



HAL
open science

Synthèse et études d'Oligonucléotides et de Peptides comportant un Complexe Photoactivable de Ruthénium(II).

Mathilde Villien

► **To cite this version:**

Mathilde Villien. Synthèse et études d'Oligonucléotides et de Peptides comportant un Complexe Photoactivable de Ruthénium(II).. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00172987

HAL Id: tel-00172987

<https://theses.hal.science/tel-00172987>

Submitted on 18 Sep 2007

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.

Université Joseph Fourier
Grenoble I – Sciences, Technologie, Santé

THÈSE

Présentée par

Mathilde VILLIEN

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
Spécialité : Chimie-Biologie

**Synthèse et Etudes d'Oligonucléotides
et de Peptides comportant un
Complexe Photoactivable de Ruthénium(II)**

Soutenue publiquement le vendredi 16 mars 2007, devant le jury composé de :

Dr. Marie-Paule TEULADE-FICHO
Pr. Andrée KIRSCH-DE MESMAEKER
Pr. Frédérique LOISEAU
Pr. Pascal DUMY
Pr. Eric DEFRANCQ

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Université Joseph Fourier
Grenoble I – Sciences, Technologie, Santé

THÈSE

Présentée par

Mathilde VILLIEN

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
Spécialité : Chimie-Biologie

**Synthèse et Etudes d'Oligonucléotides
et de Peptides comportant un
Complexe Photoactivable de Ruthénium(II)**

Soutenue publiquement le vendredi 16 mars 2007, devant le jury composé de :

Dr. Marie-Paule TEULADE-FICHOU
Pr. Andrée KIRSCH-DE MESMAEKER
Pr. Frédérique LOISEAU
Pr. Pascal DUMY
Pr. Eric DEFRANCQ

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Ca y est, c'est la fin d'une incroyable aventure humaine et scientifique. Celle-ci ayant été particulièrement enrichissante de part la diversité de la thématique du projet et de part mes début en tant qu'enseignante. Ce fut également un fort investissement personnel, notamment lors de la seconde moitié de thèse où ma santé a décidé de participer à l'aventure.

La richesse de ce projet fait que la liste des personnes que je souhaite remercier est longue.

Je remercie,

Pascal Dumy, actuel directeur du D.C.M. (ex-L.E.D.S.S.) et plus particulièrement de l'équipe Ingénierie et Interactions BioMoléculaires (I2BM), pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, d'avoir cru en mes capacités, et de m'avoir fourni de bonnes conditions logistiques et financières. Je vous remercie également de m'avoir fait bénéficier de la collaboration avec Bruxelles et permis de participer à des congrès.

Eric Defrancq, mon directeur de thèse. Je veux te remercier pour le temps et la pleine confiance que tu m'as accordé tout au long de ces années, me permettant d'aboutir à la production de ce manuscrit personnel et propre à mes aspirations.

Tous les membres de mon jury de thèse de s'être intéressés à ce travail, pour les remarques pertinentes apportées et le temps qu'ils y ont consacré, notamment les rapporteurs : Andrée Kirsch-De Mesmaeker et Marie-Paule Teulade-Fichou. Merci également à Frédérique Loiseau d'avoir présidé ce jury, ainsi que Pascal Dumy.

Yannick Vallée, ancien président de l'Université Joseph Fourier, d'avoir cru en ce projet en me permettant d'obtenir un financement. Un grand merci au Ministère de la Recherche d'avoir financé ce travail.

Je tiens aussi à remercier une nouvelle fois Andrée Kirsch-De Mesmaeker, pour son accueil à Bruxelles. Une partie des résultats exposés ont été obtenus lors de ce séjour qui fut particulièrement enrichissant. D'ailleurs, je ne peux dissocier ma jumelle de travail Belge : Stéphanie Deroo de mes connaissances en photochimie. Je te remercie pour ta disponibilité, ta patience, pour ton soutien dans les moments délicats, et un très grand merci pour ton accueil, notamment pour m'avoir fait apprécier la bière belge. Je te souhaite une bonne route pour la suite, et j'espère bientôt te croiser sur les pistes de ski de Savoie. Merci également à Etienne Gicquel, un français en Belgique, pour tes connaissances en photochimie, en plus de ton accueil chaleureux. Merci à tous les belges que j'ai croisé au P2...

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipes ex-LEDSS 5 pour leur accueil, leur bonne humeur générale, les échanges enrichissants que nous avons eus, et avec qui j'ai passé

quatre années très agréables : Laurent, Martine, Miguel, Nathalie, Olivier... Un petit coup de cœur particulier à Muriel, Pascale, Sabine pour votre bonne humeur pétillante, et votre gentillesse... Juju, merci d'avoir toujours répondu avec autant de disponibilité à mes questions... William (Bill), pour m'avoir formé à la maîtrise de la spectrométrie de masse électrospray. J'ai énormément apprécié tout le temps, et la patience, que tu m'as accordé. Ce fut un plaisir de partager tes connaissances sans oublier tes incontournables blagues. Ces compétences m'ont valu de nombreuses heures en tête à tête avec le "spectro", très lunatique vis-à-vis des oligonucléotides : que du bonheur !!!... Je ne peux pas oublier Cécile pour son enthousiasme et son dynamisme à toute épreuve, il lui en a fallu de la persévérance pour essayer d'analyser les conjugués... Didier, de m'avoir enseigné les subtilités de la synthèse peptidique. Tu as été le premier à supporter mon sale caractère dans l'équipe, quel courage !!!...

Mes plus sincères remerciements vont également à Jean-François, qui a fortement enrichi ma formation. Tes conseils et tes commentaires m'ont été fort utiles... Véronique et Elizabeth, pour votre efficacité et vos nombreux services rendus toujours avec le sourire. Un grand merci également à Régine pour ton aide précieuse, ton soutien, et ta bonne humeur (un vrai rayon de soleil...).

Je tiens à rajouter un petit clin d'œil à Régine, Muriel et Miguel, votre visite à la clinique a égayé mon séjour forcé. Merci beaucoup.

Un merci tout particulier à tous ceux qui ont partagé l'univers intime, high-tech, luxueux, et lumineux du "bureau des étudiants" (salle 228 au 2^{ème} étage, lieu de passage obligé pour les nouveaux arrivants au laboratoire). Toute cette opulence ne peut rivaliser avec l'ambiance unique. La liste des co-colocataires passés ou présents se fait longue : Bianca, Christian, Elisabeth, Gesa, Gunnar, Jésus, Joséphine, Laurent, Nicolas, Om Prakash, Sophie, Sumana, Sreedavie, Virginie, et Yashveer. Merci à tous d'avoir apporté une bonne ambiance ponctuée de coups de gueule indispensables, ainsi que votre contribution à la résolution de déboires chimiques, ou informatiques. Je pense également à tous ceux qui sont restés plus ou moins longtemps et qui ont rendu l'ambiance fort sympathique, notamment Delphine, Isabelle, Corinne, Pierre... bonne route à tous !!!

Je ne peux oublier les têtes à têtes du soir avec Stéphanie, ou Walid ; ceux du week-end avec Nabil ; les bonnes rigolades quotidiennes avec un seul mot d'ordre : tous contre un... (souvent contre Nico ...); Vincent, notre secrétaire de charme (au top pour une reconversion...); Myriam et Amandine pour leur éternel sourire... J'ai vraiment apprécié votre compagnie, ces années n'auraient jamais été aussi agréables sans votre présence quotidienne (contre poids indispensable à ma relative solitude au labo "oligo"). J'espère sincèrement que la fin de nos thèses respectives et la divergence de nos chemins ne vont pas nous séparer définitivement et que nous nous retrouverons sur des pentes enneigées, ou autour d'un verre... (voire les deux ...).

La durée de mon séjour au L.E.D.S.S. m'a permis d'user mes semelles dans les nombreux couloirs des différents étages... je remercie tous ceux que j'ai eu la chance de croiser dans un laboratoire...

Remerciements

Un tout grand merci à mes proches et en particulier à mes parents qui m'ont toujours soutenu et qui m'ont permis de faire ce bout de chemin dans les meilleurs conditions. Il y a également une place particulière à mon "chauffeur de casserole (rouge)" préféré : mon autre Eric... Enfin, j'embrasse de tout mon coeur JP qui m'a supporté avec patience, et réconforté toutes ces années.

Vous êtes ma source de soutien et de réconfort... dans les bons, comme dans les moments difficiles... sans vous je n'aurai pas surmonté ces hospitalisations, l'annonce du mal accompagné de son satané traitement...

Merci du fond du coeur...

A mon ange,

ABREVIATION	- 1 -
REPRESENTATION DES LIGANDS CITES	- 3 -
PREAMBULE	- 5 -

Introduction

- 7 -

1 - STRUCTURE ET FONCTIONS DE L'ADN

- 7 -

2 - L'ADN EN TANT QUE CIBLE THERAPEUTIQUE

- 9 -

2.1 - LES AGENTS ALKYLANTS

- 9 -

2.2 - LES AGENTS INTERCALANTS

- 10 -

2.3 - LES AGENTS DE COUPURE DE L'ADN

- 11 -

3 - L'ADN : LA CIBLE DES RADIATIONS LUMINEUSES

- 12 -

3.1 - DOMMAGES DIRECTS INDUITS PAR LES RAYONNEMENTS UV SUR L'ADN

- 13 -

3.2 - DOMMAGES INDIRECTS INDUITS PAR LES RAYONNEMENTS UV SUR L'ADN

- 13 -

4 - L'ADN ET LES COMPLEXES DE METAUX DE TRANSITION

- 16 -

4.1 - LE RUTHENIUM

- 17 -

4.2 - L'ADN ET LES COMPLEXES DE RUTHENIUM(II)

- 19 -

5 - UTILISATION DES OLIGONUCLEOTIDES EN TANT QU'OUTILS THERAPEUTIQUES

- 21 -

6 - LA CONJUGAISON "METAL DE TRANSITION-BIOMOLECULES" : ETAT DE LA QUESTION

- 29 -

6.1 - LA CONJUGAISON "METAL DE TRANSITION – OLIGONUCLEOTIDE"

- 29 -

6.2 - LA CONJUGAISON "METAL DE TRANSITION – PEPTIDE"

- 34 -

Projet de recherche

- 40 -

1 - L'OBJECTIF

- 40 -

2 - LA NATURE DES CONJUGUES	- 41 -
------------------------------------	---------------

3 - LA DEMARCHE EXPERIMENTALE	- 43 -
--------------------------------------	---------------

Résultats et discussion

- 45 -

- Partie A - Synthèses Chimiques

- 45 -

<i>Chapitre I : Le lien chimiosélectif oxime</i>	- 45 -
--	---------------

<i>Chapitre II : Préparation des "fragments aldéhydes"</i>	- 49 -
--	---------------

1 - SYNTHÈSE DES "OLIGONUCLEOTIDES ALDEHYDES"	- 49 -
--	---------------

1.1 - INSERTION DU MOTIF ALDEHYDE EN 5'	- 49 -
---	---------------

1.2 - INSERTION DU MOTIF ALDEHYDE EN 3'	- 66 -
---	---------------

2 - SYNTHÈSE DES "PEPTIDES ALDEHYDES"	- 74 -
--	---------------

2.1 - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT L'INCORPORATION DE LA FONCTION ALDEHYDE A L'EXTREMITÉ N-TERMINALE DE PEPTIDES	- 74 -
--	---------------

2.2 - PRÉSENTATION DE LA STRATÉGIE UTILISÉE	- 78 -
---	---------------

2.3 - PRÉPARATION DES "PEPTIDES ALDEHYDES" EN N-TERMINAL	- 80 -
--	---------------

<i>Chapitre III : Préparation des "complexes de Ru(II) oxyamines"</i>	- 87 -
---	---------------

1 - SYNTHÈSE DES LIGANDS FONCTIONNALISÉS	- 87 -
---	---------------

1.1 - SYNTHÈSE DU "LIGAND 1,10-PHENANTHROLINE OXYAMINE" <u>25</u>	- 89 -
---	---------------

1.2 - SYNTHÈSE DU "LIGAND 1,4,5,8-TETRAAZAPHENANTHRENE OXYAMINE" <u>29</u>	- 92 -
--	---------------

2 - SYNTHÈSE DES COMPLEXES DE RUTHENIUM FONCTIONNALISÉS	- 95 -
--	---------------

2.1 - STRATÉGIE DE SYNTHÈSE	- 96 -
-----------------------------	---------------

2.2 - CARACTÉRISATION	- 97 -
-----------------------	---------------

3 - ÉLIMINATION DU GROUPE PROTECTEUR BOC	- 103 -
---	----------------

3.1 - PREPARATION DU COMPLEXE $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{PHEN}'']^{2+}$ <u>33</u>	- 104 -
3.2 - PREPARATION DU COMPLEXE $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}'']^{2+}$ <u>38</u>	- 115 -

Chapitre IV : Assemblage chimiosélectif des conjugués - 119 -

1 - SYNTHÈSE DES CONJUGUES "COMPLEXE DE RU(II)-5'-OLIGONUCLEOTIDE" - 119 -

1.1 - SYNTHÈSE DES CONJUGUES $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{PHEN}'']^{2+}$ -5'-OLIGONUCLEOTIDE <u>39 - 40 - 41</u>	- 120 -
---	---------

1.2 - SYNTHÈSE DES CONJUGUES $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}'']^{2+}$ -5'-OLIGONUCLEOTIDE <u>42 - 43 - 44</u>	- 127 -
--	---------

2 - SYNTHÈSE DES CONJUGUES "COMPLEXE DE RU(II)-3'-OLIGONUCLEOTIDE" - 129 -

3 - SYNTHÈSE DES CONJUGUES "COMPLEXE DE RU(II) - PEPTIDE" - 133 -

3.1 - PREPARATION DU CONJUGUE « $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{PHEN}'']^{2+}$ -NLS» <u>49</u>	- 133 -
--	---------

3.2 - PREPARATION DU CONJUGUE « $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{PHEN}'']^{2+}$ -TAT» <u>50</u>	- 135 -
--	---------

- Partie B - Etudes photochimiques

- 139 -

1 - CARACTERISATION PHOTOPHYSIQUE DES CONJUGUES - 141 -

1.1 - SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION	- 141 -
----------------------------------	---------

1.2 - SPECTROSCOPIE D'ÉMISSION STATIONNAIRE	- 144 -
---	---------

1.3 - ÉMISSION RESOLUE DANS LE TEMPS	- 145 -
--------------------------------------	---------

1.3.1. - LES CONJUGUES ANCRES AU COMPLEXE $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{PHEN}'']^{2+}$	- 146 -
--	---------

1.3.2. - LES CONJUGUES ANCRES AU COMPLEXE $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}'']^{2+}$	- 149 -
---	---------

2 - PHOTOREACTIVITÉ DES CONJUGUES COMPLEXE DE RU^{II}-OLIGONUCLEOTIDE - 151 -

2.1 - LA MISE EN ÉVIDENCE DU "PHOTOCROSSLINKING"	- 152 -
--	---------

2.1.1. - ILLUMINATION DES CONJUGUES $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{PHEN}'']^{2+}$ -OLIGONUCLEOTIDE	- 152 -
---	---------

2.1.2. - ILLUMINATION DES CONJUGUES $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}'']^{2+}$ -OLIGONUCLEOTIDE	- 153 -
--	---------

2.2 - MISE EN ÉVIDENCE DU PHOTOADDUIT	- 155 -
---------------------------------------	---------

2.2.1. - COMPARAISON DU NOUVEAU SYSTÈME AVEC L'ANCIEN SYSTÈME	- 158 -
---	---------

2.2.2. - INFLUENCE DE L'EXTREMITÉ D'ANCRAGE	- 161 -
---	---------

2.2.3. - COMPARAISON DES DEUX TYPES DE COMPLEXES ÉTUDIÉS	- 162 -
--	---------

Conclusions et perspectives

- 169 -

Partie Expérimentale

- 173 -

1 - INSTRUMENTATION ET CONDITIONS GENERALES - 173 -

2 - SYNTHÈSE DES OLIGONUCLEOTIDES - 176 -

3 - SYNTHÈSE DES PEPTIDES - 188 -

4 - PRÉPARATIONS DES LIGANDS - 193 -

5 - CARACTÉRISATION ET DÉPROTECTION DES COMPLEXES DU RUTHENIUM - 200 -

6 - PRÉPARATION DES CONJUGUES - 204 -

Bibliographie

-213-

Annexe

-225-

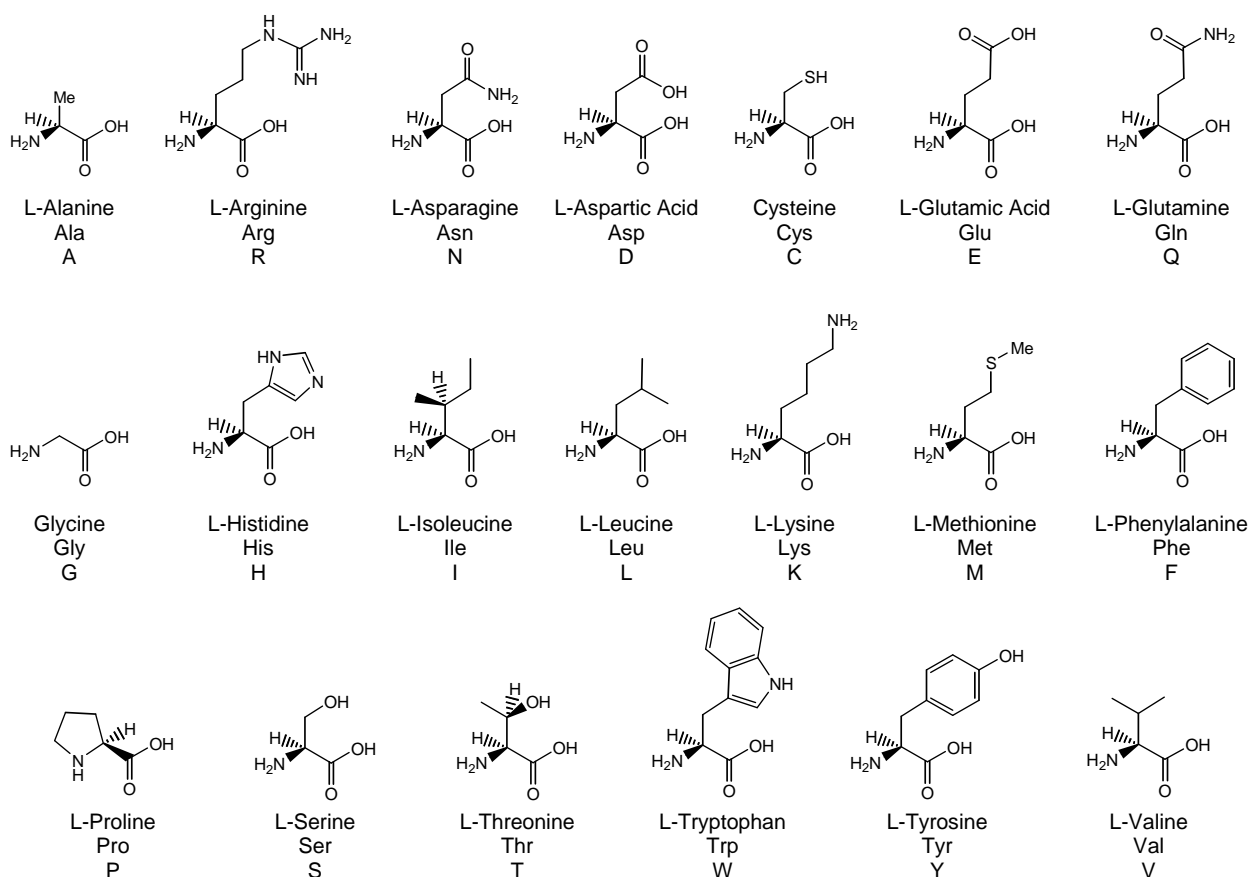
Abréviations

A	Adénine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ac	Acétyl
Acm	Acétamidométhyl
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
AcONa	Acétate de sodium
AcONH₄	Acétate d'ammonium
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
AS-ODN	AntiSens Oligonucléotide
Boc	<i>Tertio</i> -butyloxycarbonyl
Bz	Benzoyle
C	Cytosine
Calc.	calculé
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
COSY	COrelated Spectroscopy
CPG	Controlled Pore Glass
db	double brin
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCI	Desorption Chemical Ionisation
DCM	Dichlorométhane
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfert
DIEA	<i>N,N</i> -Diisoéthylamine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMT	4,4'-Diméthoxytrityle
DO	Densité optique
DTT	DiThioThreitol
éq.	Équivalent molaire
ESI	Electrospray Ionisation
ESMS	ElectroSpray Mass Spectrometry
Et₂O	Éther diéthylique
EtOH	Éthanol
Exp.	Expérimentale
Fmoc	9-Fluorénylméthylloxycarbonyl
G	Guanine
GMP	Guanosine 5'-monophosphate
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IE	Impact Electronique
iPr	Isopropyle
IR	Infra-Rouge
λ	Longueur d'onde
MBHA	<i>p</i> -MéthylBenzylHydrileAmine
MeOH	Méthanol
min	Minute
NH₄OH	Hydroxyde d'ammonium
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
ODN	OligoDésoxuriboNucléotide
Pbf	2,2,4,6,7-Pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
ppm	Partie par million
PPTS	Pyridinium ParaToluène Sulfonate
PyBOP®	(Benzotriazol-1-yl)oxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire

RNase H	Ribonucléase H
sb	simple brin
SPC	Single Photon Counting
SPPS	Synthèse peptidique sur surface solide
Succ	succinimide
t.a.	température ambiante
T	Thymine
tBu	Tertiobutyle
Théo.	Théorique
TFA	TriFluoroacétique Acid
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
U	Uracile
UV	Ultra-Violet

Les acides aminés naturels

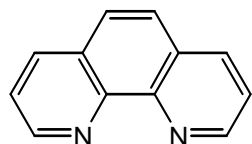
Structures et codes à une lettre et trois lettres



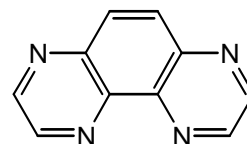
Le code à une lettre utilise une lettre majuscule pour les acides aminés de configuration L et une lettre minuscule pour ceux de configuration D.

Les ligands cités

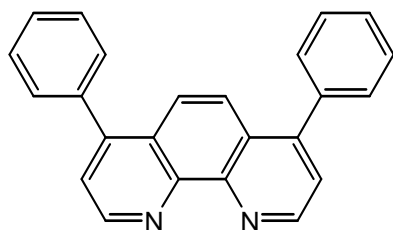
Les ligands étudiés



phen : 1,10-phénanthroline

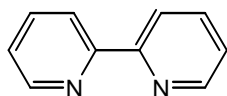


TAP : 1,4,5,8-tétraazaphénanthrène

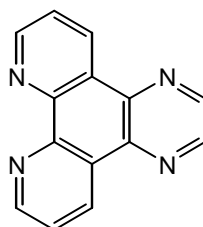


dip : 4,7-diphényl-1,10-phénanthroline

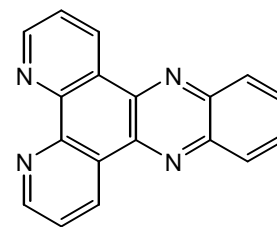
Les exemples de ligands de la littérature évoqués dans le manuscrit



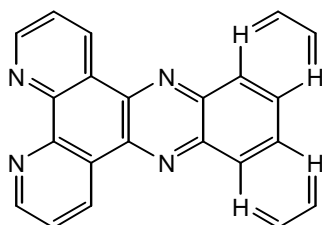
bpy : 2,2'-bipyridine



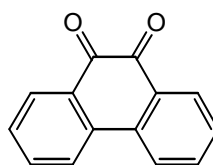
HAT : 1,4,5,8,9,12-hexaazatriphénylène



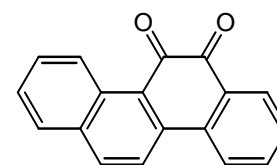
dppz : dipyrido [3,2-a:2',3'-c] phénazine



Phehat : 1,10-phénanthroline [4,5-b] 1,4,5,8,9,12-hexaazatriphénylène.



phi : 9,10-phénanthrènequinone



chrysi : 5,6-chrysènequinone

Préambule

Notre objectif de recherche concerne le développement d'une nouvelle substance potentiellement utilisable en photothérapie. Cette molécule doit pouvoir générer un dommage irréversible de l'ADN, uniquement sous l'action d'une irradiation lumineuse. Elle a été envisagée à partir des propriétés de photoréactivité des métaux de transition avec l'ADN. Nous avons décidé de mettre à profit plus particulièrement la capacité de certains complexes polyazaaromatiques de ruthénium(II) à former un photoadduit covalent avec la guanine. La possibilité d'agir directement sur l'ADN constitue une stratégie prometteuse pour contrôler directement l'expression des gènes, pouvant s'appliquer aux cellules tumorales. Néanmoins, ces complexes photooxydants de ruthénium(II) contenant des ligands TAP (1,4,5,8-tétraazaphénanthrène) ne possèdent aucune sélectivité particulière vis-à-vis de l'ADN. Ils photoréagissent avec toutes les guanines environnantes. Ce manque de spécificité bloque leur développement en tant que médicament antitumoral.

Afin d'apporter à cette photoréactivité une sélectivité vis-à-vis d'une séquence nucléotidique précise, nous avons attaché le complexe polyazaaromatique de ruthénium(II) à l'extrémité d'un oligonucléotide. Ce type d'assemblage pourrait s'inscrire dans le cadre d'une stratégie antisens. Notre modèle synthétique apporte un plus à l'approche antisens classique, avec l'oligonucléotide dans le rôle de vecteur et le complexe métallique celui d'effecteur. Après l'hybridation de l'oligonucléotide sonde à sa cible, il est possible de photoactiver le complexe qui va se lier définitivement avec une guanine proche, et ainsi sceller les deux brins nucléotidiques. Un tel photoadduit pourrait ensuite perturber le fonctionnement des enzymes cellulaires de la synthèse protéique *in vivo*.

Afin d'étudier le potentiel du procédé, nous avons réalisé différents conjugués à partir de deux complexes polyazaaromatiques de ruthénium(II) : le $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$ et le $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$, plusieurs oligonucléotides affichant ou non des guanines. L'entité métallique a également été ancrée à l'extrémité de deux peptides vecteurs, spécifiques du ciblage cellulaire.

Pour préparer les conjugués, nous avons utilisé le lien éther d'oxime. Il nous a permis de mettre au point une méthode douce et efficace de conjugaison, optimisée dans des conditions conformes aux exigences physiologiques. L'efficacité de la chimiosélectivité observée lors des essais de conjugaison sur divers fragments tels que les oligonucléotides, et les peptides, a permis de valoriser

cette nouvelle méthode. Elle s'avère très productive par rapport au procédé développé auparavant pour conjuguer le fragment métallique et l'acide nucléique, via un lien amide.

Nous avons ensuite étudié la photoréactivité de ces nouveaux assemblages photosensibilisateurs. Ils se sont montrés photooxydants de la guanine. Cela nous permet d'envisager une quantité suffisante de photoproduit pour réaliser une caractérisation complète.

Ce travail est réalisé sous la direction du Pr. Eric Defrancq dans le cadre du Laboratoire Européen Associé Ingénierie BioMoléculaire issu de la collaboration de deux laboratoires :

- L'équipe Ingénierie et Interaction BioMoléculaire (I2BM), Département de Chimie Moléculaire-UMR CNRS 5250, Université Joseph Fourier, Grenoble, France (Pr. Pascal Dumy).
- Le laboratoire de Chimie-Organique et Photochimie, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgique (Pr. Andrée Kirsch-De Mesmaeker).

Introduction

Introduction

1 - Structure et fonctions de l'ADN

La transmission des caractères héréditaires d'une génération à une autre repose sur une molécule, présente dans la totalité du règne vivant, l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ce composé universel a été découvert dès la fin du XIX^{ème} siècle par Miescher. Altmann et Kossel ont ensuite affiné sa structure chimique pour finalement aboutir à une modélisation tridimensionnelle proposée par Watson et Crick en 1953.¹ Le modèle repose sur l'appariement en double hélice et de façon antiparallèle de deux brins polynucléotidiques (*figure 1*).

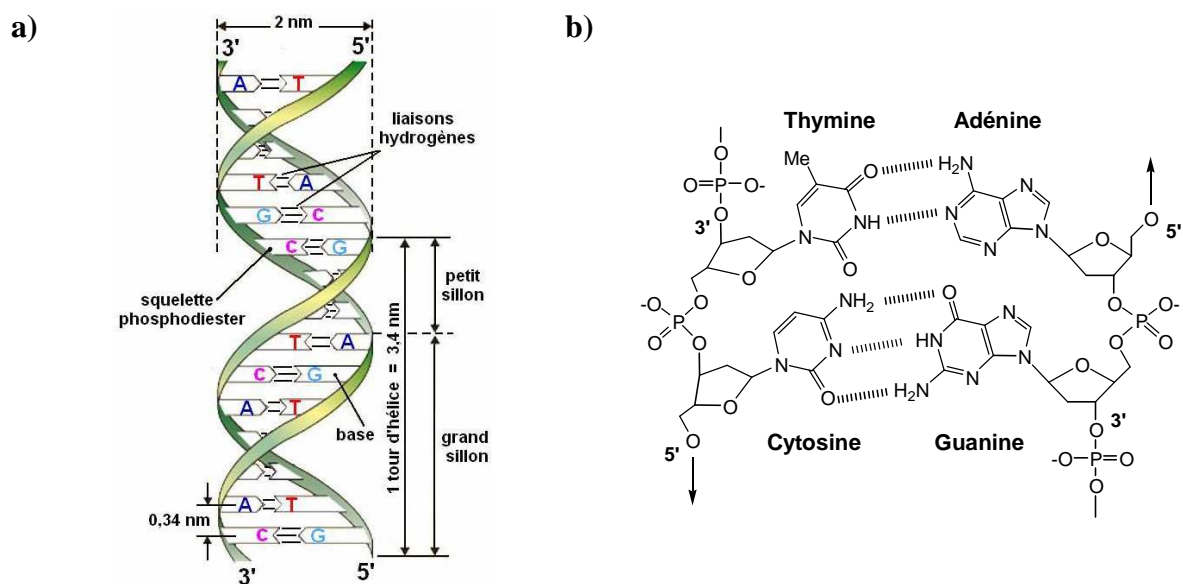


Figure 1 : La structure de la double hélice de l'ADN (a), et l'appariement des bases nucléiques (b).

Chaque nucléotide est une entité constituée d'un phosphate relié à un sucre, le 2'-désoxyribose lui-même relié par un lien *N*-glycosidique à une base nucléique azotée. Des ponts phosphodiester en 3' et 5' des furanoses connectent ensuite les nucléotides entre eux. Les bases azotées se divisent en deux catégories suivant leur nature chimique. L'adénine (A) et la guanine (G) constituent les bases puriques ; la cytosine (C) et la thymine (T) constituent les bases pyrimidiques. L'interaction des

¹ (a) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**, *171*, 737-738. (b) Wilkins, M. H. F.; Randall, J. T. Crystallinity in sperm heads : molecular structure of nucleoprotein in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1953**, *10*, 192-193. (c) Franklin, R. E.; Gosling, R. G. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* **1953**, *171*, 740-741.

constituants contraignent les deux brins à adopter la structure hélicoïdale antiparallèle caractéristique. Elle est stabilisée grâce aux liaisons hydrogènes établies entre les bases nucléiques complémentaires. L'adénine se lie respectivement à la thymine suivant deux liaisons hydrogènes, et la guanine à la cytosine grâce à trois liaisons hydrogènes. Cette propriété permet de réaliser facilement des copies fidèles de l'ADN, indispensables pour transmettre le capital génétique au cours de la division cellulaire. Ce message est ensuite interprété et exprimé grâce au code génétique universel. Il régit la correspondance entre l'information détenue par la séquence nucléotidique et les acides aminés qui participeront à l'élaboration de protéines chargées d'exécuter le programme génétique propre à chaque individu.

Seulement la partie de l'ADN correspondant aux gènes, dite codante, va être ensuite retranscrite en protéine en deux étapes successives :

- Dans le noyau des cellules eucaryotes, un gène est tout d'abord transcrit en un acide ribonucléique monobrin : l'ARN messager (ARNm). A l'instar de l'ADN, l'ARN est constitué d'un enchaînement de nucléotides, mais le 2'-désoxyribose est remplacé par un ribose et la thymine (la 5-méthyluracile) par l'uracile (U).

- Après plusieurs étapes de maturation post-transcriptionnelles et son exportation dans le cytoplasme, l'ARNm est traduit en protéine. Chaque acide aminé est ainsi mis en place selon l'ordre dicté par les séquences de codons de l'ARNm, triplets de nucléotides contigus, via l'intervention d'ARN de transfert et de la machinerie ribosomale. Les combinaisons formées par l'enchaînement de 3 bases à partir de A, C, T, et G, suffisent à coder l'ensemble des 20 acides aminés.

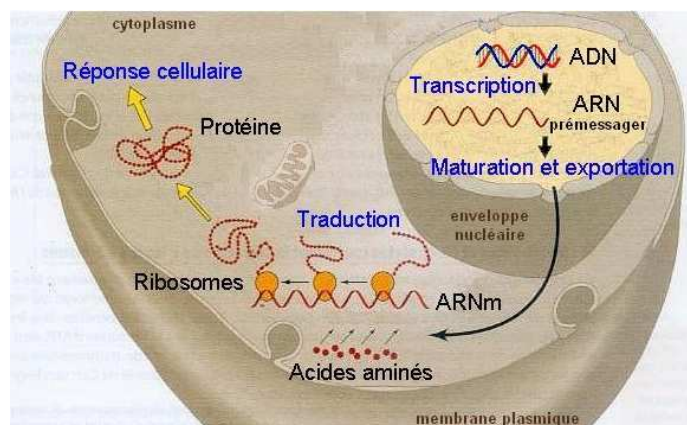


Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme de la synthèse protéique dans la cellule.

2 - L'ADN en tant que cible thérapeutique

Ces différents supports de l'information génétique constituent des cibles attractives pour l'étude de la fonction des gènes, mais également pour la mise au point de médicaments. Ainsi, de nombreux agents chimiothérapeutiques naturels ou synthétiques peuvent être utilisés pour affecter les macromolécules d'ADN ou d'ARN. Ils constituent différentes classes suivant leur mode d'action vis-à-vis des acides nucléiques.

2.1 - Les agents alkylants

Les agents alkylants établissent des liaisons covalentes avec les acides nucléiques.² Ce sont généralement des composés électrophiles qui peuvent réagir avec les groupements amines ou hydroxyles des bases de l'ADN selon une réaction de substitution nucléophile, ayant pour conséquence le greffage d'un groupe alkyle sur la base cible. On distingue des agents alkylants mono-fonctionnels, c'est à dire n'ayant qu'un seul lien chimique avec l'ADN, et les agents bi-fonctionnels qui peuvent s'accrocher sur deux sites distincts de l'ADN (agents réticulants). La plupart des alkylants utilisés en thérapeutique sont bi-fonctionnels. Ils possèdent deux groupes alkyles susceptibles de relier deux nucléotides adjacents. Ils forment donc des ponts intra- ou inter-caténaire rendant ainsi la réplication ou la transcription de l'ADN impossible. L'azote N(7) de la guanine est statistiquement la cible principale de l'alkylation. Cette classe pharmacologique comprend un très grand nombre de substances utilisées en thérapeutique, parmi lesquelles : les moutardes à l'azote comme la chlorométhine (Caryolysine®), les nitroso-urées comme la carmustine (Bicnu®), les alkylsulfonates tels que le busulfan (Misulban®), les éthylènes-imines comme l'altréamine (Hexastat®).

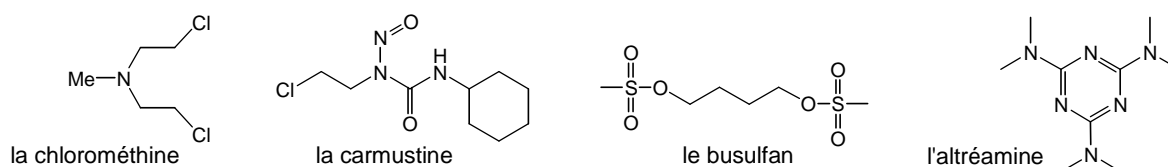


Figure 3 : Quelques exemples d'agents alkylants bi-fonctionnels de l'ADN.

Les dérivés du platine constituent la seule famille de produits anticancéreux fondée sur un métal lourd. Ils se fixent essentiellement au niveau de l'azote N(7) des guanines et forment des ponts entre les brins d'ADN. L'effet toxique est corrélé au nombre de ponts inter-brins observés, qui peuvent demander plusieurs heures à être formés et sont ensuite réparés très lentement. Les trois sels

² Mishina, Y.; Duguid, E. M.; He, C. Direct reversal of DNA alkylation damage. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 215-232.

de platine utilisés couramment sont le cisplatine (Cisplatyl®), le paraplatine (Carboplatine®) et l'oxaliplatine (Eloxatine®).

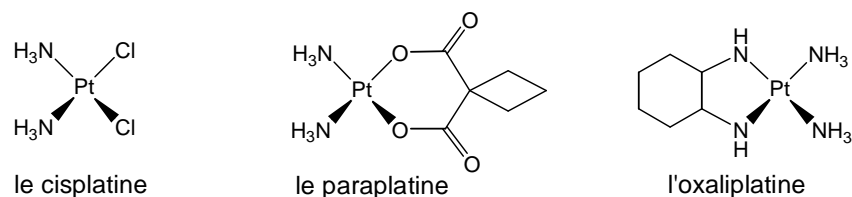


Figure 4 : Les sels de platine(II) couramment utilisés en chimiothérapie médicamenteuse.

Certains de ces agents alkylants possèdent en plus une action anti-enzymatique, plus ou moins bien définie, élargissant leur mode d'action probable. L'intérêt antitumorale de cette classe de composés réside dans le fait qu'ils sont capables d'établir rapidement des liaisons covalentes avec l'ADN. Malgré leur préférence pour les cellules en division, ils affectent aussi bien les cellules normales que tumorales. Ce manque de spécificité antitumorale entraîne de nombreux dommages aux cellules des tissus sains. Ceux-ci se manifestent par les effets secondaires de la chimiothérapie (perte de cheveux, stérilité...).

2.2 - Les agents intercalants

Les agents intercalants sont des molécules caractéristiques, constituées de plusieurs noyaux aromatiques accolés. Cette morphologie plane leurs permet de s'insérer au cœur de la double hélice d'ADN, par "stacking" (interactions hydrophobes) entre deux plans de paires de bases successifs. La distorsion ainsi créée perturbe la progression normale des systèmes enzymatiques, inhibant de ce fait la réplication et la transcription. Ils sont également responsables de coupures mono- et bi-caténares de l'ADN. Suivant le type d'intercalant, ce phénomène provient de leur capacité, soit à générer des radicaux libres, soit à inhiber l'action des topoisomérases indispensables à la transcription de l'ADN.³ Les chefs de file de ces substances appartiennent à la famille des anthracyclines, comme la doxorubicine. D'autres composés appartiennent à cette classe, dont par exemple les ellipticines (la 9-hydroxyellipticine), les acridines (l'amsacrine), les actinomycines (la dactinomycine), et les aminoanthraquinones (la mitoxantrone).

³ J. J. Champoux. DNA Topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, 70, 369-413.

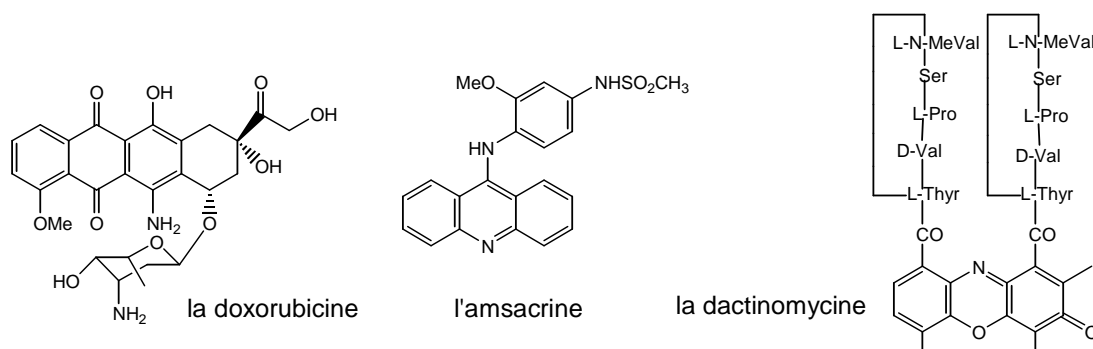


Figure 5 : Quelques exemples d'agents intercalants de l'ADN.

2.3 - Les agents de coupure de l'ADN

La seule substance qui est actuellement utilisée en tant que médicament pour ses propriétés destructrices de la double hélice d'ADN est la bléomycine (Bléomycine®).⁴ Son mode d'action met en jeu des coupures des brins d'ADN résultants d'une réaction radicalaire au niveau du désoxyribose.

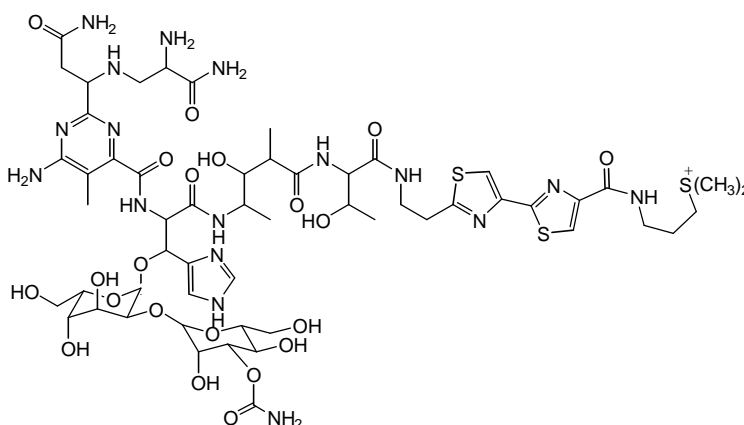


Figure 6 : La bléomycine.

Outre le manque de sélectivité pour une séquence particulière d'ADN, l'ensemble de ces composés se heurte à la chimiorésistance innée ou acquise par les cellules tumorales. Ce phénomène de chimiorésistance minimise le potentiel de cet arsenal thérapeutique. Il existe également de nombreux mécanismes pharmacocinétiques qui imposent l'utilisation de quantités importantes pour finalement obtenir une action significative. En plus des paramètres pharmacodynamiques qui rendent difficiles l'accessibilité de ces molécules à leur cible, soit à cause d'une pénétration cellulaire difficile, soit plutôt à cause d'une expulsion accrue des produits développée par les cellules. Ils obligent donc

⁴ Galm, U.; Hager, M. H.; Van Lanen, S. G.; Ju, J.; Thorson, J. S.; Shen, B. Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Enediynes, and Mitomycin. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 739-758.

les chercheurs à trouver en permanence de nouveaux produits actifs et/ou de nouvelles cibles en tenant compte de ces nombreux facteurs.

3 - L'ADN : la cible des radiations lumineuses

L'héliothérapie consiste à exposer le corps dans son entier ou en partie aux rayons du soleil. Cette thérapie a connu par le passé une grande vogue lorsque la pharmacopée était restreinte. Elle était surtout recommandée, dans le cas de certaines carences vitaminiques (rachitisme chez l'enfant, par exemple), de certaines formes de tuberculose non pulmonaire (osseuse en particulier), ou pour accélérer le processus réparateur des maladies cutanées.⁵ A ces bienfaits viennent s'ajouter des effets psychologiques bénéfiques. Aujourd'hui, la place du soleil a été pratiquement supplantée par des radiations électromagnétiques non ionisantes artificielles. La photothérapie résultante consiste à traiter une vaste gamme d'affections cutanées au moyen de rayons ultraviolets (UV). Ce traitement médical, qu'il soit de source naturelle ou artificielle, suppose le respect d'un certain nombre de conditions, et plus spécialement une surveillance étroite à cause des accidents sérieux qu'il peut provoquer. En effet, la lumière possède la capacité de déclencher des réactions chimiques. Les radiations n'agissent sur la matière que dans la mesure où elles sont absorbées. La matière biologique n'échappe pas à ce phénomène, étant donné que certaines biomolécules peuvent absorber spécifiquement l'énergie lumineuse, comme l'ADN, et les protéines. L'ADN constitue la principale cible cellulaire susceptible d'être altérée par de tels rayonnements. Une atteinte chimique photoinduite de protéines fonctionnelles, comme les enzymes, et de lipides membranaires peut aussi affecter la survie cellulaire.

Les rayonnements non ionisants se divisent en plusieurs sous-groupes, avec une réactivité plus ou moins marquée pour l'ADN suivant leur énergie. D'une manière générale, seules les radiations UV-visibles ont un intérêt, car leur énergie est de l'ordre de celle de la liaison chimique.

L'ADN peut être directement la cible des rayons UV par un transfert d'énergie ou par l'arrachement d'un électron, qui casse ou déforme sa structure. Elle peut l'être aussi indirectement, par l'effet de ces mêmes phénomènes sur des molécules photosensibles qui l'entourent. L'intensité du rayonnement et sa longueur d'onde, déterminent la nature des lésions qu'il peut infliger aux acides nucléiques.

⁵ Stockel, G.; Wanat, A.; Kulis, E.; Stasicka, Z. Light and metal complexes in medicine. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *171*, 203-220.

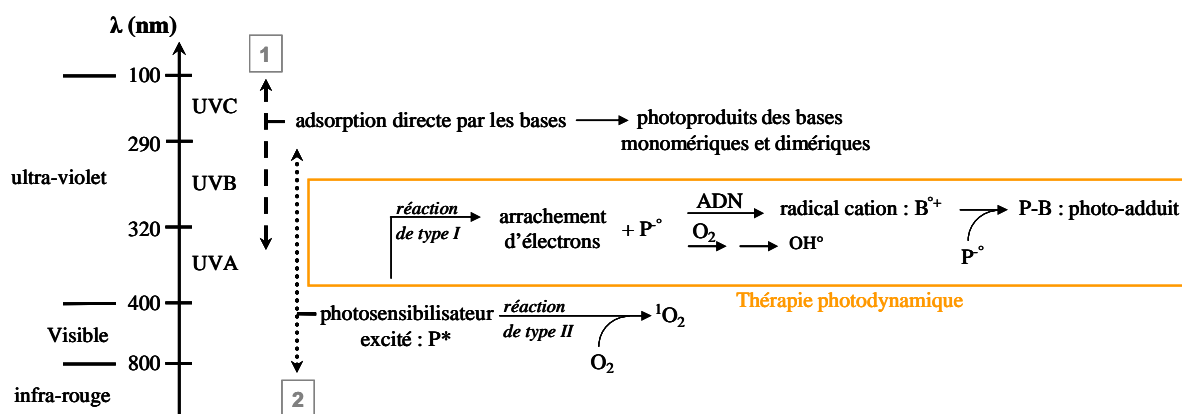


Figure 7 : Le mode d'action des rayonnements ultra-violet et visibles sur l'ADN.

3.1 - Dommages directs induits par les rayonnements UV sur l'ADN

Ce type de réaction concerne les photons les plus énergétiques des radiations UV. Il provient d'un transfert direct d'énergie du rayonnement à l'ADN, se répercutant de façon intramoléculaire entre les constituants de l'ADN. L'absorption d'un tel quanta d'énergie peut notamment entraîner des réactions entre les bases pyrimidiques adjacentes conduisant à la formation d'une liaison covalente, voire même de deux (*figure 8*).⁶ La moitié de ce type de dommage correspond à un photoproduit dimérique. Un tel phénomène induit une importante distorsion de la double hélice d'ADN, ce qui facilite la détection de l'anomalie. Ce type de lésion est relativement bien réparé chez les procaryotes, par les enzymes DNA photolyases qui réalisent la cassure du pontage.

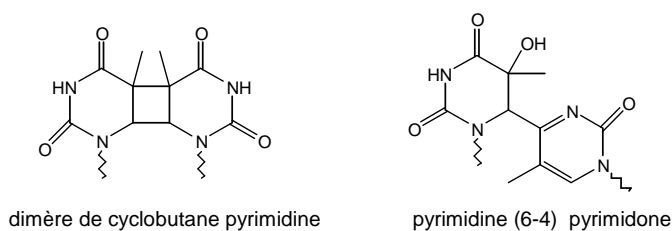


Figure 8 : Les deux principaux photoproduits dimériques formés par les radiations UV sur l'ADN.

3.2 - Dommages indirects induits par les rayonnements UV sur l'ADN

⁶ Pfeifer, G. P. Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 270-283.

3. 2. 1. - Le processus

Les rayonnements UV A et visibles ne sont pas ou très peu absorbés par l'ADN, néanmoins ils infligent indirectement des dommages à l'ADN. Leur action fait intervenir un photosensibilisateur endogène ou exogène qui absorbe le photon de lumière. Cette molécule excitée va ensuite subir une photoréaction ou transférer son énergie à l'ADN en entraînant toute une cascade d'évènements. Les dommages de l'ADN résultants proviennent de deux processus d'oxydation (figure 7).

Le processus d'oxydation de type I correspond à l'arrachement d'un électron à une base, ou d'un hydrogène au sucre. Le radical cation ($B^{+\bullet}$) ainsi obtenu au niveau d'une base purique peut conduire à la formation d'un photoadduit en se recombinant avec le radical anion issu du photosensibilisateur. La perte de l'hydrogène du sucre conduit à la coupure du polynucléotide. Ce processus peut également engendrer indirectement la formation d'un radical hydroxyle OH^\bullet .

La réaction d'oxydation de type II se traduit par la formation d'oxygène singulet consécutivement à un transfert d'énergie entre le photosensibilisateur excité et l'oxygène à l'état triplet. Au sein de l'ADN, cette espèce radicalaire peut aussi bien réagir au niveau d'une base, que d'un sucre.

Ces procédés conduisent finalement à la formation de plusieurs catégories de lésions qui incluent des dégâts au niveau des bases, des cassures simples brins, des sites abasiques, voire même des adduits ADN-protéines. Les dommages occasionnés sont généralement très dévastateurs à cause de la propagation de l'espèce radicalaire OH^\bullet , et de l'oxygène singulet.

3. 2. 2. - Les conséquences sur l'ADN

Finalement l'action du photosensibilisateur entraîne de nombreuses cascades d'évènements endommageant deux sites de l'ADN : l'unité sucre et les bases azotées.⁷ Les dommages au niveau du sucre conduisent à la coupure du brin d'ADN. Ceux concernant les bases azotées s'attaquent principalement à la base la plus réductrice de l'ADN : la guanine. Le principal produit d'oxydation de l'ADN correspond au radical guanine cationique ($G^{+\bullet}$) qui se décompose essentiellement en 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-G, *figure 9*).⁸

⁷ Szacilowski, K.; Macyk, W.; Drzewiecka-Matuszek, A.; Brindell, M.; Stochel, G. Bioinorganic Photochemistry : Frontiers and mechanisms. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2647-2694.

⁸ Burrows, C. J.; Muller, J. G. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151.

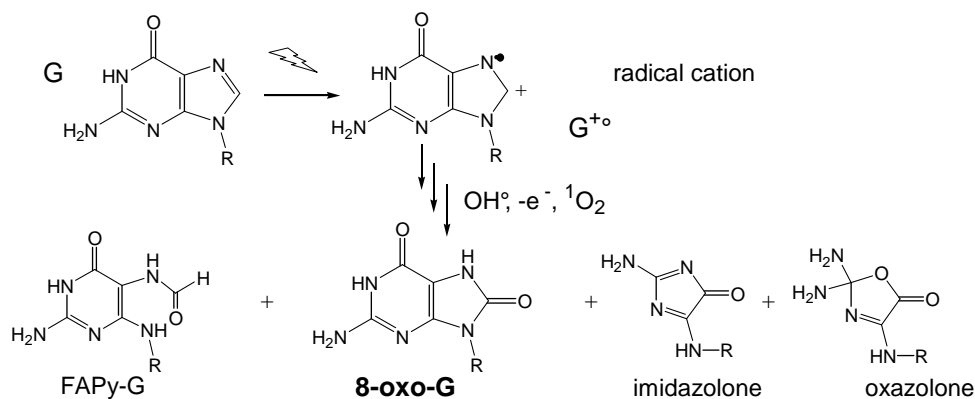


Figure 9 : Le devenir du radical guanine cationique.

(8-oxo-G : la 7, 8-dihydro-8-oxoguanine ; FAPy-G : la 2,6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine)

La 8-oxo-G correspond toujours au produit majoritairement observé, par contre son mécanisme précis de formation à partir du radical guanine cationique est encore discuté. En milieu plus réducteur le 2,6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine (FAPy-G) est très présent, et deux autres produits : l'imidazolone et l'oxazolone se forment également à partir de la déprotonation du radical en présence d' O_2 .

La lésion 8-oxo-G est d'ailleurs souvent utilisée comme marqueur biologique d'exposition aux agents oxydants. Il a même été montré qu'1 guanine sur 40 000 du génome était sous la forme de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine dans les conditions physiologiques normales, représentant plus de 30 000 8-oxo-G dans l'ensemble du génome humain.

3. 2. 3. - Le photosensibilisateur

Les molécules photosensibles sont généralement de nature exogène, elles servent notamment de médicaments dans certains cancers traités par photothérapie dynamique. Le photosensibilisateur doit être un cofacteur très sélectif de la réaction chimique photoinduite. Il faut l'activer grâce à un rayonnement de longueur d'onde supérieure à 300 nm, où les acides nucléiques et de très nombreuses protéines sont transparents. Dans ce contexte, les complexes de métaux de transition sont des photosensibilisateurs très intéressants. Ils le sont d'autant plus grâce à leurs propriétés photoredox et structurales versatiles. En effet, il est possible de moduler leur réactivité vis à vis de cibles biologiques en modifiant la nature de leurs ligands. Ainsi ces composés peuvent induire soit des coupures du brin d'ADN, soit des oxydations ou des alkylations des bases. Cette décennie a vu exploser le développement de nombreux complexes métalliques comme agents de coupure de l'ADN : $[Rh(phen)_3]^{3+}$, $[Co(NH_3)_6]^{3+}$, et $[Ru(bipy)_3]^{2+}$ par exemple.⁹ L'utilisation de ligands polyaromatiques

⁹ Shields, T. P.; Barton, J. K. Sequence-Selective DNA Recognition and Photocleavage: A Comparison of Enantiomers of $Rh(en)_2\phi^{3+}$ *Biochemistry* **1995**, *34*, 15037.

ont même permis d'augmenter l'affinité des complexes pour l'ADN : $[\text{Ru}(\text{pheat})(\text{phen})_2]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{bpz}/\text{tap})_2(\text{dppz})]^{2+}$.¹⁰

Les rayonnements lumineux engendrent initialement des effets cutanés, car ils ne peuvent que pénétrer les tissus superficiels de la peau. Néanmoins, ils peuvent modifier la cartographie génique de leur ADN. Bien que l'étape physique ne dure que quelques femtosecondes, elle constitue le chaînon initiateur d'une longue séquence d'évènements chimiques, puis biologiques qui peuvent entraîner des modifications du patrimoine génétique, pouvant même conduire à la mort cellulaire. La photothérapie dynamique est un concept thérapeutique original utilisé notamment dans le cadre du traitement de certains cancers. L'action conjointe du photosensibilisateur et de la lumière au niveau des cellules cancéreuses peut entraîner leurs éradications.

4 - L'ADN et les complexes de métaux de transition

Les complexes métalliques ont une aptitude naturelle à s'associer avec l'ADN grâce à leurs caractères cationiques, et à leurs structures tridimensionnelles. Ils peuvent ensuite induire soit une hydrolyse, une réaction redox, ou une photoréaction avec le polynucléotide suivant le type de complexe impliqué. Ces propriétés ont engendré un grand intérêt dans le développement de nouvelles drogues anti-tumorales. D'ailleurs, les complexes métalliques provenant du platine(II), le cis-platine par exemple, sont aujourd'hui couramment employés en tant qu'agents anticancéreux en chimiothérapie.¹¹ Ils ciblent directement l'ADN en formant des pontages inter- ou intra-brins. Le lien covalent reliant les deux brins d'ADN empêche l'ouverture de la double hélice, indispensable aux mécanismes de la réplication et/ou de la transcription. Des études ont estimé que 20 lésions de ce type dans le génome bactérien ou animal peuvent entraîner la mort la cellule. Malgré de nombreux efforts, le mécanisme précis de la réparation de telles lésions reste une énigme, car les enzymes impliquées diffèrent suivant la nature exacte du pontage. La seule certitude, c'est que la réparation se fait suivant un procédé d'excision de nucléotides. Il consiste à enlever la lésion en découpant une importante partie du brin d'ADN, puis une polymérase régénère le fragment éliminé en utilisant le brin complémentaire comme matrice. Ce type de réparation peut donc générer à son tour un dommage, augmentant ainsi le pouvoir cytotoxique de la drogue. Cette cytotoxicité joue également un rôle clé dans le mécanisme d'action des complexes binucléaires de rhodium(II) possédant des ligands carboxylates ($\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{L}_2$ avec R : Me, Et, Pr ; et L : une molécule de solvant). Ce type de

¹⁰ Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A. New DNA-binding ruthenium(II) complexes as photoreagents for mononucleotides and DNA. *J. Phys. Org. Chem.* **1998**, *11*, 577-583.

¹¹ Zhang, C. X.; Lippard, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr. Opinion Chem. Biol.* **2003**, *7*, 481-489.

complexes affiche une activité antitumorale en faisant aussi intervenir un pontage inter-brin au cœur de l'ADN.¹²

Les complexes de ruthénium sont également de bons candidats pour générer de tels dommages, comme par exemple : $[(\eta^6\text{-arène})\text{Ru}^{\text{I}}(\text{en})\text{Cl}]^+$, qui forme des pontages inter-brins en s'accrochant préférentiellement aux atomes d'azote N(7) des guanines.^{13,(i)}

4.1 - Le ruthénium

4.1.1. - Structure électronique des complexes de ruthénium(II)

On peut retrouver le ruthénium sous divers degrés d'oxydation (2, 3, 4, 6 et 8). A l'état d'oxydation 2+, le cation ruthénium possède une structure électronique $[\text{Kr}] 4d^6$. Sa coordinence de 6 lui permet de chélater 6 atomes, possédant au moins un doublet libre, pour former un complexe de géométrie octaédrique. Les liaisons de coordination proviennent du recouvrement des 6 orbitales vides d_{2sp^3} du cation Ru^{2+} avec les six orbitales sp^2 des ligands contenant les doublets électroniques non liants. Cette liaison est ensuite stabilisée par une composante de rétrocoordination qui implique la délocalisation partielle des électrons du métal vers les orbitales π^* des ligands.

Les orbitales moléculaires formées lors de la complexation proviennent de la combinaison linéaire des orbitales atomiques du métal avec celles des ligands. On obtient deux types d'orbitales moléculaires. Celles centrées sur le métal possèdent un caractère métallique, avec une énergie proche de celle d'une orbitale du métal ($d\pi$, $d\sigma^*$). Celles centrées sur les ligands possèdent un caractère ligand, avec une énergie proche de celle d'une orbitale d'un des ligands (π , π^*).

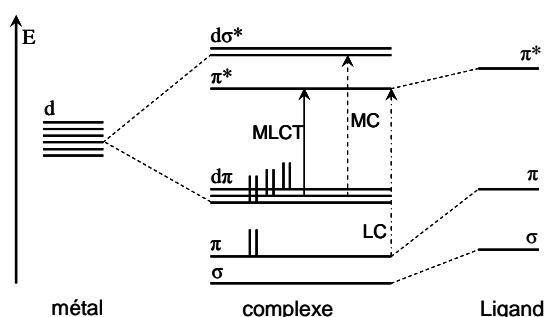


Figure 10 : Diagramme des niveaux d'énergie des principales orbitales moléculaires et les transitions résultantes pour un complexe octaédrique de ruthénium(II).

¹² Dunham, S. U. D.; Chifotides, H. T; Mikulski, S.; Burr, A. E.; Dunbar, K. R. Covalent binding and interstrand cross-linking of duplex DNA by dirhodium(II,II) carboxylate compounds. *Biochemistry* **2005**, *44*, 996-1003.

¹³ Novakova, O.; Chen, H.; Vrana, O.; Rodger, A.; Sadler, P. J.; Brabec, V. DNA interaction of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11544-11554.

⁽ⁱ⁾ en : éthylène diamine ; arène : biphényle, dihydroanthracène, tetrahydroanthracène, *p*-cumène, ou benzène.

On distingue 3 types de transitions électroniques entre les orbitales moléculaires induites par l'adsorption d'un photon (*figure 10*) :¹⁴

- les transitions LC (Ligand Centered) : elles correspondent à une transition entre deux orbitales centrées sur les ligands ($\pi - \pi^*$). Elles présentent notamment une bande d'absorption intense dans la région UV, (200-400 nm).
- les transitions MC (Metal Centered) : elles correspondent à une transition entre deux orbitales centrées sur le métal ($d\pi - d\sigma^*$). Elles sont peu intenses et situées à la frontière entre le visible et l'UV.
- les transitions MLCT (Metal to Ligand Charge Transfer) : elles correspondent à un transfert de charge d'une orbitale de type métal vers une orbitale de type ligand ($d\pi - \pi^*$). Elles sont relativement intenses et situées dans le domaine du visible.

4. 1. 2. - Caractéristiques photophysiques des complexes de ruthénium(II)

Le schéma photophysique présenté à la *figure 11* a été établi pour le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Il est admis pour tous les types de complexes de ruthénium(II) polyaaromatiques que nous étudions.¹⁵

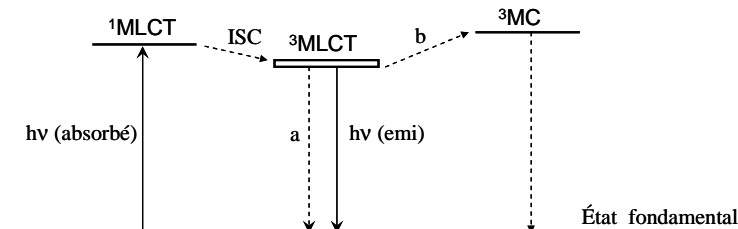


Figure 11 : Schéma photophysique établi pour les complexes polyaaromatiques de Ru(II) de type $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.

L'absorption d'un photon par le complexe lors de son irradiation entraîne le peuplement de l'état excité $^1\text{MLCT}$. Il se désactive très rapidement (quelques centaines de femtosecondes) par conversion intersystème (ISC) vers l'état excité $^3\text{MLCT}$ de plus faible énergie.¹⁶ Le complexe peut se désactiver de 3 manières à partir de cet état excité triplet (*figure 11*). Il peut subir :

¹⁴ Demas, J. N.; degraft, B. A. Design and applications of highly luminescent transition metal complexes. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 829-837.

¹⁵ Meyer, T. J. Photochemistry of metal coordination complexes : metal to ligand charge transfer excited state. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 1193-1206.

¹⁶ Damrauer, N. H.; Cerullo, G.; Yeh, A.; Boussie, T. R.; Shank, C. V., McCusker, J. K. Femtosecond dynamics of excited state evolution in $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. *Science* **1997**, *275*, 54-57.

- une désactivation non radiative en libérant de la chaleur. Ce processus dépend de l'environnement du complexe, et constitue la principale voie de désactivation de l'état excité du complexe.

- une désactivation radiative entraînant le retour à l'état fondamental en émettant de la luminescence dans la région de longueurs d'onde de 600 nm.

- un activation thermique qui le conduit vers un état 3MC plus énergétique. Cet état peut à son tour conduire à une désactivation non radiative, ou à la photodéchélation partielle du complexe. Cette déchélation entraîne souvent la substitution du ligand par une molécule de solvant.¹⁷

L'état excité 3MLCT possède une durée de vie relativement longue (quelques centaines de nanosecondes) ce qui lui permet de réaliser des réactions de transfert d'énergie et d'oxydoréduction.

A l'état fondamental, les complexes de Ru(II) peuvent être réduits en intégrant un électron sur leur orbitale π^* libre. Ils peuvent être également oxydés en perdant un électron de leur orbitale $d\pi$. Les potentiels d'oxydoréduction des complexes sont dépendants des niveaux d'énergie de ces deux orbitales, eux-mêmes dépendants des ligands coordonnés au métal. L'état électronique excité du complexe exalte ses propriétés. En effet, il devient énergétiquement plus facile d'ajouter un électron à l'état excité du complexe (réduction), comme il est plus facile de lui arracher un électron (oxydation), *figure 12*.

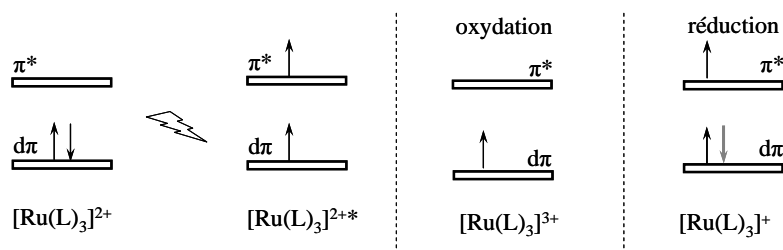


Figure 12 : Schématisation des phénomènes de réduction et d'oxydation d'un complexe de Ru(II) à l'état excité.

4.2 - L'ADN et les complexes de ruthénium(II)

Afin de perturber l'expression des gènes dans un but thérapeutique, de nombreuses molécules sont conçues pour interagir directement avec les acides nucléiques, dont le ruthénium.¹⁸

4.2.1. - L'association des complexes de ruthénium(II) avec l'ADN

¹⁷ Masschelein, A.; Jacquet, L.; Kirsch De-Mesmaeker, A.; Nasielski, J. Ruthenium complexes with 1,4,5,8-tetraazaphenanthrene. unusual photophysical behavior of the Tris-Homoleptic compound. *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 855-860.

¹⁸ Clarke, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 69-93.

L'association peut provenir d'interactions de différentes natures : électrostatique, hydrophobe, de type Van der Waals, ou impliquant des liaisons hydrogènes. Le mode d'interaction dépend principalement de la géométrie des complexes de ruthénium(II). De nombreux groupes de recherche ont étudié l'interaction des complexes de ruthénium(II) possédant des ligands polyazaaromatiques avec l'ADN.¹⁹ On peut distinguer trois types de comportement : l'association externe, l'intercalation, et l'adsorption dans un sillon de la double hélice. L'association externe provient d'une interaction électrostatique du complexe cationique avec le squelette polyphosphate anionique de la double hélice. L'intercalation résulte de la géométrie de certains ligands polyaromatiques du métal qui peuvent facilement s'insérer entre les paires de bases azotées, en mettant en jeu des interactions de "stacking" entre les systèmes aromatiques. Les complexes peuvent également s'adsorber dans les sillons de l'ADN. Ce mode d'association repose plutôt sur des interactions faibles de type Van der Waals, ou de type hydrophobe.

4. 2. 2. - La photoréaction des complexes polyazaaromatiques de ruthénium(II) avec l'ADN

En plus de leur attraction physique envers la double hélice d'ADN, certains complexes polyazaaromatiques de ruthénium(II) se sont montrés capables d'endommager de façon irréversible l'ADN. Cette propriété a été notamment mise en évidence dans le passé avec des complexes de type $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ et $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.²⁰ Leur photoexcitation a entraîné une coupure d'un polynucléotide, et cela malgré la faible affinité affichée par le complexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ pour l'ADN.²¹ Ce phénomène a été attribué à un mécanisme d'oxydation de type II mettant en jeu l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), formé en présence d'oxygène. Plus récemment, certains complexes possédant au moins deux ligands π -déficients, de type TAP ou HAT, ont montré d'importantes propriétés photooxydantes. L'illumination de tels complexes en présence d'ADN a mis en évidence un transfert direct d'électron photoinduit à partir de l'une des bases de l'ADN vers l'un des ligands du complexe à l'état électronique excité. Ce processus est possible grâce à la réaction du ligand fortement déficient en électrons π avec la base la plus réductrice de l'ADN, la guanine ; et il se fait suivant un mécanisme d'oxydation de type I.

¹⁹ (a) Lincoln, P.; Broo, B.; Norden, B. Diastereomeric DNA-binding geometries of intercalated ruthenium(II)trischelates probed by linear dichroism : $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{bdppz}]^{2+}$. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2644-2653. (b) Holmlin, R. E.; Stemp, E. D. A.; Barton, J. K. $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ luminescence : dependence on DNA sequences and groove-binding agents. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 29-34.

²⁰ (a) Tossi, A. B.; Kelly, J. M. A study of some polypyridyl ruthenium(II) complexes as DNA binders and photocleavage reagents. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 545-556. (b) Pyle, A. M.; Chiang, M. Y.; Barton, J. K. Synthesis and characterization of physical, electronic, and photochemical aspects of 9,10-phenanthrenequinone diimine complexes of Ru(II) and Rh(III). *Inorg. Chem.* **1990**, *29* 4487-4495. (c) Chow, C. S.; Barton, J. K. Shape-selective cleavage of tRNA^{Phe} by transition-metal complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2839-2841.

²¹ Kelly, J. M.; Tossi, A. B.; McConnell, D. J., OhUigin, C. A study of the interactions of some polypyridyl Ru(II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 6017-6034.

Des travaux antérieurs d'illumination visible du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$ en présence de guanosine-5'-monophosphate ont confirmé ce transfert d'électron photoinduit depuis la guanine.²² L'adduit résultant de la combinaison du complexe réduit et du radical cation a ensuite été caractérisé par RMN. Il présente un lien covalent formé entre la fonction amine exocyclique de la guanine et le carbone en position 2 du ligand TAP.²³

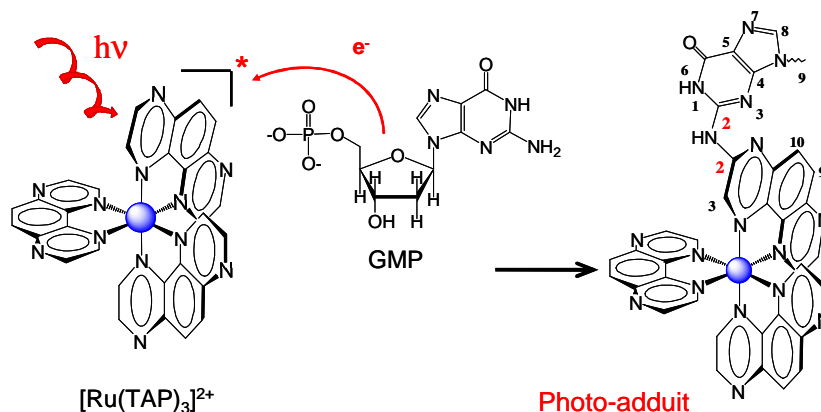


Figure 13 : Formation du photoproduit entre le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$ et la guanosine-5'-monophosphate.

Des études plus récentes réalisées avec un complexe de type $[\text{Ru}(\text{HAT})_2\text{phen}]^{2+}$ ont également mis en évidence la formation d'un tel photoadduit entre la guanine et le ligand HAT.²⁴

Ces complexes ont ensuite montré leur potentiel thérapeutique en perturbant le fonctionnement de l'activité enzymatique de l'ARN polymérase *in vivo* lors de l'illumination.²⁵ Ces propriétés rendent les complexes de ruthénium très attractifs pour le développement de nouvelles drogues ciblant l'ADN.

5 - Utilisation des oligonucléotides en tant qu'outils thérapeutiques (stratégie antisens)

²² Feeney, M. M.; Kelly, J. M.; Tossi, A. B. Photoaddition of ruthenium(II)-tris-1, 4, 5, 8-tetraazaphenanthrene to DNA and mononucleotides. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* **1994**, 23, 69-78.

²³ Jacquet, L.; Kelly, J. M., Kirsch De-Mesmaeker, A. Photoadduct between Tris(1, 4, 5, 8-tetraazaphenanthrene)ruthenium(II) and guanosine monophosphate. A model for a new mode of covalent binding of metal complexes to DNA. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 913-914.

²⁴ Blasius, R.; Nierengarten, H; Luhmer, M.; Constant, J.-F.; Defrancq, E.; Dumy, P. ; Van Dorsselaer, A.; Moucheron, M.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Photoreaction of $[\text{Ru}(\text{hat})_2\text{phen}]^{2+}$ with guanosine-5'-monophosphate and DNA: Formation of new types of photoadducts. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 1507-1517.

²⁵ Pauly, M.; Kayser, I.; Schmitz, M.; Dicato, M.; Del Guerzo, A.; Kolber, I.; Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A. *In vitro* inhibition of gene transcription by novel photo-activated polyazaaromatic ruthenium(II) complexes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **2002**, 1086-1087.

Les différents supports de l'information génétique, l'ADN et l'ARN, constituent des cibles attractives pour l'étude de la fonction des gènes, et également pour la mise au point de médicaments. Ainsi, de nombreux agents chimiothérapeutiques naturels ou synthétiques, peuvent être utilisés pour induire un blocage lors du transfert du message génétique de l'ADN à la protéine. L'inconvénient majeur de cette approche est la faible sélectivité montrée pour la cible. De ce fait de nouvelles approches ont émergé, visant une séquence unique d'acide nucléique des cellules cibles. Ces stratégies consistent à utiliser des petits fragments d'acides nucléiques synthétiques : les oligonucléotides. Ils peuvent notamment inhiber l'expression des gènes au niveau de l'ARN dans une stratégie antisens. Un oligonucléotide antisens (AS-ODN) correspond à un analogue simple brin de désoxyribonucléotide complémentaire d'un ARN messager. Il s'apparie spécifiquement à sa cible suivant le modèle de Watson et Crick pour former un hétéroduplex oligonucléotide-ARNm. Cette structure bloque le processus ultérieur de synthèse des protéines de différentes façons suivant la nature chimique de l'AS-ODN et l'emplacement du duplex sur le brin transcrit d'ARNm.

Les AS-ODNs se répartissent en deux catégories suivant leur mode d'action (*figure 14*).

- Les "steric-blocker oligonucléotides" qui induisent un blocage physique du processus de synthèse protéique.²⁶ L'assemblage oligonucléotide-ARNm peut empêcher la maturation des ARN messager en destabilisant l'ARN pré-messager dans le noyau, ou en bloquant ultérieurement son épissage. La régulation peut également avoir lieu au cours de la partie cytoplasmique du processus en interférant avec la machinerie ribosomale. Dans ce cas, les AS-ODNs s'avèrent efficaces uniquement s'ils ciblent l'extrémité 5' de l'ARNm, ou le codon d'initiation de la traduction. Malgré ces restrictions de positionnement, ce dernier procédé est avantageux par rapport aux précédents car il ne nécessite pas le franchissement problématique de la barrière nucléaire.

- Les "RNase H-dépendant oligonucleotides" qui déclenchent une dégradation enzymatique de l'ARNm.²⁷ Les hétéroduplex sont spécifiquement reconnus par la ribonucléase H (RNase H) qui va exclusivement fragmenter le brin ARNm du duplex.

Dans les deux cas, le but est atteint en empêchant la synthèse de la protéine codée par l'ARNm ciblé. La plupart des oligonucléotides engagés en essais cliniques agissent suivant le procédé enzymatique de la RNase H.²⁸ Ce mode d'action est plus attrayant car les AS-ODNs peuvent déclencher la dégradation de l'ARNm à partir de plusieurs sites accessibles du brin codant. L'avantage de ce processus réside également dans la nature catalytique de la coupure ; l'oligonucléotide "antisens" peut

²⁶ Wu H.; Lima WF.; Zhang H.; Fan A.; Sun H.; Crooke ST. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 17, 181–9.

²⁷ Kurreck J. Antisense technologies. improvement through novel chemical modification. *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 1628–44.

²⁸ Winqvist, E.; Knox J.; Ayoub, J.-P.; Wood, L.; Wainman, N.; Reid, G.; Pearce, L.; Shah, A.; Eisenhauer, E. Phase II trial of DNA methyltransferase 1 inhibition with the antisense oligonucleotide MG98 in patients with metastatic renal carcinoma: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials group investigational new drug study. *Invest New Drugs* **2006**, 24, 159–167.

donc de nouveau être utilisé. Par contre, le mécanisme précis de reconnaissance du duplex par l'enzyme n'est pas complètement déterminé.

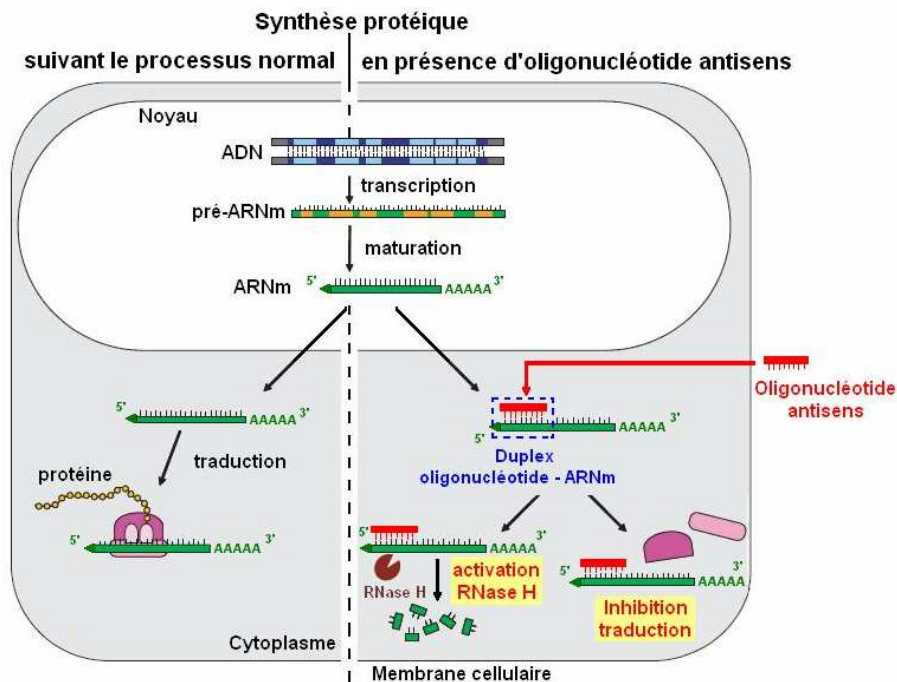


Figure 14 : Principe de la stratégie antisens au niveau cellulaire.

L'AS-ODN doit franchir de nombreuses barrières biologiques pour atteindre sa cible. Il doit passer la membrane plasmique délimitant la cellule, traverser le cytosol en évitant les nucléases. C'est un parcours semé d'embûches. Pour y parvenir il est donc indispensable de disposer de moyens permettant de surmonter ces multiples obstacles, et ce n'est que grâce au développement de tels moyens que de réelles réussites en stratégie antisens verront le jour.

L'oligonucléotide idéal pour cette approche devrait répondre aux critères suivants : (1) une grande spécificité d'interaction pour les acides nucléiques afin d'éviter les interactions non spécifiques avec d'autres constituants de la cellule (les protéines par exemple), (2) une longueur suffisante pour permettre une d'hybridation à une seule séquence complémentaire, (3) une résistance marquée vis-à-vis des nucléases cellulaires qui dégradent les liens phosphodiesters, (4) une complémentarité vis-à-vis de sites de l'ARNm facilement accessibles (boucles, épingles, repliements), (5) une pénétration facilitée à travers la membrane cellulaire (voire éventuellement un ciblage cellulaire). Idéalement, la longueur de l'oligonucléotide doit être comprise entre 15 et 25 nucléotides.²⁹

De nombreuses modifications d'oligonucléotides ont dû être élaborées afin d'améliorer cette stratégie.

²⁹ Ding, Y.; Chan, C. Y.; Lawrence, C. E. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acid. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, W135-W141.

a) Modifications chimiques des oligonucléotides

Cette stratégie est en pratique difficile à mettre en application. En effet, les AS-ODNs sont des oligonucléotides phosphodiester naturels. Leur utilisation a mis en évidence de nombreux inconvénients. Les oligonucléotides classiques sont rapidement dégradés par les nucléases abondamment présentes dans les cellules. Leur utilisation thérapeutique a également été compromise par leur faible pénétration cellulaire.³⁰ Par conséquent, de nombreuses modifications chimiques ont été développées pour favoriser leur potentiel d'action cytotoxique en améliorant leur biostabilité, et leur biodisponibilité.³¹ Elles peuvent concerner aussi bien le squelette phosphodiester, que le désoxyribose, et la base azotée. Les modifications les plus courantes se classent en 3 catégories suivant l'avancée des recherches.³²

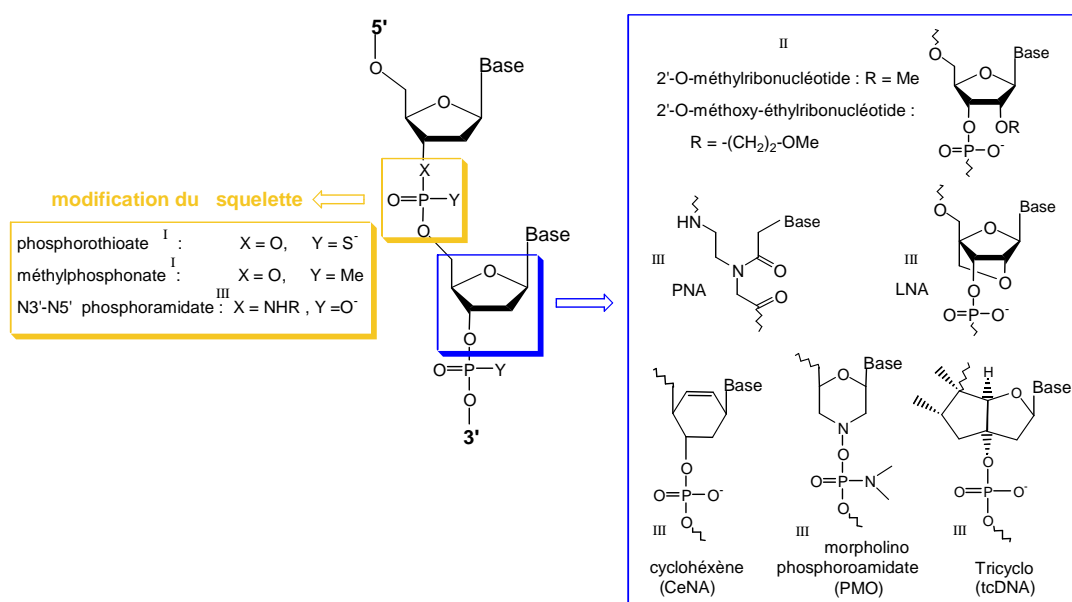


Figure 15 : Modifications réalisées à partir des oligonucléotides naturels afin d'améliorer leurs propriétés antisens (I : première génération d'AS-ODNs modifiés, II : deuxième génération d'AS-ODNs modifiés, III : troisième génération d'AS-ODNs modifiés).

La première génération provient de la modification du lien internucléotide. Elle comprend entre autre les méthylphosphonates, où l'oxygène libre du squelette phosphodiester est remplacé par un groupement méthyle. Cette nouvelle fonction rend les oligonucléotides très hydrophobes, favorisant ainsi le franchissement membranaire. Par contre, ils n'activent plus la RNase H. Une autre alternative consiste à remplacer l'oxygène libre du lien phosphodiester par un soufre. Les phosphorothioates ainsi formés ont permis de diminuer l'hydrolyse enzymatique par les nucléases,

³⁰ Opalinska, J. B.; Gewirtz, A. M. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 503-514.

³¹ Kurreck, J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 1628-1644.

³² Wong, F. W. S.; Lim, S.; Chan, J. H. P. Antisense oligonucleotides : from design to therapeutic application. *Clin. exp. Pharm. Phys.* **2006**, 33, 533-540.

tout en conservant la reconnaissance du duplex par la RNase H, même si leur affinité pour l'ARNm cible est légèrement plus faible que celle obtenue par le lien classique.³³ L'inconvénient majeur des phosphorothioates concerne leur affinité vis-à-vis de certaines protéines, pouvant entraîner des interactions non spécifiques. Néanmoins cette famille d'oligonucléotides s'avère très prometteuse pour la stratégie antisens. D'ailleurs, le premier médicament à être utilisé en thérapeutique a été un phosphorothioate : le fomivirsen. Il est utilisé pour traiter un dommage rétinien dû au cytomégalo virus humain chez des patients atteints du SIDA.

La seconde génération concerne des analogues d'oligonucléotides où un groupe alkyle a été positionné en 2' du désoxyribose. Ils ont permis d'améliorer l'affinité avec la cible ARN, et la résistance à l'hydrolyse enzymatique. Par contre, ils sont peu utilisés car ils forment des duplex non reconnus par la RNase H.

La troisième génération est moins conservatrice, elle concerne généralement une modification totale du cycle furanose. Le type de molécule le plus prometteur correspond aux acides nucléiques peptidiques (PNA). Ces oligomères possèdent un squelette achiral, non chargé, constitué du motif N-(2-aminoéthyl)glycine, sur lequel est fixé la base azotée classique. Ils sont capables de créer des duplex extrêmement stables, et spécifiques, aussi bien avec l'ADN qu'avec l'ARN. Ils bloquent la synthèse protéique uniquement selon un procédé mécanique, car les duplex résultants ne sont pas reconnus par la RNase H. Ils sont également très stables dans les fluides biologiques, en résistant aux nucléases et aux peptidases. D'ailleurs, un type de PNA s'est déjà avéré très efficace pour rendre silencieux un gène *in vitro*.³⁴

b) La conjugaison des oligonucléotides

Ce panel de modifications chimiques a permis de rendre les analogues d'oligonucléotide très stables dans les conditions biologiques, sans altérer pour autant leur capacité d'hybridation. Néanmoins, elles ne permettent pas d'exalter leur spécificité de ciblage. La conjugaison des AS-ODNs à des molécules chimiquement ou biologiquement actives représente une bonne approche pour renforcer leur action antisens, en améliorant notamment leur propriété pharmacocinétique, telle que l'hydrophobicité, la biodistribution ou la pénétration cellulaire.³⁵

A cet effet, différentes approches sont envisageables. Soit il est possible de vectoriser l'acide nucléique d'intérêt jusqu'à sa cible en lui greffant des molécules de transport. Soit l'oligonucléotide

³³ Stein, C. A. Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: questions of specificity, *Biotechnol.* **1996**, *14*, 47-149.

³⁴ Shiraishi, T.; Peter E. Nielsen, P. E. Down-regulation of MDM2 and activation of p53 in human cancer cells by antisense 9-aminoacridine-PNA (peptide nucleic acid) conjugates. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 4893-4902.

³⁵ Da Ros, T.; Spalluto, G.; Prato, M.; Saison-Behmoaras, T.; Bourtoune, A.; Cacciari, B. Oligonucleotide and oligonucleotide conjugates : a new approach for cancer treatment. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 71-88.

est plutôt couplé à une molécule capable de réagir spécifiquement avec la cible, directement ou indirectement à la suite d'une activation. Dans ce cas, le conjugué possède une propriété supplémentaire qui renforce son action antisens, où l'oligonucléotide sert d'agent de ciblage spécifique d'un ARNm et la molécule effectrice finalise l'action antisens. Afin d'exalter la stratégie, il est préférable de combiner les deux effets sur un même oligonucléotide, en lui greffant les deux types de molécules. L'emplacement du ligand peut également participer à améliorer la capacité de l'AS-ODN. La conjugaison aux extrémités de l'oligonucléotide lui offre une protection supplémentaire vis-à-vis des nucléases et phosphatases des milieux biologiques.

Il existe une grande variété de molécules de nature et de réactivité très différentes susceptibles de jouer le rôle de vecteur ou d'effecteur. Une même molécule peut même cumuler les deux propriétés. La diversité de ces conjugués d'oligonucléotides ainsi formés à partir des nombreux composés disponibles offre un grand espoir d'amélioration du potentiel thérapeutique des AS-ODNs.

- Quelques exemples de ligands transporteurs

Les oligonucléotides doivent pénétrer dans la cellule, s'accumuler ensuite spécifiquement à proximité de leur cible, en évitant au maximum de se retrouver piégés et dégradés par les enzymes endosomales. En ce sens, de nombreuses entités lipides, sucres, acides aminés, et peptides ont été greffées aux oligonucléotides. Des ligands lipophiles sont notamment utilisés pour favoriser les interactions hydrophobes avec les membranes (cholestérol, vitamine B6, lipides ...).³⁶ Des ligands glycoprotéiques permettent de cibler spécifiquement un type de récepteur cellulaire (l'asialoglycoprotéine par exemple).³⁷ L'unité sucre seule permet également de reconnaître des récepteurs cellulaires, comme certaines lectines grâce au galactose par exemple.³⁸ Les peptides vecteurs sont généralement polycationiques afin de favoriser l'adhérence du conjugué à la surface cellulaire chargée négativement (les polylysines par exemple).³⁹ De nombreux peptides sont également utilisés pour leur capacité intrinsèque de pénétration cellulaire (la pénétratine, le peptide Tat par exemple), voire même pour leur spécificité de localisation nucléaire dans le cas du peptide NLS.⁴⁰ En plus d'améliorer le franchissement membranaire, ils permettent de cibler précisément un compartiment cellulaire.

³⁶ Letsinger, R. L.; Chaturvedi, S. Tailored hydrophobic cavities in oligonucleotide-steroid conjugates. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 826-830.

³⁷ Maier, M. A.; Yannopoulos, C. G.; Mohamed, N.; Roland, A.; Fritz, H.; Mohan, V.; Just, G.; Manoharan, M. Synthesis of antisense oligonucleotides conjugated to a multivalent carbohydrate cluster for cellular targeting. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 18-29.

³⁸ Matsuura, K.; Akasada, T.; Hibino, M.; Kobayashi, K. Facile synthesis of stable and lectin -recognizable DNA-carbohydrate conjugates via diazo coupling. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 202-211.

³⁹ Tung, C.-H.; Stein, S. Preparation and applications of Peptide-Oligonucleotide Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 605-618.

⁴⁰ Astriab-Fisher, A.; Sergueev, D.; Fisher, M.; Shaw, B. R.; Juliano, R. L. Conjugates of Antisense Oligonucleotides with the Tat and Antennapedia Cell-Penetrating Peptides: Effects on Cellular Uptake, Binding to Target Sequences, and Biologic Actions. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 744-754.

- Quelques exemples de ligands effecteurs

Il existe une grande variété de molécules capables de réagir avec l'ADN. Parmi ces composés, on peut notamment distinguer des agents de coupure dérivés de complexes métalliques, des agents photoactivables, et des agents alkylants.

En couplant des complexes métalliques tels que le Fe-EDTA, une métalloporphyrine, ou le Cu-phénanthroline⁴¹ à un oligonucléotide, il est possible de former des nucléases artificielles qui vont couper l'ADN au niveau d'une séquence spécifique. Le psoralène⁴², la diméthylantraquinone⁴³, la mitomycine C⁴⁴ peuvent être également conjugués en tant qu'agent photoactivable. Ils créent spécifiquement des alkylations de l'ADN, voire même des "crosslinking" inter-caténares, à la suite d'une photoactivation.

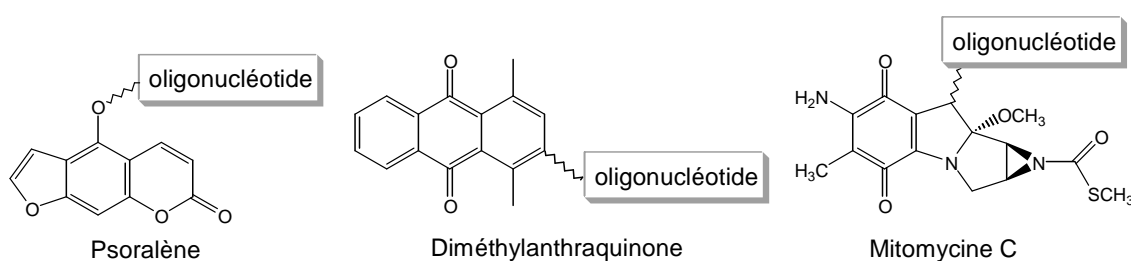


Figure 16 : Quelques exemples d'oligonucléotides couplés à des agents photoactivables.

D'autres agents peuvent induire directement l'alkylation sans nécessiter une étape préliminaire d'activation. Par exemple, le motif cyclopropapyrroloindole issu d'un antibiotique antitumoral (le CC-1065) s'accroche aux adénines de l'ADN. Il permet donc au conjugué de réaliser un pontage inter-caténaire entre le brin sonde accroché à l'effecteur et le brin cible.⁴⁵ Des conjugués ont même été élaborés à partir du dichlorodiamine-platine(II) utilisé habituellement en chimiothérapie. La conjugaison à l'oligonucléotide se fait par une substitution des deux ligands chlores, les deux groupes amines libres lui permettent de faire un pontage covalent avec le brin cible quand le conjugué se trouve sous forme de duplex.⁴⁶ Ce système manque néanmoins d'efficacité, car le complexe peut réagir non spécifiquement avec de nombreux nucléophiles avant d'atteindre sa cible.

⁴¹ Chen, C. B.; Milne, L.; Landgraf, R.; Perrin, D. M.; Sigman, D. S. Artificial nucleases. *ChemBiochem*. **2001**, *2*, 735-740.

⁴² Amosov, O.; Broitman, S. L.; Fresco, J. R. Repairing the Sickle Cell mutation. II. Effect of psoralen linker length on specificity of formation and yield of third strand-directed photoproducts with the mutant target sequence. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 4673-4681.

⁴³ Kang, H.; Steven E. Rokita, S. E. Site-specific and photo-induced alkylation of DNA by a dimethylantraquinone-oligodeoxynucleotide conjugate. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3896-3902.

⁴⁴ Huh, N.; Rege, A. A.; Yoo, B.; Kogan, T. P.; Kohn, H. Design, synthesis, and evaluation of Mitomycin-tethered phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 659-669.

⁴⁵ Lukhtanov, E. A.; Podyminogin, M. A.; Kutuyavin, I. V.; Meyer, R. B.; Gamper, H. B. Rapid and efficient hybridization-triggered crosslinking within a DNA duplex by an oligodeoxyribonucleotide bearing a conjugated cyclopropapyrroloindole. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 683-687.

⁴⁶ Boudvillain, M.; Guérin, M.; Dalbiès, R.; Saison-Behmoaras, T.; Leng, M. Transplatin-modified oligo(2'-O-methyl ribonucleotide)s: A new tool for selective modulation of gene expression. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2925-2931.

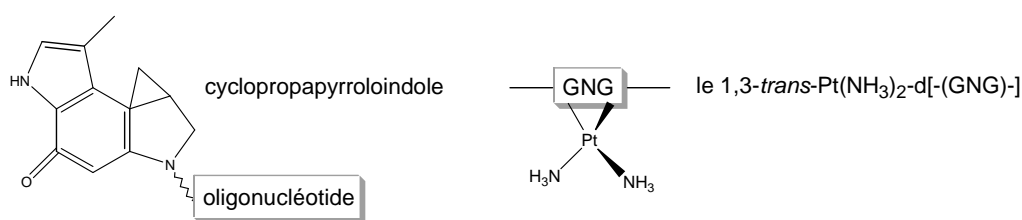


Figure 17 : Quelques exemples d'oligonucléotides couplés à des agents alkylants.

En utilisant cette stratégie, il est possible d'adresser une drogue anti-cancéreuse non spécifique, ou d'induire un dommage à l'acide nucléique, sur le gène sélectionné grâce à l'oligonucléotide conjugué complémentaire. De ce fait, la technologie antisens devient incontournable pour moduler l'expression des gènes. Elle engendre actuellement un important engouement marqué par de nombreuses expériences *in vitro* encourageantes, souvent ponctuées par des essais cliniques.

- un complexe de ruthénium(II) en tant que ligand effecteur

Les complexes de ruthénium induisent généralement un photopontage inter-brin covalent au cœur de la double hélice. Toutefois, la formation du photoadduit n'est pas spécifique d'une séquence particulière du matériel génétique. Il va plutôt photoréagir avec la première guanine rencontrée. Afin de rendre cette réaction spécifique, le laboratoire a réalisé l'ancrage du complexe polyazaaromatique [Ru(TAP)₂dip]²⁺ sur diverses séquences oligonucléotidiques via un lien amide. L'étude photophysique des différents duplex formés a révélé une photoréaction entre le complexe excité et les guanines ciblées. La nature du photoadduit a ensuite été établie, il correspond comme précédemment à une liaison covalente entre un ligand TAP du complexe et la guanine cible. Afin d'étudier la sélectivité de la réaction, l'ancrage du complexe a même été réalisé à différentes positions sur les oligonucléotides (soit au milieu de la séquence en utilisant la position C₅ d'une thymine, soit à ses extrémités 5', et 3'). Plusieurs caractéristiques ont émané de cette investigation. Il y a eu tout d'abord la dépendance de la quantité de luminescence inhibée par les guanines du brin cible à la quantité de photoadduit formé. Le nombre de paires de bases entre le site d'attachement du complexe au brin sonde et la guanine sur le brin cible permettant la formation du photoadduit a ensuite été déterminé (5 paires de bases dans la direction 5' du brin complémentaire, et 4 paires de bases dans la direction 3'). Il s'est également avéré que la photoréaction avait une direction préférentielle vers l'extrémité 3'. De plus, des études *in vitro* ont montré que de tels adduits bloquaient l'activité de l'enzyme exonucléase III qui découpe normalement le polynucléotide.⁴⁷ Il empêche également l'ADN polymérase de poursuivre l'élongation du brin au delà du pontage.⁴⁸

⁴⁷ Lentzen, O.; Constant, J.-F.; Defrancq, E.; Prevost, M.; Schumm, S.; Moucheron, C.; Dumy, P.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Photocrosslinking in Ruthenium-Labelled Duplex Oligonucleotides. *ChemBioChem*. **2003**, *4*, 195 - 202.

⁴⁸ Lentzen, O.; Defrancq, E.; Constant, J.-F.; Schumm, S.; Garcia-Fresnadillo, D.; Moucheron, C.; Dumy, P.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Determination of DNA guanine sites forming photo-adducts with Ru(II)-labelled oligonucleotides; DNA polymerase inhibition by the resulting photo-crosslinking. *J. Biol. Inorg. Chem*. **2004**, *9*, 100-108.

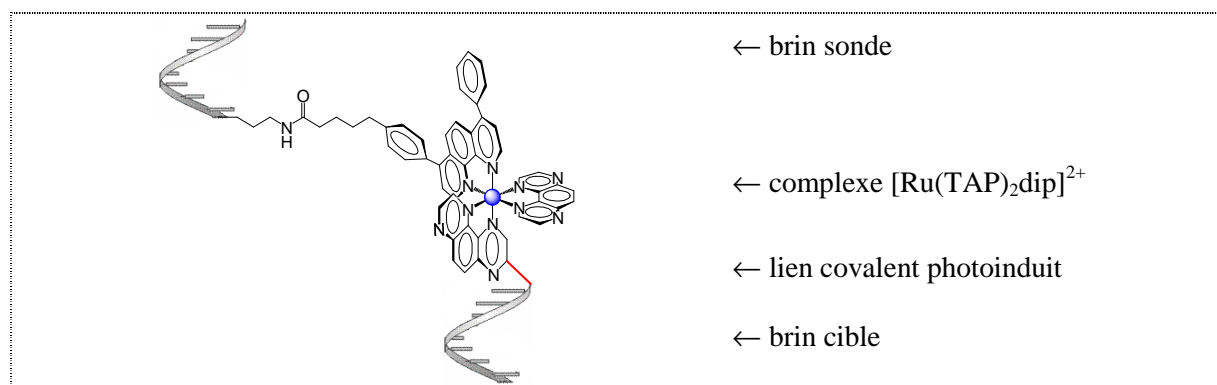


Figure 18 : Représentation du "photocrosslinking" entre le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dip}]^{2+}$ ancré sur le brin sonde via un lien amide et le brin cible contenant des guanines.

Suivant la nature de sa cible, de tels dommages peuvent entraîner le blocage du processus d'expression des gènes, soit au niveau de la transcription, soit de la traduction. Cette étude laisse présager un futur prometteur à de tels complexes de ruthénium(II) comme drogue antitumorale potentielle.

6 - La conjugaison "métal de transition-biomolécules" : état de la question

De nombreuses méthodes ont été développées pour accrocher des molécules sur les oligonucléotides (intercalants, lipides, peptides, sucres, sondes fluorescentes...). Les procédés employés peuvent se diviser en deux grandes classes : la synthèse entièrement réalisée sur support, ou la synthèse par fragment réalisée en solution. La seconde nécessite l'incorporation de fonctions réactives, complémentaires, aux deux partenaires. Dans le cas particulier des complexes métalliques, l'ancrage a été réalisé préférentiellement par la "méthode des fragments". Concernant la conjugaison des peptides aux complexes métalliques, la réaction a été réalisée à notre connaissance principalement sur support.

Nous développerons, dans la suite, quelques méthodologies mises au point pour l'ancrage de complexes métalliques sur les oligonucléotides, et sur les peptides.

6.1 - La conjugaison "métal de transition – oligonucléotide"

a) Méthodes sur support

▣ En 2001, l'équipe de Chattopadhyaya a transformé les complexes de ruthénium(II) en entités directement utilisables dans le protocole de synthèse automatisée des oligonucléotides. Ils ont

tout d'abord formé le phosphoramidite, ce qui permet d'envisager de positionner le complexe aussi bien à l'extrémité 5', que dans la séquence (*figure 19, a*). Ils ont également préparé le support modifié correspondant pour assembler ensuite l'oligonucléotide à partir de la seconde fonction alcool déprotégée (*figure 19, b*).⁴⁹

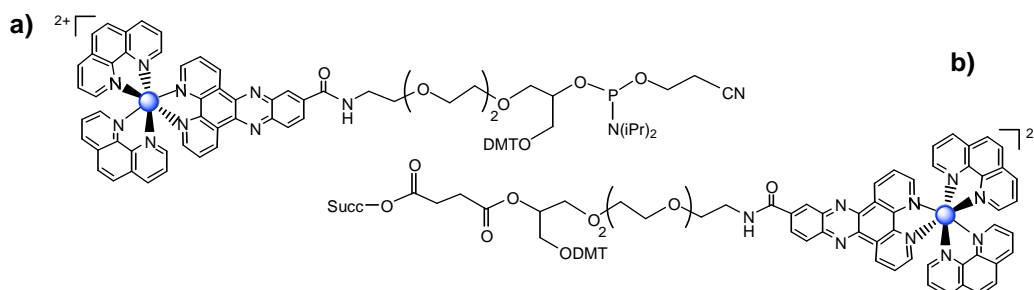


Figure 19 : Préparation de complexes de Ru(II) directement utilisables en synthèse automatisée d'oligonucléotides.

En utilisant cette méthode, le complexe doit toutefois résister aux traitements imposés par la synthèse automatisée des oligonucléotides, notamment une étape d'oxydation, ainsi que des conditions de déprotection fortement basique (NH_4OH).

▢ Une autre approche consiste à réaliser la synthèse d'oligonucléotides conventionnelle, et à faire ensuite le couplage avec l'entité métallique directement sur le support. La plupart des réactions de conjugaison décrites font intervenir un lien amide. En général, un des ligands du complexe métallique possède un groupe ester activé et la fonction amine primaire complémentaire se trouve à l'extrémité de l'oligonucléotide.

Au cours de cette dernière décennie, l'équipe de Barton a développé de nombreux conjugués de type "complexe métallique-oligonucléotide" en utilisant le lien amide. Ces composés ont été élaborés afin d'étudier le processus de photooxydation de l'ADN en présence de différents agents photooxydants, comme le complexe intercalant $[\text{Ru}(\text{phen})\text{dppz}(\text{bpy}')]^{2+}$ par exemple.^{(i),50}

⁴⁹ Ossipov, D.; Pradeepkumar, P. L.; Holmer, M.; Chattopadhyaya, J. Synthesis of $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ -tethered oligo-DNA and studies on the metallointercalation mode into the DNA duplex. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3551-3562.

⁽ⁱ⁾ bpy' : acide 4-butyrique-4'-methyl-2,2'-bipyridine.

⁵⁰ (a) Holmlin, R. E.; Dandliker, P. J.; Barton, J. K. Synthesis of metallointercalator-DNA conjugates on a solid support. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1122-1130. (b) Williams, T. T.; Dohno, C.; Stemp, E. D. A.; Barton, J. K. Effects of the photooxidant on DNA-mediated charge transport. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8148-8158.

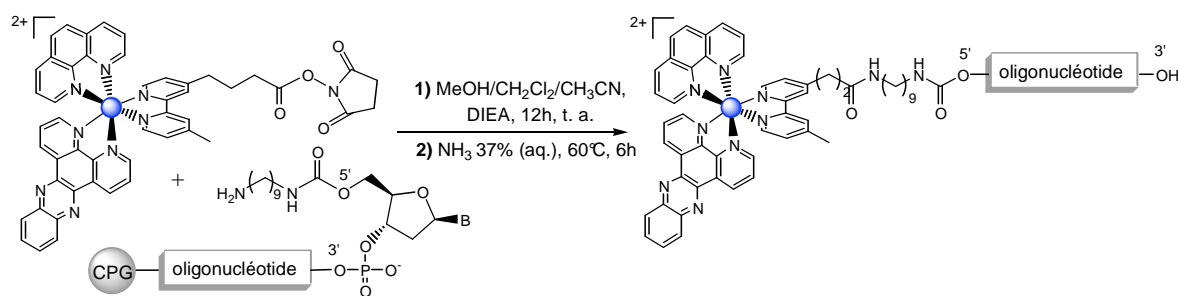


Figure 20 : Synthèse d'un conjugué $[\text{Ru}(\text{phen})\text{dppz}(\text{bpy}')]^{2+}$ -5'-oligonucléotide via un lien amide.

Sur le même principe, l'équipe de Metzler-Nolte a conjugué un complexe de Ru(II) à un acide nucléique peptidique (PNA). Le complexe de Ru(II) est utilisé pour ses propriétés de luminescence afin de faciliter la détection de la biomolécule. Ils ont réalisé le couplage par l'intermédiaire du lien amide avec un rendement de l'ordre de 90% (déterminé à partir du profil CLHP).⁵¹ Le métal ne semble pas modifier les propriétés d'hybridation du PNA avec l'ADN cible.

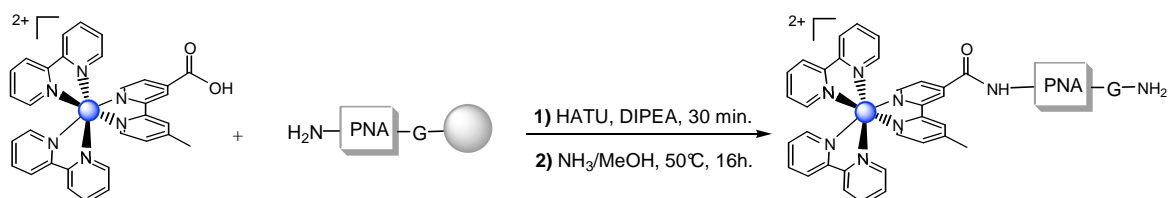


Figure 21 : Conjugaison d'un complexe de Ru(II) à l'extrémité d'un PNA, via un lien amide.

Ces procédés imposent au complexe métallique l'ultime étape de la synthèse automatisée des oligonucléotides. Le complexe devra donc subir le traitement ammoniacal à chaud nécessaire pour décrocher et déprotéger l'oligonucléotide.

b) Méthodes en solution

La méthode en solution (aussi appelée "méthode par fragment") consiste à préparer l'oligonucléotide sur le support en intégrant une fonction réactive à l'une de ses extrémités ou dans la séquence. Après déprotection, et purification, l'oligonucléotide est couplé en solution avec le complexe métallique porteur de la fonction réactive complémentaire.

☐ Généralement, le complexe métallique est introduit sur l'oligonucléotide via le lien amide. Ce lien provient également du couplage chimique de l'amine primaire incorporée à l'oligonucléotide, avec l'ester activé intégré au complexe métallique. Cette méthode offre une approche douce pour la synthèse des conjugués, cependant, le couplage manque d'efficacité. En effet, les conjugués sont obtenus en quantité relativement faible par rapport à l'excès de réactif utilisé.

⁵¹ Verheijen, J. C.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Metzler-Nolte, N. Transition metal derivatives of Peptide Nucleic Acid (PNA) oligomers-synthesis, characterization, and DNA binding. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 741-743.

En 2002, l'équipe de Kelly a greffé un oligonucléotide 17-mère à deux types de complexes de ruthénium : $[\text{Ru}(\text{Phen})_2\text{bipy}'\text{-COOH}]^{2+}$, et $[\text{Ru}(\text{Phen})_2\text{Phen-COOH}]^{2+}$.⁽ⁱ⁾ L'illumination des conjugués en présence de l'oligonucléotide cible a mis en évidence la formation d'un dommage photoinduit au niveau d'une guanine à proximité du complexe métallique.⁵²

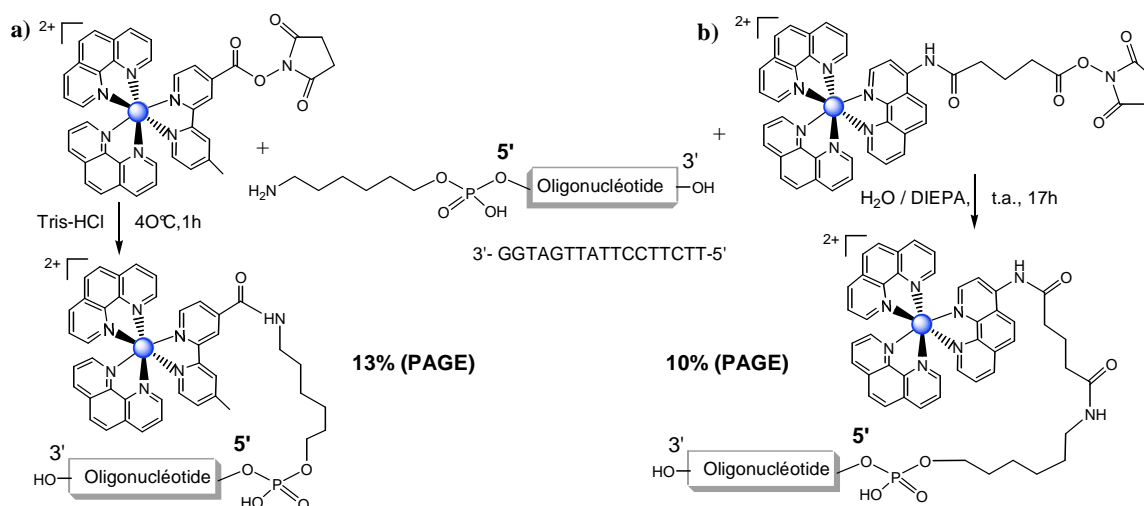


Figure 22 : Conjugaison de complexes de Ru(II) à un oligonucléotide via un lien amide en solution.

En 1999, le laboratoire a également utilisé le lien amide pour ancrer le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dip}]^{2+}$ à différentes séquences d'oligonucléotides. La fonction acide est incorporée au complexe métallique, et la fonction amine complémentaire est portée par un nucléotide modifié. Le couplage s'avère peu efficace malgré la formation de l'ester activé du succinimide à partir de la fonction acide. Le rendement est de seulement 20% après purification sur gel d'électrophorèse, en utilisant un fort excès de complexe de ruthénium(II) (20 éq.).⁵³

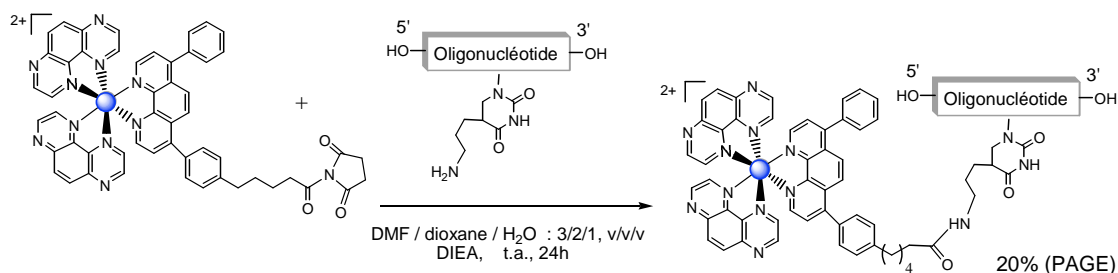


Figure 23 : Conjugaison d'un complexe de Ru(II) à un oligonucléotide via un lien amide en solution développée au laboratoire.

⁽ⁱ⁾ bipy' : acide 4-carboxylique-4'-methyl-2,2'-bipyridine.

⁵² Crean, C. W.; Kavanagh, Y. T.; O'Keeffe, C. M.; Lawler, M. P.; Stevenson, C. R.; Davies, J. H.; Boyle, P. H.; Kelly, J. M. Targeting of photooxidative damage on single-stranded DNA representing the *bcr-abl* chimeric gene using oligonucleotideconjugates containing $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ -like photosensitiser groups. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 1024–1033.

⁵³ Ortmans, I.; Content, S.; Boutonnet, N.; Kirsch De-Mesmaeker, A.; Bannwarth, W.; Constant, J.-F.; Defrancq, E.; Lhomme, J. Ru-labeled oligonucleotides for photoinduced reactions on targeted DNA guanines. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2712–2720.

En 2001, l'équipe de Bourtine a utilisé deux autres approches pour accrocher un complexe de ruthénium(II) à l'extrémité 5' d'oligonucléotides 16-mère : un lien thioéther et un lien phosphoramidate.⁵⁴

Le conjugué montre une amélioration significative de l'affinité de l'oligonucléotide pour l'ADN. Cet effet est dû au ligand du complexe de ruthénium qui stabilise la structure en s'intercalant entre les paires de bases. De plus, ces conjugués entraînent une exaltation de la fluorescence⁽ⁱ⁾ quand ils sont intercalés dans la double hélice, cette propriété permet notamment de suivre la cinétique d'assemblage de telles structures.⁵⁵

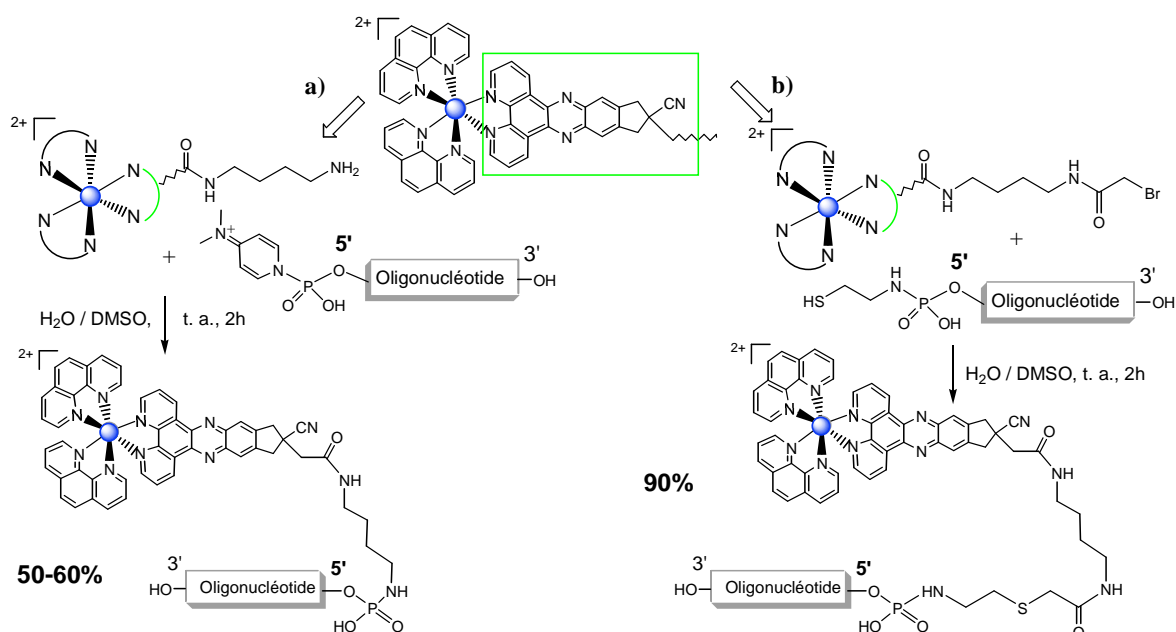


Figure 23 : Conjugaison d'un complexe de Ru(II) à l'extrémité 5' d'oligonucléotides via un lien phosphoramidate (a), ou un lien thioéther (b).

Une méthode enzymatique peut également être utilisée pour incorporer directement le complexe métallique dans la séquence oligonucléotidique. Elle nécessite d'intégrer le complexe à un nucléotide triphosphate afin que l'ADN polymérase le reconnaisse comme substrat. En 2002, l'équipe de Tor a développé un système électrochimiquement actif à partir d'un nucléoside. Pour cela, ils ont ancré un complexe métallique de ruthénium(II) ou d'osmium(II), sur une base azotée pyrimidine par l'intermédiaire d'un lien amide.⁵⁶

⁵⁴ (a) Grimm, G. N.; Alexandre S. Bourtine, A. S.; Lincoln, P.; Helene, C. Design and simple routes of synthesis of oligonucleotide conjugates for studies of DNA triple helix formation. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Ac.* **2001**, *20*, 909–914. (b) Grimm, G. N.; Alexandre S. Bourtine, A. S.; Lincoln, P.; Norden, B.; Helene, C. Formation of DNA triple helices by an oligonucleotide conjugated to a fluorescent Ruthenium complex. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 324–331.

⁽ⁱ⁾ "light-switch phenomenon" caractéristique des complexes de ruthénium(II) comportant un ligand dppz : dipyrido[3,2-a :2', 3'-c]phénazine.

⁵⁵ Olson, E. J. C.; Hu, H.; HoIrmann, A.; Jonkman, A. M.; Arkin, M. R.; Stemp, E. A. D.; Barton, J. K.; Barbara, P. F. First observation of the key intermediate in the "Light-Switch" mechanism of $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11458–11467.

⁵⁶ Weizman, H.; Tor, Y. Redox-active metal-containing nucleotides: synthesis, tunability, and enzymatic incorporation into DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1568–1569.

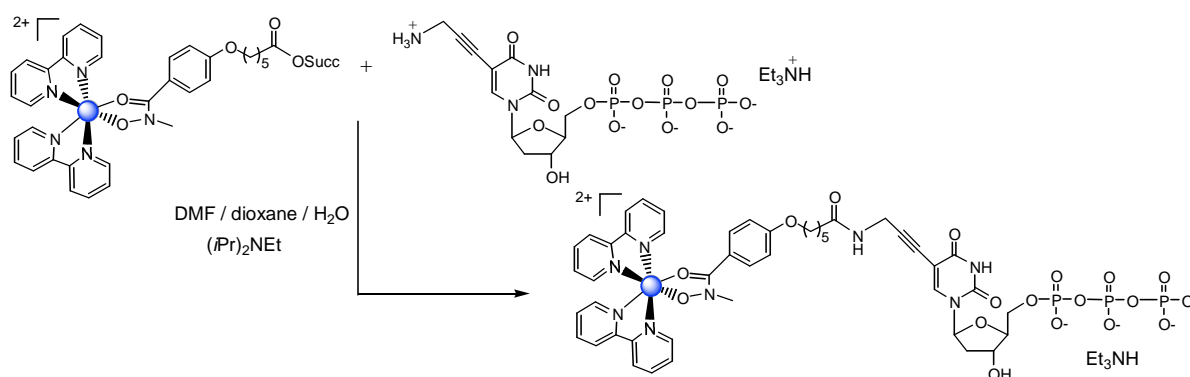


Figure 24 : Insertion du complexe de Ru(II) sur une base azotée dérivant de la thymine pour la synthèse par voie enzymatique.

Cette méthode est fortement limitée par la haute spécificité des enzymes, qui peuvent avoir des difficultés à reconnaître le nucléotide modifié.

6.2 - La conjugaison "métal de transition – peptide"

De nombreux conjugués "métal de transition – peptide" ont été développés, le peptide étant le vecteur et le métal l'effecteur (intercalant, photooxydant, sonde fluorescente...). Les peptides conjugués sont principalement utilisés pour leurs propriétés intrinsèques de reconnaissance de sites particuliers de la double hélice d'ADN. En plus de cibler une séquence particulière, ils permettent de vectoriser le complexe métallique jusqu'à l'ADN ciblé. Malgré leur spécificité, ils ne sont pas toujours capables individuellement de se lier fortement à l'ADN. En effet, ces peptides isolés sont privés des interactions non spécifiques apportées par la protéine d'origine, indispensables pour consolider le lien avec l'ADN.⁵⁷ Des conjugués "métaux de transition-peptides" ont été envisagés pour compenser cette absence, où les propriétés spécifiques des complexes métalliques vis-à-vis de l'ADN vont supplanter celles apportées naturellement par la partie protéique. Ces entités cationiques s'associent facilement avec le squelette anionique de l'ADN. Cette interaction est ensuite scellée par une variété de forces intermoléculaires, telles que les forces de Van der Waals, les interactions hydrophobes, et les liaisons hydrogènes.

A l'instar des conjugués "complexe métallique-oligonucléotide", le couplage du peptide avec le complexe métallique peut également être envisagé selon les deux méthodologies classiques, soit sur support solide, soit en solution.

⁵⁷ Morii, T.; Simomura, M.; Morimoto, S.; Saito, J. Sequence-specific DNA binding by a geometrically constrained peptide dimer. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1150–1151.

a) Méthodes sur support

□ Dans ce cas, le procédé de synthèse totalement supporté est largement utilisé par rapport à celui en solution. La majorité des conjugués sont assemblés par un lien amide, le peptide étant le porteur de la fonction amine libre, et le complexe métallique celui de l'ester activé complémentaire.

Le premier conjugué ainsi formé, a été réalisé par l'équipe de Peek en 1991.⁵⁸ Il consistait à ancrer l'extrémité *N*-terminale d'un peptide à un complexe de ruthénium $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ sur l'un de ses ligands bipyridine.

En 2005, l'équipe d'Hadjiadiadis s'est directement inspirée des travaux de Peek pour réaliser deux conjugués diastéréoisomères de "ruthénium-peptide".⁵⁹ Le lien amide permet de préparer les conjugués avec un rendement approximatif de 30%. Ces deux composés montrent ensuite une très bonne affinité pour l'ADN. Cette association s'avère totalement gouvernée par les interactions hydrophobes et électrostatiques du complexe métallique avec la double hélice. Le peptide seul possède une conformation trop flexible pour s'associer efficacement à l'ADN.

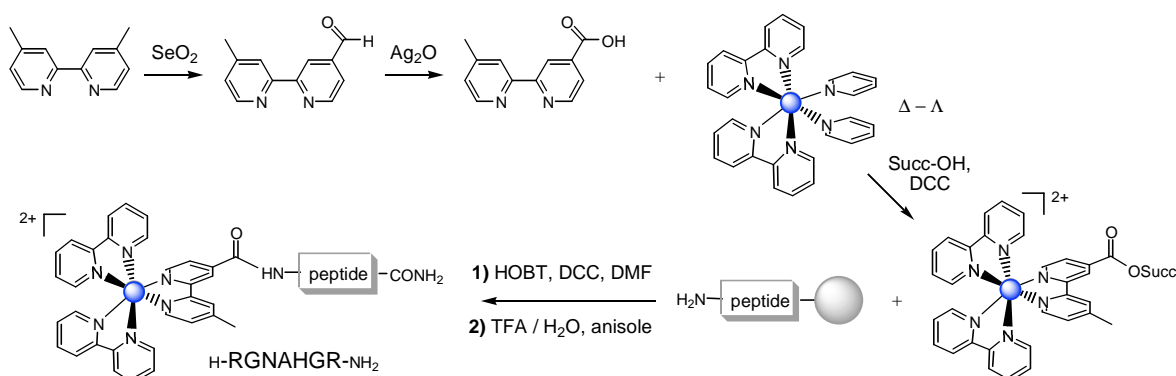


Figure 25 : Ancrage supporté d'un complexe de Ru(II) à l'extrémité *N*-terminale d'un peptide.

Cette méthode est restreinte dans le cas des peptides. Elle proscrie tous les acides aminés porteurs d'une fonction nucléophile, thiol ou amine, qui entraîneraient des conjugaisons non spécifiques (lysine, arginine, cystéine...). La solution consiste à coupler le peptide totalement protégé, mais dans ce cas le complexe métallique sera soumis aux conditions drastiques de déprotection du peptide (TFA 95% par exemple...). Il est d'ailleurs totalement incompatible avec les conditions réductrices requises pour éliminer le groupement protecteur allyloxycarbonyl (Alloc).

⁵⁸ Peek, B. M.; Ross, G. T.; Edwards, S. W.; Meyer, G. J.; Meyer, T. J.; Erickson, B. W. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 38, 114–123.

⁵⁹ Myari, A.; Hadjiadiadis, N.; Garoufis, A. Synthesis and characterization of the diastereomers Λ - and Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-bpy-L-Arg-Gly-L-Asn-L-Ala-L-His-L-Glu-L-Arg})]\text{Cl}_2$. ^1H NMR studies on their interactions with the deoxynucleotide duplex $d[(5'-\text{GCGCTTAAGCGC-3}')_2]$ and $d[(5'-\text{CGCGATCGCG-3}')_2]$. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 616–626.

D'autres complexes métalliques possédant des propriétés proches de celles du ruthénium ont été ancrés à des peptides, via le lien amide.

L'équipe de Barton a notamment développé différents conjugués "rhodium(III)-peptide" afin d'évaluer leur capacité à se lier à l'ADN. Ils ont concentré leurs travaux sur les complexes portant un ligand phénanthrène diimine (phi) qui représente une excellente entité intercalante de la double hélice d'ADN. L'ensemble des conjugués est assemblé par l'intermédiaire du lien amide à l'extrémité *N*-terminale du peptide.

En 2002, ils ont développé deux types de complexes métalliques synthétiques de rhodium(III), dans le but de réaliser des nucléases artificielles. Le peptide conjugué contient des groupes riches en électrons comme l'acide glutamique (E), l'acide aspartique (D), et l'histidine (H) qui vont permettre de chélater le Zn(II), et ainsi générer l'activité enzymatique. Le Rhodium sert d'agent intercalant de l'ADN, il permet d'augmenter la capacité du peptide à se confiner contre l'ADN, afin de mettre le zinc au contact de l'ADN (*figure 26, a*).⁶⁰

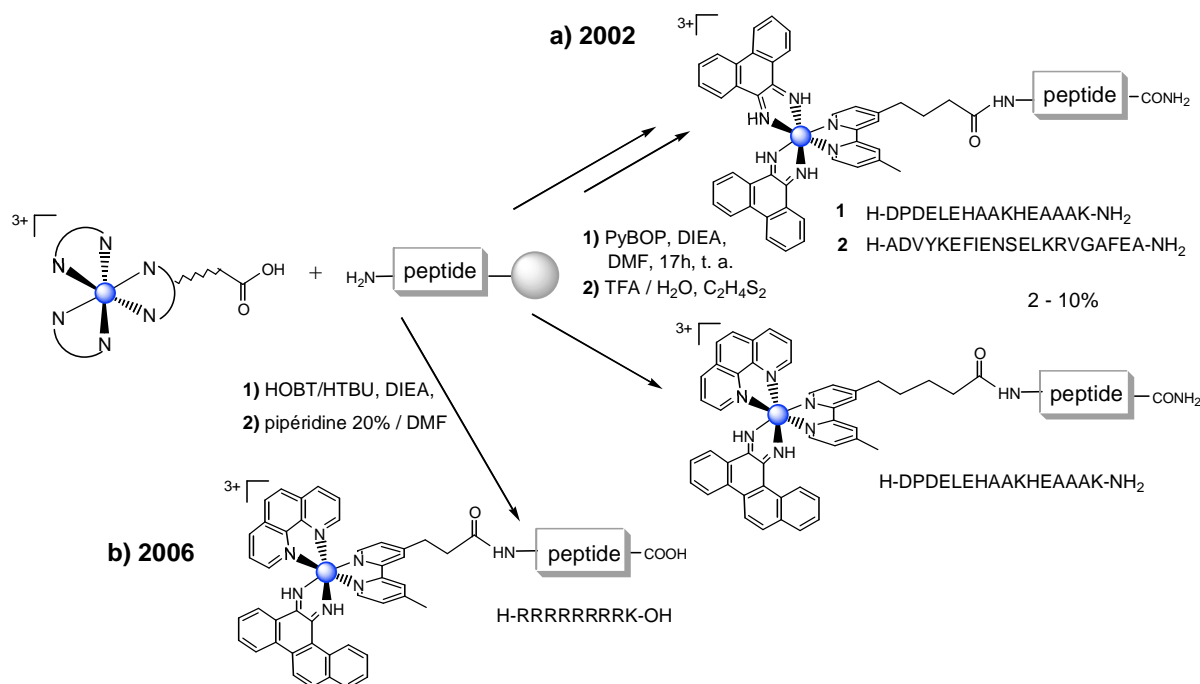


Figure 26 : Synthèse de conjugués "rhodium-peptide"; a) préparation de conjugués analogues de nucléases artificielles en 2002, b) préparation de conjugués de reconnaissance de sites mésappariement de l'ADN en 2006.

Plus récemment, en 2006, ils ont préparé un nouveau type de conjugué "rhodium(III)-peptide" capable de reconnaître spécifiquement des sites mésappariement de l'ADN (*figure 26, b*). En effet, ce complexe contient un ligand aromatique très étendu qui ne peut s'intercaler dans la double hélice

⁶⁰ Copeland, K. D.; Fitzsimons, M. P.; Houser, R. P.; Barton, J. K. DNA hydrolysis and oxidative cleavage by metal-binding peptides tethered to Rhodium intercalators. *Biochemistry* **2002**, *41*, 343-356.

qu'au niveau d'une déformation de l'enchaînement des bases. L'entité métallique est ensuite photoactivée afin de générer une coupure du brin d'ADN au niveau de son intercalation.⁶¹

b) Méthodes en solution

En 2003, l'équipe d'Alfasser a préparé un conjugué "ruthénium-tyrosine" afin de d'étudier le phénomène de photooxydation de l'acide aminé directement accroché au complexe métallique. Le couplage se fait par le lien amide avec seulement 20% de rendement.⁶² Les études photochimiques de ce système ont révélé que la tyrosine entraîne un quenching de luminescence du complexe métallique.

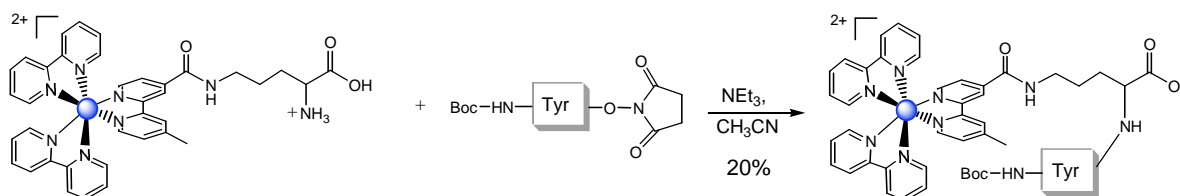


Figure 27 : Conjugaison d'un complexe de Ru(II) à un acide aminé.

En 2001, l'équipe de Haehnel a développé un conjugué "peptide-chlorophylle" en accrochant de façon covalente un pigment chlorophylle à un peptide par un lien éther d'oxime afin de mimer une métalloprotéine.⁶³ Pour cela, ils ont incorporé le groupe aldéhyde au pigment chlorophylle, au préalable démétallé, via une ozonolyse. Ils ont choisi de greffer le groupe oxyamine sur la chaîne latérale d'une lysine. Il ont ensuite ancré le conjugué sur un gabarit contenant déjà trois peptides fixés par un lien maléimide. Le noyau chlorophylle se place au centre de la structure peptidique. Ils ont ensuite étudié l'interaction de divers peptides avec le pigment afin de déterminer un environnement propice au transfert d'électron.

⁶¹ Brunner, J.; Barton, J. K. Site-specific DNA photocleavage by Rhodium intercalators analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6772-6773.

⁶² Geiber, B.; Alfasser, R. A peptide approach to covalently linked [Ru(bipy)₃]²⁺-ferrocene and [Ru(bipy)₃]²⁺-tyrosine conjugates. *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *344*, 102-108.

⁶³ Rau, H. K.; Snigula, H.; Struck, A.; Robert, B.; Scheer, H.; Haehnel, W. Design, synthesis and properties of synthetic chlorophyll proteins. *Eur. J. Biochem.* 2001, *268*, 3284-3295.

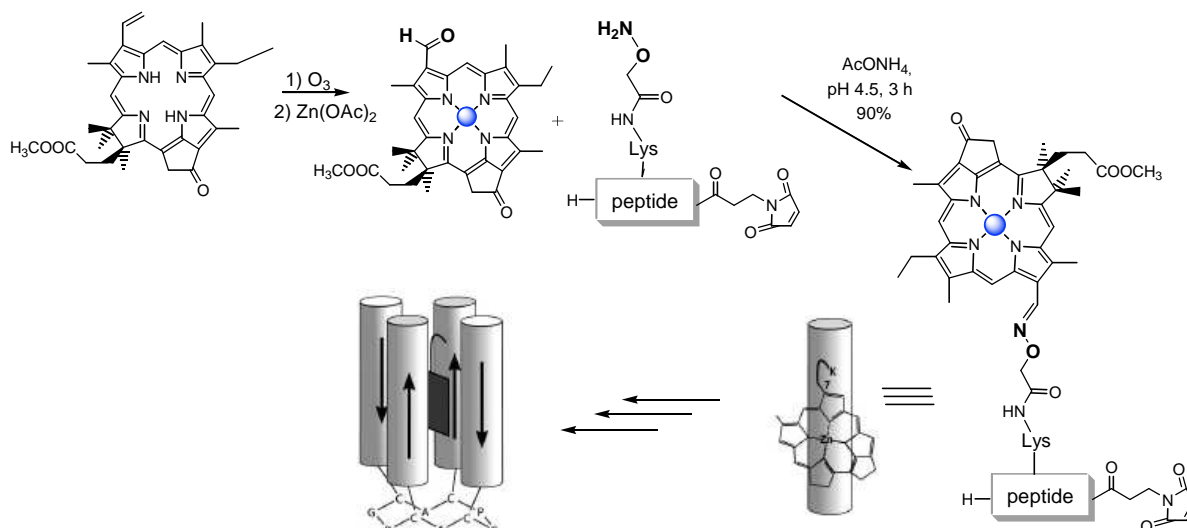


Figure 28 : Préparation d'un mime d'antenne collectrice de lumière en accrochant une chlorophylle métallée via un lien éther d'oxime.

Sur le même principe, ils ont réalisé un autre type de métalloprotéine en incorporant un complexe tris-bipyridine de ruthénium sur un peptide, via un lien chimiosélectif thioéther.⁶⁴

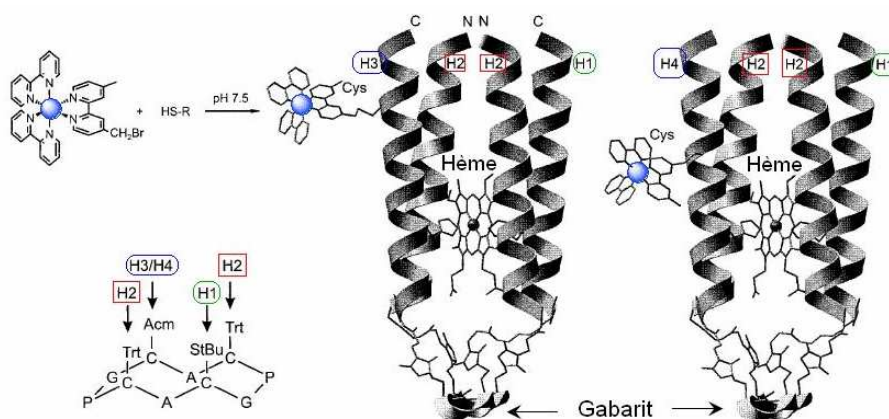


Figure 29 : Préparation d'un mime d'antenne collectrice de lumière en accrochant une chlorophylle métallée via un lien thioéther.

Pour réaliser ce couplage, ils ont dû utiliser un important excès de complexe de ruthénium. De plus, un tel processus de conjugaison suppose que le peptide ne contienne pas d'autre acide aminé cystéine.

En 2004, l'équipe de Lo a préparé un bioconjugué en couplant un complexe d'iridium(III) à une protéine albumine. Pour cela, ils ont intégré une fonction aldéhyde sur un ligand bipyridine du complexe. Ils l'ont ensuite couplé via une amination réductrice, à une fonction amine primaire de la protéine. Ils ont réalisé différents types de conjugués en faisant varier la nature d'un des ligands du centre métallique. Ces conjugués ont ensuite été caractérisés en photophysique et en

⁶⁴ Rau, H. K.; Dejonge, N; Haehnel, W. Modular synthesis of *de novo*-designed metalloproteins for light-induced electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 11526-11531.

photochimie afin de déterminer leur capacité de luminescence en vue de les utiliser comme marqueurs biologiques.⁶⁵

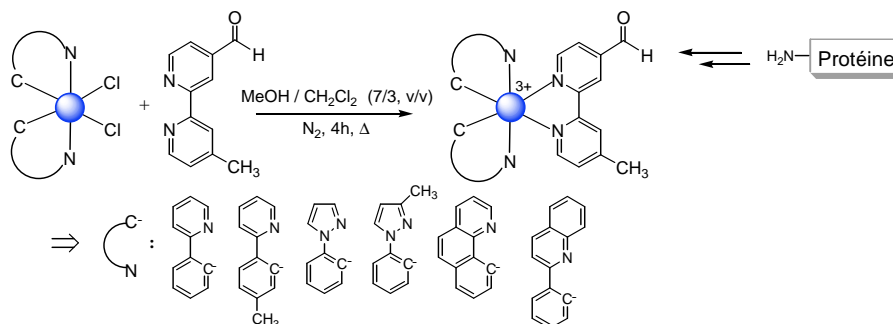


Figure 30 : Synthèse de conjugués "iridium(III)-peptide"

Cette méthode reste marginale à cause de l'étape de réduction que ce type de ligation requiert. Elle semble difficilement compatible avec les complexes métalliques.

⁶⁵ Lo, K. K.-W.; Chan, J. S.-W.; Chung, C.-K.; Tsang, V. W.-H.; Zhu, N. Synthesis, photophysical and electrochemical properties, and biological labelling studies of luminescent cyclometalated iridium(III) bipyridine-aldehyde complexes. *Inorg. Chim. Acta* **2004**, 357, 3109-3118.

Le projet de recherche

1 - L'objectif

Le projet consiste à développer une nouvelle méthode de conjugaison de complexes de ruthénium(II) avec des biomolécules de différentes natures : des oligonucléotides, et des peptides. Idéalement, l'assemblage doit se faire efficacement, et sélectivement entre des fragments non protégés, avec une manipulation chimique minimale, et en adéquation avec les conditions physiologiques. En considérant ces critères, nous avons retenu la liaison éther d'oxime. Couramment employée, cette méthode offre une excellente chimiosélectivité et une flexibilité intéressante. Au laboratoire, elle a notamment contribué au marquage d'ARN, ainsi qu'au dosage de sites abasiques de l'ADN.⁶⁶ D'ailleurs, elle s'est révélée particulièrement efficace en permettant de quantifier 1 site abasique sur 10⁵ nucléosides. Elle a également permis de préparer efficacement des nouveaux bioconjugués à partir d'une unité oligonucléotide rattachée à différents effecteurs, comme des peptides⁶⁷, des sucres⁶⁸... Toutes ces réactions chimiosélectives d'oximation s'effectuent en milieu aqueux, avec de bons rendements, et leur haute sélectivité ne nécessite pas la protection des fonctions secondaires des deux partenaires, ni l'utilisation de réactifs de couplage.

La flexibilité de couplage par le lien éther d'oxime permet d'envisager différentes combinaisons des synthons de conjugaison. Nous avons choisi de greffer la fonction électrophile aldéhyde à l'extrémité des oligonucléotides et des peptides. De ce fait les complexes de ruthénium(II) porteront la fonction nucléophile oxyamine. Cette stratégie se justifie par la forte réactivité de la fonction oxyamine. De nombreuses méthodes triviales sont décrites pour introduire la fonction aldéhyde aux oligonucléotides, alors que l'incorporation du groupe oxyamine reste plus marginale.

⁶⁶ (a) Boturnyn, D.; Constant, J.-F.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Barbin, A.; Wild, C. P. A simple and sensitive method for in vitro quantification of abasics sites in DNA. *Chem. Res. Tox.* **1999**, *12*, 476-482. (b) Trévisiol, E.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Laayoun, A.; Cros, P. Synthesis of nucleoside triphosphates that contain an aminoxy function for "post-amplification labelling". *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 211-217. (c) Trévisiol, E.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Laayoun, A.; Cros, P. Synthesis of methylketone containing nucleoside triphosphates for RNA labelling. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6501-6510.

⁶⁷ (a) Forget, D.; Boturnyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates : chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3976-3984. (b) Singh, Y.; Defrancq, E.; Dumy, P. New method to prepare peptide-oligonucleotide conjugates through glyoxylic oxime formation. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8544-8546. (c) Ghosh, S. Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P.; Bhattacharya, S. Efficient conjugation and characterization of distamycin-based peptides with selected oligonucleotide stretches. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 520-529.

⁶⁸ (a) Forget, D.; Boturnyn, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Highly efficient synthesis of peptide- and carbohydrate-oligonucleotide conjugates using chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1427-1429 (b) Singh, Y.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Preparation of a multitopic glycopeptide-oligonucleotide conjugate. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359-1362.

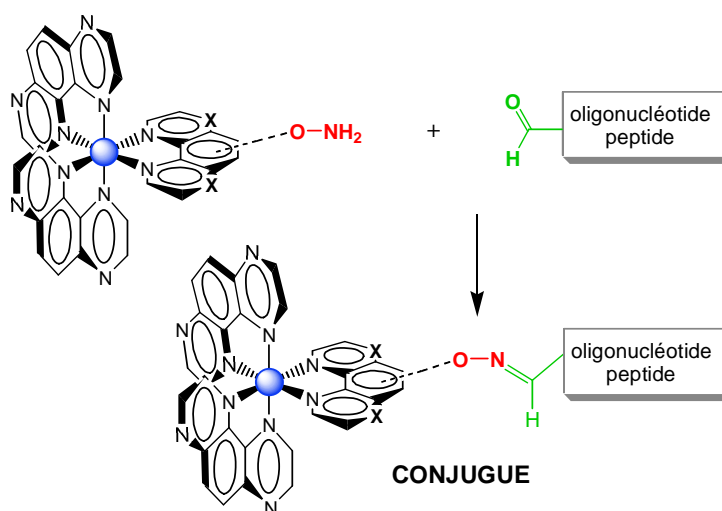


Figure 31 : Stratégie de synthèse des conjugués "complexe de ruthénium(II)-oligonucléotide" et "complexe de ruthénium(II)-peptide".

Notre travail s'est déroulé en deux parties :

La première est consacrée à la mise au point du nouveau système d'ancrage.

La seconde concerne l'étude photochimique des conjugués "complexe de ruthénium(II)-oligonucléotide" préparés.

2 - La nature des conjugués

▣ Afin d'étudier la sélectivité des phénomènes photochimiques, on a fait varier la nature des conjugués "complexe de ruthénium(II)-oligonucléotide" à partir des critères suivant :

- (1) la nature du complexe polyazaaromatique de ruthénium(II).

On utilise deux types de complexes : le $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ et le $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$.

Les deux complexes polyazaaromatiques de ruthénium(II) contiennent deux ligands π -déficients TAP (1,4,5,8-tétraazaphénanthrène). De tels complexes ont déjà affiché une certaine photoréactivité vis-à-vis des acides nucléiques, et plus particulièrement de la guanine. Des expériences antérieures développées dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire et l'équipe de Bruxelles ont permis de caractériser et d'optimiser les conditions de formation d'un tel photoadduit à partir d'un complexe de ruthénium(II) similaire, le $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dip}]^{2+}$.

- (2) la séquence des oligonucléotides.

Les travaux précédents sur différents oligonucléotides dérivatisés par le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dip}]^{2+}$ ont mis en évidence que le transfert d'électron photoinduit entre les guanines du brin cible et le complexe excité dépend principalement du potentiel d'ionisation de ces guanines, ainsi que de la distance les séparant du site d'ancrage du complexe de ruthénium.^{47, 48}

D'après ces données, on a choisi d'utiliser 4 types de séquences : ⁽ⁱ⁾

→ d-(X**TT** **TTT** TTA TTA AAT TTA).

→ d-(X**T****C** **CTT** TTA TTA AAT TTA).

→ d-5'(X**CC** **CTT** TTA TTA AAT TTA)3'.

→ d-5'(X**AA** **AAA** **AAA** TTA AAT TTA)3'.

Les deux premières représentent nos séquences de référence, elles se différencient seulement par deux nucléotides. La première sert de séquences témoin pour les études photochimiques en ne présentant aucune guanine sur le brin cible. Alors que la seconde fait intervenir deux guanines à proximité du complexe de ruthénium, afin d'appliquer les conditions optimales de photoréactivité déterminées précédemment (en terme de potentiel d'ionisation des guanines, et de leur distance par rapport au complexe de ruthénium). La troisième séquence permet de comparer nos travaux avec les résultats précédents, car la photoréactivité de cet oligonucléotide dérivatisé par le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dip}]^{2+}$ a déjà été déterminée auparavant.

- (3) l'extrémité de la conjugaison sur l'oligonucléotide.

Les complexes métalliques seront placés dans un premier temps à l'extrémité 5', et dans un deuxième temps à l'extrémité 3', des 2 séquences de référence. L'intérêt de la fonctionnalisation à l'extrémité 3' réside dans le fait qu'elle rend plus stable les oligonucléotides vis-à-vis des exonucléases qui dégradent ces derniers dans la cellule.

- (4) la nature chimique du bras de liaison entre le complexe et l'oligonucléotide.

L'ancrage à l'extrémité 3' fait intervenir une longueur de chaîne plus courte que celui à l'extrémité 5'.

L'ensemble de ces critères nécessite la préparation de 10 types de conjugués.

Il y a 8 produits issus des séquences de référence, qui se répartissent en deux familles suivant l'extrémité d'ancrage des complexes de ruthénium(II), ensuite divisées en 2 sous-familles suivant la nature du complexe ancré.

- Ancrages à l'extrémité 5' :

$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}$ -5'd-(**TT** **TTT** TTA TTA AAT TTA)3'

$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}$ -5'd-(**TC** **CTT** TTA TTA AAT TTA)3'

$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ -5'd-(**TT** **TTT** TTA TTA AAT TTA)3'

$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ -5'd-(**TC** **CTT** TTA TTA AAT TTA)3'

⁽ⁱ⁾ X : complexe de ruthénium

- Ancrages à l'extrémité 3' :



Les deux autres séquences sont seulement utilisées pour former deux conjugués différents. Ces deux produits sont préparés afin de finaliser certaines propriétés mises en évidence à partir des 8 composés précédents.

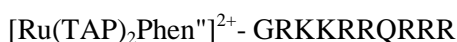
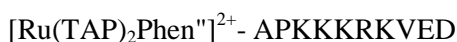


▣ On a fait varier les conjugués "complexe de ruthénium(II)-peptide" à partir d'un seul critère : la nature du peptide. Nous avons décidé d'accrocher deux peptides possédant une bonne affinité pour l'ADN, en plus de leur spécificité de ciblage cellulaire, afin de déterminer par la suite la photoréactivité de ce nouveau type de conjugué.

- Le peptide NLS⁽ⁱⁱ⁾ (APKKKRKVED) est un décapeptide basique qui dérive de l'antigène du *Simian Virus 40* (SV 40). Il contient une séquence signal de localisation nucléaire qui transporte les protéines du cytoplasme vers le noyau cellulaire.⁶⁹

- Le second peptide utilisé est un fragment fortement cationique issu de la protéine Tat. Ce décapeptide (GRKKRRQRRR) correspond à une séquence de translocation membranaire.⁷⁰

On a donc préparé 2 conjugués à partir d'un seul type de complexe de ruthénium(II) : le $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$



3 - La démarche expérimentale

Notre travail s'est tout d'abord déroulé en deux étapes convergentes pour aboutir aux conjugués. La première consiste à élaborer séparément les différents synthons. La seconde concerne

⁽ⁱⁱ⁾ NLS : Nuclear Localisation Sequence.

⁶⁹ Zanta, M. A.; Belguise-Valladier, P.; Behr, J. P.; Gene delivery : a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 91-96.

⁷⁰ Lee, H. J.; Pardridge, W. M.; Pharmacokinetics and delivery of Tat-protein conjugates to tissues in vivo *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 995-999.

l'optimisation des conditions de couplage des partenaires. L'étude se poursuit par la détermination du potentiel photochimique des différents conjugués.

Les résultats sont présentés en 2 parties :

▣ La première est la "partie chimie" de ce travail. Elle concerna la synthèse des 10 conjugués susmentionnés. Elle se divise en 3 chapitres, en débutant par une présentation succincte de la ligation chimiosélective éther d'oxime.

(1) - La préparation des fragments porteurs de la fonction aldéhyde.

Il y a tout d'abord la fonctionnalisation de l'extrémité 5' des oligonucléotides, puis celle en 3', avant de présenter l'incorporation du motif à l'extrémité *N*-terminale des deux peptides.

(2) - La préparation des complexes de ruthénium(II) porteurs de la fonction oxyamine.

Un seul procédé permet de préparer les deux types de complexe. Il consiste à synthétiser séparément les deux ligands porteurs du groupe oxyamine protégé. Les complexes sont ensuite assemblés en incorporant le ligand modifié. La dernière étape correspond à libération de la fonction oxyamine.

(3) - La préparation des conjugués.

Ce chapitre comprend l'assemblage de la totalité des conjugués.

▣ La seconde est la "partie photochimie" de ce travail.

Dans cette partie, différents aspects des conjugués sont abordés. Afin de vérifier la sélectivité de la photoréaction, l'étude des conjugués "complexe de ruthénium(II)-oligonucléotide" est réalisée sous leur forme simple brin et double brin. C'est lors de l'assemblage en duplex qu'apparaissent les deux guanines cibles de la photoréaction. Les critères caractéristiques et distinctifs des différents conjugués sont ensuite évalués en comparant les systèmes suivant : la nature du complexe de ruthénium(II), l'extrémité d'ancrage, et donc le type de lien chimique reliant les deux entités. On réalise également une comparaison avec le précédent système étudié, en intégrant le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dip}]^{2+}$.

Résultats
&
Discussions

- Partie A -

Synthèses chimiques

Chapitre I : Le lien chimiosélectif oxime

Avant de développer les synthèses des différents fragments ensuite assembler, nous rappelons les principaux avantages de la méthode chimiosélective de ligation par le lien éther d'oxime.

Le manque notable de sélectivité des méthodes de conjugaison traditionnelles limite rapidement l'assemblage de macromolécules complexes de hauts poids moléculaires. La ligation chimiosélective devient idéale, et incontournable pour assembler des biomolécules de différentes familles. Elle repose sur l'assemblage convergent de fragments polyfonctionnels déprotégés, de différente nature (peptides, protéines, saccharides, acides nucléiques, polymères...). Il suffit d'intégrer aux deux partenaires des fonctions chimiques présentant une réactivité réciproque unique et spécifique. En générale, l'un des deux synthons porte une fonction nucléophile et l'autre une fonction électrophile complémentaire. La diversité des réactions possibles entraîne différents types de liaisons chimiosélectives. Elles comprennent notamment les liaisons disulfures, thioesters, thioethers, hydrazones, thiazolidines, oxazolidines, amides, et les liaisons éthers d'oxime (figure A.I.1).⁷¹

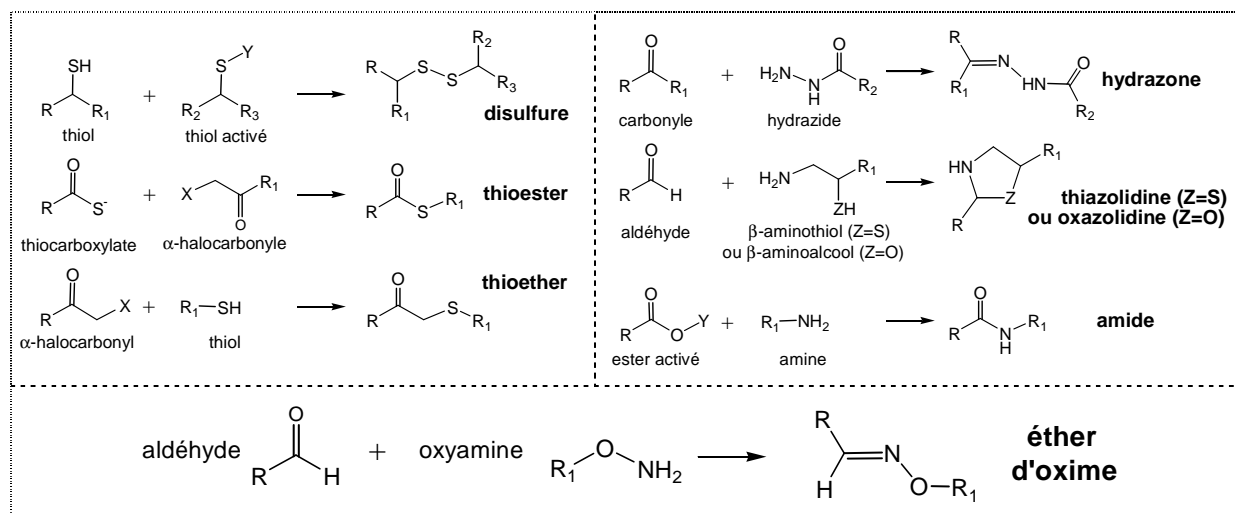


Figure A.I.1 : Différents types de liaisons chimiosélectives (Y = groupe partant, X = halogène)

Parmi toutes ces méthodes, nous avons choisi d'étudier exclusivement la liaison éther d'oxime.

⁷¹ Lemieux, G. A.; Bertozzi, C. R. Chemoselective ligations réactions with proteins, oligosaccharides and cells. *Tibtech*. 1998, 16, 506-513.

Le lien oxime provient de la réaction entre un dérivé carbonyle (fonction électrophile) et un groupe éther d'oxyamine (fonction nucléophile). Nous avons choisi le groupe aldéhyde comme fonctionnalisation électrophile. La réaction se déroule en deux temps.⁷² L'addition nucléophile sur le carbonyle conduit tout d'abord à la formation d'un intermédiaire carbinolamine qui se déshydrate ensuite pour donner l'éther d'oxime. Cette dernière étape est favorisée à pH acide. De manière générale, les études cinétiques ont montré que le pH optimum de la formation de l'éther d'oxime est voisin de 4.

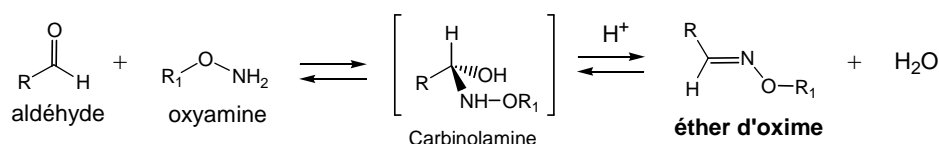


Figure A.I.2 : Mécanisme de formation de la liaison éther d'oxime.

Ce procédé de ligation chimiosélectif a déjà été utilisé efficacement pour accrocher chimiquement de nombreux effecteurs sur des oligonucléotides (peptides, saccharides, polymères...). Elle requiert uniquement l'introduction de l'une des deux fonctions complémentaires sur l'oligonucléotide. Il est préférable de l'insérer sur un site particulier de la séquence n'interférant pas avec son activité spécifique. De nombreuses méthodes sont décrites pour introduire les groupes oxyamine⁷³, et aldéhyde⁽ⁱ⁾, sur différents sites de la séquence oligonucléotidique.⁷⁴

L'étape de conjugaison consécutive a démontré de nombreux avantages très attrayants. Les couplages se font à partir d'oligonucléotides déprotégés, ce qui permet notamment de s'affranchir totalement d'une stratégie délicate de protection. Elle se fait dans des conditions douces, en solution aqueuse tamponnée à un pH légèrement acide. La réactivité des deux fragments permet d'éviter l'utilisation d'un large excès de la molécule à conjuguer. Elle permet aussi de s'affranchir d'une étape de pré-activation comme celle requise pour l'acide carboxylique dans le cas du lien amide. Il est donc plus facile de purifier le produit formé, sans la présence des molécules activatrices. Elle peut être réversible dans des conditions extrêmes d'hydrolyse acide ou basique. En revanche, elle s'est montrée totalement résistante à l'hydrolyse dans un milieu tamponné à pH 4, ou 7, pendant 72 heures à 37°C.⁷⁵

⁷² Jencks, W. P. Studies on the mechanism of oxime and semicarbazone formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 471-481.

⁷³ Defrancq, E.; Lhomme, Use of an aminoxy linker for the functionalization of oligodeoxyribonucleotides. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 931-933.

⁽ⁱ⁾ Les méthodes d'incorporation de la fonction aldéhyde aux extrémités des oligonucléotides sont présentées au chapitre A.II. (en 5' : II.1.1, en 3' : II.1.2).

⁷⁴ Zatsepin, T. S.; Stetsenko, D. A.; Gait, M. J.; Oretskaya, T. S. Use of carbonyl group addition-elimination reactions for synthesis of nucleic acid conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 471-489.

⁷⁵ Forget, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Efficient preparation of carbohydrate-oligonucleotide conjugates (COCs) using oxime bond formation. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7829-7832.

La double liaison résultant de la conjugaison entraîne la préparation de deux stéréoisomères de configuration Z ou E. Les données thermodynamiques ont mis en évidence une plus grande stabilité de la liaison quand elle est de configuration E.⁷⁶

Cette approche chimiosélective est également très populaire en chimie peptidique depuis sa mise en œuvre par l'équipe de Rose en 1994.⁷⁷ De nombreuses méthodes ont été décrites pour introduire les deux groupes exclusifs au sein des séquences peptidiques.⁷⁸ Les avantages évoqués précédemment se retrouvent exactement dans le cas des peptides. Certaines propriétés propres aux peptides ont tout de même fait apparaître quelques particularités supplémentaires, sans altérer pour autant l'efficacité de la méthode.

La fonction nucléophile oxyamine est faiblement basique, elle possède notamment un pK_a plus faible que les autres sites aminés des peptides (ϵ -NH₂ de la lysine, et l'arginine par exemple...). Le groupe aldéhyde pourra réagir exclusivement avec le groupe nucléophile oxyamine, les fonctions nucléophiles intrinsèques des peptides étant protonées dans les conditions opératoires. Les fragments peptidiques utilisés pourront être également totalement déprotégés, favorisant ainsi les réactions de couplage. En effet, le peptide déprotégé est une espèce cationique très soluble dans les solvants aqueux. De plus, l'étape de purification consécutive à la réaction de couplage fournira directement des molécules abouties. La méthodologie généralement retenue pour les peptides apporte un atout supplémentaire en utilisant un peptide carbonylé correspondant à un aldéhyde glyoxylique. En effet, la liaison éther d'oxime glyoxylique résultante est particulièrement stable. D'ailleurs de tels conjugués peptidiques ne sont pas dégradés *in vitro* et *in vivo*.⁷⁹

Les nombreux avantages relatifs à la liaison éther d'oxime nous ont semblé être tout à fait appropriés à la conjugaison des oligonucléotides, ou des peptides, aux complexes de ruthénium. Ce type de molécule cationique est totalement compatible avec de telles conditions de couplage en milieu aqueux.

⁷⁶ Polyakov, V. A.; Nelen, M. I.; Nazarpak-Kandlousy, N.; Ryabov, A. D.; Eliseev, A. V. Imine exchange in O-aryl and O-alkyl oximes as a base reaction for aqueous dynamic combinatorial libraries. A kinetic and thermodynamic study. *J. Phys. Org. Chem.* **1999**, *12*, 357-363.

⁷⁷ Rose, K. Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.

⁷⁸ Tam, J. P.; Xu, J.; Dong Eom, K. Methods and strategies of peptide ligation. *Biopolymers (Peptide Science)* **2001**, *60*, 194-205.

⁷⁹ Nardin, E. H.; Calvo-Calle, J. M.; Oliveira, G. A.; Clavijo, P.; Nussenzweig, R.; Simon, R.; Zeng, W.; Rose, K. *Plasmodium falciparum* polyoximes: highly immunogenic synthetic vaccines constructed by chemoselective ligation of repeat B-cell epitopes and a universal T-cell epitope of CS protein. *Vaccine* **1998**, *16*, 590-600.

~

En résumé, cette technique de conjugaison est très facile à mettre en œuvre. Elle ne requiert pas d'agent de couplage, ni de manipulations chimiques importantes. Il suffit de mélanger l'oligomère aldéhyde avec le fragment oxyamine.

Chapitre II : Préparation des "fragments aldéhydes"

La première partie des travaux de synthèse est consacrée à la préparation des "synthons aldéhydes". Cette fonction inexistante dans la structure naturelle des macromolécules d'intérêt biologique se doit d'être incorporée spécifiquement. Nous avons choisi d'accrocher successivement ce motif à l'extrémité 5' d'oligonucléotides, puis à l'opposé en 3', ainsi qu'à l'extrémité N-terminale de peptides.

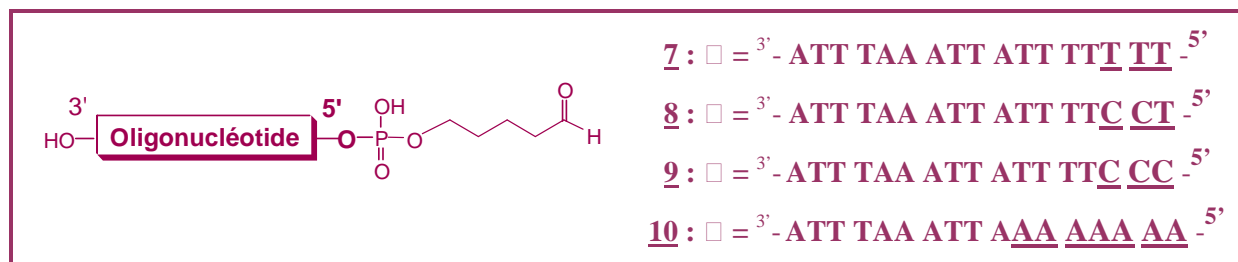
1 - Synthèse des "oligonucléotides aldéhydes"

La synthèse automatisée des oligonucléotides est incompatible avec la présence d'un groupe aldéhyde directement introduit dans la séquence, à cause des conditions réactionnelles qu'elle requiert.⁸⁰ Il est donc indispensable d'incorporer le groupe aldéhydique de façon détournée. L'extrémité 5' est en général privilégiée pour introduire la modification par rapport à son opposée en 3'. Elle permet notamment de soustraire la modification aux conditions conventionnelles d'assemblage automatisé de l'oligonucléotide à partir de l'extrémité 3'. Elle permet également d'optimiser les rendements de synthèse sur support solide en évitant de modifier le support préconisé classiquement.

1.1 - Insertion du motif aldéhyde en 5'

Dans cette première partie, la préparation de 4 oligonucléotides porteurs de la fonction aldéhyde à l'extrémité 5' est décrite.

⁸⁰ Caruthers, M. H.; Barone, A. D.; Beaucage, S. L.; Dodds, D. R.; Fischer, E. F.; McBride, L. J.; Matteucci, M.; Stabinsky, Z.; Tang, J. Y. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. *Methods Enzymol.* **1987**, *154*, 287-313.



Les produits **7**, **8**, **9** et **10** serviront de "synthons aldéhyde" dans les couplages par éther d'oxime avec les complexes de ruthénium (Partie A, Chapitre IV).

~

1. 1. 1. - Rappels bibliographiques

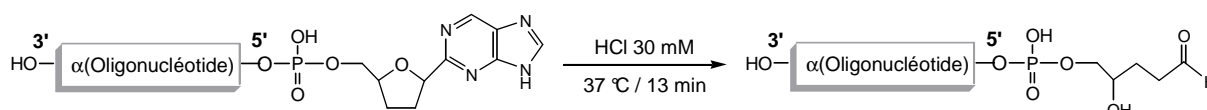
Dans la littérature, deux types de stratégie sont décrits pour introduire un groupe aldéhyde à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide en utilisant la chimie dite aux phosphoramidites en phase solide.

- Une voie implique l'utilisation d'un groupe aldéhyde protégé, qui sera libéré lors de la dernière étape de préparation de l'oligonucléotide modifié.

- L'autre approche consiste à incorporer un précurseur, possédant une fonction aldéhyde masquée, générée lors d'une étape d'oxydation au périodate de sodium. Les précurseurs de choix de l'aldéhyde sont de type 1,2-diols, grâce à leur coupure oxydante en une seule étape, efficace, et rapide, dans un milieu doux pour l'oligonucléotide.

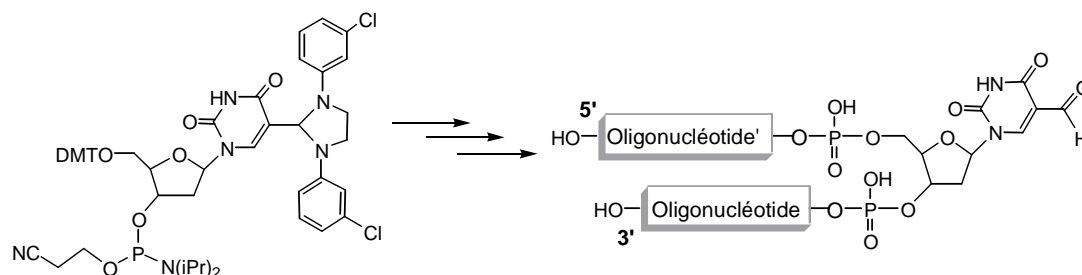
a) Insertion directe d'un groupe aldéhyde protégé

□ En 1991, l'équipe d'Imbach propose un modèle qui induit sélectivement un site abasique aldéhydique. Le précurseur 2',3'-didésoxynébularine est incorporé sous forme de 5'-phosphoramidite à l'extrémité 5' terminale d'un fragment d' α -ADN non naturel. La fonction aldéhyde est sélectivement générée par l'hydrolyse acide du nucléoside.⁸¹

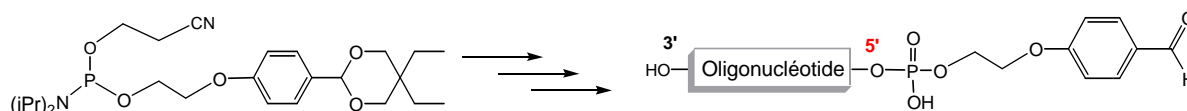


⁸¹ Vasseur, J.-J.; Peoch, D.; Rayner, B.; Imbach, J.-L. Derivatization of oligonucleotides through abasic site formation. *Nucleosides & Nucleotides* **1991**, *10*, 107-117.

En 1993, l'équipe de Matsuda a préparé un précurseur du nucléoside 5-formyl-2'-désoxyuridine. Ce nucléoside généré lors de dommages photoinduits de l'ADN est très instable en milieu basique. La solution a été de masquer l'aldéhyde par un groupe *N, N'*-diphénylimidazolidine qui résiste aux conditions basiques et régénère l'aldéhyde post-synthétiquement par hydrolyse acide.⁸² Ils ont adapté la force des conditions acides d'élimination pour qu'elle s'accorde à la synthèse supportée. En introduisant des chlores sur les cycles aromatiques, le groupe est hydrolysé en une nuit dans l'acide acétique à 80 %.



En 2001, l'équipe de Reed a décrit la première méthode d'introduction directe d'un motif aldéhyde protégé dans une séquence d'oligonucléotide au cours de la synthèse automatisée. Ils ont développé un phosphoramidite intégrant un aldéhyde aromatique protégé sous forme d'acétal.⁸³ Le benzaldéhyde est ensuite facilement libéré en hydrolysant le groupe 1,3-dioxane dans les conditions typiques d'élimination du groupe trytile, employée lors de l'assemblage automatisé des oligonucléotides.

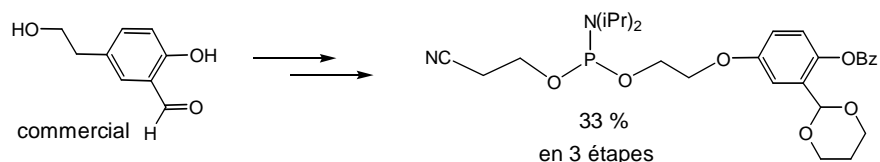


En 2001, l'équipe de Sheppard a également utilisé le groupe protecteur 1,3-dioxane pour masquer le benzaldéhyde incorporé à un phosphoramidite similaire. Ils l'ont ensuite intégré à la préparation d'oligonucléotides salicyl-aldéhydes, en libérant l'aldéhyde en fin de synthèse par une hydrolyse acide.⁸⁴ Ils ont aussi employé le phosphoramidite clé pour fonctionnaliser l'extrémité 3' d'oligonucléotide en assemblant les séquences à partir de l'extrémité 5', et en utilisant des nucléosides commerciaux 5'-phosphoramidites.

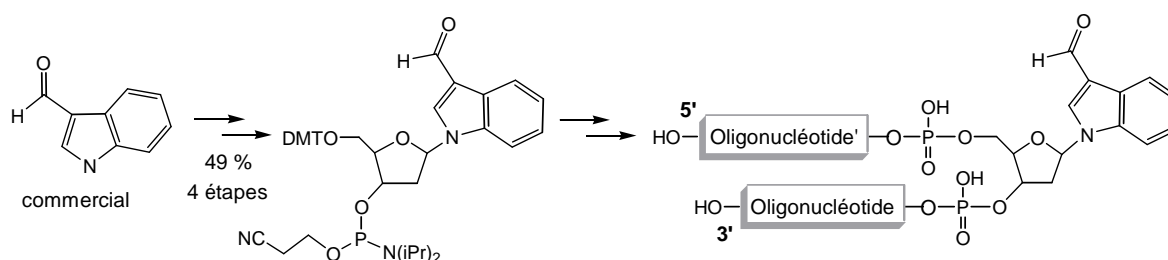
⁸² Ono, A.; Ohtsuka, E.; Nara, H.; Inada, M.; Matsuda, A. Incorporation of a mutagenic nucleoside, 5-formyl-2'-deoxyuridine, into an oligodeoxynucleotide. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2751-2754.

⁸³ Podyminogin, M. A.; Lukhtanov, E. A.; Reed, M. W. Attachment of benzaldehyde modified oligonucleotides probes to semicarbazide coated glass. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 5090-5098.

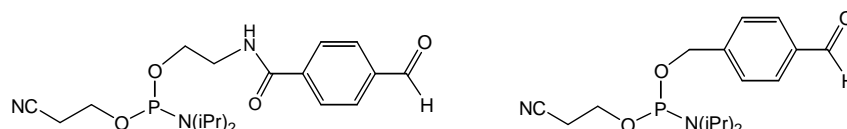
⁸⁴ Czapinski, J. L.; Sheppard, T. L. Nucleic Acid template-directed assembly of metallosalen-DNA conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8618-8619.



En 2002, l'équipe de Saito a intégré un aldéhyde dans une séquence nucléotidique sans aucune protection. Le 3-formylindole est converti en phosphoramidite, puis directement incorporé dans la séquence d'oligonucléotide.⁸⁵ Le protocole classique de synthèse supportée ne dégrade pas l'aldéhyde aromatique.



Sur le même principe, en 2005 l'équipe de Kriedrowski a préparé deux types de phosphoramidites porteurs de groupes benzaldéhydes. Ces aldéhydes aromatiques, non énolisables, peuvent être efficacement incorporés de façon post-synthétique à l'extrémité 5' terminale des oligonucléotides sans être protégés.⁸⁶



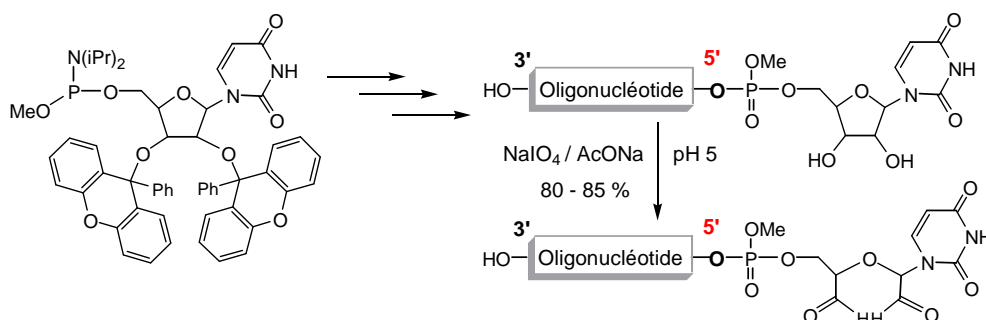
b) Insertion indirecte d'un groupe aldéhyde à partir d'un précurseur

En 1984, l'équipe de Lebleu a obtenu efficacement un motif 2',3'-bisaldéhyde à partir de la coupure oxydante du ribose libre à l'extrémité 3' d'un brin d'ARN, par le périodate de sodium. En 1986, l'équipe d'Agrawal a transposé ce procédé à l'extrémité 5' en transformant le ribonucléoside en phosphoramidite. Afin de pouvoir l'intégrer aisément à la synthèse automatisée de l'oligonucléotide, ils ont dû préparer un monomère d'uridine dont le motif diol est protégé.

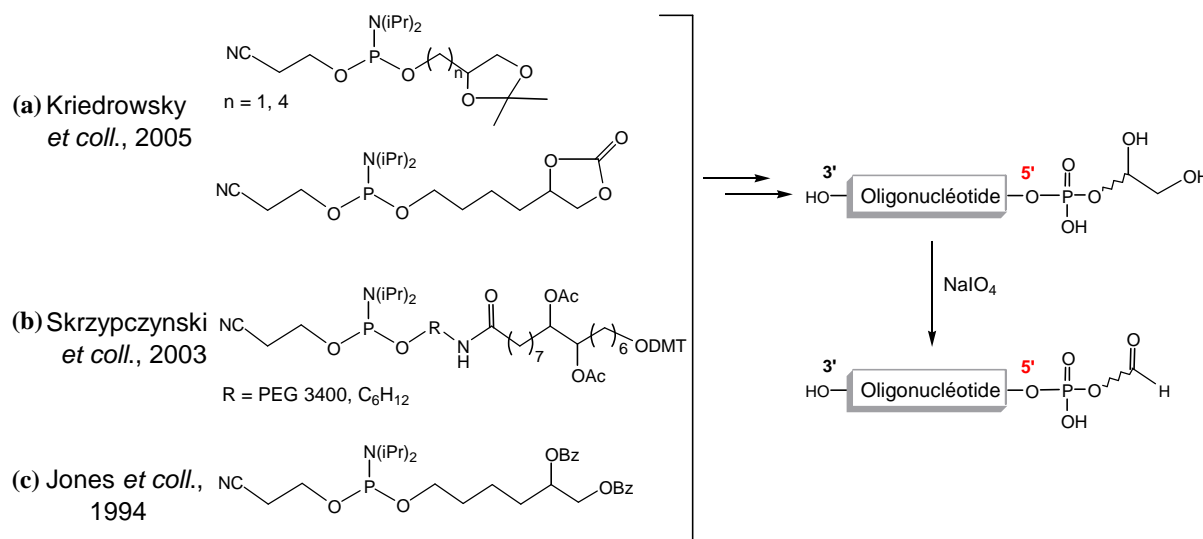
⁸⁵ Okamoto, A.; Tainaka, K.; Saito, I. A facile incorporation of the aldehyde function into DNA: 3-formylindole nucleoside as an aldehyde-containing universal nucleoside. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4581-4583.

⁸⁶ Achilles, K.; Kiedrowski, G. V. Kinetic model studies on the chemical ligation of oligonucleotides via hydrazone formation. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1229-1233.

Il est ensuite rapidement démasqué par hydrolyse acide, avant d'être oxydé quantitativement par le périodate de sodium.⁸⁷



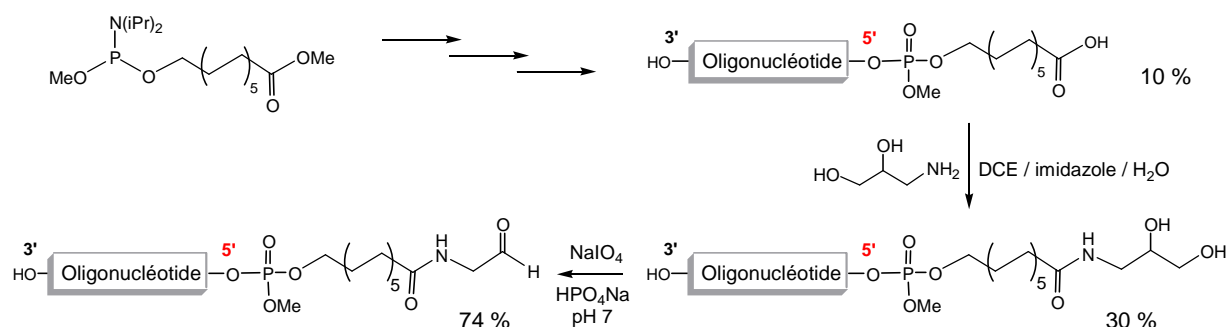
La plupart des méthodes décrites introduisent l'aldéhyde grâce à un phosphoramidite conçu pour intégrer uniquement le groupe précurseur diol protégé lors de l'ultime étape de la synthèse automatisée. Leur structure diffère légèrement suivant l'utilisation ultérieure des oligonucléotides. Dans tous les cas, le diol est ensuite déprotégé, avant d'être converti en aldéhyde par la coupure oxydante classique au périodate de sodium, totalement compatible avec les fonctions des oligonucléotides. La déprotection se fait toujours post-synthétiquement, soit lors du décrochage de l'oligonucléotide en milieu basique (NH₄OH pour b et c, ou LiOH pour a₂)⁸⁶, soit en milieu acide doux (AcOH pour a₁).⁸⁸



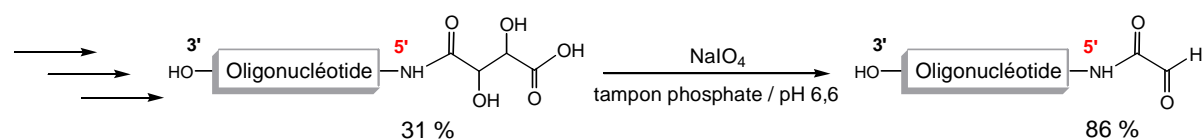
⁸⁷ (a) Bayard, B.; Bisbal, C.; Silhol, M.; Cnockaert, J.; Huez, G.; Lebleu, B. Increased stability and antiviral activity of 2'-O-phosphoglyceryl derivatives of (2'-5')oligo(adenylate). *Eur. J. Biochem.* **1984**, *142*, 291-298. (b) Agrawal, S.; Christodoulou, C.; Gait, M. J. Efficient methods for attaching non-radioactive labels to the 5' ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 6227-6245.

⁸⁸ (a) Skrzypczynski, Z.; Wayland, S. New reagents for the introduction of reactive functional groups into chemically synthesized DNA probes. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 642-652. (b) Jones, D. S.; Hachmann, J. P.; Osgood, S. A.; Hayag, M. S.; Paul A. Barstad, P. A.; G. Michael Iverson, G. M.; Coutts, S. M. Conjugates of double-stranded oligonucleotides with poly(ethyleneglycol) and keyhole limpet hemocyanin: A model for treating systemic lupus erythematosus. *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 390-399.

En 1987, l'équipe de Kremisky a incorporé un aldéhyde aliphatique à partir d'un phosphoramidite porteur d'un acide carboxylique protégé, introduit lors du dernier cycle de synthèse automatisée. Le précurseur diol est obtenu indirectement en deux étapes successives de déprotection, et d'amidification du motif acide carboxylique.⁸⁹ L'aldéhyde est ensuite classiquement formé grâce à la coupure oxydante par le périodate de sodium.



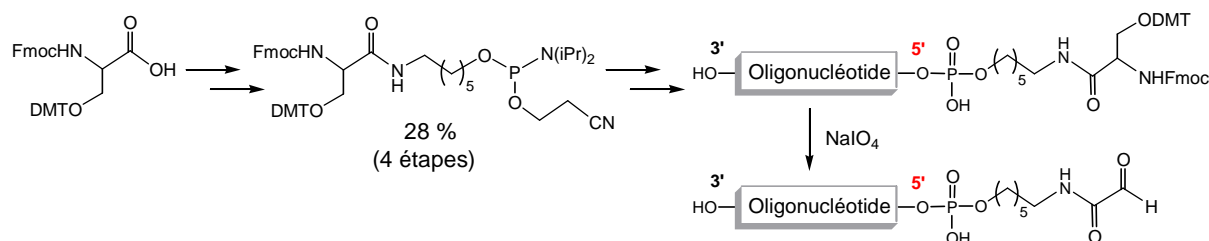
En 2002, l'équipe de Melnyk a fonctionnalisé un oligonucléotide avec un groupe aldéhyde glyoxylique. Ce type d'aldéhyde possède l'avantage d'être plus réactif que les aldéhydes classiques. Pour cela, un dérivé O,O'-diacétale de l'acide tartrique est greffé sur l'extrémité amine de l'oligonucléotide modifié via une liaison amide.⁹⁰ Le groupement diol est démasqué, et ensuite coupé par l'oxydation au périodate de sodium pour libérer efficacement l'aldéhyde.



Récemment au laboratoire, une seconde méthode d'incorporation d'un motif aldéhyde glyoxylique a été développée. Le procédé s'appuie sur l'efficacité de l'oxydation du motif 1,2-aminoalcool par le périodate de sodium. Ce groupe est naturellement présent avec la sérine, ce qui explique son engouement pour générer l'aldéhyde en chimie peptidique. L'acide aminé *N*α-Fmoc-L-sérine est donc converti en phosphoramidite en seulement 4 étapes.^{67b} Le synthon clé est ensuite introduit à l'extrémité de l'oligonucléotide, la protection Fmoc est éliminée dans les conditions basiques classiques de libération de l'oligonucléotide. Le phosphoramidite offre l'avantage d'accrocher le motif 1,2-aminoalcool en une seule étape par rapport à l'approche plus indirecte décrite par l'équipe de Melnyk.

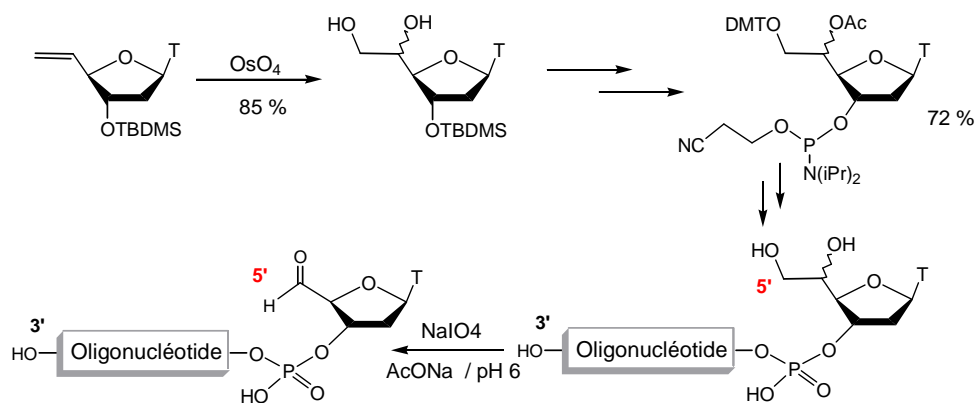
⁸⁹ Kremisky, J. N.; Wooters, J. L.; Dougherty, J. P.; Meyers, R. E.; Collins, M.; Brown, E. L. Immobilization of DNA via oligonucleotides containing an aldehyde or carboxylic acid group at the 5' terminus. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 2891-2909.

⁹⁰ Ollivier, N.; Olivier, C.; Gouyette, C.; Huynh-Dinh, T.; Gras-Masseand, H.; Melnyk, O. Synthesis of oligonucleotide-peptide conjugates using hydrazone chemical ligation. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 997-999.



▣ Une autre approche a été décrite pour insérer le motif aldéhyde à l'extrémité 5' terminale. Le procédé reste semblable, la fonction est toujours introduite post-synthétiquement grâce à un phosphoramidite porteur d'un groupe précurseur diol protégé. Par contre, le phosphoramidite correspond à un nucléotide. Il est composé à la fois de la base, du phosphate et du sucre modifié en 5'.

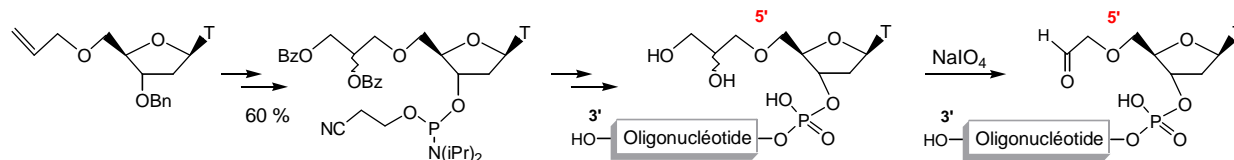
Sur ce principe, en 2005, l'équipe de Greenberg a préparé un oligonucléotide contenant un "nucléoside aldéhyde". Ce procédé a été développé pour reproduire synthétiquement le produit issu de la dégradation d'un nucléoside afin d'analyser leurs répercussions biochimiques. En effet, l'arrachement de l'hydrogène en 5' du désoxyribose génère à la fois une extrémité 3' phosphate suite à la coupure du brin d'ADN, et l'oxydation de l'extrémité 5' en aldéhyde. Cet aldéhyde doit être introduit de façon post-synthétique, car il est sensible aux conditions alcalines typiques de deprotection de l'oligonucléotide. Il est préparé à partir du phosphoramidite thymidine porteur d'un diol vicinal protégé, incorporé en 5' du nucléoside à partir d'un alcène.⁹¹



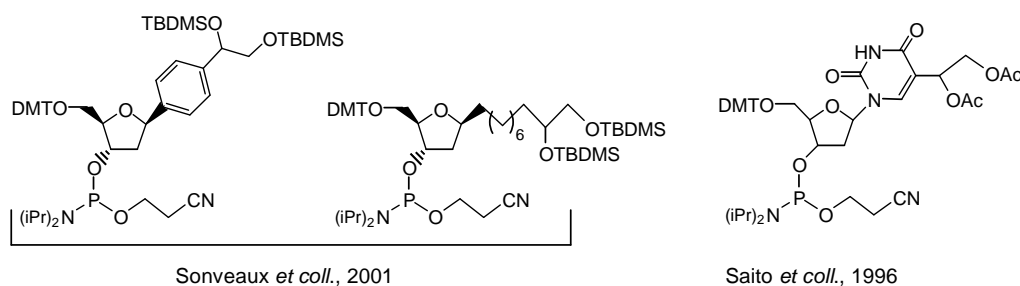
En 2006, l'équipe de Silverman a également synthétisé un phosphoramidite de thymidine porteur d'un diol vicinal protégé.⁹² Le diol est facilement déprotégé lors de l'étape de décrochage de l'oligonucléotide du support solide en milieu basique. L'aldéhyde est ensuite obtenu classiquement grâce au périodate de sodium. Ils ont généré un chaînon porteur du motif aldéhyde légèrement plus long et flexible que celui préparé par l'équipe de Greenberg.

⁹¹ Kodama, T.; Greenberg, M. M. Preparation and analysis of oligonucleotides containing lesions resulting from C5'-oxidation. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9916-9924.

⁹² Miduturu, C. V.; Silverman, S. K. Synthesis and application of a 5'-aldehyde phosphoramidite for covalent attachment of DNA to biomolecules. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5774-5777.



Une autre approche a été décrite pour insérer le motif aldéhyde à l'extrémité 5' terminale en l'intégrant à un nucléotide. Cette fois le diol précurseur est accroché sur la position anomérique du ribose.⁹³



1. 1. 2. - Présentation de la stratégie utilisée

On a choisi de préparer les oligonucléotides modifiés en 5' en utilisant la méthode de synthèse dite aux phosphoramidites, en couplant à la dernière étape de la synthèse automatisée le phosphoramidite adéquat.⁹⁴ La fonction aldéhyde est introduite sous une forme masquée par un groupement précurseur 1,2-diol. Elle sera ensuite générée post-synthétiquement par coupure oxydante du motif (figure A.II.1).

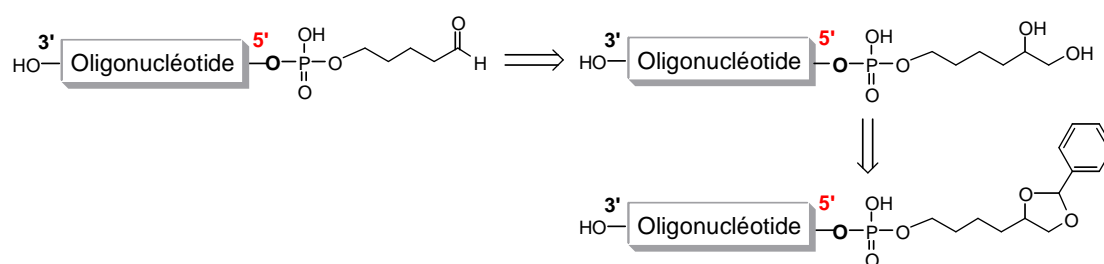
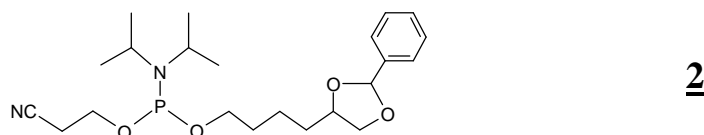


Figure A.II.1: Schéma rétrosynthétique de la préparation des oligonucléotides aldéhydiques à l'extrémité 5'.

La première étape consiste à préparer le phosphoramidite clé **2** permettant d'intégrer la fonctionnalisation diol aux oligonucléotides.

⁹³ (a) Tilquin, J. M.; Dechamps, M.; Sonveaux, E. Incorporation of an Aldehyde Function in Oligonucleotides. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 451-457. (b) Sugiyama, H.; Matsuda, S.; Kino, K.; Zhang, Q.-M.; Yonei, S.; Saito, I. New synthetic method of 5-formyluracil-containing oligonucleotides and their melting behavior. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9067-9070.

⁹⁴ Beaucage, S. L. Oligonucleotide synthesis. Phosphoramidite approach. *Methods in Molecular Biology* **1993**, *20*, 33-66.



Pour cela, nous avons employé une méthode mise au point au laboratoire, et largement utilisée pour préparer de nombreux oligonucléotides porteurs du groupe aldéhyde en 5'. Ils ont été ensuite couplés à une vaste gamme de composés par les liens thiazolidine, ou éther d'oxime (sucres, peptides...).^{75, 95}

Cette stratégie s'inspire de la méthode de préparation du phosphoramidite porteur d'un diol vicinal employée par le groupe de Jones en 1994.^{88c} Dans ce cas, le diol protégé par deux groupements benzoyle est préparé en 5 étapes avec un rendement global de 35 % (figure A.II.2). Les groupes benzoyles sont éliminés dans les conditions basiques de libération de l'oligonucléotide, ce qui entraîne une purification ultérieure délicate (10% de rendement).

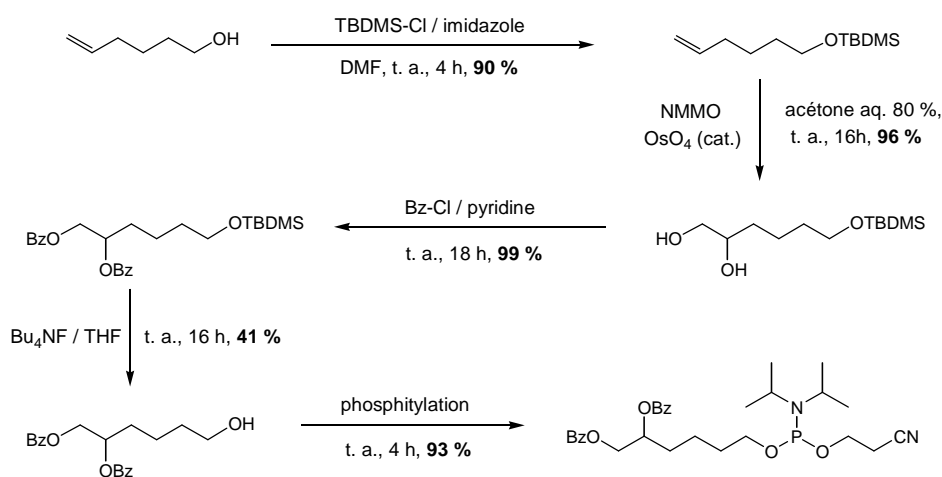


Figure A.II.2 : Synthèse du phosphoramidite modifié par Jones et coll.

Par conséquent, il faut plutôt masquer le diol par un groupe protecteur stable en milieu basique pour faciliter la purification ultérieure par CLHP en phase inverse.

Le laboratoire a ainsi mis au point une méthode à partir d'un groupe protecteur souvent utilisé, le benzylidène.^{67a}

Les conditions acides d'élimination de cet acétale peuvent varier suivant le substituant greffé sur le noyau aromatique (nitro, alkyl, *O*-alkyl...).⁹⁶ Afin de valider la méthode, l'équipe a testé différents types de groupe benzylidène substitués. Le choix du substituant s'est uniquement porté vers

⁹⁵ Forget D., thèse de doctorat, LEDSS, Université Joseph Fourier, 2002.

⁹⁶ Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed.; John Wiley and Sons: New York, 1999, p 217-224.

l'utilisation du groupe *O*-méthyl, grâce à l'élimination efficace du méthoxybenzylidène dans l'acide acétique à 80 %. Ces conditions sont attrayantes, car elles correspondent au protocole optimisé de déprotection de l'extrémité 5' utilisé en synthèse automatisée.⁹⁷ Plus le nombre de substituant sur le cycle est important, plus le groupe protecteur s'élimine rapidement par rapport au benzylidène, qui requiert un traitement de 2,5 heures à 25°C dans AcOH 60%.⁹⁸ Au final, deux méthodes ont été retenues parmi différents essais où le nombre de substituant méthoxy sur le cycle aromatique varie (*figure A.II.3*, synthèses A et B).

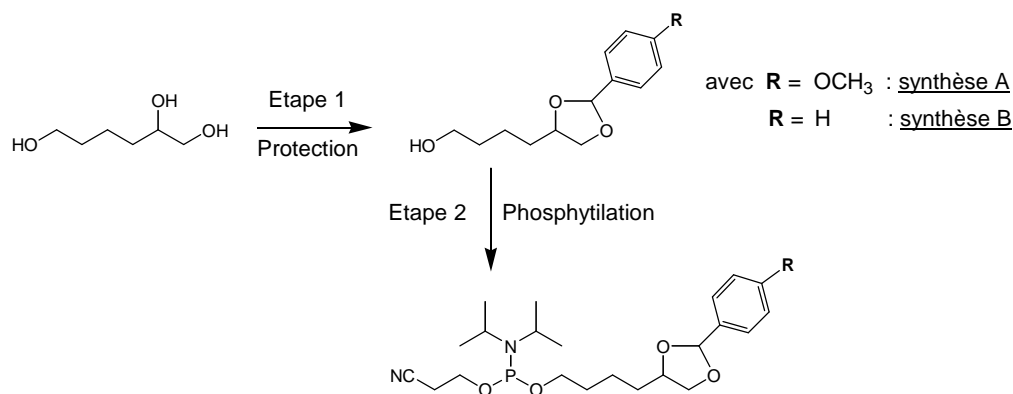


Figure A.II.3 : Stratégie globale de synthèse du phosphoramidite **2**.

Ces deux voies suivent le même cheminement synthétique pour aboutir au phosphoramidite. La synthèse se fait en seulement deux étapes consécutives à partir d'un alcool commercial. La première consiste à protéger le diol vicinal du 1,2,6-hexane-triol. La seconde correspond à la réaction classique de phosphitylation. Le phosphoramidite est obtenu avec un rendement global de 62 % par la voie A et de 89 % par la voie B, améliorant ainsi la méthode analogue du groupe de D. S. Jones. Les deux voies, A et B, ont donc été utilisées indifféremment. Elles présentent des résultats, de stabilité de la protection, similaires et compatibles avec la synthèse d'oligonucléotide. Il en est de même pour l'étape de déprotection. La voie A a été employée pour préparer divers conjugués.^{17,19} Récemment, quelques problèmes de déprotection lors de l'étape de purification par CLHP, a poussé l'équipe à plutôt se diriger vers la voie de synthèse B, qui n'a pas montré ce genre de désagrément.⁹⁹ Ce fut d'ailleurs la méthode retenue pour ce travail.

⁹⁷ Smith, M.; Rammner, D. H.; Goldberg, I. H.; Khorana, H. G. Studies on polynucleotides XIV. Specific synthesis of the C₃-C₅, interribonucleotide linkage. Syntheses of uridylyl-(3'→5')-uridine and uridylyl-(3'→5')-adenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430-440.

⁹⁸ Kaburagi, Y.; Osajima, H.; Shimada, K.; Tokuyama, H.; Tohru Fukuyama, T. 4-(tert-Butyldimethylsilyloxy) benzylidene acetal: a novel benzylidene-type protecting group for 1,2-diols. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3817-3821.

⁹⁹ Edupuganti, O. P.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. The oxime bond formation as an efficient chemical tool for the preparation of 3',5'-bifunctionalised oligodeoxyribonucleotides *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2839-2842.

1. 1. 3. - Synthèse des "oligonucléotides aldéhydes" à l'extrémité 5'

a) Protection de la fonction diol

Dans un premier temps, nous avons protégé le groupe 1,2-diol sous forme d'acétale de benzylidène en utilisant les conditions sélectives de protection classiques. Le 1,2,6-hexane-triol commercial est traité par 2 équivalents de benzaldéhyde diméthylacétale en présence du catalyseur acide paratoluène sulfonate de pyridinium (PPTS).¹⁰⁰ Le diméthylacétale est utilisé comme source de benzaldéhyde facilement généré grâce à l'eau libérée au cours de l'étape de protection.¹⁰¹

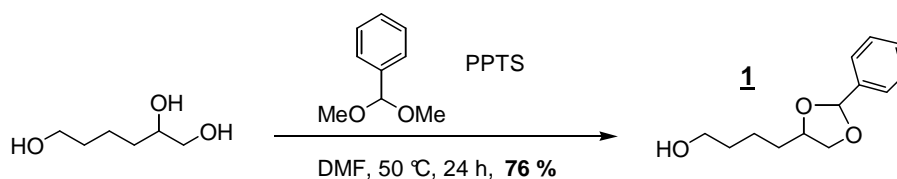


Figure A.II.4 : Synthèse du diol protégé **1**.

La réaction se fait lentement en chauffant. Après 24 heures, le milieu réactionnel est concentré, puis traité pour éliminer les réactifs restants. Il subit notamment une condensation bisulfidique pour éliminer l'excès de benzaldéhyde. L'efficacité des traitements successifs permet d'éviter une purification ultérieure, où le groupe protecteur pourrait s'éliminer sur la silice. L'alcool protégé **1** est obtenu avec 76 % de rendement, il est ensuite stocké sous atmosphère d'argon, et à -18°C.

b) Préparation du phosphoramidite **2**

Le groupe *N,N'*-diisopropyl-2-cyanoéthylphosphoramidite étant le plus utilisé,¹⁰² nous l'avons introduit sur l'alcool à partir du 2-cyanoéthyl-*N,N'*-diisopropylchlorophosphoramidite (1,3 eq.). La réaction a été effectuée en présence de la *N,N'*-diisopropylamine (2 eq.) dans des conditions rigoureusement anhydres. Lors de la phosphitylation du nucléoside, on génère un centre stéréogénique au niveau du phosphore, avec la formation de deux diastéréoisomères. Les conditions d'élution de CCM ne permettent pas de les identifier séparément, même en fin de réaction une seule tache persiste. Après chromatographie sur colonne de silice, nous obtenons le dérivé phosphoramidite **2** avec un rendement de 76 %. L'analyse par RMN du phosphore résultante présente les deux signaux

¹⁰⁰ Miyashita, M.; Yoshikoshi, A.; Grieco, P. A. Pyridinium p-toluenesulfonate. a mild and efficient catalyst for the tetrahydropyranylation of alcohols. *J. Org. Chem* **1977**, *42*, 3772-3774.

¹⁰¹ Yamanoi, T.; Akiyama, T.; Ishida, E.; Abe, H.; Amamiya, M.; Inazu, T. Horner-Wittig reaction of dimethyl 2,3-O-isopropylidene-D-glycerolmethylphosphonate and its application to the formal synthesis D-erythro-C₁₈-sphingosine. *Chem. Lett.* **1989**, *2*, 335-336.

¹⁰² Caruthers, M. H.; Brill, W.; and Dellinter, D. J. Phosphoramidites as Synthons for Polynucleotide Synthesis. *Phosphorus Sulfur* **1987**, *30*, 549-553.

caractéristiques des atomes de phosphore trivalents des deux diastéréoisomères (149,3 et 148,8 ppm). Le phosphoramidite est directement transféré sur le synthétiseur en le manipulant sous atmosphère d'argon, car il est sensible à l'hydrolyse.

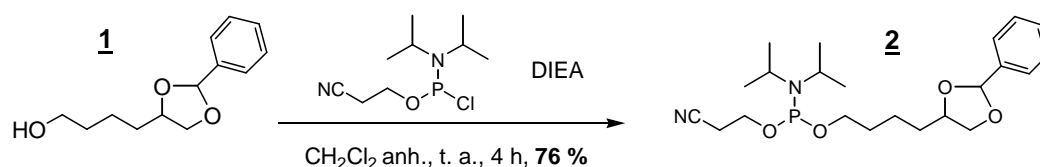


Figure A.II.5 : Synthèse du 4-[2-(phényl)-[1,3]-dioxalan-4-yl]-butan-1-ol phosphoramidite **2**.

c) Synthèse automatisée (annexe 1)

Les oligonucléotides sont assemblés par synthèse automatisée qui est maintenant devenue une routine depuis son optimisation accrue dans les années 1980.¹⁰³ Que ce soit la synthèse d'oligonucléotides naturels ou celle d'oligonucléotides modifiés, la procédure employée reste la même. Le phosphoramidite modifié **2** est accroché sur l'oligonucléotide lors de l'ultime étape de la synthèse automatisée en phase solide (figure A.II.6). Cette étape subit quelques modifications mineures par rapport au protocole habituel pour permettre d'incorporer avec succès le phosphoramidite **2**, comme le doublement du temps de couplage. Nous avons intégré le phosphoramidite **2** à l'extrémité de quatre oligonucléotides 17-mère. Trois produits ont une grande homologie de séquence, avec pour motif de base : 5'-d-(YXX XTT TTA TTA AAT TTA)3', où la lettre Y représente l'emplacement du motif glycéryle. Ils ne diffèrent que par trois bases notifiées par la lettre X : 5'-d-(YXX X-)5' = YTT T (**3'**), 5'-d-(YXX X-)3' = YTC C (**4'**), 5'-d-(YXX X-)3' = YCC C (**5'**). Le quatrième diverge de 4 nucléotides de plus, il possède comme motif : 5'-d-(YXX XXX XXA TTA AAT TTA)3', où 5'-d-(YXX XXX XX-)3' = YAA AAA AA (**6'**). On retrouve donc les séquences actives (**4'**, et **5'**) possédant un nombre croissant de cytosines, et les séquences contrôles (**3'** et **6'**) dépourvues de cytosines, établies en vue des expériences de photooxydation ultérieures (Partie B).

¹⁰³ (a) Amarnath, V.; Broom, A. D. Chemical synthesis of oligonucleotides. *Chem. Rev.* **1977**, 77, 183-217. (b) Loakes, D. Nucleotides and Nucleic Acids; Oligo- and Polynucleotides. *Organophosphorus Chem.* **2005**, 34, 227-325.

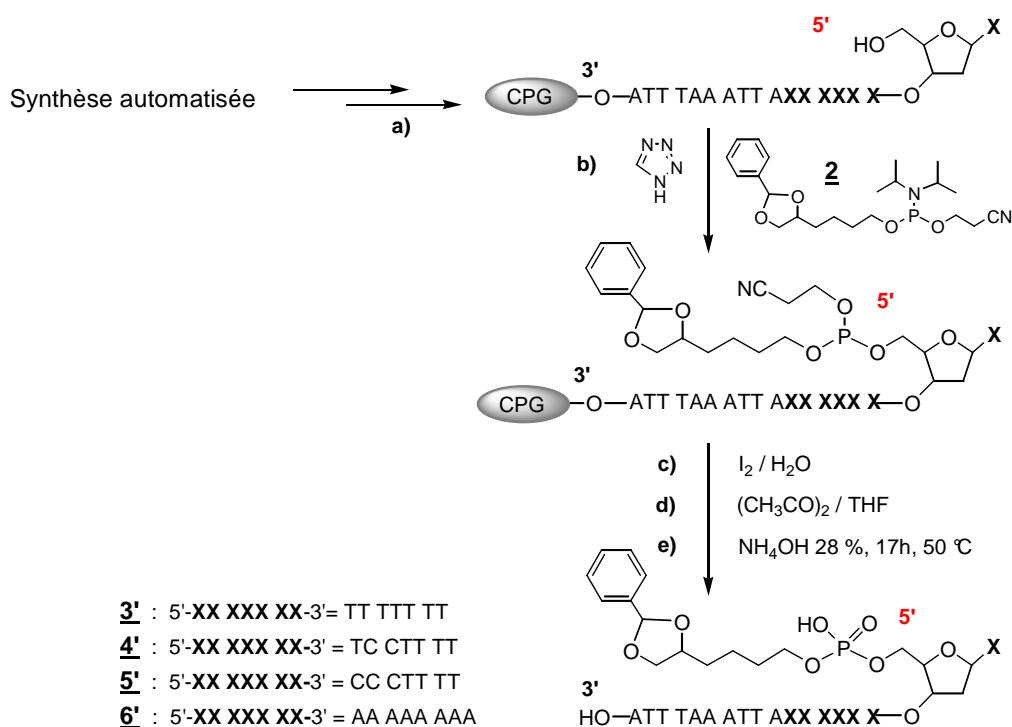


Figure A.II.6 : Schéma de l'étape d'incorporation du phosphoramidite modifié **2** lors de la synthèse automatisée des oligonucléotides par la voie aux phosphoramidites. a) Etape de déprotection de l'extrémité 5' ; b) Etape d'activation et de couplage du phosphoramidite ; c) Etape d'oxydation ; d) Etape de capping ; e) Etape de déprotection et décrochage du support (*annexe I*).

Après l'assemblage, les oligonucléotides sont décrochés du support dans les conditions basiques usuelles, ammoniacque concentrée à 55 °C pendant une nuit. Ce traitement permet également d'éliminer les groupes protecteurs des bases nucléiques. Afin de vérifier l'efficacité de la synthèse supportée, nous avons analysé par CLHP les oligonucléotides bruts dans l'ammoniacque. Nous obtenons les oligonucléotides attendus largement majoritaires et distincts des fragments secondaires produits. Par exemple, pour le 17-mère **3'** 5'-d-(YTT TTT TTA TTA AAT TTA)3' on retrouve sur le chromatogramme CLHP le produit correspondant à $t_R = 13,4$ min. (*figure A.II.7*). A ce stade, les quatre oligonucléotides **3'**, **4'**, **5'**, **6'** sont protégés à l'extrémité 5' par l'acétale. Son caractère hydrophobe facilite la séparation des produits lors de l'étape suivante de purification par CLHP en phase de polarité inversée dans le tampon acétate d'ammonium.

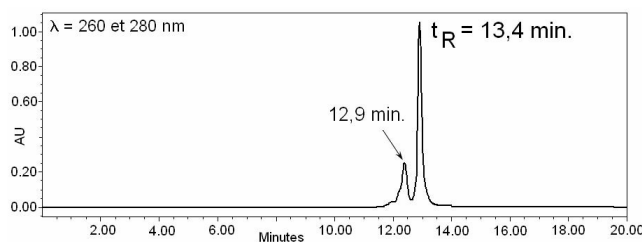
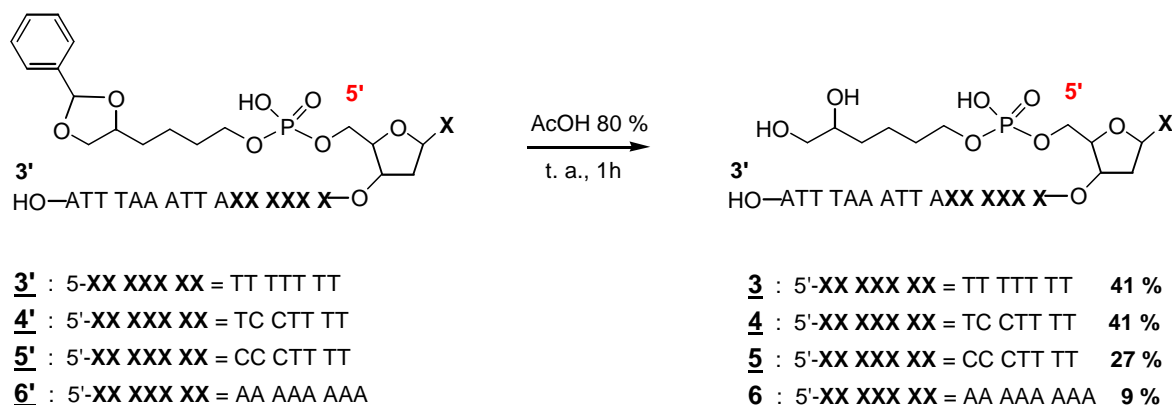
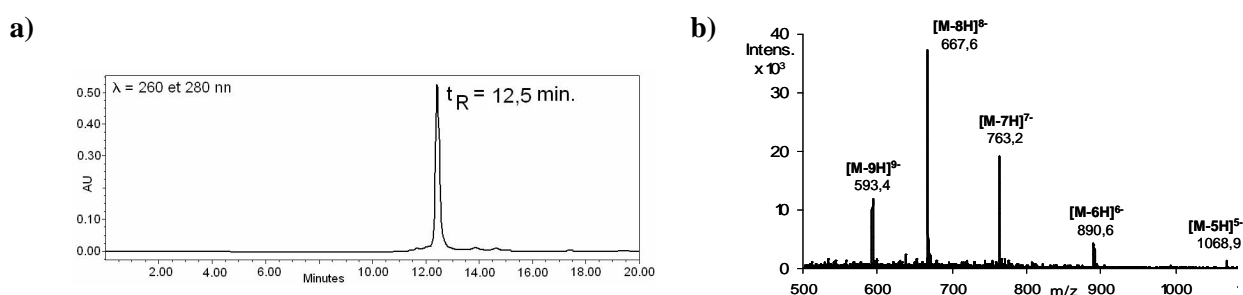


Figure A.II.7 : Analyse CLHP de l'oligonucléotide **3'** brut, protégé à l'extrémité 5'.

d) Déprotection de l'extrémité 5'

Figure A.II.8 : Etape finale de préparation des oligonucléotides modifiés **3**, **4**, **5**.

Les oligonucléotides **3'**, **4'**, **5'**, **6'** sont traités avec une solution aqueuse d'acide acétique à 80 % pendant 1 heure à température ambiante. L'acide acétique est éliminé par lyophilisation, et les résidus sont repris avec de l'eau. La phase aqueuse est ensuite lavée avec de l'éther afin d'éliminer les résidus du benzylidène libérés, et les traces restantes de solvant organique sont chassées sous air ambiant. Afin de vérifier l'intégrité des séquences obtenues, les oligonucléotides ont été caractérisés par spectrométrie de masse par électrospray en mode négatif. Par exemple, pour le 17-mère **3'** 5'-d-(YTT TTT TTA TTA AAT TTA)**3'** nous avons une masse calculée de $M = 5350,6$ g/mol et nous obtenons l'ion moléculaire $[M-H^+] = 5349,1$ à partir de ses ions multichargés (5-), (6-), (7-), (8-) et (9-) visibles sur le spectre de masse (figure A.II.9, b). On retrouve un seul produit correspondant sur le chromatogramme CLHP, $t_R = 12,5$ min. (figure A.II.9, a).

Figure A.II.9 : Analyses du 17-mère **3'** après décrochage de la résine, déprotection et purification par CLHP. a) Chromatogramme CLHP (système d'analyse I₁) ; et b) Spectre de masse ESI (système d'analyse IV₁).

Les analyses résultantes ne montrent aucune trace de produit protégé, ni de produit de dégradation. Ces conditions acides douces permettent d'éliminer efficacement le groupe protecteur benzylidène acido-labile, et sans réactions secondaires. La déprotection est très intéressante, car elle est réalisée

dans les conditions similaires à celles classiquement utilisées pour éliminer le groupe diméthoxytrityle de l'extrémité 5' des oligonucléotides non modifiés.

Les oligonucléotides **3**, **4**, **5** sont finalement obtenus avec un rendement de 27 à 41 % (déterminé par rapport à l'étape initiale d'assemblage des nucléotides supportés). Alors que l'oligonucléotide **6** est obtenu avec seulement 9 % de rendement.

e) Oxydation de la fonction 1,2-diol de l'extrémité 5'

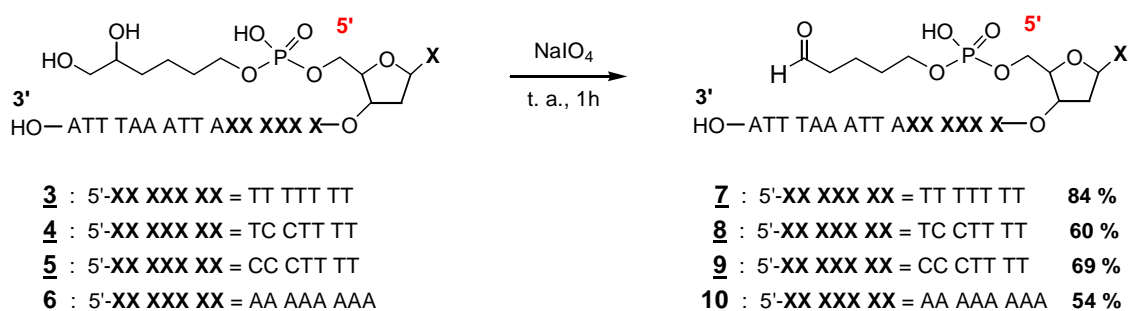


Figure A.II.10 : Synthèse des oligonucléotides aldéhydiques **7** à **10**.

La fonction aldéhyde est générée après coupure oxydative du diol vicinal en utilisant un excès de périodate de sodium aqueux, 20 équivalents à température ambiante. Bien que cette réaction soit décrite pour être rapide, nous avons préféré effectuer l'oxydation en 1 heure. Cette durée correspond à celle classiquement utilisée lors de l'oxydation au périodate de sodium où l'oxydant est intégré à la surface de billes de résine. Ce choix s'est imposé à cause de profils d'analyse CLHP peu pertinents. En effet, les oligonucléotides 1,2-diol ou aldéhyde possèdent des temps de rétention peu différents dans les conditions d'éluion utilisées (figure A.II.11).

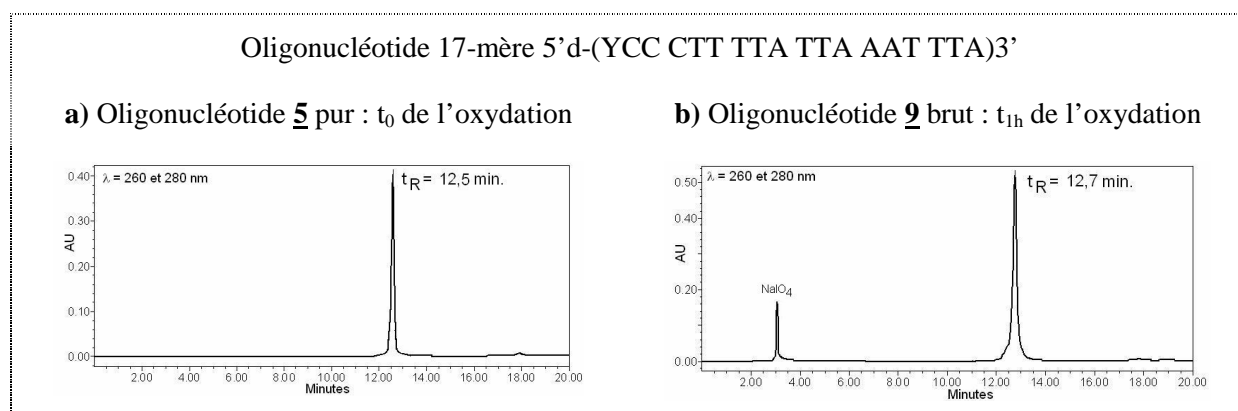


Figure A.II.11 : Suivi réactionnel par CLHP de l'oxydation de l'oligonucléotide **5** (système I₁).

On a donc réalisé une expérience supplémentaire afin de constater la présence de l'aldéhyde. Pour cela, on a fait réagir l'oligonucléotide aldéhydique brut avec un excès d'alcane linéaire porteur d'une

fonction oxyamine libre à son extrémité : $C_{11}H_{23}-ONH_2$ (disponible au laboratoire), pendant 1 heure. L'oxime correspondante étant une espèce plus hydrophobe, le temps de rétention de l'analyse CLHP se voit fortement déplacé. Dans le cas de l'oxydation de l'oligonucléotide **5**, l'aldéhyde **9** se retrouve déplacé de plus de 3 minutes en formant l'oxime avec l'alcane test (*figure A.II.12*).

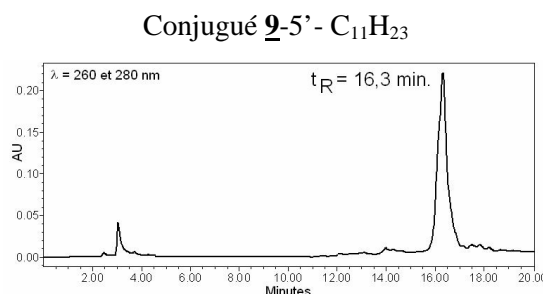


Figure A.II.12 : Chromatogramme CLHP correspondant au conjugué test réalisé à partir de l'oligonucléotide **5** au bout d'1 heure d'oxydation (système I₁).

Ce type de "couplage test" a donné des résultats concluants pour différentes réactions d'oxydation d'oligonucléotides.

Cette étape d'oxydation sélective des oligonucléotides est suivie d'une purification. Elle est indispensable pour éliminer le formaldéhyde libéré au cours de la coupure du groupe 1,2-diol, et l'excès de périodate de sodium. Deux méthodes de purification sont utilisées indifféremment. Une est réalisée par CLHP à polarité de phase inversée. L'autre se fait manuellement par chromatographie flash sur colonne de silice en phase inversée. Il semblerait que la seconde méthode soit légèrement plus efficace, en général les rendements sont supérieurs de quelques pourcents. Par contre elle nécessite une oxydation totale, car on récupère tout ce qui de composition oligonucléotidique en une fraction. De façon générale, on obtient les oligonucléotides aldéhyde **7**, **8**, **9**, **10** avec des rendements moyens de 60 à 85 %.

Les oligonucléotides sont ensuite caractérisés par spectrométrie de masse (électrospray en mode négatif). Quelques fois, on observe des massifs de pics denses autour des espèces multichargées attendues, correspondants aux nombreux adduits salins du produit. Et d'autres fois, les analyses sont évidentes, on observe le produit attendu sans adduit (*figure A.II.13*).

Par exemple, pour le 17-mère **7** 5'-d-(YTT TTT TTA TTA AAT TTA)3' nous avons une masse calculée de $M = 5318,6$ g/mol et nous obtenons l'ion moléculaire $[M-H^+]$ = 5315,8 à partir de ses ions multichargés (5-), (6-), (7-), et (8-) visibles sur le spectre de masse (*figure A.II.13*).

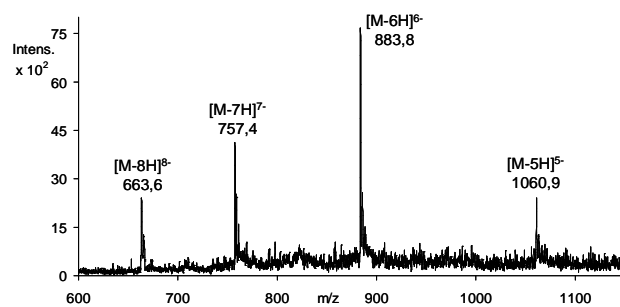


Figure A.II.13 : Spectre de masse (ESI) du 17-mère **7** après purification par CLHP (système I₃).

~

En résumé, le phosphoramidite couramment utilisé au laboratoire permet de réaliser une synthèse efficace des oligonucléotides modifiés à l'extrémité 5' avec un rendement global de 37 %. Le groupe protecteur benzylidène rend les étapes de purification conviviales, avant d'être facilement éliminé. L'oxydation suivante s'avère très efficace. La purification résultante semble être optimisée en utilisant la méthode manuelle. Les "oligonucléotides aldéhydes" à l'extrémité 5' sont finalement obtenus avec un très bon rendement moyen d'oxydation de 71 %.

1.2 - Insertion du motif aldéhyde en 3'

Dans cette partie, la préparation de 2 oligonucléotides porteurs du motif aldéhyde à l'extrémité 3' est décrite.



Les produits **14** et **15** serviront comme "synthons aldéhyde" dans les couplages par éther d'oxime avec les complexes de ruthénium (Partie A, Chapitre IV).

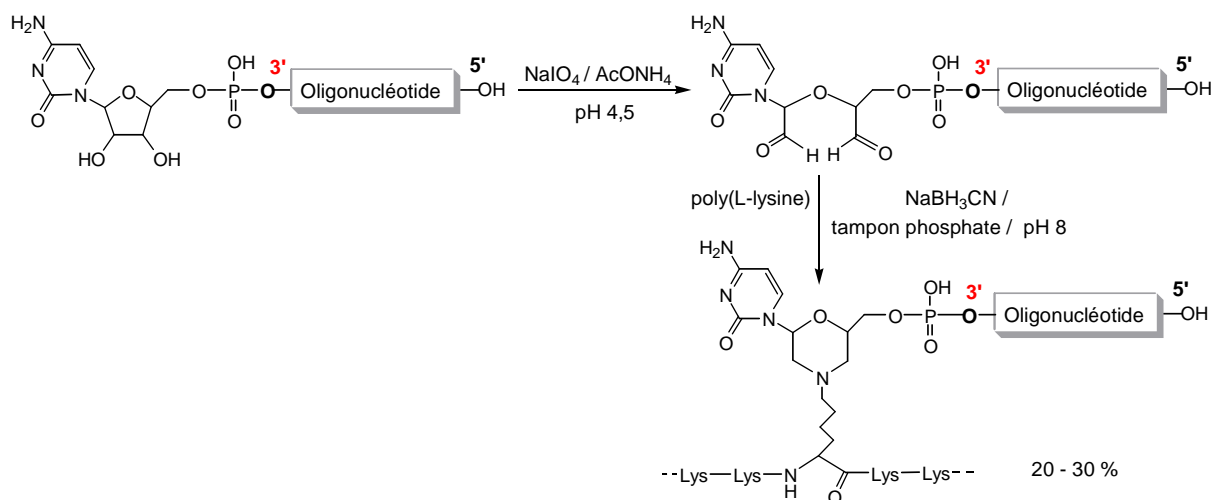
~

1. 2. 1. - Rappel bibliographique

La synthèse automatisée d'oligonucléotides s'effectue de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5', ce qui rend plus difficile l'accès chimique au site 3'. La fonctionnalisation en cette extrémité nécessite par conséquent la modification du support. C'est pourquoi il n'existe que relativement peu de méthodes décrites dans la littérature. Cet obstacle a fait émerger deux types de stratégie de conjugaison à l'extrémité 3'. Ces deux méthodes diffèrent temporellement par rapport à la synthèse des oligonucléotides. L'une est pré-synthétique, elle consiste à greffer directement sur le support le motif à conjuguer. La plus utilisée est post-synthétique, elle consiste à accrocher, ou démasquer, le motif sur l'oligonucléotide en solution.

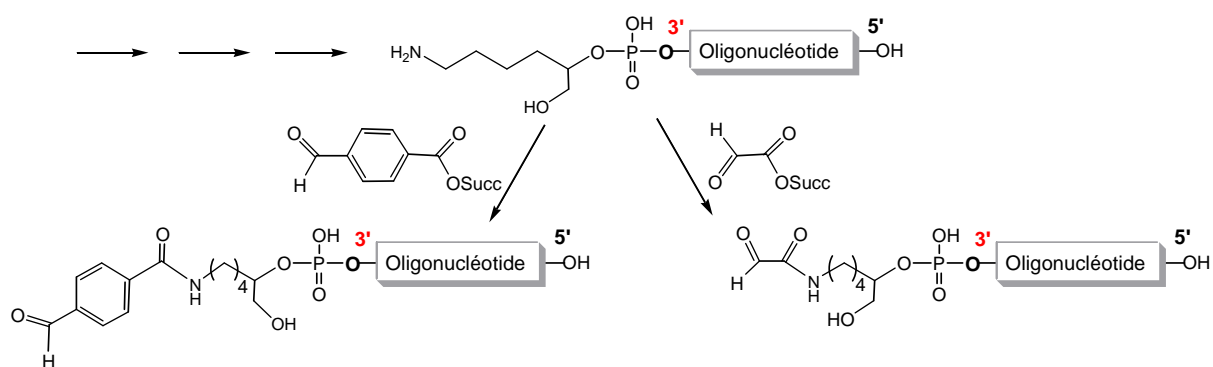
▣ En 1984, l'équipe de Lebleu a généré un motif bis-aldéhyde à l'extrémité 3' d'un fragment d'ARN en oxydant l'unité ribose terminale dans le but d'augmenter sa stabilité vis-à-vis des phosphodiesterases. En 1987, ils ont utilisé ce procédé pour modifier spécifiquement un oligonucléotide en intégrant l'unité ribonucléoside au cours du premier cycle de synthèse supportée. Le motif aldéhyde ensuite révélé par la coupure oxydante au périodate de sodium sert de point d'ancrage à un peptide poly(L-lysine), via la formation d'un cycle morpholine.^{87a, 104}

¹⁰⁴ Lemaitre, M.; Bayard, B.; Lebleu, B. Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 648-652.



La méthode a été ensuite reprise pour réaliser divers conjugués, voire même greffer des oligonucléotides sur une surface solide.^{86, 105} L'aldéhyde s'est avéré responsable de réactions non spécifiques avec des groupes amides du support en plus d'être sujet aux réactions parasites de β -élimination.

En 2001, l'équipe de Liu a intégré, post-synthétiquement, un motif aldéhyde à l'extrémité 3' de l'oligonucléotide sans aucune protection. Pour cela, ils ont réalisé l'ester activé de succinimide du groupe acide d'un composé bi-fonctionnel, comportant également le motif aldéhyde. Le synthon est ensuite accroché à l'extrémité de la chaîne, préalablement modifiée par une amine primaire, via un lien amide.¹⁰⁶ Ils ont également appliqué le même procédé pour incorporer un synthon porteur d'un motif aldéhyde glyoxylique.

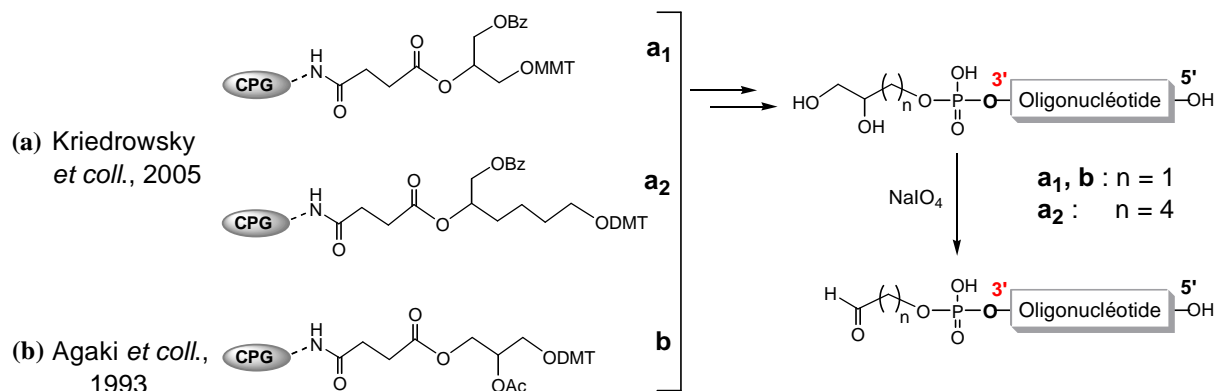


La plupart des méthodes décrites introduisent l'aldéhyde à partir d'un support solide spécialement conçu pour libérer le groupe précurseur 1,2-diol lors de l'étape de décrochage de

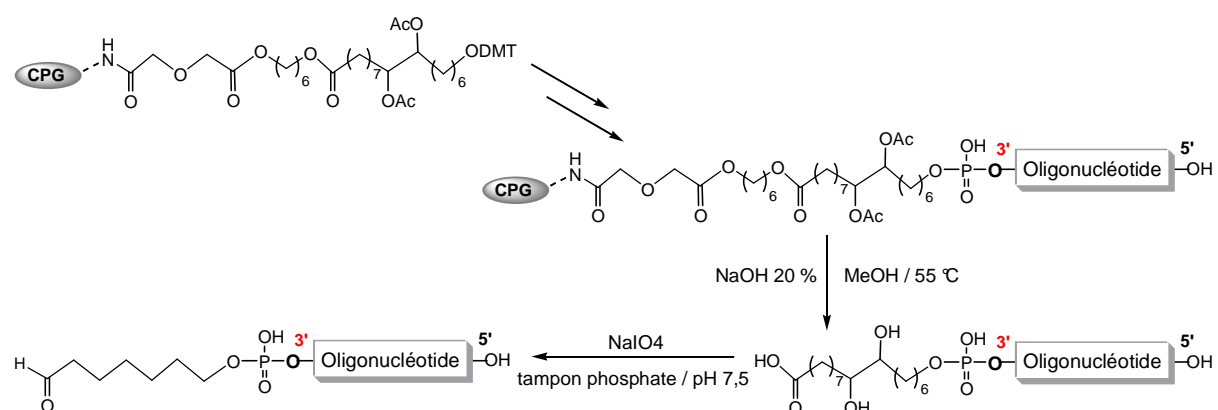
¹⁰⁵ Timofeev, E. N.; Kochetkova, S. V.; Mirzabekov, A. D.; Florentiev, V. L. Regioselective immobilization of short oligonucleotides to acrylic copolymer gels. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3142-3148.

¹⁰⁶ Calderone, C. T.; James W. Puckett, J. W.; Gartner, Z. J.; Liu, D. R. Directing otherwise incompatible reactions in a single solution by using DNA-templated organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4104-4108.

l'oligonucléotide dans l'ammoniaque. Leur structure diffère légèrement suivant la méthode de préparation du support.^{86, 107} Dans tous les cas, le diol est ensuite classiquement oxydé en aldéhyde par le périodate de sodium.



En 2003, l'équipe de Skrzypczynski a développé un support solide à partir de l'acide aleuritique qui possède naturellement le motif diol intégré dans sa structure.^{88b} Ce support permet d'accéder à l'oligonucléotide aldéhyde en deux temps, *via* un motif acide carboxylique terminal généré par le décrochage en milieu basique. L'étape suivante d'oxydation au périodate de sodium rompt la chaîne au niveau du diol pour former l'aldéhyde terminal. Les conditions classiques de décrochage de l'oligonucléotide ne sont pas optimales avec ce type de support, l'ammoniaque est donc remplacé par de la soude.



1. 2. 2. - Présentation de la stratégie utilisée

¹⁰⁷ Urata, H.; Agaki, M. A convenient synthesis of oligonucleotide with a 3'-phosphoglycolate and 3'-phosphoglycaldehyde terminus. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4015-4018.

Il est possible d'accéder à l'aldéhyde par coupure oxydative d'un groupe 1,2-aminoalcool par le périodate de sodium.¹⁰⁸ Cette méthode tout d'abord décrite à partir de la chimie peptidique, via l'oxydation du résidu sérine, a été appliquée à la chimie des oligonucléotides. Ils sont assemblés sur un support solide adéquat, qui à la particularité de générer la fonction cible 1,2-aminoalcool à l'extrémité 3'. Ce procédé a été utilisé précédemment au laboratoire pour greffer différentes entités à l'extrémité 3' des oligonucléotides par le lien oxime (peptides, sucre, fluorophores...).¹⁰⁹ Par la suite, l'emploi de ce type de fonction précurseur s'est avéré problématique. Les rendements de synthèse des oligonucléotides se sont révélés variables, et faibles, à cause d'une perte du motif 1,2-aminoalcool. Ce constat a entraîné l'utilisation d'un nouveau type de support solide, également commercial **11**. Ce nouveau matériau permet d'intégrer un motif glycéryle à l'extrémité 3'. Dans ce cas les synthèses s'avèrent beaucoup plus efficaces, la première étape d'incorporation du groupement s'effectue avec de meilleurs rendements. Le laboratoire a définitivement adopté ce support pour réaliser la conjugaison efficace de divers composés via le motif aldéhydique en 3'.⁹⁹

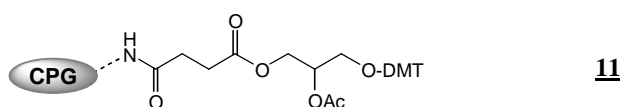


Figure A.II.14 : Support solide commercial porteur du motif 1,2-diol.

La stratégie développée pour synthétiser les oligonucléotides porteur du motif aldéhyde à l'extrémité 3' se déroule en deux étapes (figure A.II.15).

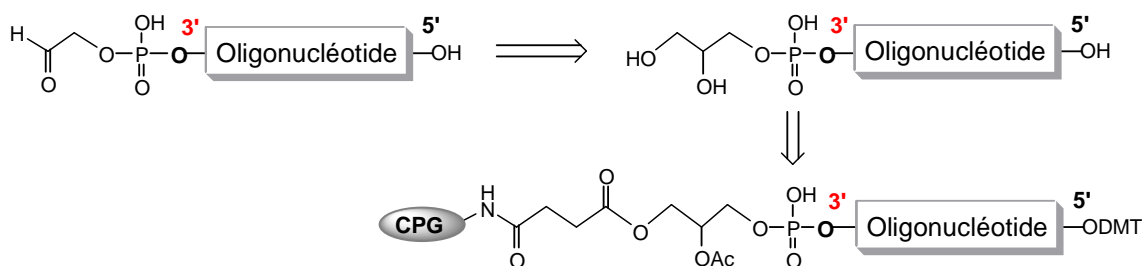


Figure A.II.15: Schéma rétrosynthétique de la préparation des oligonucléotides aldéhydiques à l'extrémité 3'.

La première consiste à assembler l'oligonucléotide sur le support solide précurseur de la fonction 1,2-diol. Ce choix de fonctionnalisation est avantageux grâce à la disponibilité commerciale du support. Puis, l'oligonucléotide est décroché, et traité. Il est ensuite engagé dans la seconde étape, où la fonction aldéhyde est facilement générée par coupure oxydante du groupe glycéryle.

¹⁰⁸ Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G. Self-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 138-146.

¹⁰⁹ Forget, D.; Boturny, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. 3'-oligonucleotides conjugation via chemoselective oxime bond formation. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 9171-9174.

1. 2. 3. - Synthèse des "oligonucléotides aldéhydes" en 3'

a) Etape 1 : synthèse des "oligonucléotides 1,2-diol" à l'extrémité 3'

▣ Synthèse automatisée

Nous avons synthétisé deux séquences oligonucléotidiques 17-mère peu différentes. Elles ont pour motif de base : 3'-d(ZTX XTT TTA TTA AAT TTA)5', où Z représente l'emplacement du motif glycéryle. Elles se distinguent uniquement par deux bases : 3'-d(ZTXX-)5' = ZTTT (**12'**), 3'-d(ZTXX-)5' = ZTCC (**13'**). On prépare de nouveau une séquence active (**13'**), et une séquence de contrôle (**12'**), pour les expériences d'irradiation lumineuses ultérieures (*Partie B*).

Les oligonucléotides sont assemblés sur le support solide modifié, en suivant le protocole classique de synthèse automatisée. Pour cela, le support est placé manuellement à l'intérieur de colonnes spéciales, séchées sous argon, puis installées sur le synthétiseur.

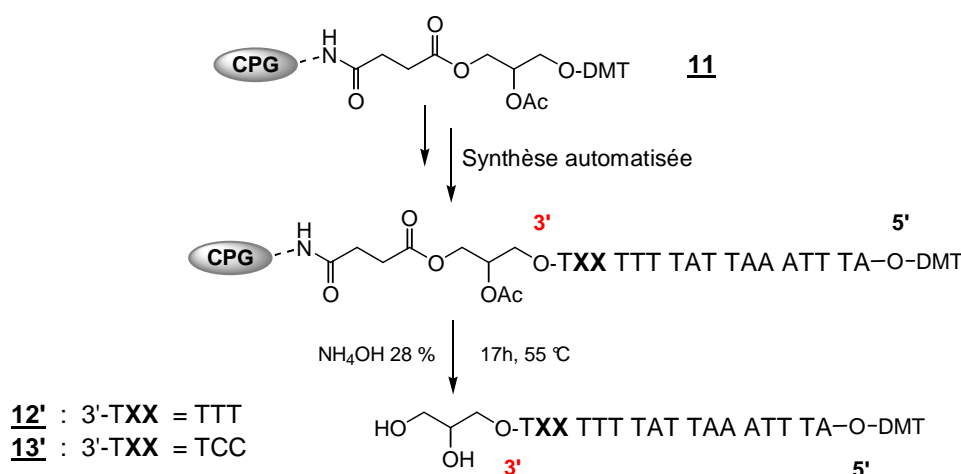


Figure A.II.16 : Préparation des oligonucléotides 1,2-diol à l'extrémité 3' : **12'** et **13'**.

Les composés **12'** et **13'** sont ensuite récupérés en appliquant le traitement ammoniacal habituel, 55° C pendant une nuit. Ces conditions entraînent une rupture de tous les liens esters, et amides. Il y a donc à la fois déprotection des bases et libération du groupe glycéryle. Cette dernière fait suite à la rupture du lien ester qui le lie en partie au support, et l'élimination de l'acétate qui protège l'autre partie. Dans les deux cas, l'efficacité de la synthèse est estimée par une analyse CLHP du brut réactionnel. Le chromatogramme montre l'oligonucléotide attendu sous la forme d'un pic largement majoritaire (*figure A.II.17*).

A partir de la quantité d'oligonucléotide **12** et **13** déterminée par spectroscopie d'absorption, on obtient un rendement moyen de 25% (estimé par rapport à la quantité de support solide initiale et de son taux de substitution théorique).

Il est à noter que les rendements moyens sont presque inférieurs de moitié à ceux obtenus pour la synthèse d'une même séquence, fonctionnalisée à l'extrémité opposée. Par exemple, l'oligonucléotide **3** "5'-d-(YTT TTT TTA TTA AAT TTA)3'" et **12** "3'-d(ZTT TTT TTA TTA AAT TTA)5'" sont synthétisés avec des rendements de 25 et 41 % respectivement. Il en est de même pour les composés **4** "5'-d-(YTC CTT TTA TTA AAT TTA)3'" et **13** "3'-d(ZTC CTT TTA TTA AAT TTA)5'" obtenus avec des rendements respectifs de 25 et 41 %. Certes cet écart doit être légèrement diminué à cause du montage manuel des colonnes dans le cas du support solide modifié, la synthèse des oligonucléotides modifiés à l'extrémité 5' reste néanmoins plus efficace.

b) Etape 2 : Oxydation de la fonction 1,2-diol à l'extrémité 3'

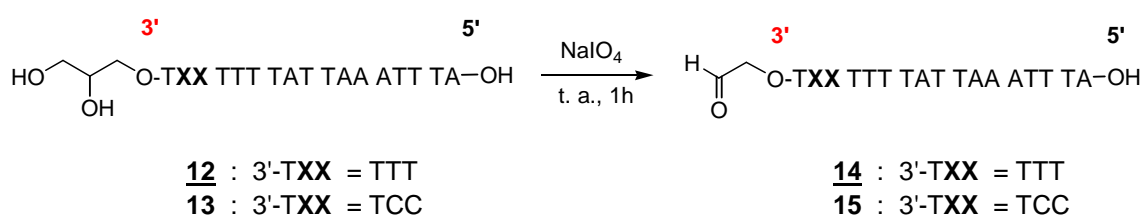


Figure A.II.20 : Formation des "oligonucléotides aldéhyde" à l'extrémité 3' : **14** et **15**.

La fonction aldéhyde est ensuite générée à partir du groupe glycéryle par une oxydation au périodate de sodium aqueux. La réaction est réalisée en présence d'un excès de périodate, 20 équivalents, pendant 1 heure à température ambiante. (Le cheminement synthétique est identique à celui employé pour l'oxydation du groupe 1,2-diol de l'extrémité 5' des oligonucléotides modifiés, détaillé précédemment dans le paragraphe 1.1.3.e du chapitre A.II).

Cette étape d'oxydation sélective du diol terminal est suivie d'une purification par CLHP à polarité de phase inversée. Elle s'avère indispensable pour éliminer le formaldéhyde libéré au cours de la coupure du motif, ainsi que l'excès de périodate de sodium restant. On obtient les oligonucléotides **14** et **15** avec des rendements de 89 et 85 % respectivement.

Ils sont également caractérisés par spectrométrie de masse (électrospray en mode négatif). Par exemple, pour le 17-mère **15** "3'-d(ZTC CT TTA TTA AAT TTA)5'" nous avons une masse calculée de $M = 5246,6$ g/mol et nous obtenons l'ion moléculaire $[M-H^+] = 5245,6$ à partir de ses ions multichargés (4-), (5-), (6-), (7-), (8-) et (9-) visibles sur le spectre de masse (figure A.II.21, b). Il en est de même pour le chromatogramme, on observe qu'un seul produit ($t_R = 12,7$ min, figure A.II.21, a).

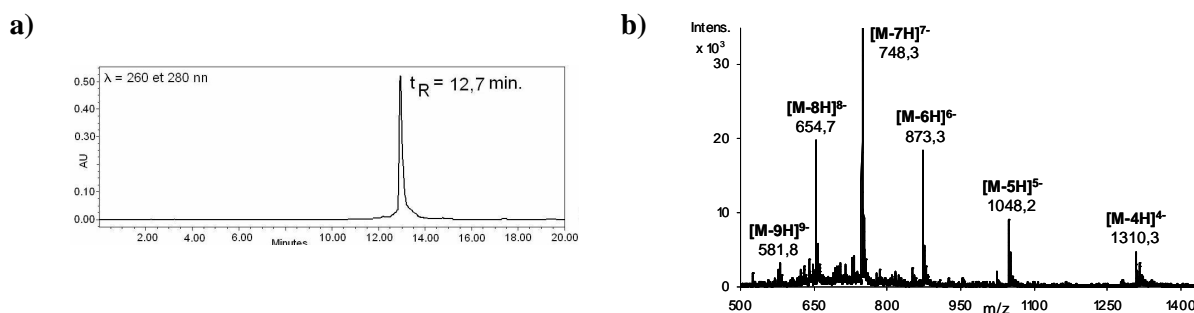


Figure A.II.21 : Analyses du 17-mère **15** après oxydation et purification par CLHP.

a) Chromatogramme CLHP (système d'analyse I₁); et b) Spectre de masse ESI (système d'analyse IV₁).

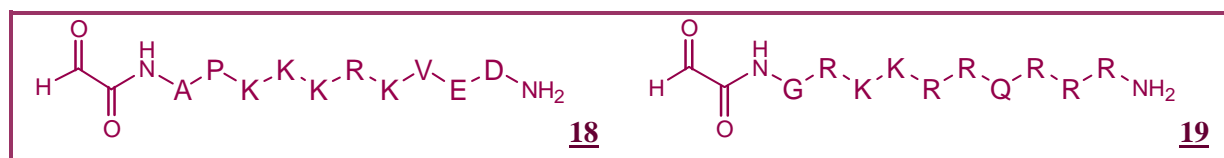
Le spectre de masse électrospray de l'oligonucléotide **15** met en évidence les ions multichargés correspondants à l'adduit sodium du produit, en plus des espèces caractérisant l'oligonucléotide désiré.

~

En résumé, les particularités engendrées par l'utilisation du "support glycéryle" s'intègrent facilement dans le protocole classique de synthèse automatisée des oligonucléotides. Il permet donc l'obtention rapide d'oligonucléotides modifiés à l'extrémité 3' avec 25 % de rendement moyen. Certes, ce rendement est plus faible que celui obtenu pour la fonctionnalisation similaire en 5', il est néanmoins excellent pour ce type de modification. La méthode est très conviviale, et surtout facile à mettre en œuvre en deux étapes à partir du support commercial. L'étape suivante d'oxydation au périodate est très efficace, même sur un groupe 1,2-diol accroché différemment à l'extrémité opposée. Les oligonucléotides sont obtenus avec un bon rendement moyen d'oxydation de 87%.

2 - Synthèse des "peptides aldéhydes"

Dans cette partie, la préparation de 2 peptides porteurs de la fonction aldéhyde est décrite.



Les produits **18** et **19** serviront de "synthons aldéhyde" pour les couplages par éther d'oxime avec les complexes de ruthénium (Partie A, Chapitre IV).

~

2.1 - Rappels bibliographiques concernant l'incorporation de la fonction aldéhyde à l'extrémité N-terminale de peptides

La fonction aldéhyde est un groupe électrophile très employé pour fonctionnaliser les séquences peptidiques. Sa réactivité unique permet d'envisager des synthèses convergentes de macromolécules peptidiques. Leur intérêt est également amplifié par une activité caractéristique en tant qu'inhibiteur de protéase.¹¹⁰

De ce fait, diverses stratégies ont été décrites pour introduire la fonction aldéhyde sur les peptides et les protéines. Dans la littérature, de nombreuses méthodes de fonctionnalisation de l'extrémité C-terminale des peptides sont présentées. Elles procèdent soit de façon pré-synthétique en intégrant un bras espaceur particulier entre le support et le peptide, soit de façon post-synthétique en modifiant l'extrémité C-terminale libérée.¹¹¹ Ce type de modification impose une certaine prudence à cause de l'épimérisation qu'elle peut engendrer au niveau du carbone en α de la fonction aldéhyde. De son côté, l'extrémité N-terminale offre uniquement la possibilité d'introduire le motif aldéhyde de façon post-synthétique, sous forme de précurseur, *via* une réaction d'acylation. La méthode employée doit être sélective afin de ne pas altérer les acides aminés du peptide. Il faut donc éviter d'utiliser la réduction de groupe ester ou amide, par exemple, en présence de glutamate, ou d'asparagine. L'oxydation de

¹¹⁰ Sarubbi, E.; Seneci, P. F.; Angelastro, M. R.; Peet N. P.; Denaro, M.; Islam K. Peptide aldehydes as inhibitors of HIV protease. *FEBS Letts* **1993**; 319, 253–256.

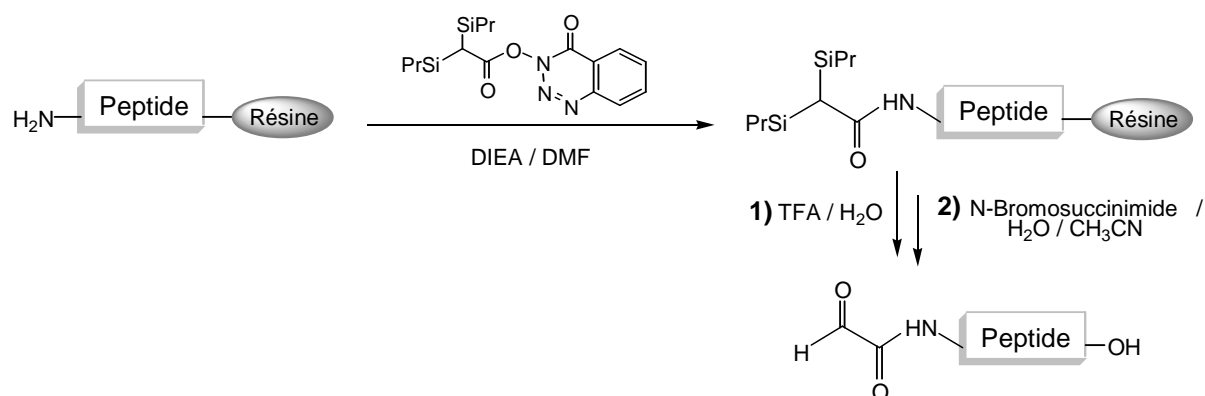
¹¹¹ (a) Melnyk, O.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Gras-Masse, H. Functionalization of Peptides and Proteins by Aldehyde or Keto Groups. *Biopolymers, Pept. Sci.*, **2000**, Vol. 55, 165–186. (b) Virta, P.; Katajisto, J.; Niittymäki, T.; Lönnberg, H. Solid-supported synthesis of oligomeric bioconjugates. *Tetrahedron* **2003**, 59, 5137-5174. (c) Gazal, S.; Masterson, L. R.; Barany, G. Facile solid-phase synthesis of C-terminal peptide aldehydes and hydroxamates from a common backbone amide linked (BAL) intermediate. *J. Pep. Res.* **2005**, 66, 314-332.

fonction alcool est également incompatible avec la présence de la sérine, thréonine, voire même de la cystéine, et de la méthionine.

Certes ces restrictions limitent les possibilités, mais l'utilisation d'un précurseur offre de nombreux avantages attracteurs. En plus d'être facilement incorporé à l'extrémité *N*-terminal en fin de synthèse, il est plus stable que l'aldéhyde, facilitant ainsi l'étape de purification en évitant les réactions non contrôlées.

2. 1. 1. - Incorporation par hydrolyse de groupes acétales

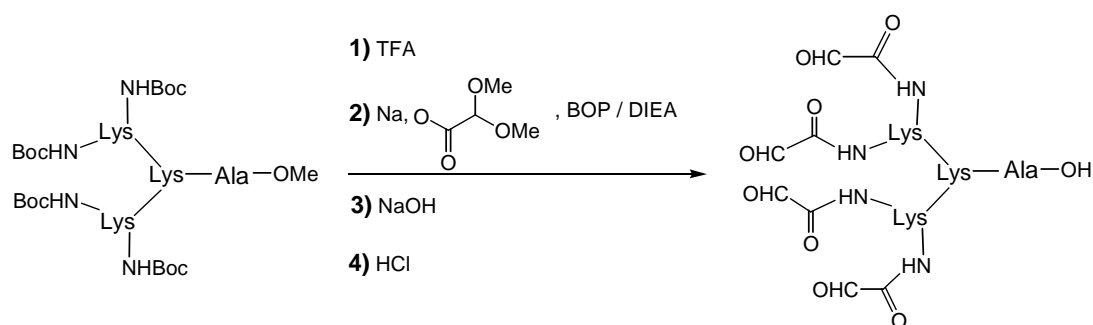
En 1994, l'équipe de Badet a développé l'incorporation d'un dérivé porteur d'un aldéhyde glyoxylique masqué par un groupe thioacétale. Ce type d'acétale possède l'avantage de résister aux conditions acides de déprotection et de libération du peptide. Il permet donc un contrôle total de l'étape de génération de l'aldéhyde. Pour valider leur approche, ils ont préparé ce précurseur sous forme d'ester activé propice à la synthèse peptidique supportée (SPPS).¹¹²



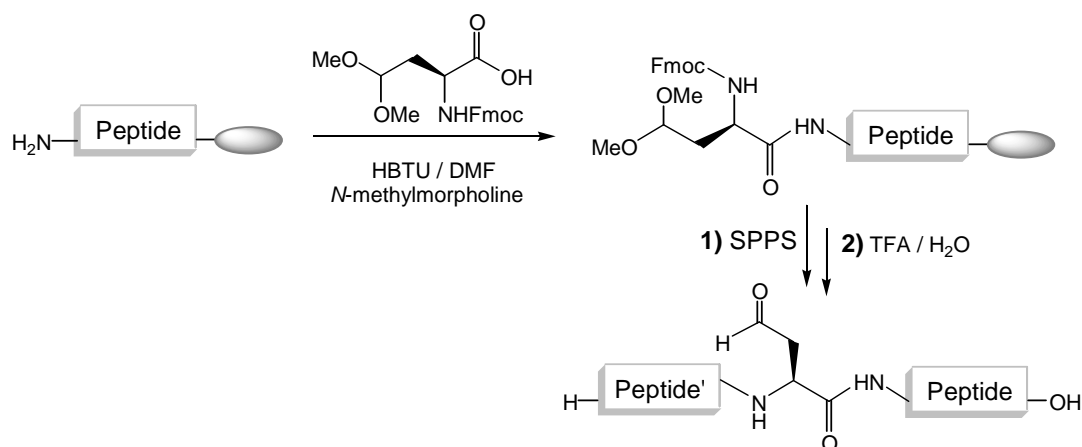
En 1995, l'équipe de Tam a imaginé un peptide tétravalent, porteur de 4 bras dérivatisés par un motif aldéhyde glyoxylique. Il est formé à partir de l'acylation simultanée des 4 fonctions amines de 2 lysines. Pour cela, le diméthoxy-acétate de sodium est incorporé en utilisant le protocole classique de couplage peptidique.¹¹³ L'aldéhyde est ensuite démasqué par acidolyse de l'acétale en présence d'acide chlorhydrique concentré.

¹¹² Qasmi, D.; René, L.; Badet, B. Synthesis of "CHO-CO-peptide" by N-terminal acylation with a glyoxylyl equivalent. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 4343-4344.

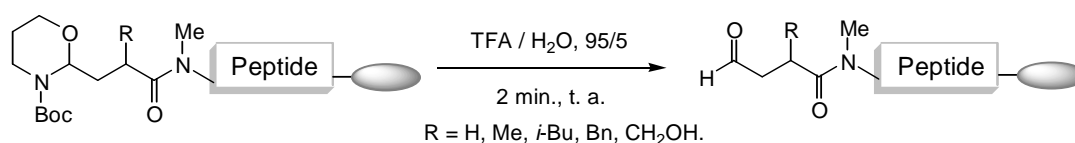
¹¹³ Shao, J.; Tam, J. P. Unprotected Peptides as Building Blocks for the Synthesis of Peptide Dendrimers with Oxime, Hydrazone, and Thiazolidine Linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3893-3899.



En 1999, l'équipe d'Hallberg a élargi ce principe à un mime d'acide aminé. Ce synthon possède l'avantage de pouvoir s'intégrer de façon aléatoire dans la séquence peptidique, par couplage peptidique sur n'importe quelle fonction amine primaire.¹¹⁴



En 2001, l'équipe de Meldal s'est inspirée des travaux d'Agami pour développer un précurseur sous forme de *N*-Boc-*N,O*-acétale.¹¹⁵ Il est facilement incorporé par un lien amide, en utilisant la chimie classique de couplage des acides aminés. L'aldéhyde est ensuite rapidement obtenu par acidolyse. Par contre, il s'avère indispensable de masquer les deux dernières fonctions amides du peptide pour éviter une réaction irréversible avec l'aldéhyde.

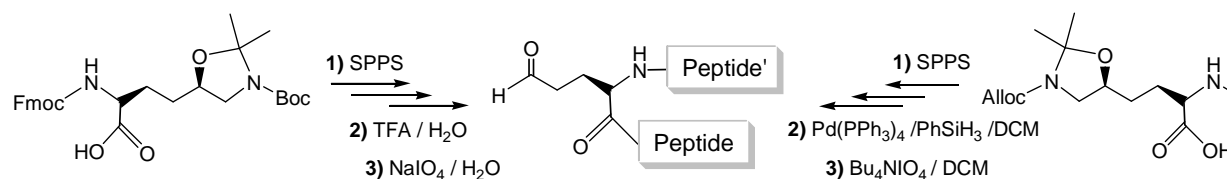


Sur le même principe, l'équipe d'Hoeg-Jensen a intégré une protection *N*-Boc-oxazolidine sur un mime d'acide aminé dérivant de la lysine. L'aldéhyde est obtenu en deux étapes

¹¹⁴ Johannesson, P.; Lindeberg, G.; Tong, W.; Gogoll, A.; Karlén, A.; Hallberg, A. Bicyclic Tripeptide Mimetics with Reverse Turn Inducing Properties. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 601-608.

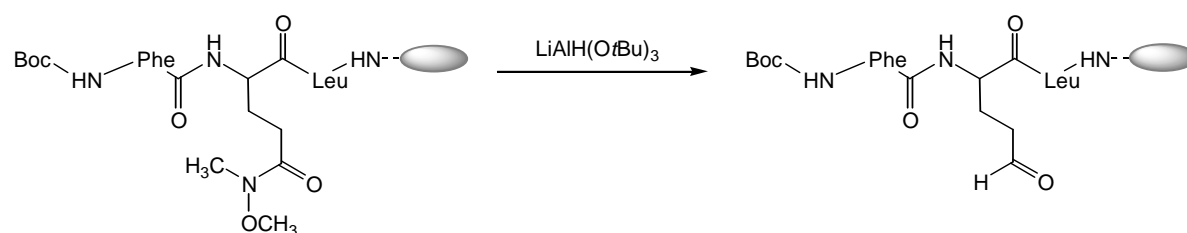
¹¹⁵ (a) Agami, C.; Couty, F.; Mathieu, H. Total synthesis of (-)-Desoxoprosopinine via the diastereoselective reduction of homochiral 2-acyl-*N*-Boc-oxazolidines. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3505-3508. (b) Groth, T.; Meldal, M. *N*-terminal peptide aldehydes as electrophiles in combinatorial solid phase synthesis of novel peptide isosteres. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 45-63.

successives de déprotection, et d'oxydation. Ils ont également élargit la sélectivité du groupement en utilisant l'alloc. Son élimination caractéristique permet de générer le conjugué final, sans décrocher le peptide du support.¹¹⁶



2. 1. 2. - Incorporation par réduction d'un groupe amide

En 1999, l'équipe de Martinez a détourné une méthode efficace d'obtention des groupes aldéhyde à l'extrémité C-terminale par réduction d'amide de Weinreb. Ce type de réduction sélectif est compatible avec la présence des groupes protecteurs ester *tert*-butyle, ou cyclohexyle, classiquement utilisés pour masquer les fonctions acides du peptide.¹¹⁷



2. 1. 3. - Incorporation par oxydation de groupes 1,2-amino alcool, ou 1,2-diol

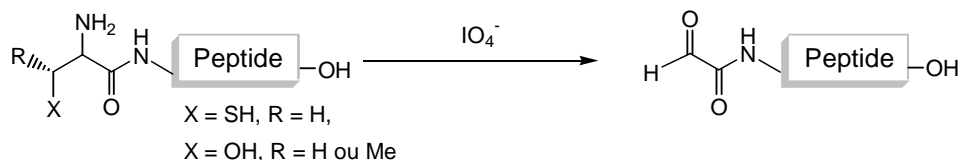
Cette méthode est la plus facilement accessible chimiquement. Elle consiste à oxyder sélectivement au périodate de sodium les groupes 1,2-diol, et 1,2-aminoalcool, ou encore 1,2-aminothiol. Les deux derniers motifs sont naturellement disponibles à partir de résidus sérine, thréonine, et cystéine introduits en utilisant la chimie standard SPPS. Ce type de réaction a été largement utilisé, et optimisé.^{77, 118} A pH neutre, l'oxydation de la sérine en N-terminale est rapide et

¹¹⁶ Spetzler, J. C.; Hoeg-Jensen, T. Masked side-chain aldehyde amino acids for solid-phase synthesis and ligation *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2303–2306.

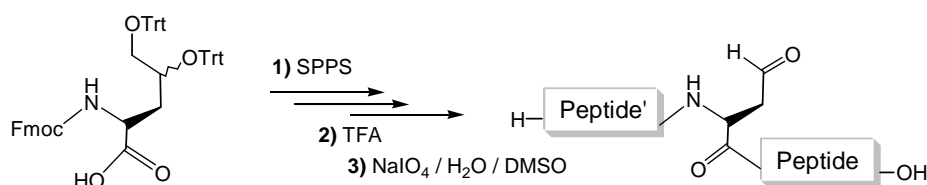
¹¹⁷ Marielle, P.; Douat, C.; Heitz, A.; Gibbons, W.; Martinez, J.; Fehrentz J.-A. Post-synthesis modification of aspartyl or glutamyl residue side-chains on solid support. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5179-5182.

¹¹⁸ (a) Liu, C.F.; Tam, J. P. Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6584-88. (b) Rose, K.; Chen, J.; Dragovic, M.; Zeng, W.; Jeannerat, D.; Kamalaprija, P.; Burger U. New cyclization reaction at the amino terminus of peptides and proteins. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1038-1043.

hautement favorisée. Dans ces conditions, elle s'avère totalement compatible avec les fonctions chimiques portées par certains acides aminés. De plus, elle génère la formation d'un aldéhyde glyoxylique très stable.



En 2001, l'équipe de Hoeg-Jensen a préparé un mime d'acide aminé porteur d'un groupe 1,2-diol. Ce précurseur est facilement incorporé dans les séquences peptidiques par SPPS, l'aldéhyde est ensuite rapidement démasqué par l'oxydation au périodate. Il se démarque des acides aminés naturels, car sa fonction cible n'est pas engagée dans la liaison peptidique. Il permet d'intégrer directement le synthon dérivatisé par l'aldéhyde masqué directement intégré dans la séquence peptidique. Néanmoins, l'oxydation de la sérine en *N*-terminal est 1000 fois plus rapide que celle du diol dans les mêmes conditions.¹¹⁶



2.2 - Présentation de la stratégie utilisée

La stratégie est analogue à celle pratiquée précédemment lors de la synthèse des oligonucléotides modifiés. Les synthons peptidiques fonctionnalisés sont également issus d'une méthode mixte de préparation en phase solide et en solution. La fonction aldéhyde est générée post-synthétiquement suite à la coupure oxydante d'un motif précurseur placé à l'extrémité du peptide. Ce procédé diverge seulement par le choix du motif. Dans ce cas on préconise la fonction 1,2-aminoalcool que représente naturellement l'acide aminé sérine.¹⁰⁸ La coupure oxydante de ce motif par le périodate de sodium forme un aldéhyde glyoxylique extrêmement réactif en présence d'une fonction oxyamine, et il conduit à la formation d'une liaison éther d'oxime glyoxylique particulièrement stable.

Le peptide est tout d'abord assemblé sur le support solide. Il est ensuite décroché et simultanément déprotégé, afin d'obtenir la fonction 1,2-aminoalcool en position *N*-terminale. Le périodate oxyde ensuite le précurseur pour conduire à la fonction aldéhyde escomptée (figure A.II.22).

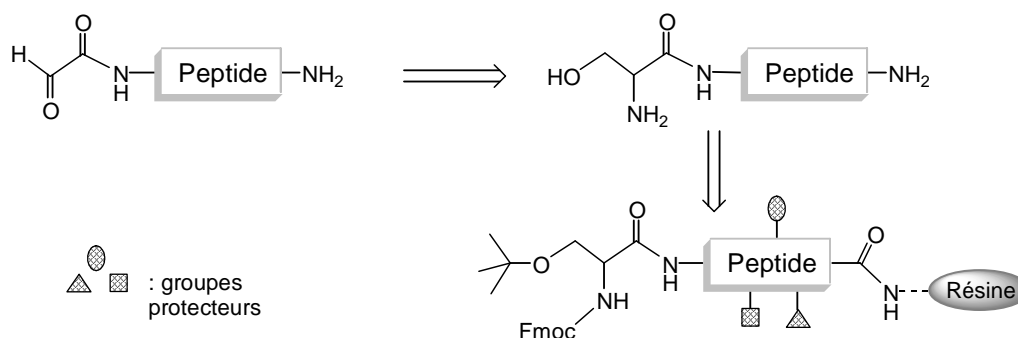


Figure A.II.22: Schéma rétrosynthétique de la préparation des peptides aldéhydiques.

Les peptides sont synthétisés par SPPS¹¹⁹ selon la stratégie Fmoc/tBu, de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale.¹²⁰ On a choisi de les assembler sur une résine Rink amide MBHA[®] afin d'introduire une fonction amide en C-terminale, générant ainsi une extrémité hydrophobe.¹²¹ Ce type de groupement offre aux peptides une meilleure activité métabolique. Dans ce cas, il faut tout d'abord éliminer le groupe protecteur Fmoc masquant la fonction amine d'ancrage du peptide sur la résine. Cette étape permet de déterminer le taux de substitution initial du support, en effectuant le dosage spectrométrique ($\lambda = 299$ nm) de l'adduit dibenzofulvène/pipéridine libéré. Le premier acide aminé est ensuite introduit classiquement par une réaction d'estérification entre la fonction amine de la résine et le groupe carboxyle de l'acide aminé en présence d'un agent de couplage, le PyBOP[®] (figure A.II.23).

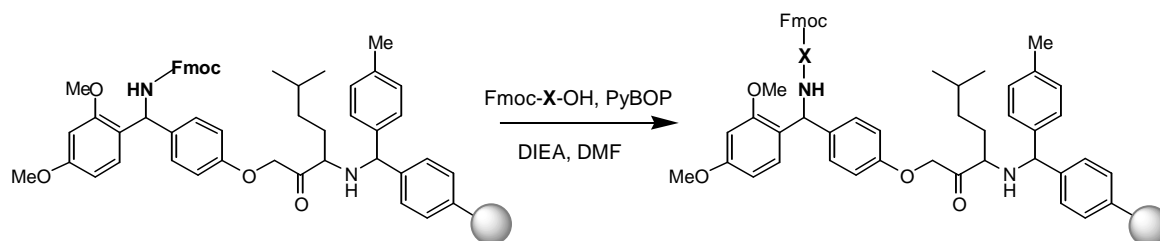


Figure A.II.23 : Assemblage du premier acide aminé sur la résine Rink-amide MBHA[®].

Les deux synthèses divergent seulement par rapport à la technique d'assemblage des peptides linéaires protégés. Le peptide "NLS", spécifique de la transfection nucléaire, est préparé manuellement. Alors que le peptide "Tat", spécialisé dans la délivrance transmembranaire, est assemblé de façon automatisée.

¹¹⁹ Merrifield, M. D. Solid phase synthesis (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 789-810.

¹²⁰ Fields, G. B.; Noble, R. L. Solid-phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.

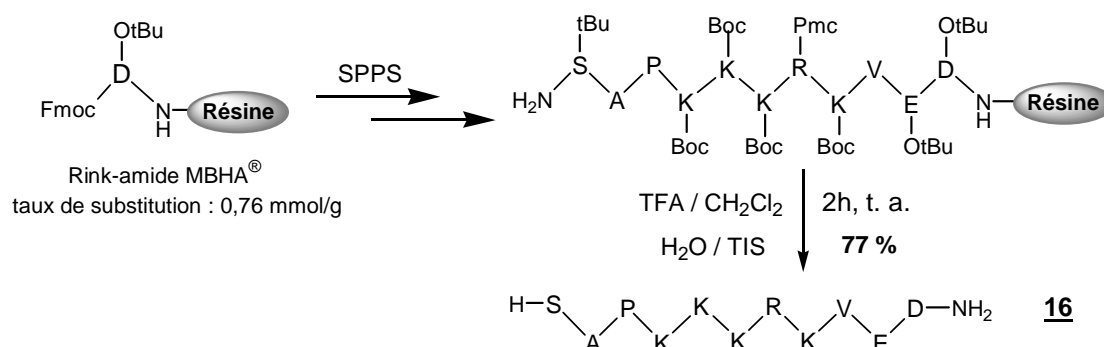
¹²¹ Nicolas, E.; Clemente, J.; Perello, M.; Albericio, F.; Pedrosa, E.; Giralt, E. A new approach to the solid-phase peptide synthesis of peptide alkyl-amides and esters. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2183-2186.

2.3 - Préparation des "peptides aldéhydes" en N-terminal

2.3.1. - Synthèse du peptide "NLS" aldéhyde **17**

a) Préparation du peptide "NLS" précurseur **16**

Le synthon "NLS" $N\alpha$ -aldéhyde **17** est préparé à partir de la séquence linéaire H-SAPKKKRKVED-NH₂ **16**. Celle-ci est obtenue manuellement selon les méthodes classiques de SPPS en stratégie Fmoc/*t*Bu à partir d'une résine de type Rink amide MBHA[®].



SPPS : 1) Pipéridine / DMF (1/4) ; 2) Fmoc-D-OH (2 éq.), PyBOP[®] (2 éq.), DIEA (3 éq.), DMF.

Figure A.II.24 : Synthèse du peptide linéaire **16**.

Les cycles de déprotection du groupement protecteur Fmoc, en position $N\alpha$ des acides aminés, sont effectués avec une solution de pipéridine à 20 % dans le DMF. Le dosage spectrométrique ($\lambda = 299$ nm) de l'adduit dibenzofulvène/pipéridine formé permet de suivre le taux de substitution de la résine au fur et à mesure de l'élongation de la séquence. Cette méthode est tout d'abord appliquée afin de déprotéger la fonction amine primaire du support. Cette première étape permet ainsi de déterminer précisément le taux de substitution initial. Les couplages peptidiques sont réalisés au moyen de l'agent activateur PyBOP^{®122} et en présence d'un excès de réactifs (typiquement 2 équivalents d'acide aminé protégé et d'agent de couplage). Chaque étape est contrôlée par les tests colorimétriques classiques de Kaiser¹²³ ou de TNBS¹²⁴ sur un petit échantillon de résine prélevé. Un suivi CLHP est réalisé ponctuellement pour conforter certains tests colorimétriques ambigus.

¹²² Coste, J.; Le Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP : a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205-208.

¹²³ Kaiser, E.; Colecott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino group in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, 34, 595-598.

¹²⁴ Hancock, W. S.; Battersby, J. E. A new micro-test for the detection of incomplete coupling reaction in solidphase synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* **1976**, 71, 261-264.

Onze cycles de couplage successifs sont nécessaires pour obtenir le peptide précurseur. Il reste la dernière étape d'élimination du groupe Fmoc *N*-terminal pour achever la partie supportée de la synthèse. Ce dernier traitement à la pipéridine permet de libérer le motif 1,2-aminoalcool cible.

Le peptide est ensuite décroché de la résine et totalement déprotégé par acidolyse au moyen de l'acide trifluoroacétique à 95 % dans le dichlorométhane. L'utilisation d'agents nucléophiles, H₂O et TIS, est indispensable pour piéger les carbocations *tert*-butyle libérés.¹²⁵ La protection de l'arginine avec le Pmc (2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulfonyl) impose ces conditions acides concentrées en TFA. Ce traitement n'est pas contraignant puisque le peptide est mono-fonctionnalisé à l'extrémité *N*-terminale. Il n'y a donc aucune déprotection sélective à réaliser. On laisse agir l'acidolyse 2 heures à température ambiante pour éliminer efficacement toutes les protections. La solution est récupérée, concentrée sans précaution particulière. Le peptide **16** est finalement obtenu sous la forme d'un sel d'acide trifluoroacétique, après purification CLHP et précipitation à l'éther, avec un rendement de 77 %. Il est analysé par CLHP et caractérisé par spectrométrie de masse, où il est identifié par ses ions multichargés (2+), (3+), et (4+), sans détecter l'ion moléculaire (*figure A.II.25*).

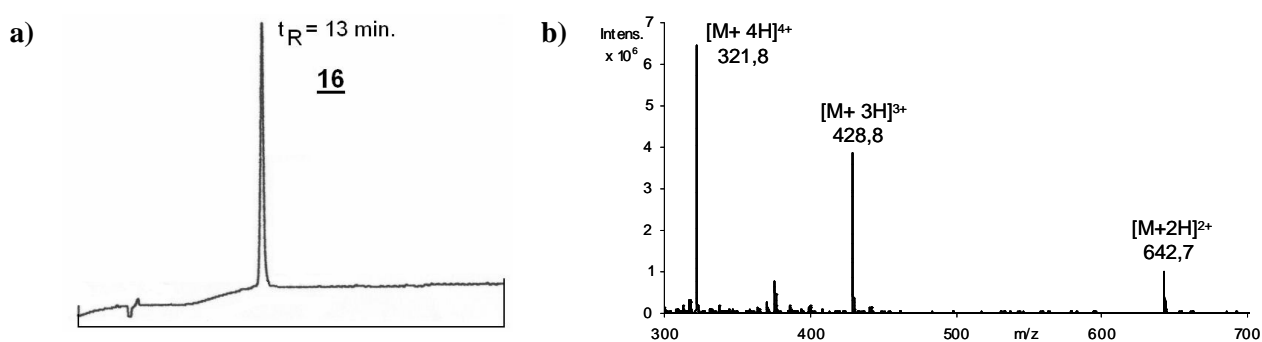


Figure A.II.25 : Caractérisation du peptide **16** isolé.

a) Chromatogramme d'analyse CLHP (système I₂); b) Spectre de SM-ESI (système IV₂).

b) Préparation du peptide "NLS" aldéhyde **17**

La fonctionnalisation de la séquence sur l'extrémité *N*-terminale par la fonction aldéhyde glyoxylique est générée par coupure oxydante du résidu sérine. Celle-ci est réalisée dans l'eau en présence d'un excès de périodate de sodium (~ 3 éq.).

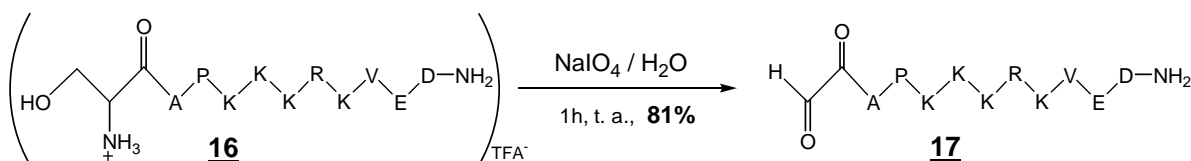


Figure A.II.26 : Synthèse du peptide *N*^α-glyoxaldéhyde **17**.

¹²⁵ Pearson, D. A., Blanchette, M., Baker, M. L., and Guindon, C. A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2739-2742.

L'évolution de la réaction est déterminée par CLHP, elle est complète après 1 heure. Elle est suivie par une étape de purification indispensable pour éliminer les sels d'iode, NaIO_4 en excès et NaIO_3 formé, ainsi que le formaldéhyde libéré. Le composé **17** est obtenu avec un rendement de 81 % (rendement de l'étape d'oxydation). Il est caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif, où il est détecté sous forme d'hydrate (figure A.II.27).

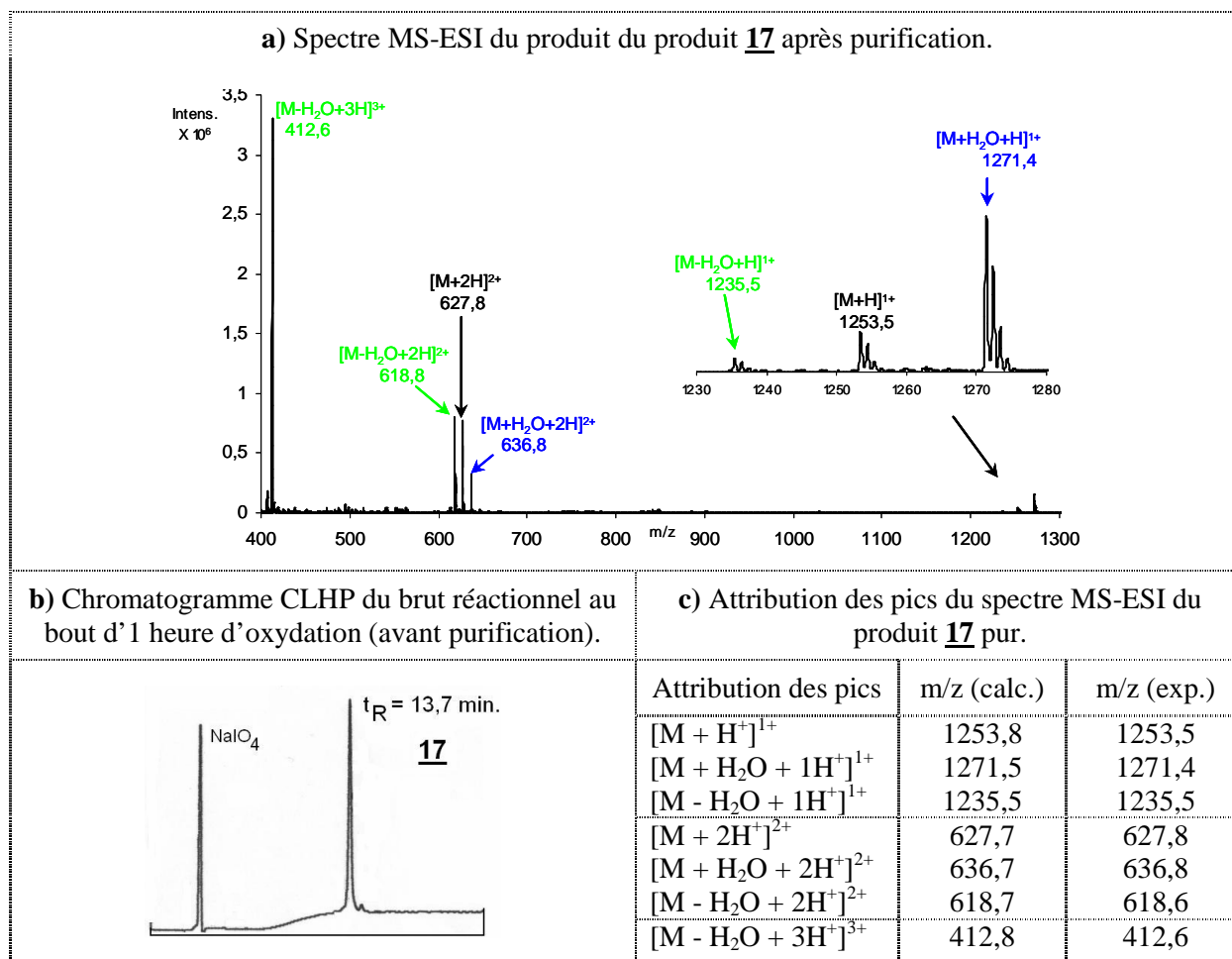
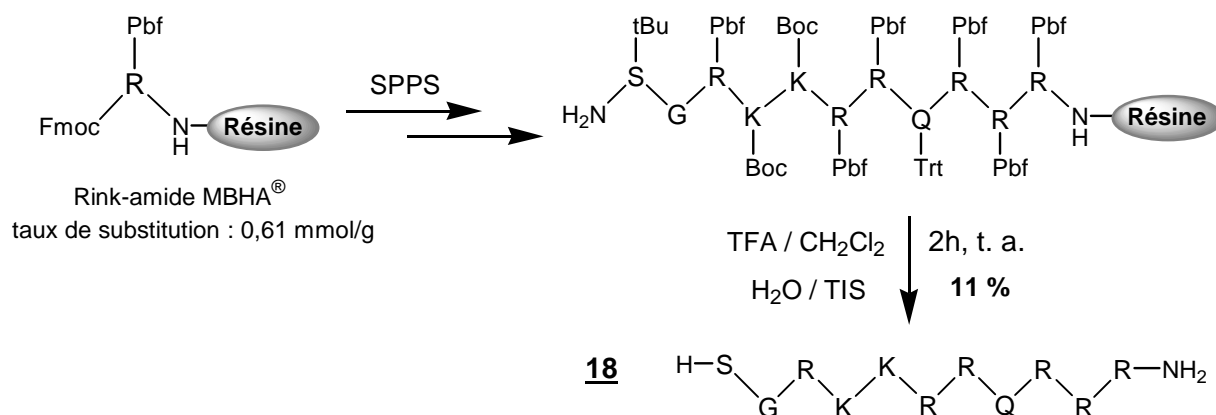


Figure A.II.27 : Caractérisation du peptide **17**. a) Spectre de SM-ESI (système IV₂) ; b) Chromatogramme d'analyse CLHP (système I₂) ; c) Attribution des pics du spectre de SM-ESI.

2. 3. 2. - Synthèse du peptide "Tat" aldéhyde

a) Préparation du peptide "Tat" précurseur **18**

Le synthon "Tat" α -aldéhyde **19** est préparé quant à lui à partir de la séquence linéaire H-SGRKKRRQRRR-NH₂ **18**. L'élongation du peptide protégé est réalisée automatiquement par SPPS selon la procédure Fmoc/tBu, sur la résine Fmoc-Rink amide MBHA[®].



SPPS : 1) Pipéridine / DMF (1/4) ; 2) Fmoc-R-OH (2 éq.), PyBOP (2 éq.), DIEA (3 éq.), DMF.

Figure A.II.28 : Synthèse du peptide linéaire **18**.

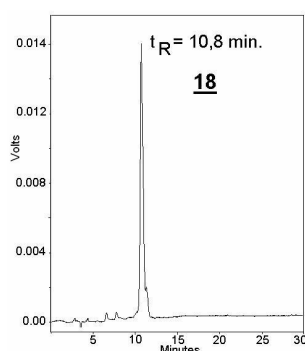
Le peptide est assemblé par des cycles répétés de couplage/déprotection, en utilisant le duo classique PyBOP[®]/pipéridine. Le synthétiseur impose certaines modifications pratiques, comme le doublement systématique des étapes de couplage. Pour chaque bloc, on utilise des excès comparables en acide aminé, PyBOP[®], et DIEA de 2,3 équivalents chacun en solution dans le DMF. Les quantités nécessaires sont déterminées post-synthétiquement à partir du taux de substitution théorique de la résine (estimé à 0,8 mmol/g). A la fin du premier couplage, les solutions de pipéridine issues de la déprotection du Fmoc sont récoltées afin d'évaluer le taux de substitution réel. La synthèse se fait également en 11 étapes successives. La résine est ensuite transférée dans un réacteur, où le peptide **18** est récupéré grâce à une solution concentrée de TFA à 95 %, en présence des nucléophiles classiques (TIS et H₂O). Ce traitement permet alors simultanément de décrocher le peptide du support et de déprotéger complètement tous les résidus. C'est également le groupe protecteur de l'arginine, le Pbf : 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl, qui impose ces conditions acides concentrées en TFA pendant 2 heures. Le peptide linéaire est obtenu avec un rendement global de 11 %, après purification et précipitation à l'éther.

Ce modeste rendement peut s'expliquer par la présence de 5 résidus arginine dans la séquence. Ces acides aminés sont particulièrement encombrant à cause de leur propre structure, et cet effet est augmenté par les groupes protecteurs macrocycliques Pbf. Et de plus, l'enchaînement de 3 résidus en début de séquence nuit irrémédiablement au taux de substitution de la résine. D'ailleurs une synthèse similaire manuelle de ce peptide entraîne également un rendement faible.⁽ⁱ⁾

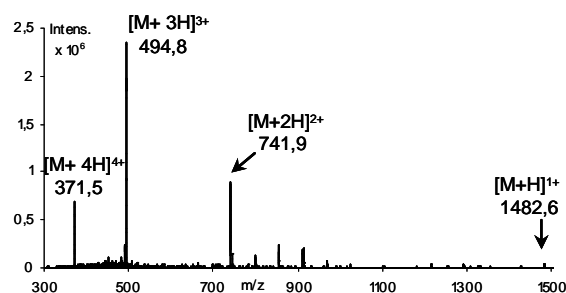
Il est ensuite analysé par CLHP et caractérisé par spectrométrie de masse (figure A.II.29). On observe de façon moins intense l'ion moléculaire [M+H]⁺ = 1482,6 par rapport à ses ions multichargés caractéristiques, (2+), (3+), et (4+) (figure A.II.29, b).

⁽ⁱ⁾ Forget, D., thèse de doctorat, 2002, LEDSS, UJF Grenoble. Rendement de 46 % après la synthèse manuelle du peptide par SPPS selon la procédure Fmoc/tBu, sur la résine Fmoc-Rink amide MBHA[®] (chapitre II).

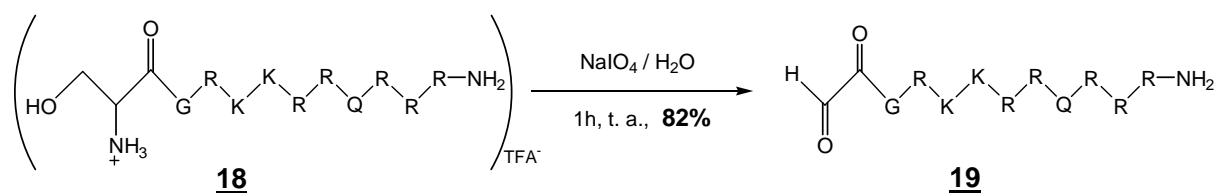
a) Chromatogramme d'analyse CLHP



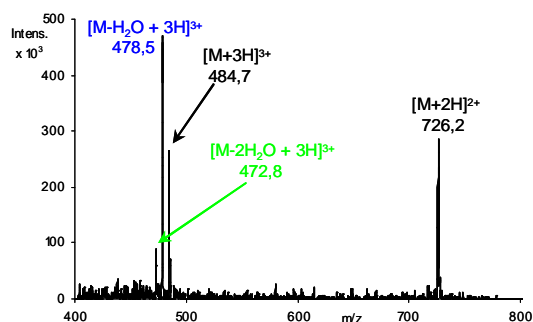
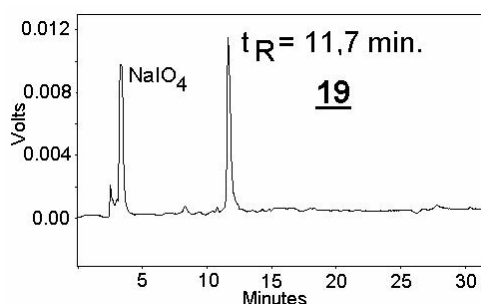
b) Spectre de SM-ESI.

Figure A.II.29 : Caractérisation du peptide **18** isolé.a) Chromatogramme d'analyse CLHP (système I₂); b) Spectre de SM-ESI (système IV₂).b) Préparation du peptide "Tat" aldéhyde **19**

La fonction aldéhyde glyoxylique est obtenue par l'oxydation au périodate du résidu sérine. Elle est réalisée selon le protocole similaire à celui utilisé précédemment pour préparer le composé **17** : en milieu aqueux et en présence de 3 éq. d'oxydant.

Figure A.II.30 : Synthèse du peptide *N*^α-aldéhyde **19**.

Le suivi par analyse CLHP du brut réactionnel confirme que l'oxydation est totale après une heure de réaction. L'aldéhyde glyoxylique correspondant **19** est finalement obtenu avec un rendement de 82 % (rendement de l'étape d'oxydation). Il est également caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif, où il est détecté sous forme d'hydrate.

Figure A.II.31 : Caractérisation du peptide **19**.a) Chromatogramme d'analyse CLHP (système I₂); b) Spectre de SM-ESI (système IV₂).

Dans ce cas, les espèces multichargées issues de l'analyse par spectrométrie de masse du peptide aldéhyde **19** se caractérisent jusqu'à la perte de deux molécules d'eau. Ce phénomène est dû à la technique d'ionisation par électrospray qui exalte l'équilibre de solvation entre la forme carbonylée de l'aldéhyde et sa forme gem-diol.¹²⁶ Techniquement, on retrouve donc les deux espèces en phase gazeuse dans la source du spectromètre après pulvérisation du solvant. Elles vont être ensuite indistinctement fragmentées pour donner les espèces chargées visibles sur le spectre.

~

En résumé, la dérivatisation d'un peptide par le motif aldéhyde est très efficace et facile d'accès selon la procédure appliquée. Il suffit d'intégrer les groupe 1,2-aminoalcool précurseur à l'extrémité du peptide en fin de synthèse sous la forme naturelle de la sérine. Néanmoins, la préparation du peptide Tat s'avère plus délicate à cause de l'enchaînement néfaste de 3 acides aminés arginines dont le motif guanidine est protégé par un groupement très encombrant. L'étape ultérieure oxydante au périodate de sodium est rapide et compatible avec le peptide totalement déprotégé, permettant ainsi de former avantageusement l'aldéhyde en toute fin de synthèse. Les peptides aldéhydes sont finalement obtenus avec un bon rendement moyen d'oxydation de 81 %.

Cette méthode conviviale est d'autant plus intéressante qu'elle permet d'envisager l'incorporation éventuelle du motif aldéhyde n'importe où dans la séquence peptidique, le cas échéant.

¹²⁶ Buré, C.; Gobert, W.; Lelièvre, D.; Delmas, A. In-source fragmentation of peptide aldehydes and acetals: influence of peptide length and charge state. *J. Mass Spectrom.* **2001**; *36*, 1149–1155.

Conclusion

Les différentes méthodes abordées témoignent de la polyvalence de l'insertion d'un motif aldéhydique à l'extrémité de biomolécules. Il est incorporé sous la forme d'un même précurseur glycéryle, ancré indifféremment à l'extrémité d'oligonucléotides, et de peptides avec une grande efficacité. L'aldéhyde est ensuite facilement démasqué par la coupure oxydative spécifique de ce motif. D'ailleurs l'approche à l'extrémité 3' d'oligonucléotides se fait simplement selon la procédure classique de synthèse automatisée d'oligonucléotides sur un support solide particulier, incluant le groupe 1,2-diol, dont le principal avantage réside dans sa disponibilité commerciale.

Il est à noter que les oligonucléotides 1,2-diol sont extrêmement stables, voire même pendant un temps relativement long de stockage. On n'observe pas l'hémiacétalisation du groupe 1,2-diol, ni son élimination, comme précédemment observé pour le motif 1,2-aminoalcool utilisé au laboratoire.

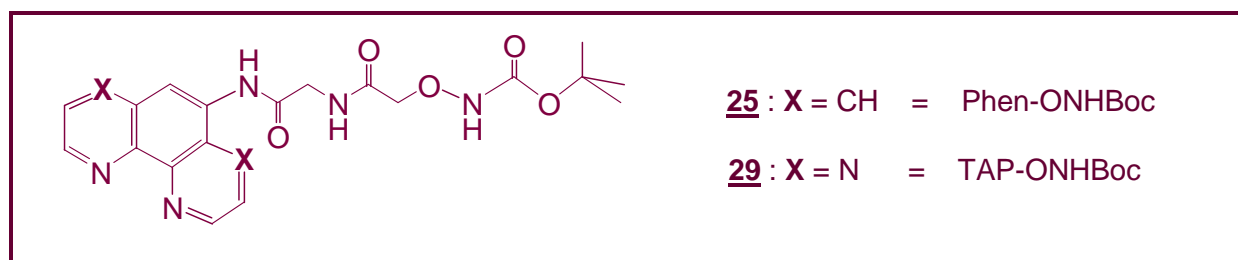
L'ancrage de ces synthons aldéhyde aux complexes sera exposé au chapitre IV. Les résultats des études photochimiques et photophysiques des conjugués ainsi obtenus seront présentés dans la partie B.

Chapitre III : Préparation des "complexes de ruthénium(II) oxyamines"

L'une des deux étapes préliminaires pour la synthèse des conjugués consiste à mettre au point la fonctionnalisation des complexes polyazaaromatiques de ruthénium(II) par le groupe nucléophile. Nous avons choisi de préparer deux nouveaux complexes en fixant la fonction oxyamine protégée sous forme de carbamate sur deux types de coordinats du ruthénium : le ligand 1,10-phénanthroline et le ligand 1,4,5,8-tétraazaphénanthrène. Dans un premier temps, ce chapitre relate la fonctionnalisation des ligands, avant de détailler leur incorporation dans les complexes du ruthénium, pour terminer par la libération de l'oxyamine.

1 - Synthèse des ligands fonctionnalisés⁽ⁱ⁾

Dans cette première partie, la préparation des 2 ligands du ruthénium est décrite.



Les produits **25** et **29** sont ensuite envoyés à Bruxelles pour permettre la synthèse des complexes de ruthénium correspondants (Paragraphe A.III.2).

~

⁽ⁱ⁾ Les ligands sont notés Phen-ONHBoc et TAP-ONHBoc quand ils sont porteurs de la fonction oxyamine protégée à l'extrémité du chaînon fonctionnalisé, alors qu'il seront notés Phen" et TAP" quand ils sont porteurs de la fonction oxyamine libre.

Les groupes nucléophiles oxyamine sont introduits, indifféremment sur le ligand Phen : 1,10-phénanthroline, ou TAP : 1,4,5,8-tétraazaphénanthrène, sous forme *N*-Boc monoprotégés.¹²⁷ La méthode mise en oeuvre permet de préparer les synthons **25** et **29**, en seulement 4 étapes successives à partir des amines cycliques correspondantes (*figure A.III.1*).

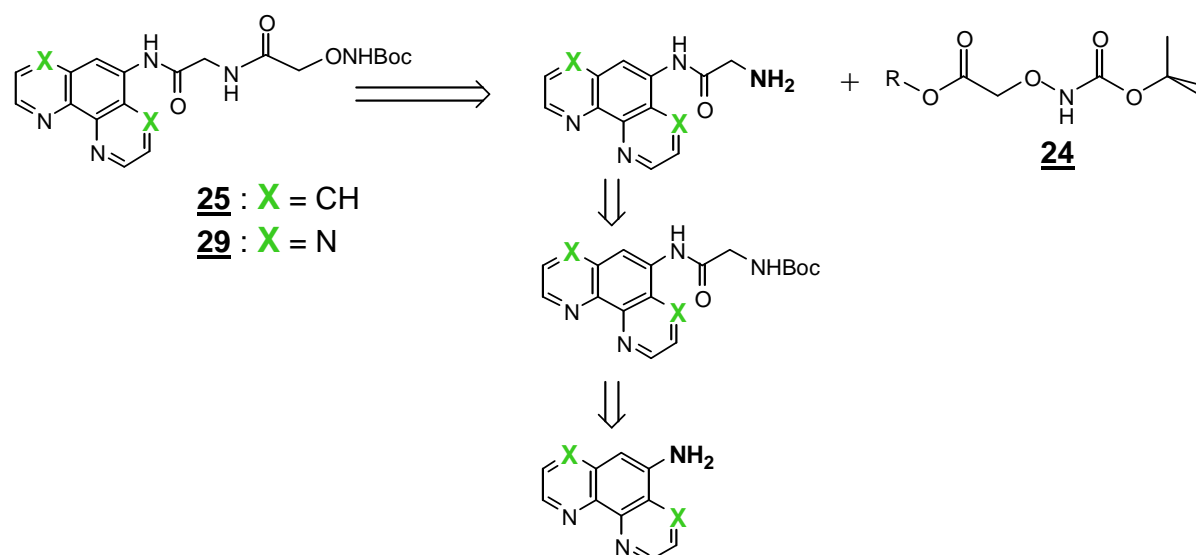


Figure A.III.1 : Schéma rétrosynthétique de la préparation des "ligands oxyamines".

Cette succession d'étapes s'est imposée à cause de la formulation du composé porteur de la fonction oxyamine **24** choisi. Son incorporation requiert une réaction d'acylation entre sa forme activée et la fonction amine visée. Le procédé le plus rapide consisterait à l'ancrer directement sur l'amine aromatique. Malheureusement le caractère aromatique de l'amine exo cyclique lui fait perdre de sa nucléophilie. En effet, cette fonction amine primaire est désactivée à cause de la délocalisation de son doublet non-liant dans les cycles aromatiques adjacents. Le couplage direct se retrouve donc très défavorisé, à moins d'avoir recours à un fort excès d'ester activé du précurseur de l'oxyamine **24**. Cette possibilité rendrait la réaction fastidieuse, et surtout très onéreuse. De ce fait, il a fallu envisager une méthode indirecte. Dont la première étape reste la réaction d'acylation délicate de l'amine aromatique. Par contre, elle est réalisée à partir de l'anhydride mixte dérivant de la glycine. Cette astuce permet de s'affranchir de la faible réactivité de l'amine grâce à un excès contrôlé de réactif bon marché. De plus, elle permet d'introduire une nouvelle fonction amine, idéale pour intégrer ensuite le "synthon oxyamine" **24**, grâce à une seconde acylation.

¹²⁷ Deroo, S.; Defrancq, E.; Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmeaker, A.; Dumy, P. Synthesis of an oxyamino-containing phenanthroline derivative for the efficient preparation of phenanthroline oligonucleotide oxime conjugates. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8379–8382.

La fonction amine primaire est donc le pilier central de la stratégie développée. Elle permet d'accéder à la fonctionnalisation du composé aromatique par l'assemblage successif de fragments *via* deux réactions d'acylation. La fonction amine aromatique étant peu réactive, nous avons choisi d'accrocher un chaînon glycidyl pour incorporer une amine aliphatique plus réactive. En effet, la réaction de cette amine aromatique avec des précurseurs activés du motif oxyamine s'avère inefficace. De plus, le lien glycidyl ainsi formé offre deux liaisons amides intéressantes pour leur importante stabilité. Elles donnent également une certaine rigidité au bras portant la fonction oxyamine.

1.1 - Synthèse du "ligand 1,10-phénanthroline oxyamine" 25

Ce ligand est synthétisé en 4 étapes à partir du précurseur 5-nitro-1,10-phénanthroline commercial. Sa disponibilité évite une étape délicate de préparation à partir de la 1,10-phénanthroline, en milieu acide concentré et à haute température.¹²⁸ L'avancement des différentes phases est déterminé par chromatographie, soit par CCM, soit CLHP en phase inverse et chaque intermédiaire est caractérisé par RMN ¹H et ¹³C.

1. 1. 1. - 5-amino-1,10-phénanthroline 20

La 5-amino-1,10-phénanthroline 20 est obtenu par la réduction du groupe nitro exocyclique, avec l'hydrate d'hydrazine comme donneur d'hydrogène. La réaction est effectuée dans l'éthanol absolu en présence d'une quantité catalytique de palladium sur charbon (Pd/C), et en chauffant 3 heures à 70 °C (*figure A.III.2*).¹²⁹

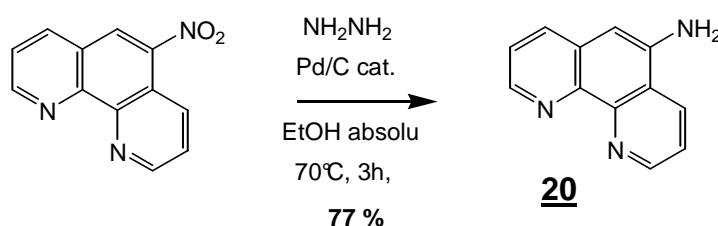


Figure A.III.2 : Etape 1, synthèse de la phénanthroline 20.

La phénanthroline 20 est isolée par précipitation avec un rendement de 77 %.

¹²⁸ Smith, G. F.; Cagle, F. W. J. The improved synthesis of 5-nitro-1,10-phenanthroline. *J. Org. Chem.* **1947**, *12*, 781-784.

¹²⁹ Lecomte, J. P.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Demeunynck, M.; Lhomme, J. J. Synthesis and characterisation of a new DNA-binding bifunctional ruthenium(II) complex. *Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1993**, *89*, 3261-3269.

1. 1. 2. - Introduction de la glycine protégée **21**

La première acylation s'effectue en utilisant l'anhydride de *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)glycine **21**.¹³⁰ Ce dernier est formé en faisant réagir un double excès d'acide correspondant avec le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide comme agent activateur (*figure A.III.3, a*). Une fois formé, l'anhydride de glycine **21** est concentré, et immédiatement ajouté au composé **20** en solution (*figure A.III.3, b*). Trois cycles d'addition consécutifs de l'anhydride **21** sont ensuite nécessaires pour obtenir un taux de conversion maximal de **20** en **22**. Chaque cycle correspondant à l'ajout de deux équivalents de **21** par rapport à la quantité de **20**. Cette consommation excessive de l'anhydride s'explique par la faible réactivité de l'amine exo cyclique. On réalise seulement des additions successives de 2 équivalents d'anhydride **21** pour éviter d'éventuelles bis-acylation secondaires de l'amine libre. L'évolution de la réaction est déterminée par CLHP. Le composé **22** est finalement obtenu après 45 heures de réaction et 6 équivalents d'anhydride **21**, sous forme d'une huile épaisse orangée. Il est donc longuement séché sous pression réduite afin d'obtenir une "pseudo-poudre". L'analyse RMN du proton (300MHz, *d*₆-DMSO) du produit résultant a permis de confirmer la présence d'une seule extension oxyamine. Le groupe oxyamine est facilement apparent sur le spectre grâce au signal caractéristique du groupe *tert*-butyle du Boc à 1,43 ppm. Mais elle a révélé la présence d'impuretés qui ont ensuite été éliminées par chromatographie sur gel de silice.

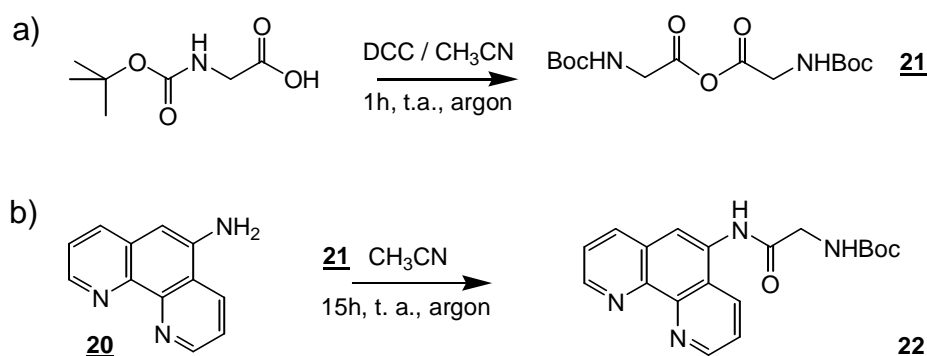


Figure A.III.3 : Etape 2, synthèse de la phénanthroline **22**.

1. 1. 3. - 5-(glycinamido)-1,10-phénanthroline **23**

La fonction amine à l'extrémité de l'extension est ensuite libérée. Pour cela, le groupement protecteur Boc est éliminé par acidolyse dans l'acide trifluoroacétique aqueux à 50 %. Au

¹³⁰ Chen, C. H. B.; Sigman, D. S. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper: sequence-specific targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 7147-7151.

cours de cette étape, l'eau sert de nucléophile piègeur de carbocations *tert*-butyle libérés, empêchant ainsi l'alkylation des fonctions amines.

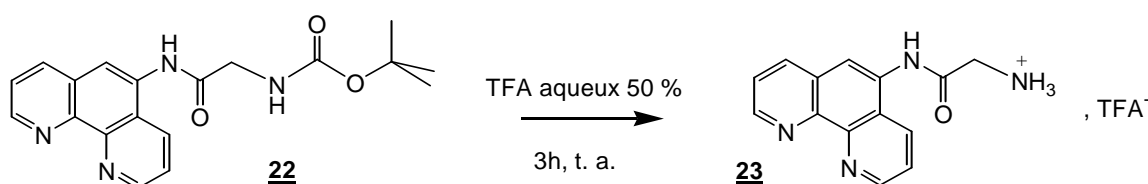


Figure A.III.4 : Etape 3, synthèse de la phénanthroline **23**.

Après 3 heures à température ambiante, et concentration, le produit **23** est récupéré sous forme de "gomme orange". La présence de l'amine libre est confirmée par la disparition du signal du *tert*-butyle à 1,43 ppm dans le spectre de RMN du proton.

1. 1. 4. - Introduction du motif oxyamine protégé **25**

La phénanthroline **23** est ensuite directement soumise à l'acylation finale. Cette ultime étape de fixation du groupe fonctionnel oxyamine est réalisée au moyen d'un ester activé *N*-Boc-aminooxysuccinimide. Pour cela, il faut au préalable préparer l'ester activé adéquat **24**.¹³¹ On choisit de réaliser une estérification en une seule étape à partir de l'acide aminoxyacétique commercial porteur d'une fonction oxyamine masquée par un groupement protecteur Boc.¹³² Sa fonction acide carboxylique libre est tout d'abord activée par le carbodiimide (DCC). Elle est suivie d'une transestérification pour former l'ester succinimide (figure A.III.5).

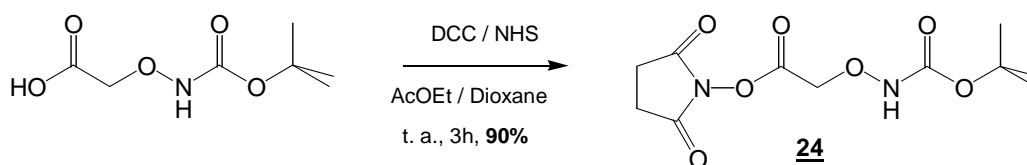


Figure A.III.5 : Schéma de synthèse de l'ester de succinimidyle du *N*-Boc-*O*-(carboxyméthyl)hydroxylamine.

Au bout de 5 minutes à 0°C, on voit apparaître la *N,N'*-dicyclohexylurée résiduelle non soluble dans le milieu réactionnel. Après 3 heures d'agitation à température ambiante, filtration, traitement et précipitation, on obtient l'ester **24** sous forme de poudre blanche avec un rendement de l'ordre de 90

¹³¹ Ide, H.; Akamatsu, K.; Kimura, Y.; Michiue, K.; Makino, K.; Asaeda, A.; Takamori, Y.; Kubo, K. Synthesis and damage specificity of a novel probe for the detection of abasic sites in DNA. *Biochem.* **1993**, 32, 8276-8283.

¹³² Vilaseca, L. A.; Rose, K.; Werlen, J. R.; Meunier, A.; Offord, R. E.; Nichols, C. L.; Scott, W. L. Protein conjugates of defined structure: synthesis and use of a new carrier molecule. *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 515-520.

%. Le produit **24** est caractérisé par RMN du proton dans le CDCl_3 par la présence de quatre singulets, correspondants aux quatre groupes de protons de la molécule.

L'ester activé **24** est ensuite engagé dans la dernière étape de formation du ligand **25**.

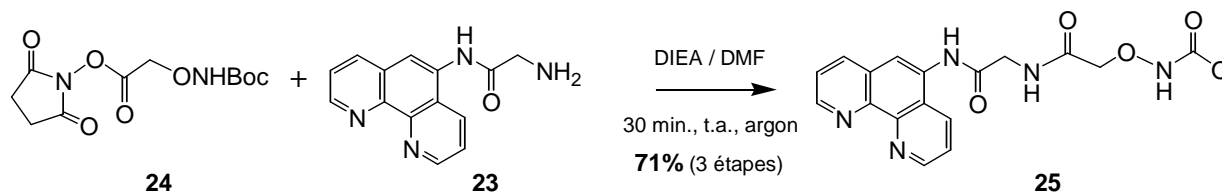


Figure A.III.6 : Etape 4, synthèse de la phénanthroline **25**

L'acylation de la fonction amine se déroule dans le diméthylformamide amené à pH basique par ajout d'une base organique (la DIEA, figure A.III.6). La réaction conduit au composé Phen-ONHBoc brut en quelques minutes. L'analyse CLHP résultante confirme la rapidité de l'acylation. Après purification sur gel de silice, le produit **25** est obtenu avec un rendement de 71% (pour les 3 étapes).

Le produit **25** est ensuite caractérisé en RMN du proton dans le d_6 -DMSO. On observe notamment le singulet à 1,40 ppm typique du groupe protecteur Boc (*t*Bu). Il a également été caractérisé par spectrométrie de masse en mode d'ionisation EI par un ion moléculaire M^{+} à $m/z = 426,0$.

1.2 - Synthèse du ligand "1,4,5,8-tétraazaphénanthrène oxyamine"

29

Le dérivé tétraazaphénanthrène **29** porteur de la fonction nucléophile masquée est quant à lui synthétisé à partir du précurseur 9-amino-1,4,5,8-tétraazaphénanthrène **26**. Ce produit est synthétisé par Deroo S. à Bruxelles, en deux étapes (figure A.III.7).¹³³

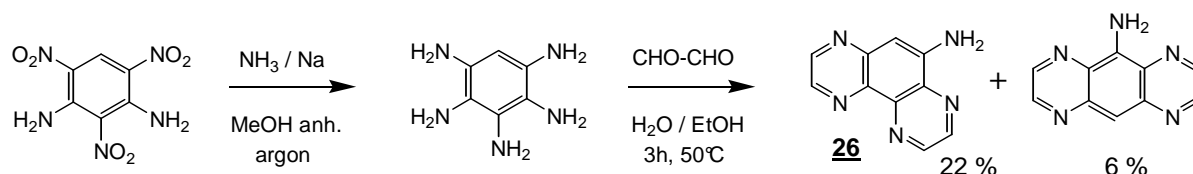


Figure A.III.7 : Procédure de synthèse du précurseur 9-amino-1,4,5,8-tétraazaphénanthrène.

¹³³ (a) Rogers, D. Z. Improved synthesis of 1,4,5,8,9,12-hexaazatriphenylene *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3904-3905. (b) Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Choua, S. Photophysics of $\text{Ru}(\text{Phen})_2(\text{PHEHAT})^{2+}$: A novel "Light Switch" for DNA and photo-oxidant for mononucleotides. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 584-592.

La première partie consiste à réduire les trois fonctions nitro du précurseur 1,3-diamino-2,4,6-trinitrobenzène en amine primaire par la réduction de Birch. Le produit pentaaminé obtenu est directement condensé avec le glyoxal pour former le 9-amino-1,4,5,8-tétrazaphénanthrène **26**. Cette seconde étape entraîne également la formation d'un produit secondaire : le 9-amino-1,4,5,8-tétrazaanthracène. Après séparation sur colonne d'alumine, les deux produits sont obtenus avec des rendements respectifs de 22 % et 6 %.

On applique ensuite le procédé précédemment décrit pour le ligand phénanthroline oxyamine **25**, de l'étape 2 à 4 (figure A.III.8).

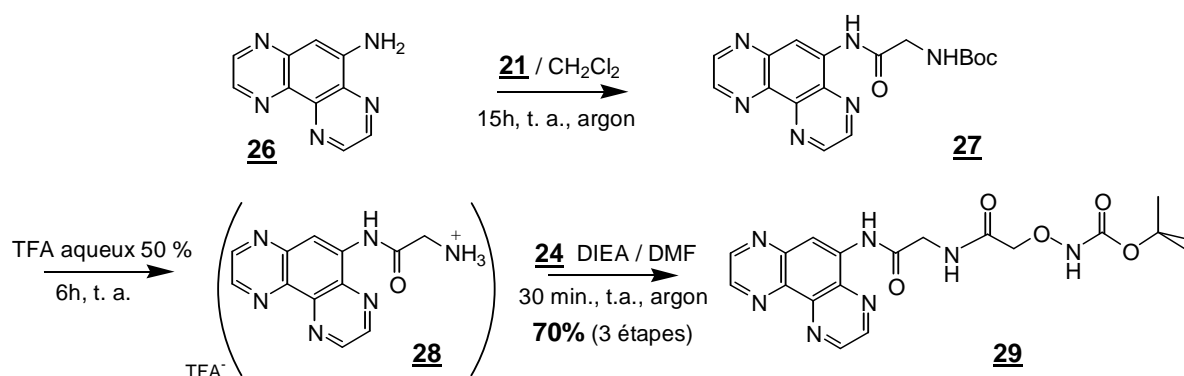
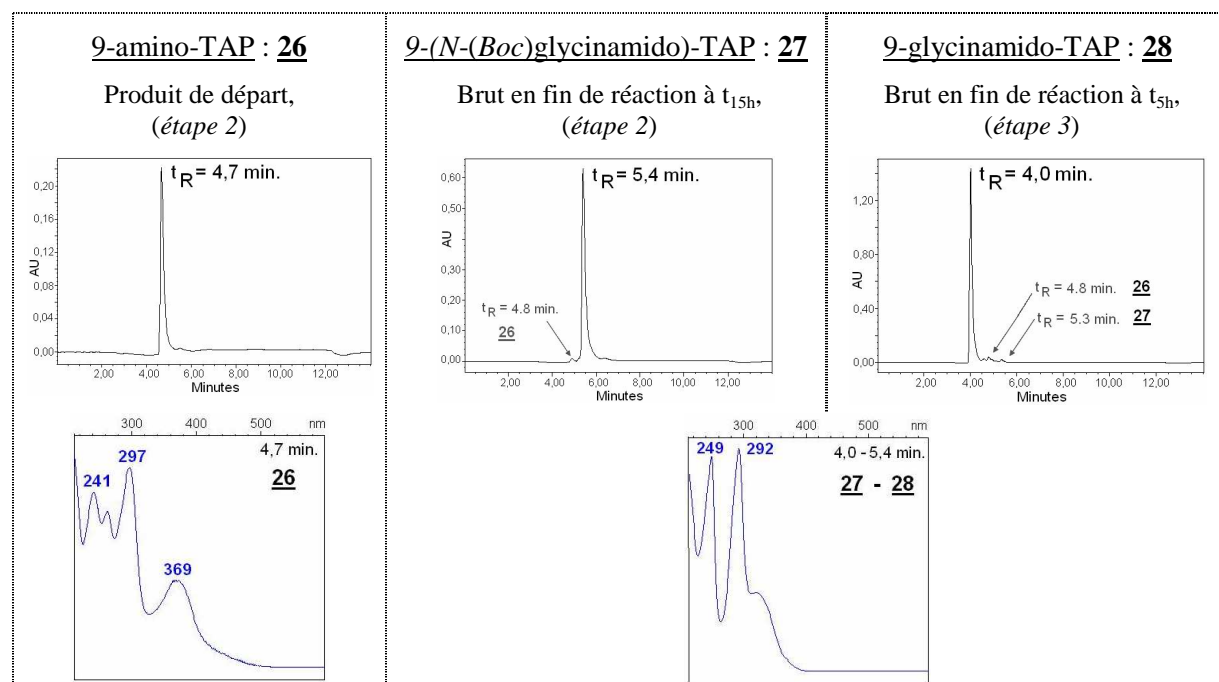


Figure A.III.8 : Synthèse totale du ligand 1,4,5,8-tétrazaphénanthrène **29**.

L'avancement des différentes phases est également évalué par CLHP en phase inverse, et chaque intermédiaire est caractérisé par RMN ^1H et ^{13}C . L'analyse CLHP des différentes étapes est présentée à la figure A.III.9.



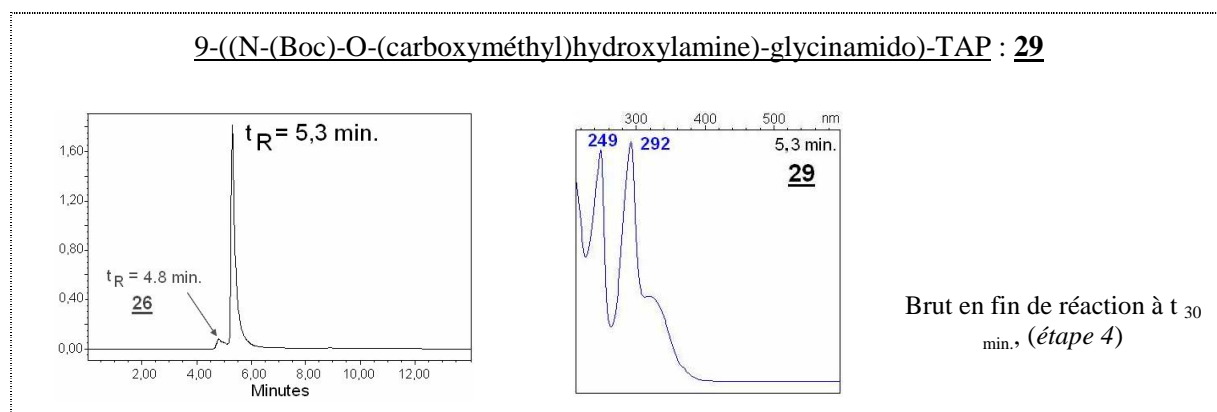


Figure A.III.9 : Bilan CLHP de l'évolution de la synthèse du ligand 1,4,5,8-tétraazaphénanthrène **29** (TAP : 1,4,5,8-tétraazaphénanthrène). En plus des chromatogrammes, la détection en absorption UV-visible des pics caractéristiques est présentée (systèmes d'analyse II₁).

On voit que le taux de conversion des réactions est presque total, pour des temps de réaction intéressants. Une différence apparaît par rapport à la synthèse homologue du ligand phénanthroline **25**, elle se situe au niveau de l'étape 2 (la première réaction d'acylation). En effet, en réalisant un unique cycle d'addition de l'anhydride **21**, on forme presque totalement le produit **27**. Même s'il reste encore une trace de produit amine libre, on choisit de poursuivre le cycle réactionnel pour éviter de former le produit bis-acylé en ajoutant un fort excès d'anhydride **21**. D'après le chromatogramme, il reste 4 % de 9-amino-1,4,5,8-tétraazaphénanthrène **26**. On retrouve cette impureté **26** tout au long de la suite réactionnelle. Elle est éliminée lors de la purification finale par chromatographie sur gel de silice. On obtient ainsi le ligand **29** avec un rendement global de 70 %.

L'intégrité structurale de tous les intermédiaires est également déterminée par RMN (¹H, ¹³C). Les attributions sont déterminées à partir des données de la littérature.¹³⁴ Il n'existe pas de différences majeures pour les déplacements chimiques des carbones et protons aromatiques. Les produits se différencient uniquement par leur chaîne aliphatique. D'ailleurs, le spectre ¹H de l'intermédiaire 9-glycinamido-TAP : **28** se caractérise par le signal large de l'amine terminale vers 8 ppm. Cette amine est fortement déblindée par rapport au déplacement d'une amine aliphatique classique, et son intégration est supérieure à deux protons (figure A.III.10). Ces indications confirment qu'elle se trouve sous la forme de sel d'ammonium de TFA.

¹³⁴ (a) Naesielski-Hinkens, R.; Benedek-Vamos, M.; Maetens, D. *J. Heterocyclic. Chem.* **1980**, *17*, 873-876. (b) Defay, N.; Maetens, D.; Naesielski-Hinkens, R. *Org. Magn. Res.* **1984**, *22*, 340-344. (c) Deroo, S. Thèse de doctorat, Université Libre de Bruxelles, **2006**.

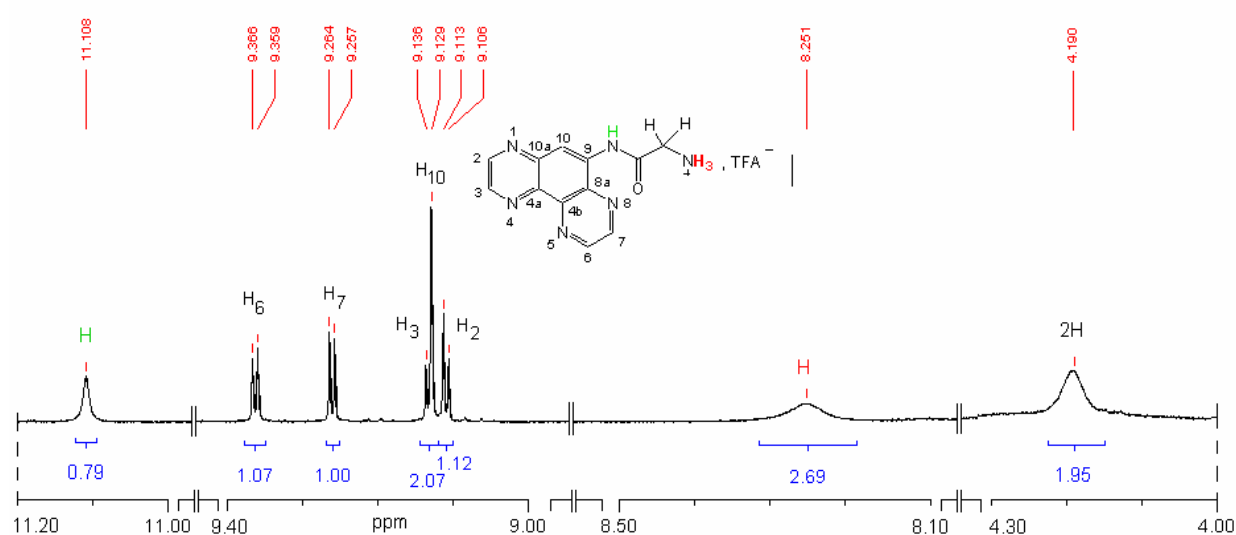


Figure A.III.10 : Spectre RMN ^1H (300 MHz, d_6 -DMSO) de l'intermédiaire 9-glycinamido-TAP : **28**.

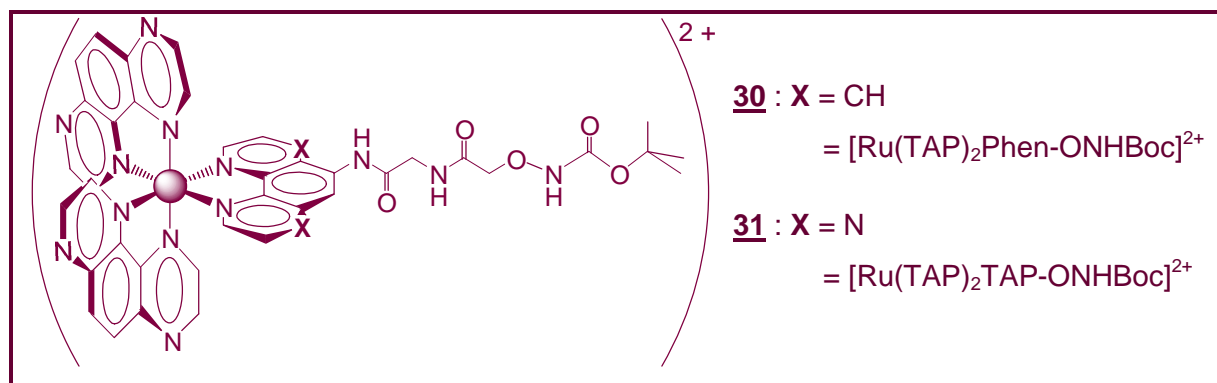
On retrouve également cette caractéristique pour l'intermédiaire 5-glycinamido-Phen : **23**.

~

En résumé, les deux "synthons oxyamines" : le Phen-ONHBoc **25** et le TAP-ONHBoc **29** sont obtenus suivant une stratégie analogue, avec des rendements proches de 70 %, à partir des produits aminés correspondants.

2 - Synthèse des complexes de ruthénium fonctionnalisés

Dans cette seconde partie, la préparation des 2 complexes de ruthénium est décrite.



Cette première étape se fait selon la méthode décrite pour le composé $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$.¹³⁵ Celui-ci est synthétisé par réduction de RuCl_3 en présence de LiCl et de deux équivalents de ligand 1,4,5,8-tétraazaphénanthrène dans le DMF à reflux. L'évolution de la réaction est suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible. Elle est considérée comme complète lorsque l'absorbance caractéristique du complexe bischélaté, à 540 nm, atteint son maximum d'intensité. Le produit est alors recristallisé dans le DMF sous atmosphère d'acétone pendant deux jours. Le précipité obtenu est lavé à l'eau, à l'éthanol et séché à l'éther. Le précurseur $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Cl}_2]^{2+}$ est caractérisé par RMN ^1H à 300 MHz dans le d_6 -DMSO. Il est obtenu avec un rendement de 45 %.

2. 1. 2. - Préparation de l'intermédiaire $[\text{Ru}(\text{TAP})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ ¹³⁷

Cette étape d'activation du précurseur bischélaté est réalisée par l'eau, en présence de deux équivalents de nitrate d'argent. La réaction de substitution des chlores par les molécules d' H_2O est également contrôlée par spectroscopie UV-visible. Elle est interrompue lorsque l'absorbance caractéristique du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, à 490 nm, a atteint son intensité maximale, soit au bout de 90 minutes environ. Le chlorure d'argent résiduel est simplement éliminé par centrifugation. Après concentration du solvant, le produit est directement engagé dans la dernière étape de chélation.

2. 1. 3. - Préparation des complexes $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen-ONHBoc}]^{2+}$ 30 & $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP-ONHBoc}]^{2+}$ 31

Dans ce cas, le complexe précurseur activé est mis en présence d'un léger excès de ligand fonctionnalisé 25 ou 29 (1,2 éq.), dans le DMF à reflux. L'évolution de la condensation est également suivie par spectroscopie d'absorption. Elle est stoppée lorsque l'absorbance caractéristique de la bande MLCT des complexes est observées vers 425 nm, soit au bout de 90 minutes environ. Le solvant est ensuite éliminé, et les complexes sont purifiés par chromatographie sur colonne d'alumine avec un gradient $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$. Les deux types de complexe sont obtenus avec un rendement de l'ordre de 70 %.

2.2 - Caractérisation

¹³⁷ Evans, I. P.; Spencer, A.; Wilkinson, G. Dichlorotetrakis(dimethyl sulphoxide)ruthenium(II) and its use as a source material for some new ruthenium(II) complexes. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1973**, 204-209.

Les complexes **30** et **31** ont été caractérisés en détail à Bruxelles par spectroscopie RMN : RMN du proton : ^1H et ^1H - ^1H COSY, RMN du carbone : ^{13}C et DEPT, ainsi que par le couplage proton-carbone (HSQC) dans le d_6 -DMSO (Voir *Partie expérimentale*).

Les deux complexes sont également analysés au laboratoire. On réalise une caractérisation par spectrométrie de masse électrospray, et une analyse CLHP avant de les engager dans les étapes suivantes de déprotection et de couplage.

2. 2. 1. - Analyses de $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen-OHNBoc}]\text{Cl}_2$ **30**

a) Analyse par spectrométrie de masse (ESI) du complexe **30**

Le spectre fait apparaître une ionisation plus importante des espèces dichargées par rapport aux monochargées, cette différence d'intensité se retrouve dans toutes les analyses du complexe de ruthénium. Une autre caractéristique correspond à la multitude d'espèces monochargées visibles, elles représentent les différents sels issus du composé **30** (figure A.III.12).¹³⁸

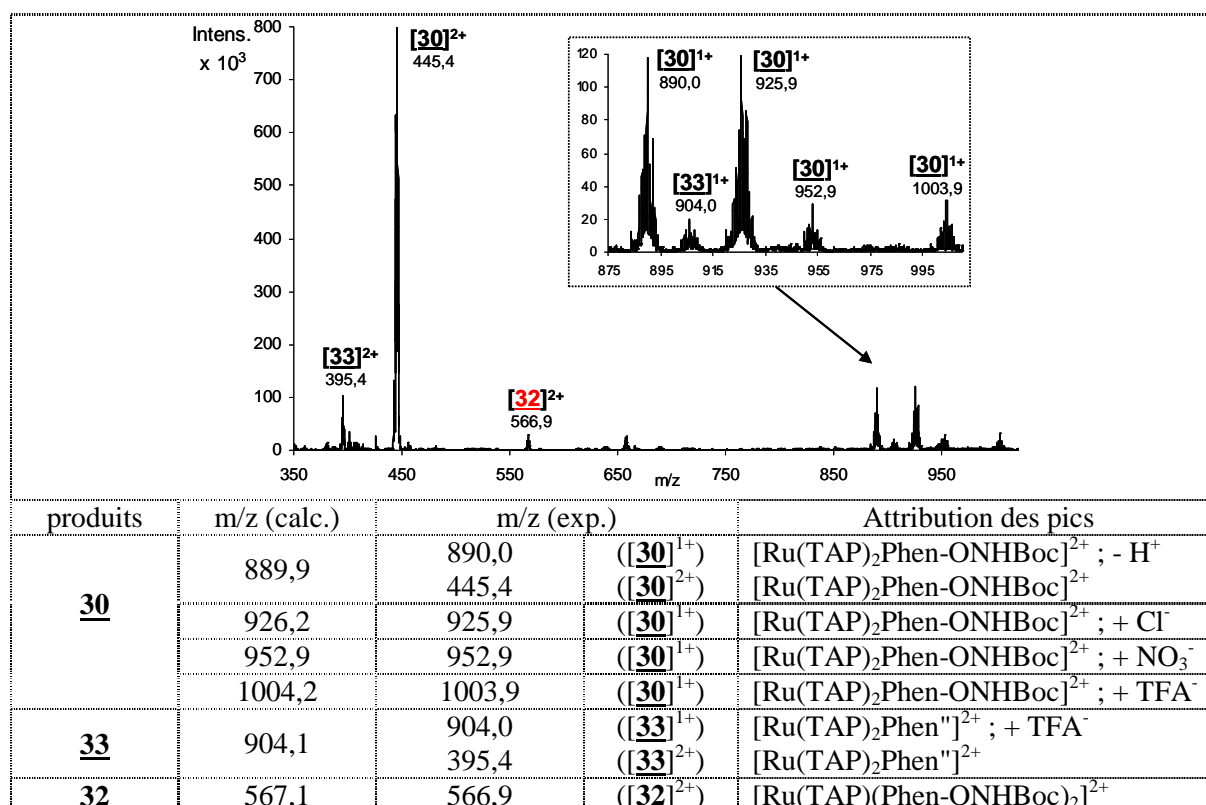


Figure A.III.12 : Spectre SM-ESI du produit **30** et l'attribution détaillée des pics du spectre (système d'analyse IV₂).

¹³⁸ Didier, P.; Jacquet, L.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Synthesis and Characterization by FAB Mass Spectrometry of a Series of New Polymetallic Homo- and Heteronuclear Complexes of Ruthenium(II) and Rhodium(III) with the symmetric bridging ligand 1,4,5,8,9,12-Hexaazatriphenylene. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4803-4309.

La nature de ces adduits a été confirmée par comparaison des profils isotopiques expérimentaux et théoriques (figure A.III.13).

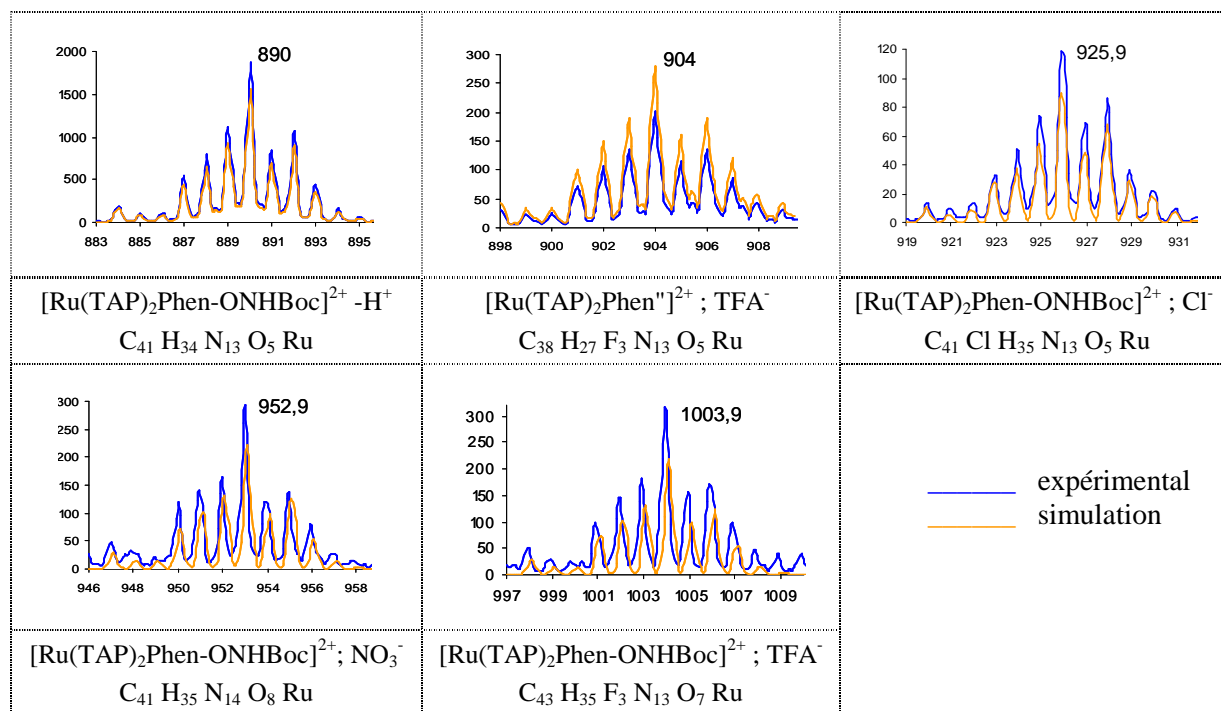


Figure A.III.13 : Distribution isotopique des produits monochargés du spectre de masse du complexe **30**, identifiés dans la figure A.III.12. La distribution simulée est calculée à partir de la formule brute de la molécule, basée sur la masse des isotopes les plus abondants des éléments présents.

La comparaison des profils isotopiques caractéristiques du complexe de ruthénium **30**, met en évidence la présence de sels de chlore, de nitrate qui proviennent du protocole de synthèse utilisé. On retrouve également des sels d'acide trifluoroacétique (TFA) qui proviennent des conditions d'analyse. Car le spectromètre est très utilisé au laboratoire pour analyser des molécules sous forme de sel de TFA. Il contient sûrement des quantités résiduelles de cet acide capable de former un sel avec le ruthénium dicationique. On observe également la présence du produit oxyamine libre. Le chromatogramme CLHP correspondant, ainsi que celui du produit $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}'']^{2+}$ **33**, confirment que la perte du groupement protecteur Boc fait suite à l'ionisation très énergétique des molécules dans la trappe en présence des sels de TFA (figures A.III.15, et A.III.20).

L'échantillon analysé correspond totalement au produit attendu. Néanmoins l'analyse détaillée des données de spectrométrie de masse, laisse présager la présence d'un produit secondaire **32** issu de la synthèse du complexe (figure A.III.12). Il correspondrait à une bis-chélation du ruthénium par le ligand fonctionnalisé Phen-ONHBoc **25** (figure A.III.14, a). Pour confirmer sa présence, une simulation isotopique a été réalisée (figure A.III.14, b).

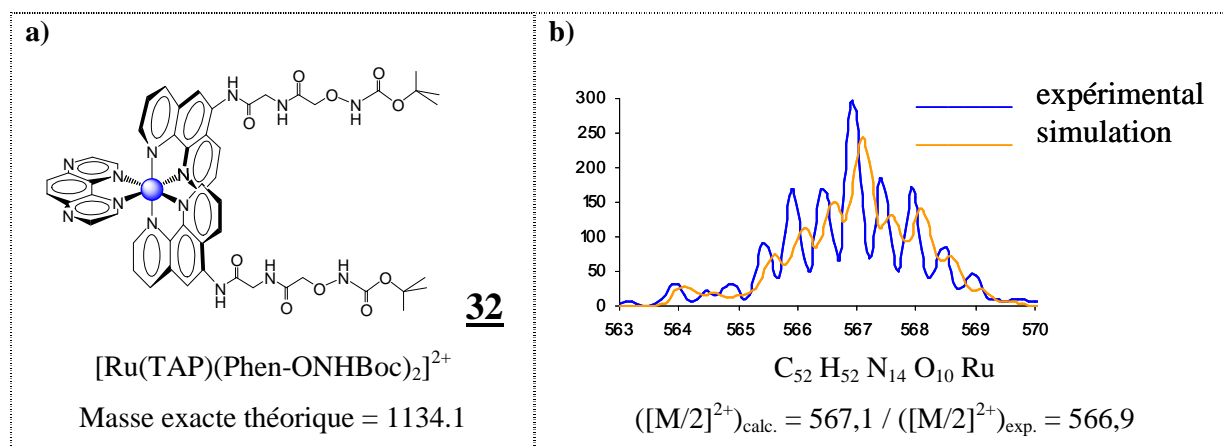


Figure A.III.14 : a) Représentation de la molécule **32**. b) Distribution isotopique du produit dichargé $[\mathbf{32}]^{2+}$ du spectre de masse du complexe **30**, identifié à la figure A.III.12. La distribution simulée est calculée à partir de la formule brute de la molécule, basée sur la masse des isotopes les plus abondants des éléments présents.

L'allure de l'enveloppe expérimentale semble correspondre à celle de la simulation. Néanmoins ce produit secondaire n'est pas mis en évidence lors de l'analyse poussée du complexe de ruthénium par RMN. L'existence de ce sous-produit est donc très discutable.

b) Analyse par chromatographie liquide haute performance du complexe **30**

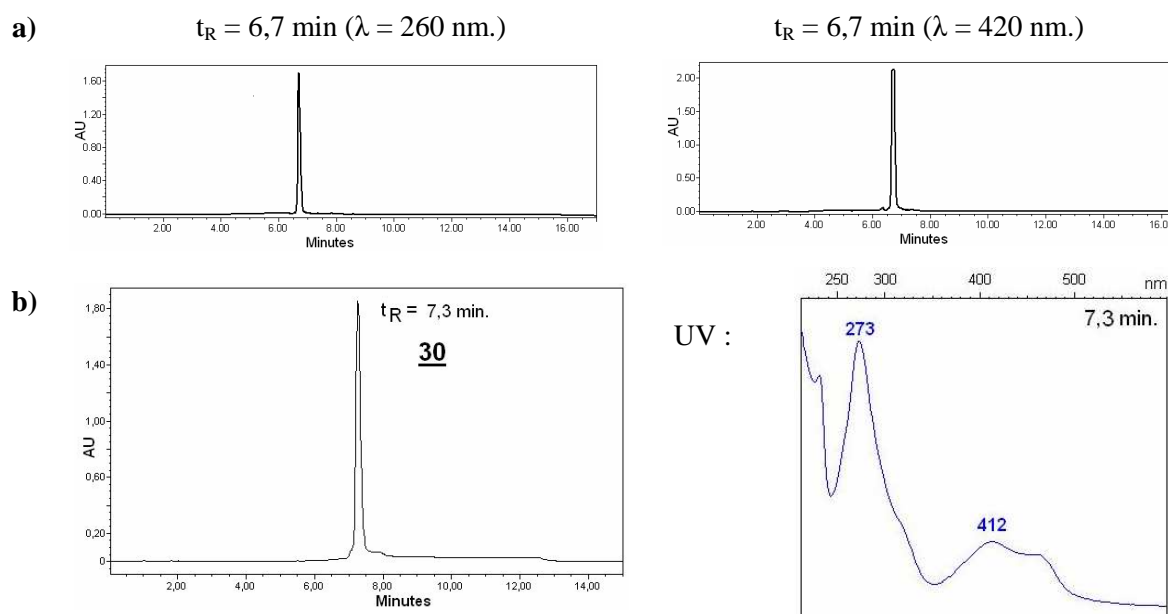


Figure A.III.15 : Chromatogramme d'analyse CLHP du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen-ONHBoc}]^{2+}$ **30**, a) caractérisation dans le système d'analyse II₁ (l'acide trifluoroacétique et l'acétonitrile comme éluants); b) caractérisation dans le système d'analyse III₁ (l'acide phosphorique et le méthanol comme éluants).

Les deux types d'analyses utilisés ont une certaine similitude. L'éluion se fait toujours suivant un gradient en solvant aqueux acidifié, soit par l'acide trifluoroacétique, soit par l'acide phosphorique.

Hors l'appareillage employé, elles diffèrent par rapport à la nature du co-solvant d'éluion. Soit les produits migrent dans un solvant aprotique : l'acétonitrile, soit dans un solvant protique : le méthanol. Les analyses obtenues sont similaires, la nature des éluants ne modifie pas l'intégrité du complexe. Même si dans un cas, on est en présence d'un acide potentiellement chélatant, l'acide trifluoroacétique (figure A.III.15, a).

Ces deux analyses ont également l'intérêt de pouvoir situer le complexe, soit par rapport au ligand **25** (chapitre A.III.1; système d'analyse III₁), soit par rapport aux conjugués (chapitre A.IV, système d'analyse II₁).

2. 2. 2. - Analyse de $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP-ONHBoc}]\text{Cl}_2$ **31**

a) Analyse par spectrométrie de masse (ESI) du complexe **31**

Le spectre SM se distingue par les mêmes caractéristiques que celui du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen-ONHBoc}]\text{Cl}_2$ **30**, c'est à dire une intensité plus importante pour les espèces dichargées, et la présence de nombreuses espèces monochargées. Elles correspondent également aux différents sels issus du composé **31** (figure A.III.16).

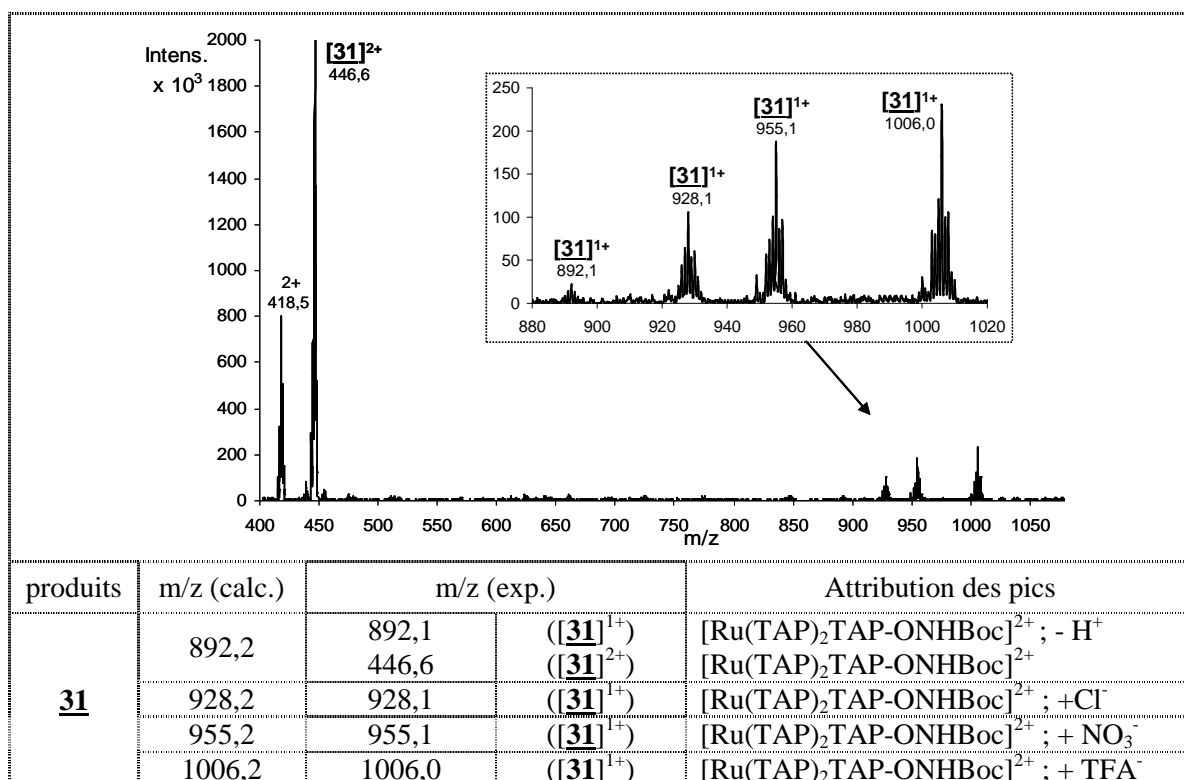


Figure A.III.16 : Spectre SM-ESI du produit **31** et l'attribution détaillée des pics du spectre (système d'analyse IV₂).

La nature de ces adduits a été confirmée en comparant les profils isotopiques expérimentaux aux profils théoriques (figure A.III.17).

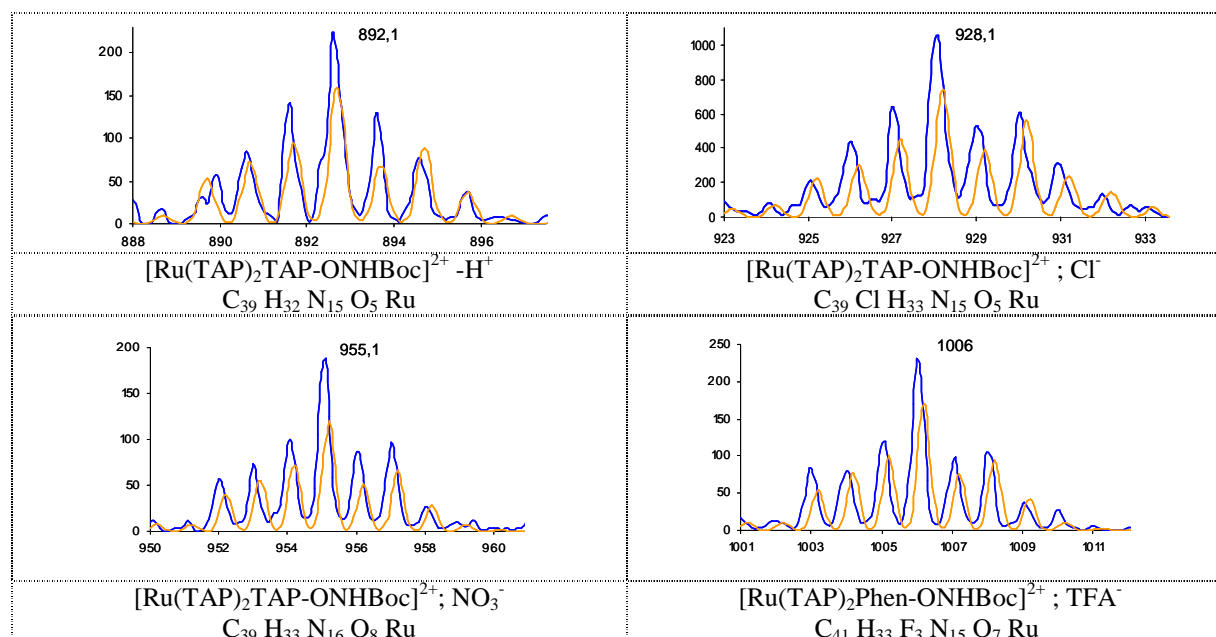


Figure A.III.17: Distribution isotopique des produits monochargés du spectre de masse du complexe **31**. La distribution simulée est déterminée à partir de la formule brute des molécules, basée sur la masse des isotopes les plus abondants des éléments présents. (— expérimentale / — simulation.)

L'analogie formelle des profils isotopiques caractéristiques du complexe de ruthénium **31**, expérimentaux et simulés, confirme la présence de sels de chlore, de nitrate, et d'acide trifluoroacétique (TFA). Par contre, contrairement au produit $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen-ONHBoc}]^{2+}$ **30**, on n'observe pas le produit secondaire provenant de la bis-chélation du métal : $[\text{Ru}(\text{TAP})(\text{TAP-ONHBoc})_2]^{2+}$, à $m/z = 569$.

b) Analyse par chromatographie liquide haute performance du complexe **31**

Il a également été caractérisé par les deux types de systèmes d'analyse CLHP utilisés précédemment.

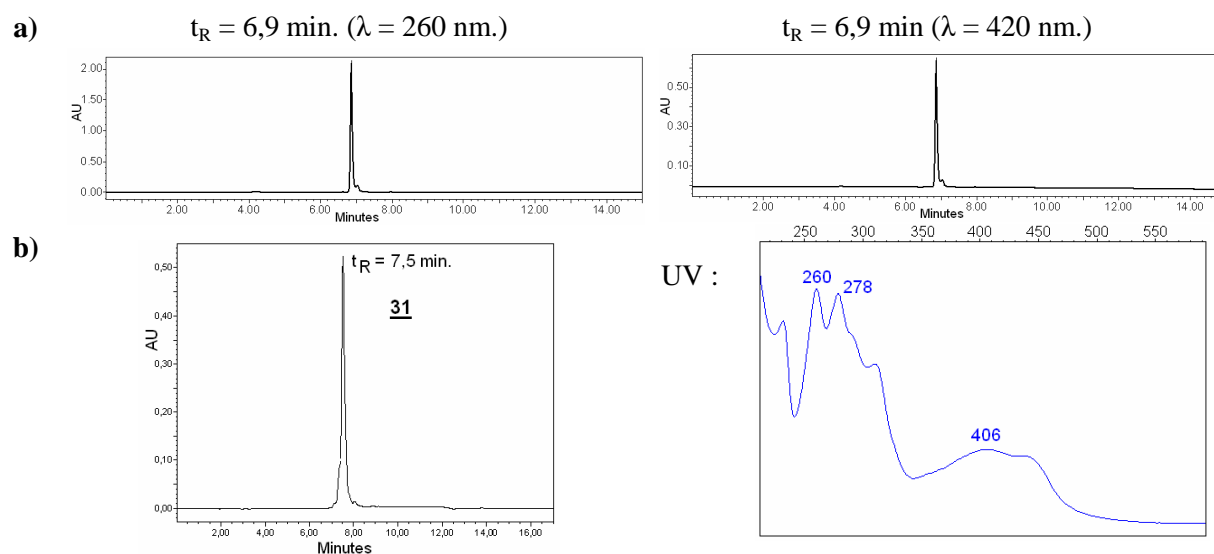


Figure A.III.18 : Chromatogramme d'analyse CLHP du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP-ONHBoc}]^{2+}$ **31**,
a) Caractérisation dans le système d'analyse II₁ (l'acide trifluoroacétique et l'acétonitrile comme éluants);
b) Caractérisation dans le système d'analyse III₁ (l'acide phosphorique et le méthanol comme éluants).

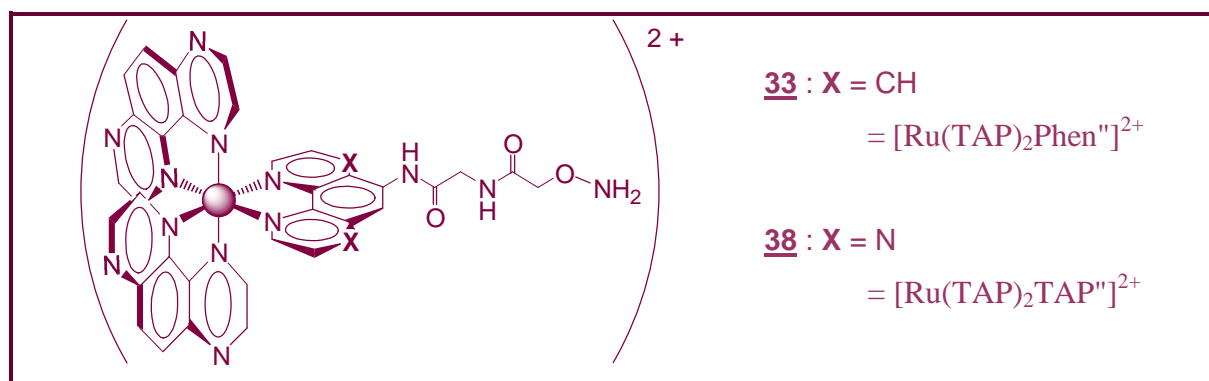
~

En résumé, les deux complexes de ruthénium **30** et **31** ont été synthétisés sous forme de poudre orange en 3 étapes avec un rendement global de 32 %.

Aucune trace de complexe porteur d'oxyamine déprotégé n'est identifiée dans les lots de produits, évitant ainsi les possibles conjugués parasites formés par lien oxime avec les moindres traces de composés carbonyle. Cette information permet d'envisager l'étape suivante de déprotection de l'oxyamine sans purification ultérieure. C'est un gain de sécurité vis-à-vis de cette fonction très réactive qui nécessite le maximum de précautions.

3 - Elimination du groupe protecteur Boc

Dans cette partie, la libération de la fonction oxyamine des 2 complexes de ruthénium est décrite.



Les produits **33** et **38** serviront de "synthons oxyamines" dans les couplages par éther d'oxime avec les oligonucléotides et peptides (chapitre A.IV).

~

Le groupe protecteur *tert*-butyloxycarbonyle (Boc) est le carbamate le plus couramment utilisé pour protéger divers groupes fonctionnels lors de synthèse de produits naturels,

comme des acides aminés, peptides, protéines... Cette ubiquité offre de nombreuses possibilités d'élimination par acidolyse.¹³⁹

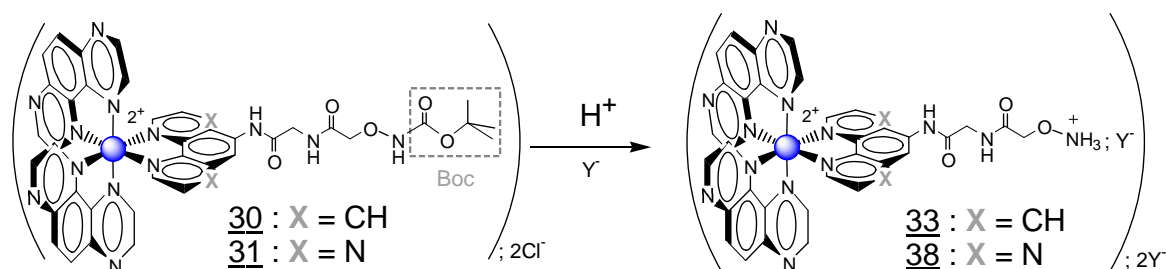


Figure A.III.19 : Schéma de déprotection de la fonction oxyamine par acidolyse.

En présence d'acide trifluoroacétique, une déprotection efficace du Boc nécessite au moins 25 % d'acide. Dans notre cas la déprotection est réalisée dans les conditions couramment pratiquées en synthèse peptidique, en présence de 50 % de TFA. Cette méthode a déjà fait ses preuves vis-à-vis des complexes de ruthénium, en éliminant à 90% le groupe Boc en 1 heure à température ambiante.¹²⁷ Dans un premier temps, nous avons donc reproduit ces conditions pour libérer les fonctions oxyamines des complexes de ruthénium **30** et **31**.

3.1 - Préparation du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}'']^{2+}$ **33**

On réalise tout d'abord la déprotection du complexe **30** dans l'acide trifluoroacétique à 50 % dans l'eau, à une concentration de 10^{-2} M. Ces conditions aqueuses sont permises par les complexes cationiques parfaitement solubles. La présence de l'eau, nous affranchit également de l'utilisation de piègeurs de carbocation spécifiques, généralement plus difficiles à éliminer. La réaction se fait à température ambiante, et son avancement est suivi par CCM.⁽ⁱ⁾ La réaction s'avère plus lente que celle décrite auparavant dans la littérature. Au bout de 3 heures environ, le profil de la CCM indique que la déprotection est totale (on ne voit plus de tache correspondant au produit de départ **30** moins polaire). L'analyse CLHP subséquente confirme la disparition du produit de départ ($t_R = 7,3$ min.), au profit du produit oxyamine **33** plus polaire (figure A.III.20).

¹³⁹ (a) Vorbruggen, H.; Krolikiewicz, K. Selective acidic cleavage of tertbutoxycarbonyl group. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1975**, *14*, 818. (b) Fuller, W.D.; Goodman, M.; Naider, F.R.; Hu, Y.F. Urethane-protected alphaamino acid N-carboxyanhydrides and peptide synthesis. *Biopolymers* **1996**, *40*, 183-205.

⁽ⁱ⁾ Conditions d'éluion en CCM : DMF/H₂O/NH₄Cl – 4/4/1 (v/v/v).

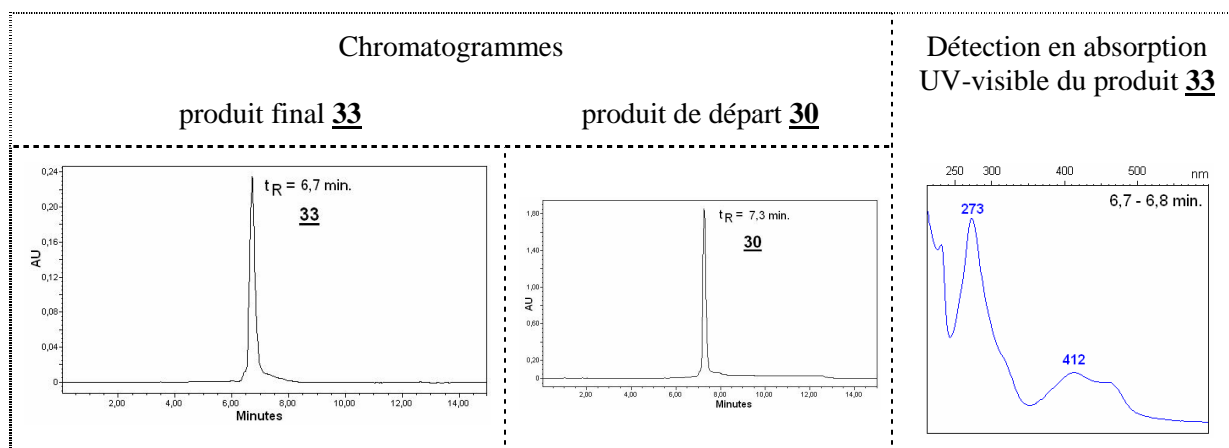


Figure A.III.20 : Analyse CHLP de l'avancement de la réaction au bout de 3 heures. Milieu réactionnel brut dilué dans H₂O (20 nmole; 15µL H₂O, système d'analyse III₁).

Afin de confirmer la présence de l'oxyamine libre en bout de chaîne, on fait réagir un aliquot du brut réactionnel avec un excès d'acétone,⁽ⁱⁱ⁾ car les fonctions oxyamines sont capables de réagir avec la moindre trace de fonction carbonyle pour former l'oxime correspondante.¹⁴⁰ L'analyse CLHP résultante met en évidence la formation de l'adduit attendu (figure A.III.21, produit **34**). La réaction teste ne semble pas totale, il reste une trace résiduelle du produit oxyamine libre **33**, qui pourrait s'expliquer par un temps d'incubation légèrement insuffisant.

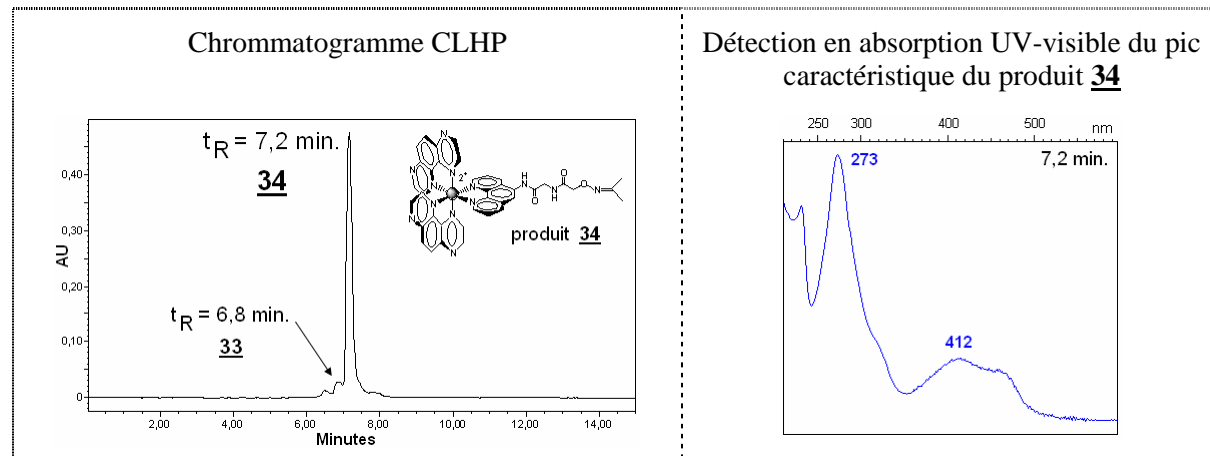


Figure A.III.21 : Analyse CHLP de l'avancement de la réaction au bout de 3 heures. Le milieu réactionnel brut est dilué dans H₂O, et enrichi en acétone : 20 nmole; 15 µL (système d'analyse III₁).

Le solvant est alors éliminé sous pression réduite. Le produit oxyamine **33** est obtenu avec un rendement quantitatif, et caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif. Dans ce cas, l'analyse a été réalisée après avoir repris le résidu dans de l'eau. Une fraction de la solution mère a été prélevée, à laquelle on a ajouté de l'acétone pour bloquer la fonction oxyamine

⁽ⁱⁱ⁾ On ajoute 10 équivalents d'acétone (5 µL), et on laisse 15 minutes à température ambiante avant de l'analyser par CLHP.

¹⁴⁰ Houdier, S.; Legrand, M.; Boturnyn, D.; Croze, S.; Defrancq, E.; Lhomme, J. A new fluorescent probe for sensitive detection of carbonyl compounds. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *382*, 253-263.

sous forme d'oxime. La masse calculée de l'adduit correspond à $M = 830,8$ g/mol pour une formule brute de $C_{39}H_{31}N_{13}O_3Ru$, et nous observons sur le spectre de masse l'ion moléculaire $[M + TFA]^{+} = 944$, ainsi que l'ion multichargé (2^{+}) (figure A.III.22). L'analyse indirecte confirme donc la présence exclusive du composé oxyamine libre dans la solution mère **33**. Le spectre de masse indique également la persistance de produit non déprotégé **30** (figure A.III.22, $[M - H^{+}]^{+} = 889$), présent sous forme de trace, car il n'est pas franchement mis en évidence sur le chromatogramme CLHP correspondant (figure A.III.20, composé **30**, $t_R = 7,3$ min.). D'après l'allure du tracé du chromatogramme, il pourrait se trouver en faible quantité au niveau de la base du pic élargi. Le produit **33** est donc utilisé tel quel lors des couplages ultérieurs.

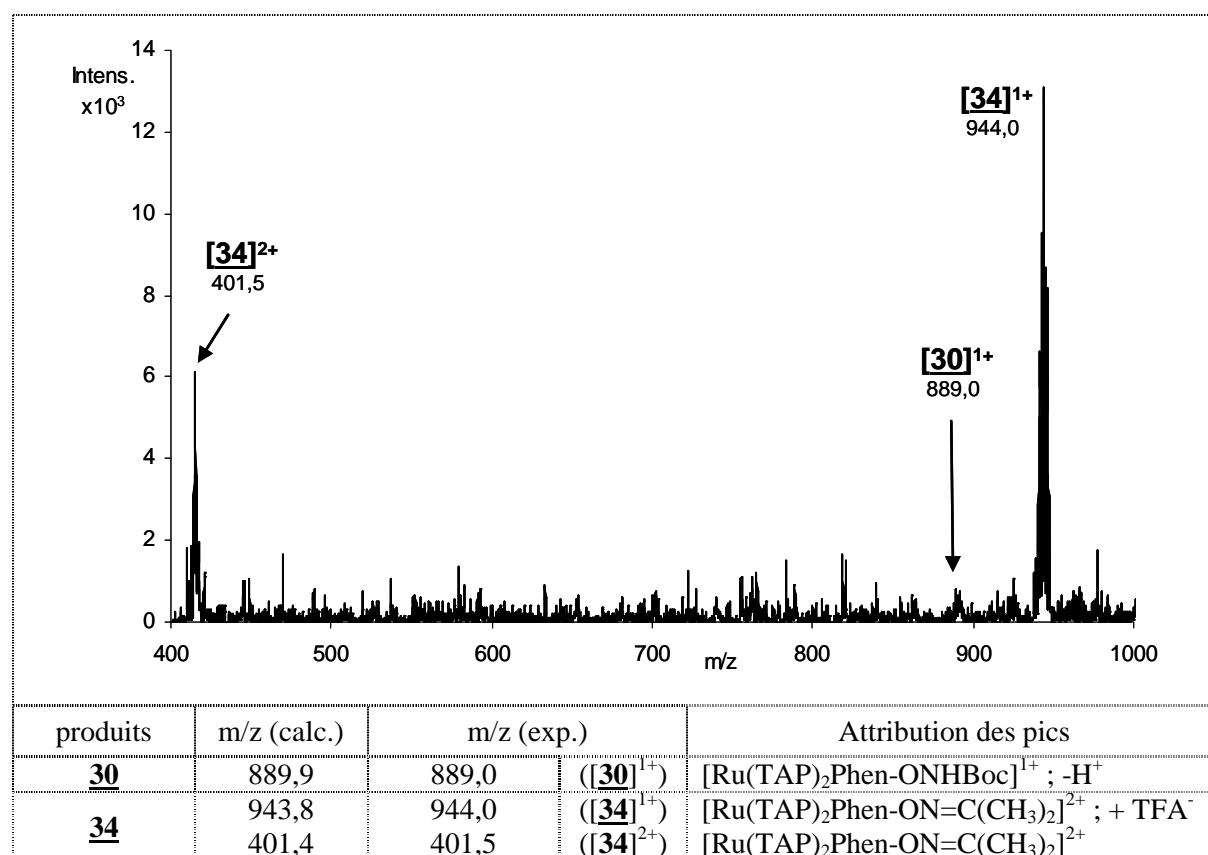


Figure A.III.22 : Spectre SM-ESI du produit **33** brut en présence d'acétone, accompagné de l'attribution des pics correspondants (système d'analyse IV₂).

Ce même protocole a été utilisé à plusieurs reprises pour préparer des pools de produit **33** indispensables pour les réactions de couplage ultérieures. Ces différents essais ont malheureusement montré une contamination du produit par une source de composé carbonyle : le formaldéhyde. Cette pollution s'est manifestée par la formation d'un adduit éther d'oxime entre l'oxyamine du complexe **33** et le carbonyle du formaldéhyde. Cette impureté, $[Ru(TAP)_2Phen-ON=CH_2]^{2+}$: **35**, a été observée pour la première fois lors d'une analyse MS-ESI classique du produit en fin de réaction (figure A.III.23).

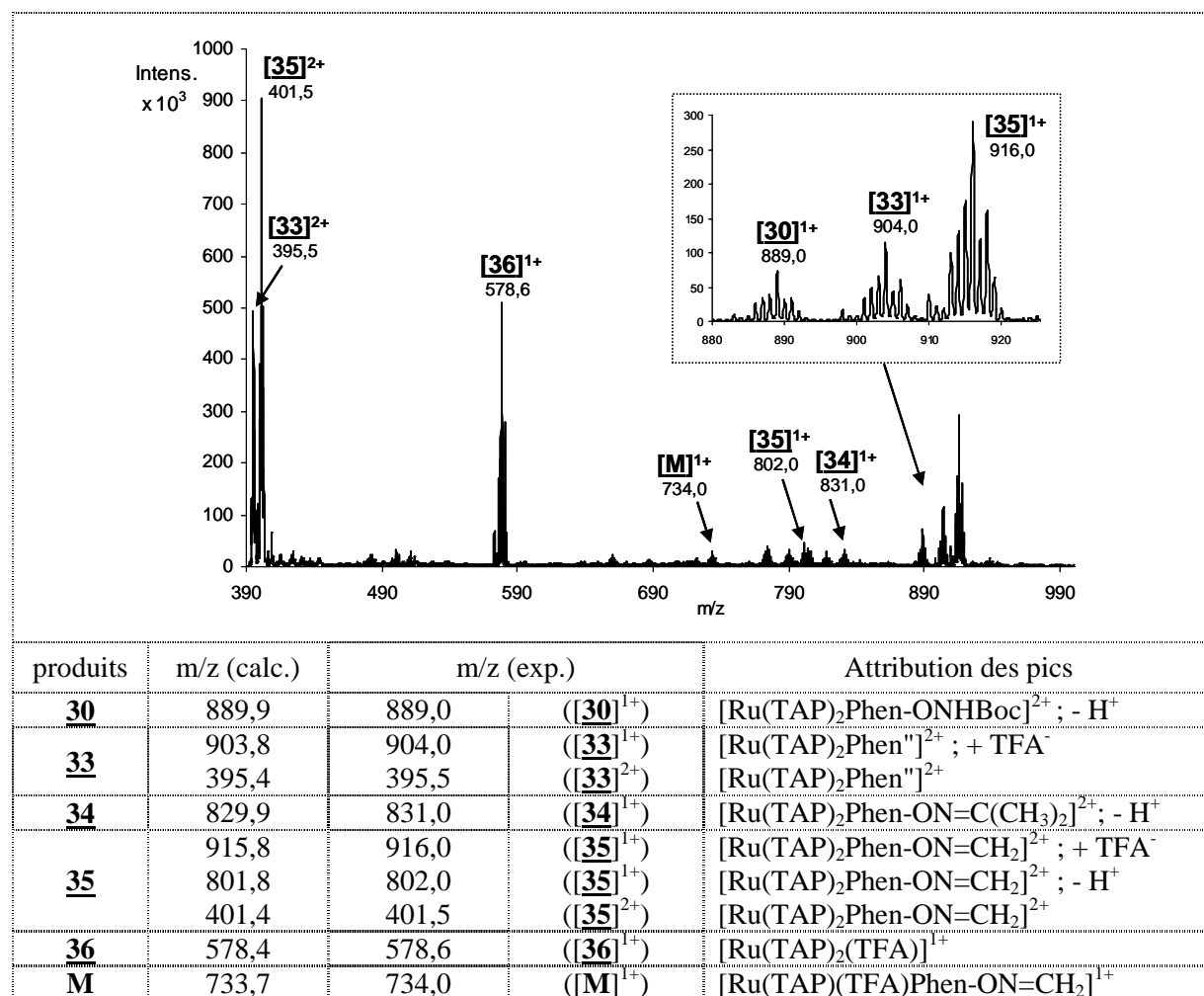


Figure A.III.23 : Spectre SM-ESI du produit souillé **33** par le formaldéhyde. L'attribution des principaux produits du spectre de masse est définie dans le tableau associé (système d'analyse IV₂)

La nature exacte de la pollution a été confirmée en comparant le profil isotopique expérimental et théorique du produit **35** se formant avec le formaldéhyde.

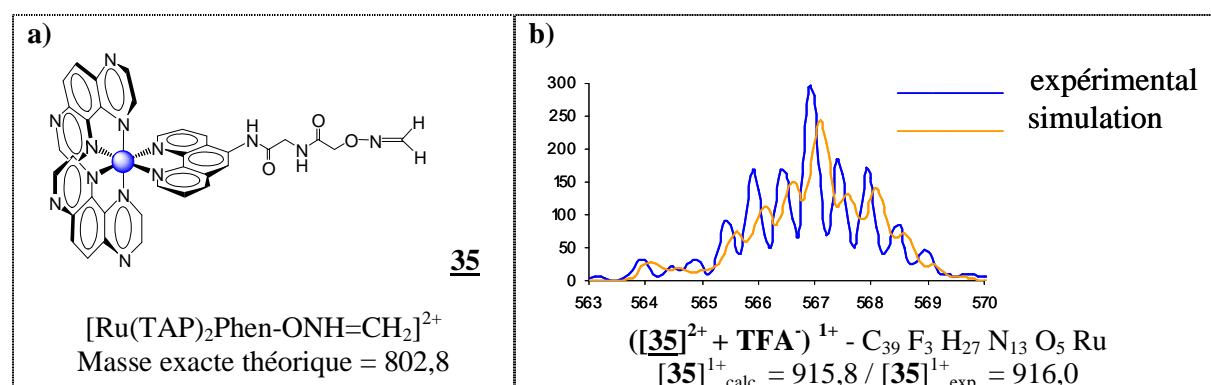


Figure A.III.24 : a) Représentation de la molécule **35**. b) Distribution isotopique du produit monochargé **[35]**¹⁺ du spectre de masse présenté à la figure A.III.23. La distribution simulée est calculée à partir de la formule brute de la molécule, basée sur la masse des isotopes les plus abondants des éléments présents.

Malheureusement la proportion exacte de la contamination n'a pas pu être estimée. Car l'analyse par MS-ESI n'est pas quantitative dans les conditions où nous l'effectuons. L'acquisition de

cette propriété nécessite un étalonnage précis de l'appareil à partir de quantités prédéterminées de produit. Pour cela, il faut tout d'abord isoler l'impureté. Un essai de purification vaine du mélange a été réalisé par CLHP préparative (système d'analyse II₃). Malgré l'utilisation de différents gradients d'éluion, le composé **35** n'est jamais isolé efficacement. Les autres moyens de purifications par chromatographie classique sur gel de silice ne sont pas envisageables à cause de la réactivité trop importante du groupe oxyamine libre.

Nous avons essayé de démasquer la source de la contamination, de plusieurs façons.

- 1) Tout d'abord, une pollution issue du spectromètre ESI a été envisagée. Pour le vérifier, nous avons réalisé une analyse par RMN ¹H du brut réactionnel dans le D₂O (figure A.III.25). Pour cela, on compare le spectre de RMN résultant avec celui du produit **30** : [Ru(TAP)₂Phen-ONHBoc]²⁺. Sur le spectre du produit analysé apparaît deux doublets correspondant aux protons de l'oxime (δ_H = 7,24 ppm et δ_H = 6,69 ppm), et le singulet correspondant au groupe Boc (δ_{9H} = 1,4 ppm) a bien disparu. Ces différences confirment la présence du produit "oxime formaldéhyde" **35** : [Ru(TAP)₂Phen-ON=CH₂]²⁺, sans mettre en évidence celle du produit attendu **33** : [Ru(TAP)₂Phen"]²⁺.

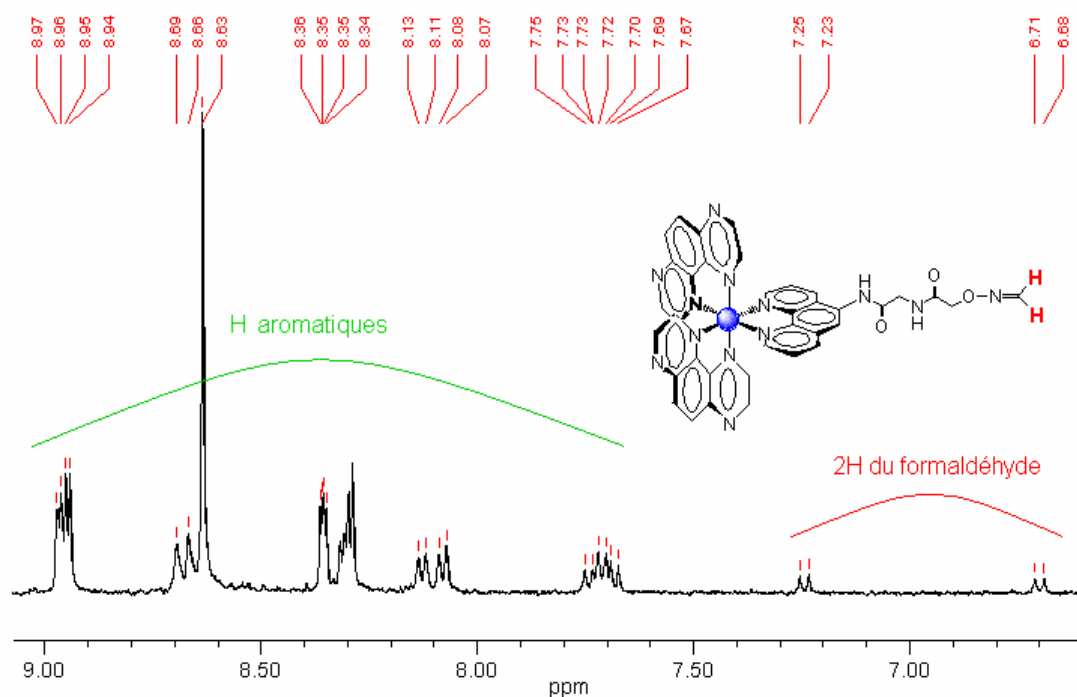


Figure A.III.25 : Une partie de spectre RMN ¹H (300 MHz, D₂O) de l'adduit aldéhyde **35**.

⇒ On peut donc exclure la possibilité d'une pollution dans le spectromètre de masse. Elle provient obligatoirement d'une étape du protocole expérimentale.

- 2) On a essayé différentes conditions expérimentales de déprotection du groupement Boc par l'acide trifluoroacétique. On a réalisé différents tests de déprotection sur ligand [Phen-ONHBoc]

en modifiant les paramètres expérimentaux. Malgré l'utilisation d'une nouvelle source de TFA saine et de qualité HPLC, d'une verrerie préparée avec soin, et le bannissement des matières plastiques du protocole (sources possibles de formaldéhyde), l'analyse MS-ESI montre toujours la formation de l'adduit formaldéhyde, correspondant au produit $[M+H]^+ = 338.1$ (figure A.III.26).

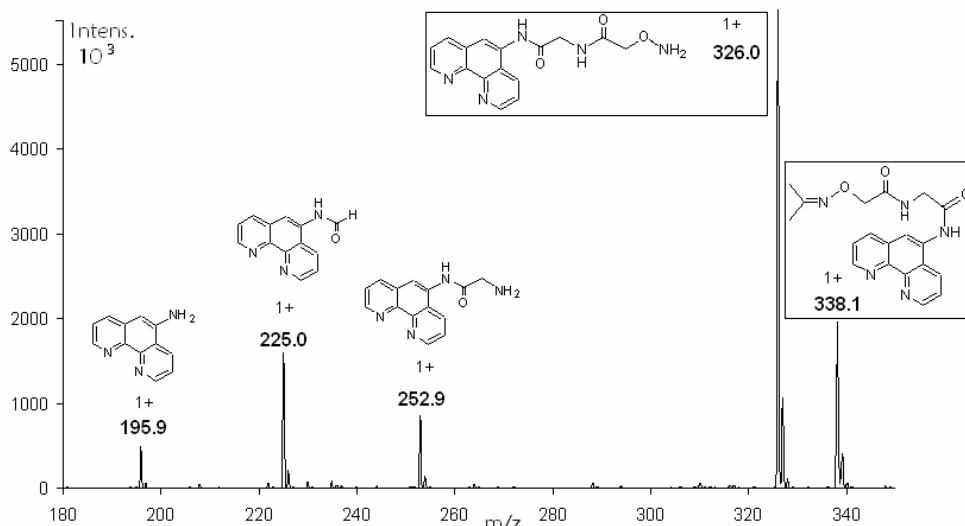


Figure A.III.26 : Spectre MS-ESI des produits issus de la déprotection du synthon Phen-ONHBoc dans l'acide trifluoroacétique. (système d'analyse IV₂).

⇒ Il paraît impossible d'exclure la pollution en suivant le protocole expérimental classique de déprotection dans l'acide trifluoroacétique.

- 3) On a donc décidé de faire l'ultime tentative de déprotection du complexe dans l'acide trifluoroacétique en réalisant la réaction dans un solvant organique, le dichlorométhane. Dans ces conditions, il est indispensable de se mettre en présence d'un nucléophile pour piéger le carbocation *tert*-butyle libéré. On a choisi d'utiliser le triisopropylsilane (5 %). L'analyse MS-ESI montre toujours la formation de l'adduit formaldéhyde **35** : $[Ru(TAP)_2PhenON=CH_2]^{2+}$, l'allure du spectre est identique à celle obtenue précédemment (figure A.III.23). Son analyse a permis d'identifier le produit **36**. Il est issu de la déchélation du complexe, caractérisée par la perte du coordinat "phénanthroline fonctionnalisée" remplacé par une molécule de TFA. Son identification a été corroborée en comparant le profil isotopique expérimental au profil théorique.

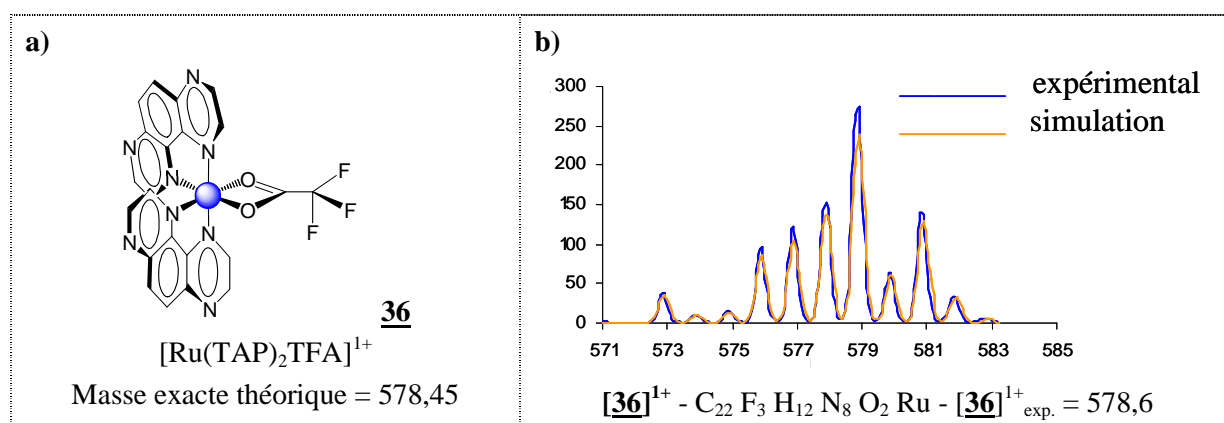


Figure A.III.27 : a) Représentation de la molécule **36**. b) Distribution isotopique du produit monochargé $[\mathbf{36}]^{1+}$ du spectre de masse présenté à la figure A.III.23. La distribution simulée est calculée à partir de la formule brute de la molécule, basée sur la masse des isotopes les plus abondants des éléments présents.

Cette possibilité de déchélation a été confortée par l'existence du produit **M** issu de l'adduit formaldéhyde (figure A.III.23). En effet, on observe le produit $[\text{Ru}(\text{TAP})(\text{TFA})\text{Phen-ON}=\text{CH}_2]^{1+}$ qui correspond à la perte de l'un des deux ligands TAP. Sa structure a également été authentifiée par concordance exacte du profil isotopique expérimental et théorique : $[\text{M}]^{1+}_{\text{exp.}} = 734,0$, et $[\text{M}]^{1+}_{\text{cal.}} = 733,7$ pour la formule brute $\text{C}_{29}\text{F}_3\text{H}_{21}\text{N}_9\text{O}_5\text{Ru}$. Dans la littérature on retrouve d'ailleurs une réaction qui consiste à assembler un complexe de ruthénium possédant un ligand trifluoroacétate à partir de la substitution d'un coordat chlore dans le dichlorométhane en présence de trifluoroacétate de sodium.¹⁴¹

⇒ En plus de l'adduit formaldéhyde constamment présent, l'acide trifluoroacétique s'avère inadapté à la déprotection des complexes du ruthénium. On a donc définitivement abandonné le TFA pour hydrolyser le groupe protecteur Boc.

Il a fallu se tourner vers une autre source d'acide.

Dans la littérature il existe de nombreuses méthodes de coupure acide du groupement Boc.¹⁴² Notre choix s'est plutôt orienté vers des conditions acides compatibles avec les complexes, des acides non bidentates pour éviter la déchélation précédemment observée. L'acide chlorhydrique semble être approprié, il a déjà permis d'hydrolyser efficacement le groupement Boc.¹⁴³ Il a notamment été réalisé des déprotections efficaces en 30 minutes à température ambiante avec HCl 4N dans le dioxane.^{9a} Il s'avère également que le groupe ne résiste pas à un milieu moins concentré en acide chlorhydrique. Il s'élimine en 5 heures à température ambiante avec HCl 1N dans l'acétate d'éthyle.^{9b} On a donc décidé

¹⁴¹ Matas, L.; Muniente, J.; Ros, J.; Alvarez-Larena, A.; Piniella, J. F. Migratory insertion reaction in alkenyl ruthenium II complexes containing a trifluoroacetate ligand. X ray structure of the $\text{Ru}(\eta^2\text{-O}_2\text{CCF}_3)(\eta^1\text{-O}=\text{CCH}=\text{CHtBu})(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2$ complex. *Inorg. Chem. Comm.* **1999**, 2, 364-367.

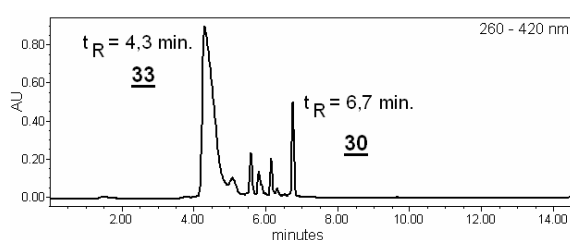
¹⁴² Greene, T. W. In *Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons: New York, 1981; Chapter 7, pp 232-233.

¹⁴³ (a) Han, G.; Tamaki, G.; Hruby, M.; Fast, V. J. efficient and selective deprotection of the tert-butoxycarbonyl (Boc) group using HCl/dioxane (4 M). *J. Peptide Res.* **2001**, 58, 338-341. (b) Gibson, F.S.; Bergmeier, S.C.; Rapoport, H. Selective removal of an N-BOC protecting group in the presence of a tert-Butyl ester and other acid-sensitive groups *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3216-3218.

de tester la déprotection dans les conditions les plus douces, soit en présence d'HCl 1N, en utilisant un solvant plus adapté aux complexes de ruthénium, l'eau.

On réalise la déprotection du complexe **30** dans HCl 1N, à 10^{-2} M. On s'affranchit donc de l'ajout de nucléophiles piègeurs du carbocation *tert*-butyle libéré. La réaction se fait à température ambiante, et son avancement est suivi par CLHP. Les chromatogrammes correspondants montrent que la réaction est presque totale au bout de 6 heures (*figure A.III.28*). Les impuretés visibles autour de 6 minutes d'élution sont déjà présentes dans l'analyse CLHP du produit $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen-ONHBoc}]^{2+}$ **30** au temps initial de la réaction.

a) Brut réactionnel à 4 heures de réaction.



b) Brut réactionnel à 6 heures de réaction.

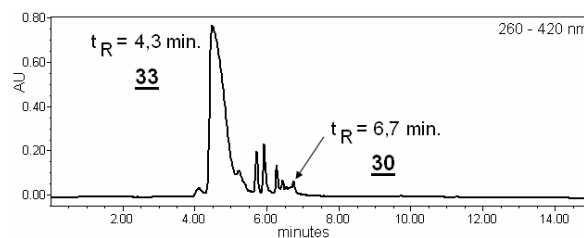


Figure A.III.28 : Analyses par CLHP de la déprotection du produit **30** dans HCl 1N (système II₁).

Le produit protégé **30** ($t_R = 7,3$ min.) disparaît de façon concomitante à l'apparition du produit oxyamine plus polaire **33** ($t_R = 4,3$ min.). Le profil CLHP du composé **33** correspond à un pic très large, qui pourrait masquer d'autres composés. Afin de vérifier l'intégrité de l'oxyamine libre en bout de chaîne, on fait réagir un aliquot du brut réactionnel avec un excès d'acétone.⁽ⁱ⁾ L'analyse CLHP résultante met en évidence la formation exclusive de l'oxime correspondant (*figure A.III.28*).

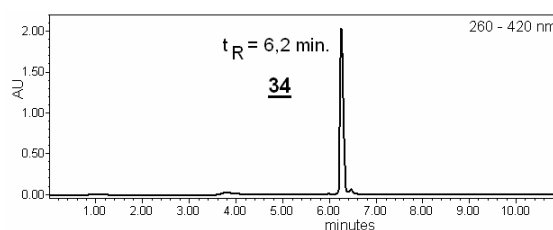


Figure A.III.29 : Analyses par CLHP de l'oxime d'acétone correspondant au produit **33** (système II₁).

L'avancement de la réaction n'évolue plus après 6 heures de déprotection, les analyses CLHP montrent toujours la présence d'une infime trace de produit de départ **30**, sans que son profil n'évolue. Le solvant est alors éliminé sous pression réduite et le résidu brut est caractérisé par spectrométrie de masse, en mode positif d'ionisation électrospray (*figure A.III.30*).

⁽ⁱ⁾ On ajoute 10 équivalents d'acétone (5 μL), et on laisse 15 minutes à température avant de l'analyser par CLHP.

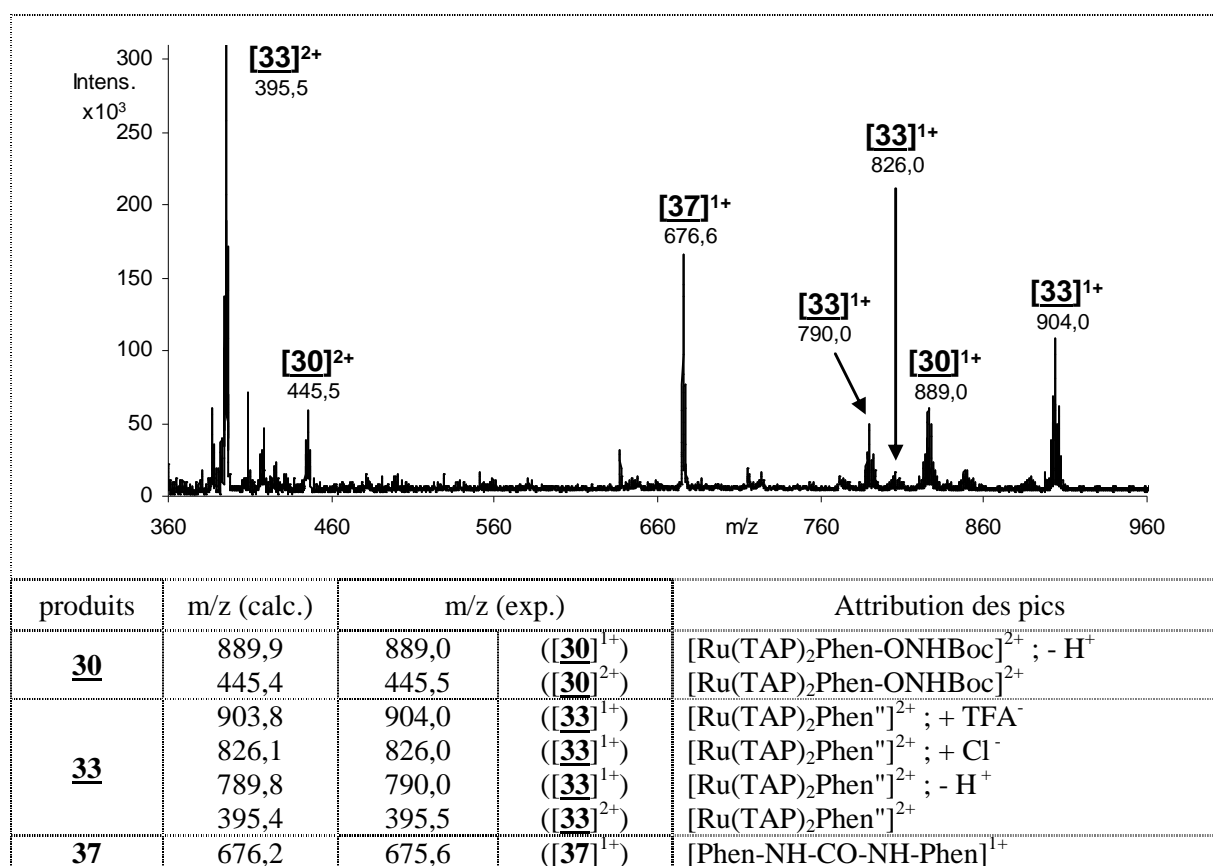


Figure A.III.30 : Spectre SM-ESI du produit **33** brut de la déprotection au HCl 1N (système d'analyse IV₂).

L'analyse MS-ESI met en évidence la formation exclusive du "produit oxyamine libre" **33**, plus aucune trace d'adduit formaldéhyde n'est retrouvée. Dans ce cas, l'analyse a été réalisée directement sur le produit **33** possédant l'oxyamine libre, car les précédents tests ont confirmé l'intégrité de l'oxyamine dans le spectromètre. La masse calculée du composé **33** correspond à $M = 790,8$ g/mol pour une formule brute de $C_{39}H_{31}N_{13}O_3Ru$, et nous observons sur le spectre de masse l'ion moléculaire $[M - H]^+ = 904$, ainsi que l'ion multichargé (2+), le sel de TFA (1+), et le sel de chlore (1+) (figure A.III.30). Elle confirme également la persistance du produit de départ **30**, comme le laissait présager le suivi CLHP de la déprotection (figure A.III.28, $[M - H]^+ = 889$).

⇒ La déprotection du groupe Boc dans ces nouvelles conditions réponds à nos attentes. Elle est certes légèrement plus longue, mais elle n'altère pas l'intégrité du groupe oxyamine libéré.

Par contre, un nouveau produit secondaire **37** apparaît (figure A.III.30). Sa présence est moins préoccupante que l'adduit aldéhyde précédemment identifié. En effet, son profil isotopique donné par le spectre MS-ESI indique qu'il ne contient pas de ruthénium. Par conséquent, il n'entraînera aucune répercussion sur la détermination ultérieure de la quantité de produit **33** engagé dans les réactions de couplage. La quantité exacte de complexe de ruthénium est évaluée par spectroscopie d'absorption, en

mesurant l'absorbance de la solution à la longueur d'onde spécifique du complexe. Par conséquent, cette valeur tient compte uniquement des composés possédant l'entité ruthénium.

D'après les données de spectrométrie de masse, l'impureté a été identifiée comme étant un produit issu de la dégradation du ligand. Le profil isotopique théorique simulé est en léger décalage par rapport au profil expérimental, ils sont néanmoins en accord parfait sur la forme de l'enveloppe isotopique (*figure A.III.31*).

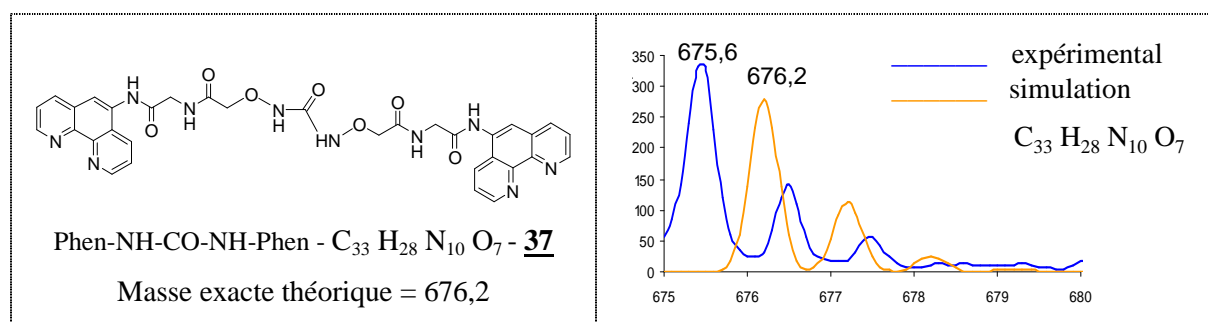


Figure A.III.31 : Distribution isotopique du produit déchargé $[37]^{1+}$ du spectre de masse présenté à la figure A.III.29. La distribution simulée est calculée à partir de la formule brute de la molécule, basée sur la masse des isotopes les plus abondants des éléments présents.

Le mécanisme proposé pour expliquer la formation de ce produit secondaire **37** repose sur l'attaque nucléophile de l'oxyamine libérée sur la fonction carbonyle du carbamate du ligand phénanthroline encore protégé (*figure A.III.32*). Il n'est cependant pas exclu que ce composé se forme uniquement dans la trappe du spectromètre à la suite de l'ionisation très énergétique des molécules.

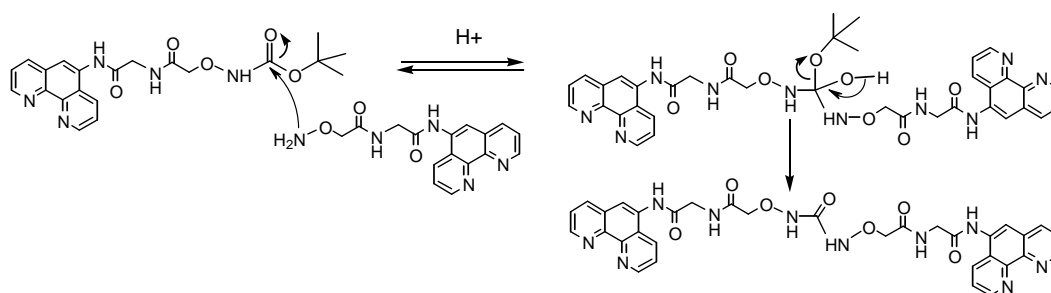


Figure A.III.32 : mécanisme supposé de formation du produit secondaire **37** dans HCl.

Nous avons réalisé une purification par CLHP semi-préparative, elle a permis d'éliminer efficacement les impuretés dont la trace de produit de départ persistante (système II₃). Cette méthode a même permis d'isoler pour la première fois le complexe $[Ru(TAP)_2Phen]^{2+}$ **33**, ensuite caractérisé par MS-ESI et CLHP (*figure A.III.33*). Le produit **33** est obtenu avec un rendement global de déprotection de 58 %.

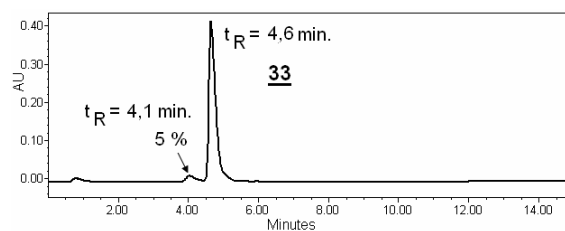


Figure A.III.33 : Chromatogramme du complexe **33** après purification CLHP (système II₁).

Le composé est ensuite stocké à -18°C , en solution dans l'eau. Cette solution de composé oxyamine **33** sert de solution mère pour les réactions de couplage ultérieures par le lien éther d'oxime. Des analyses MS-ESI et CLHP ultérieure de la solution mère, ne mettent en évidence aucun signe d'altération de la fonction oxyamine, même après trois mois de stockage (figure A.III.34). La présence de l'impureté plus polaire que le produit **33** reste stable à 5 %. Elle sera prise en compte lors de l'étape suivante de couplage avec les "synthons aldéhydes".

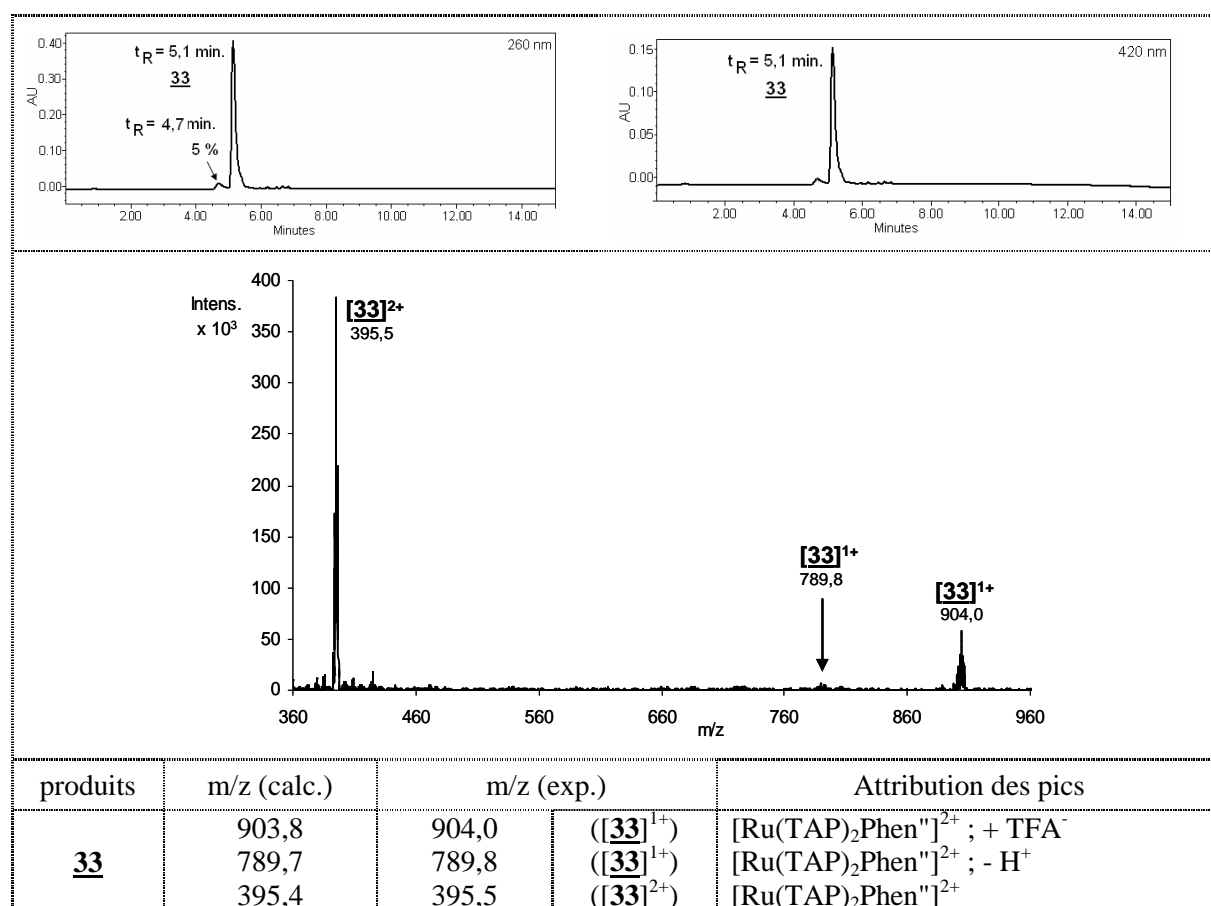


Figure A.III.34: Analyses CLHP et MS-ESI du produit **33** après de 3 mois de stockage (systèmes d'analyse II₁ et IV₂)

3.2 - Préparation du complexe $[Ru(TAP)_2TAP'']^{2+}$ **38**

Les conditions de déprotection optimisées ont été appliquées pour traiter le complexe $[Ru(TAP)_2TAP-ONHBoc]^{2+}$ **31** et former le "complexe oxyamine libre" **38**.

On réalise la déprotection du complexe **31** dans HCl 1N, à 10^{-2} M. La réaction se fait à température ambiante, et son avancement est suivi par CLHP. Les chromatogrammes montrent que la réaction est presque totale au bout de 5 heures (*figures A.III.35, a et b*). Le produit protégé **31** ($t_R = 6,9$ min.) disparaît de façon concomitante à l'apparition du produit oxyamine plus polaire **38** ($t_R = 3,9$ min.). Le composé oxyamine **38** se caractérise encore par un pic très large. L'intégrité de l'oxyamine libre a été confirmée en réalisant comme précédemment l'oxime avec l'acétone ⁽ⁱ⁾ (*figure A.III.35, c*).

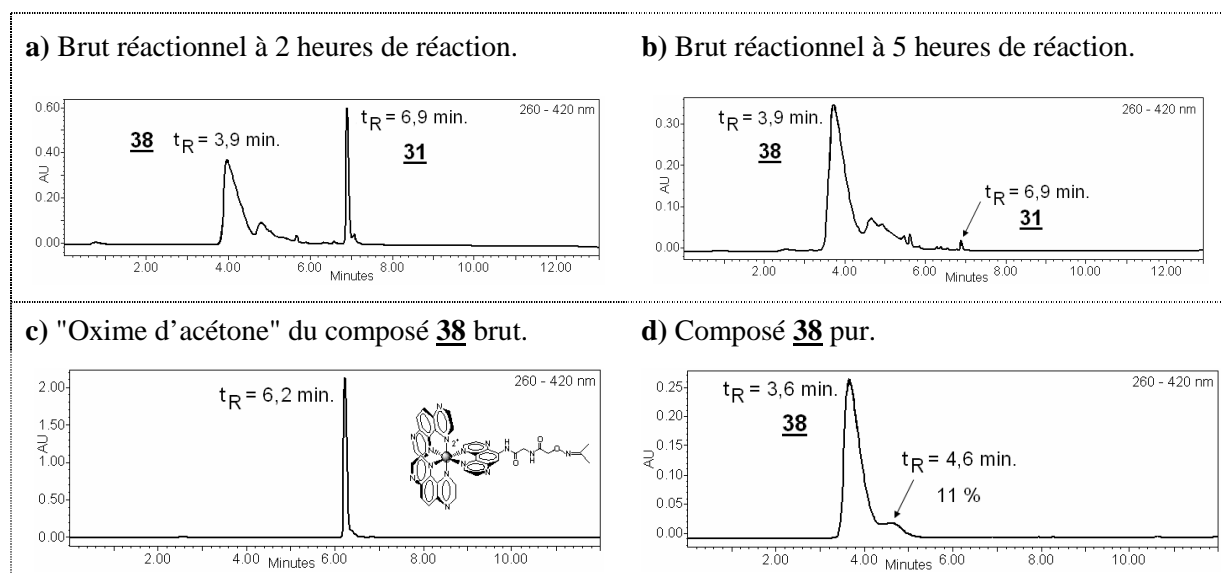


Figure A.III.35 : Analyses CLHP des produits issus de la déprotection du produit **31** dans HCl 1N (systèmes d'analyse II₁ et IV₂).

Le solvant est alors éliminé sous pression réduite. Le résidu est ensuite purifié par CLHP semi-préparative pour éliminer les impuretés présentes à 5 minutes d'élution, apparues en cours de réaction ; ainsi que le produit de départ persistant (système II₃). Le produit **38** est obtenu avec un rendement global de déprotection de 50 %. Cette méthode de purification permet d'isoler plus difficilement le complexe $[Ru(TAP)_2TAP'']^{2+}$ **38**, par rapport au produit **33** précédemment purifié. Le résidu **38** pur est ensuite repris avec de l'eau, puis caractérisé par MS-ESI et CLHP (*figures A.III.35.d, et A.III.36*). En effet, la chromatogramme met en évidence un élargissement du pic persistant au niveau des produits moins polaires, qui représente 11 % de la totalité du produit **38**.

⁽ⁱ⁾ On ajoute 10 équivalents d'acétone (5 μ L), et on laisse 15 minutes à température avant de l'analyser par CLHP.

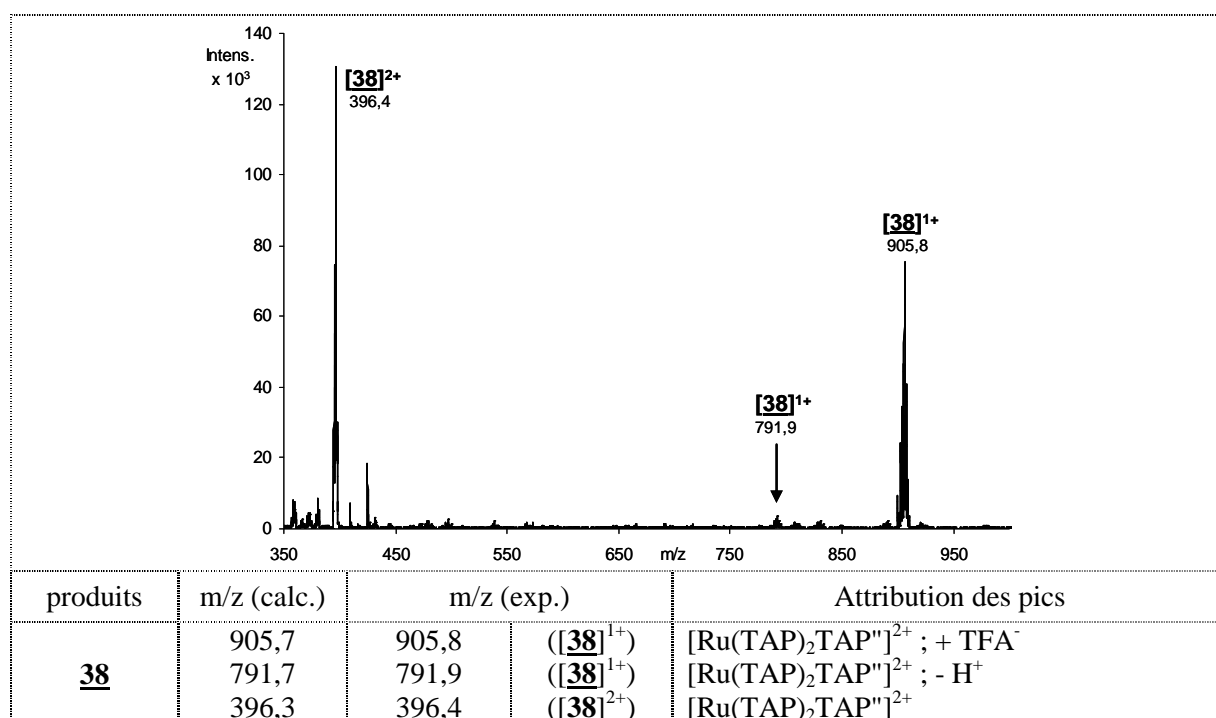


Figure A.III.36 : Analyses MS-ESI du composé **38** pur. (systèmes d'analyse II₁ et IV₂).

Le spectre MS-ESI infirme la présence de produits néfastes pour la suite, en confirmant la présence pratiquement exclusive du complexe [Ru(TAP)₂TAPⁿ]²⁺ **38**. Le composé est ensuite stocké à -18°C, en solution. Cette solution sert également de solution mère pour les réactions de couplage ultérieures par le lien éther d'oxime, en tenant compte de l'impureté. Des analyses MS-ESI et CLHP faites après quelques mois de stockage, indiquent une stabilité relative du complexe [Ru(TAP)₂TAPⁿ]²⁺ **38**. Le pic correspondant au produit **38** à tendance à s'élargir d'avantage, il est donc préférable d'utiliser rapidement le synthon [Ru(TAP)₂TAPⁿ]²⁺.

~

En résumé, l'acide trifluoroacétique s'avère trop agressif pour les complexes de ruthénium, et comme la source de formaldéhyde contaminante n'a pas été démasquée, la méthode de déprotection utilisée auparavant a dû être abandonnée. A la place, l'élimination de la protection carbamate se fait en présence d'acide chlorhydrique. Dans ces conditions on évite à la fois, la déchélation des complexes de ruthénium et la présence du formaldéhyde. On obtient les complexes de ruthénium [Ru(TAP)₂Phenⁿ]²⁺ **33** et [Ru(TAP)₂TAPⁿ]²⁺ **38** avec un bon rendement moyen de 55 %.

Conclusion

Dans ce chapitre, les trois étapes présentées nous ont permis d'obtenir les complexes oxyamines $[Ru(TAP)_2Phen]^{2+}$ **33** et $[Ru(TAP)_2TAP]^{2+}$ **38** avec une excellente pureté, permettant ainsi de concevoir les couplages ultérieurs dans les meilleures conditions.

Après plusieurs tentatives indispensables pour mettre au point les conditions d'élimination du groupement Boc, l'hydrolyse par HCl 1N est définitivement adoptée. Le groupe oxyamine s'est également avéré très stable en solution aqueuse. Cette caractéristique est très intéressante. Car les stocks de complexes de ruthénium "oxyamine" réalisés après les étapes d'élimination des groupes protecteurs Boc représentent en moyenne plus de 10 fois la quantité d'oligonucléotide "aldéhyde" disponible pour chaque couplage.

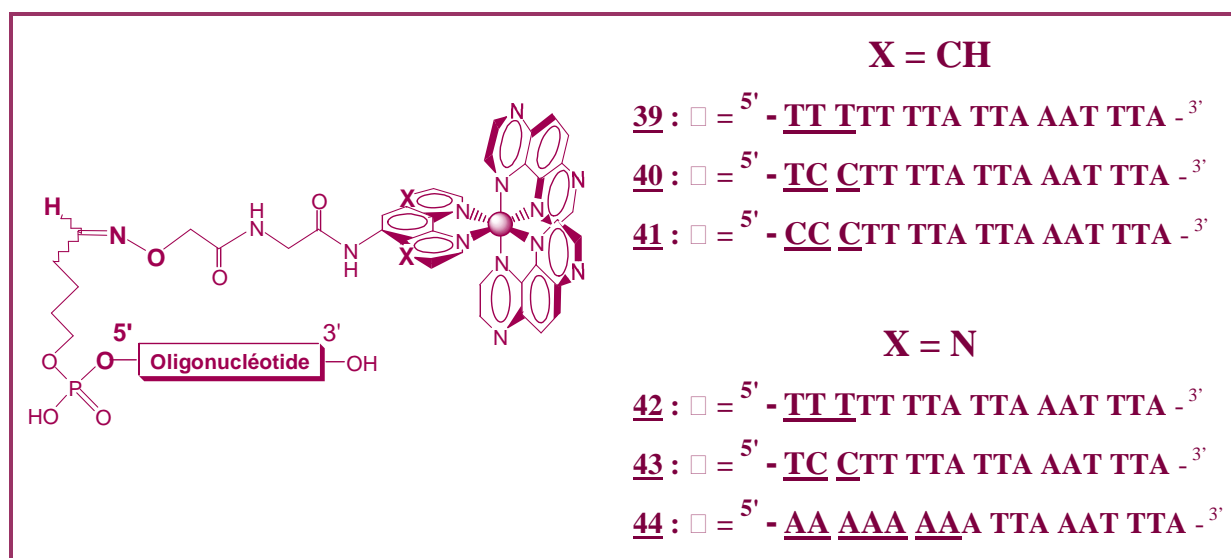
L'ancrage des deux nouveaux types de complexes à l'extrémité des "synthons aldéhyde" sera exposé au chapitre A.IV. Des études photochimiques et photophysiques comparatives des complexes libres et des conjugués seront ensuite présentées dans la partie B.

Chapitre IV : Assemblage chimiosélectif des conjugués

L'étape ultime de la synthèse repose sur l'assemblage chimiosélectif de l'unité ruthénium aux différentes espèces complémentaires. Nous avons modulé trois types de conjugués par le lien éther d'oxime à partir des fragments préparés. Dans un premier temps, ce chapitre comprend l'ancrage des complexes de ruthénium à l'extrémité 5' d'oligonucléotides, puis celui à l'opposé en 3', et enfin à l'extrémité N-terminale de peptides.

1 - Synthèse des conjugués "complexe de ruthénium(II)-5'-oligonucléotide"

Dans cette première partie, la méthode de couplage optimale est mise au point à partir de la préparation de 6 conjugués complexe de ruthénium(II)-5'-oligonucléotide. Ils sont obtenus en combinant 4 types d'oligonucléotides avec les 2 complexes de ruthénium choisis.



Les conjugués synthétisés serviront de macromolécules pour les études photophysiques (Partie B).

1.1 - Synthèse des conjugués $[Ru(TAP)_2Phen'']^{2+}$ -5'-oligonucléotide

39 - 40 - 41

Afin de mettre au point les conditions réactionnelles optimales pour ce type d'assemblage inédit "ruthénium-oligonucléotide" par le lien éther d'oxime, nous avons effectué les premières expériences de conjugaison uniquement à partir du complexe $[Ru(TAP)_2Phen'']^{2+}$ 33. Car le complexe $[Ru(TAP)_2TAP'']^{2+}$ 38 est certes plus photooxydant, il s'avère très sujet à la photodéchélation. Il nous paraît donc intéressant de débiter les expériences ultérieures de formation du photoadduit avec un complexe inédit moins réactif, mais plus stable sous illumination.

Le complexe $[Ru(TAP)_2Phen'']^{2+}$ 33 est tout d'abord fixé à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide aldéhyde 7 en employant les conditions classiques pour ce type de lien éther d'oxime.¹⁴⁴ Le couplage se fait dans le tampon aqueux d'acétate d'ammonium (0,4 M - pH 4,5) à température ambiante et en présence d'un excès de complexe 33 (3 éq., figure A.IV.1).

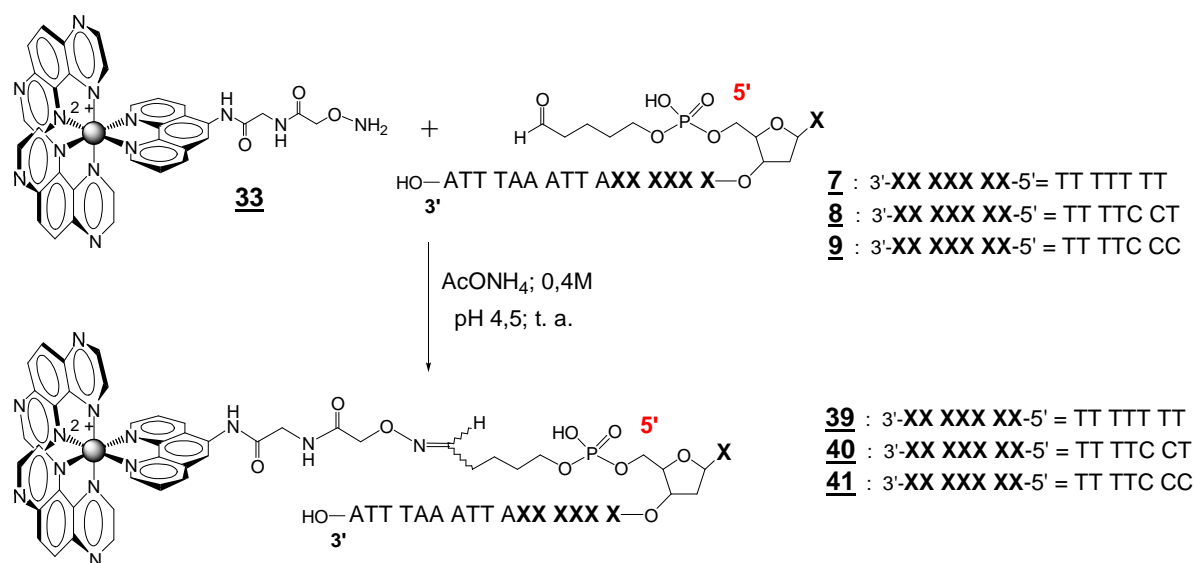


Figure A.IV.1 : Assemblage des conjugués 39, 40, et 41 par le lien chimiosélectif éther d'oxime.

L'évolution de la réaction est déterminée par CLHP en utilisant l'acétate d'ammonium comme éluant. Les oligonucléotides sont très bien détectés avec des éluants de type acétate, ou phosphate, à un pH très légèrement acide. En revanche, de telles conditions ne permettent pas de visualiser les complexes de ruthénium. Les résultats des différentes analyses effectuées au cours de la synthèse du conjugué 39 sont présentés à la figure A.IV.2 (chromatogrammes a, b, et c).

¹⁴⁴ Zatsepin, T. S.; Stetsenko, D. A.; Arzumanov, A. A.; Romanova, E. A.; Gait, M. J.; Oretskaya, T. S. Synthesis of Peptide-Oligonucleotide Conjugates with Single and Multiple Peptides Attached to 2'-Aldehydes through Thiazolidine, Oxime, and Hydrazine Linkages. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 822-830.

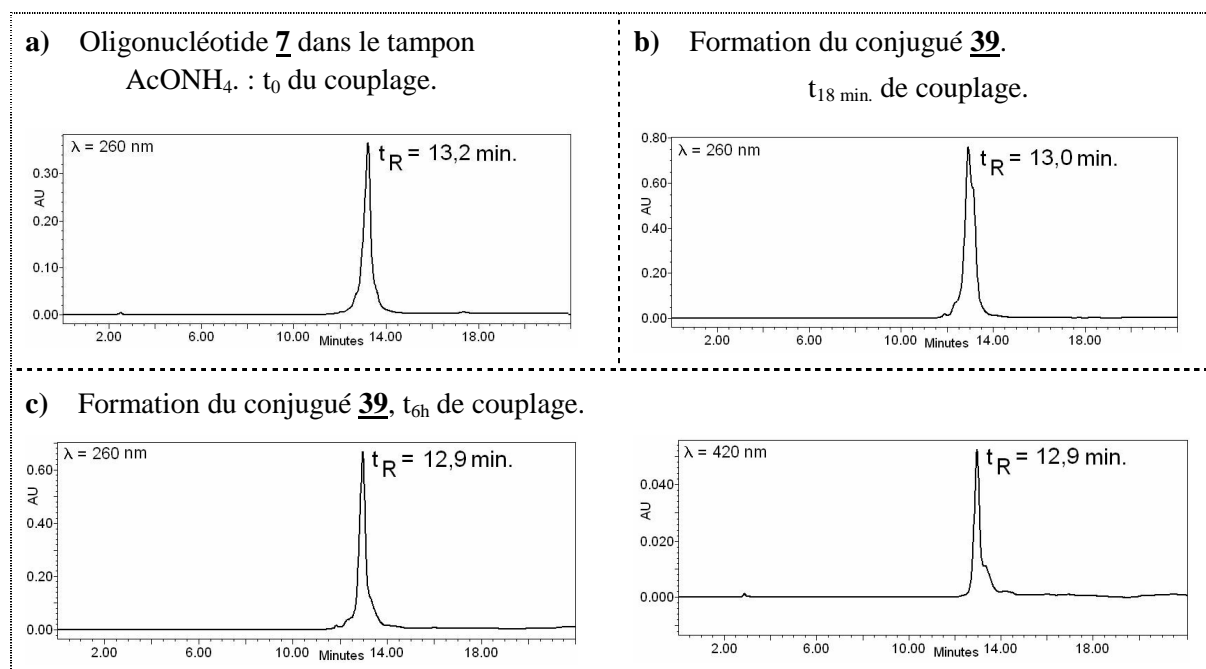


Figure A.IV.2 : Suivi réactionnel par CLHP de la préparation du conjugué **39** (système I₁).

La comparaison des trois analyses met timidement en avant la formation du conjugué **39**. En effet, la technique de CLHP utilisée ne permet pas de différencier pertinemment le réactif de départ (l'oligonucléotide aldéhyde **7**), du conjugué **39** formé. Seulement l'apparition d'un signal détectable à la longueur d'onde caractéristique du complexe de ruthénium, à 420 nm, atteste la formation du conjugué oligonucléotide-ruthénium. L'avancement précis de la réaction ne peut être déterminé dans l'acétate d'ammonium, et ce malgré l'expérimentation de différentes conditions d'élution. Nous avons réalisé de nombreux tests, soit en modifiant le gradient appliqué, soit en utilisant un tampon d'élution de type phosphate, sans le moindre succès. Les techniques usuelles de CLHP appliquées aux oligonucléotides ne permettent pas de séparer, dans ce cas, efficacement les réactifs des produits du mélange réactionnel.

Les couplages sont donc effectués sans avoir recours à la méthode d'analyse CLHP. Afin de déterminer la durée optimale du couplage, on commence par vérifier l'avancement en 15 heures de réaction à température ambiante. La réaction de couplage est directement suivie d'une étape de purification par CLHP pour éliminer l'excès de complexe de ruthénium (système I₃). Le produit **39** est obtenu avec un bon rendement de 55 %. Il est ensuite caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF⁽ⁱ⁾, et analysé par CLHP sous la forme d'un pic, unique et large, absorbant aux deux longueurs d'onde caractéristiques des conjugués "ruthénium-oligonucléotide", à 260 et 420 nm (figure A.IV.3).

⁽ⁱ⁾ Matrix assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight.

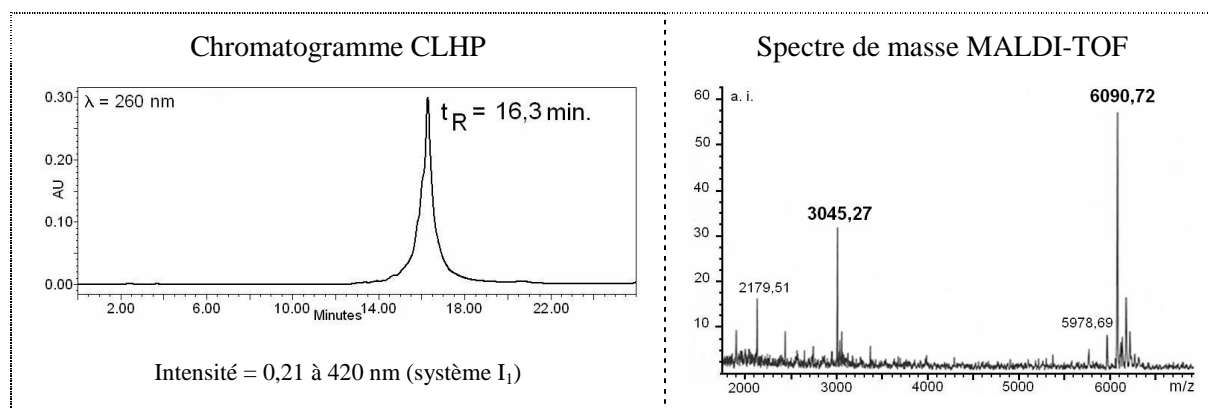


Figure A.IV.3 : Analyse du conjugué **39** purifié par CLHP.

Le spectre de masse confirme la formation du conjugué attendu, aucune trace d'oligonucléotide de départ **7** apparaît. Malgré le suivi réactionnel chaotique, les produits et les réactifs sont finalement séparés. Ces conditions de couplages sont donc appliquées pour assembler les conjugués "complexe de ruthénium(II)-5'-oligonucléotide" **40** et **41**, et ils sont obtenus avec de bons rendements de l'ordre de 38 et 45 % respectivement. Les produits ont également été analysés par CLHP et caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les spectres mettent en évidence la présence exclusive des conjugués **40** et **41** attendus.

L'étude de la photoréactivité de ces conjugués a mis en évidence la présence d'un sous-produit de masse moléculaire plus importante.⁽ⁱⁱⁱ⁾ Celui-ci semble correspondre à l'ancrage de deux oligonucléotides sur le complexe de ruthénium de départ. Un tel sous produit doit donc se former au cours de la réaction d'assemblage chimiosélectif des conjugués. Cette hypothèse est cohérente par rapport à la complexité de l'analyse de l'avancement du couplage. Dans ce cas, deux hypothèses sont envisagées pour déterminer la composition de ce sous-produit :

▢ *Hypothèse 1* : Le complexe de ruthénium **30** contient un sous-produit : $[\text{Ru}(\text{TAP})(\text{Phen})_2]^{2+}$ (figure A.IV.4).

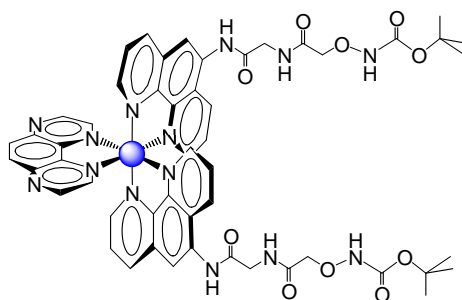


Figure A.IV. 4 : Représentation de l'impureté $[\text{Ru}(\text{TAP})(\text{Phen})_2]^{2+}$ **30**.

⁽ⁱⁱⁱ⁾ L'étude photophysique des conjugués est présentée à la partie B.

L'analyse par spectroscopie de masse électrospray ESI pouvait laisser pressentir son existence (*partie A.III.2.2.1*). Néanmoins, l'analyse poussée par RMN du complexe la remet totalement en question. C'est finalement la photoréactivité des conjugués porteurs du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}^{\prime\prime}]^{2+}$ qui a permis de trancher définitivement. En effet, leur étude photochimique a également mis en évidence un sous-produit similaire, alors que ni l'analyse par RMN, ni celle par spectrométrie de masse, n'avaient mis en évidence la présence du sous-produit $[\text{Ru}(\text{TAP})(\text{TAP}^{\prime\prime})_2]^{2+}$.

▢ *Hypothèse 2* : Le sous-produit proviendrait de la fixation de deux oligonucléotides sur un même ligand phénanthroline du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}^{\prime\prime}]^{2+}$ **33**.

- On peut tout d'abord exclure qu'un tel produit provienne d'une bis-acylation de la phénanthroline par le chaînon porteur de la fonction oxyamine **24** lors de l'étape finale de la préparation du ligand **25** (*partie A.III.1.1.4*). En effet, les analyses du ligand **25** (spectrométrie de masse EI, RMN) ne mettent jamais en évidence un tel produit.

- Par contre, il est possible que ce bis-conjugué provienne du greffage successif de deux oligonucléotides sur l'azote de l'oxyamine. D'après les données de la littérature, un tel sous-produit est envisageable.¹⁴⁵

Dans notre cas, il n'est malheureusement pas possible de confirmer cette hypothèse à partir de l'analyse directe des conjugués préparés. En effet, nos conjugués sont difficilement caractérisés par les moyens usuels d'analyse en spectrométrie de masse. Elle est donc vérifiée, indirectement, à partir d'un conjugué plus facilement analysable. Ce produit [**9-5'-Phen**] provient de l'ancrage de l'oligonucléotide **9** sur le ligand phénanthroline [**Phen**] par le lien éther d'oxime. Il a été réalisé selon le même procédé que celui employé pour préparer les conjugués "complexe de ruthénium-oligonucléotide". Le ligand [**Phen**] **25** est couplé à l'oligonucléotide **9** dans le tampon acétate d'ammonium (*figure A.IV.5*).

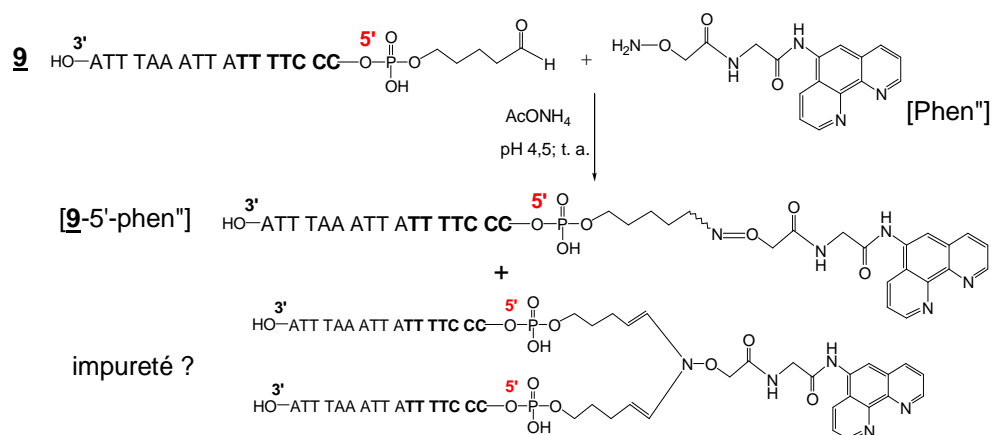


Figure A.IV.5 : Synthèse du conjugué test [**9-5'-Phen**] en envisageant la formation de l'impureté.

¹⁴⁵ Tronchet, J. M. J.; Zosimo-landolfo, G.; Balkadjian, M.; Ricca, A.; Zsély, M.; Barbalat-Rey, F.; Cabrini, D.; Lichtle, P.; Geoffroy, M. New types of spin-labelled sugar and nucleoside analogs : pyrrolidine, morpholine and piperidine *N*-Oxyls. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 4129-4132.

Le conjugué [9-5'-Phen"] est ensuite isolé lors d'une étape de purification par CLHP, avant d'être caractérisé par spectrométrie de masse ESI en mode négatif. Le spectre confirme la présence du conjugué désiré [9-5'-phen"] à partir des ions multichargés (5-), (6-), (7-), (8-) et (9-). L'analyse poussée du spectre met en évidence le sous-produit suspecté à partir des espèces multichargées (13-), (14-), et (15-) qui émergent plus légèrement du signal de fond (*figure A.IV.6*). L'identification de l'impureté est confirmée par l'homologie exacte du profil isotopique théorique avec la distribution expérimentale.⁽ⁱ⁾ Cette analyse atteste donc la possibilité de greffer successivement deux oligonucléotides sur l'azote de l'oxyamine dans les conditions de couplage usuelles.

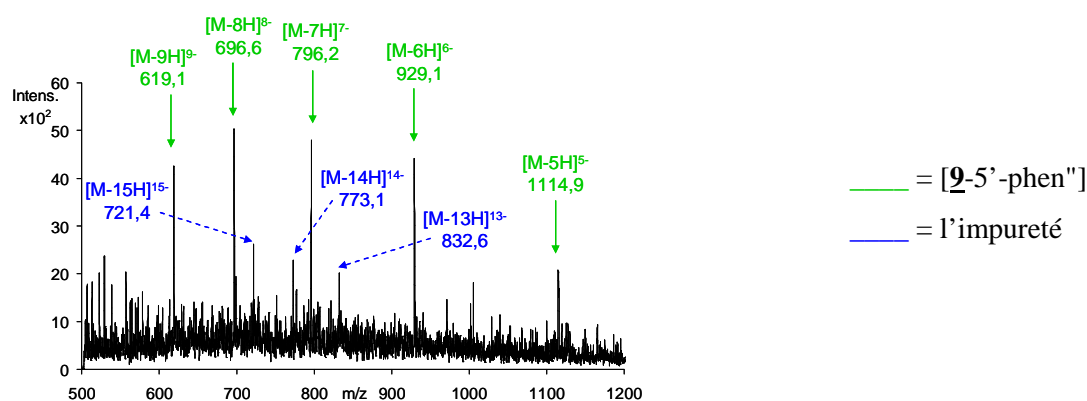


Figure A.IV.6 : Spectre de masse électrospray en mode négatif du conjugué [9-5'-phen"] pur (système IV₁).

L'hypothèse de la formation d'une impureté bis-conjugué au cours du couplage a été validée, elle provient de l'addition de deux oligonucléotides sur l'oxyamine.

La présence d'un tel sous-produit, ainsi que l'impossibilité récurrente de séparer les produits par CLHP, nous a conduit à abandonner définitivement la méthode précédente de purification par CLHP. Nous avons opté pour une purification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) dans des conditions dénaturantes.⁽ⁱⁱ⁾ Les produits sont purifiés en migrant au travers d'une matrice gélifiée d'acrylamide soumise à un potentiel électrique. Il en résulte une séparation de haute résolution suivant la taille, et la charge nette des espèces. Elle est d'autant intéressante et attrayante dans notre cas, que le complexe du ruthénium est de faible poids moléculaire et cationique, alors que l'oligonucléotide est une molécule imposante anionique.

Les produits de couplage réalisés ensuite ont tous été purifiés par gel d'électrophorèse préparatif. Cette technique nous a permis d'isoler aisément le conjugué attendu du sous-produit "bis-conjugué" qui migre plus lentement. Elle nous a apporté un double avantage en réalisant la préparation des conjugués avec une pureté excellente pour les études photochimiques, en plus d'isoler l'impureté "bis-conjugué" en quantité analysable. En revanche, l'analyse résultante ne nous a pas permis d'identifier précisément

⁽ⁱ⁾ La distribution isotopique simulée est déterminée à partir de la formule brute des molécules en se basant sur la masse des isotopes les plus abondants.

⁽ⁱⁱ⁾ Le principe de la technique est détaillé dans la Partie expérimentale.

le bis-conjugué afin de valider définitivement notre hypothèse. En effet, l'analyse par spectrométrie MALDI-TOF fournit un massif de pics dense aux environs de la masse théorique envisagée ($M = 10800$ g/mole). Et ce malgré la répétition des expériences d'élimination des sels cationiques de l'échantillon analysé. Ces résultats sont tout à fait préliminaires. Ils demandent à être répétés et affinés par une étude plus poussée, si la présence du sous-produit "bis-conjugué" sur les gels d'électrophorèse se perpétue.

Néanmoins, cette technique de purification est réputée moins productive que la purification par CLHP. Il est donc primordial d'optimiser les conditions de couplage. Il semble nécessaire de déterminer au préalable les conditions exactes de formation de l'impureté "bis-conjugué". Car malgré la répétition fidèle des conditions de couplage, les nombreuses réactions de conjugaison précédentes ont fourni des quantités variables et importantes de sous-produit (de 10 jusqu'à 50 % du conjugué désiré).

- La première approche consiste à suivre l'évolution de la réaction par un marquage radioactif de l'oligonucléotide au ^{32}P . Les deux techniques de marquage en 5', et en 3', sont expérimentées en parallèle. Afin d'éviter l'exposition des oligonucléotides aldéhydes aux conditions de marquage, nous avons choisi de fixer le ^{32}P aux oligonucléotides 1,2-diol. Le composé **3**, diol en 5', est marqué à l'extrémité 3' ; alors que l'oligonucléotide **13** le sera en 5'. Cette étape est suivie d'une précipitation dans l'éthanol pour extraire l'oligonucléotide du milieu de marquage, qui contient notamment un réducteur qui pourrait s'avérer néfaste pour le complexe métallique (le dithiothréitol pour le marquage en 5', et le β -mercaptoéthanol pour celui en 3'). Dans les deux cas, les étapes classiques d'oxydation, de purification⁽ⁱ⁾ sont réalisées, avant de terminer par le couplage en présence d'une quantité équimolaire de complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ **33**. Le produit final, ainsi que différents prélèvements, ont été analysés par gel d'électrophorèse après 15 heures de réaction à température ambiante. Cette analyse ne nous a malheureusement pas apporté d'arguments supplémentaires concernant la formation du sous-produit "bis-conjugué". Les deux techniques de marquage s'avèrent destructrices pour les "oligonucléotides 1,2-diol".

- La seconde tentative envisagée consiste à modifier le rapport [oligonucléotide]/[complexe de Ru] lors du couplage pour favoriser la formation du bis-conjugué. La réaction est réalisée dans le tampon aqueux d'acétate d'ammonium (0,4 M - pH 4,5) à température ambiante, et en présence d'un excès d'oligonucléotide (2 éq.). Ces conditions particulières n'ont pas suffi à rendre exclusive la formation du "bis-conjugué". La purification sur gel d'électrophorèse met toujours en évidence la formation du sous-produit "bis-conjugué", en plus du conjugué désiré. Malgré ce résultat, l'hypothèse

⁽ⁱ⁾ La purification se fait suivant le système de déssalage D_2 par centrifugation au travers d'une colonne C_{18} montée sur un filtre centricon dans un eppendorf à usage unique (*Partie expérimentale*, paragraphe oligonucléotide).

retenue reste la plus probable. On décide finalement d'optimiser les conditions de couplage à partir des paramètres de réaction afin de déterminer le protocole de conjugaison le plus efficace.

Plusieurs essais ont du être réalisés pour nous permettre d'optimiser la préparation des conjugués **39**, **40**, et **41** en prévenant la formation secondaire du "bis-conjugué". En définitive, la méthode validée permet d'obtenir exclusivement les conjugués attendus avec de très bon rendement de 36, 49 et 22 % respectivement. Elle consiste à réaliser le couplage dans le tampon aqueux d'acétate d'ammonium (0,4 M - pH 4,5) à température ambiante, et en présence d'un excès de "composé oxyamine" (2 éq.). Après une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est directement purifié par gel d'électrophorèse de polyacrylamide préparatif. On observe, pour la première fois, exclusivement le conjugué attendu. Il est ensuite récupéré et déssalé pour éliminer les sels cationiques, principalement l'urée présente en abondance. Cette étape se fait avec un bon rendement moyen de l'ordre de 90%. Les produits sont ensuite caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode négatif par l'ion moléculaire et l'espèce dichargée correspondante (*figure A.IV.7*).

Conjugués	$M_{\text{théo.}}$ (g/mole)	Formule brute	$M_{\text{exp.}}$ (g/mole)
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}\text{-5'd-(TTT TTT TAT TAA ATT TA)}_3'$ 39	6091,2	$\text{C}_{211}\text{H}_{251}\text{N}_{62}\text{O}_{113}\text{P}_{17}\text{Ru}$	6091,4
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}\text{-5'd-(TCC TTT TAT TAA ATT TA)}_3'$ 40	6061,5	$\text{C}_{209}\text{H}_{249}\text{N}_{64}\text{O}_{111}\text{P}_{17}\text{Ru}$	6062,7
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}\text{-5'd-(CCC TTT TAT TAA ATT TA)}_3'$ 41	6046,2	$\text{C}_{208}\text{H}_{248}\text{N}_{65}\text{O}_{110}\text{P}_{17}\text{Ru}$	6046,3

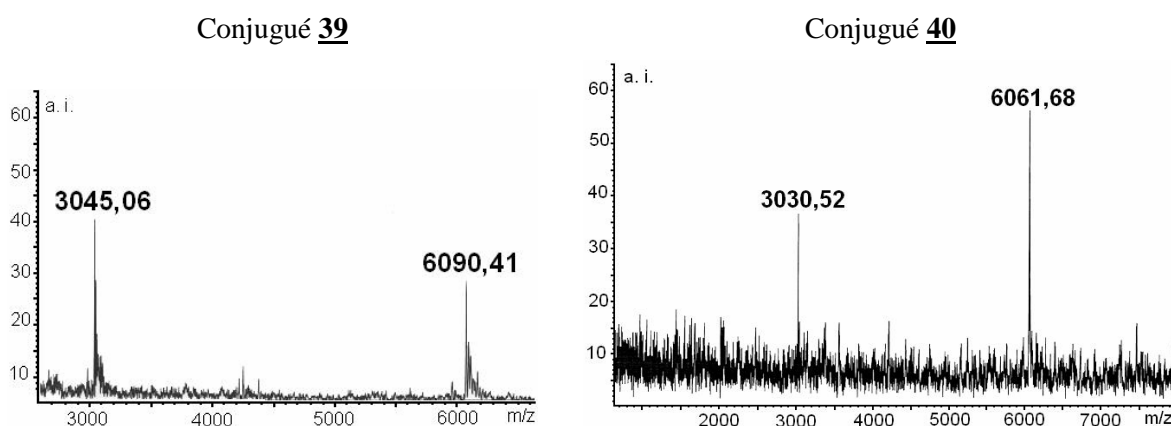


Figure A.IV.7 : Spectre MALDI-TOF (mode négatif) des composés purs **39** et **40**.

On peut comparer ce spectre de masse MALDI-TOF du conjugué **39** pur à celui obtenu précédemment par la méthode non optimisée de couplage (*figure A.IV.3*). Cette précédente analyse était réalisée sur le mélange conjugué et sous-produit "bis-conjugué". Les profils sont finalement peu différents malgré l'impureté. Cette technique d'analyse n'est donc pas idéale pour ce type de molécules. Néanmoins, c'est la seule capable de caractériser ce type de conjugué complexe de ruthénium(II)-oligonucléotide. Elle sera donc utilisée par la suite pour confirmer la préparation du produit attendu, en réalisant les analyses uniquement sur des produits purs isolés de gel d'électrophorèse.

Toutefois, le conjugué **40** a également été caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif. Il possède une masse théorique : $M = 6061$ g/mol, et on obtient l'ion moléculaire $[M-H^+] = 6058,6$ g/mole à partir de ses ions multichargés (4+), (5+), et (6+) visibles sur le spectre de masse (*figure A.IV.8*).

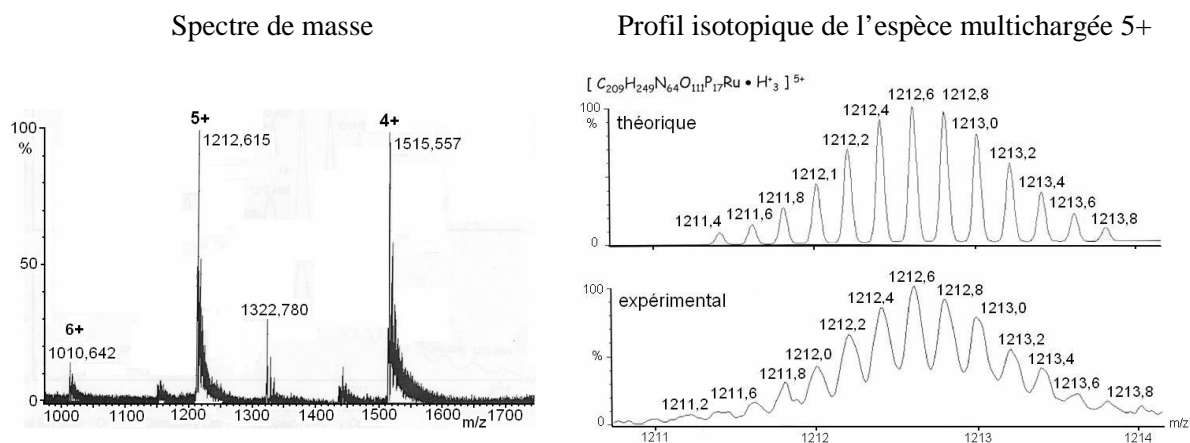


Figure A.IV.8 : Analyse du conjugué **40** obtenue avec un spectromètre quadripôle en mode positif. (la distribution simulée du profil isotopique est déterminée à partir de la formule brute du conjugué, basée sur la masse des isotopes les plus abondants des éléments présents).

Le protocole utilisé permet de s'affranchir totalement du sous-produit. Certes les précédentes expériences de couplage avaient toujours été réalisées dans ces mêmes conditions, et on n'observait pourtant l'impureté. La différence provient de la qualité des réactifs porteurs de la fonction oxyamine. Maintenant quand on réalise une conjugaison, on a un réel excès de complexe de ruthénium, alors qu'avant les nombreux piègeurs de l'oxyamine l'annulaient.

Ce protocole va donc être utilisé pour préparer l'ensemble des conjugués.

1.2 - Synthèse des conjugués $[Ru(TAP)_2TAP'']^{2+}$ -5'-oligonucléotide **42 - 43 - 44**

Les couplages chimiosélectifs du complexe **38** avec les oligonucléotides **7**, **8**, et **10** sont réalisés dans les conditions optimales déterminées précédemment. Les réactions se font dans l'acétate d'ammonium tamponné (0,4 M - pH 4,5) en présence de 2 équivalents de complexe **38**, pendant 17 heures à température ambiante. Ils conduisent, après purification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, aux conjugués **42**, **43** et **44** avec des rendements de 42, 35 et 36% respectivement. Le "bis-conjugué" n'est jamais décelé sur le gel de polyacrylamide lors de la purification réalisée après une nuit de couplage.

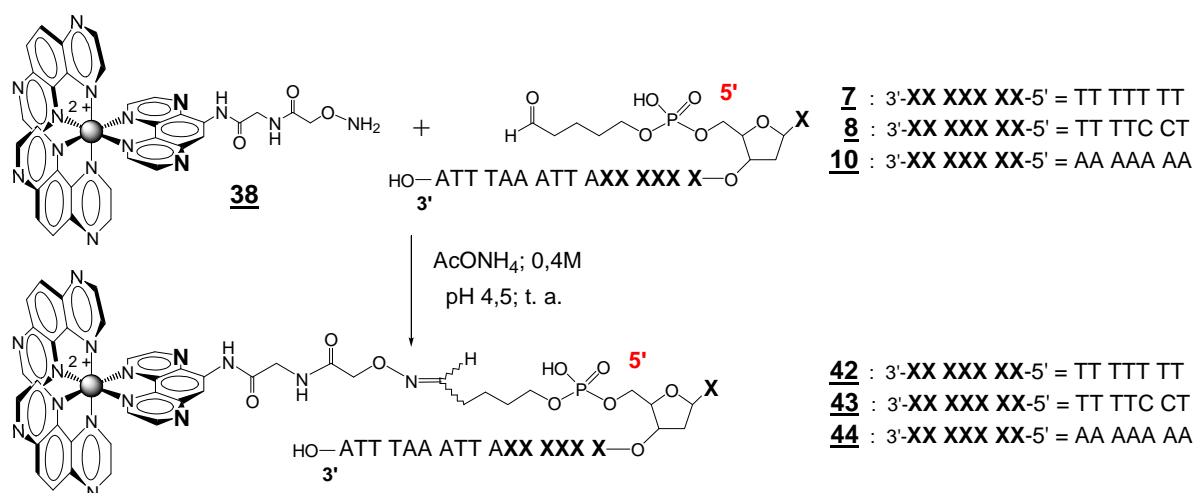


Figure A.IV.9 : Synthèse chimiosélective des conjugués **42**, **43**, et **44**.

Ils sont caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode négatif.

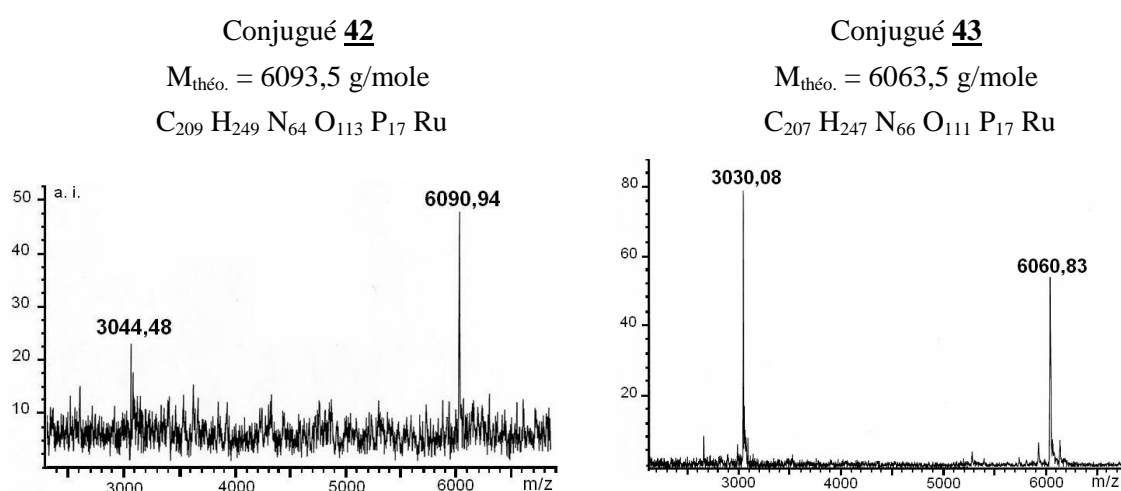


Figure IV.10 : Spectres MALDI-TOF (mode négatif) des composés purs **42** et **43**.

~

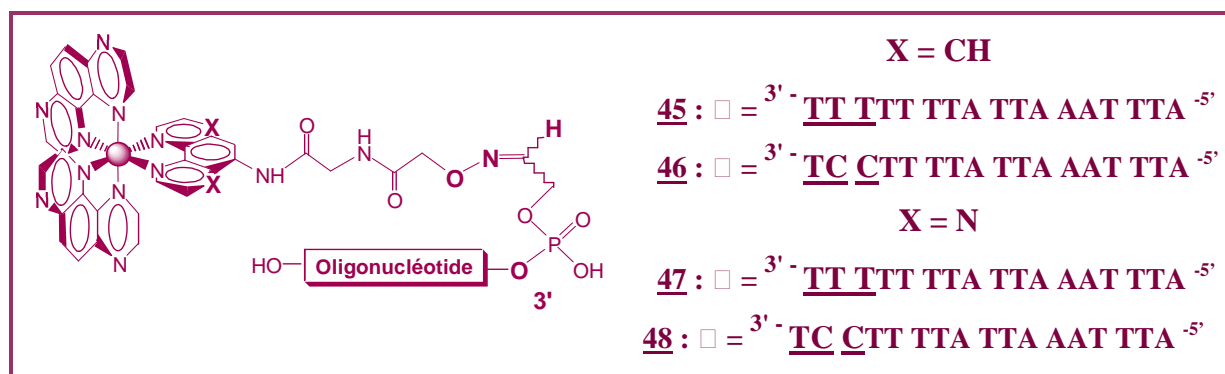
En résumé, les conjugués complexe de ruthénium(II)-5'-oligonucléotide sont obtenus avec des rendements de 35 à 50 %. L'optimisation des conditions permet de réaliser la conjugaison sans envisager la formation du "bis-conjugué". Pour cela, le couplage doit s'effectuer dans un tampon aqueux d'acétate d'ammonium (0,4 M - pH 4,5) pendant une nuit à température ambiante, et en présence d'un double excès de complexe de ruthénium porteur de la fonction oxyamine.

En revanche, il reste à optimiser les conditions d'analyse des conjugués par spectrométrie de masse électrospray. Cette technique d'analyse permettrait de maîtriser les éventuels désagréments. Elle s'avère déjà indispensable pour s'affranchir de la présence de contaminants au sein des solutions de "complexes de ruthénium oxyamine", hautement néfastes à la synthèse exclusive des conjugués.

La méthode de synthèse optimisée a ensuite été appliquée pour préparer les différents types de conjugués complexe de ruthénium(II)-3'-oligonucléotide.

2 - Synthèse des conjugués "complexe de Ru(II)-3'-oligonucléotide"

Dans cette seconde partie, la méthode est appliquée à la préparation de 4 conjugués complexe de ruthénium(II)-3'-oligonucléotide. Ils sont obtenus en combinant 2 types d'oligonucléotides avec les différents complexes de ruthénium.



Les conjugués **45**, **46**, et **48** serviront de macromolécules pour les études photophysiques (Partie B).

~

Les 2 types d'oligonucléotides porteurs de la fonction aldéhyde à l'extrémité 3', **14** et **15**, sont indifféremment accrochés sur les complexes de ruthénium [Ru(TAP)₂Phen"]²⁺ **33** et [Ru(TAP)₂TAP"]²⁺ **38**. Les 4 conjugués **45**, **46**, **47** et **48** sont préparés à partir des conditions optimales de couplage déterminées précédemment.

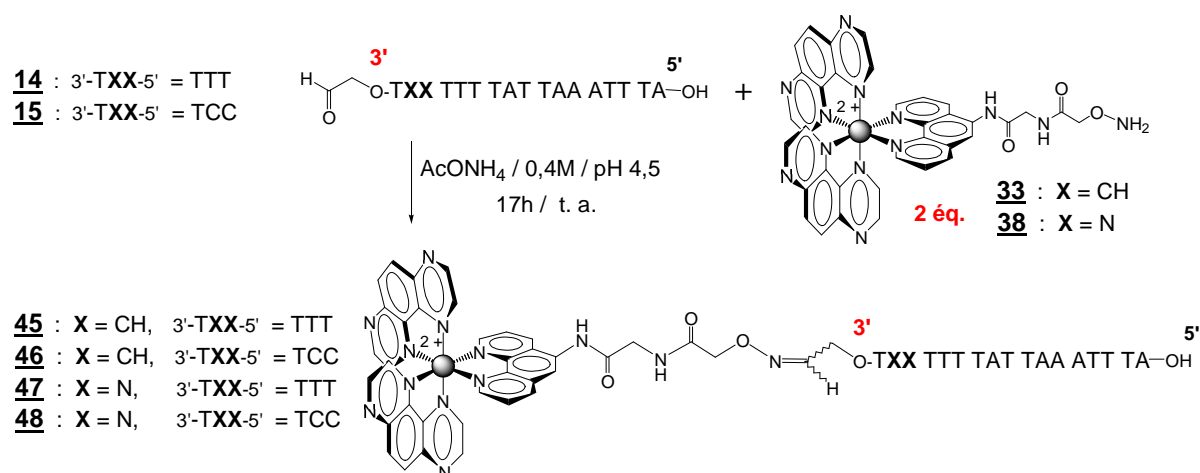


Figure A.IV.11 : Synthèse chimiosélective des conjugués **45**, **46**, **47**, et **48**.

La conjugaison se déroule classiquement dans l'acétate d'ammonium tamponné (0,4 M - pH 4,5) en présence de 2 équivalents de complexe **33**, ou **38** suivant le conjugué désiré. La réaction évolue pendant une nuit à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite directement purifié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. On obtient, après récupération et déssalage, les 3 conjugués **45**, **46**, et **48** avec des rendements de 25, 47, et 59 % respectivement. La valeur plus faible du rendement de synthèse du conjugué **45** s'explique par la présence au final de 5 % de sous-produit de haut poids moléculaire en position haute du gel de polyacrylamide préparatif. L'impureté est présente dans ce cas, car ce couplage a été effectué dans les conditions réactionnelles antérieures à l'optimisation de la stratégie. Ce type de conjugué $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ -3'd-(TTT TTT TAT TAA ATT TA)5' sert exclusivement de molécule contrôle des applications ultérieures en photochimie. Il est donc peu sollicité pour les expériences de formation des photoadduits.

D'autre part, Le conjugué **47** a été préparé avec un très faible rendement de 7 %. Le couplage conduisant à ce conjugué a été l'un des premiers effectué. Il a donc été réalisé à partir d'une solution de complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}']^{2+}$ **38** très fortement contaminée par des composés carbonylés. Malgré un fort excès de complexe **38** (9 éq.), et 26 heures de réaction à température ambiante, peu de produit a été récupéré lors de la purification par CLHP. Ce produit n'a d'ailleurs pas été utilisé ultérieurement pour les études photochimiques.

En revanche, les 2 réactions de couplage conduisant aux conjugués **46** et **48** ont été réalisées dans les conditions optimales. Elles ne révèlent aucune trace du sous-produit, ce qui explique le taux remarquable de transformation.

Les conjugués ont également été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Conjugués	$M_{\text{théo.}}$ (g/mole)	Formule brute	$M_{\text{exp.}}$ (g/mole)
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}\text{-}3'\text{-d}-(\text{TTT TTT TAT TAA ATT TA})5'$ 45	6049,1	$\text{C}_{208} \text{H}_{245} \text{N}_{62} \text{O}_{113} \text{P}_{17} \text{Ru}$	6050,3
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}\text{-}3'\text{-d}-(\text{TCC TTT TAT TAA ATT TA})5'$ 46	6019,2	$\text{C}_{206} \text{H}_{243} \text{N}_{64} \text{O}_{111} \text{P}_{17} \text{Ru}$	6020,7
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}]^{2+}\text{-}3'\text{-d}-(\text{TTT TTT TAT TAA ATT TA})5'$ 47	6051,3	$\text{C}_{206} \text{H}_{243} \text{N}_{64} \text{O}_{113} \text{P}_{17} \text{Ru}$	6052,6
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}]^{2+}\text{-}3'\text{-d}-(\text{TCC TTT TAT TAA ATT TA})5'$ 48	6027,2	$\text{C}_{204} \text{H}_{247} \text{N}_{66} \text{O}_{111} \text{P}_{17} \text{Ru}$	6028,5

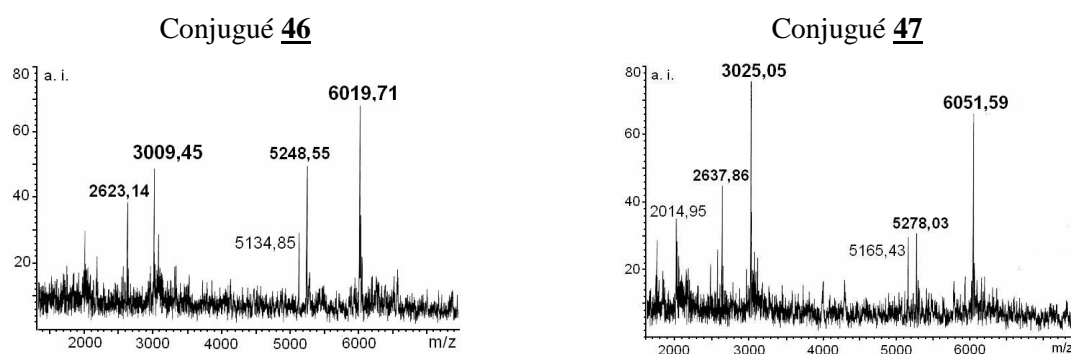


Figure A.IV.13 : Spectres MALDI-TOF (mode négatif) des composés purs **46** et **47**.

L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF se révèle destructrice pour les conjugués "ruthénium-3'-oligonucléotide". On retrouve sur les spectres des produits **46**, et **47**, l'ion moléculaire correspondant au conjugué attendu, ainsi que l'espèce multichargée (2-). Le spectre met également en évidence les oligonucléotides **14**⁽ⁱ⁾ et **15**⁽ⁱⁱ⁾ précurseurs des deux conjugués. Cette caractéristique est récurrente pour les 4 conjugués formés. Alors que les analyses des conjugués où le métal est ancré à l'extrémité 5', ne montraient pas la présence des oligonucléotides de départ (figure A.IV.7). Le lien éther d'oxime de l'extrémité 3' apparaît plus fragile, il se rompt facilement sous l'action du laser utilisé pour ioniser la molécule au cours de l'analyse MALDI-TOF, quelque soit la séquence oligonucléotidique fonctionnalisée en son extrémité 3'.

Le conjugué **46** a également été caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode négatif. Il possède une masse théorique : $M = 6019$ g/mol, et on obtient l'ion moléculaire $[\text{M-H}^+] = 6017,7$ g/mole à partir de ses ions multichargés (6-), (7-), (8-), (9-) et (10-) visibles sur le spectre de masse (figure A.IV.13). Il est le seul conjugué complexe de ruthénium-oligonucléotide caractérisé par le spectromètre à trappe ionique. Les nombreuses autres tentatives se sont révélées infructueuses. Les conjugués ont tendance à afficher le profil typique d'un composé trop salin. Les ions multichargés n'arrivent pas à émerger d'un bruit de fond trop dense, malgré les nombreuses méthodes de déssalage expérimentées (CLHP, dialyse, résines échangeuses d'ions...).

⁽ⁱ⁾ **14** : $\text{PM}_{\text{théorique}} = 5276,5$ g/mole pour $\text{C}_{172} \text{H}_{220} \text{N}_{49} \text{O}_{111} \text{P}_{17}$.

⁽ⁱⁱ⁾ **15** : $\text{PM}_{\text{théorique}} = 5246,5$ g/mole pour $\text{C}_{170} \text{H}_{218} \text{N}_{51} \text{O}_{109} \text{P}_{17}$.

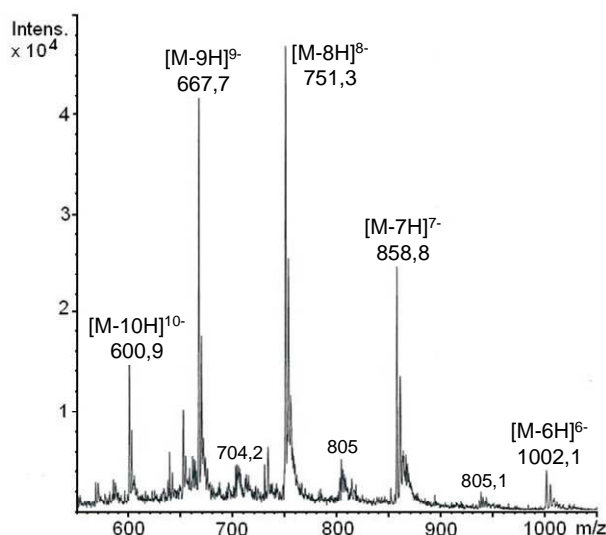


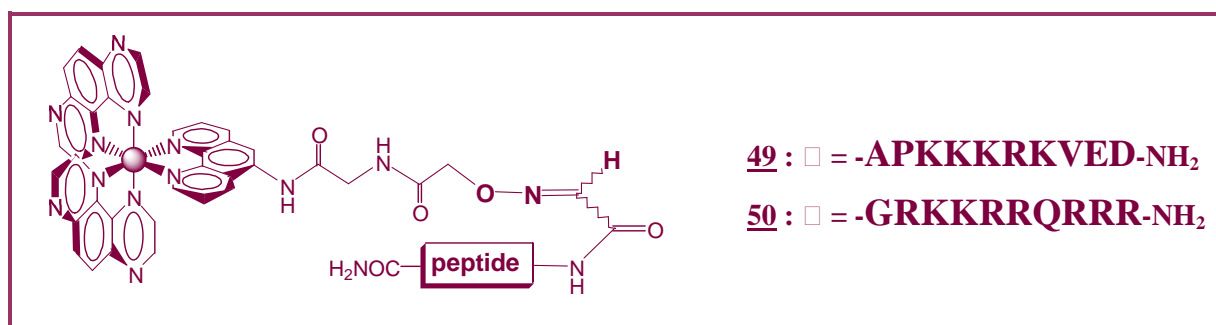
Figure A.IV.13 : Spectre de masse électrospray en mode négatif du composé **46**.

~

En résumé, la stratégie optimisée de conjugaison des complexes de ruthénium sur les oligonucléotides fait également ses preuves à l'extrémité 3'. Quelque soit le type de complexe de ruthénium, les conjugués sont obtenus avec d'excellents rendements de l'ordre de 50%. Malgré une extrémité 3'-fonctionnalisée moins prononcée et mobile que son opposée en 5', l'efficacité de la réaction est équivalente. Par contre la nature différente des chaîons porteurs de l'aldéhyde se manifeste lors de l'analyse par spectrométrie MALDI-TOF des conjugués. Le lien éther d'oxime cède quand il se trouve sur un chaînon plus court en 3'. Alors que celui de l'extrémité 5' résiste à des conditions d'analyses similaires.

3 - Synthèse des conjugués "complexe de Ru(II) - peptide"

Dans cette partie, la polyvalence de la technique est testée en préparant 2 types de conjugués complexe de ruthénium(II)-peptide. Ils sont obtenus en combinant 2 peptides différents avec un seul complexe de ruthénium : le $[Ru(TAP)_2Phen'']^{2+}$.



Le produit **49** a servi à valider le procédé de préparation d'un tout nouveau type de conjugué "ruthénium-peptide". Le produit **50** est transmis à l'équipe bruxelloise du Pr. A. Kirsch-De Mesmaeker afin de déterminer ses propriétés photophysiques.

~

3.1 - Préparation du conjugué « $[Ru(TAP)_2Phen'']^{2+}$ -NLS» **49**

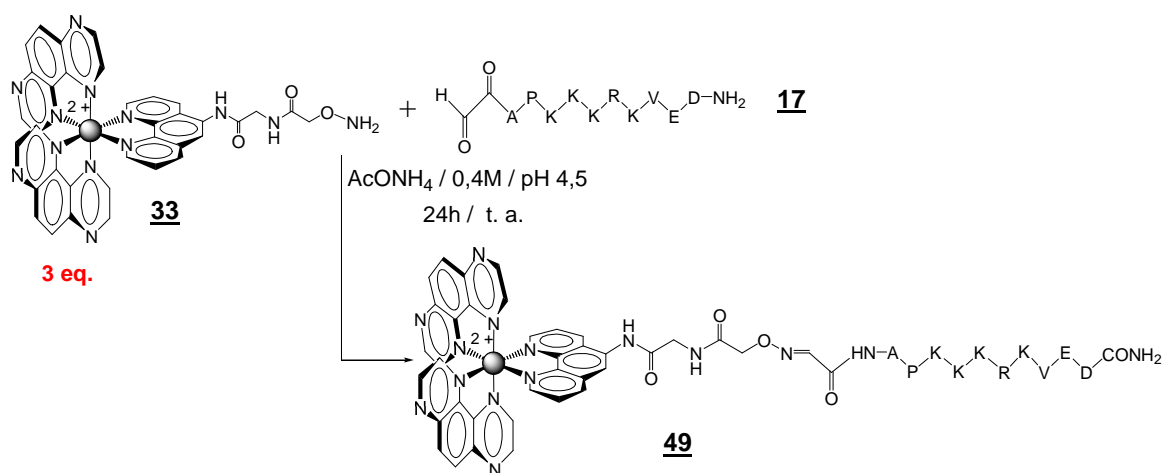


Figure A.IV.14 : Synthèse chimiosélective du conjugué **49**.

Le conjugué **49** est synthétisé à partir de l'intermédiaire peptide "NLS " **17** et le complexe de ruthénium $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ **33**. (Figure A.IV.14) La réaction se déroule dans l'acétate d'ammonium tamponné (0,4 M - pH 4,5) en présence de 3 équivalents de complexe **33**.

L'analyse CLHP montre la formation relativement rapide du composé **49**. Après 1 heure de réaction le conjugué est largement majoritaire par rapport au peptide. Le couplage est complet au bout de 22 heures à température ambiante (Figure A.IV.15). L'éluant utilisé pour les analyses CLHP est acidifié par l'acide trifluoroacétique. Ces conditions permettent de mettre en évidence simultanément les deux réactifs. Le conjugué se distingue du peptide, par son absorption caractéristique à 420 nm en plus de 214 nm.

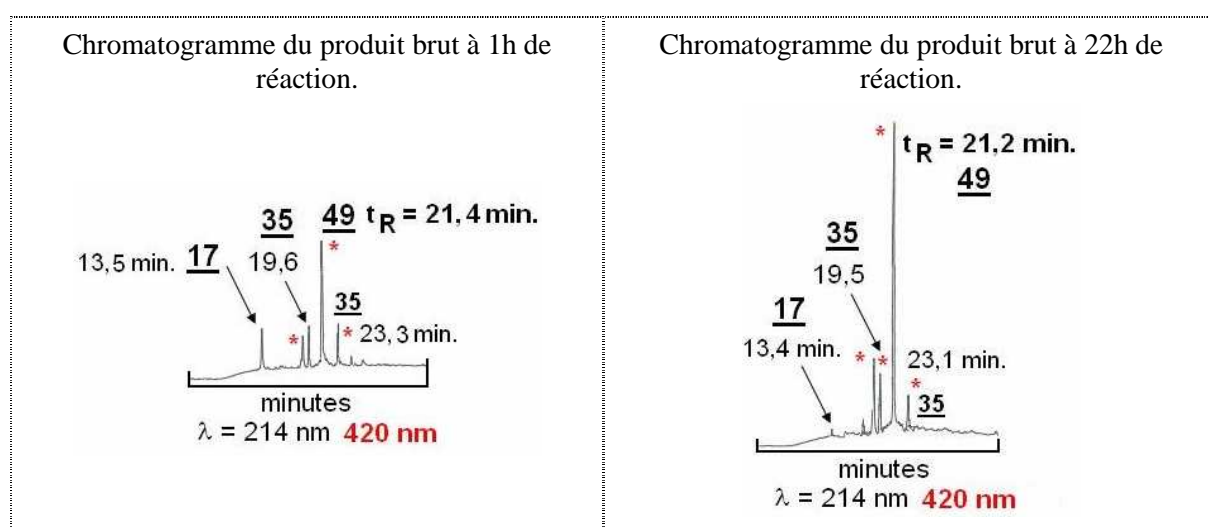


Figure A.IV.15 : Analyse de l'avancement de la réaction par CLHP (système II₂, détection à 214 nm et 420 nm).

Le milieu réactionnel est directement purifié par CLHP semi-préparative (système II₃). Le produit majoritaire est ensuite facilement caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif par ses ions multichargés (2+), et (3+). A titre comparatif, l'analyse a également été effectuée par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode positif.

Conjugué **49** : $\text{PM}_{\text{théor.}} = 2026,28 \text{ g/mole}$ pour $\text{C}_{90}\text{H}_{127}\text{N}_{31}\text{O}_{18}\text{Ru}$

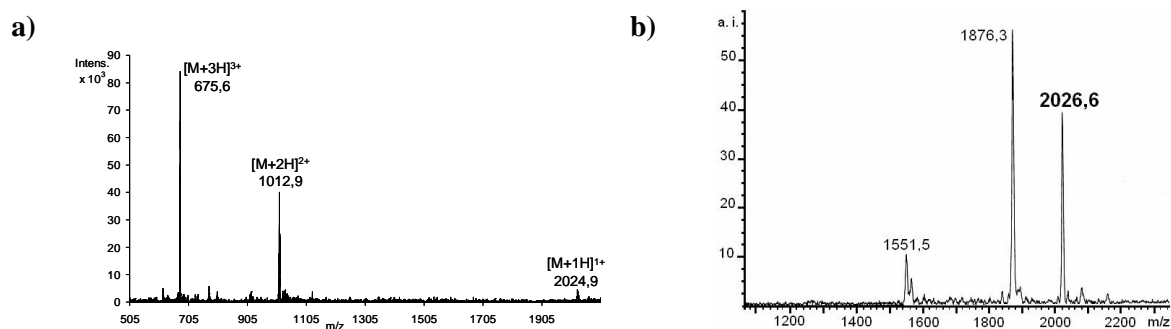


Figure A.IV.17 : Analyse du conjugué **49** pur par spectrométrie de masse : a) spectrométrie de masse électrospray ; b) spectrométrie de masse MALDI-TOF.

L'analyse MALDI-TOF entraîne une dégradation du produit. Le lien oxime ne résiste pas à ce type d'analyse. On retrouve des fragments qui semblent plutôt provenir du peptide **19** ($M_{\text{théo.}} = 1253,5$ g/mole) que du complexe de ruthénium **33** ($M_{\text{théo.}} = 790,8$ g/mole). Cette technique ne sera pas retenue pour caractériser ce type de conjugué, plus facilement analysable par spectrométrie de masse électrospray.

Finalement, on obtient le conjugué **49** avec un rendement de 45 %.

3.2 - Préparation du conjugué « $[Ru(TAP)_2Phen'']^{2+}$ -Tat» **50**

Le conjugué **50** est synthétisé à partir de l'intermédiaire peptide "Tat" **19** et le complexe de ruthénium $[Ru(TAP)_2Phen'']^{2+} **33** (Figure A.IV.17). Le couplage est réalisé dans l'acétate d'ammonium tamponné (0,4 M - pH 4,5), en présence d'une quantité équimolaire de composé **19**.$

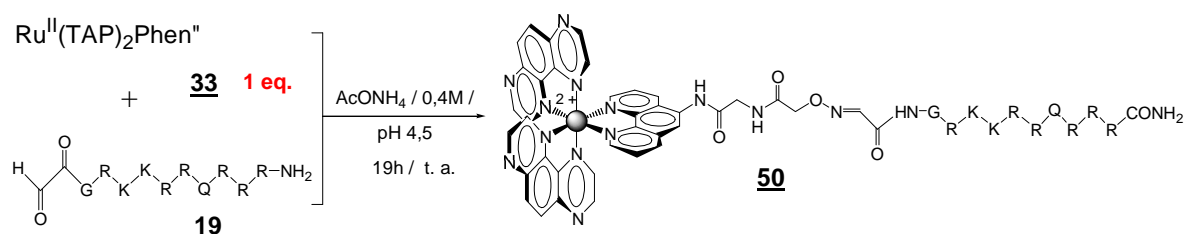


Figure A.IV.17 : Synthèse chimiosélective du conjugué **50**.

L'avancement de la réaction est déterminé par CLHP. Elle s'avère complète après une nuit à 25°C. Le milieu réactionnel est ensuite purifié par CLHP semi-préparative de façon à éliminer les éventuelles impuretés formées suite à la dégradation des deux synthons extrêmement réactifs (système II₃). Le conjugué **50** est obtenu avec un rendement de 43 %. Il est caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif par ses ions multichargés (3+), (4+) et (5+).

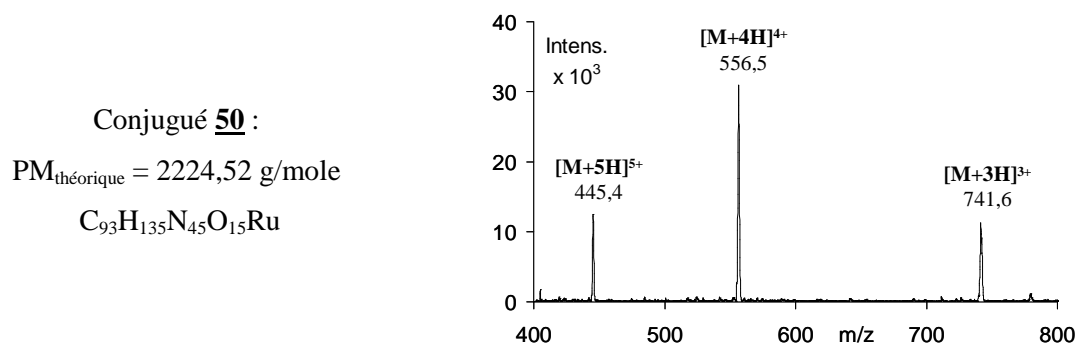


Figure A.IV.18 : Analyse du conjugué **50** pur par spectrométrie de masse électrospray.

~

En résumé, la stratégie optimisée de conjugaison des complexes de ruthénium sur les oligonucléotides est directement applicable aux peptides. Elle permet d'obtenir facilement les conjugués complexe de ruthénium(II)-peptide avec un bon rendement moyen de 45 %. La méthode devient même plus conviviale : l'évolution de la réaction est facilement suivie par CLHP ; et les conjugués sont facilement analysables par spectrométrie de masse électrospray.

Conclusion

Dans ce chapitre, la diversité des "synthons aldéhydes" (oligonucléotides 5' et 3', peptides) rattachés aux complexes de ruthénium souligne la polyvalence de la méthode de couplage employée. Cette stratégie convergente de conjugaison par le lien éther d'oxime s'avère très efficace pour assembler les différents intervenants avec un bon rendement moyen de 50%.

Le protocole mis au point consiste à réaliser la réaction de couplage dans l'acétate d'ammonium tamponné (0,4 M - pH 4,5), en présence de 2 équivalents de "complexe de ruthénium oxyamine". Après seulement une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est immédiatement purifié par gel d'électrophorèse polyacrylamide en condition dénaturante. Le conjugué isolé, traité, est finalement identifié par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Certes cette technique d'analyse s'avère peu fiable, et même destructrice dans le cas des conjugués ruthénium-3'-oligonucléotide, elle est néanmoins validée. Ses limites pourvoient totalement nos attentes en réalisant une analyse qualitative de produits purs. Il serait quand même très intéressant de caractériser les conjugués par spectrométrie de masse électrospray. Cette étape nécessite la mise au point d'une technique de déssalage optimale, d'ailleurs des essais préliminaires sont actuellement réalisés au laboratoire.

Le couplage complexe de ruthénium et oligonucléotide requiert une solution de "composé oxyamine" extrêmement pure pour obtenir un excellent rendement. Elle permet de s'affranchir totalement de la formation du contaminant bis-conjugué.

Le couplage des peptides sur l'entité métallique s'avère tout autant productif en étant moins contraignant. Les produits sont facilement séparables dans les conditions d'analyses CLHP en présence d'acide trifluoroacétique, facilitant ainsi le suivi réactionnel et la purification ultérieure.

Les conjugués ainsi formés sont destinés à des études photochimiques, et photophysiques dans le but de caractériser la formation de photoadduits avec les oligonucléotides ciblés (Partie B).

- Partie B -

Etudes photochimiques

Etudes photochimiques des conjugués "complexe de ruthénium(II)-oligonucléotide"

Notre projet repose sur une stratégie antisens, et plus particulièrement sur la neutralisation définitive d'un oligonucléotide cible par sa liaison covalente avec le conjugué "ruthénium(II)-oligonucléotide" préparé auparavant. L'étape incontournable consiste donc à vérifier que le complexe de ruthénium peut effectivement photoréagir avec une guanine et ainsi conduire à un pontage définitif entre le brin sonde rattaché au complexe métallique et sa cible complémentaire. Par conséquent, les propriétés photophysiques des conjugués sont examinées afin de déterminer les composés potentiellement photoactifs.

Des études antérieures développées au laboratoire ont montré l'intérêt d'accrocher des complexes de ruthénium photoréactif à des oligonucléotides. Pour cela, de nombreux conjugués ont été préparés en attachant le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dip}]^{2+}$ à un oligonucléotide, en faisant varier l'emplacement du métal dans la séquence oligonucléotidique. L'illumination de telles molécules a mis en évidence la formation d'un "photocrosslinking" entre le brin métallé et son complémentaire. Ce type d'adduit provient de l'ancrage covalent d'un ligand TAP sur une guanine du brin complémentaire via un transfert d'électron photoinduit. Ce photopontage ne peut se faire qu'en présence d'au moins une guanine à proximité du site métallé. Il s'est ensuite révélé responsable du blocage mécanique de certaines enzymes, dont l'ADN polymérase responsable de la réplication de l'ADN.^{48, 146} Malgré la très bonne photoréactivité des systèmes développés, la méthode de synthèse employée ne permettait d'obtenir une quantité suffisante de produit pour envisager la caractérisation complète des photoadduits obtenus ultérieurement. En effet, le complexe était attaché aux oligonucléotides par un lien amide avec un rendement relativement faible.

La nouvelle méthode de synthèse des conjugués "ruthénium(II)-oligonucléotide" par le lien éther d'oxime permet d'accéder plus facilement aux différents types de conjugués, et en quantité satisfaisante (*Partie A, chapitre IV*).¹²⁷ Il faut ensuite définir le potentiel photoréactif des nouveaux systèmes préparés, en déterminant leurs propriétés photophysiques.

¹⁴⁶ Lentzen, O; Constant, J; -F.; Defrancq, E.; Moucheron, C.; Dumy, P.; Kirsch De-Mesmaeker, A. Photoadduct leading to crosslinking in RuII-derivatized oligonucleotides. *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids* **2003**, 22, 1487-1489.

Avant de présenter les résultats obtenus, l'ensemble des duplex de conjugués ensuite caractérisés sont rassemblés dans le tableau B.1. On retrouve notamment les systèmes ne comportant pas de guanine : "**39**", "**42**", "**44**", et "**45**" qui ne devraient pas photoréagir avec les complexes de ruthénium(II). Ces produits serviront principalement comme référence, lors des expériences d'illumination. Le produit "**41**" est le seul à posséder 3 guanines successives. Il servira notamment comme élément de comparaison avec l'ancien système, car son homologue [Ru(TAP)₂dip]²⁺-5'd-(CC CTT TTA TTA AAT TTA)3' a été étudié précédemment. Les composés "**40**" et "**43**" possèdent deux guanines, ils ne diffèrent que par la nature du complexe de ruthénium(II). Ils serviront de point de comparaison des deux nouveaux types de complexes. Il y a aussi les produits "**46**" et "**48**" qui sont les homologues des composés "**40**" et "**43**", où l'entité métal est attachée à l'extrémité 3'. La comparaison des 4 produits permettra de définir l'influence de l'extrémité d'ancrage des complexes.

Duplex	Complexe de ruthénium – oligonucléotide double brin	T _m	T _m de référence
" 39 "	[Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -5'd-(TT TTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AA AAA AAT AAT TTA AAT)5'	38.0 °C ± 1 °C	36.1 °C ± 1 °C
" 40 "	[Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -5'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	44.0 °C ± 1 °C	41.1 °C ± 1 °C
" 41 "	[Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -5'd-(CC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(GG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	-	-
" 42 "	[Ru(TAP) ₂ TAP] ²⁺ -5'd-(TT TTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AA AAA AAT AAT TTA AAT)5'	-	-
" 43 "	[Ru(TAP) ₂ TAP] ²⁺ -5'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	44.0 °C ± 1 °C	41.1 °C ± 1 °C
" 44 "	[Ru(TAP) ₂ TAP] ²⁺ -5'd-(AA AAA AAA TTA AAT TTA)3' 3'd-(TT TTT TTT AAT TTA AAT)5'	38.0 °C ± 1 °C	36.1 °C ± 1 °C
" 45 "	[Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -3'd-(TT TTT TTA TTA AAT TTA)5' 5'd-(AA AAA AAT AAT TTA AAT)3'	40.0 °C ± 1 °C	36.1 °C ± 1 °C
" 46 "	[Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -3'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)5' 5'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)3'	43.5 °C ± 1 °C	41.1 °C ± 1 °C
" 47 "	[Ru(TAP) ₂ TAP] ²⁺ -3'd-(TT TTT TTA TTA AAT TTA)5' 5'd-(AA AAA AAT AAT TTA AAT)3'	40.0 °C ± 1 °C	36.1 °C ± 1 °C
" 48 "	[Ru(TAP) ₂ TAP] ²⁺ -3'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)5' 5'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)3'	44.5 °C ± 1 °C	41.1 °C ± 1 °C

Tableau B.1 : Présentation des différents conjugués oligonucléotides étudiés, ainsi que leurs températures de fusion (T_m) et celles des séquences de référence correspondantes.

Au préalable, il est nécessaire d'évaluer les propriétés d'hybridation des duplex associant l'oligonucléotide sonde du conjugué à son brin cible. Pour cela, on détermine la température pour laquelle 50 % du duplex est dissocié.⁽ⁱ⁾ La température de fusion (T_m) obtenue, traduit directement les

⁽ⁱ⁾ L'aspect théorique et expérimental des températures de fusion des oligonucléotides est présenté dans la partie expérimentale.

phénomènes de stabilisation, ou de destabilisation, du duplex. Elle permet donc d'évaluer l'influence du type de complexe métallique, ou encore celle de l'extrémité d'ancrage, sur la stabilité de l'appariement. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau *B.1* avec les températures de référence qui correspondent aux duplex dépourvus de complexe métallique. Pour l'ensemble des conjugués, on obtient une température de fusion légèrement supérieure à celle du témoin. Cette différence n'est pas suffisamment significative pour que l'on puisse envisager une importante stabilisation de la structure par les différents complexes de ruthénium(II). En revanche, cette faible différence permet d'affirmer que les complexes métalliques ne perturbent pas l'hybridation du brin sonde à sa cible. Cette information est fondamentale pour envisager les études comparatives de photoréactivité des conjugués associés en duplex. Il est également intéressant de noter que le type de complexe de ruthénium(II), ainsi que l'extrémité d'ancrage n'ont pas d'influence spécifique sur la stabilité de l'édifice.

1 - Caractérisation photophysique des conjugués

Dans cette première partie, les propriétés photophysiques des nouveaux systèmes sont présentées. Les conjugués dérivant des deux types de complexes étudiés $[Ru(TAP)_2Phen]^{2+}$ et $[Ru(TAP)_3]^{2+}$ sont tout d'abord caractérisés en spectroscopie stationnaire d'absorption, et d'émission, puis en spectroscopie d'émission résolue dans le temps. Ces études ont été réalisées lors d'un séjour à l'ULB dans le laboratoire de Chimie-Organique et Photochimie dirigé par A. Kirsch- De Mesmeaker.

~

1.1 - Spectroscopie d'absorption

Les spectres d'absorption sont réalisés dans l'eau à température ambiante. Les concentrations en produits sont déterminées à partir des coefficients d'extinction molaire (ϵ) des complexes non fonctionnalisés. On base cette estimation sur l'hypothèse que la dérivatisation d'un ligand du complexe ne modifie pas ses caractéristiques.¹⁴⁷

¹⁴⁷ Del Guerso, A.; Kirsch De-Mesmaeker, A.; Demeunynck, M.; Lhomme, J. Photophysics of bifunctional Ru(II) complexes bearing an aminoquinoline organic unit.potential new photoprobes and photoreagents of DNA. *J. Phys. Chem. B*, **1997**, *101*, 7012-7021.

L'allure générale des spectres des complexes fonctionnalisés $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen-ONHBoc}]^{2+}$, et $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP-ONHBoc}]^{2+}$, est très proche de celle de leurs homologues non modifiés (*figure B.2*). Ils se caractérisent par des bandes d'absorption remarquables similaires. Ils présentent notamment plusieurs bandes d'absorption intenses dans la région UV, 200-400 nm, attribuée aux transitions LC centrées sur les ligands (Ligand Centered). Les bandes d'absorption observées dans le visible correspondent aux transitions MLCT de transfert de charge du métal vers le ligand. Ces transitions sont les plus faibles en énergie.

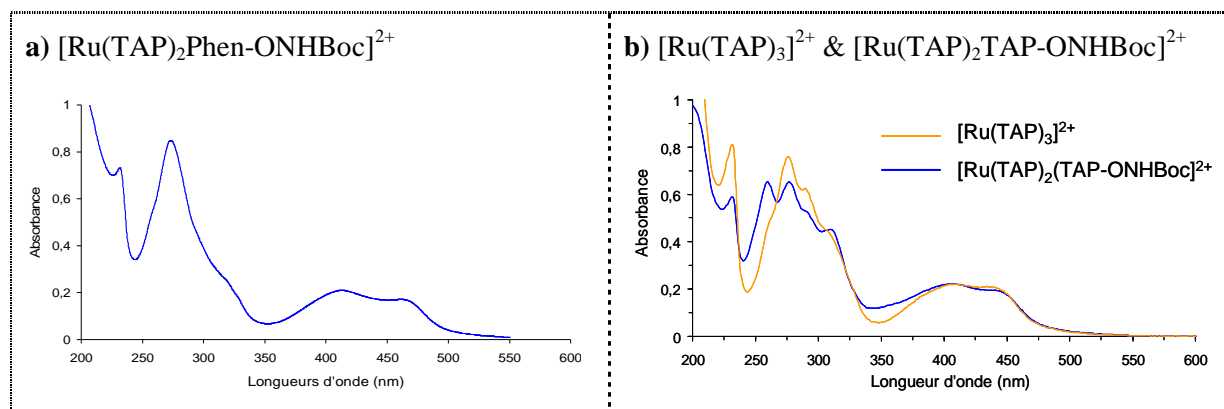


Figure B.2 : Spectres d'absorption des complexes de ruthénium libres à 13 μM , dans l'eau et à température ambiante.

On détermine également le profil d'absorption de l'ensemble des conjugués préparés, en simple et double brin d'oligonucléotide, par rapport aux complexes libres en solution. Les spectres sont équivalents et homogènes pour un même complexe polyazaaromatique. L'allure met en évidence la présence des deux entités : l'oligonucléotide et le ruthénium. En effet, on retrouve les bandes MLCT caractéristiques des complexes polyazaaromatiques de ruthénium dans le visible. D'ailleurs, les tracés se superposent exactement vers 400 nm, qu'on soit en présence du conjugué simple brin, double brin, ou du complexe libre. Dans l'ultraviolet, le tracé des conjugués présente une bande très intense vers 260 nm. Elle correspond à la somme de l'absorption de la bande LC du complexe polyazaaromatique et des transitions $\pi\text{-}\pi^*$ des bases de l'oligonucléotide simple brin. Elle devient encore plus intense quand le conjugué est hybridé au brin d'oligonucléotide complémentaire (*figure B.3*).

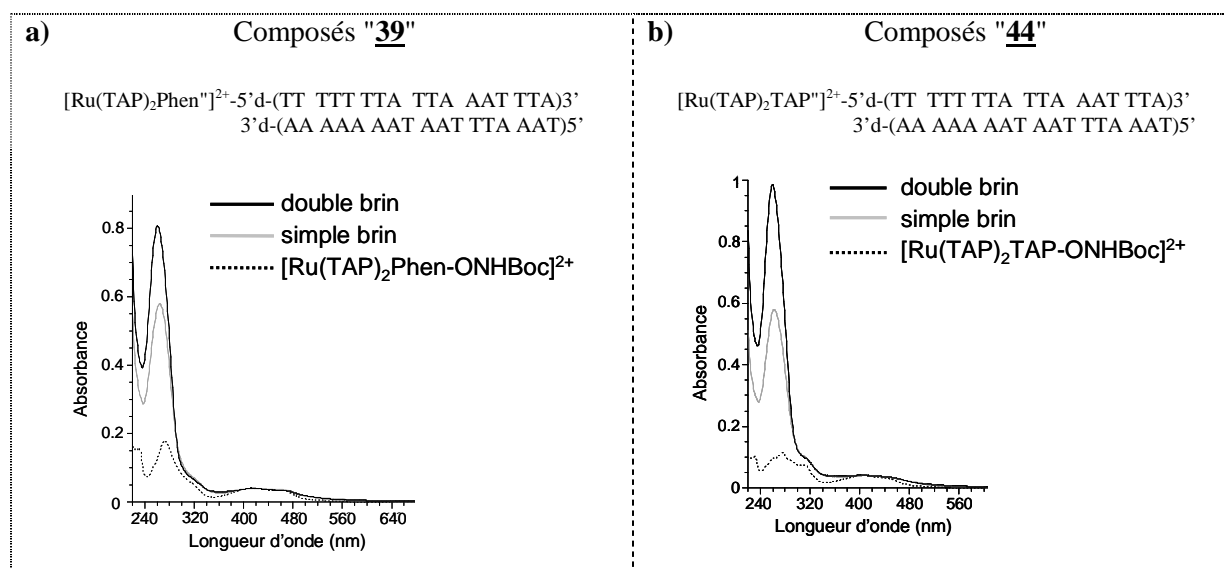


Figure B.3 : Spectres d'absorption des conjugués ruthénium (II)-5'-oligonucléotide **39** (a) et **44** (b) (à 10 μ M, en milieu aqueux tamponné : 10 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7).

Les valeurs des longueurs d'onde des maxima d'absorption des complexes libres modifiés, et non modifiés sont répertoriées au tableau B.4. Il reprend également les valeurs caractéristiques d'un type de conjugués en 5', en version simple et double brin, ainsi que celles de son homologue à l'extrémité 3' en simple brin.

Composés	Longueur d'onde (nm)			
	Domaine de l'ultraviolet		Domaine du visible	
[Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺	230	272	411	466
[Ru(TAP) ₂ Phen-ONHBoc] ²⁺	231	272	412	460
39 simple brin	-	262	415	464
39 double brin	-	263	415	464
45 simple brin	-	267	417	469
[Ru(TAP) ₃] ²⁺¹⁴⁸	230	274	406	435
[Ru(TAP) ₂ TAP-ONHBoc] ²⁺	230	258 / 275	405	434
44 simple brin	-	260	406	437
44 double brin	-	259	407	438
47 simple brin	-	262	410	439

Tableau B.4 : Maxima d'absorption des complexes libres, modifiés ou non modifié, des conjugués correspondants à l'extrémité 5', simple et double brin, ainsi que le conjugué homologue en 3' et simple brin.

Les propriétés spectroscopiques globales d'absorption des conjugués correspondent à la somme de celles de l'oligonucléotide et celles des complexes de ruthénium isolés. Les spectres ne présentent aucun déplacement significatif des maxima d'absorption par rapport aux complexes libres.

¹⁴⁸ Ortman, I.; Elias, B.; Kelly, J. M.; Moucheron, C.; Kirsch-DeMesmaeker, A. [Ru(TAP)₂(dppz)]²⁺: a DNA intercalating complex, which luminesces strongly in water and undergoes photo-induced proton-coupled electron transfer with guanosine-5'-monophosphate. *Dalton Trans.* **2004**, 668-676.

1.2 - Spectroscopie d'émission stationnaire

Les spectres d'émission stationnaire des différents systèmes étudiés sont relevés en milieu aqueux tamponné à pH 7, à température ambiante et sous air. Ils sont obtenus à des densités optiques identiques, après excitation des composés au maximum d'absorption de la bande MLCT du complexe conjugué :

- 415 nm pour les conjugués porteurs du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$.
- 408 nm pour les conjugués porteurs du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}]^{2+}$.

L'allure générale des spectres de luminescence des conjugués simple et double brin est très similaire (*figure B.5*). L'émission est globalement non-structurée, et typique des complexes polyaaromatiques de Ru(II). Elle a été attribuée à l'état excité $^3\text{MLCT}$ du complexe impliquant un ligand TAP.¹⁴⁹ Toutefois, l'intensité varie significativement en fonction de la séquence oligonucléotidique ancrée.

Dans le cas du composé dépourvu de guanines "**39**", l'intensité maximale émise par le conjugué simple brin correspond exactement à celle émise par le conjugué double brin. Et, elles sont plus importantes que le maximum d'émission du complexe libre dans les mêmes conditions (*figure B.5, a*). Ce résultat montre que le complexe conjugué à l'oligonucléotide est protégé du solvant par l'environnement hydrophobe généré à proximité de l'oligonucléotide. Cette protection permet ainsi de soustraire en partie l'état excité du complexe à la désactivation induite par son environnement direct, d'où sa capacité d'émission préservée. La juxtaposition des spectres d'émission indique également un environnement similaire autour du complexe excité, qu'on soit en présence du simple ou du double brin d'oligonucléotide. Il semblerait donc que le simple brin adopte une conformation repliée qui engloberait le complexe. Cette structure confectionnerait ainsi une enveloppe protectrice autour du complexe, semblable à celle générée naturellement par l'oligonucléotide double brin. Une telle structuration dynamique a déjà été rencontrée au cours de l'étude antérieure des conjugués de type "[Ru(TAP)₂(dip)]²⁺-oligonucléotide".¹⁵⁰

En présence de guanines, on observe une forte inhibition de la luminescence du complexe. Cette inhibition devient même de plus en plus marquée avec l'augmentation du nombre de guanine (*figure B.5, b et c*). Elle peut s'expliquer par un quenching de l'état excité du complexe faisant suite à un transfert d'électron photoinduit à partir de la guanine.

¹⁴⁹ Kirsch-DeMesmaeker, A.; Lecomte, J.-P.; Kelly, J. M. Photoreactions of metal complexes with DNA, especially those involving a primary photo-electron transfer. *Topics in Current Chemistry* **1996**, *177*, 25-76.

¹⁵⁰ Garcia-Fresnadillo, D.; Lentzen, O.; Ortman, I.; Defrancq, E.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Detection of secondary structures in 17-mer Ru(II)-labeled single-stranded oligonucleotides from luminescence lifetime studies. *Dalton Trans.* **2005**, 852-856.

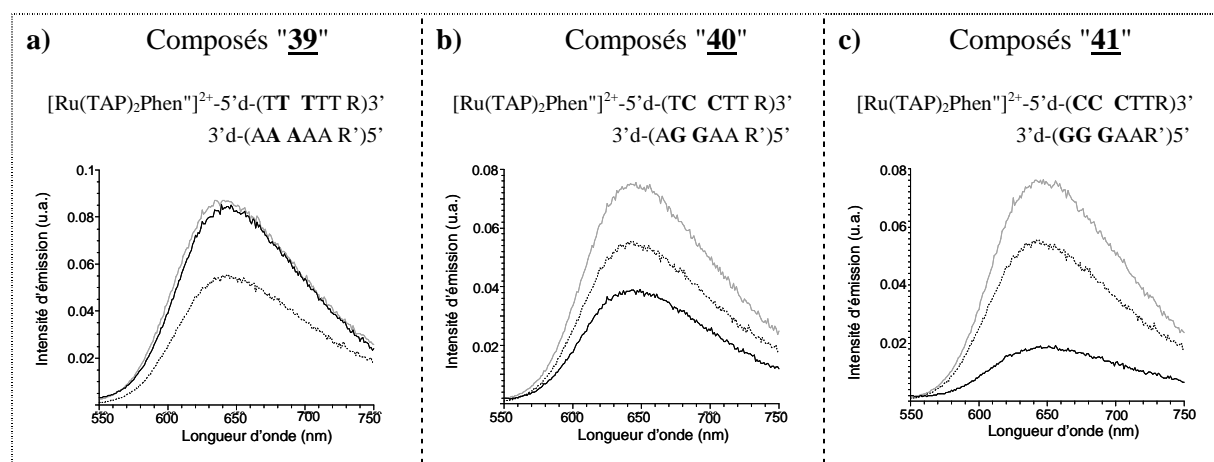


Figure B.5 : Spectres d'émission stationnaire des trois conjugués $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ -5'-oligonucléotide **39** (a), **40** (b), et **41** (c), mesuré à 10 μM , en milieu aqueux tamponné : 10 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7. Pour chaque conjugué, 3 spectres d'émission sont présentés : celui du conjugué simple brin (gris), du conjugué double brin (noir), et du complexe libre $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen-ONHBoc}]^{2+}$ (pointillé), avec $\text{R} = -\text{TTA TTA AAT TTA}$, et $\text{R}' = \text{AAT AAT TTA AAT}$.

On retrouve des propriétés caractéristiques similaires pour les conjugués ancrés sur le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}]^{2+}$, ainsi que pour les conjugués analogues dérivatisés à l'extrémité 3'.

Pour tous les systèmes étudiés, le complexe de ruthénium est protégé par l'oligonucléotide double brin. Il semble être également protégé par l'oligonucléotide simple brin. En présence des guanines, on observe toujours une inhibition de l'émission, faisant suite à un quenching de luminescence de l'état excité du complexe par un transfert d'électron photoinduit.

1.3 - Emission résolue dans le temps

Les durées de vie de luminescence de l'ensemble des conjugués "ruthénium-oligonucléotide" ont été déterminées par Single Photon Counting (SPC), à 25°C dans l'eau et en présence d'air. Cette méthode permet d'enregistrer la décroissance de luminescence d'un échantillon qu'il faut ensuite analyser en ajustant les points expérimentaux par un modèle mathématique. Contrairement aux complexes libres, les décroissances de luminescence des conjugués ne sont pas mono-exponentielles, elles doivent être analysées par une fonction multi-exponentielle de type : $I_{\text{ém}}(t) = \sum \alpha_i \exp(-t/\tau_i)$

$I_{\text{ém}}(t)$ correspond à la décroissance de l'émission au cours du temps.

α_i est le facteur pré-exponentiel de la durée de vie τ_i .

A partir de cette analyse, on obtient différentes durées de vie τ_i , dont chaque valeur est associée à un facteur pré-exponentiel normalisé A_i . Ce coefficient détermine la contribution de la durée de vie concernée à la décroissance de la luminescence.⁽ⁱ⁾

A partir des données récoltées, il est possible de déterminer une durée de vie moyenne : τ_m . Elle est calculée à partir de la relation : $\tau_m = \sum A_i \tau_i / \sum A_i$. Cette valeur pondérée permet ensuite de pouvoir comparer les différentes séquences rattachées à un même complexe. Plus son taux est élevé, plus le degré de protection de l'état excité du complexe concerné est important.

Les mesures des durées de vie de l'état excité des deux types de complexes $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$, et $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}$, conjugués aux différents oligonucléotides étudiés ont été réalisées sur les séquences simples brins et doubles brins. A titre comparatif, les durées de vie des complexes libres dérivatisés et non dérivatisés sont également présentées.

Dans le cas des complexes $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}$, la durée de vie de l'état excité du complexe modifié est légèrement supérieure à celle observée généralement pour le complexe non modifié (*tableau B.6*). Alors que pour le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$, la stabilité de l'état excité du complexe ne semble pas affecté par la fonctionnalisation (*tableau B.9*).

1. 3. 1. - Les conjugués ancrés au complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}$

Dans le cas des conjugués simple brin, et des doubles brins dépourvus de guanines, deux durées de vie sont généralement détectées. La plus courte (τ_2) est proche de celle mesurée pour le complexe non dérivatisé libre en solution. Elle est affectée aux complexes ancrés aux oligonucléotides, dont l'état excité n'est pas protégé par l'acide nucléique. La durée de vie longue (τ_3) correspond quant à elle à des conjugués dont le complexe est protégé du solvant par l'entité nucléotidique. Elle apparaît aussi bien pour le conjugué double brin, que pour le simple brin. En présence du brin complémentaire, le complexe peut se retrouver facilement protégé au cœur du duplex. Par contre, en présence uniquement du simple brin, le squelette phosphodiester doit adopter une conformation repliée pour protéger de manière significative l'état excité du complexe.¹⁴⁸ Les durées de vie moyenne pondérée τ_m affichent tout de même une meilleure protection de l'état excité du complexe quand il se trouve en présence d'un duplex d'oligonucléotide. En effet, la valeur de τ_m des systèmes ("39" db), et ("45" db), est supérieure à celle obtenue pour les conjugués analogues simples brins (*tableau B.6*).

⁽ⁱ⁾ Les facteurs pré-exponentiels sont calculés à partir de l'équation : $A_i = \alpha_i / \sum \alpha_i$.

Composés	Durées de vie de l'état excité						
	τ_1 (ns)	A ₁ (%)	τ_2 (ns)	A ₂ (%)	τ_3 (ns)	A ₃ (%)	τ_m (ns)
[Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺	656	100	-	-	-	-	-
[Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺	720	100	-	-	-	-	-
"39" sb [Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -5'd-(TT TTT R)3'	-	-	701	51	1391	49	1040
db [Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -5'd-(TT TTT R)3' 3'd-(AA AAA R')5'	-	-	720	49	1410	51	1070
"40" sb [Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -5'd-(TC CTT R)3'	-	-	688	58	1290	42	940
db [Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -5'd-(TC CTT R)3' 3'd-(AG GAA R')5'	96	51	421	32	1054	17	360
"41" sb [Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -5'd-(CC CTT R)3'	-	-	700	68	1346	32	907
db [Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -5'd-(CC CTT R)3' 3'd-(GG GAA R')5'	22	71	165	18	897	11	144
"45" sb [Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -3'd-(TT TTT R)5'	-	-	671	54	1525	46	1070
db [Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -3'd-(TT TTT R)5' 5'd-(AA AAA R')3'	-	-	754	56	1720	44	1180
"46" sb [Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -3'd-(TC CTT R)5'	-	-	660	58	1320	42	937
db [Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -3'd-(TC CTT R)5' 5'd-(AG GAA R')3'	56	45	272	45	953	10	243

Tableau B.6 : Durées de vie de l'état excité du complexe [Ru(TAP)₂Phen]²⁺ libre et conjugué sur les oligonucléotides aux extrémités 5' et 3', en simple (sb) et double brin (db). Les mesures sont effectuées dans un milieu tamponné à pH 7 (Tris-HCl à 10 mM, NaCl 50 mM), pour les composés : R = - TTA TTA AAT TTA, et R' = AAT AAT TTA AAT.

Dans les cas particuliers des conjugués hybridés dont le brin cible contient au moins deux guanines, une troisième durée de vie très courte apparaît. Elle est attribuée au phénomène de quenching de luminescence de l'état excité du complexe métallé. Les systèmes (**"40"** db), (**"41"** db), et (**"46"** db) mettent même en évidence deux durées de vie plus courtes que celle du complexe libre. La très courte durée de vie (τ_1 , moins de 100 ns) correspondrait au quenching de luminescence de l'état excité par les guanines du brin complémentaire. La seconde, de valeur plus élevée (τ_2 , plus de 200 ns), proviendrait également du quenching de luminescence par les guanines. Mais dans ce cas, la conformation du système lui serait légèrement moins favorable. Le pourcentage de la plus courte durée de vie (τ_1), dans le cas du conjugué (**"46"** db), est beaucoup plus important que celui observé pour les conjugués (**"40"** db), et (**"41"** db). La présence d'une guanine supplémentaire pour le conjugué (**"46"** db) favorise considérablement le quenching de luminescence. On retrouve également pour les trois systèmes une durée de vie très longue correspondant, comme précédemment, à la protection de l'état excité des complexes par la structure en double brin.

Les résultats des conjugués (**"40"** db), et (**"46"** db) laissent présager une réactivité légèrement plus importante pour l'ancrage du complexe à l'extrémité 3', par rapport à son opposé en 5'. En effet, la durée de vie τ_1 en version double brin, est plus faible pour le système conjugué en 3'. Ainsi, le

quenching réalisé par les guanines semble favorisé dans ce cas. Par contre, les deux durées de vie obtenues ont la même influence sur la luminescence globale du système (A_1 , 50% environ).

Dans le cas des conjugués "**39**", et "**40**" des mesures antérieures ont également été réalisées à partir des échantillons de conjugués contaminés par le "bis-conjugué". Le comportement des différents systèmes semble peu affecté par la présence de l'impureté (tableau B.7). En effet, la courte durée de vie de l'état excité du conjugué "**39**" apparaît légèrement plus élevée que celle obtenue classiquement avec le complexe libre $[Ru(TAP)_2Phen]^{2+}$.

Composés	Durées de vie de l'état excité						
	τ_1 (ns)	A_1 (%)	τ_2 (ns)	A_2 (%)	τ_3 (ns)	A_3 (%)	τ_m (ns)
" 39 " sb [Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -5'd-(TT TTT R)3'	-	-	785	49	1410	51	1100
db [Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -5'd-(TT TTT R)3' 3'd-(AA AAA R')5'	-	-	730	56	1380	44	1020
" 40 " sb [Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -5'd-(TC CTT R)3'	-	-	685	49	1190	51	945
db [Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -5'd-(TC CTT R)3' 3'd-(AG GAA R')5'	80	52	375	30	1230	18	375

Tableau B.7 : Durées de vie de l'état excité du complexe $[Ru(TAP)_2Phen]^{2+}$ conjugué à l'extrémités 5' d'oligonucléotides, en simple (sb) et double brin (db), en présence de l'impureté "bis-conjugué". Les mesures sont effectuées dans un milieu tamponné à pH 7 (Tris-HCl à 10 mM, NaCl 50 mM), pour les composés : R = -TTA TTA AAT TTA, et R' = AAT AAT TTA AAT.

D'après les résultats, on peut assimiler le comportement photophysique des conjugués $[Ru(TAP)_2Phen]^{2+}$ -oligonucléotide aux systèmes précédemment étudiés au laboratoire, où des oligonucléotides analogues étaient ancrés au complexe $[Ru(TAP)_2Dip]^{2+}$.¹⁵¹ L'attitude des complexes vis-à-vis des guanines laisse présager la formation potentielle d'un photoadduit entre ces deux entités.

Cette étude a permis de mettre en évidence un important quenching de luminescence du complexe $[Ru(TAP)_2Phen]^{2+}$, quand celui-ci se retrouve à proximité de guanines. Dans ce cas, il est possible de quantifier l'extinction de la luminescence pour chaque séquence (%Q) à partir des durées de vie moyennes pondérées (τ_m), et de l'intensité d'émission (I). Cette estimation peut se faire à partir de deux types de relations :

$$\%Q = 1 - I/I_0$$

$$\%Q = 1 - \tau_m / \tau_{m0}$$

Où I correspond à l'intensité d'émission, et τ_m à la durée de vie moyenne pondérée calculée précédemment. Ces valeurs peuvent être uniquement déterminée pour les duplex où le brin complémentaire est susceptible de réaliser un quenching de luminescence, c'est-à-dire en présence de

¹⁵¹ Garcia-Fresnadillo, D.; Boutonnet N.; Schumm, S.; Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmeaker, A.; Defrancq, E.; Constant, J.-F.; Lhomme, J. Luminescence quenching of Ru-labeled oligonucleotides by target complementary strands. *Biophysical J.* **2002**, *82*, 978-987.

guanines ("**40**" db, "**41**" db, "**46**" db, *tableau B.8*). Pour cela, il faut comparer chaque système à son système de référence correspondant, où il n'y a pas de quenching ("**39**" db, "**45**" db). Ces deux duplex de référence fournissent respectivement I_0 et τ_{m0} .

Conjugués sous forme de duplex		%Q en fonction de I	%Q en fonction de τ
" 40 " db	[Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -5'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	60	63
" 41 " db	[Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -5'd-(CC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(GG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	82	79
" 46 " db	[Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -3'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)5' 5'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)3'	78	86

Tableau B.8 : Pourcentages de quenching de luminescence déterminés soit en fonction de l'intensité d'émission (I), soit en fonction des durées de vie moyennes (τ) de l'ensemble des duplex [Ru(TAP)₂Phen]²⁺-oligonucléotides contenant des guanines, avec db pour double brin.

Les pourcentages de quenching de luminescence obtenus en fonction de l'émission et de la durée de vie moyennes sont équivalents dans la limite imposée par les erreurs expérimentales. Cette similitude indique que le quenching est d'origine purement dynamique. Il n'existe pas de quenching statique.

Le taux d'extinction de luminescence s'accroît avec le nombre de guanine. Il augmente significativement, de 60 à 82 %, quand on accole une guanine supplémentaire à la paire déjà présente.¹⁵² De plus, l'extrémité d'ancrage du complexe influence le pourcentage de quenching. L'extrémité 3' semble fournir une conformation plus favorable à l'extinction de la luminescence en affichant 78 % d'inhibition, contre seulement 60 % pour l'extrémité opposée en 5'. Cette distinction peut provenir de la nature chimique différente du lien qui rattache le complexe au squelette phosphodiester des oligonucléotides. Le lien carboné en 3' des oligonucléotides est plus court de 3 entités carbonées par rapport à celui situé en 5'. L'effet de proximité généré par l'attache en 3' semble plus favorable à la rencontre du complexe avec les guanines.

Les données de la littérature ont prouvées que ce pourcentage de quenching (%Q) est en corrélation directe avec la quantité de photoadduit formée.⁴⁷ On s'attend donc à obtenir plus de photoadduit quand on a trois guanines successives. Et également une quantité supérieure quand le complexe est ancré à l'extrémité 3', par rapport à son opposé en 5'. On va ensuite vérifier ces tendances en comparant la capacité de chaque système à fournir des photoadduits sous illumination.

1. 3. 2. - Les conjugués ancrés au complexe [Ru(TAP)₂TAP]²⁺

¹⁵² Schumm, S.; Prévost, M.; Garcia-Fresnadillo, D.; Lentzen, O.; Moucheron, C.; Kirsh-De Mesmeaker, A. Influence of the sequence dependent ionization potentials of guanines on the luminescence quenching of Ru-labeled oligonucleotides : a theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2763-2768.

Dans le cas du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}^{\prime\prime}]^{2+}$ les mesures ont été réalisées uniquement à partir des conjugués où le ruthénium est ancré à l'extrémité 5' d'oligonucléotides possédant ou non des guanines, en version simple et double brin (tableau B.9).

Composés		Durées de vie de l'état excité						
		τ_1 (ns)	A ₁ (%)	τ_2 (ns)	A ₂ (%)	τ_3 (ns)	A ₃ (%)	τ_m (ns)
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}^{\prime\prime}]^{2+}$		220	100	-	-	-	-	-
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}^{\prime\prime}]^{2+}$		226	100	-	-	-	-	-
"42" sb	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}^{\prime\prime}]^{2+}$ -5'd-(TT TTT R)3'	195	45	641	45	2110	10	585
db	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}^{\prime\prime}]^{2+}$ -5'd-(TT TTT R)3' 3'd-(AA AAA R')5'	195	53	570	41	1775	6	445
"43" sb	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}^{\prime\prime}]^{2+}$ -5'd-(TC CTT R)3'	184	64	406	31	1625	5	325
db	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}^{\prime\prime}]^{2+}$ -5'd-(TC CTT R)3' 3'd-(AG GAA R')5'	69	42	294	51	1345	7	275

Tableau B.9 : Durées de vie de l'état excité du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}^{\prime\prime}]^{2+}$ libre et conjugué à l'extrémité 5' d'oligonucléotides, en simple (sb) et double brin (db). Les mesures sont effectuées dans un milieu tamponné à pH 7 (Tris-HCl à 10mM, NaCl 50 mM), pour les composés : R = - TTA TTA AAT TTA, et R' = AAT AAT TTA AAT.

Les quatre types de mesures réalisées donnent un profil général de décroissance de la luminescence similaire. Il ne peut être ajusté que par une fonction tri-exponentielle. Contrairement au complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}^{\prime\prime}]^{2+}$, on aboutit donc à trois durées de vie très distinctes de l'état excité. On ne retrouve pas de composante de durée de vie équivalente à celle du complexe libre en solution. Le complexe semble être constamment sous l'influence protectrice de l'oligonucléotide à proximité.

On retrouve une durée de vie intermédiaire τ_2 , supérieure à celle du complexe libre en solution. Elle contribue pratiquement toujours à la moitié de la luminescence (42% environ). Elle est parfaitement en adéquation avec les précédents résultats. Elle correspond à la protection de l'état excité du complexe vis-à-vis de la désactivation par le solvant. Elle résulte d'une protection physique exercée par le brin d'oligonucléotide. Elle apparaît aussi bien quand le conjugué est sous la forme de duplex ("42" db, et "43" db), qu'en simple brin ("42" sb, et "43" sb). Le complexe se retrouve donc soit protégé dans une cavité formée par la double hélice, soit par celle formée intrinsèquement suite au repliement dynamique du simple brin.

Par ailleurs, deux autres durées de vie extrêmes apparaissent. La plus longue (τ_3), contribue peu à la luminescence totale du complexe (10% environ). Par contre, sa valeur très importante indique que l'état excité est fortement protégé par l'oligonucléotide, et ce même en présence uniquement du simple brin. L'oligonucléotide doit créer un blocage mécanique de la photodéchélation habituelle d'un ligand TAP. Ainsi, l'énergie généralement mobilisée pour ce phénomène servira à stabiliser fortement l'état excité.

La plus courte (τ_1 , 190 ns environ) atteste du quenching de luminescence de l'état excité du complexe. On retrouve ce phénomène indifféremment avec ou sans guanine, en version simple ou double brin. Ce résultat suggère que les adénines pourraient réaliser un quenching de luminescence de l'état excité en présence de ce type de complexe très oxydant. D'ailleurs, un tel phénomène a déjà été rencontré auparavant avec des complexes de ruthénium analogues, contenant au moins deux ligands TAP.¹⁵³ Dans notre cas, on n'obtient pas comme précédemment une meilleure protection de l'état excité du complexe quand il se trouve en présence du duplex d'oligonucléotide dépourvu de guanine par rapport à sa version simple brin. En effet, la durée de vie moyenne pondérée τ_m du système ("**42**" db) est inférieure à celle obtenue pour le conjugué simple brin ("**42**" sb). Les adénines à proximité du complexe, dans le cas du conjugué ("**42**" db), photoréagissent plutôt avec le complexe au dépend de la simple protection physique qu'elles fournissent habituellement. Malgré la réactivité affichée des adénines vis-à-vis du quenching de luminescence, celui réalisé par les guanines reste beaucoup plus efficace. La très courte durée de vie obtenue dans le cas du conjugué ("**43**" db) atteste cette tendance.

D'après les résultats, on peut également envisager la formation potentielle d'un photoadduit entre le complexe $[Ru(TAP)_2TAP"]^{2+}$ photoactivé et les guanines à proximité. Ce phénomène pourrait même avoir lieu en présence uniquement d'adénines.

~

En résumé, les deux types de conjugués ont un comportement photophysique proche. En effet, les deux systèmes montrent indifféremment une protection de l'état excité des complexes par l'oligonucléotide. Ils affichent également un important quenching de luminescence en présence de guanines. Ce phénomène permet d'envisager la formation de photoadduits en illuminant de tels conjugués. Le complexe $[Ru(TAP)_2TAP"]^{2+}$ n'exclue pas la possibilité de former un photoadduit en présence d'adénines.

2 - Photoréactivité des conjugués "complexe de Ru^{II}-oligonucléotide"

¹⁵³ Lecomte, J.-P.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Feeney, M. M.; Kelly, J. M. Ruthenium(II) complexes with 1,4,5,8,9,12-Hexaazatriphenylene and 1,4,5,8-Tetraazaphenanthrene ligands: key role played by the photoelectron transfer in DNA cleavage and adduct formation. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 6481-6491.

Dans cette seconde partie, la photoréactivité des différents systèmes est tout d'abord estimée à partir de l'évolution de leur absorption sous illumination dans le temps. Les photoadduits sont ensuite formés à partir de l'illumination des conjugués sous la forme de duplex.

~

2.1 - La mise en évidence du "photocrosslinking"

Le "quenching" de luminescence indique qu'un photoadduit se forme sûrement sous illumination. Cette hypothèse peut être validée par spectroscopie d'absorption. En effet, en suivant l'évolution du profil d'absorption des conjugués au cours du temps et sous illumination, on peut prouver la formation d'un tel photoproduit.¹⁵⁴ D'ailleurs, cette caractérisation a été utilisée auparavant pour prouver la formation d'un photoadduit entre la guanine du nucléotide GMP et le ligand TAP du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$.¹⁵⁵ Elle a également servi à confirmer la formation du photoadduit dans le cas du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dip}]^{2+}$ dérivatisé par des oligonucléotides, dont la séquence est identique à celle utilisée pour nos conjugués.⁵³

On a donc réalisée l'illumination continue, dans le visible et sous air, des conjugués $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ -oligonucléotide ("39", "40", "45", et "46"), et des conjugués $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}]^{2+}$ -oligonucléotide ("42", et "43"), sous forme de simple et double brin.

2. 1. 1. - Illumination des conjugués $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ -oligonucléotide

Les conjugués simple brins sont parfaitement photostables. L'illumination continue pendant 2 heures n'entraîne pas la moindre modification des spectres d'absorption, ni l'apparition de nouvelles espèces. Ce résultat corrobore l'absence de photodégradation observée lors de l'illumination continue du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ libre, dans des conditions similaires. L'ancrage de l'entité métallée sur les oligonucléotides ne modifie donc pas la photostabilité de ce type complexe. On retrouve cette caractéristique pour les conjugués hybridés ne présentant pas de guanines sur le brin complémentaire : "39" db, et "45" db. Leur spectre d'absorption reste inchangé au cours de l'illumination continue (figure B.10, a). Par contre, la présence de guanines au sein des duplex entraîne une modification du spectre d'absorption au cours du temps. En effet, on observe un effet

¹⁵⁴ Jacquet, L.; Davies, R. J.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Kelly, J. M. Photoaddition of $\text{Ru}(\text{tap})_2(\text{bpy})^{2+}$ to DNA : a new mode of covalent attachment of metal complexes to duplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11763-11768.

¹⁵⁵ Feeney, M. M.; Kelly, J. M.; Tossi, A. B.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Lecomte, J.-P. Photoaddition of ruthenium(II)-tris-1,4,5,8-tetraazaphenanthrene to DNA and mononucleotides. *J. Photochem. Photobiol. B* **1994**, *23*, 69-78.

hyperchrome accompagné d'un déplacement hypsochromique du maximum d'absorption au niveau des bandes MLCT (*figure B.10, b et c*).

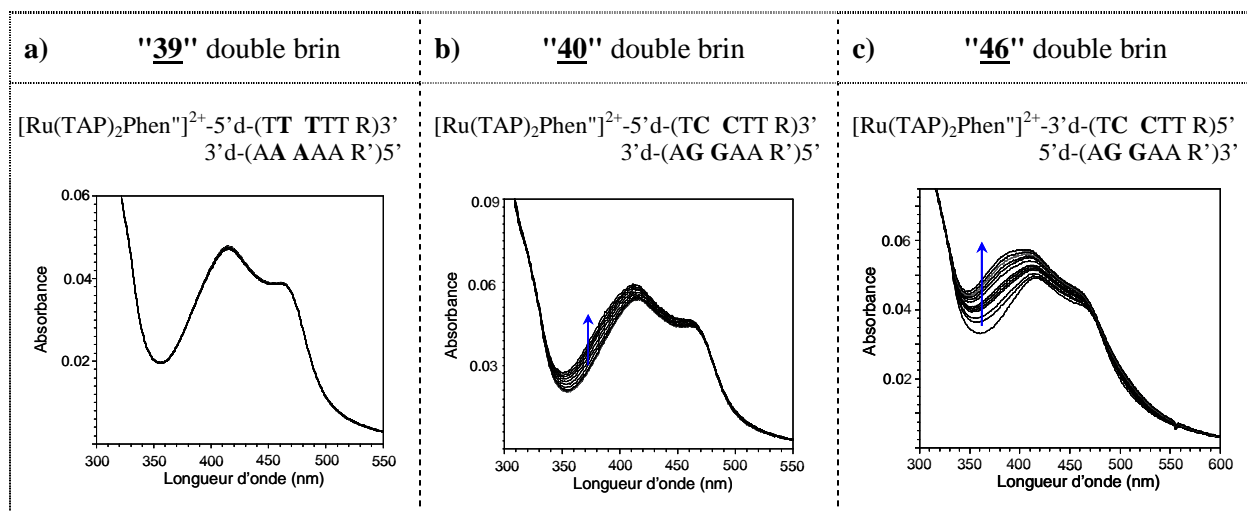


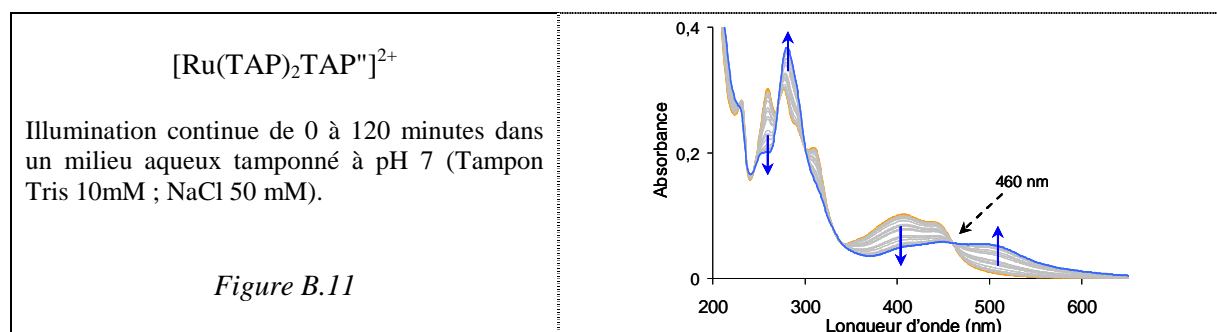
Figure B.10 : Spectres d'absorption relevés au cours de l'illumination continue de 0 à 120 minutes de conjugués $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ -oligonucléotide double brin, ancrés aux extrémités 5' et 3'. Les mesures sont effectuées sous air et dans un milieu tamponné à pH 7 (Tris-HCl à 10 mM, NaCl 50 mM), pour les composés : R = - TTA TTA AAT TTA, et -R' = AAT AAT TTA AAT.

Cet effet est caractéristique de la formation du photoadduit correspondant.¹⁵⁴ Les expériences antérieures avec le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dip}]^{2+}$ ont prouvé que ce phénomène était bien la conséquence de la formation d'un photoproduit.⁵³

On peut également noter que l'effet hyperchrome est plus marqué dans le cas de l'ancrage du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ à l'extrémité 3' de l'oligonucléotide par rapport à celui de l'extrémité 5', indiquant ainsi une quantité plus importante de photoproduit formé. Cette constatation confirme le pourcentage de quenching de luminescence plus important obtenu précédemment pour le conjugué en 3'.

2. 1. 2. - Illumination des conjugués $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}]^{2+}$ -oligonucléotide

Le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}]^{2+}$ peut être facilement dégradé sous illumination dans le visible. En effet, ce type de complexe peut perdre un de ses ligands TAP au profit d'une molécule du solvant. Cette photodégradation entraîne une modification spectrale du profil d'absorption du complexe, avec un déplacement bathochromique des maxima des bandes MLCT.¹⁵³ Ce phénomène se traduit par un déplacement hypochrome vers 400 nm, concomitant à un déplacement hyperchrome vers 500 nm, avec un point isosbestique vers 460 nm (*figure B.11*).



On observe ce phénomène de façon moins marqué pour l'ensemble des conjugués ("42", et "43") soumis à l'illumination continue, qu'on soit en présence ou non du duplex d'oligonucléotide.

Dans le cas du conjugué "42", dépourvu de guanine (*figure B.12*) :

On observe un effet hyperchrome aux environs de 500 nm, accompagné d'un effet hypochrome vers 400 nm. Ces déplacements sont caractéristiques de la photodéchélation du complexe. Néanmoins, pour le complexe ancré à l'oligonucléotide, le phénomène est beaucoup plus lent que celui observé pour le complexe libre. Un réel point isosbestique apparaît à 375 nm dans le cas du duplex, par rapport au conjugué simple brin. Ce point provient d'un effet hyperchrome à 350 nm, inexistant dans le spectre du complexe libre. Cette caractéristique est directement associée à la formation du photoadduit correspondant. Ce qui signifie qu'un adduit pourrait se former avec les adénines du brin complémentaire. Des études antérieures ont d'ailleurs montré que des complexes de ruthénium(II) analogues, possédant au moins deux ligands TAP, pouvaient photooxyder les adénines et générer des adduits covalents.¹⁵³

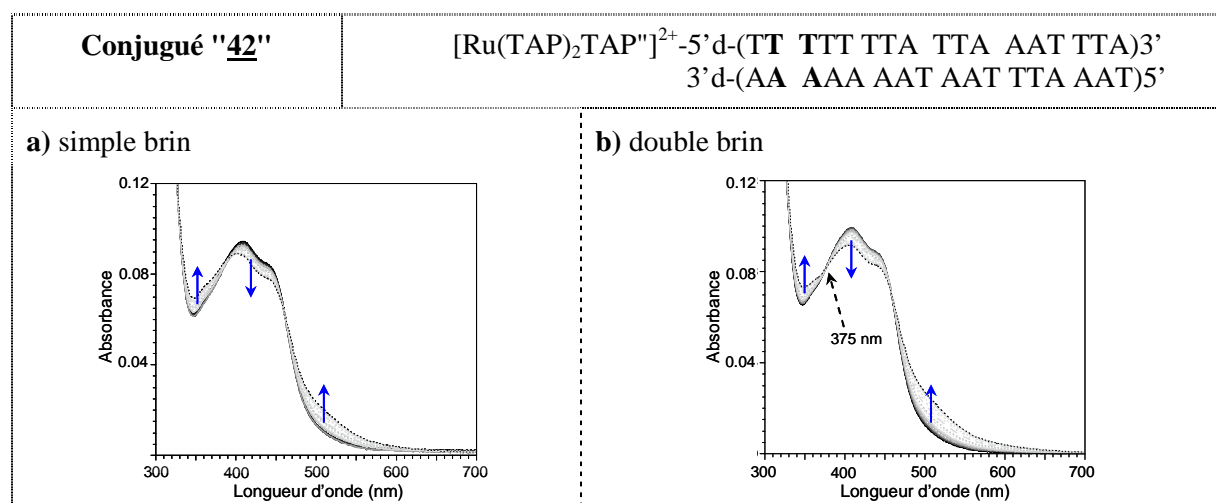


Figure B.12 : Spectres d'absorption relevés au cours de l'illumination continue de 0 à 120 minutes du conjugué "42". Les mesures sont effectuées sous air et dans un milieu tamponné à pH 7 (Tris-HCl à 10 mM, NaCl 50 mM).

Dans le cas du conjugué "**43**", possédant deux guanines (*figure B.13*) :

Pour le simple brin, on observe un ralentissement de la cinétique de photodéchélation par rapport au complexe libre, accompagné d'un effet hyperchrome vers 350 nm à l'origine d'un point isosbestique à 365 nm. En revanche, on n'obtient plus l'effet hypochrome au niveau de la bande MLCT en présence du brin complémentaire (*figure B. 13, b.*). On observe seulement deux effets hyperchromes concomitants. L'accroissement à 350 nm correspondrait à la formation du photoadduit entre une guanine et un des ligands TAP du complexe. Par contre, ce phénomène s'accompagne toujours d'une photodéchélation du complexe, mise en évidence par l'augmentation de l'absorbance vers 500 nm.

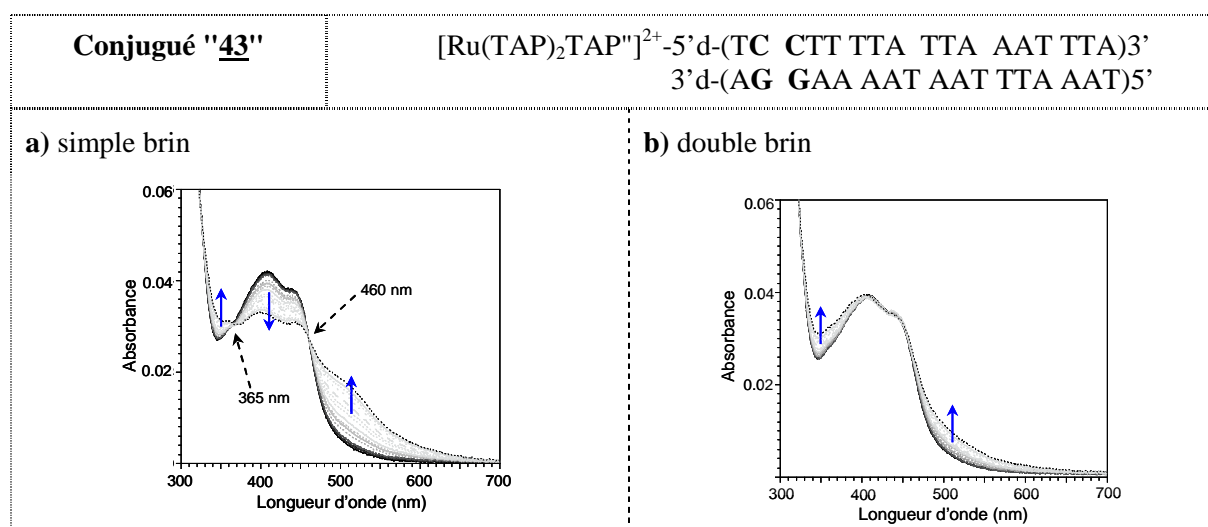


Figure B.13 : Spectres d'absorption relevés au cours de l'illumination continue de 0 à 120 minutes du conjugué "**43**". Les mesures sont effectuées sous air et dans un milieu tamponné à pH 7 (Tris-HCl à 10 mM, NaCl 50 mM).

Les modifications des spectres d'absorption des conjugués sous illumination pourraient être attribuées à la formation de photoadduits correspondant à un photocrosslinking du brin sonde avec le brin cible. Les deux complexes semblent entraîner la formation du pontage interbrin.

2.2 - Mise en évidence du photoadduit

L'ensemble des résultats précédents laisse présager la formation du photoadduit à partir de plusieurs conjugués préparés. Ces photoproduits peuvent être aisément mis en évidence par des gels d'électrophorèse de polyacrylamide en condition dénaturante. Cette technique a d'ailleurs permis de révéler le photocrosslinking obtenu précédemment avec les complexes $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dip}]^{2+}$ dérivatisés par les oligonucléotides homologues. Des expériences supplémentaires ont permis de prouver que ce photoproduit correspondait à l'ancrage de la guanine sur le ligand TAP du complexe, créant ainsi un

pontage covalent entre le conjugué et son brin cible complémentaire.^{47, 53} Le gel d'électrophorèse type de la photoréaction est présenté en exemple (*figure B.14*).

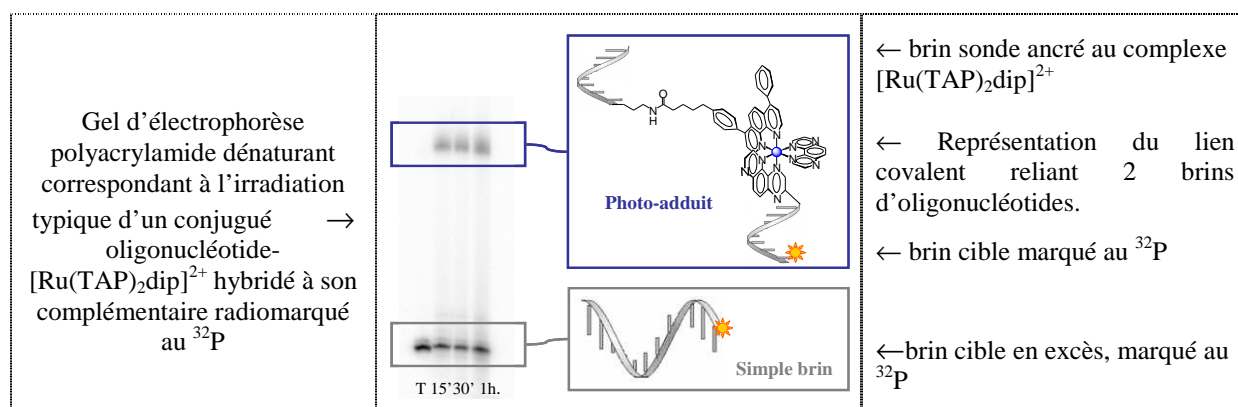


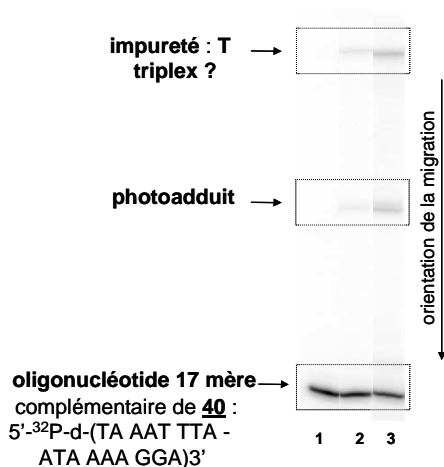
Figure B.14 : Caractérisation de la formation du photoadduit par gel d'électrophorèse en condition dénaturante à différents temps d'irradiation (0, 15 minutes, 30 minutes, 1 heure respectivement).

Pour réaliser ces études, il est nécessaire de radiomarquer au préalable les oligonucléotides avec du ^{32}P . Nous avons choisi de le fixer à l'extrémité 5' du brin cible, pour ne pas soumettre les conjugués au traitement exigé par un tel processus. De ce fait, on visualisera uniquement le brin complémentaire et le photoadduit résultant sur les gels d'électrophorèse. Le gel d'électrophorèse doit également être fortement dénaturant pour désapparier efficacement les conjugués de leur cible complémentaire lors de la migration. L'identification des deux espèces se fait ensuite facilement grâce à leur différence de taille et de charge. En effet, le brin cible 17-mère migre plus rapidement que le photoadduit constitué de deux oligonucléotides 17-mère complémentaires reliés de façon covalente par l'intermédiaire du complexe de ruthénium. Sa migration peut d'ailleurs être assimilée à celle d'un oligonucléotide 34-mère, il se trouvera donc beaucoup plus retardé sur le gel d'électrophorèse. La radioactivité résultante de chaque produit présent sur le gel peut être ensuite quantifiée, permettant ainsi de déterminer un pourcentage de photocrosslinking. Cette valeur permet d'évaluer l'efficacité de la photoréaction pour chaque séquence illuminée.

Cette technique a d'ailleurs permis de révéler la présence du sous-produit observé précédemment, qu'on identifiait comme étant un "bis-conjugué" (*paragraphe 1.1, Chapitre A.IV*), à partir de l'illumination du conjugué "**40**". L'expérience a mis en évidence la formation de deux produits possédant un photopontage, sous la forme de deux bandes en position haute du gel d'électrophorèse. La première pourrait être attribuée au photopontage attendu entre le complexe et le brin cible portant les guanines. Ce produit se forme progressivement au cours de l'illumination, car le pourcentage de la radioactivité correspondante augmente de 6 à 17 % quand on passe de 5 minutes à 1 heure d'illumination (*figure B.15, b*). La seconde pourrait correspondre à un produit de plus haut poids moléculaire contenant le brin radiomarqué au ^{32}P . La quantité de ce produit secondaire croît également en fonction du temps d'illumination, de 8 à 19 % en taux de radioactivité (*figure B.15, b*). Il s'agirait

donc d'un produit issu de la photoréaction du ruthénium avec l'oligonucléotide 17-mère radiomarké. Cela signifie qu'il contient obligatoirement une entité ruthénium ancrée à la séquence oligonucléotidique complémentaire. On peut également noter que le photoadduit attendu se trouve à égale distance du produit de départ 17-mère et de l'impureté **T**. Cette particularité laisse supposer que le produit **T** contient deux fois la séquence oligonucléotidique du "fragment aldéhyde" **8** du conjugué **40**.

a) Gel d'électrophorèse en condition dénaturante correspondant à l'irradiation lumineuse du conjugué **40** sous forme de duplex.



b) Représentation la répartition de la radioactivité le long des lignes 2 et 3 du gel d'analyse.

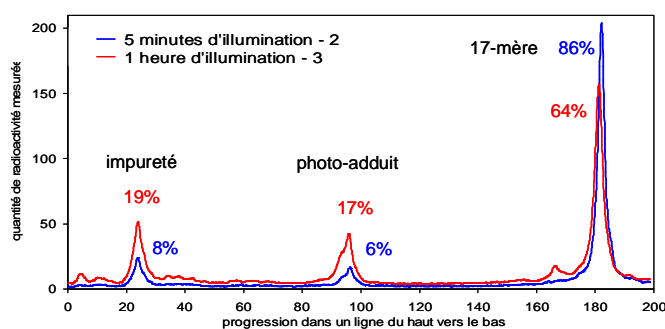


Figure B. 15 : Analyse des produits issus de l'illumination du conjugué **40** sous forme de duplex. (a) ligne 1 : avant illumination ; ligne 2 et 3 : après 5 minutes et 1 heure d'illumination respectivement).

Ces éléments confirment l'hypothèse avancée où le produit secondaire observé précédemment est un bis-conjugué composé de deux oligonucléotides identiques, provenant du synthon **8** accroché sur l'entité métallique. En effet, un tel bis-conjugué peut ensuite conduire sous illumination au photoproduit **T** composé d'un triplex d'oligonucléotide "**8**".

On procède ensuite à l'illumination continue de l'ensemble des duplex correspondants aux conjugués synthétisés, en présence de leur brin complémentaire marqué au ³²P. Dans ce cas, les conjugués correspondent aux produits purs, issus de la purification sur gel d'électrophorèse qui permet d'éliminer le sous-produit. Les résultats sont présentés sous la forme d'une étude comparative des systèmes, en évaluant successivement :

- l'ancien complexe et l'un des deux nouveaux : $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Dip}]^{2+}$ & $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$
- l'extrémité d'ancrage 3' et son opposée en 5'
- la nature du complexe : $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ & $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}]^{2+}$

Les duplex "**39**" $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ -5'-d-(TT TTT TTA TTA AAT TTA)3' et "**45**" $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ -3'-d-(TT TTT TTA TTA AAT TTA)5' n'engendrent pas la formation de photoadduit lors de l'illumination continue. Sur le gel d'électrophorèse correspondant, on observe uniquement la bande caractéristique du brin cible complémentaire marqué (*figure B.16*). Cette observation confirme nos attentes en certifiant l'absence de photoréactivité du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ vis à vis des adénines. Ce résultat corrobore les mesures de durées de vie de luminescence, où l'on observait seulement les deux durées de vie caractéristiques de la protection du complexe par l'oligonucléotide (τ , *B.1.3.1*). Il permet également de justifier l'utilisation de cette séquence comme référence, lors de la détermination des pourcentages d'extinction de luminescence (% Q, *B.1.3.1*).

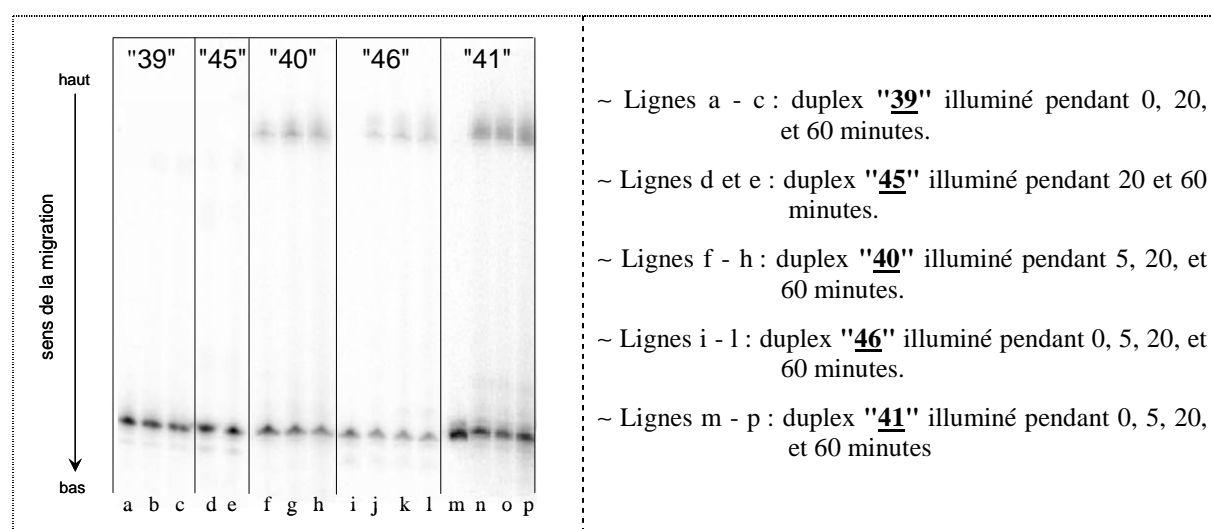


Figure B.16 : Gel d'électrophorèse dénaturant à 20% d'acrylamide résultant de l'illumination des conjugués $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ -oligonucléotide doubles brins.

Sur le gel d'électrophorèse présenté en exemple, on distingue bien séparément les oligonucléotides complémentaires (en bas du gel), des photoadduits (en haut du gel).

2. 2. 1. - Comparaison du nouveau système avec l'ancien système

On compare la photoréactivité du duplex "**41**" avec le duplex analogue de l'ancien système "**dip**".

On a réalisé un nouveau conjugué possédant 3 guanines consécutives à proximité du complexe afin de reproduire les meilleures conditions de formation du photoadduit obtenues précédemment. En effet, les études antérieures ont montré que le duplex possédant ce motif est le plus photoréactif de la série de conjugués étudiée.

Pourcentages de photoadduit (%)		Temps d'illumination (en minutes)					
		5	10	15	20	30	60
conjugués							
" 41 "	[Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -5'-d-(CC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'-d-(GG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	-	-	35	-	34	35
" dip "	[Ru(TAP) ₂ dip] ²⁺ -5'-d-(CC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'-d-(GG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	-	-	47	-	59	61

Les précédents résultats avaient mis en évidence un comportement analogue des deux conjugués vis-à-vis du phénomène d'extinction de luminescence. En effet, on obtenait 82 % de quenching pour le nouveau système contre 81 % pour l'ancien.⁴⁷ Cette similitude photophysique laissait présager une désactivation similaire de l'état excité photoinduit des deux types de complexe, conduisant ainsi à une quantité de photoadduit équivalente. Expérimentalement, le conjugué "**dip**" fournit 61 % de photoadduit au bout d'une heure d'illumination, alors que le conjugué "**41**" en produit seulement 35 % dans les mêmes conditions. Cette différence peut provenir de la conformation dynamique adoptée par les conjugués en solution. Le lien oxime doit fournir une géométrie moins favorable au transfert d'électron photoinduit. Le caractère rigide des deux liaisons amides, en plus de l'éther d'oxime, confère au nouveau système d'ancrage une moins bonne flexibilité que son homologue, formé uniquement de liaisons saturées. De plus, l'ancien système possède un caractère plus hydrophobe que le nouveau grâce aux deux groupements phényles, favorisant ainsi son positionnement au cœur du duplex, donc à proximité des guanines (*figure B.17*).

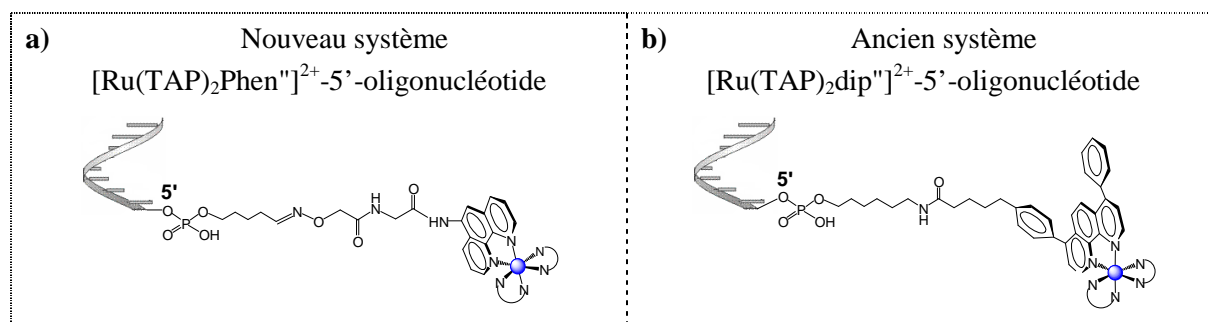


Figure B.17 : Comparaison du système d'ancrage à l'extrémité 5' d'oligonucléotide des deux types de complexes évalués : a) nouveau système utilisant le lien oxime, b) ancien système utilisant le lien amide.

La comparaison des durées de vie de luminescence des deux conjugués corrobore cette caractéristique. En effet, on observe une proportion beaucoup plus importante de la longue durée de vie τ_3 dans le cas du conjugué "**dip**" simple brin (70 % contre 32 % pour ("**41**" sb), *tableau B.18*). Cette longue durée de vie reflète la protection du complexe par l'oligonucléotide. Elle s'avère donc largement plus efficace dans le cas du conjugué "**dip**".

Composés	Durées de vie de l'état excité							
	τ_1 (ns)	A ₁ (%)	τ_2 (ns)	A ₂ (%)	τ_3 (ns)	A ₃ (%)	τ_m (ns)	
[Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺	720	100	-	-	-	-	-	
"41" sb	[Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -5'-d-(CC CTT R)3'	-	-	700	68	1346	32	907
db	[Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -5'-d-(CC CTT R)3' 3'-d-(GG GAA R')5'	22	71	165	18	897	11	144
[Ru(TAP) ₂ dip"] ²⁺	556	100	-	-	-	-	-	
"dip" sb	[Ru(TAP) ₂ Dip"] ²⁺ -5'-d-(CC CTT R)3'	-	-	520	29	880	70	780
db	[Ru(TAP) ₂ Dip"] ²⁺ -5'-d-(CC CTT R)3' 3'-d-(GG GAA R')5'	34	79	185	7	895	14	160

Tableau B.18 : Durées de vie de l'état excité des complexes [Ru(TAP)₂Phen"]²⁺ et [Ru(TAP)₂dip"]²⁺ libres et conjugués à l'extrémité 5' du même oligonucléotide, en simple (sb) et double brin (db). Les mesures sont effectuées dans un milieu tamponné à pH 7 (Tris-HCl à 10 mM, NaCl 50 mM), pour les composés : R = - TTA TTA AAT TTA, et R' = AAT AAT TTA AAT.

Cette étude comparative nous a permis de confirmer la formation du photoadduit désiré lors de l'illumination du duplex **"41"**. En effet, le gel d'électrophorèse a mis en évidence la formation d'un adduit possédant les mêmes caractéristiques que celui précédemment formé avec le duplex **"dip"** (figure B.19). La structure exacte de cet adduit avait été déterminée. Il s'agissait d'une liaison covalente entre un ligand TAP et l'amine libre de la guanine. On peut donc affirmer que l'adduit formé avec le nouveau système provient d'un lien covalent entre une guanine et un ligand TAP du complexe [Ru(TAP)₂Phen"]²⁺.

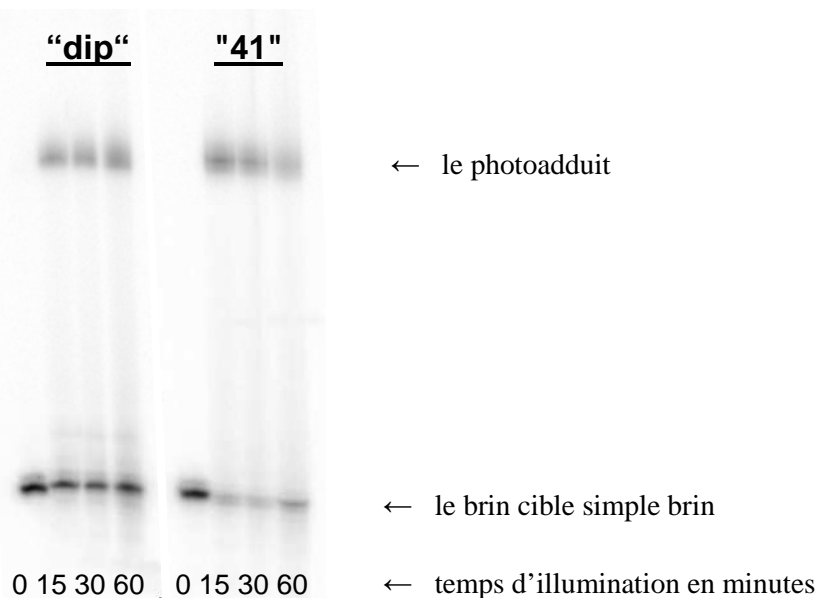


Figure B.19 : Gel d'électrophorèse dénaturant à 20% d'acrylamide résultant de l'illumination des conjugués **"41"** et **"dip"**.

> Le nouveau système permet donc également de former l'adduit espéré entre le ligand TAP et la guanine du brin cible. Par contre, il s'avère moins performant que l'ancien.

2. 2. 2. - Influence de l'extrémité d'ancrage

On détermine l'influence de l'ancrage en 5' par rapport à celui en 3', en comparant tout d'abord le duplex "**40**" avec le duplex analogue "**46**" :

Pourcentages de photoadduit (%)		Temps d'illumination (en minutes)					
Duplex de conjugués		5	10	15	20	30	60
"40"	[Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -5'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	13	24	26	27	31	32
"46"	[Ru(TAP) ₂ Phen] ²⁺ -3'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)5' 5'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)3'	23	25	26	32	26	31

La nature chimique des deux types de lien est similaire, le lien en position 3' est seulement plus court de 3 entités carbonées (*figure B.20*).

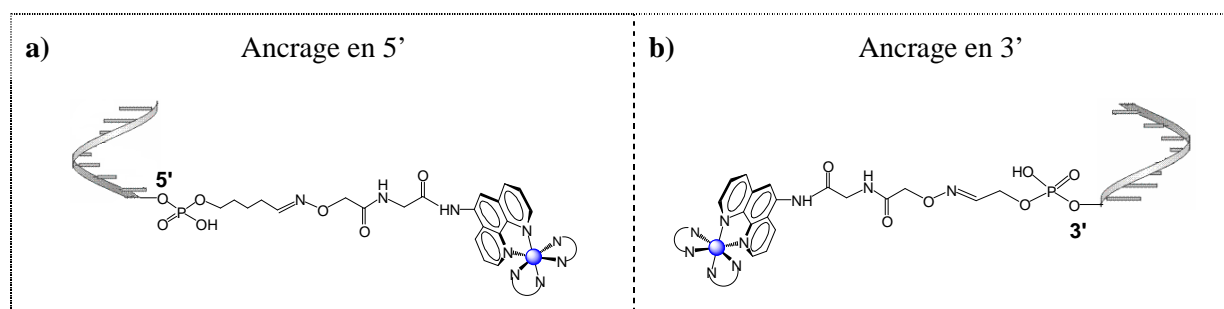


Figure B.20 : Comparaison des extrémités d'ancrage des complexes sur les oligonucléotides.

Les précédents résultats avaient mis en évidence une différence non négligeable entre les deux systèmes vis-à-vis du phénomène d'extinction de luminescence. En effet, on obtenait presque 80 % de quenching pour la conjugaison à l'extrémité 3', contre 60% pour celui en 5' (% Q, B.1.3.1). Ce résultat indiquait que l'extrémité 3' offrait une conformation plus favorable à la photoréactivité du système. Cette tendance avait été validée par les expériences d'illumination continue des duplex "**40**", et "**46**". On observait un effet hyperchrome vers 350 nm, caractéristique de la présence du photoadduit, plus marqué dans le cas du duplex "**46**", où le métal est ancré en 3' (B.2.2.1, *figure B.10*). Cette différence de photoréactivité se vérifie au début de l'illumination. Au bout de 5 minutes, la cinétique de formation du photoadduit apparaît deux fois plus rapide pour l'ancrage en 3' (23 %), que celle observée en 5' (13 %). Cependant, elle s'estompe rapidement pour conduire à la même quantité d'adduit après 10 minutes d'illumination (25 %). L'évolution temporelle conduit finalement à la même quantité d'adduit au bout d'une heure d'illumination.

> Le type d'ancrage n'a donc aucune d'influence sur la photoréactivité du complexe [Ru(TAP)₂Phen]²⁺.

On détermine ensuite l'influence de l'extrémité d'ancrage sur le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$. Pour cela, on compare le duplex "**43**" avec le duplex analogue "**48**".

Pourcentages de photoadduit (%)		Temps d'illumination (en minutes)					
Duplex de conjugués		5	10	15	20	30	60
" 43 "	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ -5'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	7	9	11	12	13	16
" 48 "	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ -3'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)5' 5'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)3'	30	38	39	42	39	37

Dans ce cas, le phénomène précédemment constaté en début d'illumination perdure. En effet, on observe déjà trois fois plus d'adduit après seulement 5 minutes d'illumination quand le complexe est ancré en 3'. Par contre, cette différence subsiste au cours du temps. Le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ s'avère donc très sensible à son environnement proche. Il apparaît plus photooxydant quand il se trouve à proximité de l'oligonucléotide. Ce contact entraîne un effet de protection de l'état excité du complexe, qui est normalement très sensible à la déchélation. De ce fait, le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ peut réellement exprimer son fort pouvoir photooxydant quand il est ancré à l'extrémité 3'. Alors que la longueur plus importante du lien en 5' soumet plus facilement son état excité à l'influence désactivatrice du solvant environnant.

> *Il semblerait donc que fondamentalement les deux extrémités soient équivalentes. Par contre, l'extrémité 3' est à privilégier dans le cas du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ très sensible à la photodéchélation. Elle offre une protection très efficace de son état excité, lui permettant ainsi de générer une grande quantité de photoproduit. De ce fait, la plus forte réactivité photochimique du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ par rapport à son homologue structural $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{phen}"]^{2+}$ peut finalement s'exprimer.*

2. 2. 3. - Comparaison des deux types de complexes étudiés

On détermine ensuite le potentiel du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$, par rapport à celui du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}$. En théorie, les deux complexes sont photochimiquement très différents. Le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$ est plus photooxydant que le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}$, alors qu'il est beaucoup moins photostable.¹⁵⁶

En comparant deux à deux les systèmes "**40**" & "**43**", "**46**" & "**48**", on retrouve les caractéristiques classiques des complexes appliqués aux conjugués :

¹⁵⁶ Elias, B.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Photo-reduction of polyazaaromatic Ru(II) complexes by biomolecules and possible applications. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 1627-1641.

Pourcentages de photoadduit (%)		Temps d'illumination (en minutes)					
Duplex de conjugués		5	10	15	20	30	60
"40"	[Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -5'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	13	24	26	27	31	32
"43"	[Ru(TAP) ₂ TAP"] ²⁺ -5'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	7	9	11	12	13	16
"46"	[Ru(TAP) ₂ Phen"] ²⁺ -3'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)5' 5'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)3'	23	25	26	32	26	31
"48"	[Ru(TAP) ₂ TAP"] ²⁺ -3'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)5' 5'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)3'	30	38	39	42	39	37

Le complexe [Ru(TAP)₂Phen"]²⁺ ancré sur les oligonucléotides s'avère moins photooxydant que son homologue structural [Ru(TAP)₂TAP"]²⁺. Il fournit intrinsèquement moins de photoadduit. On obtient plus de 40% de photoadduit avec le duplex **"48"**, contre 32% avec le duplex **"46"** dans les mêmes conditions. Néanmoins, le complexe [Ru(TAP)₂TAP"]²⁺ requiert des conditions particulières pour exalter ses capacités. En effet, il génère seulement 16% de photoadduit (**"43"**) quand il est moins protégé par l'oligonucléotide. Alors que le complexe [Ru(TAP)₂Phen"]²⁺ est certes moins oxydant, il est plus polyvalent. Il permet d'obtenir une quantité non négligeable de photoadduit d'environ 30% quelque soit son environnement.

La plus importante différence entre les deux systèmes provient du comportement affiché précédemment par le complexe [Ru(TAP)₂TAP"]²⁺ vis-à-vis de l'adénine. En effet, les précédents résultats avaient mis en évidence la formation d'un photoadduit entre le complexe [Ru(TAP)₂TAP"]²⁺ photoactivé et l'adénine. Alors que le complexe [Ru(TAP)₂Phen"]²⁺ n'est pas suffisamment photooxydant pour réagir avec l'adénine. L'illumination du duplex **"42"** confirme cette caractéristique propre au complexe [Ru(TAP)₂TAP"]²⁺. En effet, on observe aucun photoadduit quand on illumine les duplex **"39"** et **"45"**, qui correspondent aux conjugués [Ru(TAP)₂Phen"]²⁺-oligonucléotide dépourvus de guanine. Par contre, l'illumination du duplex **"42"** confirme le transfert d'électron envisagé entre une adénine du brin complémentaire et l'état excité du complexe [Ru(TAP)₂TAP"]²⁺. On observe donc le photoadduit résiduel, ce transfert reste quand même très faible avec seulement 1 à 2% de photoproduit formé.

Pourcentages de photoadduit (%)		Temps d'illumination (en minutes)					
Duplex de conjugués		5	10	15	20	30	60
"42"	[Ru(TAP) ₂ TAP"] ²⁺ -5'd-(TT TTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AA AAA AAT AAT TTA AAT)5'	3	1	1	3	1	3
"44"	[Ru(TAP) ₂ TAP"] ²⁺ -5'd-(AA AAA AAA TTA AAT TTA)3' 3'd-(TT TTT TTT AAT TTA AAT)5'	-	-	1	1	1	1

Afin d'affiner cette caractéristique, on a préparé une nouvelle séquence d'oligonucléotide ne faisant pas apparaître d'adénine à proximité du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$, quand le conjugué résultant est hybridé à son complémentaire. Ce nouveau système "**44**" n'a pas été caractérisé en photophysique. Il a été directement soumis à une expérience d'illumination continue en présence de son brin complémentaire marqué au ^{32}P . Les résultats montrent toujours la formation d'une faible quantité de photoadduit, alors qu'aucune adénine n'est directement opposée au complexe. Il semblerait donc que le complexe puisse photoréagir avec le brin sur lequel il est fixé. Il serait donc intéressant de réaliser une expérience d'illumination du conjugué simple brin pour vérifier cette affirmation. Pour cela, il faut marquer au préalable l'extrémité libre du conjugué au ^{32}P . Un essai préliminaire a été réalisé dans les conditions usuelles de marquage de l'extrémité 3'. Malheureusement, de telles conditions ont entraîné une importante dégradation des conjugués. Il est donc nécessaire de modifier le protocole de marquage, afin de pouvoir envisager ce type d'expérience.

> Les deux complexes ne peuvent pas être directement comparés, car la réactivité du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ demande un ajustement précis pour exprimer tout son pouvoir rédox. Néanmoins, le principal attrait du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ est sa capacité de photoréaction avec l'adénine. Alors que le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}$ n'est pas suffisamment oxydant pour le faire.

En résumé, la proportion de l'ensemble des photoadduits obtenus à partir des nouveaux conjugués est reprise dans le tableau suivant :

Pourcentages de photoadduit (%)		Temps d'illumination (en minutes)					
Duplex de conjugués		5	10	15	20	30	60
" 40 "	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}$ -5'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	13	24	26	27	31	32
" 41 "	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}$ -5'd-(CC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(GG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	-	-	35	-	34	35
" dip "	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Dip}]^{2+}$ -5'd-(CC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(GG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	-	-	47	-	59	61
" 42 "	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ -5'd-(TT TTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AA AAA AAT AAT TTA AAT)5'	3	1	1	3	1	3
" 43 "	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ -5'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)3' 3'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)5'	7	9	11	12	13	16
" 44 "	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ -5'd-(AA AAA AAA TTA AAT TTA)3' 3'd-(TT TTT TTT AAT TTA AAT)5'	-	-	1	1	1	1
" 46 "	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}"]^{2+}$ -3'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)5' 5'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)3'	23	25	26	32	26	31
" 48 "	$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}"]^{2+}$ -3'd-(TC CTT TTA TTA AAT TTA)5' 5'd-(AG GAA AAT AAT TTA AAT)3'	30	38	39	42	39	37

Figure B.21 : Pourcentages de photocrosslinking calculés à partir de la radioactivité détectée sur les gels d'électrophorèse après 5, 10, 15, 20, 30, 60 minutes d'illumination continue d'une solution de conjugué hybridé à son complémentaire marqué au ^{32}P .

L'évolution temporelle de la formation des photoproduits est répertoriée dans le graphique suivant :

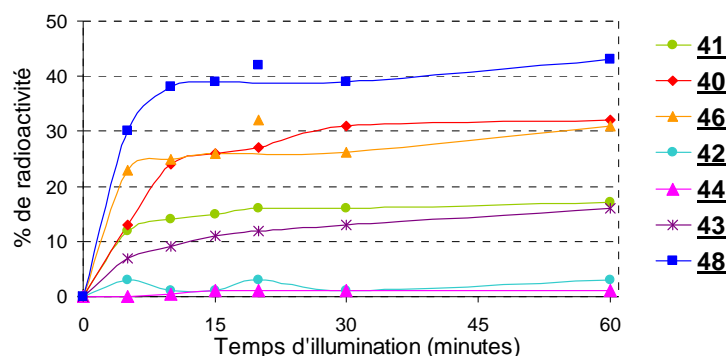


Figure B.22 : Représentation graphique de l'ensemble des pourcentages de radioactivité mesurés.

Ce bilan permet de mettre en évidence un taux de photoadduit constant après 15 minutes d'illumination, la photoréaction n'évolue pratiquement plus au delà. Il est intéressant de noter que ce phénomène se produit indifféremment du type de complexe. Les photoproduits issus du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}^{\text{m}}]^{2+}$ n'apparaissent pas plus sensibles à la photodéchélation au cours du temps, que ceux obtenus avec le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}^{\text{m}}]^{2+}$. En effet, une déchélation des photoproduits entraînerait plutôt une chute du taux d'adduit formé.

Afin de rendre les réactions d'illumination encore plus efficace, il serait intéressant de pouvoir prévenir la formation de ce pallier. Pour cela, il est nécessaire de déterminer son origine. On a supposé que ce taux constant pouvait provenir d'une séparation des deux brins complémentaires du duplex au cours du temps. En effet, de tels conjugués possèdent des températures de fusion de l'ordre de 40°C , ce qui signifie qu'au delà de cette température le duplex n'est plus complètement apparié. Certes les expériences d'illumination sont réalisées en refroidissant la solution irradiée pour pallier à l'échauffement de la solution, mais notre système ne nous permet pas de contrôler la température de la solution irradiée. Toutefois, la formation du photoadduit prouve obligatoirement l'hybridation des duplex, en amont. Mais il n'est pas exclu, qu'une longue période d'illumination entraîne l'échauffement nécessaire pour séparer les deux brins complémentaires. Afin de vérifier cette hypothèse, on a réalisé une expérience d'illumination fractionnée. Pour cela, on a soumis différents conjugués à 5 périodes de 5 minutes d'illumination, entrecoupées d'une heure d'obscurité afin que le duplex puisse se réhybrider, s'il y a lieu, lors du retour à température ambiante de l'échantillon. Les quantités de photoadduits ensuite obtenues à partir du gel d'électrophorèse correspondant, sont exactement identiques à celles issues de l'expérience d'illumination continue classique. Le taux maximal de photoadduit ne peut donc pas s'expliquer par un phénomène de désappariement des deux partenaires. Ce résultat conforte également notre méthode d'illumination.



En résumé, les deux complexes conduisent bien à la formation de photoadduits précédemment envisagée. La réactivité du complexe $[Ru(TAP)_2TAP'']^{2+}$ dépend beaucoup de son environnement, il doit absolument être protégé pour atténuer sa très grande sensibilité à la photodéchélation. Il apparaît très photooxydant quand il est fixé à l'extrémité 3' des oligonucléotides, alors qu'il devient moins réactif en 5'. Ce type de complexe doit absolument être protégé par l'oligonucléotide pour exprimer son potentiel rédox, lui permettant ainsi de former jusqu'à 40 % de photoadduit. Alors que le complexe $[Ru(TAP)_2Phen'']^{2+}$ est beaucoup moins sensible à son environnement, il montre peu de préférence par rapport au type d'ancrage. Il conduit indifféremment à 30 % de photoproduit quand il est en présence de deux guanines.

Conclusion

Dans cette partie, nous avons montré que les nouveaux complexes $[Ru(TAP)_2Phen"]^{2+}$ et $[Ru(TAP)_2TAP"]^{2+}$ entraînent bien la formation photoinduite d'un lien irréversible entre deux brins complémentaires d'oligonucléotides. En effet, l'illumination dans le visible offre la possibilité de relier de façon covalente le complexe de ruthénium dérivatisé à l'oligonucléotide ciblé. Les oligonucléotides photoréactifs ainsi synthétisés présentent un réel avantage applicable en stratégies antisens. Malgré une préparation plus efficace, ces conjugués s'avèrent moins photoréactifs que leurs homologues contenant le complexe $[Ru(TAP)_2dip]^{2+}$. Dans notre cas on obtient au maximum 40 % d'adduit avec le complexe $[Ru(TAP)_2TAP"]^{2+}$ ancré à l'extrémité 3' d'un oligonucléotide, alors que précédemment le système permettait d'atteindre 55%. Cette différence semble provenir de la rigidité plus importante du nouveau type de lien qui relie le métal à l'oligonucléotide. Il offre moins de liberté au complexe activé. Néanmoins, le système développé a montré un comportement distinctif vis-à-vis des adénines. En effet, le complexe $[Ru(TAP)_2TAP"]^{2+}$ est capable de former un photoadduit avec des adénines à proximité. Il semblerait même capable de réagir avec des adénines présentes sur sa propre entité oligonucléotidique.

*Conclusion
&
Perspectives*

Conclusion et perspectives

Nos travaux ont été consacrés à la synthèse et à l'étude de nouveaux assemblages complexes de ruthénium(II)-biomolécules photoréagissant avec les acides nucléiques. Ils s'inscrivent dans la continuation des travaux entrepris au sein du Laboratoire Européen Associé Ingénierie BioMoléculaire concernant la photoréaction d'un complexe de ruthénium(II) : le $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dip}]^{2+}$, ancrés chimiquement à différents oligonucléotides. Les études précédentes ont montré que ce type de complexe était capable, sous illumination, de former une liaison covalente irréversible avec une guanine du brin d'oligonucléotide ciblé. De tels photoadduits pourraient même perturber les systèmes enzymatiques de la synthèse protéique *in vivo*.

Notre travail s'est concrétisé par la conjugaison de complexes polyazaaromatiques de ruthénium(II) à des oligonucléotides, mais également à des peptides. Les complexes de ruthénium(II) étudiés possèdent au moins deux ligands π -déficients ce qui leur permet d'envisager une photooxydation de la base la plus réductrice de l'ADN, la guanine. Deux types de complexes ont été choisis : le $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$ qui est très photooxydant à cause de ses trois ligands TAP π -déficients, mais très sensible à la photodéchélation à l'état électronique excité ; et le $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$, qui est certes moins photooxydant, mais dont l'état excité est plus photostable.

L'assemblage des entités sus mentionnées a nécessité le développement d'un nouveau système de conjugaison sélectif.

La première partie de mon travail consistait à optimiser le procédé chimique d'assemblage des conjugués par le lien éther d'oxime. Différents conjugués ont été réalisés en faisant varier la nature de l'oligonucléotide, ainsi que celle du complexe, et celle du peptide. Pour cela, on a tout d'abord préparé les différents partenaires en intégrant le motif aldéhyde aux oligonucléotides ou aux peptides, et le motif oxyamine sur le complexe de ruthénium(II). La formation des conjugués s'est révélée efficace et rapide en ce qui concerne les oligonucléotides. Une étape finale de purification sur gel d'électrophorèse est nécessaire afin d'éliminer l'éventuel sous-produit issu de l'ancrage de deux oligonucléotides sur un complexe de ruthénium, pouvant se former au cours du couplage. Cette technique permet également d'analyser la composition du milieu, alors que les méthodes classiques par CLHP ne nous l'ont pas permis. La méthode de conjugaison a été validée aussi bien pour préparer les composés **39**, **40**, **41**, **42**, **43**, et **44** qui possèdent le complexe de ruthénium ancré à l'extrémité 5' de la séquence, que les composés **45**, **46**, **47**, et **48** où le métal est à l'extrémité 3'. Elle a également

offre la possibilité de greffer efficacement le complexe de ruthénium(II) à l'extrémité *N*-terminale de peptides, en se concrétisant par la synthèse des produits **49** et **50**. L'ensemble de ces conjugués a été préparé avec un bon rendement moyen de l'ordre de 50 %.

L'étude de l'hybridation des conjugués a ensuite montré que l'introduction du complexe métallique à l'extrémité des oligonucléotides n'altérait pas la stabilité thermodynamique du duplex. La nature du lien, ou encore celle du complexe, n'a pas d'influence sur le duplex formé entre le brin sonde du conjugué et sa cible. Cette affinité est indispensable pour préserver les propriétés spécifiques de reconnaissance de la cible, qui représente le fondement de la stratégie antisens visée.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé l'étude photochimique des différents conjugués afin de déterminer la sélectivité de la séquence en acide nucléique, de la nature du complexe, et de sa position sur l'oligonucléotide, vis-à-vis du photopontage. L'étude des conjugués, sous forme simple, et double brin, a tout d'abord permis de mettre en évidence un quenching de luminescence de l'état électronique excité des complexes en présence de la guanine. L'étude par gel d'électrophorèse, des solutions illuminées, a confirmé la formation du photoadduit. La comparaison avec le précédent système permet d'attester qu'il correspond bien au pontage covalent entre un ligand TAP du complexe et la guanine. L'étude de l'ensemble des conjugués a montré que l'extrémité d'ancrage des complexes de ruthénium(II) avait une influence sur le quenching de la luminescence des complexes, ainsi que sur la formation du photoadduit. L'extrémité 3' semble favoriser la photooxydation. Cet effet pourrait s'expliquer par la longueur différente des deux liens chimiques, celui à l'extrémité 3' étant plus court. Cette spécificité offre une géométrie d'interaction différente, et selon la capacité du complexe à s'immobiliser dans le duplex, on obtient plus ou moins de photoadduit. Ceci est très intéressant dans le cadre d'une utilisation des oligonucléotides en tant qu'outils thérapeutiques. En effet, il est généralement admis que la fonctionnalisation en 3' protège plus efficacement les oligonucléotides de l'action des nucléases. Dans le cas particulier du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2(\text{TAP}'')]^{2+}$, on observe également un quenching de luminescence en présence d'adénines. Cette particularité est ensuite confirmée par la mise en évidence d'un photoproduit sur les gels d'électrophorèse. Le fort pouvoir oxydant du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$ permet donc d'oxyder l'adénine, en plus de la guanine.

Par contre, le nouveau système s'avère moins photoréactif que l'ancien. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la géométrie spatiale adoptée par les nouveaux systèmes serait moins favorable à la recombinaison des radicaux photoinduits. En outre, les ligands TAP et Phen utilisés dans cette étude sont moins hydrophobes que le ligand dip utilisé auparavant et par conséquent différent quant à leur interaction avec l'ADN.

Dans leur ensemble, nos travaux ont apporté un nouveau procédé d'assemblage chimiosélectif très efficace pour ancrer des complexes de ruthénium à des biomolécules (oligonucléotides et peptides). Ils ont également permis de valider l'approche antisens visée en réalisant un photoadduit spécifique de la séquence d'acide nucléique ciblée. Ces résultats offrent des perspectives d'application thérapeutiques prometteuses. Ces assemblages irréversibles pourraient fortement perturber les enzymes de la synthèse protéique au niveau d'un ARNm spécifique, et donc compromettre la synthèse d'une protéine particulière. Cette méthode de préparation des conjugués "complexe de ruthénium-oligonucléotide" est par ailleurs actuellement utilisée dans le cadre d'un programme (WALEO) associant plusieurs laboratoires en Belgique et le Département de Chimie Moléculaire. Le but du projet est d'utiliser ces conjugués pour induire l'apoptose de cellules cancéreuses dans le contexte des carcinomes de la peau.

Aujourd'hui, notre laboratoire tente de finaliser les résultats, surtout ceux concernant la forte photoréactivité observée pour le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2(\text{TAP}'')]^{2+}$ à l'extrémité 3' des oligonucléotides. De plus, la caractérisation complète du photoproduit est prochainement envisagée. Les perspectives concernent également l'étude des conjugués "complexe de ruthénium-peptide", afin de déterminer le pouvoir photoréactif, et d'évaluer les propriétés de ciblage cellulaire des ces nouveaux assemblages. Des études récentes ont montré d'une part que les complexes de ruthénium sont capables de photoréagir avec le tryptophane.¹⁵⁷ D'autre part, le conjugué « $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}''']^{2+}$ -Tat » **50** a montré une très bonne photoréactivité avec les oligonucléotides simples et doubles brins.

¹⁵⁷ Gicquel, E.; Boisdenghien, A.; Defrancq, E.; Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Adduct formation by photo-induced electron transfer between photooxidising Ru(II) complexes and tryptophan. *Chem. Commun.* **2004**, 2764 – 2765.

Partie expérimentale

1 - Instrumentation et conditions générales

Les réactifs proviennent d'Aldrich ou Lancaster et ont été utilisés sans purification préalable. Les solvants utilisés sont de pureté commerciale, également sans traitement préalable, sauf indication préalable. L'acétonitrile nécessaire à la synthèse d'oligonucléotide est soigneusement conservé sous argon.

- La purification des produits par chromatographie sur colonne a été réalisée avec du gel de silice Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm) Merck.

- Les analyses par chromatographie sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice 60F₂₅₄ Merck de 0,25 mm d'épaisseur, avec détection UV à 254 nm.

- Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur les spectromètres Bruker AC 200 et Avance 300. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au pic du solvant pris comme référence interne (CDCl₃ : 7,24 ppm ; DMSO : 2,50 ppm). Les spectres sont décrits avec les abréviations : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint = quintuplet, m = multiplet. Les constantes de couplage (J) sont données en Hertz.

Les spectres de RMN ¹³C ont été enregistrés en utilisant la séquence d'impulsions C13mult qui permet d'obtenir le déplacement chimique ainsi que la nature des noyaux de carbone (primaire, secondaire, tertiaire ou quaternaire). Il s'agit d'une séquence de type INADEQUAT.

- Les spectres d'absorption électronique (UV-Visible) ont été obtenus sur un spectrophotomètre Varian Cary 400 scan UV/Visible.

1.1 - Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

1.1.1. - Conditions d'analyse

▣ Conditions d'analyse CLHP I

Les analyses ont été effectuées sur un appareillage Waters équipé de deux pompes M510, d'un injecteur universel U6K, d'un programmeur de gradient M680 et d'un détecteur UV M490E à longueur d'onde variable.

- Colonne analytique : Macherey-Nagel Nucleosil μ -bondapack, 4,6 x 250 mm², C₁₈ phase inverse, 5 μ m de porosité.

- Eluants : A : acétate d'ammonium 20 mM / CH₃CN, 95/5, v/v, pH 6. - B : CH₃CN / H₂O, 95/5, v/v.

- **Système I₁** : Gradient linéaire de 0 à 30 % de B en 20 minutes. Débit : 1 mL/min.

▣ Conditions d'analyse CLHP II

Les analyses ont été effectuées sur un appareillage Waters controller 600 équipé de pompes Delta-600, d'un injecteur universel U6K, d'un programmeur de gradient 600E, d'un détecteur UV Waters 2487 à double longueur d'onde, et d'un système de dégazage Waters In-line Degasser.

- Colonne analytique : Nucleosil μ -bondapack 120 Å, 4 x 30 mm², C₁₈ phase de polarité inverse, 3 μ m de porosité.

- Eluants : A : H₂O / TFA, 99,9/0,1, v/v. - B : CH₃CN / H₂O / TFA, 90/9,9/0,1, v/v/v.

- **Système II₁** : Gradient linéaire de B en 15 minutes. Débit : 1,3 mL/min.

- **Système II₂** : (dans ce cas la colonne est différente : Nucleosil μ -bondapack 100 Å, 4,6 x 250 mm², C₁₈ phase de polarité inverse, 3 μ m de porosité.)

Gradient linéaire de B en 30 minutes. Débit : 1 mL/min.

▣ Conditions d'analyse CLHP III

Les analyses ont été effectuées en phase inverse sur un appareil Waters équipé de deux pompes M510, d'un injecteur universel U6K, d'un programmeur de gradient M680, d'un détecteur UV Waters à barrette de diode.

- Colonne analytique : Waters μ -bondapack, 3,9 x 300 mm², phase de polarité inverse C₁₈, 10 μ m de porosité.

- Eluants : A : H₂O, pH 2,5 (acide phosphorique).- B : MeOH / H₂O : 95/5, v/v.

- **Système III₁** : Gradient linéaire de 0 à 100 % de B en 5 minutes, puis 100 % de B pendant 5 minutes. Débit : 2 mL/min.

1. 1. 2. - Conditions de purification

▣ Conditions de purification CLHP I

- L'appareillage de CLHP des conditions analytiques **I** est utilisé.

- Colonne préparative : Macherey-Nagel, 10 x 250 mm², C₁₈ nucleosil phase inverse, 7 μ m de porosité.

- Eluants : A : acétate d'ammonium 20 mM/CH₃CN, 95/5, v/v, pH 6.- B : CH₃CN / H₂O, 95/5, v/v.

- **Système I₃** : Gradient : de 0 à 30 % de B en 20 minutes. Débit : 4 mL/min.

▣ Conditions de purification CLHP II

- L'appareillage de CLHP des conditions analytiques **II** est utilisé.

- Colonne semi-préparative : Delta-PakTM 300 Å, 25 x 200 mm², phase de polarité inverse C₁₈, 15 μ m de porosité.

- Eluants : A : H₂O / TFA, 9,9/0,1, v/v - B : CH₃CN / H₂O / TFA : 90/9,9/0,1, v/v/v.

- **Système II₃** : Gradient : de 5 à 100 % de B en 30 minutes. Débit : 22 mL/min.

Tous les produits utilisés pour l'élution sont de qualité HPLC : CH₃CN, MeOH de Carlo-Erba, TFA de SDS (Peypin, France). L'eau est de qualité Milli-Q, obtenue après filtration d'eau distillée au travers de cartouches Milli-Q[®].

1.2 - Spectrométrie de masse (SM)

1.2.1. - L'ionisation par électrospray (ESI)

Les spectres de masse sont obtenus avec un spectromètre Esquire 3000+ (Bruker) par ionisation par électrospray (ESI) en mode négatif dans 50 % d'acétonitrile aqueux contenant 2 % de triéthylamine.

Différents modes d'analyse sont utilisés suivant les produits analysés :

Système IV₁ : Solvant : CH₃CN / H₂O, 50/50, v/v + 2% Et₃N

Analyse en mode négatif, C = 10⁻⁵-10⁻⁶M, débit : 8μL/min.

Système IV₂ : Solvant : CH₃CN / H₂O, 50/50, v/v

Analyse en mode positif, C = 10⁻⁵-10⁻⁶M, débit : 8μL/min.

Les simulations des distributions isotopiques des composés ont été réalisées avec le logiciel de traitement des données "Bruker daltonics datanalysis" du spectrophotomètre à partir de la fonction Stimulate Isotopic Pattern.

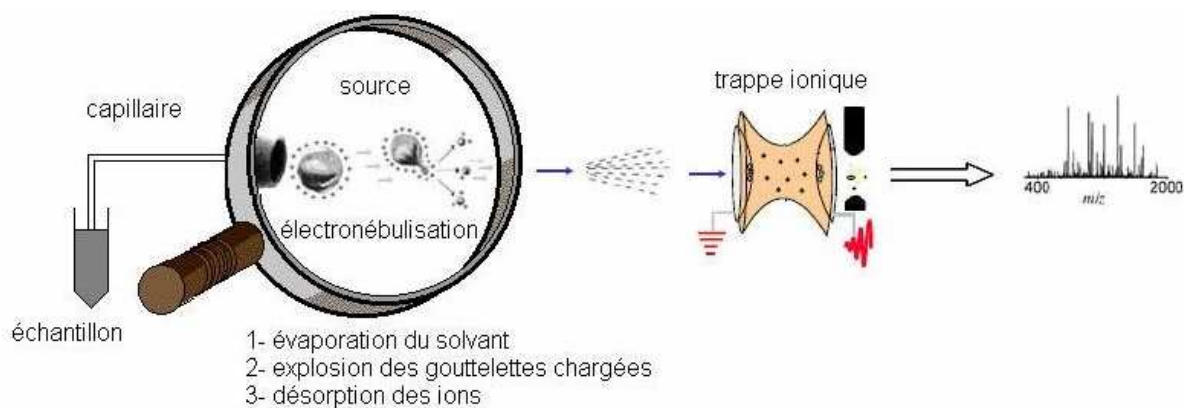


Schéma représentant le système d'analyse du spectromètre ESI.

1.2.2. - L'ionisation par désorption chimique (DCI)

Les spectres de masse sont enregistrés sur un spectromètre POLARISQ Thermo Finnigan à trappe à ions (logiciel X Calibur). Les analyses sont réalisées par J.-P. Gaude (LEDSS, UJF Grenoble, P. Dumy)

1.2.3. - Spectrométrie de masse MALDI-TOF

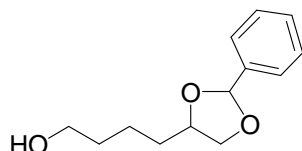
"Matrix assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight"

Les spectres de masse ont été enregistrés au moyen d'un spectromètre Bruker. Les analyses sont réalisées par C. Saint-Pierre (Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, SCIB-DRFMC, CEA Grenoble, équipe de D. Gasparutto).

2 - Synthèse des oligonucléotides

2.1 - Préparation du phosphoramidite 1,2-diol protégé

a) Le 4-[2-(phényl)-[1,3]-dioxalan-4-yl]-butan-1-ol

**1**

$$M_{\text{théo.}} = 222.28 \text{ g/mol}$$

$$C_{13} H_{18} O_3$$

Le benzaldéhyde diméthylacétale (2 g, 13.2 mmol, 2 mL) est mis en solution, sous argon, dans 22 mL de DMF. On ajoute le 1,2,6-hexanetriol (2 éq., 26.3 mmol, 3.63 g) au préalablement solubilisé dans 5 mL de DMF ($C = 0.5 \text{ mol/L}$; $V_t = 27 \text{ mL}$). Le milieu est également enrichi d'une quantité catalytique de pyridinium paratoluène sulfonique (une pointe de spatule, 0.5 g). La réaction est agitée à 50 °C et sous argon pendant 24 heures. Son avancement est vérifié par CCM (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 1\% \text{ EtN}_3$, v/v). Après retour à température ambiante, le solvant est concentré sous pression réduite. Le résidu huileux résultant est repris dans de l'acétate d'éthyle (40 mL). Et la phase organique est successivement lavée avec une solution aqueuse saturée de sulfite de sodium (3x 30 mL), puis avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium (3x 30 mL), et finalement avec une solution de chlorure de sodium saturée (1x 30 mL). Elle est ensuite séchée sur sulfate de sodium anhydre, concentrée sous pression réduite. Le produit obtenu sous forme d'une huile incolore est ensuite longuement séché sous pression réduite (dessiccateur), avant d'être stocké sous argon à -18°C (2.21 g, 9.98 mmol ; 76 %).

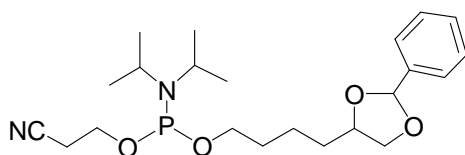
CCM : $R_f = 0,16$ (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 1\% \text{ EtN}_3$, v/v, révélateur : U.V., $\lambda = 254 \text{ nm}$)

RMN-¹H (300 MHz, CDCl_3) : $\delta \text{ ppm} = 7.48 - 7.45$ (m, 2 $\underline{\text{H}}_{\text{Ar}}$), 7.33 - 7.31 (m, 3 $\underline{\text{H}}_{\text{Ar}}$), 5.87 et 5.74 (2s, 1H_{dia}, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{O}}_2$), 4.21 - 3.99 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{O}$), 3.64 - 3.46 (m, 3H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{OH}$ et $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{O}}$), 3.32 (s, 1H, $\underline{\text{O}}\underline{\text{H}}$), 1.71 - 1.34 (m, 6H, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$ x3).

RMN-¹³C (300 MHz, CDCl_3) : $\delta \text{ ppm} = 138.81$ et 138.17 (dia, quat, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$: $\text{C}_{1'}$), 129.74 et 129.53 (dia, 2 $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_{\text{Ar}}$: $\text{C}_{3'}$, $5'$), 128.75 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_{\text{Ar}}$: $\text{C}_{4'}$), 127.12 et 126.84 (dia, 2 $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_{\text{Ar}}$: $\text{C}_{2'}$, $6'$), 104.33 et 103.45 (dia, $\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{O}}$), 77.69 et 76.84 (dia, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\underline{\text{O}}$), 71.07 et 70.42 (dia, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{O}$), 62.49 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2\text{OH}$), 33.52 et 33.38 (dia, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 32.84 et 32.82 (dia, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$), 22.46 ($\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2$).

SM (DCI(+)-NH₃/Isobutane) : $m/z = 223.1$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), $m/z = 239.8$ ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)

b) Le 4-[2-(phényl)-[1,3]-dioxalan-4-yl]-butan-1-ol phosphoramidite

**2**

$M_{\text{théo.}} = 422.23 \text{ g/mol}$
 $\text{C}_{22} \text{H}_{35} \text{N}_2 \text{O}_4 \text{P}$

Dans un ballon de 100 mL surmonté d'un septum, on prépare sous argon le phosphoramidite **2** dans 3 mL de CH_2Cl_2 anhydre enrichi de DIEA (2 éq., 4.4 mmol, 770 μL) à partir du 4-[2-(phényl)-[1,3]dioxalan-4-yl]-butan-1-ol **1** (491 mg, 2.2 mmol). On place le ballon dans un bain de glace pour réaliser une addition lente, (goutte à goutte au travers du septum), du 2-cyanoéthyl-N,N'-diisopropylchlorophosphoramidite (1.3 éq., 2.9 mmol, 681 mg, 642 μL). Le milieu est ensuite agité sous argon à température ambiante, pendant 4 heures, jusqu'à disparition complète du produit de départ (CCM : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 98/2, v/v). Le mélange est dilué dans du dichlorométhane (CH_2Cl_2 , 25 mL), lavé rapidement avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium à 10 % (NaHCO_3 , 3x 20 mL), concentré sous pression réduite, et séché sur sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4). Le résidu huileux incolore obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 99/1 + 1 % Et_3N , v/v, $R_f = 0,70$). La fraction récupérée est ensuite longuement concentrée et séchée sous pression réduite (dessiccateur). Le composé **2** est obtenu sous forme d'huile incolore (705 mg, 1.67 mmol, 76 %).

CCM : $R_f = 0.63$ (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 98/2, v/v ; révélateur : U.V., $\lambda = 254 \text{ nm}$)

RMN- ^{31}P (200 MHz, CDCl_3) : $\delta \text{ ppm} = 145.54$ et 145.07 .

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) : $\delta \text{ ppm} = 7.51 - 7.44$ (m, 2H_{Ar} : $\text{H}_{3', 5'}$), $7.38 - 7.36$ (m, 3H_{Ar} : $\text{H}_{2', 4', 6'}$), 5.91 et 5.79 (2s, 1Hdia, OCHO), $4.27 - 4.08$ (m, 2H, CH_2OCO), $3.68 - 3.49$ (m, 5H, CHO et CH_2O x2), $2.63 - 2.58$ (m, 2H, CH_2CN), $1.79 - 1.52$ (m, 8H, CH_2 x3 et CHN x2), $1.35 - 1.16$ (m, 12H, CH_3 x4).

RMN- ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) : $\delta \text{ ppm} = 138.56$ et 137.93 (dia, quat, C_{Ar} : $\text{C}_{1'}$), 129.25 et 129.04 (dia, 2CH_{Ar} : $\text{C}_{3', 5'}$), 128.34 (CH_{Ar} : $\text{C}_{4'}$), 126.65 et 126.37 (dia, 2CH_{Ar} : $\text{C}_{2', 6'}$), 103.99 et 103.11 (dia, CHO_2), 77.47 et 76.62 (dia, CHO), 70.73 et 70.09 (dia, CH_2O), 63.51 et 63.27 (dia, CH_2OP), 43.14 et 42.98 (dia, 2CHN), 33.11 et 33.08 (dia, CH_2), 31.15 et 31.06 (dia, CH_2), 24.70 et 24.61 (dia, 4CH_3), 20.44 et 20.35 (dia, CH_2).

SM (DCI(+)- NH_3 /Isobutane) : $m/z = 423.1$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$), $m/z = 439.9$ ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)

2.2 - Synthèse automatisée

Les oligonucléotides sont synthétisés à l'aide d'un synthétiseur Expedite 8909 (Perkin-Elmer, PerSpective Biosystems) en utilisant les réactifs fournis par Cruachem et Eurogentec.

La synthèse automatisée des oligonucléotides se fait selon le principe de la voie aux phosphoramidites, sur un taux de 1 μ mole d'oligonucléotides. Par rapport aux conditions standard, des quantités doubles d'amidites sont utilisées pour tous les couplages, ainsi que 5 fois la quantité requise pour le "capping". Après l'incorporation du dernier nucléotide, la fonction trityle 5'-terminale est conservée. La synthèse des séquences non modifiées à l'extrémité 3' se fait sur des cartouches commerciales de résines CPG, fonctionnalisée avec une base, pour un taux de substitution de 1 μ mole (Glen Research).

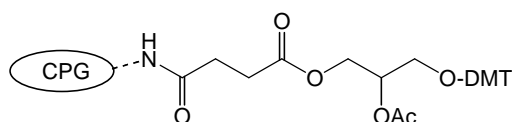
L'évolution de la synthèse est suivie en mesurant la quantité de cation trityle libéré à chaque nouvelle addition d'amidite. La synthèse est estimée correcte si la quantité de trityle détecté ne subit pas une importante diminution.

▣ Synthèse d'oligonucléotides modifiés à l'extrémité 5'

L'assemblage s'effectue selon le protocole classique de synthèse des oligonucléotides décrit précédemment. Le phosphoramidite modifié **2** est placé sur le synthétiseur sur une position réservée, après l'avoir solubilisé dans CH_3CN (50 mg/mL) sous atmosphère d'argon. Il est incorporé lors de l'étape finale en tant que base X, en doublant les temps de couplage.

▣ Synthèse d'oligonucléotides modifiés à l'extrémité 3'

La seule différence par rapport au protocole classique décrit précédemment, réside au niveau du choix du support solide. Les oligonucléotides modifiés à l'extrémité 3' sont assemblés sur un support solide spécifique, contenant la fonction diol masquée. Ce type de support est disponible commercialement : le 3-[(4,4'-diméthoxytrityoxy)glycéryl-1-succinoyl]-long chain alkylamino CPG (Eurogentec).



11

Dans ce cas la matrice est placée manuellement dans différentes colonnes dépourvues de support solide, au préalable nettoyées à l'acétonitrile, et séchées sous argon. La quantité déposée correspond à une synthèse de 1 μ mole d'oligonucléotide : soit 14 mg de support **11** possédant un taux de chargement de 71 μ moles/g.

2.3 - Déprotection et purification : (4 étapes)

a) Etape 1 : Récupération des produits

Les oligonucléotides sont ensuite décrochés du support et déprotégés lors d'un traitement à l'ammoniaque aqueux 28 % (1 mL/30 minutes + 0,5 mL/30 minutes) à température ambiante. Les deux

fractions collectées sont ensuite chauffées à 55 °C pendant 16 heures. Après refroidissement, la totalité de l'ammoniaque est évaporé sous argon, avant de congeler et lyophiliser les composés (Speed Vac).

b) Etape 2 : Purification

Les oligonucléotides tritylés à l'extrémité 5' sont ensuite repris dans 1 mL d'eau, et purifiés par CLHP en phase de polarité inversée en tampon acétate d'ammonium 20 mM (système de purification **I**₃). Entre chaque fraction de purification, la colonne est rincée avec 100 % de B pendant 10 minutes. Les fractions collectées sont ensuite lyophilisées.

c) Etape 3 : Déprotection de l'extrémité 5'

L'élimination du groupe protecteur à l'extrémité 5' s'effectue dans une solution aqueuse d'acide acétique 80 % (1 mL), pendant une heure à température ambiante. Les oligonucléotides déprotégés obtenus après congélation et lyophilisation, sont solubilisés dans l'eau (1 mL). La phase aqueuse subit trois lavages successifs à l'éther pour éliminer les résidus trityles. Après évaporation sous air ambiant des traces restantes d'éther, la phase aqueuse est lyophilisée.

d) Etape 4 : Quantification

La quantité d'oligonucléotide est déterminée par absorbance UV à 260 nm. Et les produits sont caractérisés par CLHP analytique (système **I**₁), spectrométrie de masse (système **IV**₁) et conservés au congélateur (cf. tableau ci-dessous). Le bilan de tous les différents oligonucléotides préparés est présenté dans les tableaux suivants.

Produits ⁽ⁱ⁾	λ_{\max} (nm)	Rendement %	t_R / CLHP (min.)	$M_{\text{théo.}}$ (g/mol)	SM / $M_{\text{exp.}}$ (g/mol)
Oligonucléotides 1,2- diol à l'extrémité 5'					
<u>3</u> (<i>BXL 23</i>)	262,4	41 +/- 7	12,5	5350,6	5349,4
<u>4</u> (<i>BXL 25</i>)	263,6	41 +/- 11	12,2	5320,6	5319,6
<u>5</u> (<i>BXL 7</i>)	264,2	27 +/- 7	12,1	5305,6	5305,5
<u>6</u> (<i>BXL 43</i>)	259,2	9	11,8	5413,7	5416,2
Produit	λ_{\max} (nm)	Rendement %	t_R / CLHP (min.)	$M_{\text{théo.}}$ (g/mol)	SM / $M_{\text{exp.}}$ (g/mol)
Oligonucléotides 1,2- diol à l'extrémité 3'					
<u>12</u> (<i>BXL 32</i>)	262,0	25 +/- 10	12,2	5308,5	5307,9
<u>13</u> (<i>BXL 33</i>)	262,6	25 +/- 12	12,1	5278,5	5277,7

⁽ⁱ⁾ Les produits sont également identifiés par leur nom usuel (en italique), définis dans le cadre de la collaboration franco-belge dans un souci d'homogénéité entre les deux équipes.

Produit – séquence ^{(i), (ii)}	λ_{\max} (nm)	Rendement %	CLHP / t _R (min.)	M _{théo.} (g/mol)	SM / M _{exp.} (g/mol)
Oligonucléotides naturels					
(Ru 0C) : 5'- TAA ATT TAA TAA AAA AA -3' oligonucléotide complémentaire de <u>3</u> – BXL 23	258,4	39	12,1	5217,6	5216,6
(Ru 0nat) : 3'- ATT TAA ATT ATT TTT TT -5' oligonucléotide naturel correspondant à <u>3</u> – BXL 23	262,1	40	12,3	5154,5	5152,5
(BXL 25C) : 5'- TAA ATT TAA TAA AAG GA -3' oligonucléotide complémentaire de <u>4</u> – BXL 25	258,4	31	12,4	5249,6	5249,4
(BXL 25nat) : 3'- ATT TAA ATT ATT TTC CT -5' oligonucléotide naturel correspondant à <u>4</u> – BXL 25	263,6	26	12,5	5124,4	5122,8
(Ru 7C) : 3'- GG GAA AAT AAT TTA AAT -5' oligonucléotide complémentaire de <u>5</u> – BX L7	258,0	46	11,8	5265,6	5265,9
(BXL 43C) : 5'- TA AAT TTA ATT TTT TTT -3' oligonucléotide naturel correspondant à <u>6</u> – BXL 43	262,0	44	12,1	5154,5	5151,3
(BXL 32C) : 5'- AAA AAA ATA ATT TAA AT -3' oligonucléotide complémentaire de <u>12</u> – BXL 32	258,4	31	12,2	5217,6	5217,2
(BXL 33C) : 5'- AGG AAA ATA ATT TAA AT -3' oligonucléotide complémentaire de <u>13</u> – BXL 33	258,4	29	11,9	5249,6	5248,9

2.4 - Oxydation des fonctions 1,2-diol terminales

Les oligonucléotides modifiés sont solubilisés dans l'eau à 10⁻³ mole/L. On ajoute le périodate de sodium (20 équivalents, 10 µL), le mélange est agité à température ambiante. La réaction est stoppée au bout d'1 heure. Les oligonucléotides sont purifiés par CLHP (système I₃) ou sur colonne ouverte C₁₈ (cf. méthode de dessalage D₂), et stockés au congélateur. Le bilan de l'oxydation des oligonucléotides est présenté dans le tableau ci-dessous.

Produits ⁽ⁱ⁾	Formule brute	M _{théo.} (g/mol)	SM ⁽ⁱ⁾ / M _{exp.} (g/mol)	CLHP t _R (min.)	Rendement (%) syst. I ₃	Rendement (%) syst. D ₂
Oligonucléotides aldéhyde à l'extrémité 5'						
<u>7</u> - (BXL 23)	C ₁₇₅ H ₂₂₆ N ₄₉ O ₁₁₁ P ₁₇	5318,6	5318,2	12,4	84 +/-8	78 +/-8
<u>8</u> - (BXL 25)	C ₁₇₃ H ₂₂₄ N ₅₁ O ₁₀₉ P ₁₇	5288,5	5287,4	12,6	60 +/-10	80 +/-2
<u>9</u> - (BXL 7)	C ₁₇₂ H ₂₂₃ N ₅₂ O ₁₀₈ P ₁₇	5273,5	5273,8	12,3	69 +/-6	-
<u>10</u> - (BXL 43)	C ₁₇₂ H ₂₂₃ N ₅₂ O ₁₀₈ P ₁₇	5381,6	-	12,1	-	54

⁽ⁱⁱ⁾ Les caractéristiques des séquences d'oligonucléotides naturelles et complémentaires utilisées lors de l'étude des conjugués sont présentées, alors que leur synthèse n'est pas abordée dans la partie concernant la préparation des oligonucléotides (*Partie résultats et discussion, chapitre II*).

⁽ⁱ⁾ L'analyse par spectrométrie de masse électrospray des oligonucléotides a été uniquement réalisée sur les produits issus de la purification par CLHP, système I₃.

Oligonucléotides aldéhyde à l'extrémité 3'						
14 - (BXL 32)	$C_{172} H_{220} N_{49} O_{111}$ P ₁₇	5276,5	5276,1	12,3	89 +/-6	-
15 - (BXL 33)	$C_{170} H_{218} N_{51} O_{109}$ P ₁₇	5246,5	5245,6	12,7	85 +/-7	-

Bilan de l'oxydation des oligonucléotides.

2.5 - Quantification UV-visible des produits

La quantité de produit est déterminée par spectrophotométrie UV-visible à 25 °C, dans l'eau en utilisant la loi de Beer Lambert :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

- A : absorbance
- ϵ : coefficient d'extinction molaire en $\text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- l : longueur de trajet optique qui traverse la cuve d'analyse en cm.
- C : concentration en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

D'après la valeur de l'absorbance expérimentale A, à la longueur d'onde spécifique du coefficient d'extinction molaire de la molécule ϵ , on obtient la quantité de produit présent dans l'échantillon analysé. (cf.. les données du tableau ci-dessous)

On emploie cette méthode pour déterminer précisément les quantités d'oligonucléotides, de complexes du ruthénium, et des conjugués synthétisés (oligonucléotide-ruthénium ou peptide-ruthénium).

- Les coefficients d'extinction molaire des oligonucléotides proviennent de la base de donnée "Integrated DNA Technologies" disponible sur la page web : <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>.

- Les coefficients d'extinction molaire des complexes du ruthénium sont déterminés expérimentalement par l'équipe du Pr. Kirsch-De Mesmaecker de Bruxelles.

- L'absorbance des peptides est négligée aux longueurs d'onde caractéristiques des molécules.

La mesure de la densité optique se fait en utilisant deux types de cuves en quartz de 1 cm de trajet optique. Des cuves de 1 mL pour quantifier les oligonucléotides naturels ou modifiés et les complexes du ruthénium, et des cuves de 70 μL pour les conjugués. Car dans ce dernier cas, la quantité de produit est trop faible pour obtenir des absorbances significatives qui se distinguent suffisamment de la ligne de base du spectrophotomètre en utilisant une cuve de 1 mL.

molécules	$\epsilon \times 10^3 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}$	molécules	$\epsilon \times 10^3 \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}$
Oligonucléotides modifiés / naturels		Oligonucléotides naturels	
BXL 23 / BXL 23 nat	164,3	RuO C	205,9
BXL 25 / BXL 25 nat	161,6	BXL 25 C	199,3
BXL 7 / BXL 7 nat	160,3	BXL 32 C	205,9
BXL 43	191,9	BXL 33 C	199,3
BXL 32	164,3	Ru 7 C	195,9
BXL 33	161,6	BXL 43C	161,8
Complexes du ruthénium			
Ru(TAP) ₂ Phen	1,65 à 411 nm	Ru(TAP) ₃	1,75 à 410 nm
	1,45 à 465 nm		

Bilan des propriétés d'absorption des oligonucléotides.

Pour les oligonucléotides, les ϵ correspondent à la longueur d'onde caractéristique de 260 nm.

2.6 - Méthode d'électrophorèse

Les électrophorèses ont été réalisées à partir de Gel de PolyAcrylamide (PAGE).

a) Principe théorique de l'électrophorèse PAGE

La matrice est sous forme de matériel gélifié qui est obtenu grâce à la polymérisation de l'acrylamide. Il en résulte un gel poreux qui permet la migration à l'intérieur même de la matrice, dont les mailles peuvent ralentir la progression des grosses molécules. Elle est préparée en formant un "sandwich" plaque de verre / gel / plaque de verre. Durant la gélification, des puits sont formés à l'extrémité pour permettre le dépôt des échantillons. Le gel est ensuite monté verticalement sur l'électrophorèse, car l'acrylamide peut s'accrocher par affinité sur le verre. Chaque extrémité du gel est ensuite mise en contact avec un tampon contenant des électrolytes qui, soumis à un potentiel électrique, permettra la propagation du courant. Ce courant entraînant les molécules constituant l'échantillon. Cette migration permet la séparation de diverses espèces moléculaires qui migreront à des vitesses différentes suivant leur taille, et leur charge nette. Cette matrice inerte électriquement n'entrave pas la migration, permettant ainsi des séparations de haute résolution. Elle est couramment utilisée pour les acides nucléiques, qui migreront vers l'anode à cause de leur caractère fortement anionique.

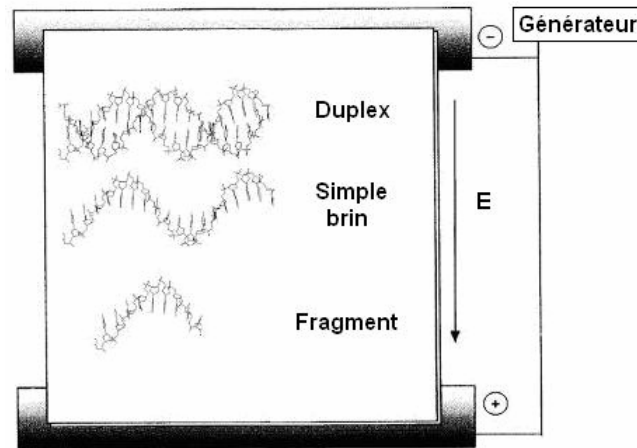


Illustration de l'électrophorèse sur gel.

b) Préparation des gels d'électrophorèse

Les électrophorèses sont réalisées sur Gel de PolyAcrylamide (PAGE) (ratio 19:1 entre l'acrylamide et le bisacrylamide) en utilisant du tampon TBE (Tris-borate 90 mM, pH 8, EDTA 2 mM) et en milieu dénaturant (7 M urée). De façon générale, la solution est préparée, sous agitation, en chauffant le mélange par intermittence à 50 °C pour faciliter la solubilisation des réactifs. Quand le milieu est homogène, il est filtré et refroidi jusqu'à température ambiante. Pendant ce temps, les plaques en verre sont préparées : en les essuyant successivement avec H₂O/EtOH/cyclohexane. La polymérisation est ensuite initiée par ajout de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine) et de persulfate d'ammonium (APS 10 %), et le gel monté sur l'électrophorèse en utilisant le TBE comme tampon de migration.

Tampon tris-borate-EDTA (TBE) :

Ce tampon est stocké à température ambiante sous forme d'une solution mère concentrée 10 fois. Pour préparer cette solution "10X", il faut mettre en solution 108 g de base Tris, 55 g d'acide borique, et 40 mL d'EDTA (0,5 M, pH 8) dans 1L d'eau, ajuster ensuite le pH à 8,0. Le tampon "1X" utilisé sera en concentration finale à 89 mM de tris-borate et 2 mM en EDTA.

▣ Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide : (protocole G₁)

Il faut préparer une solution mère à partir de : - acrylamide/bis-acrylamide (19/1) : 45 mL

- tampon TBE ("10X") : 9 mL

- urée : 45 g

- H₂O (qsp 100 mL) : 3 mL.

Le gel est monté à partir de 60 mL de la solution mère en ajoutant : - TEMED (0.3 µL/mL) : 20 µL

- APS 10 % (5 µL/mL) : 300 µL

Il est préférable de former un pied de gel avant de couler complètement le gel. Pour cela, on prélève une petite quantité de la solution mère (6 mL), et on initie la polymérisation avec 12 μL de TEMED (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) et 60 μL d'APS à 10 % (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Elle est rapidement injectée au fond du gel.

Chaque échantillon est mélangé à un tampon de charge (95% formamide, EDTA 20 mM, 0,1% xylène cyanole, 0,1% bleu de bromophénol). On ajoute 3 μL de tampon de charge pour un dépôt de 1 pmol d'oligonucléotide (1 μL). La migration se fait sous une puissance de 50 W pendant 5 heures. Les fragments d'ADN radiomarqués sont visualisés par radiographie avec des films Kodak X-OMAT AR et la radioactivité comptée sur un imageur Amersham Biosciences Typhoon 9410.

▣ Purification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide : (protocole G₂)

Il faut préparer une solution à partir de : - acrylamide/bis-acrylamide (19/1) : 150 mL

- tampon TBE ("10X") : 30 mL

- urée : 150 g

- H₂O (qsp 300 mL) : 10.5 mL.

- TEMED (0.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$) : 20 μL

- APS 10 % (6.7 $\mu\text{L}/\text{mL}$) : 2 mL

Les oligonucléotides à purifier sont dissous dans de l'urée 7 M (0,5 mmol/L), en se limitant à 100 nmol (200 μL), afin de ne pas saturer les dépôts. La migration se fait sous une puissance de 60 W pendant 6 heures. Les produits sont ensuite extraits du gel après avoir été repérés par UV ("UV shadowing") à l'aide d'une plaque de silice 60F₂₅₄ Merck placée directement sous le gel. Les bandes visualisées sont alors découpées, broyées à l'aide d'un mortier, et placées dans quelques mL d'eau pendant 24h à température ambiante. La solution est récupérée après filtration par centrifugation sur filtre centricon (Ultra free CL, Millipore). Les oligomères sont ensuite déssalés sur une colonne ouverte C₁₈ (cf. protocole D₁), et lyophilisés. Les échantillons récupérés sont alors dosés par absorbance UV à 260 nm.

2.7 - Marquage des oligonucléotides

▣ Marquage à l'extrémité 5' (protocole M₁)

Les brins ont été marqués sur l'extrémité 5' au phosphore ³²P. Pour cela, les oligonucléotides sont incubés 30 minutes à 37°C en présence d'ATP-[γ ³²P] et de l'enzyme phosphorylante : T4 polynucléotide kinase C, provenant d'*E.Coli* (fournisseur : Fermentas - Life Sciences). Cette enzyme est capable de transférer des groupements γ -phosphates aussi bien sur les groupes 5'-OH des brins d'ADN, que ceux d'ARN. Il faut également tenir compte du fait qu'elle possède une activité phosphatase spécifique des extrémités 3'. L'enzyme est ensuite rendue inactive par dénaturation

thermique, en chauffant 5 minutes le milieu réactionnel à 70°C. Cette étape sert également à hybrider les ODN radiomarqués avec leur brin complémentaire ajouté en excès.

Milieu de marquage : L'oligonucléotide (2.5 µmol/L) est placé dans les conditions optimales de marquage décrites par le protocole, contenant au final : 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6 à 25°C), 10 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L de DTT, 0.1 mmol/L de spermidine et 0.1 mmol/L d'EDTA en plus de l'ATP-[$\gamma^{32}\text{P}$] et de l'enzyme. Chaque échantillon contient en moyenne 3 unités d'enzyme, sachant qu'une unité est capable de transférer 1 nmol de [$\gamma^{32}\text{P}$] de l'ATP sur l'hydroxyle libre en 5' dans les conditions de marquage.

Milieu d'hybridation : On complète le milieu avec NaCl (50 mmol/L), et l'oligonucléotide complémentaire (1.2 µmol/L), en diluant 2.5 fois le milieu de marquage.

▣ Marquage à l'extrémité 3' (protocole M₂)

Les brins ont été marqués sur l'extrémité 3' au phosphore ³²P. Pour cela, les oligonucléotides sont incubés 15 minutes à 37°C en présence de [$\alpha^{32}\text{P}$]-ddATP et de l'enzyme phosphorylante : Terminal Deoxynucléotidyl transférase, provenant d'*E.Coli* (fournisseur : Fermentas - Life Sciences). Cette enzyme réalise l'addition de groupements α -phosphates sur un groupe hydroxyle secondaire à l'extrémité 3' des oligonucléotides. Elle exige au moins trois bases comme amorce, et elle allonge plus facilement un simple brin qu'un double brin. L'enzyme est ensuite rendue inactive par dénaturation thermique, en chauffant 10 minutes le milieu réactionnel à 70°C. Cette étape sert également à hybrider les ODN radiomarqués avec leur brin complémentaire ajouté en excès.

Milieu de marquage : L'oligonucléotide (0.5 µmol/L) est placé dans les conditions optimales de marquage décrites par le protocole, contenant au final : 200 mmol/L cacodylate de potassium, 25 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L CoCl₂ (pH 7.2 à 25°C), 3 mmol/L de AcOK (pH 6.8), 0.07 mmol/L de 2-mercaptoéthanol et des traces de glycérol (1.6 %) et de triton X-100 (0.01 %), en plus de l' [$\alpha^{32}\text{P}$]-ddATP et de l'enzyme. Chaque échantillon contient en moyenne 6 unités d'enzyme, sachant qu'une unité est capable de transférer 1 nmol de [$\alpha^{32}\text{P}$]-ddATP sur l'hydroxyle libre en 3' dans les conditions de marquage.

Milieu d'hybridation : On complète le milieu avec NaCl (50 mmol/L), et l'oligonucléotide complémentaire (0.24 µmol/L), en diluant 2.5 fois le milieu de marquage.

2.8 - Dessalage des oligonucléotides

▣ Méthode de dessalage D₁

Les produits sont dessalés par chromatographie flash sur colonne ouverte C₁₈, en utilisant la silice Lichroprep RP-18, de 40 à 63 µm de porosité (15 mL). La colonne est conditionnée dans MeOH, (20

mL), puis rincée abondamment avec H₂O (50 mL). Les oligonucléotides sont ensuite déposés (H₂O, 1 mL), et rincés avec H₂O (90 mL) pour éliminer le maximum de sels. On récupère ensuite les oligonucléotides en éluant la colonne avec MeOH/H₂O (50/50, v/v, 65 mL), on divise l'éluat en fraction de 8 mL. On détermine par absorption UV-visible, à partir de la valeur de l'absorbance à 260 nm, la présence de l'oligonucléotide. Les fractions ainsi identifiées sont concentrées, le produit est repris dans H₂O (1 mL), lyophilisé, stocké au congélateur. Finalement, la colonne est rincée avec MeOH (15 mL) afin de la reconditionner pour un nouveau dessalage. Sinon elle est stockée sous cette forme.

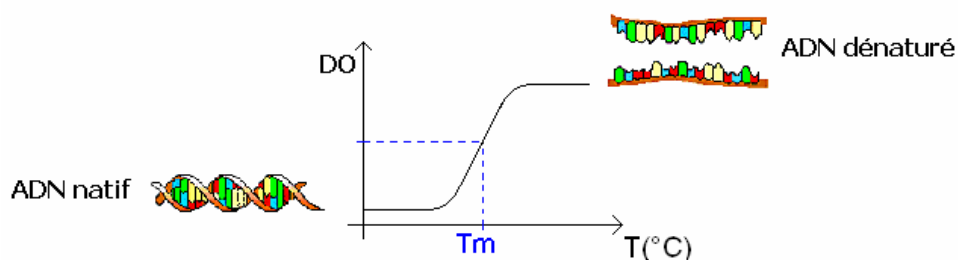
▣ Méthode de dessalage D₂

Cette méthode est utilisée pour extraire les oligonucléotides du milieu réactionnel de l'oxydation au périodate. Dans ce cas, on reprend le même protocole que celui employé précédemment, avec une seule différence, l'utilisation de CH₃CN au lieu de MeOH pour préserver les oligonucléotides aldéhyde.

2.9 - Mesure des températures de fusion (T_m)

a) Le principe

La fusion de l'ADN se définit comme la transition entre sa forme double hélice (le modèle organisé) et sa forme simple brin (le modèle désordonné). Durant ce processus de fusion, les liaisons hydrogène reliant les bases complémentaires, ainsi que les forces d'empilement entre les noyaux aromatiques d'un même brin sont détruites. Cette séparation des deux brins peut être réalisée par chauffage progressif du duplex d'ADN en milieu aqueux tamponné, et ceci dans une gamme permise par le solvant utilisé (de 2 à 80°C pour l'eau). Pour mettre en évidence ce phénomène de fusion, les propriétés spectroscopiques des oligonucléotides sont utilisées. En effet, chaque nucléotide présente un maximum d'absorption UV autour de 260 nm. Dans la forme ordonnée des brins d'ADN, les interactions d'empilement base-base provoquent un effet hypochrome. L'élévation de température fait disparaître ces interactions, ce qui se traduit par une augmentation de l'absorbance à 260 nm. La température de fusion est définie comme étant la température pour laquelle 50 % du duplex est dissocié.



Allure de la courbe différentielle obtenue en utilisant la méthode graphique de détermination du T_m à partir des mesures de densité optique (DO) à différentes températures (T).

b) La procédure expérimentale

Les expériences sont réalisées avec un spectrophotomètre Varian Cary 400 scan UV/visible relié à un contrôleur de température digital C570-0701.

Les mesures sont relevées sur des solutions d'oligonucléotides (3,8 $\mu\text{mole/L}$; 3,8 nmol) dans un milieu tamponné à pH 7 (1 mL) dont la composition est la suivante :

Tampon phosphate de sodium (Na_2HPO_4) 10 mM

NaCl 100 mM

EDTA 1 mM, à pH 8.

Chaque duplex d'oligonucléotide analysé est formé à partir d'une concentration équimolaire en brins dans le tampon de mesure. Les échantillons ainsi obtenus sont tout d'abord chauffés à 80°C pendant 5 minutes, suivie d'un retour lent à température ambiante (15 h), pour favoriser l'appariement parfait du duplex.

Toutes les mesures sont ensuite réalisées dans des cuves en quartz de 1 mL et de 1 cm de trajet optique. Chaque échantillon est placé dans le bloc thermostaté du spectromètre où il va subir deux cycles successifs de chauffage (**a**) /refroidissement (**b**) prédéfinis. (cf. tableau ci-dessous, **cycle 1 & 2**). L'absorbance à 260 nm est enregistrée toutes les minutes au cours des montées lentes en température (**a**).

		Température initiale : θ_i ($^\circ\text{C}$)	gradient de température ($^\circ\text{C}/\text{min}$)	Température finale : θ_f ($^\circ\text{C}$)	maintient à θ_f (min.)
Cycle 1	a	10	1	80	-
	b	80	1	10	5
Cycle 2	a	10	1	80	-
	b	80	1	10	5

Programme utilisé pour les analyses de T_m .

Les données récoltées sont ensuite traitées par le logiciel couplé au spectromètre UV-visible afin d'obtenir les courbes $DO = f(T)$ et ainsi déterminer la valeur du T_m par la méthode graphique. Pour cela, les données expérimentales sont corrigées de l'influence de l'absorbance du solvant, en déterminant les absorbances relative $\theta = (A_T - A_{20}) / (A_{80} - A_{20})$ qui seront reportées sur les courbes (A_T correspond à l'absorbance aux différentes températures T).

(Le logiciel permet également de calculer les paramètres thermodynamiques ΔG , ΔH et ΔS , ainsi que les températures de fusion grâce à la méthode de la dérivée.)

3 - Synthèse des peptides

Les acides aminés protégés proviennent de Advanced ChemTech Europe (Bruxelles, Belgique), Bachem Biochimie SARL (Voisins-les-Bretonneux, France), France Biochem SA (Meudon, France), Merck Eurolab (Fontenay-sous-Bois, France) et Calbiochem- Novabiochem (Merck Biosciences - VWR, Limonest, France). Le PyBOP® et la résine Rink-amide MBHA® sont fournis par Calbiochem-Novabiochem. Les autres réactifs proviennent de Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), Acros (Noisy-le-Grand, France).

Les peptides linéaires protégés ont été assemblés manuellement (protocole **P₁**) ou de manière automatisée (protocole **P₂**) à l'aide d'un synthétiseur de peptide Advanced ChemTech 348Ω. Ils ont été préparés selon les protocoles de SPPS en stratégie Fmoc/tBu, sur une résine de type RINK-amide MBHA. L'assemblage des *n* acides aminés requiert *n* cycles de couplage/déprotection (étape a à c) répétés en boucle pour allonger le peptide jusqu'à l'étape ultime de récupération du composé (étape c).
2/ A ce niveau s'achève la synthèse classique des peptides, il reste néanmoins l'étape d'oxydation consécutive (étape e) pour transformer les peptides en synthons de conjugaison.

3.1 - Couplage des acides aminés protégés Fmoc-N-α

a) Couplage manuel

Avant utilisation, ce réacteur est silanisé pendant 5 heures avec une solution de dichlorométhylsilane dans le toluène (1/4, v/v), puis lavé successivement avec du DCM (3 × 20 mL × 1min.), DCM/DIEA (4/1, v/v; 3 × 20 mL × 1min.), puis DCM (3 × 10 mL × 1min.). Ceci est réalisé jusqu'à neutralité du pH des solutions de lavage. En début de synthèse et après chaque lavage à l'éther, la résine est solvatée et lavée dans le réacteur en utilisant du DCM (3 × 10 mL × 10+1+1min.), puis du DMF (3 × 10 mL × 1min.).

Les réactions de couplage sont réalisées en utilisant, par rapport au taux de substitution de la résine, 2 éq d'acide aminé, 2 éq. de PyBOP® comme réactif de couplage et 3 éq. de DIEA comme base, dans le DMF (10mL) préalablement dégazé (pour éliminer toutes formes possibles d'amines présentes dans le solvant). La réaction de couplage est agitée pendant 30 minutes. La résine est ensuite lavée avec du DMF (4 × 10mL × 1min.), puis du DCM (4 × 10mL × 1min.). Le DCM fait gonfler la résine, ce qui permet de faire un prélèvement de quelques grains, pour vérifier par la suite si la réaction de couplage est complète, grâce à des tests de coloration caractéristiques de la présence d'amine libre. Les tests utilisés sont : les tests KAISER et TNBS.

b) Couplage automatisé

Les étapes de synthèse sur support solide sont réalisées dans les puits du synthétiseur comportant un filtre en verre fritté à leur base. Ce fritté permet l'élimination des solvants et des excès de réactif.

Les réactions de couplage réalisées avec le synthétiseur de peptide sont toujours doublées. Pour chaque couplage, on utilise 2,3 éq. d'acides aminés, à partir d'une solution à 0,5 M dans le DMF. On ajoute également 2,3 éq. de PyBOP® à partir d'une solution à 0,25 M, et 2,3 éq. de DIEA à partir d'une solution à 1 M. Le calcul des équivalents se fait à partir du taux de substitution théorique de la résine. Après 25 minutes de couplage sous agitation mécanique, la résine est lavée avec du DMF ($5 \times 17 \text{ mL.g}^{-1} \times 1 \text{ min.}$). L'étape suivante est la déprotection des groupements Fmoc, suivie d'une série de lavages : DMF ($2 \times 17 \text{ mL.g}^{-1} \times 1 \text{ min.}$), puis avec du MeOH ($1 \times 17 \text{ mL.g}^{-1} \times 2 \text{ min.}$), DCM ($2 \times 17 \text{ mL.g}^{-1} \times 1 \text{ min.}$), et enfin du DMF ($2 \times 17 \text{ mL.g}^{-1} \times 1 \text{ min.}$).

c) Suivi de la réaction de couplage peptidique

▣ Détection qualitative d'amines libres

Deux tests colorimétriques sont pratiqués indifféremment pour estimer la persistance d'amines libres sur la matrice, étant le signal d'une défaillance du couplage peptidique antérieur.

Le **test de Kaiser** requiert : - 1 solution de ninhydrine (500 mg) dans 10 mL de EtOH.

- 1 solution de phénol (80 g) dans 20 mL de EtOH.

- 1 solution de 2 mL de KCN 1 mM diluée à 100 mL avec de la pyridine.

Trois gouttes de chacune de ces solutions sont ajoutées dans un tube à hémolyse contenant quelques billes de résine à analyser. Le tube est porté à 80-110 °C pendant 3min. La présence de fonctions amines libres se traduit par une coloration bleue de la solution et de la résine (test de Kaiser positif). La réaction de couplage doit être répétée jusqu'à ce que les grains restent incolores (test de Kaiser négatif).

Le **test TNBS** requiert : - une solution d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) 1 % dans le DMF.

- une solution DIEA/DMF 1:9.

Quatre gouttes de chacune de ces solutions sont ajoutées dans un tube à hémolyse contenant quelques billes de résine à analyser. Le tube est laissé à température ambiante pendant 1min. La présence de fonctions amines libres se traduit par une couleur rouge-orangée des grains de résine (test TNBS positif). La réaction de couplage doit être répétée jusqu'à ce que les grains restent incolores (test TNBS négatif).

▣ Détection quantitative

L'intégrité du peptide formé peut être estimée en pratiquant une analyse CLHP. Pour cela, il faut prélever quelques billes de résines, décrocher le peptide par acidolyse avec une solution de TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5 ; v/v/v) pendant deux heures à température ambiante pour s'assurer de la libération et de la déprotection totale du peptide analysé. Puis la solution est filtrée, et le brut réactionnel est analysé par CLHP. Cette méthode est plus longue à mettre en place, elle est donc seulement utilisée en complément des tests colorimétriques douteux.

Il se peut que le doute persiste sur l'intégrité du peptide, comme dans le cas de tests désespérément positifs même après un second couplage. Dans ce cas, il est possible de masquer les fonctions amines libres en les acétylant. Cette réaction est réalisée en utilisant une solution de DMF/pyridine/anhydride acétique 7/2/1, v/v/v, (2 × 10 mL × 5 min.), suivi de lavages au DMF (4 × 10 mL × 1 min.).

3.2 - Elimination des groupes Fmoc-N-α sur support solide

Les acides aminés protégés, couplés sont traités avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF (10 mL × 5 + 10 + 10 min.), puis lavés avec du DMF (5 × 10 mL × 1 min.).

La quantité de groupements Fmoc clivés peut être déterminée par spectrométrie U.V. En effet, le dibenzofulvène produit par la coupure de Fmoc forme un adduit avec la pipéridine qui absorbe la lumière UV ($\lambda = 299 \text{ nm}$, $\epsilon = 7800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$). De ce fait, les solutions de pipéridine et de lavage sont réunies et leur volume est ramené à une valeur connue V en complétant avec du méthanol (V=250 mL). On mesure ensuite l'absorbance en diluant 30 fois la solution dans du MeOH, dans une cuve UV de 3 mL et de 1 cm de trajet optique. L'absorbance U.V. de cette solution (DO_{299}) mesurée à 299 nm permet de déterminer la quantité de groupements Fmoc clivés (n_{Fmoc}) par l'intermédiaire de la loi de Beer-Lambert :

$$n_{\text{Fmoc}} = \frac{DO_{299 \text{ nm}} \times V}{\epsilon_{299 \text{ nm}} \times l} \quad - l = \text{longueur du trajet optique (cm)}$$

Cette mesure est utilisée pour suivre l'évolution d'une synthèse peptidique sur support solide en évaluant de manière indirecte le taux de substitution de la résine.

3.3 - Décrochage des peptides de la résine associé à la déprotection des groupes acido-labiles

Que ce soit avec le protocole P1 ou P2, cette étape double se fait dans le réacteur identique à celui requis pour l'assemblage manuel.

La résine est lavée avec du DCM ($3 \times 10\text{mL} \times 1\text{min.}$), puis séchée sous air comprimé. Elle est ensuite traitée de manière répétée avec une solution TFA/TIS/ H_2O 95/2,5/2,5 ($2 \times 10\text{mL} \times 2\text{heures} + 10\text{min.}$). Une pointe de spatule de para-crésol est rajoutée à la solution de décrochage des peptides. Les solutions de coupure sont récupérées pour être ensuite concentrées sous pression réduite. Les résines se colorent en rouge, caractéristique des carbocations formés. Le peptide linéaire brut est ensuite obtenu par précipitation dans l'éther et lavé trois fois par de l'éther.

Ces conditions permettent d'éliminer conjointement les groupes protecteurs acido-labiles temporaires et semi-permanents des fonctions amines, carboxyliques et hydroxyles utilisés lors de l'assemblage Pmc, tBu, Boc, Trt, Pbf, OtBu.

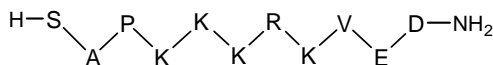
3.4 - Formation de l'aldéhyde glyoxylique

Le peptide est mis en solution dans de l'eau millipore à une concentration de 0,01 M, puis on ajoute le périodate de sodium aqueux (3 éq., $100\mu\text{L}$). La solution d'oxydant est fraîchement préparée à partir de réactif solide solubilisé dans de l'eau millipore. La réaction est laissée, sous agitation, 1 heure à température ambiante. Le peptide est aussitôt purifié par CLHP préparative, puis lyophilisé pour donner une poudre blanche floconneuse. L'excès de peptide est stocké à -18°C .

Remarque : Les peptides sont toujours obtenus sous la forme de sels d'acide trifluoroacétique après purification CLHP. Dans ce cas, les quantités de peptide sont calculées en intégrant les sels de TFA dans le calcul de la masse moléculaire.

3.5 - Préparation du peptide "NLS"

a) Synthèse du peptide NLS linéaire



16

$$M_{\text{théo.}} = 1284.54 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$\text{C}_{55} \text{H}_{101} \text{N}_{19} \text{O}_{16}$$

$$(M + 6\text{TFA} = 1962.4 \text{ g.mole}^{-1})$$

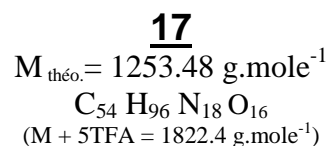
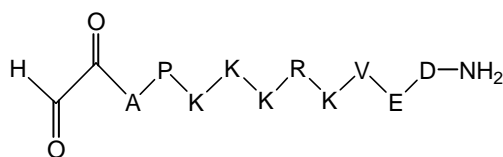
Le peptide linéaire est assemblé sur la résine Rink amide MBHA[®] (100 mg, $0.91 \text{ mmole.g}^{-1}$) en utilisant la procédure de couplage automatisée de 3.1.a) à 3.2. Le peptide est ensuite décroché du support en utilisant le procédé 3.3. Le produit obtenu est précipité et lavé à l'éther. Il est ensuite dissout dans H_2O / TFA, 99,9/0,1, v/v (10 mg.mL^{-1}) et purifié par CLHP semi-préparative (Système **II**₃). Le peptide **16** est obtenu après lyophilisation sous la forme d'une poudre blanche (137 mg).

Rendement : 77% (calculé à partir du taux de substitution de la résine après le premier couplage).

CLHP : $t_R = 13 \text{ min.}$ (H_2O , système d'analyse **II**₂, 5-40% B en 30 minutes).

SM –ESI : $m/z = 1284.4 (M+H)^+$ ($H_2O / CH_3CN, 1/1, v/v$; système d'analyse **IV**₂).

b) Synthèse du peptide NLS aldéhyde



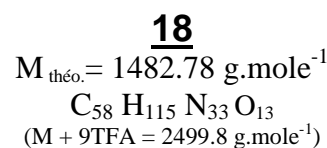
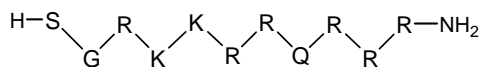
Le groupe glyoxyaldéhyde est généré par l'oxydation du résidu sérine en utilisant la procédure de 3.4. Le peptide aldéhyde **17** est obtenu avec 81% de rendement.

CLHP : $t_R = 13.7 \text{ min.}$ (H_2O , système **II**₂, 5-40% B en 30 minutes).

SM –ESI : $m/z = 1253.8 (M+H)^+$ ($H_2O / CH_3CN, 1/1, v/v$; système d'analyse **IV**₂).

3.6 - Préparation du peptide "Tat"

a) Synthèse du peptide Tat linéaire



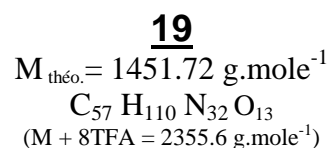
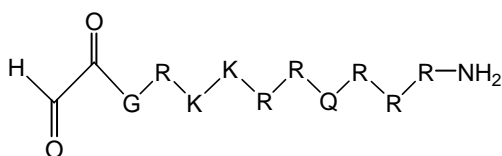
Le peptide linéaire est assemblé sur la résine Rink amide MBHA[®] (150 mg, 0.61 mmole.g⁻¹) en utilisant la procédure de couplage automatisée de 3.1.b) à 3.2. Le peptide est ensuite décroché du support en utilisant le procédé 3.3. Le produit obtenu est précipité et lavé à l'éther. Il est ensuite dissout dans $H_2O / TFA, 99,9/0,1, v/v$ (10 mg.mL⁻¹) et purifié par CLHP semi-préparative (Système **II**₃). Le peptide **18** est obtenu après lyophilisation sous la forme d'une poudre blanche (26 mg).

Rendement : 11% (calculé à partir du taux de substitution de la résine après le premier couplage).

CLHP : $t_R = 10.8 \text{ min.}$ (H_2O , système **II**₂, 5-40% B en 30 minutes).

SM –ESI : $m/z = 1482.6 (M+H)^+$ ($H_2O / CH_3CN, 1/1, v/v$; système d'analyse **IV**₂).

b) Synthèse du peptide Tat aldéhyde



Le groupe glyoxyaldéhyde est généré par l'oxydation du résidu sérine en utilisant la procédure de 3.4. Le peptide aldéhyde **19** est obtenu avec 82% de rendement.

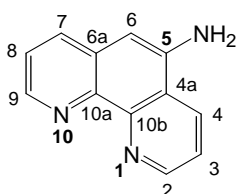
CLHP : $t_R = 11.7$ min. (H_2O , système **II**₂, 5-40% B en 30 minutes).

SM – ESI : $m/z = 1482.6$ ($M+H$)⁺ (H_2O / CH_3CN , 1/1, v/v ; système d'analyse **IV**₂).

4 - Préparations des ligands

4.1 - Synthèse du ligand Phen-ONHBoc

a) 5-amino-1,10-phénanthroline



20

$$M_{\text{théo.}} = 195.22 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$C_{12} H_9 N_3$$

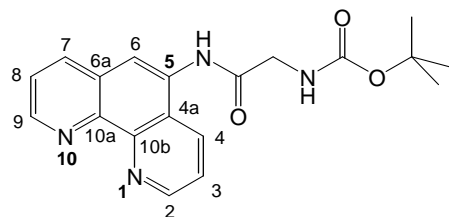
Dans un ballon bicol de 100 mL, équipé d'un barreau aimanté, d'une ampoule à addition, on place la 5-nitro-1,10-phénanthroline (2 g, 8.9 mmol) dans 50 mL d'EtOH. Le mélange est agité à 70°C dans un bain d'huile. Malgré une agitation vigoureuse, la solubilisation se fait difficilement. Dès que la solution devient presque limpide, on ajoute le palladium sur charbon activé : Pd/C 10 % (0.05 éq., 0.44 mmol, 470 mg). On prépare précautionneusement, sous la sorbone close, le réactif hydrazine : $N_2H_4 \cdot H_2O$ (4.5 éq., 41 mmol, 2.06 g, 2 mL) dans EtOH absolu (1 mol.L⁻¹, 41 mL au final). L'hydrazine est ensuite additionnée goutte à goutte au milieu réactionnel. Le mélange est agité 3 heures à 70 °C. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur un verre fritté recouvert d'une couche de célite, lavée à l'éthanol absolu. Le filtrat est ensuite concentré sous pression réduite jusqu'à un volume de 5 mL environ. Le produit **20** est précipité dans l'eau, filtré sur fritté, et séché au dessiccateur sous pression réduite. On récupère le produit **20** sous forme d'une poudre jaune (1.13 g, 5.8 mmol, 65 %).

CCM : $R_f = 0,15$ (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$ 80/20, v/v, révélateur : U.V., $\lambda = 254$ nm).

CLHP : $t_R = 3.9$ min. (dilution du prélèvement dans MeOH, système d'analyse **III**₁).

RMN-¹H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm = 9.18 (1H, dd, $J = 4.3$ et 1.6 Hz, H₂), 8.92 (1H, dd, $J = 4.3$ et 1.7 Hz, H₉), 8.25 (1H, dd, $J = 8.3$ et 1.6 Hz, H₄), 7.96 (1H, dd, $J = 8.1$ et 1.7 Hz, H₇), 7.62 (1H, dd, $J = 8.3$ et 4.3 Hz, H₃), 7.47 (1H, dd, $J = 8.1$ et 4.3 Hz, H₈), 9.6 (1H, s, H₆).

b) 5-(N-(*ter*-butoxycarbonyl)glycinamido)-1,10-phénanthroline

**22**

$$M_{\text{théo.}} = 352.39 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$\text{C}_{19} \text{H}_{20} \text{N}_4 \text{O}_3$$

Etape a : Formation de l'anhydride de *N*-(*ter*-butoxycarbonyl)glycine **21**

L'acide *N*-(*ter*-butoxycarbonyl)glycine (20 mmol, 3.65 g à 98%) est solubilisé sous argon dans CH₃CN (0.2 mol.L⁻¹, 100 mL). De façon à former l'anhydride en quantité deux fois supérieure à celle de l'amine libre à acyler. On ajoute le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (0.5 éq. d'acide, 10 mmol, 2.1 g), l'urée apparaît immédiatement sous forme d'un précipité blanc. Le mélange est agité 1 heure à température ambiante avant d'être filtré sur fritté. Le filtrat récupéré est concentré afin d'être ramené à un volume de 5 mL environ.

Etape b : condensation de l'anhydride **21** sur la 5-amino-1,10-phénanthroline **20**

La solution de *N*-(*ter*-butoxycarbonyl)glycine **21** est directement ajoutée dans le ballon contenant la 5-amino-1,10-phénanthroline **20** (5.2 mmol, 1.04 g) en solution dans 50 mL d'acétonitrile (0.1 mol.L⁻¹). La réaction est relativement lente. Après 20 heures d'agitation à température ambiante et sous argon, son avancement est déterminé par CLHP (système d'analyse **III**₁). On réalise 3 cycles d'additions successifs d'anhydride (30 mmole au total, 6 éq.). Le milieu est concentré sous pression réduite. Le résidu huileux orangé obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH, 90/10 + 1 % NH₄OH, v/v). Le produit **22** est récupéré sous forme d'une pâte épaisse. Il est donc longuement séché sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'une poudre orange dense. Il est directement engagé sous cette forme dans l'étape suivante.

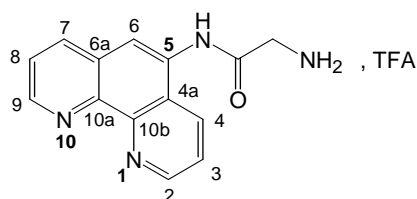
CLHP : t_R = 4.6 min. (dilution du prélèvement dans MeOH, système d'analyse **III**₁).

RMN-¹H (300 MHz, *d*₆-DMSO) : δ ppm = 10.28 (1H, s, Phen-NH), 9.12 (1H, dd, J = 4 Hz, J = 1,5 Hz, H₂), 9.04 (1H, dd, J = 4 Hz, J = 1,5 Hz, H₉), 8.64 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 1,5 Hz, H₄), 8.46 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 1,5 Hz, H₇), 8.14 (1H, s, H₆), 7.80 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 4 Hz, H₃), 7.74 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 4 Hz, H₈), 7.26 (1H, t, J = 5,5 Hz, CH₂NH), 3.94 (2H, d, J = 5 Hz, CH₂NH), 1.43 (9H, s, tBu).

RMN-¹³C (300 MHz, *d*₆-DMSO) : δ ppm = 169.60 (Phen-NH-CO), 156.00 (NH-CO-O), 149.80 (C₂-H), 149.26 (C₉-H), 145.72 (C_{10b}), 143.73 (C_{10a}), 135.75 (C₇-H), 131.77 (C₄-H), 131.69 (C₅), 127.98 (C_{6a}), 124.74 (C_{4a}), 123.49 (C₈-H), 122.68 (C₃-H), 120.09 (C₆-H), 78.08 (C, tBu), 43.85 (CH₂NH), 28.14 (CH₃, tBu).

SM (EI) : m/z = 352 (M⁺).

c) 5-(glycinamido)-1,10-phénanthroline

**23**

$$M_{\text{théo.}} = 252.27 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$\text{C}_{14} \text{H}_{12} \text{N}_4 \text{O}$$

Le composé **22** brut issu directement de la réaction d'acylation (5.2 mmole : quantité mise en réaction lors de l'étape précédente), est solubilisé une solution de TFA/H₂O (50/50, v/v, 0.1 mol.L⁻¹, 50 mL). On ajoute tout d'abord directement dans le ballon 25 mL d'H₂O, puis 25 mL de TFA. La solution est agitée 3 heures à température ambiante, puis concentrée sous pression réduite. Le résidu est repris dans 50 mL de CH₃CN, auquel on ajoute 10 mL de toluène. La solution est de nouveau concentrée sous pression réduite. On réalise 3 fois successives ce traitement, et on obtient une huile orange, très collante. Le produit est précipité par ajout d'Et₂O, qui est ensuite éliminé sous pression réduite. La précipitation n'est pas totale, une partie du produit reste sous forme d'agglomérat dense. Le résidu est donc longuement séché sous pression réduite (dessiccateur), pendant au moins une nuit.

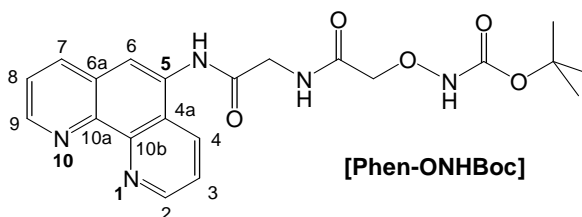
CLHP : t_R = 2.6 min. (dilution du prélèvement dans MeOH, système d'analyse **III**₁).

RMN-¹H (300 MHz, d₆-DMSO) : δ ppm = 10.80 (1H, s, Phen-NH), 9.17 (1H, dd, J = 4 Hz, J = 1,5 Hz, H₂), 9.09 (1H, dd, J = 4 Hz, J = 1,5 Hz, H₉), 8.75 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 1,5 Hz, H₄), 8.60 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 1,5 Hz, H₇), 8.34 (2H, s, NH₂), 8.23 (1H, s, H₆), 7.91 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 4 Hz, H₃), 7.85 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 4 Hz, H₈), 4.07 (2H, s, CH₂NH₂).

RMN-¹³C (300 MHz, d₆-DMSO) : δ ppm = 166.37 (Phen-NH-CO), 149.97 (C₂-H), 148.74 (C₉-H), 143.96 (C_{10b}), 141.75 (C_{10a}), 137.81 (C₇-H), 132.73 (C₄-H), 131.30 (C₅), 128.21 (C_{6a}), 124.60 (C_{4a}), 124.20 (C₈-H), 123.55 (C₃-H), 119.80 (C₆-H), 40.99 (CH₂NH₂).

SM (EI) : m/z = 252 (M⁺).

d) 5-((N-(ter-butoxycarbonyl)-O-(carboxyméthyl)hydroxylamine)glycinamido)-1,10-phénanthroline

**25**

$$M_{\text{théo.}} = 425.44 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$\text{C}_{21} \text{H}_{23} \text{N}_5 \text{O}_5$$

On solubilise, sous argon, le composé **23** (5.2 mmol) dans 55 mL de DMF (0.1 mol.L⁻¹), contenant de la DIEA (3 équ., 16 mmol, 2.7 mL). On ajoute, après vérification du pH basique, l'ester

activé de l'acide *N*-Boc-oxyaminoacétique **24** (1.2 éq., 6,3 mmol, 1.82 g). On agite la solution à température ambiante, jusqu'à l'obtention d'une solution limpide (10 minutes environ). On vérifie l'avancement de la réaction par analyse CLHP, puis on concentre le DMF sous pression réduite. Le résidu est repris dans 50 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec NaHCO₃ 10 % (30 mL x 3), puis séchée sur Na₂SO₄, et concentrée sous pression réduite. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 80/20 + 2% de NH₄OH, v/v). Après concentrations de la solution de **25** récoltée, on obtient une huile orange. Le produit est précipité par EtO₂, concentré et longuement séché sous pression réduite (dessiccateur). Le composé **25** (1.58 g, 3.72 mmol) est isolé avec 72 % de rendement (3 étapes, au départ de la 5-amino-1,10-phénanthroline).

CLHP : t_R = 4.6 min. (dilution du prélèvement dans MeOH, système d'analyse III₁).

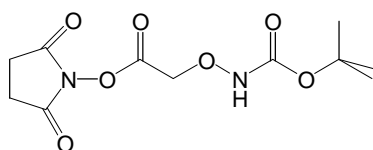
RMN-¹H (300 MHz, *d*₆-DMSO) : δ ppm = 10.31 (1H, s, ONHBoc), 10.22 (1H, s, Phen-NH), 9.13 (1H, dd, J = 4 Hz, J = 1,5 Hz, H₂), 9.05 (1H, dd, J = 4 Hz, J = 1,5 Hz, H₉), 8.62 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 1,5 Hz, H₄), 8.46 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 1,5 Hz, H₇), 8.43 (1H, t, J = 5,5 Hz, CH₂NH), 8.14 (1H, s, H₆), 7.82 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 4 Hz, H₃), 7.75 (1H, dd, J = 8 Hz, J = 4 Hz, H₈), 4.30 (2H, s, CH₂O), 4.18 (2H, d, J = 5,5 Hz, CH₂-O-NH), 1.40 (9H, s, tBu).

RMN-¹³C (300 MHz, *d*₆-DMSO) : δ ppm = 168.59 (NH-CO x2), 156.61 (CO-O), 149.85 (C₂-H), 149.40 (C₉-H), 147.76 (C_{10b}), 143.86 (C_{10a}), 135.78 (C₇-H), 131.72 (C₄-H), 131.38 (C₅), 127.92 (C_{6a}), 124.73 (C_{4a}), 123.53 (C₈-H), 122.79 (C₃-H), 120.46 (C₆-H), 80.48 (C, tBu), 74.65 (CH₂-O), 42.30 (CH₂NH), 27.86 (CH₃, tBu).

SM (EI) : m/z = 426 (M⁺).

4.2 - Synthèse de l'ester activé

Ester du *N*-(ter-butoxycarbonyl)-*O*-(carboxyméthyl)hydroxylamine



24

M_{théo.} = 288.25 g.mole⁻¹
C₁₁ H₁₆ N₂ O₇

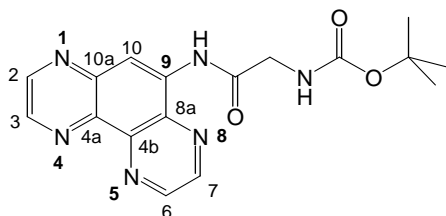
Dans un ballon de 250 mL équipé d'un barreau aimanté, on solubilise sous argon l'acide *ter*-butoxycarbonylaminoxyacétique (2 g, 10.7 mmol) dans un mélange AcOEt/Dioxane (50/50, v/v) préparé *in situ* (26 mL, 0.4 mol.L⁻¹). Le mélange est refroidi à 0°C dans un bain de glace. On ajoute successivement le *N*-Hydroxysuccinimide (1 éq., 1.2 g), le dicyclohexylcarbodiimide (1 éq., 2.16 g). On voit directement apparaître un précipité blanc correspondant au dicyclohexyl urée. Le mélange est agité 3 heures à température ambiante, sous argon. La solution est ensuite filtrée sur fritté, et le filtrat concentré sous pression réduite. Le résidu huileux incolore obtenu est placé une nuit au dessiccateur sous pression réduite, avant d'être repris dans le minimum CH₂Cl₂ (3 mL environ) afin d'obtenir une

solution limpide, à laquelle on ajoute du pentane pour faire précipiter le produit **24**. Pour accélérer la cristallisation, le mélange est placé à 4°C (10 min. environ), puis quelques heures à -18°C. Le solvant est ensuite éliminé sous pression réduite, et on obtient le produit **24** sous forme de poudre blanche (2.65 g, 9.2 mmol, 86 %).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ ppm = δ ppm 7.76 (1H, s, NH), 4.76 (2H, s, CO-CH₂-O), 2.85 (4H, s, (CH₂)₂-succ), 1.47 (9H, s, (CH₃)₃-Boc).

4.3 - Synthèse du ligand TAP-ONHBoc

a) 9-(*N*-(*ter*-butoxycarbonyl)glycinamido)-1,4,5,8-tétraazaphénanthrène



27

$$M_{\text{théo.}} = 354.36 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$\text{C}_{17} \text{H}_{18} \text{N}_6 \text{O}_3$$

Etape a : Formation de l'anhydride de *N*-(*ter*-butoxycarbonyl)glycine :

L'acide *N*-(*ter*-butoxycarbonyl)glycine (6.4 mmol, 1.21 g à 98%) est solubilisé sous argon dans CH₃CN (0.2 mol.L⁻¹, 32 mL). De façon à former l'anhydride en quantité deux fois supérieure à celle de l'amine libre à acyler. On ajoute le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (0.5 éq. d'acide, 3.2 mmol, 0.66 g), l'urée apparaît immédiatement sous forme d'un précipité blanc. Le mélange est agité 1 heure à température ambiante avant d'être filtré sur fritté. Le filtrat récupéré est concentré afin d'être ramené à un volume de 5 mL environ.

Etape b : condensation de l'anhydride sur le 9-amino-1,4,5,8-tétraazaphénanthrène **26** :

La solution de *N*-(*ter*-butoxycarbonyl)glycine est directement ajoutée dans le ballon contenant le 9-amino-1,4,5,8-tétraazaphénanthrène (1.6 mmol, 316 mg) en solution dans 16 mL d'acétonitrile (0.1 mol.L⁻¹). La réaction est relativement lente. Après 20 heures d'agitation à température ambiante et sous argon, son avancement est déterminé par CLHP (système d'analyse **III**₁). Le milieu est concentré sous pression réduite. Le résidu huileux marron obtenu est repris dans 100 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium à 10 % (3x 25 mL), avant d'être séchée (Na₂SO₄), concentrée. On obtient le produit **27** sous forme d'une huile marron. Il est donc longuement séché (48 heures) sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'une pseudo-poudre (600 mg). Il est directement engagé sous cette forme dans l'étape suivante.

CLHP : t_R = 5.4 min. (dilution du prélèvement dans MeOH, système d'analyse **III**₁).

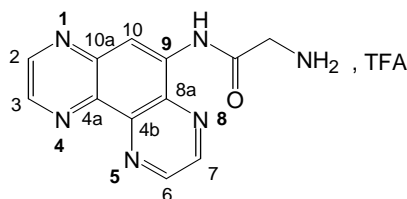
RMN-¹H (300 MHz, *d*₆-DMSO) : δ ppm = 10.53 (1H, s, TAP-NH), 9.33 (1H, d, J = 2 Hz, H₆),

9.20 (1H, d, J = 2 Hz, \underline{H}_7), 9.10 (1H, d, J = 2 Hz, \underline{H}_2), 9.07 (2H, m, \underline{H}_3 et \underline{H}_{10}), 7.61 (1H, t, J = 6 Hz, \underline{NHCO}), 3.97 (2H, d, J = 6 Hz, $\underline{CH}_2\text{NH}$), 1.46 (9H, s, \underline{CH}_3 x3).

RMN- ^{13}C (300 MHz, d_6 -DMSO) : δ ppm = 169.71 (TAP-NH- \underline{CO}), 156.05 ($\underline{CO-O}$), 147.09 (\underline{C}_2 -H), 146.38 (\underline{C}_6 -H), 144.99 (\underline{C}_7 -H), 144.45 (\underline{C}_9), 143.85 (\underline{C}_3 -H), 140.23 (\underline{C}_{10a}), 137.01 (\underline{C}_{4b} ou $8a$), 135.69 (\underline{C}_{4b} ou $8a$), 134.94 (\underline{C}_{4a}), 114.92 (\underline{C}_{10} -H), 78.70 (\underline{C} , tBu), 44.89 ($\underline{CH}_2\text{NH}$), 28.09 (\underline{CH}_3 , tBu).

SM (EI) : $m/z = 354$ (M^+).

b) 9-glycinamido-1,4,5,8-tétraazaphénanthrène



28

$M_{\text{théo.}} = 254.26 \text{ g.mole}^{-1}$
 $\text{C}_{12} \text{H}_{10} \text{N}_6 \text{O}$

Le composé **28** brut issu directement de la réaction d'acylation (1.6 mmole : quantité mise en réaction lors de l'étape précédente), est solubilisé une solution de TFA/ H_2O (50/50, v/v, 0.1 mol.L $^{-1}$, 16 mL). On ajoute tout d'abord directement dans le ballon 8 mL d' H_2O , puis 8 mL de TFA. La solution est agitée 3 heures à température ambiante, puis concentrée sous pression réduite. Le résidu est repris dans 50 mL de CH_3CN , auquel on ajoute 10 mL de toluène. La solution est de nouveau concentrée sous pression réduite. On réalise 3 fois successives ce traitement, et on obtient une huile marron. Le produit est précipité par ajout d' Et_2O , qui est ensuite éliminé sous pression réduite. La précipitation n'est pas totale, une partie du produit reste sous forme d'agglomérat dense. Le résidu est donc longuement séché sous pression réduite (dessiccateur), pendant au moins une nuit.

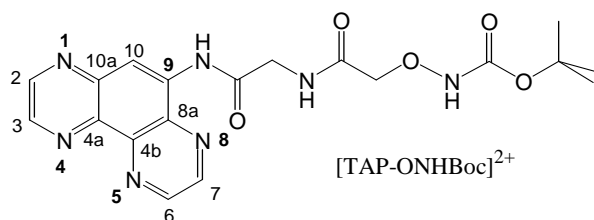
CLHP : $t_R = 4.0$ min. (dilution du prélèvement dans MeOH, système d'analyse **III**₁).

RMN- ^1H (300 MHz, d_6 -DMSO) : δ ppm = 11,11 (1H, s, TAP-NH), 9.34 (1H, d, J = 2 Hz, \underline{H}_6), 9.24 (1H, d, J = 2 Hz, \underline{H}_7), 9.11 (3H, m, \underline{H}_2 - \underline{H}_3 - \underline{H}_{10}), 8.30 (2H, s, \underline{NH}_2), 4.19 (2H, s, $\underline{CH}_2\text{NH}$).

RMN- ^{13}C (300 MHz, d_6 -DMSO) : δ ppm = 166.89 (TAP-NH- \underline{CO}), 147.18 (\underline{C}_2 -H), 146.33 (\underline{C}_6 -H), 145.05 (\underline{C}_7 -H), 144.19 (\underline{C}_3 -H et \underline{C}_9), 140.21 (\underline{C}_{10a}), 137.24 (\underline{C}_{4b} ou $8a$), 136.06 (\underline{C}_{4b} ou $8a$), 135.24 (\underline{C}_{4a}), 116.45 (\underline{C}_{10} -H), 41.68 ($\underline{CH}_2\text{NH}_2$).

SM (EI) : $m/z = 254$ (M^+).

c) 9-((N-(ter-butoxycarbonyl)-O-(carboxyméthyl)hydroxylamine)-glycinamido)-1,4,5,8-tétraazaphénanthrène

**29**

$$M_{\text{théo.}} = 427.41 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$\text{C}_{19} \text{H}_{21} \text{N}_7 \text{O}_5$$

On solubilise, sous argon, le composé **28** (1.6 mmol) dans 17 mL de DMF (0.1 mol.L⁻¹), contenant de la DIEA (3 éq., 5 mmol, 880 µL). On ajoute, après vérification du pH basique, l'ester activé de l'acide *N*-Boc-oxyaminoacétique (1.2 éq., 2,03 mmol, 585 mg). On agite la solution à température ambiante, jusqu'à l'obtention d'une solution limpide (10 minutes environ). On vérifie l'avancement de la réaction par analyse CLHP, puis on concentre le DMF sous pression réduite. L'évaporation n'est pas complète, il reste une petite quantité de DMF (2 mL environ). Le résidu est repris dans 50 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec NaHCO₃ 10 % (30 mL x 3), puis séchée sur Na₂SO₄, et concentrée sous pression réduite. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH : 90/10 + 1% de NH₄OH, v/v). Après concentrations de la solution de **29** récoltée, on obtient une huile marron. Le produit est précipité par EtO₂. Le composé **29** (480 mg, 1.12 mmol) est isolé avec 70 % de rendement (3 étapes, au départ du le 9-amino-1,4,5,8-tétraazaphénanthrène).

CLHP : t_R = 5.3 min. (dilution du prélèvement dans MeOH, système d'analyse III₁).

RMN-¹H (300 MHz, *d*₆-DMSO) : δ ppm = 10.58 (1H, s, ONHBoc), 10.33 (1H, s, TAP-NH), 9.32 (1H, d, J = 2 Hz, H₆), 9.20 (1H, d, J = 2 Hz, H₇), 9.08 (1H, d, J = 2 Hz, H₂), 9.05 (1H, d, J = 2 Hz, H₃), 9.02 (1H, m, H₁₀), 8.61 (1H, t, J = 6 Hz, NHCO), 4.34 (2H, s, CH₂O), 4.27 (2H, d, J = 6 Hz, CH₂NH), 1.40 (9H, s, CH₃-tBu).

RMN-¹³C (300 MHz, *d*₆-DMSO) : δ ppm = 168.81 et 168.76 (NH-CO x2), 156.69 (CO-O), 147.07 (C₂-H), 146.26 (C₆-H), 145.02 (C₇-H), 144.40 (C₉), 143.86 (C₃-H), 140.15 (C_{10a}), 136.99 (C_{4b} ou 8a), 135.83 (C_{4b} ou 8a), 135.16 (C_{4a}), 115.29 (C₁₀-H), 80.56 (C, tBu), 74.50 (CH₂-O), 43.16 (CH₂NH), 27.85 (CH₃, tBu).

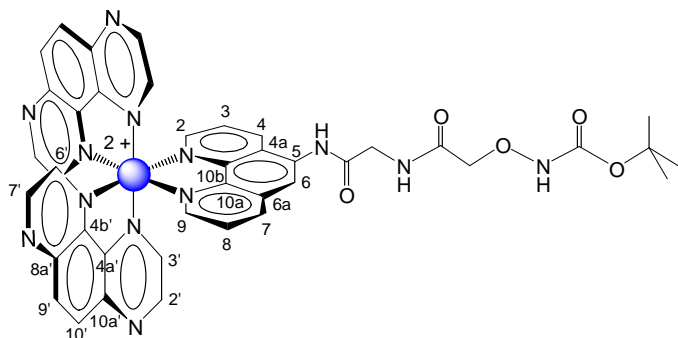
SM (EI) : m/z = 427 (M⁺).

SM (DCI (-) - NH₃/Isobutane) : m/z = 426.7 ([M-H]⁻).

5 - Caractérisation et déprotection des complexes du ruthénium

5.1 - Analyses des complexes $[Ru(TAP)_2L-ONHBoc]^{2+}$

a) $[Ru(TAP)_2Phen-ONHBoc]^{2+}$



30

$M_{\text{théo.}} = 890.87 \text{ g.mole}^{-1}$
 $C_{41} H_{35} N_{13} O_5 Ru$

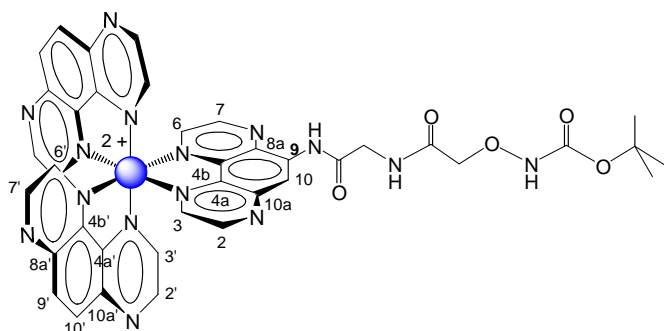
CCM : $R_f = 0,2$ (éluant : $CH_3CN / H_2O / NH_4Cl$ saturée 4/4/1, v/v/v; U.V., $\lambda = 254 \text{ nm}$).

CLHP : $t_R = 6.9 \text{ min.}$ (dilution du prélèvement dans H_2O , système d'analyse **II**₁, détection à $\lambda = 260 \text{ nm}$ et 420 nm) ; $t_R = 4.8 \text{ min.}$ (dilution du prélèvement dans $MeOH$, système d'analyse **III**₁).

RMN-¹H (300 MHz, *d*₆-DMSO) : $\delta \text{ ppm} = 10.71$ (1H, s, ONHBoc), 10.32 (1H, s, Phen-NH), 9.04 (4H, m, 2x $H_{2', 7'}$), 8.99 (1H, d, $J = 8 \text{ Hz}$, H_4), 8.79 (1H, d, $J = 8 \text{ Hz}$, H_7), 8.65 (4H, s, 2x $H_{9', 10'}$), 8.62 (1H, s, H_6), 8.47 (3H, m, 2x H_6 + CH_2NH), 8.30 (1H, d, $J = 5 \text{ Hz}$, H_2), 8.23 (2H, d et d, $J = 3 \text{ Hz}$, 2x H_3), 8.17 (1H, d, $J = 5 \text{ Hz}$, H_9), 7.82 (1H, dd, $J = 8 \text{ Hz}$, $J = 5 \text{ Hz}$, H_3), 7.74 (1H, dd, $J = 8 \text{ Hz}$, $J = 5 \text{ Hz}$, H_8), 4.28 (2H, s, CH_2O), 4.23 (2H, d, $J = 5,5 \text{ Hz}$, CH_2NH), 1.40 (9H, s, tBu).

RMN-¹³C (300 MHz, *d*₆-DMSO) : $\delta \text{ ppm} = 168.96$ et 168.57 (2x NH-CO-CH₂), 156.60 (NH-CO-O), 153.98 (C_2 -H), 152.76 (C_9 -H), 149.59 (2x $C_{2', 7'}$ -H), 149.49 (2x C_6 -H), 148.58 (2x $C_{3'}$ -H), 146.75 (C_{10b}), 144.42 (2x $C_{8a', 10a'}$), 144.13 (C_{10a}), 141.89 (C_{6a}), 141.84 (2x $C_{4a', 4b'}$), 137,32 (C_7 -H), 136.95 (C_{4a}), 133.53 (C_4 -H), 132.30 (2x $C_{9', 10'}$ -H), 130.20 (C_5), 126.42 (C_8 -H), 125.60 (C_3 -H), 119.37 (C_6 -H), 80.47 (C , tBu), 74.54 (CH_2 -O), 42.57 (CH_2 -NH), 27.87 (CH_3 , tBu).

SM -ESI (système d'analyse **IV**₂) : $m/z = 889,0$ ($M^{2+} - H$)⁺ ; 445,4 (M^{2+}) ; 925,9 ($M^{2+} + Cl$)⁺ ; 952,9 ($M^{2+} + NO_3$)⁺ ; 1003,9 ($M^{2+} + TFA$)⁺.

b) $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP-ONHBoc}]^{2+}$ **31**

$$M_{\text{théo.}} = 892.85 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$\text{C}_{39} \text{H}_{33} \text{N}_{15} \text{O}_5 \text{Ru}$$

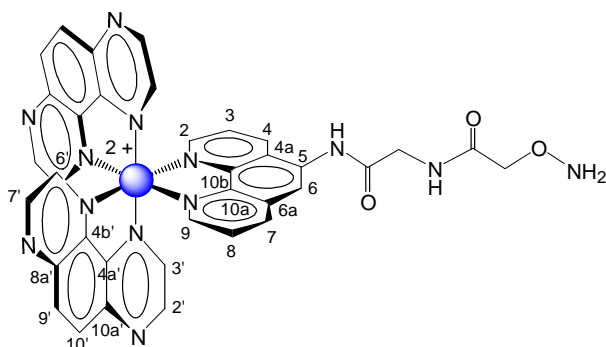
CLHP : $t_R = 6.7$ min. (dilution du prélèvement dans H_2O , système d'analyse **II**₁, détection à $\lambda = 260$ nm et 420 nm) ; $t_R = 7.5$ min. (dilution du prélèvement dans MeOH, système d'analyse **III**₁).

RMN-¹H (300 MHz, d_6 -DMSO) : δ ppm = 10.89 (1H, s, ONHBoc), 10.38 (1H, s, TAP-NH), 9.26 (1H, s, 1H, $\underline{\text{H}}_{10}$), 9.09 (4H, m, $\underline{\text{H}}_{2,2',7,7'}$), 9.04 (1H, d, $J = 3$ Hz, $\underline{\text{H}}_7$), 8.99 (1H, d, $J = 3$ Hz, $\underline{\text{H}}_2$), 8.72 (1H, t, $J = 6$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2\text{NH}$), 8.67 (4H, s, $\underline{\text{H}}_{9,9',10,10'}$), 8.58 (1H, d, $J = 3$ Hz, $\underline{\text{H}}_6$), 8.52 (4H, m, $\underline{\text{H}}_{3,3',6,6'}$), 8.35 (1H, d, $J = 3$ Hz, $\underline{\text{H}}_3$), 4.30 (2H, s, $\underline{\text{CH}}_2\text{O}$), 4.29 (2H, d, $J = 6$ Hz, $\underline{\text{CH}}_2\text{NH}$), 1.41 (9H, s, tBu).

RMN-¹³C (300 MHz, d_6 -DMSO) : δ ppm = 168.84 et 169.33 (2x NH-CO-CH₂), 156.61 (NH-CO-O), 150.23 ($\underline{\text{C}}_2\text{-H}$ ou $\underline{\text{C}}_6\text{-H}$), 150.20 ($\underline{\text{C}}_2\text{-H}$ ou $\underline{\text{C}}_6\text{-H}$), 149.67 (2x $\underline{\text{C}}_{2', 3', 6', 7'\text{-H}}$), 147.86 ($\underline{\text{C}}_7\text{-H}$), 147.43 ($\underline{\text{C}}_3\text{-H}$), 145.22 ($\underline{\text{C}}_9$), 144.38 (2x $\underline{\text{C}}_{8a', 10a'}$), 141.72 ($\underline{\text{C}}_{10a}$), 141.35 (2x $\underline{\text{C}}_{4a', 4b'}$), 137.96 ($\underline{\text{C}}_{4b}$ ou $8a$), 137.36 ($\underline{\text{C}}_{4b}$ ou $8a$), 137.08 ($\underline{\text{C}}_{4a}$), 132.18 (2x $\underline{\text{C}}_{9', 10'\text{-H}}$), 115.39 ($\underline{\text{C}}_{10\text{-H}}$), 80.50 ($\underline{\text{C}}$, tBu), 74.39 ($\underline{\text{CH}}_2\text{O}$), 43.18 ($\underline{\text{CH}}_2\text{NH}$), 27.86 ($\underline{\text{CH}}_3$, tBu).

SM -ESI (système d'analyse **IV**₂) : $m/z = 892,1$ ($\text{M}^{2+}\text{-H}$)⁺ ; 446,6 (M^{2+}) ; 928,1 ($\text{M}^{2+}\text{+Cl}$)⁺ ; 955,1 ($\text{M}^{2+}\text{+NO}_3$)⁺ ; 1006,2 ($\text{M}^{2+}\text{+TFA}$)⁺.

5.2 - Libération des fonctions oxyamines des complexes

a) Préparation du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}''']^{2+}$ **33**

$$M_{\text{théo.}} = 790.76 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$\text{C}_{36} \text{H}_{27} \text{N}_{13} \text{O}_3 \text{Ru}$$

☐ Méthode 1 : TFA/H₂O, 1/1 (v/v)

Le produit **30** (10,7 mg, 11 μmole) est pesé directement dans le ballon de réaction. Le maximum de précautions est utilisé pour éviter les moindres traces de composés carbonylés souillants. Pour cela, le ballon de réaction est en verre, il est lavé plusieurs fois à l'eau distillée avant d'être séché à l'étuve. Le produit **30** est solubilisé par l'ajout successif, d' H_2O (550 μL), de TFA (550 μL), afin d'obtenir une

solution à 10^{-2} mol.L⁻¹. Dans le même principe de précaution vis-à-vis des fonctions carbonyle, les ajouts se font en utilisant des pipettes jaugées en verre, rincées abondamment avec de l'eau millipore, et séchées sous atmosphère ambiante. Les prélèvements se font en une fois, soit à partir d'un bécher contenant de l'eau millipore issue directement de la source, soit à partir d'une bouteille de TFA de qualité HPLC par prélèvement direct. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante. L'avancement de la réaction est vérifié soit par CCM (éluant : CH₃CN / H₂O / NH₄Cl saturée 4/4/1, v/v/v), soit par CLHP (système d'analyse III₁). L'évolution est tout d'abord vérifié après 2 heures de réaction, au bout de 3 heures une seconde analyse confirme l'avancement total. Le solvant est directement éliminé sous pression réduite. Le produit **33**, obtenu avec un rendement quantitatif, est ensuite repris dans de l'eau millipore (200 µL). On obtient une solution orange intense, à partir de laquelle les analyses CLHP, MS-ESI, et la quantification seront faites, avant de la stocker au congélateur sous atmosphère d'argon.

CCM : R_f = 0.1 (éluant : CH₃CN / H₂O / NH₄Cl saturée 4/4/1, v/v/v; révélateur : U.V., λ = 254 nm).

CLHP : t_R = 6.7 min. (dilution du prélèvement dans MeOH, système d'analyse III₁).

SM -ESI de l'oxime d'acétone (système d'analyse IV₂) : m/z = 830,82 calculé pour C₃₉H₃₁N₁₃O₃Ru ; m/z = 944,0 (M²⁺+TFA⁻)⁺ ; 401,4 (M²⁺).

▣ Méthode 2 : TFA/CH₂CL₂, 1/1 (v/v)

Le produit **30** (7 mg, 7,3 µmole) est pesé directement dans le ballon de réaction. Le maximum de précautions est utilisé pour éviter les moindres traces de composés carbonylés souillants. Pour cela, le ballon de réaction est en verre, il est lavé plusieurs fois à l'eau distillée avant d'être séché à l'étuve. Le produit **30** est solubilisé par l'ajout successif, de CH₂Cl₂ anhydre (175 µL), de triisopropylsilane (18 µL, soit 5 %), de TFA (175 µL), afin d'obtenir une solution à 0,02 mol.L⁻¹. Dans le même principe de précaution vis-à-vis des fonctions carbonyle, les ajouts se font en utilisant, soit une seringue sous atmosphère d'argon pour le dichlorométhane, soit une pipette jaugée en verre, rincées abondamment avec de l'eau millipore et séchées sous atmosphère ambiante pour le TFA. Ils se font par prélèvement direct dans les bouteilles de réactifs. Le milieu réactionnel est ensuite agité à température ambiante. L'avancement de la réaction est vérifié par CLHP (système d'analyse III₁) à différents temps de réaction, soit au bout de 2 minutes, puis 30 minutes, 2 heures, 3 heures et enfin 5 heures où l'avancement est total. Le solvant est directement éliminé sous pression réduite. Le produit **33**, obtenu avec un rendement quantitatif, est ensuite repris dans de l'eau millipore (150 µL ; 0,05 mol.L⁻¹). On obtient une solution orange intense, à partir de laquelle les analyses CLHP, MS-ESI, et la quantification seront faites, avant de la stocker au congélateur sous atmosphère d'argon.

CLHP : t_R = 5.5 min. (dilution du prélèvement dans MeOH, système d'analyse III₁).

SM -ESI (système d'analyse IV₂) : m/z = 904,0 (M²⁺+TFA⁻)⁺ ; 395,5 (M²⁺).

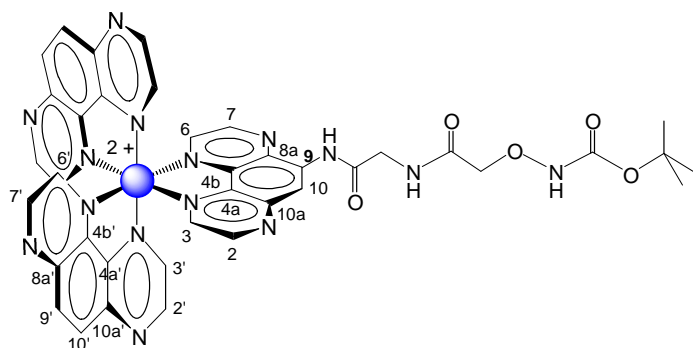
☐ Méthode 3 : HCl 1N

Le produit **30** (8 mg, 8,3 μmole) est pesé directement dans le ballon de réaction. Le maximum de précautions est utilisé pour éviter les moindres traces de composés carbonylés souillants. Pour cela, le ballon de réaction est en verre, il est lavé plusieurs fois à l'eau distillée avant d'être séché à l'étuve. Le produit **30** est solubilisé dans HCl 1N (415 μL ; 0,02 mol.L^{-1}). Dans le même principe de précaution vis-à-vis des fonctions carbonyle, l'ajout se fait en utilisant une pipette jaugée en verre, rincées abondamment avec de l'eau millipore et séchées sous atmosphère ambiante, à partir d'une solution mère d'HCl 1N (10 mL) stockée dans une bouteille à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite agité à température ambiante. L'avancement de la réaction est vérifié par CLHP (système d'analyse **III**₁) à différents temps de réaction, soit au bout de 2 minutes, puis 2 heures, 4 heures et enfin 6 heures où l'avancement est total. Le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu est ensuite repris dans H₂O (1 mL), la quantité de produit brute est estimée précisément par quantification U.V. à partir de cette solution (7,06 μmole). Cette mesure permet de s'affranchir de l'erreur de pesée (15 %). Le mélange brut est purifié par CLHP semi-préparative (système d'analyse **II**₃). Après lyophilisation, le produit **33** est repris dans de l'eau millipore (50 μL). On obtient une solution orange intense à partir de laquelle les analyses CLHP, MS-ESI, et la quantification seront faites, avant de la stocker au congélateur sous atmosphère d'argon. Le produit **33** est obtenu avec un rendement 58 % (4,05 μmole).

CLHP : $t_R = 4.6$ min. (dilution du prélèvement dans H₂O, système d'analyse **II**₁).

SM -ESI (système d'analyse **IV**₂) : $m/z = 790,0$ ($\text{M}^{2+} - \text{H}$)⁺ ; 395,5 (M^{2+}) ; 826,0 ($\text{M}^{2+} + \text{Cl}$)⁺ ; 904,0 ($\text{M}^{2+} + \text{TFA}$)⁺.

b) Préparation du complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP-ONH}_2]^{2+}$



38

$M_{\text{théo.}} = 792.73 \text{ g.mole}^{-1}$
 $\text{C}_{34} \text{H}_{25} \text{N}_{15} \text{O}_3 \text{Ru}$

☐ Méthode 3 : HCl 1N

Le produit **31** (9,9 mg, 10,2 μmole) est pesé directement dans le ballon de réaction. Le maximum de précautions est utilisé pour éviter les moindres traces de composés carbonylés souillants. Pour cela, le

ballon de réaction est en verre, il est lavé plusieurs fois à l'eau distillée avant d'être séché à l'étuve. Le produit **31** est solubilisé dans HCl 1N (515 μL ; $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$). Dans le même principe de précaution vis-à-vis des fonctions carbonyle, l'ajout se fait en utilisant une pipette jaugée en verre, rincées abondamment avec de l'eau millipore et séchées sous atmosphère ambiante, à partir d'une solution mère d'HCl 1N (10 mL) stockée dans une bouteille à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite agité à température ambiante. L'avancement de la réaction est vérifié par CLHP (système d'analyse **III**₁) à différents temps de réaction, soit au bout de 2 heures, puis 5 heures et enfin 6 heures où l'avancement est total. Le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu est ensuite repris dans H₂O (1 mL), la quantité de produit brute est estimée précisément par quantification U.V. à partir de cette solution (9,57 μmole). Cette mesure permet de s'affranchir de l'erreur de pesée (6 %). Le mélange brut est purifié par CLHP semi-préparative (système d'analyse **II**₃). Après lyophilisation, le produit **38** est repris dans de l'eau millipore (50 μL). On obtient une solution orange très intense à partir de laquelle les analyses CLHP, MS-ESI, et la quantification seront faites, avant de la stocker au congélateur sous atmosphère d'argon. Le produit **38** est obtenu avec un rendement 50 % (4,72 μmole).

CLHP : $t_R = 3.6 \text{ min.}$ (dilution du prélèvement dans H₂O, système d'analyse **II**₁).

SM-ESI (système d'analyse **IV**₂) : $m/z = 791,9 (M^{2+}-H)^+$; $396,4 (M^{2+})$; $905,8 (M^{2+}+TFA)^+$.

6 - Préparation des conjugués

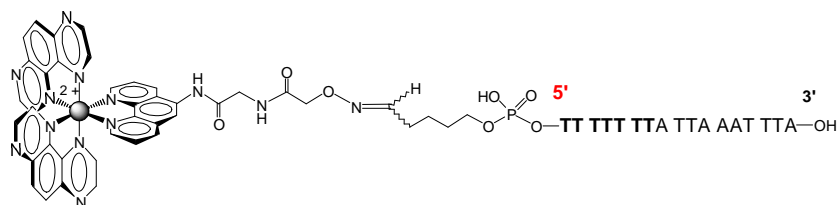
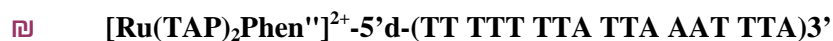
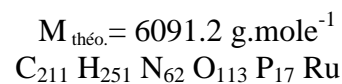
6.1 - Conjugués "complexe de Ru(II)- oligonucléotide"

Les différents conjugués sont généralement préparés à partir du protocole suivant :

L'oligonucléotide est solubilisé le tampon acétate de sodium 0.4 mole.L^{-1} et à pH 4.5. On ajoute le complexe de ruthénium(II) (2 éq) afin d'obtenir une concentration finale de $5 \cdot 10^{-3} \text{ mole.L}^{-1}$. Après 17 heures de réaction à température ambiante, le mélange réactionnel est purifié par gel d'électrophorèse polyacrylamide préparatif (*cf. partie 2.6, protocole G*₂). Le conjugué est obtenu, après traitement, avec un rendement global comprenant les étapes de couplage, de purification, et de déssalage.

Ce protocole n'est pas utilisé pour synthétiser le conjugué **47**.

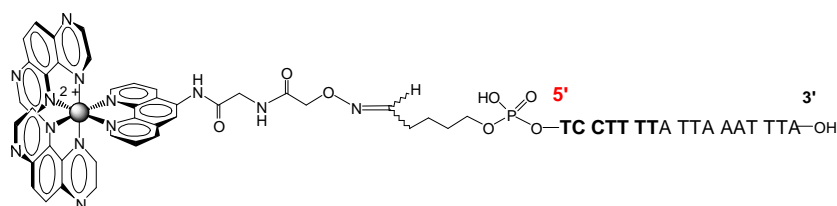
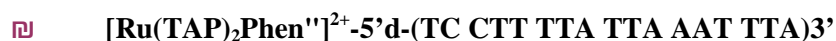
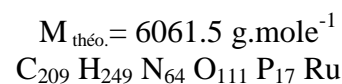
a) Couplage du complexes $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}'']^{2+}$ **33** à l'extrémité 5' d'oligonucléotides

**39**

On utilise la solution de complexe [Ru(TAP)₂Phen"']²⁺ **33** de stockage (2.74 μmole, 50 μL).

L'oligonucléotide **7** (267 nmole) est solubilisé dans le tampon (21 μL), on ajoute ensuite le complexe [Ru(TAP)₂Phen"']²⁺ **33** (2 éq., 534 nmole, 10 μL de la solution). Le conjugué **39** est obtenu avec un rendement global de 36 % (95 nmole, dont 83 % pour l'étape de déssalage).

SM – (Maldi-Tof) : m/z = 6090.4 (M-H)⁻.

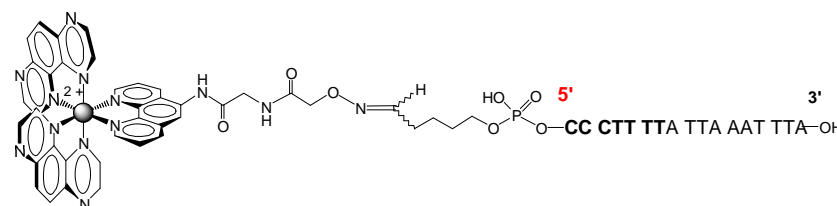
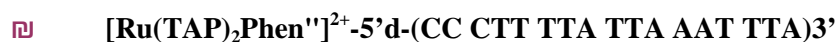
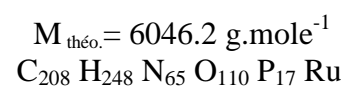
**40**

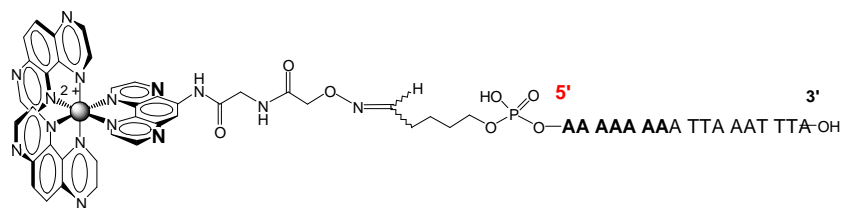
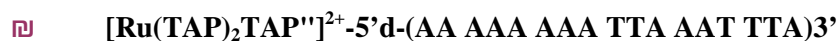
On utilise la solution de complexe [Ru(TAP)₂Phen"']²⁺ **33** de stockage (2.47 μmole, 50 μL).

L'oligonucléotide **8** (358 nmole) est solubilisé dans le tampon (56 μL), on ajoute ensuite le complexe [Ru(TAP)₂Phen"']²⁺ **33** (2 éq., 716 nmole, 15 μL de la solution). Le conjugué **40** est obtenu avec un rendement global de 49 % (173 nmole, dont 86 % pour l'étape de déssalage).

SM – (Maldi-Tof) : m/z = 6062.7 (M-H)⁻.

SM –ESI : m/z = 6058.6 (M-H)⁻.

**41**

**44**

$$M_{\text{théo.}} = 6156.4 \text{ g.mole}^{-1}$$

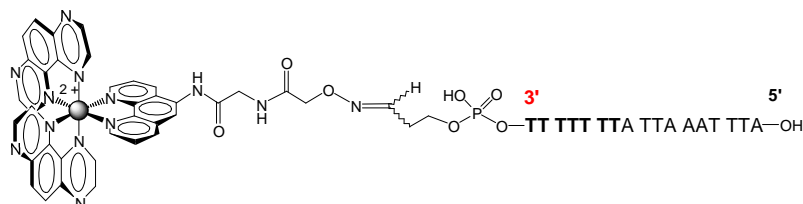
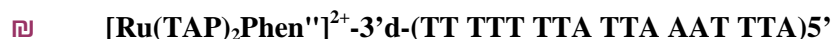
$$C_{209} H_{242} N_{85} O_{99} P_{17} Ru$$

On utilise la solution de complexe $[Ru(TAP)_2TAP'']^{2+}$ **38** de stockage (2.26 μmole , 50 μL).

L'oligonucléotide **10** (34 nmole) est solubilisé dans le tampon (11 μL), on ajoute ensuite le complexe $[Ru(TAP)_2TAP'']^{2+}$ **38** (2 éq., 68 nmole, 1.5 μL de la solution). Le conjugué **44** est obtenu avec un rendement global de 36 % (12 nmole).

SM – (Maldi-Tof) : en cours d'analyse.

c) Conjugaison du complexes $[Ru(TAP)_2Phen'']^{2+}$ **33** à l'extrémité 3' d'oligonucléotides

**45**

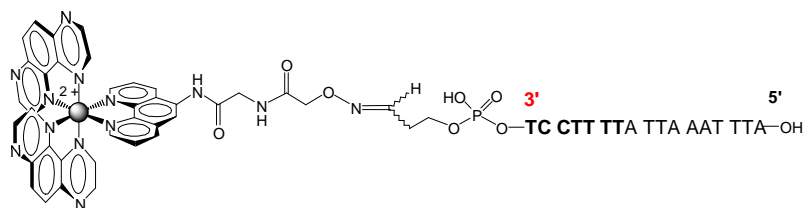
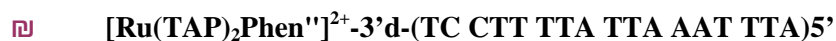
$$M_{\text{théo.}} = 6049.1 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$C_{208} H_{245} N_{62} O_{113} P_{17} Ru$$

On utilise la solution de complexe $[Ru(TAP)_2Phen'']^{2+}$ **33** de stockage (4.88 μmole , 80 μL).

L'oligonucléotide **14** (340 nmole) est solubilisé dans le tampon (57 μL), on ajoute ensuite le complexe $[Ru(TAP)_2TAP'']^{2+}$ **33** (2 éq., 680 nmole, 11 μL de la solution). On laisse la réaction 20 heures à température ambiante, avant d'appliquer la suite du protocole classique. Le conjugué **45** est obtenu avec un rendement global de 25% (82 nmole). Dans ce cas, le gel d'électrophorèse polyacrylamide préparatif met en évidence le sous-produit en position haute (5%, 15 nmole). Le rendement comprend les étapes de couplage, de purification et de déssalage (69%, et 72% dans le cas du sous-produit).

SM – (Maldi-Tof) : m/z = 6049.3 (M-H)⁻.

**46**

$$M_{\text{théo.}} = 6019.2 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$\text{C}_{206} \text{H}_{243} \text{N}_{64} \text{O}_{111} \text{P}_{17} \text{Ru}$$

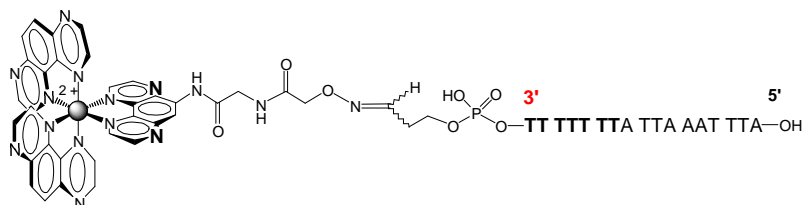
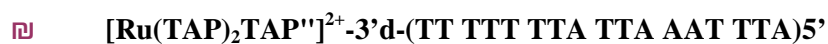
On utilise la solution de complexe [Ru(TAP)₂Phen'']²⁺ **33** de stockage (1.44 μmole, 22 μL).

L'oligonucléotide **15** (309 nmole) est solubilisé dans le tampon (52 μL), on ajoute ensuite le complexe [Ru(TAP)₂Phen'']²⁺ **33** (2.1 éq., 648 nmole, 10 μL de la solution). Le conjugué **46** est obtenu avec un rendement global de 47 % (145 nmole).

SM – (Maldi-Tof) : m/z = 6019.7 (M-H)⁻.

SM –ESI : m/z = 6017.7 (M-H)⁻.

d) Conjugaison du complexes [Ru(TAP)₂TAP'']²⁺ **38** à l'extrémité 3' d'oligonucléotides

**47**

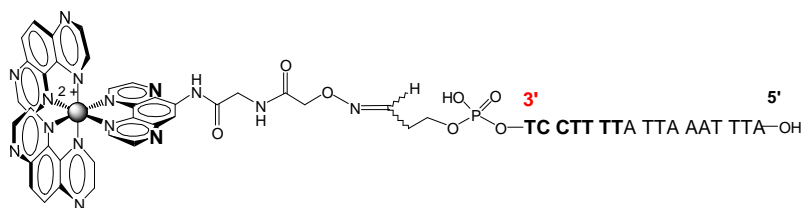
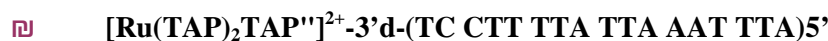
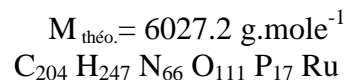
$$M_{\text{théo.}} = 6051.3 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$\text{C}_{206} \text{H}_{243} \text{N}_{64} \text{O}_{113} \text{P}_{17} \text{Ru}$$

On utilise la solution de complexe [Ru(TAP)₂TAP'']²⁺ **38** de stockage (10 μmole, 775 μL).

L'oligonucléotide **14** (92 nmole) est solubilisé dans le tampon acétate de sodium 0.4 mole.L⁻¹ et à pH 4.5 (52 μL). On ajoute le complexe [Ru(TAP)₂TAP'']²⁺ **38** (3 éq., 276 nmole, 21 μL de la solution), on a une concentration de 4.5 .10⁻³ mole.L⁻¹. L'avancé de la réaction est suivi par CLHP. Après 24h de réaction, on ajoute du complexe [Ru(TAP)₂Phen''] **38** (3 éq., 276 nmole, 21 μL de la solution). On recommence cet ajout à 24 heures de réaction. Après 26 heures de réaction à température ambiante, le mélange réactionnel est purifié par CLHP en phase inverse (système I₃). Le conjugué **47** est obtenu, après lyophilisation, avec un rendement global de 7% (6 nmole).

SM – (Maldi-Tof) : m/z = 6051.6 (M-H)⁻.

**48**

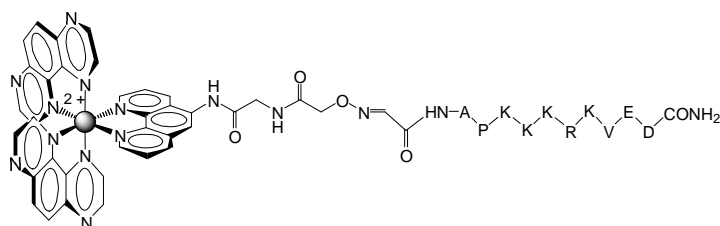
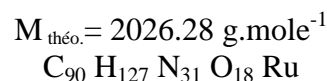
On utilise la solution de complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}'']^{2+}$ **38** de stockage (3.1 μmole , 43 μL).

L'oligonucléotide **15** (343 nmole) est solubilisé dans le tampon (58 μL), on ajoute ensuite le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{TAP}'']^{2+}$ **38** (2.1 éq., 720 nmole, 10 μL de la solution). Le conjugué **48** est obtenu avec un rendement global de 59 % (201 nmole).

SM – (Maldi-Tof) : $m/z = 6027.5$ (M-H)⁻.

6.2 - Préparation des conjugués ruthénium - peptide

a) Synthèse du conjugué $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}'']^{2+}$ -NLS

**49**

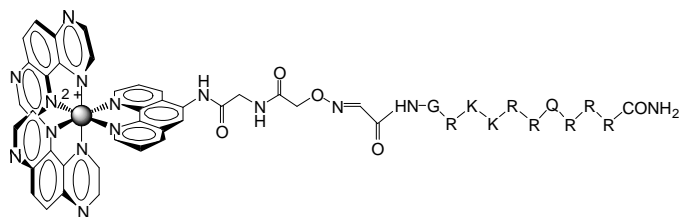
On utilise la solution de complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}'']^{2+}$ **33** de stockage (5.2 μmole , 320 μL).

Le peptide **17** (1 mg, 549 nmole) est solubilisé dans le tampon acétate de sodium 0.4 mole.L⁻¹ et à pH 4.5 (450 μL). On ajoute Le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}'']^{2+}$ **33** (2 éq., 1.1 nmole, 68 μL de la solution). La réaction est suivie par CLHP en phase inverse (système **II**₂, 5-100% B en 30 minutes, $\lambda=214$ nm et 420 nm). Au bout de 3 heures de réaction, on ajoute 1 équivalent de complexe **33** (549 μmole , 34 μL de la solution). Après 24 heures de réaction à température ambiante, le conjugué **49** est purifié par CLHP semi-préparative en phase inverse (système **III**₂, 5-100% B en 30 minutes, $\lambda=214$ nm et 420 nm), et lyophilisé. Le produit **49** est obtenu avec un rendement de 45% ($m=0.5$ g, 247 nmoles).

CLHP : $t_R = 21.2$ min. (H_2O , système **II**₂, 5-40% B en 30 minutes, $\lambda=214$ nm et 420 nm).

SM –ESI : $m/z = 2023.4$ (M+H)⁺ ($\text{H}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{CN}$, 1/1, v/v ; système d'analyse **IV**₂).

b) Synthèse du conjugué [Ru(TAP)₂Phen"']²⁺-Tat

**50**

$$M_{\text{théo.}} = 2224.52 \text{ g.mole}^{-1}$$

$$\text{C}_{93} \text{H}_{135} \text{N}_{45} \text{O}_{15} \text{Ru}$$

On prépare séparément deux solutions de réactifs dans l'eau. Le peptide **19** (17.1 mg, 7.26 μmole) est solubilisé dans l'eau (85 μL), afin de préparer une solution de peptide à 0.85 mole.L^{-1} . Le complexe [Ru(TAP)₂Phen"']²⁺ **33** (453 nmole) est solubilisé dans l'eau (10.5 μL), afin de préparer une solution de complexe à 0.04 mole.L^{-1} .

Le complexe [Ru(TAP)₂Phen"']²⁺ **33** (425 nmole, 10 μL de la solution) est ensuite mis en solution dans le tampon acétate de sodium 0.4 mole.L^{-1} et à pH 4.5 (23 μL). On ajoute le peptide **19** (425 nmole, 5 μL de la solution), on a une concentration finale de 10⁻² mole.L^{-1} . La réaction est suivie par CLHP en phase inverse (système **II**₁, 5-40% B en 15 minutes, $\lambda=214$ nm et 420 nm). Après 17 heures de réaction à température ambiante, le conjugué **50** est directement purifié par CLHP semi-préparative en phase inverse (système **III**₂, 5-40% B en 30 minutes, $\lambda=214$ nm et 420 nm). Le produit récupéré est ensuite lyophilisé, repris dans de l'eau. La solution est quantifiée par absorption U.V, à partir de l'absorbance de la solution à 412 nm ($\epsilon([\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}'''])_{412\text{nm}} = 16500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Le produit **50** est obtenu avec un rendement de 43% (179 nmoles).

CLHP : $t_R = 8.4$ min. (H₂O, système **II**₁, 5-40% B en 15 minutes, $\lambda=214$ nm et 420 nm).

SM –ESI : $m/z = 2223.3$ (M+H)⁺ (H₂O / CH₃CN, 1/1, v/v ; système d'analyse **IV**₂).

6.3 - Spectroscopie d'absorption

Les spectres d'absorption sont enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda UV-vis. Cet appareillage est utilisé pour déterminer les spectres d'absorption nécessaires pour les quantifications des produits, et pour les expériences de mise en évidence du photo-adduit sous illumination.

6.4 - Spectroscopie d'émission

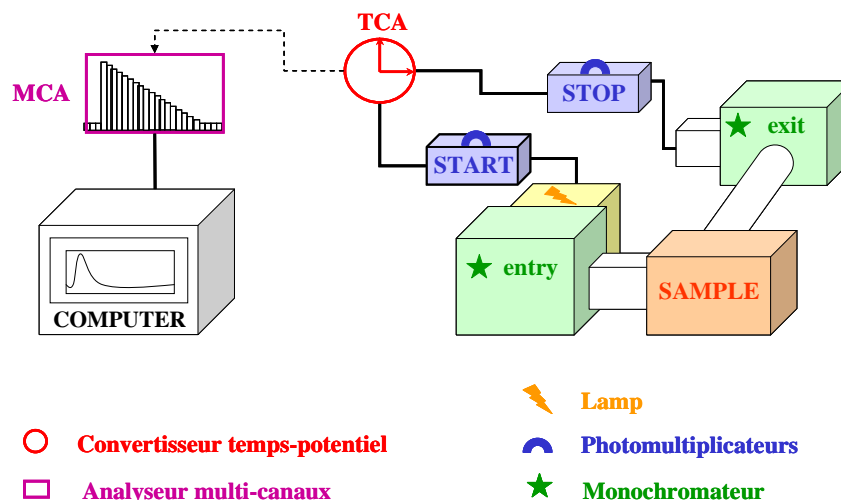
a) Spectres d'émission stationnaire

Les spectres d'émission ont été enregistrés sur un spectromètre Shimadzu RF-501 PC équipé d'un tube photomultiplicateur Hamamatsu R-928 avec comme source excitatrice une lampe au xénon de 250 W. Les spectres d'émission ont été corrigés en fonction de la réponse du phototube en utilisant une

fonction de correction pour pallier à la réponse non linéaire que fournit le système de détection en fonction de la longueur d'onde.

b) Spectres d'émission résolue dans le temps

Les durées de vie en émission ont été mesurées par la technique de TCSPC ("Time Correlated Single photon counting") avec un spectrofluoromètre FL-900 de Edinburgh Instruments (cf. figure ci-dessous).



Schématisation du système de TCSPC. (Lamp) Lampe à arc remplie de N_2 , (sample) compartiment accueillant l'échantillon, (4) filtre UV, (5) monochromateur.

La source excitatrice est une lampe à arc pulsée qui provoque l'émission d'un gaz (N_2) sous basse pression (environ 0,4 bars). Les deux électrodes de tungstène sont écartées l'une de l'autre de 1.3 mm. Les arcs électriques entre les deux électrodes sont caractérisés par une tension comprise entre 5,0 et 5,5 kV ainsi qu'une fréquence de 30 kHz. Le début de la mesure est signalé par un photomultiplicateur "START" qui déclenche le TAC ("Time to Amplitude Converter"). La lumière excitatrice passe au travers d'un monochromateur qui permet de sélectionner une longueur d'onde à laquelle l'émission du diazote est intense (379 nm). Le faisceau monochromatique excite l'échantillon thermo staté à 25 °C par un circuit d'eau externe, et la luminescence émise à 90° par rapport au faisceau exciteur est focalisée vers le monochromateur de sortie. Elle est ensuite détectée par un photomultiplicateur (Hamamatsu R955) refroidi à -33 °C. Et la fin de la mesure est signalée par le photomultiplicateur "STOP". Les données digitalisées sont transférées dans un MCA (Multi Channel Analyser) où elles vont être traitées par un ajustement de courbe exponentielle. Un total de 10^4 coups est collecté dans le canal de pic pour construire l'historgramme du nombre de photons observés en fonction du temps. Les profils d'émission sont analysés avec le logiciel de Edinburgh Instruments (version 3.0) en déconvoluant la réponse propre à la lampe. Pour l'ajustement des valeurs expérimentales, un ordre

croissant de la fonction exponentielle est utilisé jusqu'à obtenir une concordance statistique acceptable, laquelle est évaluée par le test du χ^2 (valeur proche de 1).

Contrairement aux complexes libres, les décroissances de luminescence des conjugués ne sont pas mono-exponentielles, elles doivent donc être analysées par une fonction multi-exponentielle de type :

$$I_{em}(t) = \sum \alpha_i \exp(-t/\tau_i)$$

$I_{em}(t)$ correspond à la décroissance de l'émission au cours du temps.

α_i est le facteur préexponentiel de la durée de vie τ_i .

Les facteurs préexponentiels normalisés sont calculés à partir de l'équation : $A_i = \alpha_i / \sum \alpha_i$. Ils reflètent les contributions des différents composants de durée de vie τ_i à la décroissance de luminescence.

Les durées de vie pondérées par les facteurs préexponentiels ont été calculées à partir de la relation :

$$\tau_m = \sum A_i \tau_i / \sum A_i.$$

6.5 - Expériences d'illumination

a) Système d'illumination continue

Elles sont réalisées dans des cellules en quartz éclairées avec de la lumière visible ($\lambda > 400$ nm) provenant de deux lampes perpendiculaires l'une à l'autre. La première source est une lampe halogène de 2000 W (Philips) et la seconde une lampe au mercure (Osram HBO) de 200 W. Des filtres à eau sont utilisés pour absorber les radiations IR et une solution de NaNO_2 0.2 M filtre les rayonnements UV. Les faisceaux sont focalisés sur la cellule contenant l'échantillon à l'aide de lentilles convergentes. Et de miroirs placés derrière la cellule réfléchissent la lumière transmise par l'échantillon afin de maximiser le rayonnement traversant la cellule.

b) Système de formation du photoadduit

Les mélanges sont illuminés avec une lampe mercure/xénon (Oriol 200 W). Les longueurs d'onde inférieures à 320 nm sont coupées par un filtre KNO_3 2M. L'échantillon est placé dans un eppendorf, refroidi par un circuit d'eau glacée externe. Le volume dans le tube ne peut pas excéder 150 μL , car il est placé horizontalement dans le système d'analyse.

Procédure d'illumination des oligonucléotides radiomarqués :

On illumine une solution d'oligonucléotide marqué (1 $\mu\text{mol/L}$) entre 0 et 1 h. On réalise 4 ou 7 prélèvements de 2 pmol (2 μL) à différents temps d'illumination : 0, 5, 20 minutes et 1h, (ou à 0, 5, 10, 15, 20, 30 minutes et 1h). Une partie des échantillons (1 pmol) est analysé par électrophorèse PAGE (protocole **G₁**), le reste est conservé à -18°C , le temps que la période du ^{32}P permette une nouvelle analyse éventuelle.

Bibliographie

Introduction

- 1- (a) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
(b) Wilkins, M. H. F.; Randall, J. T. Crystallinity in sperm heads : molecular structure of nucleoprotein in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1953**, *10*, 192-193.
(c) Franklin, R. E.; Gosling, R. G. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* **1953**, *171*, 740-741.
- 2- Mishina, Y.; Duguid, E. M.; He, C. Direct Reversal of DNA Alkylation Damage. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 215-232.
- 3- J. J. Champoux. DNA Topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, *70*, 369-413.
- 4- Galm, U.; Hager, M. H.; Van Lanen, S. G.; Ju, J.; Thorson, J. S.; Shen, B. Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Eneidyne, and Mitomycin. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 739-758.
- 5- Stockel, G.; Wanat, A.; Kulis, E.; Stasicka, Z. Light and metal complexes in medicine. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *171*, 203-220.
- 6- Pfeifer, G. P. Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 270-283.
- 7- Szacilowski, K.; Macyk, W.; Drzewiecka-Matuszek, A.; Brindell, M.; Stochel, G. Bioinorganic Photochemistry : Frontiers and mechanisms. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2647-2694.
- 8- Burrows, C. J.; Muller, J. G. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1151.
- 9- Shields, T. P.; Barton, J. K. Sequence-Selective DNA Recognition and Photocleavage: A Comparison of Enantiomers of Rh(en)₂phi³⁺ *Biochemistry* **1995**, *34*, 15037.
- 10- Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A. New DNA-binding ruthenium(II) complexes as photoreagents for mononucleotides and DNA. *J. Phys. Org. Chem.* **1998**, *11*, 577-583.
- 11- Zhang, C. X.; Lippard, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr. Opinion Chem. Biol.* **2003**, *7*, 481-489.
- 12- Dunham, S. U. D.; Chifotides, H. T.; Mikulski, S.; Burr, A. E.; Dunbar, K. R. Covalent binding and interstrand cross-linking of duplex DNA by dirhodium(II,II) carboxylate compounds. *Biochemistry* **2005**, *44*, 996-1003.
- 13- Novakova, O.; Chen, H.; Vrana, O.; Rodger, A.; Sadler, P. J.; Brabec, V. DNA interaction of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11544-11554.
- 14- Demas, J. N.; degraft, B. A. Design and applications of highly luminescent transition metal complexes. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 829-837.
- 15- Meyer, T. J. Photochemistry of metal coordination complexes : metal to ligand charge transfer excited state. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 1193-1206.
- 16- Damrauer, N. H.; Cerullo, G.; Yeh, A.; Boussie, T. R.; Shank, C. V., McCusker, J. K. Femtosecond dynamics of excited state evolution in [Ru(bpy)₃]²⁺. *Science* **1997**, *275*, 54-57.
- 17- Masschelein, A.; Jacquet, L.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Nasielski, J. Ruthenium complexes with 1,4,5,8-tetraazaphenanthrene. unusual photophysical behavior of the Tris-Homoleptic compound. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 855-860.

- 18- Clarke, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 69-93.
- 19- (a) Lincoln, P.; Broo, B.; Norden, B. Diastereomeric DNA-binding geometries of intercalated ruthenium(II)tris-chelates probed by linear dichroism : $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{bdppz}]^{2+}$. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2644-2653.
(b) Holmlin, R. E.; Stemp, E. D. A.; Barton, J. K. $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ luminescence : dependance on DNA sequences and groove-binding agents. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 29-34.
- 20- (a) Tossi, A. B.; Kelly, J. M. A study of some polypyridyl ruthenium(II) complexes as DNA binders and photocleavage reagents, *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 545-556.
(b) Pyle, A. M.; Chiang, M. Y.; Barton, J. K. Synthesis and characterization of physical, electronic, and photochemical aspects of 9,10-phenanthrenequinone diimine complexes of Ru(II) and Rh(III), *Inorg. Chem.* **1990**, *29* 4487-4495.
(c) Chow, C. S.; Barton, J. K. Shape-selective cleavage of tRNA^{Phe} by transition-metal complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2839-2841
- 21- Kelly, J. M., Tossi, A. B.; McConnell, D. J., OhUigin, C. A study of the interactions of some polypyridyl Ru(II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 6017-6034.
- 22- Feeney, M. M.; Kelly, J. M.; Tossi, A. B. Photoaddition of ruthenium(II)-tris-1, 4, 5, 8-tetraazaphenanthrene to DNA and mononucleotides. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* **1994**, *23*, 69-78.
- 23- Jacquet, L.; Kelly, J. M., Kirsch-De Mesmaeker, A. Photoadduct between Tris(1,4,5,8-tetraazaphenanthrene)ruthenium(II) and guanosine monophosphate. A model for a new mode of covalent binding of metal complexes to DNA. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 913-914.
- 24- Blasius, R.; Nierengarten, H; Luhmer, M.; Constant, J.-F.; Defrancq, E.; Dumy, P. ; Van Dorsselaer, A.; Moucheron, M.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Photoreaction of $[\text{Ru}(\text{phen})_2]^{2+}$ with guanosine-5'-monophosphate and DNA: Formation of new types of photoadducts. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1507 - 1517
- 25- Pauly, M.; Kayser, I.; Schmitz, M.; Dicato, M.; Del Guerzo, A.; Kolber, I.; Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A. *In vitro* inhibition of gene transcription by novel photo-activated polyaaromatic ruthenium(II) complexes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **2002**, 1086-1087.
- 26- Wu H.; Lima WF.; Zhang H.; Fan A.; Sun H.; Croke ST. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17, 181-9.
- 27- Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modification. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-44.
- 28- Winquist, E.; Knox J.; Ayoub, J.-P.; Wood, L.; Wainman, N.; Reid, G.; Pearce, L.; Shah, A.; Eisenhauer, E. Phase II trial of DNA methyltransferase 1 inhibition with the antisense oligonucleotide MG98 in patients with metastatic renal carcinoma: A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials group investigational new drug study. *Invest New Drugs* **2006**, *24*, 159-167.
- 29- Ding, Y.; Chan, C. Y.; Lawrence, C. E. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acid. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W135-W141.
- 30- Opalinska, J. B.; Gewirtz, A. M. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 503-514.
- 31- Kurreck, J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-1644.
- 32- Wong, F. W. S.; Lim, S.; Chan, J. H. P. Antisense oligonucleotides : from design to therapeutic application. *Clin. exp. Pharm. Phys.* **2006**, *33*, 533-540.
- 33- Stein, C. A. Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: questions of specificity, *Biotechnol.* **1996**, *14*, 47-149.

- 34- Shiraishi, T.; Peter E. Nielsen, P. E. Down-regulation of MDM2 and activation of p53 in human cancer cells by antisense 9-aminoacridine-PNA (peptide nucleic acid) conjugates. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 4893–4902.
- 35- Da Ros, T.; Spalluto, G.; Prato, M.; Saison-Behmoaras, T.; Bourtoune, A.; Cacciari, B. Oligonucleotide and oligonucleotide conjugates : a new approach for cancer treatment. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 71-88.
- 36- Letsinger, R. L.; and Chaturvedi, S. Tailored hydrophobic cavities in oligonucleotide-steroid conjugates. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 826-830.
- 37- Maier, M. A.; Yannopoulos, C. G.; Mohamed, N.; Roland, A.; Fritz, H.; Mohan, V.; Just, G.; Manoharan, M. Synthesis of antisense oligonucleotides conjugated to a multivalent carbohydrate cluster for cellular targeting. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 18-29.
- 37- Matsuura, K.; Akasada, T., Hibino, M.; Kobayashi, K. Facile synthesis of stable and lectin – recognizable DNA-carbohydrate conjugates via diazo coupling. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 202-211.
- 39- Tung, C.-H.; Stein, S. Preparation and applications of Peptide-Oligonucleotide Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 605-618.
- 40- Astriab-Fisher, A.; Sergueev, D.; Fisher, M.; Shaw, B. R.; Juliano, R. L. Conjugates of Antisense Oligonucleotides with the Tat and Antennapedia Cell-Penetrating Peptides: Effects on Cellular Uptake, Binding to Target Sequences, and Biologic Actions. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 744-754.
- 41- Chen, C. B.; Milne, L.; Landgraf, R.; Perrin, D. M.; Sigman, D. S. Artificial nucleases. *ChemBiochem.* **2001**, *2*, 735-740.
- 42- Amosova, O.; Broitman, S. L.; Fresco, J. R. Repairing the Sickle Cell mutation. II. Effect of psoralen linker length on specificity of formation and yield of third strand-directed photoproducts with the mutant target sequence. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 4673-4681.
- 43- Kang, H.; Steven E. Rokita, S. E. Site-specific and photo-induced alkylation of DNA by a dimethylantraquinone–oligodeoxynucleotide conjugate. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3896–3902.
- 44- Huh, N.; Rege, A. A.; Yoo, B.; Kogan, T. P.; Kohn, H. Design, synthesis, and evaluation of Mitomycin-tethered phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 659-669.
- 45- Lukhtanov, E. A.; Podyminogin, M. A.; Kutuyavin, I. V.; Meyer, R. B.; Gamper H. B. Rapid and efficient hybridization-triggered crosslinking within a DNA duplex by an oligodeoxyribonucleotide bearing a conjugated cyclopropapyrroloindole. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 683-687.
- 46- Boudvillain, M.; Guérin, M.; Dalbiès, R.; Saison-Behmoaras, T.; Leng, M. Transplatin-modified oligo(2'-O-methyl ribonucleotide)s: A new tool for selective modulation of gene expression. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2925-2931.
- 47- Lentzen, O.; Constant, J.-F.; Defrancq, E.; Prevost, M.; Schumm, S.; Moucheron, C.; Dumy, P.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Photocrosslinking in Ruthenium-Labelled Duplex Oligonucleotides. *ChemBioChem.* **2003**, *4*, 195 - 202.
- 48- Lentzen, O.; Defrancq, E.; Constant, J.-F.; Schumm, S.; Garcia-Fresnadillo, D.; moucheron, C.; Dumy, P.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Determination of DNA guanine sites forming photo-adducts with Ru(II)-labelled oligonucleotides ; DNA polymerase inhibition by the resulting photo-crosslinking. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 100-108.
- 49- Ossipov, D.; Pradeepkumar, P. L.; Holmer, M.; Chattopadhyaya, J. Synthesis of [Ru(phen)₂dppz]²⁺-tethered oligo-DNA and studies on the metallointercalation mode into the DNA duplex. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3551-3562.

- 50- (a) Holmlin, R. E.; Dandliker, P. J.; Barton, J. K. Synthesis of metallointercalator-DNA conjugates on a solid support. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1122-1130.
(b) Williams, T. T.; Dohno, C.; Stemp, E. D. A.; Barton, J. K. Effects of the photooxidant on DNA-mediated charge transport. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8148-8158.
- 51- Verheijen, J. C.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Metzler-Nolte, N. Transition metal derivatives of Peptide Nucleic Acid (PNA) oligomers-synthesis, characterization, and DNA binding. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 741-743.
- 52- Crean, C. W.; Kavanagh, Y. T.; O'Keeffe, C. M.; Lawler, M. P.; Stevenson, C. R.; Davies, J. H.; Boyle, P. H.; Kelly, J. M. Targeting of photooxidative damage on single-stranded DNA representing the *bcr-abl* chimeric gene using oligonucleotideconjugates containing $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ -like photosensitiser groups. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 1024-1033.
- 53- Ortmans, I.; Content, S.; Boutonnet, N.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Bannwarth, W.; Constant, J.-F.; Defrancq, E.; Lhomme, J. Ru-labeled oligonucleotides for photoinduced reactions on targeted DNA guanines. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2712-2720.
- 54- (a) Grimm, G. N.; Alexandre S. Boutorine, A. S.; Lincoln, P.; Helene, C. Design and simple routes of synthesis of oligonucleotide conjugates for studies of DNA triple helix formation. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Ac.* **2001**, *20*, 909-914.
(b) Grimm, G. N.; Alexandre S. Boutorine, A. S.; Lincoln, P.; Norden, B.; Helene, C. Formation of DNA triple helices by an oligonucleotide conjugated to a fluorescent Ruthenium complex. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 324-331.
- 55- Olson, E. J. C.; Hu, H.; Holrmann, A.; Jonkman, A. M.; Arkin, M. R.; Stemp, E. A. D.; Barton, J. K.; Barbara, P. F. First observation of the key intermediate in the "Light-Switch" mechanism of $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11458-11467.
- 56- Weizman, H.; Tor, Y. Redox-active metal-containing nucleotides: synthesis, tunability, and enzymatic incorporation into DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1568-1569.
- 57- Morii, T.; Simomura, M.; Morimoto, S.; Saito, J. Sequence-specific DNA binding by a geometrically constrained peptide dimer. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1150-1151.
- 58- Peek, B. M.; Ross, G. T.; Edwards, S. W.; Meyer, G., J.; Meyer, T. J.; Erickson, B. W. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *38*, 114-123.
- 59- Myari, A.; Hadjiliadis, N.; Garoufis, A. Synthesis and characterization of the diastereomers Λ - and Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-bpy-L-Arg-Gly-L-Asn-L-Ala-L-His-L-Glu-L-Arg})]\text{Cl}_2$ ^1H NMR studies on their interactions with the deoxynucleotide duplex $\text{d}[(5'-\text{GCGCTTAAGCGC-3}')_2]$ and $\text{d}[(5'-\text{CGCGATCGCG-3}')_2]$. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 616-626.
- 60- Copeland, K. D.; Fitzsimons, M. P.; Houser, R. P.; Barton, J. K. DNA hydrolysis and oxidative cleavage by metal-binding peptides tethered to Rhodium intercalators. *Biochemistry* **2002**, *41*, 343-356.
- 61- Brunner, J.; Barton, J. K. Site-specific DNA photocleavage by Rhodium intercalators analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6772-6773.
- 62- Geiber, B.; Alsfasser, R. A peptide approach to covalently linked $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ -ferrocene and $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ -tyrosine conjugates. *Inorg. Chim. Acta* **2003**, *344*, 102-108.
- 63- Rau, H. K.; Snigula, H.; Struck, A.; Robert, B.; Scheer, H.; Haehnel, W. Design, synthesis and properties of synthetic chlorophyll proteins. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 3284-3295.
- 64- Rau, H. K.; Dejonge, N.; Haehnel, W. Modular synthesis of *de novo*-designed metalloproteins for light-induced electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11526-11531.

- 65- Lo, K. K.-W.; Chan, J. S.-W.; Chung, C.-K.; Tsang, V. W.-H.; Zhu, N. Synthesis, photophysical and electrochemical properties, and biological labelling studies of luminescent cyclometalated iridium(III) bipyridine-aldehyde complexes. *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 3109-3118.
- 66- (a) Boturyn, D.; Constant, J.-F.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Barbin, A.; Wild, C. P. A simple and sensitive method for in vitro quantification of abasic sites in DNA. *Chem. Res. Tox.* **1999**, *12*, 476-482.
(b) Trévisiol, E.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Laayoun, A.; Cros, P. Synthesis of nucleoside triphosphates that contain an aminoxy function for "post-amplification labelling". *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 211-217.
(c) Trévisiol, E.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Laayoun, A.; Cros, P. Synthesis of methylketone containing nucleoside triphosphates for RNA labelling. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6501-6510.
- 67- (a) Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates : chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3976-3984.
(b) Singh, Y.; Defrancq, E.; Dumy, P. New method to prepare peptide-oligonucleotide conjugates through glyoxylic oxime formation. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8544-8546.
(c) Ghosh, S. Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P.; Bhattacharya, S. Efficient conjugation and characterization of distamycin-based peptides with selected oligonucleotide stretches. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 520-529.
- 68- (a) Forget, D.; Boturyn, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Highly efficient synthesis of peptide- and carbohydrate- oligonucleotide conjugates using chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1427-1429
(b) Singh, Y.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Preparation of a multitopic glycopeptide-oligonucleotide conjugate. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359-1362.
- 69- Zanta, M. A.; Belguise-Valladier, P.; Behr, J. P.; Gene delivery : a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 91-96.
- 70- Lee, H. J.; Pardridge, W. M.; Pharmacokinetics and delivery of Tat-protein conjugates to tissues in vivo *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 995-999.

PARTIE A

Chapitre I : Le lien chimiosélectif oxime

- 71- Lemieux, G. A.; Bertozzi, C. R. Chemoselective ligations réactions with proteins, oligosaccharides and cells. *Tibtech.* **1998**, *16*, 506-513.
- 72- Jencks, W. P. Studies on the mechanism of oxime and semicarbazone formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 471-481.
- 73- Defrancq, E.; Lhomme, Use of an aminoxy linker for the functionalization of oligodeoxyribonucleotides. *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 931-933.
- 74- Zatsepin, T. S.; Stetsenko, D. A.; Gait, M. J.; Oretskaya, T. S. Use of carbonyl group addition-elimination reactions for synthesis of nucleic acid conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 471-489.
- 75- Forget, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. Efficient preparation of carbohydrate-oligonucleotide conjugates (COCs) using oxime bond formation. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7829-7832.
- 76- Polyakov, V. A.; Nelen, M. I.; Nazarpak-Kandlousy, N.; Ryabov, A. D.; Eliseev, A. V. Imine exchange in O-aryl and O-alkyl oximes as a base reaction for aqueous 'dynamic' combinatorial libraries. A kinetic and thermodynamic study. *J. Phys. Org. Chem.* **1999**, *12*, 357-363.

- 77- Rose, K. Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.
- 78- Tam, J. P.; Xu, J.; Dong Eom, K. Methods and strategies of peptide ligation. *Biopolymers (Peptide Science)* **2001**, *60*, 194-205.
- 79- Nardin, E. H.; Calvo-Calle, J. M.; Oliveira, G. A.; Clavijo, P.; Nussenzweig, R.; Simon, R.; Zeng, W.; Rose, K. *Plasmodium falciparum* polyoximes: highly immunogenic synthetic vaccines constructed by chemoselective ligation of repeat B-cell epitopes and a universal T-cell epitope of CS protein. *Vaccine* **1998**, *16*, 590-600.

~

Chapitre II : Les "fragments aldéhydes"

- 80- Caruthers, M. H.; Barone, A. D.; Beaucage, S. L.; Dodds, D. R.; Fischer, E. F.; McBride, L. J.; Matteucci, M.; Stabinsky, Z.; Tang, J. Y. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. *Methods Enzymol.* **1987**, *154*, 287-313.
- 81- Vasseur, J.-J.; Pech, D.; Rayner, B.; Imbach, J.-L. Derivatization of oligonucleotides through abasic site formation. *Nucleosides & Nucleotides* **1991**, *10*, 107-117.
- 82- Ono, A.; Ohtsuka, E.; Nara, H.; Inada, M.; Matsuda, A. Incorporation of a mutagenic nucleoside, 5-formyl-2'-deoxyuridine, into an oligodeoxynucleotide. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2751-2754.
- 83- Podyminogin, M. A.; Lukhtanov, E. A.; Reed, M. W. Attachment of benzaldehyde modified oligonucleotides probes to semicarbazide coated glass. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 5090-5098.
- 84- Czapinski, J. L.; Sheppard, T. L. Nucleic Acid template-directed assembly of metallosalen-DNA conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8618-8619.
- 85- Okamoto, A.; Tainaka, K.; Saito, I. A facile incorporation of the aldehyde function into DNA: 3-formylindole nucleoside as an aldehyde-containing universal nucleoside. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4581-4583.
- 86- Achilles, K.; Kiedrowski, G. V. Kinetic model studies on the chemical ligation of oligonucleotides via hydrazone formation. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1229-1233.
- 87- (a) Bayard, B.; Bisbal, C.; Silhol, M.; Cnockaert, J.; Huez, G.; Lebleu, B. Increased stability and antiviral activity of 2'-O-phosphoglyceryl derivatives of (2'-5')oligo(adenylate). *Eur. J. Biochem.* **1984**, *142*, 291-298.
(b) Agrawal, S.; Christodoulou, C.; Gait, M. J. Efficient methods for attaching non-radioactive labels to the 5' ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 6227-6245.
- 88- (a) Skrzypczynski, Z.; Wayland, S. New reagents for the introduction of reactive functional groups into chemically synthesized DNA probes. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 642-652.
(b) Jones, D. S.; Hachmann, J. P.; Osgood, S. A.; Hayag, M. S.; Paul A. Barstad, P. A.; G. Michael Iverson, G. M.; Coutts, S. M. Conjugates of double-stranded oligonucleotides with poly(ethyleneglycol) and keyhole limpet hemocyanin: A model for treating systemic lupus erythematosus. *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 390-399.
- 89- Kremsky, J. N.; Wooters, J. L.; Dougherty, J. P.; Meyers, R. E.; Collins, M.; Brown, E. L. Immobilization of DNA via oligonucleotides containing an aldehyde or carboxylic acid group at the 5' terminus. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 2891-2909.
- 90- Ollivier, N.; Olivier, C.; Gouyette, C.; Huynh-Dinh, T.; Gras-Masseand, H.; Melnyk, O. Synthesis of oligonucleotide-peptide conjugates using hydrazone chemical ligation. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 997-999.

- 91- Kodama, T.; Greenberg, M. M. Preparation and analysis of oligonucleotides containing lesions resulting from C5'-oxidation. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9916-9924.
- 92- Miduturu, C. V.; Silverman, S. K. Synthesis and application of a 5'-aldehyde phosphoramidite for covalent attachment of DNA to biomolecules. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5774-5777.
- 93- (a) Tilquin, J. M.; Dechamps, M.; Sonveaux, E. Incorporation of an Aldehyde Function in Oligonucleotides. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 451-457.
(b) Sugiyama, H.; Matsuda, S.; Kino, K.; Zhang, Q.-M.; Yonei, S.; Saito, I. New synthetic method of 5-formyluracil-containing oligonucleotides and their melting behavior. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9067-9070.
- 94- Beaucage, S. L. Oligonucleotide synthesis. Phosphoramidite approach. *Methods in Molecular Biology* **1993**, *20*, 33-66.
- 95- Forget D., thèse de doctorat, LEDSS, Université Joseph Fourier, **2002**.
- 96- Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed.; John Wiley and Sons: New York, **1999**, p 217-224.
- 97- Smith, M.; Rammler, D. H.; Goldberg, I. H.; Khorana, H. G. Studies on polynucleotides XIV. Specific synthesis of the C₃-C₅, interribonucleotide linkage. Syntheses of uridylyl-(3'→5')-uridine and uridylyl-(3'→5')-adenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430-440.
- 98- Kaburagi, Y.; Osajima, H.; Shimada, K.; Tokuyama H.; Tohru Fukuyama, T. 4-(tert-Butyldimethylsilyloxy) benzylidene acetal: a novel benzylidene-type protecting group for 1,2-diols. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 3817-3821.
- 99- Edupuganti, O. P.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. The oxime bond formation as an efficient chemical tool for the preparation of 3',5'-bifunctionalised oligodeoxyribonucleotides *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2839-2842.
- 100- Miyashita, M.; Yoshikoshi, A.; Grieco, P. A. Pyridinium p-toluenesulfonate. a mild and efficient catalyst for the tetrahydropyranlation of alcohols. *J. Org. Chem* **1977**, *42*, 3772-3774.
- 101- Yamanoi, T.; Akiyama, T.; Ishida, E.; Abe, H.; Amamiya, M.; Inazu, T. Horner-Wittig reaction of dimethyl 2,3-O-isopropylidene-D-glycerolmethylphosphonate and its application to the formal synthesis D-erythro-C₁₈-sphingosine. *Chem. Lett.* **1989**, *2*, 335-336.
- 102- Caruthers, M. H.; Brill, W.; and Dellinter, D. J. Phosphoramidites as Synthons for Polynucleotide Synthesis. *Phosphorus Sulfur* **1987**, *30*, 549-553.
- 103- (a) Amarnath, V.; Broom, A. D. Chemical synthesis of oligonucleotides. *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 183-217.
(b) Loakes, D. Nucleotides and Nucleic Acids; Oligo- and Polynucleotides. *Organophosphorus Chem.* **2005**, *34*, 227-325.
- 104- Lemaitre, M.; Bayard, B.; Lebleu, B. Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 648-652.
- 105- Timofeev, E. N.; Kochetkova, S. V.; Mirzabekov, A. D.; Florentiev, V. L. Regioselective immobilization of short oligonucleotides to acrylic copolymer gels. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3142-3148.
- 106- Calderone, C. T.; James W. Puckett, J. W.; Gartner, Z. J.; Liu, D. R. Directing otherwise incompatible reactions in a single solution by using DNA-templated organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4104-4108.
- 107- Urata, H.; Agaki, M. A convenient synthesis of oligonucleotide with a 3'-phosphoglycolate and 3'-phosphoglycaldehyde terminus. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4015-4018.

- 108- Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G. Self-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 138-146.
- 109- Forget, D.; Boturyn, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. 3'-oligonucleotides conjugation via chemoselective oxime bond formation. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 9171-9174.
- 110- Sarubbi, E.; Seneci, P. F.; Angelastro, M. R.; Peet N. P.; Denaro, M.; Islam K. Peptide aldehydes as inhibitors of HIV protease. *FEBS Letts* **1993**; *319*, 253-256.
- 111- (a) Melnyk, O.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Gras-Masse, H. Functionalization of Peptides and Proteins by Aldehyde or Keto Groups. *Biopolymers, Pept. Sci.*, **2000**, *Vol. 55*, 165-186.
(b) Virta, P.; Katajisto, J.; Niittymäki, T.; Lönnberg, H. Solid-supported synthesis of oligomeric bioconjugates. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5137-5174.
(c) Gazal, S.; Masterson, L. R.; Barany, G. Facile solid-phase synthesis of C-terminal peptide aldehydes and hydroxamates from a common backbone amide linked (BAL) intermediate. *J. Pep. Res.* **2005**, *66*, 314-332.
- 112- Qasmi, D.; René, L.; Badet, B. Synthesis of "CHO-CO-peptide" by N-terminal acylation with a glyoxylyl equivalent. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4343-4344.
- 113- Shao, J.; Tam, J. P. Unprotected Peptides as Building Blocks for the Synthesis of Peptide Dendrimers with Oxime, Hydrazone, and Thiazolidine Linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893-3899.
- 114- Johannesson, P.; Lindeberg, G.; Tong, W.; Gogoll, A.; Karlén, A.; Hallberg, A. Bicyclic Tripeptide Mimetics with Reverse Turn Inducing Properties. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 601-608.
- 115- (a) Agami, C.; Couty, F.; Mathieu, H. Total synthesis of (-)-Desoxoprosopinine via the diastereoselective reduction of homochiral 2-acyl-N-Boc-oxazolidines. *Tetrahedron. Lett.* **1998**, *39*, 3505-3508.
(b) Groth, T.; Meldal, M. N-terminal peptide aldehydes as electrophiles in combinatorial solid phase synthesis of novel peptide isosteres. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 45-63.
- 116- Spetzler, J. C.; Hoeg-Jensen, T. Masked side-chain aldehyde amino acids for solid-phase synthesis and ligation *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2303-2306.
- 117- Marielle, P.; Douat, C.; Heitz, A.; Gibbons, W.; Martinez, J.; Fehrentz J.-A. Post-synthesis modification of aspartyl or glutamyl residue side-chains on solid support. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5179-5182.
- 118- (a) Liu, C.F.; Tam, J. P. Peptide segment ligation strategy without use of protecting groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6584-88.
(b) Rose, K.; Chen, J.; Dragovic, M.; Zeng, W.; Jeannerat, D.; Kamalaprija, P.; Burger U. New cyclization reaction at the amino terminus of peptides and proteins. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1038-1043.
- 119- Merrifield, M. D. Solid phase synthesis (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1985**, *24*, 789-810.
- 120- Fields, G. B.; Noble, R. L. Solid-phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- 121- Nicolas, E.; Clemente, J.; Perello, M.; Albericio, F.; Pedroso, E.; Giralt, E. A new approach to the solid-phase peptide synthesis of peptide alkyl-amides and esters. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2183-2186.
- 122- Coste, J.; Le Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP : a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- 123- Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino group in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.

- 124- Hancock, W. S.; Battersby, J. E. A new micro-test for the detection of incomplete coupling reaction in solidphase synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 261-264.
- 125- Pearson, D. A., Blanchette, M., Baker, M. L., and Guindon, C. A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739-2742.
- 126- Buré, C.; Gobert, W.; Lelièvre, D.; Delmas, A. In-source fragmentation of peptide aldehydes and acetals : influence of peptide length and charge state. *J. Mass Spectrom.* **2001**; *36*, 1149-1155.

~

Chapitre III : Les complexes de Ru(II) porteurs de l'oxyamine

- 127- Deroo, S.; Defrancq, E.; Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Dumy, P. Synthesis of an oxyamino-containing phenanthroline derivative for the efficient preparation of phenanthroline oligonucleotide oxime conjugates. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8379-8382.
- 128- Smith, G. F.; Cagle, F. W. J. The improved synthesis of 5-nitro-1,10-phenanthroline. *J. Org. Chem.* **1947**, *12*, 781-784.
- 129- Lecomte, J. P.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Demeunynck, M.; Lhomme, J. Synthesis and characterisation of a new DNA-binding bifunctional ruthenium(II) complex. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1993**, *89*, 3261-3269.
- 130- Chen, C. H. B.; Sigman, D. S. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper: sequence-specific targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 7147-7151.
- 131- Ide, H.; Akamatsu, K.; Kimura, Y.; Michiue, K.; Makino, K.; Asaeda, A.; Takamori, Y.; Kubo, K. Synthesis and damage specificity of a novel probe for the detection of abasic sites in DNA. *Biochem.* **1993**, *32*, 8276-8283.
- 132- Vilaseca, L. A.; Rose, K.; Werlen, J. R.; Meunier, A.; Offord, R. E.; Nichols, C. L.; Scott, W. L. Protein conjugates of defined structure: synthesis and use of a new carrier molecule. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 515-520.
- 133- (a) Rogers, D. Z. Improved synthesis of 1,4,5,8,9,12-hexaazatriphenylene *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3904-3905.
(b) Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Choua, S. Photophysics of Ru(Phen)₂(PHEHAT)₂⁺ : A novel "Light Switch" for DNA and photo-oxidant for mononucleotides. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 584-592.
- 134- (a) Naesielski-Hinkens, R.; Benedek-Vamos, M.; Maetens, D. *J. Heterocyclic. Chem.* **1980**, *17*, 873-876.
(b) Defay, N.; Maetens, D.; Naesielski-Hinkens, R. *Org. Magn. Res.* **1984**, *22*, 340-344.
(c) Deroo, S. Thèse de doctorat, Université Libre de Bruxelles, **2006**.
- 135- Sullivan, B. P.; Salmon, D. J.; Meyer, T. J. Mixed phosphine 2,2'-bipyridine complexes of ruthenium. *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 3340-3341.
- 136- Belser, P.; Von Zelewsky, A. *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 1675-.
- 137- Evans, I. P.; Spencer, A.; Wilkinson, G. Dichlorotetrakis(dimethyl sulphoxide)ruthenium(II) and its use as a source material for some new ruthenium(II) complexes. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1973**, 204-209.

- 138- Didier, P.; Jacquet, L.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Synthesis and Characterization by FAB Mass Spectrometry of a Series of New Polymetallic Homo- and Heteronuclear Complexes of Ruthenium(II) and Rhodium(III) with the symmetric bridging ligand 1,4,5,8,9,12-Hexaazatriphenylene. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4803-4309.
- 139- (a) Vorbruggen, H.; Krolkiewicz, K. Selective acidic cleavage of tertbutoxycarbonyl group. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1975**, *14*, 818.
(b) Fuller, W.D.; Goodman, M.; Naider, F.R.; Hu, Y.F. Urethane-protected alphaamino acid N-carboxyanhydrides and peptide synthesis. *Biopolymers* **1996**, *40*, 183-205.
- 140- Houdier, S.; Legrand, M.; Boturyn, D.; Croze, S.; Defrancq, E.; Lhomme, J. A new fluorescent probe for sensitive detection of carbonyl compounds. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *382*, 253-263.
- 141- Matas, L.; Muniente, J.; Ros, J.; Alvarez-Larena, A.; Piniella, J. F. Migratory insertion reaction in alkenyl ruthenium II complexes containing a trifluoroacetate ligand. X ray structure of the Ru(η^2 -O₂CCF₃)(η^1 -O=CCH=CHtBu)(CO)(PPh₃)₂ complex. *Inorg. Chem. Comm.* **1999**, *2*, 364-367.
- 142- Greene, T. W. In *Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons: New York, 1981; Chapter 7, pp 232-233.
- 143- (a) Han, G.; Tamaki, G.; Hruby, M.; Fast, V. J. efficient and selective deprotection of the tert-butoxycarbonyl (Boc) group using HCl/dioxane (4 M). *J. Peptide Res.* **2001**, *58*, 338-341.
(b) Gibson, F.S.; Bergmeier, S.C.; Rapoport, H. Selective removal of an N-BOC protecting group in the presence of a tert-Butyl ester and other acid-sensitive groups *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3216-3218.

~

Chapitre IV : Assemblage chimiosélectif des conjugués

- 144- Zatsepin, T. S.; Stetsenko, D. A.; Arzumanov, A. A.; Romanova, E. A.; Gait, M. J.; Oretskaya, T. S. Synthesis of Peptide-Oligonucleotide Conjugates with Single and Multiple Peptides Attached to 2'-Aldehydes through Thiazolidine, Oxime, and Hydrazine Linkages. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 822-830.
- 145- Tronchet, J. M. J.; Zosimo-landolfo, G.; Balkadjian, M.; Ricca, A.; Zsély, M.; Barbalat-Rey, F.; Cabrini, D.; Lichtle, P.; Geoffroy, M. New types of spin-labelled sugar and nucleoside analogs: pyrrolidine, morpholine and piperidine N-Oxyls. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4129-4132.

PARTIE B

Etudes photochimiques des conjugués

- 146- Lentzen, O; Constant, J; -F.; Defrancq, E.; Moucheron, C.; Dumy, P.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Photoadduct leading to crosslinking in RuII-derivatized oligonucleotides. *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1487-1489.
- 147- Del Guerzo, A.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Demeunynck, M.; Lhomme, J. Photophysics of bifunctional Ru(II) complexes bearing an aminoquinoline organic unit.potential new photoprobes and photoreagents of DNA. *J. Phys. Chem. B*, **1997**, *101*, 7012-7021.
- 148- Ortmans, I.; Elias, B.; Kelly, J. M.; Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A. [Ru(TAP)2(dppz)]²⁺: a DNA intercalating complex, which luminesces strongly in water and undergoes photo-induced proton-coupled electron transfer with guanosine-5'-monophosphate. *Dalton Trans.* **2004**, 668-676.

- 149- Kirsch-De Mesmaeker, A.; Lecomte, J.-P.; Kelly, J. M. Photoreactions of metal complexes with DNA, especially those involving a primary photo-electron transfer. *Topics in Current Chem.* **1996**, *177*, 25-76.
- 150- Garcia-Fresnadillo, D.; Lentzen, O.; Ortmans, I.; Defrancq, E.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Detection of secondary structures in 17-mer Ru(II)-labeled single-stranded oligonucleotides from luminescence lifetime studies. *Dalton Trans.* **2005**, 852-856.
- 151- Garcia-Fresnadillo, D.; Boutonnet N.; Schumm, S.; Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Defrancq, E.; Constant, J.-F.; Lhomme, J. Luminescence quenching of Ru-labeled oligonucleotides by target complementary strands. *Biophysical J.* **2002**, *82*, 978-987.
- 152- Schumm, S.; Prévost, M.; Garcia-Fresnadillo, D.; Lentzen, O.; Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Influence of the sequence dependent ionization potentials of guanines on the luminescence quenching of Ru-labeled oligonucleotides : a theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2763-2768.
- 153- Lecomte, J.-P.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Feeney, M. M.; Kelly, J. M. Ruthenium(II) complexes with 1,4,5,8,9,12-Hexaazatriphenylene and 1,4,5,8-Tetraazaphenanthrene ligands: key role played by the photoelectron transfer in DNA cleavage and adduct formation. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 6481-6491.
- 154- Jacquet, L.; Davies, R. J.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Kelly, J. M. Photoaddition of $[\text{Ru}(\text{tap})_2(\text{bpy})]^{2+}$ to DNA : a new mode of covalent attachment of metal complexes to duplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11 763.
- 155- Feeney, M. M.; Kelly, J. M.; Tossi, A. B.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Lecomte, J.-P. Photoaddition of ruthenium(II)-tris-1,4,5,8-tetraazaphenanthrene to DNA and mononucleotides. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* **1994**, *23*, 69-78.
- 156- Elias, B.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Photo-reduction of polycyclic aromatic Ru(II) complexes by biomolecules and possible applications. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 1627-1641.

~

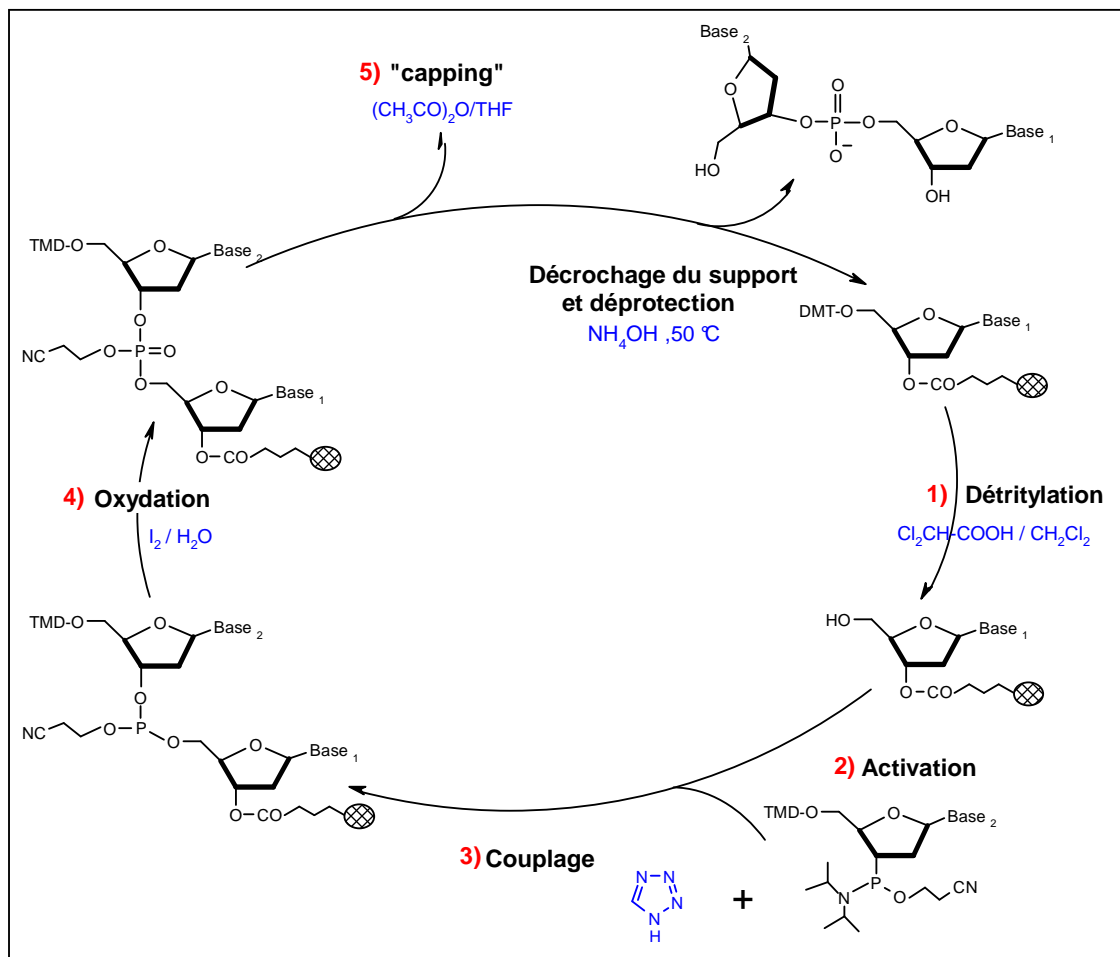
Conclusion et perspectives

- 157- Gicquel, E.; Boisdenghien, A.; Defrancq, E.; Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A. Adduct formation by photo-induced electron transfer between photooxidising Ru(II) complexes and tryptophan. *Chem. Commun.* **2004**, 2764 – 2765.

Annexe

Annexe

Cycles de synthèse des oligodeoxyribonucléotides par la méthode dites aux "phosphoramidites".



Résumé : Les complexes de ruthénium(II) font l'objet d'un intérêt croissant en tant que photosondes du matériel génétique ou nouvelles drogues en photothérapie anti-cancéreuse. Les complexes contenant des ligands TAP (1,4,5,8-tétraazaphénanthrène) sont capables sous l'action d'une irradiation lumineuse, de générer spécifiquement un photoadduit avec la guanine. Cette photoréactivité constitue une stratégie prometteuse pour contrôler l'expression d'un gène. Toutefois, le manque de sélectivité de ce type de photoréaction bloque leur potentiel thérapeutique.

Afin de surmonter cet obstacle, nous avons attaché le complexe de ruthénium à l'extrémité d'un oligonucléotide. Cette approche repose sur l'utilisation des propriétés intrinsèques de reconnaissance spécifiques des oligonucléotides vis-à-vis d'une cible acide nucléique. Pour préparer les conjugués, nous avons utilisé la formation d'un lien éther d'oxime en mettant au point une méthode douce et efficace de conjugaison, optimisée dans des conditions conformes aux exigences physiologiques. Nous avons préparé différents conjugués à partir des complexes $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$ et $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$, ancrés indifféremment à l'extrémité 3' ou 5' des oligonucléotides, afin d'en étudier le potentiel photochimique. En illuminant ces nouveaux conjugués dans le visible, nous avons mis en évidence la formation spécifique d'un photopontage entre une guanine de l'acide nucléique ciblé et le complexe de ruthénium. Nous avons également étendu notre procédé en ancrant le complexe $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ à des peptides vecteurs.

Mots clés : Oligonucléotide, conjugué, complexe de ruthénium(II), liaison éther d'oxime, transfert d'électron, photopontage.

Summary : The Ru(II) complexes have found widespread interest as luminescent DNA probes, or new phototherapeutic agent against cancer. Complexes containing highly π -deficient polyazaaromatic ligands such as TAP (1,4,5,8-tetraazaphenanthrene) under illumination are able to form specifically a photoadduct with the guanine nucleobase. This photoreactivity might be an extremely promising strategy to control the normal cellular process, and so perturb the gene expression. However, the lack of selectivity of this photoreaction blocks their therapeutic development.

To overcome this, we have realised the attachment of such metal complexes to the extremity of an oligonucleotide. This approach is based on the specific recognition of a target nucleotidic sequence by a nucleic acid probe. In this purpose, we have chosen to use the chemoselective oxime ligation. This coupling reaction was found to be highly efficient, between both unprotected moieties, with minimal chemical manipulation and working in physiological conditions. We have built some conjugate with two complexes of Ru(II) : $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$, anchoring at the 3' or 5' extremity of the oligonucléotides, in order to determine their photochemical potentiel. Then under visible illumination, we have demonstrated that the conjugates produce the specific and irreversible photocrosslinking between a guanine unit of the target and the ruthenium complex. Finally, we have also decided to extend our process by anchoring the complex $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Phen}]^{2+}$ to cell-penetrating peptides.

Key words : Oligonucleotide, conjugate, ruthenium complex, oxime ligation, electron transfer, photocrosslinking.
