se désexciter pour donner l'un un pyrène seul P_1 , l'autre deux molécules de pyrène P_1 + P_2. Dans les deux cas, il existe soit une désexcitation non radiative (qui ne nous intéresse pas) soit une désexcitation radiative. La désexcitation de P_1* émet une radiation d'énergie $h\nu$ et celle de [P_1 P_2]* une d'énergie $h\nu'$. Le complexe [P_1 P_2]* étant plus stabilisé que l'espèce seule P_1*, on a $h\nu > h\nu'$ d'où $\lambda < \lambda'$. Ainsi le spectre d'émission de fluorescence du pyrène fait apparaître une bande fine à 350 nm, attribué à la transition $P_1^* \rightarrow P_1$ et une large bande centrée à 420 nm attribuée à la transition [P_1 P_2]* $\rightarrow$ P_1 + P_2. L'étude du 1,3-dipyrènylpropane révèle que de nombreux paramètres, parmi lesquels les positions relatives des résidus pyrènes l'un par rapport à l'autre, influencent la formation de l'excimère. Les deux pyrènes doivent en effet être proches dans l'espace l'un de l'autre et orientés parallèlement [151].

La formation des excimères du pyrène appliquée aux ODNs a été employée pour suivre la fixation de dérivés cancérogènes sur un brin d'ADN [152]. Par la suite, des dimères du pyrène (non conjugués à des ODNs) ont été préparés afin d'étudier la structures des ODNs, hybridés ou non hybridés.

La synthèse d'un dérivé *bis*-pyrényle en vue de son utilisation en interaction avec les acides nucléiques a été proposée en 1991 (Figure 106, à gauche). Ce composé, dérivé du 1,5-dipyrènylpentane, présente dans son spectre de fluorescence une large bande due à la formation de l'espèce excimère [153]. En présence d'une concentration croissante en duplex poly(dA)/poly(dT),

cette bande décroît fortement. Un dérivé voisin donne des résultats comparables en présence d'un duplex comportant les quatre bases nucléiques [154]. Les différentes structures qu'adoptent ce dérivé *bis*-pyrène sont responsables de ces propriétés (Figure 106, à droite). En effet, en milieu aqueux, les unités pyrènes s'agrègent en raison de leur hydrophobie, ce qui conduit à la formation de l'espèce dimérique susceptible de produire un signal excimérique. En revanche, en présence d'ADN double brin, l'un des groupes pyrène s'intercale dans le duplex tandis que le deuxième en est exclu. Chacun des deux pyrènes est alors présent sous forme monomérique.

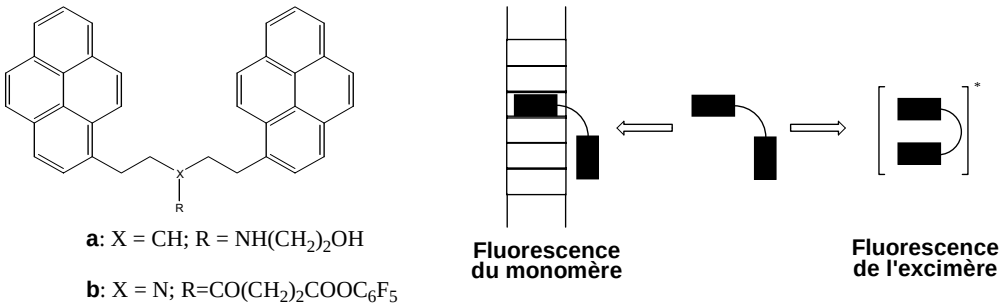


Figure 106: (*à gauche*) Structure des dérivés *bis*-pyrène développés par Shimidzu (**a**) et Berlin (**b**), (*à droite*) structure d'un dérivé *bis*-pyrène seul et en interaction avec une double hélice.

Selon le même principe, les études réalisées avec un troisième dérivé, dont les deux unités pyrènes sont séparés par sept atomes et qui a été également greffé à un ODN en position 5'-terminale, montrent que le composé présente un spectre de fluorescence de l'excimère dans l'eau, tandis que dans le méthanol, dans lequel il y a solvatation des résidus pyrènes, c'est l'émission du monomère qui prédomine largement [154,155].

1.1.2. Présentation des conjugués ODNs *bis*-pyrène

Trois méthodes ont été employées pour synthétiser des conjugués capables de former des excimères après excitation. La première consiste en la synthèse de deux conjugués pyrènes séparés dont les marqueurs ne se retrouvent à proximité qu'après hybridation sur une cible commune aux deux sondes (Figure 107a), la seconde à introduire en deux étapes les groupes pyrènyles en tant qu'analogues de nucléosides de telle manière qu'ils soient proches l'un de l'autre dans l'espace (Figure 107b) et, enfin, la dernière méthode s'appuie sur l'introduction du groupe *bis*-pyrène comme un marqueur à part entière (Figure 107c).

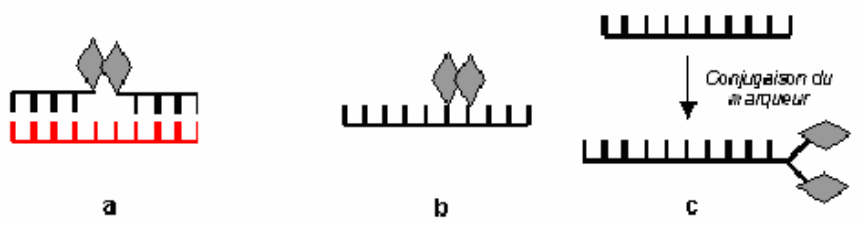


Figure 107: Représentation schématique des différentes méthodes de formation d'excimères du pyrène. **a**: Hybridation de deux conjugués *mono*-pyrène sur une cible unique (en rouge) **b**: Incorporation successive de deux groupes pyrènes analogues de nucléosides, **c**: Incorporation directe d'un marqueur *bis*-pyrène

1.1.2.1. Hybridation de conjugués 3'-pyrène et 5'-pyrène sur une cible unique

Cette méthode permet de former une paire de pyrènes et consiste à synthétiser deux conjugués ODNs-pyrènes, l'un porteur du marqueur à son extrémité 3', le second à l'extrémité 5', capables de s'hybrider sur deux séquences adjacentes présentés sur une même cible (Figure 108).

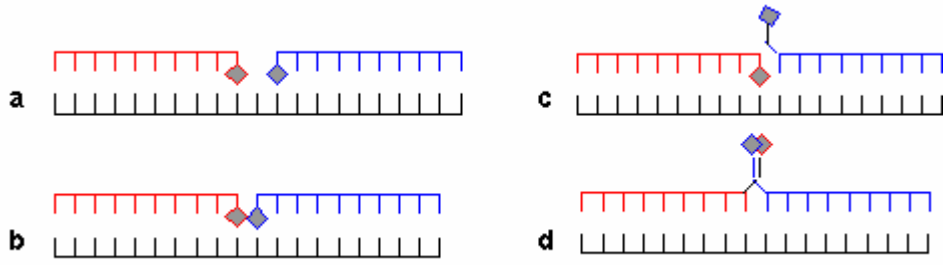


Figure 108: Différents modèles d'hybridation de deux conjugués ODNs pyrène (3'-pyrène, *en rouge* et 5'-pyrène *en bleu*). Les résidus pyrènes peuvent être séparés d'une paire de base (**a**), adjacents (**b**), se chevaucher d'une base (**c**) ou de deux (**d**).

L'hybridation des sondes sur leur cible se traduit, en spectrométrie de fluorescence, par l'apparition de la bande à 495 nm. Lorsqu'on substitue l'une des sondes par son équivalent non marqué, cette bande n'apparaît plus [156,157], confirmant que la bande à 495 nm n'est générée qu'en présence de deux noyaux pyrènes. L'avantage majeur de cette méthode est qu'en absence de cible complémentaire, les interactions entre les groupes pyrènes sont uniquement dépendantes du facteur dilution, donc très faibles voire nulles. Les inconvénients sont la nécessité de synthétiser deux sondes et que les risques de mesappariements sont plus élevés. Cette technique a été employée avec deux 16-mères s'hybridant sur une cible 32-mère [157]. Par ajout de quantités croissantes de cible, la fluorescence à 495 nm (excimère), initialement nulle, augmente fortement, tandis que celle des monomères diminue. L'efficacité de ce format d'hybridation est très sensible à la distance qui sépare les deux pyrènes l'un de l'autre. Si les deux séquences complémentaires de la cible sont séparées d'une ou deux bases nucléiques, l'intensité de la bande à 495 nm diminue nettement [156,155]. Inversement, si le complexe ternaire formé comporte deux sondes pyrènes qui se chevauchent d'une ou deux bases, la fluorescence excimérique est supérieure [156]. La longueur des bras de liaison liant le pyrène au brin d'ODN influe également sur l'intensité de la bande à 495 nm [158]. On peut retenir de l'ensemble de ces expériences que la distance séparant les centres des polyaromatiques est un critère décisif en ce qui concerne l'intensité de la fluorescence de l'excimère. Celle-ci devant en effet être la plus proche de la distance de Förster qui est de 3 à 4 Å .

1.1.2.2 Conjugués comportant deux pyrènes adjacents en position internucléotidique

La deuxième méthode couramment employée pour générer des excimères consiste à incorporer deux résidus pyrènes consécutivement comme analogues de nucléoside. Le groupe pyrène peut être introduit soit en position anomérique d'un ribose, soit en remplaçant le phosphate-ribose par un fragment de type glycérol.

Deux types de sondes peuvent être synthétisés. Dans le premier cas, les pyrènes font face à des bases nucléiques non-appariées (Figure 109, à gauche), dans le second ils ne font face à aucune base et sont exclus du duplex tandis que les autres bases de la sonde sont appariées (Figure 109, à droite).

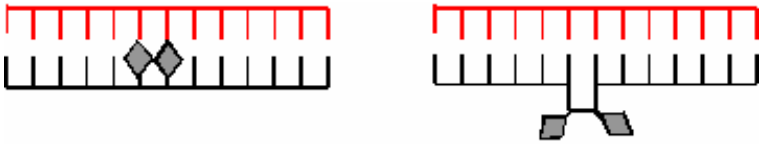


Figure 109: Conjugués comportant deux pyrènes contigüs faisant face aux bases de la cible *(à gauche)* et exclus du duplex par formation d'un renflement *(à droite)*

Le premier modèle a été étudié avec des oligothymidylates, les pyrènes font face à des adénosines dans le duplex et ils ne perturbent pas l'hybridation. Après hybridation sur une cible polyadénine, les intensités de fluorescence attribuées au monomère et à l'excimère augmentent. Celle de l'excimère étant nettement plus marquée, le rapport I_E/I_M passe de 0,72 à 2,56 au cours de l'hybridation [159]. De plus, les auteurs notent que l'hybridation du conjugué *bis*-pyrène (T_8-Pyr-Pyr-T_8) et d'un dérivé marqué à l'extrémité (Pyr-Pyr-T_8) sur une cible A_8 ne conduisent à aucune variation de signal ce qui les pousse à supposer que la présence de bases face aux pyrènes est indispensable pour observer une variation de fluorescence.

D'autres conjugués correspondants au second modèle ont également été synthétisés, la présence des pyrènes ne déstabilise que légèrement le duplex formé avec l'ADN et plus fortement avec l'ARN, ce qui peut en limiter l'emploi comme sonde à ARN [160]. Cette sonde qui contient deux pyrènes contigus, présente, libre, en émission de fluorescence une bande à 495 nm caractéristique de la formation d'excimères et un rapport I_E/I_M élevé. Après hybridation avec une cible ADN de même longueur, la fluorescence ne varie pas car les deux résidus restent à proximité l'un de l'autre [161].

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Saito *et al.* [162] qui emploient un autre conjugué portant un marqueur *bis*-pyrène en position internucléotidique. Ce conjugué peut s'hybrider sur une cible de manière à former un renflement duquel le groupe *bis*-pyrène se retrouve expulsé (Figure 109, à droite): la fluorescence n'augmente alors que faiblement. Par contre dans le cas où le duplex formé comporte une base nucléique X en face du groupe *bis*-pyrène , la fluorescence augmente fortement (d'un facteur 10 à 13, selon X). Yamana *et al.* ont également obtenu, avec un conjugué comportant un groupe *bis*-pyrène internucléotidique, des augmentations de la fluorescence excimérique, variables selon la nature de la base opposée (oscillant entre des facteurs 3,1 et 3,3) [163]. Dans ce format également, la longueur du bras reliant les deux unités pyrènes influence fortement la formation de l'espèce excimérique [162]. Ce type de conjugué a également été employé pour distinguer les différentes structures secondaires, simple brin, duplex et quadruplex, adoptées par la sonde [164].

Le groupe pyrène a également été introduit en position anomérique *via* une liaison amide [165]. Ce pseudo-nucléoside a été employé dans la synthèse d'un conjugué comportant consécutivement deux fois ce motif. Le rapport I_E/I_M est de 1,86, soit davantage que celui observé avec une sonde comportant des motifs glycérols [159]. On peut supposer que les groupes pyrènes sont à plus grande proximité l'un de l'autre lorsqu'ils sont liés en position anomérique. Il semble que plus le squelette porteur des pyrènes est rigide, plus le rapport I_E/I_M est élevé.

Des conjugués comportant deux motifs pyrènes distants de plusieurs bases l'un de l'autre présentent une fluorescence essentiellement excimérique [166]. En présence de séquence complémentaire,

l'intensité de la bande à 490 nm en spectrométrie d'absorption diminue fortement tandis que l'émission d'origine monomérique à 330 nm augmente. En effet, la plus grande souplesse du simple brin autorise le rapprochement des deux groupes pyrènes l'un de l'autre et donc la formation d'excimère. Inversement, la rigidité de la structure induite par l'hybridation éloigne les deux résidus dans le duplex et seule la fluorescence monomérique est observée.

1.1.2.3 Dérivés *bis*-pyrène liés à l'extrémité 5' d'ODNs

Cette dernière méthode consite à coupler un chromophore *bis*-pyrène à l'extrémité 5' de l'ODN. A cet effet, la synthèse d'un marqueur *bis*-pyrène comportant un ester de pentafluorophénol a été proposée en 1997 [154]. Comme cela a été vu au § C.1.1.1, ces marqueurs, lorsqu'ils ne sont pas conjugués, présentent une fluorescence essentiellement de nature excimérique (I_E/I_M = 15) [163]. Après conjugaison à l'ODN, la fluorescence décroît globalement [154,155] attestant du fait que les unités pyrènes ne s'agrègent pas (ou peu) dans le cas du conjugué et la fluorescence d'origine monomérique est la plus importante (I_E/I_M = 0,3) comme cela a été constaté par de nombreux auteurs [18,36,154,155,163]. Cela corrobore la possibilité de *back binding* d'au moins un résidu avec sa séquence. Après hybridation avec une séquence complémentaire de même taille, le ratio I_E/I_M augmente fortement et est sensible à la nature de la base à laquelle le marqueur est lié [163]. Ce résultat a été reproduit pour des conjugués 5'-*bis* pyrène hybridés avec des cibles ADN et ARN [155] dont la fluorescence excimèrique augmente jusqu'à un facteur 10 [36] tandis qu'elle ne varie pas en présence de séquence non complémentaire. La fluorescence d'un duplex formé entre une sonde *bis*-pyrène et une cible de même taille est supérieure à celle observée dans le cas de l'hybride formé entre cette même sonde et une cible portant une séquence T_5 surnuméraire [155], alors que la présence d'un G supplémentaire ne modifie pas le signal fluorescent. Les thymines agiraient comme des inhibiteurs de fluorescence. Le positionnement des résidus pyrènes dans le petit sillon est contredit par les fortes augmentations de stabilité des conjugués [36,155] et par le quenching observé en présence de thymines surnuméraires [155]. L'intercalation d'un résidu pyrène apparaît improbable en raison de la formation d'excimère [36,155] après hybridation ainsi que par la faiblesse de l'intensité de fluorescence du monomère. Le double stacking des unités pyrènes en 5' semble être un modèle convenable pour l'interaction de ceux-ci avec le double brin (Figure 110).

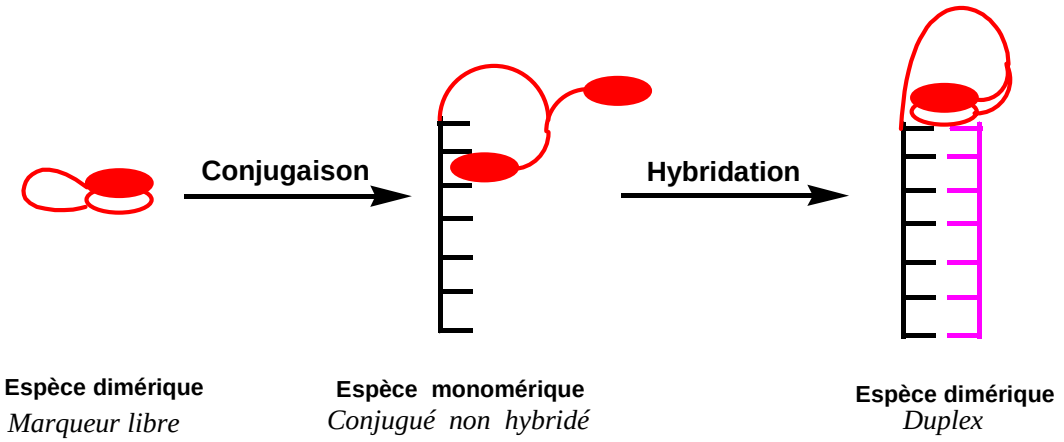


Figure 110: Représentation schématique du positionnement des unités pyrènes (*en rouge*) du marqueur non conjugué *(à gauche)*, du conjugué libre *(au millieu)* et du duplex *(à droite)*.

Haralambidis *et al.* [167] ont synthétisé un oligonucléotide conjugué en 5' à un peptide modifié. La partie peptidique est en effet composée de plusieurs motifs lysine dont l'amine de la chaîne latérale porte un résidu pyrène. Des conjugués portant jusqu'à cing unités pyrène, dont trois consécutifs, ont été obtenus. Le rapport I_E/I_M croît avec l'augmentation du nombre de résidus pyrènes. On n'observe donc pas de phénomène de quenching. En présence de cible, la fluorescence croît jusqu'à un facteur 2. Les auteurs avancent l'hypothèse que les résidus pyrènes, dans la sonde libre, interagissent avec la partie oligonucléotidique par empilement. En présence de cible, ces interactions étant rendues impossibles, les résidus pyrènes sont davantage disponibles pour former les complexes excimèriques. Ce comportement est similaire à celui observé pour les autres conjugués comportant le *bis* pyrène en position 5'.

1.2 Le pérylène

1.2.1 Propriétés du pérylène: interaction avec l'ADN

Le pérylène est un hydrocarbure formé de cinq cycles benzéniques condensés. Sa solubilité dans l'eau est presque nulle: inférieure à 0,5 μgL^{-1} [144]. Les interactions pérylène / ADN dans l'eau ont été moins étudiées que celles du pyrène [145]. En présence d'ADN, on observe un déplacement de 3µm du maximum d'absorption vers les courtes longueurs d'onde. Les expériences de polarisation de fluorescence sont en faveur d'une interaction pérylène / ADN de type intercalation. En outre, une corrélation a été établie entre la taille des HPAs et leur faculté à s'intercaler dans l'ADN plutôt qu'à s'agréger entre eux [168]. Les auteurs démontrent qu'un HPA présentant une surface trop importante ne peut s'intercaler dans la double hélice d'ADN car, dans ce cas, l'intercalation ne peut totalement isoler le HPA du milieu aqueux et l'agrégation des molécules entre elles prédomine. Le pyrène a été étudié et est suffisamment petit. Le pérylène n'a pas été étudié. Certains HPA à cinq cycles s'intercalent, d'autres non. Ce qui, rapproché avec les travaux précédents [145], tendrait à démontrer que le pérylène s'intercale, mais moins facilement que le pyrène. D'autres travaux portant sur l'étude d'une trentaine de HPAs portant chacun un bras hydrophile tendent à démontrer, qu'au contraire, les propriétés intercalantes d'un HPA croissent avec le nombre de cycles qu'il comporte [169], toutefois, les auteurs n'ont étudié que deux systèmes pentacycliques, tous les autres étant plus petits. De ce fait les deux études restent complémentaires l'une de l'autre. Le dérivé pérylène étudié stabilise un duplex plus fortement que ne le font les dérivés du pyrène et est, de manière générale, le deuxième meilleur stabilisateur de la série étudiée.

Un dérivé naturel du pérylène, nommée hypocrelline A (Figure 111, à gauche) est extrait d'une plante médicinale chinoise. Ce dérivé pérylènequinone présente un maximum d'absorption UV à 470 nm et un maximum d'émission de fluorescence vers 600 nm. Il est capable d'interagir avec l'ADN selon un mode non-intercalatif et peut être utilisé en tant que sonde [170], puisque son maximum d'émission de fluorescence, à un pH aux environs de 3,4~4, est augmenté en présence d'ADN (× 2,8), tandis qu'il l'est moins en présence d'ARN (×1,3).

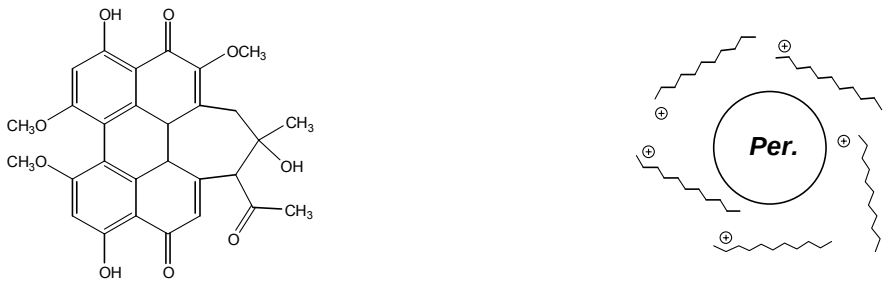


Figure 111: Structure de l'hypocrelline A (*à gauche*) et des colloïdes de taille contrôlée (*à droite*)

Une autre technique fait appel à des colloïdes de pérylène [171]. L'ajout d'une solution acétonique de pérylène dans un grand volume d'eau aboutit à la formation de colloïdes, due à l'insolubilité du pérylène. Toutefois, en présence de bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB), on obtient des colloïdes de taille contrôlée (85 nm) qui ne s'agrègent pas grâce aux répulsions entre les charges positives du CTAB adsorbés à leur surface (Figure 111, à droite). Outre les émissions classiques à 445 nm et 469 nm du pérylène en solution, on observe une très large et intense bande à 565 nm attribuée par les auteurs à la forme colloïdale du pérylène. L'ajout d'acides nucléiques, porteurs de charges négatives, rompt les répulsions entre colloïdes positifs et conduit à une nette décroissance de la bande à 565 nm. Bien que ne s'appuyant pas sur les interactions entre HPA et acides nucléiques, cette méthode permet la détection et la quantification de l'ADN.

1.2.2 Présentation des synthons pérylènes de la littérature

Le pérylène a été introduit sur les oligonucléotides de multiples façons. La stabilité chimique de cet aromatique permet d'une part d'utiliser un large éventail de réactions pour sa fonctionnalisation et pour la déprotection des conjugués qui le contiennent. La plupart des méthodes employées pour l'incorporation de marqueurs sur des ODNs ont été appliquées à la synthèse de conjugués pérylènes.

Le premier synthon **A** (Figure 112) permettant l'introduction du pérylène sur un ODN a été développé en 1998 par l'équipe de Berlin [172], il s'agit d'un ester actif. La réaction a été effectuée en milieu hétérogène, entre l'oligonucléotide fixé sur support et fonctionnalisé au préalable par un mélange CDI/1,6-hexanediamine. Le synthon est obtenu en quatre étapes à partir du pérylène et l'inconvénient majeur est l'impossibilité d'obtenir des bras de liaison de longueur différente. Cette équipe a, par la suite, mis au point un support modifié **B** permettant d'introduire le pérylène en 3' d'une chaîne oligonucléotidique [173]. Ce support comporte un cycle pyrrolidine dont l'azote porte le groupe pérylène. Le dérivé **C** portant un groupe iodoacétamide permet d'incorporer l'unité pérylène par le couplage avec un groupe thiophosphate [50]. Le pérylènylméthylamine **D** a été employé pour obtenir des conjugués 5' [174,175] *via* l'activation d'un ODN 5'-phosphate par le DMAP, la triphénylphosphine et la dipyridinedisulfure.

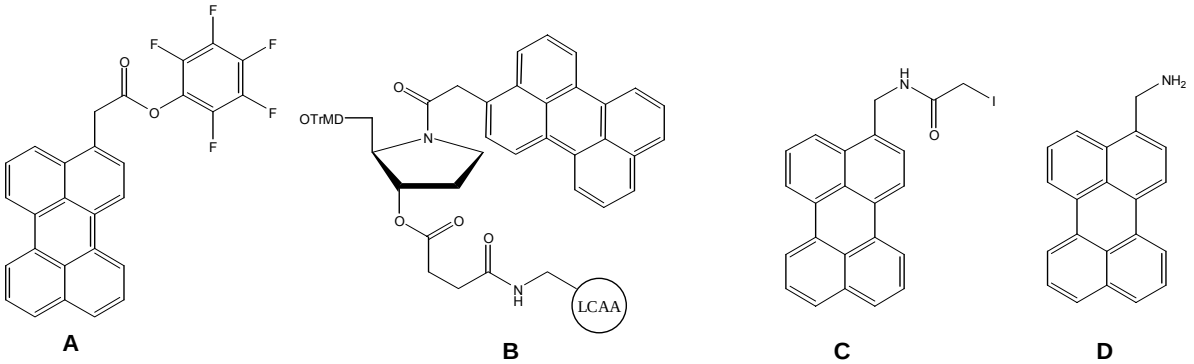


Figure 112: Présentation de réactifs d'introduction du pérylène sur les ODNs (années 1998-2000)

Ces synthons ne permettent pas l'incorporation directe du groupe pérylenyle, hormis **B** mais qui, dans ce cas, la limite à la position 3'. La mise au point du phosphoramidite **E** pour l'incorporation chimique [176] résoud t-elle ce problème. Le dérivé triphosphate **F** a également été synthétisé [177] Par la suite, le pérylène a été incorporé en position anomérique de 2'-désoxyriboses introduits sous la forme de dérivés phosphoramidites [178] et de H-phosphonates [179,180] (Figure 113). Le bras espaceur entre le carbone 1' du ribose et la position 3 du pérylène étant un oxygène **G** [178], un bras triméthylène ou propynyle [180] **Ha** et H**b** puis, finalement, le pérylène a été directement lié au sucre **I** [179]. Il est à noter que les deux anomères α et β des composés **Ha**,**Hb** et **I** ont été séparés et que les conjugués obtenus à partir de chacun d'entre eux ont été étudiés séparément.

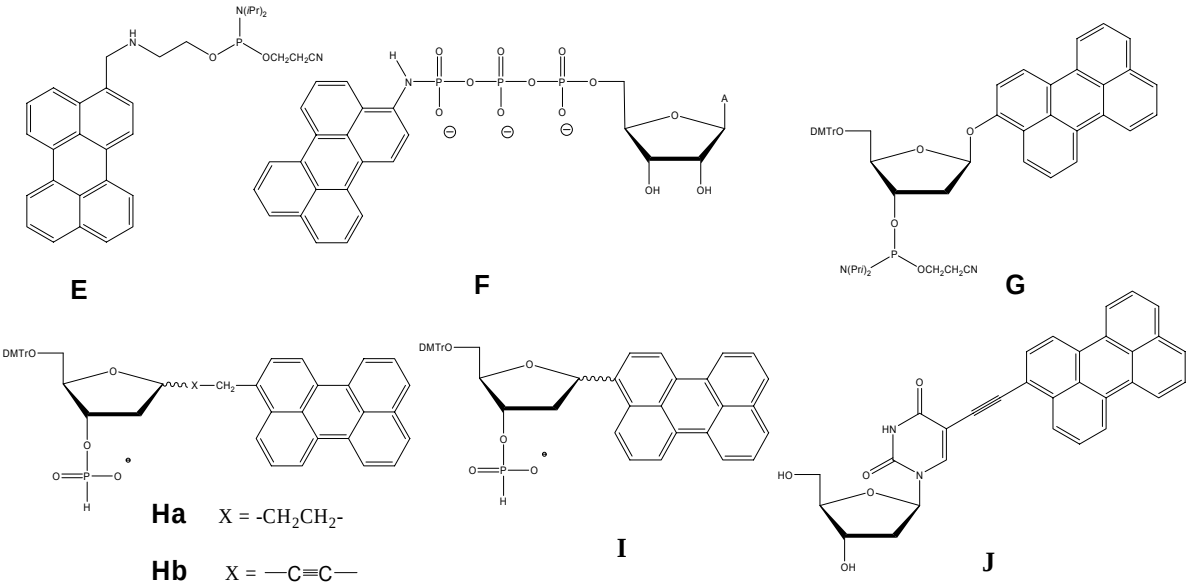


Figure 113: Présentation de réactifs d'introduction du pérylène sur les ODNs (années 2001-2003)

Outre leur utilisation pour l'incorporation du pérylène dans la synthèse de conjugués, les nucléosides modifiés de pérylène, tel **J** possèdent des propriétés antivirales [181].

L'équipe de Tilley a travaillé sur des dérivés de dibenzo[*a,j*]pérylène-8,16-dione. Ces composés, diversement substitués (Figure 114, à gauche) présentent un spectre UV comportant un maximum d'absorption allant de 564 nm à 630 nm (selon le nombre et la nature des groupements) et recèlent un intérêt comme marqueurs de biomolécules au vu de leur maximum d'absorption très décalé vers le rouge, leur déplacement de Stockes élevé (29 à 94 nm) et leur rendement quantique de fluorescence élevé (jusqu'à 0,82). Plusieurs dérivés ont été synthétisés en vue de leur

incorporation à des ODNs [182] et ont été couplés par une réaction ester actif/amine [183]. Le conjugué présente une fluorescence faible comparée à celle du marqueur libre (Φ=0,007 contre 0,260).

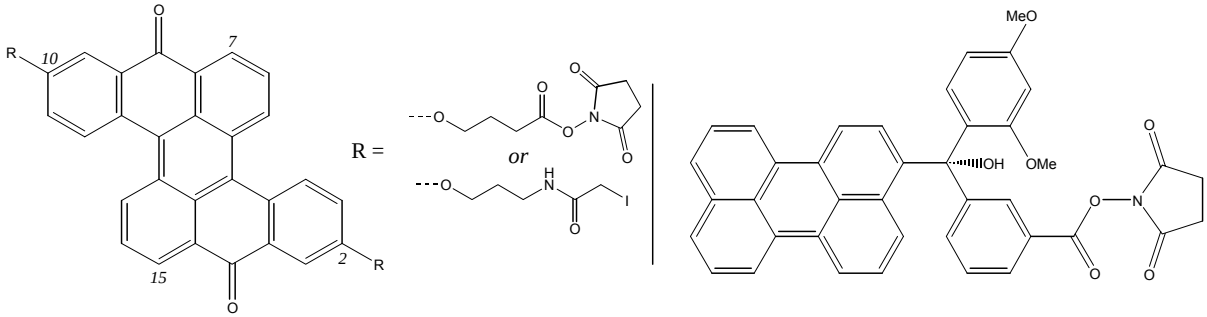


Figure 114: Structure des dibenzo[*a,j*] pérylène-8,16-dione (*à gauche*) et des groupes trityles modifiés (*à droite*)

Un autre synthon permettant l'incorporation du pérylène s'apparente au groupe trityle (Figure 114, à droite). Les études réalisées sur ce composé [184] montrent qu'il constitue un marqueur dont les spectres UV et de fluorescence sont très sensibles aux variations de pH

Le diimide de l'acide pérylènetetracarboxylique a également fait l'objet de plusieurs travaux, en partie grace à la possibilité de le *bis*-fonctionnaliser facilement au niveau des atomes d'azote. Les dérivés mis au point par l' équipe de McLaughin [185,186] avec n=4 peuvent être incorporés au sein d'une chaîne oligonucléotidique de la même manière qu'un dérivé phosphoramidite de nucléoside.

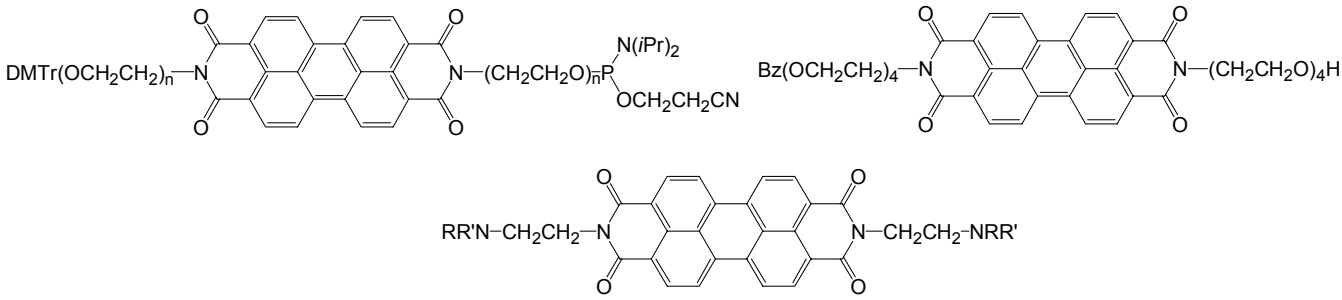


Figure 115: Dérivés du pérylènediimide *bis*-fonctionnalisés développés par les équipes de McLaughin (*en haut à gauche),* Li *(en haut à droite)* et de la famille du PIPER *(en bas)*

En outre, la synthèse d'un dérivé du pérylènediimide *N*-ω-hydroxypolyalcoxy, *N'*-ω-benzoylpolyalcoxy (Figure 115, en haut à droite) par l'équipe de Li a permis la synthèse de polymères comportant entre deux et six unités pérylène [187,188].

Une autre propriété des pérylènediimides *N,N'*-bisfonctionnalisés est leur capacité à promouvoir la formation de tétrades de guanines, à inhiber l'action de la télomérase, à stabiliser les quadruplex formés ou à effectuer des coupures de brin comme le PIPER (Figure 115, en bas, R = R' = $-(CH_2)_5-$) [189,190,191]. D'autres groupes ont également étudié l'influence des pKa de plusieurs dérivés comportant d'autres groupes R et R' sur la capacité d'agrégation de ces composés et sur la sélectivité de leur interaction envers diverses structures adoptées par l'ADN [192,193,194,195].

1.2.3 Présentation des conjugués ODNs-pérylène

Les conjugués ODN-pérylène ont été relativement peu étudiés. Toutefois, le pérylène présente de nombreux avantages, tels un haut rendement quantique de fluorescence, un spectre d'émission situé bien en dehors des longueurs d'onde classiques d'absorption de nombreuses molécules ainsi que la capacité à former des excimères.

Berlin *et al.* [172] ont synthétisé un ODN 13-mère lié en position 5' par un bras de liaison de 12 atomes au carbone 3 du pérylène (Figure 116). Ce conjugué présente, après hybridation avec la séquence complémentaire, deux maxima d'absorption à 413 et 439 nm. En présence de séquence cible, aucune modification spectrale n'est observée.

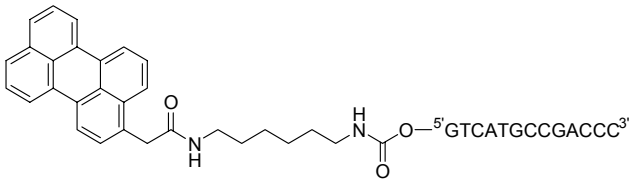


Figure 116: Conjugué ODN lié au pérylène par sa position 5' (Berlin *et al.*)

D'autres études ont porté sur des ODNs polypyrimidiques liés au pérylène, soit par l'intermédiaire d'un bras de liaison polyméthylène [176], soit par l'intermédiaire d'unités sucre-pérylène. Dans le dernier cas, le pérylène a été lié en position anomérique du 2'-desoxyribose [179], soit *via* des bras de liaisons propynyle et propyle [179, 180], conduisant dans chaque cas à la formation de deux anomères qui ont été incorporés séparément aux ODNs (Figure 117). En présence de cible complémentaire, le maxima d'absorption de ces composés se déplace vers le rouge.

$$\text{Per-CH}_2\text{-}\overset{\text{H}}{\text{N}}\text{—(CH}_2\text{)}_n\text{—p-}^{5'}\text{TTTTCTTTTC}^{3'}$$

n = 2 ou 6

$$^{5'}(\text{PER}^{\beta})\text{TTCTTTTTCT}(\text{PER}^{\beta})\text{TCTCT}^{3'}$$

Figure 117: Conjugué pérylène et *bis*-pérylène polypyrimidiques
Le groupe PER^{β} désigne un nucléoside modifié dont la base est remplacée par un groupe 3-(3-pérylènyl)propyle de configuration β.

Ces conjugués stabilisent plus efficacement les triple hélices que les double hélices. La meilleure stabilisation a été obtenue avec le conjugué ODN-pérylène dont le pérylène est lié en position 5' de la séquence *via* l'anomère β d'une unité sucre-pérylène comportant le bras de liaison propyle. La double incorporation de ce motif sucre-pérylène à la fois en position 5' et en interne (ou en position 3' et 5') conduit à une stabilisation beaucoup plus importante que dans le cas de l'utilisation de conjugué ne comportant qu'un motif pérylène. De plus, dans le cas des conjugués comportant deux motifs pérylènes, la formation de duplex ou de triplex s'accompagne d'une augmentation importante du signal fluorescent émis par la sonde (entre 1,5 et jusqu'à 3,7 fois pour le conjugué présenté en figure 117, en bas) [179].

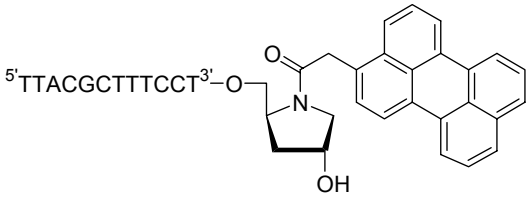


Figure 118: Conjugué pérylène en 3' de Balakin *et al.*

La synthèse d'un pseudonucléoside à cycle pyrrolidine portant un résidu pérylène sur l'azote endocyclique a été réalisée [173] (Figure 118) . En présence de la séquence complémentaire, on observe une augmentation de l'anisotropie de fluorescence de 60% par rapport à ce qui est observé en présence d'un 30-mère non-complémentaire.

1.3. Utilisation conjointe du pyrène ou du pérylène et d'autres conjugués

Le pérylène peut être également employé dans le cadre d'expérience de transfert d'énergie de fluorescence (FRET). Les couples pérylène/pyrène et pérylène/tetrafluoroazidobenzène ont été étudiés.

Lorsque le pyrène est excité à 330 nm, il émet à 376, 388 et 396 nm, lorsque le pérylène est excité à 420 nm, il émet à 456 et 485 nm. Des essais réalisés sur une macromolécule comportant des motifs pyrène et pérylène relié de manière covalente par un bras de liaison montrent qu'après une irradiation à 330 nm, on observe uniquement l'émission de fluorescence du pérylène, attestant ainsi du transfert total de l'énergie de fluorescence du pyrène vers le pérylène [184].

Le couple pyrène/pérylène est en effet connu pour être un couple donneur/accepteur dans les expériences de fluorescence en solution [196] et le pérylène agit comme accepteur avec d'autres HPAs [197]. La synthèse de composés comportant à la fois un motif pérylène et un pyrène a été effectué dans le cadre d'études de transfert d'énergie [198] au sein d'une même molécule. Les maxima d'émission de fluorescence de ces composés, après excitation à 330 nm (absorption du pyrène) sont ceux du pérylène (pics à 450, 480 et 510 nm) [184]. L'émission de fluorescence du pyrène (370 à 440 nm) recouvre largement l'absorption du pérylène (390 à 470 nm) et l'idée d'employer ces propriétés dans la conception de sondes oligonucléotidiques a été évoquée dès 1998 [172]. La méthode consiste en l'utilisation de deux oligonucléotides marqués, l'un en 3' par un pyrène l'autre en 5' par un pérylène, qui s'hybrident simultanément sur une même cible de manière à ce que les deux HPA soient proches l'un de l'autre (Figure 119).

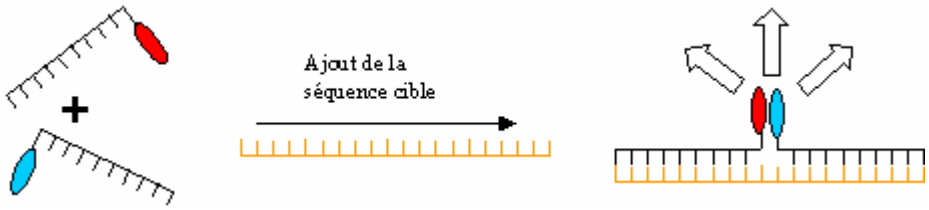


Figure 119: Format d'hybridation de Shimadzu *et al.*

En absence de cible aucun transfert d'énergie de fluorescence n'est constaté. Par contre, après hybridation, les HPAs étant à proximité l'un de l'autre, le phénomène de transfert d'énergie de fluorescence a lieu du pyrène (donneur) vers le pérylène (accepteur) avec un rendement proche de 100% [50]. En excitant l'hybride à 347 nm (absorption du pyrène) on observe une émission à 459 nm (émission de fluorescence du pérylène) Le transfert le plus efficace est observé lorsque l'hybridation

des deux conjugués ne laissent aucun nucléoside de la cible non apparié. Les auteurs supposent que le pérylène ne s'intercale pas dans la double hélice formée.

D'autres travaux ont porté sur des conjugués 5'-pérylène et 3'-tetrafluoroazidobenzène s'hybridant sur deux séquences adjacentes d'une même cible. Par irradiation du groupe pérylène, le groupe azidophényle oxyde les résidus guanines situés sur la cible [175]. La cible est un 14-mère sur lequel s'hybrident deux heptamères. Lorsque l'un des heptamères est lié par son extrémité 5' à un résidu pérylène , on observe une forte stabilisation du complexe ternaire (T_M passant de 15 à 28°C). De plus, les études par dichroïsme circulaire concluent à une intercalation du pérylène dans le duplex. Les études menés sur ce conjugué ODN-pérylène montrent qu'il stabilise fortement le complexe formé de la cible 14-mère et des deux sondes 7-mères [174]. Toutefois, l'absence de liaison phosphodiester dans la région où se situe le résidu pérylène, relativement encombrant, favorise certainement son intercalation dans ce complexe ternaire, entre les deux séquences. Il est alors hasardeux d'extrapoler que le pérylène, en position internucléotidique, s'intercalerait de la même manière dans des duplex "classiques" formés de deux brins.

Par la suite, Korshun et Shehepinov ont démontré que ces propriétés de transfert pouvaient être étendues à la série pyrène/pérylène/fluorescéïne/TAMRA [199]. Ces quatre chromophores étant liés les uns aux autres par un squelette phosphotriester, on observe, en irradiant le motif pyrène à 330 nm, l'émission quasi-exclusive du TAMRA à 570 nm. L'utilisation du pyrène et du pérylène, conjointement à d'autres chromophores, a été largement étudié par l'équipe de Kool qui a effectué la synthèse des 256 tetramères possibles comportant les motifs pyrène, pérylène, diméthylaminostilbène et/ou quinacridone en position 2' de désoxyribose [178]. Les marqueurs furent introduits sous forme de pseudonucléosides en position anomérique du 2'-desoxyribose. Un très large éventail de couleurs, maximum d'absorption, absorption molaire, rendement quantique de fluorescence et déplacement de Stockes ont été observés. De manière générale, les tétramères présentent des propriétés éloignées de celles des monomères qui les composent en raison des nombreuses interactions et/ou complexes qui peuvent se produire tels les excimères, exciplex, tranfert de charge ou de fluorescence. Toutefois, ni le tétramère tétrapérylène ni le dimère pérylène/pyrène (obtenu en tant qu'intermédiaire de synthèse) n'ayant fait l'objet d'études approfondies, peu de renseignements peuvent en être tirés pour nos travaux.

Enfin le transfert d'énergie de fluorescence de la fluoresceine vers le pyrène a été mis à profit dans l'élaboration de sondes MagiProbe [200]. Un ODN comporte en positions internucléotidiques et contiguës un pyrène et une fluorescéine. Dans la sonde libre, l'irradiation au λ_{max} de la fluorescéine, est suivie d'un phénomène de FRET vers le pyrène, l'émission exclusive du pyrène est observée. En présence de cible, le pyrène s'intercale dans le duplex formé, seule l'émission de la fluorescéine est observée.

2. Synthèse et études des conjugués originaux préparés au laboratoire

Le modèle que nous avons choisi pour cette étude consiste en des conjugués de séquence 1, pour pouvoir effectuer le cas échéant, des comparaisons avec les conjugués **50**. Peu d'ODN *bis*-marqués ayant été synthétisés actuellement, nous avons choisi de commencer par la fixation des chromophores en position 5' des ODNs pour des raisons de simplicité de synthèse. Enfin, pour

laisser aux chromophores un degré de liberté suffisant, nous avons choisi de les fixer à l'ODN *via* des liaisons souples.

2.1. Synthèse du bras espaceur et de l'ODN 5'-*bis*-amino

Il aurait été possible de coupler l'ODN sur un marqueur bichromophorique préalablement synthétisé comme cela a été fait pour obtenir des conjugués comportant deux pyrènes décrits dans la littérature [153,154,155,162,163]. Cependant cette voie nécessite la préparation d'un nouveau synthon bichromophorique pour chaque couplage, or ce type de composé peut être difficile d'accès. Les techniques de greffage sur support restaient impossible d'emploi du fait que le TO est déméthylé en milieu basique (comme observé par spectrométrie de masse). La synthèse préalable d'un ODN comportant deux fonctions réactives puis sa *bis*-fonctionnalisation par deux chromophores nous a semblé être une statégie plus simple. La technique employée par Vlassov *et al.* [35,36] qui fait appel à des couplages phosphate activé / marqueur amino est difficile de mise en œuvre et nécessite un très large excès de marqueur. De plus, elle limite considérablement le choix du bras de liaison ainsi que sa souplesse car il n'y a aucun atome entre l'extrémité 5' de l'ODN et "l'embranchement de la fourche" du bras de liaison. Nous avons donc choisi de synthétiser un ODN comportant à son extrémité 5' un bras porteur de deux fonctions amines. Cela nous permet d'obtenir des conjugués dont le bras de liaison est souple et d'utiliser directement, quand ils existent, des réactifs commerciaux.

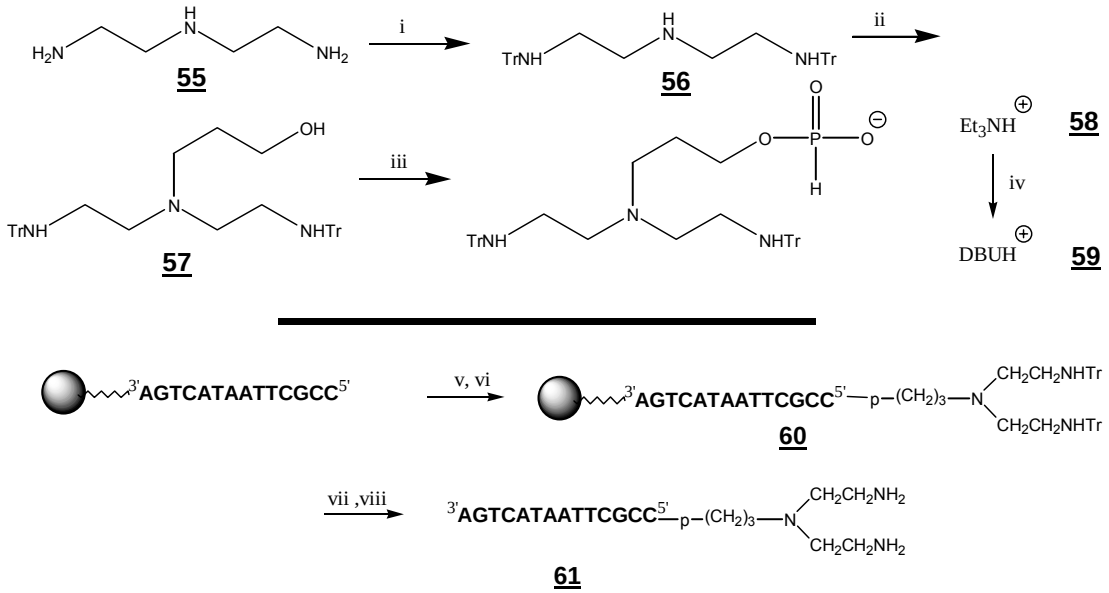


Figure 120: Synthèses du bras espaceur *bis*-amino **59** et de l'ODN *bis*-amine **61**
i) TrCl, Pyr. ii) $BrCH_2CH_2CH_2OH$, DIEA, CH_3CN, reflux 1h. iii) 2-chlorobenzo-1,3-dioxa-2-phosphorin-4-one; Et_3NH^+, HCO_3^- 1M., iv) $DBUH^+$, HCO_3^-., v) **59**, PivCl, C_5H_5N, CH_3CN., vi) I_2, C_5H_5N/H_2O (98:2, v/v); vii) NH_4OH conc., 55°C, 16h., viii) AcOH 80%, 3 h.

Le bras espaceur retenu est dérivé de la diéthylènetriamine **55** et est obtenu en trois étapes. Après tritylation des amines primaires (**56**), l'amine secondaire est alkylée par le bromopropanol (**57**). Enfin, la fonction alcool est mise à réagir avec le 2-chlorobenzo-1,3-dioxa-2-phosphorin-4-one [64] pour donner le dérivé H-phosphonate désiré **58**. Le sel de triéthylammonium correspondant n'étant pas soluble dans les conditions de couplages classiques, le sel de DBU **59** a été synthétisé.

Le bras espaceur **59** et les marqueurs retenus sont tels que les liaisons chromophore 1 – chromophore 2 d'une part et chromophore – phosphate 5' d'autre part soient suffisamment longues (> 8 atomes) et souples (absence de double liaison).

Le composé H-phosphonate **59** est couplé par la méthode classique [15] à l'extrémité 5'-OH de l'ODN de séquence 1 sur support avec un rendement de 90% (Figure 121). Après déprotection à l'ammoniaque concentrée à 28%, l'ODN portant le bras *bis*-tritylé **60** est purifié par CLHP. Dans une seconde étape, il est déprotégé par action d'une solution d'acide acétique à 80% pendant trois heures. En effet, les ODNs 5'-OH **30** et 5'-*bis*NH_2 **61** ont des temps de rétention proches en CLHP, et il est plus aisé d'effectuer la purification du dérivé *bis*-tritylé **60**. (caractérisation du conjugué portant le bras *bis*-amine en tableau 19).

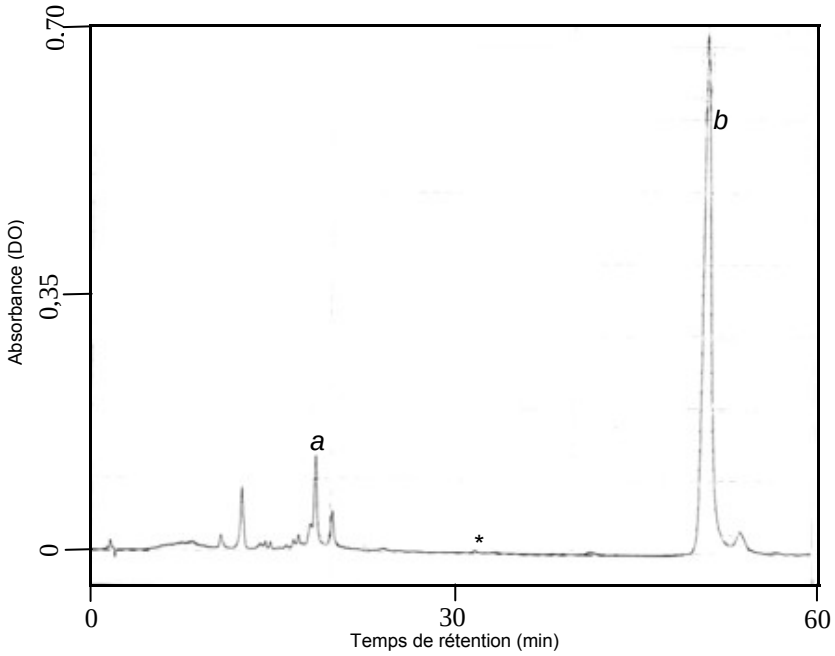
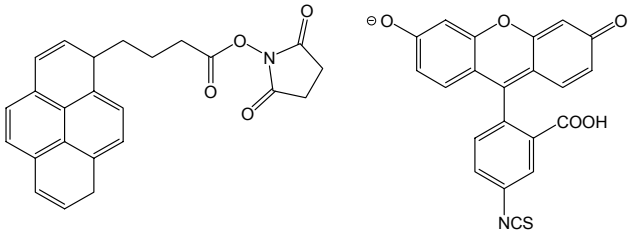


Figure 121: Profil chromatographique du mélange obtenu après déprotection de l'ODN de séquence d[5']CCGCTTAATACTGA[3'] fonctionnalisé en 5' par le réactif **59**. Pic *a*: ODN n'ayant pas réagi **30**, Pic *b*: ODN *bis*-NHTr **60**. (Des traces d'ODN ayant perdu un groupe trityle sont parfois décelables au niveau du *).
Gradient d'acétonitrile 0% à 48% en 60 minutes.

2.2 Synthèse des marqueurs

Les réactifs d'introduction des groupes pyrène et la fluoresceine sont les réactifs commerciaux: 4-(1-pyrènyl)butanoate de succinimidyle **62** et isothiocyanate de fluorescéïne **63**. (Figure 121bis)

.



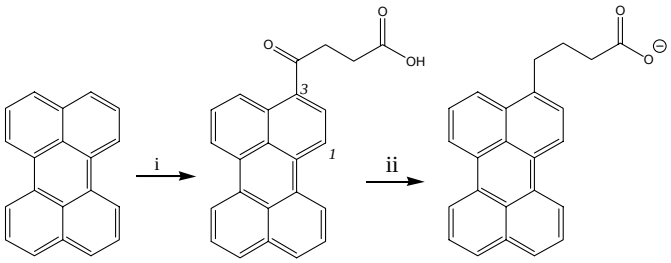
62 **63**

Figure 121bis : Structure des marqueurs **62** et **63**

Les réactifs d'introduction du thiazole orange et du pérylène ont été obtenus selon les méthodes décrites ci-dessous

2.2.1 4-(3-Pérylènyl)butanoate de succinimidyle

Le 4-(3-pérylènyl)butanoate de succinimidyle **72** est le marqueur retenu pour effectuer les couplages sur les extrémités 5'-amino de l'oligonucléotide **61**. Les premières tentatives de synthèse au laboratoire ont porté sur une réaction de Friedel et Craft sur le noyau pérylène à l'aide de l'anhydride succinique ou du chlorure d'acide double de l'acide succinique. Des essais similaires avaient été entrepris sur le noyau pyrène avec succès [201]. Quelques années plus tard, en 1940, la synthèse de l'acide pérylènoylpropionique **64** fut proposée [202] (Figure 122). La réaction entre le pérylène et l'anhydride succinique aboutit à un mélange inexploitable tandis que la réaction du chlorure succinique sur le pérylène dans le CS_2 [202] donne un composé supposé être celui attendu **64** avec un rendement faible (15%) et mélangé à de nombreux coproduits supposés être, entre autres, des produits de 3,4- et 3,9- *bis* acylation. Similairement, le 3-hexanoylpérylène avait également été obtenu par une réaction de Friedel et Craft dans le chlorobenzène avec un bon rendement, mais les auteurs rapportaient la présence d'isomères de position ainsi que, en des teneurs plus élevées, des diacylpérylènes [203]. L'acide pérylènoylpropionique **64** mélangé à 2-4% d'isomères de positions a été obtenu par une autre équipe par réaction du chlorure succinique sur le pérylène dans le nitrométhane à –5°C [204]. En outre, les caractérisations des produits obtenus en 1940 [202] et en 1982 [204] diffèrent. Malgré plusieurs tentatives, la réaction conduit soit à des mélanges complexes soit à des rendements trop peu élevés pour présenter une voie convaincante d'accès à ce synthon. En effet la réaction du pérylène dans le nitrométhane à 0°C en présence d'anhydride succinique et de chlorure d'aluminium aboutit, après des étapes de purification fastidieuses, à moins de 5% de rendement. L'utilisation du chlorobenzène comme solvant [203] n'améliore pas le rendement. Dans le nitrométhane à -5°C~-10°C et en présence du chlorure succinique et de chlorure d'aluminium, le résultat est le même. Un meilleur résultat (54%) est obtenu en effectuant la réaction au reflux du CS_2 en présence de chlorure succinique et de chlorure d'aluminium. Par contre la réaction suivante de réduction du carbonyle par la méthode de Huanh-Minlon [205] échoue et donne un mélange complexe ne contenant qu'environ 3% du produit désiré **65**.



64 **65**

Figure 122: Synthèse de l'acide 4-(3-pérylènyl)butyrique **65**.
i: a) $AlCl_3$, $ClCOCH_2CH_2COCl$, CS_2, 6h., reflux, b) HCl 1M; ii) N_2H_4, KOH, TEG, 2h, reflux

La stratégie finalement retenue est celle élaborée par Müllen [206]. La synthèse a été effectuée à partir du 3-(3-pérylènyl)propanol **68** synthétisé au laboratoire en vue d'autres

applications [66]. Le pérylène est monobromé par action du NBS dans le DMF [207,208]. Puis le bromopérylène **66** est converti en 3-(3-pérylènyl)prop-2-ynol **67** par une réaction de Sonogashira suivie d'une réduction de la triple liaison (**68**). L'hydroxyle est successivement converti en halogénure (**69**), nitrile (**70**), acide (**71**) puis ester actif **72** (Figure 123). C'est ce dernier composé qui est utilisé pour le couplage avec les oligonucléotides.

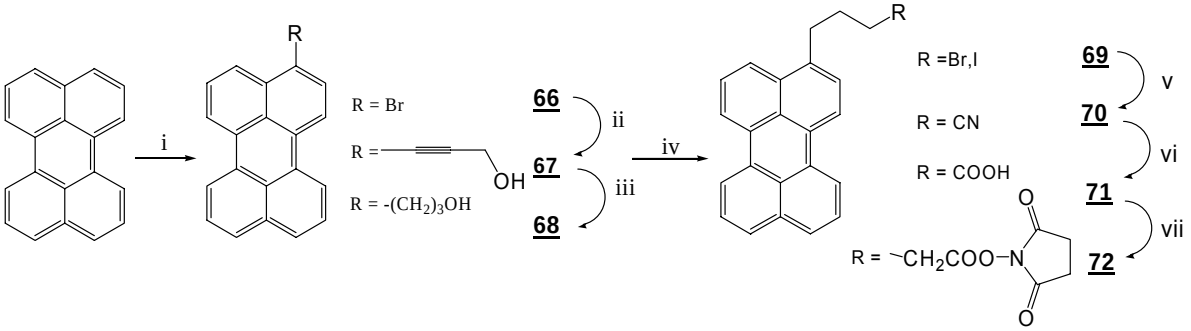


Figure 123: Séquence réactionnelle de la synthèse du pérylènebutyrate de succinimidyle
i) NBS,DMF. ii)Pd(PPh$_3$)$_4$, CuI HC≡CCH$_2$OH, THF/pipéridine (1:1, v/v) iii) H$_2$, Pd/C, THF iv) CBr$_4$, PPh$_3$, DMF. v)NaCN, DMSO. vi)KOH iPrOH/H$_2$O. vii) DCC, NHS, DMAP, THF.

2.2.2. Synthèse de l'ester actif du TO

La synthèse de l'ester actif du Thiazole Orange **75** est dérivée de celle du TO (Figure 124). Afin d'éviter les éventuelles réactions de cyclisations parasites observées sur des cyanines comportant des bras acide carboxylique courts (3 ou 4 atomes) [209], nous avons retenu un bras plus long (6 atomes). La lépidine est alkylée à l'aide de l'acide 6-bromohexanoïque pour donner l'acide **73**. Puis ce composé est mis à réagir sur l'iodure de 3-méthyl-2- thiométhylbenzothiazolium pour donner un dérivé acide carboxylique du TO **74**. L'ester actif **75** est obtenu par une esterification classique en présence de *N*-hydroxysuccinimide, DCC et DMAP.

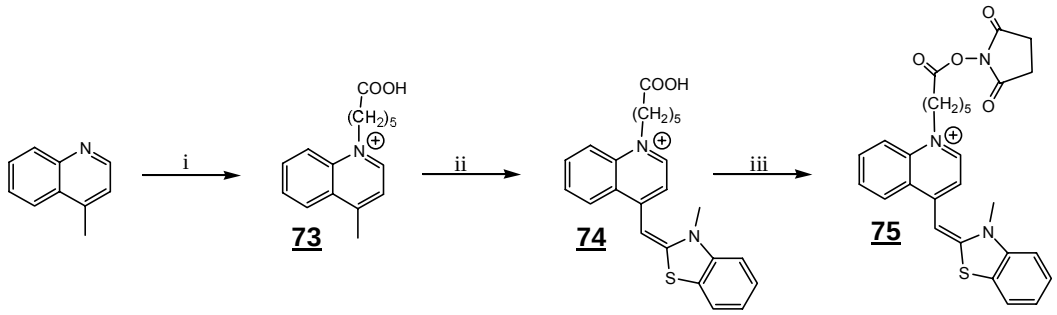


Figure 124: Séquence réactionnelle de la synthèse de l'ester actif du TO **75**
i) Br(CH$_2$)$_5$COOH, dioxane; ii) Iodure de 3-méthyl-2-méthylthiobenzothiazolium; TEA; iii) NHS, DCC, DMAP, DMF

2.3. Synthèse et caractérisation des conjugués

L'ODN 5'-*bis* NH$_2$ **61** est dissous dans un petit volume d'une solution tampon (NaHCO$_3$ 1% ; pH=9). Le marqueur **62**, **63**, **72** ou **75** est ajouté en excès dans le DMF (environ 10 équivalents par résidu NH$_2$). La phase aqueuse est extraite au dichlorométhane plusieurs fois puis purifiée par chromatographie par passages sur colonne d'exclusion stérique puis colonne en phase inverse.

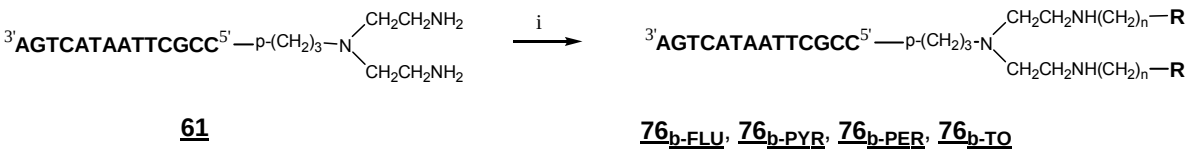


Figure 125: Séquence réactionnelle de la synthèse des conjugués *bis*-marqués **76$_{b\text{-}FLU}$**, **76$_{b\text{-}TO}$**, **76$_{b\text{-}PYR}$** et **76$_{b\text{-}PER}$**.
i) **62**, **63**, **72** ou **75**, DMF, NaHCO$_3$ 1%, pH=9.

L'élution des conjugués *bis*-marqué **76**$_{b\text{-}FLU}$, **76**$_{b\text{-}TO}$, **76**$_{b\text{-}PYR}$ et **76**$_{b\text{-}PER}$ est très retardée par rapport à celle du conjugué non marqué, en particulier pour les ODNs *bis*-pyrène et *bis*-pérylène **76**$_{b\text{-}PYR}$ et **76**$_{b\text{-}PER}$ (Figure 126). Les conjugués **76**$_{b\text{-}FLU}$ et **76**$_{b\text{-}TO}$ sont obtenus avec des rendements finaux de 30 et 29% respectivement. Les conjugués **76**$_{b\text{-}PYR}$ et **76**$_{b\text{-}PER}$, dont les synthons respectifs **62** et **72** sont peu solubles, sont obtenus avec des rendements moindres de 16 et 11%.

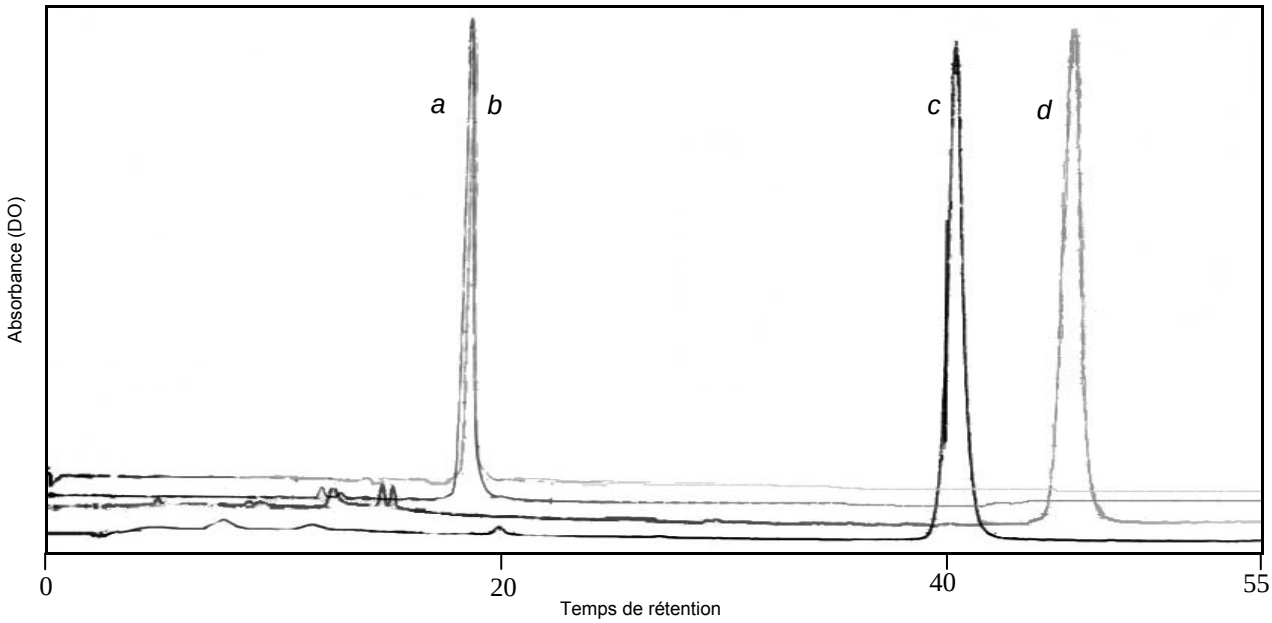


Figure 126: Chromatogrammes des différents ODNs 5' *bis*-marqués. *a*: *Bis*-FLU (**76**$_{b\text{-}FLU}$), *b*: *Bis*-TO (**76**$_{b\text{-}TO}$), *c*:*Bis*-PYR (**76**$_{b\text{-}PYR}$) et *d*: *Bis*-PER (**76**$_{b\text{-}PER}$).
Gradient d'acétonitrile: 8% à 44% en 55 minutes.

Afin de pouvoir effectuer des comparaisons, des dérivés *mono* substitués ont été synthétisés. Le dérivé *mono*-TO retenu est le conjugué **50**$_{TO}$ qui possède la même séquence que les ODNs **76**. Le dérivé *mono*-FLU est le conjugué **76**$_{m\text{-}FLU}$ qui est le produit de *mono* fonctionnalisation obtenu par la réaction entre l'ODN **61** et le marqueur **63** et a été isolé avec un rendement de synthèse de 32%. Les ODNs *mono*-HPA **76**$_{m\text{-}PYR}$ et **76**$_{m\text{-}PER}$ ont été synthétisés avec des rendements respectifs de 28 et 30%. Un bras de liaison de type hexylamine monométhoxytritylé a été gréffé en position 5' de l'ODN sur support et protégé de séquence 1. L'ODN **77** obtenu comporte une fonction amine monométhoxytritylée et est déprotégé par un traitement acide pour donner l'ODN 5'-hexylamine **78**. Ce dernier a été couplé avec les marqueurs **62** et **72** pour donner les conjugués **76**$_{m\text{-}PYR}$ et **76**$_{m\text{-}PER}$ (Figure 127).

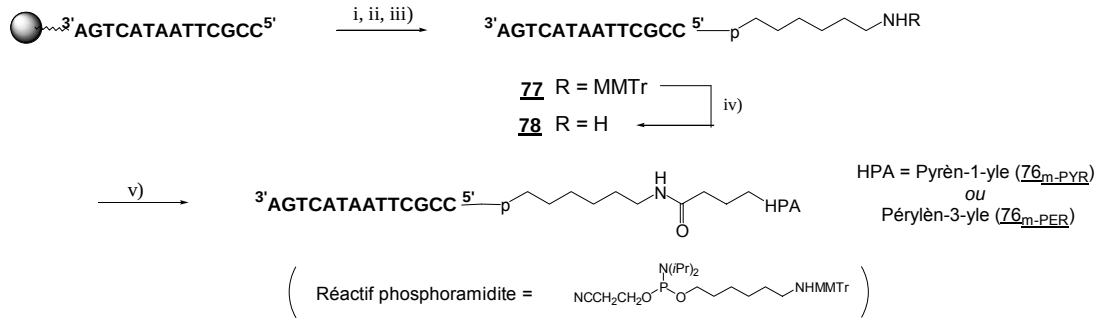


Figure 127: Séquence réactionnelle de synthèse des conjugués **76m-PYR** et **76m-PER**. Réactifs: i) Réactif phosphoramidite, tétrazole; ii) I_2, H_2O/Pyr, 1h., t.a.; iii) $NH_4OH_{conc.}$, 55°C, 16h.; iv)AcOH 80%, 30 min., t.a.; v) **62** *ou* **72**, DMF, $NaHCO_3$ 1% pH=9.

Le nombre d'atomes reliant l'extrémité 5' de l'ODN au système polycyclique des différents marqueurs reste le même pour les conjugués *mono*- et *bis*-substitués qui comportent les marqueurs FLU (9 atomes), PYR (11) et PER (11). Le bras de liaison du conjugué **76m-TO** comporte 8 atomes contre 13 pour le conjugués **76b-TO**. Les structures des conjugués obtenus sont données en figure 128.

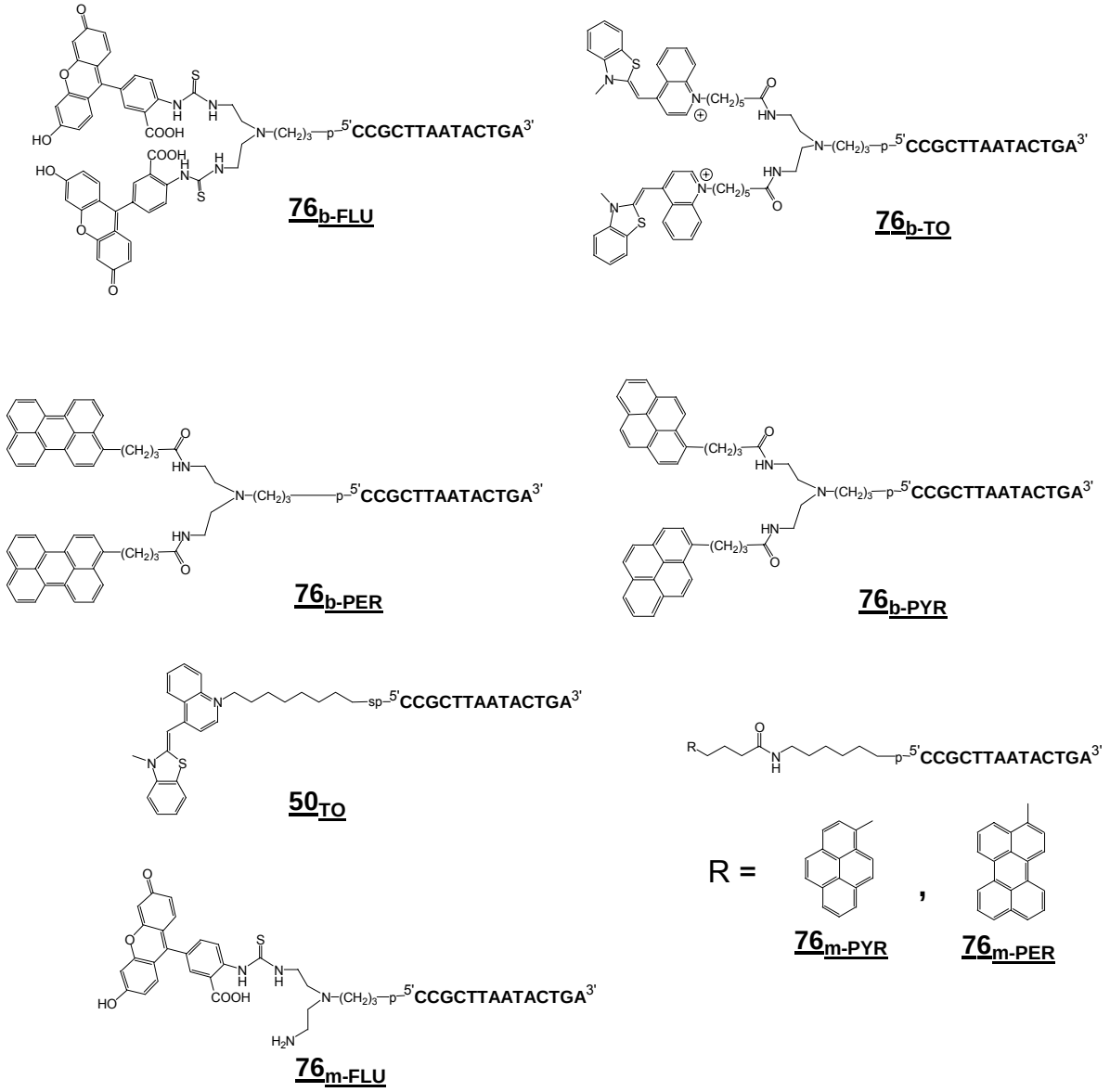


Figure 128: Structure des ODNs *bis*-marqués et *mono*-marqués

Les conjugués obtenus ont été caractérisés par spectrométrie de masse, leurs caractéristiques sont portées en tableau 19.

conjugué		Formule brute	SM		t_R [2]	Bandes d'absorption [3] λ_{max} (nm)				
Linker [1]			Th.	Observé		UV		visible		
ref [4]	-	$C_{143}H_{191}O_{85}N_{53}P_{14}$	4446,05	4444,50	8 min 48 sec	260			-	
PYR	*m*	$C_{162}H_{201}O_{86}N_{51}P_{14}$	4672,30	4671,44	26min 47sec	245	259	317	333	348
	b	$C_{183}H_{219}O_{87}N_{53}P_{14}$	4986,70	4986,40	40 min 22 sec	244	265	316	332	348
PER	*m*	$C_{166}H_{203}O_{86}N_{51}P_{14}$	4722,37	4721,89	31 min 32 sec	255		398	421	449
	b	$C_{191}H_{223}O_{87}N_{53}P_{14}$	5086,82	5086,89	46 min 06 sec	255		404	423	451
TO	*m*	$C_{162}H_{203}O_{84}N_{52}P_{14}S_2$	4719,46	4719,11	-	240	262		515 [5]	
	b	$C_{191}H_{237}O_{87}N_{57}P_{14}S_2$	5221,09	5218.*90*	17 min 38 sec	241	262	484		509
FLU	*m*	$C_{164}H_{203}O_{90}N_{54}P_{14}S$	4835,44	4834,75	13 min 10 sec	258			493 [6]	
	b	$C_{185}H_{215}O_{95}N_{55}P_{14}S_2$	5224,83	5224,06	16 min 37 sec	241	257	477		491

[1] *m*: mono-marqué; *b*: bis-marqué. Tous les ODNs possèdent la même séquence. Les chromophores des dérivés *mono*-PYR et *mono*-PER sont liés à l'extrémité 5' de l'ODN *via* une liaison $-(CH_2)_3C(=O)NH(CH_2)_6$-*p;* le dérivé *mono*-TO *via* une liaison $-(CH_2)_8$-*p*(S) et le dérivé *mono*-FLU *via* une liaison $-NHC(=S)N(CH_2)_2N(CH_2CH_2NH_2)(CH_2)_3$-*p*.
[2] Gradient d'acétonitrile: 8% à 56% en 60 minutes.
[3] Les spectres ont été enregistrés dans l'eau distillée à pH=7 à t.a. excepté pour les dérivés de la fluorescéine dont les spectres ont été enregistrés dans un tampon cacodylate à pH=10.
[4] Référence: ODN **61**
[5] Epaulement vers 490 nm.
[6] Epaulement de faible intensité vers 470 nm

Tableau 19: Caractéristiques des conjugués 5'-*mono* et 5'-*bis* marqués

L'aspect visuel des ODNs *bis*-substitués est différent de celui *mono*-substitués. Ainsi la solution aqueuse de *mono*-pérylène **76**$_{m\text{-}PER}$ est jaune fluorescente avec des reflets bleutés, tandis que celle du conjugué *bis*-pérylène **76**$_{b\text{-}PER}$ est jaune mat. La solution du conjugué *mono*-fluoresceine **76**$_{m\text{-}FLU}$ est également orange avec une fluorescence verte, tandis que celle du dérivé *bis* **76**$_{b\text{-}FLU}$ est orange mat. Enfin, la solution du dérivé *mono*-TO **50**$_{TO}$ est rose avec des reflets verts alors que celle du conjugué *bis*-TO est orange **76**$_{b\text{-}TO}$.

2.4. Etudes par spectroscopie d'absorption, sondes libres

2.4.1 Dérivés du pyrène et du pérylène

Les conjugués pyrène **76**$_{b\text{-}PYR}$ et pérylène **76**$_{b\text{-}PER}$ ont des comportements voisins. Dans le domaine visible, les maxima d'absorption des conjugués *mono*- et *bis*-substitué sont peu différents. Les conjugués pyrène **76**$_{m\text{-}PYR}$ et **76**$_{b\text{-}PYR}$ présentent des spectres très structurés avec trois maxima vers 316, 332 et 348 nm et une bande vers 260 nm qui correspond à la somme de la contribution de l'absorbance des bases nucléiques et de l'absorbance du pyrène. Le pyrène posséde une très forte absorbance en UV suffisante pour modifier l'aspect habituel de cette bande, on observe donc deux bandes à 243 et 264 nm.

Les conjugués du pérylène **76**$_{m\text{-}PER}$ et **76**$_{b\text{-}PER}$ présentent un spectre également structuré dans le domaine visible à 398, 423 et 451 nm, la bande à 260 nm est peu affectée par la contribution du pérylène. La partie visible des spectres des conjugués *bis*-substitués présente donc un aspect très proche de ceux des dérivés *mono*-subsitués. Toutefois un hypochromisme important (environ 30%) du spectre d'absorption dans le domaine visible de ces conjugués est observé (Spectres de **76**$_{m\text{-}PER}$ et **76**$_{b\text{-}PER}$ présentés en figure 129).

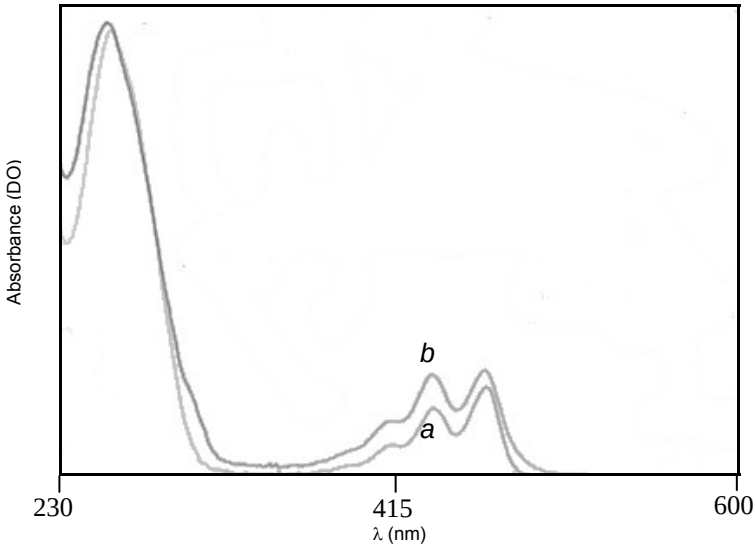


Figure 129: Spectres UV d'un conjugué *mono*-PER **76**$_{m\text{-}PER}$ (a) et *bis*-PER **76**$_{b\text{-}PER}$ (b) normalisés à 260 nm. Dans les deux cas on observe DO_{260} < 0,3.

La valeur de ε des dérivés *bis*-pyrène **76**$_{b\text{-}PYR}$ et *bis*-pérylène **76**$_{b\text{-}PER}$ est inférieure au double de celles des ODNs *mono*-substitués correspondants (tableau 21) ce qui est caractéristique des composés bichromophoriques et a été observé avec des conjugués *bis*-pyrène [36] et d'autres familles de composés polyaromatiques [210]. D'autre part, l'intensité relative de la bande visible centrale (423 nm) augmente dans le cas du dérivé *bis*-PER **76**$_{b\text{-}PER}$ comparée à celle du *mono*-PER **76**$_{m\text{-}PER}$. Le rapport des intensités des bandes d'absorption à 423 nm et 451 nm (Abs_{451}/Abs_{423}) varie de 1,3 pour le dérivé *mono* à 1,0 pour le dérivé *bis*.

Dans le cas des dérivés *bis*-PYR **76**$_{b\text{-}PYR}$ et *bis*-PER **76**$_{b\text{-}PER}$, les λ_{max} d'absorption sont légèrement décalés vers le bleu après élévation de température et leurs deux bandes principales subissent des variations d'intensité opposées. Lorsqu'on étudie les variations du spectre UV-visible du conjugué *bis*-PYR **76**$_{b\text{-}PYR}$ en fonction de la température, on note un léger déplacement vers le bleu des bandes à 333 et 348 nm et un hyperchromisme de la bande à 333 nm plus marqué que celui de la bande à 348 nm.

Le dérivé **76**$_{b\text{-}PER}$ se comporte de manière similaire. Lors de l'élévation de la température, les deux bandes à 423 et 451 nm se déplacent vers le bleu. Cependant que la bande à 423 nm subit un léger hyperchromisme (+6%), on observe un hypochromisme de la bande à 451 nm (-4%) (Figure 130).

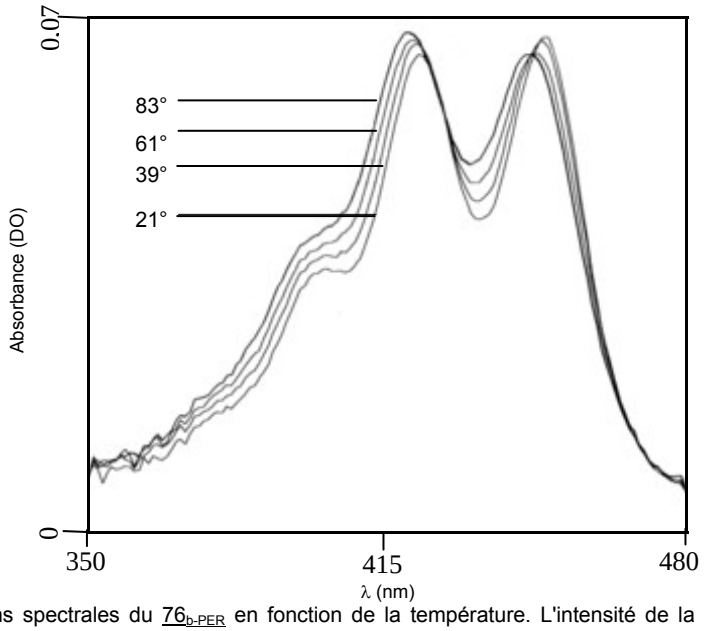


Figure 130: Variations spectrales du $\underline{76_{b\text{-}PER}}$ en fonction de la température. L'intensité de la bande à 423 nm augmente tandis que celle à 451 nm diminue

2.4.2 Dérivé du thiazole orange

Le conjugué **$\underline{76_{b\text{-}TO}}$** présente en visible un spectre nettement différent de celui du conjugué *mono*-TO **$\underline{50_{TO}}$** (Figure 131). En effet, les spectres d'absorption UV-visible des conjugués oligonucléotidiques du TO présentent un maximum vers 510 nm avec un épaulement vers 485 nm [121,123,124,128]. Le spectre du conjugué ODN *bis*-TO présente, à basse température, deux bandes distinctes à 484 et 510 nm.

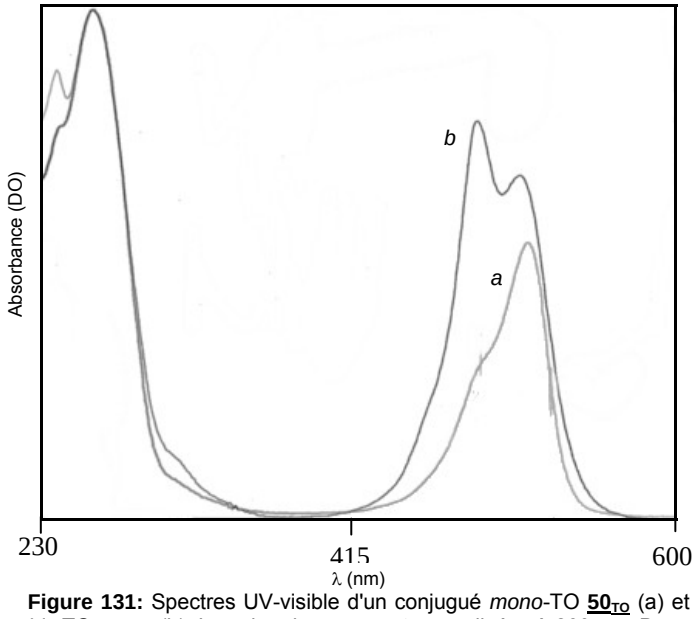


Figure 131: Spectres UV-visible d'un conjugué *mono*-TO **$\underline{50_{TO}}$** (a) et *bis*-TO **$\underline{76_{b\text{-}TO}}$** (b). Les absorbances sont normalisées à 260 nm. Dans les deux cas, on observe DO_{260} < 0,6. Tampon cacodylate, t.a. Le composé *bis* se distingue par des maxima vers 240 nm et 485 nm.

Il a été postulé que la bande à 485 nm est caractéristique de l'espèce TO dimérique, puisque celle-ci croît avec l'augmentation de la concentration en TO [73].

En augmentant la température progressivement de 3 à 80°C on observe une légère augmentation (+15%) de l'intensité de la première bande, ainsi qu'un déplacement vers le bleu de son maximum à

481 nm. Simultanément, on note une décroissance plus forte (-35%) de l'intensité de la bande à 510 nm qui est réduite à un épaulement (voir figure 132).

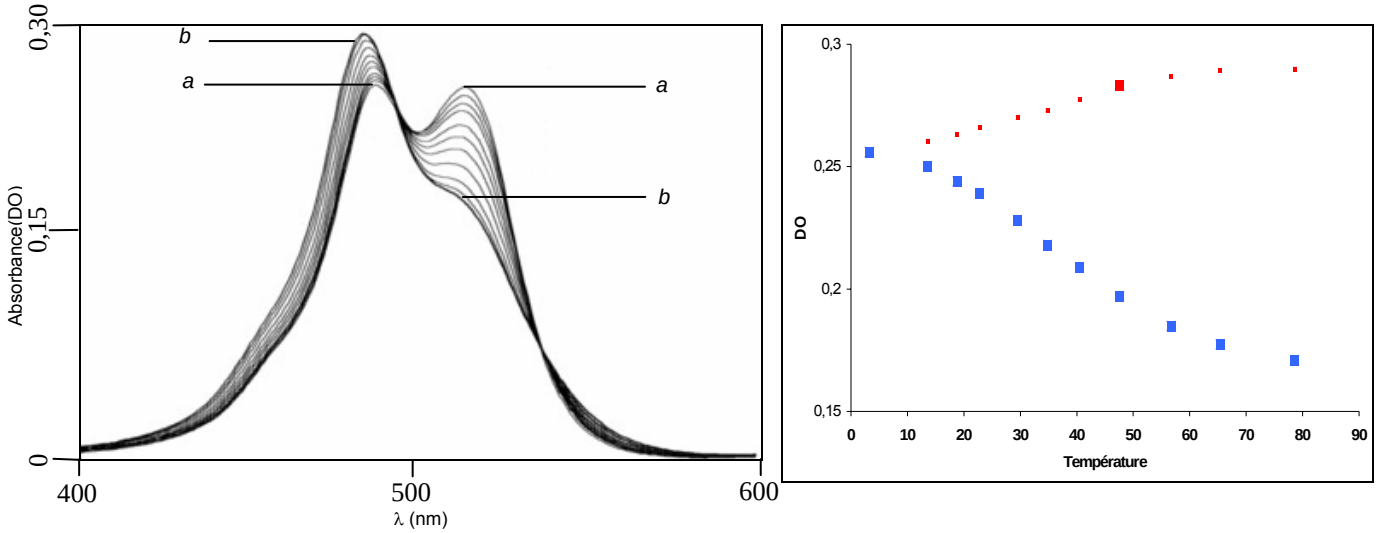


Figure 132: *A gauche:* Evolution de la partie visible du spectre d'absorption d'une solution de **76**$_{b\text{-}TO}$ en fonction de la température. *[bis*-TO] = 2,2µM dans le tampon cacodylate à 3,2°C (a) à 78,6°C (b). *A droite*: Absorbance à 485 nm (rouge) et 510 nm (bleu) en fonction de la température (mêmes conditions) . Le ratio Abs_{510}/Abs_{484} passe de 1,0 (3,2°C) à 0,6 (78,2°C)

La présence de deux points isobestiques à 491 et 532 nm permet de supposer que les variations observées sont dues à l'équilibre entre deux espèces distinctes. Cette observation peut être rapprochée de celles formulées par Svanvik à propos des conjugués PNAs *mono*-TO [121]: à basse température, de manière très majoritaire (>95% des sondes), le TO interagit avec les bases nucléiques du PNA auquel il est lié (§. B.2.2.1.1.), la fraction de sondes repliée de cette manière diminue avec l'augmentation de température. L'étude du dérivé *bis*-TO **76**$_{b\text{-}TO}$ fournit une preuve indirecte de ces observations. En effet, on peut supposer qu'à basse température l'un des deux TO est en interaction avec les bases nucléiques et est, de ce fait, éloigné du deuxième TO, réduisant ainsi le phénomène de dimérisation, ce qui se traduit par un rapport des intensités Abs_{510}/Abs_{484} élevé. A haute température, conformément aux observations de Svanvik, le premier TO est expulsé de sa position aux environs des bases nucléiques et se retrouve à proximité du deuxième TO permettant ainsi la formation de dimères et donc, comme observé, la diminution du rapport Abs_{510}/Abs_{484}.

2.4.3 Dérivés de la fluorescéine

La partie visible du spectre d'absorption du conjugué *bis*-fluorescéine **76**$_{b\text{-}FLU}$ ne correspond pas simplement à celle du conjugué *mono*-fluorescéine avec une intensité doublée (Figure 133), contrairement à ce qui a été observé avec des ODNs comportant deux groupes fluorescéines éloignées de neuf bases l'une de l'autre [211]. Cela démontre que la fluorescéine est capable d'interaction avec son milieu et que son spectre UV-visible est sensible à ces modifications d'environnement.

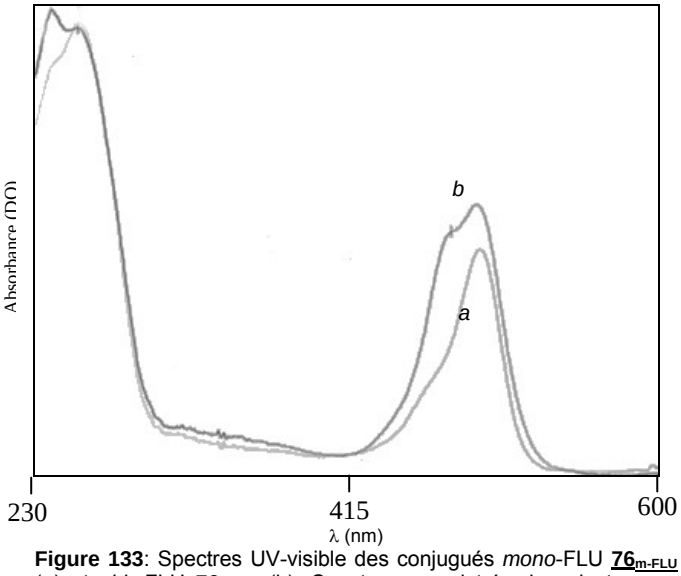


Figure 133: Spectres UV-visible des conjugués *mono*-FLU **76$_{m\text{-}FLU}$** (a) et *bis*-FLU **76$_{b\text{-}FLU}$** (b). Spectres enregistrés dans le tampon cacodylate à pH=10, t.a. Spectres normalisés à 257 nm. Dans tous les cas, on observe DO_{260} < 0,3.

Le spectre d'absorption du conjugué *mono*-FLU **76$_{m\text{-}FLU}$** présente une bande unique à 493 nm avec un faible épaulement vers 470 nm. Le spectre de **76$_{b\text{-}FLU}$** comporte toujours une bande majoritaire à 491 nm, une seconde bande qui se détache très légèrement à 477 nm ainsi qu'une bande située à 241 nm qui se détache plus nettement. La valeur du coefficient d'extinction molaire (ε_{491}) de l'ODN **76$_{b\text{-}FLU}$** n'est que 1,44 fois supérieure à celui de l'ODN *mono* substitué **76$_{m\text{-}FLU.}$** Le conjugué ODN *bis*-FLU **76$_{b\text{-}FLU}$** présente à haute température un spectre d'absorption différent de celui décrit ci-dessus. Le λ_{max} est déplacé à 494 nm et son intensité augmente de 10% tandis que l'intensité de la bande que l'on distingue à basse température à 477 nm diminue de 13% pour devenir un épaulement (Figure 134, encadré c). Lors du chauffage, deux phénomènes distincts peuvent être observés. A faible température, entre 6 et 32°C, l'élévation de température n'a pas d'influence notable sur les λ_{max} ni sur l'intensité de la bande majoritaire (491 nm), tandis que l'intensité de la bande à 477 nm diminue légèrement (Figure 134, encadré a). Entre 32 et 81°C, un déplacement bathochromique de la bande principale accompagné d'une augmentation de son intensité est observé, tandis que la bande à 477 nm continue à décroître (Figure 134, encadré b). La présence de deux points isobestiques à 455 et 483 nm permet de supposer que le phénomène correspond à l'interconversion de deux espèces. Ces points ne sont pas visibles entre 6 et 32°C.

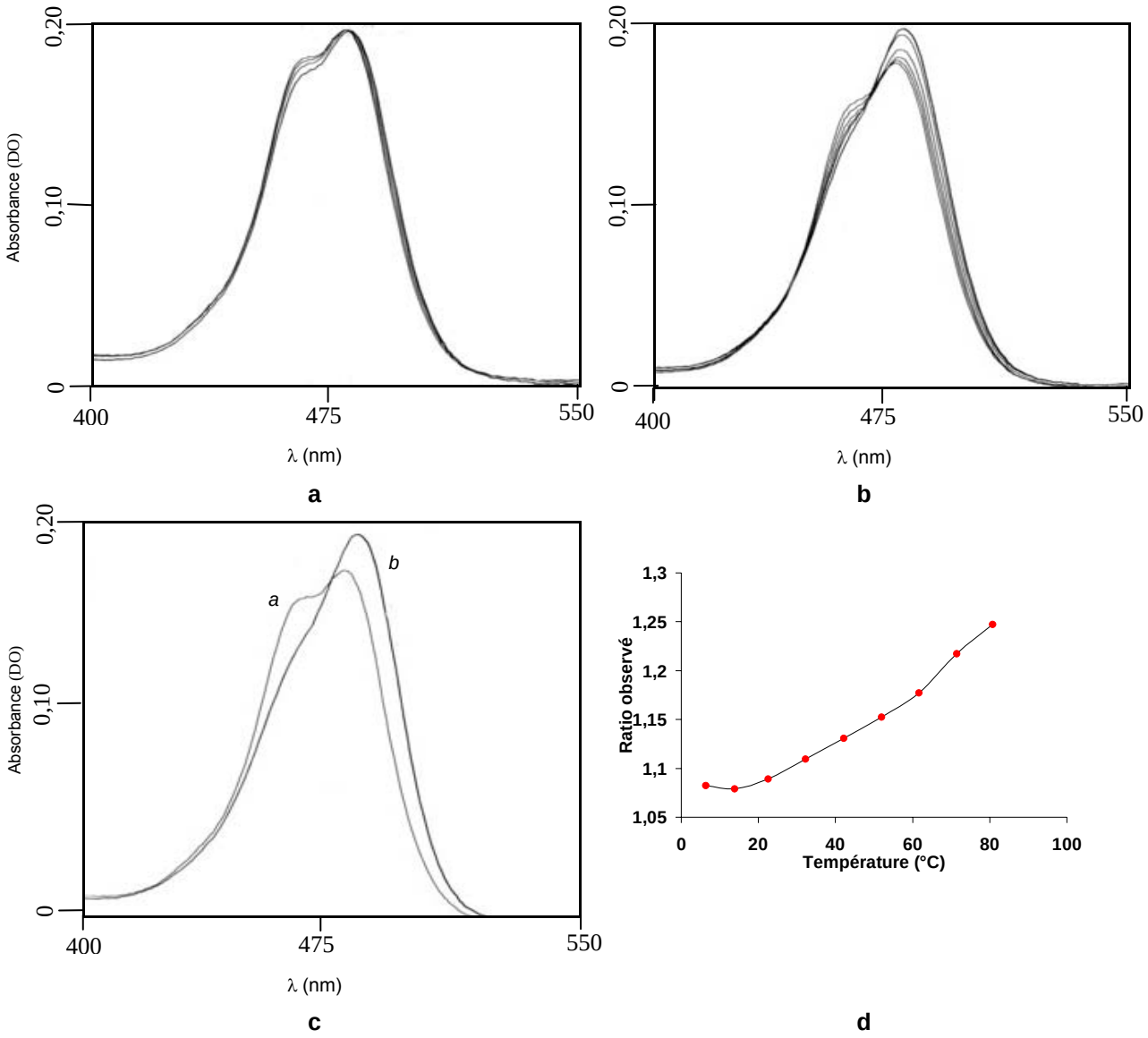


Figure 134: Variations de la partie visible du spectre d'absorption d'une solution de l'ODN **76**$_{b\text{-}FLU}$ en fonction de la température. 1 µM dans le tampon cacodylate à pH=10,0. a: Variations entre 6 et 32°C; b: variations entre 32 et 81°C; c: spectres à 6°C (*a*) et 81°C (*b*) et d: variation du rapport Abs_{491}/Abs_{480} en fonction de la température.

D'autre part, qu'à haute température, on peut noter que la bande visible des spectres d'absorption des conjugués **76**$_{b\text{-}FLU}$ et **76**$_{m\text{-}FLU}$ sont de forme similaire, avec cependant différentes intensités (Figure 134, encadré c). On peut supposer que les interactions FLU/FLU sont amoindries par la température et que les deux unités FLU du conjugué *bis*-FLU peuvent être assimiliées à deux résidus FLU indépendants l'un de l'autre. Réciproquement cela confirmerait que la fluorescéine est capable d'interaction avec d'autres molécules à basse température et que son spectre est susceptible d'en être altéré.

2.5 Etudes par spectroscopie d'absorption, sondes hybridées

A basse température, en présence d'un équivalent de cible **32**, les spectres d'absorption des différents composés *bis*-marqués sont modifiés avec, en dénominateur commun, un léger hypochromisme.

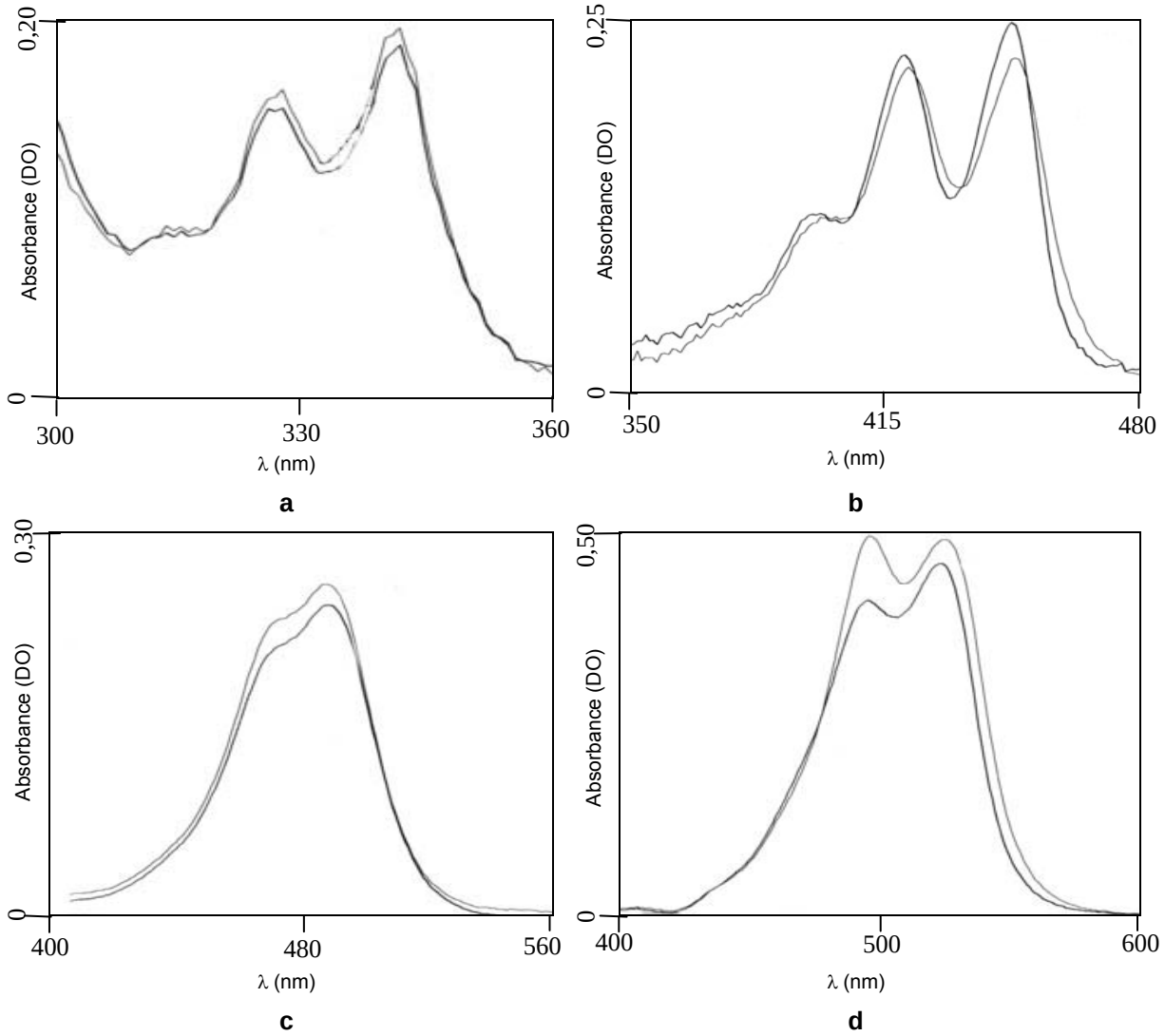


Figure 135: Partie visible des spectres d'absorption des ODNs *bis*-marqués seuls et en présence d'un équivalent de cible 27mer. Dans tous les cas, le spectre du conjugué hybridé est celui de plus faible intensité. Spectres enregistrés à 1µM; 1mL; duplex 1:1; dans le tampon cacodylate. Après ajout de la solution de l'ODN cible (30µL), le conjugué subit une dilution de 3%. **a**: *bis*-PYR (**76**$_{b\text{-}PYR}$) à 26°C; **b**: *bis*-PER (**76**$_{b\text{-}PER}$) à 27°C; **c**: *bis*-FLU (**76**$_{b\text{-}FLU}$) à 26°C (dans ce cas, pH=10,0) et **d**: *bis*-TO (**76**$_{b\text{-}TO}$) à 6°C.

L'étude des variations spectrales des conjugués *bis*-marqués lors de l'hybridation montre que celles-ci sont très faibles. On note un déplacement du λ_{max} d'absorption vers le rouge de 0 à 2 nm ainsi qu'une diminution très faible de l'intensité d'environ 3% (Figure 135). L'exception notable est la diminution plus importante (-15%) de l'intensité de la bande à 485 nm du conjugué **76**$_{b\text{-}TO}$ lors de l'hybridation (Tableau 20). Cette bande est attribuée à la fraction des sondes dont les deux unités TO sont à proximité l'une de l'autre; on peut alors assimiler les chromophores à une espèce dimérique.

ODNs	λ_{max} (nm) libre		λ_{max} (nm) hybridé		Variation d'intensité après hybridation [a]	
76$_{b\text{-}PYR}$ [b]	349		349		-3%	
76$_{b\text{-}PER}$	423	451	423	450	- 2%	0 %
76$_{b\text{-}FLU}$	491		492		-2 %	
76$_{b\text{-}TO}$	485	511	485	509	- 15%	- 3%

Tableau 20: Modifications spectrales en UV-visible lors de l'hybridation de différents conjugués *bis*-marqués. Spectres enregistrés à 1µM; 1mL; duplex 1:1; à 26°C; tampon cacodylate; excepté pour le *bis*-TO (où T = 6°C) et le *bis*-FLU (où pH = 10,0). La solution de cible (30µL) est ajoutée à l'ODN étudié (1µM, 1mL).
[a] Les calculs tiennent compte du facteur de dilution (3%).
[b] Les caractéristiques techniques du spectrophotomètre UV (basculement de la lampe D_2 vers la H_2 à 340 nm) provoquent des fluctuations du signal empêchant une détermination précises du λ_{max} (± 2 nm)

Dans le même temps, l'intensité de la bande vers 510 nm, attribuée au TO monomérique, ne diminue que de 3%. Ce résultat est à rapprocher de celui observé pour le conjugué ODN *mono*-TO **50$_{TO}$**, de même séquence et dont le chromophore est lié par une chaîne octaméthylène. Lors de l'hybridation, une diminution plus importante de l'intensité (-13%) avait été observée (tableau 15). En rapprochant ces deux observations, on peut supposer que, dans le cas du conjugué *bis*-TO **76$_{b\text{-}TO}$**, la fraction de sondes comportant des TO dimériques diminue au profit de celles comportant des TO monomériques. Etant donné que ce phénomène est observé au cours de l'hybridation, on peut supposer que les unités TO ont une certaine propension à interagir avec le duplex formé et, ainsi, à les interactions TO / TO sont défavorisées. Ceci est confirmé par le fait que, dans le cas du TO libre, les interactions avec l'ADN double brin sont supérieures à celles avec le TO simple brin.

2.5.1 Coefficients d'extinction molaires

Les coefficients d'extinction molaire des conjugués *bis*-TO **76$_{b\text{-}TO}$** et *bis*-PER **76$_{b\text{-}PER}$** ont été déterminés par titration (voir partie expérimentale). Du fait de l'hypochromisme résultant de l'hybridation des sondes à leur cible, l'absorbance du duplex est inférieure à la somme des absorbances des deux brins.

ODNs	ε_{260} ($M^{-1}cm^{-1}$)[1]	$\varepsilon_{marqueur}$ ($M^{-1}cm^{-1}$)[2]	
76$_{b\text{-}FLU}$	48000	111600 *(491)*	
76$_{b\text{-}PYR}$	45000	51300 *(349)*	
76$_{b\text{-}PER}$	55100	45400 *(451)*	
76$_{b\text{-}TO}$	24300	122500 *(484)*	110000 *(512)*

Tableau 21: Coefficients d'extinction molaires des ODNs *bis*-marqués étudiés.
[1] Contribution du marqueur à 260 nm
[2] Les chiffres entre parenthèses correspondent au λ_{max} auquel se rapporte la valeur de ε.

La contribution du marqueur à 260 nm (ε_{260}) du conjugué **76$_{b\text{-}PYR}$** a été évaluée à 45000 $M^{-1}cm^{-1}$ ce qui est en accord avec la valeur donnée pour un conjugué *mono*-Pyr (ε_{260}=24000 $M^{-1}cm^{-1}$) [35] et celle donnée pour un composé *bis*-(1-pyrenylethyl)amine (estimée entre 35000 et 45000 $M^{-1}cm^{-1}$) [154]. Au regard du spectre du composé **76$_{b\text{-}PYR}$** on en déduit que ε_{349}=51300 $M^{-1}cm^{-1}$, ce qui est proche de la valeur trouvée pour le maximum d'absorption en visible d'un autre conjugué *bis*-pyrène (ε = 55000 $M^{-1}cm^{-1}$)[164].

Le coefficient d'extinction molaire à 260 nm du chromophore du conjugué **76$_{b\text{-}PER}$** a été évalué à 55100 $M^{-1}cm^{-1}$. Ce qui correspond assez bien à la valeur déterminée par Fedorova par une autre méthode pour un conjugué *mono*-PER qui trouve une valeur de 24300 $M^{-1}cm^{-1}$ soit environ moitié

moins [174,175]. Par contre, la valeur de ε_{451} (45400 $M^{-1}cm^{-1}$) est bien inférieure au double de la valeur de ε_{450} (31100 $M^{-1}cm^{-1}$) déterminée par la même équipe pour un ODN *mono*-PER, ce qui confirme l'existence d'un fort hypochromisme lorsque les deux unités pérylènes se trouvent proches l'une de l'autre.

La valeur ε_{260} du chromophore du conjugué **76**$_{b\text{-}TO}$ (24300 $M^{-1}cm^{-1}$) est également environ le double de celle trouvée pour la contribution du TO dans le cas du dérivé *mono*-TO **50**$_{TO}$ (9500 $M^{-1}cm^{-1}$, voir tableau 11). Du fait de la formation partielle d'une espèce TO dimérique, la valeur de ε_{512} (110000 $M^{-1}cm^{-1}$) est nettement inférieure au double de la valeur obtenue avec un *mono*-TO **50**$_{TO}$ (77000 $M^{-1}cm^{-1}$). Il en en est de même pour la valeur de ε_{484}. La valeur ε_{260} du chromophore *bis*-FLU **76**$_{b\text{-}FLU}$ a été calculée en prenant le double de celle du *mono*-FLU [212] dans ces conditions le coefficient d'extinction molaire de la bande à 491 nm (111600 $M^{-1}cm^{-1}$) est nettement inférieure au double de celui du *mono*-FLU **76**$_{m\text{-}FLU}$ (77700 $M^{-1}cm^{-1}$). La formation d'une espèce, présumée être un dimère de fluorescéine, responsable d'une forte bande vers 477 nm (qui reste très faible dans le cas du dérivé *mono* correspondant) est la cause de cette observation.

2.5.2. Etude de la stabilité des duplex (tableau 22)

Parmi les conjugués *bis*-marqués étudiés, le *bis*-fluorescéine **76**$_{b\text{-}FLU}$ forme un duplex de stabilité légèrement inférieure à celle du duplex non modifié. Malgré la plus grande surface du pérylène par rapport à celle du pyrène, les stabilités des duplex **76**$_{b\text{-}PER}$•**32** et **76**$_{b\text{-}PYR}$•**32** dont très proches. L'étude ayant été réalisée avec la cible **32**, plus longue à son extrémité 5' que les sondes étudiées, on peut supposer que l'empilement des résidues pyrènes et pérylènes (selon ce qui a été déduit des études bibliographiques) est défavorisé.

ODN [1]	Tm	Δ_{Tm} [2]
76$_{b\text{-}FLU}$	40	-2,5
76$_{b\text{-}PYR}$	47,0	+3,5
76$_{b\text{-}PER}$	47,5	+4
76$_{b\text{-}TO}$	52	+8,5

[1] Hybridé avec un équivalent de la cible **32**
[2] Par rapport au duplex **30**·**32** (Tm=43,5°C)

Tableau 22: Températures de demi-dissociation des conjugués *bis*-marqués **76**$_{b\text{-}FLU}$, **76**$_{b\text{-}Pyr}$, **76**$_{b\text{-}PER}$ et **76**$_{b\text{-}TO}$

Le stabilité du duplex **76**$_{b\text{-}TO}$•**32** est supérieure à celle du duplex non modifié **30**•**32** mais également à celle du duplex formé avec la sonde *mono*-TO **50**$_{TO}$•**32** (Tm=48°C). Ce gain en stabilité observé lors du passage du conjugué *mono* au conjugué *bis* laisse supposer que, contrairement a ce qui a été conclu de l'étude de **76**$_{b\text{-}PER}$•**32** et **76**$_{b\text{-}PYR}$•**32**, les résidus TO ne s'empilent pas à l'extrémité 5' du duplex.

2.5.3 Evolution spectrale lors de la fusion du duplex.

Les caractéristiques spectrales étant peu altérées par l'ajout de la cible 27-mère **32**, la majeure partie des modifications observées sont dues aux variations de température. Toutefois, dans le domaine de température dans lequel la sonde reste hybridée, le chromophore ne subit pas toujours les mêmes modifications spectrales selon qu'il est dans un environnement duplex (sonde hybridée) ou simple brin (sonde libre). Dans le cas du composé **76**$_{b\text{-}FLU}$ on assiste toujours à une

diminution de l'intensité de l'épaulement à 477 nm et une augmentation de l'intensité de la bande à 491 nm ainsi qu'un faible déplacement vers le rouge.

Au cours de la fusion du duplex **76**$_{b\text{-}PYR}$•**32**, on observe un léger hyperchromisme des bandes à 333 et 348 nm ainsi qu'un déplacement vers le bleu.

La partie visible du spectre d'absorption du duplex **76**$_{b\text{-}PER}$•**32** présente un léger déplacement vers le bleu des bandes à 423 et 451 nm, un léger hyperchromisme de la bande à 423 nm ainsi que de la vallée vers 440 nm. L'observation des variations de la bande à 451 nm du composé **76**$_{b\text{-}PER}$ sont plus importantes. On a précédemment noté que cette bande est plus intense dans le cas du composé *mono*-PER **76**$_{m\text{-}PER}$ que dans le cas du dérivé *bis*-PER **76**$_{b\text{-}PER}$ comparativement à la bande située vers 423 nm (ratio de 1,3 contre 1,0; voir §.2.2.1). De ce fait, des bandes à 423 et 451 nm d'intensités comparables peuvent être le signe de l'aggrégation des unités PER tandis qu'une intensité supérieure de la bande à 451 nm comparativement à celle à 423 nm est davantage le signe d'un résidu PER indépendant ou, du moins, faiblement agrégé. De même l'ajout de la séquence complémentaire à l'ODN *bis*-PER **76**$_{b\text{-}PER}$ conduit à une augmentation de ce rapport, signe que l'hybridation de la sonde conduit à une séparation des deux unités PER l'une de l'autre. Ce phénomène se retrouve en suivant par spéctrométrie d'absorption UV la fusion du duplex **76**$_{b\text{-}PER}$•**32**. En effet la diminution d'intensité de la bande à 451 nm est importante au début du gradient de température (de 6 à 50°C) ce qui correspond à la fusion de l'hybride et, peut-on supposer, à l'éjection d'un des résidus PER. Ce premier chromophore se retrouve alors à proximité du second et la forme du spectre correpondant se rapproche de celle du conjugué *bis*-PER non hybridé (avec un ratio proche de 1)

La fusion de l'hybride **76**$_{b\text{-}TO}$•**32** (Figure 136) s'accompagne d'une forte augmentation d'intensité de la bande à 485 nm et d'une diminution de l'intensité de celle à 511 nm. A partir de 40°C environ, on retrouve deux points isobestiques à 491 et 527 nm qui attestent de l'équilibre entre sonde recourbée (l'un des résidus TO interagit avec les bases nucléiques auxquelles il est lié) et sonde dépliée. Ces observations avaient déjà été précédemment faites au sujet du conjugué **76**$_{b\text{-}TO}$ non hybridé. A l'inverse, en deça de 40°C l'absence de points isobestiques laisse supposer que outre l'équilibre évoqué ci-dessus, un deuxième phénomène a lieu.

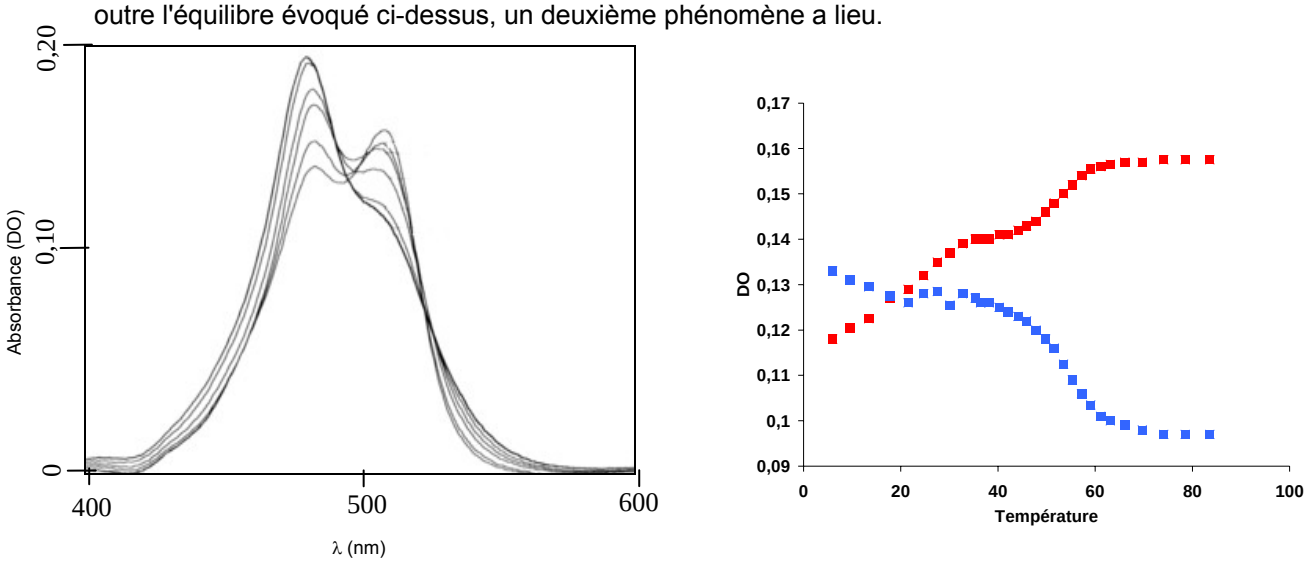


Figure 136: Evolution de la partie visible du spectre du duplex **76**$_{b\text{-}TO}$•**32** en fonction de la température. 1µM (1:1), dans tampon cacodylate. (*à gauche*: spectres UV à 6, 21, 42, 52, 61 et 84°C et , *à droite*: absorbances à 485 nm (en rouge) et à 512 nm (en bleu) en fonction de la température. (Tm=52°C).

2.6. Etude par spectroscopie de fluorescence

Nous avons étudié les propriétés de fluorescence des quatre sondes *bis*-marquées **76**$_{b\text{-}FLU}$ à **76**$_{b\text{-}PER}$. L'étude bibliographique des différents conjugués *bis*-pyrène a montré que l'hybridation d'un conjugué *bis*-pyrène avec une séquence cible s'accompagnait d'une augmentation de la fluorescence excimérique nettement plus importante si la cible choisie ne comportait pas de bases surnuméraires. Nous avons donc choisi d'étudier, outre les duplex formés avec la cible 27-mère **32**, les duplex formés avec la cible 17-mère **77** que nous nommerons duplex "à bout franc" (Figure 137).

Figure 137: Structure de la cible **77** et apariement avec l'ODN non modifié **30**

Les propriétés de fluorescence des conjugués sont répertoriées dans le tableau 23. L'ODN *bis*-pyrène **76**$_{b\text{-}PYR}$ est le moins fluorescent de la série étudiée mais, en présence de la cible **77** une importante augmentation du signal fluorescent est observée.

ODNs [1]	λ_{max} (nm) Exc.	Emission Seul	Emission Hybridé (+ 32)		Emission Hybridé (+ 77)		DS	Intensité [2] Seul	Intensité Hybridé (+ 32)		Intensité Hybridé (+ 77)		Variation [4] Hybridé (+ 32)		Variation Hybridé (+ 77)	
Bis-FLU **76**$_{b\text{-}FLU}$	490	516	515		515		26	44,0	25,3		19,1		0,56		0,43	
Bis-PYR **76**$_{b\text{-}PYR}$	348	378	378	484	376	491	30	1,64[3]	0,25	2,58	1,66	0,71	4,19	1,57	6,69	0,43	16,9
Bis-PER **76**$_{b\text{-}PER}$	451	459	459		459		8	28,4	36,9		16,1		1,30		0,57	
Bis-TO **76**$_{b\text{-}TO}$	513	534	532		530		21	26,2	32,8		21,2		1,25		0,81	

[1] Toutes les mesures sont effectuées à 6°C, à une concentration de 1µM en sonde et en cible et dans le tempon cacodylate de sodium 10mM, NaCl 100mM, pH=7 excepté pour l'ODN **76**$_{b\text{-}FLU}$ pour lequel les mesures sont effectuées à pH=10.
[2] Les intensités sont exprimées en unités arbitraires. Les valeurs fournies sont celles relevées à la longueur d'onde λ_{max} telle qu'elle est portée dans les colonnes de gauche.
[3] Mesurée à 490 nm (absence de maximum)
[4] Les variations de fluorescence sont les rapports des intensités I_{Seul}/I_{hyb} mesurées, respectivement, au λ_{max} de la sonde seule et du duplex

Tableau 23: Propriétés des conjugués *bis*-marqués **76**$_{b\text{-}FLU}$ à **76**$_{b\text{-}TO}$ étudiés par spectroscopie de fluorescence.

2.6.1. Conjugué *bis*-fluorescéine **76**$_{b\text{-}Flu}$

Le conjugué **76**$_{b\text{-}Flu}$ est celui qui possède, à l'état libre, la fluorescence la plus élevée. En présence de chacune des deux cibles **32** et **77**, l'intensité du signal fluorescent décroit mais plus fortement dans le cas du duplex "à bout franc", (**76**$_{b\text{-}FLU}$•**77**)respectivement – 44% et –57%. Cette diminution de la fluorescence est plus importante que celle observée dans le cas de conjugué *mono*-fluorescéine.

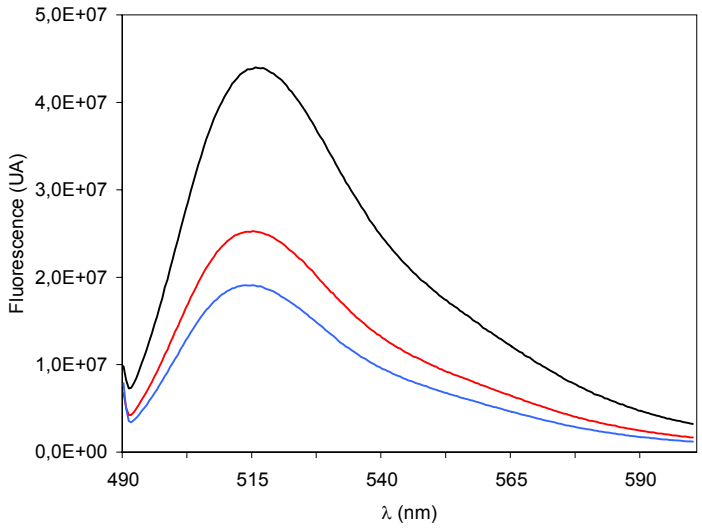


Figure 138: Spectres d'émission de fluorescence du conjugué **76**$_{b\text{-}FLU}$ non hybridé (noir), hybridé avec **32** (rouge) et avec **77** (bleu)

2.6.2. Conjugué *bis*-pyrène **76**$_{b\text{-}PYR}$

Le conjugué *bis*-pyrène **76**$_{b\text{-}PYR}$ présente, sous forme libre, une fluorescence essentiellement monomérique. Le rapport des intensités de fluorescence est I_{490} / I_{378} = 0,15. Conformément aux résultats décritrs dans la littérature, on peut supposer que, dans cette sonde, l'un des résidus pyrène est en interaction avec les bases nucléiques et, de ce fait, éloigné du second résidu pyrènes. Le duplex **76**$_{b\text{-}PYR}$• **32** émet un signal excimérique marqué, à λ=481 nm d'intensité 7 fois supérieure. La fluorescence d'origine monomérique augmente également de telle manière que I_{490} / I_{378} = 0,64. De manière plus intéressante, le duplex "à bout franc" **76**$_{b\text{-}PYR}$• **77** présente un signal fluorescent essentiellement d'origine excimérique (I_{490} / I_{378} = 5,90) et l'hybridation s'accompagne d'une augmentation de l'intensité de fluorescence d'un facteur 17 environ à λ=490nm.

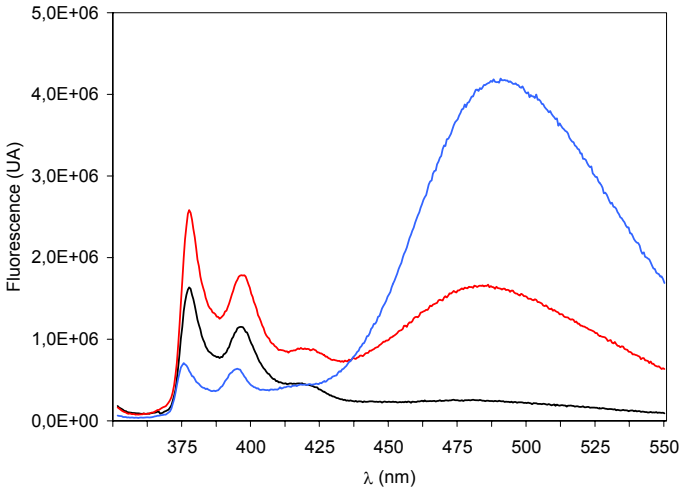


Figure 139: Spectres d'émission de fluorescence du conjugué **76**$_{b\text{-}PYR}$ non hybridé (noir), hybridé avec **32** (rouge) et avec **77** (bleu)

En nous basant sur des études effectuées avec d'autres dérivés *bis*-pyrène, nous pouvons supposer que, dans les duplex formés par l'ODN **76**$_{b\text{-}PYR}$ les deux résidus pyrènes s'empilent à l'extrémité du duplex formé parallèlement aux plan des bases terminales. Cette hypothèse est corroborée par le

fait que, dans le cas du duplex à "bout franc" formé avec la cible **77**, la fluorescence excimérique est 2,5 fois supérieure à celle obtenue dans le cas du duplex formé avec la cible **32**. En effet, la présence de bases nucléiques au delà du plan formé par la cytosine 5'-terminale, liée aux chromophore *bis*-pyrène, et la guanine présente sur le brin opposé, perturbe l'empilement des groupes pyrènes encombrants.

2.6.3. Conjugué *bis*-pérylène **76**$_{b\text{-}PER}$

Le conjugué *bis*-pérylène **76**$_{b\text{-}PER}$ présente, en spéctrométrie d'émission de fluorescence, un spectre structuré comportant trois bandes à 460, 490 et 523 nm. En présence de la séquence cible complémentaire **32** on observe une faible augmentation de l'intensité du signal fluorescent λ=460 nm (+ 30%) et une diminution de l'intensité de la bande à 523 m (-19%). Par contre, en présence de la cible **77**, le duplex "à bout franc" formé présente une fluorescence inférieure quelle que soit la bande considérée avec des diminutions comprises entre 56 à 60% (Figure 140, à gauche). Nous assistons donc à deux phénomènes différents selon la structure de la cible.

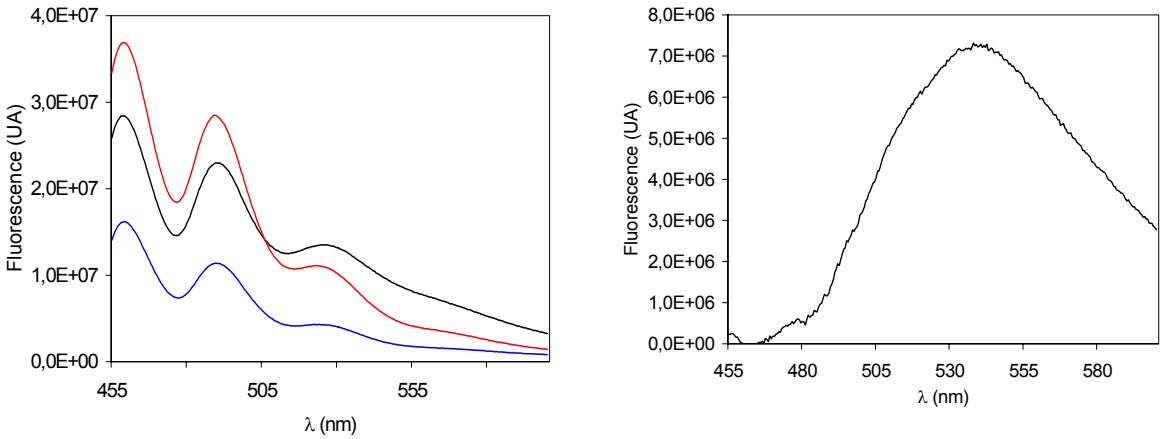


Figure 140: *à gauche:* Spectres d'émission de fluorescence du conjugué *bis*-pérylène **76**$_{b\text{-}PER}$ seul (en noir), hybridé avec la séquence cible **32** (en rouge) et avec la séquence cible **77** (en bleu), [**76**$_{b\text{-}PER}$=1µM]
à droite: composante excimérique de la fluorescence du conjugué **76**$_{b\text{-}PER}$. La courbe a été obtenue après soustraction du spectre du duplex **76**$_{b\text{-}PER}$•**32** (en rouge) du spectre de **76**$_{b\text{-}PER}$ (en noir) normalisés à λ=459nm

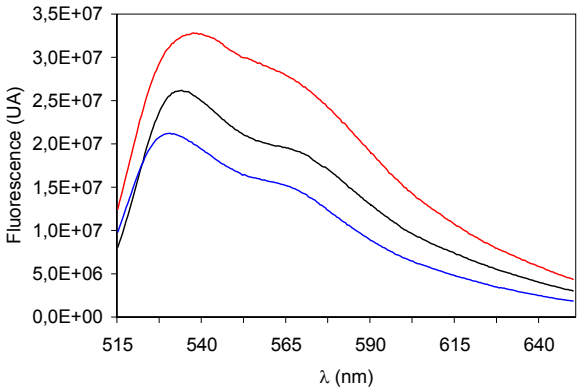
Une observation intéressante est le fait que la fluorescence du conjugué **76**$_{b\text{-}PER}$ reste non nulle, même à grande longueur d'onde (600 nm) ce qui est différent de ce qui est observé avec le pérylène libre [56]. Pour mettre en exergue la composante spectrale responsable de ce phénomène, on soustrait le spectre du duplex **76**$_{b\text{-}PER}$•**32** (Figure 140, à gauche et en rouge) après l'avoir normalisé du spectre du conjugué seul **76**$_{b\text{-}PER}$ (en noir). On met ainsi en évidence, une large bande qui présente un maximum à λ=540 nm. Cette composante ayant un maximum d'émission nettement décalé par rapport au maximum d'émission de la troisième bande du spectre de fluorescence (λ=523 nm), on ne peut l'attribuer à une simple variation d'intensité de cette dernière. Nous supposons que ce phénomène est du à la formation d'une espèce excimérique du pérylène, comme constaté précédemment avec le pérylène libre en solution [213,214], le pérylène colloïdal [171] à λ=565 nm et des composés macromoléculaires comportant des résidus pérylène [187], bien que l'excimérie n'ait pas été évoquée comme explication .

Le conjugué **76**$_{b\text{-}PER}$ est le premier décrit pour lequel l'excimérie du pérylène est à l'origine de la variation de fluorescence. Toutefois, alors que l'intensité de la bande attribuée à l'espèce excimérique augmente fortement lors de l'hybridation du conjugué *bis*-pyrène **76**$_{b\text{-}PYR}$, celle observée dans le cas du composé *bis*-pérylène (**76**$_{b\text{-}PER}$) diminue, principalement dans le cas de la formation du duplex "à bout franc" **76**$_{b\text{-}PER}$•**77**. Ainsi à λ=540nm, on observe une décroissance du signal fluorescent de 47% après hybridation avec la cible **32** et de 73% après hybridation avec la cible "à bouts francs" **77**.

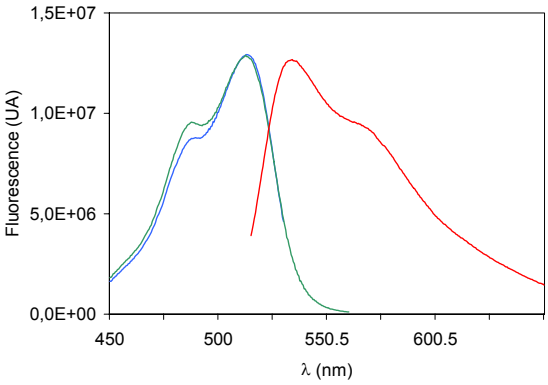
2.6.4. Conjugué *bis*-TO **76**$_{b\text{-}TO}$

L'intensité du signal fluorescent émis par le *bis*-TO **76**$_{b\text{-}TO}$ à 530 nm est voisine de celle du signal fluorescent émis par le *mono*-TO **50**$_{TO}$ mais est supérieure à λ=570nm qui correspond à la longueur d'onde maximum d'émission du TO dimérique (Figure 141, encadré 3) comme le montrent les spectres d'excitation sur lesquels on observe que la bande à 485 nm contribue plus fortement à l'émission de fluorescence observée à 570 nm que ne le fait la bande à 510 nm (Figure 141, encadré 2).

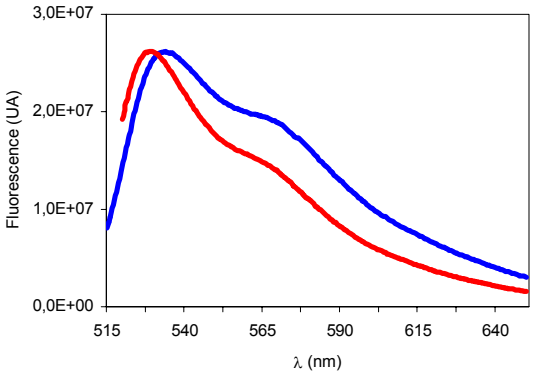
On observe que l'intensité du signal fluorescent est augmentée de 25% après hybridation avec la cible **32** tandis qu'elle diminue lors de l'hybridation avec la cible "à bout franc" **77**. Dans les mêmes conditions, l'hybridation du conjugué *mono*-TO **50**$_{TO}$ avec **32** s'accompagnait d'une diminution de l'intensité de fluorescence de 61% (§. B.3.5.3.2.2.).



1



2



3

Figure 141: *Encadré 1:* Fluorescence du conjugué *bis*-TO **76**$_{b\text{-}TO}$ seul (en noir), hybridé avec la séquence complémentaire **32** (en rouge) et avec la cible complémentaire **77** (en bleu). *Encadré 2*: Fluorescence du conjugué *bis*-TO **76**$_{b\text{-}TO}$ seul (en rouge), spectre d'excitation du *bis*-TO **76**$_{b\text{-}TO}$ (λ_{Em} = 530 nm, en bleu; λ_{Em} = 570 nm, en vert). *Encadré 3*: Fluorescence du conjugué *bis*-TO **76**$_{b\text{-}TO}$ seul (en bleu) et du conjugué *mono*-TO **50**$_{TO}$ (en rouge). Les spectres sont normalisés aux maxima d'intensité

Les intensités des signaux fluorescents émis par le conjugué **76$_{b\text{-}TO}$** et le duplex **76$_{bTO}$•32** diminuent avec l'augmentation de la température comme cela avait été constaté avec le dérivé *mono*-TO **50$_{TO}$** (Figure 142, à gauche). Toutefois, cette décroissance est plus accentuée dans le cas de la sonde libre que dans le cas du duplex. D'autre part, nous avons vu par spectrométrie d'absorption (§ C.2.4.2.) que l'intensité relative des bandes varie selon la température. Le même phénomène est observé en fluorescence puisque le rapport I_{530}/I_{570} varie de 1,40 à 6°C jusqu'à 1,05 à 50°C. De ce fait, l'augmentation de l'intensité de fluorescence varie selon la température et la longueur d'onde de travail. L'étude de ces paramètres (Figure 142, à droite) montre que les augmentations les plus importantes sont obtenues à des températures proches de la température de demi-dissociation d'une part et à des longueurs d'onde autres que le λ_{max} d'émission du conjugué alors que les mesures sont habituellement effectuées à basse température et au maximum d'émission de fluorescence. Alors qu'une augmentation modeste (+20%) est observée à 6°C et à $\lambda=\lambda_{max}$=530nm une augmentation plus conséquente (+100%) est obtenue à plus haute température (36°C) et à λ=524nm.

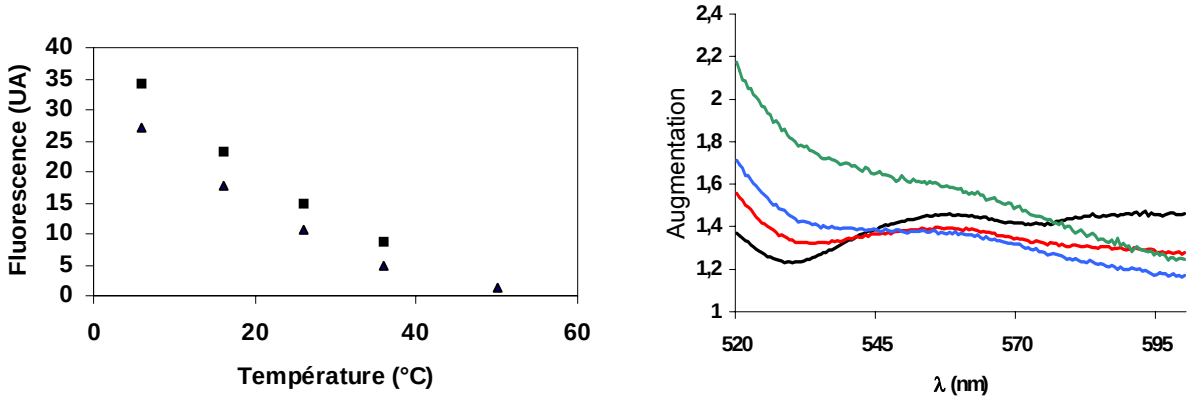


Figure 142: *A gauche*: intensité du signal fluorescent émis à 530 nm par la sonde **76$_{b\text{-}TO}$** libre (triangles) et hybridée à **32** (carrés) en fonction de la température. *A droite*: Augmentation de l'intensité de fluorescence à différentes longueurs d'onde observée au cours de l'hybridation de **76$_{b\text{-}TO}$** à **32** aux températures de 6°C (noir), 16°C (rouge), 26°C (bleu) et 36°C (vert).

Conclusion

Les quatre conjugués *bis*-marqués en position 5' que nous avons synthétisés présentent tous un signal fluorescent dont l'intensité est modifiée en présence de séquence cible. L'augmentation obtenue avec le conjugué *bis*-pyrène (**76$_{b\text{-}PYR}$**) est particulièrement élevée (17 fois) et la formation de l'espèce excimérique s'accompagne d'une modification de la valeur de λ_{max}, puisque l'on passe à une sonde émettant un signal de nature monomérique à l'état libre (λ_{max}=348 nm) à une sonde émettant un signal de nature excimérique (λ_{max}=490 nm) en présence de cible.

Les résultats obtenus avec le *bis*-TO (**76$_{b\text{-}TO}$**) et le *bis*-pérylène (**76$_{b\text{-}PER}$**) sont moins bons puisque l'augmentation de fluorescence n'est que de 30% après hybridation avec **32**. Toutefois, ces composés étant totalement nouveaux, des travaux restent à réaliser pour tenter d'améliorer leur propriétés. La position d'ancrage des marqueurs devrait être un facteur déterminant dans le cas du composé **76$_{b\text{-}TO}$**. L'intercalation d'un chromophore TO étant peut-être facilitée lorsqu'il se trouve en position internucléotidique. L'étude des spectres d'absorption montrent que l'hypothèse de

chromophores TO présents sous forme dimérique dans la sonde libre et monomérique dans la sonde hybridée est confirmée, même si le phénomène n'est pas aussi intense qu'attendu.

Le composé **76**$_{\text{b-PER}}$ présente dans son spectre d'emission, une bande attribuée à la formation d'excimères; cette propriété n'avait pas été exploitée jusqu'alors pour le marquage des sondes oligonucléotidiques. Le signal excimérique du pérylène (λ_{max}=540 nm) étant très décalé par rapport au signal monomérique (λ_{max}=460 nm), ce type de sonde pourrait se révéler intéressant pour la détection d'acides nucléiques. Les études menées sur des polymères du pérylène montrent que l'intensité du signal fluorescent peut être nettement plus élevée et que, par conséquent, la structure de nos sondes peut être améliorée. Les bons résultats obtenus avec le conjugué **76**$_{\text{b-PYR}}$ nous laissent supposer que le format d'hybridation est le bon. Toutefois, étant donné la taille supérieure du pérylène comparée à celle du pyrène, la conception de sonde dont le bras de liaison serait plus souple (pour donner aux groupes pérylènes davantage de degré de liberté) constituerait une voie intéressante pour améliorer les propriétés de ce type de conjugués.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de nos travaux était la conception et l'étude de sondes oligonucléotidiques dont le signal fluorescent est modifié au cours de l'hybridation.

Pour pouvoir synthétiser certaines de nos sondes, nous avons mis au point un nouveau réactif permettant l'incorporation du groupe thiophosphate en position 5'. Ce composé présente de nombreux avantages comparé aux autres réactifs commerciaux ou décrits dans la littérature. En particulier, les ODNs sur support fonctionnalisés par ce réactif peuvent être déprotégés dans des conditions particulièrement douces comparées à celles employées dans le cas de l'utilisation des autres réactifs.

Des travaux précédents avaient démontré l'interêt des sondes oligonucléotidiques dont le chromophore est une cyanine monométhine pour la détection des acides nucléiques. Toutefois, les paramètres gouvernant la stabilité des duplex formés par ces sondes ainsi que les variations spectrales observées après hybridation restaient inconnus par manque de données à leur sujet, car seules deux cyanines monométhines avaient été greffées à des ODNs. Afin de mieux les cerner, nous avons entrepris la synthése d'ODNs liés de manière covalente à des cyanines originales. Parmi les paramètres que nous avons étudiés, figurent la structure des cyanines (nature des hétérocycles et position d'ancrage du groupe méthine), la nature des bases nucléiques aux environs du marqueur, la position d'ancrage des colorants (5'-terminale ou internucléotidique) ainsi que l'influence de l'isomérie générée au niveau du phosphate modifié des conjugués portant le marqueur en position internucléotidique.

Un des objectifs de ces travaux a été atteint car l'ensemble des sondes obtenues présentent un signal modifié en présence de séquence cible. Cette variation se traduit par une nette diminution de l'intensité du signal fluorescent, pouvant atteindre 72%, dans le cas des sondes dont le marqueur est fixé à l'extrémité 5'. Dans le cas des sondes dont le marqueur est lié en position internucléotidique, de fortes diminutions (-85%) ainsi que des augmentations de l'intensité du signal fluorescent ($\times$2,6) ont été observées. De plus nous avons pu mettre en évidence quelques-uns des paramètres qui gouvernent les propriétés des sondes: une corrélation a pu être établie entre la structure des cyanines et la stabilité des duplex formés, que ce soit dans le cas des conjugués marqués à l'extrémité 5' ou en position internucléotidique. En ce qui concerne l'augmenation de l'intensité du signal fluorescent, seule la nature des bases environnant la cyanine a pu être mise en évidence comme paramètre important dans le cas des conjugués marqués à l'extrémité 5'. Dans le cas des conjugués portant le marqueur en position internucléotidique, le couple isomérie des conjugués / structure de la cyanine a pu être identifié comme ayant une forte influence sur la variation de l'intensité du signal fluorescent.

Dans tous les cas, la variation du signal fluorescent était due à une modification de l'environnement immédiat de la cyanine telles la modification de sa solvatation, des interactions qu'elles engagent avec les bases nucléiques ou de la souplesse de la partie oligonucléotidique lors de l'hybridation. Pourtant les cyanines, dont le thiazole orange, présentent une autre propriété interessante qui n'a pas été exploitée pour le marquage de sondes oligonucléotidiques. En effet, à forte concentration, les cyanines forment des dimères et présentent des propriétés spectrales

différentes de celles des cyanines monomériques; en particulier la valeur du maximum d'absorption est décalée. Nous avons donc cherché à exploiter cette caractéristique pour la conception de sonde. Le phénomène recherché étant que les chromophores se présentent sous une forme (monomérique ou dimérique) lorsque la sonde est libre, et sous l'autre lorsqu'elle est hybridée, conduisant ce cas à la production d'un signal modifié lors de l'hybridation.

D'autres molécules, tels le pyrène et le pérylène, déjà étudiées au laboratoire, présentent des propriétés spectrales fortement modifiées selon qu'elles se présentent sous forme monomérique ou dimérique, bien que le phénomène conduisant à ces variations ne soit pas le même que celui mis en jeu dans le cas des cyanines. Nous avons donc décidé de synthétiser et d'étudier des oligonucléotides liés de manière covalente à deux thiazoles oranges, ainsi qu'à deux pyrènes et deux pérylènes. Ces trois marqueurs possèdent des propriétés d'intercalation. Nous avons également fixé deux fluorescéines en position 5' d'un ODN de même séquence. Pour cela, nous avons mis au point un réactif permettant l'incorporation en position 5' d'un bras de liaison terminé par deux fonctions amines primaires. La réaction entre les ODNs ainsi fonctionnalisés et les esters actifs (ou isothiocyanate) des quatre marqueurs conduit aux ODNs liés par leur extrémité 5' à deux marqueurs identiques. Les conjugués ODNs *bis*-thiazole orange, *bis*-pérylène et *bis*-fluorescéine n'avaient pas été décrits auparavant. Toutes ces sondes présentent un signal fluorescent modifié au cours de l'hybridation. La variation la plus marquante est celle observée avec le conjugué *bis*-pyrène pour lequel un intense signal de nature excimérique est observé. Dans le cas des deux conjugués originaux, les variations sont moindres. Toutefois, le but recherché, passage d'une forme chromophores empilés à chromophores indépendants, a été atteint. En effet, l'étude du conjugué *bis*-thiazole orange montre une modification du rapport TO monomère/TO dimère au cours de l'hybridation. Dans le cas du conjugué *bis*-pérylène, nous avons observé la diminution de l'intensité du signal émis par l'espèce excimérique lors de l'hybridation. Cela constitue la première utilisation de conjugués ODN-pérylène capables d'émettre un signal excimérique modifié au cours de l'hybridation.

Bien que les variations spectrales soient encore faibles dans le cas de ces nouveaux conjugués, l'amélioration de ces sondes est possible. En effet, ces composés étant nouveaux, des études restent à mener pour comprendre les paramètres régissant les variations spectrales. Les variations spectrales observées dans le cas du TOTO libre d'une part, et dans le cas de polymères de type pérylène d'autre part, nous font supposer que de plus fortes variations spectrales pourraient être observées dans les cas des ODNs marqués par le *bis*-thiazole orange ou le *bis*-pérylène. Nous pourrions ainsi obtenir de nouvelles sondes dont les modifications spectrales seraient causées par des modifications de leur structure secondaire. D'autres sondes oligonucléotidiques pourraient être obtenues en fixant les marqueurs en d'autres positions: aux deux extrémités de l'ODN, sur des bases, en position 2' des riboses afin de faire varier les interactions entre les deux marqueurs.

Partie expérimentale

Partie Expérimentale

1. Matériels employés

1.1. Solvants

Les solvants figurant dans le tableau 24 ont été utilisés au cours de ces travaux. Lors de certaines synthèses, des purifications supplémentaires ont pu être effectuées.

Solvant	Vendeur	Pureté	Eau	
Dichlorométhane	SDS	99,9 %	<0,02 %	
1,2-Dichloroéthane [1]	Distrilab	"Extra-sec pour synthèse ADN"		
1,4-Dioxane [2 ou 3]	Aldrich	99 %		
Acétate d'éthyle	Aldrich	99 %		
Acétonitrile	SDS	99,9	<0,03 %	*Pour HPLC*
Acétonitrile	SDS	99,9%	< 30 ppm	*Pour synthèse*
Acide acétique	Prolabo	99 %		
Chlorobenzène [4]				
Chloroforme [4]				
CS_2 [5]	Riedel-de-Haën	99,9 %	<0,01 %	
DIEA [1,6]				
DMF [7 et/ou 8]	Aldrich	99 %		
DMSO		Technique		
Ether éthylique [9]	SDS	99,8 %	< 0,02 %	
Isopropanol		Technique		
Méthanol	SDS	99,8 %	<0,05 %	*Pour HPLC*
n-Hexane	Prolabo	99 %	<0,005 %	
Nitrométhane [10]				
n-Pentane	Carlo Erba	99 %	< 0,01 %	
TEA [1]	Merck	99 %	<0,02 %	
Tétrachlorure de carbone [4]				
THF [2 ou 9]	Aldrich	99,9 %		
Toluène [11]	Prolabo	99 %		
Triéthylèneglycol	Aldrich	99%		

[1] Distillé sur KOH, conservé sur tamis moléculaire 4 Å.
[2] Distillé sur sodium, test à la benzophénone, conservé sur tamis moléculaire 4 Å.
[3] Distillé sur $LiAlH_4$, conservé sur Fe^{II}. Absence de péroxydes (Test KI)
[4] Distillé sur P_2O_5, conservé sur tamis moléculaire 4 Å.
[5] Distillé sur $CaCl_2$
[6] Distillée sur anhydride benzoïque
[7] Distillé sous vide sur ninhydrine
[8] Agité sur $BaO/CaSO_4$, distillé sous vide sur nihydrine
[9] Distillé sur $LiAlH_4$, conservé sur CaH_2.
[10] Redistillé, conservé sur $CaSO_4$
[11] Distillé sur sodium

Tableau 24: Solvants utilisés

1.2. Chromatographies sur plaque

Les chromatographies sur couche mince sont effectuées sur des plaques en aluminium recouverte de silice. Merck, Silicagel 60 F_{254}. Les plaques sont soumises à l'élution dans des cuves closes. Les spots sont lus sous lampe UV, Vilber-Lourmat, CN-6, à 254 nm ou 365 nm. Selon la nature des produits, les spots sont révélés par une pulvérisation d'une solution à 10% d'acide perchlorique (révélation des nucléosides modifiés, composés tritylés), une solution de ninhydrine à 1% (Prolabo) dans le butan-1-ol (Aldrich 99,5%) (révélation des amines), une solution de 2,6-

dichloroquinone-4-chloroimide (Aldrich, 99%) dans l'éthanol pour les composés comportant des groupes thiophosphate ou thiol.

L'éluant utilisé pour l'analyse des produits de réaction des couplages oligonucléotidiques est un mélange eau/isopropanol/$NH_4OH_{(aq)}$ dans les proportions 55:25:20. Les cuves sont saturées d'éluant 24 heures avant l'analyse.

Certains composés sont purifiés sur plaques préparatives, Macherey-Nagel SIL 6-200 UV_{254}, 2mm d'épaisseur, format 20×20 cm.

1.3. Tampon utilisé

Sauf mentions contraires précisées dans le texte principal, les spectres d'absorption UV-visible, les spectres de fluorescence, les titrations et les températures de demi-dissociation sont réalisés avec des solutions d'ODNs à 1µM dissous dans un "tampon cacodylate" (cacodylate de sodium 10mM, NaCl 100mM, pH=7, exceptés les composés comportant des résidus fluorescéines, auquel cas le pH est égal à 10) à 6°C.

1.4. Caractérisation des produits

Les produits sont desséchés sous vide dans un dessicateur contenant du P_2O_5 et de la potasse.

RMN

Les échantillons destinés aux études RMN sont dilués dans les solvants deutérés DMSO-d_6 ou $CDCl_3$ en utilisant le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne dans le premier cas et le DMSO-d_5 dans le second (□□2,48ppm). Les spectres ^{31}P sont enregistrés en utilisant un capillaire d'acide phosphorique comme référence. Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre Varian Unity 500 (500MHz), les constantes de couplages *J* sont exprimées en Hertz, les abréviations suivantes ont été employées: s (singulet), d (doublet), t (triplet), quint (quintuplet), m (massif), le signe × désigne un couplage double (d×d, doublet de doublet, etc…).

SM

Les spectres de masse sont obtenus par Electrospray sur un appareil Quattro II (Micromas). Les échantillons d'ODNs (0,1 DO environ) sont fournis lyophilisés.

UV

Les spectres d'absorption sont enregistrés sur un spectrophotomètre Kontron Uvikon 860 à double faisceau dans des cuves de 600µL ou 1 mL thermostatées. Les estimations de quantités d'ODNs sont réalisées à t.a. Les mesures à basse température sont réalisées en soumettant la cuve à un courant d'azote afin de réduire les phénomènes de condensation sur les parois. Les échantillons sont dissous dans le tampon "cacodylate" (§.1.3.)

Fluorescence

Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence sont enregistrés sur un Fluoromax 2 (ISA-Jobin-Yvon) dans des cuves en quartz Suprasil de trajet optique de 5 mm (Hellma) avec une largeur de fente de 2 nm et une mesure tous les 0,5 nm. Les mesures sont réalisées avec des solutions d'ODNs 1µM dans le tampon "cacodylate" (§.1.3.), exceptées les solutions de dérivés fluorescéinés où le pH est maintenu à 10. Sauf mentions contraires, les spectres d'émissions sont

enregistrés après excitation au λ_{MAX} du spectre d'absorption UV, tandis que les spectres d'excitation sont enregistrés en suivant l'émission au λ_{MAX} du spectre d'émission.

Les mesures effectuées sur des sondes hybridées sont réalisées à basse température (4 à 8 °C). L'hybridation a lieu pendant 15 heures à 4°C pour permettre l'interaction des marqueurs avec les acides nucléiques.

1.5. CLHP en phase inverse et par échange d'ions

Les gradients employés pour les différentes analyses et purifications sont fournis dans le texte principal ou en légende des chromatogrammes présentés.

Avant toute purification sur les différents systèmes chromatographiques, les échantillons sont filtrés (filtres adaptables sur seringue, GHP Acrodisc©, 13 mm, membrane GHP 0,2 µm).

Les analyses et purifications à petite échelle (<100 DO_{260}) sont effectuées sur un appareil de chromatographie 600E (Waters) équipé d'un détecteur à barette de diodes (Waters 990) sur colonne Lichrospher© 100 RP-18 (5µm, 125 mm x 4 mm) de Merck. Un gradient linéaire d'acétonitrile dans un tampon TEAA 0,1M, pH = 7 est utilisé pour la purification à un débit de 1mL/min. Les chromatogrammes sont enregistrés à 260 nm, l'élution est suivie à 260 nm et au maximum d'absorption du colorant le cas échéant.

Les purifications à l'échelle semi-préparative (>100 DO_{260}) sont effectuées sur un 600E (Waters) équipé d'un détecteur à une longueur d'onde variable Varian UV-50 sur colonne Lichrocart© 100 RP-18 (10µm, 250mm × 10mm) avec un tampon de même composition que ci-dessus et à un débit de 4mL/min. L'élution est suivie à une longueur d'onde ne conduisant pas à la saturation du signal UV (généralement entre 290 et 300 nm).

Les analyses par échanges d'ions sont réalisées à l'aide d'un appareil de chromatographie Pharmacia FPLC en utilisant une colonne DEAE (8µm, 10 x 100 mm) et en employant un gradient linéaire de NaCl dans un tampon TRIS 25mM, pH=8 contenant 10% de méthanol. L'élution est suivie à 260 nm.

Le dessalage des fractions récupérées après purification par échange d'ions est réalisé sur ce même appareil en utilisant une colonne Lichroprep© RP-18, 40-63 µM (10 x 100 mm), avec un gradient de methanol dans l'eau et un débit de 4 mL/min.

Les purifications sur colonne d'exclusion stérique sont réalisées sur des colonnes pré-packées Sephadex™ , G-25 DNA grade en utilisant de l'eau distillée comme éluant.

Les purifcations chromatographiques par colonne sont réalisées en utilisant le gel de silice 60 (Merck), granulométrie: 63 – 230 µm.

1.6. Synthétiseur automatisé d'ODNs

L'assemblage des chaînes oligonucléotidiques est réalisé sur un synthétiseur Expedite NASS (Nucleic Acid Synthesis System) 8909 de chez Perspetive Biosystems à l'échelle de 1µM en utilisant les supports et les phosphoramidites commerciaux (Perspective Biosystems et Chemgenes Corporation). Selon les besoins, le groupe 5'-diméthoxytrityle est conservé en fin de synthèse pour faciliter les purifications ultérieures (mode DMT-ON).

1.7. Séquences non modifiées

Les séquences de référence **30** et **31** ainsi que les séquences cibles **32** et **77** proviennent de chez Eurogentec S.A. Avant toute utilisation, leur pureté a été contrôlée en CLHP. Excepté dans le cas de la séquence **77**, les ODNs ont été repurifiés par CLHP. Les caractéristiques des séquences non modifiées sont fournies dans le tableau 25.

Séquence		t_R (min) [1]	UV [2]	
			λ_{Max}	ε_{260}
30	(14-mère)	19 min et 26 sec	260	133600
31	(14-mère)	14 min et 16 sec	266	115700
32	(27-mère)	19 min et 12 sec	257	278900
77	(17-mère)	20 min et 51 sec	256	169400

[1] Gradient d'acétonitrile: 0 à 24 % en 30 minutes
[2] Dans l'eau distillée

Tableau 25: Caractérisations des séquences non modifiées.

1.8. Préparation des solutions

La solution de déprotection d'ammoniac méthanolique est obtenue par bullage d'ammoniac dans environ 300 mL de méthanol refroidis à –30°C. Le titre de la solution est calculé par pesées. La solution est conservée à –30°C.

Les solutions de bicarbonate de triéthylammonium ou de DBU sont obtenues par bullage de CO_2 dans une solution du titre voulu de TEA ou de DBU.

1.9. Températures de demi-dissociation

Les températures de demi-dissociation sont déterminées avec un spectrophotomètre (§ 1.4.). Les ODNs sont dissous dans le tampon "cacodylate" à une concentration de 1 µM et refroidis à 6°C (§ 1.3.). Une quantité équivalente de séquence complémentaire est ajoutée. Les mesures sont relevées une fois la valeur de DO_{260} stabilisée et tous les 2°C.

1.10. Titration

Les valeurs de coefficients d'extinction molaire des conjugués sont déterminées par titration et par spectrométrie d'absorption UV-visible. Une solution du conjugué étudié dans le tampon "cacodylate" (§.1.3.) de concentration approximativement égale à 1µM est préparée en se basant sur les valeurs de ε_{260} de l'ODN non-conjugué (valeurs données au §.1.7.). Des petits volumes de solution de l'ODN cible (chacuns égaux à environ 4% du volume de la solution à titrer et comportant environ 0,2 eq. de l'ODN cible) sont ajoutés et les valeurs de DO_{260} relevée à basse température. Du fait de l'hypochromisme résultant de l'hybridation du conjugué avec sa cible, la droite tracée aux abcisses inférieures à l'équivalence est de pente plus faible que celle tracée aux abcisses supérieures à l'équivalence. Leur intersection est un point dont l'abscisse est égale à l'équivalence. Il est alors possible de déterminer la concentration exacte du conjugué titré, puis, grâce à la valeur de DO_{260} du conjugué avant l'ajout de la solution d'ODN cible, la valeur de $\varepsilon_{260}^{(ODN\text{-}Cyan)}$ et, grace à la valeur de ε_{260} de l'ODN non-conjugué (§.1.7.), la valeur de $\varepsilon_{260}^{(Cyan.)}$ qui est la contribution du marqueur à l'absorbance à λ=260 nm.

2. Protocoles expérimentaux

2.1. Synthèse d' ODNs comportant des fonctions réactives

2.1.1. Par greffage de nucléoside H-phosphonate sur des ODNs sur support (ODNs: **12**, **13**, **19**, **21**, **22**, **24**, **50**, **51**, **52**$_{(R)}$, **52**$_{(S)}$,**60**)

L'élongation de l'ODN sur support est réalisée jusqu'à la taille désirée puis le groupe trityle 5'-terminal est retiré (mode DMT-off). La résine (environ 30 mg) est séchée par coévaporation des traces d'eau résiduelles avec de l'acétonitrile anhydre, puis elle est conservée sous argon.
La veille les solutions suivantes sont préparées:
a- Dérivé H-phosphonate (15 µmol) en solution dans 2mL d'un mélange pyridine/acétonitrile (1:1; v/v).
b- Une solution de chlorure de pivaloyle obtenue par dilution de 80µL du chlorure d'acide dans 2 mL d'acétonitrile sec conservé sur tamis moléculaire 4Å.
c- Un mélange pyridine/acétonitrile (1:1; v/v) anhydre conservé sur tamis 4Å.

Dans le pilulier contenant la résine, 500 µL de chacune des deux solutions *a* et *b* sont injectés, sous atmosphère d'argon. Après environ 3 minutes d'agitation manuelle, le surnageant est prélevé et le support lavé par un mélange pyridine/acétonitrile (3×1 mL).

2.1.1.1. *Oxydation par l'iode du H-Phosphonate (synthèses des ODNs* **12**, **60** *et* **77***)*

A la résine ainsi lavée, on ajoute 1 mL d'une solution d'iode 0,1M dans un mélange pyridine/eau (98:2; v/v). Après environ 1 heure d'agitation, le surnageant est prélevé et la résine lavée plusieurs fois à l'acétonitrile (4×1 mL). Puis la résine est séchée sous vide.
Dans le cas où le bras introduit comporte un groupe trityle (ce qui est le cas des deux nouveaux dérivés H-phosphonates présentés dans ces travaux), le calcul du rendement de couplage peut être réalisé. A 2,0 mg de résine sont ajoutés 2 mL d'un mélange $HClO_{4\ (aq)}$ 70% / MeOH (53:47). La coloration rouge du cation $DMTr^+$ est dosée par spectrophotométrie (ε_{498} = 70000 $M^{-1}cm^{-1}$ pour le $DMTr^+$, ε_{431} = 38700 $M^{-1}cm^{-1}$ pour le Tr^+ au maxima d'absorption respectifs)

2.1.1.2. *Sulfuration du H-Phosphonate (synthèse des ODNs* **13**, **19**, **21**, **22**, **24**, **50**, **51**, **52**$_{(R)}$, **52**$_{(S)}$)

A la résine ainsi lavée, on ajoute 2,5 mL d'une solution de 50 mg de soufre dans 2,5 mL d'un mélange CS_2/pyr (3:2). Après environ 1 heure d'agitation, le surnageant est prélevé et le support lavé plusieurs fois avec du CS_2, afin d'éliminer le soufre colloïdal résiduel, puis à l'acétonitrile. La résine est séchée sous vide.

2.1.1.3. *Fonctionnalisation du H-phosphonate par une amine (synthèse des ODNs* ***52***$_{(R)}$ *et* ***52***$_{(S)}$*)*

A la résine ainsi lavée, on additionne simultanément 500µL d'une solution de cystamine (obtenue par dilution de 1,1 mL de cystamine dans 2 mL de pyridine anhydre conservée sur tamis 4Å) et 500µL de CCl_4 anhydre conservé sur tamis 4Å. Le pilulier est agité une heure puis le surnageant est prélevé et la résine lavée avec de l'acétonitrile sec (3×1mL). Puis on ajoute un mélange de 500µL de la solution commerciale de Cap A et 500µL de Cap B (solutions d'acétylation comportant, l'une l'anhydride acétique, l'autre un activateur: la DMAP). Après une heure d'agitation, la résine est lavée avec 1mL d'acétonitrile sec (×3). La résine est séchée, replacée dans une cassette et l'assemblage de la séquence poursuivi.

2.2. Déprotection et traitement des ODNs

2.2.1. Cas général

L'ODN sur support est déprotégé en traitant la résine par environ 4mL d'ammoniaque concentrée (28% dans l'eau) à 55°C pendant 10 heures.

2.2.2. ODN comportant des fonctions alkylamines libres (ODNs **24**, **60** et **78**)

2,5 mg de phénol par mL sont ajoutés à la solution de déprotection.

2.2.3. Déprotection "douce" des ODNs fonctionnalisés par le nouveau réactif **10**

2.2.3.1. *Déprotection partielle, conservation des bras disulfures* (ODNs **19** et **23**)

L'ODN sur support est déprotégé en traitant la résine par environ 2mL d'ammoniac méthanolique (10M) à t.a. pendant 4 heures (support succinate) ou 1 heure (support oxalate).

2.2.3.2. *Poursuite de la déprotection* (ODNs **20** et **21**)

L'ODN est déprotégé en le traitant par 1mL d'une solution de DTT (5mg) dans de la DIEA aqueuse à 0,5% pendant 30 minutes.

2.2.3.3. *Déprotection totale directe* (ODNs **20**, **21** et **24**)

L'ODN sur support est déprotégé en traitant la résine par environ 2mL d'ammoniac méthanolique (10M) contenant 5mg de DTT à t.a. pendant 30 minutes (support succinate) ou 1 heure (support oxalate)

2.2.4. Traitements des mélanges bruts de déprotection

L'ammoniac et, le cas échéant, le méthanol, sont évaporés à t.a. Dans le cas où l'ODN comporte des fonctions trityles que l'on souhaite conserver, environ 10 µL de TEA sont ajoutés au milieu. Le pH doit être constamment surveillé et de la TEA additionnée si la solution n'est plus basique.
Puis le surnageant est prélévé, la résine est lavée plusieurs fois à l'eau distillée et les fractions aqueuses sont réunies. La phase aqueuse est extraite avec du dichlorométhane (3×1mL), puis avec de l'acétate d'éthyle (3×1mL). Les solvants organiques résiduels sont chassés par évaporation. Si la solution de déprotection contenait du DTT, la purification est poursuivie par un passage sur colonne d'exclusion stérique. La présence de DTT dans les différentes fractions est contrôlée par un test avec une solution de 2,6-dichloroquinone-4-chloroimide dans l'éthanol (le DTT est révélé en jaune). Selon les cas, une (ou plusieurs) fractions est à nouveau purifiée sur gel d'exclusion stérique. L'ODN est purifié par CLHP d'échange d'ions ou en phase inverse, selon la nature du mélange à séparer.

2.2.5. Détritylation d'un ODN hors synthèse automatisée (ODNs **60** et **77**)

Après déprotection en milieu basique, l'ODN est détritylé par l'action de 5 mL d'une solution d'acide acétique à 80% pendant 30 minutes environ. Par ajouts successifs de volumes d'éthanol (20 mL), l'azéotrope AcOH/EtOH est évaporé jusqu'à élimination de l'acide acétique.

2.2.6. Conditionnement

Les ODNs obtenus sont lyophilisés (3 x 16 heures) avant tout emploi. A l'issue de la deuxième lyophilisation et après remise en solution de l'ODN, si l'on constate la présence de particules insolubles, la solution est filtrée.

2.3. Synthèse de conjugués ODNs-chromophores

2.3.1. Couplage à des ODNs comportant un groupe thiophosphate en 5'
(Conjugués **26**, $\mathbf{50}_{Th}$ à $\mathbf{50}_{44q}$ et $\mathbf{51}_{Th}$ à $\mathbf{51}_{24q}$)

Les ODNs sont lyophilisés et conditionnés dans des tubes Eppendorf (10 DO / tube) puis dissous dans du méthanol anhydre (800 µL) contenant quelques miligrammes de résine Chelex-100 © 100-200 mesh, sel sodique (Bio-Rad) et environ 5 mg d'éther couronne 18-C-6 (Aldrich, 99%). Après agitation, les échantillons sont vortexés, le surnageant est prélevé. Le marqueur (environ 10 equivalents) est dilué dans un minimum de méthanol passé sur Chelex puis ajouté à la solution d'ODN. La réaction est laissée sous agitation pendant une nuit à l'abri de la lumière à t.a.
La réaction est suivie par CCM (cf. plus haut), le R_f du conjugué est légèrement supérieur à celui du *p*(S)ODN. Le conjugué apparaît sous forme d'un trait coloré, l'ODN n'ayant pas réagi peut être révélé par pulvérisation d'une solution de 2,6-dichloroquinone-4-chloroimide.

Après environ 5 heures, la réaction n'évolue plus. Durant les étapes de traitement, la température est maintenue en dessous de 50°C et les solution sont protégées de la lumière. Le méthanol est éliminé par évaporation. Le résidu est dissous dans 1 mL d'une solution de KH_2PO_4 1M contenant 10% de MeOH à pH=6, puis est extrait avec du CH_2Cl_2 jusqu'à l'absence de coloration de la phase organique.

Le CH_2Cl_2 résiduel de la phase aqueuse est chassé par chauffage, la solution aqueuse est prélevée. La verrerie est lavée avec 1 mL d'une solution de NaCl 1M contenant 15% d'acétonitrile. Les deux phases aqueuses sont réunies et purifiées sur colonne d'exclusion stérique. Les fractions colorées éluant le plus rapidement (i.e. entre 4 et 8 mL) sont conservées et purifiées sur CLHP en phase inverse (cf. rubrique chromatographie § 1.4., les gradients sont fournis en pages intérieures aux chapitres correspondants). Après élimination de l'acétonitrile, le tampon TEAA est éliminé par trois lyophilisations (§ 2.2.6.).

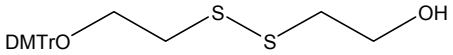
2.3.2. Couplage des marqueurs à des ODNs comportant un bras disulfure en position internucléotidique (ODNs **54**$_{Th(R)}$ à **54**$_{44q(S)}$)

Les ODNs sont lyophilisés et conditionnés dans des tubes Eppendorf (10 DO / tube) puis dissous dans un tampon $NaHCO_3$ 0,5% pH=9 (400 µL). La solution est dégazée à l'argon pendant 10 minutes. Puis 2 µL d'une solution de TCEP (20 mg dans 300 µL) sont ajoutés. Le mélange est vortexé et dégazé pendant dix minutes. Puis le marqueur (10 équivalents) en solution dans 400µL de DMF (distillé sur ninhydrine) est ajouté. La réaction est laissée environ 4 heures à 37°C et une nuit à t.a. Après environ deux heures, 2 µL de solution de TCEP sont à nouveau ajoutés. Le brut réactionnel est évaporé à sec après ajout de xylène qui forme un azéotrope avec le DMF. Le résidu est repris par environ 2 mL d'eau et la solution extraite plusieurs fois avec du CH_2Cl_2 (1 mL). Le CH_2Cl_2 résiduel est chassé par évaporation, la phase aqueuse est prélevée et la verrerie lavée par 1 mL d'une solution de NaCl 1M contenant 15% d'acétonitrile. Les phases aqueuses sont réunies et purifiées par passage sur colonne d'exclusion stérique puis par CLHP en phase inverse.

2.3.3. Couplage des marqueurs à des ODNs comportant des bras alkylamines (ODNs: **25**, **76**$_{m\text{-}FLU}$ à **76**$_{b\text{-}PER}$)

L'ODN 5'-*bis* NH_2 est dissous dans un petit volume (50 µL pour 10 DO) d'une solution tampon ($NaHCO_3$ 1% ; pH=9). Le marqueur est ajouté en excès (environ 10 equivalents par résidu NH_2) dans le DMF distillé sur ninhydrine (50 µL pour 10DO). Le mélange est chauffé 4h. à 38°C puis est laissé la nuit à t.a. à l'abri de la lumière. Tous les traitements s'effectuent à l'abri de la lumière. Le mélange réactionnel est concentré à sec par l'utilisation du xylène comme azéotrope (bain-marie : 50°C max). Le résidu est repris par de l'eau (1 mL) puis par une solution de NaCl 1M contenant 20% d'acétonitrile (1 mL). La phase aqueuse est extraite par CH_2Cl_2 jusqu'à décoloration de la phase organique. Dans le cas des couplages du pyrène et du pérylène, l'extraction est poursuivie par AcOEt. Après évaporation des solvants organiques contenus dans la phase aqueuse, la purification est poursuivie par un passage sur colonne d'exclusion stérique (G25) puis par CLHP en phase inverse.

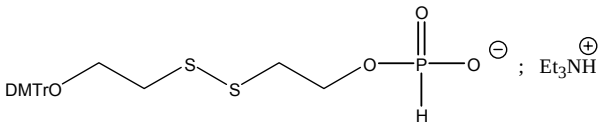
6-diméthoxytrityloxy-3,4-dithiahexanol 9



Le *bis*-mercaptoéthanol (3,38 g; 2,70 mL; 21,9 mmol; 5 eq) est mis en solution dans 30 mL de pyridine anhydre. Une solution de chlorure de diméthoxytrityle (1,50 g; 4,43 mmol, 1 eq.) dans 20 mL de pyridine anhydre est additionnée au goutte-à-goutte lentement. Après environ deux heures, le suivi de l'avancement de la réaction par CCM montre la disparition du diol (Rf=0,03 dans CH_2Cl_2/MeOH; 98:2; v/v) et l'apparition du produit *mono*-tritylé (Rf=0,46) et *bis*-tritylé (Rf=0,62). Le mélange réactionnel est dilué par 100mL de CH_2Cl_2 et extrait par une solution de $NaHCO_3$ à 5% (2×100 mL) puis est évaporé à sec. L'huile rouge obtenue est purifiée sur colonne de silice (Eluant: CH_2Cl_2/hexane (1:1)) pour éliminer le produit *bis*-tritylé puis CH_2Cl_2 pour recueillir le produit désiré.
On recueille 1,24 g d'une huile brune.

Rendement: 61%
CCM: Rf=0,46 (CH_2Cl_2/MeOH (98:2, v/v))

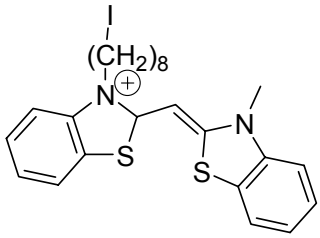
***O*-(6-diméthoxytrityloxy-3,4-dithiahexyl)-H-phosphonate 10**



Le 6-diméthoxytrityloxy-3,4-dithiahexanol (1.24 g; 2.72 mmol) est séché par coévaporation avec de la pyridine anhydre (3 x 10 ml) puis solubilisé dans de la pyridine anhydre (25 ml) et la solution est refroidie à 5°C à l'aide d'un bain de glace. Le 2-chlorobenzo-1,3,2-dioxaphosphorin-4-one (1.33 g, 6.6 mmol, ~1,5eq) solubilisé dans du 1,2-dichloroéthane anhydre (5 mL) est ajouté goutte-à-goutte. La réaction est suivie par CCM (Eluant: CH_2Cl_2 /MeOH (95:5, v/v)). Après environ 16 heures, la réaction est terminée et 50mL d'une solution de bicarbonate de triéthylammonium (0,3M) sont additionnés. Le mélange est dilué dans 50mL de CH_2Cl_2 puis extrait par un mélange H_2O/TEA (99 :1, v/v) (2×50mL). Les phases organiques sont séchées sur Na_2SO_4 et concentrées à sec. Le résidu est purifié sur colonne de silice en utilisant un gradient de méthanol dans le dichlorométhane (2,5 à 4,5 %) contenant 0,5 % de TEA. On obtient 1,1g d'une huile jaune.

Rendement :65%.
CCM: Rf = 0.16 (CH_2Cl_2 /MeOH (80:20, v/v)).
RMN ^{31}P ($CDCl_3$, 500 MHz). δ: 4.54 ppm.
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz). δ: (ppm): 12,62 (1H, $Et_3N\mathbf{H}^+$); 7,47 (2H, d, H_{Ar}, J=7.3 Hz); 7,16-7,34 (7H, m, H_{Ar}); 6,87 (1H, d, P-**H**, J=617 Hz); 6,83 (4H, d, J = 8,8 Hz, H_{Ar}); 4,07 (2H, quad, C$\mathbf{H}_2$-O-P, J = 7.3 Hz); 3,79 (6H, s, OC$\mathbf{H}_3$); 3,35 (2H, t, J = 6.3 Hz, C$\mathbf{H}_2$-ODMT); 3,06 (6H; quad; J=7.3 Hz; $CH_3C\mathbf{H}_2)_3NH^+$); 2,86 (4H, m, -C$\mathbf{H}_2$SSC$\mathbf{H}_2$-); 1,34 (9H, t, J = 7.3 Hz, C$\mathbf{H}_3CH_2)_3NH^+$).
SM (ES-): M=519. 3 (calculée : 519,1).

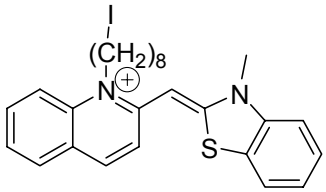
Iodure de 3-(8-iodooctyl)-2-[(2,3-dihydro-3-methylbenzothiazol-2-ylidene)methyl]benzothiazolium 33



Dans un ballon monocol de 10 mL, 96,9 mg de iodure de (8-iodooctyl)-2-méthylbenzothiazolium (188 µmol ; 1eq.) et 62,6 mg d'iodure de 2-méthylthio-3-méthylbenzothiazolium (194 µmol ; 1,03 eq.) sont dissous dans 2 mL de 1,2-dichloroéthane anhydre. Une fois la dissolution constatée, on ajoute 3 µL de triéthylamine sèche (21 µmol ; 0,11 eq). La solution vire rapidement au jaune. Après une heure on rajoute 5 µL de TEA supplémentaires (36 µmol ; 0,19 eq.). Après deux heures, la réaction est terminée, la solution est de couleur jaune. Le mélange est concentré et purifié sur colonne de silice (Eluant CH_2Cl_2/MeOH (95:5; v/v)). Les fractions recueillies sont concentrées à sec. On obtient 120 mg d'une poudre ocre.

Rendement: 94%.
CCM R_f=0,36 (CH_2Cl_2/MeOH ; 90:10 v/v)
RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 500 MHz) : 7,91 ppm (1H, d, J=10,8 Hz, H_{Ar}); 7,50 ppm (1H, m, H_{Ar}); 7,36 ppm (1H, m, H_{Ar}); 7,08 ppm (1H, s, -CH=); 4,91 ppm (2H, t, J=7,84 Hz, N^+-CH_2-); 4,29 ppm (3H, t, CH_3-N^+); 3,14 ppm (2H, t, J=7,8 Hz ; CH_2-I); 1,90 ppm (2H, quint, J=7,8 Hz, CH_2-C-N^+); 1,75 ppm (2H, quint, J=7,8 Hz, CH_2-C-I) ; 1,26~1,36 ppm (8H, m, H).
SM (ES-): M=535,1 (calculée : 535,3).

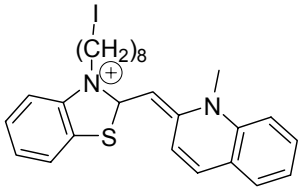
Iodure de 1-(8-iodooctyl)-2-[(2,3-dihydro-3-methylbenzothiazol-2-ylidene)methyl]quinolinium 34



Dans un ballon de 10 mL, on place 40,0 mg d'iodure de N-8-Iodooctylquinaldinium (78,6 µmol, 1eq.) et 29 mg d'iodure de N-Méthyl,2-méthylbenzothiazolium (89,7 µmol, 1,15 eq.) en solution dans 2mL d'un mélange MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v). On ajoute 30µL de TEA. la solution prend instantanément une couleur orange foncé. Après 24 h, le mélange est concentré à sec par évaporation et purifié sur colonne de silice par un gradient de MeOH dans le CH_2Cl_2 de 0,5 à 3 %. Après concentration des fractions, on recueille 37mg d'une poudre rouge très foncé.

Rendement: 72%
CCM: Rf = 0,27 (CH_2Cl_2/MeOH (90 :10; v/v)).
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) : 8,11 ppm (1H,d, J=9,5 Hz, H_{Ar}) ; 8,00 ppm (1H,d, J=9,0 Hz, H_{Ar}) ; 7,78 ppm (3H,massif, H_{Ar}) ; 7,69 ppm (1H,d, J=8,0 Hz, H_{Ar}) ; 7,52 ppm (1H,t, J=8 Hz ; H_{Ar}); 7,50 ppm (1H, t,J=7,5 Hz H_{Ar}) ; 7,45 ppm (1H,d, J=8,5 Hz, H_{Ar}); 7,34 ppm (1H,t, J=8,0 Hz, H_{Ar}) ; 6,34 ppm (1H, s, =CH ; 4,18 ppm (3H, s,NCH_3);-); 3,77 ppm (2H, t, J=7,5 Hz , CH_2-N); 3,18 ppm (2H, t, J=7,0 Hz , CH_2-I); 1,98 ppm (2H, quint, J=7,5 Hz , $NCH_2C\mathbf{H}_2$); 1,80 ppm (2H, quint, J=7,0 Hz ,$C\mathbf{H}_2CH_2I$); 1,45~1,65 ppm (8H, m, 4 CH_2).
SM (ES+) : M=529,0 (calculée :529,5)

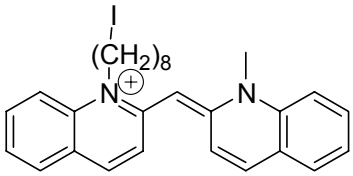
Iodure de 3-(8-iodooctyl)-2-[(1,2-dihydro-1-methylquinolin-2-ylidene)methyl]benzothiazolium 36



Dans un ballon de 10 ml, on place 71,4 mg d'iodure de N-méthyl, 2-iodoquinoléinium (180 µmol, 1eq.) et 91,5 mg d'iodure de 8-iodooctylméthylbenzothiazolium (178 µmol, 1eq.) en solution dans 2mL d'un mélange MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v). On ajoute 140 µL de TEA. la solution prend instantanément une couleur orange foncé. Après 24 h, le brut est concentré à sec et purifié sur colonne de silice par un gradient de MeOH dans le CH_2Cl_2 de 0 à 2 %. Après évaporation des fractions, on recueille 93mg d'une poudre rouge très foncé.

Rendement: 80%
CCM: Rf = 0,58 (CH_2Cl_2/MeOH (80 :20; v/v)).
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) : 8,07 ppm (1H,t, J=9,0 Hz, H_{Ar}) ; 8,05 ppm (1H,t, J=9,0 Hz, H_{Ar}) ; 7,84 ppm (1H,d, J=9,0 Hz, H_{Ar}) ; 7,80 ppm (1H,d, J=7,0 Hz, H_{Ar}); 7,75 ppm (1H,d, J=7,5 Hz, H_{Ar}) ; 7,68 ppm (1H,t, J=8,0 Hz, H_{Ar}) ; 7,50 ppm (1H,t, J=6 Hz ; H_{Ar}); 7,48 ppm (1H, t,J=7,5 Hz H_{Ar}) ; 7,35 ppm (1H,d, J=4,5 Hz, H_{Ar}); 7,33 ppm (1H,d, J=4,5 Hz, H_{Ar}) ; 6,53 ppm (1H, s, =CH-); 4,74 ppm (2H, t, J=7,5 Hz , CH_2-N); 4,42 ppm (3H, s,NCH_3); 3,15 ppm (2H, t, J=7,0 Hz , CH_2-I); 1,93 ppm (2H, quint, J=7,5 Hz , $NCH_2C\mathbf{H}_2$); 1,77 ppm (2H, quint, J=7,0 Hz ,$C\mathbf{H}_2CH_2I$); 1,45~1,65 ppm (8H, m, 4 CH_2).
SM (ES+) : M=529,0 (attendu :529,5)

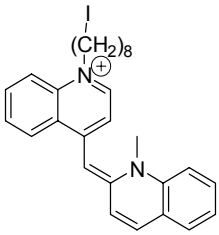
Iodure de 1-(8-iodooctyl)-2-[(1,2-dihydro-1-methylquinolin-2-ylidene)methyl]quinolinium 37



Dans un ballon de 10 ml, on place 71,0 mg d'iodure de N-méthyl, 2-iodoquinoléinium (180 µmol, 1eq.) et 91,5 mg d'iodure de 8-iodooctylméthylquinaldinium (147 µmol, 0,82 eq.) en solution dans 2mL d'un mélange MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v). On ajoute 140 µL de TEA. La solution prend instantanément une couleur rouge. Après 24 h, le mélange réactionnel est concentré à sec et purifié sur colonne de silice par un gradient de 0,5 à 3 % de MeOH dans le CH_2Cl_2. Une seconde étape de purification est effectuée. On dépose sur plaque préparative l'huile contenant le produit mélangé aux impuretés de Rf supérieurs, et d'autre part, l'huile contenant les impuretés à Rf inférieurs. Elutions: CH_2Cl_2/MeOH (99:1; ×3) ;CH_2Cl_2/MeOH (98:2; ×2) ;CH_2Cl_2/MeOH (96:4; ×2). Après concentration des fractions, on recueille 18 mg d'une pâte rouge foncé, rose en solution.

Rendement: 19 %.
CCM: Rf = 0,60 (CH_2Cl_2/MeOH (80 :20; v/v)).
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) : 7,40~7,95 ppm (12H, plusieurs massifs, H_{Ar}); 5,85 ppm (1H, s, =CH-); 4,53 ppm (2H, t, J=7,5 Hz , CH_2-N); 4,21 ppm (3H, s,NCH_3); 3,18 ppm (2H, t, J=7,0 Hz , CH_2-I); 1,96 ppm (2H, quint, J=7,5 Hz , $NCH_2C\mathbf{H}_2$); 1,81 ppm (2H, quint, J=7,0 Hz ,$C\mathbf{H}_2CH_2I$); 1,20~1,40 ppm (8H, m, 4 CH_2).
SM (ES+) : M=523,1 (calculé 523,5)

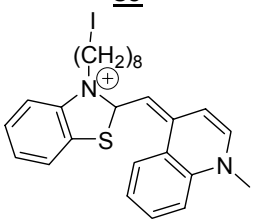
Iodure de 1-(8-iodooctyl)-4-[(1,2-dihydro-1-methylquinolin-2-ylidene)methyl]quinolinium 38



Dans un ballon de 10 ml, on place 71,5 mg d'iodure de N-méthyl, 2-iodoquinoléinium (180 µmol, 1 eq.) et 90,0mg d'iodure de 8-iodooctylméthyllépidinium (172 µmol, 1eq.) en solution dans 2mL d'un mélange MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v). On ajoute 140 µL de TEA. La solution prend instantanément une couleur violet foncé. Après 24h, le mélange réactionnel est concentré à sec et purifié sur colonne de gel de silice par un gradient de MeOH dans le CH_2Cl_2 de 0 à 2 %. Après évaporation des fractions, on recueille 60g d'un solide pâteux violet foncé.

Rendement: 52% .
CCM: Rf = 0,54 (CH_2Cl_2/MeOH (80 :20; v/v)).
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) : 8,65 ppm (1H,d, J=7,5 Hz, H_{Ar}) ; 8,34 ppm (1H,d, J=8,5 Hz, H_{Ar}) ; 8,02 ppm (1H,d, J=10,0 Hz, H_{Ar}); 7,87 ppm (1H,d, J=9,0 Hz, H_{Ar}) ; 7,79 ppm (1H,t, J=7,7 Hz, H_{Ar}) ; 7,67 ppm (4H,massif, H_{Ar}); 7,59 ppm (2H,massif, H_{Ar}) ; 7,40 ppm (1H,t, J=7,5 Hz, H_{Ar}) ;6,24 ppm (1H, s, =CH-); 4,51 ppm (2H, t, J=7,5 Hz , CH_2-N); 4,02 ppm (3H, s,NCH_3); 3,17 ppm (2H, t, J=7,0 Hz , CH_2-I); 1,94 ppm (2H, quint, J=7,5 Hz , $NCH_2C\mathbf{H}_2$); 1,79 ppm (2H, quint, J=7,0 Hz ,$C\mathbf{H}_2CH_2I$); 1,20~1,60 ppm (8H, m, 4 CH_2).
SM (ES+) : M=523,1 (calculé 523,5)

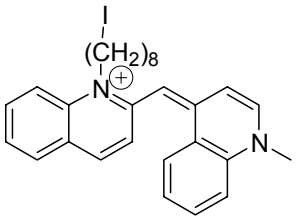
Iodure de 3-(8-iodooctyl)-2-[(1,4-dihydro-1-methylquinolin-4-ylidene)methyl]benzothiazolium 39



Dans un ballon monocol de 5 mL sont dissous 50 mg d'iodure de 8-Iodoctyl, 2-méthylbenzothiazole (97 µmol ; 1 eq.) et 36 mg d'iodure de N-méthylquinoléînium (133 µmol ; 1,4 eq) dans 1ml de 1,2-dichloroéthane. Après dissolution des sels, on ajoute 68 µL de TEA. Le mélange est laissé à l'agitation à température ambiante. Après quatre heures, le mélange est concentré à sec et purifié sur colone de silice (Eluant: CH_2Cl_2/MeOH; 98:2; (v/v)). Les fractions sont réunies et évaporées. L'huile obtenue est laissée sous vide dans un dessicateur toute la nuit. On obtient une poudre pourpre.

Rendement: 62%
CCM: Rf = 0,35 (CH_2Cl_2/MeOH (90:10; v/v)).
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz): 8,73 ppm (1H, d, J=10,8 Hz ; H_{Ar}); 8,61 ppm (1H, d, J=8,4 Hz ; H_{Ar}); 8,05 ppm (3H, m, H_{Ar}); 7,76 ppm (2H, d, J=9,0 Hz ; H_{Ar}); 7,60 ppm (1H, t, J=8,7 Hz ; H_{Ar}); 7,40 ppm (2H, m ; H_{Ar}); 6,94 ppm (1H, s, =CH-); 4,63 ppm (2H, t, J=8,4 Hz; C-CH_2-N^+); 4,17 ppm (3H, s, N^+CH_3); 3,19 ppm (2H, t, J=8,4 Hz ; CH_2-I); 1,79 ppm (2H, q, J=10,8 Hz ; H_{Ar}); 1,66 ppm (2H, d, J=8,4 Hz ; H_{Ar}); 1,44 ppm (2H, d, J=7,8 Hz ; H_{Ar}); 1,21-1,34 ppm (6H, m, J=10,8 Hz ; H_{Ar}).
SM (ES+) : M=529,1 (calculé : 529,5)

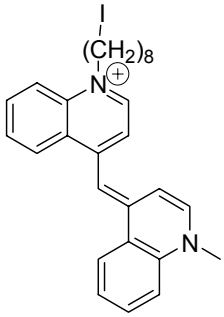
Iodure de 1-(8-iodooctyl)-2-[(1,4-dihydro-1-methylquinolin-4-ylidene)methyl]quinolinium 40



Dans un ballon de 10 ml, on place 26,0 mg d'iodure de N-méthyl, 4-chloroquinoléinium (85,0 µmol, 1,1 eq.) et 40,0 mg d'iodure de 8-Iodooctyl-*N*-méthylquinaldinium (78,6 µmol, 1 eq.) en solution dans 2mL d'un mélange MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v). On ajoute 30 µL de TEA. la solution prend instantanément une couleur violette foncé. Après 24h, le mélange réactionnel est concentré à sec et purifié sur colonne de silice par un gradient de MeOH dans le CH_2Cl_2 de 0 à 0,8 %. Après évaporation des fractions, on recueille 46,2 mg d'un solide pâteux violet foncé

Rendement: 90%.
CCM: Rf = 0,55 (CH_2Cl_2/MeOH (80 :20; v/v)).
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) : 8,68 ppm (1H,d, J=7,5 Hz, H_{Ar}) ; 8,15 ppm (1H,d, J=8,5 Hz, H_{Ar}) ; 8,06 ppm (1H,d, J=9,5 Hz, H_{Ar}); 7,87 ppm (1H,d, J=9,0 Hz, H_{Ar}) ; 7,84 ppm (1H,t, J=7,5 Hz, H_{Ar}) ; 7,70 ppm (4H,massif, H_{Ar}); 7,61 ppm (1H,massif, H_{Ar}); 7,53 ppm (1H,d, J=9,0 Hz, H_{Ar}) ; 7,40 ppm (1H,t, J=7,5 Hz, H_{Ar}); 6,14 ppm (1H, s, =CH-); 4,34 ppm (2H, t, J=7,5 Hz , CH_2-N); 4,20 ppm (3H, s,NCH_3); 3,18 ppm (2H, t, J=7,0 Hz , CH_2-I) ; 1,40~1,60 ppm (12H, m, 4 CH_2).
SM (ES+) : M=523,1 (calculé 523,5)

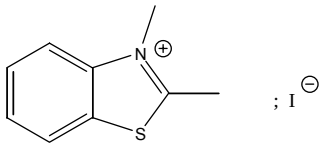
Iodure de 1-(8-iodooctyl)-4-[(1,4-dihydro-1-methylquinolin-4-ylidene)methyl]quinolinium 41



Dans un ballon de 10mL, on place 1mL d'une solution de 100 mg de iodure de *N*-(8-iodooctyl) lépidinium (196µmol, 1eq.) dans le 1,2-dichloroéthane puis 1mL d'une solution de 80 mg de l'huile contenant le sel de chloroquinolinium dans le dichloroéthane. Le mélange est de couleur brune. On ajoute à la seringue environ 200 µL de DIEA. La solution vire instantanemment au bleu sombre.
Après environ une heure, le mélange réactionnel est concentré à sec et purifié sur colonne de silice par un gradient de MeOH dans le CH_2Cl_2 de 2 à 4 %. Les fractions sont réunies et évaporées, on obtient 70mg d'une pâte bleue très sombre.

Rendement: 68%
CCM: Rf = 0,63 (CH_2Cl_2/MeOH (80 :20; v/v)).
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) : 7,51~8,34 ppm (12H, plusieurs massifs, H_{Ar}); 7,03 ppm (1H, s, =CH-); 4,36 ppm (2H, t, J=7,5 Hz, CH_2-N); 4,07 ppm (3H, s,NCH_3); 3,16 ppm (2H, t, J=7,0 Hz , CH_2-I); 1,92 ppm (2H, quint, J=7,5 Hz, $NCH_2C\mathbf{H}_2$); 1,78 ppm (2H, quint, J=7,0 Hz, $C\mathbf{H}_2CH_2I$); 1,20~1,40 ppm (8H, m, 4 CH_2).
SM (ES+) : M=523,3 (calculé : 523,2)

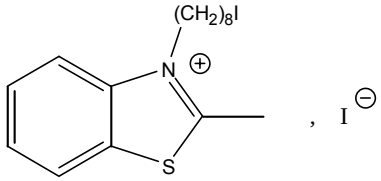
Iodure de 2,3-diméthylbenzothiazolium 42



On dissous 1,00 g de 2-méthylbenzothiazole (7,1mmol; 1eq.) dans 5mL de iodométhane, et le mélange est chauffé à reflux. Une poudre blanche se forme rapidement. Après 14 heures de reflux, la réaction est arrêtée. La solution est filtrée et le filtrat lavé plusieurs fois au pentane. On isole environ 2g d'une poudre blanche.

Rendement: 93%
CCM: Rf = 0,15 (CH_2Cl_2/MeOH (90 :10; v/v)); .
Caractérisation: voir référence [128]

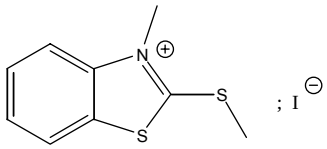
Iodure de N-(8-Iodooctyl)-2-méthyl-benzothiazolium 43



Dans un ballon de 10mL, sont placés 1mL de 1,8-dioodooctane (1,85 g ; 4,79 mmol ; 5eq.) et 130µL de 2-méthylbenzothiazole (152mg ; 1mmol ; 1eq.). Le mélange est chauffé à 150°C. La couleur du mélange vire au rouge brique. La réaction est suivie par CCM (CH_2Cl_2/MeOH ; 90:10 v/v), la formation de deux produits polaires (R_{f1}=0,10 et R_{f2}=0,32) est constatée. Le mélange est refroidi à 0°C. L'huile rouge recueillie est chromatographiée sur colonne de silice par un gradient de MeOH dans le CH_2Cl_2 de 0 à 8%. Les fractions contenant le premier produit sont concentrés, l'huile obtenue est coévaporée avec de l'acétonitrile (x3) et du toluène (x3). La poudre obtenue est reprise dans un peu de cyclohexane à froid. On obtient 164mg d'une poudre blanche légèrement grisée récupérée par filtration.

Rendement: 32%
CCM: Rf = 0,10 (CH_2Cl_2/MeOH (90 :10; v/v)).
RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 500 MHz) : 8,43 ppm (1H, d, J=9,6 Hz, H_{Ar}); 8,33 ppm (1H, d, J=9,6 Hz, H_{Ar}); 7,88 ppm (1H, t, J=9,6 Hz, H_{Ar}); 7,80 ppm (1H, d, J=9,0 Hz, H_{Ar}); 4,69 ppm (2H, t, J=8,4 Hz, N^+-CH_2-); 3,25 ppm (2H, t, J=8,4 Hz, CH_2-I); 3,20 ppm (3H, s, CH_3); 1,83 ppm (2H, quint, J=7,8 Hz, CH_2-C-N^+); 1,73 ppm (2H, quint, J=7,8 Hz, CH_2-C-I) ; 1,42 ppm (2H, quint, J=7,8 Hz, CH_2) 1,22~1,36 ppm (6H, m, H).
SM (ES+) : M=388,2 (calculé 388,1)

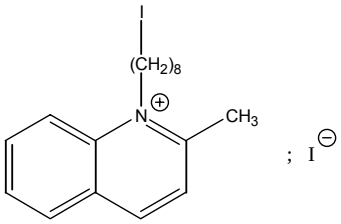
Iodure de 2-méthyl,3-méthylthiobenzothiazolium 44



La benzothiazole-2-thione (1,5g; 8,27mmol; 1eq.) est dissoute dans 20mL de méthanol, puis on ajoute l'iodure de méthyle (1,16mL; 18,7mmol; 2,26eq.). La solution est chauffée à reflux pendant trois heures, puis refroidie. Un produit précipite et la solution est filtrée. Le filtrat est lavé plusieurs fois avec du toluène. On recueille 2,55g d'une poudre de couleur crème.

Rendement: 95%
CCM: Rf=0,15 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10).
RMN ^{1}H (DMSO-d_6, 500 MHz) : 8,40 ppm (1H, d, J=9,6 Hz, H_{Ar}); 8,18 ppm (1H, d, J=9,6 Hz, H_{Ar}); 7,83 ppm (1H, t, J=9,6 Hz, H_{Ar}); 7,72 ppm (1H, d, J=9,0 Hz, H_{Ar}); 4,10 ppm (3H, s, N^+-CH_3); 3,12 ppm (3H, s, CH_3-S-).

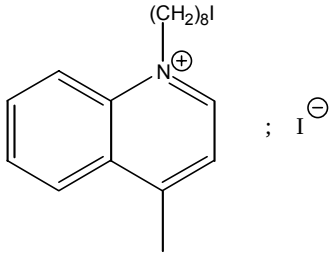
Iodure de *N*-(8-iodooctyl)-2-méthylquinolinium 45



Dans un ballon tricol, le diiodooctane (4,27 g; 2,33 mL; 11,7 mmol; 5 eq.) est dissous dans 6 mL de dioxanne. La solution est chauffée à reflux puis une solution de quinaldine (333 mg; 315 µL; 2,33 mmol; 1 eq.) dans 3mL de dioxanne est ajoutée au goutte-à-goutte lent et à l'abri de la lumière. Après 30 heures de réaction, le suivi par CCM de l'avancement de la réaction montre que le produit de *bis*-alkylation se forme rapidement. La réaction est arrêtée et le mélange réactionnel évaporé jusqu'à obtention d'une huile brune. Une poudre noire est précipitée par ajout de 20mL de pentane, lavée plusieurs fois au pentane puis purifée sur colonne de silice par un gradient de 0 à 4% de méthanol dans le dichlorométhane. On isole 120mg d'une poudre ocre.

Rendement: 10%
CCM: Rf=0,35 pour le composé **46**, Rf=0,17 pour le produit de *bis*-alkylation (CH_2Cl_2/MeOH 80:20).
SM (ES+) : M=382,1 (calculé 382,3)

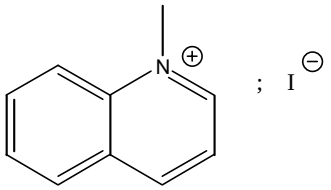
Iodure de N-(8-Iodooctyl)-lepidinium 46



On dilue dans 2 mL de dioxanne sec, 1mL de diiodooctane (5,03 mmol, 4,7 eq.) qu'on place dans un tricol de 10 mL équipé d'un réfrigérant et d'une ampoule à brome. Le mélange est chauffé à reflux, puis une solution de 140 µL de lépidine (1,06 mmol, 1eq.) dans 1mL de dioxanne sec est additionnée pendant 30 minutes. Le reflux est maintenu pendant 3 heures, la solution est de couleur brune. Le mélange est concentré à sec et le résidu est purifié sur colonne de silice par un gradient de méthanol dans le CH_2Cl_2 de 1 à 3%. Les fractions sont évaporées et on receuille 298 mg d'une huile brun jaune.

Rendement: 55%.
CCM: Rf=0,20 (CH_2Cl_2/MeOH 90:10).
RMN ^{1}H (DMSO-*d*$_6$, 500 MHz) : 9,40 ppm (1H, d, J=9,6 Hz, H_{Ar}); 8,58 ppm (1H, d, J=9,6 Hz, H_{Ar}); 8,53 ppm (1H, d, J=9,6 Hz, H_{Ar}); 8,25 ppm (1H, t, J=9,0 Hz, H_{Ar}); 8,08 ppm (2H, m, J=9,0 Hz, H_{Ar}); 4,99 ppm (2H, t, N^+-CH_3, J=7Hz); 3,24 ppm (2H, quint, CH_2) ; 3,00 ppm (3H, s, CH_3); 1,93 ppm (2H, quint, CH_2) ; 1,72 ppm (2H, quint, CH_2) ; 1,24-1,36 ppm (8H, m) ;
SM (ES+) : M=382,2 (calculé 382,3)

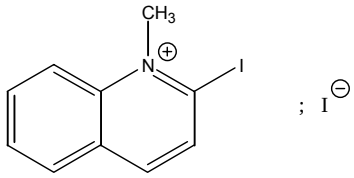
Iodure de N-Méthylquinolinium 47



Dans un ballon monocol de 25mL surmonté d'un réfrigérant, 915mg (7,08 mmol) de quinoléine sont dilués dans 5mL de méthanol. Puis on ajoute 2,64 mL d'iodométhane (42,5 mmol, 6 eq.) et le mélange est porté à reflux durant une heure. Le mélange est refroidi à température ambiante, le méthanol est évaporé jusqu'à ce que le mélange soit huileux. On ajoute 10mL de cyclohexane, un solide orangé précipite. Après avoir refroidi les eaux-mères, la solution est filtrée. On récupère 1,79g d'une poudre ocre.

Rendement: 93%
CCM R_f=0,00 (CH_2Cl_2/MeOH ; 95:5 v/v) ; R_f=0,18 (CH_2Cl_2/MeOH ; 90:10 v/v)
RMN ^{1}H (DMSO-*d*$_6$, 500 MHz) : 9,50 ppm (1H, m, H_{Ar}) ; 9,27 ppm (1H, d,J=10,8 Hz, H_{Ar}) ; 8,51 ppm (1H ; d, J=10,2 Hz, H_{Ar}) ; 8,47 ppm (1H ; d, J=6,0 Hz, H_{Ar}) ; 8,28 ppm (1H ; t, J=8,4 Hz, H_{Ar}) ; 8,16 ppm (1H ; dd, J=7,2 Hz x 10,2 Hz , H_{Ar}) ; 8,06 ppm (1H ; t, J=9,0 Hz, H_{Ar}) ; 4,63 ppm (3H ; s, N^+-CH_3).
SM (ES+) : M=144,1 (calculé : 144,2)

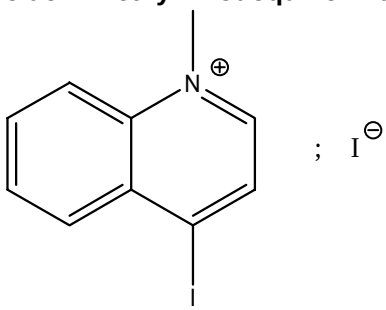
Iodure de *N*-méthyl-2-iodoquinolinium 48



La 2-chloroquinoline (400mg; 2,44 mmol; 1eq.) est dissoute dans 6 mL de dioxanne à l'abri de la lumière. Le sulfate de diméthyle (350 µL; 3,67 mmol; 1,5 eq.) est ajouté à la seringue et le mélange est chauffé à 80°C. Après une heure, le suivi de l'avancement de la réaction par CCM montre l'apparition d'un produit apolaire (Rf=0,78 dans CH_2Cl_2/MeOH; 90:10; v/v). Environ 1,5 mL de sulfate de diméthyle (6,5 eq.) sont ajoutés. Après 7 heures supplémentaires de chauffage, on constate la disparition de la chloroquinoline (Rf=0,84), l'apparition du produit désiré (Rf=0,14) ainsi que la présence de deux produits de dégradation (Rf=0,71 et Rf=0,78). La réaction est arrêtée et le mélange réactionnel dilué par 25mL de CH_2Cl_2. La phase organique est extraite par 20 mL d'une solution de KI à 0,2M puis avec l'eau (2×20 mL). La phase organique est séchée, filtrée et concentrée. On recueille une huile brune sombre. Etant donnée la sensibilité du produit, il n'est pas purifié davantage. L'analyse par spectrométrie de masse montre la présence des produits de dégradation par attaque nucléophile de l'eau (2-hydroxyquinolinium) et du méthanol (2-méthoxyquinolinium).

CCM: Rf = 0,14 (CH_2Cl_2/MeOH (90 :10; v/v)).

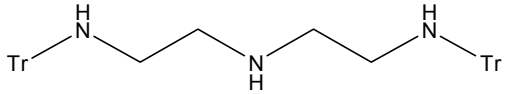
Iodure de *N*-Méthyl-4-iodoquinolinium 49



Dans un ballon de 10 mL , on place 100mg de 4-chloroquinoline (611µmol, 1eq.) en solution dans 2 mL de dioxanne sec distillé sur $LiAlH_4$ et conservé sur $CaSO_4$. Puis on injecte 290 µL de diméthylsulfate (3 mmol ; 5 eq.) et le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à 80°C.
Après 3 heures, l'analyse CCM montre que la chloroquinoléine a disparu. Le mélange réactionnel est concentré, on obtient une huile blanchâtre. Le résidu est dilué dans 25mL de dichlorométhane et extrait par une solution de iodure de potassium 0,1M à pH=5 (HCl) (2x25mL). Le mélange brut est concentré par évaporation, on recueille une huile brun rougeâtre.
Le produit est conservé tel quel sans purification ultèrieure.

CCM: Rf = 0,10 (CH_2Cl_2/MeOH (90 :10; v/v));

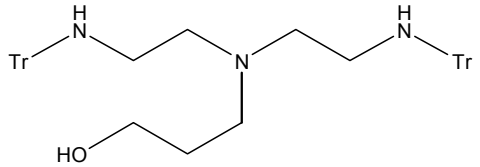
1,7-*bis*-trityl-hepta-1,4,7-triazane 56



Dans 25 mL de pyridine anhydre sont dissous 10,9 g de chlorure de trityle (39 mmol; 2,1 eq.). La diiéthylènetriamine (2 mL; 18,5 mmol; 1 eq.) est séchée par coévaporation dans la pyridine (2×5 mL) et ajoutée à t.a. Après une nuit à t.a. le mélange réactionnel est dilué avec 100 mL de dichlorométhane et extrait par 3×100mL NaOH 0,1M. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4, filtrée et évaporée. On obtient un épais sirop ambré qui est cristallisé dans un faible volume de *n*-hexane. Après filtration, on recueille un solide qui est seché sous vide dans un dessicateur/P_2O_5. Le produit majoritaire est le composé *bis*-tritylé qu'on observe en CCM à R_f=0,68 (CH_2Cl_2/MeOH 80:20). L'impureté principale est le produit *tris*-tritylé (R_f=0,88).
On isole 9,39 g de poudre.

Rendement: 86%
CCM: Rf = 0,32 (CH_2Cl_2/MeOH (90 :10; v/v));

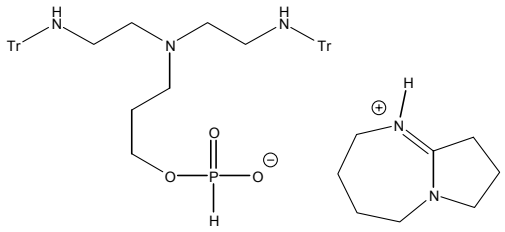
1,7-*bis*-trityl, 4-(3-hydroxypropyl)hepta-1,4,7-triazane 57



L'amine (750 mg ; 1,28 mmol ; 1eq.) est séchée par coévaporation avec de l'acétonitrile anhydre puis mise en solution dans 7 mL d'acétonitrile sec ; la solubilité n'est que partielle. On ajoute à la seringue à ce mélange, sous agitation et sous atmosphère d'argon, 450 µL de DIEA (335 mg ; 2,59 mmol ; 2,0 eq.) et 235 µL de 3-bromopropanol (361 mg ; 2,60 mmol ; 2,0 eq.). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant une heure. La réaction est suivie par CCM. Le mélange réactionnel est dilué avec du CH_2Cl_2 (100 mL) et lavé par 2x25 mL d'une solution aqueuse à 5% de bicarbonate de sodium. Les phases organiques sont réunies, séchées et concentrées sous vide, le résidu est purifié sur colonne de silice (éluant: CH_2Cl_2 / MeOH; 99:1 (v/v)). Les fractions sont réunies et séchées sous vide. On recueille 750 mg d'une pâte brune/orangée.

Rendement: 91%
CCM: Rf = 0,27 (CH_2Cl_2/acétone (90 :10; v/v)) ; Rf = 0,12 (CH_2Cl_2/acétone (95 :5; v/v)) ; Rf = 0,00 (CH_2Cl_2); Rf = 0,48 (CH_2Cl_2/MeOH (90 :10; v/v)) ; Rf = 0,85 (CH_2Cl_2/MeOH (80 :20; v/v)) ; Rf du produit de départ dans les deux derniers systèmes : 0,32 et 0,74)
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) : 7,42 ppm (12H, d, J=9,0 Hz, H_{Ar}); 7,19 ppm (12H, t, J=9,0 Hz , H_{Ar}); 7,14 ppm (6H, t, J=8,4 Hz , H_{Ar}); 5,28 ppm (1H, s, OH); 3,59 ppm (2H, t, J=6,3 Hz , CH_2-O); 2,41 ppm (4H, t, J=6,9 Hz , TrNH-C**H**$_2$-); 2,31 ppm (2H, t, J=6,6 Hz , NCH_2); 2,21 ppm (4H, t, J=6,9 Hz , $NHCH_2C$**H**$_2$); 1,57 ppm (2H, quint, J=6,6 Hz , CH_2C**H**$_2CH_2$); 1,24 ppm (2H, s, NH).
SM (ES+) : M=646,3; (calculé M= 645,9)

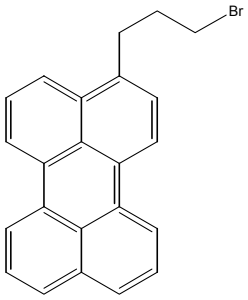
_O_-(4-(3-tritylaminoethyl)-7-trityl, hepta-4,7-diazyle)-H-phosphonate 58, 59



On coévapore 110,6 mg de la triamine alcool (171 µmol ; 1 eq.) avec 5 mL de pyridine anhydre (x2), puis on la dissous dans 2 ml d'un mélange pyridine/1,2-dichloroéthane (1:1; v/v) sec conservé sur tamis 4Å. La solution est refroidie à 0°C, on ajoute 134,7 mg de 2-chlorobenzo-1,3,2-dioxaphosphorin-4-one (171 µmol ; 1 eq.). L'avancement de la réaction est suivi par CCM Après 15 minutes d'agitation, le mélange réactionnel est versé dans une solution molaire de bicarbonate de triéthylammonium (40 mL). Le mélange biphasique est maintenu sous agitation pendant 30 minutes puis est extrait par du CH_2Cl_2 (2x50 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées, séchées sur Na_2SO_4 et concentrées sous vide. Le résidu est purifié sur colonne de silice par un gradient de 1 à 5% de MeOH dans le CH_2Cl_2 contenant 0,5% de TEA. Les fractions sont réunies et évaporées. On recueille 90 mg d'une produit blanc, mousseux. Ce sel est insoluble dans l'acétonitrile, la pyridine, le THF, le dichlorométhane ainsi que le chloroforme. Afin de le solubiliser en vue du couplage à l'oligonucléotide, le sel de DBU est préparé . Pour cela, le sel de triéthylammonium est dissous dans l'acétate d'éthyle (20 mL) puis lavé par 10mL d'une solution 0,2M d'hydrogénocarbonate de DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undécène). La phase organique est séchée et concentrée sous vide

Rendement: 66%.
CCM: Rf = 0,45 (CH_2Cl_2/MeOH (80 :20; v/v)); Rf = 0,21 (CH_2Cl_2/MeOH (90:10; v/v));
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz) : 6,73 ppm (1H,d,J = 615 Hz, P-**H**)
SM (ES+) : M=708,4 (attendu : 708,8)

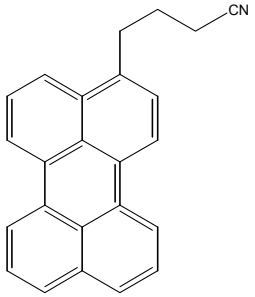
1-Bromo,3-pérylènylpropane 69



Le 3-pérylènylpropanol (60 mg ; 195 µmol ; 1 eq.) et la triphénylphosphine (86 mg ; 330 µmol ; 1,8 eq.) sont séchés par coévaporation avec du toluène (4×3 mL) puis dissous dans 5 mL de DMF (sec, distillé sous pression réduite sur $CaSO_4$). On ajoute rapidement le tetrabromure de carbone (108 mg ; 326 µmol ; 1,7eq.) et le montage est placé sous atmosphère d'argon. Le mélange est agité à t.a. pendant une nuit puis à 80°C pendant 16 heures. La réaction est suivie par CCM, lorsque la disparition de l'alcool est constatée, on laisse la réaction refroidir pendant la nuit jusqu'à t.a. Puis le mélange réactionnel est dilué avec 200 mL de CH_2Cl_2 et extrait par 2×100 mL HCl 0,1N. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4. Le résidu est purifié sur gel de silice (éluant CH_2Cl_2/Hexane 1:1).
On recueille 65 mg d'une poudre jaune clair.

Rendement: 90%
CCM R_f=0,33 (CH_2Cl_2/hexane ; 1:2 v/v); Rf= 0,75 (CH_2Cl_2)

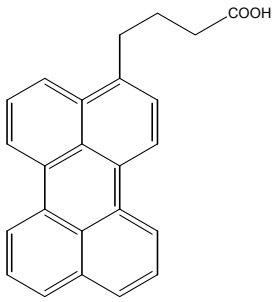
4-(3-pérylènyl)butyronitrile 70



Aux 65 mg de 1-bromo,3-pérylènylpropane (174µmol), on mélange 46 mg de 1-iodo,3-pérylènylpropane (109 µmol), qu'on dissous dans 50mL de DMSO technique. Le cyanure de sodium (150 mg, 3 mmol, > 10 eq.) est ajouté. Après environ 15 minutes, la réaction, suivie par CCM, est totale. Le brut est dilué dans 200 mL CH_2Cl_2 et lavé par 3×150 mL $NaHCO_3$ 2%. Les traces de dérivés halogénés sont éliminées par purification sur plaque préparative (élutions : Hexane/ CH_2Cl_2 (2:1) ×2 ; puis Hexane/ CH_2Cl_2 (1:1) ×3). On obtient 90mg d'une poudre jaune foncé.

Rendement: 99%.
CCM R_f=0,00 (CH_2Cl_2/hexane ; 1:2 v/v); Rf= 0,33 (CH_2Cl_2)
SM (ES+) : M=319,4 (calculé : 319,1)

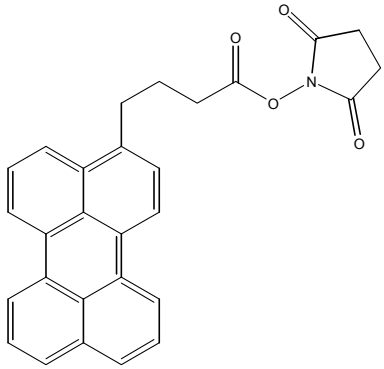
Acide 4-(3-pérylènyl)butyrique 71



Dans un ballon de 250 mL, on dissous le pérylenylbutyronitrile (90 mg ; 280 µmol ; 1 eq.) dans 80 mL d'isopropanol technique. On ajoute 50 mL d'une solution de potasse 0,4 M (>80 eq. en KOH). Le mélange est chauffé à reflux à l'abri de la lumière. Le composé est totalement soluble dans la solution hydroalcoolique chaude. La réaction est suivie par CCM, après 5 h de reflux, deux composés apparaissent, après 10 h. de réaction le dérivé nitrile a quasiment disparu et le deuxième produit formé (supposé être le pérylenylbutyramide) a à présent presque disparu. Le reflux est maintenu 3 heures supplémentaires jusqu'à évaporation totale de l'isopropanol. La phase aqueuse est additionnée de potasse jusqu'à la concentration de 2 M puis extraite avec 2×100 mL de CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec 50 mL KOH 2M, les phases aqueuses sont réunies. Le dichlorométhane résiduel est évaporé précautionneusement (formation de mousse), puis la phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH=1 et refroidie à 5°C. Après quelques temps, un produit précipite. La solution est filtrée, les eaux-mères sont incolores. L'analyse par CCM montre que les eaux-mères contiennent plus de 90% d'acide, tandis que la phase organique ne contient exclusivement que l'amide. Le gateau est lavé par CH_2Cl_2/MeOH (1:1, v/v). On recueille 75 mg d'une poudre ocre.

Rendement: 78%
CCM R_f=0,34 (CH_2Cl_2/MeOH ; 95:5 v/v), R_f=0,52 (CH_2Cl_2/MeOH ; 90:10 v/v). Butyramide : R_f=0,22 et 0,47 respectivement)
RMN ^{1}H ($CDCl_3$ 500 MHz) : 8,35 ppm (2H, d×d, J=8,0 × 13,5 Hz, H_{Ar}) ; 8,28 ppm (2H, d×d, J=8,0 × 13,5 Hz, H_{Ar}) ; 7,99 ppm (1H, d, J=9,0 Hz, H_{Ar}) ; 7,76 ppm (2H ; t, J = 8,3 Hz ; H_{Ar}) ; 7,54 ppm (3H ; m,H_{Ar}) ; 7,38 ppm (1H ; d ; J = 7,5 Hz, H_{Ar}) ; 3,00 ppm (2H ; t, Per-C**H**$_2$- ; J=7,3 Hz) ; 2,32 ppm (2H ; t ; -C**H**$_2$-COO-) ; 1,89 ppm (2H ; quint ; J = 7,3 Hz, -CH_2C**H**$_2$$CH_2$-).
SM (ES+) : M=337,3 (calculé : 338,1)

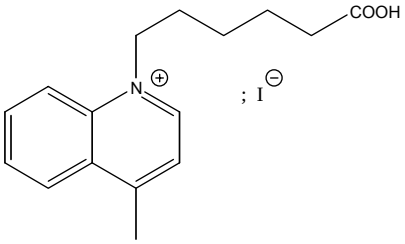
4-(3-pérylènyl)butyrate de succinimidyle 72



Le THF est agité sur $FeSO_4$ pendant une heure puis distillé sur Na / benzophénone 3h. puis distillé sous argon. Le dérivé pérylène (57 mg; 168 µmol; 1eq.) et le *N*-hydroxysuccinimide (23,3 mg ; 203 µmol ; 1,2 eq.) sont séchés par coévaporation au toluène (3×5 mL) puis mis sous argon. Après dissolution dans 8 mL de THF sec, on ajoute le DCC (69,5 mg; 337 µmol ; 2 eq.). La réaction se déroule à t.a. à l'abri de la lumière. Après 16h., la solution devient légèrement troublée. Le mélange est centrifugé et le surnageant prélevé. Le THF est évaporé, le résidu repris dans un minimum de CH_2Cl_2. Le mélange est purifié sur plaque chromatographique préparative (éluant : CH_2Cl_2). L'ester actif migre sous forme d'une large bande jaune qui se détache de l'acide résiduel. Le produit est extrait, repris dans CH_2Cl_2 et le solvant évaporé. On obtient 50 mg d'une poudre jaune clair.

Rendement: 68%.
CCM R_f=0,35 (CH_2Cl_2)
RMN ^{1}H ($CDCl_3$ 500 MHz): 8,21 ppm (2H, d×d, J=7,7 × 14,5 Hz, H_{Ar}) ; 8,15 ppm (2H, d×d, J=8,0 × 13,5 Hz, H_{Ar}); 7,89 ppm (1H, d, J=8,5 Hz, H_{Ar}); 7,67 ppm (2H, t, J = 8,3 Hz, H_{Ar}); 7,54 ppm (1H, t, J=8,5 Hz,H_{Ar}); 7,48 ppm (2H, d×t, J = 1,8×7,5 Hz, H_{Ar}); 7,38 ppm (1H, d, J=7,7 Hz, H_{Ar}); 3,16 ppm (2H, t, Per-C**H**$_2$-, J=7,7 Hz); 2,86 ppm (4H, s,Succ); 2,73 ppm (2H, t, -C**H**$_2$-COO-, J=7,3 Hz); 2,22 ppm (2H, quint, J = 7,4 Hz, -CH_2C**H**$_2$$CH_2$-).

Iodure de 1-(5-carboxypentyl)-4-méthylquinolinium 73

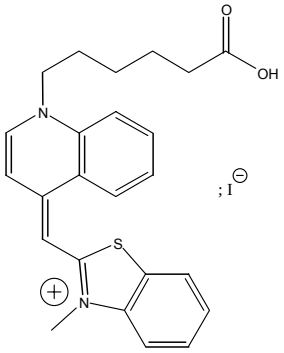


Le chlorobenzène est distillé sur P_2O_5.
L'acide 6-bromohéxanoïque (546 mg; 2,8 mmol; 1 eq.) est dissous dans 1 mL de chlorobenzène. La lépidine (186 µL; 1,4 mmol; 1 eq.) est ajoutée et le mélange réactionnel est chauffé à 120°C à l'abri de la lumière. Après environ 20 h. de chauffage, la solution est d'aspect brun foncé. Après refroidissement, une huile épaisse se dépose et est séparée puis lavée plusieurs fois au chlorobenzène (3×3 mL). L'huile est engagée dans la réaction suivante sans purification supplémentaire.

CCM R_f=0,00 (CH_2Cl_2/MeOH; 80:20 v/v)

Caractéristiques: référence [209]

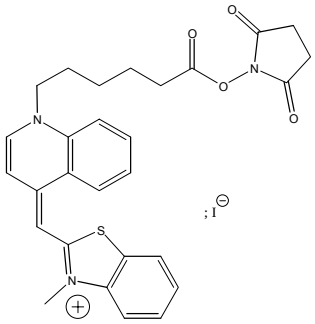
Acide 6-(1,4-dihydro(4-((3-methylbenzothiazol-2-ylidene)methyl)quinolin-1-yl))hexanoïque 74



Le iodure de 2,3-diméthylbenzothiazolium (452 mg ; 1,4 mmol 1eq.) et le bromure de *N*-(5-carboxypentyl)lépidinium (474 mg; 1,4 mmol; 1eq.) sont dissous dans 10 mL d'un mélange MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v) dans un ballon. On ajoute 150 µL de TEA, la solution prend immédiatement une couleur rouge sombre. Après une nuit, le mélange réactionnel est concentré à sec et purifié sur colonne de silice (éluant: MeOH/CH_2Cl_2 (95:5, v/v)). On recueille 169 mg d'une poudre rouge.

Rendement: 25%
CCM R_f=0,07 (CH_2Cl_2/MeOH ; 80:20 v/v)
RMN ^{1}H ($CDCl_3$ 500 MHz) : 8,77 ppm (1H, d, J=8,3 Hz, H_{Ar}) ; 8,65 ppm (1H, d, J=7,3 Hz, H_{Ar}) ; 8,11 ppm (1H, d, J=8,8 Hz, H_{Ar}) ; 8,03 ppm (1H, d, J=7,3 Hz, H_{Ar}) ; 7,97 ppm (1H, t, J=7,8 Hz, H_{Ar}) ; 7,77 ppm (1H, d, J=8,3 Hz, H_{Ar}); 7,73 ppm (1H, t, J=7,8 Hz, H_{Ar}) ; 7,60 ppm (1H, t, J=7,8 Hz, H_{Ar}) ; 7,40 ppm (1H, t, J=7,6 Hz, H_{Ar}); 7,35 ppm (1H ; d, J = 7,3 Hz H_{Ar}) ; 6,90 ppm (1H ; s, =CH-) ; 4,57 ppm (2H ; t ; J = 7,7 Hz, quin-C**H**$_2$-) ; 4,00 ppm (3H ; s, -CH_3) ; 2,06 ppm (2H ; t ; J = 7,3 Hz) ; 1,84 ppm (2H, quint, J = 7,5 Hz) ; 1,53 ppm (2H, quint, J=7,4 Hz) ; 1,36 ppm (2H, quint).
SM (ES+) : M=405,3 (calculée : 405,2)

6-(1,4-dihydro(4-((3-methylbenzothiazol-2-ylidene)methyl)quinolin-1-yl))hexanoate de succinimidyle 75



L' acide 6-(2-((*N*'-methylquinolin-4-ylidène)méthyl)benzothiazol-3-yle)hexanoïque (160 mg ; 330 µmol ; 1 eq.) est séché par coévaporation avec du toluène (3×5 mL), et dissous dans 3 mL de DMF. On additionne 143 mg de DCC (693 µmol ; 2,1eq.) et 80 mg de *N*-hydroxysuccinimide (693 µmol ; 2,1 eq.), et la réaction évolue à t.a. à l'abri de la lumière. La réaction est suivie par CCM. Après 72h., la réaction n'évolue plus. Le brut est filtré et le filtrat est lavé avec 25 mL d'AcOEt. Les eaux-mères sont refroidies à 5°C et filtrées à nouveau puis évaporées à sec. Le produit est purifié sur colonne de silice par un gradient de 0 à 5 % de MeOH dans le CH_2Cl_2. Le produit est recueilli sous forme d'un solide rouge

Rendement: 25%
CCM: R_f=0,58 (CH_2Cl_2/MeOH ; 80:20 v/v)
RMN ^{1}H ($CDCl_3$ 500 MHz) : 8,85 ppm (1H, d, J=7,3 Hz, H_{Ar}) ; 8,71 ppm (1H, d, J=8,7 Hz, H_{Ar}) ; 7,24 à 7,76 ppm (8H ; m, H_{Ar}) ; 6,72 ppm (1H ; s, =CH-) ; 4,52 ppm (2H ; t ; J = 7,7 Hz, quin-C**H**$_2$-) ; 4,00 ppm (3H ; s, -CH_3) ; 2,85 ppm (4H ; s ; succ) ; 2,62 ppm (2H ; t ; J = 7,3 Hz, -C**H**$_2$-COOSucc) ; 1,94 ppm (2H ; quint ; J = 7,5 Hz) ; 1,82 ppm (2H ; quint, J=7,4 Hz) ; 1,60 ppm (2H ; quint).
SM (ES+) : M=502,3 (calculée : 502,2)

<u>Annexe</u>: Notions de fluorescence

Le conjugué en solution est excité par un rayonnement de longueur d'onde λ émis par une lampe. Le photon possède une énergie $h\nu$. Les deux grandeurs sont liées par la relation $\lambda = c/\nu$ où c est la vitesse de la lumière dans le vide. Une partie des molécules à l'état fondamental S_0 en solution capture ce photon. Ce phénomène d'absorption se traduit par une excitation des molécules qui se retrouvent à un niveau d'énergie vibrationel du premier état excité (S_1*) ①.

La molécule peut se désexciter partiellement et son énergie revenir au premier niveau du premier état excité (S_1) ②. Ces transferts d'énergie se font par des phénomènes de vibration et rotation des liaisons qui composent la molécule excitée.

Dans un deuxième temps, la molécule se désexcite en émettant un photon d'énergie $h\nu'$; elle se retrouve au niveau énergétique fondamental S_0. C'est l'émission de fluorescence ③. Etant donné que $h\nu' < h\nu$, nous avons $\lambda_{em} > \lambda_{exc}$, ce qui explique pourquoi le maximum d'émission de fluorescence est décalé vers le rouge comparé au maximum d'excitation (ou d'absorption). Le décalage entre λ_{em} et λ_{exc} est appelé "décalage de Stockes".

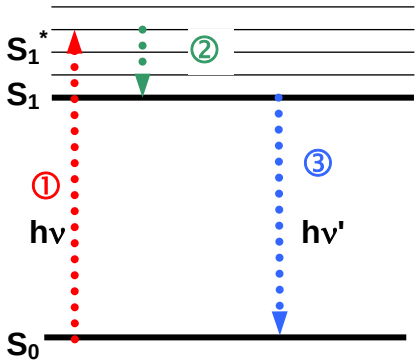


Figure 143: Diagramme de Jablonski simplifié des différents niveaux énergétiques

Certains composés émettent peu ou pas de fluorescence car leurs molécules se desexcitent selon d'autres voies tels le transfert de chaleur, le transfert d'énergie par collision avec d'autres molécules en solution, le passage à l'état triplet, les réactions photochimiques…

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

[1]: Molecular structure of nucleic acids.
Watson J.D., CrickF.H., *Nature*, **1953**, *171*, 737-738.

[2]: Formation of a three-stranded polynucleotide molecule.
Felsenfeld G., Davies D.R., Rich A., *J.Am.Chem.Soc.,* **1957**, *80*, 2023-2024.

[3]: G-quadruplex DNA as a target for drug design
Kerwin S.M.; *Curr. Pharmaceutical Design.,* **2000**, *6*, 441-471.

[4]: Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature.
Marmur J., Doty P., *J.Mol.Biol.,* **1962**, *5*, 109-118.

[5]: Analysis of thermal melting curves
Mergny J.-L., Lacroix L., *Oligonucleotides*, **2003**, *13(6)*, 515-537.

[6]: Control of gene expression by oligodeoxynucleotides covalently linked to intercalating agents and nucleic acid-cleaving reagents. pg. 137-172. Dans " Oligonucleotides. Antisens Inhibitors of Gene Expression". Topic in molecular and structural biology Vol. 12.
Edité par Cohen J.S. MacMillan Press LTD, London, 1989.
Hélène C., Toulmé J.J.

[7]: Detection of sickle cell β^S-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides.
Conner B.J., Reyes A.A., Morin C., Itakura K., Teplitz R.L., Wallace R.B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, *80*, 278-282.

[8]: Studies in polynucleotides I. A new and general method for the chemical synthesis of the C5'-C3' interdinucleotidic linkage. Synthesis of deoxyribonucleotides.
Gilham P.T., Khorana H.G, *J. Am. Chem. Soc.,* **1958**, *80*, 6521-6222.

[9]: Part XXXII: Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3'-5' internucleotide linkage.
Michelson A.M., Todd A.R., *J. Chem. Soc.,* **1955**, 2632-2636.

[10]: Nucleotide chemistry. XX. Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links
Letsinger R.L., Finnan J.L., Lundsford W.B., *J. Am. Chem. Soc.,* **1975**, *97*, 3278-3279.

[11]: Universal reusable polymer support for oligonucleotide synthesis.
Kumar P., Mahajan S., Gupta K.C., *J.Org.Chem.,* **2004**, *69*, 6482-6485.

[12]: Deoxynucleosides phosphoramidites. A new class of key intermediates for deoxypolynucleotides synthesis.
Beaucage S.L., Caruthers M.H, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862

[13] : Diastereomerically pure R_p and S_p dinucleoside H-phosphonates : the stereochemical course of their conversion into *P*-methylphosphonates, phosphorothioates, and [^{18}O] chiral phosphates.
Seela F., Kretschmer U., *J. Org. Chem.,* **1991**, *56*, 3861-3869.

[14]: The automated synthesis of sulfur-containing oligodeoxyribonucleotides using 3H-1,2-benzodithiol-3-one 1,1-dioxide as a sulfur-transfer reagent.
Radhakrishnan P.I., Lawrence R.P., William E., Regan J.B., Beaucage S.L.; *J. Org. Chem.*; **1990**; *55(15)*; 4693-4699.

[15]: Part XLI: Mixed anhydrides as intermediates in the synthesis of dinucleosides phosphates.
Hall R.H., Todd A.R., Webb R.F., *J. Chem. Soc.,* **1957**, 3291-3296.

[16] : Syntheses of polycyclic aromatic hydrocarbon-nucleoside and oligonucleotide adducts speciffically alkylated on the amino functions of deoxyguanosine and deoxyadenosine.
Lee H., Hinz M., Stezowski J.J., Harvey R.G., *Tetrahedron Lett.,* **1990**, *31*, 6773-6776.

[17] : Selective and stable DNA base pairing without hydrogen bonds.
Metray T.J., Kool E.T., *J.Am.Chem.Soc.,* **1998**, *120*, 6191-6192.

[18] : Reagent for introducing pyrene residues in oligonucleotides.
Korshun V.A., Pestov N.B., Birikh K.R., Berlin Y.A., *Bioconjugate Chem.,* **1992**, *3*, 559-562.

[19]: Palladium (0)- catalysed modification of oligonucleotides during automated solid-phase synthesis.
Khan S.I., Grinstaff M.W., *J. Am. Chem. Soc.,* **1999**, *121*, 47704-4705.

[20]: A versatile modification on on-column oligodeoxynucleotides using a copper-catalyzed oxydative acetylenic coupling reaction.
Minakawa N., Ono Y., Matsuda A., *J. Am. Chem. Soc.,* **2003**, *125*, 11545-11552.

[21]: Introducing structural diversity in oligonucleotides via photolabile, convertible C5-substituted nucleotides.
Kahl J.D., Greenberg M.M., *J. Am. Chem. Soc.,* **1999**, *121*, 597-604.

[22]: A simple method for electrophilic functionalization of DNA.
Miller G.P., Kool E.T., *Org. Lett.,* **2002**, *4(21)*, 3599-3601.

[23]: Versatile 5'-functionalization of oligonucleotides on solid support: amine, azide, thiol and thioether via phosphorus chemistry.
Miller G.P., Kool E.T., *J. Org. Chem.,* **2004**, 69, 2404-2410.

[24]: The synthesis of oligonucleotides containing a primary amino group at the 5'-terminus
Connolly B.A., *Nucleic. Acid. Res.*, **1987**, *15***,** 3131-3139.

[25]: Synthesis and application of derivatizable oligonucleotides
Gibson K.J., Benkovic S.J., *Nucleic Acid Res.,* **1987**, *15,* 6455-6467.

[26]: Site-specific functionalization of oligodeoxynucleotides for non-radioactive labelling.
Agrawal S., Tang J.-Y., *Tetrahedron Lett.,* **1990**, *31*, 1543-1546.

[27]: Protocols for oligonucleotide conjugates. Functionalization of oligonucleotides with amino groups and attachment of amino specific reporter groups.p.93-120.
Agrawal S., Methos in molecular biology, Volume 26. Humana Press., Totowa, NJ, **1994**.

[28]: Aminooxy functionalized oligonucleotides: preparation, on-support derivatization, and postsynthetic attachment to polymer support.
Salo H., Virta P., Hakala H., Prakash T.P., Kawazaki A.M., Manoharan M., Lönnberg H., *Bioconjugate Chem.,* **1999**, *10*, 815-823.

[29]: Use of an aminooxy linker for the functionalization of oligodeoxyribonucleotides.
Defrancq E., Lhomme J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2001**, *11*, 931-933.

[30] : Chemical synthesis of oligonucleotides containing a free sulphydryl group and subsequent attachment of thiol specific probes.
Connolly B.A., Rider P., *Nucleic. Acids Res.,* **1985**, *13*, 4485-4502.

[31] : Solid phase 5'-phosphorylation of oligonucleotides.
Connolly B.A., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28* , 463-466.

[32]: The stereospecific introduction of reporter groups to oligodeoxynucleotides by the labeling of individual phosphorus diastereomers.
O'Donnel M.J., Herbert N., McLaughlin L.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **1994**, *4*, 1001-1004.

[33] : Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphin.
Burns J.A., Butler J.C., Moran J., Whitesides G.M., *J.Org.Chem.,* **1991**, *56*, 2648-2650**.**

[34]: Rapid routes of synthesis of oligonucleotide conjugates from non-protected oligonucleotides and ligands possessing diffrent nucleophilic or electrophilic functionnal groups.
Grimm G.N., Boutorine A.S., Hélène C., *Nucleoside Nucleotide Nucleic Acids*, **2000**, *19*, 1943-1965.

[35] : 5'-bis-pyrenylated oligonucleotides displaying excimer fluorescence provide sensitive probes of RNA sequence and structure.
Kostenko E., Dobrikov M., Pyshnyi D., Petyuk V., Komarova N., Vlassov V., Zenkova M., *Nucleic Acids Res.,* **2001**, *29*, 3611-3620.

[36] : 5'-bis pyrenylated oligonucleotides display enhanced excimer fluorescence upon hybridization with DNA and RNA.
Kostenko E., Donrikov M., Komarova N., Pyshniy D., Vlassov V. Zenkova M., *Nucleoside Nucleotide Nucleic Acids,* **2001**, *20*, 1859-1870.

[37]: Antiviral activity of conjugates between poly(L-lysine) and synthetic oligodeoxyribonucleotides.
Leonetti J.P., Rayner B., Lemaître M., Gagnor C., Milhaud P.G., Imbach J.-L., Lebleu B., *Gene*, **1988**, *72*, 323-332.

[38]: Recognition and photo-induced cleavage and cross-linking of nucleic acids by oligonucleotides covaently linked to ellipticine.
Le Doan T., Perrouault L., Asseline U., Thuong N.T., Rivalle C., Bisagni E., Hélène C., *Antisense Res. Dev.,* **1991**, *1*, 43-54.

[39]: Versatile linker chemistry for synthesis of 3'-modified DNA
Lyttle M.H., Adams H., Hudson D., Cook R.M., *Bioconjugate Chem.,* **1997**, *8*, 193-198.

[40]: A general approach for the hydroxy group functionalization of synthetic oligonucleotides.
Guzaev A., Hovinen J., Azhayev A., Lönnberg H., *Nucleoside Nucleotide,* **1995**, *15*, 833-837.

[41]: DNA-binding of drugs used in medicinal therapies
Bischoff G., Hoffman S., *Curr. Med. Chem.,* **2002**, *9*, 321-348.

[42]: Intercalative binding of small molecules to nucleic acids
Graves D.E., Velea L.M., *Curr. Org. Chem.,* **2000**, *4*, 915-929.

[43]: Intercalators as anticancer drugs
Braña M.F., Cacho M., Gradillas A., de Pascual-Teresa B., Ramos A., *Curr. Pharmaceutical Design.,* **2001**, *7(17)*, 1745-1780.

[44]: Molecular recognition of DNA by small molecules
Dervan P.B.; *Bioorg. Med. Chem.,* **2001**, 9, 2215-2235.

[45]: Progress of Spectral probes for nucleic acids
Wang Y., Yang J., Wu X., Li L., Sun S., Su B., Zhao Z., *Anal. Lett.,* **2003**, *36*, 2063-2094.

[46]: Stains, labels and detection strategies for nucleic acids assay.
Kricka L.J., *Ann. Clin. Biochem.,* **2002**, *39*, 114-129.

[47]: Molecular fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence spectrometry.
Abgaria R.A., Oldham P.B., McCarroll M., McGown L.B., Warner I.M., *Anal. Chem.,* **2004**, *74*, 3952-3962.

[48]: DNA probes using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): designs and applications.
Didenko V.V., *BioTechniques*, **2001**, *31*, 1106-1121.

[49]: Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfert.
Carduallo R.A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P.C., Wolf D.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 8790-8794.

[50] : Fluorescence resonance energy transfer from pyrene to pérylène for nucleic acid hybridization assays under homogeneous solution conditions.
Masuko M., Ohuchi S., Sode K., Ohtani H., Shimadzu A., *Nucleic Acids Res.,* **2000**, *28*, e34.

[51]: Moleculare beacons –Probes that fluoresce upon hybridization.
Tyagi S., Kramer F.R., *Nat. Biotechnol.,* **1996**, *14*, 303-308.

[52]: DNA Sensors
Campas i Homs M., *Anal. Lett.,* **2002**, *35*, 1875-1894**.**

[53]: DNA-tethered Hoechst groove-binding agents: duplex stabilization and fluorescence characteristics.
Wiederholt K., Rajur S.B., Giuliano J., O'Donnell M.J., McLaughin L.W., *J.Am.Chem.Soc.,* **1995**, *118*, 7055-7062.

[54]: Fluorescent deazaflavin – oligonucleotide probes for selective detection of DNA.
Dueymes C., Décout J.-L., Peltié P., Fontecave M., *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2002**, *41*, 486-489.

[55]: Formation of DNA triple helice by an oligonucleotide conjugated to a fluorescent ruthenium complex.
Grimm G.N., Boutorine A.S., Lincoln P., Norden B., Hélène C., *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 324-331.

[56] : Fluorescence detection of specific RNA sequences using 2'-pyrene-modified oligoribonucleotides.
Yamana K., Zako H., Asazuma K., Iwase R., Nakano H., Murakami A., *Angew. Chem. Int. Ed.,* **2001**, *40*, 1104-1106.

[57] : Enhanced fluorescence in the binding of oligonucleotides with a pyrene group in the sugar fragment to complementary polynucleotides.
Yamana K., Gokota T., Ozaki H., Nakano H., Sangen O., Shimidzu T., *Nucleoside Nucleotide,* **1992**, *11*, 383-390.

[58]: Synthèse et réactivité d'oligothymidylates substitués par un agent intercalant et un groupe thiophosphate.
Thuong N.T., Chassignol M., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28* , 4157-4160.

[59] : Chemical 5'-phosphorylation of oligonucleotides valuable in automated DNA synthesis.
Uhlmann E., Engels J., *Tetrahedron. Lett.*, **1986**, *27*, 1023-1026.

[60] : A Chemical 5'-phosphorylation of oligodeoxyribonucleotides that can be monitored by trytil cation release.
Horn T., Urdea M.S., *Tetrahedron Lett.,* **1986**, *27*, 4705-4708.

[61] : Synthesis and utility of a DNA phosphorylating agent based on 2-(triphenylsilyl)ethanol.
Celebuski J.E., Chan C., *J. Org. Chem.,* **1992**, *57*, 5535-5538.

[62] : A new approach for chemical phosphorylation of oligonucleotides at the 5'-terminus.
Guzaev A., Salo H., Azhayev A., Lönnberg H., *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 9375-9384.

[63]: A novel reagent for the chemical phosphorylation of oligonucleotides.
Leuck M., Vagle K.E., Roach J.S., Wolter A., *Tetrahedron Lett.,* **2004**, *45*, 321-324.

[64]: A convenient and general approach to the synthesis of properly protected d-nucleoside-3′-hydrogenphosphonates *via* phosphite intermediates
Marugg J.E., Tromp M., Kuyl-Yeheskiely E., van der Marel G.A., van Boom J.H., *Tetrahderon Lett.,* **1986**, *27*, 2661-2664.

[65]: New reagent for the preparation of oligonucleotides involving a 5'-thiophosphate or a 5'-phosphate group.
Lartia R., Asseline U., *Tetrahedron Lett.,* **2004**, *45*, 5949-5952.

[66] : The alkaline decomposition of organic disulfides. II. Alternative pathways as determined by structure.
Danehy J.P., Hunter W.E., *J.Org.Chem.*, **1967**, *32*, 2047-2053.

[67]: Oxalyl-CPG: a labile support for synthesis of sensitive oligonucléotide derivatives.
Alul R.H., Singman C.N., Zhang G., Letsinger R.L., *Nucl. Acid Res.,* **1991**, *19*, 1527-1532.

[68]: Hydroquinone-*O,O*'-diacetic acid ('Q-linker') as a replacement for succinyl and oxalyl linker arms in solid phase oligonucleotide synthesis.
Pon R.T., Yu S., *Nucleic Ac. Res.,* **1997**, *25*, 3629-3635.

[69]: Solid-phase synthesis of modified oligodeoxyribonucleotides with an acridine derivative or a thiophosphate group at their 3′end. Asseline, U.; Thuong, N. T. *Tetrahedron Lett.,* **1989**, *30*, 2521-2524

[70]: New solid-phase for automated synthesis of oligonucleotides containing an amino-alkyl linker at their 3′-end. Asseline, U.; Thuong, N. T., *Tetrahedron Lett*., **1990**, *31*, 81-84.

[71] : The Cyanine and related dyes.
Chemistry of Carbon Compound Vol. IVb, **1959**, pp.1053-1080.
Andersen G.
Ed. : E.H. Rodd. G.
Elsevier Publishing Company

[72]: Cyanines during the 1990's: A review
Mishra A., Behera R.K, Behera P.K., Mishra B.K., Behera G.B., *Chem. Rev.,* **2000**, *100*, 1973-2011.

[73]: The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA.
Nygren J., Svanvik N., Kubista M., *Biopolymers.,* **1998**, *1,* 39-51.

[74] : Determination of the stability of complexes between DNA and the thiazole orange derivatives TO6 and TOTO by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy.
Nissum M., Jacobsen J.P., Nielsen O., Waage Jensen P., *Biospectroscopy*, **1997**, *3*, 207-213.

[75] :Fluorescence spectral characteristics of novel asymmetric monomethine cyanine dyes in nucleic acid solutions.
Timcheva I.I., Maximova V.A., Deligeorgiev T.G., Gadjev N.I., Sabnis R.W., Ivanov I.G., *FEBS Letters.,* **1997**, *405*, 141-144.

[76]: Color and constitution V. the absorption of unsymmetrical cyanines. Resonance as a basis for a classification of dyes.
Brooker L.G.S. ; Keyes G.H. ; Williams W.W. ; *J. Am. Chem. Soc.,* **1942**, *64*, 199-210.

[77]: Studies in the cyanines dye series. VIII. Dyes derived from 2-Methylphenantro-[9,10]-thiazole.
Brooker L.G.S. ; Keyes G.H. ; *J. Am. Chem. Soc.,* **1937**, *59,* 74-79.

[78]: Blue sensitizing dyes : Synthesis, spectroscopy, and performance in photographic emulsions.
Zhou X-F ; Peng Z-H ; Geise H.J., Peng B-X ; Li Z-X ; Yan M. ; Dommisse R., Carleer R., Claeys M. ; *J. Imag. Sci.Tech.,* **1995**, *39,* 244-252.

[79]: Preparation of intercalating dye thiazole orange and derivatives.
Deligeorgiev T.G., Gadjev N.I.Drexhage K.H., Sabnis R.W., *Dyes and Pigments,* **1995**, *29*, 315-322.

[80]: A novel method for the preparation of monomethine cyanines dyes
Deligeorgiev T.D., Zaneva D.A., Katerinopoulos H.E., Kolev V.N., *Dyes and Pigments,* **1999**, *41*, 49-54.

[81]: Préparation of monomethine cyanine dye for nucleic acid detection.
Deligeorgiev T.D., Zaneva D.A., Kim S.H., Sabnis R.W., *Dyes and Pigments*, **1998**, *37*, 205-211.

[82]: Solid-phase dyes synthesis of asymmetric cyanine.
Isacsson J., Westman G., *Tetrahedron. Lett.,* **2001**, *42*, 3207-3210.

[83]: Probe for analysis of nucleic acids.
Sandstrom J., Westmann G.,
Brevet US 20040044219 /A1, 4 mars **2004**.

[84]: Stable fluorescent complexes of double stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes : properties and applications.
Rye H.S. ; Yue S. ; Wemmer D.E. ; Quesada M. A. ; Haugland R.P., Mathies R. A., Glazer A. N.. ; *Nucleic Acids Res.,* **1992**, *20* ; 2803-2812.

[85]: A theoretical and experimental study of two thiazole orange derivatives with single and double-stranded oligonucleotides, polydeoxyribonucleotides and DNA.
Prodhomme S., Demaret J-P., Vinogradov S., Asseline U., Morin-Allory L., Vigny P., *J. Photochem. Photobiol. B .,* **1999**, *53*, 60-69.

[86]: Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis.
Lee L.G., Chen C-H., Liu L.A ; *Cytometry*, **1986**, *7*, 508-517.

[87]: Base-content dependence of emission enhancements, quantum yields and lifetimes for cyanine dyes bound to double-stranded DNA : photophysical properties of monomeric and bichromophoric DNA stains.
Netzel T.L., Nafisi K., Zhao M., Lenhard J.R., Johnson I., *J.Phys.Chem.,* **1995**, *99*, 17936-17947.

[88]: Thermodynamic characterization of the association of cyanine dyes with DNA.
Petty J.T., Bordelon J.A., Robertson M.E., *J.Phys.Chem. B,* **2000**, *104*, 7221-7227.

[89]: Thiazole orange as the fluorescent intercalator in a high resolution FID assay for determining DNA binding affinity and sequence selectivity of small molecules.
Boger D.L., Tse W.C., *Bioorg. Med. Chem.,* **2001**, *9,* 2511-2518.

[90]: Characterization of the binding of the fluorescent dyes YO and YOYO to DNA by polarized lightspectroscopy.
Larsson A., Carlsson C., Jonsson M., Albinsson B., *J.Am.Chem.Soc.,* **1994**, *116*, 8459-8465.

[91]: Optical and photophysical properties of the oxazole yellow DNA probes YO and YOYO.
Carlsson C., Larsson A., Jonsson M., Albinsson B., Norden B., *J.Phys.Chem.,* **1994**, *98*, 10313-10321.

[92]: Single and double strand photocleavage of DNA by YO, YOYO and TOTO.
Åkermann B., Tuite E., *Nucleic Acids Res.,* **1996**, *24*, 1080-1090.

[93]: DNA bifunctional intercalators. 1. Synthesis and conformational properties of an ethidium homodimer and of an acridine ethidium heterodimer
Gaugain B., Barbet J., Oberlin R., Roques B.P., Le Pecq J.B., *Biochemistry*, **1978**, *17*, 5071-5078.

[94]: Heterodimeric DNA-binding dyes designed for energy transfer : stability and applications of the DNA complexes.
Benson S.C., Mathies R.A., Glazer A.N., *Nucleic Acids Res.,* **1993**, *21*, 5720-5726.

[95]: Solution structure of a DNA complex with the fluorescent bis-intercalator TOTO determined by NMR spectroscopy.
Spielmann H.P., Wemmer D.E., Jacobsen J.P.,*Biochemistry,* **1995**, *34*, 8542-8553.

[96]: Solution structure and energy calculation of bis-intercalation of homodimeric thiazole orange dye derivatives in DNA : effects of modifying the linker.
Bondensgaard K., Jacobsen J.P., *Bioconjugate Chem.,* **1999**, *10*, 735-744.

[97]: On the sequence selective bis-intercalation of a homodimeric thiazole orange dye in DNA.
Bunkenborg J., Stidsen M.M., Jacobsen J.P., *Bioconjugate Chem*, **1999**, *10*, 824-830.

[98]: Solution structure of a DNA complex with the fluorescent bis-intercalator TOTO modified on the benzothiazole ring.
Petersen M., Jacobsen J.P., *Bioconjugate Chem.,***1998**, *9*, 331-340.

[99]: Bis-intercalation of homodimeric thiazole orange dyes in selective binding sites of DNA studied by 1H NMR spectroscopy.
Jensen L.K., Gotfredsen C.H., Bondensgaard K., Jacobsen J.P., *Acta. Chem. Scand.,* **1998**, *52*, 641-650.

[100]: Bis-intercalation of a homodimeric thiazole orange dye in DNA in symmetrical pyrimidine-pyrimidine-purine-purine oligonucleotides.
Hansen L.F., Jensen L.K., Jacobsen J.P., *Nucleic Acids Res.,* **1996**, *24*, 859-867.

[101]: Site selective bis-intercalation of a homodimeric thiazole orange dye in DNA oligonucleotides.
Jacobsen J.P., Pedersen J.B., Hansen L.F., Wemmer D.E.; *Nucl. Acid Res.,* **1995**, *23,* 753-760.

[102]: Concerted intercalation and minor groove recognition of DNA by homodimeric Thiazole Orange dye.
Bunkenborg J., Gadjev N.I., Deligeorgiev T., Jacobsen J.P., *Bioconjugate Chem.,* **2000**, *11*, 861-867.

[103] : Fluorescence energy transfer cyanine heterodimers with high affinity for double stranded DNA.
Zeng Z., Benson S.C., Glazer A.N., *Anal. Biochem.,* **1995**, *231*, 256-260.

[104]: Double bands in DNA gel electrophoresis caused by bis-intercalating dyes.
Carlsson C., Jonsson M., Åkerman B., *Nucl. Acids Res.,* **1995**, *23(13)*, 2413-2420.

[105]: Stable dye-DNA intercalation complexes as reagents for high-sensitivity fluorescence detection.
Glazer A.N., Rye H.S., *Nature*, **1992**, *359*, 859-861.

[106]: Interaction of dimeric intercalating dyes with single-stranded DNA.
Rye H.S., Glazer A.N., *Nucleic Acids Res.,* **1995**, *23*, 1215-1222.

[107]: Fluorescent DNA-intercalating cyanine dyes including a positively charged benzothiazole substituent.
Lee L.G.(Biometric Imaging Inc.)
Brevet US 5,734,058.
31 mars **1998**.

[108]: The ψ-cyanine condensation.
Hamer F.M., *J. Chem. Soc.,* **1928**, *127,* 206-214.

[109]: Comportement et réactivité d'hétérocycloammoniums dans la synthèse des colorants cyanines et carbocyanines. VIII : Transfert d'ions hydrure dans la synthèse des cyanines.
Metzger J., Larivé H., Dennilauler R., Baralle R., Gaurat C., *Bull. Soc. Chim. Fr.,* **1967**, 57-65.

[110]: Synthesis of 2,2'-quinocyanines with long *N*-alkyl substituents.
Orlova N.A., Kolchina E.F., Zhuralev F.A., Shakirov M.M., Gerasimova T.N., Shelkovnikov.V.V., *Chem. Heterocycl. Comp.,* **2002**, *38*, 1233-1241**.**

[111]: Optical studies on complexes between DNA and pseudoisocyanine
Norden B., Tjerneld F.; *Biophys. Chem.,* **1977**, *6*, 31-45.

[112] : Influence of inorganic salts and bases on the J-band in the absorption spectra of water solutions of 1,1'-diethyl-2,2''cyanine iodide.
Struganova I.A., Hazell M., Gaitor J., McNally-Carr D., Zivanovic S., *J. Phys. Chem. A .*, **2003**, *107*, 2650-2656.

[113] : Aggregation of sensitizing dyes in solution and their adsorption onto silver halides.
Herz A.H.; Adv. Colloïd Interface Sci., **1977**, 8, 237-298.

[114]: Preparation of monomethine cyanine dyes as noncovalent labels for nucleic acids.
Gadjev N.I., Deligeorgiev T.G., Kim S.H., *Dyes and pigments*, **1999**, *40*, 181-186.

[115]: The cyanine dyes : Part V : The virtual tautomerism of the thiocyanines.
Mills W.H., Braunholtz W.T.K., *J.Chem.Soc.,* **1922**, *121*, 1489-1495.

[116]: Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XXI : Arguments for half-intercalation model of interaction.
Yarmoluk S.M., Lukashov S.S., Ogul'chansky T.Y., Losytsky M.Y., Kornyushyna O.S., *Biopolymers,* **2001**, *62*, 219-227.

[117]: Interaction of cyanine dyes with nucleic acids. XXIV : Aggregation of monomethine cyanine dyes in presence of DNA and its manifestation in absorption and fluorescence spectra.
Ogul'chansky T.Y., Losytskyy M.Y., Kovalska V.B., Yashchuk V.M., Yarmoluk S.M., *Spectrochim. Acta. A.,* **2001**, *57*, 1525-1532.

[118]: Photophysics on a "simple" cyanide dye
Sahyun M.R.V., Blair J.T., *J. Photochem. Photobiol., A.,* **1997**, *104*, 179-187.

[119]: Peptide Nucleic Acids: Analogs and derivatives
Ganesh K.N., Nielsen P.E. *Curr. Org. Chem.,* **2000**, *4*, 931-943.

[120]: Thiazole orange as fluorescent universal base in peptide nucleic acids
Köhler O., Seitz O., *Chem. Comm.,* **2003**, 2938-2939.

[121]: Free-Probe fluorescence of light-up probes.
Svanvik N., Nygren J., Westman G., Kubista M., *J. Am. Chem. Soc.,* **2001**, *123*, 803-809.

[122] :Light-up probes : thiazole orange-conjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogeneous solution.
Svanvik N., Westmann G., Wang D., Kubista M. ; *Anal. Biochem.,* **2000**, *281*, 26-35.

[123] : Oligonucleotide-conjugated Thiazole Orange probes as « light-up » probes for messenger ribonucleic acid molecules in living cells.
Privat E., Melvin T., Asseline U., Vigny P., *Photochem. And photobiol,* **2001**, *74* , 532-540.

[124] : Fluorescent properties of oligonucleotide-conjugated thiazole orange probes.
Privat E., Melvin T., Mérola F., Schweizer G., Prodhomme S., Asseline U., Vigny P., *Photochem. And Photobiol.,* **2002**, *75* , 201-210.

[125]: The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA.
Nygren J., Svanvik N., Kubista M., *Biopolymers,* **1998**, *1*, 39-51.

[126] : A convergent strategy for the modification of Peptide Nucleic Acids : Novel mismatch-specific PNA-Hybridization probes.
Seitz O., Bergmann F., Heindl D. ; *Angew. Chem. Int. Ed.,* **1999**, *38* ; 2203-2206.

[127]: Probe for analysis of target nucleic acids
Kubista M., Svanvik N.,
Brevet US 6,239,144 /B1
11 décembre **2001.**

[128] : Synthesis and binding properties of oligo-2'-deoxyribonucleotides covalently linked to thiazole orange derivative.
Privat E., Asseline U.,*Bioconjugate Chem.,* **2001**, *12*, 757-769.

[129]: Covalent attachment of thiazole orange to oligonucleotides for use in nucleic acid detection.
Linn C.P., Pitner J.B., (Marks&Clerk)
Brevet européen EP 0710668 / A2
8 mai **1996**.

[130]: Light-Up Probe based real-time Q-PCR
Kubista M., Ståhlberg A., Bar T.
Raghavachari R, Tan W. Edition. Genomics & Proteomics technologies
Proceeding of SPIE, Vol. 4264. Bellingham, WA. International Society of Optical Engineering., **2001**, pg. 53-58.

[131] :Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes.
Isacsson J., Cao H., ohlsson L., Nordgren S., Svanvik N ;, Westmann G., Kubista M., Sjöback R., Sehlstedt U. ; *Mol. Cell. Probes,* **2000**, *14*; 321-328.

[132] : Detection of PCR products in real time using light-up probes.
Svanvik N., Ståhlberg A., Sehlstedt U., Sjöback R., Kubista M., *Anal Biochem.,* **2000**, *287*, 179-182.

[133]: Quantitative Real-Time PCR method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of κ and λ immunoglobin light chain expression.
Ståhlberg A., Åman P., Ridell B., Mostad P., Kubista M., *Clin. Chem.,* **2003**, *49*, 51-59.

[134]: Aminoglycoside hybrids as potent RNA antagonists
Tok J. B.-H., Cho J., Rando R.R., *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 5741-5758.

[135] : Fluorescent and photochemical properties of a single zinc finger conjugated to a fluorescent DNA-Binding probe.
Thompson M., Woodbury N.W., *Biochemistry*, **2000**, *39*, 4327-4338.

[136] : Development of a fluorescent probe for the study of nucleosome assembly and dynamics.
Babendure J., Liddell P.A., Bash R., LoVullo D., Schiefer T.K., Williams M., Daniel D.C., Thompson M., Taguchi A.K.W., Lohr D., Woodbury N.W., *Anal. Biochem.,* **2003**, *317*, 1-11.

[137]: Thiazole orange – peptide conjugates: sensitivity of DNA binding to chemical structure.
Carreon J.R., Mahon K.P., Kelley S.O., *Org. Lett.,* **2004**, *6(4)*, 517-519.

[138]: Photosensitized DNA cleavage promoted by amino acids.
Mahon K.P., Ortiz-Meoz R.F., Prestwich E.G., Kelley S.O., *Chem. Comm.,* **2003**, *15*, 1956-1957.

[139]: Tethered thiazole orange intercalating dye for development of fibre-optic nucleic acid biosensors.
Wang X., Krull U.J., *Anal. Chim. Acta.,* **2002**, *470*, 57-70.

[140]: Fluorescence detection of specific sequence of nucleic acid by oxazole yellow-linked oligonucleotides. Homogeneous quantitative monitoring of *in vitro* transcription.
Ishiguro T., Saitoh J., Yawata H., Otsuka M., Inoue T., Sugiura Y., *Nucl. Ac. Res.,* **1996,** *24*, 4992-4997.

[141]: Fluorescence properties of oxazole yellow-linked oligonucleotide. Triple helix formation and photocleavage of double-stranded DNA in the presence of spermine.
Inoue T., Sugiura Y., Saitoh J., Ishiguro T., Otsuka M., *Bioorg. Med. Chem.,* **1999**, *7,* 1207-1211.

[142]: Oligododeoxynucleotides covalently linked to intercalating dyes as base sequence-specific ligands. Influence of dye attachment site.
Asseline U., Toulme F., Thuong N.T., Delarue M., Montenay-Garestier T., Hélène C., *EMBO J.*, **1984**, *3(4)*,795-800.

[143]: Synthesis and binding properties of oligonucleotides covalently linked to an acridine derivative: new study of the influence of the dye attachment site.
Asseline U., Bonfils E., Dupret D., Thuong N.T., *Bioconjugate Chem.,* **1996**, *7*, 369-379.

[144] : Solubility and carcinogenic and related hydrocarbons in water
Davis W.W., Krahl M.E., Clowes G.H.A., *J.Am.Chem.Soc.,* **1942**, *64*, 108-110.

[145] : Polarized fluorescence of polycyclic hydrocarbons in aqueous DNA solutions : effect of flow-orientation.
Green B., McCarter J.A., *J.Mol.Biol.,* **1967**, *29*, 447-456.

[146] : Interaction of polynuclear aromatic hydrocarbons, 4-Nitroquinoline 1-oxides, and various dyes with DNA.
Nagata C., Kodama M., Tagashira Y., Imamura A., *Biopolymers*, **1966**, *4*, 409-427

[147] : Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalates into duplex regions of denatured DNA.
Wolfe A., Shimer, G.H., Meehan T., *Biochemistry*, **1987**, *26*, 6392-6396.

[148] : Binding of pyrene to DNA, base sequence specificity and its implication.
Chen F.-M.,. *Nucleic Acids Res.,***1983**, *11*, 7231-7251.

[149] : Properties of benzopyrene DNA complexes investigated by fluorescence and triplet flash photolysis techniques.
Geacintov N.E., Prusik T., Khosrofian J.M., *J.Am.Chem.Soc.,* **1976,** *98*, 6444-6452.

[150]: The pyrene excimer
Birks J.B.; *Acta Phys. Pol.,* **1968**, *34*, 603-617.

[151]: Intramolecular excimer formation in bichromophoric molecules linked by a short flexible chain.
De Schryver F.C., Collart P., Vandendriessche J., Goedeweeck R., Swinnen A., Van der Auweraer M., *Acc. Chem. Res.,* **1987**, *20,* 159-166.

[152] : Observation of excimer formation in the covalent adducts of 9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene-7,8-diol with poly (dG-dC).
Eriksson M., Norden B., Jernström B., Gräslund A., Lycksell P-O., *J. Chem. Soc. Commun.,* **1988**, 211-212.

[153]: Oligonucleotides with *bis*-pyrene adduct in the backbone: syntheses and properties of intramolecular excimer forming probe.
Kitamura M., Nimura A., Yamana K., Shimidzu T., *Nucl. Acids. Res. Symp. Ser.,* **1991**, 67-68.

[154]: A new reagent for labelling macromolecules: an activated derivative of the pyrene bichromophore with excimer fluorescence.
Balakin K.V., Korshun V.A., Prokorenko I.A., Maleev G.V., Kudelina I.A., Gontarev S.V., Berlin Y.A., *Russ. J. Bioorg. Chem.,* **1997**, *23,* 33-41.

[155] : Bispyrenyl excimer fluorescence : a sensitive oligonucleotide probe.
Lewis F.D., Zhang Y., Letsinger R.L., *J. Am. Chem. Soc.,* **1997**, *119*, 5451-5452.

[156] : Probing DNA sequences in solution with a monomer-excimer fluorescence color change.
Paris L.P., Langenhan J.M., Kool E.T., *Nucleic. Acid. Res.,* **1998**, *26*, 3789-3793.

[157] : Nucleic acid hybridization accompanied with excimer formation from two pyrene-labeled probes.
Ebata K., Masuko M., Ohtani H., Kashiwasake-Jibu M., *Photochem. Photobiol.,* **1995**, *62*, 836-839.

[158] : Optimisation of excimer-forming two-probe nucleic acid hybridization method with pyrene as a fluorophore.
Masuko M., Ohtani H., Ebata K., Shimadzu A., *Nucleic Acids Res.,* **1998**, *26*, 5409-5416.

[159] : Synthesis of oligonucleotide derivatives containing pyrene labeled glycerol linkers : enhanced excimer fluorescence on binding to a complementary DNA sequence.
Yamana K., Takei M., Nakano H., *Tetrahedron Lett.,* **1997**, *38*, 6051-6054.

[160]: Intercalating Nucleic Acids with pyrene nucleoside analogues as next-nearest neighbors for excimer fluorescence detection of single point mutations under nonstringent hybridization conditions.
Christensen U., Pedersen E.B., *Helv. Chim. Acta.,* **2003**, *86*, 2090-2097.

[161]: Intercalating nucleic acids containing insertions of 1-*O*-(1-pyrenylmethyl)glycerol: stabilisation of dsDNA and discrimination of DNA over RNA.
Christensen U.B., Pedersen E.B., *Nucleic Acids Res.,* **2002**, *30,* 4918-4925.

[162]: Pyrene-labeled oligodeoxynucleotide probe for detecting base insertion by excimer fluorescence emission.
Okamoto A., Ichiba T., Saito I., *J.Am.Chem.Soc..,* **2004**, *126*, 8364-8365.

[163] : Bis-pyrene labeled oligonucleotides : sequence specificity of excimer and monomer fluorescence changes upon hybridization with DNA.
Yamana K., Iwai T., Ohtani Y., Sato S., Nakamura M., Nakano H., *Bioconjugate Chem.,* **2002**, *13*, 1266-1273.

[164]: A novel fluorescent guanine derivative distinguishable of three structures, single strand, duplex and quadruplex.
Okamoto A., Kanatani K., Ochi Y., Saito Y., Saito I., *Tetrahedron Lett.,* **2004**, *45,* 6059-6062.

[165] : Synthesis of a novel pyrene-containing nucleoside and its incorporation into oligonucleotides.
Frazer J.D., Horner S.M., Woski S.A., *Tetrahedron Lett.,* **1998**, *39*, 1279-1282.

[166]: Pyrenemetyl *ara*-Uridine-2'-carbamate: a strong interstrand excimer in the major groove of a DNA duplex.
Dioubankova N.N., Malakhov A.D., Stetsenko D.A., Gait M.J., Volynsky P.E., Efremov R.G., Korshun V.A., *ChemBioChem*, **2003**, *4*, 841-847.

[167] : Oligonucleotide-polyamide hybrid molecules containing multiple pyrene residues exhibit significant excimer fluorescence.
Tong G., Lawlor J.M., Tregear G.W., Haralambidis J., *J.Am.Chem.Soc.,* **1995**, *117*, 12151-12158.

[168] : Testing of a size criterion for DNA-hydrocarbon binding.
Craig M., Isenberg I., *Biopolymers*, **1970**, *9*, 689-696.

[169] : 2-[(Arylmethyl)amino]-2-methyl-1,3-propanediol DNA intercalators. An examination of the effects of aromatic ring variation on antitumor activity and DNA binding.
Bair K.W., Andrews C.W., Tuttle R.L., Knick V.C., Cory M., McKee D.D., *J. Med. Chem,* **1991**, *34*, 1983-1990.

[170] : Application of a novel fluorescence probe in the determination of nucleic acids
Zhu Q.-Z., Li F., Guo X.-Q., Xu J.-G., Li W.-Y., *Analyst ,* **1997**, *122*, 937-940.

[171] : Novel fluorescent colloids as a DNA fluorescence probe
Jinshui L., Lun W., Feng G., Yongxing L., Yun W., *Anal. Bioanal. Chem.,* **2003**, *377*, 346-349.

[172] : Conjugates of oligonucleotides with polyaromatic fluorophores as promising DNA probes.
Balakin K.V., Korshun V.A., Mikhalev I.I., Maleev G.V., Malakhov A.D., Prokhorenko I.A., Berlin Yu.A., *Biosensors and Bioelectronics,* **1998**, *13*, 771-778.
(Erratum: *Biosensors and Bioelectronics*, **1999**, *14*, 597.)

[173] : Pérylène-labeled oligonucleotide as a probe in homogeneous hybridation assay.
Balakin K.V. ; Korshun V.A. ; Esipov D.S. ; Mikhalev I.I., Berlin Y. A., *Nucleosides and Nucleotides*, **1999**, *18*, 1279-1280.

[174] : CD and melting curves structural studies of the tandem DNA complex formed with oligonucleotides carrying photoactive and sensitizing groups in the nick region.
Koval V.V., Pyshnyi D.V., Fedorova O.S., *J. Biomol. Struct. Dyn.,* **2001**, *19*, 515-526.

[175] : Cooperative interactions in photosensitized modification of DNA with oligonucleotide-derived binary reagents.
Fedorova O.S., Koval V.V., Karnaukhova S.L., Dobrikov M.I., Vlassov V.V., Knorre D.G., *Mol. Biol.,* **2000**, *34*, 814-822.

[176] : Synthesis and binding properties of pérylène-oligo-2'-deoxyribonucleotide conjugates
Asseline U. ; Cheng E. ; *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42,* 9005-9010.

[177]: Reagents for modification of protein-nucleic acid complexes: III. Site-specific photomodification of elongation complex of DNA polymerase β with arylazide derivatives of primers sensitized with fluorescent ATP γ-amides.
Safronov I.V., Drachkova I.A., Petruseva I.O., Khodyreva S.N., Dobrikov M.I., Ivanova T.M., Shishkin G.V., Lavrik O.I., *Russ. J. Bioorg. Chem.,* **2001**, *27(5)*, 330-339.

[178] : Libraries of composite polyfluors built from fluorescent deoxyriboses.
Gao J., Strässler C., Tahmassebi D., Kool E.T., *J.Am.Chem.Soc.,* **2002**, *124*, 11590-11591.

[179]: Synthesis and hybridization properties of oligonucleotides-pérylène conjugates:influence of the conjugation parameters on triplex and duplex stabilities.
Aubert Y. Asseline U., *Org. Biomol. Chem.,* **2004**, accepté pour publication.

[180]: Synthesis and properties of oligonucleotides involving a pérylène unit linked to a 2'-deoxyribose residue.
Aubert Y., Asseline U., *Nucleoside Nucleotide Nucleic Acids.,* **2003**, *22*, 1223-1225.

[181] : Antiviral activity of some 2'-deoxyuridine 5-arylethynyl derivatives.

Andronova V.L., Skorobogatyi M.V., Manasova E.V., Berlin Y.A., Korshun V.A., Galegov G.A., *Russ. J. Bioorg. Chem.,* **2003**, *29*, 262-266.

[182]: Far-red dibenzo[*a,j*]pérylène-8,16-dione dyes as fluorescent enzyme substrates and tags for biomolecules.
Deady L.W., Hughes A.B., Mahadevan I.B., Quazi N.H., Tilley L.M., *Nucleoside Nucleotide Nucleic Acids.,* **2000**, *19*, 803-821

[183]: Characterization of a series of far red Absorbing pérylène diones: a new class of fluorescent probes for biological applications.
Klonis N., Wang H., Quazi N.H., Casey J.L., Neumann G.M., Hewish D.R., Hughes A.B., Deady L.W., Tilley L., *J. Fluorescence.,* **2001**, *11*, 1-11.

[184] : Trytilisation of pyrene, pérylène and coronene : a new family of switchable fluorescent labels.
Shchepinov M.S. ; Korshun V.A. ; Egeland R.D. ; Southern E.M. ;*Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41* ; 4943-4948.

[185] : Pérylène and naphtalene based linkers for duplex and triplex stabilization.
Bevers S., O'Dea T.P., McLaughin L.W., *J. Am. Chem. Soc.,* **1998**, *120*, 11004-11005.

[186] : Naphtalene- and pérylène based linkers for the stabilization of hairpin triplexes.
Bevers S., Schutte S., McLaughin L.W., *J. Am. Chem. Soc.,* **2000**, *122*, 5905-5915.

[187] : To fold or to assemble ?
Wang W., Li L-S., Helms G., Zhou H-H., Li A.D.Q., *J. Am. Chem. Soc.,* **2003**, *125*, 1120-1121.

[188] : Alterning DNA and π-conjugated sequences. Thermophilic foldable polymers.
Wang W., Wei W., Zhou H-H., Niu S., Li A.D.Q., *J. Am. Chem. Soc.,* **2003**, *125*, 5248-5249.

[189] : Accelerated assembly of G-quadruplex stuctures by small molecule.
Han H. ; Cliff C.L. ; Hurley L.H. ; *Biochemistry*; **1999**, *38,* 6981-6986.

[190] : NMR-based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA
Fedoroff O.Y., Salazar M., Han H., Chemeris V.V., Kerwin S.M., Hurley L.H. ; *Biochemistry,* **1998**, *36*; 12367-12374.

[191] : Design and synthesis of the G-quadruplex-specific cleaving reagent perylene-EDTA-Iron (II)
Tuntiwechapikul W., Lee T.J., Salazar M., *J. Am. Chem. Soc.,* **2001**, *123*, 5606-5607.

[192] :Pérylène diimide G-quadruplex DNA binding selectivity is mediated by ligand aggregation.
Kerwin S.M., Chen G., Kern J.T. ,Thomas P.W. ; *Bioorg. Med. Chem. Let.,* **2002**, *12* ; 447-450.

[193] : Pérylène diimides with different side chain are selective in inducing different G-quadruplex DNA structures and in inhibiting telomerase.
Rossetti L., Franceshin M., Bianco A., Ortaggi G., Savino M., *Bioorg. Med. Chem. Lett,* **2002**, *12***,** 2527-2533.

[194] : The aggregation and G-quadruplex DNA selectivity of charged 3,4,9,10-pérylènetetracarboxylic acid diimides.
Kern J.T., Kerwin S.M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2002**, *12*, 3395-3398.

[195] : The relationship between ligand aggregation and G-quadruplex DNA selectivity in a serie of 3,4,9,10-pérylènetetracarboxylic acid diimides.
Kern J.T., Thomas P.W., Kerwin S.M., *Biochemistry*, **2002**, *41*, 11379-11389.
(Erratum : *Biochemistry*, **2002**, *41*, 12568.)

[196] : Energy transfer by resonance between organic molecules in solvents.
Tomura M., Ishiguro E., Mataga N., *J. Phys.Soc.Japan.*, **1967**, *22*, 117.

[197] : High rates of fluorescence quenching between pérylène dodecyldiimide and certain π-electron donors.
Içli S., Icil H., Gürol I., *Turk. J. Chem.,* **1997**, *21*, 363-368.

[198]: Bichromophoric pérylène derivatives: energy transfer from non-fluorescent chromophores.
Langhals H., Saulich S., *Chem. Eur.J.,* **2002**, *8)*, 5630-5643.

[199]: Design of multidye systems for FRET-based applications.
Shehepinov M.S., Korshun V.A., *Nucleoside Nucleotide Nucleic Acids.,* **2001**, *20(4-7),* 369-374**.**

[200]: MagiProbe: a novel fluorescence quenching-based oligonucleotide probe carrying a fluorophore and an intercalator.
Yamane A., *Nucleic Acids Res.,* **2002**, *30*, e97.

[201]: The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Part III.
Cook J.W., Hewett C.L., *J. Chem. Soc.,* **1933**, 398-405.

[202]: Untersuchung über Pérylèn und seine derivate.
Zinke A., Troger H., Ziegler E., *Chem. Ber.,* **1940,** *73,* 1042-1048.

[203]: Alkylpérylènes. The isomeric ethylpérylènes.
Zieger H.E., *J.Org.Chem.,* **1966**, 31*,* 2977-2980.

[204]: Fluorescence and absorption properties of pérylènyl and pérylènoyl probe molecules in solvents and liquid crystals.
Johansson L.B.-Å, Molotovsky J.G., Bergelson L.D., *J.Am.Chem.Soc.,* **1987**, *109*, 7374-7387.

[205]: A simple modification of the Wolff-Kishner reduction.
Huang-Minlon, *J.Am.Chem.Soc.,* **1946**, *68*, 2487-2488.

[206] : New synthetic routes to alkyl-substituted and functionalized pérylènes.
Schlichting P., Rohr U., Müllen K., *Liebigs Ann./ Recueil,* **1997**,395-407.

[207]: Synthèse des trois régioisomères des pyrène et pérylène monosubstitués.
Lapouyade R., Pereyre J., Garrigues P., *C.R. Acad. Sci.:Ser. II,* **1986**, *303*, 903-906.

[208]: *N*-Bromosuccinimide-dimethylformamide: a mild, selective nuclear monobromination reagent for reactive aromatic compounds.
Mitchell R.H., Lai Y-H., Williams R.V., *J.Org.Chem.,* **1979**, *44,* 4733-4735.

[209] : Cyanine Dyes with high absorption cross section as donor chromophores in energy transfer primers.
Hung S-C., Ju J., Mathies R. A., Glazer A.N., *Anal. Biochem.,* **1996**, *243*, 15-27.

[210]: Cyclobisintercaland macrocycles: synthesis and physicochemical properties of macrocyclic polyamines containing two crescent-shaped dibenzophenantroline subunits. Baudoin O., Teulade-Fichou M.-P., Vigneron J.-P., Lehn J.-M., *J.Org.Chem.,* **1997**, *62*, 5458-5470.

[211]: Novel functionalization of the sugar moiety of nucleic acids for multiple labeling in the minor groove.
Manoharan M., Guinosso C.J., Cook P.D., *Tetrahedron Lett.,* **1991**, *32*, 7171-7174.

[212]: The Sigma-Aldrich handbook of stains, dyes and indicators.
Grenn F.J.Aldrich Chemical Company Inc., **1990** (Milwaukee, Wisconsin, USA), p. 377.

[213]: Excimer fluorescence. IV : Solution spectra of polycyclic hydrocarbons
Birks J.B., Christophorou L.G., *Proc. Roy. Soc., Ser. A.,* **1964**, 571-582.

[214] : Near-IR absorption spectrum of aromatic excimers
Katoh R., Katoh E., Nakashima N., Yuuki M., Kotani M., *J. Phys Chem. A,* **1997**, *101*, 7725-7728.

Synthèse et études de sondes oligonucléotidiquees dont le signal fluorescent est modifié au cours de l'hybridation

Le but de ce travail était de développer des sondes oligonucléotidiques liées à des marqueurs fluorescents émettant des signaux modifiés lors de l'hybridation avec des séquences complémentaires. Des conjugués ODNs-cyanines originaux ont été développés. L'influence de différents paramètres sur le signal fluorescent émis par la sonde ont été étudiés : position de liaisons des marqueurs à l'ODN (5'- ou internucléotidique), structure des cyanines, stéréochimie. Un nouveau réactif de phosphorylation des ODNs a été mis au point et utilisé pour la synthèse des conjugués marqués en position 5'.
D'autres conjugués comportant à leur extrémité 5' deux marqueurs identiques possédant des propriétés intercalantes : thiazole orange, pyrène ou pérylène ont été obtenus. Les interactions entre les deux marqueurs varient lors de l'hybridation de la sonde avec la séquence complémentaire, induisant une modification du signal fluorescent dont la nature et l'intensité dépendent du marqueur considéré.

Mots-clefs : synthèse, conjugués ODN-cyanine, réactif de phosphorylation,, ODN 5'-bis marqués, pérylène, pyrène, spectroscopies d'absorption et de fluorescence.

Synthesis and studies of oligonucleotidic probes exhibiting modified fluorescent signal upon hybridization ;

The aim of this work was the synthesis and studies of oligonucleotidic probes linked to fluorescent labels exhibiting modified signals upon hybridization with the complementary sequences. New ODN-cyanine conjugates were synthesized. The influence of different parameters on the fluorescent signal modification was studied: attachment position of the labels to the ODNs (5'- or internucleotidic position), cyanine structure, stereochemistry. A new phosphorylating reagent has been developed and used for the preparation of the 5'-labeled conjugates.
Another family of conjugates involving two identical labels at their 5'-ends was obtained. These labels: thiazole orange, pyrene or perylene are possessing intercalating properties. Hybridization of the conjugates with their complementary sequences induces modifications of the interactions between the two labels leading to changes of the fluorescent signals dependent on the label considered.

Keywords: perylene, pyrene, synthesis, ODN-cyanine conjugates, phosphorylation reagent, 5'-bis labelled conjugates, absorption and fluorescence spectroscopies.