Développement de nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes pour l'analyse des acides nucléiques

Brice-Loïc Renard

▶ **To cite this version:**

Brice-Loïc Renard. Développement de nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes pour l'analyse des acides nucléiques. Chimie. Université d'Orléans, 2008. Français. NNT : . tel-00364558

HAL Id: tel-00364558
https://theses.hal.science/tel-00364558

Submitted on 26 Feb 2009

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 D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

THÈSE présentée par :

Brice-Loïc RENARD

soutenue le : **17 décembre 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : **Chimie**

DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES FLUORESCENTES POUR L'ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES

THÈSE dirigée par :
Mme Ulysse ASSELINE : Directrice de Recherche CNRS, Orléans

RAPPORTEURS :
Mme Sylvie POCHET : Directrice de Recherche, Institut Pasteur, Paris.
Mme Pascale CLIVIO : Directrice de Recherche, Institut Chimie Moléculaire Reims

JURY :
Mr Olivier MARTIN : Professeur, Université d'Orléans - **Président du jury**
Mme Ulysse ASSELINE : Directrice de Recherche CNRS, Orléans
Mme Sylvie POCHET : Directrice de Recherche, Institut Pasteur, Paris.
Mme Pascale CLIVIO : Directrice de Recherche, Institut Chimie Moléculaire Reims
Mme Paola ARIMONDO : Directrice de Recherche, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été effectuée au Centre de Biophysique Moléculaire (UPR 4301) dirigé par le Docteur Jean-Claude Beloeil, Directeur de Recherche au CNRS, dans l'équipe « Oligonucléotides modifiés : synthèse et applications » sous la direction du Docteur Ulysse Asseline, Directrice de Recherche au CNRS.

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Directeur J.C. Beloeil qui m'a fait l'honneur et le plaisir de m'accueillir dans son laboratoire. Un grand merci également au CNRS et à la Région Centre pour le financement des trois années de thèse.

Je remercie très vivement Madame le Docteur Ulysse Asseline de m'avoir si bien guidé dans mon travail ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité tout au long de ces trois années d'intenses recherches. Ses connaissances, ses conseils et ses critiques avisés ont été essentiels à ma formation scientifique.

J'exprime ma gratitude à Mesdames les Docteurs Sylvie Pochet et Pascale Clivio, Directrices de Recherche au CNRS qui ont accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Je tiens également à remercier Madame le Docteur Paola Arimondo, Directrice de Recherche au CNRS et Monsieur le Professeur Olivier Martin d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je suis également reconnaissant envers les autres membres de l'équipe : les expérimentés Victoria Roig, Yves Aubert et Marcel Chassignol, et les padawans Gerald Mathis et Aurélien Cavatz qui ont su m'épauler à tout moment et ont contribué à une bonne ambiance tout au long de cette thèse.

Je souhaite aussi remercier Corinne Buré, Guillaume Gabant et Hervé Meudal pour l'enregistrement des spectres de masse et de RMN, ainsi que Sandrine Villette pour ses conseils en fluorescence.

Enfin, je tiens à remercier tous les membres du laboratoire pour leur aide et la bonne humeur.

GLOSSAIRE

A Adénine
AA Acétate d'ammonium
Ac Acétyle
ADN Acide désoxyribonucléique
ARN Acide ribonucléique
ARNm Acide ribonucléique messager
Bn Benzyle
Bz Benzoyle
C Cytosine
CCM Chromatographie sur couche mince
CDI Carbonylediimidazole
CLHP Chromatographie liquide haute performance
CPG Controlled pore glass
DCC Dicyclohexylcarbodiimide
DIEA Diisopropyléthylamine
DMAP Diméthylaminopyridine
DMF Diméthylformamide
DMSO Diméthylsulfoxyde
DMTr Diméthoxytrityle
DO Densité optique
DTT Dithiothréitol
EDTA Acide éthylènediaminetétraacétique
FISH Fluorescence *in situ* hybridization
FRET Fluorescence resonance energy transfer
G Guanine
H Hoogsteen
iBu Isobutyryle
$\mathbf{I_F}$ Intensité de fluorescence
LED Light Emitting Diode
LNA Locked nucleic acid
MMTr Monométhoxytrityle
NMI *N*-méthylimidazole
ODN Oligo-2'-désoxyribonucléotide
OFT Oligonucléotide formant une triple hélice
OGM Organisme génétiquement modifié
ON Oligonucléotide

Sp ODN Oligo-2'-désoxyribonucléique comportant un groupement thiophoshate à l'éxtrémité 5'

PCR Polymerase chain reaction

Ph Phényle

pIR Proche Infrarouge

PNA Peptidic nucleic acid

Pu Purine

Py Pyrimidine

Pyr Pyridine

RMN Résonance magnétique nucléaire

RNase H Ribonucléase H

RT-PCR Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SM Spectrométrie de Masse

SNP Single nucleotide polymorphism

T Thymine

t.a. Température ambiante

TCEP Tricarboxyéthylphosphine

TEAA Acétate de triéthylammonium

Th Thiocyanine

Tm Température de demi-dissociation

Tr Trityle

t_R Temps de rétention

TO Thiazole orange comportant le bras de liaison sur le noyau quinoline

TO' Thiazole orange comportant le bras de liaison sur le noyau benzothiazole

TOTO Homodimère du TO

Tx triplex

U Uracile

UA Unité Arbitraire

WC Watson-Crick

YO Yellow oxazole

YOYO Homodimère du YO

ϕ_F Rendement quantique de fluorescence

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 11

GENERALITES 13

A. STRUCTURE, SYNTHESE ET APPLICATIONS DES ACIDES NUCLEIQUES 14

I. Structures et fonctions des acides nucléiques 14

I. 1. L'ADN, support de l'information génétique 14

I. 2. Les différentes structures d'acides nucléiques 15

I. 2. A. Le double brin 15

I. 2. B. Triples hélices et tétrades d'ADN 17

I. 2. C. Autres structures 18

I. 3. Les mutations 18

II. Les oligonucléotides : acides nucléiques de synthèse 18

II. 1. La synthèse en solution 19

II. 2. La synthèse sur support 20

II. 2. A. Les supports 20

II. 2. B. Protection des fonctions réactives de l'oligonucléotide pour la synthèse sur support 21

II. 2. C. Cycle de synthèse des oligonucléotides selon la méthode aux phosphoramidites 21

II. 2. D. Méthode aux H-phosphonates 23

III. Les applications des oligonucléotides 24

III. 1. L'utilisation d'oligonucléotides pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques 24

III. 1. A. Ciblage de l'ARN 24

III. 1. B. Ciblage de l'ADN double brin 25

III. 2. Outils pour la recherche fondamentale, l'analyse fine des acides nucléiques et pour le diagnostic 25

B. LES SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES FLUORESCENTES : SYNTHESE ET APPLICATIONS 27

I. Conception des sondes oligonucléotidiques 28

II. La fluorescence 29

II. 1. Rappels de fluorescence 29

II. 2. Les paramètres de la fluorescence 30

II. 3. Instrumentation 33

II. 4. Les différentes classes de marqueurs fluorescents 34

II. 4. A. Les analogues de nucléosides fluorescents 34

II. 4 .B. Les marqueurs fluorescents ou fluorophores 34

III. Les méthodes de synthèse des sondes oligonucléotidiques fluorescentes 36

III. 1. Incorporation directe du marqueur à l'oligonucléotide lié au support au cours de l'assemblage 36

III. 2. Couplage du ligand sur l'oligonucléotide déprotégé 37

III. 3. Polymarquage 40

IV. Les principaux formats d'hybridation 40

IV. 1. Sonde unique 40

IV. 1. A. Sonde linéaire 40

IV. 1. B. Sonde changeant de forme par hybridation compétitive 42

IV. 2. Plusieurs sondes 43

V. Les applications des sondes oligonucléotidiques fluorescentes 44

V. 1. Les techniques de détection et d'analyse des acides nucléiques par hybridation en solution 44

V. 1. A. La PCR 44

V. 1. B. Le séquençage 45

V. 1. C. La détection par FISH 45

V. 2. Les techniques de détection et d'analyse des acides nucléiques par hybridation sur support 46

V. 2. A. Méthode Southern et techniques dérivées 46

V. 2. B. Hybridation sandwich 46

V. 2. C. Puces à ADN 47

V. 2. D. Séquençage par hybridation 47

VI. Utilisation des sondes en milieu cellulaire 47

RESULTATS ET DISCUSSIONS 49

A. SYNTHESE ET PROPRIETES DE NOUVELLES SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES FLUORESCENTES SPECIFIQUES DES DOUBLES BRINS D'ADN 50

I. Introduction sur les oligonucléotides formant des triples hélices (OFTs) 50

I. 1. Formation des triples hélices avec des OFTs 50

I. 2. Applications thérapeutiques des OFTs 51

I. 3. Amélioration des propriétés des OFTs 52

I. 3. A. Modifications de la composition chimique des OFTs 52

I. 3. B. Couplage de ligands aux OFTs 54

II. Détection des doubles brins d'ADN 55

III. Conception des sondes OFTs fluorescentes 56

III. 1. Choix des marqueurs fluorescents 56

III. 1. A. Emission d'un signal modifié après hybridation de la sonde 56

III. 1. B. La famille des cyanines monométhines 56

III. 1. C. Propriétés des cyanines monométhines en présence d'acides nucléiques 57

III. 1. C. 1. *Interactions non covalentes des cyanines monométhines avec les acides nucléiques* 57

III. 1. C. 2. *Interactions des cyanines monométhines fixées sur une sonde avec les acides nucléiques* 59

III. 1. D. Choix des cyanines 63

III. 1. E. Synthèse des cyanines 64

III. 2. Choix des OFTs et de leur cible ADN double brin 64

IV. Synthèse et propriétés des 5'-conjugués OFT-cyanine 65

IV. 1. Synthèse des 5'-conjugués OFT-cyanine 65

IV. 1. A. Stratégie de couplage des fluorophores sur les OFTs 65

IV. 1. B. Incorporation d'une fonction thiophosphate sur les oligonucléotides 65

IV. 1. C. Synthèse des OFTs 5'-thiophosphate 67

IV. 1. D. Couplage des cyanines sur les OFTs 5'-thiophosphate 68

IV. 2. Caractérisation des 5'-conjugués OFT-cyanine 69

IV. 3. Etude des propriétés des 5'-conjugués OFT-cyanine après hybridation 70

IV. 3. A. Spectroscopie d'absorption UV/Vis 70

IV. 3. B. Etudes de dénaturation thermique 71

IV. 4. Propriétés de fluorescence des 5'-conjugués OFT-cyanine 73

V. Synthèse et propriétés des 3'-conjugués OFT-cyanine 76

V. 1. Synthèse et propriétés de stabilisation des 3'-conjugués OFT-cyanine avec un bras octaméthylène 76

V. 2. Propriétés de fluorescence des 3'-conjugués OFT-cyanine 80

VI. Synthèse et propriétés des bis 5', 3'-conjugués OFT-cyanines 81

VI. 1. Synthèse des bis 5', 3'-conjugués OFT-cyanines 81

VI. 2. Caractérisation des bis 5', 3'-conjugués OFT-cyanines 83

VI. 3. Etude des propriétés des bis-conjugués après hybridation 85

VI. 4. Propriétés de fluorescence des bis 5', 3'-conjugués OFT-cyanines 87

VII. Résumé des résultats obtenus 89

VIII. Modification de la stratégie afin d'augmenter la variation d'intensité de fluorescence lors de l'hybridation 91

VIII. 1. Stratégie basée sur le transfert de brins 91

VIII. 2. Application de la stratégie aux triples hélices 92

IX. Influence de la longueur et de la séquence de l'OFT conjugué sur ses propriétés de fluorescence 96

X. Détection de mésappariements sur les triples hélices 98

X. 1. Structures des mésappariements 98

X. 2. Influence des mésappariements sur la fluorescence des OFTs conjugués 98

XI. Conclusion 103

B. SYNTHESE ET PROPRIETES DE NOUVELLES SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES FLUORESCENTES DETECTABLES DANS LE PROCHE INFRAROUGE 104

I. Introduction sur la détection dans le proche IR 104

I. 1. Zone spectrale du proche IR 104

I. 2. Les familles de marqueurs fluorescents détectables dans le proche IR 105

I. 3. Les marqueurs fluorescents détectables dans le proche IR couplés ou en interaction avec des oligonucléotides 107

II. Les squaraines 108

II. 1. Rappels sur les propriétés et applications des squaraines 108

II. 2. Conception des squaraines et leur liaison aux oligonucléotides 109

II. 2. A. Structures des squaraines 109

II. 2. B. Stratégie de couplage et choix du bras de liaison 110

III. Synthèse des squaraines 111

III. 1. Synthèse des hétérocycles méthylés 111

III. 2. Synthèse des hétérocycles comportant le bras de liaison 112

III. 3. Synthèse des composés squaraine 113

III. 3. A. Choix de la voie de synthèse 113

III. 3. B. Synthèse des dioxo-squaraines 115

III. 3. C. Synthèse du dicyano-squaraine 117

IV. Caractérisation et propriétés d'absorption et de fluorescence des squaraines 118

V. Synthèse et propriétés des sondes oligonucléotidiques détectables à grande longueur d'onde 121

V. 1. Choix des séquences et de leur cible ADN simple et double brin 121

V. 2. Synthèse des 5'-conjugués oligonucléotide-squaraine 122

V. 2. A. Synthèse des oligonucléotides 5'- thiophosphate 122

V. 2. B. Couplage des squaraines sur les oligonucléotides 5'- thiophosphate 122

V. 3. Propriétés des 5'-conjugués oligonucléotide-squaraine 124

VI. Comparaison des propriétés de fluorescence des conjugués oligonucléotide-squaraine avec des conjugués de référence 128

VI. 1. Choix des fluorophores de référence 128

VI. 2. Synthèse et caractérisation des conjugués de référence 129

VI. 3. Comparaison des propriétés de fluorescence des conjugués 131

VI. 3. A. Emission de fluorescence 131

VI. 3. B. Influence du pH sur la fluorescence des conjugués 132

VI. 3. C. Influence de la température sur la fluorescence des conjugués 133

VI. 4. Etude des propriétés de fluorescence des conjugués après hybridation sur cibles simple et double brin 134

VI. 4. A. Etudes par dénaturation thermique 134

VI. 4. B. Etudes par fluorescence des conjugués hybridés 135

VII. Conclusion 136

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 137

CHAPITRE EXPERIMENTAL 140

A. Matériels et méthodes 141

A. 1. Solvants 141

A. 2. Chromatographie sur plaque 141

A. 3. Caractérisation des produits 141

A. 3. 1. Quantification des oligonucléotides 141

A. 3. 2. Spectrométrie par RMN et masse 142

A. 3. 3. Spectroscopies d'absorption et de fluorescence 142

A. 4. Systèmes chromatographiques de purification 143

A. 5. Stockage des produits 143

A. 6. Synthétiseur d'oligonucléotides 143

A. 7. Oligonucléotides commerciaux 143

B. Protocoles expérimentaux 144

B. 1. Synthèse de nouveaux marqueurs fluorescents détectables dans le proche infrarouge **30-33** 144

B. 1. 1. Synthèse du squaraine **SQBt** comportant des motifs benzothiazole **30** 144

B. 1. 2. Synthèse du squaraine **SQFBt** comportant des motifs 4-fluorobenzothiazole **31** 147

B. 1. 3. Synthèse du squaraine **SQFQ** comportant des motifs 6-fluoroquinoline **32** 150

B. 1. 4. Synthèse du squaraine dicyano **SQBtCN 33** 153

B. 2. Synthèse d'oligonucléotides 156

B. 2. 1. Synthèse d'oligonucléotides non modifiés 156

B. 2. 2. Synthèse d'oligonucléotides comportant un groupement thiophosphate en 5' 156

B. 2. 3. Synthèse d'oligonucléotides comportant un groupement thiophosphate en 3' 157

B. 2. 4. Synthèse d'oligonucléotides comportant un groupement thiol en 3' 158

B. 2. 4. 1. *Synthèse d'un nouveau support permettant d'obtenir une fonction thiol protégée en 3'* 158

B. 2. 4. 2. *Synthèse d'oligonucléotides comportant une fonction thiol protégée en 3'* 160

B. 2. 5. Synthèse d'oligonucléotides comportant deux groupements thiophosphate en 5' et 3' 160

B. 2. 6. Synthèse d'oligonucléotides comportant un groupement thiophosphate en 5' et une fonction thiol protégée en 3' 160

B. 2. 7. Synthèse d'oligonucléotides comportant une fonction amine en 3' 160

B. 3. Synthèse de conjugués oligonucléotide-fluorophore et oligonucléotide-inhibiteur 161

B. 3. 1. Couplage à des oligonucléotides comportant un ou deux groupements thiophosphates aux extrémités 5' et/ou 3' 161

B. 3. 2. Couplage à des oligonucléotides comportant une fonction thiol protégée en 3' 161

B. 3. 3. Couplage à des oligonucléotides comportant un groupement thiophosphate en 5' et une fonction thiol protégée en 3' 162

B. 3. 4. Couplage à des oligonucléotides comportant une fonction amine en 3' 162

B. 4. Mesures d'absorption et de fluorescence 163

B. 4. 1. Spectroscopie d'absorption 163

B. 4. 2. Spectroscopie de fluorescence 164

B. 4. 3. Conditions d'hybridation et mesures de Tm 164

REFERENCES 165

INTRODUCTION GENERALE

Depuis des milliers d'années, les hommes ont réalisé des manipulations génétiques pour la sélection d'espèces végétales ou animales sans même connaître l'existence des gènes. Cependant, la véritable révolution génétique n'est que toute récente, liée à la capacité de manipuler directement les acides nucléiques.

Depuis les travaux de Mendel puis de Morgan au 19ème siècle, plusieurs avancées scientifiques majeures ont contribué à une meilleure connaissance de la structure des acides nucléiques et de leurs fonctions. Les travaux d'Avery[1] et Chargaff[2] ont montré respectivement que l'acide désoxyribonucléique (ADN) est le constituant fondamental des chromosomes et qu'il comporte quatre molécules appelées bases nucléiques: l'Adénine, la Thymine, la Guanine et la Cytosine. En 1953, Watson et Crick[3] déterminent la structure spatiale de la molécule d'ADN, ce qui a permis de comprendre comment l'ADN est transmis de génération en génération. Suivent le déchiffrage du code génétique et les découvertes de l'ARN messager et du dogme fondamental de la biologie moléculaire.

L'apparition dans les années 70 du génie génétique a permis d'isoler et d'étudier les acides nucléiques de nombreux organismes. Ces travaux ont ensuite été facilités par le développement de techniques révolutionnaires telles que la PCR et le séquençage qui permettent respectivement d'obtenir un grand nombre de copies d'une molécule d'ADN à partir de celui contenu dans quelques cellules et de connaître l'enchaînement exact des nucléotides qui composent cet ADN. Un lien a été établi entre des altérations du génome et certaines maladies.

Le séquençage du génome humain[4, 5] en 2001 et de ceux d'un nombre sans cesse grandissant d'espèces animales, végétales, de bactéries et de virus donne accès à une grande quantité d'informations génétiques. Son décryptage peut donner accès à la compréhension du fonctionnement des gènes et à leurs dysfonctionnements, permettant ainsi de définir des profils de prédisposition à certaines maladies (cancers, diabète, obésité, alcoolisme, artériosclérose, maladies infectieuses, maladie d'Alzheimer, désordres mentaux…). Ces études sont facilitées par le développement de systèmes automatisés à forte capacité et haut débit, les puces à ADN, constituées d'un grand nombre de segments d'acides nucléiques ancrés sur des supports appropriés. La détection génétique possède un champ d'application immense, que ce soit bien sûr en diagnostic clinique mais également en recherche biologique ou pharmaceutique ainsi qu'en contrôle agroalimentaire. Le développement des OGM (plantes, bactéries) notamment pour l'agrochimie, l'industrie pharmaceutique et la production de biocarburants nécessitera une analyse génétique performante pour contrôler leur présence.

Des outils performants d'analyse des gènes et de leur fonctionnement sont donc nécessaires pour traiter spécifiquement un grand nombre d'échantillons. Affiner le diagnostic devrait permettre de mieux comprendre le fonctionnement des circuits métaboliques conduisant d'une mutation de l'ADN à une pathologie et de pouvoir envisager le développement de nouveaux traitements.

Les oligonucléotides, petits fragments d'acides nucléiques obtenus par synthèse chimique, sont des outils très utiles dans les domaines de la biologie moléculaire et du diagnostic et en tant qu'agents thérapeutiques. Le principe d'action des oligonucléotides repose sur leur capacité d'hybridation sur la séquence d'acides nucléiques complémentaire. D'autre part, la spectroscopie de fluorescence est une méthode sensible pour étudier les propriétés structurales et dynamiques des biomolécules et l'assemblage des complexes supramoléculaires.

Le but de ce travail de thèse est donc de contribuer au développement de nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes utilisables comme outils pour le diagnostic, l'analyse fine des acides nucléiques *in vitro* mais également *in vivo* par imagerie cellulaire. Ces sondes sont constituées d'oligonucléotides, obtenus par synthèse chimique, de séquences complémentaires à celle des cibles à détecter. La majorité des techniques d'analyse des acides nucléiques est basée sur les propriétés d'hybridation de ces sondes oligonucléotidiques sur support (puces à ADN) ou en solution. En effet, une sonde est capable de reconnaître une séquence unique parmi des millions d'autres.

Après un rappel des généralités sur les acides nucléiques et leur analyse par l'emploi de sondes oligonucléotidiques fluorescentes, les résultats seront présentés sous la forme de deux chapitres. Le premier porte sur la synthèse et les propriétés d'oligonucléotides formant des triples hélices (OFTs) conjugués à des cyanines monométhines pour la détection de doubles brins d'ADN, et le second sur la synthèse et les propriétés de conjugués oligonucléotide-squaraine émettant dans le proche infrarouge avec pour objectif la détection de séquences sur les ARNs à l'intérieur des cellules et de suivre leur trafic intracellulaire ou de les utiliser pour suivre l'internalisation d'oligonucléotides à but thérapeutique.

GENERALITES

A. STRUCTURE, SYNTHESE ET APPLICATIONS DES ACIDES NUCLEIQUES

I. Structures et fonctions des acides nucléiques

I. 1. L'ADN, support de l'information génétique

La continuité des caractères spécifiques de toute espèce, animale ou végétale, est assurée par la transmission des informations vitales lors de chaque division et renouvellement cellulaire et au cours des générations. Le matériel génétique contient ces informations sous la forme d'un code dont le déchiffrage doit permettre à chaque cellule de synthétiser les molécules nécessaires à sa structure et à son fonctionnement. Il se réplique avec précision afin que les informations soient transmises fidèlement d'une cellule à l'autre au cours des divisions successives et ainsi maintenir l'intégrité du génome, constitué par l'acide désoxyribonucléique (ADN). Chaque individu d'une espèce possède un caractère génétique particulier dont les séquences d'ADN spécifiques ne représentent qu'une infime proportion du génome.

Chez les eucaryotes, la quasi-totalité de l'ADN se trouve dans le noyau cellulaire sous la forme d'une double hélice. Le reste du patrimoine génétique de la cellule est représenté par de petites molécules d'ADN circulaire localisée dans les mitochondries et les kinétoplastes. La structure en double hélice de deux brins d'ADN possédant des séquences complémentaires est responsable non seulement de la stabilité de la macromolécule mais permet également le transfert de l'information génétique d'un brin d'ADN soit sur un autre brin d'ADN (réplication), soit sur un brin d'acide ribonucléique (ARN) messager (ARNm) (transcription). Dans ce dernier cas, l'information est ensuite traduite en structure polypeptidique lors de la synthèse des protéines dans les ribosomes. L'information génétique est fragmentée au niveau du gène en segments d'ADN appelés exons, que l'on retrouve au niveau de l'ARNm, séparés par des segments d'ADN qui n'ont pas de correspondance dans l'ARNm appelés introns (la plus grande partie du gène). Le transcrit primaire ou ARN prémessager subit une série de modifications qui conduisent à l'aboutement des exons et à l'élimination des introns. L'ARNm ne représente que 3 à 5 % de l'ARN total de la cellule. Ces trois grands mécanismes (réplication, transcription, et traduction) forment le dogme fondamental de la biologie moléculaire.

L'information génétique, nécessaire à la synthèse de chacun des constituants protéiques de la cellule, s'exprime par groupe de trois nucléotides ou triplets (64 possibles) qui codent pour des acides aminés. C'est le code génétique. Un gène regroupe donc un certain nombre de triplets pour coder une protéine. Chez les bactéries et les virus, les gènes sont constitués de segments d'ADN continus et occupent la quasi-totalité de l'ADN, n'étant séparés que par de très courts segments d'ADN qui servent au contrôle de leur fonctionnement. Chez les organismes eucaryotes, les gènes ne correspondent qu'à une faible partie de l'ADN dans les chromosomes alors qu'une grande partie de l'ADN intervient dans la structuration et la duplication des chromosomes. L'information codée est

imbriquée à des parties non-codantes, spécifiques de chaque individu d'où la notion de polymorphisme génétique. Chez l'homme, l'information génétique est contenue dans seulement environ 25000 gènes. Les gènes sont constitués d'une partie codante et d'une partie dite promoteur qui détermine où, quand et en quelle quantité la protéine sera produite. La production de centaines de milliers de protéines est contrôlée par les gènes. Les allèles sont les différentes formes que peut prendre un gène en un même locus (emplacement sur chromosome). Ils influent sur la différence entre génotype et phénotype.

I. 2. Les différentes structures d'acides nucléiques

I. 2. A. Le double brin

Elucidée par Watson et Crick en 1953[3], la molécule d'ADN est constituée de deux longues chaînes polynucléotidiques organisées en double hélice et formées par l'enchaînement de quatre nucléotides (constitués par un motif 2'-désoxyribose substitué en position β-anomérique par une base hétérocyclique) qui sont différenciés par la nature de leur base azotée : bases puriques (adénine A, guanine G), bases pyrimidiques (thymine T, cytosine C), (Figure 1). Les groupements phosphodiester permettent la liaison de la fonction 3'-hydroxyle d'un nucléoside avec la fonction 5'-hydroxyle du suivant. Généralement, une molécule d'ADN possède des quantités équimolaires de thymine et d'adénine, ainsi que de guanine et de cytosine car dans la plupart des cas (sauf cas de mutations) une base A fait face à une base T et une base G fait face à une base C.

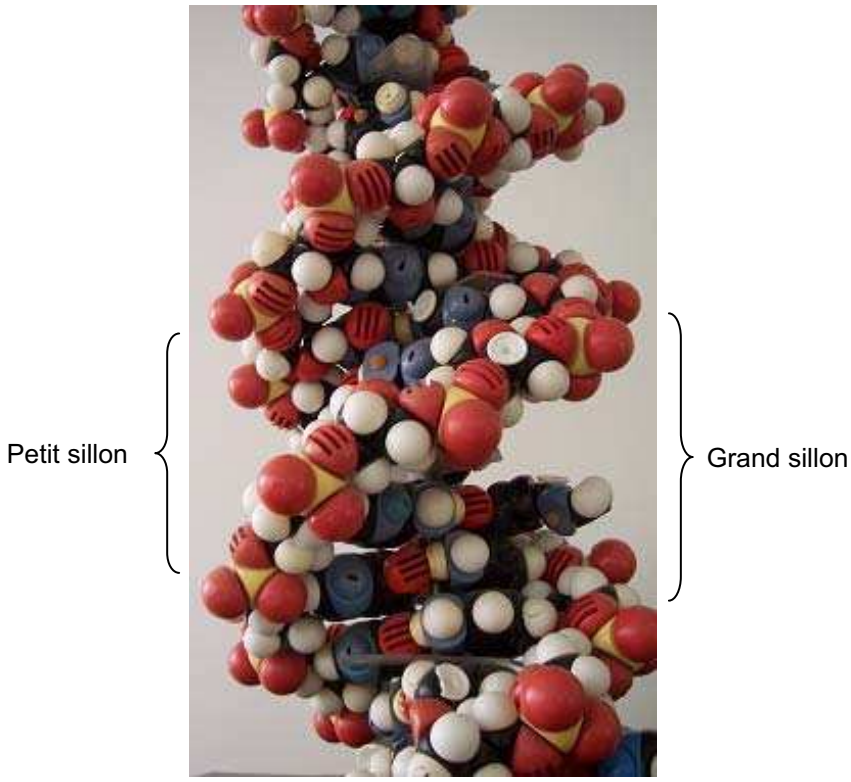
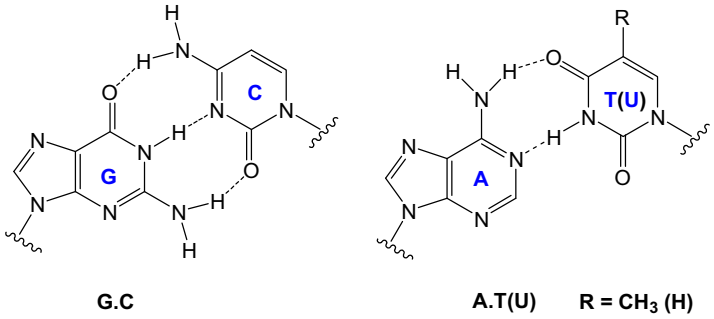


Figure 1 : Structure de la double hélice d'ADN.

Les deux chaînes sont appariées au niveau de leurs bases azotées par l'intermédiaire de liaisons hydrogène, trois entre les guanines et les cytosines et deux entre les adénines et les thymines (Figure 2). Une paire G-C est donc plus stable qu'une paire A-T. Les liaisons hydrogène sont des liaisons faibles qui peuvent être rompues par une élévation de température ou une modification du pH du milieu. Les deux chaînes complémentaires ont une orientation antiparallèle, l'une 5'→3' et l'autre 3'→5'. Par convention, une séquence oligonucléotidique est écrite dans le sens 5'→3'. La cohésion de la double hélice est également due aux forces d'empilement entre les bases. Les interactions entre les nuages d'électrons π des bases azotées donnent lieu à des interactions π-π (stacking). Le cœur de la double hélice est donc hydrophobe alors que l'extérieur (squelette phosphodiester) est hydrophile.



G.C **A.T(U)** **R = CH_3 (H)**

Figure 2 : Appariement des bases nucléiques en double hélice.

Il a été montré que les deux brins d'ADN peuvent être séparés par chauffage[6]. Ces expériences de dénaturation thermique permettent d'étudier la thermodynamique de la réaction d'hybridation. Il est ainsi établi que l'empilement π des bases nucléiques et la formation de liaisons hydrogène entre bases complémentaires contribuent à la stabilisation de la structure en double hélice.

L'ARN se différencie chimiquement de l'ADN par la présence d'un sucre ribose à la place du désoxyribose et par le remplacement de la thymine par l'uracile (U) qui ne possède pas de groupement méthyle en position 5. Il se trouve généralement sous la forme de mono-brins bien que plusieurs types d'appariements de brins d'ARN existent.

Outre les différentes conformations de doubles hélices (B, A, Z, …) où le pas et le compactage du double brin peuvent varier, les acides nucléiques peuvent également former des ensembles plus complexes telles que les triples hélices ou les tétrades.

I. 2. B. Triples hélices et tétrades d'ADN

La première description de la formation d'une triple hélice *in vitro* date de la fin des années 50 seulement quelques années après la découverte de la double hélice. Elle fut décrite par Felsenfeld et al.[7] en 1957 et correspondait au triplex poly rA-(poly rU)$_2$ en présence d'ions Mg^{2+}. Cette découverte a été le point de départ de nombreuses études sur les structures multi-brins de polynucléotides. La formation d'une triple hélice à partir d'une double hélice et d'un oligonucléotide synthétique (pyrimidique) n'a été décrite que dans les années 80[8, 9]. Il a été montré que de petits oligonucléotides peuvent s'hybrider dans le grand sillon d'une double hélice d'ADN. Une triple hélice intramoléculaire a également été décrite[10]. Depuis cette date, les triples hélices ont fait l'objet de nombreuses études en vue de leur utilisation en diagnostic et biotechnologie ainsi que pour réguler l'expression des gènes dans un but fondamental et thérapeutique[11]. Ce thème sera plus amplement développé au chapitre Résultats (§ **A. I.**).

Les tétrades sont généralement des quartets de bases nucléiques constitués de guanines maintenus par les liaisons hydrogène qu'engagent l'atome d'azote 7 et le groupement carbonyle en position 6 d'une guanine avec respectivement les atomes d'hydrogène en position 1 et 2 d'une autre guanine (Figure 3)[12]. Elles se forment à partir d'une ou plusieurs séquences riches en G (au moins trois contiguës) et d'ions sodium (Na^+) ou potassium (K^+) dont dépend la stabilité de la structure qui peut être à brins parallèles ou antiparallèles. Les ions sont complexés dans le canal formé au centre de la tétrade.

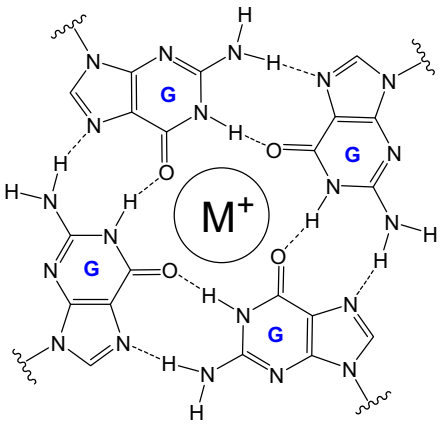


Figure 3 : Tétrade de guanines.

Ces structures particulières possèdent des rôles biologiques importants. L'extrémité des chromosomes de beaucoup d'organismes, dont l'être humain, nommée télomère, est composée d'une séquence répétitive $(TTAGGG)_n$ (n = 1000 à 3000) qui permet la formation de nombreuses tétrades[13]. A chaque cycle de division, cette extrémité se raccourcit pour aboutir finalement à la mort programmée de la cellule. Il a également été décrit que certaines tétrades particulières sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes[14].

I. 2. C. Autres structures

Les acides nucléiques peuvent également former des ensembles plus complexes telles que des structures de type tige-boucle. L'ARN peut prendre de nombreuses formes repliées différentes telles que les ARNs de transfert (ARNt) et les ribozymes. D'une manière générale, les acides nucléiques peuvent facilement se déformer pour interagir avec d'autres acides nucléiques ou biomolécules (protéines, ligands, …).

I. 3. Les mutations

La réplication de l'ADN est un mécanisme fiable qui est vérifié et corrigé par de nombreux processus enzymatiques mais l'apparition d'anomalies dans l'enchaînement des nucléotides y est quand même possible. Ces anomalies peuvent être des délétions (disparition d'un ou de plusieurs nucléotides) ou des mutations (changement de la nature d'un ou de plusieurs nucléotides avec une fréquence inférieure à 1 % dans une population). L'influence d'agents extérieurs tels que le rayonnement solaire ou l'exposition aux produits chimiques peut également être responsable de l'apparition de mutations dans des cellules spécifiques de l'organisme. Ces altérations du processus cellulaire sont à l'origine de l'apparition de différentes versions modifiées d'un même gène. Certaines de ces versions peuvent être responsables du développement d'une maladie alors que d'autres ne sont responsables d'aucune maladie et constituent le polymorphisme génétique et contribuent à l'évolution de l'espèce. Des mutations qui entraînent la synthèse de protéines anormales peuvent ainsi provoquer des maladies comme la drépanocytose (mutation de la β-globine des hématies) ou la maladie de Duchenne (mutation de la dystrophine, une protéine des tissus musculaires). La détection des Single Nucleotide polymorphism (SNPs), nucleotides spécifiques présents au sein d'une population avec une fréquence > 1 % (pouvant être séparés par plus de mille paires de bases invariables) est importante en milieu clinique.

II. Les oligonucléotides : acides nucléiques de synthèse

La synthèse de séquences d'oligonucléotides non modifiés peut être réalisée selon plusieurs méthodes. Elles sont basées sur l'assemblage des nucléotides, dans un ordre déterminé, par l'intermédiaire de liens phosphodiester reliant la fonction 3'-hydroxyle d'un nucléotide avec la fonction 5'-hydroxyle du nucléotide suivant (leurs autres fonctions réactives nécessitant d'être protégées) avec un rendement optimal obligatoire à chaque étape pour de longues séquences. Plusieurs familles d'oligonucléotides modifiés (§ **B. VI.**) nécessitent des voies de synthèse propres à chacune d'entre elles qui ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

II. 1. La synthèse en solution

Les premières synthèses d'oligonucléotides ont été réalisées en solution (en milieu homogène). La première méthode de couplage développée a été l'approche « phosphodiester »[15]. Khorana et *al.* ont décrit la réaction entre la thymidine 5'-phosphate et la 5'-*O*-tritylthymidine qui aboutit après déprotection au dinucléotide phosphodiester TpT chargé donc peu soluble dans les solvants organiques (Schéma 1). Un excès de monomère et des temps de couplage importants étaient nécessaires pour obtenir de courtes séquences oligonucléotidiques avec de bons rendements, après de longues purifications par chromatographie d'échanges d'ions. De plus, les couplages en série ribose ne se sont pas avérés satisfaisants, malgré la synthèse de gènes à l'aide de cette méthode quelques décennies plus tard[16].

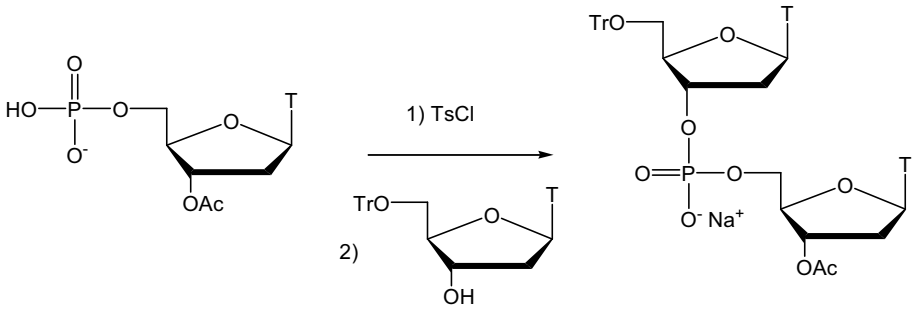


Schéma 1 : Approche « phosphodiester ».

Une autre méthode a alors été utilisée : l'approche « phosphotriester »[17], développée par Michelson et Todd, qui pallie les problèmes de solubilité dans les solvants organiques en estérifiant l'une des fonctions acides du groupement phosphoré internucléotidique. La 3'-*O*-acétylthymidine réagit avec la 5'-*O*-acetylthymidine 3'-*O*-benzylphosphorochloridate pour libérer après déprotection le produit TpT (Schéma 2). Des agents de couplage[18] plus performants dérivés du triazole ou du tétrazole ont été mis au point par plusieurs équipes dont notamment celles de Letsinger[19]. Plusieurs équipes ont fait progresser les étapes d'activation et de protection/déprotection, en utilisant des réactifs stables et solubles dans les solvants organiques. La structure triester apporte un gain de lipophilie et permet donc une purification plus aisée et protège de réactions parasites dues à la nucléophilie des phosphates.

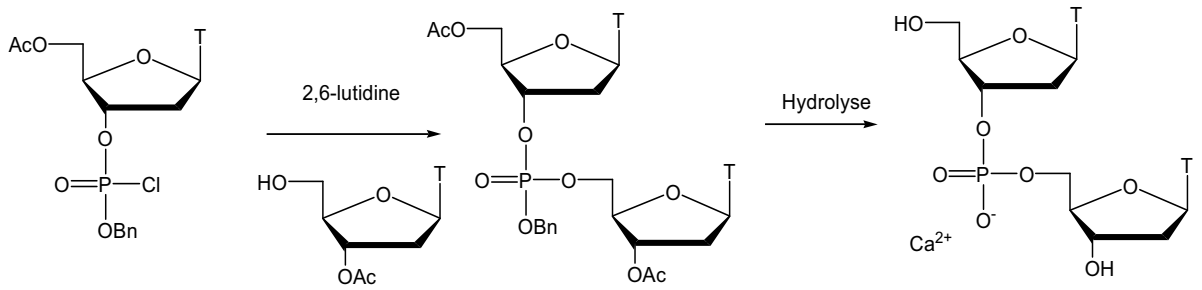


Schéma 2 : Approche « phosphotriester ».

D'autres méthodes basées sur l'utilisation de dérivés chlorophosphite[20] (degré d'oxydation III, phosphore trivalent) plus réactifs que les dérivés phosphate triester ont été développées, cependant les intermédiaires sont difficilement isolables et purifiables (Schéma 3).

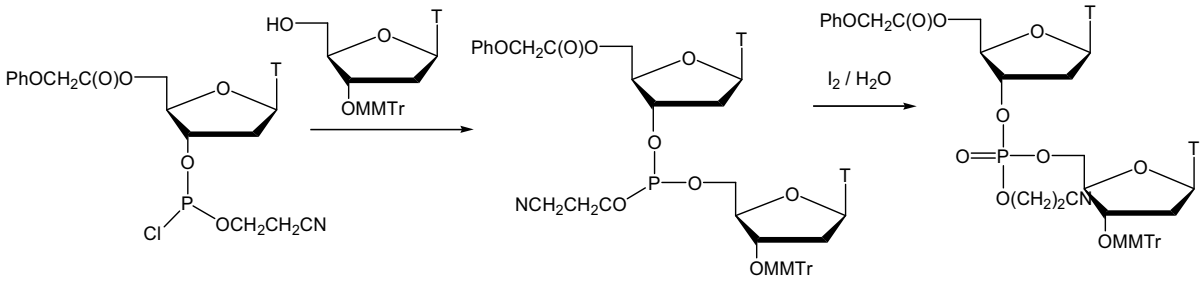


Schéma 3 : Méthode utilisant les chlorophosphites

La recherche de réactifs plus maniables a conduit à l'utilisation de phosphoramidites[21], plus faciles à préparer et à stocker mais qui nécessitent une activation pour le couplage. Toutes ces améliorations en solution ont contribué au développement d'une méthode de synthèse sur support.

II. 2. La synthèse sur support

La première synthèse d'oligonucléotides sur support a été réalisée par la méthode phosphotriester[22]. Les avantages de la synthèse en phase solide sont un temps de couplage plus court, une plus grande réactivité, la possibilité de travailler à une échelle micromolaire et un gain de temps (absence de purification à chaque étape). En contrepartie, elle exige un excès de réactifs plus important, des solvants et des réactifs d'une grande pureté. L'élongation de l'oligonucléotide est dirigée dans le sens 3'→5'.

L'utilisation des synthons phosphoramidite permet de réaliser le couplage (activation par une solution de tétrazole dans l'acétonitrile) à température ambiante. Beaucoup de laboratoires ont contribué à leur optimisation en généralisant la présence sur l'atome de phosphore du groupement *N*-diisopropylamino[23] (la stabilité de ces composés est directement liée à la taille des groupements *N*-alkyles[24]) et surtout à l'utilisation du groupement protecteur *β*-cyanoéthyle[25]. Une autre méthode sur support basée sur l'utilisation de synthons H-phosphonate sera détaillée au paragraphe § **A. II. 2. D.**.

L'automatisation de la synthèse sur support a été généralisée à partir du début des années 80[26].

II. 2. A. Les supports

De nombreux types de supports ont été développés notamment à base de silice[27] ou de disques de cellulose[28]. Le support le plus généralement utilisé est à base de verre à porosité contrôlée (CPG, dont la porosité est choisie en fonction de la taille de l'oligonucléotide à synthétiser)[29]. Le verre est fonctionnalisé en faisant réagir les résidus hydroxyle présents à sa surface avec le réactif silylé $EtO_3Si(CH_2)_3NH_2$. Le premier nucléoside est ensuite introduit par réaction entre les résidus amine et un groupement succinate en 3' du nucléoside. Cette fonction permet la libération de l'oligonucléotide

en fin de synthèse par traitement en milieu alcalin à température ambiante. Ce type de support peut être fonctionnalisé jusqu'à 70 µmol/g. Des supports composés de billes de polystyrène peuvent être utilisés pour des synthèses à grande échelle (capacité de 200 µmol/g).

II. 2. B. Protection des fonctions réactives de l'oligonucléotide pour la synthèse sur support

A chaque étape, les fonctions qui ne sont pas impliquées dans le couplage sont protégées pour éviter des réactions secondaires (Figure 4). L'hydroxyle à l'extrémité 5' du nucléotide ajouté est le plus souvent protégé par le groupement 4,4'-diméthoxytrityle[30] (DMTr), libéré en milieu acide (ex : solution d'acide dichloroacétique 2 % dans le dichlorométhane (DCM)). Il est possible de suivre le taux de déprotection par titration du cation tritylium libéré car il absorbe fortement dans le visible.

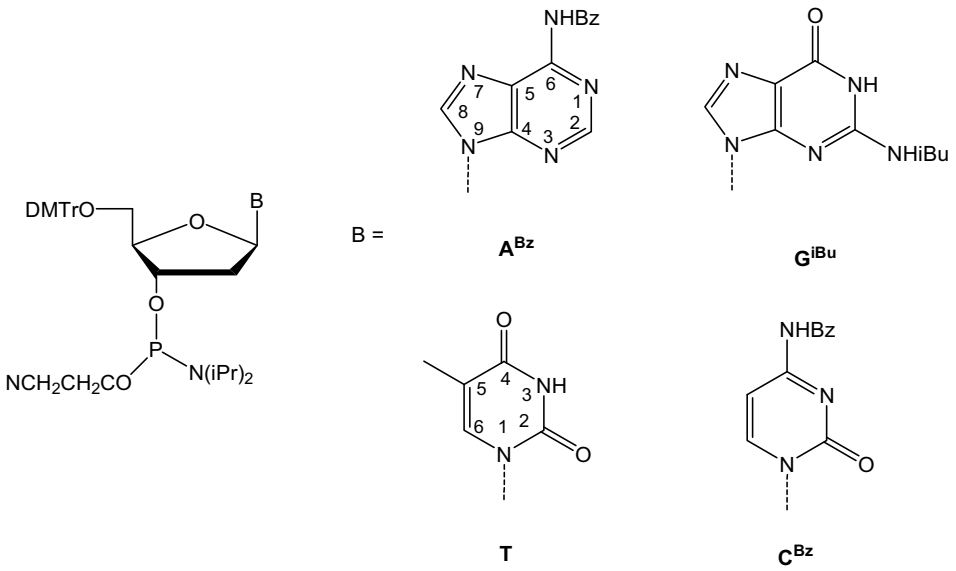


Figure 4 : Structure des monomères phosphoramidites pour la synthèse sur support.

Les fonctions amine des bases nucléiques A (position 6) et C (position 4) sont protégées par le groupement benzoyle[30] et celle de G (position 2) par le groupement isobutyryle[31], et sont libérées en fin de synthèse.

II. 2. C. Cycle de synthèse des oligonucléotides selon la méthode aux phosphoramidites

Le cycle de synthèse oligonucléotidique utilisant la chimie des phosphoramidites est un cycle de protection-déprotection comportant quatre étapes (Schéma 4). La première étape consiste à détrityler l'hydroxyle de l'extrémité 5' du nucléotide ou de l'oligonucléotide sur support en milieu acide (ex : solution d'acide dichloroacétique 2 % dans le DCM). Ces conditions permettent de minimiser le phénomène de dépurination (coupure de la liaison glycosidique des bases puriques en milieu acide).

Lors de la deuxième étape, l'hydroxyle précédemment déprotégé est mis en réaction avec le dérivé phosphoramidite du nucléoside à incorporer. Cette réaction est activée par une solution de tétrazole dans l'acétonitrile (le tétrazole est un acide faible qui protone le groupement diisopropylamino qui est alors substitué par l'ion tétrazolure formé). Ce nouveau phosphoramidite, beaucoup plus réactif, réagit

avec l'hydroxyle 5' de l'oligonucléotide sur support pour former le dérivé phosphite triester correspondant. Pour que le rendement global reste satisfaisant, le rendement de cette étape ne doit pas être inférieur à 98 %.

La troisième étape, dite de « coiffage », a pour but d'empêcher les fonctions alcool, qui n'ont pas couplé lors de l'étape précédente, de réagir lors du futur cycle de synthèse et ainsi réduire le nombre de séquences tronquées. Les 5'-hydroxyles n'ayant pas réagi sont acétylés, par exemple, par l'anhydride acétique en présence de *N*-méthylimidazole (NMI) dans un mélange THF/pyridine.

La quatrième étape est l'étape d'oxydation qui transforme la fonction phosphite triester, très réactive, en groupement phosphate triester beaucoup plus stable surtout vis-à-vis du traitement acide des prochains cycles. Le réactif employé est une solution d'iode dans un mélange THF/eau/pyridine.

La synthèse se poursuit en revenant à la première étape du cycle de synthèse.

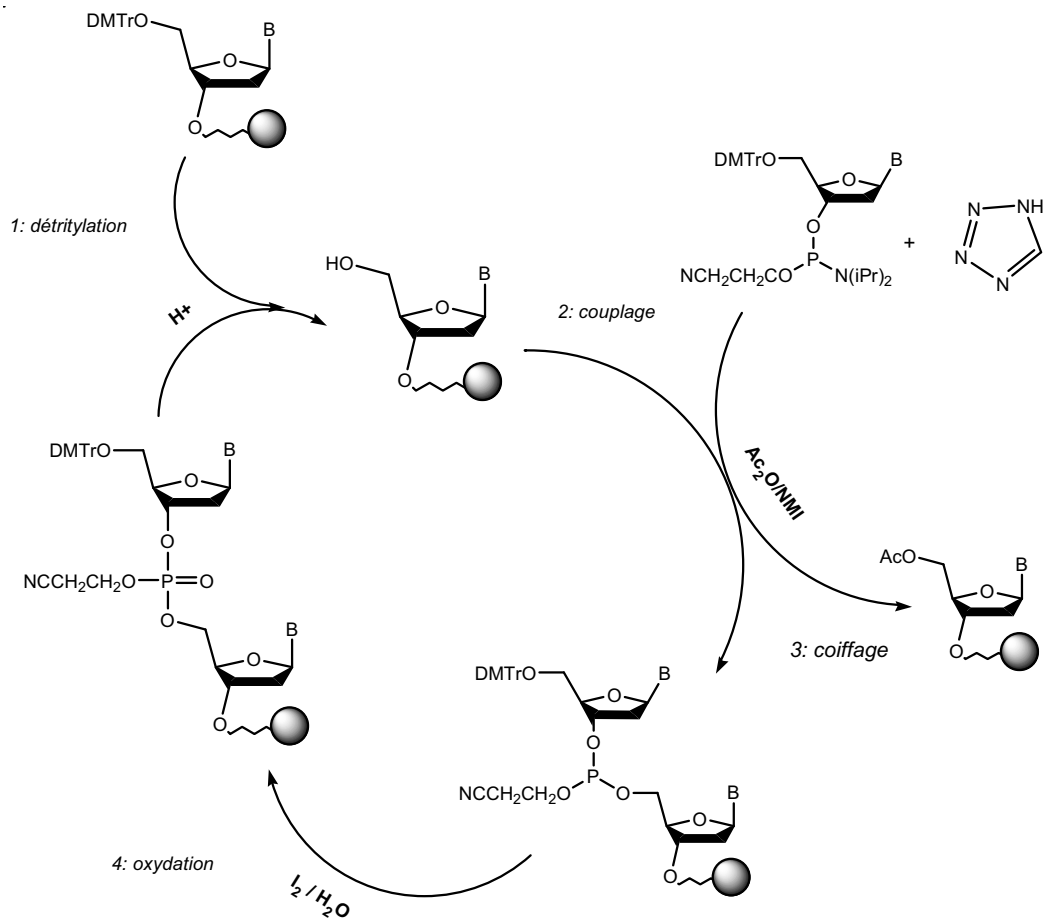


Schéma 4 : Cycle de synthèse d'oligonucléotides sur support par la méthode aux phosphoramidites.

Le groupe 5'-diméthoxytrityle peut être conservé en fin de synthèse (mode DMTr-on) pour faciliter les purifications ultérieures. L'oligonucléotide est alors déprotégé et libéré du support par un traitement à l'ammoniaque concentrée 28 % à 55 °C pendant 6 à 8 heures.

La méthode permet également l'incorporation de nucléosides modifiés, ce qui peut nécessiter la modification des différentes étapes du cycle de synthèse. La synthèse des ces oligonucléotides modifiés ne sera pas décrite.

II. 2. D. Méthode aux H-phosphonates

Au milieu des années 80, à partir de travaux antérieurs sur des anhydrides phosphorés mixtes[32], plusieurs équipes[33, 34] ont observé qu'un nucléoside 3'-H-phosphonate pouvait être couplé après activation pour donner rapidement le composé H-phosphonate diester correspondant avec de très bons rendements. L'étape d'oxydation a lieu à la fin de la synthèse juste avant la détritylation finale car les composés H-phosphonate diester sont suffisamment stables vis-à-vis des autres réactifs.

Plusieurs voies d'accès ont été développées dont notamment celle basée sur l'emploi du composé 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one (salicylchlorophosphite)[35]. Un anhydride mixte est formé par la réaction d'un large excès d'activateur (par exemple le chlorure de pivaloyle), sur le dérivé H-phosphonate. Cet anhydride, très électrophile, réagit avec l'hydroxyle 5' de l'oligonucléotide sur support puis l'élongation peut continuer (Schéma 5).

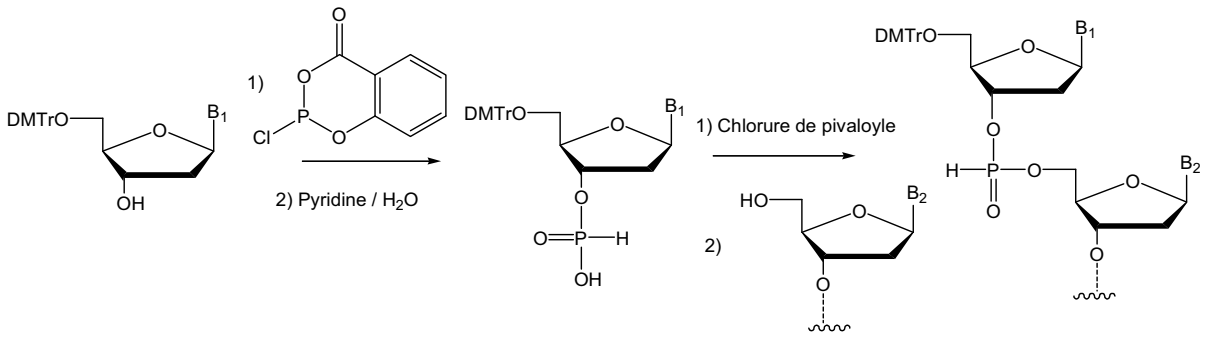


Schéma 5 : Méthode aux H-phosphonates.

L'avantage de cette méthode est un cycle court (4 min) mais nécessite une étape d'oxydation finale de plusieurs heures (0,1 M I_2 dans H_2O/Pyr 2/98). En revanche, le taux d'erreur (délétions, insertions et substitutions) semble supérieur à celui de la méthode aux phosphoramidites[36] et le rendement moyen de couplage légèrement plus faible. Aucune protection du phosphore n'est nécessaire.

Un composé H-phosphonate peut être oxydé en thiophosphate[37] ou être transformé en méthylphosphonate[38] ou en phosphotriester[39]. Les deoxynucléosides H-phosphonate sont également de bons précurseurs de phosphoramidates internucléotidiques[40]. L'utilisation alternée avec des phosphoramidites pour les couplages permet des modifications spécifiques à des sites déterminés dans la séquence[41].

III. Les applications des oligonucléotides

Les oligonucléotides sont utilisés pour étudier la structure des acides nucléiques ou l'interaction de ces derniers avec des protéines ou différents ligands. Ils sont également employés comme outils pour l'analyse fine des acides nucléiques (ex : séquençage), la biologie moléculaire, le diagnostic médical, en médecine légale, en biotechnologie. Les oligonucléotides sont également à la base du développement de plusieurs stratégies de régulation de l'expression des gènes dans un but fondamental et thérapeutique.

III. 1. L'utilisation d'oligonucléotides pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques

Le développement du séquençage a permis d'établir des cartes de variations génétiques humaines[42] et à ce jour, il a été déterminé que plus de 3000 maladies génétiques humaines sont causées par des mutations d'un seul gène. Une cible thérapeutique peut donc être un gène ou une protéine dont on pense que la stimulation ou l'inhibition de la production va empêcher la maladie de se développer. Or, la production des centaines de milliers de protéines humaines est contrôlée par les gènes. De nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation d'oligonucléotides ciblant les acides nucléiques ont été développées depuis une vingtaine d'années afin de réguler l'expression des gènes.

III. 1. A. Ciblage de l'ARN

La principale stratégie ciblant l'ARN est la stratégie antisens. Elle consiste à hybrider un oligonucléotide complémentaire sur une séquence définie de l'ARNm et ainsi bloquer la traduction du gène en protéine. D'autres oligonucléotides peuvent empêcher l'épissage d'un exon (saut d'exon) ou modifier la structure de l'ARN en se fixant dans des régions structurées[43]. Les oligonucléotides antisens[44] doivent être suffisamment résistants dans les conditions physiologiques afin de former des duplex stables avec l'ARN pour permettre le blocage de la traduction. Un autre mode d'action d'oligonucléotides antisens consiste à déclencher la destruction de l'ARNm par la ribonucléase H (RNase H)[45]. La RNase H régule la présence des ARNs dans la cellule en hydrolysant les brins d'ARN dans des complexes ADN/ARN (élimination des amorces d'ARN lors de la réplication de l'ADN dans le noyau). Les oligonucléotides naturels ne sont pas assez résistants vis-à-vis des nucléases en milieu cellulaire. Ils doivent donc être modifiés chimiquement pour être suffisamment résistants. Les principales modifications de la structure des oligonucléotides seront présentées au paragraphe § **B. VI.**. Cette stratégie a conduit au premier oligonucléotide médicament dirigé contre le CMV retinitis[46], virus de type herpès. D'autres oligonucléotides dirigés contre différentes pathologies sont au stade d'évaluation clinique. Les oligonucléotides antisens pourraient être utilisés comme agents antiviraux[47] ou comme agents antitumoraux[48].

La stratégie de ciblage de l'ARN englobe l'interférence ARN[49], les ribozymes[50, 51] (structure d'ARN double brin qui catalyse des réactions de coupure par transestérification au sein des ARNs) et les aptamères[52], approches généralement basées sur une reconnaissance d'une séquence d'ARN.

III. 1. B. Ciblage de l'ADN double brin

Cette approche connue sous le nom de stratégie anti-gène consiste à hybrider un oligonucléotide synthétique à l'ADN double brin pour former une triple hélice stabilisée par les liaisons hydrogène Hoogsteen[53]. Ce phénomène stoppe aussi bien la réplication que la transcription de l'ADN[54]. Les triples hélices empêchent également les enzymes et les protéines de se fixer sur l'ADN.

Cette approche présente un avantage important par rapport à la stratégie antisens : son activité car chaque cellule n'a en principe que deux copies d'un gène donné alors qu'un gène peut donner plus de mille copies d'ARNm qui sont transcrites continuellement ce qui implique la nécessité d'une concentration importante d'oligonucléotide antisens. De plus, à l'aide de cette stratégie, il est possible de manipuler le génome et notamment d'induire des recombinaisons et des mutations[55].

En revanche, la formation d'une triple hélice *in vivo* est désavantagée par le nombre de sites potentiels (hybridation restreinte le plus souvent sur des séquences cibles homopurine / homopyrimidine, chapitre Résultats § **A. I.**). De plus, l'affinité des OFTs pour leurs cibles est fortement influencée par des paramètres physico-chimiques et par les conditions intracellulaires défavorables à cette interaction.

III. 2. Outils pour la recherche fondamentale, l'analyse fine des acides nucléiques et pour le diagnostic

La recherche d'agents infectieux nécessite de détecter quelques molécules d'ADN appartenant à un agent pathogène parmi une quantité importante de molécules de même taille et de même composition chimique, mais possédant une séquence différente. Le décryptage et l'analyse des génomes d'organismes variés ont été entrepris notamment dans le but de comprendre leur structure et leur rôle dans le contrôle des mécanismes biologiques.

L'étude d'un seul gène du génome humain nécessite sa recherche dans un génome complet de plus de 3 milliards de nucléotides. Grâce à leur grande spécificité d'hybridation, les sondes oligonucléotidiques peuvent être utilisées pour détecter et suivre le développement de maladies génétiques, tumorales (dues à des anomalies dans le génome de cellules) et infectieuses (détermination de la charge virale, détection de génomes viraux et identification de virus mutants). L'analyse simultanée des allèles dans un grand nombre de sites du génome sert à en effectuer la cartographie et permet de caractériser chaque individu d'une espèce de manière spécifique et de procéder à son identification. La détection des allèles de sites polymorphes, souvent extérieurs aux gènes, permet de définir les marqueurs du polymorphisme de génomes et de réaliser les empreintes génétiques qui permettent d'identifier un individu par son ADN. La détection d'allèles de certains gènes sert au diagnostic anténatal des maladies héréditaires ou de la prédisposition à différentes pathologies. De nombreuses sondes oligonucléotidiques ont été employées à la détection de SNPs et des mutations[56, 57, 58].

L'apport des nanotechnologies à la médecine s'est traduit notamment par la conception de dispositifs d'analyse *in vitro* plus rapides et plus puissants comme les laboratoires sur puce à ADN[59]

(*lab on chip*) pour traiter le prélèvement, multiplier la quantité de matériel biologique et enfin reconnaître et quantifier les analytes.

Les puces à ADN qui permettent de fixer jusqu'à un demi-million de séquences différentes sur quelques cm² sont des outils d'analyse très puissants. Les informations obtenues peuvent être utilisées dans un but prédictif, de diagnostic et peuvent constituer une aide au développement thérapeutique. Leur utilisation permet de savoir quels sont les gènes exprimés dans une cellule donnée (détection des ARNm), ou d'identifier les bactéries présentes dans un échantillon d'eau potable (les sondes greffées sur la puce correspondent dans ce cas à des séquences d'ADN caractéristiques de chacune des espèces bactériennes).

Les oligonucléotides n'étant pas directement détectables, il faut leur incorporer des marqueurs sensibles pour analyser leurs interactions avec leurs cibles.

L'incorporation d'isotopes radioactifs (^{32}P, ^{35}S, ^{3}H, ^{125}I…) permet la détection de la sonde. Ces isotopes peuvent être introduits dans un oligonucléotide par réaction enzymatique (emploi d'ATP radiomarqué pour un marquage à l'extrémité 5' et des méthodes de marquage par « Random Priming » et par « Nick Translation » pour un marquage interne ou par réaction chimique pour greffer des ligands radiomarqués[60]). L'utilisation de sondes radioactives comporte des risques liés à la manipulation de matière radioactive et est limitée par le temps de demi-vie court des isotopes. De plus, la radioactivité émise par la sonde n'est pas spécifique de l'hybridation, les sondes non hybridées devant être éliminées pour éviter un bruit de fond.

C'est pourquoi la détection par fluorescence, méthode spectroscopique la plus sensible, connaît un essor considérable. Les techniques de détection par fluorescence sont en général non destructives. L'utilisation de molécules fluorescentes pour explorer la matière inanimée ou vivante a fait l'objet de développements considérables depuis les années 70. L'application de la fluorescence à l'analyse des acides nucléiques sera développée au chapitre suivant.

B. LES SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES FLUORESCENTES : SYNTHESE ET APPLICATIONS

Une sonde oligonucléotidique fluorescente est composée d'un oligonucléotide de séquence complémentaire d'un fragment d'acide nucléique à détecter et d'un marqueur fluorescent pour le détecter. L'interaction sonde-fragment repose sur une réaction d'hybridation moléculaire entre les deux séquences complémentaires. Du fait de leurs nombreuses applications en recherche fondamentale (pour l'étude de la structure et de la fonction des gènes), pour le diagnostic et pronostic médical, en biotechnologie et nanotechnologie, en médecine légale et dans le domaine agroalimentaire, le développement de sondes oligonucléotidiques fluorescentes fait l'objet d'intenses recherches.

Les techniques de fluorescence appliquées à l'étude des acides nucléiques ont été développées durant les années 80 lors des travaux sur le séquençage[61]. Les propriétés de fluorescence sont sensibles à la structure des oligonucléotides et aux interactions qu'ils engagent avec d'autres séquences d'acides nucléiques, des protéines ou d'autres petites molécules. Il est possible de moduler ces propriétés en modifiant chimiquement les paramètres de liaison entre les fluorophores et les oligonucléotides. De nombreux fluorophores sont utilisables et recouvrent l'ensemble de la plage du spectre visible de la lumière. Cependant, dans la majorité des cas, les marqueurs fluorescents produisent des signaux peu différents lorsque les sondes sont libres ou hybridées avec les séquences complémentaires. Il faut alors éliminer l'excès de sondes libres afin d'écarter la possibilité que le signal fluorescent observé soit dû à la sonde non hybridée, ce qui est peu compatible avec un certain nombre d'applications en particulier la détection de séquences spécifiques à l'intérieur des cellules vivantes. Afin de pallier ce problème, le développement de sondes oligonucléotidiques liées à des marqueurs produisant des signaux modifiés lors de l'hybridation a été entrepris. L'hybridation de la sonde s'accompagne d'une modification de l'environnement du marqueur qui entraîne une variation du signal (intensité ou déplacement du spectre) qui peut être utilisée comme signature de l'hybridation.

Les marqueurs fluorescents peuvent être liés en diverses positions de la sonde ou remplacer les bases nucléiques. Ces derniers sont notamment utilisés pour la détection de mésappariements et pour identifier la base opposée[62]. Ces fluorophores et analogues fluorescents sont très sensibles aux modifications des liaisons hydrogène et de l'empilement des bases[58]. Ces sondes sont donc largement employées pour la détection des SNPs et l'étude des mécanismes naturels des acides nucléiques[63].

I. Conception des sondes oligonucléotidiques

Une sonde oligonucléotidique est capable de s'hybrider spécifiquement, par association entre les bases complémentaires. Cet appariement s'effectue quelle que soit la proportion de la séquence cible dans l'échantillon exploré. La longueur de la séquence est un élément important à prendre en compte. Si cette dernière était trop courte, la séquence cible serait présente dans un plus grand nombre de cibles biologiques. Inversement, si la longueur de la sonde est trop grande, la sélectivité vis-à-vis de la cible diminue, la possibilité de formation de structures intramoléculaires augmente et le coût de la synthèse de la sonde est plus important. La longueur idéale d'une sonde correspond à environ 20 nucléotides, ce qui représente une probabilité quasi nulle de trouver deux séquences identiques dans le génome humain[64].

Une propriété importante d'une sonde oligonucléotidique est la température de demi-dissociation notée Tm[6] du complexe formé après hybridation avec la cible. Elle correspond à la température à laquelle 50 % des brins sont associés. Les liaisons hydrogène qui lient les bases nucléiques de chaque brin complémentaire peuvent être rompues par une élévation de température. Cette mesure est généralement déterminée par spectroscopie d'absorption (mais peut également l'être par fluorescence lorsque la détection est possible et si la fluorescence varie au cours de l'hybridation). La rupture de la double hélice induit une augmentation de l'absorbance (Figure 5).

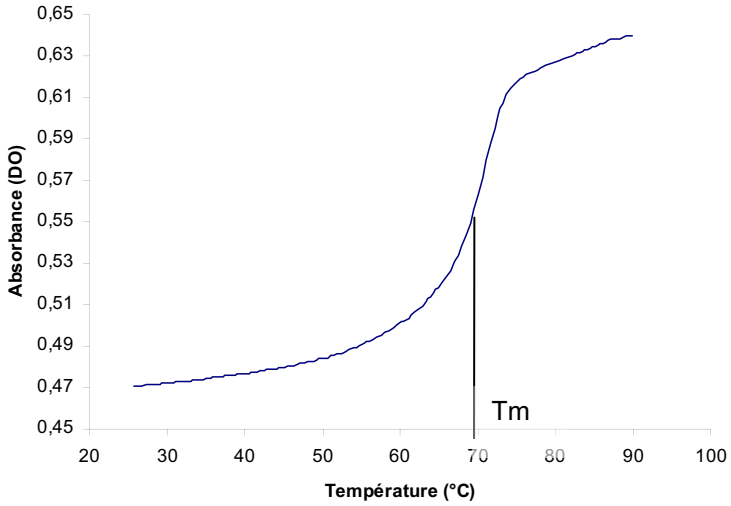


*Figure 5 : Exemple de courbe de Tm d'une double hélice (Chapitre Résultats § **A**. **X. 2.**, cible double brin du triplex **A**).*

La stabilité d'un complexe d'acides nucléiques dépend du nombre, de la nature et de l'enchaînement des paires de bases. La valeur de Tm augmente avec le nombre de paires de bases. Un complexe à bouts francs sera moins stable qu'un complexe dont un brin est plus long que l'autre. Une séquence riche en G et/ou C formera, à longueur égale, des hybrides plus stables qu'une séquence riche en A et/ou T. D'autres paramètres tels que la concentration, la force ionique (la répulsion électrostatique entre les charges négatives diminue lorsque la concentration en sels

augmente) ou encore le pH du milieu (ionisation des bases, destruction des liaisons hydrogène) influent sur la valeur de Tm.

La présence de mésappariements affecte également la stabilité d'un complexe d'acides nucléiques. Or, une analyse efficace des acides nucléiques par hybridation de sondes nécessite une discrimination parfaite entre les complexes parfaits et ceux possédant un faible nombre de mésappariements qui n'empêche pas l'appariement de la sonde (d'autant plus si les séquences sont riches en paires de bases G-C). De plus, les mésappariements terminaux sont beaucoup moins déstabilisants que les mésappariements centraux[65]. Il est possible de modifier les conditions de stringence (pH, température, concentration en sel) pour diminuer la possibilité de formation de complexes mésappariés. Il est toutefois nécessaire de développer des sondes capables de distinguer les complexes mésappariés des complexes parfaits.

II. La fluorescence

II. 1. Rappels de fluorescence[66]

Le phénomène de fluorescence moléculaire repose sur l'émission d'un signal lumineux par une molécule dans un état électronique excité singulet. Cette molécule est excitée par un rayonnement de longueur d'onde λ, produit généralement par une lampe ou un laser dont les photons possèdent une énergie $E = h\nu = hc/\lambda$ où c est la célérité de la lumière dans le vide, h la constante de Planck et ν la fréquence de vibration.

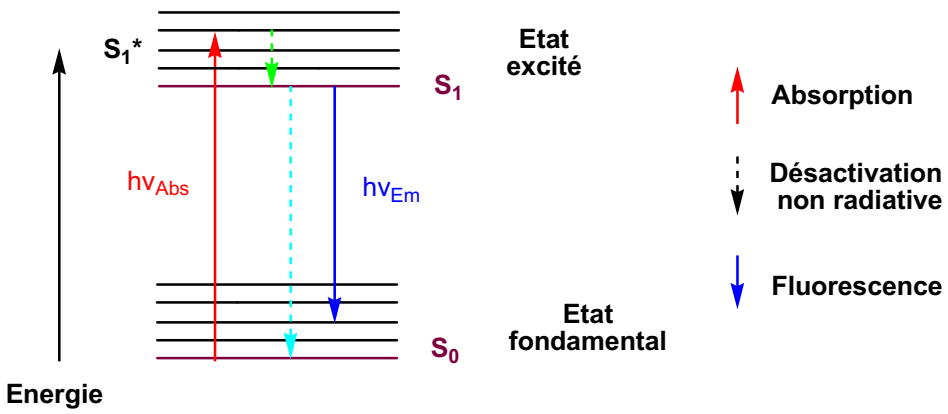


Figure 6 : Diagramme de Jablonski simplifié.

Lors de l'excitation, la molécule absorbe un photon et passe de l'état fondamental S_0 à un niveau d'énergie vibrationnel supérieur singulet dit état excité S_1* (de l'orbitale π à l'orbitale π*). La molécule se désexcite alors en deux temps : premièrement elle revient sur le niveau vibrationnel le plus bas de l'état excité S_1 par désactivation thermique non-radiative (désexcitation vibrationnelle et rotationnelle) puis dans un deuxième temps revient sur un niveau vibrationnel de l'état fondamental S_0 en émettant un photon d'énergie $h\nu$' inférieure à celle du photon absorbé (processus radiatif). Le phénomène de fluorescence, non destructif, peut être résumé à l'aide du diagramme de Jablonski (Figure 6).

Comme $h\nu' < h\nu$, alors $\lambda_{em} > \lambda_{abs}$ d'où le déplacement vers le rouge (vers les grandes longueurs d'ondes) du maximum d'émission de fluorescence par rapport au maximum d'absorption. Ce déplacement est nommé « déplacement de Stokes ». Son amplitude sera d'autant plus grande que la polarité du solvant sera élevée. Les spectres d'excitation et d'absorption coïncident sauf en cas de défauts de la lampe excitatrice, de présence d'impuretés ou de différentes formes de la molécule dans l'échantillon.

Les molécules peuvent se désexciter selon d'autres phénomènes non luminescents tels que la chaleur, transformation photochimique, transfert de proton ou d'électron, changement conformationnel…

Les molécules fluorescentes ou fluorophores sont généralement des molécules poly- ou hétérocycliques comportant des systèmes d'électrons π délocalisés et des groupements auxochromes (le plus souvent donneurs d'électrons).

II. 2. Les paramètres de la fluorescence

La fluorescence d'une molécule est caractérisée par différents paramètres mesurables dont les principaux sont :

- la longueur d'onde, les intensités et les formes des spectres d'émission et d'excitation (Figure 7) : la forme du spectre de fluorescence ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation contrairement à l'intensité de fluorescence. Le déplacement hypsochromique (vers le bleu) et bathochromique (vers le rouge) de la longueur d'onde du spectre d'absorption ou d'émission peut résulter de la stabilisation ou de la déstabilisation du niveau d'énergie fondamental à la suite d'interactions du solvant ou d'autres composés avec les orbitales électroniques du chromophore. La présence d'un point isobestique signale une transition entre deux espèces, sans qu'il y ait une espèce intermédiaire. Souvent une transition spectrale est caractérisée par la présence de plusieurs points isobestiques.

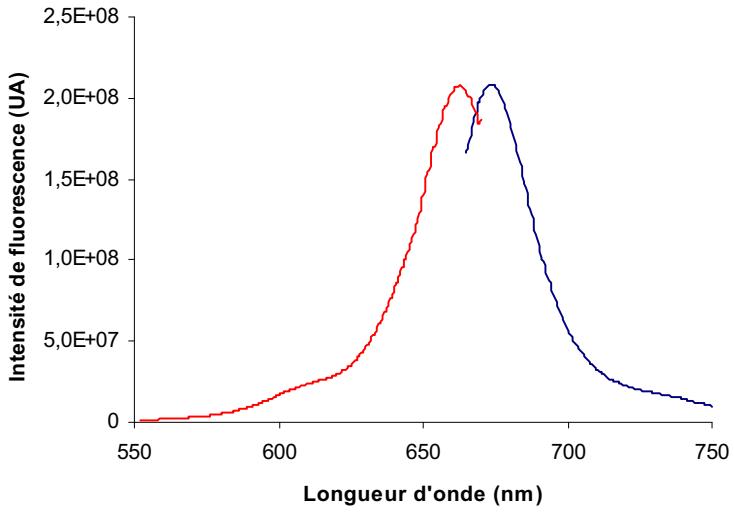


*Figure 7 : Exemples de spectres d'excitation et d'émission d'une sonde oligonucléotidique fluorescente (Chapitre Résultats § **B. V. 3.**, **13**$_{SQFBt}$).*

- le rendement quantique de fluorescence ϕ_F : égal au rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés et donc compris entre 0 et 1. Les molécules les plus fluorescentes (fluorescéine, rhodamine B) ont des rendements proches de l'unité. Cette propriété dépend du pH pour un composé en solution aqueuse et est calculé à partir de valeurs connues de densité optique et d'intensité de fluorescence d'un fluorophore de référence (Chapitre expérimental § **A. 3. 3.**).

- le temps de vie de fluorescence τ_F : temps moyen mis par une molécule excitée pour revenir à son état fondamental, compris généralement entre 0,1 à 100 ns. En général, une augmentation de la température provoque une diminution du rendement quantique et du temps de vie.

- le degré d'anisotropie de fluorescence : il décroît exponentiellement avec le temps, et peut être utilisé pour la détection de l'hybridation d'une sonde[67].

- les excimères : sont formés par collision d'une molécule excitée avec une molécule de même type non excitée (ex : pyrène, pérylène), dans le cas de solutions concentrées en chromophore. L'énergie d'excitation est alors délocalisée sur les deux molécules. Les exciplexes correspondent au même phénomène mais avec deux molécules différentes (par exemple anthracène et *N*,*N*-diéthylaniline).

- la technique du FRET[68] (Fluorescence Resonance Energy Transfer) a été développée par Förster à la fin des années 40. Elle fut d'abord utilisée avec des peptides à partir des années 70 avant d'être appliquée aux acides nucléiques au milieu des années 80. Ce type de marquage s'appuie sur l'utilisation d'au moins deux fluorophores, l'un est dit donneur d'énergie et l'autre est dit accepteur d'énergie (Figure 8), le spectre d'émission du premier devant recouvrir le spectre d'absorption du second et les orientations de leurs dipôles doivent être parallèles. L'efficacité du FRET dépend de la distance r entre les deux marqueurs, déterminée par la formule $1/[1 + (r/R_0)^6]$ ou R_0 représente le rayon de Förster, distance à laquelle 50 % de l'énergie d'excitation du donneur est transférée à l'accepteur (comprise généralement entre 10 et 100 Å). Cette technique permet d'obtenir un signal d'émission décalé par rapport à celui du donneur.

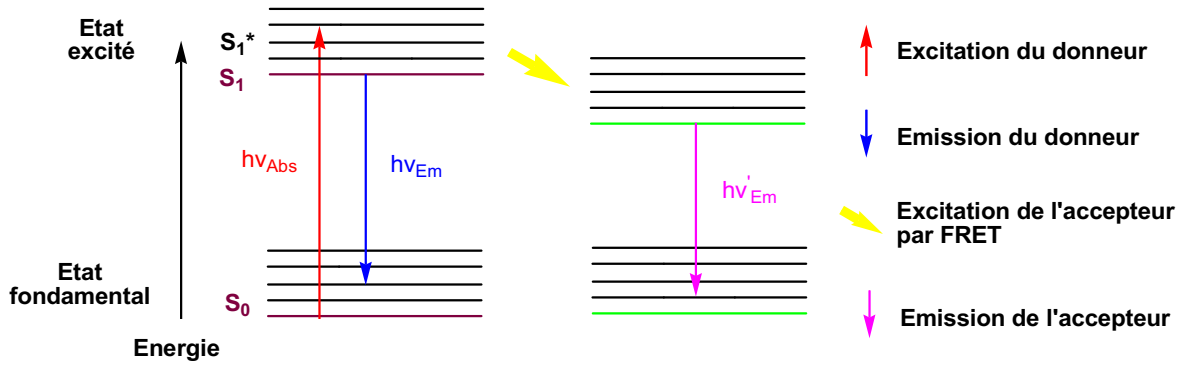


Figure 8 : Processus de transfert d'énergie non-radiatif (Förster).

C'est un outil couramment utilisé en biologie (étude antigène/anticorps, repliement des protéines, organisation de la membrane cellulaire, …). Cette technique peut être appliquée aussi bien en milieu homogène (cible et sonde en solution) qu'en milieu hétérogène (puces à ADN : cible en solution, sonde sur support). L'intensité de fluorescence, le temps de vie et le rendement quantique du donneur diminuent alors que ceux de l'accepteur augmentent[57].

De nombreux paramètres tels que la température, le pH, la polarité et la viscosité du milieu d'étude, les liaisons hydrogène ou encore la présence d'inhibiteurs de fluorescence (Figure 9) induisent des modifications du signal fluorescent et peuvent être étudiés à l'aide de sondes fluorescentes ce qui motive leur utilisation dans de nombreux domaines : physique, chimie, biologie moléculaire, médecine, environnement, industrie pharmaceutique…

- le phénomène d'inhibition de fluorescence entre deux marqueurs peut être basé sur deux modes :

Le mode statique (ou par contact) : la distance entre les deux marqueurs doit être inférieure à 20 Å. L'électron concerné ne parvient pas à l'état excité ce qui induit une diminution de l'intensité du rayonnement fluorescent de la molécule. Ce phénomène suit la théorie de l'exciton[69, 70] appliquée à des composés formant des agrégats de type H ou J ou des exciplexes dont l'état fondamental est hétérodimérique où l'énergie absorbée est dissipée principalement sous forme de chaleur. Le recouvrement entre le spectre d'absorption du donneur et le spectre d'émission de l'accepteur n'est pas nécessaire mais la forme de ces spectres est amplement modifiée lors de l'interaction[71].

Le mode dynamique (ou par transfert d'énergie) : la distance entre les deux marqueurs est comprise entre 20 et 100 Å. Deux principaux types de mode dynamique ont été décrits, celui dit de Dexter engendré par la collision du fluorophore avec l'inhibiteur après avoir reçu l'irradiation qui induit une baisse de l'intensité et du temps de vie du signal fluorescent, et celui dit de Förster dont le principe est proche de celui du FRET et qui dépend du recouvrement spectral et des moments dipolaires des marqueurs[72]. Dans ce dernier cas, la forme des spectres n'est pas modifiée lors de l'interaction.

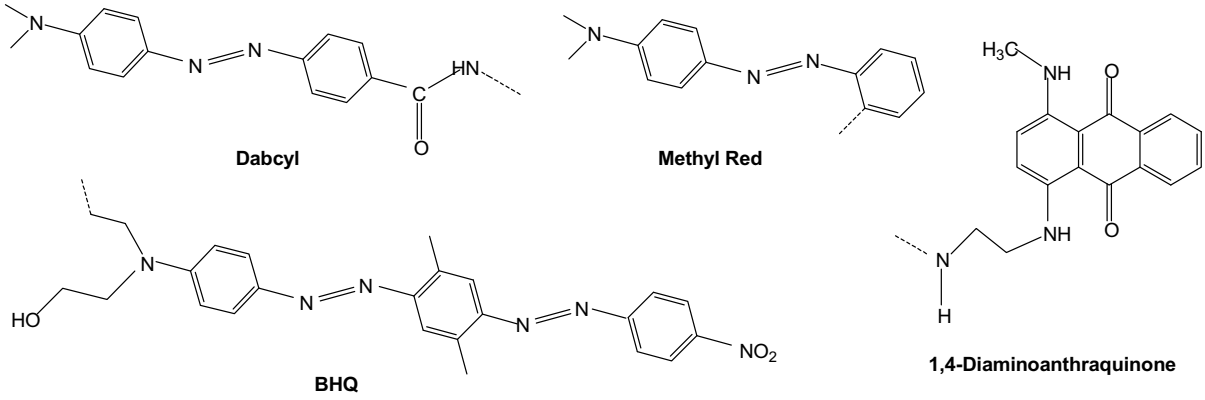


Figure 9 : Structures de quelques inhibiteurs de fluorescence.

Il a été prouvé que l'inhibition de fluorescence par contact est plus efficace que l'inhibition par FRET[72], et plus le duplex comportant le fluorophore et l'inhibiteur est stable, plus l'inhibition est efficace. L'inhibiteur est donc choisi en fonction du fluorophore ou inversement. L'efficacité de

l'inhibiteur est meilleure lorsque ce dernier possède un large spectre d'absorption et un coefficient d'extinction molaire important. De nombreux inhibiteurs ont été développés pour couvrir l'ensemble des spectres des fluorophores émettants dans le visible (dabcyl, BHQ, Methyl Red, …)[72] et des nanoparticules métalliques sont également en développement[73] (Figure 9).

Des Moléculars Beacons (MBs, § **B. 4. 1. B.**) possédant plusieurs inhibiteurs de fluorescence à l'une des extrémités (formant un complexe dit « superquencher »)[74] ont leur fluorescence augmentée de 250 fois après hybridation sur la séquence cible (pour environ 20 fois avec un MB classique). Une inhibition intramoléculaire a été observée dans le cas d'une sonde structurée en épingle à cheveux (decoy) marquée par des cyanines Cy5.5 qui forment un complexe dimérique lorsque la sonde n'est pas hybridée[75].

L'extinction ou la diminution de l'intensité du signal fluorescent par l'influence des nucléotides naturels est possible mais le phénomène est généralement moins important que lors de l'utilisation d'inhibiteurs de fluorescence synthétiques[76]. La daunomycine est un exemple de marqueur sensible aux paires de bases voisines[77]. Par exemple, la fluorescence des coumarines est éteinte par l'interaction avec les bases nucléiques[78]. L'inhibition de la fluorescence des fluorophores par les nucléotides dépend de la nature des bases environnantes (Ex : pyrène : A < G < T < C)[79] et la guanine est en moyenne la base la plus inhibitrice de fluorescence[72] (ex : la fluorescence de la fluorescéine à proximité de guanines est pratiquement éteinte). D'autres composés chimiques comme l'acrylamide, l'oxygène moléculaire, l'ion iodure ou le trifluoroacétamide qui éteint la fluorescence des résidus tryptophanes des protéines sont des inhibiteurs de fluorescence non spécifiques[80].

II. 3. Instrumentation[81]

Au cours du 20ème siècle, la microscopie de fluorescence est devenue une technique indispensable en biologie. Elle a connu une véritable révolution technologique avec la mise au point de microscopes, caméras et systèmes d'acquisition de plus en plus performants. Elle permet la visualisation de structures indétectables en microscopie optique conventionnelle et l'étude de phénomènes dynamiques, d'interactions entre macromolécules dans les cellules vivantes. Il est important de pouvoir visualiser l'expression des gènes, le cheminement des oligonucléotides thérapeutiques…

Diverses techniques de microscopie de fluorescence existent telles que la microscopie à épi-fluorescence, la microscopie confocale ou encore la microscopie de fluorescence à deux photons.

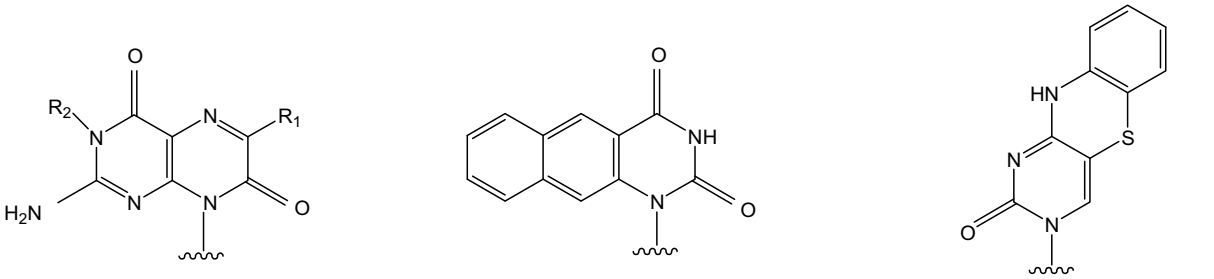
Les autres appareils de mesure de la fluorescence sont les spectrofluorimètres et lecteurs de microplaques, les scanners (ex : lecteurs de puces), les cytomètres (identification et quantification des cellules). Le progrès de l'instrumentation, dont notamment de nouveaux lasers, couplé à l'utilisation de sondes fluorescentes efficaces peut permettre de diminuer le seuil de détection à une seule molécule fluorescente dans certains cas.

II. 4. Les différentes classes de marqueurs fluorescents

Les nucléosides naturels n'étant que peu fluorescents, une détection par fluorescence nécessite de modifier chimiquement ou enzymatiquement les séquences oligonucléotidiques utilisées.

II. 4. A. Les analogues de nucléosides fluorescents

Il est possible de remplacer les nucléosides naturels par des nucléosides modifiés plus fluorescents[56, 82]. Ils sont généralement incorporés en une position choisie de la séquence oligonucléotidique par l'intermédiaire de leurs dérivés phosphoramidite ou H-phosphonate. Les bases modifiées[62] fluorescentes ont pour avantage de former des paires de bases spécifiques après hybridation et certaines possèdent des rendements quantiques de fluorescence (ϕ_F) relativement élevés (Figure 10). Les changements de fluorescence de sondes sensibles aux paires de bases voisines peuvent être utilisés pour discriminer les paires de bases parfaites ou imparfaites[58].



Pteridines **Benzo[g]-quinazoline-2,4-(1H,3H)-dione** **1,3-Diaza-2-oxo-phenothiazine**

Figure 10 : Exemples d'analogues de nucléosides fluorescents.

L'emploi d'analogues non-naturels de bases nucléiques s'est montré également efficace dans la détection de mésappariements où la fluorescence de ces composés, faible en présence de duplex parfait augmente fortement au voisinage d'un mésappariement[58, 63].

II. 4 .B. Les marqueurs fluorescents ou fluorophores

La recherche de nouveaux fluorophores absorbant et émettant dans les régions spectrales du visible et du proche infrarouge présente un grand intérêt en raison de leurs possibles applications en biologie, diagnostic médical et imagerie[83]. En plus d'une bonne adéquation avec la région d'absorption et d'émission recherchée, ils doivent posséder des coefficients d'extinction molaire et des rendements quantiques élevés. Les fluorophores les plus couramment employés[84] (Figure 11) sont les dérivés de la fluoresceine, de la rhodamine, de la série des BODIPYs et des cyanines polyméthines dont beaucoup sont commerciales (Cy^{TM}). Tous ces composés peuvent être utilisés pour un marquage post-synthétique d'oligonucléotides. La rhodamine est plus stable photochimiquement que la fluorescéine et ses propriétés varient moins en fonction du pH. Les séries de marqueurs BODIPY et Alexa Fluor® recouvrent toutes les longueurs d'onde du visible et sont également moins sensibles au pH que la fluorescéine[85]. La fluorescence des marqueurs tels que le

pyrène, la fluorescéine, les oxazines et flavines diminue généralement lorsqu'ils sont liés aux oligonucléotides alors que la fluorescence des cyanines monométhines augmente généralement après couplage.

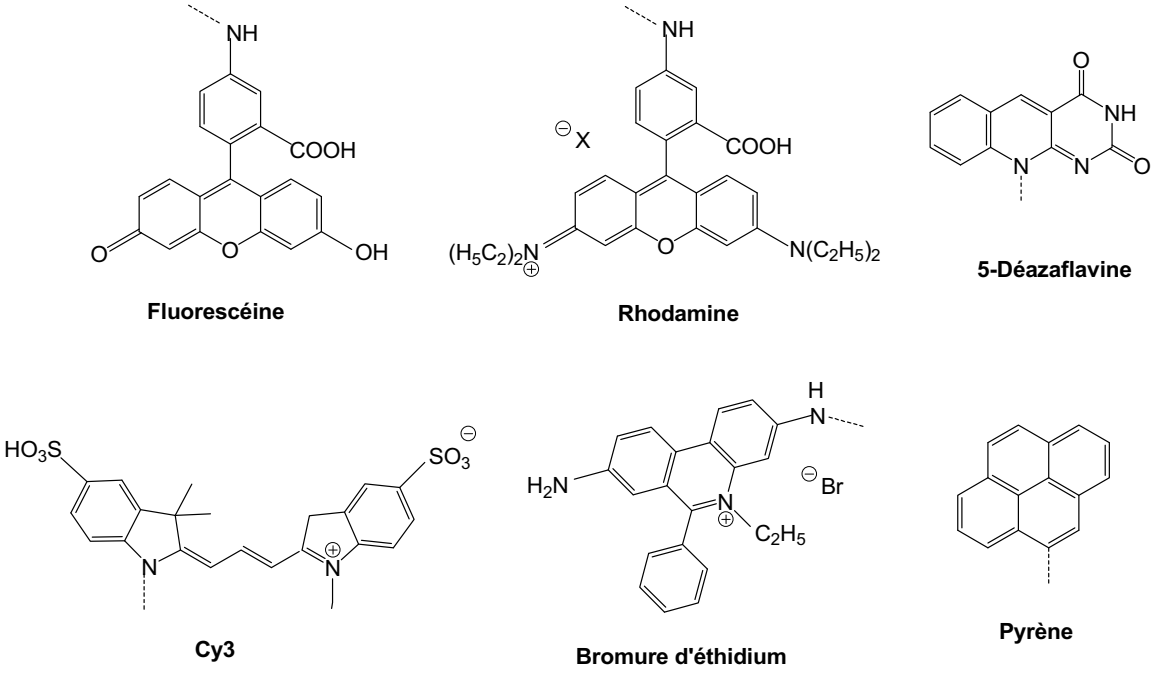


Figure 11 : Exemples de fluorophores couramment utilisés pour marquer les oligonucléotides.

Certains marqueurs possèdent des propriétés d'intercalation (bromure d'éthidium, HPAs, acridine, daunomycine, coumarines, …), d'autres se lient aux différents sillons des complexes d'acides nucléiques (DAPI, Hoechst, …)[86]. Le dérivé Hoechst 33258, un ligand du petit sillon, a été fixé en diverses positions d'oligonucléotides et après hybridation avec une cible simple brin d'ADN, une forte augmentation de fluorescence a été observée[87]. Des flavines (530 nm) et des déazaflavines (455 nm) ont été liées à l'extrémité 5' d'oligonucléotides comportant les quatre bases nucléiques. Une forte diminution de fluorescence (d'un facteur 20) a été observée après hybridation[88]. De nombreux exemples utilisant des nucléosides liés au pyrène ont montré l'importance du choix du bras de liaison entre le fluorophore et le nucléoside. Des conjugués oligonucléotide-pyrène se sont montrés intéressants pour distinguer les mésappariements des appariements parfaits[89]. La fluorescence d'oligothymidylates-pyrène augmente après hybridation avec leur cible d'un facteur 15[90]. Le polymorphisme d'insertion/délétion est également détecté par exemple par l'emploi de sondes fluorescentes composées de deux molécules de pyrène qui émettent un signal excimérique accru après hybridation avec une séquence possédant une erreur de type insertion ou déletion[91].

Des complexes de métaux de transition[92] émettent un signal luminescent important après hybridation et possèdent un temps de vie d'émission assez long (de l'ordre de la milliseconde) ce qui permet d'éliminer le bruit de fond (dispersion du signal, autofluorescence cellulaire) qui se produit à l'échelle de la nanoseconde. Des complexes du Ruthénium ont été couplés à des oligonucléotides. Une extinction du signal luminescent est causée par l'intercalation d'un des ligands du complexe de

Ru^{2+} dans la double hélice dans un environnement de guanines[93]. Les Quantum Dots (nanocristaux inorganiques semiconducteurs) possèdent des propriétés de luminescence uniques et notamment des temps de vie de fluorescence plus longs que les fluorophores organiques classiques[94], mais leur taille et leur toxicité sont souvent des facteurs limitants.

III. Les méthodes de synthèse des sondes oligonucléotidiques fluorescentes

L'incorporation du ligand peut s'effectuer suivant deux stratégies: lors de l'assemblage de l'oligonucléotide avant l'étape de déprotection *via* l'incorporation de leurs dérivés phosphoramidite ou H-phosphonate ou de supports modifiés ou après déprotection de l'oligonucléotide par réaction en solution sur une ou plusieurs fonctions adéquates incorporées aux sites choisis pour la liaison des marqueurs. Les propriétés des oligonucléotides fonctionnalisés dépendent beaucoup des paramètres de liaison qui doivent permettre une interaction optimale du ligand avec le complexe formé après hybridation. Leur spécificité d'hybridation ne doit pas être diminuée par la présence du ou des marqueurs. De nombreuses positions sont accessibles sur l'oligonucléotide : aux extrémités 3' ou 5' de la séquence, en position interne sur le sucre, au niveau des fonctions phosphate internucléotidiques, sur les bases hétérocycliques. Une fonctionnalisation aux extrémités est avantageuse dans le cas où une perturbation minimale de la structure est désirée. Une position plus interne à la séquence est plus favorable à l'interaction du ligand avec le complexe formé. D'une manière générale, le choix de la position du marqueur s'effectue en fonction des propriétés recherchées.

III. 1. Incorporation directe du marqueur à l'oligonucléotide lié au support au cours de l'assemblage

Cette méthode n'est utilisable que si le marqueur résiste aux conditions d'assemblage et de déprotection de l'oligonucléotide. La molécule à coupler doit également être soluble dans le solvant de réaction (acétonitrile le plus souvent) et être disponible en quantité relativement importante. De plus, sa présence ne doit pas gêner le couplage suivant. Plusieurs méthodes d'incorporation directe[95] en diverses positions prédéfinies ont été développées et passent par l'utilisation de supports modifiés comportant le ligand, de dérivés phosphoramidite ou H-phosphonate du ligand, d'un nucléoside modifié comportant le ligand ou d'analogues de nucléosides naturels. De nombreuses positions des nucléotides ont été utilisées (sur les bases nucléiques en positions 2, 6, 7 et 8 des purines et en positions 4 et 5 des pyrimidines, sur la position 2' du sucre).

Des hydrocarbures aromatiques polycycliques ont été introduits par l'intermédiaire de dérivés phosphoramidite ou H-phosphonate préalablement substitués en position anomérique d'un 2'-désoxyribose (pyrène, phénantrène, naphtalène)[96], (pérylène)[97]. Le pyrène a également été fixé sur plusieurs bases nucléiques naturelles[98] et également par l'insertion d'un lien non naturel à la place d'un nucléoside[91]. Afin d'incorporer des ligands (acridine, psoralène, pyrène, anthraquinone, fluorescéine, …) à l'extrémité 3' de l'oligonucléotide au cours de l'assemblage, il est possible d'employer des supports modifiés[95, 99] dont certains sont commerciaux.

Plusieurs équipes ont développé des réactifs afin d'introduire le ligand directement sur colonne après élongation de la séquence sur support. Il est possible d'obtenir des séquences possédant des marqueurs différents à partir d'une seule synthèse d'oligonucléotide. Un couplage alcyne-alcyne catalysé au cuivre permet de coupler un marqueur (fluorescéine, anthraquinone, biotine) à une base modifiée introduite au cours de la synthèse[100]. Il est également possible d'utiliser des bases modifiées comportant des groupes photolabiles afin d'incorporer à l'oligonucléotide sur support des fonctions réactives amine ou acide carboxylique[101] permettant le couplage du ligand correspondant après irradiation à la fin de l'élongation.

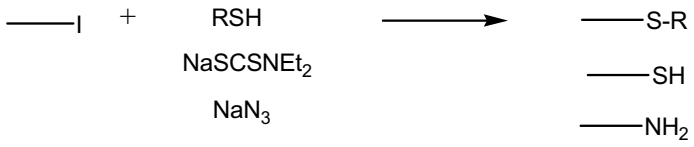


Schéma 6 : Réactivité des 5'-iodo-oligonucléotides sur support avant déprotection.

Des conjugués comportant le naphtalène ont été obtenus à partir des 5'-iodo-oligonucléotides[102] (Schéma 6).

III. 2. Couplage du ligand sur l'oligonucléotide déprotégé[103, 104, 105, 106]
(Figure 12 et schéma 7)

De nombreux ligands ne peuvent pas supporter toutes les conditions réactionnelles des méthodes de synthèse oligonucléotidique et notamment les conditions de déprotection. C'est pourquoi l'introduction post-synthétique de ligands est particulièrement intéressante pour obtenir les conjugués visés. De plus, de nombreux ligands ne sont pas assez solubles ou ne sont disponibles qu'en petites quantités et la préparation des analogues de nucléosides pour la synthèse automatisée peut prendre beaucoup de temps. Dans la grande majorité des cas, un bras de liaison est utilisé pour greffer le ligand car les oligonucléotides non modifiés ne présentent pas de fonctions susceptibles de réagir sélectivement et efficacement. De plus, le bras de liaison a une influence importante sur les propriétés de l'oligonucléotide conjugué. Ce bras peut être fixé au marqueur ou à l'oligonucléotide. Il peut également se composer de deux parties, une sur l'oligonucléotide et l'autre sur le marqueur.

La fonction réactive peut être introduite au cours ou à la fin de l'assemblage à l'aide le plus souvent de dérivés phosphoramidite ou H-phosphonate et des supports modifiés préalablement synthétisés ou commerciaux. C'est pourquoi de nombreux supports modifiés ont été développés qui permettent d'obtenir après déprotection un oligonucléotide dont l'hydroxyle à l'extrémité 3' est fonctionnalisé. De nombreuses fonctions réactives peuvent être obtenues par l'intermédiaire d'un support modifié[95, 99, 107]. La réaction de couplage du marqueur s'effectuera sur l'oligonucléotide purifié en milieu aqueux ou en milieu organique en présence d'éthers couronne pour solubiliser l'oligonucléotide[56].

D'une façon générale, les positions fonctionnalisables sont : les extrémités 5' et 3', le phosphate internucléotidique, le sucre en 1' et 2', les bases nucléiques (aux positions 4 et 5 des pyrimidines ; 2 et 7 des guanines ; 2, 6 et 7 des adénines) (Flèches rouges, figure 12). La fonctionnalisation aux positions 2 des guanines, 6 des adénines et 4 des pyrimidines peut gêner la formation des liaisons hydrogène lors de l'hybridation avec des brins d'acides nucléiques (Flèches bleues, figure12).

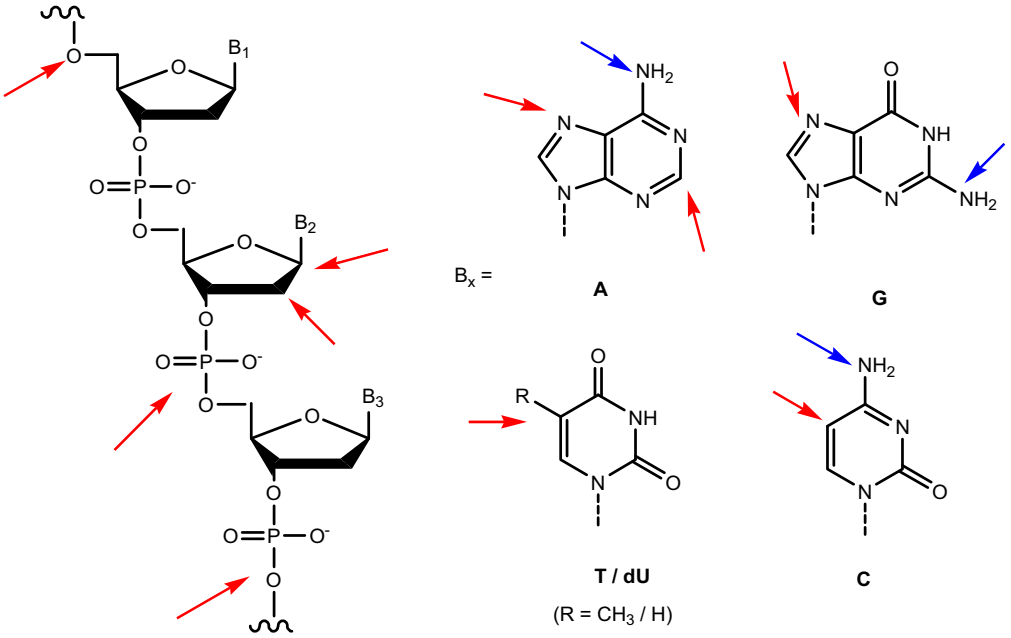


Figure 12 : Positions d'insertion de fonctions réactives sur les oligonucléotides dans le but d'un couplage après déprotection.

Des fonctions amine peuvent coupler avec des ligands comportant des groupements isothiocyanate, ester activé, (anhydride mixte), aldéhyde en présence d'un agent réducteur (ex : $NaBH_3CN$). Il est également possible de les modifier à l'aide de réactifs tel que le CDI[108] pour ensuite les coupler à d'autres fonctions amine.

Des fonctions thiophosphate et thiol peuvent réagir avec des ligands comportant des groupements halogénure d'alkyle, disulfure, iodoacétamide, halogénoacétyle, maléimide. La fonction thiol est plus réactive que la fonction thiophosphate, cette dernière étant plus réactive lorsqu'elle se situe aux extrémités plutôt qu'en position internucléotidique. Dans ce dernier cas, un mélange de deux diastéréoisomères est obtenu.

Une fonction azide peut coupler avec des ligands comportant des groupements alcyne vrai (click chemistry). Une fonction aminooxy peut coupler avec des ligands comportant des groupements aldéhyde. Une fonction acide carboxylique peut réagir à l'aide d'un réactif de couplage avec des fonctions amine. Les groupements phosphate terminaux peuvent réagir à l'aide d'un réactif de couplage avec des ligands comportant des fonctions amine.

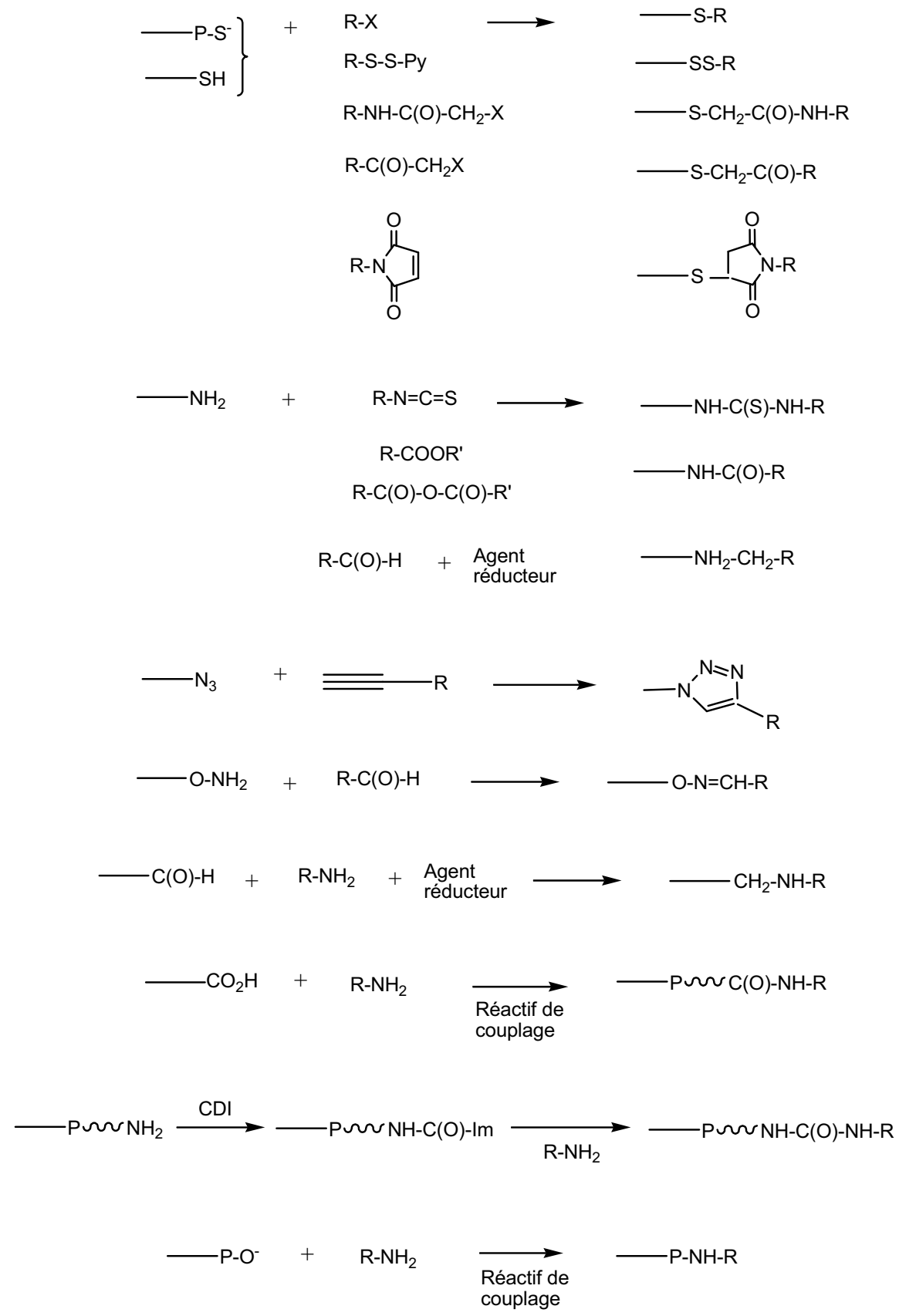


Schéma 7 : Liste non exhaustive des fonctionnalisations possibles après déprotection des oligonucléotides.

III. 3. Polymarquage

Il est possible d'effectuer différents types de polymarquage de l'oligonucléotide[109]. Plusieurs dérivés phosphoramidite ou H-phosphonate comportant des ligands identiques ou différents peuvent être incorporés au cours de la synthèse. Plusieurs ligands identiques peuvent être couplés sur plusieurs fonctions réactives identiques après déprotection. Il est également possible de coupler des ligands différents sur des fonctions réactives correspondantes introduites au cours de la synthèse. Des combinaisons de méthodes d'incorporation directe et après déprotection sont également envisageables. D'une manière générale, la mise au point des polymarquages n'est pas évidente. Il faut choisir judicieusement les positions d'ancrage des ligands, leur présence ne doit pas faire chuter les rendements de couplage. De plus, la purification d'oligonucléotides polymarqués s'avère compliquée. Il a été décrit que la fluorescence de certains marqueurs peut être inhibée lorsqu'ils se trouvent à proximité les uns des autres, d'autant plus si ces marqueurs sont hydrophobes (le rendement quantique d'un oligonucléotide polymarqué avec la cyanine commerciale Cy3 est maximal lorsqu'elle est incorporée toutes les 6 paires de bases[110]).

IV. Les principaux formats d'hybridation

IV. 1. Sonde unique

IV. 1. A. Sonde linéaire (Schéma 8)

La sonde la plus simple est composée d'un oligonucléotide auquel est greffé un fluorophore (**I**). Le fluorophore doit émettre un signal modifié après hybridation afin de distinguer la sonde libre du complexe qu'elle forme avec sa cible. Ces fluorophores sont généralement des intercalants mais également des complexes organométalliques. Le fluorophore peut être couplé aux extrémités, en position internucléotidique, sur ou à la place d'une base nucléique.

Il est possible de produire un signal fluorescent modifié après hybridation, basé sur le phénomène de FRET, avec une sonde linéaire comportant un accepteur de fluorescence et un intercalant de l'ADN ou un ligand du sillon donneur de fluorescence[111] (**II**). L'efficacité optimale est obtenue avec un intercalant (ex : dérivé du YO) toutes les deux paires de bases qui interagit avec le second fluorophore fixé par liaison covalente aux sondes (ex : marquées avec un dérivé du TO). Des nanotags[112] très fluorescents sont ainsi conçus dont le coefficient d'extinction molaire peut atteindre le million et peuvent être utilisés en cytométrie afin de marquer les membranes cellulaires. Dans le cas où les deux marqueurs fluorescents sont des intercalants non liés aux acides nucléiques, il est possible qu'ils interagissent entre eux par FRET sans recouvrement de leurs spectres (§ **B. II. 2.**). Ils doivent se trouver dans des sites d'intercalation proches et la présence des bases nucléiques entre eux doit empêcher l'inhibition de fluorescence par contact.

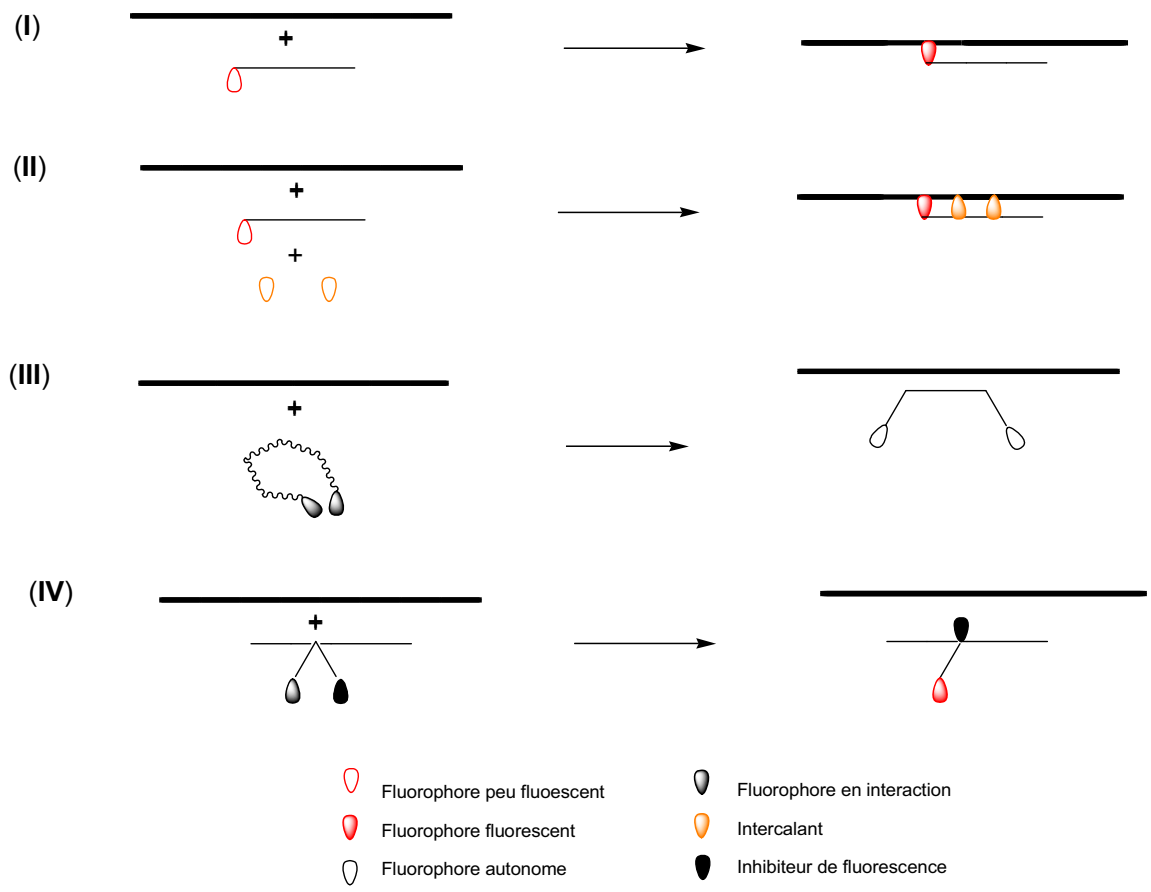


Schéma 8 : Formats d'hybridation des principales familles de sondes oligonucléotidiques fluorescentes linéaires.

Le polymarquage d'une sonde avec plusieurs fluorophores identiques induit une forte augmentation de l'intensité de fluorescence de la sonde. Il est souvent nécessaire d'éloigner les fluorophores les uns des autres afin d'éviter une inhibition de fluorescence par contact[56]. Des sondes comportant deux molécules de pyrène peuvent être utilisées pour étudier l'affinité et la cinétique du phénomène d'hybridation où la formation et l'intensité du signal excimérique dépend de la structure du complexe.
Le random coil est une sonde où les donneurs et accepteurs de fluorescence sont accrochés aux extrémités du même oligonucléotide (**III**). Les extrémités se retrouvent en contact en solution (courbure de la sonde) ce qui induit un transfert d'énergie. Après hybridation, les deux extrémités se retrouvent éloignées et les deux fluorophores deviennent alors autonomes[113]. Un système voisin est composé d'une sonde comportant un fluorophore et un intercalant inhibiteur de fluorescence (**IV**). Le signal fluorescent est éteint lorsque la sonde est libre (les deux marqueurs se trouvant à proximité l'un de l'autre). Lors de l'hybridation de la sonde avec sa cible, l'inhibiteur s'intercale et s'éloigne du fluorophore qui émet un fort signal fluorescent[114, 115].

De nombreuses évolutions des sondes ont été entreprises afin d'améliorer la discrimination du bruit de fond, la sélectivité et la limite de détection mais leurs concepts et leurs synthèses sont souvent plus compliqués.

IV. 1. B. Sonde changeant de forme par hybridation compétitive (Schéma 9)

Les sondes dites « Sunrise Primer », utilisées en PCR (§ **B. V. 1.**) afin de diminuer le nombre d'amorces marquées et donc le coût de l'expérience, possèdent une structure en épingle à cheveux dont l'extrémité 5' porte le fluorophore et l'inhibiteur de fluorescence (Ex : respectivement fluorescéine et dabcyl) et permet de détecter le signal à partir de 10 molécules[116]. La sonde TaqMan® (commerciale) exploite l'activité 5'-3'-exonucléase de l'enzyme Taq DNA polymérase pour effectuer l'amplification de la cible et générer le signal fluorescent[117]. La sonde possède un fluorophore à l'extrémité 5' et un inhibiteur de fluorescence à l'extrémité 3'. Une fois la sonde hybridée sur la séquence cible, le complexe est alors digéré par l'enzyme et le signal fluorescent est émis du fait de l'éloignement de l'inhibiteur du fluorophore lorsque la sonde hybridée est hydrolysée.

Les Molecular Beacons (MBs)[118] sont constitués d'une séquence oligonucléotidique où à chaque extrémité est greffé soit un accepteur (inhibiteur de fluorescence (**VI**) ou fluorophore[119] (**V**)) soit un donneur (fluorophore) de fluorescence. La partie centrale de la séquence est complémentaire de la cible alors que les deux extrémités sont autocomplémentaires et forment le pied du MB (en moyenne de 5 à 8 paires de bases). Le MB se retrouve donc dans une conformation dite de tige-boucle à l'état libre où le donneur et l'accepteur sont en contact. La fluorescence du donneur est donc inhibée ou modifiée (§ **B. II. 2.**). En revanche, en présence de la cible, le MB s'ouvre et s'hybride sur la séquence cible car ce nouveau complexe est plus stable que le MB replié du fait du plus grand nombre d'appariements formés.

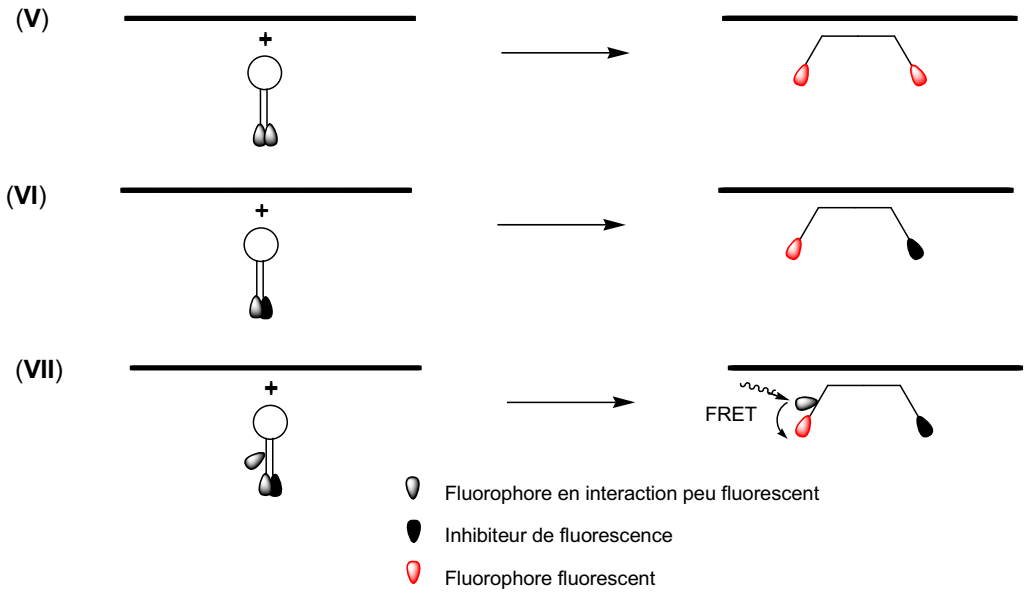


Schéma 9 : Formats d'hybridation des sondes changeant de forme par hybridation compétitive.

D'autres MBs ont été développés, dont notamment certains comportant à une extrémité deux fluorophores voisins (capables d'interagir par FRET) et un inhibiteur de fluorescence à l'autre extrémité, qui engendrent un déplacement du spectre d'émission pour la même longueur d'onde d'excitation[120] (**VII**). Des MBs possédant trois fluorophores ont également été décrits et améliorent l'efficacité du FRET[68]. Plusieurs MBs possédant différents fluorophores peuvent être utilisés lors d'une même expérience pour la détection de plusieurs rétrovirus pathogènes dans un même échantillon[121, 122]. Des MBs 2'-*O*-méthyle ont été employés pour suivre la synthèse d'ARN en temps réel[123] et ont été couplés à des ARNt pour détecter les ARNm dans le cytoplasme[124].

Les premières sondes Scorpion étaient basées sur un format boucle-épingle à cheveux semblable aux MBs[125]. La sonde est allongée par PCR afin qu'une partie du brin d'ADN formé soit complémentaire du pied de la sonde. Le duplex formé est plus long que le pied de la sonde donc plus stable. Il est également intramoléculaire donc plus favorable que les MBs d'un point de vue cinétique et entropique. Une deuxième génération de sondes Scorpion basée sur un format de duplex intermoléculaire permet de simplifier leur synthèse et produit généralement un signal plus intense[126].

IV. 2. Plusieurs sondes

De nombreux systèmes de détection de séquences d'acides nucléiques sont basés sur l'utilisation simultanée de plusieurs sondes oligonucléotidiques fluorescentes[127] (Schéma 10). Il est possible d'obtenir un signal modifié par FRET après hybridation sur des sites adjacents d'une cible commune de deux sondes possédant deux fluorophores distincts, l'un à l'extrémité 5' d'une sonde et l'autre à l'extrémité 3' afin qu'ils se retrouvent à proximité l'un de l'autre après hybridation (**VIII**). La concentration des solutions en mélange de sondes est trop faible pour permettre le FRET en absence de cible. Le même système comportant des fluorophores identiques (Pyrène) permet d'obtenir un signal modifié par formation d'excimères[128]. Les sondes binaires se sont révélées être plus efficaces que les MBs en milieu intracellulaire malgré le fait que les facteurs cinétiques et entropiques des sondes binaires sont généralement moins favorables que ceux des MBs. Un signal émis par FRET entre deux MBs ciblant des séquences adjacentes est utilisé pour visualiser des ARNm dans des cellules vivantes[129].

L'émission du signal fluorescent des sondes QUAL (Quenched auto-ligation) est basée sur une réaction chimique[130] (**IX**). Ce système est composé de deux sondes conçues pour s'hybrider de façon adjacente sur la cible. L'une comporte à l'extrémité 5' un fluorophore à proximité d'un inhibiteur de fluorescence lié par un lien électrophile de type sulfonate. L'autre sonde comporte une fonction thiophosphate nucléophile à l'extrémité 3'. Lors de l'hybridation, une réaction de substitution nucléophile se produit à partir du groupement thiophosphate qui libère l'inhibiteur et lie les deux sondes entre elles.

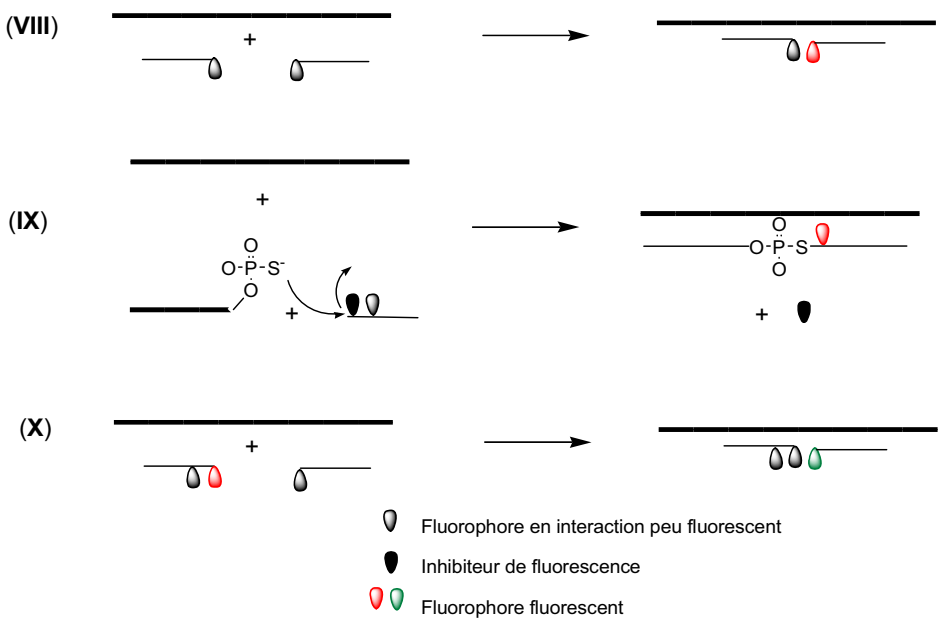


Schéma 10 : Formats d'hybridation comprenant plusieurs sondes.

Un système de sondes binaires dont l'une comporte deux fluorophores a également été développé. Le deuxième fluorophore sert de relais au phénomène de FRET qui s'avère être beaucoup plus efficace[127] (**X**). La technique du transfert de brins sera détaillé au chapitre Résultats, § **A. VIII.**.

V. Les applications des sondes oligonucléotidiques fluorescentes

Les sondes oligonucléotidiques fluorescentes sont couramment employées pour le diagnostic ainsi que pour étudier les structures d'acides nucléiques et leurs interactions avec d'autres biomolécules mais également des réactions de ligation, de clivage et de recombinaison impliquant des acides nucléiques[56]. Nous ne citerons ci-dessous que les principales techniques utilisant des sondes fluorescentes, qui sont toutes basées sur le phénomène d'hybridation.

V. 1. Les techniques de détection et d'analyse des acides nucléiques par hybridation en solution

V. 1. A. La PCR

La PCR[131], imaginée par K. Mullis en 1985, est une méthode permettant de multiplier une séquence d'ADN choisie par duplication enzymatique à l'aide de l'ADN polymérase, enzyme impliquée dans le processus de réplication naturelle de l'ADN. Il est possible de quantifier le nombre de séquences crées en les marquant à l'aide de fluorophores fixés soit sur l'amorce soit sur les nucléotides introduits dans le milieu réactionnel. On peut également moduler l'intensité de fluorescence avec des techniques telles que le FRET, l'inhibition de fluorescence… Il est possible de produire un fragment d'ADN particulier à partir d'un génome très complexe dont il ne représente qu'une très petite fraction suffisante pour qu'il devienne détectable et identifiable. Cette méthode se substitue dans de nombreux cas au clonage et à l'amplification dans des micro-organismes pour préparer l'ADN en quantité suffisante. Elle facilite la détection des différences entre allèles et peut être appliquée à la détermination d'empreintes génétiques. Des segments d'ADN amplifiables par la méthode de PCR

servent de marqueurs pour la constitution de cartes de génomes. Couplée au séquençage, elle est également devenue un outil de diagnostic génétique pour l'étude des maladies héréditaires, des cancers, des agents infectieux (virus et bactéries) et a rendu accessible l'analyse génétique à de nombreux autres domaines : environnement, alimentation, etc…

Cette technique a évolué considérablement depuis son apparition et de nouvelles méthodes de PCR ont été introduites telle que la PCR quantitative en temps réel ou la RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) où divers formats d'hybridation de sondes fluorescentes (§ **B. IV.**) sont utilisés[132].

V. 1. B Le séquençage

Le séquençage permet de déterminer l'ordre des nucléotides dans la molécule d'ADN. Il repose sur des méthodes de dégradation des molécules d'ADN ou de synthèse de brins complémentaires de ceux de la molécule d'ADN étudiée. Le principe consiste à générer des molécules marquées commençant toutes au même endroit à l'extrémité 5'. La méthode de séquençage enzymatique[133] (développée par le biochimiste F. Sanger en 1977, la même année que la méthode chimique[134]) est fondée sur le principe de la synthèse d'une copie de l'ADN à séquencer par l'ADN polymérase. Au cours de la polymérisation, des nucléotides triphosphate modifiés (didésoxynucléotides) sont introduits à la place des nucléotides normaux. Ils empêchent la polymérisation de se poursuivre. Les chaînes interrompues sont marquées à l'aide de marqueurs fluorescents greffés sur l'amorce afin de permettre l'analyse. Il est possible de marquer les 4 types de nucléotides modifiés par des fluorophores différents (séquençage automatisé) et d'utiliser des amorces émettant un signal fuorescent par FRET[57]. Des techniques de séquençage sur support sont détaillées au paragraphe § **B. V. 4. D.**.

V. 1. C. La détection par FISH (fluorescence in situ hybridization)

Cette méthode de suivi des acides nucléiques *in situ*, développée initialement avec des marqueurs radioactifs, permet entre autres de localiser des séquences d'acides nucléiques au sein d'un organisme (cellule, tissu…) sans l'altérer et de différencier certaines régions génomiques spécifiques grâce à l'utilisation de plusieurs marqueurs fluorescents différents. Il est notamment possible de visualiser simultanément plusieurs séquences sur un ou plusieurs chromosomes. La visualisation des acides nucléiques *in vivo* peut apporter de nombreuses informations sur la localisation, les cinétiques d'action et les différentes fonctions de ces biomolécules, comme par exemple la détermination des phases du cycle cellulaire ou la séparation et l'analyse des chromosomes[135]. La détection peut s'effectuer par microscopie de fluorescence ou cytométrie en flux[136]. Le système employant deux sondes qui, après hybridation sur la séquence cible, possèdent leurs marqueurs juxtaposés et émettent un signal modifié notamment par FRET a permis de suivre l'expression d'un ARNm d'une cellule vivante sous microscopie de fluorescence[137]. La technique de TISH (triplex in situ hybridization) a été appliquée à la détection de séquences répétées sur les chromosomes humains de cellules fixées[138].

V. 2. Les techniques de détection et d'analyse des acides nucléiques par hybridation sur support

L'avantage des techniques d'hybridation sur support réside dans l'élimination simple et rapide, par lavage, des sondes marquées en excès non hybridées sur leurs cibles.

V. 2. A. Méthode Southern[139] et techniques dérivées

L'ADN d'un échantillon à analyser est extrait puis fragmenté sous l'action d'enzymes de restriction (nucléases). Les fragments d'ADN sont séparés par ordre de taille par électrophorèse sur gel dans des conditions dénaturantes puis transférés sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon. Ils sont alors détectés par hybridation de sondes marquées et les bandes représentatives visualisées par autoradiographie (car le marquage de l'époque était effectué à l'aide de sondes radioactives). Aujourd'hui, la détection par fluorescence est de plus en plus utilisée. Cette méthode permet de visualiser le polymorphisme d'une partie de l'ADN sous la forme d'une succession de bandes représentatives de fragments d'ADN de longueur variable. La technique Northern suit le même principe mais est appliquée à la détection de séquences ARN (ne comporte pas d'étape de dénaturation). La technique dot-blot dérive de la méthode de Southern mais ne comporte pas l'étape de coupure par les nucléases et s'applique à l'analyse d'un petit nombre d'acides nucléiques relativement courts. Elle est maintenant souvent remplacée par la technique de PCR quantitative. Une variante de ce procédé intitulée dot-blot inverse passe par la fixation des sondes oligonucléotidiques sur la membrane puis la mise en contact du produit d'amplification sur cette membrane.

V. 2. B. Hybridation sandwich

Le brin d'acide nucléique à analyser est pris en sandwich entre une sonde de capture fixée sur support et une sonde de détection[140] (Schéma 11). Les étapes de séparation et de détection ont été améliorées par l'utilisation de sondes émettant un signal modifié après hybridation et par l'utilisation de stratégies telles que le FRET ou l'inhibition de fluorescence.

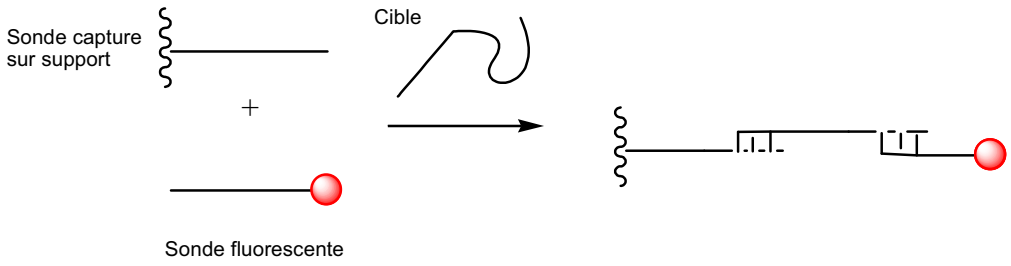


Schéma 11 : Détection par hybridation sandwich.

V. 2. C. Puces à ADN[141, 142]

Ces puces sont composées de sondes ADN (préparées chimiquement ou enzymatiquement) fixées sur des supports solides micrométriques (verre, graphite, polymère : polypropylène ou polyacrylamide) qui permettent de rechercher simultanément des centaines de milliers de séquences dans un même échantillon. Contrairement aux précédentes techniques sur support, la surface est imperméable, transparente et rigide et ses dimensions ne varient pas sous l'effet du solvant, ce qui facilite et augmente la rapidité de détection. L'acide nucléique à analyser est généralement amplifié par PCR où les fragments peuvent être marqués par incorporation de molécules fluorescentes. Les marqueurs peuvent se trouver également sur les séquences de la puce. Les sondes sont soit déposées par une tête d'impression commandée par un robot par adressage mécanique ou électrochimique soit synthétisées *in situ*. Les données de l'analyse sont ensuite traitées par informatique

Il est également possible d'analyser les mutations, les produits d'un séquençage, de diagnostiquer des maladies génétiques et infectieuses. Les puces à ADN sont utilisées en pharmacogénomique (identification de cibles pour la recherche thérapeutique), toxicogénomique (après hypothèse de l'effet toxicologique d'une substance entraînant une modification de l'expression de gènes), agroalimentaire (contrôle des microorganismes utilisés dans certaines fabrication comme les levures ou les ferments lactiques, détection de séquences provenant d'OGMs), environnement (analyse bactérienne de l'eau, détection d'agents infectieux dans l'alimentation).

V. 2. D. Séquençage par hybridation

Cette technique de séquençage[143, 144] est un outil très puissant pour l'analyse fine des acides nucléiques. Son principe repose sur l'utilisation de cibles fixées sur support et de sondes chevauchantes. La détection des sondes hybridées avec la cible permet ainsi de séquencer par "petits blocs" et de reconstituer le brin d'ADN par un traitement informatique des résultats. Cependant la méthode se heurte à un certain nombre de difficultés, en particulier au fait qu'il est difficile de distinguer les appariements parfaits des mésappariements quand ils se trouvent à l'extrémité des duplex d'ADN[145].

VI. Utilisation des sondes en milieu cellulaire

Le développement des stratégies de régulation de l'expression des gènes à but fondamental et thérapeutique a conduit au développement de nombreuses modifications des éléments constitutifs des oligonucléotides (sucres, bases, liens internucléotidiques) et ont permis de sélectionner des oligonucléotides modifiés possédant des propriétés compatibles avec une utilisation intracellulaire. Différentes stratégies de modifications d'oligonucléotides ont été développées pour améliorer leurs propriétés (ciblage, distribution intracellulaire[146], affinité pour la cible, spécificité de l'hybridation, résistance aux nucléases[147, 148], figure 13).

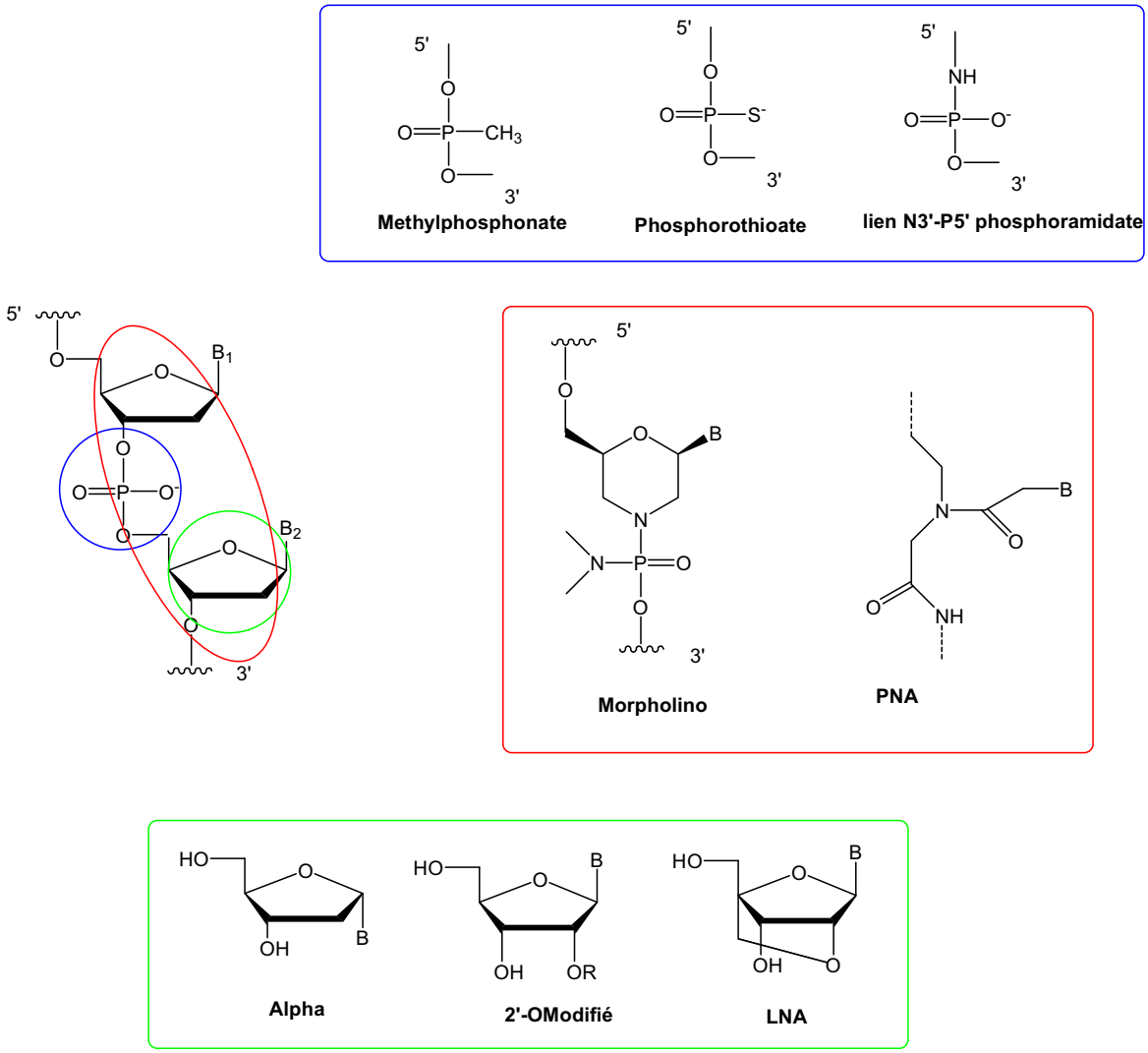


Figure 13 : Exemples de modifications chimiques des oligonucléotides.

Les modifications du lien phosphodiester en méthylphosphonate[149], phosphorothioate[150] ou phosphoramidate[151] ont augmenté la stabilité des oligonucléotides. La modification du squelette sucre-phosphate en PNA[152] (Peptidic Nucleic Acid), morpholino[153] ou l'insertion de motifs LNA[154, 155] (Locked Nucleic Acid) augmente la stabilité et l'affinité d'hybridation avec la cible. Les oligonucléotides 2'-*O*-modifiés peuvent être considérés comme des analogues des oligoribonucléotides. Ils apportent un gain de stabilité et d'affinité dans les complexes formés avec un brin complémentaire d'ADN ou d'ARN[156, 157]. La résistance enzymatique des oligonucléotides peut être également augmentée en inversant la configuration du nucléoside naturel pour former des *α*-oligonucléotides[158, 159] qui gardent une très bonne affinité pour leurs cibles.

Les principales méthodes de délivrance[146] des sondes oligonucléotidiques à l'intérieur des cellules sont la microinjection ou leur complexation avec des nanoparticules, liposomes, dendrimères, polymères cationiques. Des modifications chimiques des oligonucléotides (couplage de peptides[160], sucres, anticorps, …) peuvent également favoriser leur internalisation par simple incubation.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

A. SYNTHESE ET PROPRIETES DE NOUVELLES SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES FLUORESCENTES SPECIFIQUES DES DOUBLES BRINS D'ADN

I. Introduction sur les oligonucléotides formant des triples hélices (OFTs)

I. 1. Formation des triples hélices avec des OFTs

L'intérêt d'une triple hélice d'ADN est apparu en 1987 avec l'utilisation d'une telle structure pour réguler l'expression génétique[8, 9] (Chapitre généralités § **A. I. 2. B.**). Le troisième brin se fixe dans le grand sillon par formation de liaisons hydrogène Hoogsteen et Hoogsteen inverse avec une séquence de purines contigües présente sur l'un des brins de l'ADN cible.

La formation des triples hélices est limitée à des séquences homopuriques (Pu)-homopyrimidiques (Py). Il existe deux types principaux de triples hélices qui diffèrent par la composition du 3ème brin (Figure 14). Un 3ème brin pyrimidique se lie parallèlement au brin purique du duplex cible par liaisons hydrogène Hoogsteen pour former les triplets T.A*T et C.G*C$^+$ (où C$^+$ indique une cytosine protonée et les symboles . et * indiquent respectivement les liaisons hydrogène Watson-Crick et Hoogsteen). La protonation des cytosines déstabilise légèrement le triplex dans les conditions physiologiques si le nombre de paires de bases contigües G-C est important[161]. Un 3ème brin purique se lie antiparallèlement à l'autre brin purique par liaisons hydrogène Hoogsteen inverse pour former les triplets T.A*A et C.G*G qui sont beaucoup plus stables que les précédents.

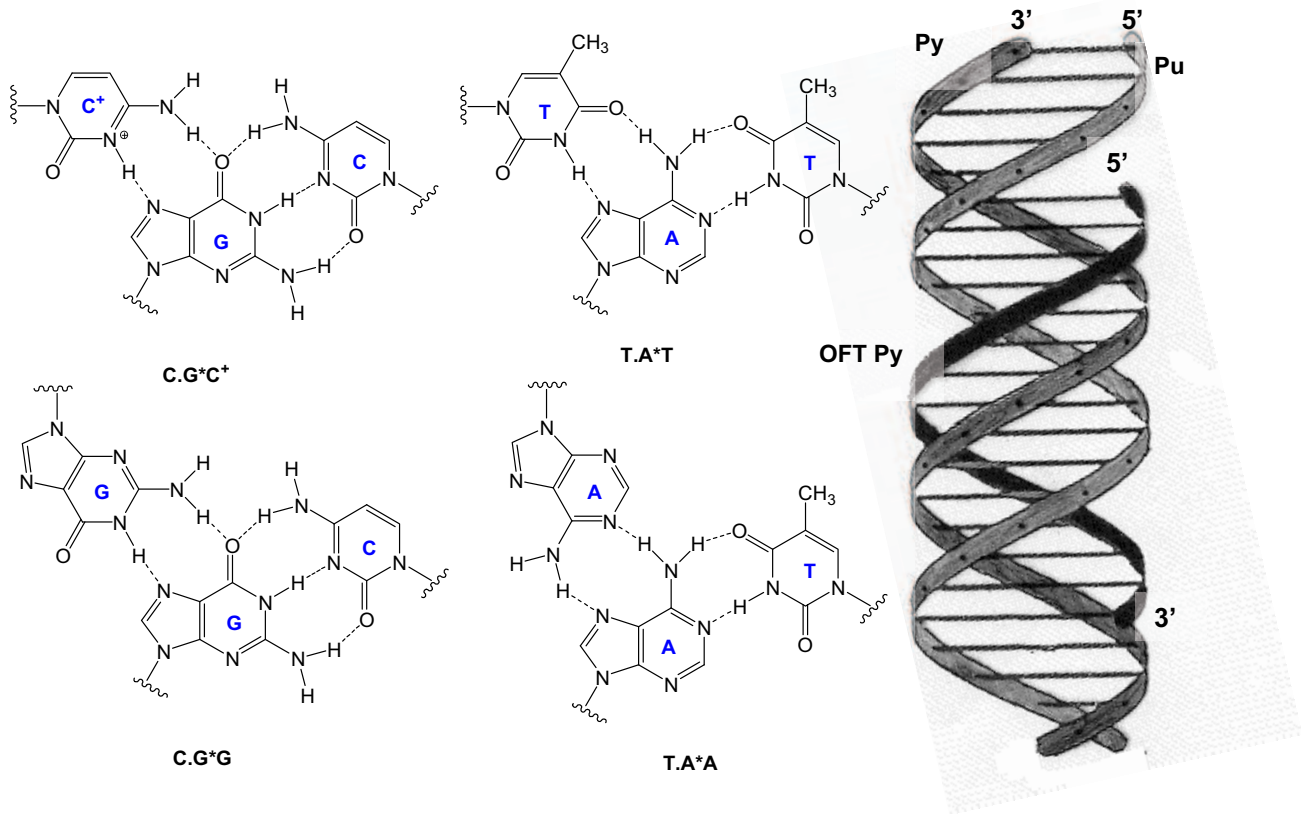


*Figure 14 : Appariements des bases nucléiques en triple hélice, structure d'une triple hélice Py.Pu*Py.*

L'orientation des brins d'une triple hélice formée à partir d'un OFT composé de thymines et de guanines est séquence dépendante[162, 163]. Des OFTs comportant les trois bases T, C (5-methylcytosine) et G sont capables de s'hybrider parallèlement à un brin homopurique d'un duplex homopurique-homopyrimidique[164]. Il existe de nombreuses autres structures de triples hélices mais elles sont généralement moins stables et s'obtiennent dans des conditions particulières[165].

Pour pallier ces inconvénients, de nombreux analogues de bases nucléiques[166] ont été développés afin de pouvoir former des liaisons hydrogène avec plusieurs bases naturelles ou pour éviter la formation d'autres complexes d'acides nucléiques (Figure 15). Par exemple, la 7-chloro-7-deaza-2'-deoxyguanosine est un analogue de guanine qui diminue le nombre de liaisons hydrogène possibles entre les guanines ainsi que le phénomène d'agrégation notamment en présence de cations monovalents (K^+). Elle a été incorporée dans des oligonucléotides riches en G[167] en deux à cinq positions et leur présence permet une augmentation de 5 °C du Tm. Mais surtout on dénote un pourcentage de formation de triplex passant de 15 à 100 % à une concentration de 10 µM.

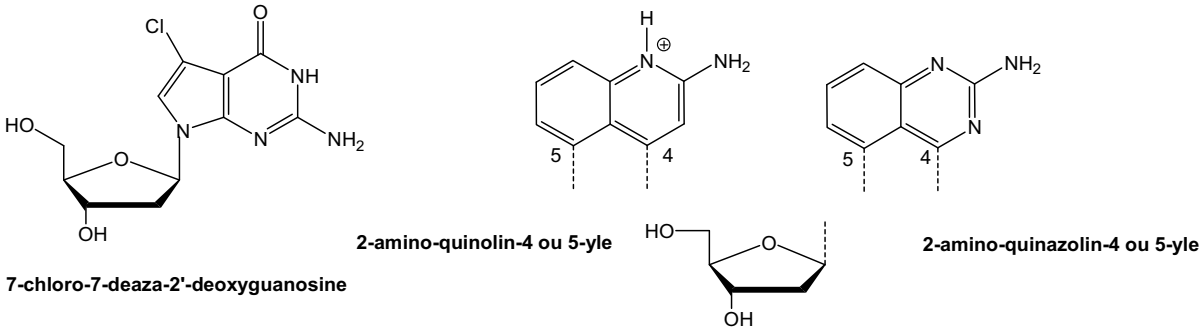


Figure 15 : Exemples d'analogues de bases nucléiques.

L'emploi d'OFTs possédant des bases modifiées de type amino-quinoline (pour les paires C-G) et amino-quinazoline (pour les paires A-T) permet de pallier l'obligation de cibler des doubles brins homopurine-homopyrimidine[168]. Des modifications chimiques des bases nucléiques ont permis d'utiliser des OFTs pour cibler des séquences comportant des inversions purine/pyrimidine[169]. De plus, il est possible de former une triple hélice à partir d'un duplex composé d'alternances de séquences puriques et pyrimidiques avec un troisième brin s'hybridant sur les brins cibles alternés en traversant le grand sillon. Cet OFT peut être composé d'une combinaison de séquences puriques et pyrimidiques [5'-$(purine)_m$-$(pyrimidine)_n$-3' ou inversement][170] ou de deux extrémités identiques (5'-5' ou 3'-3') avec deux brins pyrimidiques[171].

I. 2. <u>Applications thérapeutiques des OFTs</u>

Les oligonucléotides de synthèse, qui sont largement utilisés dans de nombreux domaines tels que les biotechnologies et le diagnostic, offrent des perspectives intéressantes pour la régulation de l'expression génétique. Les familles d'OFTs constituent un outil spécifique pour cibler des sites de l'ADN double brin[172]. Ils peuvent être liés à des agents de coupure ou pontant, à des nucléases artificielles ou des inhibiteurs de topoisomérases. La stratégie anti-gène (Chapitre généralités § **A. 3. I.**

B.) est basée sur l'action d'OFTs afin de réguler la réplication ou la transcription par formation d'une triple hélice à un endroit précis du duplex cible (en empêchant la fixation de facteurs de transcription sur des sites promoteurs durant la phase d'initiation, en bloquant la phase d'élongation, en détruisant le complexe ou encore en causant une terminaison prématurée du processus)[53, 173]. Il a été décrit que de petits triplex peuvent inhiber les phases d'initiation[174] ou d'élongation[175] de la transcription. De plus, les OFTs peuvent induire des mutations ciblées[176] et démontrer l'accessibilité de la séquence d'ADN cible dans le noyau[177].

De nombreuses molécules ont été greffées aux OFTs telles que des agents alkylants, des agents de coupure synthétiques (Fe-EDTA, Cu-orthophénantroline), des intercalants et des fluorophores[178]. Des OFTs liés à la camptothécine[179], inhibiteur de la topoisomérase I, empêchent l'enzyme de relier les brins après coupure du double brin. La présence du psoralène sur le troisième brin peut induire une liaison pontante au sein du duplex cible sous irradiation sur une séquence A-T[180], et cet OFT peut reconnaître et se lier à son duplex cible au niveau de la chromatine dans le noyau de la cellule[181]. Des OFTs liés au psoralène peuvent induire des recombinaisons dans les cellules de plusieurs organismes, ainsi que des mutations et des coupures de brins d'ADN[182].

I. 3. Amélioration des propriétés des OFTs

La stabilité des triples hélices est généralement inférieure à celle des doubles hélices en raison de la répulsion électrostatique entre les charges négatives des trois brins polyphosphate. Pour qu'ils soient efficaces dans la régulation de l'expression génétique, il est nécessaire d'améliorer les caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des oligonucléotides anti-gène afin qu'ils franchissent les membranes cellulaires, qu'ils soient résistants vis-à-vis des nucléases et surtout qu'ils s'hybrident très fortement avec leurs cibles ADN double brin. Pour cela, il est possible de modifier chimiquement le squelette des OFTs.

I. 3. A. Modifications de la composition chimique des OFTs[183, 184, 185] (Figure 16)

Les oligonucléotides homopyrimidiques α se lient dans le grand sillon de duplex d'ADN homopurique-homopyrimidique naturels avec une orientation antiparallèle contrairement aux brins homopyrimidiques β[186]. Les 3èmes brins de type ARN formant des triplex plus stables que leurs analogues de type ADN, les modifications en 2' du sucre ont été beaucoup étudiées, les plus efficaces étant les 2'-méthoxy et 2'-aminoéthoxy[187]. Des OFTs N3'→P5' phosphoramidates forment des triples hélices stables en configuration Hoogsteen et peuvent inhiber la transcription[188]. Des OFTs morpholinopyrimidiques ont été synthétisés et ont montré une aptitude à former des triplex plus stables que leurs homologues naturels[189] et cette formation ne nécessite pas la présence de cations métalliques[153]. Des OFTs possédant un squelette partiel LNA forment des triples hélices stables, la substitution optimale correspondant à un motif LNA tous les 2-3 nucléotides de l'OFT[190].

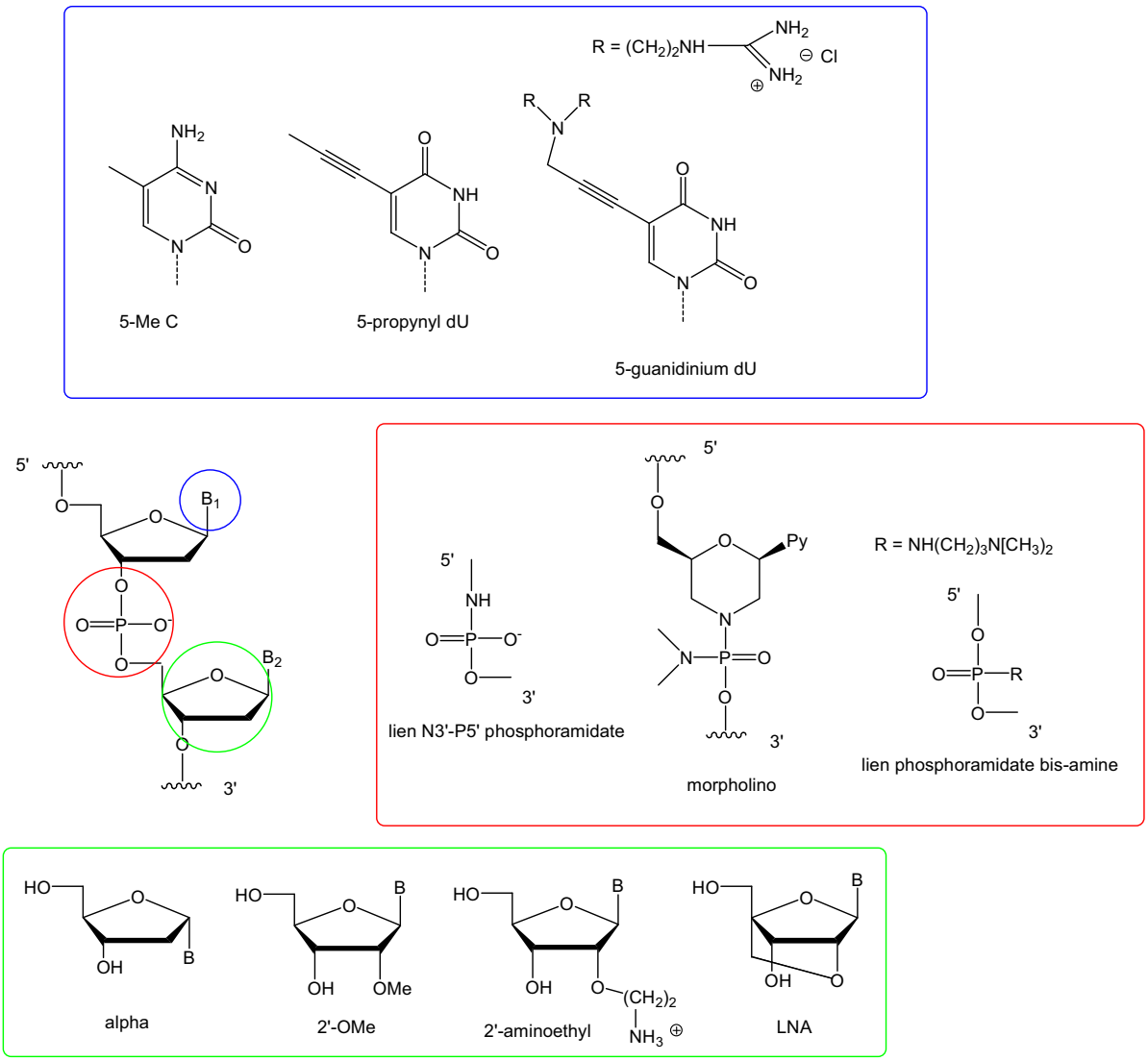


Figure 16 : Principales modifications chimiques des OFTs.

La présence de 5-méthylcytosines, dont le groupement méthyle favorise la protonation de l'atome N3, est connue pour augmenter la stabilité des triples hélices[191] tout en diminuant la restriction due au pH des motifs C-T. Une autre modification de la base nucléique qui apporte une augmentation de stabilité importante est la fixation d'une fonction propynyle en position 5 de dU[192, 193].

La stabilité des triples hélices peut être augmentée lorsque la répulsion entre le 3^{éme} brin et la cible est réduite par remplacement partiel ou complet du lien phosphodiester chargé négativement par des groupes neutres ou chargés positivement. Il est également possible d'incorporer des fonctions chargées positivement sur les bases nucléiques, sur le sucre en position internucléotidique ou aux extrémités de l'OFT[194]. L'introduction d'un substituant sur un phosphate internucléotidique conduit à la formation de deux isomères qui peuvent être séparés et qui possèdent généralement des propriétés différentes. La stabilité des triplex augmente avec le nombre de modifications. L'incorporation d'une ou deux fonctions amine ou guanidinium en position 5 des 2'-désoxyuridines stabilise les doubles et triples hélices[195].

I. 3. B. Couplage de ligands aux OFTs (Figure 17)

Dans le but d'incorporer des charges positives afin de minimiser la répulsion électrostatique, il est possible de coupler en diverses positions des polyamines telles que la spermine[191]. Une autre voie pour stabiliser les triplex est de leur lier des intercalants.

La fixation d'intercalants aux extrémités des oligonucléotides a montré une grande stabilisation du triplex due à l'intercalation à la jonction duplex-triplex. De plus, dans le cas de l'acridine, la stabilisation est plus grande lorsqu'elle est fixée à l'extrémité 5' plutôt qu'en 3' d'un OFT[196] (contrairement à l'intercalation de l'acridine dans un duplex[197]).

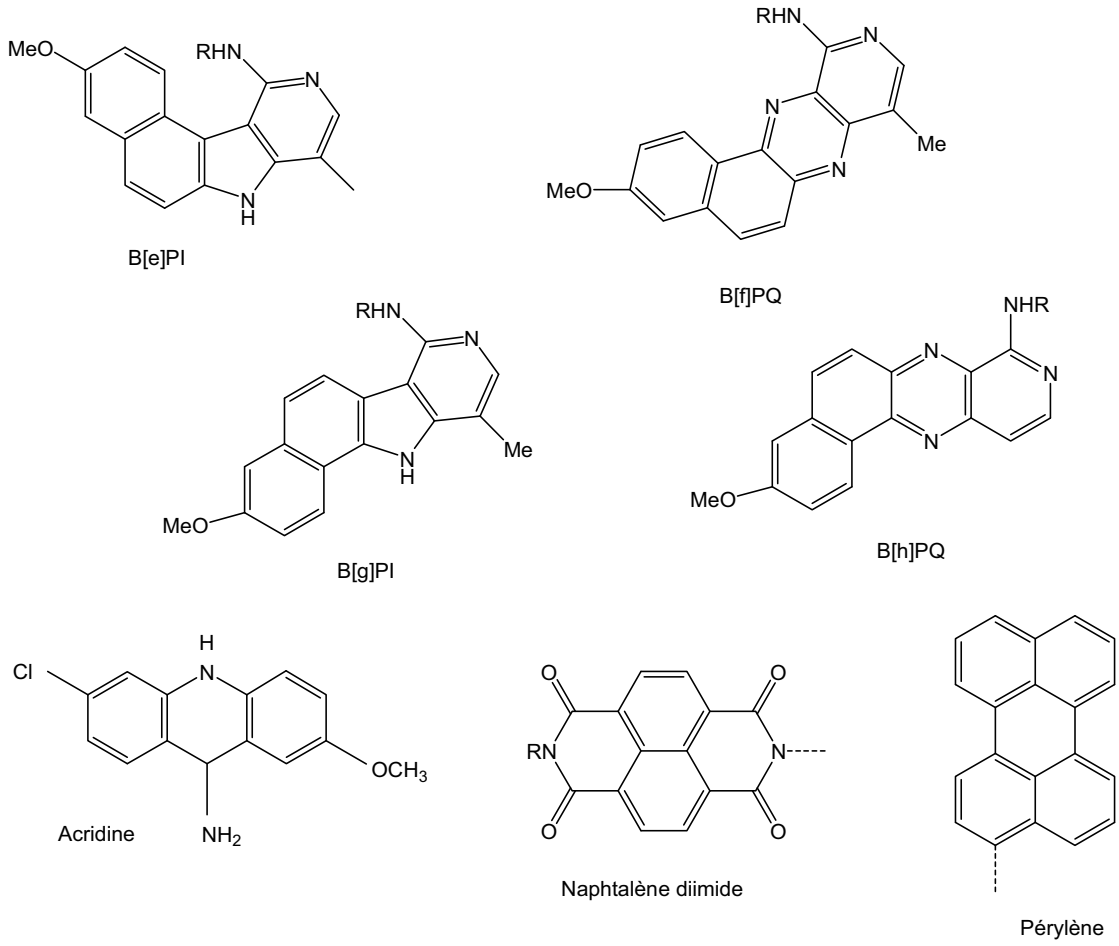


Figure 17 : Exemples de ligands qui stabilisent les triples hélices.

Une étude sur l'influence de la longueur et de la nature du bras de liaison utilisé pour relier l'intercalant à l'oligonucléotide a été effectuée avec l'acridine fixée à l'extrémité 5' d'un OFT T_{10} en interaction avec un duplex A-T[198]. L'intercalation du marqueur est favorisée avec une longueur de bras de liaison de 5 à 9 atomes. La flexibilité du bras de liaison est également importante car elle influe sur l'orientation et le positionnement de l'intercalant avec le complexe d'acides nucléiques. Des intercalants de type benzopyridoindole et benzopyridoquinoxaline (B[f]PQ et B[h]PQ) fixés à l'extrémité 5' d'oligonucléotides via un lien phosphoramidate ou à la place d'une base nucléique interne stabilisent les triples hélices[199]. De plus, il a été observé que ces conjugués se lient préférentiellement aux triplex par rapport aux duplex[200]. Par la suite, des dérivés benzo[e]pyridoindole

(B[e]PI) et benzo[g]pyridoindole (B[g]PI) ont été incorporés[201] en position 5 d'une 2'-désoxyuridine en diverses positions d'un OFT. Le composé B[e]PI stabilise les triples hélices dans le cas du mono-marquage à l'extrémité 5' de l'OFT par l'intermédiaire d'un bras de liaison flexible. Le couplage d'un dérivé de l'acridine en position 5' d'OFTs pyrimidiques comportant des nucléosides modifiés de type LNA permet la formation de triples hélices stables dans les conditions physiologiques[202]. La présence de l'intercalant augmente considérablement l'affinité de l'OFT pour sa cible et son activité biologique. Le naphtalènediimide, intercalant couplé aux extrémités 5' et/ou 3' d'un OFT pyrimidique, possède des propriétés intéressantes de stabilisation des triples hélices[203].

Pour tester les propriétés de stabilisation du pérylène, il a été introduit aux extrémités 3' et/ou 5' d'un décamère pyrimidique[204]. L'effet stabilisant du pérylène est plus important lors d'un bis-marquage et lors d'une fixation en 5' de l'OFT plutôt qu'en 3'. Il est également plus important lors d'un marquage en 5' plutôt qu'en position internucléotidique car l'empilement du pérylène avec le triplet de bases à la jonction duplex-triplex est favorisé[97].

II. Détection des doubles brins d'ADN

La détection de séquences spécifiques d'acides nucléiques par hybridation d'oligonucléotides est très utilisée en recherche fondamentale, en biotechnologie et en diagnostic. Depuis quelques années, des séries d'oligonucléotides fluorescents capables d'émettre un signal fluorescent modifié en présence de cibles simple brin utilisable comme signature de l'hybridation ont été développées[56]. La majorité des techniques de détection de l'ADN sont basées sur la détection des simples brins d'ADN après dénaturation de la double hélice. En revanche, il serait intéressant de pouvoir détecter directement les doubles brins d'ADN[205].

Un polymère de structure polythiophène permet de détecter les doubles brins d'ADN de manière non spécifique en s'hybridant par interaction électronique entre les charges positives du polymère avec les charges négatives du duplex d'ADN[206]. Les polyamides contenant des acides aminés *N*-méthylimidazole et *N*-méthylpyrrole reconnaissent les doubles brins d'ADN par interaction dans le petit sillon et forment des triplex stables qui ont été étudiés en milieu cellulaire[207]. Un polymère de structure polyamide auquel a été greffé un TO détecte les doubles brins d'ADN parfaits avec une très forte augmentation de fluorescence (> 1000 fois) alors qu'une très faible augmentation se produit en présence d'un duplex imparfait[208].

Seuls quelques exemples de détection du duplex par un OFT fluorescent ont été décrits (Figure 18).

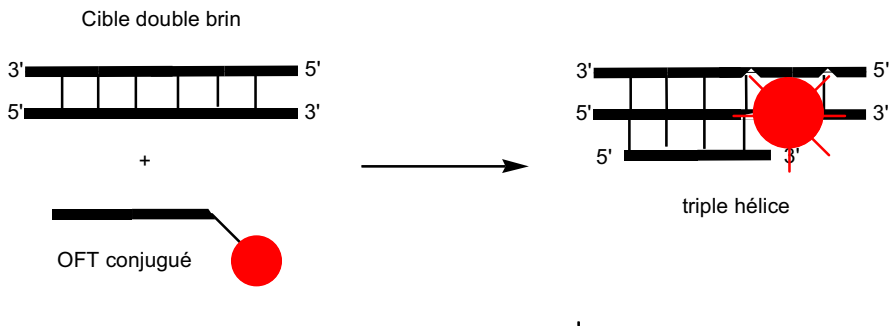


Figure 18 : Détection de doubles brins d'ADN à l'aide d'OFTs fluorescents.

Le premier était basé sur une paire d'OFTs marqués produisant du FRET après hybridation[209]. D'autres exemples utilisent des OFTs marqués avec un ou deux fluorophores identiques dont la fluorescence est augmentée après hybridation : avec le YO 3 fois [210], avec deux pérylènes 3 fois[97] et avec un complexe de ruthénium 10 fois[211]. Lors de l'étude des propriétés d'OFTs-pérylène, l'augmentation de l'intensité de fluorescence la plus importante a été observée lorsque deux fluorophores sont fixés sur les phosphates terminaux en 3' et 5' avec des bras de liaison (2,8 fois). Un complexe de ruthénium a également été accroché à l'extrémité 5' d'un OFT-15 mère. La stabilité du triplex est améliorée et une augmentation de 6 à 10 fois de l'intensité de fluorescence a été observée après hybridation avec une cible simple brin. L'augmentation de l'intensité de fluorescence avec une cible double brin est du même ordre.

La détection de doubles brins d'ADN doit donc être dévelopée et optimisée afin d'obtenir un signal spécifique en présence du duplex cible.

III. Conception des sondes OFTs fluorescentes

III. 1. Choix des marqueurs fluorescents

III. 1. A. Emission d'un signal modifié après hybridation de la sonde

Nombreuses sont les sondes oligonucléotidiques comportant un ou plusieurs marqueurs fluorescents dont le rendement quantique de fluorescence est élevé mais qui varie peu au cours de l'hybridation (fluoresceine, rhodamine, texas-red, …). Il est donc nécessaire d'éliminer les sondes libres (ex : par lavage lors d'une analyse sur support) afin d'écarter la possibilité que le signal fluorescent soit dû à leur présence. Afin de supprimer ces étapes supplémentaires et de simplifier les analyses, des sondes capables d'émettre un signal modifié lors de l'hybridation avec la séquence complémentaire ont été développées. L'hybridation de la sonde avec sa cible s'accompagne d'une modification de l'environnement du marqueur (réduction de son degré de liberté, modification de la solvatation, interaction avec les bases nucléiques, inhibition de la fluorescence causée par les bases environnantes), qui peut entraîner une modification de son spectre d'absorption et d'émission. L'hybridation peut être mise en évidence à l'aide de ces modifications spectrales sans étape de séparation des sondes non hybridées.

III. 1. B. La famille des cyanines monométhines

Les cyanines constituent une famille de molécules longtemps utilisées comme pigments. Plus récemment, elles ont permis le développement d'outils pour le traitement de signaux optiques, pour la technologie du laser, dans les télécommunications ou encore dans les applications biomédicales et notamment pour la détection et le marquage des acides nucléiques.

Les cyanines constituent un groupe de composés ioniques (cations) dans lequel deux noyaux hétérocycliques contenant chacun un atome d'azote (l'un tertiaire et l'autre quaternaire) sont reliés par un nombre impair de groupements méthines qui contribuent au phénomène de résonance

électronique entre les atomes d'azote tertiaire et quaternaire (Figure 19). La fonction ammonium présente également l'avantage d'accroître les interactions du colorant avec les résidus phosphate chargés négativement des acides nucléiques. Les cyanines avec n = 0 (n : nombre de doubles liaisons intercycliques) sont appelées monocyanines et si n = 1, 2, ou 3, elles se nomment tri-, penta-, ou heptacyanines respectivement. Suivant le nombre d'atomes d'azote endocycliques x, ces molécules sont nommées streptocyanine (x = 0), hémicyanine (x = 1) ou cyanine (x = 2). Les cyanines symétriques (les deux hétérocycles sont identiques) sont plus souvent utilisées du fait que leurs longueurs d'onde d'absorption sont généralement plus grandes et qu'elles possèdent des rendements quantiques de fluorescence plus importants que celles des cyanines asymétriques. En revanche, ces dernières présentent de grandes variations d'intensité de fluorescence en présence d'acides nucléiques.

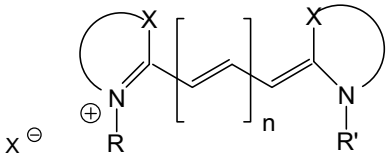


Figure 19 : Structure générale des cyanines.

Les cyanines monométhines absorbent dans le visible puis chaque extension du chromophore par une double liaison C=C engendre un déplacement bathochromique d'environ 100 nm[212]. Leurs maxima d'absorption et d'émission couvrent tout le spectre du visible et du proche IR en fonction de la nature des hétérocycles et de la longueur du pont polyméthine les reliant. Le temps de vie de fluorescence est également une caractéristique importante qui varie suivant les familles de cyanines[213]. Quelques unes de ces cyanines sont commerciales et de nombreux composés de cette famille ont déjà été synthétisés[214]. Des études approfondies sur les interactions entre les cyanines et les acides nucléiques ont été menées sur deux cyanines monométhines asymétriques, le Thiazole Orange (TO) et l'Oxazole Yellow (YO) ainsi que sur leurs dimères respectifs, le TOTO et le YOYO[215] car ces composés émettent un signal fluorescent modifié en présence d'acides nucléiques (Figure 20).

III. 1. C. Propriétés des cyanines monométhines en présence d'acides nucléiques

III. 1. C. 1. *Interactions non covalentes des cyanines monométhines avec les acides nucléiques*

Les interactions non covalentes entre des petites molécules et des acides nucléiques regroupent les interactions ioniques, hydrophobes et les liaisons hydrogène. Les cyanines monométhines possèdent la propriété de s'associer très fortement avec les acides nucléiques[216]. Elles se lient fortement avec l'ADN simple brin et possèdent des propriétés d'intercalation et de bons rendements quantiques de fluorescence lorsqu'elles sont intercalées[217]. La rotation interne autour de la liaison simple pontante est impossible (diminution du degré de rotation autour du lien internucléaire entre les cycles benzothiazole et quinoline) d'où une augmentation importante de la fluorescence. L'exposition aux solvants est également modifiée. Le TO, cyanine monométhine la plus étudiée et utilisée, est un

composé faiblement basique, de pKa égal à 2,71, dont l'espèce dicationique acide, protonée sur l'azote du cycle benzothiazole, est incolore. De plus, il se conserve longtemps à basse température et n'est pas mutagène[218], ce qui justifie son utilisation *in vivo*. Son rendement quantique de fluorescence varie suivant le milieu dans lequel il se trouve ; une différence d'un facteur 100 peut être observée entre un milieu fluide (φ_F = 0,001) et un milieu visqueux (φ_F = 0,1) [219].

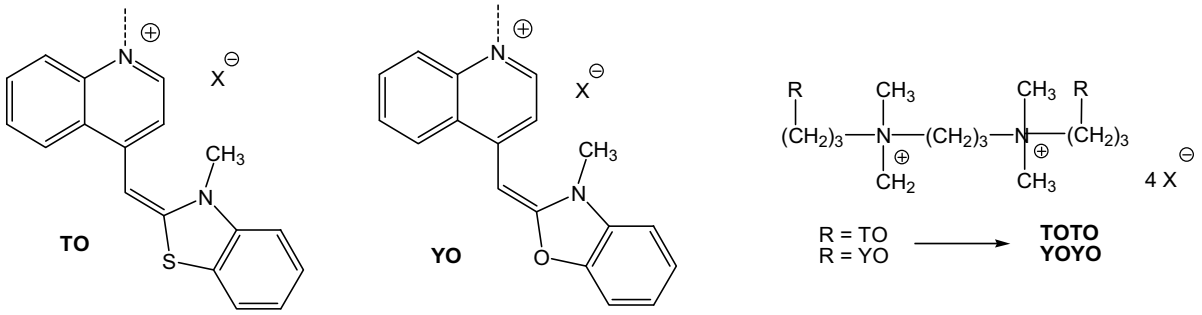


Figure 20 : Structure du TO, du YO et de leurs dimères respectifs TOTO et YOYO.

Le TO a été beaucoup étudié à l'état libre en présence d'ADN. A faible concentration de TO par rapport à l'ADN, il est présent sous forme de monomère caractérisé en spectrométrie UV-visible par une bande d'absorption dont le pic principal se situe vers 500 nm avec un épaulement à 480 nm. Il absorbe légèrement dans l'UV avec un λ_{max} à environ 300 nm. A concentration plus élevée, le TO s'agrège en dimère ce qui induit une inversion des longueurs d'onde de l'épaulement et du pic principal du spectre d'absorption qui correspond alors à celui du dimère à l'état libre nommé TOTO[220]. En présence d'ADN simple brin, la forme du spectre du TO varie suivant la composition en bases. Avec de l'ADN double brin, le TO s'intercale préférentiellement avec la chaîne latérale dans le petit sillon, les hétérocycles sont empilés entre les bases[217] et sa fluorescence est généralement plus importante en présence de purines. Il s'est avéré être un meilleur choix pour le marquage d'ADN en FID (fluorescent intercalator displacement) que le bromure d'éthidium (BET)[221]. Le TO peut s'intercaler dans l'ADN double brin au ratio d'une molécule de TO pour deux paires de bases ce qui conduit à une augmentation de fluorescence pouvant aller jusqu'à un facteur de 3000[222] selon la séquence et la température[220](Figure 21). Il est donc largement utilisé dans les techniques de cytométrie en flux[223] (pour le comptage et la caractérisation de cellules) et de PCR. Un analogue du TO avec une liaison triméthine reconnait spécifiquement un type d'aptamère ARN par une augmentation de 60 fois de l'intensité de fluorescence[224].

Le YO a été moins étudié que le TO bien qu'il soit plus fluorescent à l'état libre et qu'il possède généralement des propriétés similaires. Mais l'augmentation de l'intensité de fluorescence du YO en présence d 'ADN double brin est moins importante que dans le cas du TO[219].

Les composés dimériques du TO et du YO font partie des meilleurs marqueurs non covalents des acides nucléiques en raison de la forte intensité de leurs signaux fluorescents en présence d'ADN double brin (ϕ_F = 0,3-0,9)[225]. Ce sont des bis-intercalants dont une étude par RMN montre que dans le

cas du TOTO les deux atomes d'azote se positionnent différemment avec l'ADN : l'azote quinoline vers le petit sillon et l'azote benzothiazole vers le grand sillon[226]. Le dimère s'intercalerait par le petit sillon avec un TO dans un site sur deux et les charges cationiques du bras de liaison interagissent avec les anions phosphate du squelette ADN[227] (Figure 21). D'autres analyses RMN ont montré que les noyaux quinolinium s'empilent entre les bases puriques alors que les noyaux benzothiazolium s'empilent entre les bases pyrimidiques[228]. Le bras de liaison polyammonium traverse le petit sillon tandis que le groupement *N*-méthyle du noyau benzothiazolium pointe vers le grand sillon[229]. Ce positionnement favorise les interactions hydrophobes entre le groupement 5-méthyle des thymidines et le cycle benzothiazole du TO. Le TOTO est une molécule de choix pour marquer l'ADN et remplacer l'utilisation du BET ou de marqueurs radioactifs.

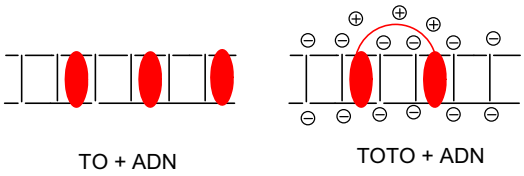


Figure 21 : Interaction du TO et du TOTO avec l'ADN simple et double brin.

La bis-intercalation du YOYO entre les paires de bases a été démontrée par diverses techniques spectroscopiques ainsi que son orientation perpendiculaire à l'axe de l'hélice[230]. L'utilisation du YOYO est plus rare mais il a été utilisé pour effectuer des coupures sous irradiation dans des duplex d'ADN[231].

III. 1. C. 2. *Interactions des cyanines monométhines fixées sur une sonde avec les acides nucléiques*

Le TO, représentant le plus étudié de la famille des cyanines, est beaucoup plus fluorescent en présence d'ADN, ce qui est intéressant pour la détection des acides nucléiques malgré sa faible sélectivité à l'état libre. En effet, le TO libre ne distingue que l'ADN double brin en présence d'ADN simple brin et les simples brins homopuriques des simples brins homopyrimidiques[220]. Afin d'améliorer la sélectivité du marquage fluorescent, le TO a été lié à des oligonucléotides et analogues. Lorsque le TO est lié à des PNAs, son spectre d'absorption visible est déplacé vers le rouge avec un λ_{max} d'émission de fluorescence vers 510 nm ce qui correspondrait à l'empilement du TO entre les bases nucléiques. Ce phénomène nommé *back-binding*[232] est température dépendant : la fluorescence d'une sonde libre décroît avec l'augmentation de la température ce qui se traduit par un repliement moins marqué du TO sur la séquence oligonucléotidique et par un rendement quantique de fluorescence plus faible (Figure 22).

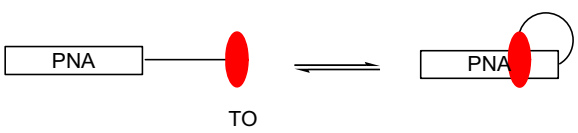


Figure 22 : Phénomène de back-binding du TO conjugué à une sonde PNA.

Lorsque la sonde est hybridée, l'intensité de fluorescence émise décroit avec l'augmentation de la température. Cette dernière induit la dissociation progressive du double brin et permet au TO de se mouvoir entre les bases nucléiques, ce qui se traduit par une proportion plus importante de désactivation non radiative des composés excités et donc une émission de fluorescence plus faible. Les rendements quantiques de fluorescence de ces conjugués sont de 10 à 400 fois plus grand que ceux du TO libre, le ϕ_F d'une sonde riche en purines marquée par le TO est supérieur à celui d'une sonde riche en pyrimidines. Des résultats similaires ont été obtenus avec des PNAs lié au TO', dérivé du TO où le bras de liaison est fixé sur l'atome d'azote du noyau benzothiazole (le bras de liaison du TO est fixé sur l'atome d'azote du noyau quinoline) [233].

Plusieurs conjugués PNAs-TO ont servi pour la détection de produits d'amplification en PCR[234]. Ils ont été utilisés également pour détecter les séquences codant pour les deux chaînes légères de l'immunoglobuline humaine dont le rapport sert de marqueur tumoral[235].

La fluorescence de conjugués oligonucléotide-TO dans lesquels le TO occupe la place d'une base nucléique peut être réduite par l'incorporation d'un analogue de base, le 5-nitroindole. L'hybridation avec la cible se traduit par une augmentation de fluorescence d'un facteur 3.[236] (Schéma 12).

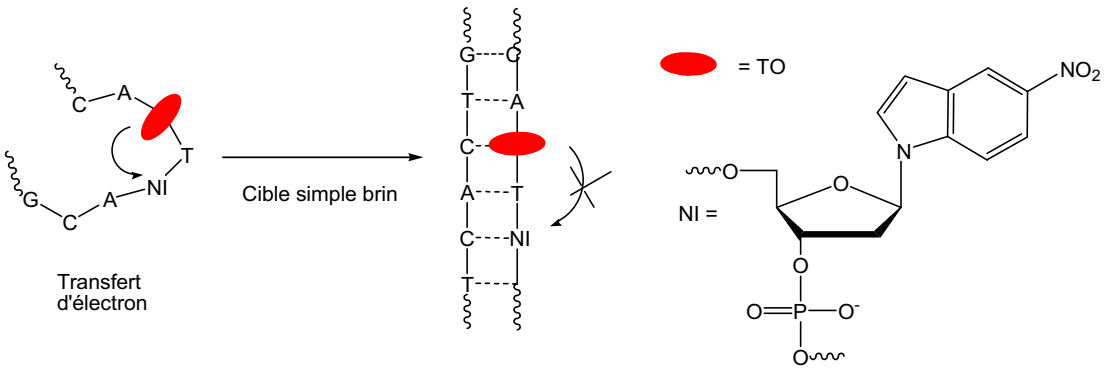


Schéma 12 : Transfert d'électron photo-induit entre le TO et le 2-nitro-indole.

Le TO ou le TO' ont également été fixés sur des peptides[237], protéines[238] et d'autres biomolécules[239] afin d'augmenter leurs affinités pour les acides nucléiques. Des dipeptides liés au TO et TO' présentent une activité de coupure d'ADN monobrin par la formation de peroxydes à partir d'acides aminés (notamment du tryptophane) en présence d'$^1O_2$[240].

La détection de mutations et de mésappariements a été étudiée avec des PNAs marqués par le TO en position *N*-terminale[232]. La fluorescence d'un duplex parfait est plus importante que celle d'un duplex comportant des mésappariements (désintercalation du TO au niveau du mésappariement). Dans le cas de PNAs où le TO ou le TO' remplace une base nucléique, les propriétés de stabilisation du duplex ne sont pas affectées et l'augmentation de fluorescence après hybridation est plus importante dans le cas où la base opposée au fluorophore est une pyrimidine[241] (Schéma 13).

De nouvelles sondes fluorescentes développées au laboratoire comportant le marqueur TO' à l'extrémité 5' permettent de détecter la présence de mésappariements terminaux ou dans les deux

dernières positions. Contrairement à la majorité des résultats décrits dans la littérature sur la détection de mésappariements centraux (notamment avec des conjugués-pyrène[58] et des PNAs-cyanines[242], les duplex comportant les mésappariements en position terminale sont plus fluorescents (de 3 à 7 fois) que les duplex parfaits[243].

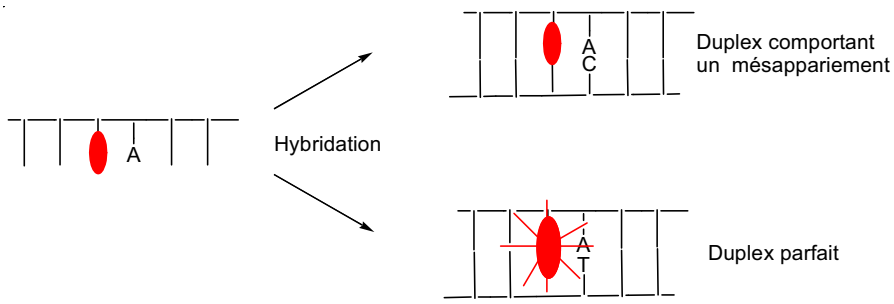


Schéma 13 : Détection de mésappariements centraux avec une sonde PNA-TO[242].

Des travaux effectués au laboratoire ont montré que le TO lié à une sonde oligonucléotidique émet un signal fluorescent largement supérieur à celui du TO libre (environ 10 fois plus avec une séquence homopyrimidique[244] et 30 fois plus avec une séquence homopurique[245]), résultats en accord avec ceux observés lorsque le TO est en interaction non covalente[220] (empilement préférentiel du cycle quinolinium du TO avec les purines qui comportent 2 cycles conjugués contre un seul pour les pyrimidines). Le TO, fixé en position internucléotidique de β-oligo-2'-désoxyadénylates et d'α- ou de β-oligo-2'-désoxythymidylates[244], induit une forte augmentation de fluorescence après hybridation, plus marquée dans le cas de l'isomère Rp qui oriente le TO vers le petit sillon (alors que l'isomère Sp oriente le TO vers le grand sillon). Dans le cas d'eicosa-α-thymidylates résistants aux nucléases liés au TO, une augmentation de fluorescence d'un facteur 15 est observée en présence de cible poly(A)[245]. Ces conjugués ont permis d'étudier la distribution intracellulaire des ARNm dans des cellules d'ostéosarcome humaines (HOS).

Des travaux récents effectués au laboratoire[246] ont porté sur l'étude de neuf cyanines fixées à l'extrémité 5' d'oligonucléotides comportant les quatre bases et de leurs interactions avec une cible ADN simple brin (Figure 24). L'hybridation des conjugués avec leur cible monobrin stabilise le duplex ainsi formé dans chaque cas. L'effet stabilisant du marqueur dépend du noyau de la cyanine lié à l'oligonucléotide : quinaldine (**2TO**, **22'Q**, **24'Q**) > benzothiazole (**Th**, **2TO'**, **4TO'**) > lépidine (**4TO**, **42'Q**, **44'Q**). Un angle dièdre aigu doit permettre un meilleur empilement de la cyanine entre les bases nucléiques en augmentant l'interaction des deux hétérocycles avec le duplex. De plus, un environnement en bases GC du marqueur est plus favorable à une augmentation de la stabilité qu'un environnement AT. L'effet stabilisant des cyanines fixées en position internucléotidique est favorisé lorsqu'elles sont liées soit par le noyau benzothiazole avec une isomérie Sp, soit par le noyau lépidine avec un isomérie Rp. Ces résultats sont en accord avec ceux qui décrivent que le TOTO s'intercale par le petit sillon avec les noyaux lépidine entre des purines[228] et que dans le cas de l'isomère Sp le bras marqué pointe vers le grand sillon mais se retourne vers le petit sillon[247]. Les études de fluorescence des sondes libres montrent que la présence d'un ou deux noyaux benzothiazole est

nécessaire pour obtenir un signal fluorescent intense. Après hybridation avec leur cible simple brin, l'intensité de fluorescence des sondes marquées à l'extrémité 5' diminue. Dans le cas des conjugués internucléotidiques, les augmentations les plus importantes de l'intensité de fluorescence après hybridation (jusqu'à 3 fois) sont obtenues avec l'isomère Rp de l'oligonucléotide-TO et avec l'isomère Sp de l'oligonucléotide-TO', ce qui va dans le sens des résultats d'études sur des conjugués peptide-cyanine en présence de doubles brins d'ADN où le TO s'intercale par le petit sillon alors que le TO' s'intercale par le grand sillon[237].

La cyanine YO a également été liée de façon covalente à des oligonucléotides en position 5' ou en internucléotidique par l'intermédiaire de bras thioéther (Figure 23). La faible fluorescence des sondes libres est due aux interactions entre le YO et les bases nucléiques. L'intensité de fluorescence augmente d'un facteur 2 après hybridation sur une cible simple brin[248] et de 4 fois après hybridation sur une cible double brin[210].

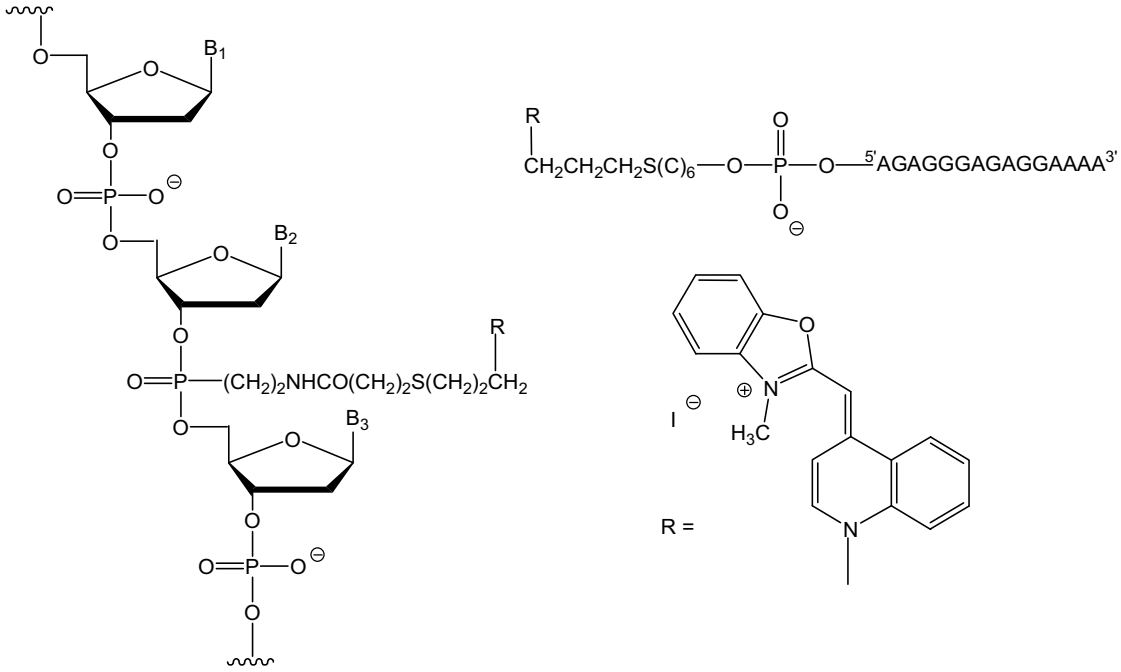


Figure 23 : Sondes marquées par le YO pour détecter les simples et doubles brins d'ADN.

Parmi les conjugués-cyanines, seuls les oligonucléotides-YO ont été étudiés en triple hélice.

L'étude bibliographique justifie donc l'utilisation des cyanines monométhines pour marquer des OFTs afin de développer des sondes. L'ensemble des études effectuées sur les interactions cyanines/ADN et ON-cyanine/ADN ont montré la sensibilité des propriétés spectrales des sondes à plusieurs facteurs structuraux tels que la longueur du bras de liaison, la nature de la séquence oligonucléotidique, la structure du fluorophore ou le point d'ancrage du marqueur à l'oligonucléotide. De plus, les cyanines monométhines possèdent une bonne stabilité chimique, ne sont pas toxiques, ne perturbent pas l'hybridation, possèdent une faible fluorescence à l'état libre et il est possible de couvrir une grande gamme de longueurs d'onde avec la famille de cyanines précédente.

III. 1. D. Choix des cyanines

Outre la position d'ancrage du fluorophore sur l'oligonucléotide, la longueur et la nature du bras de liaison et l'environnement en bases, les précédents travaux ont montré une variation des interactions des cyanines avec les acides nucléiques en fonction de leur structure. Il est donc nécessaire d'étudier l'influence de la nature des noyaux constitutifs de la cyanine et de la position d'ancrage de celle-ci sur le bras de liaison sur les propriétés de stabilisation et de fluorescence des OFTs fluorescents.

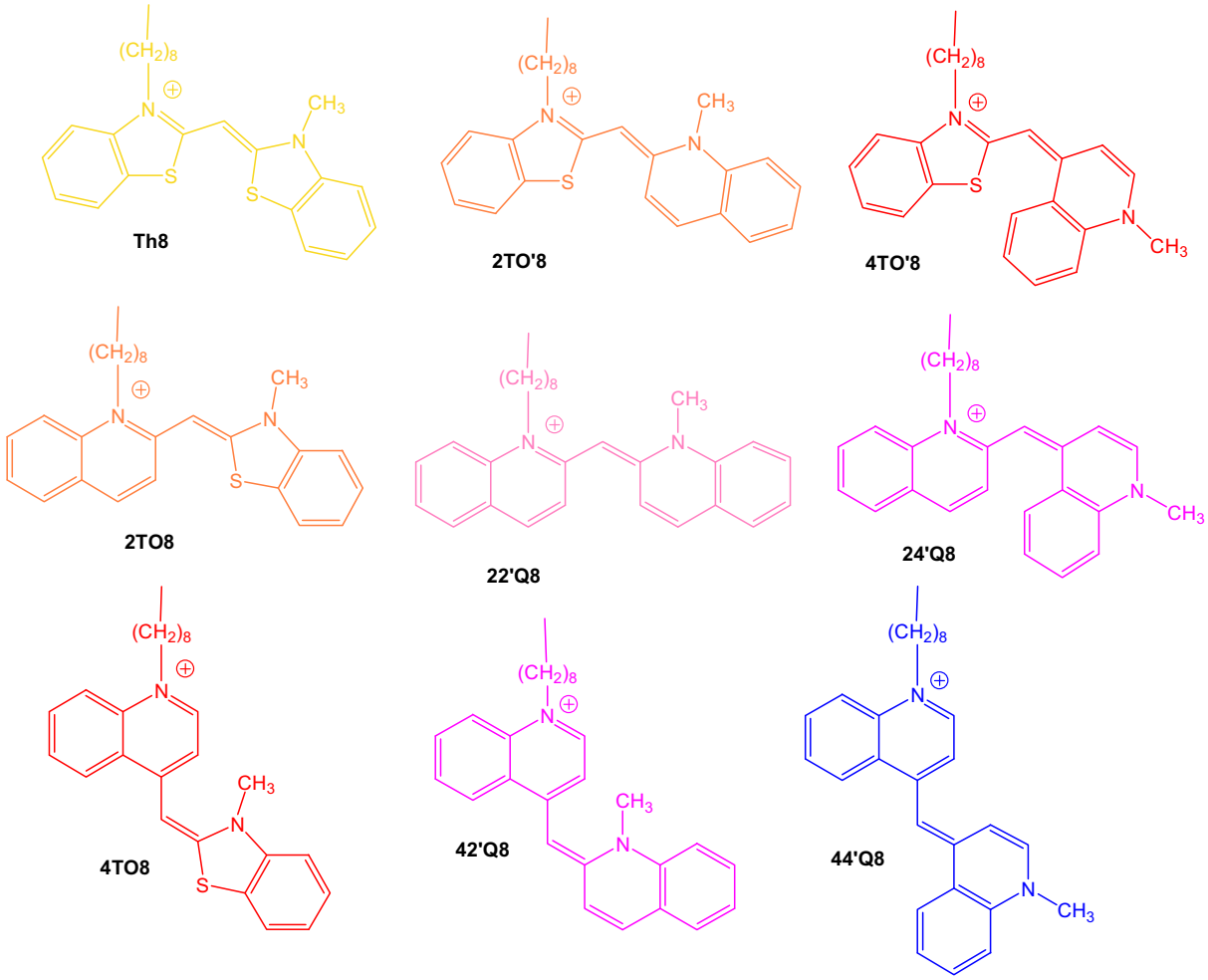


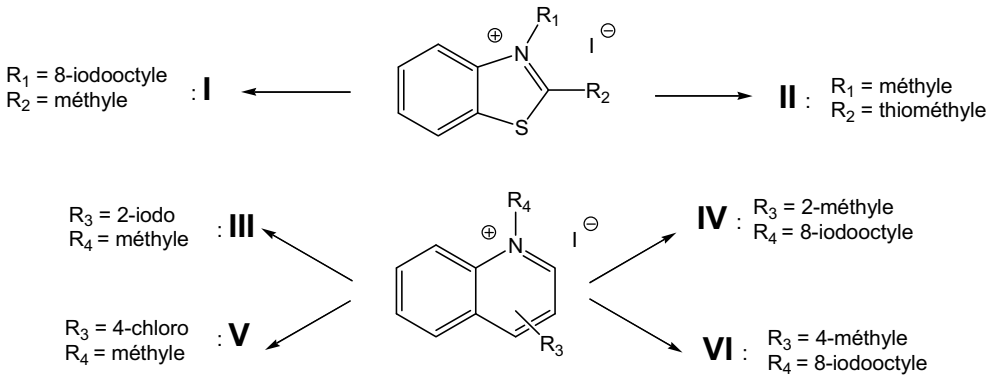
Figure 24 : Structures des cyanines-bras choisies pour marquer les OFTs.

Pour le marquage des OFTs, nous avons donc choisi d'utiliser la série de cyanines déjà synthétisées au laboratoire utilisée pour la détection de cibles simple brin d'ADN[246]. (Figure 24).

Le bras de liaison sera un lien octaméthylène fixé sur les cyanines sous la forme d'un bras iodooctyle avant couplage sur les oligonucléotides car il a été montré que des bras de liaison de 5 à 9 atomes favorisent l'intercalation[99, 198].

III. 1. E. Synthèse des cyanines

Les neuf cyanines choisies comportent chacune deux noyaux bicycliques de type benzothiazole ou quinoline (lépidine ou quinaldine). Le bras de liaison iodooctyle est lié à l'un ou l'autre des noyaux.



Réactifs	II	III	V
I	Th8	2TO'8	4TO'8
IV	2TO8	22'Q8	24'Q8
VI	4TO8	42'Q8	44'Q8

Th 2TO' 2TO 4TO' 4TO 22Q 42Q 24Q 44Q
dans $CHCl_3$

Schéma 14 : Synthèse des cyanines.

La synthèse de ces cyanines, précédemment effectuée au laboratoire[246], est basée sur la méthode développée par Brooker[249] dans les années 40 (Schéma 14). Un des hétérocycles possède un groupement méthyle susceptible d'être facilement déprotoné, la charge négative résultante est stabilisée par résonance. Il réagit alors sur le second hétérocycle comme nucléophile en substituant un groupement partant (thioalkyle ou halogène) fixé sur un atome de carbone électrophile.

III. 2. Choix des OFTs et de leur cible ADN double brin

La séquence choisie pour être l'OFT de base de notre étude est une séquence 10-mère homopyrimidique d-$^{5'}$TTTTCTTTTC$^{3'}$ (**1**) précédemment utilisée au laboratoire pour le développement de conjugués OFT-intercalant[201, 204]. Les deux séquences choisies pour former le duplex cible (**2**) homopurine / homopyrimidine sont :
d-$^{5'}$GCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGG$^{3'}$ / d-$^{3'}$CGGTGAAAAATTTTCTTTTCCCC$^{5'}$.
Les valeurs de Tm pour cette double hélice et pour la triple hélice de référence formée avec le 10-mère sont respectivement de 62 °C ± 1 °C et de 13 °C ± 1 °C (Figure 25). La plus grande longueur des cibles double-brin permet de distinguer les transitions triplex-duplex et duplex-simples brins. Les expériences sont réalisées dans un tampon « phosphate » (Chapitre expérimental, § **B. 4.**) à pH 6

pour faciliter la protonation des cytosines requise pour favoriser la formation des deux liaisons hydrogène Hoogsteen entre C et G, ainsi qu'en présence de cations bivalents pour éviter la répulsion entre les charges négatives des phosphates des différents brins.

Figure 25 : Hybridation en triple hélice de l'OFT avec sa cible double brin.

IV. Synthèse et propriétés des 5'-conjugués OFT-cyanine

Nous décrivons ici la synthèse et les propriétés photo-physiques de courts OFTs pyrimidiques mono- et bis-marqués avec les cyanines monométhines citées précédemment. L'influence du marquage sur la stabilité de la triple hélice est étudiée par dénaturation thermique suivie par spectroscopie d'absorption. Les changements d'émission de fluorescence après hybridation sont observés à l'aide d'un spectrofluorimètre.

IV. 1. Synthèse des 5'-conjugués OFT-cyanine

IV. 1. A. Stratégie de couplage des fluorophores sur les OFTs

Tout d'abord, les couplages des neuf cyanines sont effectués à l'extrémité 5' de l'OFT car la jonction duplex-triplex en 5' de la triple hélice est un site favorable pour l'intercalation[250, 251]. Le marquage aux extrémités perturbe peu l'hybridation. Les cyanines de la famille du TO ne supportent pas les conditions basiques de déprotection standard du cycle de synthèse oligonucléotidique. Pour ces raisons, nous avons choisi d'effectuer le couplage après déprotection. La stratégie de couplage thiophosphate-halogénure d'alkyle nécessite l'utilisation de quantités de réactifs beaucoup plus faibles que lors de l'incorporation directe via des dérivés phosphoramidite ou H-phosphonate. Cette stratégie limite l'exposition des cyanines à la lumière et donc leur dégradation. La fonctionnalisation des oligonucléotides par l'incorporation d'un groupement thiophosphate à l'extrémité 5' est effectuée à la fin de la synthèse oligonucléotidique avant déprotection et libération de l'oligonucléotide du support.

IV. 1. B. Incorporation d'une fonction thiophosphate sur les oligonucléotides

Les premiers travaux ont été effectués par Eckstein qui a synthétisé un nucléoside 5'-phosphorothioate[252]. Le groupement thiophosphate est moins réactif mais également moins enclin à dimériser qu'une fonction thiol. L'introduction de groupements thiophosphate aux extrémités d'oligonucléotides a d'abord été réalisée par voie enzymatique[253] puis par voie chimique[254]. Il existe de nombreux réactifs de phosphorylation d'oligonucléotides en 5'. La majorité des méthodes d'introduction du groupement thiophosphate à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide suit le même

cheminement : l'hydroxyle en 5' de l'oligonucléotide est phosphitylé par un dérivé phosphoramidite puis le phosphite obtenu est sulfuré à l'aide d'un réactif de sulfuration (Figure 26).

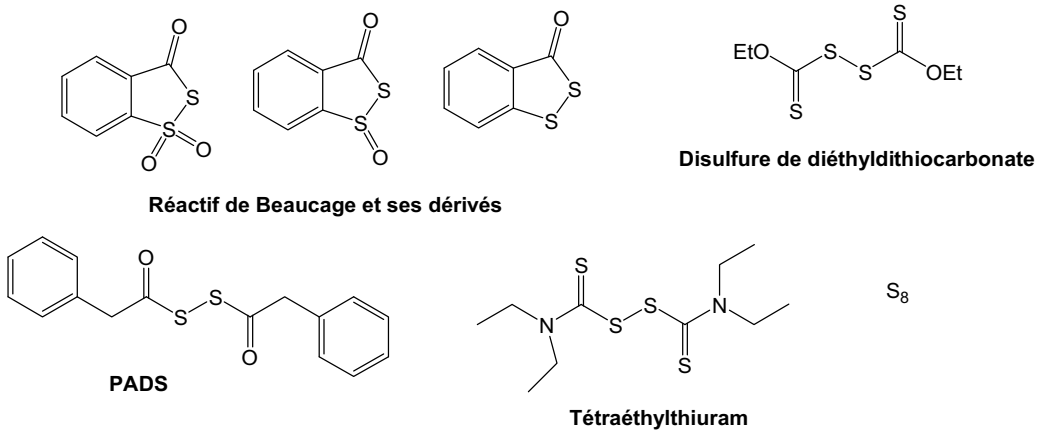


Figure 26 : Principaux réactifs de sulfuration de groupements phosphites.

Pour obtenir un groupement thiophosphate, l'étape de sulfuration peut être réalisée à l'aide du réactif de Beaucage[255] (largement utilisé de nos jours sur synthétiseur lors de l'approche phosphoramidite) ou de ses dérivés[256, 257], du phénylacétyldisulfure (PADS)[258], du tétraéthylthiuram[259], du disulfure de diéthyldithiocarbonate[260], ou encore du soufre colloïdal[261] (S_8 dans CS_2/Pyr).

Le réactif de phosphitylation le plus courant est le bis-cyanoéthyl-*N*,*N*-diisopropylphosphoramidite **3**[262] car commercialisé. Plusieurs autres réactifs ont été développés, quelques exemples sont présentés sur la figure 27 : **4**[263], **5**[264], **6**[265], **7**[266], **8**[267], **9**[268] et **10**[269].

Récemment, un nouveau réactif de phosphorylation a été synthétisé au laboratoire: un dérivé H-phosphonate du 1-diméthoxytrityl-2,2'-dithiodiéthanol, le *O*-(6-dimethoxytrityloxy-3,4-dithiahexyl-H-phosphonate **11**[270]. Il permet d'obtenir des oligonucléotides possédant un groupement thiophosphate 5' terminal avec de bons rendements et son emploi peut être suivi de l'utilisation de conditions de déprotection et de libération du support relativement douces [ammoniac méthanolique 10 M, dithiothréitol (DTT)[271]], ce qui permet son utilisation pour fonctionnaliser des oligonucléotides sensibles en milieu alcalin. Il est possible d'associer son utilisation à celle de supports permettant d'obtenir des oligonucléotides 5'-thiophosphate-3'-OH[272], 3'-(thio)phosphate-5'-(thio)phosphate[273] ou 3'-aminohexyle-5'-(thio)phosphate[274]. Ce réactif est facile à synthétiser, se conserve plusieurs mois à - 20 °C et l'excès de réactif, utilisé lors de la fonctionnalisation des oligonucléotides, peut être recyclé. Le rendement de l'étape de couplage de ce réactif peut être déterminé par dosage du cation tritylium. Le couplage de **11** sur une fonction hydroxyle terminale d'un oligonucléotide s'effectue en présence d'un activateur tel que le chlorure de pivaloyle.

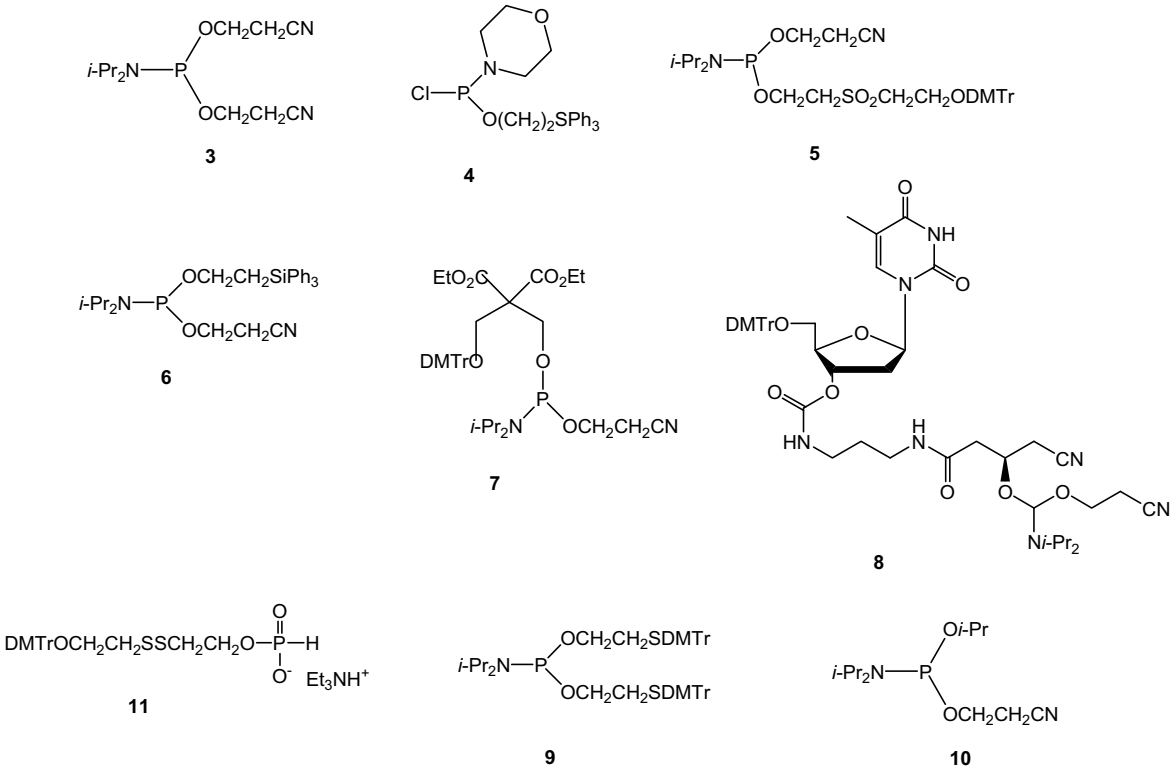


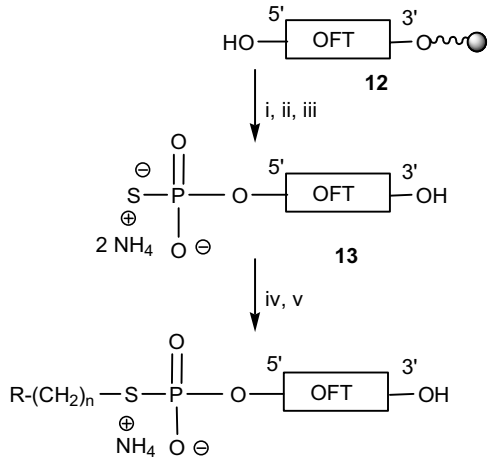
Figure 27 : Principaux réactifs utilisés pour phosphoryler les oligonucléotides à l'extrémité 5'

IV. 1. C. Synthèse des OFTs 5' -thiophosphate

La synthèse de l'OFT est réalisée sur synthétiseur suivant la méthode aux phosphoramidites, puis une étape supplémentaire de détritylation est effectuée pour libérer la fonction hydroxyle de l'extrémité 5'. Nous utiliserons donc le réactif **11** pour fonctionnaliser l'extrémité 5' de nos OFTs. L'introduction du groupement thiophosphate n'est pas effectuée sur le synthétiseur en fin de cycle car il faut utiliser des quantités de réactif plus importantes pour les purges et mobiliser des flacons supplémentaires et le soufre risquerait de précipiter dans les tubulures du synthétiseur. De plus, l'opération manuelle est globalement plus rapide.

Le couplage de **11** sur la séquence protégée HO-$^{5'}$TTTTCTTTTC$^{3'}$ **12** lié au support CPG commercial est réalisé en présence de chlorure de pivaloyle (Schéma 15). Après 2,5 minutes, le support est lavé plusieurs fois à l'acétonitrile puis traité par une solution de soufre colloïdal, les autres réactifs de sulfuration n'étant efficaces que sur les groupements phosphite. Après 20 minutes, le support est lavé et la déprotection s'effectue en présence d'une solution d'ammoniaque concentrée et de DTT. Ce dernier empêche la dimérisation des groupements thiophosphate ainsi que la réaction de l'acrylonitrile issu de la déprotection des groupements phosphotriester internucléotidiques sur la fonction thiophosphate. Les oligonucléotides 5'-thiophosphate sont obtenus sous forme de sels d'ammonium après purification en phase inverse.

IV. 1. D. Couplage des cyanines sur les OFTs 5'-thiophosphate



i: **11**, Chlorure de pivaloyle;
ii: S_8, CS_2/C_5H_5N;
iii: NH_4OH + DTT, une nuit, 55 °C;
iv: R-$(CH_2)_n$-I, 2,5 % tampon bicarbonate aqueux (pH 9)/ DMF, 6 h à t.a.;
v: purification.

$\mathbf{13_{4TO'8}}$	**R = 4TO'**, n = 8	$\mathbf{13_{Th8}}$	**R = 4Th**, n = 8
$\mathbf{13_{4TO'7}}$	**R = 4TO'**, n = 7	$\mathbf{13_{2TO'8}}$	**R = 2TO'**, n = 8
$\mathbf{13_{4TO'6}}$	**R = 4TO'**, n = 6	$\mathbf{13_{4TO8}}$	**R = 4TO**, n = 8
$\mathbf{13_{4TO'5}}$	**R = 4TO'**, n = 5	$\mathbf{13_{22'Q8}}$	**R = 22'Q**, n = 8
$\mathbf{13_{4TO'4}}$	**R = 4TO'**, n = 4	$\mathbf{13_{24'Q8}}$	**R = 24'Q**, n = 8
$\mathbf{13_{2TO8}}$	**R = 2TO**, n = 8	$\mathbf{13_{42'Q8}}$	**R = 42'Q**, n = 8

Schéma 15 : Synthèse des 5'-conjugués OFT-cyanine.

L'oligonucléotide 5'-thiophosphorylé déprotégé réagit avec les dérivés iodoalkyle des cyanines en excès (10 éq.) dans un mélange de tampon $NaHCO_3$ 2,5 % pH 7/DMF à l'abri de la lumière pendant une durée de 4 à 10 heures (Schéma 15). Après traitement du mélange réactionnel (Chapitre expérimental, § **B. 3. 1.**), les conjugués sont purifiés sur CLHP en phase inverse (Figure 28 et tableau 1) et caractérisés par spectrométrie de masse (SM), (Tableau 1) et spectroscopie UV/Vis.

OFTs	Séquences	Rdt	Analyse par SM ($g.mol^{-1}$)		
		(%)	Formule brute	Calculée	Obtenue
13	$^{5'}$*p*(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$	70	$C_{98}H_{128}N_{22}O_{68}P_{10}S$	3044,00	3044,06
$\mathbf{13_{Th8}}$	$^{5'}$**Th**-*p*(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$	37	$C_{122}H_{156}N_{24}O_{68}P_{10}S_3$	3452,62	3452,23
$\mathbf{13_{2TO'8}}$	$^{5'}$**2TO'8**-*p*(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$	32	$C_{124}H_{158}N_{24}O_{68}P_{10}S_2$	3446,60	3446,01
$\mathbf{13_{4TO'8}}$	$^{5'}$**4TO'8**-*p*(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$	30	$C_{124}H_{158}N_{24}O_{68}P_{10}S_2$	3446,60	3446,37
$\mathbf{13_{2TO8}}$	$^{5'}$**2TO8**-*p*(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$	27	$C_{124}H_{158}N_{24}O_{68}P_{10}S_2$	3446,60	3446,39
$\mathbf{13_{22'Q8}}$	$^{5'}$**22'Q8**-*p*(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$	48	$C_{126}H_{160}N_{24}O_{68}P_{10}S$	3440,57	3440,05
$\mathbf{13_{24'Q8}}$	$^{5'}$**24'Q8**-*p*(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$	28	$C_{126}H_{160}N_{24}O_{68}P_{10}S$	3440,57	3440,00
$\mathbf{13_{4TO8}}$	$^{5'}$**4TO8**-*p*(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$	35	$C_{124}H_{158}N_{24}O_{68}P_{10}S_2$	3446,60	3446,27
$\mathbf{13_{42'Q8}}$	$^{5'}$**42'Q8**-*p*(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$	40	$C_{126}H_{160}N_{24}O_{68}P_{10}S$	3440,57	3439,81
$\mathbf{13_{44'Q8}}$	$^{5'}$**44'Q8**-*p*(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$	20	$C_{126}H_{160}N_{24}O_{68}P_{10}S$	3440,57	3440,02

*Tableau 1 : Caractérisation des OFTs de la série **13** par spectrométrie de masse.*

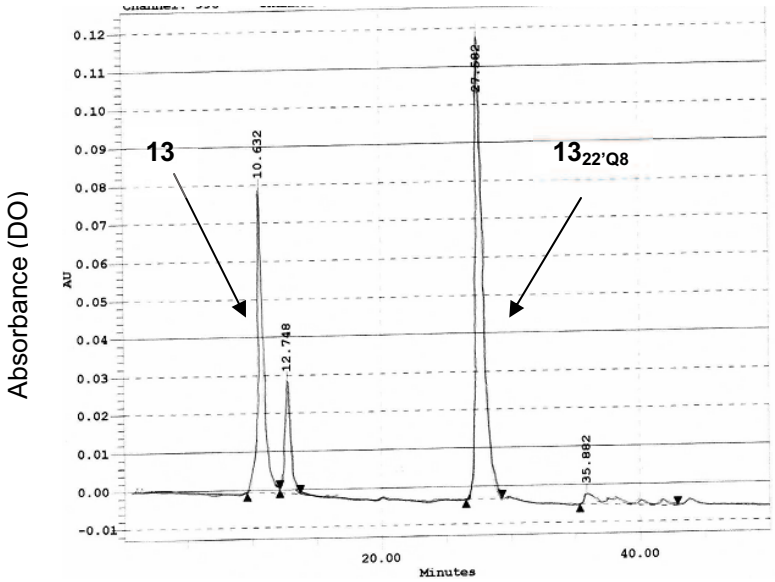


Figure 28 : Chromatogramme d'analyse en phase inverse du conjugué $\mathbf{13_{22'Q8}}$.

IV. 2. Caractérisation des 5'-conjugués OFT-cyanine

Les spectres UV-Visible des conjugués sont enregistrés entre λ = 230 nm et λ = 700 nm. Ils présentent tous deux bandes d'absorption principales (Tableau 2 et figure 29). Dans chaque cas, la bande d'absorption en UV du spectre correspond à l'absorbance de l'oligonucléotide et de la cyanine avec $\lambda_{UV} \approx 267$ nm alors que la bande d'absorption dans le visible (350 nm < λ < 700 nm) correspond seulement à l'absorbance de la cyanine.

ONs	t_R (min)[a]	λ_{UVmax} (nm)[b]		λ_{VISmax} (nm)[b]		
		Pic principal	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	Pic principal	épaulement	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)
13	11 min 37 s	267	80100			
$\mathbf{13_{Th8}}$	28 min 19 s	267	95600	427	408	77100
$\mathbf{13_{2TO'8}}$	28 min 38 s	267	93500	486	470	48400
$\mathbf{13_{4TO'8}}$	28 min 49 s	267	116500	508	478	82700
$\mathbf{13_{2TO8}}$	28 min 42 s	267	120300	488	470	62700
$\mathbf{13_{22'Q8}}$	28 min 20 s	267	82600	526	494	58600
$\mathbf{13_{24'Q8}}$	28 min 51 s	267	83600	561	528	59200
$\mathbf{13_{4TO8}}$	28 min 29 s	267	89600	508	478	65300
$\mathbf{13_{42'Q8}}$	28 min 32 s	267	82400	560	528	42100
$\mathbf{13_{44'Q8}}$	28 min 19 s	267	83300	591	-	30100

[a] Colonne Lichrospher© 100 RP-18 (5 µm, 125 mm × 4 mm) Merck, gradient linéaire d'acétonitrile (5 à 50 % sur 60 min) dans un tampon AA 0,1 M, pH 7 à un débit de 1 mL/min.

[b] tampon « cacodylate » pH 7

Tableau 2 : Caractérisation des OFTs de la série ***13*** *par chromatographie en phase inverse et spectroscopie d'absorption.*

Les λ_{VISmax} des conjugués vont de 427 à 561 nm. Leur forme générale est constituée d'une bande principale précédée d'un épaulement à plus courte longueur d'onde et correspond aux résultats obtenus lors de la précédente étude sur les conjugués des cyanines[246]. Les valeurs de λ_{max} dans le visible et des rapports d'intensité des bandes de l'UV et du visible dépendent de la cyanine considérée (Figure 29).

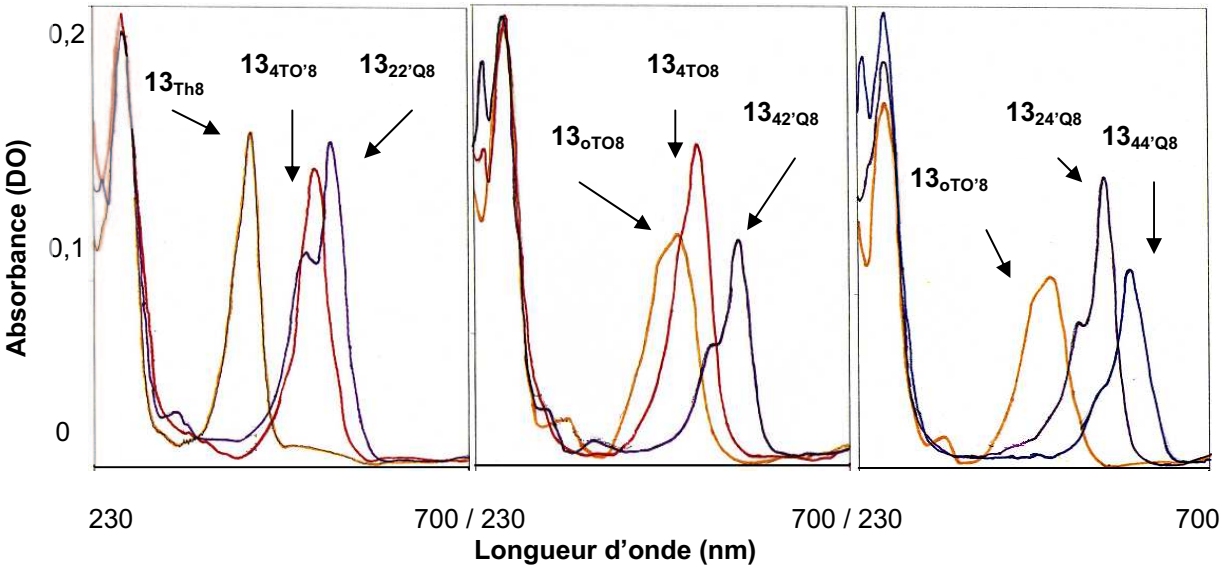


*Figure 29 : Spectres d'absorption des conjugués de la série **13**.*

Les coefficients d'extinction molaires à 260 nm ε_{260} des conjugués de la série **13** ont été déterminés par addition des valeurs ε_{260} des cyanines déterminées par titration lors de précédents travaux[246] et de la valeur ε_{260} de l'oligonucléotide **1** déterminée en utilisant le modèle « des proches voisins »[275] (Chapitre expérimental, § **A. 3. 1.**). Les différences des ε_{260} pour chaque cyanine attestent de l'influence de leur structure sur les propriétés spectroscopiques. La contribution spectrale des cyanines à 260 nm est faible par rapport à celle des oligonucléotides non modifiés et diffère en fonction de la cyanine. Le λ_{max} UV des conjugués est peu différent de celui des oligonucléotides non modifiés.

IV. 3. Etude des propriétés des 5'-conjugués OFT-cyanine après hybridation

IV. 3. A. Spectroscopie d'absorption UV/Vis

Le mélange des OFTs conjugués de la série **13** avec la cible double brin d'ADN **2** à 4 °C n'induit que de légères modifications spectrales. Ces changements se traduisent par un léger déplacement vers le rouge d'environ 4 nm de la bande d'absorption principale dans le visible et un léger hypochromisme de 4-8 % (données non fournies). Ces changements sont annulés lorsque la température dépasse la valeur de Tm du triplex, ce qui confirme la dissociation de l'OFT du duplex cible (Figure 30).

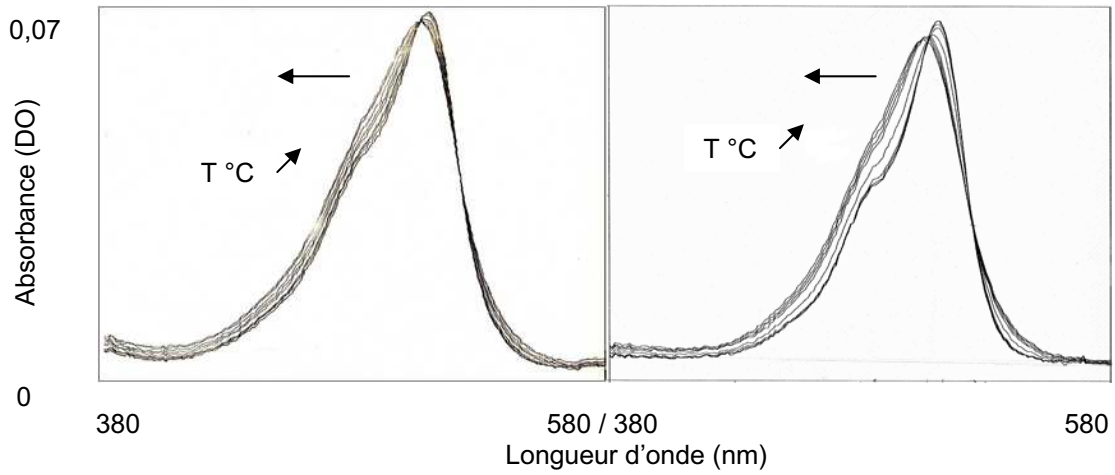


Figure 30 : Spectres d'absorption en fonction de la température (de 4 à 70 °C) d'une solution du conjugué ***13*** $_{4TO'8}$ *libre (gauche) et hybridé (droite) dans le tampon « phosphate ».*

Après hybridation, il est possible d'observer par superposition des spectres d'absorption des sondes à diverses températures la présence de deux points isobestiques qui démontre un changement de conformation du marqueur.

IV. 3. B. Etudes de dénaturation thermique

Les expériences sont réalisées par spectroscopie d'absorption dans un tampon « phosphate » à pH 6 pour faciliter la protonation des cytosines requise pour favoriser la formation de la seconde liaison hydrogène Hoogsteen entre C et G. Les stabilités des triplex sont déterminées par dénaturation thermique en utilisant un mélange équimolaire de conjugué et de cible double brin **2**. L'OFT non modifié correspondant **1** est utilisé comme référence. Deux transitions sont observées durant la fusion de chaque triplex (Figure 31). La transition avec les valeurs de Tm élevées correspond à la fusion du duplex (environ 62 °C) et la transition avec les valeurs de Tm faibles à la fusion du triplex. Les valeurs de Tm indiquent que les triples hélices formées entre les OFTs marqués de la série **13** et le duplex cible **2** sont stabilisées dans chaque cas par rapport à celle formée avec l'OFT de référence (Tableau 4).

La stabilisation du triplex dépend de la structure des cyanines. Une comparaison des gains de stabilité apportées par les différentes cyanines fixées par un même bras de liaison octaméthylène indique que la molécule la plus stabilisante est le **4TO'** (ΔTm**13**$_{4TO'8}$ = + 24,5 °C) suivie du **2TO** (ΔTm**13**$_{2TO8}$ = + 19,5 °C), **Th** (ΔTm**13**$_{Th8}$ = + 18 °C), **2TO'** (ΔTm**13**$_{2TO'8}$ = + 15 °C), **4TO** (ΔTm**13**$_{4TO8}$ = + 14 °C) et des quatre quinocyanines apportant une stabilisation de ΔTm = + 6,5 °C à ΔTm = + 13 °C.

Ces fluorophores stabilisent plus les triples hélices que le pérylène greffé sur la même séquence avec un bras de liaison hexaméthylène (ΔTm**OFT**$_{per}$ = + 17 °C)[204] et autant que l'acridine (Résultats non publiés). Il faut noter que seules les cyanines qui comportent au moins un noyau benzothiazole permettent de beaucoup stabiliser les triplex. En revanche, la correspondance entre la stabilité des triplex avec la valeur de l'angle dièdre des cyanines fixées sur les OFTs n'est pas retrouvée comme lors de l'étude sur l'hybridation d'oligonucléotides-cyanine avec une cible simple brin[246].

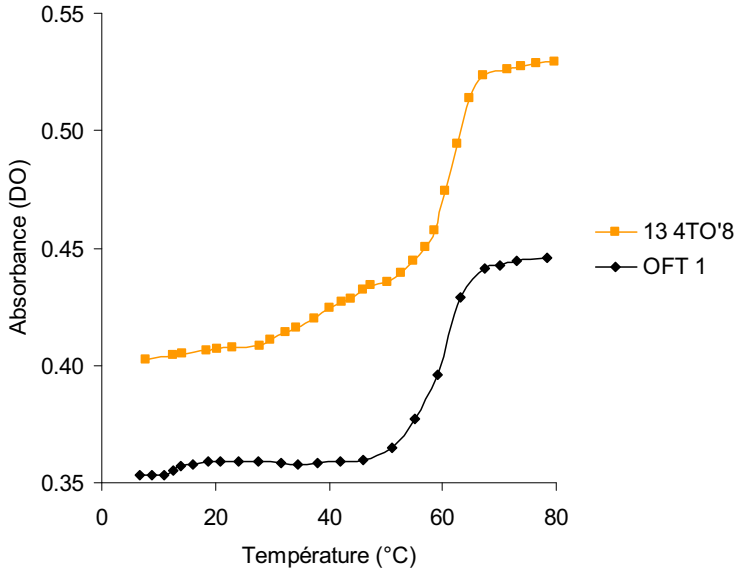


Figure 31 : Courbes de dénaturation thermique déterminées par spectroscopie d'absorption à 260 nm des triplex formés par le conjugué ***13*** $_{4TO'8}$ *et l'OFT* ***1*** *non modifié avec le duplex* ***2****.*

Le bras de liaison entre le marqueur et la séquence a un rôle important afin de positionner correctement le marqueur pour qu'il stabilise le triplex. Il a été précédemment décrit que des bras de liaison reliant des molécules intercalantes à l'extrémité 5' d'OFTs comportant 5 à 9 atomes de carbone étaient favorables à l'intercalation (§ **III. 1. D.**). Pour étudier l'influence de la longueur du bras, nous avons donc choisi de coupler à l'OFT étudié la cyanine la plus stabilisante **4TO'** avec des bras de liaison d'une longueur décroissante de 7 à 4 atomes de carbone.

La synthèse des cyanines **4TO'**$_n$ (n = 4, 5, 6, et 7) a été préalablement effectuée au laboratoire[243]. Les conjugués OFT-cyanine sont obtenus suivant la méthode de synthèse précédente (§ **A. IV. 1. D.**, Tableau 3).

OFTs	Séquences	Rdt (%)	t_R (min)	Analyse par SM (g.mol^{-1})		
				Formule brute	Calculée	Obtenue
13 $_{4TO'4}$	5'**4TO'4**-*p*(S)TTTTCTTTTC3'	25	20 min 46 s	$C_{120}H_{150}N_{24}O_{68}P_{10}S_2$	3390,49	3389,88
13 $_{4TO'5}$	5'**4TO'5**-*p*(S)TTTTCTTTTC3'	23	22 min 28 s	$C_{121}H_{152}N_{24}O_{68}P_{10}S_2$	3404,52	3403,64
13 $_{4TO'6}$	5'**4TO'6**-*p*(S)TTTTCTTTTC3'	38	24 min 05 s	$C_{122}H_{154}N_{24}O_{68}P_{10}S_2$	3418,54	3417,55
13 $_{4TO'7}$	5'**4TO'7**-*p*(S)TTTTCTTTTC3'	31	26 min 27 s	$C_{123}H_{156}N_{24}O_{68}P_{10}S_2$	3432,57	3431,63

Tableau 3 : Caractérisation des conjugués ***13*** $_{4TO'n}$ *(n = 4, 5, 6, et 7) par chromatographie en phase inverse (mêmes conditions que tableau 2) et spectrométrie de masse.*

Les temps de rétention obtenus sur CLHP en phase inverse diminuent d'environ 2 minutes par groupement méthylène en moins dans le bras de liaison (Tableau 3).

Les mêmes valeurs de ε_{260} que celle du conjugué $\mathbf{13_{4TO'8}}$ sont utilisés pour la série de conjugués $\mathbf{13_{4TO'n}}$ (n = 4, 5, 6, 7 et 8) comportant des bras de liaison alkyle plus courts. Les spectres d'absorption UV-Visible de cette série de conjugués sont quasiment identiques. Les mesures de Tm indiquent que la stabilité du triplex décroit avec la longueur du bras de liaison (environ 3 °C par atome de carbone en moins dans le bras de liaison, Tableau 4). L'OFT conjugué avec le **4TO'** fixé à l'extrémité 5' par un bras de liaison octaméthylène forme la triple hélice la plus stable.

OFTs	Triplex		OFTs	Triplex	
	Tm /°C[a] (± 0.5 °C)	Δ Tm (± 1 °C)		Tm /°C[a] (± 0.5 °C)	Δ Tm (± 1 °C)
$\mathbf{13_{4TO'4}}$	26,5	+ 13,5	$\mathbf{13_{22'Q8}}$	26,5	+ 13,5
$\mathbf{13_{4TO'5}}$	29,0	+ 16,0	$\mathbf{13_{24'Q8}}$	25,5	+ 12,5
$\mathbf{13_{4TO'6}}$	32,5	+ 19,5	$\mathbf{13_{4TO8}}$	27,5	+ 14,5
$\mathbf{13_{4TO'7}}$	35,0	+ 22,0	$\mathbf{13_{42'Q8}}$	19,5	+ 6,5
$\mathbf{13_{4TO'8}}$	37,5	+ 24,5	$\mathbf{13_{44'Q8}}$	23,0	+ 10,0
$\mathbf{13_{Th8}}$	31,0	+ 18,0	$\mathbf{13_{2TO'8}}$	28,0	+ 15,0
$\mathbf{13_{2TO8}}$	32,5	+ 19,5			

[a] : cible **2**

Tableau 4 : Valeurs de Tm des triplex formés avec les OFTs-cyanine (1 µM, tampon phosphate).

IV. 4. Propriétés de fluorescence des 5'-conjugués OFT-cyanine

Les expériences de fluorescence sont effectuées dans les mêmes conditions de tampon et de concentration que les études de dénaturation thermique. Les études de fluorescence ont été effectuées à 4 et 20 °C afin d'étudier l'influence de la température sur la fluorescence. Les conjugués possèdent une bonne photostabilité car aucune diminution d'intensité d'émission n'a été observée après l'enregistrement de dix spectres de fluorescence de la même solution. Les conjugués de la famille du TO sont très résistants à la chaleur et aux variations de pH (Chapitre suivant, § **VI. 3. C.**). En revanche, les propriétés du composé $\mathbf{13_{44'Q}}$ en triple hélice ne pourront être étudiées car il se décolore et perd sa fluorescence au pH légèrement acide nécessaire à la formation des triples hélices comportant des cytosines. La quinocyanine **44'Q**, dont le pKa est voisin de 8[246], est protonée à pH 6 sur l'atome d'azote endocyclique tertiaire et perd ainsi sa conjugaison responsable de l'émission du signal fluorescent (Figure 32).

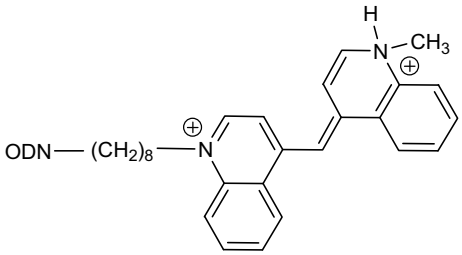


*Figure 32 : Protonation de la quinocyanine **44'Q** à pH légèrement acide.*

Les spectres d'émission de fluorescence des conjugués libres ont été comparés avec ceux des triplex correspondants (Figure 33 et tableau 5). Les λ_{exc} et λ_{em} dépendent de la nature de la cyanine. Les λ_{exc} des sondes ne varient pratiquement pas en fonction de la température. En revanche, les λ_{em} des sondes sont légèrement déplacées vers le rouge lorsque la température augmente. Les longueurs d'ondes d'émission principales des conjugués vont de 467 nm pour le $\mathbf{13_{Th8}}$ à 576 nm pour le $\mathbf{13_{42'Q8}}$. A une même concentration, les intensités de fluorescence sont les plus importantes pour le dérivé de la thiocyanine $\mathbf{13_{Th8}}$, suivies de celles des isomères du TO. Les conjugués des quinocyanines donnent les signaux les plus faibles. Ces observations sont en accord avec les précédentes études effectuées sur une cible simple brin où la présence du noyau benzothiazole est nécessaire pour obtenir une sonde suffisamment fluorescente afin de s'affranchir du bruit de fond. La fluorescence des sondes libres à 4 °C est toujours supérieure à celle à 20 °C, cette observation étant justifiée par la diminution des phénomènes de « back-binding » précédemment évoqué (§ **III. 1. C. 2.**) et de rotation de la molécule autour de sa liaison méthine lorsque la température augmente[233].

Après hybridation des OFTs **13** avec la cible double brin **2**, les λ_{em} des triplex ne varient généralement pas par rapport à celles des sondes libres. En revanche, une très forte augmentation des intensités des signaux fluorescents des conjugués est détectée et ces changements dépendent de la nature de la cyanine et de la longueur du bras de liaison. Les plus grandes variations d'intensité de fluorescence sont observées à 20 °C, et sont très importantes pour les composés $\mathbf{13_{24'Q8}}$ (37 fois), $\mathbf{13_{4TO'4}}$ (32 fois), $\mathbf{13_{4TO'7}}$ (27 fois) et $\mathbf{13_{4TO'8}}$ (24 fois). A basse température (4 °C), ce sont les 3 conjugués des quinocyanines qui provoquent les plus grandes augmentations de fluorescence après hybridation (de 17,5 à 32,4 fois plus fluorescent). Les spectres d'émissions des OFTs libres et hybridés $\mathbf{13_{24'Q8}}$, $\mathbf{13_{2TO8}}$ et $\mathbf{13_{4TO'7}}$ sont représentés à la figure 33.

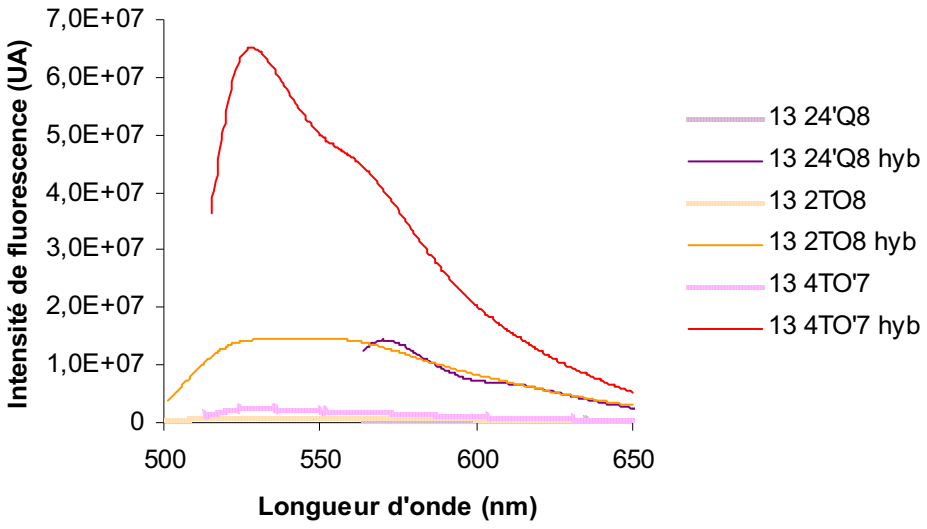


Figure 33 : Spectres d'émission de fluorescence des conjugués $\mathbf{13_{24'Q8}}$, $\mathbf{13_{2TO8}}$ et $\mathbf{13_{4TO'7}}$ *libres et hybridés à 20 °C.*

Ces résultats sont intéressants par rapport à ce qui a été décrit dans la littérature sur la variation de l'intensité de fluorescence au cours de l'hybridation en triple hélice. L'hybridation sur une cible double brin d'ADN d'OFTs de séquences différentes couplés à un dérivé du Hoechst[276] et à un complexe de ruthénium[211] provoque une augmentation de l'intensité de fluorescence de respectivement 3 et 6 à 10 fois alors que l'intensité de fluorescence d'OFTs-acridine diminue (× 0,8) (Données non fournies).

Les variations d'intensité de fluorescence des conjugués des isomères du TO sont toutes pratiquement doublées entre 4 °C et 20 °C ; ce phénomène est du à la faible fluorescence des conjugués libres à 20 °C et probablement à l'intercalation des marqueurs toujours effective à 20 °C. Seul le conjugué $\mathbf{13_{42'Q8}}$ induit une variation d'intensité de fluorescence plus faible à 20 °C, en accord avec le fait que la quinocyanine **42'Q8** est le marqueur le moins stabilisant.

Il est important de noter que lors de l'utilisation d'un marqueur $\mathbf{4TO'_n}$ (n = 4-8), la plus grande augmentation de fluorescence ($\mathbf{13_{4TO'4}}$) ne coïncide pas avec la plus forte stabilisation du triplex ($\mathbf{13_{4TO'8}}$). Lorsque le marqueur est fixé par un bras de liaison plus court, il peut se trouver que partiellement intercalé et ainsi la conformation du complexe peut empêcher la libre rotation de la molécule autour de sa liaison méthine et la protéger de l'inhibition de fluorescence provoquée par les nucléobases de la jonction duplex-triplex. Ces observations peuvent être rapprochée des précédentes études sur des ODNs-**4TO'** capables de détecter les mésappariements terminaux de duplex d'ADN. Dans ce cas, les duplex mésappariés sont plus fluorescents que les duplex parfaits[243].

	Spectres de fluorescence à 20 °C						Intensité de fluorescence (UA)					
OFTs	Libres			Hybridés			I_F libre		I_F hybridé		I_F hyb / I_F libre	
pH 6 1 µM	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Dép. Stockes	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Dép. Stockes	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
$\mathbf{13_{4TO'4}}$	511	528	17	513	525	12	3,09	1,32	53,12	42,51	17,19	32,20
$\mathbf{13_{4TO'5}}$	512	529	17	513	528	15	4,14	1,93	40,12	29,65	9,69	15,36
$\mathbf{13_{4TO'6}}$	512	528	16	514	528	14	7,70	3,72	56,92	55,64	7,39	14,96
$\mathbf{13_{4TO'7}}$	511	529	18	513	528	15	4,71	2,36	62,78	65,20	13,33	27,63
$\mathbf{13_{4TO'8}}$	511	529	18	513	527	14	4,81	2,49	58,32	60,93	12,12	24,47
$\mathbf{13_{Th8}}$	429	467	38	431	454	23	26,26	16,84	89,26	89,50	3,40	5,31
$\mathbf{13_{2TO'8}}$	490	557	67	494	548	54	0,90	0,51	10,07	7,94	11,19	15,57
$\mathbf{13_{2TO8}}$	490	546	56	499	552	53	1,42	0,80	17,88	14,63	12,59	18,29
$\mathbf{13_{22'Q8}}$	526	579	53	528	541	13	0,22	0,15	5,14	3,61	23,36	24,07
$\mathbf{13_{24'Q8}}$	561	574	13	561	570	9	0,70	0,38	22,75	14,38	32,50	37,84
$\mathbf{13_{4TO8}}$	510	529	19	511	527	16	3,44	1,58	24,09	20,12	7,00	12,73
$\mathbf{13_{42'Q8}}$	560	576	16	556	566	10	0,33	0,18	5,69	2,90	17,24	16,11

Tableau 5 : Caractérisation par fluorescence des 5'-conjugués OFT-cyanine libres et hybridés.

Lors d'études sur une cible simple brin, il a été montré que certains intercalants stabilisaient plus lorsqu'ils étaient liés à l'extrémité 3' plutôt qu'à l'extrémité 5' du duplex formé[197]. Pour étudier l'influence de la position d'ancrage du marqueur sur l'OFT, nous avons donc choisi d'étudier sur notre modèle de triple hélice la stabilisation et la variation de fluorescence provoquée par la fixation des cyanines possédant les meilleures propriétés de stabilisation lorsqu'elles sont liées en 5', à l'extrémité 3' de l'OFT.

V. Synthèse et propriétés des 3'-conjugués OFT-cyanine

V. 1. Synthèse et propriétés de stabilisation des 3'-conjugués OFT-cyanine avec un bras octaméthylène

Les cyanines **4TO'** et **2TO**, les plus efficaces pour stabiliser la triple hélice lorsqu'elles sont attachées à l'extrémité 5' de l'OFT, sont fixées en 3' de l'OFT par l'intermédiaire d'une fonction thiophosphate avec un bras octaméthylène. La synthèse d'oligonucléotides modifiés en position 3' est plus délicate que celle d'oligonucléotides modifiés à l'extrémité 5'. En effet, l'élongation de la chaîne oligonucléotidique sur support étant réalisée dans le sens 3' → 5', toutes les séquences tronquées comportent la modification. Dans notre cas, une purification de l'oligonucléotide avant la réaction de couplage avec le marqueur est donc impérative. D'autre part, la synthèse d'oligonucléotides 3'-thiophosphate requiert l'emploi d'un support modifié (Schéma 16). Le support comportant un lien disulfure a été développé au laboratoire[273]. L'emploi d'un agent réducteur tel le DTT permet en une seule étape de libérer l'oligonucléotide du support et simultanément, de libérer le groupement 3'-thiophosphate.

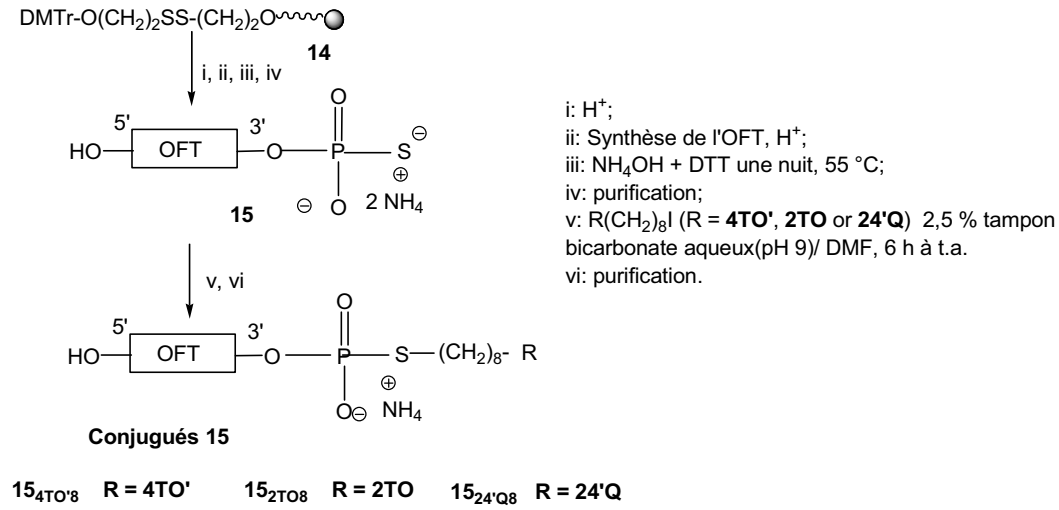


Schéma 16 : Synthèse des 3'-conjugués OFT-cyanine.

Le support modifié est détritylé puis le dérivé phosphoramidite du premier nucléoside est couplé en présence de tétrazole. La fonction phosphite résultante est sulfurée en fonction thiophosphate triester par le tétraéthylthiuram (§ **IV. 1. B.**). Le rendement de couplage est évalué par dosage du cation tritylium libéré en milieu acide. Après une étape de coiffage, l'élongation de l'oligonucléotide est poursuivie sur le synthétiseur d'oligonucléotides, puis le groupement trityle 5'-terminal est retiré (mode

DMTr-off). L'oligonucléotide est déprotégé et libéré du support en présence d'une solution d'ammoniaque concentrée (28 %) et de DTT pendant 6 à 8 heures à 55 °C. La solution aqueuse est concentrée puis lavée à l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est purifiée sur colonne d'exclusion stérique Sephadex G-10 puis par chromatographie d'échange d'ions.

OFTs	Séquences	Rdt (%)	t_R (min)	Analyse par SM (g.mol^{-1})		
				Formule brute	Calculée	Obtenue
$15_{4TO'8}$	$^{5'}$TTTTCTTTTC*p*(S)-**4TO'8** $^{3'}$	18	25 min 58 s	$C_{124}H_{158}N_{24}O_{68}P_{10}S_2$	3446,60	3446,00
$15_{4TO'4}$	$^{5'}$TTTTCTTTTC*p*(S)-**4TO'4** $^{3'}$	9	22 min 21 s	$C_{120}H_{150}N_{24}O_{68}P_{10}S_2$	3390,49	3389,28
15_{2TO8}	$^{5'}$TTTTCTTTTC*p*(S)-**2TO8** $^{3'}$	18	26 min 07 s	$C_{124}H_{158}N_{24}O_{68}P_{10}S_2$	3446,60	3446,79
$20_{4TO'6}$	$^{5'}$TTTTCTTTTC*p*-$(CH_2)_6$S-**4TO'6** $^{3'}$	21	31 min 17 s	$C_{128}H_{166}N_{24}O_{69}P_{10}S_2$	3518,71	3532,71
$20_{4TO'4}$	$^{5'}$TTTTCTTTTC*p*-$(CH_2)_6$S-**4TO'4** $^{3'}$	17	28 min 08 s	$C_{126}H_{162}N_{24}O_{69}P_{10}S_2$	3490,65	3505,00

Tableau 6 : Caractérisation des 3'-conjugués OFT-cyanine par chromatographie en phase inverse (mêmes conditions que tableau 2) et spectrométrie de masse.

Les temps de rétention obtenus par analyse en phase inverse indiquent que les 3'-conjugués sont moins retenus que les 5'-conjugués dans nos conditions d'élution (2 à 3 minutes, Tableau 6).

Les mêmes valeurs de ε_{260} que celles des conjugués **$13_{4TO'8}$** et **13_{2TO8}** sont utilisées pour les conjugués **$15_{4TO'n}$** (n = 4, 8) et **15_{2TO8}**. La contribution spectroscopique dans l'UV et le visible ne varie que très peu selon que la cyanine est fixée à l'extrémité 5' ou 3'.

L'hybridation des OFTs conjugués **15** avec la cible double brin d'ADN **2** à 4 °C n'induit que de légères modifications spectrales comparables à celles observées avec les OFTs 5'-conjugués. La bande principale du spectre d'absorption visible du conjugué **15_{2TO8}** tend à se diviser en deux pics ce qui suggère un changement d'interaction du marqueur avec le complexe d'acides nucléiques (Figure 34).

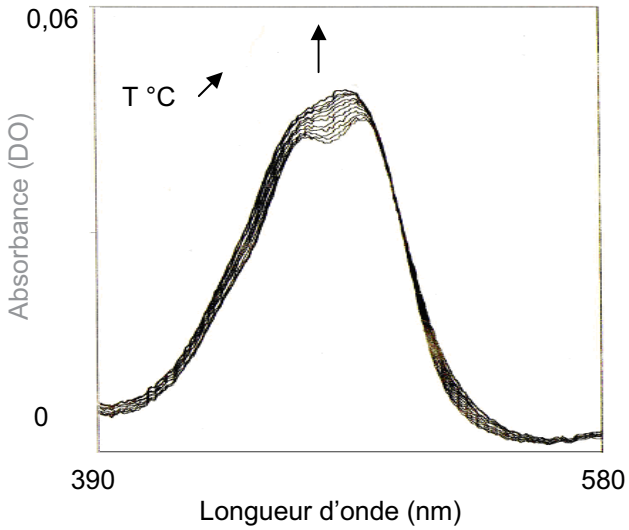
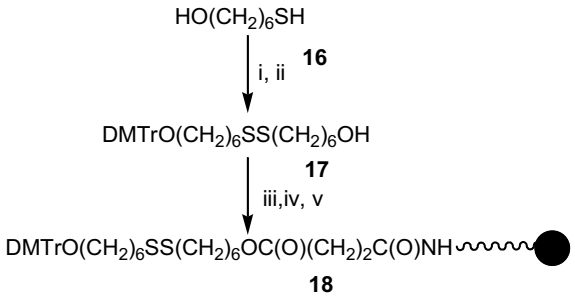


*Figure 34 : Spectres d'absorption dans le visible du triplex formé avec le conjugué **15_{2TO8}** au cours de la dénaturation thermique.*

Les cyanines stabilisent moins les triples hélices lorsqu'elles sont fixées à l'extrémité 3' de l'OFT que lorsqu'elles sont liées à l'extrémité 5' : Δ**Tm15$_{4TO'8}$** : + 13 °C contre + 24,5 °C et Δ**Tm15$_{2TO8}$**: + 6 °C contre + 19,5 °C (Tableau 7). Ces résultats sont en accord avec de précédentes études sur des OFTs-acridine[196]. Ces études avaient également montré qu'un allongement du bras de liaison du marqueur à l'OFT à l'extrémité 3' par rapport à celui de l'extrémité 5' augmentait la stabilisation du triplex.

Nous avons donc choisi de synthétiser les 3'-conjugués de **4TO'** possédant des longueurs de bras de 4, 11 et 13 atomes afin d'étudier l'influence de la longueur du bras de liaison à l'extrémité 3' de l'OFT. La synthèse de l'OFT **15$_{4TO'4}$** repose sur l'emploi du support modifié précédemment décrit pour obtenir une fonction thiophosphate à l'extrémité 3' succeptible de réagir avec le marqueur **4TO'4**.

Afin d'éviter la synthèse des cyanines **4TO'** avec des bras iodoalkyle de 11 et 13 atomes de carbone dont la synthèse est difficile, il est préférable d'insérer préalablement une partie du bras de liaison sur l'OFT afin d'y coupler des dérivés du **4TO'** déjà synthétisés. La synthèse des conjugués **20$_{4TO'4}$** et **20$_{4TO'6}$** possédant respectivement un bras de liaison de 11 et 13 atomes de carbone repose donc sur l'emploi d'un nouveau support modifié aboutissant après déprotection et libération de l'OFT du support à une fonction thiol protégée à l'extrémité d'un bras hexaméthylène fixé sur le phosphate 3' terminal. Le support permettant d'accéder à ce composé n'a jamais été décrit.

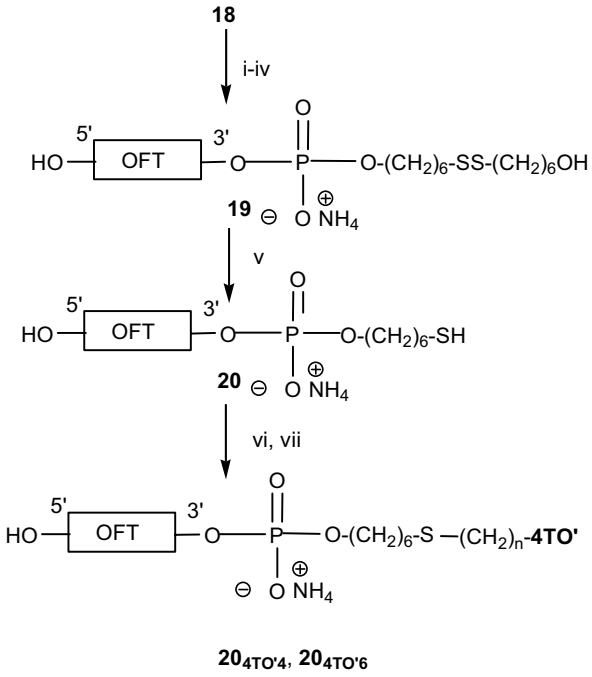


i: EtOH/NH_4OH, air;
ii: DMTrCl/Pyr;
iii: anhydride succinique, DMAP, pyridine;
iv: p-nitrophenol, pyridine, DCC, dioxane;
v: aminopropyl-CPG-500, NEt_3, DMF;

Schéma 17 : Synthèse du support modifié donnant accès à un oligonucléotide comportant une fonction thiol en 3'.

Ce nouveau support est obtenu suivant un mode opératoire comprenant 4 étapes principales (Schéma 17). Premièrement, le thiohexanol **16** est dimérisé en 6,6'-dithiodihexanol dans un mélange ammoniaque/éthanol et en présence d'un bullage d'air[109] puis le dimère réagit alors avec du chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle en présence de pyridine pour donner le 1-*O*-diméthoxytrityl-6,6'-dithiodihexanol **17**. Ce dernier réagit avec l'anhydride succinique dans un mélange pyridine/DMAP pour donner l'acide 20-*O*-diméthoxytrityl-12,13-dithia-5,20-dioxa-4-oxo-eicosanoique. Cet acide est activé par estérification en présence de *para*-nitrophénol et de DCC puis est ajouté à une suspension de support CPG 500 Å (Chemgenes) dans un mélange DMF/TEA. Les fonctions amine résiduelles du support non couplées sont alors acétylées. Le support obtenu **18** possède une capacité de 36 µmol/g.

Après synthèse de l'oligonucléotide, la déprotection est réalisée en présence d'ammoniaque. L'oligonucléotide **19** avec la fonction thiol protégée sous forme de lien disulfure est alors purifié en chromatographie par échange d'ions. La fonction thiol est libérée en présence de TCEP[277] pour donner l'OFT **20** non isolé, afin de réagir ultérieurement avec les dérivés iodoalkyle des cyanines dans les mêmes conditions que précédemment (Schéma 18). Les conjugués sont purifiés sur CLHP en phase inverse (Tableau 6) et caractérisés par spectrométrie de masse et spectroscopie UV/Vis.



i: H^+;
ii: Synthèse de l'OFT, H^+;
iii: NH_4OH 15 h, 55 °C;
iv: purification;
v:2,5 % tampon bicarbonate aqueux (pH 9)/TCEP;
vi: **4TO'-**$(CH_2)_n$-I, 2,5 % tampon bicarbonate aqueux (pH 9)/ DMF, 6 h à t.a.;
vii: purification;

*Schéma 18 : Introduction d'une fonction thiol protégée en 3 'suivie du couplage de **4TO'4** et **4TO'6.***

L'allongement du bras de liaison augmente le temps de rétention obtenu par analyse en phase inverse, parallèlement à ce qui a été observé pour les 5'-conjugués (§ **IV. 3. B.**).

Les mêmes valeurs de ε_{260} que celles des conjugué $\mathbf{13_{4TO'8}}$ sont utilisées pour les conjugués $\mathbf{15_{4TO'4}}$ et $\mathbf{20_{4TO'n}}$ (n = 4 et 6).

La stabilisation apportée par le **4TO'** lié à l'OFT à l'extrémité 3' avec un bras à 8 atomes de carbone est plus grande que celle obtenue par sa fixation par des bras de liaison plus courts ou plus longs (ΔTm$\mathbf{15_{4TO'4}}$: + 5 °C, ΔTm$\mathbf{20_{4TO'4}}$: + 8 °C, ΔTm$\mathbf{20_{4TO'6}}$: + 5 °C contre + 13 °C, tableau 7). Après hybridation, du fait de la rigidité de la triple hélice, les cyanines ne peuvent interagir qu'avec les bases du duplex cible proches de l'extrémité de l'OFT où est liée la cyanine. En raison du choix du duplex cible, les marqueurs fixés à l'extrémité 5' de l'OFT se retrouvent dans un environnement A-T alors que ceux fixés à l'extrémité 3' se retrouvent dans un environnement G-C.

OFTs	Triplex	
1 µM	Tm /°C[a]	Δ Tm
pH 6	(± 0.5 °C)	(± 1 °C)
$15_{4TO'8}$	26,0	+ 13,0
$15_{4TO'4}$	18,0	+ 5,0
15_{2TO8}	19,0	+ 6,0
$20_{4TO'6}$	18,0	+ 5,0
$20_{4TO'4}$	21,0	+ 8,0
$13_{4TO'8}$	37,5	+ 24,5

[a] : Cible **2**

Tableau 7 : Valeurs de Tm des 3'-conjugués OFT-cyanine.

V. 2. Propriétés de fluorescence des 3'-conjugués OFT-cyanine

Les spectres d'excitation et d'émission des 3'-conjugués sont semblables à ceux des 5'-conjugués correspondants. Les intensités de fluorescence de tous les 3'-conjugués augmentent après hybridation sur la cible double brin d'ADN, mais nettement moins comparativement aux 5'-conjugués (Tableau 8). Les 3'-conjugués provoquant la plus grande variation d'intensité de fluorescence sont le **$20_{4TO'4}$** (12 fois à 20 °C) et le **$20_{4TO'6}$**, les deux conjugués possédant les bras de liaison du fluorophore à l'OFT les plus longs, respectivement de 11 et 13 atomes (Figure 35). Il faut noter que toutes les variations d'intensité de fluorescence sont plus importantes à 20 °C qu' 4 °C sauf dans le cas du **$15_{4TO'4}$** (et du **$13_{42'Q8}$**). Les deux marqueurs **4TO'4** et **42'Q8** sont ceux qui stabilisent le moins le triplex. Ce dernier n'étant que partiellement hybridé à 20 °C, il est normal que l'intensité de fluorescence émise par ces conjugués hybridés soit plus faible.

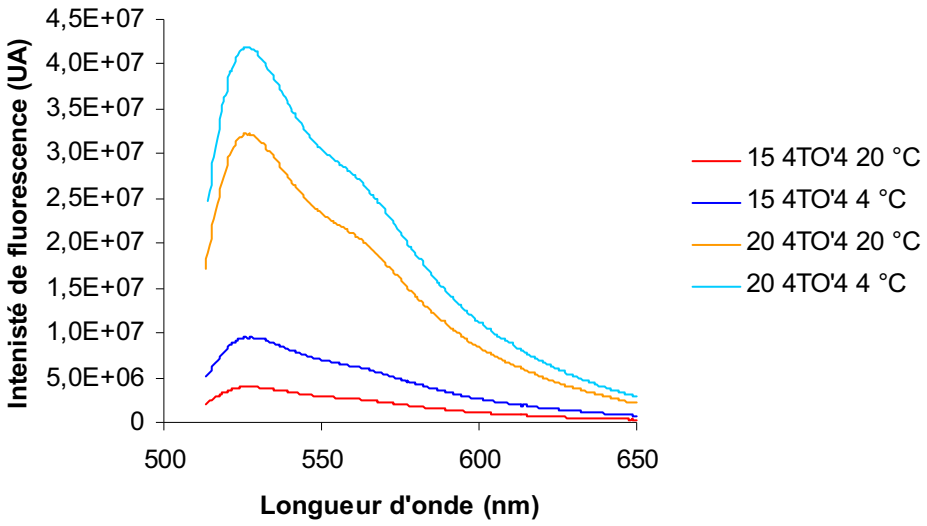


Figure 35 : Spectres d'émission de fluorescence des conjugués **$15_{4TO'4}$** et **$20_{4TO'4}$** *hybridés à 4 et 20 °C.*

Les données de fluorescence du conjugué **$15_{4TO'8}$** ne sont pas expliquées car les intensités de fluorescence de la sonde libre sont anormalement élevées par comparaison avec celles de tous les autres conjugués du même fluorophore ou de la famille du TO.

OFTs pH 6 1 µM	Spectres de fluorescence à 20 °C						Intensité de fluorescence (UA)					
	Libres			Hybridés			libres		hybridés		I_F hyb / I_F libre	
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Dép. Stockes	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Dép. Stockes	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
$15_{4TO'8}$	514	527	13	511	527	16	49,21	22,58	51,09	38,66	1,04	1,71
$15_{4TO'4}$	510	528	18	511	527	16	0,99	0,45	9,49	3,96	9,59	8,80
15_{2TO8}	491	546	55	494	524	28	1,93	0,98	8,76	5,71	4,54	5,83
$20_{4TO'6}$	511	531	20	510	526	16	7,70	2,46	38,41	30,63	4,99	12,45
$20_{4TO'4}$	512	529	17	511	526	15	7,16	3,00	41,93	32,25	5,86	10,75
$13_{4TO'8}$	511	529	18	513	527	14	4,81	2,49	58,32	60,93	12,12	24,47

Tableau 8 : Caractérisation par fluorescence des 3'-conjugués OFT-cyanine libres et hybridés.

Dans le but d'effectuer un polymarquage et d'améliorer les propriétés de fluorescence de nos sondes par rapport aux conjugués monomarqués en 5', nous avons synthétisé et étudié les propriétés de bis 5', 3'-conjugués OFT-cyanines. L'augmentation de stabilité des triples hélices apportée par la présence d'un second marqueur à l'extrémité 3' a été précédemment décrite avec des bis-conjugués OFT-naphtalènes[203] et OFT-perylènes[97].

VI. Synthèse et propriétés des bis 5', 3'-conjugués OFT-cyanines

VI. 1. Synthèse des bis 5', 3'-conjugués OFT-cyanines

Nous avons choisi de coupler les deux cyanines **4TO'8** et **2TO8**, qui ont l'effet stabilisant le plus important lorsqu'elles sont liées en 5' ainsi que la quinocyanine **24'Q8** responsable de la plus grande variation de fluorescence après hybridation, par l'intermédiaire de deux fonctions thiophosphate afin de pouvoir coupler le même fluorophore aux deux extrémités en une seule réaction. Les oligonucléotides bis-fonctionnalisés par des fonctions thiophosphate aux extrémités 5' et 3' sont obtenus en utilisant la méthode précédemment décrite (§ **V. 1.**) pour le mono-marquage à l'extrémité 3' suivie de la méthode utilisée pour le mono-marquage à l'extrémité 5' décrite au paragraphe § **IV. 1. D.** (Schéma 19). Ces oligonucléotides bis-fonctionnalisés sont purifiés en chromatographie par échange d'ions avant couplage du marqueur et caractérisés par spectrométrie de masse et spectroscopie UV/Vis.

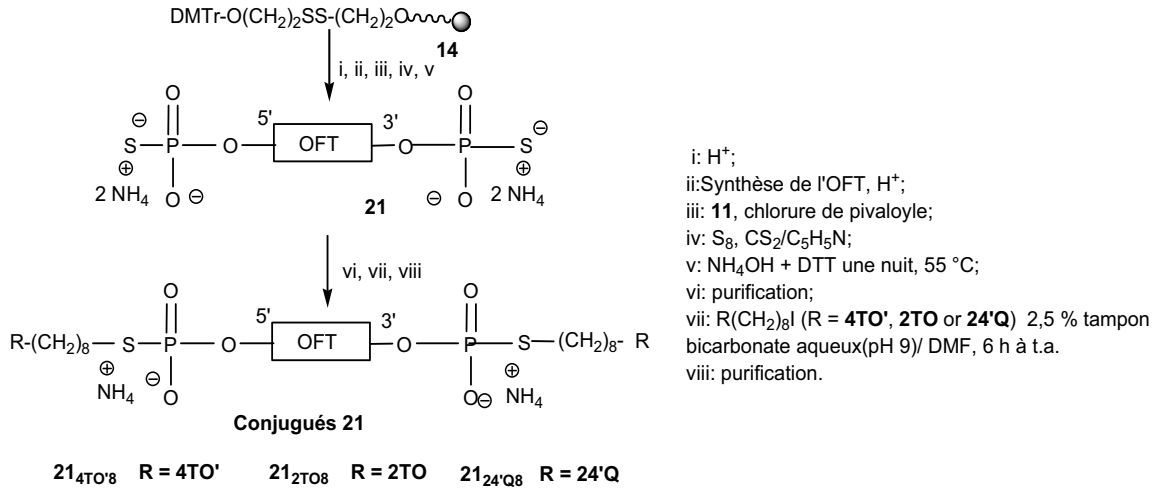


Schéma 19 : Synthèse des bis 5', 3'-conjugués OFT-cyanines.

La méthode de couplage des marqueurs sur les OFTs bis-thiophosphates **21** est identique à celle des mono-conjugués. Les temps de rétention obtenus par analyse en phase inverse indiquent que les bis-conjugués de la série **21** sont plus retenus dans nos conditions d'élution que les mono-conjugués correspondants du fait de la présence de deux fluorophores qui augmente la lipophilie du conjugué.

Nous avons également étudié l'influence de l'allongement du bras de liaison en 3' sur les propriétés des bis-conjugués. A l'aide du nouveau support précédemment décrit dans le cas des 3'-conjugués libérant une fonction thiol protégée après décrochage du support, le bis-conjugué **22$_{4TO'8.4}$** possédant un bras de liaison thioéther de 11 atomes à l'extrémité 3' et un bras de liaison à 8 atomes de carbone en position 5' a été obtenu en deux étapes (Schéma 20). Le couplage de l'OFT bis-modifié **22** avec le **4TO'8** est suivi de la libération de la fonction thiol par coupure du pont disulfure par l'agent réducteur (TCEP) puis de sa réaction avec le **4TO'4** pour obtenir le composé **22$_{4TO'8-4}$** qui est alors purifié sur CLHP en phase inverse et caractérisé par spectrométrie de masse (Tableau 9) et spectroscopie UV/Vis. Le rendement est plus faible car une étape de purification supplémentaire est nécessaire après couplage du **4TO'8** en position 5'.

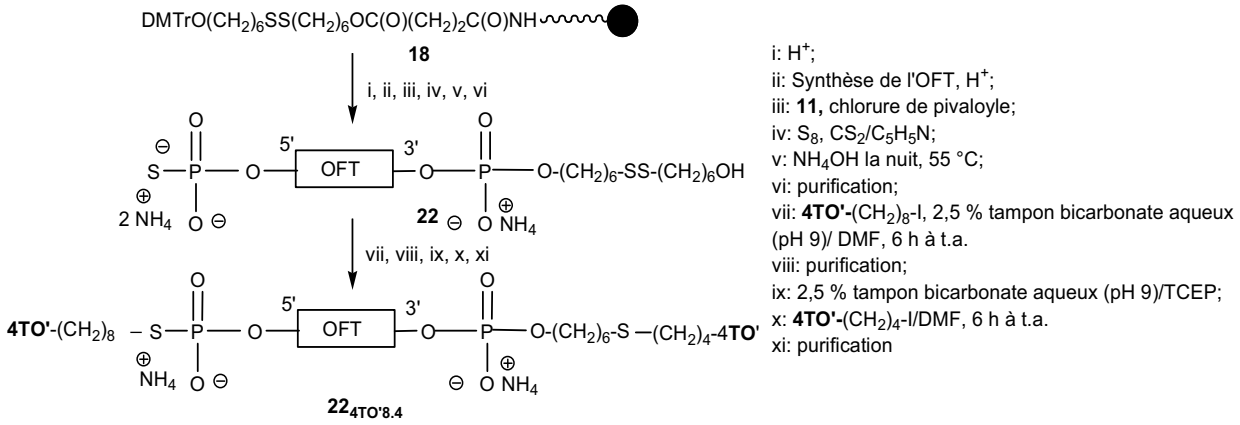


Schéma 20 : Synthèse du bis-conjugué 5'-thiophosphate, 3'-thiol **22$_{4TO'8-4}$**.

VI. 2. Caractérisation des bis 5', 3'-conjugués OFT-cyanines

Le temps de rétention obtenu par analyse en phase inverse de $\mathbf{22_{4TO'8-4}}$ est proche de celui de l'autre bis-conjugué correspondant $\mathbf{21_{4TO'8}}$ avec un bras de liaison plus court en 3' (Figure 36).

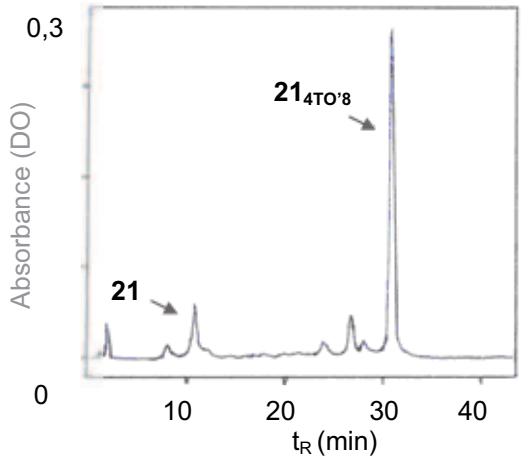


Figure 36 : Chromatogramme d'analyse CLHP phase inverse du conjugué $\mathbf{21_{4TO'8}}$.

OFTs	Séquences	Rdt (%)	t_R (min)	Analyse par SM ($g.mol^{-1}$) Formule brute	Calculée	Obtenue
$\mathbf{21_{4TO'8}}$	$^{5'}$**4TO'8**-*p*(S)TTTTCTTTTC*p*(S)-**4TO'8**$^{3'}$	27	32 min 47 s	$C_{150}H_{188}N_{26}O_{70}P_{11}S_4$	3944,24	3942,79
$\mathbf{21_{2TO8}}$	$^{5'}$**2TO8**-*p*(S)TTTTCTTTTC*p*(S)-**2TO8**$^{3'}$	22	34 min 27 s	$C_{150}H_{188}N_{26}O_{70}P_{11}S_4$	3944,24	3943,36
$\mathbf{21_{24'Q8}}$	$^{5'}$**24'Q8**-*p*(S)TTTTCTTTTC*p*(S)-**24'Q8**$^{3'}$	25	32 min 58 s	$C_{154}H_{192}N_{26}O_{70}P_{11}S_2$	3932,19	3931,59
$\mathbf{22_{4TO'8-4}}$	$^{5'}$**4TO'8**-*p*(S)TTTTCTTTTC*p*-$(CH_2)_6$S-**4TO'4**$^{3'}$	5	32 min 13 s	$C_{152}H_{192}N_{26}O_{71}P_{11}S_4$	3988,30	4002,41

Tableau 9 : Caractérisation des bis-conjugués OFT-cyanines par chromatographie en phase inverse (mêmes conditions que tableau 2) et spectrométrie de masse.

Les formes des spectres d'absorption des bis-conjugués dans le visible diffèrent de celles des mono-conjugués (Figure 37). Le spectre du bis-conjugué $\mathbf{21_{4TO'8}}$ possède une bande principale la plus intense à λ = 478 nm et un épaulement à λ = 508 nm alors que le spectre du mono-conjugué $\mathbf{13_{4TO'8}}$ est composé d'un épaulement à 478 nm et d'une bande principale à 508 nm. Lorsque la température augmente, de 20 à 60 °C, la bande principale du spectre du conjugué $\mathbf{13_{4TO'8}}$ dans le visible est déplacée de 3 nm vers le bleu avec un léger hypochromisme de 2-3 % alors que seulement un hypochromisme de 4 % à 478 nm est détecté pour le bis-conjugué correspondant $\mathbf{21_{4TO'8}}$. Des changements d'intensité spectrale du même ordre sont observés dans le cas des OFTs $\mathbf{13_{2TO8}}$ et $\mathbf{21_{2TO8}}$ marqués avec la cyanine **2TO**. Le spectre de l'OFT mono-marqué $\mathbf{13_{2TO8}}$ possède une bande principale à λ = 488 nm et un épaulement à λ = 470 nm alors que l'OFT bis-marqué possède une bande principale à λ = 459 nm et un épaulement à λ = 500 nm. Dans le cas du bis-marquage de l'OFT avec la quinocyanine **24'Q**, le spectre d'absorption visible du mono-conjugué montre un pic principal à λ = 561 nm et un épaulement à λ = 528 nm. Le spectre visible du bis-conjugué correspondant possède deux bandes principales à λ = 519 nm et λ = 560 nm.

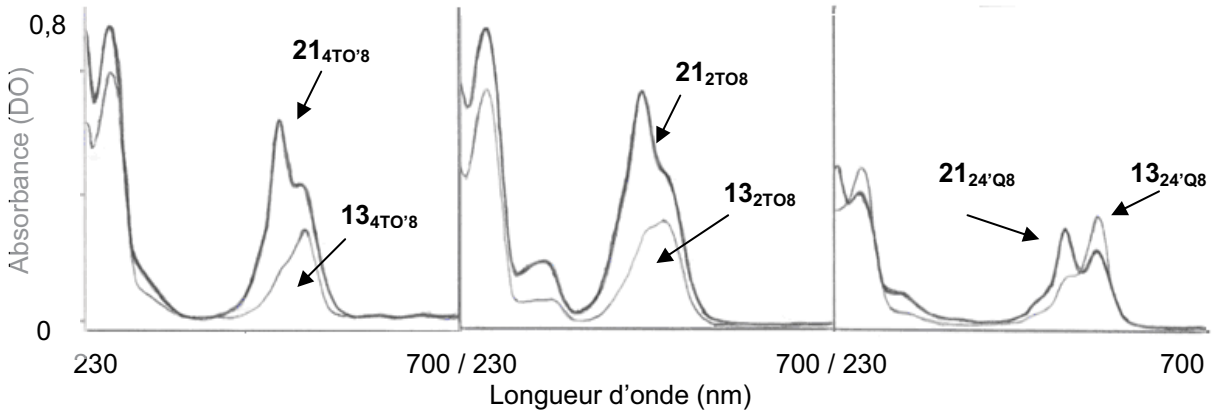


Figure 37 : Spectres d'absorption des bis-conjugués **$21_{4TO'8}$**, **21_{2TO8}** *et* **$21_{24'Q8}$** *comparés à ceux des mono-conjugués correspondants.*

En plus des différences de forme des spectres d'absorption dans le visible des OFTs mono- et bis-conjugués, l'observation du rapport UV-Visible indique que les intensités des bandes dans le visible des bis-conjugués ne sont pas égales au double de celles des mono-conjugués. Le déplacement vers les courtes longueurs d'onde de la bande d'absorption visible des bis-conjugués indique un phénomène d'agrégation des cyanines. Des changements spectraux similaires ont été précédemment décrits pour des dimères du TO[220]. D'après une étude récente sur l'agrégation de cyanines polyméthines[278], la forme des spectres d'absorption de nos bis-conjugués correspondrait à la formation de H-agrégats moins fluorescents que les monomères correspondants. De plus, d'après une étude précédente sur l'agrégation du TO libre en solution aqueuse[220], les H-agrégats seraient de type intramoléculaire car la concentration de 1 µM en bis-conjugué de nos études serait trop faible pour engendrer des interactions intermoléculaires.

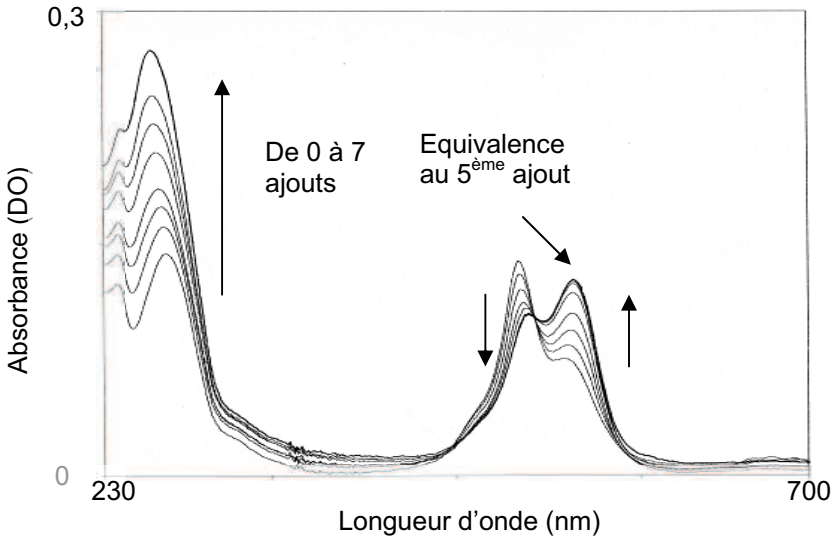


Figure 38 : Courbes de titration du conjugué **$21_{4TO'8}$** *suivie par spectroscopie d'absorption.*

Les coefficients d'extinction molaire à 260 nm ε_{260} des composés **$21_{4TO'8}$**, **21_{2TO8}**, **$21_{24'Q8}$** ont été déterminés par titration de leurs solutions dans le tampon « phosphate » (pH 6) à 4 °C en présence de

leur séquence complémentaire simple brin $^{5'}$GGGAAAAGAAAATTT$^{3'}$ (Figure 38). Il faut noter que leurs valeurs sont inférieures d'environ 5 % à la somme de la contribution de l'oligonucléotide et du double de la contribution de la cyanine à 260 nm. Le coefficient d'extinction molaire à 260 nm ε_{260} utilisé pour le bis-conjugué $\mathbf{22_{4TO'8\text{-}4}}$ est le même que celui du composé $\mathbf{21_{4TO'8}}$.

VI. 3. Etude des propriétés des bis-conjugués après hybridation

L'hybridation des OFTs conjugués dérivés de **21** avec la cible double brin d'ADN **2** à 4 °C induit des changements spectraux plus importants que lors de l'hybridation des mono-conjugués. Ils s'illustrent dans le cas du bis-conjugué $\mathbf{21_{4TO'8}}$ par une diminution (24 %) de l'intensité de la bande principale à 478 nm et une augmentation (34 %) de la bande secondaire à 508 nm (Tableau 10). Des changements similaires mais d'intensités variables sont observés pour les composés $\mathbf{22_{4TO'8\text{-}4}}$ (hypochromisme de 18 % à 481 nm et hyperchromisme de 20 % à 511 nm), $\mathbf{21_{2TO8}}$ (déplacement bathochromique de 7 nm, 13 % d'hypochromisme à 488 nm) et $\mathbf{21_{24'Q8}}$ (4 nm vers le rouge, 20 % d'hyperchromisme à 519 nm). Ces changements indiquent qu'en présence du duplex cible, les interactions entre les deux cyanines sont rompues. Après hybridation, comme les triples hélices d'ADN sont plus rigides que les simples brins, les cyanines sont en interaction avec l'extrémité du triplex et quelques paires de bases du duplex proches de la jonction duplex-triplex du côté de la cyanine.

L'hybridation de l'OFT conjugué avec le duplex cible engendre une inversion des intensités du pic secondaire et du pic principal, forme comparable au spectre d'absorption de l'espèce dimérique du TO étudiée par Svankik et al.[232-233]. La présence de deux points isobestiques suggère l'hypothèse que lorsque la sonde est hybridée, le marqueur lié en 5' est intercalé et donc éloigné de celui lié en 3' alors que lorsque la sonde est libre ils peuvent interagir pour former un homodimère. Ce phénomène a été précédemment observé au laboratoire (résultats non publiés) avec des sondes comportant deux TO liés sur un même groupement phosphate terminal à l'extrémité 5' par un bras bis-amine. Dans le cas du bis-conjugué $\mathbf{21_{2TO8}}$, l'intensité de la bande principale (488 nm) diminue au cours de l'hybridation et l'épaulement devient un second pic principal (Figure 39).

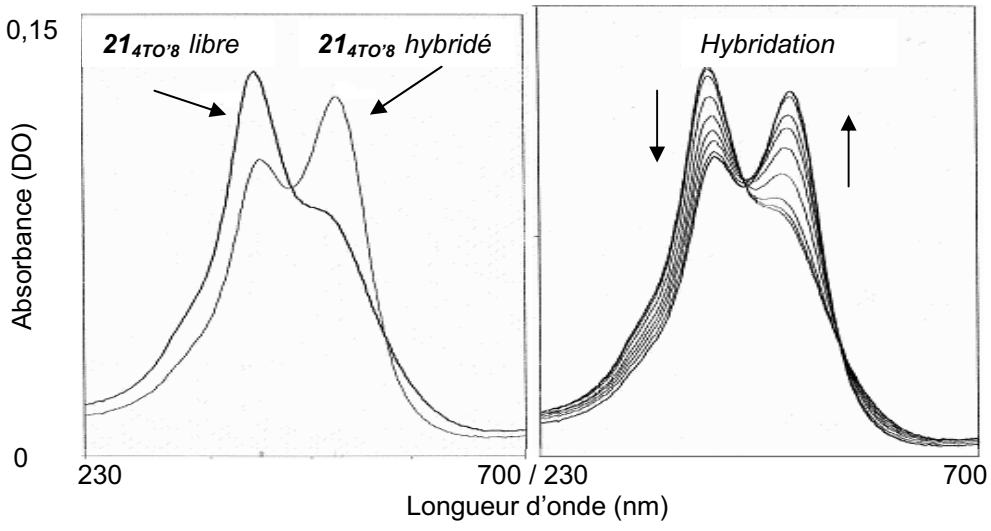


Figure 39 : Evolution du spectre d'absorption visible du bis-conjugué $\mathbf{21_{4TO'8}}$ au cours de l'hybridation.

Dans tous les cas (conjugués **$21_{4TO'8}$**, **21_{2TO8}**, **$21_{24'Q8}$**, **$22_{4TO'8-4}$**), la présence de la seconde cyanine induit une nette augmentation de la stabilité des triples hélices comparées à celles obtenues avec les mono-conjugués en 5' ou 3' (Figure 40). La présence du second intercalant **4TO'8**, **2TO8** et **24'Q8** induit une augmentation des valeurs de Tm de respectivement + 7,5 °C, + 6,5 °C et + 5 °C.

OFTs 1 µM pH 6	λ_{UVmax} (nm) Pic principal	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{VISmax} (nm) Pic principal	épaulement	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	Triplex Tm /°C[a] (± 0.5 °C)	Triplex Δ Tm (± 1 °C)
$21_{4TO'8}$	267	145000	478	508	143600	45,0	+ 32,0
21_{2TO8}	267	154500	459	500	143900	39,0	+ 26,0
$21_{24'Q8}$	267	85800	519	560	74500	30,5	+ 17,5
$22_{4TO'8-4}$	267	145000	479	509	111500	43,0	+ 30,0
$13_{4TO'8}$	267	116500	508	478	82700	37,5	+ 24,5

[a] : Cible **2**

Tableau 10 : Caractérisation des bis-conjugués OFT-cyanines par spectroscopie d 'absorption.

La plus forte stabilisation (ΔTm : + 32 °C) est observée avec le composé **$21_{4TO'8}$** comportant deux marqueurs **4TO'8**. Elle correspond globalement à la somme des stabilisations apportées par les deux cyanines. Une augmentation de la longueur du bras de liaison à l'extrémité 3' dans le cas du composé **$22_{4TO'8-4}$** (de 8 à 11 atomes de carbone) induit une légère diminution de la stabilité du triplex (ΔTm : + 30 °C).

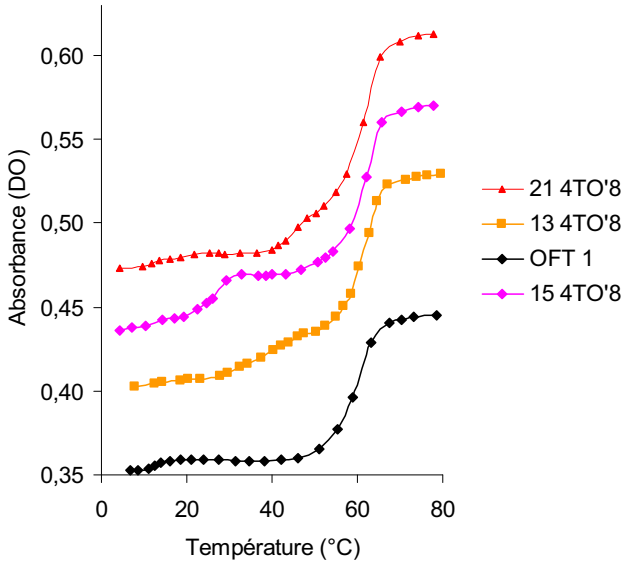


*Figure 40 : Courbes de dénaturation thermique déterminées par spectroscopie d'absorption à 260 nm des triplex formés par les conjugués **$21_{4TO'8}$**, **$15_{4TO'8}$**, **$13_{4TO'8}$** et l'OFT **1** non modifié avec le duplex **2**.*

Les mesures des valeurs de Tm effectuées à 260 nm et dans le visible aux λ_{max} des pics d'absorption correspondant aux formes dimère et monomère des cyanines aboutissent aux mêmes valeurs, ce qui veut dire que la chaîne oligonucléotidique et les marqueurs se dissocient en même temps, contrairement à ce qui a été observé avec des conjugués OFT-naphtalènes[203] (Figure 41).

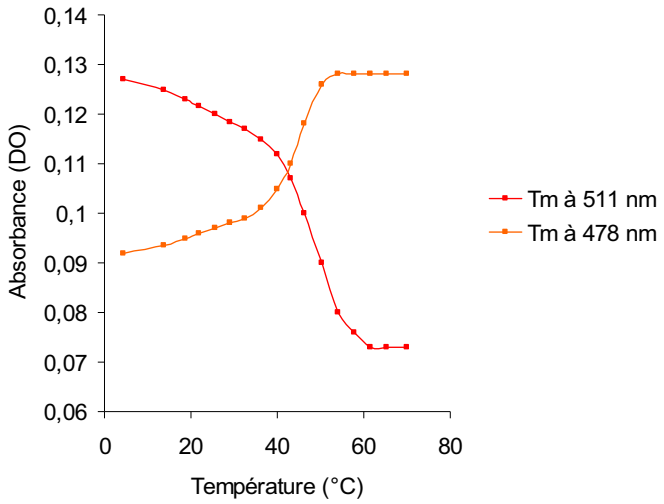


Figure 41 : Courbes de dénaturation thermique suivie par spectroscopie d'absorption au λ_{VISmax} pour le triplex ***21*** $_{4TO'8}$ ***+ 2****.*

VI. 4. <u>Propriétés de fluorescence des bis 5', 3'-conjugués OFT-cyanines</u>

La présence d'un second marqueur induit un changement de l'intensité du signal fluorescent émis alors que la forme du spectre d'émission n'est pas modifiée (Figure 42). Dans le cas des composés **21**$_{4TO'8}$**,** **21**$_{24'Q8}$ et **21**$_{4TO'8\text{-}4}$ non hybridés, les intensités de fluorescence sont proches de celles des 5'-mono-conjugués correspondants. Ces résultats peuvent être expliqués par un phénomène d'inhibition de fluorescence provoqué par les interactions intramoléculaires entre les deux cyanines. De plus, la comparaison des signaux émis par les deux bis-conjugués **21**$_{4TO'8}$ et **21**$_{4TO'8\text{-}4}$ du **4TO'** indique qu'un bras de liaison plus long à l'extrémité 3' de l'OFT augmente l'effet d'inhibition de fluorescence car le conjugué **21**$_{4TO'8\text{-}4}$ est moins fluorescent que **21**$_{4TO'8}$. Les interactions des deux cyanines sont donc favorisées par la plus grande longueur de bras de liaison à l'extrémité 3'. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature concernant le bis-marquage de sondes oligonucléotidiques en épingle à cheveux avec la cyanine Cy 5.5[75]. Dans le cas du conjugué **21**$_{2TO8}$, la présence du second marqueur induit un déplacement important du λ_{em} vers le rouge (de 544 nm à 579 nm) et une nette augmentation de l'intensité de fluorescence. D'après les valeurs d'intensités de fluorescence des mono- et des bis-conjugués du **2TO'**, il n'y a pas d'inhibition de fluorescence entre les deux cyanines du **21**$_{2TO8}$ (Tableau 11).

Les augmentations d'intensité de fluorescence des bis-conjugués **21**$_{4TO'8}$**,** **21**$_{2TO8}$**,** **21**$_{24'Q8}$ et **21**$_{4TO'8\text{-}4}$ après hybridation à 20 °C sont inférieures à celle des 5'-mono-conjugués correspondants (respectivement 18, 8, 8 et 7 fois contre 24, 18, 38 et 24 fois).

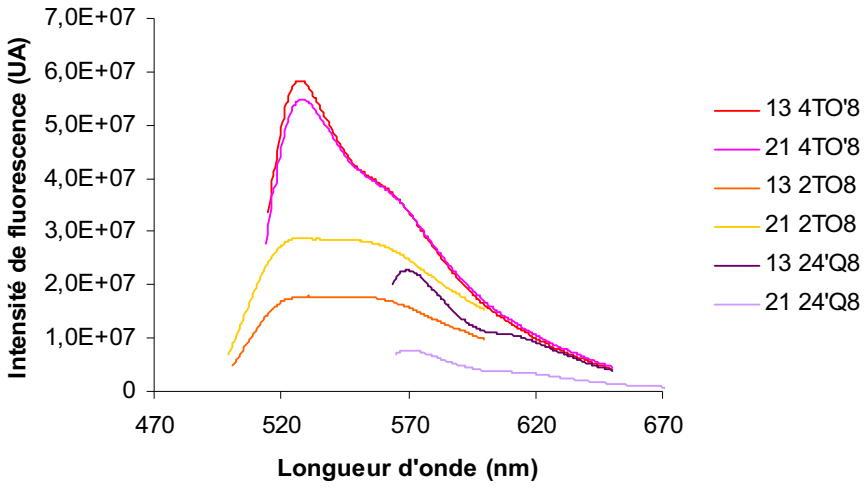


*Figure 42 : Spectres d'émission à 20 °C des mono- et des bis-conjugués des cyanines **4TO'8**, **2TO8** et **24'Q8** hybridés.*

L'allongement du bras de liaison pour lier le **4TO'** en position 3' n'améliore pas les propriétés de fluorescence du bis-conjugué.

	Spectres de fluorescence à 20 °C						Intensité de fluorescence (UA)					
OFTs pH 6 1 µM	Libres			Hybridés			libres		hybridés		I_F hyb / I_F libre	
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Dép. Stockes	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Dép. Stockes	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
$21_{4TO'8}$	511	533	22	512	528	16	5,86	3,19	54,77	58,45	9,35	18,32
21_{2TO8}	459	584	125	496	535	39	4,24	2,95	28,93	22,72	6,82	7,70
$21_{24'Q8}$	519	585	66	560	570	10	0,58	0,36	7,77	2,87	13,40	7,97
$22_{4TO'8-4}$	512	531	19	512	527	15	3,00	1,87	16,26	12,39	5,42	6,63
$13_{4TO'8}$	511	529	18	513	527	14	4,81	2,49	58,32	60,93	12,12	24,47

*Tableau 11 : Caractérisation par fluorescence des bis-conjugués avec en référence le **$13_{4TO'8}$**.*

L'hypothèse du phénomène d'inhibition de fluorescence provoqué par l'interaction des deux cyanines par formation d'H-agrégats est en accord avec une étude récente effectuée par l'équipe d'Okamoto[279] sur des bis-conjugués du TO' liés par un bras bis-amine fixé sur une base en milieu de séquence. Ils ont observé une forte inhibition de l'intensité de fluorescence émise par les deux TO' sur l'oligonucléotide. En revanche, après hybridation sur une cible simple brin, une augmentation importante de l'intensité de fluorescence a été observée correspondant à la dissociation des agrégats des cyanines.

VII. Résumé des résultats obtenus

Les longueurs d'onde et les intensités de fluorescence des oligonucléotides conjugués dépendent non seulement des propriétés intrinsèques du marqueur mais également des différentes interactions avec l'environnement (solvant, oligonucléotide, cible double brin). L'émission de fluorescence est également dépendante des paramètres de liaison du marqueur à l'oligonucléotide (position de fixation du bras de liaison, longueur et nature du bras, nature des bases environnantes).

Les meilleures propriétés de stabilisation ont été obtenues avec la cyanine **4TO'8** (Tableau 12). L'effet stabilisant est plus important lorsqu'elle est fixée à l'extrémité 5' de l'OFT par un bras de liaison à 8 méthylènes. Le conjugué **$13_{4TO'8}$** présente le meilleur compromis en terme de stabilisation du triplex, d'intensité de fluorescence et d'augmentation de l'intensité du signal fluorescent après hybridation. La présence d'un cycle benzothiazole dans la molécule fluorescente est nécessaire à l'apport de stabilité et à l'émission d'un signal fluorescent intense.

OFTs pH 6 1 µM	Triplex		Spectres de fluorescence à 20 °C Hybridés			Intensité de fluorescence (UA)					
						I_F libre		I_F hybridé		I_F hyb / I_F libre	
	Tm /°C[a] (±0.5°C)	Δ Tm (±1°C)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Dép. Stockes	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
$13_{4TO'4}$	26,5	+ 13,5	513	525	12	3,09	1,32	53,12	42,51	17,19	32,20
$13_{4TO'5}$	29,0	+ 16,0	513	528	15	4,14	1,93	40,12	29,65	9,69	15,36
$13_{4TO'6}$	32,5	+ 19,5	514	528	14	7,70	3,72	56,92	55,64	7,39	14,96
$13_{4TO'7}$	35,0	+ 22,0	513	528	15	4,71	2,36	62,78	65,20	13,33	27,63
$13_{4TO'8}$	37,5	+ 24,5	513	527	14	4,81	2,49	58,32	60,93	12,12	24,47
13_{Th8}	31,0	+ 18,0	431	454	23	26,26	16,84	89,26	89,50	3,40	5,31
$13_{2TO'8}$	28,0	+ 15,0	494	548	54	0,90	0,51	10,07	7,94	11,19	15,57
13_{2TO8}	32,5	+ 19,5	499	552	53	1,42	0,80	17,88	14,63	12,59	18,29
$13_{22'Q8}$	26,5	+ 13,5	528	541	13	0,22	0,15	5,14	3,61	23,36	24,07
$13_{24'Q8}$	25,5	+ 12,5	561	570	9	0,70	0,38	22,75	14,38	32,50	37,84
13_{4TO8}	27,5	+ 14,5	511	527	16	3,44	1,58	24,09	20,12	7,00	12,73
$13_{42'Q8}$	19,5	+ 6,5	556	566	10	0,33	0,18	5,69	2,90	17,24	16,11
$15_{4TO'8}$	26,0	+ 13,0	511	527	16	49,21	22,58	51,09	38,66	1,04	1,71
$15_{4TO'4}$	18,0	+ 5,0	511	527	16	0,99	0,45	9,49	3,96	9,59	8,80
15_{2TO8}	19,0	+ 6,0	494	524	28	1,93	0,98	8,76	5,71	4,54	5,83
$20_{4TO'6}$	18,0	+ 5,0	510	526	16	7,70	2,46	38,41	30,63	4,99	12,45
$20_{4TO'4}$	21,0	+ 8,0	511	526	15	7,16	3,00	41,93	32,25	5,86	10,75
$21_{4TO'8}$	45,0	+ 32,0	512	528	16	5,86	3,19	54,77	58,45	9,35	18,32
21_{2TO8}	39,0	+ 26,0	496	535	39	4,24	2,95	28,93	22,72	6,82	7,70
$21_{24'Q8}$	30,5	+ 17,5	560	570	10	0,58	0,36	7,77	2,87	13,40	7,97
$22_{4TO'8\text{-}4}$	43,0	+ 30,0	512	527	15	3,00	1,87	16,26	12,39	5,42	6,63

Tableau 12 : Récapitulatif des propriétés des conjugués OFT-cyanine libres et hybridés.

Le marquage à l'extrémité 3' est moins efficace qu'à l'extrémité 5'. Le bis-marquage de l'OFT aux extrémités 5' et 3' améliore les propriétés de stabilisation mais la variation d'intensité de fluorescence après hybridation est plus faible que lors du mono-marquage en 5'.

Dans les mêmes conditions expérimentales, l'hybridation du conjugué $\mathbf{13}_{\mathbf{4TO'8}}$ avec sa cible complémentaire simple brin $^{5'}$GGGAAAAGAAAATTT$^{3'}$ (Tm$\mathbf{13}_{\mathbf{4TO'8}}$ de 30,5 °C, ΔTm$\mathbf{13}_{\mathbf{4TO'8}}$: + 8 °C) induit une augmentation de fluorescence de seulement 30 % à 20 °C et diminue de 60 % à 4 °C, ce qui démontre le potentiel de ces nouvelles sondes pour détecter les doubles brins d'ADN.

Nous avons envisagé d'augmenter la variation de fluorescence entre la sonde libre et la sonde hybridée en inhibant la fluorescence de la sonde libre par hybridation avec une séquence complémentaire comportant un inhibiteur. Nous avons également décidé d'étudier l'influence de la longueur et de la composition en bases des OFTs conjugués ainsi que la possibilité de discriminer des mésappariements en plusieurs positions du duplex cible.

VIII. Modification de la stratégie afin d'augmenter la variation d'intensité de fluorescence lors de l'hybridation

VIII. 1. Stratégie basée sur le transfert de brins

Afin d'augmenter la variation de l'intensité de fluorescence entre les sondes libres et les triplex correspondants, l'utilisation de la stratégie de transfert de brins précédemment décrite avec des cibles simple brin a été envisagée[280, 281]. Cette méthode est basée sur l'hybridation de la sonde oligonucléotidique fluorescente marquée en 5' avec une séquence complémentaire comportant un inhibiteur de fluorescence à l'extrémité 3'. Ces deux molécules se retrouvent à proximité l'une de l'autre après hybridation des deux brins et la fluorescence du fluorophore est ainsi éteinte. Après transfert d'hybridation de la sonde sur une cible simple brin de longueur supérieure (le duplex ainsi formé est plus stable que le petit duplex inhibé), le fluorophore se retrouve séparé de l'inhibiteur ce qui provoque une augmentation importante de l'intensité de fluorescence (Schéma 21).

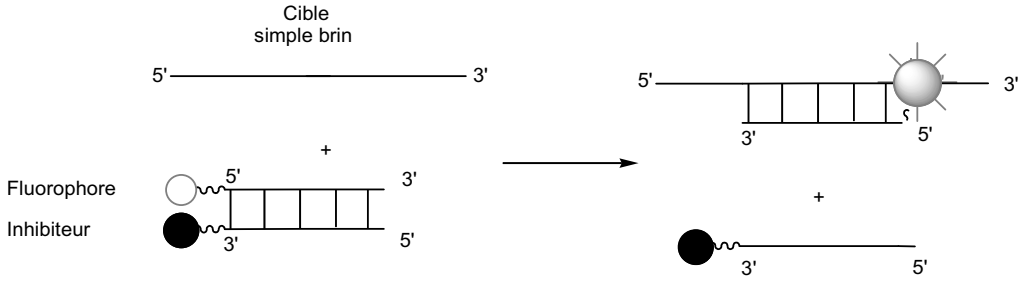


Schéma 21 : Aperçu général du transfert de brins.

Cette stratégie a été appliquée à la détection simultanée de plusieurs séquences contenant des mésappariements différents à l'aide du même nombre de sondes double brin comportant un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence[281]. Elle permet la reconnaissance spécifique de séquences possédant la mutation d'un seul nucléotide. Cette stratégie avait été développée dans un premier temps avec un second fluorophore à la place de l'inhibiteur. Dans le mode d'inhibition statique, les spectres d'absorption des fluorophores sont modifiés et les intensités de leurs signaux fluorescents sont diminués alors que dans le mode d'inhibition par FRET, les spectres d'absorption sont inchangés et l'émission du donneur est diminuée et celle de l'accepteur augmentée[280].

Lors d'une étude de FRET entre la fluorescéine (donneur) et la rhodamine (accepteur qui devient inhibiteur de fluorescence lorsqu'elle est en interaction avec la fluorescéine), les meilleurs résultats de transfert de fluorescence sont observés dans le cas où le brin portant le donneur à l'extrémité 5' est plus long de 5 nucléotides que celui portant l'accepteur (par opposition aux cas où le brin portant le donneur est plus long de 10 nucléotides et où les deux brins possèdent la même longueur)[72].

La stratégie du transfert de brins a également été testée *in vivo* avec une cible simple brin ARN. Après administration d'un duplex antisens-Cy5.5/sens-BHQ3 dans une souris, le signal fluorescent est inhibé sauf dans la cellule possédant l'ARNm visé[282].

Une autre méthode génère un signal fluorescent intense par hybridation compétitive du brin portant l'inhibiteur avec la séquence cible après sa séparation de la sonde fluorescente[283] (Schéma 22). Une sonde comportant un inhibiteur (TAMRA dans cet exemple) est initialement hybridée avec une sonde fluorescente (le marqueur est un dérivé de la fluorescéine), la fluorescence de ce complexe étant éteinte. Si une séquence cible complémentaire de la sonde comportant l'inhibiteur est ajoutée au milieu et ce nouveau complexe plus stable que le précédent, la séquence cible se substitue à la sonde fluorescente qui devient détectable. L'intensité de fluorescence émise est liée à l'affinité de la cible avec le brin portant l'inhibiteur et au recouvrement spectral dans le visible des séquences marquées. Les concentrations des différents brins et la température sont préalablement définies afin d'obtenir les plus grandes variations de fluorescence.

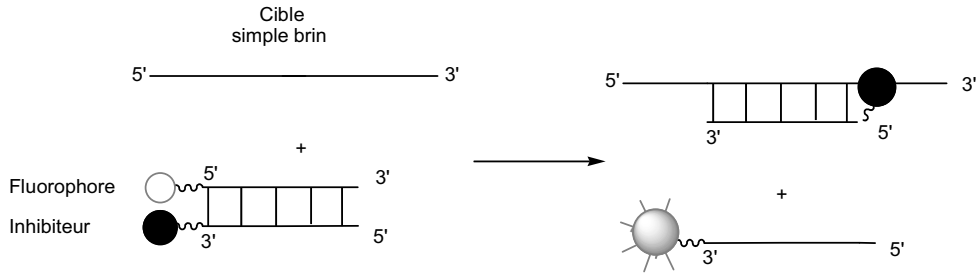


Schéma 22 : Seconde méthode de transfert de brins .

VIII. 2. Application de la stratégie aux triples hélices

Le principe de notre stratégie appliquée à la détection d'une cible double brin est le suivant : la sonde oligonucléotidique fluorescente marquée à l'extrémité 5' est hybridée à une courte séquence complémentaire comportant un inhibiteur de fluorescence à l'extrémité 3'. Ces deux molécules se retrouvent à proximité et la fluorescence du fluorophore est ainsi éteinte. Après transfert d'hybridation de la sonde sur une cible double brin de longueur supérieure (dont le triplex ainsi formé est plus stable que le duplex inhibé), le fluorophore se retrouve séparé de l'inhibiteur ce qui provoque une augmentation importante de l'intensité de fluorescence (Schéma 23).

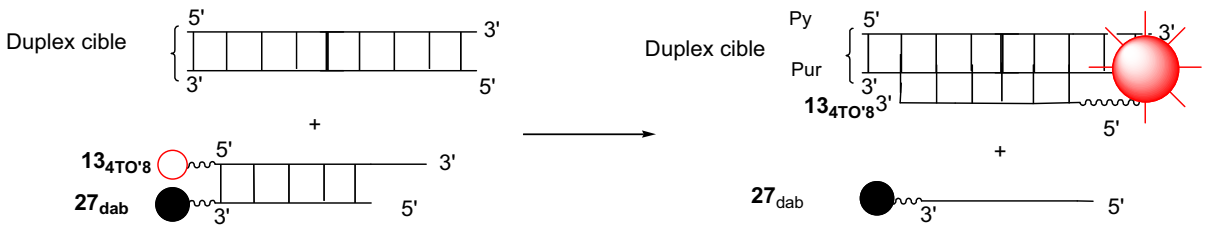


Schéma 23 : Aperçu général du transfert de brins appliqué aux triples hélices.

Nous avons appliqué cette stratégie à trois conjugués du TO' (cyanine qui possède les meilleures propriétés stabilisantes) : $\mathbf{13}_{\mathbf{4TO'8}}$, $\mathbf{13}_{\mathbf{4TO'4}}$ et $\mathbf{21}_{\mathbf{4TO'8}}$. Les conjugués inhibiteurs sont des séquences de diverses longueurs (10-mère, 8-mère, 7-mère et 6-mère) complémentaires de l'extrémité 5' de l'OFT et comportant une molécule de dabcyl à l'extrémité 3', ceci afin de moduler la stabilité du duplex

inhibé et d'optimiser le transfert de brins. Le dabcyl a été choisi comme inhibiteur de fluorescence de la cyanine TO' car il est connu pour posséder de bonnes propriétés d'inhibition des signaux fluorescents de dérivés de la fluorescéine qui émet dans la même zone spectrale que le TO' (510-530 nm)[284] et peut inhiber la fluorescence soit par FRET, soit par contact[70, 121]. Le dabcyl est fixé par réaction entre son dérivé ester de succinimidyle avec le bras de liaison aminohexyle incorporé à l'extrémité 3' de l'OFT, dont la synthèse a été réalisée à l'aide d'un support modifié présent au laboratoire[285] (Schéma 24 et tableau 13).

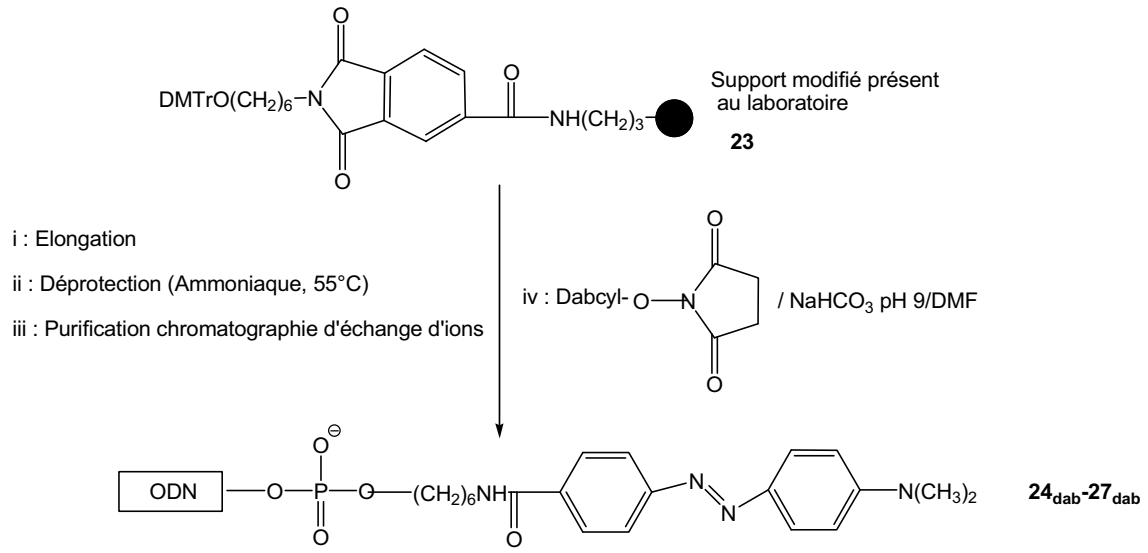


Schéma 24 : Synthèse des oligonucléotides marqués avec le dabcyl.

Le coefficient d'extinction molaire à 260 nm du composé **24_{dab}** (ε_{260} = 125500 $M^{-1}.cm^{-1}$) a été déterminé par titration de sa solution dans le tampon « phosphate » (pH 6) à 4 °C en présence de la séquence complémentaire $^{5'}$TTTTCTTTTC$^{3'}$. La contribution du dabcyl à 260 nm déterminée à partir de la titration est de 5000 $M^{-1}.cm^{-1}$. Les coefficients d'extinction molaires à 260 nm ε_{260} des composés **25_{dab}**, **26_{dab}** et **27_{dab}** sont calculés à partir de la valeur précédente qui est ajoutée au coefficient d'extinction molaire des oligonucléotides non substitués et sont respectivement de 103700, 91700 et 79700 $M^{-1}.cm^{-1}$.

ODNs	Séquences	Rdt (%)	t_R (min)	Analyse par SM ($g.mol^{-1}$)		
				Formule brute	Calculée	Obtenue
24dab	$^{5'}$GAAAAGAAAA*p*$(CH_2)_6$NHdabcyl$^{3'}$	60	25 min 50 s	$C_{121}H_{148}N_{54}O_{54}P_{10}$	3530,58	3530,58
25dab	$^{5'}$AAAGAAAA*p*$(CH_2)_6$NHdabcyl$^{3'}$	55	27 min 18 s	$C_{101}H_{124}N_{44}O_{43}P_8$	2889,15	2888,89
26dab	$^{5'}$AAGAAAA*p*$(CH_2)_6$NHdabcyl$^{3'}$	70	27 min 30 s	$C_{91}H_{112}N_{39}O_{38}P_7$	2575,94	2575,95
27dab	$^{5'}$AGAAAA*p*$(CH_2)_6$NHdabcyl$^{3'}$	75	28 min 12 s	$C_{81}H_{100}N_{34}O_{33}P_6$	2262,73	2263,10

Tableau 13 : Caractérisation des conjugués ODN-dabcyl par chromatographie en phase inverse et spectrométrie de masse (mêmes conditons que tableau 2).

Deux séries d'expériences ont été effectuées à 4 et à 20 °C. Les spectres d'absorption des duplex inhibés dans le domaine du visible sont différents en fonction de la longueur de la séquence comportant le dabcyl (Figure 43), ce qui reflète la différence de stabilité des duplex et suggère que le transfert d'énergie s'effectue par contact plutôt que par FRET[72]. L'interaction entre le TO' et le dabcyl est plus importante lorsque le duplex est plus stable.

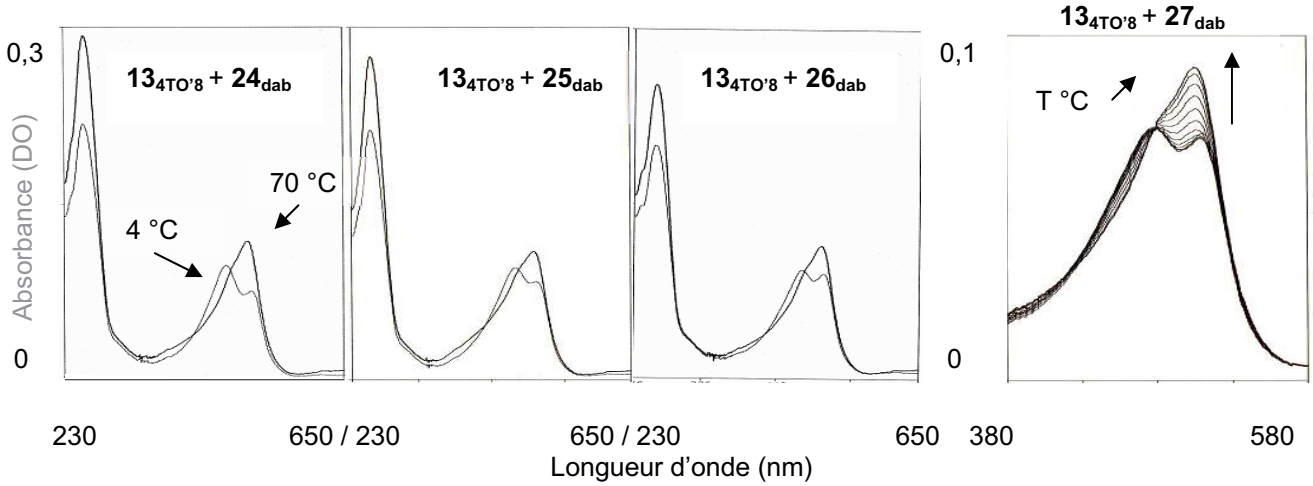


Figure 43 : Spectres d'absorption de dénaturation thermique des duplex $\mathbf{13_{4TO'8}}$ + $\mathbf{23\text{-}27_{dab}}$.

Avec une telle stratégie, l'utilisation de l'OFT marqué formant la triple hélice la plus stable est nécessaire pour permettre un transfert de brins optimal. Ce résultat est en accord avec les valeurs de Tm obtenues pour les duplex $\mathbf{13_{4TO'8}}$ + $\mathbf{27_{dab}}$ et $\mathbf{13_{4TO'4}}$ + $\mathbf{27_{dab}}$ (23,5 °C et 18 °C respectivement) et celles des triplex correspondants (37,5 °C et 26,5 °C respectivement). Le transfert de brins s'effectue donc d'autant mieux que la séquence comportant l'inhibiteur est courte car la différence de stabilité des deux complexes est plus grande (Tableau 14).

ODNs 1 µM, pH 6	Tm (°C), (± 0,5 °C) duplex : $\mathbf{X_{dab}}$ + $\mathbf{13_{4TO'8}}$	I_F ($\mathbf{X_{dab}}$ + $\mathbf{13_{4TO'8}}$ + **2**) 20 °C
24dab	40,5	6
25dab	33,0	23
26dab	28,5	36
27dab	23,5	47

Tableau 14 : Valeurs de Tm des duplex inhibés formés avec la sonde $\mathbf{13_{4TO'8}}$ *et rapports des intensités de fluorescence avant et après transfert de brins.*

Lorsque le duplex $\mathbf{13_{4TO'8}}$ + $\mathbf{27_{dab}}$ est mis en présence du duplex cible **2**, des augmentations importantes de l'intensité de fluorescence sont observées après 10 heures d'incubation : 14 fois à 4 °C et 47 fois à 20 °C (Tableau 15 et figure 44).

ODNs 1 µM pH 6	Intensité de fluorescence (UA)					
	duplex		triplex		$I_F$triplex/$I_F$duplex	
	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
$13_{4TO'8}$ + 27_{dab}	1,3 (73 %)	1 (60 %)	18,4	46,8	14,2	46,8
$13_{4TO'4}$ + 27_{dab}	0,8 (74 %)	0,7 (46 %)	27,9	28,3	36,2	39,9
$21_{4TO'8}$ + 27_{dab}	1,6 (73 %)	2 (38 %)	34,4	40,9	21,5	20,1

( ):pourcentage d'inhibition du signal fluorescent

Tableau 15 : Intensités de fluorescence des duplex inhibés et des triplex formés après transfert de brins.

L'hybridation de chaque conjugué **$13_{4TO'8}$**, **$13_{4TO'4}$** et **$21_{4TO'8}$** avec l'ODN-dabcyl **27_{dab}** induit une inhibition du signal fluorescent respectivement de 60 %, 48 % et 36 % à 20 °C et d'environ 75 % dans chaque cas à 4 °C. Les stabilités différentes des duplex inhibés sont responsables de la variation de l'inhibition à 20 °C. Après ajout du duplex cible **2**, des augmentations importantes de l'intensité de fluorescence sont détectées dans le cas de la séquence inhibitrice courte 6-mer **27_{dab}**.

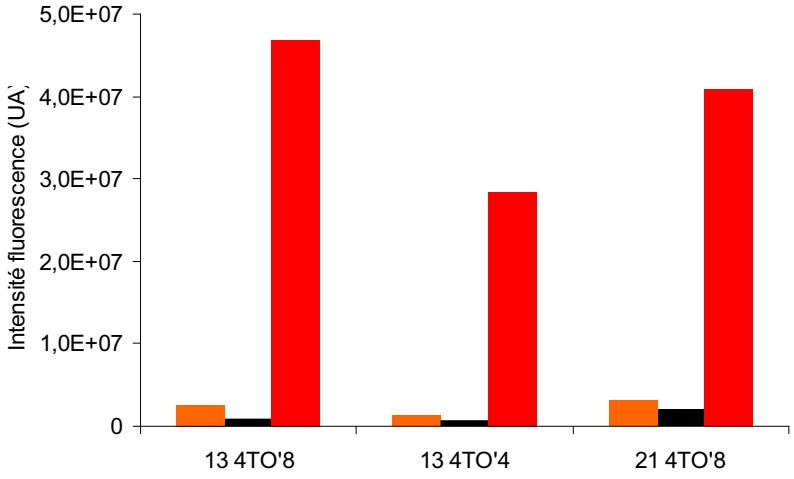


Figure 44 : Comparaison des intensités de fluorescence des conjugués **$13_{4TO'8}$**, **$13_{4TO'4}$**, **$21_{4TO'8}$** *libres (orange), hybridés avec le conjugué-dabcyl* **27_{dab}** *(beige) puis en présence de la cible double brin* ***2*** *(rouge) à 20 °C.*

L'intensité de fluorescence du mélange contenant l'OFT **$13_{4TO'8}$** atteint 80 % de celle observée en l'absence du conjugué-dabcyl après 4 h d'incubation à 20 °C (Figure 45). Cette stratégie aboutit à une augmentation de l'intensité de fluorescence de 47 fois avec le conjugué **$13_{4TO'8}$**.

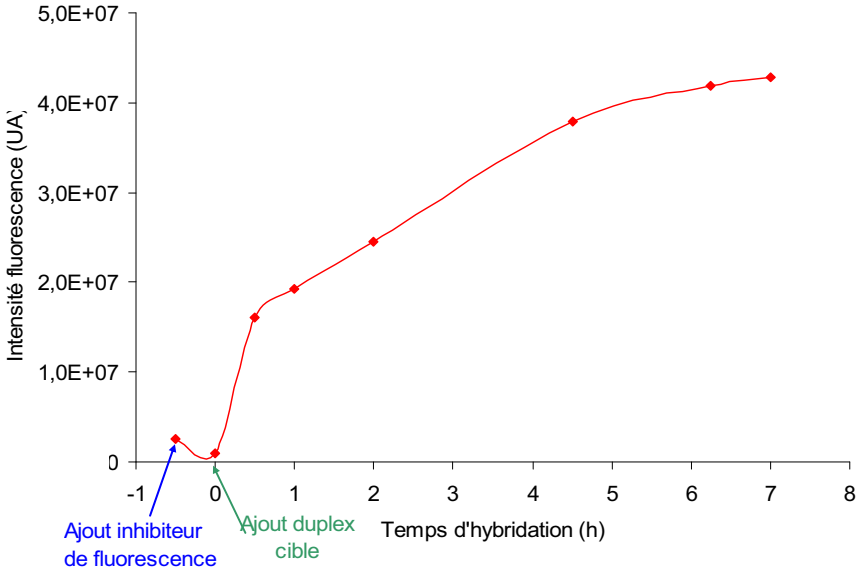


Figure 45 : Evolution de l'émission de fluorescence du conjugué ***13*** $_{4TO'8}$ *en présence du duplex* ***2*** *en fonction du temps à 20 °C.*

Il est à noter que les duplex comportant le TO' et le dabcyl sont plus stables que les duplex correspondants ne comportant que le TO'.

Cette stratégie de transfert de brins a également été testée avec une cible simple brin (séquence cible, § **VI. 2.**). Après ajout de la séquence cible au duplex inhibé à 20 °C, l'intensité de fluorescence détectée est 2,5 fois supérieure à celle du conjugué libre **13**$_{4TO'8}$ (dont la variation d'intensité de fluorescence en présence de la cible simple brin augmente de 30 % sans la stratégie de transfert de brins § **VII.**).

IX. Influence de la longueur et de la séquence de l'OFT conjugué sur ses propriétés de fluorescence

Afin de tester l'influence de différents paramètres comme la nature et la longueur de la séquence de l'OFT, la cyanine **4TO'8** (qui possède le meilleur compromis en termes de stabilité, d'intensité et de variation de fluorescence lors de l'hybridation) a été couplée à des OFTs 17-mère **28** et **29** qui comportent au niveau de la 8ème base respectivement une thymine et une guanine (Tableau 16). Les conjugués **28**$_{4TO'8}$ et **29**$_{4TO'8}$ sont obtenus selon la méthode de synthèse du conjugué **13**$_{4TO'8}$ (§ **IV. 1. D.**).

ODNs	Séquences	Rdt (%)	t_R (min)	Analyse par SM (g.mol^{-1}) Formule brute	Calculée	Obtenue
28$_{4TO'8}$	5'**4TO'8**-*p*(S)CTTCTTTTTCTTTCTTC3'	25	24 min 08 s	$C_{191}H_{247}N_{41}O_{114}P_{17}S_2$	5531,93	5532,59
29$_{4TO'8}$	5'**4TO'8**-*p*(S)CTTCTTTGTCTTTCTTC3'	20	23 min 24 s	$C_{191}H_{246}N_{44}O_{113}P_{17}S_2$	5556,95	5557,11

Tableau 16 : Caractérisation des conjugués ***28*** $_{4TO'8}$ *et* ***29*** $_{4TO'8}$ *par chromatographie en phase inverse et spectrométrie de masse.*

Les coefficients d'extinction molaires à 260 nm ε_{260} de ces conjugués ont été déterminés selon la méthode décrite précédemment (§ **IV. 2.**, tableau 17).

OFTs 1 µM pH 6	λ_{UVmax} (nm) Pic principal	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{VISmax} (nm) Pic principal	épaulement	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	I_F au λ_{plRmax} (UA) 4 °C	20 °C
$28_{4TO'8}$	268	169800	508	478	82700	6,82	1,58
$29_{4TO'8}$	268	172400	508	478	82700	12,05	3,11
$13_{4TO'8}$	267	116500	508	478	82700	4,81	2,49

Tableau 17 : Propriétés spectroscopiques des conjugués **$28_{4TO'8}$**, **$29_{4TO'8}$** et **$13_{4TO'8}$**.

La comparaison des intensités de fluorescence émises par les nouveaux conjugués **$28_{4TO'8}$** et **$29_{4TO'8}$** avec celles des conjugués précédents indique qu'elles dépendent à la fois de la longueur et de la composition en bases des conjugués et de la température à laquelle est effectuée la mesure. L'intensité de fluorescence de l'OFT **$28_{4TO'8}$** est 1,4 fois supérieure à celle de l'OFT 10-mère **$13_{4TO'8}$** à 4 °C mais inférieure de 40 % à 20 °C (Tableau 17).

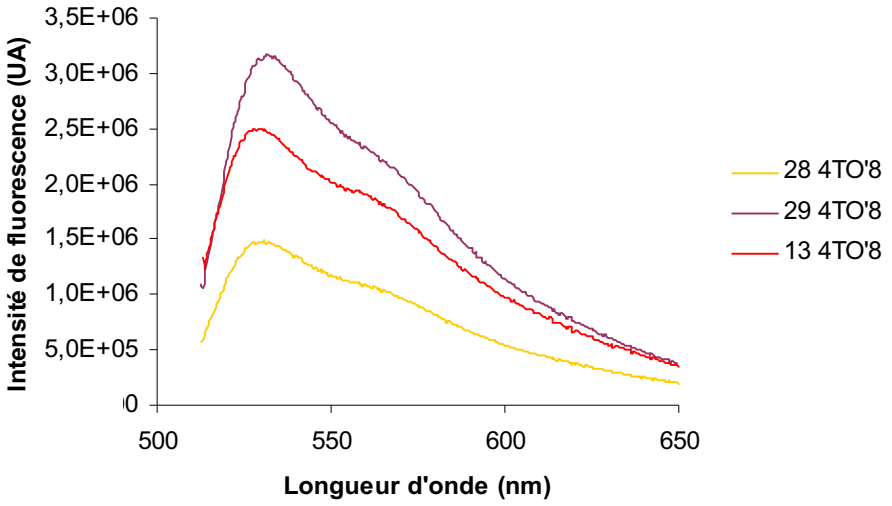


Figure 46 : Spectres d'émission des conjugués **$28_{4TO'8}$**, **$29_{4TO'8}$** et **$13_{4TO'8}$** à 20 °C.

Le remplacement d'une thymine par une guanine dans la séquence de l'OFT **$29_{4TO'8}$** induit une augmentation d'environ 2 fois de l'intensité du signal fluorescent (Figure 46). Cette variation peut être expliquée par le phénomène de « back-binding » précédemment décrit dans le cas de PNAs et d'oligonucléotides conjugués au TO. Les oligonucléotides riches en purines marqués avec le TO sont plus fluorescents que ceux riches en pyrimidines car les interactions du TO avec les purines sont plus fortes qu'avec les pyrimidines[220]. De plus, dans le cas de l'OFT **$29_{4TO'8}$**, la possibilité de former un appariement G-C intramoléculaire doit favoriser l'interaction du marqueur avec l'OFT. Lorsque la température augmente, une diminution de l'intensité du signal fluorescent est observée comme précédemment.

X. Détection de mésappariements sur les triples hélices

X. 1. Structures des mésappariements

Des études portant sur la présence de mésappariements dans les structures en triple hélice ont montré que leur formation est très spécifique de la composition des séquences d'acides nucléiques. Un mésappariement en position centrale d'une triple hélice est plus déstabilisant qu'en position terminale[286]. De plus, l'effet déstabilisant dépend de la nature du mésappariement. La stabilité thermique des 64 combinaisons de triplets a été étudiée par fluorescence (le brin purique du duplex et le 3^{éme} brin comportant respectivement à leurs extrémités 5' un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence)[169].

Les mésappariements sont plus déstabilisants lorsqu'ils impliquent le brin purique (modifient à la fois les liaisons hydrogène de type Hoogsteen (H) et celles de type Watson-Crick (WC)). Les inversions de paires de bases pyrimidine-purine dans le duplex cible sont également très déstabilisantes. Il a été démontré que des guanines présentes dans un OFT pyrimidique peuvent reconnaître des thymines dans le brin purique du duplex cible[287]. La formation du triplet G*T.A est dans ce cas la moins déstabilisante[169]. Il est également possible de diminuer l'effet déstabilisant de mésappariements en fixant des intercalants à l'OFT[288]. Des études sur des OFTs liés à l'acridine ont montré qu'ils pouvaient stabiliser les triplex contenant des inversions dans la complémentarité homopurine-homopyrimidine[289].

X. 2. Influence des mésappariements sur la stabilité et la fluorescence des triplex

L'oligonucléotide **28** s'hybride avec une séquence complémentaire homopurique d'un double brin d'ADN de 26 paires de bases (triplex **A**, figure 47). La plus grande longueur des cibles double brin permet de distinguer les transitions triplex-duplex et duplex-simples brins. La valeur de Tm pour le triplex parfait **A** formé avec l'OFT de référence **28** est de 41,5 °C et celle du duplex parfait est de 69,5 °C.

$^{3'}$C C C G A C T T C T T T T T C T T T C T T C G C G C$^{5'}$
$^{5'}$G G G C T GA AG A A AA AG A A AG A AG C G C G $^{3'}$
$^{5'}$C T T C T T T T T C T T T C T T C$^{3'}$

*Figure 47 : Structure du triplex **A**.*

Afin de vérifier la spécificité de l'hybridation de nos nouvelles sondes, leur interaction avec des cibles double brin comportant des mésappariements en des positions différentes a été étudiée (triplex **B** à **E**) ainsi qu'avec un duplex comportant une inversion d'une paire de base A-T en position interne (triplex **F**), (Figure 48).

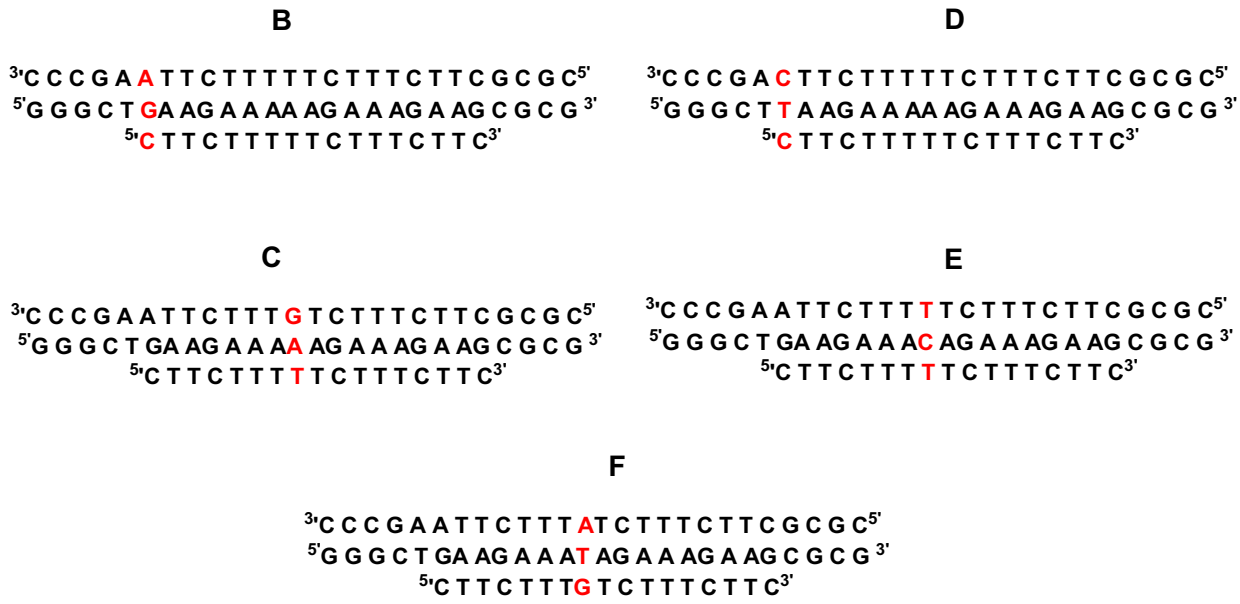


*Figure 48 : Structure des triplex **B-F**.*

La présence de mésappariements dans les triples hélices induit des effets qui différent en fonction de leur position (interne ou en position terminale) et du brin concerné (pyrimidique ou purique) du duplex cible (Figure 49 et Tableau 18). Les résultats indiquent que l'incorporation d'une base purique sur un brin pyrimidique qui affecte seulement les liaisons hydrogène WC n'ont pas (triplex **B**, à l'extrémité 5') ou peu d'effet (triplex **C**, en position interne : ΔTm = - 1,5 °C) sur les stabilités des triplex. En revanche, l'incorporation d'une base pyrimidique sur le brin purique a un effet plus déstabilisant (triplex **D** et **E**). Ce dernier type de mutation touche à la fois les appariements de type WC et H. Dans ce cas, la stabilité du triplex possédant un mésappariement 5'-terminal (triplex **D**) est inférieure de 2,5 °C à celle du triplex parfait alors qu'aucune transition triplex-duplex n'est détectée, dans les conditions expérimentales utilisées, lorsque qu'une pyrimidine est incorporée en position interne du brin purique (triplex **E**). Dans le cas de l'inversion de paire de base A-T, la présence d'une guanine sur le 3^{éme} brin en position opposée permet la formation d'un triplex (triplex **F**) moins stable (ΔTm = - 8,5 °C) que le triplex de référence.

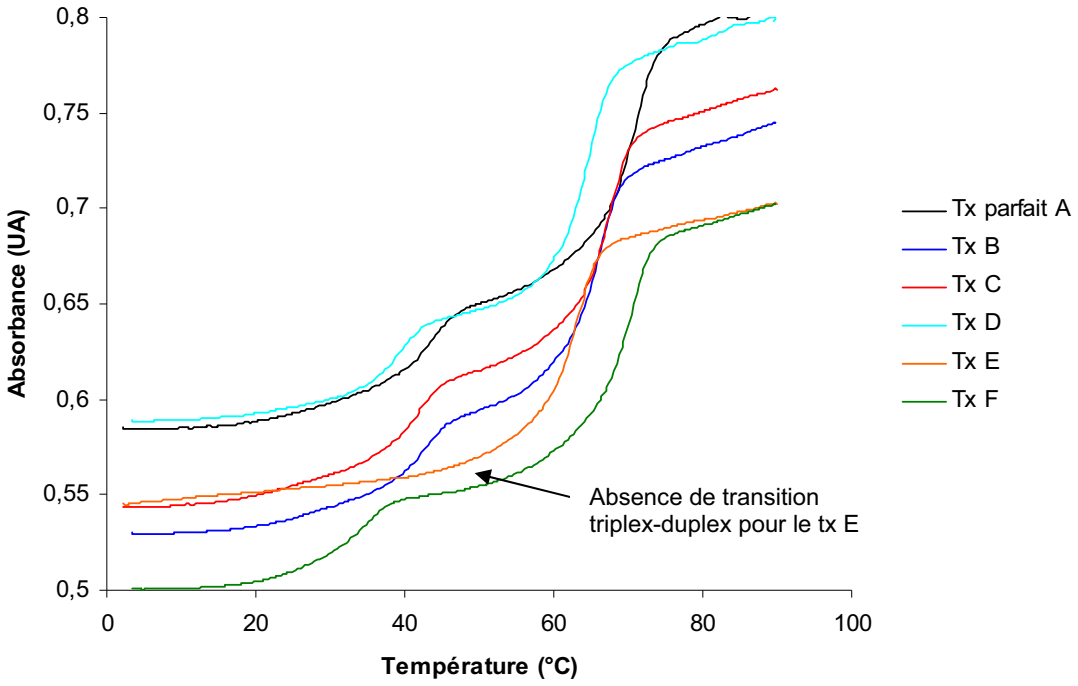


*Figure 49 : Courbes de Tm des triplex **A**-**F**.*

La stabilité apportée par la présence du TO' dans les différentes structures est évaluée par dénaturation thermique suivie par spectroscopie d'absorption en utilisant comme références les triplex non marqués correspondants. Dans chaque cas, le marquage avec le **4TO'8** des OFTs **28** et **29** (synthèses décrites au § **IX**.) induit une augmentation de stabilité des triplex formés. Cette dernière est plus faible que dans le cas des triplex plus courts. Cette propriété a aussi était observée avec d'autres intercalants tels que l'acridine[196] et le pérylène[97, 204]. La comparaison des stabilités des triplex marqués avec celles des triplex non modifiés montre clairement que la spécificité d'hybridation n'est pas réduite avec la présence du TO'. Une augmentation de stabilité de + 6 °C est observée pour le triplex parfait **A** et de + 5.5 °C pour le triplex **F** comportant une inversion A-T. Des augmentations de stabilité similaires ont été observées dans le cas des triplex **B** et **C** (respectivement + 5 et + 4 °C) comportant des mésappariements terminaux et du triplex **D** (+ 6,5 °C) possédant une mutation interne sur le brin pyrimidique. Lorsque la mutation est incorporée sur le brin purique (triplex **E**), la présence du marqueur induit la formation d'une triple hélice mais avec une faible stabilité (Tm = 26 °C) comparée à celle des autres triplex mésappariés.

L'hybridation des OFTs **29** et $\mathbf{29}_{\mathbf{4TO'8}}$, contenant une guanine en position opposée à l'inversion A-T dans le duplex, forme des triplex **F** dont la stabilité est inférieure respectivement de 8,5 et 9 °C à celle des triplex parfaits **A**. Cette différence de Tm est similaire à celle observée avec des triplex non marqués.

Complexes d'acides nucléiques 1 µM	Absorption		Intensité de fluorescence (UA, ×10^6)					
	Tm / °C (± 0.5 °C)	Δ Tm / °C[a] (± 1 °C)	I_FOFT		$I_F$triplex		$I_F$triplex / I_FOFT	
			4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
Duplex cible du triplex **A**	69,5	-	-	-	-	-	-	-
Triplex **A**	41,5	-	-	-	-	-	-	-
Triplex **A** avec **28**$_{4TO'8}$	47,5	-	6,76	1,48	28,56	20,41	4,22	13,79
Duplex cible du triplex **B**	65	- 4,5	-	-	-	-	-	-
Triplex **B**	41,5	0	-	-	-	-	-	-
Triplex **B** avec **28**$_{4TO'8}$	46,5	- 1	6,76	1,48	20,82	14,65	3,08	9,90
Duplex cible du triplex **C**	66	- 3,5	-	-	-	-	-	-
Triplex **C**	40	- 1,5	-	-	-	-	-	-
Triplex **C** avec **28**$_{4TO'8}$	44	- 3,5	6,76	1,48	28,50	20,19	4,21	13,64
Duplex cible du triplex **D**	63,5	- 6	-	-	-	-	-	-
Triplex **D**	39	- 2,5	-	-	-	-	-	-
Triplex **D** avec **28**$_{4TO'8}$	45,5	- 2	6,76	1,48	19,42	13,66	2,87	8,55
Duplex cible du triplex **E**	62	- 7,5	-	-	-	-	-	-
Triplex **E**	nd	nd	-	-	-	-	-	-
Triplex **E** avec **28**$_{4TO'8}$	26	- 21,5	6,76	1,48	23,71	6,81	3,51	4,60
Duplex cible du triplex **F**	68,5	- 1	-	-	-	-	-	-
Triplex **F**	33	- 8,5	-	-	-	-	-	-
Triplex **F** avec **29**$_{4TO'8}$	38,5	- 9	12,32	3,16	29,08	20,40	2,36	6,46

[a] : calculé avec les duplex et triplex marqué et non marqué de référence
nd : non déterminé

*Tableau 18 : Valeurs de Tm et d'intensité de fluorescence des triplex **A**-**F**.*

Après hybridation des OFTs **28**$_{4TO'8}$ et **29**$_{4TO'8}$ avec les différents duplex cibles, une augmentation de fluorescence est observée dans chaque cas (Figure 50). Les intensités de fluorescence des OFTs libres et hybridés sont plus grandes à 4 °C qu'à 25 °C. A 4 °C, les intensités de fluorescence des triplex marqués **A**, **C** et **F** sont pratiquement identiques alors que celle du triplex marqué le moins stable **E** est plus faible. Les plus faibles intensités de fluorescence sont observées dans le cas des triplex marqués **B** et **D** possédant des triplets mésappariés en position adjacente au site d'intercalation du marqueur à la jonction triplex-duplex.

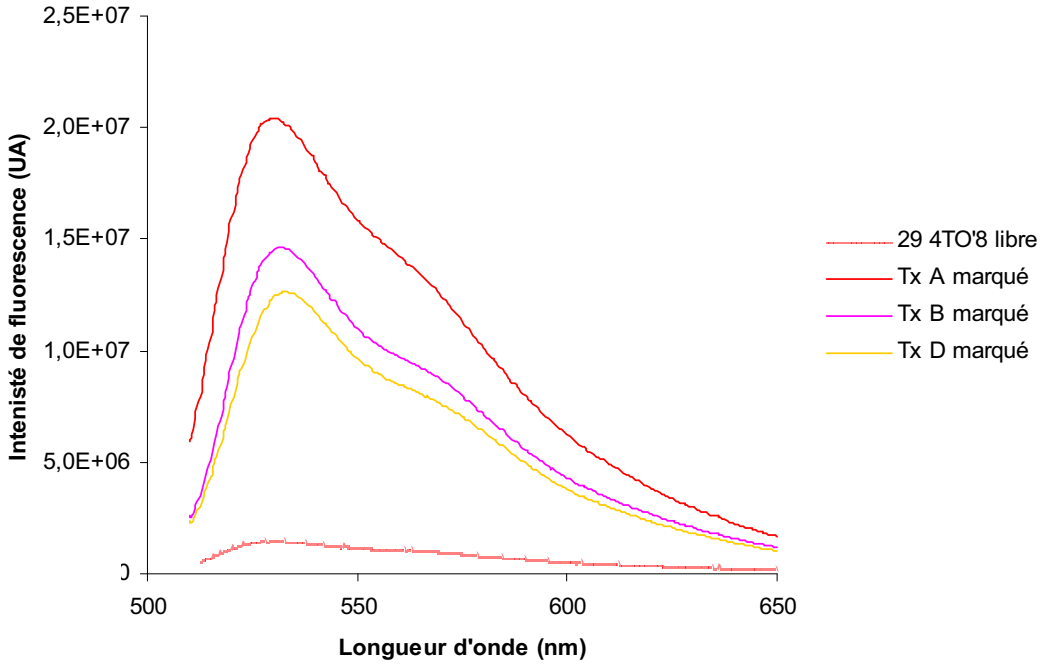


Figure 50 : Spectres d'émission de fluorescence du conjugué $\mathbf{29_{4TO'8}}$ *libre et hybridé (triplex **A**, **B**, **D**) à 25 °C.*

Lorsque les expériences sont réalisées à 25 °C, les intensités de fluorescence sont diminuées d'un tiers pour tous les triplex marqués excepté le triplex **E** pour lequel la diminution est de deux tiers. Cette observation est justifiée par le fait que l'expérience est réalisée à sa température de demi-dissociation, la concentration en triplex est donc divisée par deux ce qui implique une valeur de l'intensité de fluorescence plus faible. Le rapport de fluorescence à 25 °C entre les triples hélices et les conjugués libres sont d'environ 13,7 fois dans le cas des triplex **A** (parfait) et **C** (comportant une mutation en position interne sur le brin pyrimidique). En raison de la présence de mésappariements terminaux proche du site d'intercalation de la cyanine, le rapport est légèrement inférieur pour les triplex **B** et **D** (9,9 fois et 8,5 fois respectivement). Le rapport le plus faible est observé dans le cas du triplex **E** possédant une mutation en position interne sur le brin purique qui déstabilise le plus la triple hélice. La variation d'intensité de fluorescence du triplex **F** marqué possédant une inversion de paire de base A-T est seulement de 6,5 fois du fait de la forte intensité de fluorescence de l'OFT $\mathbf{29_{4TO'8}}$ libre.

Ces résultats confirment la possibilité de détection spécifique de doubles brins d'acides nucléiques comportant des mésappariements variés par formation de triples hélices avec des 5'-conjugués OFT-TO' émettant un signal fluorescent qui augmente sensiblement après hybridation.

XI. Conclusion

Nous avons décrit la possibilité de détecter des séquences d'ADN double brin par hybridation d'OFTs conjugués à des marqueurs fluorescents possédant des propriétés d'intercalation. Ces fluorophores appartiennent à la famille des cyanines monométhines. Une thiocyanine, quatre isomères du TO et trois quinocyanines ont été liées à l'extrémité 5' d'un OFT pyrimidique. Les propriétés de ces conjugués hybridés avec leur cible d'ADN double brin ont été étudiées par spectroscopies d'absorption et de fluorescence. Toutes les cyanines étudiées stabilisent les triples hélices et cet effet stabilisant dépend de la nature du bras de liaison utilisé pour lier le marqueur à l'OFT et de la structure du fluorophore. Les expériences de fluorescence ont montré une augmentation importante de l'intensité du signal émis après formation du triplex. Les conjugués comportant les marqueurs en position 5' ont donné les meilleurs résultats. Bien que la plus grande variation de fluorescence soit observée avec une quinocyanine fixée à l'extrémité 5' de l'OFT (37 fois), les conjugués du TO fixé à l'OFT par le noyau benzothiazole apportent le meilleur compromis en terme de stabilisation du triplex, d'intensité de fluorescence et d'augmentation de l'intensité du signal fluorescent après hybridation. Le couplage a également été effectué à l'extrémité 3', à l'aide notamment d'un nouveau support modifié synthétisé au laboratoire. Le marquage en 3' est moins efficace qu'en 5'. En revanche, en effectuant un bis-marquage aux deux extrémités, la stabilisation est fortement augmentée mais la variation de fluorescence après hybridation est plus faible que lors du mono-marquage. Les cyanines de la famille du TO et en particulier le 4TO' pourraient également être utilisés lors d'une stratégie antigène grâce à leur effet stabilisant.

Il est possible d'améliorer la variation de l'intensité de fluorescence en inhibant la fluorescence de la sonde libre en l'hybridant avec une courte séquence complémentaire de l'extrémité 5' de l'OFT comportant un inhibiteur de fluorescence de type dabcyl à l'extrémité 3'. Grâce aux propriétés stabilisantes des fluorophores, un transfert de brins permet la formation du triplex qui est accompagnée d'une augmentation importante de l'intensité de fluorescence (jusqu'à 47 fois).

Nous avons également étudié l'influence de mésappariements à l'extrémité ou en position interne des triples hélices. Les expériences ont démontré que la formation des triplex s'effectue sans perte de spécificité et est accompagnée d'une forte augmentation de fluorescence. La présence des mésappariements sur le duplex cible au niveau de la jonction duplex-triplex induit une augmentation moins importante du signal fluorescent.

Les modifications chimiques sont donc indispensables à l'obtention de sondes performantes afin d'optimiser les stratégies et les paramètres de liaison. Ces nouveaux « light-up » OFTs (LU-OFTs) seraient des outils intéressants pour la détection spécifique de séquences d'ADN en double brin et l'étude de la cinétique de formation des triples hélices *in vitro* par fluorescence.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication, référence 343 :

B.-L. Renard, R. Lartia, U. Asseline, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4413-4425.

B. SYNTHESE ET PROPRIETES DE NOUVELLES SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES FLUORESCENTES DETECTABLES DANS LE PROCHE INFRAROUGE

Dans le but d'obtenir des sondes utilisables en culture cellulaire et *in vivo*, nous envisageons de développer des fluorophores détectables par fluorescence dans le proche infrarouge pour marquer des sondes oligonucléotidiques et ainsi s'affranchir de l'autofluorescence cellulaire dont l'intensité décroit fortement au-delà de 600 nm. Pour ces applications, il est nécessaire d'obtenir des marqueurs détectables au-delà de 600 nm, stables chimiquement dans tous les compartiments cellulaires (pH 4,5 – 9), possédant une grande photostabilité, un rendement quantique important et qui permettent un marquage stable des oligonucléotides. Il existe un grand nombre de marqueurs détectables dans le proche IR. Cependant, ils ne possèdent pas tous les propriétés optimales pour une utilisation *in vivo*.

I. Introduction sur la détection dans le proche IR

I. 1. Zone spectrale du proche IR

Le proche IR se situe dans la zone spectrale allant de 700 à 1400 nm alors que l'infrarouge moyen se situe dans l'intervalle 1400-3000 nm et l'infrarouge lointain atteint la longueur d'onde de 1000 µm[290] (Figure 51). De nombreux matériaux deviennent pratiquement « transparents » dans le proche IR (fibres de verre, tissus et polymères synthétiques, surfactants, ...). Les molécules qui émettent un signal fluorescent à grande longueur d'onde sont utilisées pour la détection de biomolécules, pour la conception de cellules photovoltaïques solaires, de détecteurs d'éléments chimiques, ou encore pour le transport de signaux optiques en se comportant comme des photoconducteurs.

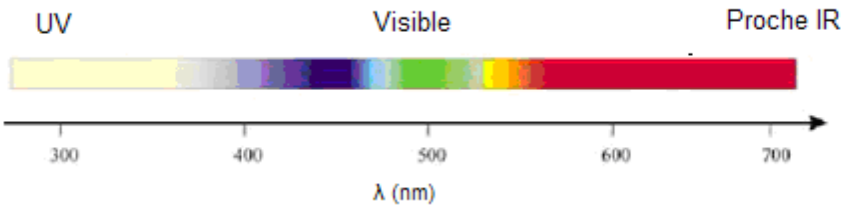


Figure 51 : Spectre d'absorption de la lumière.

L'autofluorescence est une propriété générale des cellules. Elle provoque un signal fluorescent de fond qui gêne l'analyse lorsque le signal recherché est faible. De plus, le spectre de l'émission cellulaire dans le visible est assez large (400-600 nm). Dans les cellules humaines[291], elle est principalement causée par les molécules de coenzymes telles que NADH, flavine et riboflavine. Les molécules de lipofuscine, de collagène et d'élastine possèdent également une autofluorescence importante dans les régions spectrales bleu-vert et jaune. Dans les cellules végétales, les molécules de chlorophylle (porphyrines), les alkaloïdes et les flavonoïdes peuvent provoquer une fluorescence

de fond. Les mesures de fluorescence effectuées à partir du proche IR sont donc plus précises dans des matrices telles que l'eau, les tissus vivants, les sérums qui n'induisent des interférences que dans les courtes longueurs d'onde. Les longueurs d'onde infrarouge pénètrent plus profondément dans les tissus et sont moins énergétiques. De plus, le phénomène de diffusion du signal incident est considérablement réduit.

Les sources d'excitation dans le proche IR les plus utilisées sont les diodes lasers, les LEDs (light-emitting diodes), les lampes au krypton ou tungstène (dont la pureté du signal est inférieure à celle du signal des diodes). En utilisant une diode laser comme source de rayonnement[292], la limite de détection d'une cyanine émettant dans le proche IR est de 5 pM. La détection est effectuée généralement par microscopie ou par scanner. D'une manière générale, la limite de détection par fluorescence dépend de l'amplitude du bruit de fond de fluorescence (impuretés, diffusion). Cette fluorescence de fond est très diminuée dans le proche IR. La comparaison a été effectuée avec le visible lors d'expériences de séquençage et est largement en faveur de la détection dans le proche IR où la limite de détection est 100 fois inférieure[293].

Les fluorophores détectables dans le proche IR ont été couplés à une grande variété de biomolécules telles que des enzymes, anticorps, peptides, sucres, … Ils sont également utilisés pour le marquage des acides nucléiques (§ **I. 3.**).

I. 2. Les familles de marqueurs fluorescents détectables dans le proche IR

En comparaison avec la région UV-Visible, seul un petit nombre de fluorophores organiques et organométalliques émet dans la région spectrale du proche IR[294] (Figure 53). Les fluorophores UV-Visible sont généralement rigides, très riches en électrons et le plus souvent composé de deux à quatre cycles aromatiques et conjugués. La structure des marqueurs du proche IR est généralement plus grande ou composée de plus de cycles aromatiques conjugués (quatre à six), ce qui n'améliore pas la solubilité de ces marqueurs (sans fonctions spécifiques) en milieu aqueux et surtout leur photo- et thermostabilité. Comparativement à la détection par fluorescence dans l'UV-Visible, la famille des cyanines est également la famille de marqueurs la plus développée et utilisée pour la détection par fluorescence dans le proche IR.

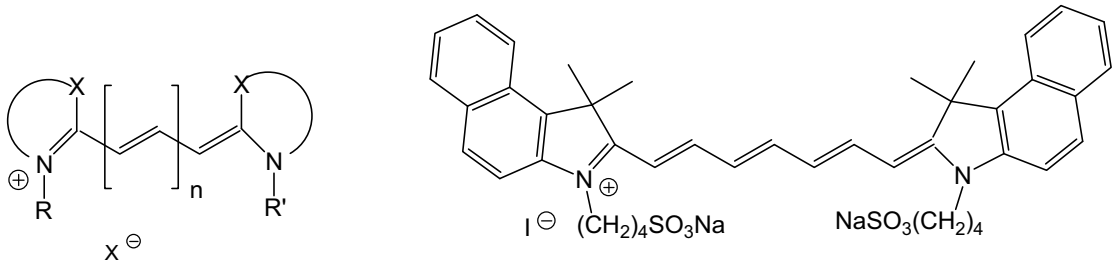


Figure 52 : Structure générale des cyanines et de l'Indocyanine Green.

Les cyanines se différencient par la nature des hétérocycles azotés et la longueur de la chaîne polyméthine[212, 214] (Figure 52). La longueur d'onde d'émission de certaines cyanines peut dépasser 1200 nm. Elles possèdent des coefficients d'extinction molaire importants. Le rendement quantique

des cyanines dépend de la nature des noyaux et du nombre de liaisons méthine. Ceux des cyanines émettant à grande longueur d'onde sont relativement faibles et diminuent lorsque la longueur d'onde augmente. Ces cyanines sont généralement plus fluorescentes dans des solvants non polaires car la polarité augmente la probabilité de former des agrégats moins fluorescents. De nombreux analogues de cyanines émettant dans le proche IR ont été employés pour le marquage non-covalent de protéines[295]. L'Indocyanine Green (ICG, Figure 52), une des cyanines les plus biocompatibles, a notamment été utilisée en ophtalmologie et pour détecter les tumeurs *in vivo* chez l'animal et l'homme[296]. Les phtalocyanines sont des fluorophores détectables dans le proche IR (au-delà de 700 nm) et très stables mais peu solubles dans les solvants organiques. Cependant leur taille importante peut gêner le couplage et leurs interactions avec les acides nucléiques. Il existe également de nombreux complexes métalliques qui fluorescent dans le proche IR mais dont les applications en milieu cellulaire peuvent être limitées du fait de la présence de cations métalliques dans leurs structures.

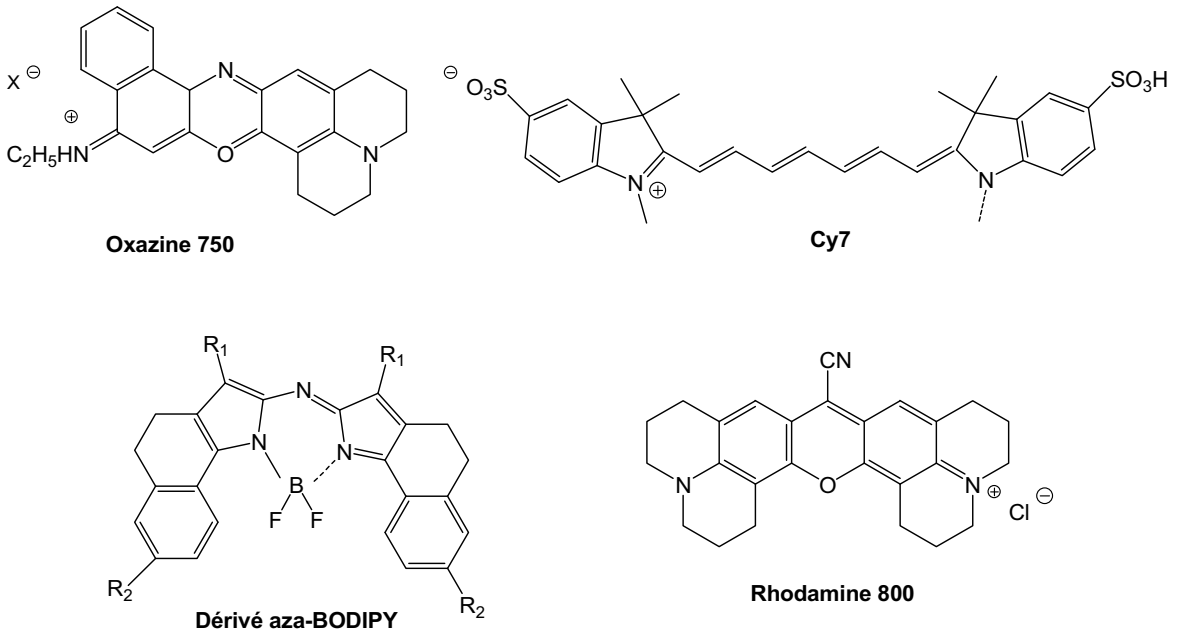


Figure 53 : Exemples de fluorophores émettant au-delà du visible.

Les cyanines les plus classiques sont les molécules Cy5 et Cy7 (Figure 53), synthétisées par l'équipe de Waggoner[297] et maintenant commercialisées par Amersham-Biosciences. Elles comportent des fonctions sulfonate sur les noyaux indole ce qui permet d'améliorer la solubilité et le rendement quantique de fluorescence de ces marqueurs en milieu aqueux et de diminuer le phénomène d'agrégation[298]. Afin d'améliorer la stabilité chimique de ces composés, un motif rigide cyclohexenyle a été incorporé au milieu de la chaîne polyméthine, ce qui donne la possibilité d'une fonctionnalisation supplémentaire sur ces cyanines[299]. Elles ont été utilisées pour marquer un phage et le suivre à l'intérieur de cellules endothéliales[300].

La famille des oxazines[301] est également une famille importante de marqueurs dans le proche IR. Ce sont des molécules très stables photochimiquement, plus compactes que les cyanines (Figure 53).

De nombreuses études sont en cours afin d'améliorer leur solubilité et leur fonctionnalisation. Les marqueurs de la famille des BODIPYs[85] absorbent à des longueurs d'onde de 500 à 650 nm. Des dérivés aza-BODIPYs émettant dans le proche IR ont été récemment synthétisés et possèdent des propriétés de fluorescence intéressantes[302] (Figure 53). Les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPAs)[290] sont moins développés pour la détection au-delà du visible car leur synthèse est difficile, ils sont peu solubles en milieu aqueux mais également dans les solvants organiques classiques car ils possèdent une structure générale de grande taille et très rigide.

I. 3. Les marqueurs fluorescents détectables dans le proche IR couplés ou en interaction avec des oligonucléotides

Peu de fluorophores émettant dans le proche IR ont été couplés aux oligonucléotides. Les fluorophores de la famille Alexa[85, 303] absorbent à des longueurs d'onde jusqu'à 750 nm. Il a été décrit que le composé Alexa Fluor 647[85] a tendance à être plus fluorescent que le marqueur Cy 5 (Figure 54) couplé aux oligonucléotides,

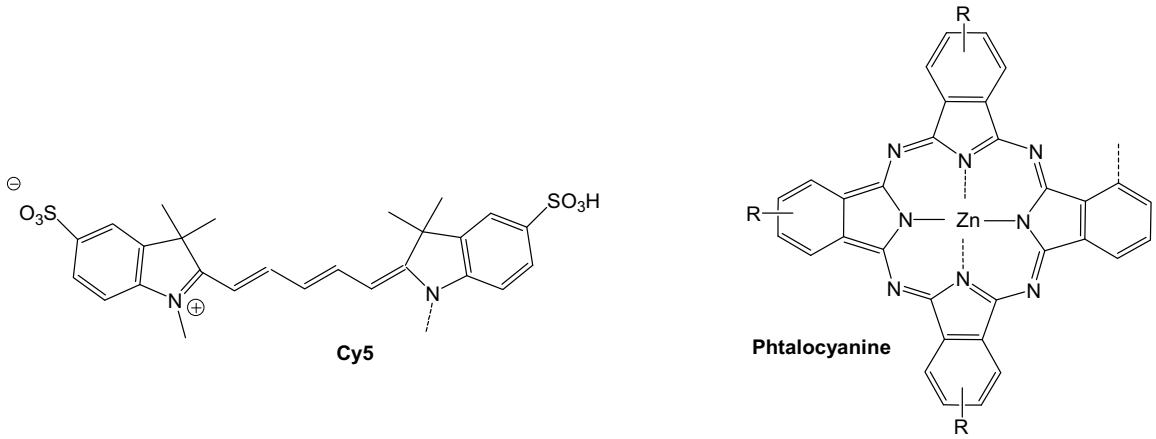


Figure 54 : Structures de fluorophores émettant dans le proche IR utilisés pour le marquage des oligonucléotides.

Des oligonucléotides marqués avec le dérivé Alexa fluor 647 émettant dans le proche IR ont été utilisés pour la détection d'ARNm par FISH[304]. Les marqueurs fluorescents dans le proche IR sont également utilisés dans le développement de nouvelles puces à ADN. Ils sont greffés à l'extrémité 5' d'oligonucléotides déposés sur des surfaces de verre ou de polymère[305]. Les fluorophores de la série Alexa Fluor® semblent posséder des propriétés de fluorescence légèrement supérieures à celles de la série des Cy™ lorsque les marqueurs sont couplés à des oligonucléotides sur puces à ADN[306].

Des dérivés de phtalocyanines comportant des fonctions hydrophiles ont été couplés à des oligonucléotides et émettent un signal fluorescent au-delà de 700 nm[307] (Figure 54).

A notre connaissance, les interactions des squaraines avec les acides nucléiques n'ont jamais été étudiées et le couplage des squaraines aux oligonucléotides n'a pas été décrit. D'après les propriétés des cyanines dont les squaraines forment une sous-classe, il serait intéressant d'étudier leurs propriétés lorsqu'ils sont couplés aux oligonucléotides.

II. Les squaraines

II. 1. Rappels sur les propriétés et applications des squaraines

Les squaraines constituent une vaste famille de marqueurs dont le motif central, obtenu à partir de l'acide squarique, est substitué par deux noyaux riches en électrons de structures variées. De nombreuses squaraines émettent un signal fluorescent dans le proche IR. Les squaraines sont généralement plus fluorescents que les cyanines en raison de leur rigidité et de leur structure plane (Figure 55). De plus, ils sont beaucoup plus fluorescents en milieu organique qu'en milieu aqueux[308] et lorsque la polarité du solvant organique diminue[309]. Ces fluorophores possèdent des coefficients d'extinction molaire importants ce qui implique une grande détectabilité.

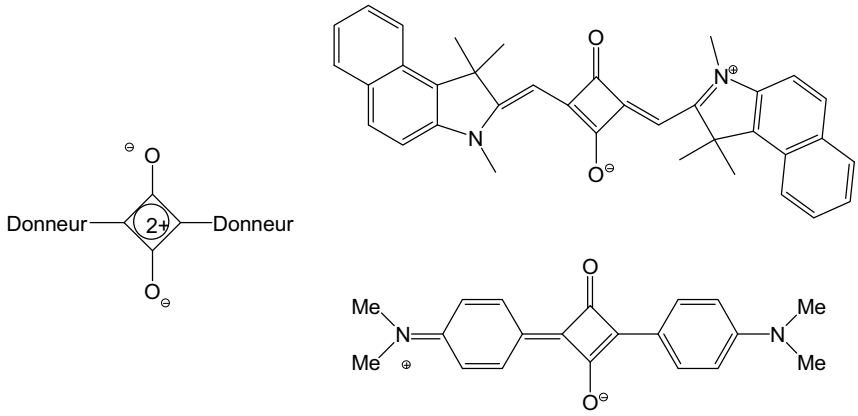


Figure 55 : Structure générale des squaraines et exemples.

Ces molécules possèdent une structure zwittèrionique stabilisée par résonance et produisent des transitions électroniques π-π^* intenses par transfert de charges donneur-accepteur-donneur[310]. Elles sont employées en tant que semiconducteurs et détecteurs d'ions ou encore pour le transport de signaux optiques, car elles peuvent se comporter comme des photoconducteurs[311]. Des molécules de cholestérol ou des sucres ont été fixés sur des squaraines afin d'améliorer leur biodistribution notamment lors d'une application en thérapie photodynamique (PDT) pour le traitement de certains cancers[312].

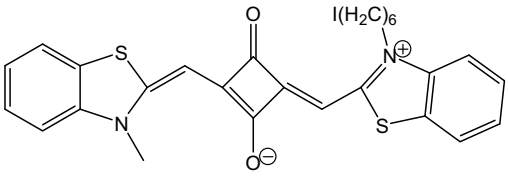
Ces fluorophores, en interaction ou une fois fixés sur des protéines, émettent un signal fluorescent déplacé vers le rouge et beaucoup plus intense que celui émis par le fluorophore seul. Cette augmentation varie en fonction de la nature et du pH de la solution tamponnée, de la concentration en protéine et de la nature des noyaux du squaraine. Les squaraines sont généralement moins stables en milieu acide qu'en milieu neutre ou basique[308]. Des composés squaraines-rotaxanes[313] ont été développés afin d'améliorer la stabilité, et diminuer le phénomène d'agrégation. Ils possèdent des rendements quantiques de fluorescence importants.

La fluorescence de squaraines contenant des noyaux benzothiazole et benzosélénothiazole peut augmenter jusqu'à 300 fois en présence d'albumines[314]. Le phénomène de FRET a également été appliqué aux squaraines pour par exemple détecter l'interaction entre l'HSA (Human serum Albumin) et son anticorps l'anti-HSA[315].

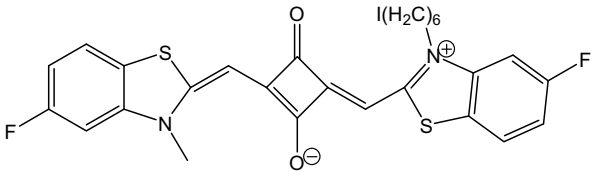
II. 2. Conception des squaraines et leur liaison aux oligonucléotides

II. 2. A. Structures des squaraines

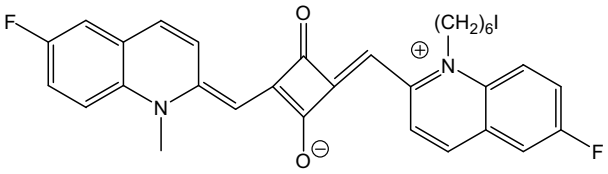
Il a été montré précédemment que la présence de noyaux benzothiazole au sein de la structure de cyanines monométhines engendrait l'émission d'un signal fluorescent intense (§ **A. III. 1. B.**). Nous avons donc choisi tout d'abord de synthétiser et de coupler aux oligonucléotides le composé **SQBt 30,** représenté ci-dessous, comportant deux noyaux benzothiazole liés et conjugués au motif squarique central (Figure 56). Des squaraines symétriques de type dibenzothiazole non substitués ont été synthétisés et leurs propriétés de fluorescence ont été étudiées dans des solvants organiques. Ils sont très peu fluorescents dans des solvants polaires tel que le méthanol (φ_f = 0,09) mais beaucoup plus fluorescents dans des solvants peu polaires tel que le toluène (φ_f = 0,53)[309].



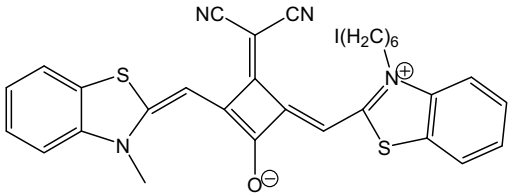
SQBt 30



SQFBt 31



SQFQ 32



SQBtCN 33

Figure 56 : Structures des squaraines synthétisées.

D'après la littérature, la présence d'atomes de fluor sur les noyaux benzéniques de cyanines de la famille du TO augmente la stabilité thermique et photochimique des marqueurs et diminue le phénomène d'agrégation[316]. Les rendements quantiques de fluorescence des dérivés du TO augmentent avec le nombre d'atomes de fluor mais diminuent en présence d'ADN. De plus, il a été décrit que la présence de groupements accepteurs d'électrons (-Cl, -NO_2) sur les noyaux indole de squaraines améliorait la photostabilité[317]. Nous synthétiserons donc également le composé **SQFBt 31** possédant un atome de fluor sur chaque cycle benzénique des noyaux benzothiazole (Figure 56). D'après les précédentes études effectuées sur les squaraines et les fluorophores en général[318], les maxima d'absorption des deux composés sont attendus vers 680 nm.

Afin d'élargir la gamme de nos sondes à grandes longueurs d'onde, la synthèse du squaraine **SQFQ 32** comportant cette fois deux motifs quinaldine (2-méthyl-quinoline) fluorés a été envisagée (Figure 56). D'après la littérature, la présence des noyaux de type quinoline devrait engendrer un déplacement bathochromique d'une vingtaine de nanomètres[318, 319]. L'effet de la substitution sur les

cycles benzéniques des squaraines de type quinaldine a été étudié[320] (Schéma 25). Lorsque le substituant est donneur d'électrons (effet +M), la synthèse s'arrête au stade du composé hemisquaraine alors que lorsqu'il n'y a pas de substituant ou lorsqu'il est accepteur d'électrons (-I et -M), le composé squaraine final est obtenu. La présence de groupements donneurs d'électrons réduit l'acidité des atomes d'hydrogène du groupement 2-méthyle du noyau quinaldine, ce qui défavorise la formation de la fonction énamine nucléophile qui réagit sur le dibutylsquarate électrophile. Le premier couplage peut tout de même se réaliser mais pas le second car l'électrophilie du composé semisquaraine est diminuée par la présence des groupements donneurs d'électrons. Lors de nos synthèses, l'absence de substituants ou la présence de l'atome de fluor (effet majoritaire -I) devrait favoriser la formation du squaraine.

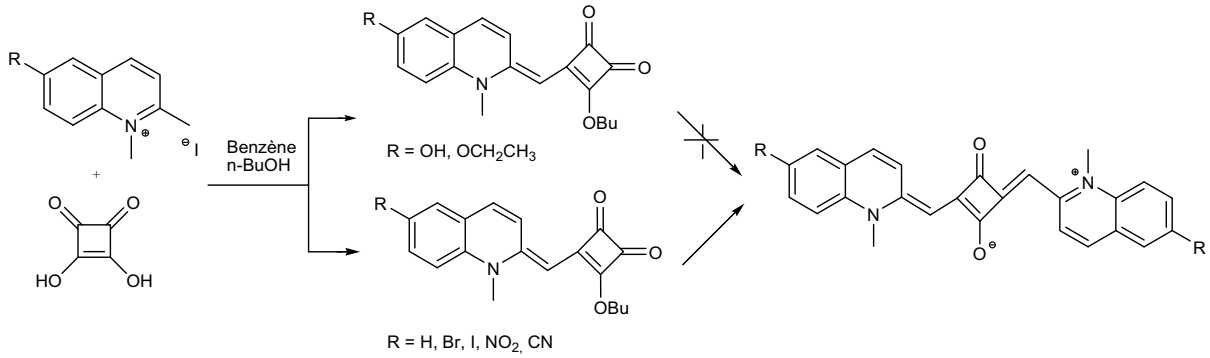


Schéma 25 : Synthèse de squaraines de type quinaldine[320].

D'autre part, la substitution de l'une des deux fonctions carbonyle du noyau central squarique engendre généralement un déplacement du maximum de la bande d'absorption du composé vers le rouge. Les molécules de type amino-squaraine et thio-squaraine[321] absorbent et émettent à des longueurs d'onde supérieures d'environ 15 nm à celles des dioxo-squaraines correspondants mais elles s'avèrent être beaucoup moins stables[322]. En revanche, la substitution par un groupement malonodinitrile provoque, d'après les études de l'équipe de Yarmoluk[323], un déplacement bathochromique des spectres d'absorption et d'émission des squaraines d'environ 25 à 30 nm et augmente la photostabilité du composé. Il serait donc intéressant d'obtenir le composé **SQBtCN 33** dont la longueur d'onde d'émission devrait être supérieure à 700 nm (Figure 56). L'utilisation de certains dicyanosquaraines pour la détection et la localisation de protéines et de peptides a été brevetée[324].

II. 2. B. Stratégie de couplage et choix du bras de liaison

Les structures des cyanines et des squaraines étant proches, il est plus judicieux d'effectuer le couplage après déprotection car il a été montré que les cyanines de la famille du TO ne supportaient pas les conditions basiques de déprotection classique des oligonucléotides. D'une manière générale, les propriétés d'hybridation de conjugués d'oligonucléotides ne sont pas altérées lorsque les bras de liaison flexibles utilisés ont des longueurs comprises entre 5 et 9 atomes de carbone (§ **A. IV. 1.**). Le bras de liaison choisi pour relier le squaraine aux oligonucléotides est un lien hexaméthylène. La

position de la liaison sera l'extrémité 5' des oligonucléotides pour les mêmes raisons que précédemment. Afin de lier les fluorophores aux oligonucléotides à l'extrémité 5', nous avons donc choisi de synthétiser les dérivés iodohexyle des fluorophores pour les coupler sur des fonctions 5'-thiophosphate introduites lors de la synthèse oligonucléotidique (§ **A. IV. 1.**). Cette stratégie limite l'exposition des fluorophores à la lumière et donc leur dégradation.

III. Synthèse des squaraines

La synthèse des marqueurs appartenant à la famille des squaraines asymétriques peut être divisée en trois étapes principales : la synthèse du motif squarique central et celles des deux noyaux hétérocycliques, le couplage du premier noyau aboutissant au composé hemisquaraine suivi du couplage du second noyau hétérocyclique pour donner le composé squaraine (Schéma 26). Sur l'un des noyaux, l'atome d'azote hétérocyclique est substitué par le bras de liaison iodohexyle et l'atome d'azote de l'autre noyau est substitué par un groupement méthyle afin de limiter l'encombrement stérique[325]. La substitution à cette position par d'autres groupements, peut être utilisée pour moduler la solubilité du composé[326].

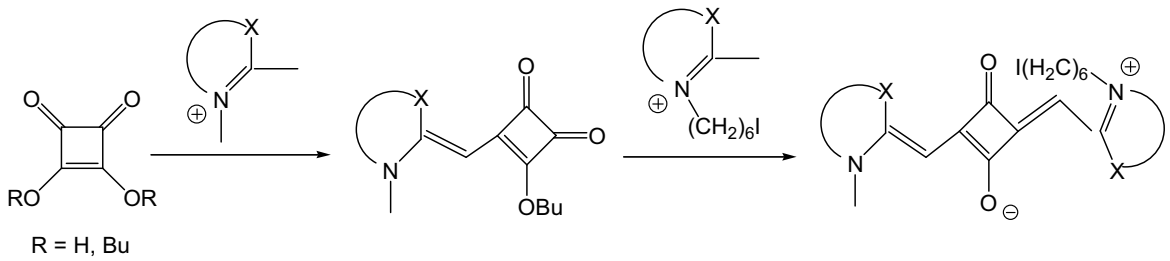


Schéma 26 : Voie générale de synthèse des squaraines.

III. 1. Synthèse des hétérocycles méthylés

Les noyaux hétérocycliques de chaque squaraine dont l'atome d'azote est substitué par un groupement méthyle sont obtenus à partir des hétérocycles commerciaux sur lesquels nous avons fait réagir un large excès (7 éq.) d'iodure de méthyle, qui sert aussi de solvant, dans un tube scellé à 90 °C (Schéma 27)[327]. Les produits, après lavage à l'éther et filtration, sont obtenus avec des rendements voisins de 60 % (Tableau 19).

Dans le cas du 5-fluoro-2-méthylbenzothiazole, la réaction avec l'iodure de méthyle a été optimisée. Le produit méthylé **35** est obtenu après 3 heures de réaction à 110 °C dans un tube scellé avec un rendement de 83 %.

Les réactivités des trois hétérocycles vis-à-vis de l'agent alkylant sont sensiblement identiques.

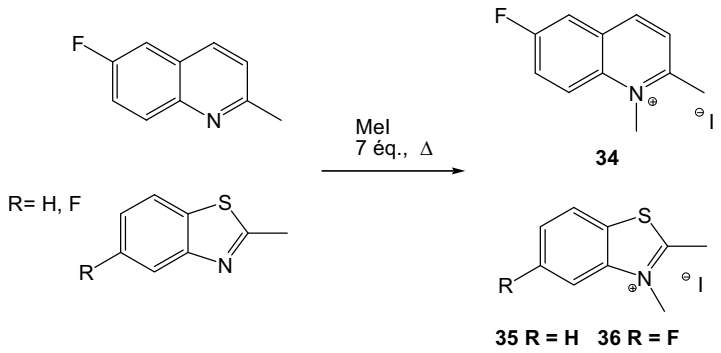


Schéma 27 : Synthèse des hétérocycles méthylés.

III. 2. Synthèse des hétérocycles comportant le bras de liaison

Les hétérocycles comportant le bras de liaison iodohexyle sont synthétisés, suivant une méthode connue[243], à partir des hétérocycles commerciaux sur lesquels nous avons fait réagir dans un tube scellé un large excès (5 éq.) de diiodohexane en l'absence d'autre solvant (Schéma 28). Afin de minimiser la formation de produits secondaires et de dégradation, la température réactionnelle nécessaire est optimisée lors de plusieurs essais pour chaque hétérocycle (Données non fournies). Les produits sont purifiés sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM (Chapitre expérimental, § **B.**).

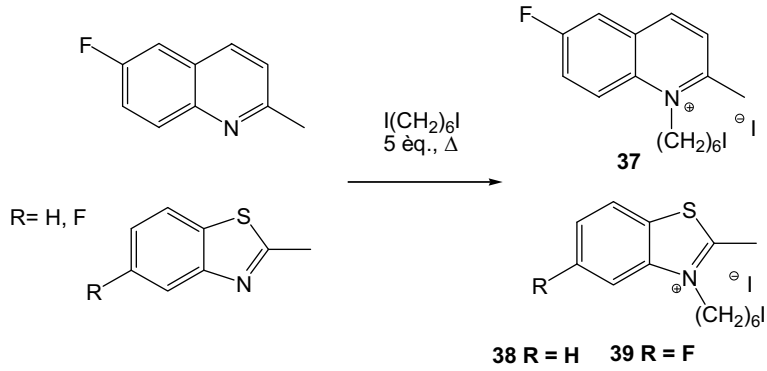


Schéma 28 : Synthèse des hétérocycles comportant un bras de liaison iodohexyle.

La fonctionnalisation du noyau benzothiazole est effectuée à 130 °C avec un rendement de 45 % après 3 heures de réaction. Le motif fluorobenzothiazole n'est pas plus fragile que le motif non fluoré mais semble être un peu moins réactif (2 heures de plus sont nécessaires afin d'obtenir le même rendement, Tableau 19). Lorsque la température est diminuée de 20 °C (110 °C), le rendement chute malgré un temps de réaction beaucoup plus long (20 heures, 30 %) (Données non fournies).

En accord avec de précédents résultats[246], la réaction d'un dihalogénoalcane avec l'atome d'azote tertiaire d'un hétérocycle de type quinaldine est plus difficile qu'avec un hétérocycle de type benzothiazole. Le rendement et la vitesse de réaction diminuent avec la température mais la formation de produits de dégradation est favorisée si la température est trop élevée. L'iodure de 6-fluoro-*N*-(6-iodohexyl)-2-méthylquinolinium **37** est obtenu avec un rendement de 25 % après 6 heures de réaction à 110 °C.

Composé de départ commercial	Composé obtenus			
	Méthylation avec MeI		Fixation du bras de liaison avec $I(CH_2)_6I$	
	Conditions réactionnelles	N° composé et Rdt (%)	Conditions réactionnelles	N° composé et Rdt (%)
6-fluoro-2-méthylquinolinium	7,2 éq., 90 °C, 2 h	**34** (55)	4,5 éq., 110 °C, 6 h	**37** (25)
2-methylbenzothiazole	7 éq., 90 °C, 4 h	**35** (64)	5 éq., 130 °C, 3h	**38** (45)
5-fluoro-2-méthylbenzothiazole	7 éq., 110 °C, 3 h	**36** (83)	5 éq., 130 °C, 5 h	**39** (45)

Tableau 19 : Conditions réactionnelles optimales de méthylation et de fixation du bras de liaison.

III. 3. Synthèse des composés squaraine

III. 3. A. Choix de la voie de synthèse

Les premiers travaux de synthèse de l'acide squarique[328] et de ses dérivés[329] datent des années 60. Depuis, de très nombreuses méthodes de substitution et de transformation de l'acide squarique ont été développées aboutissant à un grand nombre de composés hétérocycliques bioactifs et de matériaux innovants. L'acide squarique possède une double acidité (pKa_1 = 0,52, pKa_2 = 3,48). C'est un composé aromatique de type 2π[330] (Schéma 29).

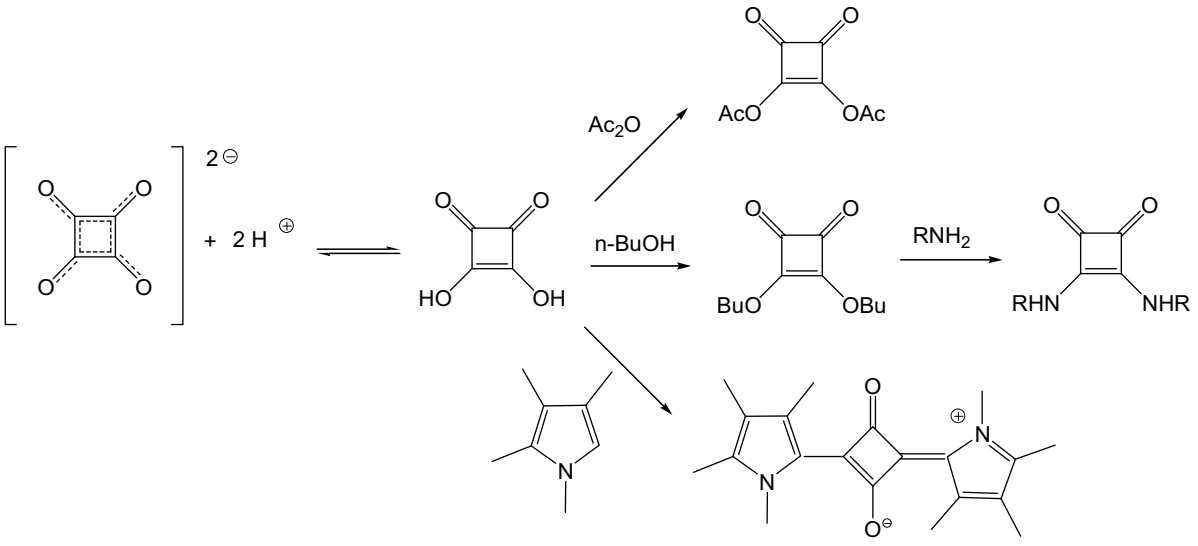


Schéma 29 : Structure[328] et réactivité de l'acide squarique[329].

Il peut se comporter comme un alcool en réagissant avec l'anhydride acétique pour former la 1,2-diacétoxycyclobutène-3,4-dione et comme un acide carboxylique en réagissant avec un excès d'alcool pour donner le 1,2-dialkylsquarate. Les premiers essais de condensation sur l'acide squarique ont été effectués avec des dérivés du pyrrole libre aux positions 2 ou 5 pour aboutir à la famille de colorants cyclotriméthine[331] où l'acide squarique est substitué aux positions 1-3. Depuis, de nombreux squaraines 1-3 ont été obtenus à partir de l'acide squarique et d'hétérocycles nucléophiles dans un

mélange butanol/toluène sous distillation azéotropique[320, 322]. Il a également été décrit que le dérivé bis-ester de l'acide squarique peut réagir avec de nombreux nucléophiles aux postions 1-2, dont notamment le sel de *N*-éthyl-2-méthylbenzothiazolium (et des amines substituées pour réagir comme un ester et donner le squaramide correspondant), (Schéma 30).

Contrairement à ce qui vient d'être dit, de nombreuses autres publications décrivent la synthèse de squaraines asymétriques où le noyau central squarique est substitué aux positions 1-3 à partir du 1,2-dibutylsquarate commercial, en présence de TEA[332] ou de pyridine[333] (Schéma 30). Des squaraines symétriques sont également obtenus à partir du dibutylsquarate en présence de 2 équivalents d'hétérocycle[323]. Une méthode, qui débute par l'obtention du dérivé hemisquaraine monoester à partir du dibutylsquarate, consiste à hydrolyser le composé monoester avant d'y faire réagir le deuxième noyau hétérocyclique dans un mélange butanol/toluène sous distillation azéotropique[320, 334, 335] (Schéma 30).

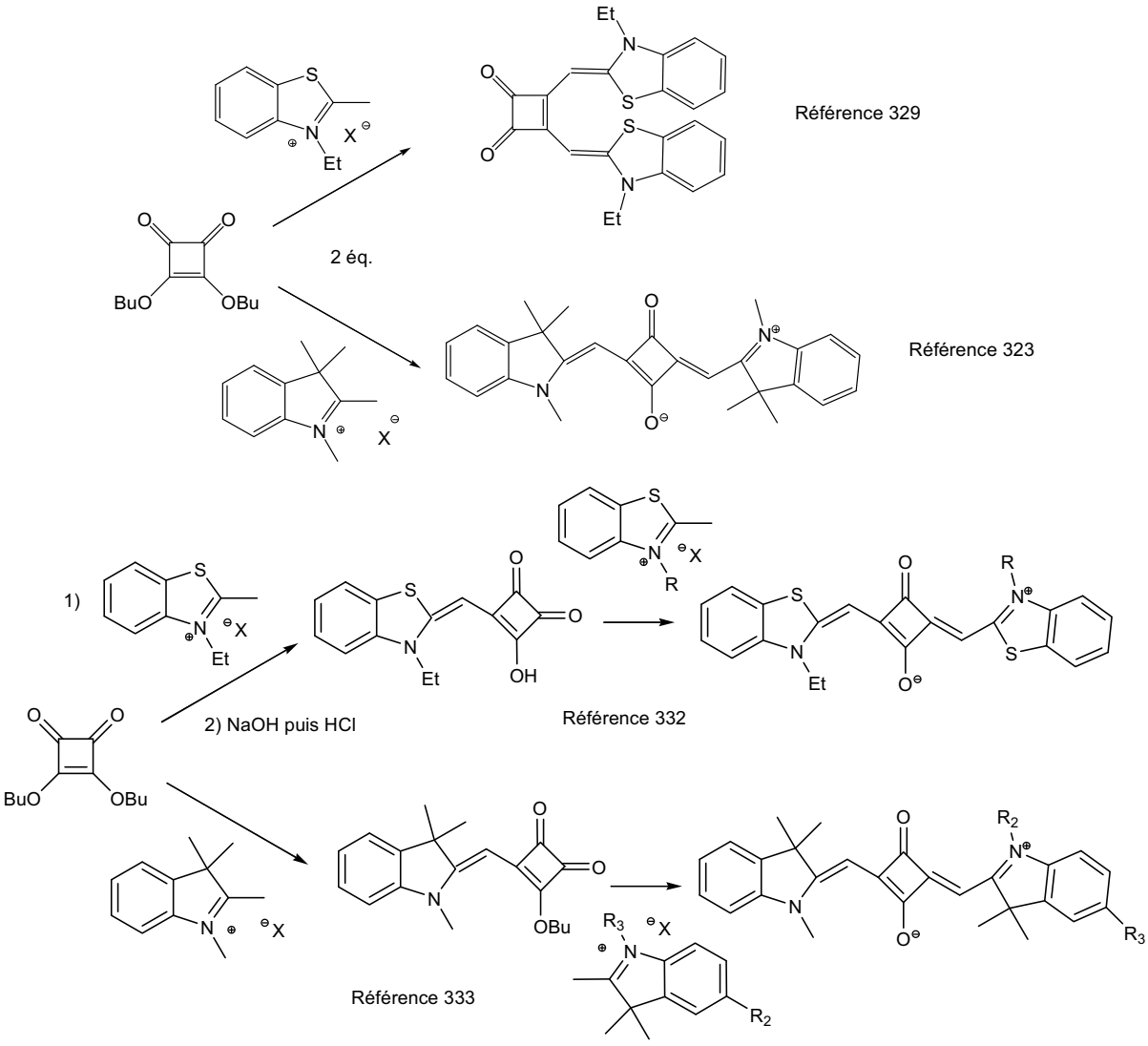


Schéma 30 : Plusieurs voies de synthèse de squaraines décrites à partir du dibutylsquarate.

Deux voies générales de synthèse sont possibles pour obtenir des squaraines asymétriques. Il est possible de coupler en premier sur le noyau squarique soit l'hétérocycle *N*-méthylé soit celui comportant le bras de liaison iodohexyle. Nous avons donc testé diverses méthodes de synthèse. L'obtention du motif squarique central ne nécessite pas de modifier le réactif commercial dans le cas des dioxo-squaraines. Nous avons choisi le dibutylsquarate commercial afin de simplifier le mode opératoire.

III. 3. B. Synthèse des dioxo-squaraines

En nous basant sur la stratégie décrite pour la préparation de dérivés squaraine de type quinaldine[320], le marqueur **SQFQ 32** est obtenu en couplant le premier le noyau comportant le bras iodohexyle sur le dibutylsquarate **40** dans le butanol à 100 °C en l'absence de base avec un rendement de 50 % après une heure et demie de réaction. Le second noyau est couplé dans les mêmes conditions et le squaraine est obtenu avec un rendement de 10 % après 7 heures de réaction (Schéma 31 et tableau 20). Nous avons couplé le noyau comportant le bras de liaison en premier afin de faciliter le couplage du second noyau et éviter une gêne stérique du bras de liaison.

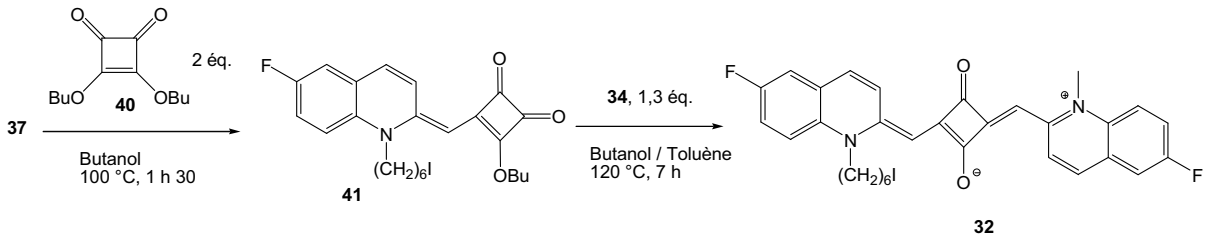


*Schéma 31 : Synthèse du squaraine **SQFQ 32**.*

Tous les squaraines et hemisquaraines sont purifiés sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM. Dans le cas des squaraines, une purification supplémentaire est effectuée après dépôt des résidus sur une plaque de silice préparative éluée plusieurs fois avec un éluant DCM/MeOH (Chapitre expérimental, § **A. 4.**) (Figure 57).

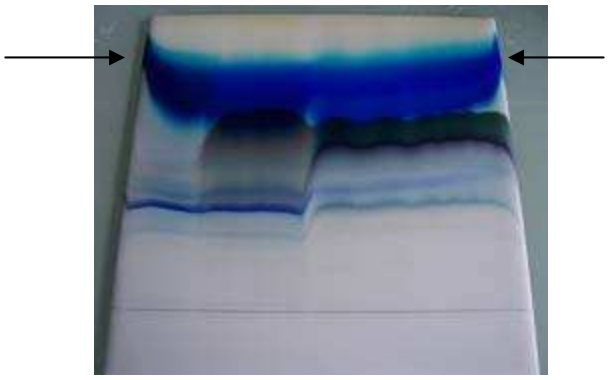


*Figure 57 : Purification de **SQBt 30** sur plaque de silice*

Dans les mêmes conditions, afin d'obtenir le marqueur **SQFBt 31**, le noyau comportant le bras de liaison est couplé en premier dans l'éthanol à 70 °C et après de 1 heure et demie, la réaction est arrêtée car une légère proportion de composé bis comportant deux bras de liaison est apparue. Le rendement en dérivé hemisquaraine est de 28 %. Le second hétérocycle est couplé dans les mêmes conditions et le squaraine est obtenu avec un rendement de 20 % après 6 heures (Données non fournies).

Lorsque l'hétérocycle *N*-méthyle est couplé en premier au dibutylsquarate, la formation du squaraine bis-*N*-méthyle concurrence trop celle du composé hemisquaraine après 30 minutes à 100 °C dans le butanol. Un nouvel essai est effectué en présence cette fois de 1,6 équivalent de TEA. Le premier couplage est quasi quantitatif (80 %) dans l'éthanol à 65 °C en une heure. Le second couplage est alors effectué dans un mélange butanol/toluène à 120 °C. Un rendement de 23 % est obtenu après 10 heures de réaction (Schéma 32 et Tableau 20).

Le marqueur **SQBt 30** est obtenu en suivant ce dernier protocole.

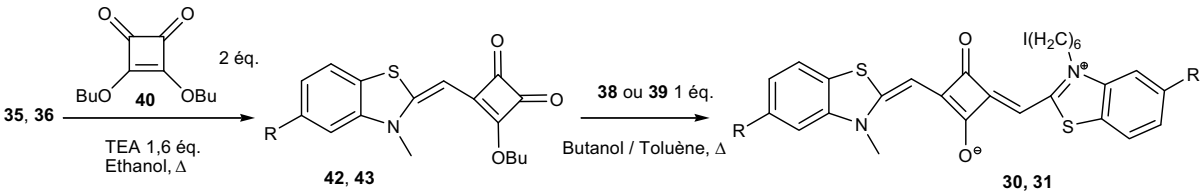


*Schéma 32 : Synthèse des squaraines **SQBt 30** et **SQFBt 31**.*

Squaraine	Composés obtenus			
	Semisquaraine		Squaraine	
	Conditions réactionnelles	N° composé et Rdt (%)	Conditions réactionnelles	Rdt (%)
SQFQ 32	**37** + **40** (1,5 éq.), n-BuOH, 100 °C, 1 h 30	**41** (50)	**41** + **34** (1,3 éq.), n-BuOH / Toluène, 120 °C, 7 h	10
SQFBt 31	**36** + **40** (2 éq.), Ethanol, TEA (1,6 éq.), 65 °C, 1 h	**42** (80)	**42** + **39**, n-BuOH / Toluène, 120 °C, 10 h	23
SQBt 30	**35** + **40** (2 éq.), Ethanol, TEA (1,6 éq.), 65 °C, 1 h 30	**43** (40)	**43** + **38**, n-BuOH / Toluène, 120 °C, 10 h	12
SQBtCN 33	**34** + **44** (1,3 éq.), Ethanol, TEA (1,5 éq.), 60 °C, 1 h	**45** (50)	**45** + **38** (1,2 éq.), Ethanol, 100 °C, 8 h	15

Tableau 20 : Récapitulatif des synthèses des squaraines.

Afin de tester la stratégie décrite dans la littérature, un essai de couplage du second hétérocycle a été effectué après hydrolyse du composé hemisquaraine. Le squaraine obtenu est identique au précédent (Rf, SM, RMN, propriétés spectroscopiques), ce qui va dans le sens de l'obtention des composés squaraine substitués aux positions 1-3 (§ **III. 3. A.**), contrairement à ce qui a été décrit lors des premiers travaux mais en accord avec toutes les synthèses effectuées ensuite.

III. 3. C. Synthèse du dicyano-squaraine

Afin d'obtenir le squaraine dicyané **SQBtCN 33**, deux méthodes décrites dans la littérature ont été envisagées : la première est basée sur la synthèse au préalable du noyau dicyanosquarique suivie des couplages successifs des noyaux benzothiazole et la seconde repose sur la réaction du malonodinitrile sur le composé hemisquaraine[323] (Schéma 33).

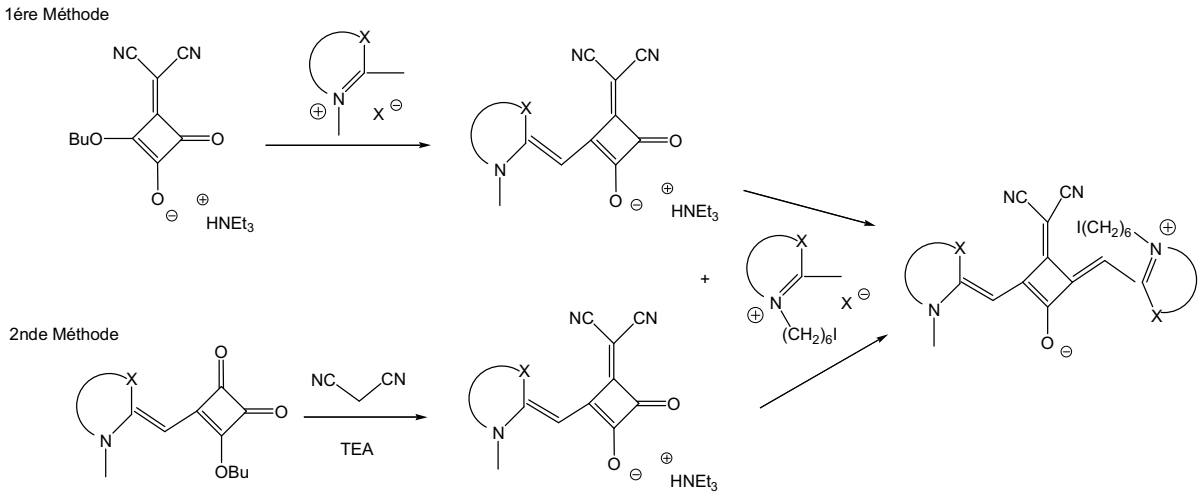


Schéma 33 : Deux voies de synthèse des dicyano-squaraines.

La première méthode basée sur la synthèse du noyau central dicyanosquarique prête à débat. L'équipe d'Oswald a décrit que la réaction du malononitrile sur le dibutylsquarate en présence de TEA aboutit à la formation du dérivé malonodinitriledibutylsquarate[318]. Cependant, une équipe spécialisée en cristallographie a prouvé que le produit de cette réaction n'est pas le dérivé précédent mais le sel de triéthylammonium de malonodinitrilebutylsquarate[336]. En suivant ce mode opératoire, nous avons obtenu le sel de triéthylammonium 2-butoxy-3-dicyanométhylène-4-oxo-1-cyclobutène-1-olate **44** avec un rendement de 95 % (selon les résultats obtenus par spectrométrie de masse).

Le squaraine **SQBtCN 33** est obtenu en appliquant cette dernière méthode où le noyau *N*-méthylé **35** est couplé en premier dans l'éthanol en présence de TEA pendant une heure à 60 °C avec un rendement de 50 % puis le second hétérocycle comportant le bras de liaison **38** est couplé dans l'éthanol à 100 °C pendant 8 heures avec un rendement de 15 % (Schéma 34 et tableau 20).

La seconde méthode a été testée à partir du **SQFBt** monosquarate **42** en suivant le protocole décrit[323] mais nous n'avons pas obtenu le monosquarate dicyané désiré (données non fournies).

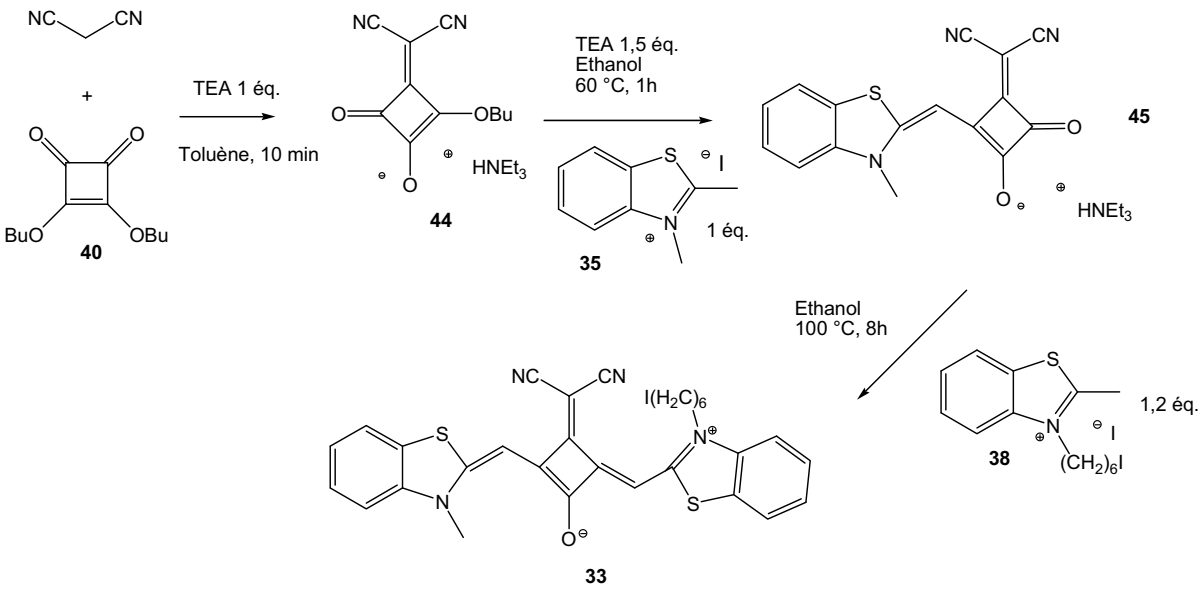


*Schéma 34 : Synthèse du squaraine **SQBtCN 33**.*

IV. Caractérisation et propriétés d'absorption et de fluorescence des squaraines

Les composés obtenus ont été caractérisés par spectrométrie de masse (Tableau 21) ainsi que par RMN ^{1}H et ^{13}C dans le cas des squaraines (Chapitre expérimental).

Squaraine	Couleur dans $CHCl_3$	Analyse par SM ($g.mol^{-1}$)		
		Formule brute	Calculée	Obtenue
SQBt	Bleu	$C_{27}H_{25}O_2N_2S_2I$	600,55	600,00
SQFBt	Bleu	$C_{27}H_{23}N_2O_2S_2F_2I$	636,52	637,27
SQBtCN	Vert turquoise	$C_{30}H_{25}N_4OS_2I$	648,59	648,02
SQFQ	Vert clair	$C_{27}H_{27}N_2O_2F_2I$	624,48	624,50

SQBt SQFBt SQBtCN SQFQ

Tableau 21 : Caractérisation des squaraines.

Toutes les mesures d'absorption et de fluorescence sont effectuées à 4 et 20 °C. Les squaraines synthétisées sont insolubles dans les tampons aqueux.

Les spectres UV-Visible des squaraines **SQBt**, **SQFBt**, **SQBtCN**, **SQFQ** sont enregistrés entre λ = 250 nm et λ = 800 nm avec des λ_{max} dans le proche IR compris entre 656 et 738 nm (Figure 58).

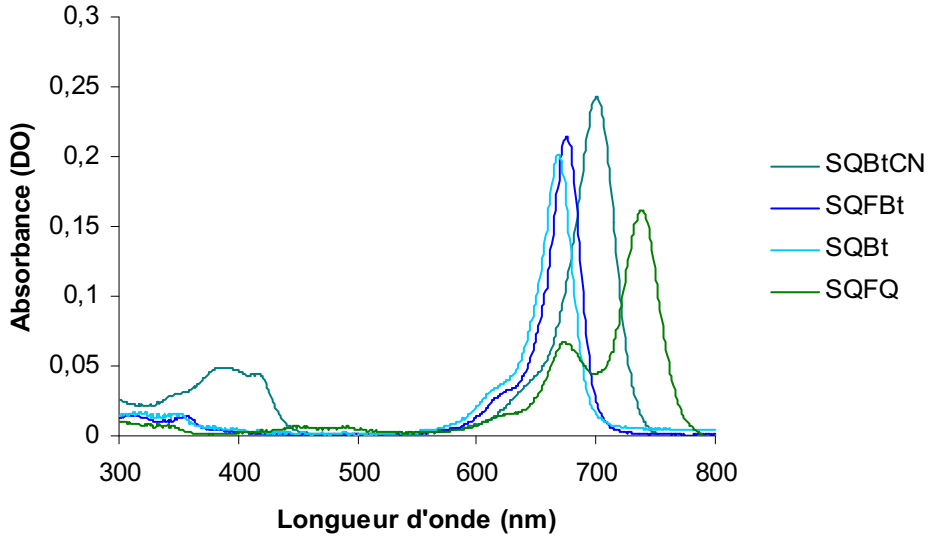


Figure 58 : Spectres d'absorption des squaraines à 20 °C dans le chloroforme.

La forme générale des spectres est constituée d'une bande principale précédée d'un épaulement à plus courte longueur d'onde et est similaire à celle des cyanines correspondantes. Les valeurs de λ_{max} dans le visible dépendent du squaraine considérée (Tableau 22).

Squaraine	Spectroscopie d'absorption							
	EtOH				$CHCl_3$			
	λ_{max} (nm)		ε ($M^{-1}cm^{-1}$)		λ_{max} (nm)		ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	
	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
SQBt	655	656	219500	204500	669	669	218000	202000
SQFBt	661	662	207000	200000	675	675	220500	214500
SQBtCN			-		700	700	270000	243000
SQFQ			-		739	738	178000	156000

Tableau 22 : Propriétés d'absorption des squaraines.

Les coefficients d'extinction molaire $\varepsilon_{\lambda max}$ des fluorophores sont déterminés à partir de la valeur d'absorbance de solutions dont les concentrations sont connues, dans le chloroforme et l'éthanol pour les composés **SQBt** et **SQFBt** afin d'étudier l'influence de la nature et de la polarité du solvant sur les propriétés spectroscopiques des squaraines. Les squaraines **SQBtCN** et **SQFQ** n'étant pas solubles dans l'éthanol, leurs coefficients d'extinction molaire $\varepsilon_{\lambda max}$ sont déterminés seulement dans le chloroforme. Les coefficients d'extinction molaire diminuent légèrement lorsque la température passe de 4 à 20 °C. Les différences des $\varepsilon_{\lambda max}$ entre chaque squaraine attestent de l'influence de leur structure sur les propriétés spectroscopiques. En revanche, l'influence du solvant sur les $\varepsilon_{\lambda max}$ est faible. La présence du groupement malonodinitrile induit une augmentation d'environ 20 % du

coefficient d'extinction molaire au maximum d'absorption. De plus, les déplacements bathochromiques de 6 nm entre les maxima d'absorption des squaraines **SQBt** et **SQFBt** et de 31 nm entre les maxima d'absorption des squaraines **SQBt** et **SQBtCN** attestent de la participation des atomes de fluor et du groupement malonodinitrile au système électronique conjugué des squaraines.

Les squaraines **SQBt** et **SQFBt** possèdent des rendements quantiques de fluorescence[337] relativement élevés (ϕ_F compris entre 0,16 et 0,44 à 20 °C) qui sont plus de 2 fois supérieurs lorsque les squaraines sont en solution dans le chloroforme par rapport à l'éthanol ce qui est en accord avec la littérature[309] (Tableau 23 et figure 59). Le squaraine **SQFBt** est plus fluorescent que le **SQBt** et cette différence augmente avec la polarité du solvant. Cette observation va dans le sens de la diminution du phénomène d'agrégation (plus important dans un solvant polaire et responsable de l'inhibition de fluorescence) due à la présence des atomes de fluor. Ces rendements quantiques de fluorescence sont du même ordre voir légèrement supérieurs à ceux des fluorophores commerciaux émettant dans la même gamme de longueur d'onde[297, 298]. Les rendements quantiques diminuent en moyenne de 15 % lorsque la température passe de 4 à 20 °C.

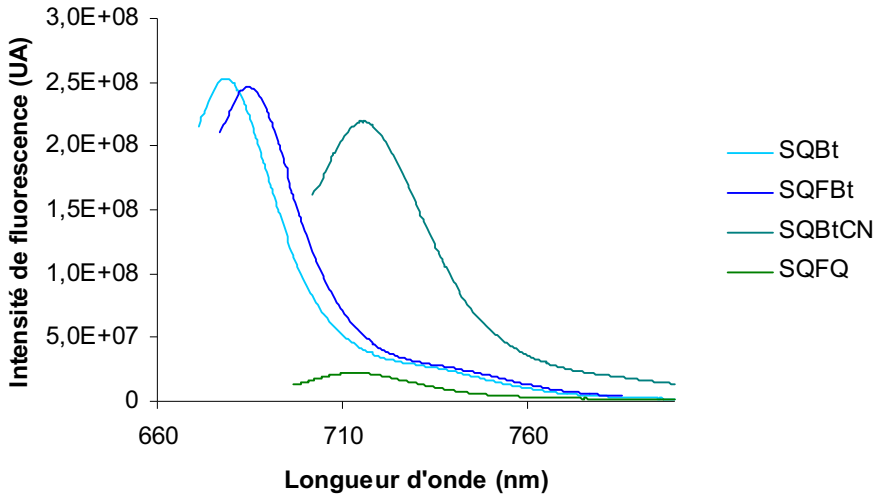


Figure 59 : Spectre d'émission des squaraines excités au λ_{max} d'absorption à 20 °C dans le chloroforme.

Les rendements quantiques de fluorescence de ces composés sont relativement importants sauf celui du squaraine **SQFQ** qui est environ 10 fois plus faible (ϕ_F = 0,057 à 20 °C) que celui du composé **SQFBt**. La présence du groupement malonodinitrile induit une diminution d'environ 20 % du rendement quantique de fluorescence (ϕ_F = 0,35 à 20 °C).

Le faible rendement quantique du squaraine **SQFQ** pourrait s'expliquer par la tendance accrue des noyaux de type quinoline à former des agrégats[278].

Squaraine 1 µM	Solvant	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)		Dép, Stockes		Intensité de fluorescence (UA, ×10^6)		Rendement quantique	
			4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
SQBt	EtOH	656	663	666	7	10	190,36	129,73	0,19	0,16
	$CHCl_3$	669	677	678	8	9	390,74	252,97	0,50	0,42
SQFBt	EtOH	662	671	672	9	10	214,71	147,17	0,25	0,20
	$CHCl_3$	675	684	683	9	8	425,12	279,28	0,53	0,44
SQBtCN	$CHCl_3$	700	718	716	18	16	295,47	219,19	0,39	0,35
SQFQ	$CHCl_3$	694	715	714	19	20	29,94	22,29	0,063	0,057

Tableau 23 : Propriétés d'émission de fluorescence des squaraines.

La photostabilité des squaraines a été étudiée en enregistrant dix fois les spectres de fluorescence d'une même solution (1 nm/s). L'intensité de fluorescence des squaraines **SQBt**, **SQBtCN** et **SQFQ** diminue d'environ 1 % par irradiation alors que celle du squaraine fluoré ne varie pas.

Nous avons également testé la stabilité de ces marqueurs fluorescents en fonction de la température à 4, 20 et 37 °C dans l'éthanol pour les squaraines **SQBt** et **SQFBt** et dans le chloroforme pour les composés **SQBtCN** et **SQFQ**. Les propriétés de tous les squaraines n'évoluent pas pendant 15h à 4°C. A 20 et 37 °C, l'intensité de fluorescence diminue beaucoup plus pour les composés **SQBtCN** et **SQFQ** (respectivement à 20 °C pendant 15 h, - 10 et - 20 %) que pour les squaraines **SQBt** et **SQFBt** qui sont très résistants à la température (- 3 %).

V. Synthèse et propriétés des sondes oligonucléotidiques détectables à grande longueur d'onde

V. 1. Choix des séquences et de leur cible ADN simple et double brin (Tableau 24)

Tout d'abord, les squaraines sont couplés en position 5' terminale de deux 10-mères 5'-thiophosphate, un ODN homopyrimidique précédemment utilisé comme OFT (§ **A. IV.**) avec une thymine à l'extrémité 5' (**1**) et un ODN comportant une majorité de purines avec une adénine à l'extrémité 5' (**46**).

Afin d'étudier les propriétés des squaraines en fonction de la longueur et de la nature de la séquence, les iodohexyle-squaraines sont couplés en position 5' terminale de deux 14-mères 5'-thiophosphate comportant les quatre bases nucléiques naturelles qui sont soit $^{5'}$TT- terminale (**47**) soit $^{5'}$CC- terminale (**48**). Dans le but d'anticiper la possible utilisation de ces sondes en milieu cellulaire ou *in vivo*, les squaraines sont également greffés en position 5' terminale d'un oligonucléotide 20-mère constitué de 2'-*O*-méthyle-uridines (**49**), plus résistant vis-à-vis des nucléases (Chapitre généralités, § **B. VI.**).

V. 2. Synthèse des 5'-conjugués oligonucléotide-squaraine

V. 2. A. Synthèse des oligonucléotides 5'- thiophosphate

La synthèse des oligonucléotides (Tableau 24) est réalisée sur synthétiseur suivant la méthode aux phosphoramidites, puis une étape supplémentaire de détritylation est effectuée pour obtenir la fonction hydroxyle à l'extrémité 5' libre. Nous utiliserons le réactif **11**, synthétisé au laboratoire, pour fonctionnaliser l'extrémité 5' de nos sondes suivant le mode opératoire décrit précédemment (§ **A. IV. C**.).

ONs	Séquences
13	$^{5'}p$(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$
46	$^{5'}p$(S)ATTTGGAACC$^{3'}$
47	$^{5'}p$(S)TTCTCCCCCGCTTA$^{3'}$
48	$^{5'}p$(S)CCGCTTAATACTGA$^{3'}$
49	$^{5'}p$(S)U$_{20}$$^{3'}$(2'OMe)
13$_{SQFBt}$	$^{5'}$**SQFBt**-*Sp*TTTTCTTTTC$^{3'}$
46$_{SQFBt}$	$^{5'}$ **SQFBt**-*Sp*ATTTGGAACC$^{3'}$
47$_{SQFBt}$	$^{5'}$ **SQFBt**-*Sp*TTCTCCCCCGCTTA$^{3'}$
48$_{SQFBt}$	$^{5'}$ **SQFBt**-*Sp*CCGCTTAATACTGA$^{3'}$
49$_{SQFBt}$	$^{5'}$ **SQFBt**-*Sp*(U-2'OMe)$_{20}$$^{3'}$
13$_{SQBt}$	$^{5'}$**SQBt**-*Sp*TTTTCTTTTC$^{3'}$
46$_{SQBt}$	$^{5'}$ **SQBt**-*Sp*ATTTGGAACC$^{3'}$
47$_{SQBt}$	$^{5'}$ **SQBt**-*Sp*TTCTCCCCCGCTTA$^{3'}$
48$_{SQBt}$	$^{5'}$ **SQBt**-*Sp*CCGCTTAATACTGA$^{3'}$
49$_{SQBt}$	$^{5'}$ **SQBt**-*Sp*(U-2'OMe)$_{20}$$^{3'}$

Tableau 24 : Oligonucléotides obtenus.

V. 2. B. Couplage des squaraines sur les oligonucléotides 5'- thiophosphate

Les oligonucléotides 5'-thiophosphorylés déprotégés réagissent avec les dérivés iodohexyle des squaraines en excès (10 éq.) dans un mélange tampon $NaHCO_3$ 2,5 % pH 7 ou pH 9/DMF à l'abri de la lumière pendant une durée de 4 à 20 heures. Après traitement du mélange réactionnel (Chapitre expérimental), les conjugués sont purifiés sur CLHP en phase inverse (Figure 60) et caractérisés par spectrométrie de masse (Tableau 25) et spectroscopie UV/Vis (Tableau 26).

Les temps de rétention des conjugués-squaraine obtenus sur CLHP en phase inverse sont proches de ceux des conjugués-cyanine comportant la même séquence dans des conditions d'analyse identiques. Les temps de rétention des conjugués du squaraine fluoré sont légèrement plus élevés que ceux du squaraine non fluoré.

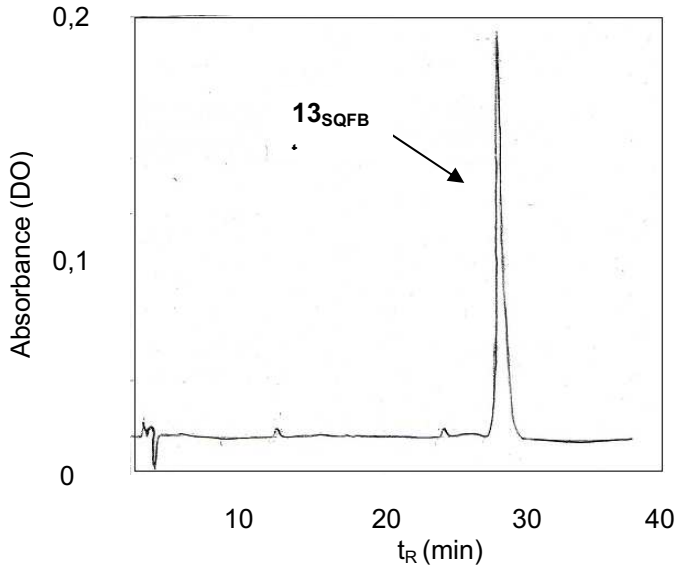


Figure 60 : Chromatogramme d'analyse en phase inverse du conjugué ***13*** $_{SQFBt}$.

Les couplages des squaraines **SQFQ** et **SQBtCN** aux oligonucléotides 5'-thiophosphate ont échoué. Nous avons fait varier le pH (entre 7 et 9), le solvant de réaction (mélange eau/DMF, éthanol, méthanol, acétonitrile) et la proportion de solvant aqueux/organique, la température (entre 20 et 50°C), la stoechiométrie (de 5 à 20 équivalents de marqueur). Des essais de couplage ont alors été effectués dans le méthanol en présence d'éther couronne 18-Crown-6 mais n'ont pas abouti (Données non fournies).

			Analyse par SM (g.mol^{-1})	
ONs	Rdt (%)	Formule brute	Calculée	Obtenue
13	70	$C_{98}H_{128}N_{22}O_{68}P_{10}S$	3044,00	3044,06
46	65	$C_{98}H_{124}N_{37}O_{60}P_{10}S$	3123,08	3122,85
47	50	$C_{133}H_{174}N_{41}O_{88}P_{14}S$	4221,77	4221,70
48	58	$C_{136}H_{173}N_{50}O_{84}P_{14}S$	4318,87	4318,94
49	66	$C_{200}H_{262}N_{40}O_{160}P_{20}S$	6438,97	6438,40
13$_{SQFBt}$	24	$C_{125}H_{151}N_{24}O_{70}P_{10}S_3F_2$	3553,62	3554,90
46$_{SQFBt}$	8	$C_{125}H_{146}N_{39}O_{62}P_{10}S_3F_2$	3630,68	3629,30
47$_{SQFBt}$	4	$C_{161}H_{197}N_{43}O_{90}P_{14}S_3F_2$	4730,37	4729,64
48$_{SQFBt}$	3	$C_{161}H_{196}N_{52}O_{86}P_{14}S_3F_2$	4827,46	4827,99
49$_{SQFBt}$	5	$C_{227}H_{284}N_{42}O_{162}P_{20}S_3F_2$	6946,57	6946,70
13$_{SQBt}$	6	$C_{125}H_{155}N_{24}O_{70}P_{10}S_3$	3519,63	3519,03
46$_{SQBt}$	7	$C_{125}H_{148}N_{39}O_{62}P_{10}S_3$	3594,70	3592,89
47$_{SQBt}$	5	$C_{161}H_{199}N_{43}O_{90}P_{14}S_3$	4694,39	4695,55
48$_{SQBt}$	6	$C_{161}H_{198}N_{52}O_{86}P_{14}S_3$	4791,48	4791,56
49$_{SQBt}$	8	$C_{227}H_{286}N_{42}O_{162}P_{20}S_3$	6910,59	6912,38

Tableau 25 : Caractérisation des conjugués par spectrométrie de masse.

La difficulté à coupler ces composés doit être liée au fait qu'ils ont tendance à s'agréger dans les solvants polaires[338]. De plus, il a été décrit que certains squaraines sont plus solubles dans le méthanol que dans les tampons aqueux[308]. En revanche, d'autres se dégradent dans le DMF et dans les tampons aqueux à pH 7 après quelques heures[321].

V. 3. Propriétés des 5'-conjugués oligonucléotide-squaraine

Les spectres UV-Visible-proche IR des conjugués sont enregistrés entre λ = 230 nm et λ = 900 nm. Ils présentent tous deux bandes d'absorption principales. Pour chaque conjugué, la bande d'absorption en UV du spectre correspond aux absorbances de l'oligonucléotide et du fluorophore alors que la bande d'absorption dans le visible-proche IR entre λ = 400 nm et λ = 900 nm correspond seulement à celle du fluorophore (Tableau 26, figure 61).

ONs pH 7	t_R (min) en phase inverse	λ_{UVmax} (nm)		λ_{plRmax} (nm)		
		Pic principal	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	Pic principal	épaulement	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)
13	11 min 37 s	267	80100			
46	9 min 41 s	260	98100			
47	12 min 40 s	268	115700			
48	10 min 43 s	261	133600			
49	12 min 50 s	259	162600			
$\mathbf{13_{SQFBt}}$	28 min 03 s	266	85500	661	604	122000
$\mathbf{46_{SQFBt}}$	27 min 34 s	260	103500	662	605	126600
$\mathbf{47_{SQFBt}}$	26 min 59 s	266	121100	666	609	119300
$\mathbf{48_{SQFBt}}$	26 min 33 s	262	139000	661	605	114300
$\mathbf{49_{SQFBt}}$	27 min 58 s	260	168000	655	603	102000
$\mathbf{13_{SQBt}}$	27 min 06 s	268	87100	654	601	114300
$\mathbf{46_{SQBt}}$	27 min 10 s	260	105100	656	602	128400
$\mathbf{47_{SQBt}}$	26 min 22 s	265	122700	659	604	102200
$\mathbf{48_{SQBt}}$	24 min 53 s	262	140600	657	602	108600
$\mathbf{49_{SQBt}}$	27 min 31 s	259	169600	649	600	100600

Tableau 26 : Caractérisation des conjugués par spectroscopie d'absorption à 20 °C (tampon cacodylate).

Les spectres d'absorption des 5'-conjugués oligonucléotide-squaraine sont composés de deux pics principaux qui dépendent de la séquence oligonucléotidique et du squaraine, dont les λ_{max} dans l'UV se situent entre 259 et 268 nm et dans le proche infrarouge entre 649 et 666 nm. Les λ_{plRmax} sont précédés d'un petit épaulement (10 % de l'intensité du pic principal) entre 600 et 605 nm. La présence des atomes de fluor sur le squaraine **SQFBt** provoque un déplacement bathochromique du λ_{max} dans le proche IR des conjugués correspondants de 4 à 7 nm selon la séquence oligonucléotidique. Un

déplacement spectral similaire avait été précédemment décrit sur les spectres d'absorption des dérivés squaraine-bras libres (§ **IV.**), (Figure 61). L'absorbance des conjugués dans le visible augmente en moyenne de plus de 30 % lorsque la mesure est effectuée dans l'éluant de CLHP comprenant environ 30 % d'acétonitrile dans une solution de tampon AA 0,1 M, pH 7.

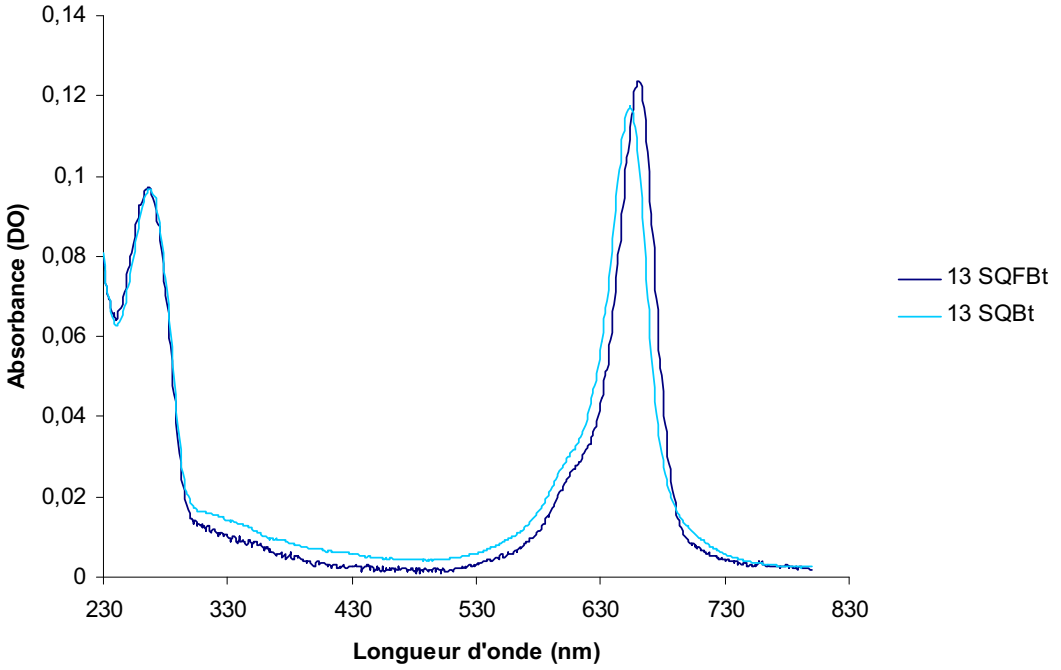


Figure 61 : Spectres d'absorption du conjugués **13$_{SQFBt}$** et **13$_{SQBt}$** à 20 °C.

Les spectres d'absorption des conjugués sont très peu sensible à la température entre 4 et 20 °C. A température plus élevée, des modifications irréversibles se produisent sur les spectres d'absorption des conjugués. L'intensité du pic principal dans le proche IR diminue avec la température et d'autant plus au-dessus de 40 °C jusqu'à pratiquement disparaître si l'expérience est prolongée dans le temps ou si la température continue d'augmenter. Les coefficients d'extinction molaire à 260 nm ε_{260} des composés **13$_{SQBt}$** et **13$_{SQFBt}$** ont été déterminés par titration de leurs solutions dans le tampon « cacodylate » à 4 °C en présence de leur séquence complémentaire $^{5'}$GGGAAAAGAAAATTT$^{3'}$. Les contributions spectrales à 260 nm des squaraines **SQBt** et **SQFBt** (respectivement 7000 et 5400 $M^{-1}.cm^{-1}$) calculées pour les conjugués **13$_{SQBt}$** et **13$_{SQFBt}$** sont utilisées pour déterminer les ε_{260} des autres conjugués par addition des valeurs ε_{260} des squaraines et de celles des oligonucléotides. La contribution spectrale de ces fluorophores à 260 nm est très faible par rapport à celle des oligonucléotides. Le λ_{max} UV des conjugués est peu différent de celui des oligonucléotides non modifiés et ne varie pratiquement pas en fonction de la présence ou non des atomes de fluor sur le squaraine. Les $\varepsilon_{\lambda max}$ des conjugués du squaraine non fluoré **SQBt** sont légèrement inférieurs à ceux des conjugués du squaraine fluoré **SQFBt** (sauf dans le cas du 10-mère contenant des purines où les deux valeurs sont très proches).

Les études par fluorescence sont effectuées à 4 et 20 °C afin d'étudier l'influence de la température sur l'intensité de fluorescence émise. Les λ_{pIRmax} d'absorption des conjugués des squaraines vont de 665 nm à 678 nm. Parallèlement aux λ_{pIRmax} d'absorption, les λ_{pIRmax} d'émission des conjugués des squaraines fluorés sont déplacées vers le rouge de 4 à 7 nm (Figure 62, 63 et Tableau 27).

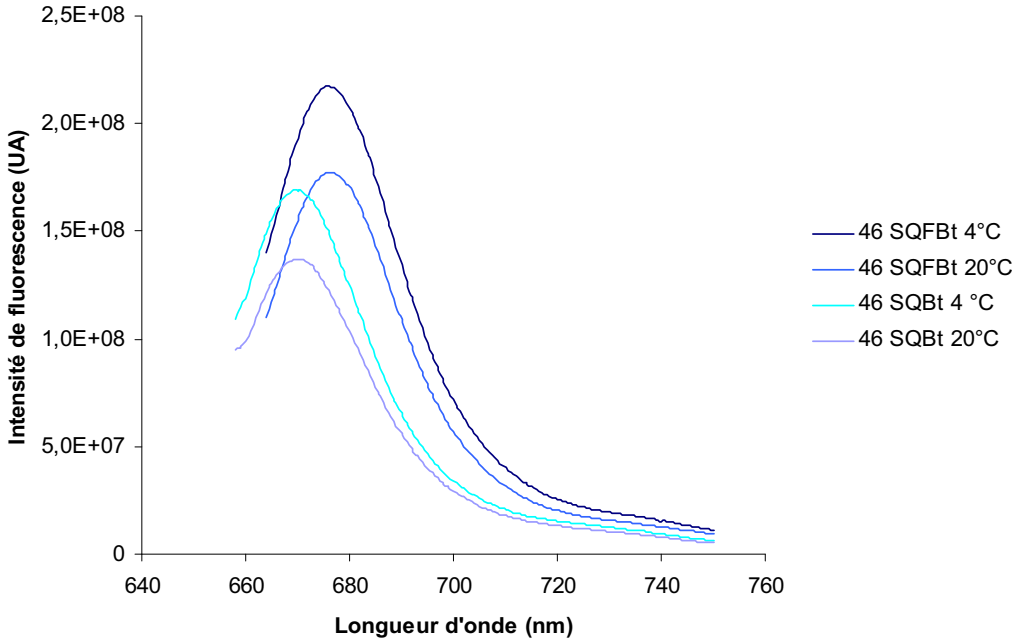


Figure 62 : Spectres d'émission de fluorescence des conjugués ***46***$_{SQFBt}$ *et* ***46***$_{SQBt}$ *excités au* λ_{pIRmax} *d'absorption.*

La fluorescence des sondes libres à 4 °C est toujours supérieure à celle à 20 °C, cette observation étant justifiée par la rotation plus importante des liaisons méthine des fluorophores[233]. Les rendements quantiques diminuent en moyenne de 15 % lorsque la température passe de 4 à 20 °C. L'intensité de fluorescence des sondes a tendance à diminuer avec la longueur de la séquence oligonucléotidique. Les valeurs des déplacements de Stockes des conjugués, qui se situent autour de 15 nm, permettent de distinguer le signal fluorescent de la diffusion du signal d'excitation. Les conjugués des squaraines **SQBt** et **SQFBt** possèdent des rendements quantiques de fluorescence élevés (ϕ_F compris entre 0,17 et 0,39 à 20 °C) par comparaison à ceux des squaraines de type dibenzothiazole dans les solvants polaires (ϕ_F = 0,09 dans le méthanol)[309]. A une même concentration, les intensités de fluorescence sont plus importantes pour le conjugué du squaraine fluoré **46**$_{SQFBt}$. D'une manière générale, les intensités et les rendements quantiques de fluorescence des conjugués du squaraine fluoré sont supérieures de 30 à 50 % par rapport à ceux des conjugués du squaraine non fluoré.

ONs pH 7 1 µM	Fluorescence 4 °C			 20 °C			I_F (UA, ×10^6)		Rendement quantique	
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Dép. Stockes	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Dép. Stockes	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
13$_{SQFBt}$	661	673	12	661	673	12	214,59	165,34	0,38	0,32
46$_{SQFBt}$	662	676	14	662	676	14	217,59	177,56	0,43	0,37
47$_{SQFBt}$	666	678	14	666	678	14	212,91	176,33	0,44	0,39
48$_{SQFBt}$	661	674	13	661	675	14	193,24	160,00	0,39	0,35
49$_{SQFBt}$	655	670	15	655	671	16	181,92	110,27	0,37	0,27
13$_{SQBt}$	654	668	14	654	668	14	162,64	111,48	0,33	0,24
46$_{SQBt}$	656	670	14	656	670	14	169,14	137,05	0,30	0,26
47$_{SQBt}$	659	671	12	659	671	12	153,02	103,36	0,32	0,24
48$_{SQBt}$	657	670	13	657	671	14	120,77	100,00	0,27	0,23
49$_{SQBt}$	649	665	16	649	666	17	103,13	61,83	0,25	0,17

Tableau 27 : Propriétés de fluorescence des conjugués.

La photostabilité des conjugués a été étudiée en enregistrant dix fois les spectres de fluorescence d'une même solution (1 nm/s). La fluorescence des conjugués des squaraines diminue au cours des irradiations : d'environ 1 % par irradiation pour les conjugués de **SQFBt** et d'environ 2,5 % par irradiation pour les conjugués de **SQBt** (données non fournies). La présence des atomes de fluor sur le squaraine apporterait donc un gain de photostabilité au fluorophore.

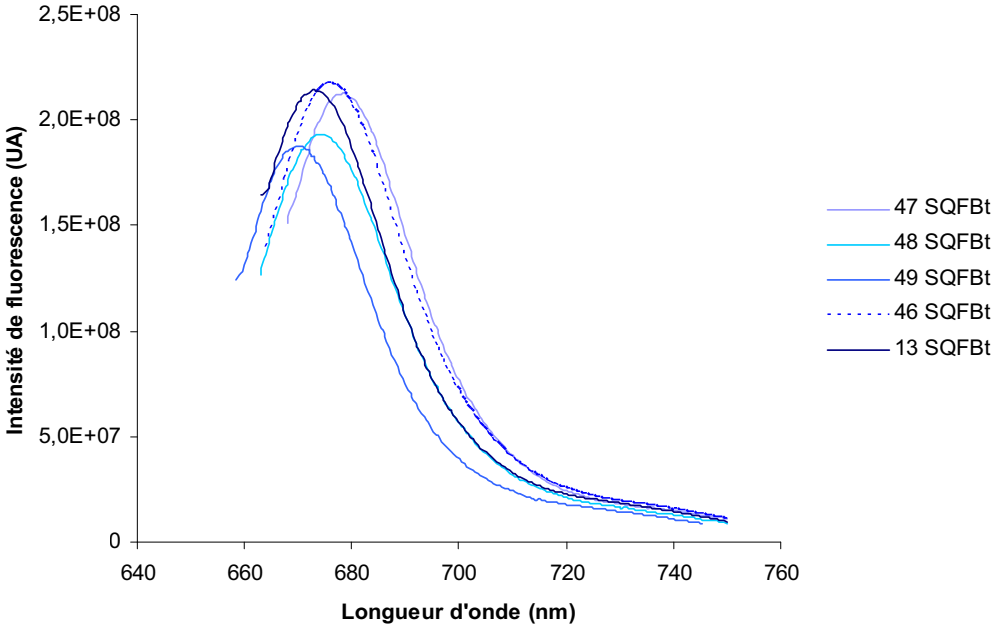


*Figure 63 : Spectres d'émission de fluorescence des conjugués du squaraine **SQFBt** à 4 °C.*

Il serait intéressant de comparer les propriétés de ces conjugués à celles de conjugués marqués avec d'autres fluorophores couramment utilisés pour la détection de biomolécules.

VI. Comparaison des propriétés de fluorescence des conjugués oligonucléotide-squaraine avec des conjugués de référence

VI. 1. Choix des fluorophores de référence

Notre premier choix s'est porté sur la fluorescéine, l'un des fluorophores commerciaux possédant les meilleurs rendements quantiques de fluorescence (ϕ_F = 0,9). Les dérivés de la fluorescéine possèdent également des coefficients d'extinction molaire élevés et sont solubles dans l'eau. Cependant, comme la majorité des marqueurs fluorescents, ils photoblanchissent rapidement, leur fluorescence est sensible au pH et est souvent affectée par l'environnement du marqueur lorsqu'ils sont liés à des biomolécules. Le ϕ_F de la fluorescéine couplé à un oligonucléotide diminue en moyenne de 0,9 à 0,6 et atteint 0,2 - 0,3 lorsque le conjugué est hybridé à une cible simple brin d'ADN comportant les quatre bases nucléiques[339]. Nous utiliserons le dérivé commercial iodoacétamido de la fluorescéine **FI** (Molecular Probes), (Figure 64).

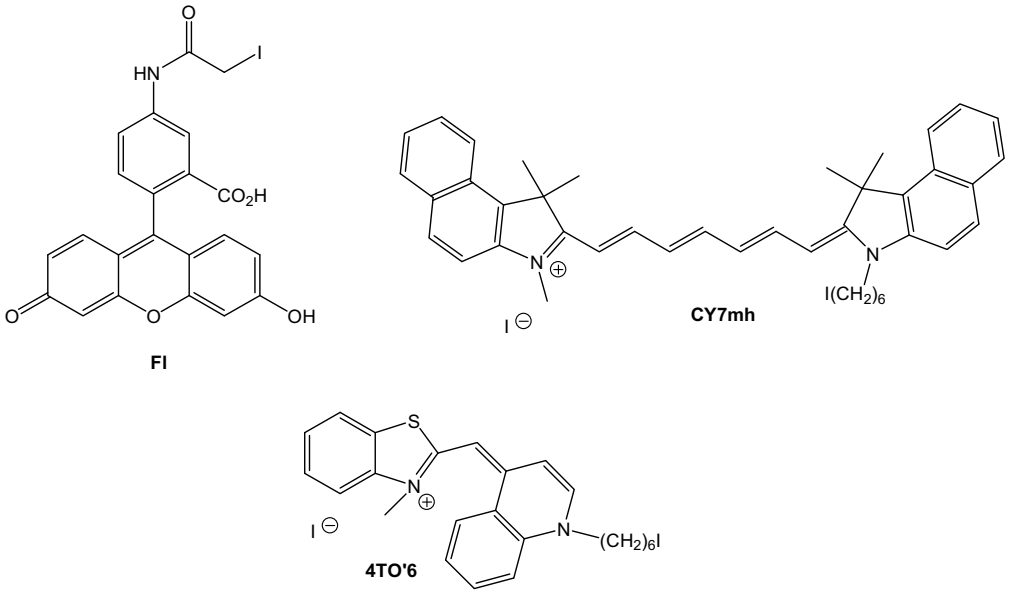


Figure 64 : Structures des fluorophores de références.

Nous avons également choisi d'étudier un analogue de l'Indocyanine Green commerciale (ICG), déjà présent au laboratoire (synthèse non publiée). L'heptacyanine **CY7mh** a été liée en position 5' de l'ODN en utilisant le même bras de liaison que pour les squaraines (Figure 64).

La fluorescence de l'ICG est faible et d'autant plus en milieu aqueux (ϕ_{eau} = 0,005[340]; $\phi_{éthanol}$ = 0,05[341]) car elle a tendance à s'agréger. En revanche, les monomères de l'ICG peuvent s'associer aux protéines, leur fluorescence est alors fortement augmentée (plus de 10 fois) et le maximum d'émission est déplacé vers le rouge. L'ICG n'est pas stable en milieu aqueux, sa fluorescence

diminue de moitié en deux heures. En présence de protéine, elle n'est diminuée que de 25 % après 24 heures[342].

Nous comparerons également nos conjugués oligonucléotide-squaraine à un TO'-oligonucléotide, comportant un bras de liaison identique, précédemment synthétisé et étudié, le conjugué **$13_{4TO'6}$** (§ **A. IV. 3. B.**)[343]. Les rendements quantiques des conjugués du TO sont généralement inférieurs à 0,1[244].

VI. 2. Synthèse et caractérisation des conjugués de référence

L'heptacyanine **CY7mh** a été obtenue avec un bras de liaison iodohexyle suivant une voie de synthèse adaptée de celle décrite par l'équipe de Romieu[344, 345] (Schéma 35). Ce marqueur est à la fois soluble dans l'éthanol et le chloroforme.

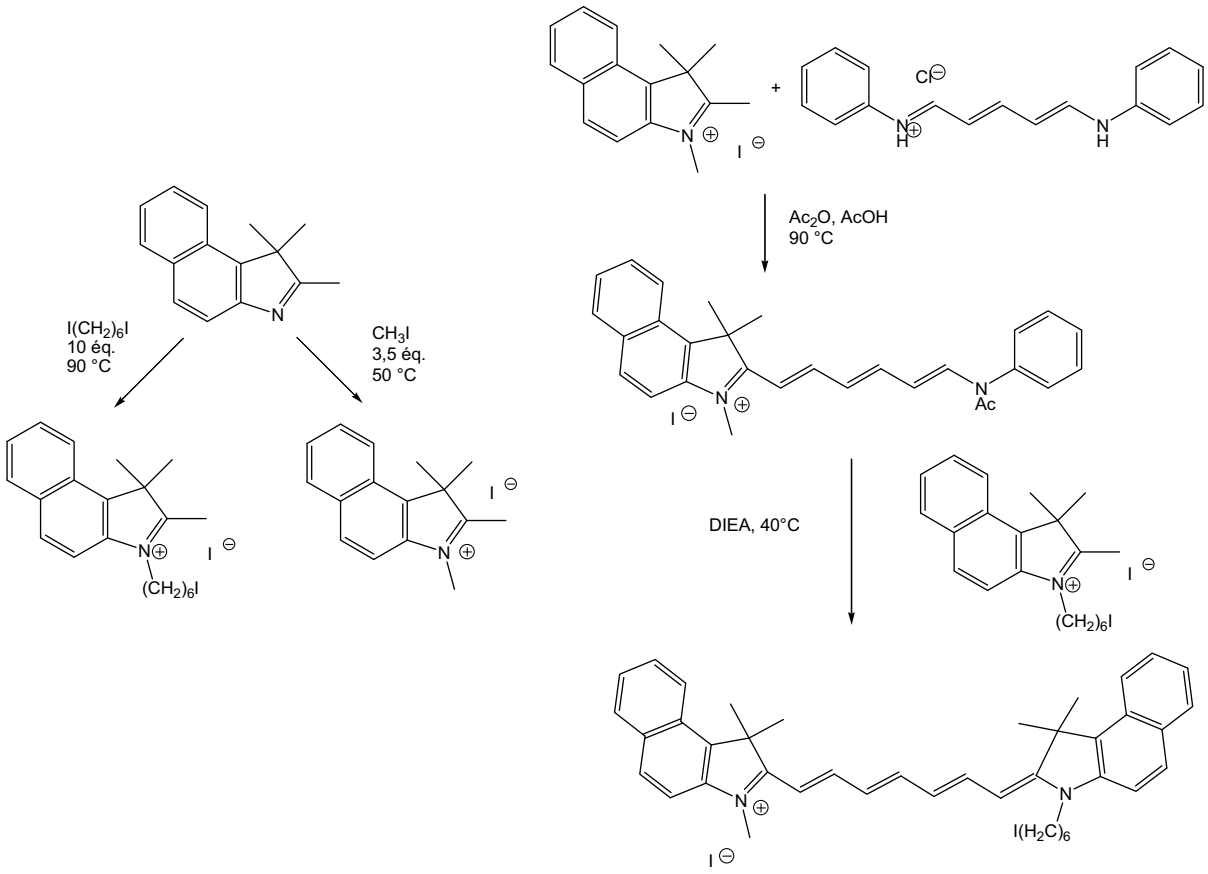


Schéma 35 : Voie de synthèse de l'heptacyanine de référence.

L'intensité de fluorescence de ce fluorophore dans l'éthanol diminue de 16 % à 20 °C après 15 heures et de 11 % à 37 °C après 4 heures. La stabilité de **CY7mh** en fonction de la température est proche de celles des squaraines **SQBtCN** et **SQFQ** et inférieure à celles des squaraines **SQBt** et **SQFBt**.

Les deux fluorophores de référence sont couplés à l'oligonucléotide 5'-thiophosphate **13** suivant le mode opératoire décrit précédemment (Tableau 28). Le temps de rétention du conjugué $\mathbf{13_{CY7mh}}$ obtenu sur CLHP en phase inverse est pratiquement le double de celui des conjugués des squaraines. La chaine heptaméthine de la cyanine **CY7mh** est responsable de l'augmentation du temps de rétention. Celui du conjugué $\mathbf{13_{Fl}}$ est inférieur de plus de dix minutes à celui des autres conjugués car la structure de la fluorescéine est différente des autres marqueurs et elle est reliée à l'ODN par un bras de liaison plus court.

ODNs références	Séquences	t_R (min)	Rdt (%)	Analyse par SM ($g.mol^{-1}$)		
				Formule brute	Calculée	Obtenue
$\mathbf{13_{Fl}}$	$^{5'}$**Fl** -*p*(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$	14 min 52 s	25	$C_{120}H_{142}N_{23}O_{74}P_{10}S$	3432,35	3433,49
$\mathbf{13_{CY7mh}}$	$^{5'}$**CY7mh** -*p*(S)TTTTCTTTTC$^{3'}$	51 min 06 s	13	$C_{140}H_{174}N_{24}O_{68}P_{10}S$	3622,84	3624,38

Tableau 28 : Analyse par chromatographie en phase inverse et spectrométrie de masse des conjugués de référence.

Les spectres d'absorption des conjugués $\mathbf{13_{CY7mh}}$ et $\mathbf{13_{Fl}}$ sont également composés de deux pics principaux, dont les λ_{max} dans l'UV à 4 °C se situent respectivement à 265 et 262 nm et dans le visible-proche IR respectivement à 791 et 493 nm avec un épaulement à 724 et 456 nm (Figure 65).

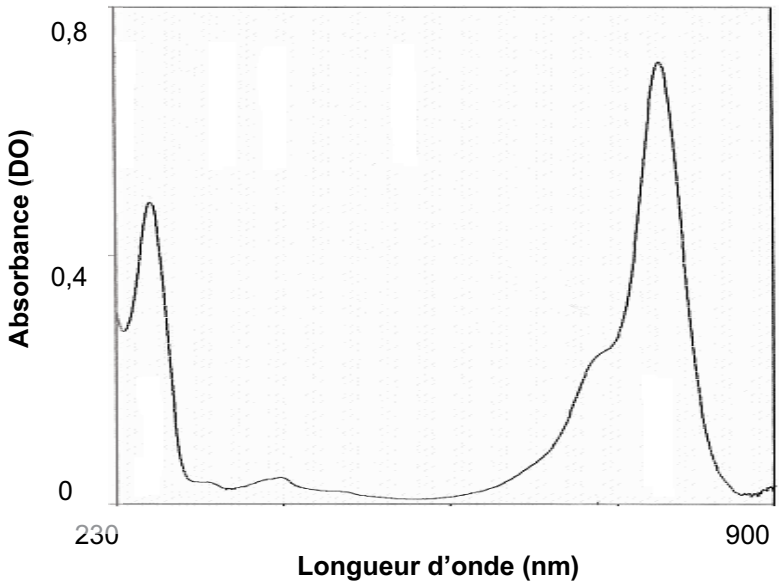


Figure 65 : Spectres d'absorption du conjugué $\mathbf{13_{CY7mh}}$.

Les coefficients d'extinction molaires à 260 nm ε_{260} des composés $\mathbf{13_{CY7mh}}$ et $\mathbf{13_{Fl}}$ ont été déterminés par titration de leurs solutions dans le tampon « cacodylate » à 4 °C en présence de leur séquence complémentaire $^{5'}$GGGAAAAGAAAATTT$^{3'}$. Les contributions spectrales à 260 nm des références **CY7mh** et **Fl** sont respectivement de 4000 et 5000 $M^{-1}.cm^{-1}$.

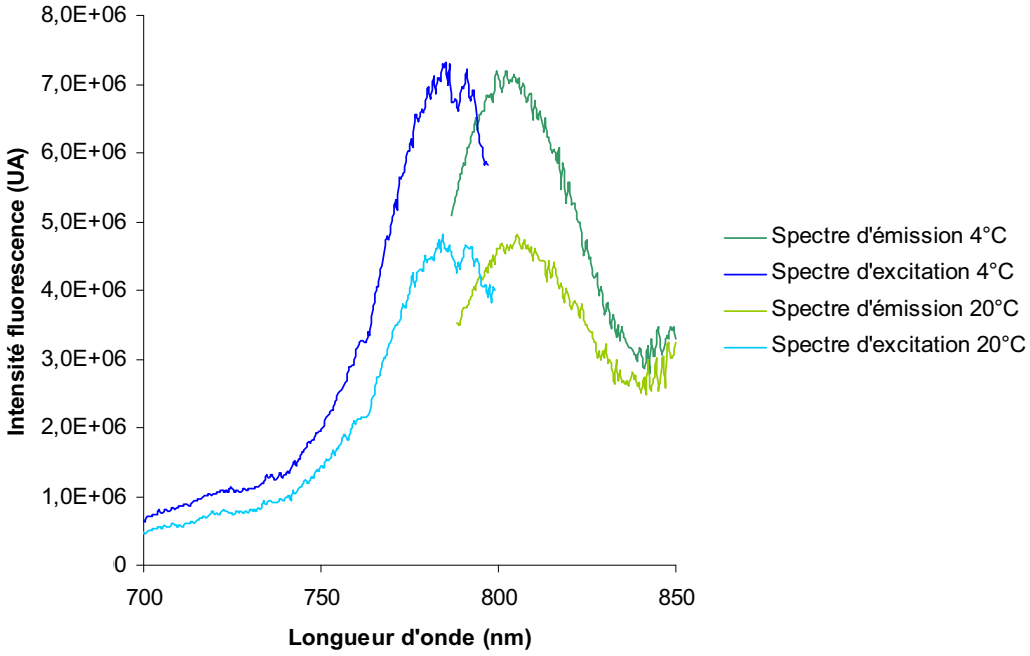


Figure 66 : Spectres d'excitation et d'émission du conjugué $\mathbf{13_{CY7mh}}$.

Aucun changement de l'intensité de fluorescence émise par les conjugués de référence n'a été observé après dix enregistrements consécutifs du spectre de fluorescence d'une même solution (1 nm/s).

VI. 3. Comparaison des propriétés de fluorescence des conjugués

VI. 3. A. Emission de fluorescence

La propriété la plus importante observée pour ces nouvelles sondes oligonucléotide-squaraine est l'intensité du signal fluorescent émis : dans le cas du conjugué $\mathbf{13_{SQFBt}}$, elle est supérieure de respectivement 50 %, 30 fois et 60 fois à celles émises par les conjugués correspondants de la fluorescéine **FI**, de l'heptacyanine **CY7mh** (Figure 66) et du **4TO'6** (Tableau 29).

ODNs 1 µM pH 7	λ_{Abs} (nm)	λ_{Em} (nm)		I_F (UA, ×10^6)		ϕ_F	
		4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
$\mathbf{13_{SQFBt}}$	661	673	673	214,59	165,34	0,38	0,32
$\mathbf{13_{FI}}$	494	515	515	108,72	120,46	-	-
$\mathbf{13_{CY7mh}}$	785	800	806	7,20	4,81	0,012	0,009
$\mathbf{13_{4TO'6}}$	512	527	528	7,55	3,72	-	-

Tableau 29 : Comparaison des propriétés de fluorescence des conjugués de la série ***13****.*

VI. 3. B. Influence du pH sur la fluorescence des conjugués

Les propriétés de fluorescence des conjugués oligonucléotide-squaraine ont été étudiées en fonction du pH et de la température afin d'évaluer leur potentiel d'utilisation en culture cellulaire et *in vivo* (Figure 67 et Tableau 30). Par exemple, lors de l'internalisation des oligonucléotides dans les cellules par endocytose, ils se retrouvent enfermés dans les endosomes, où le pH est d'environ 4,5-5.

Le conjugué **46**$_{SQBt}$ du squaraine non fluoré est sensible au pH. Son intensité de fluorescence diminue lorsque la solution devient acide (à partir d'un pH inférieur à 7), de 30 % entre pH 8 et pH 5 mais ne varie pratiquement pas entre pH 7 et pH 8. Après incubation des solutions aux différents pH pendant 15 heures à 4 °C, les solutions de pH 5 à pH 7 ne sont pratiquement plus fluorescentes (diminution de plus de 80 % de l'intensité de fluorescence) alors que l'intensité de fluorescence de la solution à pH 8 n'a diminué que de 39 %.

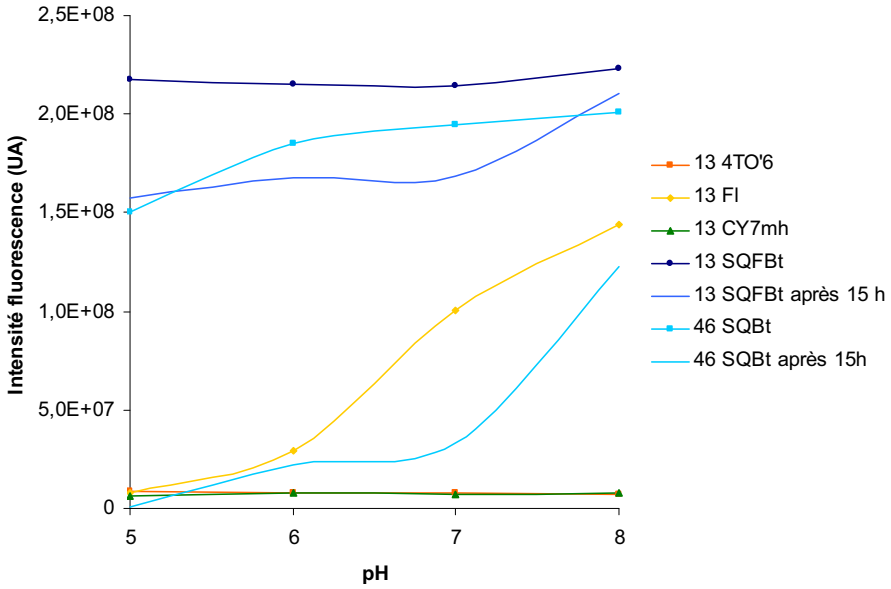


Figure 67 : Courbes des valeurs d'intensité de fluorescence des conjugués en fonction du pH et du temps à 4 °C.

Les mêmes essais ont été effectués avec le conjugué du squaraine fluoré et ceux de nos trois références. Il s'avère que le conjugué du squaraine fluoré est beaucoup plus stable en fonction du pH que son homologue non fluoré. Pratiquement aucune variation de l'intensité de fluorescence n'est observée entre les solutions de pH différents. Après 15 heures à 4 °C, les diminutions d'intensité de fluorescence des solutions sont nettement inférieures à celles observées avec les conjugués du squaraine non fluoré (- 28 % à pH 5, - 6 % à pH 8). La sensibilité au pH du conjugué de l'heptacyanine est pratiquement identique à celle du composé **13**$_{SQFBt}$. Le conjugué du TO' est légèrement plus fluorescent à pH acide et l'intensité de fluorescence émise ne diminue pas au cours du temps (Tableau 30). Conformément aux résultats attendus, la fluorescence du conjugué de la fluorescéine est stable au cours du temps mais son intensité de fluorescence varie beaucoup avec le pH. Elle diminue d'un facteur 20 entre pH 8 et pH 5. La présence des atomes de fluor améliore sensiblement la résistance des conjugués des squaraines en milieu acide.

ODNs 1 µM	Intensité de fluorescence / pH (UA, ×10^6) pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
13$_{SQFBt}$ t = 0	217.75	214.87	214.25	222.99
13$_{SQFBt}$ t = 15 h	157,12 (- 28 %)	167,48 (- 22 %)	168,34 (- 21 %)	210,55 (- 6 %)
46$_{SQBt}$ t = 0	150,16	185,14	194,89	201,27
46$_{SQBt}$ t = 15 h	0,88 (- 99 %)	21,80 (- 88 %)	33,01 (- 83 %)	122,34 (- 39 %)
13$_{CY7mh}$ t = 0	6,65	7,63	7,27	8,08
13$_{CY7mh}$ t = 15 h	4,38 (- 34 %)	6,05 (- 21 %)	6,37 (- 12 %)	7,72 (- 4 %)
13$_{Fl}$	7,53	29,35	100,29	143,84
13$_{4TO'6}$	8,94	7,73	7,63	7,24

Tableau 30 : Valeurs d'intensité de fluorescence des conjugués en fonction du pH et du temps d'incubation des solutions à 4 °C.

VI. 3. C. Influence de la température sur la fluorescence des conjugués

Nous avons testé la stabilité de nos sondes en fonction de la température à 4, 20 et 37 °C pour des solutions à pH 7 qui est proche du pH physiologique (Figure 68 et Tableau 31). La température moyenne des cellules vivantes humaines se situe vers 37 °C. Les essais à 4 °C ont été décrits lors du précédent paragraphe. Il est observé que le conjugué comportant le squaraine fluoré est plus stable que celui comportant le squaraine non fluoré quelque soit la température. La fluorescence de la sonde non fluorée est complètement éteinte après respectivement 4 heures à 20 °C et 1 heure à 37 °C alors que l'intensité de fluorescence de la sonde fluorée a diminué de 30 % après 4 heures à 20 °C et de 25 % après 1 heure à 37 °C (- 75 % après 4 heures).

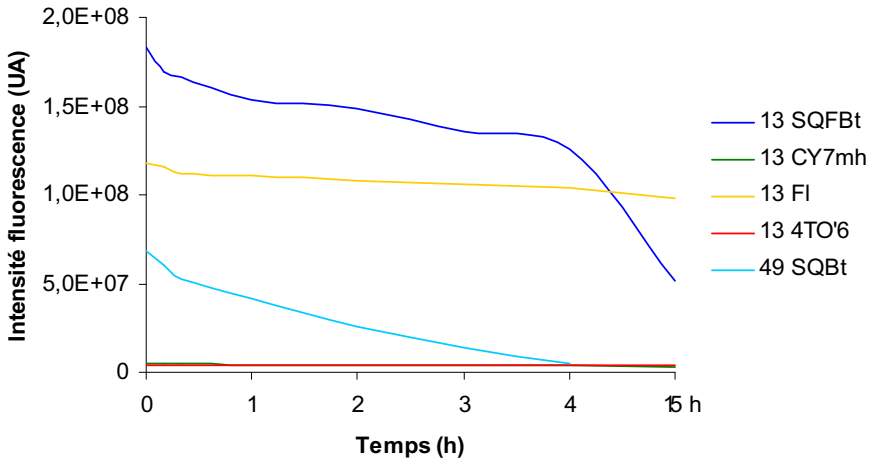


Figure 68 : Courbes des valeurs d'intensité de fluorescence des conjugués (1 µM) à 20 °C en fonction du temps.

ONs 1 µM	Intensité de fluorescence / temps (UA, ×10^6)				
	20 °C			37 °C	
	0	4 h	15 h	0	4 h
13_{SQFBt}	165,34	115,74 (- 30 %)	51,66 (- 71 %)	132,43	33,90 (- 74 %)
49_{SQBt}	68,67	0,48 (- 99 %)	-	48,28	-
13_{Fl}	120,46	106,01 (- 12 %)	99,98 (- 17 %)	126,29	115,24 (- 9 %)
13_{CY7mh}	4,81	3,03 (- 37 %)	2,65 (- 45 %)	4,34	2,53 (- 42 %)
$13_{4TO'6}$	3,67	3,63 (- 1 %)	3,55 (- 3 %)	1,02	0,96 (- 6 %)

Tableau 31 : Valeurs d'intensité de fluorescence des conjugués en fonction de la température (à 20 et 37 °C) et du temps d'incubation des solutions.

La stabilité du conjugué **13_{SQFBt}** est comparable à celle du conjugué **13_{CY7mh}** à 20 °C mais légèrement inférieure à 37 °C. Les conjugués de référence de la fluorescéine et du TO' sont très résistants à une température élevée. Une fois de plus, la présence des atomes de fluor améliore sensiblement les propriétés des sondes oligonucléotide-squaraine.

VI. 4. Etude des propriétés de fluorescence des conjugués après hybridation sur cibles simple et double brin

VI. 4. A. Etudes par dénaturation thermique

Pour les études d'hybridation sur une cible simple brin, les ODNs conjugués de la série **13** sont hybridés à la cible $^{5'}$GGGAAAAGAAAATTT$^{3'}$ à 4 °C dans un tampon « cacodylate » à pH 7 (Figure 69). Pour les études d'hybridation avec une cible double brin, les OFTs conjugués 10-mères de la série **13** sont hybridés avec le duplex cible homopurique / homopyrimidique **2** utilisé lors du chapitre précédent (§ **A. III. 2.**, Figure 69). Les expériences seront réalisées dans un tampon « phosphate » à pH 6 pour faciliter la protonation des cytosines requise pour favoriser la formation de la seconde liaison hydrogène Hoogsteen entre C et G.

$^{5'}$T T T T C T T T T C$^{3'}$
$^{3'}$T T T A A A A G A A A A G G G$^{5'}$

$^{5'}$T T T T C T T T T C$^{3'}$
$^{5'}$G C C A C T T T T T A A A A G A A A A G G G G$^{3'}$
$^{3'}$C G G T G A AAA A T T T T C T T T T C C C C$^{5'}$

*Figure 69 : Hybridation en double et triple hélice de l'OFT **1**.*

L'ODN non modifié correspondant **1** est utilisé comme référence. Le mélange des OFTs marqués de la série **13** avec la cible simple brin et la cible double brin d'ADN **2** à 4 °C n'induit pas de modification des spectres d'absorption. La stabilisation du duplex dépend de la structure des marqueurs. Une comparaison des gains de stabilisation apportées par les différents fluorophores fixés par un même bras de liaison hexaméthylène indique que les squaraines stabilisent légèrement les doubles hélices et que la présence des atomes de fluor n'influe pas sur la stabilité (ΔTm $\mathbf{13_{SQBt}}$ = + 6,5 °C, ΔTm $\mathbf{13_{SQFBt}}$ = + 8 °C). L'heptacyanine et la fluorescéine stabilisent peu les doubles hélices (ΔTm $\mathbf{13_{CY7mh}}$ = + 4 °C, ΔTm $\mathbf{13_{Fl}}$ = + 4,5 °C).

Des résultats similaires sont observés lors des études de stabilité en triple hélice. Deux transitions sont observées durant la fusion de chaque triplex. La transition avec les valeurs de Tm élevées correspond à la fusion du duplex (environ 62 °C pour chaque) et la transition avec les valeurs de Tm faibles à la fusion du triplex. Les valeurs de Tm (Tableau 32) indiquent que les triples hélices formées entre les conjugués de la série **13** et le duplex cible **2** sont plus stables que le triplex non modifié de référence.

ODNs	Tm duplex		Tm triplex	
	Tm /°C (± 0.5 °C)	Δ Tm /°C (± 1 °C)	Tm /°C (± 0.5 °C)	Δ Tm /°C (± 1 °C)
13	22,5	-	13,0	-
$\mathbf{13_{SQFBt}}$	30,5	+ 8	20,0	+ 7
$\mathbf{13_{SQBt}}$	29,0	+ 6,5	19,0	+ 6,5
$\mathbf{13_{Fl}}$	27,0	+ 4,5	16,5	+ 3,5
$\mathbf{13_{CY7mh}}$	26,5	+ 4	14,5	+1,5
$\mathbf{13_{4TO'6}}$	29	+ 6,5	32,5	+19,5

Tableau 32 : Valeurs de Tm des complexes d'acides nucléiques formés avec les sondes.

La présence des atomes de fluor n'a pas d'influence sur la stabilité (ΔTm $\mathbf{13_{SQBt}}$ = + 6,5 °C, ΔTm $\mathbf{13_{SQFBt}}$ = + 7 °C), et l'heptacyanine et la fluorescéine stabilisent peu les triples hélices (ΔTm $\mathbf{13_{CY7mh}}$ = + 1,5 °C, ΔTm $\mathbf{13_{Fl}}$ = + 3,5 °C).

VI. 4. B. Etudes par fluorescence des conjugués hybridés

Les expériences de fluorescence en présence de cibles simple et double brin sont effectuées dans les mêmes conditions de tampon et de concentration que les études de dénaturation thermique.

Les spectres d'émission de fluorescence des conjugués libres $\mathbf{13_{SQBt}}$, $\mathbf{13_{SQFBt}}$, $\mathbf{13_{CY7mh}}$ et $\mathbf{13_{Fl}}$ ont été comparés avec ceux des duplex et des triplex correspondants. Les λ_{exc} et λ_{em} dépendent de la nature du fluorophore. Cependant, ils ne varient pratiquement pas en fonction de la température et sont identiques que les sondes soient libres ou hybridées (Données non fournies).

ODNs 1 µM pH 7	Intensité de fluorescence (UA, ×10^6)				I_F hyb / I_F libre	
	Conjugué libre		Conjugué hybridé			
	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
13_{SQFBt}	214,59	165,34	191,63	150,18	0,89	0,91
13_{SQBt}	162,64	111,48	149,01	79,79	0,92	0,72
13_{Fl}	108,72	120,46	36,31	56,70	0,33	0,47
13_{CY7mh}	7,20	4,81	6,74	6,13	0,94	1,27
$13_{4TO'6}$	7,55	3,59	4,53	4,56	0,60	1,27

Tableau 33 : Fluorescence des conjugués libres et après hybridation avec la cible simple brin.

Après hybridation des sondes **13_{SQBt}** et **13_{SQFBt}** avec leur cibles simple et double brin, la fluorescence diminue dans chaque cas d'environ 10 % en duplex et de 30 à 50 % en triplex (Tableaux 33 et 34). Il en est de même pour les sondes références. Seules les intensités de fluorescence des sondes **13_{CY7mh}** et **$13_{4TO'6}$** augmentent après hybridation sur la cible simple brin de 30 % à 20 °C.

ODNs 1 µM pH 6	Intensité de fluorescence (UA, ×10^6)				I_F hyb / I_F libre	
	Conjugué libre		Conjugué hybridé			
	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
13_{SQFBt}	208,34	162,60	131,53	94,32	0,63	0,58
13_{SQBt}	121,98	83,61	90,96	76,77	0,75	0,92
13_{Fl}	30,83	34,99	25,68	29,40	0,83	0,84
13_{CY7mh}	7,14	4,94	3,89	3,36	0,54	0,68
$13_{4TO'6}$	7,70	3,72	56,92	55,64	7,39	14,96

Tableau 34 : Fluorescence des conjugués libres et après hybridation avec la cible double brin.

VII. Conclusion

Les sondes oligonucléotide-squaraine possèdent des propriétés de fluorescence très intéressantes. Elles émettent un signal fluorescent très intense dans le proche IR, quelque soit le pH et la température.

Le facteur limitant leur utilisation serait leur faible stabilité au pH et à la température mais l'introduction de deux atomes de fluor sur le marqueur squaraine a considérablement augmenté la stabilité des conjugués. Il serait intéressant d'introduire plus de deux atomes de fluor sur les squaraines afin de confirmer l'influence des atomes de fluor sur la photo- et thermostabilité de ces composés et d'améliorer encore leurs propriétés pour étendre leur utilisation, notamment *in vivo*.

Il est possible d'envisager d'introduire également sur ces squaraines des fonctions hydrophiles (ex : fonctions sulfonate[335]) qui amélioreraient la solubilité des squaraines dans les tampons aqueux et leur couplage aux oligonucléotides et d'étudier leur potentiel pour le marquage des oligonucléotides ou en interaction non covalente avec des simples ou doubles brins d'acides nucléiques.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les techniques et les applications du génie génétique, toujours plus nombreuses, nécessitent des outils de détection et d'analyse toujours plus sensibles et spécifiques afin de détecter et d'analyser l'information génétique sous toutes ses formes que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Les sondes oligonucléotidiques fluorescentes, utilisées dans de nombreux domaines tels que la biologie moléculaire, le diagnostic médical, les bio- et nanotechnologies, doivent être améliorées notamment afin d'émettre un signal modifié après hybridation avec leurs cibles pour faciliter la détection. Leur utilisation *in vivo* nécessite une détection dans le proche infrarouge afin d'éviter l'autofluorescence des cellules.

La première partie de ce travail a été consacrée à la mise au point de nouvelles sondes oligonucléotidiques capables de détecter spécifiquement des séquences d'ADN double brin. Nous avons préparé des sondes constituées d'oligonucléotides en série pyrimidique, capables de former des triples hélices, conjuguées à des marqueurs fluorescents de la famille des cyanines monométhines (une thiocyanine, quatre isomères du thiazole orange et trois quinocyanines) possédant des propriétés d'intercalation. Les marqueurs ont d'abord été liés en position 5' d'une séquence décamère. Les marqueurs étant peu stables dans les conditions basiques requises pour les étapes de déprotection des oligonucléotides, leur liaison à l'oligonucléotide a été réalisée après déprotection de ce dernier par réaction spécifique entre une fonction thiophosphate incorporée en position 5' de l'oligonucléotide et une fonction iodooctyle incorporée sur les marqueurs. Les propriétés de ces conjugués hybridés avec leur cible double brin ont été étudiées par spectroscopies d'absorption et de fluorescence. Dans tous les cas la présence du marqueur stabilise les triples hélices et l'hybridation s'accompagne d'une augmentation importante de l'intensité du signal fluorescent. La stabilisation et le gain de fluorescence observés dépendent de la structure de la cyanine et des paramètres de sa liaison à l'oligonucléotide (longueur du bras de liaison et position de fixation sur la cyanine, des bras de liaison plus courts ont également été utilisés). Les cyanines donnant les meilleurs résultats lorsqu'elles sont liées en position 5' de l'oligonucléotide ont également été fixées en position 3' par l'intermédiaire de bras de liaison de longueur variable. Des oligonucléotides porteurs d'une fonction thiophosphate ou thiol (introduite par l'intermédiaire d'un nouveau support) en position 3' ont été synthétisés afin de permettre le couplage des marqueurs. L'incorporation de deux marqueurs identiques a également été réalisée en position 5' et 3' par des bras de liaison identiques ou différents en utilisant des oligonucléotides porteurs d'une fonction thiophosphate en position 5' et soit d'une fonction thiophosphate ou d'une fonction thiol en position 3'. Les résultats des études d'hybridation ont montré que la liaison des marqueurs en position 3' et le bis-marquage induisent des augmentations de fluorescence plus faibles que celles observées avec les conjugués porteurs des marqueurs en position 5'.

Les résultats obtenus avec les trois séries de conjugués ont montré que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les marqueurs sont liés en position 5'. Bien que le gain de fluorescence le plus

important soit obtenu avec un conjugué comportant une quinocyanine (37 fois), les sondes liées au thiazole orange (TO'), attaché par le noyau benzothiazole *via* un bras de liaison à huit méthylènes, présentent le meilleur compromis en termes de stabilisation (Δ Tm = + 24 °C), d'intensité de fluorescence et d'augmentation de l'intensité de fluorescence lors de l'hybridation (24 fois). En présence d'une cible simple brin, la variation de fluorescence observée reste faible (+ 30%). Les propriétés stabilisantes de ces nouvelles sondes ont été exploitées pour augmenter la variation de l'intensité du signal fluorescent émis lors de l'hybridation en utilisant une stratégie de transfert de brins. La sonde marquée par le TO' a été hybridée avec une séquence complémentaire plus courte liée par son extrémité 3' à une molécule inhibitrice de fluorescence, le dabcyl. Le duplex ainsi formé est moins fluorescent que la sonde libre. En présence de la cible double brin, une augmentation très importante de l'intensité du signal fluorescent est observée (47 fois).

Le TO' a ensuite été utilisé pour marquer des séquences 17-mères. L'hybridation avec le duplex cible se traduit également par une augmentation importante de l'intensité du signal fluorescent (13 fois). L'influence de mésappariements à l'extrémité ou en position interne des triples hélices a également été étudiée. Les résultats obtenus ont confirmé que la formation des triplex s'effectue sans perte de spécificité. La présence des mésappariements sur le duplex cible au niveau de la jonction duplex-triplex induit une augmentation moins importante du signal fluorescent.

Ces résultats montrent que des modifications chimiques sont indispensables pour optimiser les stratégies et les paramètres de liaison nécessaires à l'obtention de sondes performantes. Ces nouvelles sondes sont des outils intéressants pour la détection spécifique de séquences d'ADN en double brin et l'étude de la cinétique de formation des triples hélices *in vitro* par fluorescence. L'effet stabilisateur du TO' pourrait également être utilisé en stratégie anti-gène.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à la synthèse et à l'étude des propriétés d'oligonucléotides marqués par des fluorophores de la famille des squaraines avec pour objectif d'obtenir de nouvelles sondes oligonucléotidiques détectables dans le proche infrarouge. Des marqueurs fluorescents de type squaraine avaient été précedemment décrits et utilisés pour le marquage de biomolécules mais à notre connaissance jamais utilisés pour marquer des oligonucléotides. Quatre squaraines ont été synthétisés, trois comportant des motifs benzothiazole et un des motifs quinaldine. Le premier squaraine de la série benzothiazole ne porte aucune substitution ni sur les noyaux benzothiazole ni sur le noyau squarique. Le deuxième comporte un atome de fluor en position 5 des cycles benzéniques des noyaux benzothiazole, alors que le troisième comporte des motifs benzothiazole et un motif dicyanosquarique. Le squaraine basé sur le motif quinaldine est également substitué par des atomes de fluor en position 6 des cycles benzéniques. A ces squaraines ont été attachés des chaînes iodohexyle afin de permettre leur couplage aux oligonucléotides par réaction avec un groupement thiophosphate selon la stratégie déjà employée pour le marquage par les cyanines monométhines. Cinq séquences oligonucléotidiques, deux décamères, deux tétradécamères et un eicosamère en série 2'-OMe ont été choisies pour effectuer le marquage. Malgré les différentes conditions opératoires mises en œuvre pour le marquage des oligonucléotides,

seulement deux séries de conjugués ont été obtenues comportant d'une part, les squaraines à motifs benzothiazole non substitués et substitués par les atomes de fluor, d'autre part.

Les études spectroscopiques réalisées avec les deux séries de conjugués obtenus ont montré qu'ils émettent un signal fluorescent détectable au-delà de 650 nm et possèdent des rendements quantiques de fluorescence élevés quelque soit la séquence oligonucléotidique, le pH et la température. Leur stabilité en milieu acide et à température physiologique est fortement augmentée après incorporation d'atomes de fluor sur les squaraines. Il serait intéressant d'incorporer plus de deux atomes de fluor sur les squaraines afin de leur conférer une plus grande stabilité compatible avec une utilisation *in vivo.* Il serait également possible de modifier la structure de ces squaraines pour qu'ils émettent à plus grande longueur d'onde (ex : incorporation du groupement malonodinitrile). Leur solubilité en milieu aqueux et leur capacité à coupler aux oligonucléotides pourraient être améliorées en leur incorporant des fonctions hydrophiles.

CHAPITRE EXPERIMENTAL

A. Matériels et méthodes

A. 1. Solvants

Le tableau suivant indique les solvants et réactifs utilisés qui ont nécessité des conditions propres de purification et de conservation.

DMF	Distillé sur ninhydrine
Tétrachlorure de carbone	Distillé sur P_2O_5, conservé sur tamis moléculaire 4 Å
TEA	Distillé sur KOH
Chloroforme	Distillé sur P_2O_5, conservé sur tamis moléculaire 4 Å

Tous les solvants utilisés ne contiennent pas plus de 10 ppm d'eau.

A. 2. Chromatographie sur plaque

Les Chromatographies sur couche mince (CCM) sont réalisées sur plaques d'aluminium recouvertes de silice, Merck Silicagel 60 F_{254} 5554. Les plaques sont soumises à l'élution dans des cuves closes. Les spots sont lus sous lampe UV, Vilber-Lourmat, CN-6, à 254 nm ou 365 nm. Selon la nature des produits, les spots sont révélés par chauffage précédé d'une pulvérisation d'une solution à 10 % d'acide perchlorique dans l'eau pour la révélation des nucléosides et des oligonucléotides modifiés et non modifiés et des composés tritylés, une solution de ninhydrine à 1 % dans le butan-1-ol pour la révélation des amines, une solution de 2,6-dichloroquinone-4-chloroimide dans l'éthanol pour la révélation des composés soufrés (colorations différentes pour les fonctions thiophosphate, thiol et disulfure). L'éluant utilisé pour l'analyse des séquences oligonucléotidiques est un mélange isopropanol/ammoniaque/eau (les proportions varient suivant la longueur et la séquence de l'oligonucléotide). Les cuves sont saturées d'éluant 24 heures avant l'analyse. Les plaques CCM sont préalablement éluées dans un mélange DCM/méthanol 9/1 pour faire migrer des impuretés moins retenues.

A. 3. Caractérisation des produits

A. 3. 1. Quantification des oligonucléotides

Les quantités d'oligonucléotides sont données en unités de DO (densité optique) mesurées à la longueur d'onde de 260 nm. Une unité de DO est la quantité d'oligonucléotide qui donne une absorbance de 1 quand elle est dissoute dans 1 mL de tampon et mesurée dans une cuve de trajet optique 1 cm. Cette unité découle de la loi de Beer-Lambert : $A = \varepsilon .l.C$ où A est l'absorbance (DO), l le trajet optique de la cuve (cm), C la concentration de la solution analysée ($mol.L^{-1}$) et ε le coefficient d'extinction molaire du composé en solution à une longueur d'onde précise ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$).

Les coefficients d'extinction molaire ε_{260} ou ε_{vis} des conjugués sont déterminés par titration (§ **B. 5. 1.**) dans le cas d'oligonucléotides conjugués, ou par application de la méthode dite « des proches voisins »[275] dans le cas de séquences non modifiées. Les coefficients d'extinction molaire ε_{vis} des fluorophores sont déterminés à partir de la valeur d'absorbance de solutions de concentrations connues.

A. 3. 2. Spectrométrie par RMN et masse

Les spectres RMN ^{1}H, ^{13}C, ^{31}P sont enregistrés sur un spectromètre Varian Unity 500 (500 MHz) aux fréquences respectives de 500,13; 125,76; 202,46 MHz avec lock deutérium interne. Les échantillons destinés aux études RMN sont mis en solution dans des solvants deutérés (précisé au niveau des données RMN de chaque produit) en utilisant respectivement comme référence interne le tétraméthylsilane (TMS) pour les spectres ^{1}H et ^{13}C et l'acide phosphorique 85 % externe pour les spectres ^{31}P. Les constantes de couplages (^{n}J) sont exprimées en Hertz (Hz), les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm. Lorsque les spectres sont du premier ordre ou peuvent être analysés comme s'ils l'étaient, les signaux sont désignés par les lettres: s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (doublet dédoublé). Dans le cas contraire, la lettre m (multiplet) est indiquée.

Les spectres de masse sont obtenus par Electrospray (ESI/ MS/ MS) sur un appareil VG Quattro II (Microsmas) ou par MALDI sur un appareil Autoflex de chez Bruker (Maldi-TOF). Les échantillons d'oligonucléotides (0,1 DO environ) sont fournis lyophilisés.

A. 3. 3. Spectroscopies d'absorption et de fluorescence

Les spectres d'absorption sont enregistrés sur un spectrophotomètre Kontron Uvikon 860 à double faisceau dans des cuves de 1 mL avec un trajet optique de 1 cm (Hellma). Les mesures à basse température sont réalisées en soumettant la cuve à un courant d'azote afin de réduire les phénomènes de condensation sur les parois. Les cuves sont thermostatées à l'aide d'un cryostat Bioblock.

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence sont enregistrés sur un spectrofluorimètre Fluoromax 2 (ISA-Jobin-Yvon) dans des cuves de 600 µL en quartz Suprasil, de trajet optique de 5 mm (Hellma) avec une largeur de fente de 2 nm et une mesure tous les 0,5 nm. Les mesures sont réalisées avec des solutions d'oligonucléotides 1 µM dans un tampon choisi en fonction de l'étude. Les spectres sont corrigés suivant les différents rendements de la lampe aux longueurs d'ondes utilisées pour l'étude. Sauf mentions contraires, les spectres d'émission sont enregistrés après excitation au λ_{max} du spectre d'absorption, tandis que les spectres d'excitation sont enregistrés au λ_{max} du spectre d'émission. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la densité optique (DO) pour des absorbances inférieures à 0,1.

A. 4. Systèmes chromatographiques de purification

Avant toute purification, les échantillons sont filtrés à l'aide de filtres adaptables sur seringue, GHP Acrodisc© 13 mm, membrane GHP 0,2 µm. Les analyses et purifications d'oligonucléotides sont généralement effectuées sur un appareil CLHP 600 E Waters équipé d'un détecteur à barrette de diodes Waters 996. les analyses et purifications sont réalisées par chromatographie en phase inverse sur une colonne Lichrospher© 100 RP-18 (5 µm, 125 mm × 4 mm) Merck. Un gradient linéaire d'acétonitrile (5 à 50 % sur 60 min) dans un tampon AA 0,1 M, pH 7 est utilisé à un débit de 1 mL/min. L'élution est suivie à 260 nm et au maximum d'absorption du marqueur fluorescent le cas échéant. Après élimination de l'acétonitrile, les solutions d'oligonucléotides sont lyophilisés 3 fois avant couplage ou analyse par spectrométrie de masse.

Les analyses et purifications des oligonucléotides riches en purines ainsi que les séquences modifiées en 3' sont effectuées par chromatographie d'échange d'ions à l'aide d'un appareil Pharmacia en utilisant une colonne Mono Q (8 µm, 10 × 100 mm, Pharmacia) et en employant un gradient linéaire de NaCl 1,5 M (0,5 %/min) dans un tampon TRIS 25 mM, pH 8 contenant 10 % de méthanol (0,5 %/min). L'élution est suivie à 260 nm. Le dessalage des solutions d'oligonucléotides récupérées après purification par échange d'ions est réalisé à l'eau en phase inverse sur une colonne Lichroprep© RP-18, 40-63 µm (10 × 100 mm). Les oligonucléotides sont élués avec un gradient de méthanol dans l'eau et un débit de 4 mL/min.

Les purifications sur colonne d'exclusion stérique sont réalisées sur des colonnes G-10 ou G-25 Sephadex™ en utilisant de l'eau distillée comme éluant.

Les purifications chromatographiques sur colonne de silice sont réalisées en utilisant le gel de silice 60 Merck 9385 de granulométrie : 40-63 µm.

Pour certains composés, une étape de purification supplémentaire est réalisée sur des plaques de silice préparatives, (Macherey-Nagel SIL 6-200 UV_{254}) ou Merck 5717, 2 mm d'épaisseur, format 20 × 20 cm.

A. 5 Stockage des produits

Les produits solides sont séchés sous vide dans un dessicateur contenant de l'anhydride phosphorique (P_2O_5) ou de la potasse (KOH) à l'abri de la lumière puis stockés au congélateur. Les oligonucléotides sont conservés lyophilisés.

A. 6. Synthétiseur d'oligonucléotides

L'assemblage des séquences oligonucléotidiques est réalisé sur un synthétiseur Expedite 8909 de Perspective Biosystems à l'échelle de 1 µM en utilisant les phosphoramidites et supports commerciaux ainsi que les réactifs et supports décrits précédemment (Chapitre résultats).

A. 7. Oligonucléotides commerciaux

Les oligonucléotides du duplex **2** et des triplex mésappariés (Chapitre résultats, § **A. X. 2.**) proviennent de chez Eurogentec.

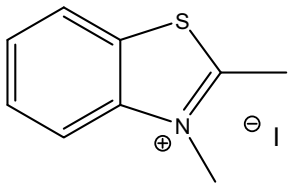
B. Protocoles expérimentaux

B. 1 Synthèse de nouveaux marqueurs fluorescents détectables dans le proche infrarouge **30** - **33**

B. 1. 1. Synthèse du squaraine **SQBt** comportant des motifs benzothiazole **30**

Iodure de *N* ,2-diméthyl-1,3-benzothiazolium **35**

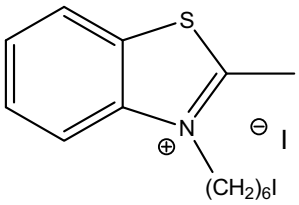
Dans un tube scellé, sont placés 1 éq. de 2-méthylbenzothiazole (2,98 g, 2,54 mL, 20 mmol) et 7 éq. de iodure de méthyle (19,88 g, 8,72 mL, 140 mmol). Le mélange est chauffé à 90 °C pendant 4 heures. Le résidu obtenu est lavé au diéthyléther sec puis récupéré sur fritté et séché au dessicateur. 3,725 g de solide blanchâtre sont obtenus avec un rendement de 64 %.



$C_9H_{10}INS$
M : 291,16 g/mol
CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0
SM (MALDI): m/z= 164,04.

Iodure de *N*-(6-iodohexyl)-2-méthyl-1,3-benzothiazolium **38**

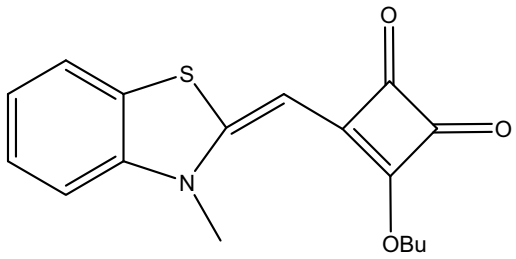
Dans un tube scellé, sont placés 1 éq. de 2-méthylbenzothiazole (1,42 g, 1,2 mL, 9,46 mmol) et 5 éq. de diiodohexane (16 g, 7,8 mL, 47,34 mmol). Le mélange est chauffé à 130 °C pendant 3 heures. Le produit de la réaction est purifié sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 3 % puis séché au dessicateur. 2 g d'un solide grisâtre sont obtenus avec un rendement de 45 %.



$C_{14}H_{19}I_2NS$
M : 487,19 g/mol
CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0,1
SM (MALDI): m/z= 360,03.

3-Butoxy-4-(*N*-méthyl-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-2-ylidèneméthyl)-3-cyclobutène-1,2-dione (**SQBt** monosquarate **43**)

L'iodure de *N*,2-diméthyl-1,3-benzothiazolium **35** (1 g, 1 eq., 3,43 mmol) est ajouté à une solution de 1,55 g de dibutylsquarate **40** (2 éq., 1,48 mL, 6,86 mmol) dans 15 mL d'éthanol contenant 0,8 mL de TEA (1,7 éq., 5,8 mmol). Le mélange réactionnel est agité à 65 °C pendant 1 heure et demie puis le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 2 %, puis séché au dessicateur. 440 mg d'une poudre orange sont obtenus avec un rendement de 40 %.



$C_{17}H_{17}NO_3S$

M : 315,39 g/mol

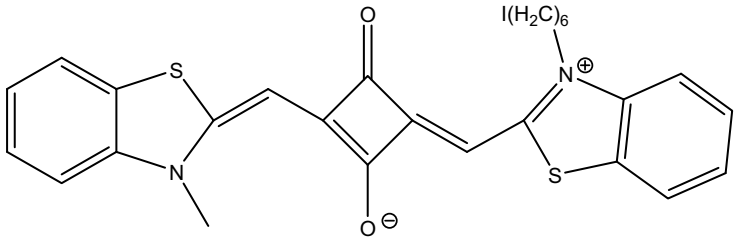
CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0,55

SM (MALDI+): m/z= 316,12.

RMN ^1H (500 MHz, DMSO) δ ppm : 7,80 (d, 1H, $^3J_{H-H}$ = 8,2 Hz, H_{Ar}), 7,48 (d, 1H, $^3J_{H-H}$ = 8,2 Hz, H_{Ar}), 7,40 (t, 1H, $^3J_{H-H}$ = 7,8 Hz, H_{Ar}), 7,21 (t, 1H, $^3J_{H-H}$ = 7,8 Hz, H_{Ar}), 5,51 (s, 1H, =CH-), 4,71 (m, 2H, -OCH_2-), 3,62 (s, 3H, N-CH_3), 1,78 (m, 2H, -CH_2-), 1,43 (m, 2H, -CH_2-), 0,94 (t, 3H, $^3J_{H-H}$ = 7,4 Hz, -CH_3).

4-[*N*-(6-iodohexyl)-1,3-benzothiazoliumyl-2-méthylène]-2-(*N*-méthyl-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-2-ylidèneméthyl)-3-oxo-1-cyclobutène-1-olate (**SQBt 30**)

Le **SQBt** monosquarate **43** (380 mg, 1 éq., 1,20 mmol) est ajouté à une solution de 587 mg de iodure de *N*-(6-iodohexyl)-2-méthyl-1,3-benzothiazolium **38** (1 éq., 1.20 mmol) dans un mélange de 15 mL de butanol/toluène 1:1. Le mélange réactionnel est agité à 120 °C pendant 10 heures puis le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 5 %. Une purification supplémentaire est effectuée après dépôt du résidu sur une plaque de silice préparative éluée plusieurs fois avec un éluant DCM/MeOH 94/6. On obtient 43 mg d'un solide bleu nuit avec un rendement de 12 %.



$C_{27}H_{25}IN_2O_2S_2$

M : 600,55 g/mol

CCM: Rf (DCM/MeOH 8/2) = 0,45

SM (MALDI): m/z= 600,00.

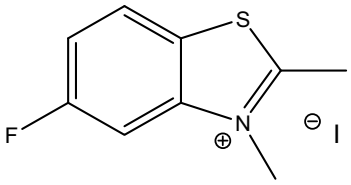
RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 7,61 (t, 2H, $^3J_{H-H}$ = 7,8 Hz, H_{Ar}), 7,47 (m, 2H, H_{Ar}), 7,32 (m, 4H, H_{Ar}), 6,39 (s, 2H, =CH-), 4,18 (m, 2H, -$^+NCH_2$-), 3,75 (s, 3H, N-CH_3), 3,24 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,9 Hz, 2H, -CH_2I), 1,88 (m, 4H, 2 -CH_2-), 1,56 (m, 4H, 2 -CH_2-).

RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 6,8; 26,1; 27,4; 30,4; 33,0; 33,4; 46,2; 85,6; 111,4; 111,5; 122,3; 122,4; 124,1; 124,2; 127,2; 127,3; 128,7; 128,9; 141,2; 141,7; 159,9; 160,1.

B. 1. 2. Synthèse du squaraine **SQFBt** comportant des motifs 5-fluorobenzothiazole **31**

Iodure de 5-fluoro-*N*,2-diméthyl-1,3-benzothiazolium **36**

Dans un tube scellé sont placés 1 éq. de 5-fluoro-2-méthylbenzothiazole (879,2 mg, 0,7 mL, 5,26 mmol) et 7 éq. d'iodure de méthyle (5,47 g, 2,4 mL, 38 mmol). Le mélange est chauffé à 110 °C pendant 3 heures. Le résidu obtenu est lavé au diéthyléther sec, récupéré sur fritté puis séché au dessicateur. 1,35 g de solide blanchâtre sont obtenus avec un rendement de 83 %.



C_9H_9FINS

M : 309,14 g/mol

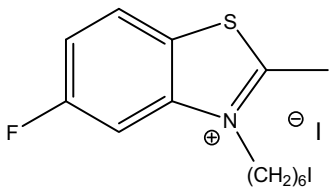
CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0

SM (ES+): m/z= 182,24.

RMN ^1H (500 MHz, DMSO) δ ppm : 8,50 (dd, 1H, $^3J_{H-H}$ = 9 Hz, $^4J_{H-F}$ = 5,1 Hz, H_{Ar}), 8,34 (dd, 1H, $^3J_{H-F}$ = 9,6 Hz, $^4J_{H-H}$ = 2,4 Hz, H_{Ar}), 7,74 (td, 1H, $^3J_{H-H}$ = 9 Hz, $^4J_{H-H}$ = 2,4 Hz, H_{Ar}), 4,17 (s, 3H, $^+$N-CH_3), 3,18 (s, 3H, -CH_3).

Iodure de 5-fluoro-*N*-(6-iodohexyl)-2-méthyl-1,3-benzothiazolium **39**

Dans un tube scellé, sont placés 1 éq. de 5-fluoro-2-méthylbenzothiazole (790 mg, 0,63 mL, 4,73 mmol) et 5 éq. de diiodohexane (8g, 3,9 mL, 23,67 mmol). Le mélange est chauffé à 130 °C pendant 5 heures. Le produit de la réaction est purifié sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 5 %. 1,68 g d'un solide grisâtre sont obtenus avec un rendement de 45 %.



$C_{14}H_{18}FI_2NS$

M : 505,17 g/mol

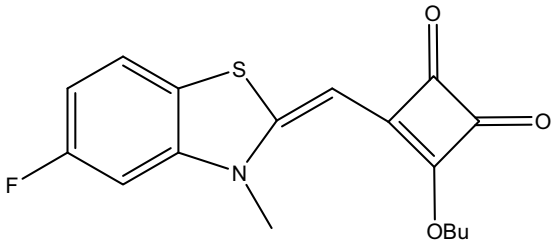
CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0,1

SM (ES+): m/z= 378,35.

RMN ^1H (500 MHz, DMSO) δ ppm : 8,49 (dd, 1H, $^3J_{H-H}$ = 9 Hz, $^4J_{H-F}$ = 5,2 Hz, H_{Ar}), 8,41 (dd, 1H, $^3J_{H-F}$= 9,5 Hz, $^4J_{H-H}$ = 2,3 Hz, H_{Ar}), 7,75 (td, 1H, $^3J_{H-H}$ = 9 Hz, $^4J_{H-H}$ = 2,3 Hz, H_{Ar}), 4,65 (t, 2H, $^3J_{H-H}$ = 7,9 Hz, =$^+$NH-), 3,29 (m, 2H, $^3J_{H-H}$ = 6,9 Hz, -CH_2I), 3,22 (s, 3H, -CH_3), 1,83 (m, 4H, 2 -CH_2-), 1,44 (m, 4H, 2 -CH_2-).

3-Butoxy-4-(5-fluoro-*N*-méthyl-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-2-ylidèneméthyl)-3-cyclobutène-1,2-dione (**SQFBt** monosquarate **42**)

L'iodure de 5-fluoro-*N*,2-diméthyl-1,3-benzothiazolium **36** (1 g, 1 eq., 3,23 mmol) est ajouté à une solution de 1,46 g de dibutylsquarate **40** (2 éq., 1,4 mL, 6,46 mmol) dans 15 mL d'éthanol contenant 0,7 mL de TEA (1,6 éq., 5,23 mmol). Le mélange réactionnel est agité à 65 °C pendant 1 heure puis le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 2 % puis séché au dessicateur. 885 mg d'une poudre orange sont obtenus avec un rendement de 80 %.



$C_{17}H_{16}FNO_3S$

M : 333,38 g/mol

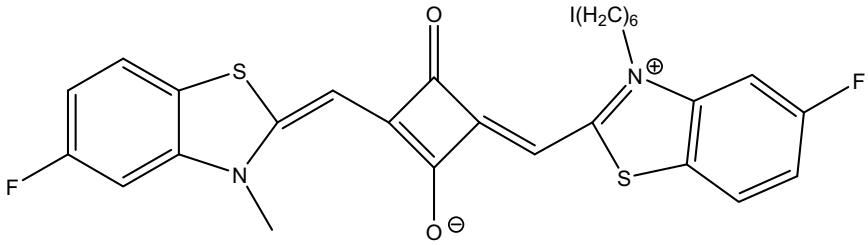
CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0,55

SM (MALDI+): m/z= 334,10.

RMN ^1H (500 MHz, DMSO) δ ppm : 7,80 (dd, 1H, $^3J_{H-H}$ = 8,6 Hz, $^4J_{H-F}$ = 3,3 Hz, H_{Ar}), 7,47 (dd, 1H, $^3J_{H-F}$ = 10,3 Hz, $^4J_{H-H}$ = 2,3 Hz, H_{Ar}), 7,05 (td, 1H, $^3J_{H-H}$ = 9 Hz, $^4J_{H-H}$ = 2,3 Hz, H_{Ar}), 5,52 (s, 1H, =CH-), 4,73 (t, 2H, -OCH_2-), 3,59 (s, 3H, N-CH_3), 1,78 (m, 2H, -CH_2-), 1,43 (m, 2H, -CH_2-), 0,94 (t, 3H, $^3J_{H-H}$ = 7,4 Hz, -CH_3).

4-[5-Fluoro-*N*-(6-iodohexyl)-1,3-benzothiazoliumyl-2-méthylène]-2-(5-fluoro-*N*-méthyl-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-2-ylidèneméthyl)-3-oxo-1-cyclobutène-1-olate (**SQFBt 31**)

Le **SQFBt** monosquarate **42** (1 éq., 1,32 mmol) est ajouté à une solution de 668 mg d'iodure de 5-fluoro-*N*-(6-iodohexyl)-2-méthyl-1,3-benzothiazolium **39** (1 éq., 1.32 mmol) dans un mélange de 15 mL de butanol/ toluène 1:1. Le mélange réactionnel est agité à 120°C pendant 10 heures puis le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 3 %. Une purification supplémentaire est effectuée après dépôt du résidu sur une plaque de silice préparative éluée plusieurs fois avec un éluant DCM/MeOH 94/6. On obtient 91 mg d'un solide bleu nuit avec un rendement de 23 %.



$C_{27}H_{23}F_2IN_2O_2S_2$

M : 636,52 g/mol

CCM: Rf (DCM/MeOH 8/2) = 0,45

SM (ES+): m/z= 637,27.

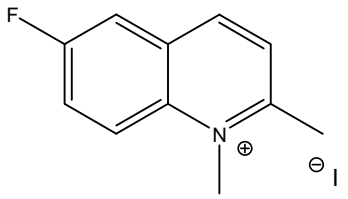
RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 7,47 (m, 2H, H_{Ar}), 6,96 (m, 2H, H_{Ar}), 6,89 (m, 2H, H_{Ar}), 5,91 (s, 2H, =CH-), 4,06 (t, 2H, $^3J_{H-H}$ = 7,8 Hz, -$^+$NCH$_2$-), 3,64 (s, 3H, N-CH$_3$), 3,23 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,9 Hz, 2H, -CH$_2$I), 1,86 (m, 4H, 2 -CH$_2$-), 1,52 (m, 4H, 2 -CH$_2$-).

RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 6,7; 26,1; 27,3; 30,4; 33,2; 33,3; 46,6; 86,5 (d, ^{3}J= 14,7 Hz); 99,4 (d, $^2J_{C-F}$ = 28,1 Hz); 99,6 ($^2J_{C-F}$ = 28,1 Hz); 111,7 (t, $^2J_{C-F}$ = 23,1 Hz); 123,2 (t, $^3J_{C-F}$ = 10,5 Hz); 161,0; 162,7 (d, $^1J_{C-F}$ = 245,7 Hz).

B. 1. 3. Synthèse du squaraine **SQFQ** comportant des motifs 6-fluoroquinoline **32**

Iodure de *N* ,2-diméthyl-6-fluoroquinolinium **34** (6-fluoro-2-quinaldine)

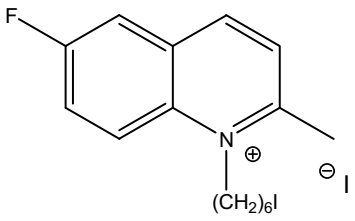
Dans un tube scellé, sont placés 1 éq. de 6-fluoro-2-méthylquinoline (900 mg, 5,58 mmol) et 7,2 éq. de iodure de méthyle (5,7 g, 2,5 mL, 40,16 mmol). Le mélange est chauffé à 90 °C pendant 2 heures. Le résidu obtenu est lavé au diéthyléther sec, récupéré sur fritté puis séché au dessicateur. 870 mg de solide jaune sont obtenus avec un rendement de 55 %.



$C_{11}H_{11}FIN$
M : 303,12 g/mol
CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0
SM (ES+): m/z= 176,18.

Iodure de 6-fluoro-*N*-(6-iodohexyl)-2-méthylquinolinium **37** (6-fluoro-*N*-(6-iodohexyl)-2-quinaldine)

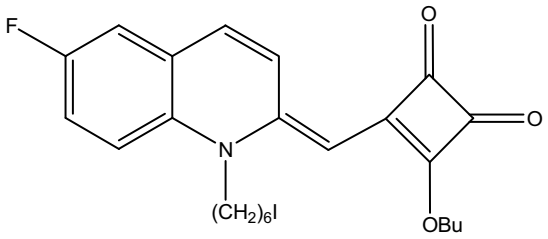
Dans un tube scellé, sont placés 1 éq. de 6-fluoro-2-methylquinoline (922 mg, 5,72 mmol) et 4,5 éq. de diiodohexane (8,7 g, 4,24 mL, 25,74 mmol). Le mélange est chauffé à 110 °C pendant 6 heures. Le produit de la réaction est purifié sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 4 %. 700 mg d'un solide marron sont obtenus avec un rendement de 25 %.



$C_{16}H_{20}FI_2N$
M : 499,15 g/mol
CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0,15
SM (ES+): m/z=372,41.

3-Butoxy-4-(6-fluoro-*N*-(6-iodohexyl)-quinolin-2-ylidèneméthyl)-3-cyclobutène-1,2-dione (**SQFQ** monosquarate **41**)

L'iodure de 6-fluoro-*N*-(6-iodohexyl)-2-méthylquinolinium **37** (500 mg, 1 eq., 1 mmol) est ajouté à une solution de 340 mg de dibutylsquarate **40** (1,5 éq., 0,32 mL, 1,5 mmol) dans 20 mL de butanol. Le mélange réactionnel est agité à 100 °C pendant 1 heure et demie puis le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 3 %. 250 mg d'une huile visqueuse orange sont obtenus avec un rendement de 50 %.



$C_{24}H_{27}FINO_3$

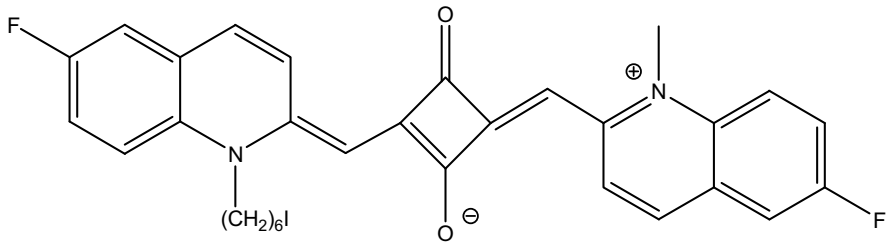
M : 523,39 g/mol

CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0,6

SM (ES+): m/z=524,39.

4-[6-Fluoro-*N*-(6-iodohexyl)-quinoliniumyl-2-méthylène)]-2-(6-fluoro-*N*-méthyl quinolin-2-ylidèneméthyl)-3-oxo-1-cyclobutèn-1-olate (**SQFQ 32**)

Le **SQFQ** monosquarate **41** (120 mg, 1 éq., 0,23 mmol) est ajouté à une solution de 94 mg d'iodure de *N*,2-diméthyl-6-fluoroquinolinium **34** 1,3 éq., 0,30 mmol) dans un mélange de 7 mL de butanol/ toluène 1:1. Le mélange réactionnel est agité à 120 °C pendant 7 heures puis le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 4 %. Une purification supplémentaire après dépôt du résidu sur une plaque de silice préparative éluée plusieurs fois avec un éluant DCM/MeOH 94/6 permet d'obtenir 12 mg de solide vert avec un rendement de 10 %.



$C_{27}H_{27}F_2IN_2O_2$

M : 624,48 g/mol

CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0,5

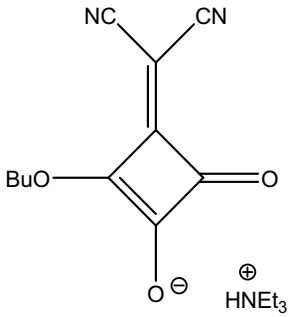
SM (ES+): m/z=624,50.

RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 9,41 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 9,6 Hz, 1H, H_4), 9,39 (d, $^3J_{H\text{-}H}$ = 9,6 Hz, 1H, $H_{4'}$), 7,41 (m, 4H, H_{Ar}), 7,22 (m, 4H, H_{Ar}), 5,83 (s, 1H, =CH-), 5,80 (s, 1H, =CH), 4,21 (t, 2H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8,2 Hz, -$^+NCH_2$-), 3,79 (s, 3H, N-CH_3), 3,28 (t, $^3J_{H\text{-}H}$ = 6,9 Hz, 2H, -CH_2I), 1,94 (m, 4H, 2 -CH_2-), 1,61 (m, 4H, 2 -CH_2-).

B. 1. 4. Synthèse du squaraine dicyano **SQBtCN 33**

Sel de triéthylammonium 2-butoxy-3-dicyanométhylène-4-oxo-1-cyclobutène-1-olate **44**

Le malonodinitrile (330 mg, 1 éq., 5 mmol) est dissous dans 20 mL de toluène puis 1,08 mL de dibutylsquarate (1 éq., 1,131 g, 5 mmol) sont ajoutés goutte à goutte sous forte agitation. 0,7 mL de TEA (1 éq., 5 mmol) est alors additionné lentement puis le mélange réactionnel est agité 10 minutes à température ambiante. Le solvant est évaporé puis le résidu est lavé à l'eau et extrait au DCM. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 10 %. 1,497 g d'une huile brune claire sont obtenus avec un rendement de 95%.



$C_{17}H_{25}N_3O_3$

M : 319,40 g/mol

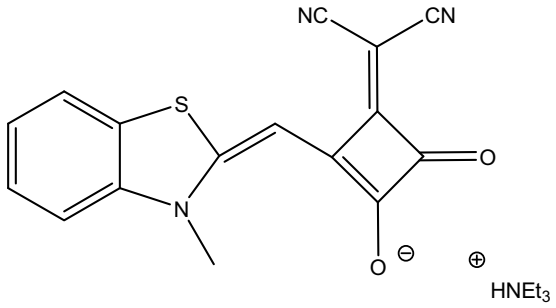
CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0,3

SM (MALDI-): m/z=217,09.

RMN ^1H (500 MHz, DMSO) δ ppm : 8,82 (s, 1H, H^+NEt_3), 4,59 (t, 1H, $^3J_{H-H}$ = 6,6 Hz, $-OCH_2-$), 3,10 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,3 Hz, 6H, $^+NEt_3$), 1,69 (m, 2H, $-CH_2-$), 1,37 (m, 2H, $-CH_2-$), 1,18 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,3 Hz, 9H, $^+NEt_3$), 1,61 (t, 3H, $^3J_{H-H}$ = 7,4 Hz, $-CH_3$).

Sel de triéthylammonium de 3-dicyanométhylène-2-(*N*-méthyl-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-2-ylidènméthyl)-4-oxo-1-cyclobutène-1-olate **45**

Le sel de triéthylammonium de dicyanobutoxysquarate **44** (712 mg, 1,3 éq., 2,23 mmol) est ajouté à une solution de 500 mg de iodure de *N*,2-diméthyl-1,3-benzothiazolium **35** (1 éq., 1,72 mmol) dans 6 mL d'éthanol en présence de 0,3 mL de TEA (1,5 éq., 2,64 mmol). Le mélange réactionnel est agité à 60 °C pendant 1 heure. Le solvant est évaporé puis le résidu est purifié sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 3 %. 334 mg d'une poudre orange sont obtenus avec un rendement de 50 %.



$C_{22}H_{24}N_4O_2S$

M : 408,53 g/mol

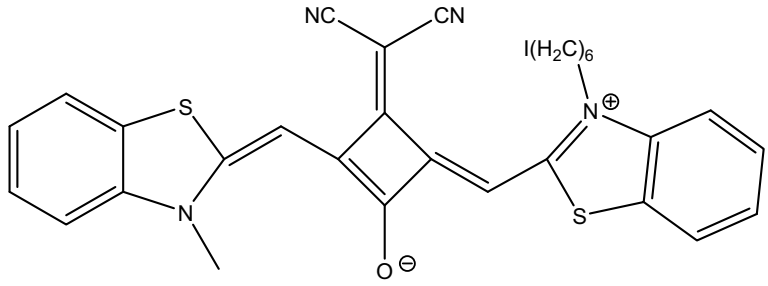
CCM: Rf (DCM/MeOH 8/2) = 0,4

SM (MALDI-): m/z=306,06.

RMN ^1H (500 MHz, DMSO) δ ppm : 8,87 (s, 1H, H^+NEt_3), 7,90 (td, 1H, $^3J_{H-H}$ = 7,4 Hz, J_{H-H} = 1,1 Hz, H_{Ar}), 7,81 (t, 1H, H_{Ar}), 7,28 (m, 1H, H_{Ar}), 7,07 (td, 1H, $^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz, J_{H-H} = 1,1 Hz, H_{Ar}), 5,86 (s, 1H, =CH-), 3,18 (s, 3H, $-CH_3$), 3,10 (q, $^3J_{H-H}$ = 7,3 Hz, 6H, $^+NEt_3$), 0,91 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,4 Hz, 9H, $^+NEt_3$).

3-dicyanométhylène-4-(*N*-(6-iodohexyl)-1,3-benzothiazoliumyl-2-méthylène)-2-(*N*-méthyl-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-2-ylidèneméthyl)-1-cyclobutène-1-olate (**SQBtCN 33**)

Le sel de 3-dicyanométhylène-2-(*N*-méthyl-2,3-dihydro-1,3-benzothiazol-2-ylidènméthyl)-4-oxo-1-cyclobutèn-1-olate de triéthylammonium **45** (270 mg, 1 éq., 0,66 mmol) est ajouté à une solution de 362 mg de iodure de *N*-(6-iodohexyl)-2-méthyl-1,3-benzothiazolium **38** (1,2 éq., 0,74 mmol) dans 10 mL d'éthanol. Le mélange réactionnel est agité à 100 °C pendant 8 heures. Le solvant est évaporé puis le résidu est purifié sur colonne de silice avec un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 5 %. Une purification supplémentaire est effectuée après dépôt du résidu sur une plaque de silice préparative éluée plusieurs fois avec un éluant DCM/MeOH 98/2. On obtient 43 mg d'un solide bleu turquoise avec un rendement de 15 %.



$C_{30}H_{25}IN_4OS_2$

M : 648,59 g/mol

CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0,75

SM (MALDI): m/z= 648,02.

RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm) : 7,57 (t, 2H, $^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz, H_{Ar}), 7,41 (td, 2H, $^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz, $^3J_{H-H}$= 8 Hz, H_{Ar}), 7,24 (q, 2H, $^3J_{H-H}$ = 7 Hz, H_{Ar}), 7,17 (m, 2H, H_{Ar}), 5,92 (s, 2H, =CH-), 4,12 (t, 2H, $^3J_{H-H}$ = 7,5 Hz, -$^+NCH_2$-), 3,68 (s, 3H, N-CH_3), 3,23 (t, $^3J_{H-H}$ = 7 Hz, 2H, -CH_2I), 1,88 (m, 4H, 2 -CH_2-), 1,52 (m, 4H, 2 -CH_2-).

RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 7,1; 26,0; 27,6; 29,9; 30,3; 33,3; 46,9; 87,3; 112,0; 112,1; 119,1; 122,5; 122,6; 124,9; 127,7.

B. 2. Synthèse d'oligonucléotides

Les rendements, les temps de réaction et les caractérisations de tous les oligonucléotides obtenus (conjugués et non conjugués) sont indiqués dans la partie théorique de ce manuscrit.

B. 2. 1. Synthèse d'oligonucléotides non modifiés

L'élongation de l'oligonucléotide est réalisée sur le synthétiseur d'oligonucléotides à partir de supports commerciaux CPG 500 Å (PE Biosystems) comportant le premier nucléotide de l'extrémité 3' suivant le cycle de synthèse précédemment décrit (Chapitre généralités, § **A. II. 2. C.**), puis le groupement trityle 5'-terminal est retiré (mode DMTr-off). La résine est séchée sous courant d'argon puis l'oligonucléotide est déprotégé et libéré du support par traitement avec une une solution d'ammoniaque concentrée (27 %) pendant 15 heures à 55 °C. L'ammoniac est éliminé sous vide et la phase aqueuse concentrée puis extraite à l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est purifiée sur colonne d'exclusion stérique G-10 puis sur CLHP en phase inverse. Après 2 lyophilisations, la quantité d'oligonucléotide (DO) est mesurée puis la solution est à nouveau lyophilisée.

B. 2. 2. Synthèse d'oligonucléotides comportant un groupement thiophosphate en 5'

L'élongation de l'oligonucléotide est réalisée sur le synthétiseur d'oligonucléotides à partir du support commercial CPG 500 Å (PE Biosystems) fonctionnalisé avec le nucléoside 3'-terminal suivant le cycle de synthèse, puis le groupement trityle 5'-terminal est retiré (mode DMTr-off). La résine est séchée sous courant d'argon puis par coévaporation des traces d'eau résiduelles avec de l'acétonitrile anhydre (ou 1 heure au dessicateur en présence d'anhydride phosphorique puis stocké sous atmosphère d'argon).

Une solution de chlorure de pivaloyle (20 mg, 0,166 mmol) dans 0,5 mL d'acétonitrile préalablement séché sur tamis moléculaire 3 Å et 25 mg (0,04 mmol) de *O*-(6-diméthoxytrityloxy-3,4-dithiahexyl-H-phosphonate **11** dans 0,4 mL de mélange pyridine/acétonitrile 1/1 préalablement séché sur tamis moléculaire 3 et 4 Å sont ajoutés simultanément au support et l'agitation est maintenue pendant 2,5 minutes. Les solutions de réactifs sont prélevées, la résine lavée 3 fois avec un mélange pyridine/acétonitrile anhydre 1/1. Une solution de soufre (50 mg de S_8 dans 2,5 mL de mélange CS_2/pyridine 3/2) est alors ajoutée. Après 20 minutes d'agitation, le surnageant est prélevé, la résine lavée 3 fois avec un mélange pyridine/acétonitrile anhydre 1/1 puis 3 fois avec de l'acétonitrile anhydre puis séchée sous vide. L'oligonucléotide est déprotégé et libéré du support par traitement avec une solution d'ammoniaque concentrée en présence de DTT[271] pendant 15 heures à 55 °C. L'ammoniac est éliminé sous vide et la phase aqueuse concentrée puis extraite à l'acétate d'éthyle. L'oligonucléotide est purifié sur colonne d'exclusion stérique G-10 puis par CLHP en phase inverse (gradient § **A. 4.**). Après 2 lyophilisations, la quantité d'oligonucléotide (DO) est mesurée puis la solution est à nouveau lyophilisée.

B. 2. 3. Synthèse d'oligonucléotides comportant un groupement thiophosphate en 3'

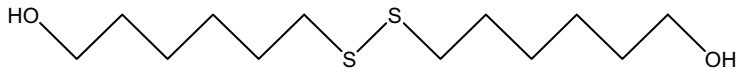
La détritylation de 32,3 mg de support **14**[273](capacité : 31 µmol/g) est effectuée par deux additions successives de 2 mL d'une solution d'acide dichloroacétique 2 % dans le 1,2-dichloroéthane, puis le support est lavé à l'acétonitrile anhydre et séché sous vide. Le support est mis en réaction avec 8 éq. du dérivé phosphoramidite de la déoxycytidine (6,7 mg, 8 µmol) dans 2,5 mL d'acétonitrile et 0,5 mL d'une solution 0,5 M de tétrazole dans l'acétonitrile pendant 30 minutes (les deux solutions ajoutées sont préalablement séchées 2 heures sur tamis moléculaire 3 Å). Le surnageant est alors prélevé et la résine lavée à l'acétonitrile anhydre. 1 mL d'une solution $6{,}7.10^{-4}$ M de tetraéthylthiuramdisulfure dans l'acétonitrile (solution de sulfuration) est ajouté à la résine et le mélange agité pendant 20 minutes. Le surnageant est prélevé, la résine lavée 3 fois à l'acétonitrile anhydre puis séchée. Un dosage du cation tritylium est effectué pour connaître le rendement de ce premier couplage. L'étape de coiffage est effectuée par ajout simultané sur la résine de 1 mL de solution Cap A (anhydride acétique/THF, Chemgenes) et 1 mL de solution Cap B (1-Methylimidazole/Pyr/THF, Perseptive Biosystems). Le mélange hétérogène est agité pendant 20 minutes puis le surnageant est prélevé et la résine lavée 3 fois à l'acétonitrile anhydre puis séchée par évaporation. L'élongation de l'oligonucléotide est poursuivie sur le synthétiseur d'oligonucléotides comme précédemment, puis le groupement trityle 5'-terminal est retiré (mode DMTr-off). L'oligonucléotide est déprotégé et libéré du support par traitement avec une solution d'ammoniaque concentrée contenant du DTT pendant 15 heures à 55 °C. L'ammoniac est éliminé sous vide et la phase aqueuse concentrée puis extraite à l'acétate d'éthyle. L'oligonucléotide est purifié sur colonne d'exclusion stérique G-10 puis en chromatographie par échange d'ions. Après une étape de dessalage sur phase inverse et une lyophilisation, la quantité d'oligonucléotide (DO) est mesurée puis la solution est à nouveau lyophilisée.

B. 2. 4. Synthèse d'oligonucléotides comportant un groupement thiol en 3'

B. 2. 4. 1. *Synthèse d'un nouveau support permettant d'obtenir une fonction thiol protégée en 3'*

Synthèse du 6,6'-dithiodihexanol

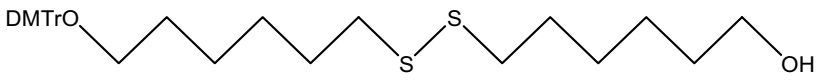
Une solution de 5 g de thiohexanol **16** (37,25 mmol) dans un mélange éthanol/ammoniaque (1/2, 30 mL) est agitée en présence d'un bullage d'air pendant dix jours avec rajout de petites fractions d'ammoniaque (2 mL) tous les deux jours. Le mélange réactionnel est alors concentré sous vide puis purifié sur colonne de silice en utilisant un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 3 %. 1,7 g (6,4 mmol) de 6,6'-dithiodihexanol sont obtenus sous la forme d'une poudre blanchâtre avec un rendement de 35 %.



$C_{12}H_{26}O_2S_2$
M : 266,46 g/mol
CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0,3
SM (ES-): m/z = 265,40 .

Synthèse du 1-*O*-diméthoxytrityl-6,6'-dithiodihexanol **17**

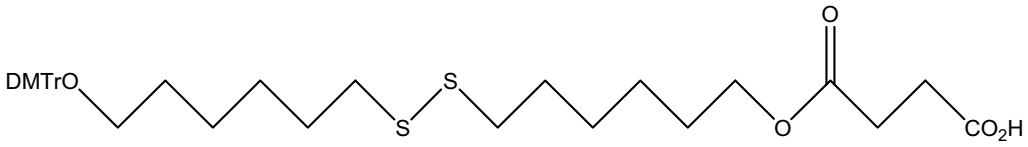
Le 6,6'-dithiodihexanol (1,65g, 1 éq., 6,2 mmol) est séché par coévaporation en présence de pyridine, puis est solubilisé dans 20 mL de pyridine et le chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle (550 mg, 0,27 éq., 1,65 mmol) est ajouté. L'agitation est poursuivie pendant 5 heures à température ambiante puis 0,1 éq. (51 mg, 0,15 mmol) de réactif tritylé est rajouté et la réaction laissée la nuit sous agitation. La pyridine est éliminée en présence de toluène et le produit de la réaction purifié sur colonne de silice en utilisant un gradient de méthanol dans le DCM de 0 à 3 %. 950 mg (1.6 mmol) de 1-*O*-diméthoxytrityl-6,6'-dithiodihexanol **17** sont obtenus sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 95 %.



$C_{33}H_{44}O_4S_2$
M :568,84 g/mol
CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0,55
SM (ES+): m/z = 591,73 ($M+Na^+$).
RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm) : 7,45 (d, $^3J_{H-H}$ = 7,3 Hz, 2H, -ODMTr), 7,33 (d, $^3J_{H-H}$ = 8,9 Hz, 4H, -ODMTr), 7,29 (m, 2H, -ODMTr), 7,21 (t, $^3J_{H-H}$ = 7,1 Hz, 1H, -ODMTr), 6,83 (d, $^3J_{H-H}$ = 8,9 Hz, 4H, -ODMTr), 3,80 (s, 6H, $-OCH_3$), 3,64 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,5 Hz, 2H, $-CH_2ODMTr$), 3,05 (t, $^3J_{H-H}$ = 6,5 Hz, 2H, $-CH_2OH$), 2,68 (m, 4H, -ODMTr), 1,68 (m, 4H, $-CH_2CH_2SSCH_2CH_2-$), 1,60 (m, 4H, $-CH_2CH_2OH$ + $-CH_2CH_2ODMTr$), 1,40 (m, 8H, $-(CH_2)_n-$).

Synthèse de l'acide 20-*O*-diméthoxytrityl-12,13-dithia-5,20-dioxa-4-oxo-eicosanoïque

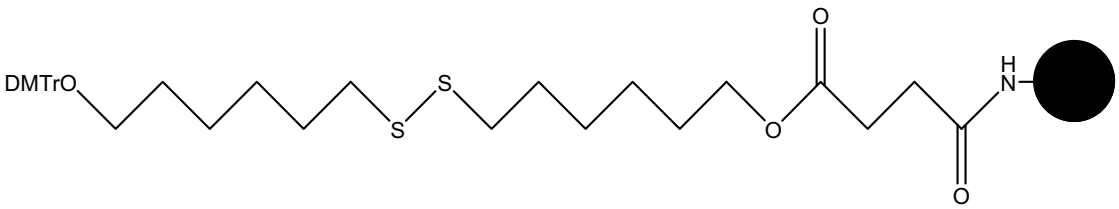
Le 1-*O*-diméthoxytrityl-6,6'-dithiodihexanol (900 mg, 1 éq., 1,6 mmol) est ajouté à 0,95 éq d'anhydride succinique (159 mg, 1,59 mmol) en présence de 0,9 éq de 4-diméthylaminopyridine (183 mg, 1,5 mmol) dans 12 mL de pyridine. L'agitation est poursuivie pendant 24 heures à température ambiante. La solution jaune de départ brunit au cours de la réaction. La pyridine est coévaporée avec du toluène, puis le résidu est lavé à l'acide citrique 10% aqueux (10 mL), puis à l'eau (10 mL) et la phase organique extraite au DCM (3×20 mL), séchée sur sulfate de magnésium et concentrée. 1,04 g (1,52 mmol) d'acide 20-*O*-diméthoxytrityl-12,13-dithia-5,20-dioxa-4-oxo-eicosanoique sont obtenus sous la forme d'une huile marron avec un rendement de 95%.



$C_{37}H_{48}O_7S_2$
M :668,90 g/mol
CCM: Rf (DCM/MeOH 9/1) = 0,35
SM (ES-): m/z= 667,49.

Fonctionnalisation du support **18**

L'acide 20-*O*-diméthoxytrityl-12,13-dithia-5,20-dioxa-4-oxo-eicosanoique (1g, 1,49 mmol, 1 éq.) est séché par coévaporation dans la pyridine puis activé par estérification en présence de 0,98 éq. de *p*-nitrophénol (204 mg, 1,46 mmol) et de 2,5 éq. de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (769 mg, 3,72 mmol) dans 10 mL de dioxane et 0,5 mL de pyridine. La réaction est laissée sous agitation pendant 3 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. La dicyclohexylurée précipite sous la forme d'une poudre blanche. Le milieu réactionnel est filtré et le filtrat ajouté à une suspension de 3,3 g de support CPG 500 Å lcaa (Chemgenes) dans 5 mL de DMF et 1 mL de TEA. Le mélange est alors laissé sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Le milieu prend une couleur jaune vif, due au relargage du *p*-nitrophénol. Le support est rincé au DCM puis à l'acétonitrile anhydre. Sa capacité est vérifiée (38 µmol/g) par dosage du cation tritylium libéré en présence d'une solution d'acide perchlorique 60% dans l'éthanol[346]. Le support est alors coiffé par mise en contact avec une solution de 1,5 mL d'anhydride acétique dans 12 mL de pyridine anhydre contenant 30 mg de DMAP pendant une heure, puis il est lavé sur fritté au DCM puis à l'acétonitrile anhydre. Sa capacité à nouveau vérifiée est de 36 µmol/g.



B. 2. 4. 2. *Synthèse d'oligonucléotides comportant une fonction thiol protégée en 3'*

L'élongation de l'oligonucléotide est réalisée sur 27,8 mg du nouveau support **18** (capacité : 36 µmol/g) sur le synthétiseur d'oligonucléotides comme précédemment, puis le groupement trityle 5'-terminal est retiré (mode DMTr-off). L'oligonucléotide est déprotégé et libéré du support en présence d'une solution d'ammoniaque concentrée (27 %) pendant 60 heures à température ambiante. L'ammoniac est éliminé sous vide et la phase aqueuse concentrée puis extraite à l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est purifiée sur colonne d'exclusion stérique G-10 puis par chromatographie d'échange d'ions. Après une étape de dessalage sur phase inverse et lyophilisation, la quantité d'oligonucléotide (DO) est mesurée puis la solution est à nouveau lyophilisée.

B. 2. 5. Synthèse d'oligonucléotides comportant deux groupements thiophosphate en 5' et 3'

Une fois l'élongation de l'oligonucléotide comportant un groupement thiophosphate en 3' sur le support **14** terminée (§ **B. 2. 3.**), la synthèse est poursuivie en suivant le mode opératoire du paragraphe § **B. 2. 2.**. La purification est effectuée par chromatographie d'échange d'ions. Après dessalage sur phase inverse et lyophilisation, la quantité d'oligonucléotide (DO) est alors mesurée sur le spectrophotomètre puis lyophilisée.

B. 2. 6. Synthèse d'oligonucléotides comportant un groupement thiophosphate en 5' et une fonction thiol protégée en 3'

Une fois l'élongation de l'oligonucléotide comportant une fonction thiol protégée en 3' sur le nouveau support **14** terminée (§ **B. 2. 4. 2.**), la synthèse est poursuivie en suivant le mode opératoire du paragraphe § **B. 2. 2.**. La purification est effectuée en chromatographie par échange d'ions. Après dessalage sur phase inverse et lyophilisation, la quantité d'oligonucléotide (DO) est mesurée puis la solution est lyophilisée.

B. 2. 7. Synthèse d'oligonucléotides comportant une fonction amine en 3'

L'élongation automatisée de l'oligonucléotide est réalisée comme précédemment sur 33,3 mg de support modifié **23**[285] (capacité : 30 µmol/g) présent au laboratoire, puis le groupement trityle 5'-terminal est retiré (mode DMTr-off). L'oligonucléotide est déprotégé et libéré du support en présence d'une solution d'ammoniaque concentrée pendant 15 heures à 55 °C. La solution aqueuse est concentrée puis extraite à l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est purifiée sur colonne d'exclusion stérique G-10 puis par chromatographie d'échange d'ions. Après une étape de dessalage sur phase inverse et une lyophilisation, la quantité d'oligonucléotide (DO) est mesurée puis la solution est lyophilisée.

B. 3. Synthèse de conjugués oligonucléotide-chromophore et oligonucléotide-inhibiteur

Durant toute la durée des expériences, les solutions de conjugués sont protégées de la lumière.

B. 3. 1. Couplage à des oligonucléotides comportant un ou deux groupements thiophosphates aux extrémités 5' et/ou 3'

L'oligonucléotide modifié déprotégé (10 DO) est dissous dans 150 µL de tampon $NaHCO_3$ 2,5 % pH 9 dans tous les cas (et à pH 7 lors du couplage du composé **SQFBt**), puis une solution de 300 µL du dérivé iodoalkyle des marqueurs en excès (10 éq.) dans le DMF est ajoutée et la réaction est laissée à l'abri de la lumière pendant une durée de 4 à 10 heures. Le R_f sur CCM de l'oligonucléotide conjugué est légèrement supérieur à celui de l'oligonucléotide thiophosphate. Le conjugué apparaît sous forme d'un trait coloré. Durant les étapes de traitement, la température est maintenue en dessous de 30 °C et les solutions sont protégées de la lumière. Le DMF est évaporé et le résidu dissous dans un petit volume d'eau (2 mL). La solution est extraite plusieurs fois au DCM jusqu'à ce que la phase organique soit incolore. La phase aqueuse est alors concentrée puis purifiée sur colonne d'exclusion stérique en éluant à l'eau. Les conjugués sont analysés et purifiés sur CLHP, avec des temps de rétention supérieurs à ceux des oligonucléotides non conjugués. Après concentration sous vide, le tampon est éliminé par trois lyophilisations. L'analyse par spectrométrie de masse confirme la masse attendue de tous les conjugués. Les rendements sont : $\mathbf{13}_{\mathbf{Th8}}$ (37 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{2TO'8}}$ (32 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{4TO'4}}$ (25 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{4TO'5}}$ (23 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{4TO'6}}$ (38 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{4TO'7}}$ (31 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{4TO'8}}$ (30 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{2TO8}}$ (27 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{4TO8}}$ (35 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{22'Q8}}$ (48 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{24'Q8}}$ (28 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{42'Q8}}$ (40 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{44'Q8}}$ (20 %), $\mathbf{28}_{\mathbf{4TO'8}}$ (25 %), $\mathbf{29}_{\mathbf{4TO'8}}$ (20 %), $\mathbf{15}_{\mathbf{4TO'8}}$ (18 %),$\mathbf{15}_{\mathbf{4TO'4}}$ (9 %),$\mathbf{15}_{\mathbf{2TO8}}$ (18 %),$\mathbf{21}_{\mathbf{4TO'8}}$ (27 %), $\mathbf{21}_{\mathbf{2TO8}}$ (22 %),$\mathbf{21}_{\mathbf{24'Q8}}$ (25 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{Fl}}$ (25 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{CY7mh}}$ (13 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{SQFBt}}$ (24 %), $\mathbf{13}_{\mathbf{SQBt}}$ (6 %), $\mathbf{46}_{\mathbf{SQFBt}}$ (8 %), $\mathbf{46}_{\mathbf{SQBt}}$ (7 %). $\mathbf{47}_{\mathbf{SQFBt}}$ (4 %), $\mathbf{47}_{\mathbf{SQBt}}$ (5 %), $\mathbf{48}_{\mathbf{SQFBt}}$ (3 %),$\mathbf{48}_{\mathbf{SQBt}}$ (6 %), $\mathbf{49}_{\mathbf{SQFBt}}$ (5 %), $\mathbf{49}_{\mathbf{SQBt}}$ (8 %).

B. 3. 2. Couplage à des oligonucléotides comportant une fonction thiol protégée en 3'

Les oligonucléotides sont lyophilisés et conditionnés dans des tubes Eppendorf (10 DO/tube) puis dissous dans 200 µL de tampon $NaHCO_3$ 2,5 % pH 9. La solution est dégazée à l'argon pendant 15 minutes. Puis 20 µL d'une solution tamponnée de TCEP[277] (5 mg dans 750 µL de tampon $NaHCO_3$ 2,5 % pH 9) préalablement dégazée pendant 15 minutes sont ajoutés. Le marqueur (environ 10 éq.) est dilué dans 300 µL de DMF distillé puis la solution est dégazée pendant 10 minutes et ajoutée à la solution d'oligonucléotide. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 6 heures et l'avancement de la réaction suivi par CCM. Les conjugués sont analysés et purifiés sur CLHP, avec des temps de rétention supérieurs à ceux des oligonucléotides non conjugués. Après concentration sous vide, le tampon est éliminé par trois lyophilisations. L'analyse par spectrométrie de masse confirme la masse attendue de tous les conjugués. Les rendements sont : $\mathbf{20}_{\mathbf{4TO'4}}$ (21 %), $\mathbf{20}_{\mathbf{4TO'6}}$(17 %).

B. 3. 3. Couplage à des oligonucléotides comportant un groupement thiophosphate en 5' et une fonction thiol protégée en 3'

Les oligonucléotides sont lyophilisés et conditionnés dans des tubes Eppendorf (20 DO/tube) puis dissous dans 200 µL de tampon $NaHCO_3$ 2,5 % pH 9. Le marqueur **4TO'8** qui doit être couplé en 5' (environ 10 éq.) est dilué dans 300 µL de DMF distillé puis ajouté à la solution d'oligonucléotide. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 6 heures et l'avancement de la réaction suivi par CCM. Le DMF est évaporé et le résidu dissous dans un petit volume d'eau (2 mL). La solution est extraite plusieurs fois au DCM jusqu'à ce que la phase organique soit incolore. La phase aqueuse est alors concentrée puis purifiée sur colonne d'exclusion stérique en éluant à l'eau, puis sur CLHP en phase inverse. Après concentration sous vide, le tampon est éliminé par trois lyophilisations. Les oligonucléotides sont alors dissous dans 200 µL de tampon $NaHCO_3$ 2,5 % pH 9. La solution est dégazée à l'argon pendant 15 minutes. Puis 20 µL d'une solution tamponnée de TCEP (5 mg dans 750 µL de tampon $NaHCO_3$ 2,5 % pH 9) préalablement dégazée pendant 15 minutes sont ajoutés. Le second marqueur **4TO'4** (environ 10 éq.) est dilué dans 300 µL de DMF distillé puis la solution est dégazée pendant 10 minutes et ajoutée à la solution d'oligonucléotide. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 6 heures et l'avancement de la réaction suivi par CCM. Le conjugué est analysé et purifié sur CLHP, avec des temps de rétention supérieurs à ceux de l'oligonucléotide non conjugué **22**. Après concentration sous vide, le tampon est éliminé par trois lyophilisations. L'analyse par spectrométrie de masse confirme la masse attendue de tous les conjugués. Le rendement en oligonucléotide $\mathbf{22}_{\mathbf{4TO'8\text{-}4}}$ est de 5 %.

B. 3. 4. Couplage de l'inhibiteur de fluorescence à des oligonucléotides comportant une fonction amine en 3'

Les oligonucléotides sont lyophilisés et conditionnés dans des tubes Eppendorf (10 DO/tube) puis dissous dans 200 µL de tampon $NaHCO_3$ 2,5 % pH 9. L'ester succinimidyl du dabcyl (environ 10 éq.) est dilué dans 300 µL de DMF distillé puis ajouté à la solution d'oligonucléotide. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante durant 4 heures et l'avancement de la réaction suivi par CCM. Les conjugués sont analysés et purifiés sur CLHP, avec des temps de rétention supérieurs à ceux des oligonucléotides non conjugués **24-27**. Après concentration sous vide, le tampon est éliminé par trois lyophilisations. L'analyse par spectrométrie de masse confirme la masse attendue de tous les conjugués. Les rendements sont : $\mathbf{24}_{\mathbf{dab}}$ (60 %), $\mathbf{25}_{\mathbf{dab}}$ (55 %), $\mathbf{26}_{\mathbf{dab}}$ (70 %), $\mathbf{27}_{\mathbf{dab}}$ (75 %).

B. 4. Mesures d'absorption et de fluorescence

B. 4. 1. Spectroscopie d'absorption

Les coefficients d'extinction molaire ε_{pIR} des fluorophores **30** – **33**, **CY7mh** sont déterminés à partir de la valeur d'absorbance de solutions de concentrations connues.

Les concentrations des oligonucléotides non modifiés sont calculées en utilisant les coefficients d'extinction molaire à 260 nm ε_{260} déterminés à partir de la méthode dite « des proches voisins » (ε_{260}**2Pu** = 234500 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{260}**2Py** = 208000 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{260}**1** = 80100 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{260}**24** = 120500 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{260}**25** = 98700 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{260}**26** = 86700 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{260}**27** = 74700 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{260}**28** = 133400 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{260}**29** = 136000 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{260}**46** = 98100 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{260}**47** = 115700 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{260}**48** = 133600 $M^{-1}cm^{-1}$, ε_{260}**49** = 162600 $M^{-1}cm^{-1}$).

Les ε_{260} des oligonucélotides modifiés des séries **13**, **15**, **20**, **28** et **29** sont estimés comme étant la somme des ε_{260} de l'OFT et des cyanines. Les mêmes valeurs ε_{260} sont utilisées pour la série de conjugués possédant différents bras de liaison (n= 4, 5, 6, 7 et 8). La valeur de la contribution du fluorophore à 260 nm a été déterminée par titration pour le conjugué $\mathbf{13_{Fl}}$ (4000 $M^{-1}.cm^{-1}$). La titration est suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible à basse température (4 °C) afin d'avoir un taux d'hybridation maximal. Une solution d'oligonucléotide dans le tampon « cacodylate » de concentration approximativement égale à 1 µM est préparée en se basant sur les valeurs de ε_{260} de l'oligonucléotide non modifié. De petits volumes de solution de l'oligonucléotide cible (environ 1% du volume de la solution à titrer à chaque ajout contenant environ 0,2 eq. de l'oligonucléotide cible) sont ajoutés et les valeurs de DO_{260} relevée à 4 °C. Du fait de l'hypochromisme résultant de l'hybridation du conjugué avec sa cible, la droite tracée à l'équivalence aux abscisses inférieures est de pente plus faible que celle tracée aux abscisses supérieures. Leur intersection est un point dont l'abscisse est égale à l'équivalence. A partir de la concentration exacte du conjugué titré, de l'absorbance du conjugué avant l'ajout de la solution d'oligonucléotide cible et de la valeur de ε_{260} de l'oligonucléotide non-conjugué, on obtient la contribution du marqueur à l'absorbance à 260 nm.

Les ε_{260} des bis-conjugués **21** sont déterminés par titration de leurs solutions dans le tampon « phosphate » (10 mM KH_2PO_4, 140 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 6) avec une solution de concentration connue de la séquence complémentaire $^{5'}$GGGAAAAGAAAATTT$^{3'}$ d'environ 10^{-6} M déterminée en utilisant la relation $\varepsilon_{260} = \varepsilon_{260}$ODN + 2 ε_{260}cyanine. Le ε_{260} du bis-conjugué **22** est déduit de la précédente titration.

Le ε_{260} du conjugué ODN-dabcyl $\mathbf{24_{dab}}$ a été déterminé par titration avec l'ODN de séquence complémentaire $^{5'}T_4CT_4C^{3'}$. Pour les autres oligonucléotides substitués par un dabcyl, une approximation du ε_{260} sera déterminée par la somme de la contribution du dabcyl à 260 nm (5000 $M^{-1}.cm^{-1}$) qui découle de la précédente titration et de la valeur du ε_{260} de l'oligonucléotide libre donnée par la règle dite « des proches voisins ».

Les ε_{260} des ODNs-squaraine **13** sont déterminés par titration des solutions dans le tampon « cacodylate » (cacodylate de sodium $Me_2As(O)O^-\ Na^+$ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7) avec une solution de cible complémentaire $^{5'}$GGGAAAAGAAAATTT$^{3'}$. Les ε_{260} des conjugués dérivés des ONs **46-49** sont estimés comme étant la somme des ε_{260} de l'ON et des squaraines déterminés lors de la précédente titration.

B. 4. 2. Spectroscopie de fluorescence

Les spectres d'émission de fluorescence des ONs libres et hybridés sont enregistrés entre λ=450 nm et 700 nm. L'erreur dans les mesures de fluorescence est estimée à ± 10 %. Les spectres d'émission sont corrigés pour les changements d'absorbance observés lors de l'hybridation.

Les longueurs d'ondes d'excitation utilisées pour les conjugués libres et pour les duplex et triplex correspondants sont les λ_{max} d'absorption.

Les rendements quantiques de fluorescence φ sont calculés à partir de la formule suivante[337]:
$\varphi_X = \varphi_R\ (A_R\ .\ I_X\ .\ n_X^2)\ /\ (A_X\ .\ I_R\ .\ n_R^2)$ où φ_X et φ_R représentent les rendements quantiques du composé et de la référence, A_R et A_X les absorbances en DO de la référence et du composé à la longueur d'onde d'excitation, I_X et I_R les aires intégrées des spectres d'émission corrigés du composé et de la référence et n_X et n_R les indices de réfraction des solvants du composé et de la référence. La référence pour les fluorophores absorbant entre 650 et 700 nm est la 3,3'-diéthylthiadicarbocyanine[347, 348] qui possède un rendement quantique de 0,33 dans l'éthanol et la référence pour l'heptacyanine absorbant à 785 nm est l'indocyanine verte (ICG, également nommée Cardiogreen, Aldrich) qui possède un rendement quantique de 0,05 dans l'éthanol[340, 341]. Les indices de réfraction[349] de l'éthanol, des tampons aqueux et du chloroforme sont respectivement de 1,359, 1,332 et 1,444.

B. 4. 3. Conditions d'hybridation et mesures de Tm

Les solutions de duplex sont préparées par addition d'un petit volume (5 µL) de solution concentrée de la cible simple brin (1 éq.) dans un tampon « cacodylate » à pH 7 et incubés pendant une heure à 4 °C. Les concentrations finales sont de 1 µM en chaque brin.

Les solutions de triplex sont préparées par addition d'un petit volume (5 µL) de solution concentrée de la cible double brin (1 éq.) dans un tampon « phosphate » à pH 6 et incubés pendant 15 heures à 4 °C. Les concentrations finales sont de 1 µM en ON et en duplex cible.

Les valeurs de Tm sont déterminées par dénaturation thermique des complexes d'oligonucléotides suivies par spectroscopie d'absorption (§ **A. 3. 3.**). Les valeurs de Tm sont déterminées à partir de la transition de la courbe des variations d'absorbance en fonction de la température. L'incertitude sur les valeurs de Tm est ± 1 °C. Les concentrations en duplex et triplex sont égales à 1 µM dans un tampon « phosphate » dans le cas des triplex et dans un tampon « cacodylate » dans le cas des duplex.

Des conditions particulières d'hybridation peuvent être requises. Le cas échéant, elles sont indiquées dans le chapitre résultats.

REFERENCES

[1] Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M. *J. Exp. Med.*. **1944**, *79,* 137-158.

[2] Chargaff E. *Experientia*, **1950**, *6*, 201-209.

[3] Watson J.D., Crick F.H. *Nature*, **1953**, *171*, 737-738.

[4] International Human genome sequencing Consortium *Nature* **2001**, *409*, 860-921.

[5] Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W. et al. *Science* **2001**, *291*, 1304-1351.

[6] Marmur J., Doty P. *J. Mol. Biol.* **1962**, *5*, 109-118.

[7] Felsenfeld G., Davies D., Rich A. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79,* 2023-2024.

[8] Le Doan T., Perrouault L., Praseuth D., Habhoud N., Decout J.L., Thuong N.T., Lhomme J., Hélène C. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 7749-7760.

[9] Moser H.E., Dervan P.B. *Science* **1987**, *238*, 645-650.

[10] Mirkin S.M., Lyamichev V.I., Drushlyak K.N., Dobrynin V.N., Filippov S.A., Frank-Kamenetskii M.D. *Nature* **1987**, *330*, 495-497.

[11] *Triple Helix Forming Oligonucleotides* (Eds : Malvy C., Harel-Bellan A., Pritchard L.L.), Kluwer Academic Publishers **1999**.

[12] Gellert I., Lipsett M.N., Davies D.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1962**, *48*, 2013-2018.

[13] Huppert J.L., Balasubramanian S. *Nucleic Acids Res*. **2005**, *33*, 2909-2916.

[14] Siddiqui-Jain A., Grand C. L., Bearss D. J., Hurley L. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 11593–11598.

[15] Gilham P.T., Khorana H.G*., J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6212-6222.

[16] Khorana H.G. *Science* **1979**, *203*, 614-625.

[17] Michelson A.M., Todd A.R., *J. Chem. Soc*. **1955**, 2632-2638.

[18] Katagiri N., Itakura K., Narang S.A. *Chem. Commun.* **1974**, 325-326.

[19] Letsinger R.L., Ogilvie K.K. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4801-4803.

[20] Letsinger R.L., Finnan J.L., Lundsford W.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3278-3279.

[21] Beaucage S.L., Caruthers M.H. *Tetrahdron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1962.

[22] Letsinger R.L., Mahadevan V. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526-3527.

[23] Mc Bride L.J., Caruthers M.H. *Tetrahdron Lett*. **1983**, *24*, 245-248.

[24] Dahl B.H., Nielsen J., Dahl O. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1729-1743.

[25] Sinha N.D., Biernat J., Köster H. *Tetrahdron Lett.* **1983**, *24*, 5843-5846.

[26] Engels J.W., Uhlmann E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 716-734.

[27] Dörper T., Winnacker E.-L. *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 2575-2584.

[28] Ott J., Eckstein F. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *91*, 9137-9142.

[29] Köster H., Stumpe A., Wolter A. *Tetrahdron Lett*. **1983**, *24*, 747-750.

[30] Schaller H., Weimar G., Lerch B;, Khorana H.G. *J. Am. Chem. Soc.***1963**, *85,* 3821-3827.

[31] Agrawal K.L., Yamazaki A., Cashion P.J., Khorana H.G. . *Angew. Chem. Int. Ed.* **1972**, *11,* 451-459.

[32] Corby N.S., Kenner G.W., Todd A.R. *J. Chem. Soc. (Lond.)* **1952**, 3669-3675.

[33] Froehler B.C., Matteucci M.D. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 5399-5407.

[34] Garegg P.J., Lindh I., Regberg T., Stawinski J., Stromberg R., Henrichson C. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4051-4054.

[35] Marugg J.E., Tromp M., Kuyl-Yeheskiely E., Van der Marel G.A., Van Boom J.H. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2661-2664.

[36] Vasser M., Ng P.G., Jhurani P., Bischofberger N. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3089.

[37] Fujii M., Ozaki K., Kume A., Sekine M., Hata T. *Tetrahedron Lett*. **1986**, *27,* 935-938.

[38] Seela F., Kretschmer U. *J. Org. Chem.,* **1991**, *56,* 3861-3869.

[39] Uznanski B., Willk A., Stec W.J. *Tetrahedron Lett*. **1987**, *28,* 3401-3404.

[40] Froehler B.C. *Tetrahedron Lett*. **1986**, *27*, 5575-5578.

[41] Letsinger R.L., Zhang G., Sun D.K., Ikeuchi T., Sarin P.S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989**, *86*, 6553-6557.

[42] Goldstein D.B., Cavalleri G.L. *Nature* **2005**, *437,* 1241-1242.

[43] Crooke S.T. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 31-44.

[44] Zamecnik P.C., Stephenson M.L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1978**, *75*, 280-284.

[45] Walder R.Y., Walda J.A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 5011-5015.

[46] Crooke S.T. *Annu. Rev. Med.* **2004**, *55*, 61-95.

[47] Hélène C., Toulmé J.J., *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1049*, 99-125.

[48] Heikkila R., Schwab G., Wickstrom E., Loke S.L., Pluznik D.H., Watt R., Neckers L.M. *Nature*, **1987**, *328*, 445-449.

[49] Fire A., Mello C. *Nature* **1998**, *391*, 806-811.

[50] Cech T.R., Zaug A.J., Grabowski A.J. *Cell* **1981**, *27*, 487-496.

[51] Doudna J.A., Cech T.R. *Nature* **2002**, *418*, 222-228.

[52] Gold L., Polisky B., Uhlenbeck O., Yarus M. *Ann. Rev. Biochem.* **1995***, 64*, 763-799.

[53] Sun J.-S., Garestier T., Hélène C. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 327-333.

[54] Faria M., Giovannangeli C. *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 299-310.

[55] Seidman M.M., Glazer P.M. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 487-494.

[56] Asseline U. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 491-518.

[57] Didenko V.V. *Biotechniques* **2001**, *31*, 1106-1121.

[58] Okamoto A., Saito Y., Saito I.*Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2005**, *6*, 108-122.

[59] Krishnan M., Namasivayam V., Lin R.S., Pal R., Burns M.A. *Curr. Opin. Biotech.* **2001**, *12*, 92-98.

[60] Younes C.K., Boisgard R., Tavitian B. *Cur. Pharm. Design* **2002**, *8*, 1451-1466.

[61] Smith L.M., Saunders J.Z., Kaiser R.J., Hughes P., Dodd C.R., Connell C.R., Heiner C., Kent S.B.H., Hood L.E. *Nature* **1986***, 321,* 674-679.

[62] Rist M.J., Marino J.P. *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 775-793.

[63] Wilson J.N., Kool E.T. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4265-4274.

[64] Wu Q., Gaddis S.S., MacLeod M.C., Walborg E.F., Thames H.D., DiGiovanni J., Vasquez K.M. *Mol. Carcinog.* **2007**, 46, 15-23.

[65] Narayanan S., Gall J., Richert C. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 2901-2911.

[66] Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York,* **1999**.

[67] Kumke M.U., Li G., McGown L.B., Walker G.T., Linn C.P. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3945-3951.

[68] Sapsford K.E., Berti L., Medintz I.L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45,* 4562-4588.

[69] Kasha M. *Radiat. Res.* **1963**, *20*, 55-71.

[70] Bernacchi S., Mély Y. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e62.

[71] Johansson M.K., Cook R.M. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3466-3471.

[72] Marras S.A.E., Kramer F.R., Tyagi S. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e122.

[73] Ipe B.I., Thomas K.G., Barazzouk S., Hotchandani S., Kamat P.V. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 18-21.

[74] Yang C.J., Lin H., Tan W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127,* 12772-12773.

[75] Metelev V., Weissleder R., Bogdanov A. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1481-1487.

[76] Crockett A.O., Wittwer C.T. *Anal. Biochem.* **2001**, *290*, 89-97.

[77] Garbesi A., Bonazzi S., Zanella S., Capobianco M.L., Giannini G., Arcamone F. *Nucleic Acids Res*. **1997**, *25*, 2121-2128.

[78] Seidel C.A.M., Schultz A., Sauer M.H.M. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553.

[79] Manoharan M., Tivel K.L., Zhao M., Nafisi K., Netzel T.L. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17461-17472.

[80] Eftink M.R. *Fluorescence Quenching,Theory and Applications*, 53-126, Lakowicz J.R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol.2* Plenum Press, New York **2002**.

[81] Lakowicz J.R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol.1* Plenum Press, New York **2002**.

[82] *Tetrahedron Symposium series* **2007**, *63*, 17, guest Ed. Tor Y.

[83] Waggoner A. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 62–66.

[84] Kricka L.J. *Ann. Clin. Biochem.* **2002**, *39*, 114-129.

[85] *Handbook of Fluorescent Probes and Research Product*. 9th Edition, Haugland R.P. Molecular Probes, USA, **2002**.

[86] Bischoff G., Hoffmann S. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9,* 321-348.

[87] Wiederholt K., Rajur S.B., Giuliano Jr J., O'Donnell M.J., McLaughlin L.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7055-7062.

[88] Dueymes C., Decout J.L., Peltié P., Fontecave M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41,* 486-489.

[89] Saito Y., Miyauchi Y., Okamoto A., Saito I. *Tetrahdron Lett*. **2004**, *45*, 7827-7831.

[90] Yamana K., Zako H., Asazuma K., Iwase R., Nakatano A., Murakami A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40,* 1104-1106.

[91] Okamoto A., Ichiba T., Saito I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8364-8365.

[92] Johansson M.K., Cook R.M. Xu J., Raymond K.N. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16451-16455.

[93] Garcia-Fresnadillo D., Boutonnet N., Schumm S., Moucheron C., Kirsch-De Mesmaeker A., Defrancq E., Constant J.F., Lhomme J. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 978-987.

[94] Smith A.M., Gao X., Nie S. *Photochem. Photobiol.* **2004**, *80*, 377-385.

[95] Virta P., Katajisto J., Niittymäki T., Lönnberg H. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5137-5174.

[96] Ren R.X.-F., Chaudhuri N.C., Paris P.L., Rumney S., Kool E.T. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671-7678.

[97] Aubert Y., Asseline U. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3496-3503.

[98] Lee H., Hinz M., Stezowski J.J., Harvey R.G. *Tetrahedron Lett*. **1990**, *31,* 6773-6776.

[99] Asseline U., Thuong N.T., Hélène C. *New J. Chem.* **1997**, *21*, 5-17.

[100] Minakawa N., Ono Y., Matsuda A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11545-11552.

[101] Kahl J.D., Greenberg M.M., *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 597-604.

[102] Miller G.P., Kool E.T. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2404-2410.

[103] Goodchild J. *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 165-187.

[104] Boutorine A.S., Grimm G.N., Hélène C. *Mol. Biol.* **2000**, *34*, 804-813.

[105] Zatsepin T.S., Stetsenko D.A., Gait M.J., Oretskaya T.S. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 471-489.

[106] Singh Y., Spinelli N., Defrancq E. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 263-290.

[107] Lyttle M.H., adams H., Hudson D., Cook R.M. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 193-198.

[108] Wachter L., Jablonski J.A., Ramachandran K.I. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 7985-7994.

[109] Asseline U., Bonfils E., Kurfüst R., Chassignol M., Roig V., Thuong N.T. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1233-1254.

[110] Randolph J.B., Waggoner A.S. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2923-2929.

[111] Carduallo R.A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P.C., Wolf D.E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 8790-8794.

[112] Benvin A.L., Creeger Y., Fisher G.W., Ballou B., Waggoner A.S., Armitage B.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129,* 2025-2034.

[113] Parkhurst K.M., Parkhurst L.J. *Biochemistry* **1995**, 34, 285-292.

[114] Maier T., Pfleiderer W. *Nucleosides & Nucleotides* **1995**, *14*, 961-965.

[115] Yamane A. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e97.

[116] Nazarenko I.A., Bhatnagar S.K., Hohman R.J. *Nucl. Acids Res.* **1997**, *25*, 2516-2521.

[117] Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 7276-7280.

[118] Tyagi S., Kramer F.R. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.

[119] Zhang P., Beck T., Tan W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40,* 402-405.

[120] Tyagi S., Marras S., A. E., Kramer F.R. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1191-1196.

[121] Tyagi S., Bratu P.B., A. E., Kramer F.R. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49-53.

[122] Vet J.A., Majithia A.R., Marras S.A.E., Tyagi S., Dube S., Poiesz B.J., Kramer F.R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 6394-6399.

[123] Marras S.A.E., Gold B., Kramer F.R, Smith I., Tyagi S. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e72.

[124] Mhlanga, MM, Tyagi, S. *Nature. Prot.* **2006**, *1*, 1392-1398.

[125] Withcombe D., Theaker J., Guy S.P., Brown T., Little S. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 804-807.

[126] Solinas A., Brown L.J., McKeen C., Mellor J.M., Nicol J.T.G., Thetwell N., Brown T. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e96.

[127] Marti A.A., Jockusch S., Stevens N., Ju J., Turro N.J. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 402-409.

[128] Marti, AA, Li, X, Jockusch, S, Li, Z, Raveendra, B, Kalachikov, S, Russo, JJ., Morozova, I, Puthanveettil, S. V, Ju, J, Turro, N. J. *Nucleic Acids Res*. **2006**, 34, 3161-3168.

[129] Santangelo P.J., Nitin B., Tsourkas A., Bao G. *Ann. Biomed. Eng.* **2004**, 3234, e57.

[130] Sando S., Kool E.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2096-2097.

[131] Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.A. *Science* **1985**, *230*, 1350-1354.

[132] Ranasinghe R., Brown T. *Chem. Commun.* **2005**, 5487-5502.

[133] Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977***, 74,* 5463-5467.

[134] Maxam A.M., Gilbert W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977***, 74,* 560-564.

[135] Silverman A.P., Kool E.T. *Trends in Biotech.* **2005**, *23*, 225-230.

[136] Baerlocher, GM., Vulto, I, de Jong, G, Lansdorp, PM. *Nature Protocols.* **2006**, *1*, 2365-2376.

[137] Tsuji A., Koshimoto H., Sato Y., Hirano M., Sei-Lida Y., Kondo S., Ishibashi K. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 3260-3274.

[138] Johnson M.D. *Chromosoma* **1999**, *108*, 181-189.

[139] Southern E.M. *J. Mol. Biol.* **1975**, *98*, 503-517.

[140] Syvänen A.C., Laaksonen M., Söderlund H. *Nucl. Acids Res* **1986**, *14*, 5037-5048.

[141] Niemeyer C.M., Blohm D. *Angew. Chem. Int.* **1999**, *38,* 2865-2869.

[142] Southern E., Mir K., Shchepinov M. *Nature genetics* **1999**, *21*, 5-9.

[143] Southern E. *GB 8810400* **1988**.

[144] Strezoska Z., Paunesku T., Radosavljevic D., Labat I., Drmanac R., Crkvenjakov R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88,* 10089-10093.

[145] Drmanac S., Kita D., Labat I., Hauser B., Schimdt C., Burczak J.D., Drmanac R. *Nat. Biotechnol.* **1998***, 16,* 54-58.

[146] Patil S.D., Rhodes D.G., Burgess D.J. *The AAPS Journal* **2005**, *7*, 61-77.

[147] Micklefield J. *Curr. Med. Chem*. **2001**, *8,* 1157-1179.

[148] Kurreck J. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-1644.

[149] Smith C.C., Aurelian L., Reddy M.P., Miller P.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83,* 2787-2791.

[150] Spitzer S., Eckstein F. *Nucl. Acids Res* **1988**, *16*, 11691-11704.

[151] Gryaznov S., Chen J.-K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3143-3144.

[152] Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.

[153] Summerton J., Weller D. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7,* 187-195.

[154] Koshkin A.A., Singh S.A., Nielsen P., Rajwanshi V.K., Kumar R., Meldgaard M., Olsen C.E., Wengel J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607-3630.

[155] Obika S., Nanbu D., Hari A.,Morio K.I., In Y., Ishida T., Imanishi T. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38,* 8735-8738.

[156] H. Inoue, Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 6131-6148.

[157] Winkler K.E. *Nat. Rev. Drug Discov*. **2004**, *3*, 823-824.

[158] Morvan F., Rayner B., Imbach J.L., Chang D.K., Lown J.W. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 5019-5035.

[159] Thuong N.T., Asseline U., Roig V., Takasugi M., Hélène C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84,* 5129-5133.

[160] Nitin, N, Santangelo, PJ, Kim, G, Nie, S, Bao, G. *Nucleic Acids Res*. **2004**, *32*, e58.

[161] Asensio J.L., Lane A.N., Dhesi J., Berqvist S., Brown T. *J. Mol. Biol.* **1998**, *275,* 811-822.

[162] Cooney M., Czernuszewicz G., Postel E.H., Flint S.J., Hogan M.E. *Science* **1988**, *241*, 456-459.

[163] De Bizemont T., Duval-Valentin G., Sun J.S., Bisagni E., Garestier T., Hélène C. *Nuceic Acids Res.* **1996**, *24*, 1136-1143.

[164] Giovannnageli C., Rougée M., Montenay-Garestier T., Thuong N.T. Hélène C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 8631-8635.

[165] Soyfer V.N., Potaman V.N. *Triple-helical Nucleic Acids*, Springer-Verlag, New York, **1996**, 151-193.

[166] Doronina S.O., Behr J.-P. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 63-71.

[167] Aubert Y., Perrouault L., Hélène C., Giovannangeli C., Asseline U. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1617-1624.

[168] Li J.-S., Fan Y.-H., Zhang Y., Marky L.A., Gold B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125,* 2084-2093.

[169] Rusling D.A., Brown T., Fox K.R. *Biophysical Chemistry* **2006**, *123*, 134-140.

[170] Beal P.A., Dervan P.B. . *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114,* 4976-4982.

[171] Zhou B.-W., Marchand C., Asseline U., Thuong N.T., Sun J.-S., Garestier T., Hélène C. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 516-523.

[172] Duca M., Vekhoff P., Oussedik K., Halby L., Arimondo P.B. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5123-5130.

[173] Karympalis V., Kalopita K., Zarros A., Carageorgiou H. *Biochemistry (Moscow)* **2004**, *69*, 1051-1058.

[174] Grigoriev M., Praseuth D., Guieysse A.L., Robin P., Thuong N.T., Hélène C., Harel-Bellan A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3501-3505.

[175] Giovannangeli C., Perrouault L., Escudé C., Thuong N.T., Hélène C. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10539-10548.

[176] Faruqi A.F., Krawczyk S.H., Matteucci M.D., Glazer P.M. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 633-640.

[177] Barre F.-X., Ait-Si-Ali S., Giovannangeli C., Luis R., Robin P., Pritchard L.L., Hélène C., Harel-Ballan A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3084-3088.

[178] Asseline U. *Chemical modifications of triple helix forming oligonucleotides* dans *Triple Helix Forming Oligonucleotides* (Eds : Malvy C, Harel-Bellan A., Pritchard L.L.), Kluwer Academic Publishers **1999**, 63-73.

[179] Matteucci M., Lin K.-Y., Huang T., Wagner R., Sternbach D.D., Mehrotra M., Bestermann J.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119,* 6939-6940.

[180] Takasugi M., Guendouz A., Chassignol M., Decout J.L., Lhomme J., Thuong N.T., Hélène C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5602-5606.

[181] Giovannangeli C., Diviacco S., Labrousse V., Gryaznov S., Charneau P., Hélène C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 79-84.

[182] Faruqi A.F., Seidman M.M., Segal D.J., Carroll D., Glazer P.M. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 6820-6828.

[183] Sun J.-S., Hélène C. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, *22*, 489-505.

[184] Fox K.R. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 17-37.

[185] Buchini S., Leumann C.J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 717-726.

[186] Sun J.S., Giovannangeli C., François J.C., Kurfürst R., Montenay-Garestier T., Asseline U., Thuong N.T., Hélène C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 6023-6027.

[187] Cuenoud B., Casset F., Hüsken D., Natt F., Wolf R.M., Alymann K.-H., Martin P., Moser H.E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1288-1291.

[188] Escudé C., Giovannangeli C., Sun J.-S., Lloyd D.H., Chen J.-K., Gryaznov S.M., Garestier T., Helène C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4365-4369.

[189] Lacroix L., Arimondo P.B., Takasugi M., Hélène C., Mergny J.-L. . *Biochem. Biophys. Res. Com.* **2000**, *270*, 363-369.

[190] Sun B.-W., Babu B.R., Sorensen M.D., Zakrzewska K., Wengel J., Sun J.-S. *Biochemistry* **2004**, *43*, 4160-4169.

[191] Povsic T.J., Dervan P.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111,* 3059-3060.

[192] Froehler B.C., Wadwani S., Terhorst T.J., Gerrard S.R. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33,* 5307-5310.

[193] Deglane G., Morvan F., Debart F., Vasseur J.-J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 951–954.

[194] Asseline U. dans *Modified Nucleosides, Synthesis and Applications* (Ed : Loakes D.) **2002**, 33-55 Research Signpost, Kerala.

[195] Roig V., Asseline U. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125,* 4416-4417.

[196] T. Montenay-Garestier, J.S. Sun, J. Chomilier, J.L. Mergny, M. Takasugi, U. Asseline, N.T. Thuong, M. Rougee, C. Helene. In *"Molecular basis of specificity in nucleic acid-drug interactions"* B. Pullman et J.Jortner Eds. Kluwer Academic Publishers, **1990**, 275-290.

[197] Asseline U., Toulmé F., Thuong N.T., delarue M., Montenay-Garestier T., Hélène C. *EMBO J.* **1984**, *3*, 795-800

[198] Orson F.K., Kinsey B.M., McShan W.M. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 479-484.

[199] Silver G.C., Sun J.S., Nguyen C.H., Boutorine A.S., Bisagni E., Hélène C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119,* 263-268.

[200] Mergny J.L., Duval-Valentin G., Nguyen C.H., Perrouault L., Faucon B., Rougée M., Montenay-Garestier T., Bisagni E., Hélène C. *Science* **1992**, *256*, 1681-1684.

[201] Vinogradov S., Roig V., Sergueeva Z., Nguyen C.H., Arimondo P., Thuong N.T., Bisagni E., Sun J.-S., Hélène C., Asseline U. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 120-135.

[202] Brunet E, Corgnali M., Perrouault L., Roig V., Asseline U., Sörensen M.D., Barbu B.R., Wengel J., Giovannangeli C. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4223-4234.

[203] Gianolo D.A., Segismundo J.M., McLaughlin L.W. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2128-2134.

[204] Asseline U., Cheng E. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 9005-9010.

[205] Ghosh I., Ctains C.I., Ooi A.T., Segal D.J. *Mol. BioSyst.* **2006**, *2*, 551-560.

[206] Ho H.A., Boissinot M., Bergeron M.G., Boudreau D., Leclerc M. *Angew. Chem. Int.* **2002**, *41,* 1548-1551.

[207] Szewczyk J.W., Baird, E.E., Dervan P.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996,** *118,* 6778-6779.

[208] Fechter E.J., Olenyuk B., Dervan P.B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127,* 16685-16691.

[209] Mergny J.L., Garestier T., Rougée M., Lebedev A.V., Chassignol M., Thuong N.T., Hélène C. *Biochemistry* **1994**, *33*, 15321-15328.

[210] Inoue T., Sugiura Y., Saitoh J., Ishiguro T., Otsuka M., *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1207-1211.

[211] Grimm G.N., Boutorine A.S., Lincoln P., Nordén B., Hélène C. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 324-331.

[212] Fabian J., Nakazami N., Matsuoka M. *Chem. Rev*. **1992**, *92*, 1197-1226.

[213] Cosa G., Focsaneanu K.-S., McLean J.R.N., Scaiano J.C. *Chem. Commun.* **2000***,* 689-690.

[214] Mishra A., Behera R.K., Behera P.K., Mishra B.K., Behera G.B. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1973-2011.

[215] Rye H.S., Yue S., Wemmer D.E., Quesada M.A., Haugland R.P., Maties R.A., Glazer A.N. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 2803-2811.

[216] Glazer A.N., Rye H.S. *Nature* **1992**, *359*, 859-861.

[217] Prodhomme S., Demaret J.P., Vinogradov S., Asseline U., Morin-Allory L., Vigny P. *J. Photochem. Photobiol. B:Biology* **1999**, *53*, 60-69.

[218] Timcheva I., Maximova V.A., Deligeorgiev T.G., Gadjev N.I., Sabnis R.W., Ivanov I.G. *FEBS Letters* **1997**, *405*, 141-144.

[219] Netzel T.L., Nafisi K., Zhao M., Lenhard J.R., Johnson I. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17936-17947.

[220] Nygren J., Svanvik N., Kubista M. *Biopolymers.* **1998**, *1*, 39-51.

[221] Boger D.L., Tse W.C. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2511-2518.

[222] Lee L.G., Chen C.-H., Liu L.A. *Cytometry* **1986**, *7*, 508-517.

[223] Matyus L., Edidin M. *Flow Cytometry and Cell Sorting*, 411-449, Lakowicz J.R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol.1* Plenum Press, New York **2002**.

[224] Constantin T.P., Silva G.L., Robertson K.L., Hamilton T.P., Fague K., Waggoner A.S., Armitage B.A. *Org. Letters* **2008**, *10*, 1561-1564.

[225] Timcheva I., Maximova V.A., Deligeorgiev T.G., Gadjev N.I., Drexhage K.H., Petkova I. *J. Photochem. Photobiol. B:Biology* **2000**, *58*, 130-135.

[226] Staerk D., Hamed A.A., Pedersen E.B., Jacobsen J.P. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 869-877.

[227] Benson S.C., Mathies R.A., Glazer A.N. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5720-5726.

[228] Bondensgaard K., Jacobsen J.P. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 735-744.

[229] Bunkenborg J., Stidsen M.M., Jacobsen J.P. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 824-831.

[230] Larsson A., Carlsson C., Jonsson M., Albinsson B.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116,* 8459-8465.

[231] Akermann B., Tuite E. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1080-1090.

[232] Svankik N., Westman G., Wang D., Kubista M. *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 26-35.

[233] Svankik N., Nygren J., Westman G., Kubista M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123,* 803-809.

[234]Kubista M., Stälhberg A., Bar T. *Proceeding of SPIE, Vol. 4264. Bellingham, WA. International Society of Optical Engineering* **2001**, 53-58.

[235] Stählberg A., Äman P., Ridell B., Mostad P., Kubista M., *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 51-59.

[236] Menacher F., Rubner M., Berndl S., Wagenknecht H.-A. *J. Org. Chem.* **2008**, *73,* 4263-4266.

[237] Carreon J ;R., Mahon K.P. Jr, Kelley S.O. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 517-519.

[238] Babendure J., Liddell P.A., Bash R., Lovullo D., Schiefer T.K., Williams M., Daniel D.C., Thompson M., Taguchi A.K.W., Lohr D., Woodbury N.W. *Anal. Biochem.* **2003**, *317*, 1-11.

[239] Tok J.B.-H., Cho J., Rando R.R. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 5741-5758.

[240] Mahon Jr K.P., Roy M.D., Carreon J.R., Prestwich E.G., Rouge J.L., Shin S., Kelley S.O. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 766-773.

[241] Köhler O., Jarikote D.V., Seitz O. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 69-77.

[242] Bethge L., Jarikote D.V., Seitz O. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 114-125.

[243] Asseline U., Chassignol M., Aubert Y., Roig V. *Org. Biomol.Chem.* **2006**, *4*, 1949-1957.

[244] Privat E., Melvin T., Asseline U., Vigny P. *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, *74*, 532-541.

[245] Privat E., Melvin T., Merola F., Schweizer G., Prodhomme S., Asseline U., Vigny P. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 201-210.

[246] Lartia R., Asseline U. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 2270-2281.

[247] Privat E., Asseline U. *Bioconj. Chem.* **2001**, *12*, 757-769.

[248] Ishiguro T., Saitoh J., Yawata H., Otsuka M., Inoue T., Sugiura Y. *Nucleic Acids Res.* **1996** *24*, 4992-4997.

[249] Brooker L.G.S., Keyes G.H., Williams W.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64,* 199-210.

[250] Sun J.-S., Francois J.-C., Montenay-Garestier T., Saison-Behmoaras T., Roig V., Thuong N.T., Helène C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 9198-9202.

[251] Collier D.A., Mergny J.-L., Thuong N.T., Helene C. *Nucleic Acids Res.* **1991** *19*, 4219-4224.

[252] Eckstein F. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88,* 4292-4294 .

[253] Cosstick R., McLaughlin L.W., Eckstein F. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 1791-1810.

[254] Thuong N.T., Chassignol M. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4157-4160.

[255] Iyer R.P., Egan W., Regan J.B., Beaucage S.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112,* 1253-1254.

[256] Stawinski J., Thelin M. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5169-5175.

[257] Ghisaidoobe A.B.T., De Koning M.C., Duynstee H.I., Ten Kortenaar P.B.W., Overkleeft H.S., Filippov D.V., Van der Marel G.A. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3129-3132.

[258] Kamer P.C.J., Roelen H.C.P.F., Van Der Elst H., Van Der Marel G.A., Van Boom J.H. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6757-6760.

[259] Vu H., Hirschbein B.L. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3005-3008.

[260] Eleuteri A., Cheruvallath Z.S., Capaldi D.C., Cole D.L., Ravikumar V.T. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 1803-1807.

[261] Stec W.J., Zon G., Egan W., Stec B. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106,* 6077-6079.

[262] Uhlmann E., Engels J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1023-1026.

[263]Connolly B.A. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 463-466.

[264] Horn T., Urdea M.S. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4705-4708.

[265] Celebuski J.E., Chan C. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5535-5538.

[266] Guzaev A., Salo H., Azhayev A., Lönnberg H. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9375-9384.

[267] Leuck M., Vagle K.E., Roach J.S., Wolter A. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 321-324.

[268] Ausin C., Grajkowski A., Cieslak J., Beaucage S.L. *Org. Letters* **2005**, *7*, 4201-4204.

[269] Meyer A., Bouillon C., Vidal S., Vasseur J.-J., Morvan F *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8867-8871.

[270] Lartia R., Asseline U. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5949-5952.

[271] Cleland W.W. *Biochemistry* **1964**, *3*, 480-482.

[272] Alul R.H., Singman C.N., Zhang G., Letsinger R.L. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 1527-1532.

[273] Asseline U., Thuong, N.T. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2521-2524.

[274] Asseline U., Thuong N.T. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 81-84.

[275] Cantor C.R., Warshaw M.M., Shapiro H. *Biopolymers* **1970**, *9*, 1059-1077.

[276] Robles J., McLaughlin L.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119,* 6014-6021.

[277] Burns J.A., Butler J.C., Moran J., Whitesides G.M. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2648-2650.

[278] Hannah K.C., Armitage B.A. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 845-853.

[279] Ikeda S., Okamoto A. *Chem. Asian. J.* **2008**, *3*, 958-968.

[280] Morrison L.E., Halder T.C., Stols L.M. *Anal. Biochem.* **1989**, *183*, 231-244.

[281] Li Q., Luan G., Guo Q., Liang J. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e5.

[282] Liu X., Wang Y., Nakamura K., Liu G., Dou S., Kubo A., Rusckowski M., Hnatowich D.J. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*,.

[283] Harrison J.G., Liu X., Balasubramanian S. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, e14.

[284] Sherill B.C., Marshall D.J., Moser M.J., Larsen C.A., Daudé-Snow L., Prudent J.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004***, 126,* 4550-4556.

[285] Aubert Y., Bourgerie S., Meunier L., Mayer R., Roche A.-C., Monsigny M., Thuong N.T., Asseline U. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 818-825.

[286] Mergny J.-L., Sun J.-S., Rougée M., Montenay-Garestier T., Barcelo F., Chomilier J., Hélène C. *Biochemistry* **1991**, *30*, 9791-9798.

[287] Griffin L.C., Dervan P.B. *Science* **1989**, *245*, 967-971.

[288] Sun J.-S. *New targets for triple helix forming oligonucleotides* dans *Triple Helix Forming Oligonucleotides* (Eds : Malvy C, Harel-Bellan A., Pritchard L.L.), Kluwer Academic Publishers **1999**, 273-284.

[289] Kukreti S., Sun J.-S., Garestier T., Hélène C. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4264-4270.

[290] *Topics in Fluorescence Spectroscopy* (J. R. Lakowicz, ed.), Vol. 4: *Probe design and chemical sensing*, Plenum, New York **1994**.

[291] Aubin J.E. *J. Histochem. Cytochem*. **1979**, *27*, 36-43.

[292] Imasaka T., Yoshitake, A., Ishibashi N. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1077-1079.

[293] Williams D.C., Soper S.A. *Anal. Chem,* **1995***, 67,* 3427–3432.

[294] Gomez-Hens A., Aguilar-Caballos M.P. *Trends in Anal. Chem.* **2004**, *23*, 127-136.

[295] Patonay G., Salon J., Strekowski L. *Molecules* **2004**, *9*, 40-49.

[296] Sevick-Muraca E.M., Houston J.P., Gurfinkel M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 642-650.

[297] Mujumdar R.B., Ernst L.A., Mujumdar S.R., Lewis C.J., Waggoner A.S. *Bioconjugate Chem.* **1993***, 4,* 105-111.

[298] Mujumdar S.R., Mujumdar R.B., Grant C.M., Waggoner A.S. *Bioconjugate Chem.* **1996***, 7,* 356-362.

[299] Song F., Peng X., Lu E., Zhang R., Chen X., Song B. *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* **2004**, *168*, 53-57.

[300] Hiderbrand S.A., Kelly K.A., Weissleder R., Tung C.-H. *Bioconjugate Chem.* **2005***, 16,* 1275-1281.

[301] Jose J., Burgess K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11021-11037.

[302] Zhao W., Carreira E.M. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7254-7263.

[303] Panchuk-Voloshina N., Haugland R.P., Bishop-Stewart J., Bhalgat M.K., Millard P.J., Mao F., Leung W.-Y., Haugland R.P. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 1179-1188.

[304] Coleman J.R., Culley D.E., Chrisler W.B., Brockman F.J. *J. Microb. Meth.* **2007**, *71*, 246–255.

[305] Waddell E., Wang Y., Stryjewski W., McWhorter S., Henry A.C., Evans D., McCarley R., Soper S.A. *Anal. Chem.* **2000***, 72,* 5907–5917.

[306] Ballard J.L., Peeva V.K., deSilva C.J.S., Lynch J.L., Swanson N.R. *Mol. Biotechnol.* **2007**, *36*, 175-183.

[307] Hammer R.P., Owens C.V., Hwang S.-H., Sayes C.M., Soper S.A. *Bioconjugate Chem.* **2002***, 13,* 1244-1252.

[308] Welder F., Paul B., Nakazumi H., Yagi S., Colyer C.L. *J. Chromatogr. B* **2003**, *793*, 93-105.

[309] Das S., Thomas K.G., Ramanathan R., George M.V., Kamat P.V. *J. Phys. Chem.,* **1993**, *97*, 13265-13268.

[310] Ajayaghosh A. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 449-459.

[311] Sreejith S., Carol P., Chithraa P. Ajayaghosh A. *J. Mater. Chem.,* **2008**, *18*, 264–274.

[312] Jyothish K., Avirah R.R., Ramaiah D. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 111-114.

[313] Johnson J.R., Fu N., Arunkumar E., Leevy M.W., Gammon S.T., Piwnica-Worms D., Smith B.D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007***, 119,* 5624-5627.

[314] Volkova K.D., Kovalska V.B., Losytskyy M.Y., Bento A., Reis L.V., Santos P.F., Almeida P., Yarmoluk S.M. *J. Fluoresc.* **2008**.

[315] Oswald B., Lehmann F.,Simon L.,Terpetschnig E., Wolfbeis O.S. *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 272-277.

[316] Silva G.L., Ediz V., Yaron D., Armitage B.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129,* 5710-5718.

[317] Kim S.H., Hwang S.H. *Dyes and Pigments* **1997**, *35*, 111-121.

[318] Oswald B., Gruber M., Böhmer M., Lehmann F., Probst M., Wolfbeis O.S. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 237-245.

[319] Ramaiah D., Kuthanapillil J., Arun K.T. US **2007 /** 0167350 A1

[320] Jyothish K., Arun K.T., Ramaiah D. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3965-3968.

[321] Wetzl B., Gruber M., Oswald B., Dürkop A., Weidgans B., Probst M., Wolfbeis O.S. *J. Chromatogr. B* **2003**, *793*, 83-92.

[322] Kim S.H., Hwang S.H., Kim J.J., Yoon C.M., Keum S.R. *Dyes and Pigments* **1998,** *37*, 145-154.

[323] Tatarets A.L., Fedyunyayeva I.A., Dyubko T.S., Povrozin Y.A., Doroshenko A.O., Terpetschnig E.A., Patsenker L.D. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *570*, 214-223.

[324] Berkelman T.R., Yarmoluk S.M., Kovalska V.B., Losytskyy M.Y., Volkova K.D. US 20080091015.

[325] Petersen M., Jacobsen J.P. *Bioconjugate Chem.* **1998***, 9,* 331-340.

[326] Tong L., Bixian P. *Dyes and Pigments* **1998**, *39*, 201-209.

[327] Koral M., Bonis D., Fusco A.J., Dougherty P., Leifer A., LuValle J.E. *J. Chem. Eng. Data* **1964**, *9*, 406-407.

[328] Park J.D., Cohen S., Lacher J.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1962***, 84,* 2919-2922.

[329] Maahs G., Hegenberg P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1966***, 5,* 888-893.

[330] Ohno M., Eguchi S. *Top Heterocycl. Chem.* **2006**, *6*, 1-37.

[331] Treibs A., Jacob K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1965***, 4,* 694.

[332] Thomas J., Sherman D.B., Amiss T.J., Andaluz S.A., Pitner J.B. *Bioconjugate Chem.* **2007***, 18,* 1841-1846.

[333] Volkova K.D., Kovalska V.B., Tatarets A.L., Patsenker L.D., Kryvorotenko D.V., Yarmoluk S.M. *Dyes and Pigments* **2007**, *72*, 285-292.

[334] Oswald B., Patsenker L., Duschl J., Szmacinski H., Wolfbeis O.S., Terpetschnig E. *Bioconjugate Chem.* **1999***, 10,* 925-931.

[335] Tatarets A.L., Fedyunyeva I.A., Terpetschnig E., Patsenker L.D. *Dyes and Pigments* **2005**, *64*, 125-134.

[336] Zubatyuk R.I., Baumer V.N., Tatarets A.L., Patsenker L.D., Shishkin O.V. *Acta Cryst.* **2004,** *E60*, 2252-2554.

[337] Demas J., Crosby G. *J. Phys.Chem.* **1971***, 75,* 991-1024.

[338] Dimitriev O.P. *J. Molec. Liquids* **2005,** *121*, 131-133.

[339] Sjöback R., Nygren J., Kubista M. *Biopolymers* **1998**, *46*, 445-453.

[340] Reindl S., Penzkofer A., Gong S.-H., Landthaler M., Szeimies R.M., Abels C., Bäumler W. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1997**, *105,* 65-68.

[341] Soper S.A., Mattingly Q.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994***, 116,* 3744-3752.

[342] Sauda K., Imasaka T., Ishibashi N. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2649-2653.

[343] B.-L. Renard, R. Lartia, U. Asseline, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4413-4425.

[344] Bouteiller C., Clavé G., Bernardin A., Chipon B., Massonneau M., Renard P.-Y., Romieu A. *Bioconjugate Chem.* **2007***, 18,* 1303-1317.

[345] Ye Y., Bloch S., Kao J., Achilefu S. *Bioconjugate Chem.* **2005***, 16,* 51-61.

[346] Atkinson T., Smith M. *Oligonucleotide Synthesis a practical approach*, 35-82, Gait M.J., IRL Press, Oxford Washington DC, **1984**.

[347] Ernst L.A., Gupta R.K., Mujumdar R.B., Waggoner A.S. *Cytometry* **1989**, *10,* 3-10.

[348] Roth N.J.L., Craig A.C. *J. Phys. Chem.* **1974**, *78*, 1554-1555.

[349] *Handbook of Chemistry and Physics 50th Ed.*, Weast R.C., The Chemical Rubber, USA, **1969**.

Brice-Loïc RENARD

DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES FLUORESCENTES POUR L'ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES

De nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes spécifiques des structures d'acides nucléiques en double brin ont été obtenues. Ces oligonucléotides formant des triples hélices, sont liés par leurs extrémités 5'-ou/et 3' à une série de marqueurs fluorescents de la famille des cyanines monométhines possédant des propriétés intercalantes, par des bras polyméthylène de longueur variable. Dans tous les cas, l'hybridation des sondes avec les cibles en double brin s'accompagne d'une forte augmentation de l'intensité du signal fluorescent émis qui dépend de la structure de la cyanine et des paramètres de sa liaison aux oligonucléotides (longueur du bras de liaison et sa position de fixation sur les oligonucléotides et sur les marqueurs). En présence d'une cible simple brin, les modifications du signal ne sont pas significatives. La présence du marqueur stabilise les triples hélices. Les sondes comportant le thiazole orange, attaché par le noyau benzothiazole *via* un bras de liaison à huit méthylènes, présente le meilleur compromis en termes de stabilisation, d'intensité de fluorescence et d'augmentation d'intensité de fluorescence lors de l'hybridation.

Dans le but d'obtenir de nouvelles sondes utilisables en milieu cellulaire et *in vivo*, de nouveaux marqueurs fluorescents de type squaraine ont été synthétisés et couplés pour la première fois, à notre connaissance, à des oligonucléotides. Les conjugués correspondant émettent un signal fluorescent détectable au-delà de 650 nm et possèdent des rendements quantiques de fluorescence élevés. La photostabilité des marqueurs et des conjugués, en milieu acide faible et à 37 °C a été fortement augmentée après incorporation d'atomes de fluor sur le squaraine.

Mots clés : sondes oligonucléotidiques, détection d'acides nucléiques, synthèse oligonucléotidique, synthèse supportée, synthèse chimique, cyanines monométhines, squaraines, spectroscopies d'absorption et de fluorescence, marquage, proche infrarouge, duplex, triplex, oligonucléotides formant des triples hélices, propriétés d'hybridation, Tm.

DEVELOPEMENT OF NEW FLUORESCENT OLIGONUCLEOTIDE PROBES FOR NUCLEIC ACIDS ANALYSIS

New fluorescent oligonucleotide probes for the specific recognition of double-stranded nucleic acid structures were obtained. These triple helix forming oligonucleotides were linked through their 5'-or/and 3'-ends to a series of cyanine monomethine labels, with intercalating properties, *via* polymethylene linkers. In all cases, the hybridization of the labelled oligonucleotides with their double-stranded targets induced a strong increase of the fluorescence emission. The fluorescence increase was dependent on both the cyanine and the parameters of its linkage to the oligonucleotides (linker size and positions of its attachment to both the label and the oligonucleotide). In the presence of the single-stranded target, the fluorescence increase was weak. The triplex structures were stabilized by the presence of the labels. The probes involving thiazole orange attached by the benzothiazole ring and an octamethylene link provided the best balanced properties in terms of triplex stabilization, fluorescence intensity and fluorescence enhancement upon hybridization with the double-stranded target.

With the aim to obtain new probes that can be used in cellular and *in vivo* experiments, squaraine dyes were synthesized and used, for the first time to our knowledge, for the labelling of oligonucleotides. These squaraine-oligonucleotide conjugates are detectable beyond 650 nm and possess good quantum yields. The photophysical properties of the conjugates at 37 °C and in moderate acidic conditions can be strongly improved by the incorporation of fluorine atoms on the squaraine dye.

Key words : oligonucleotide probes, detection of nucleic acids, oligonucleotide synthesis, solid-phase synthesis, chemical synthesis, cyanines monomethines, squaraines, absorption and fluorescence spectroscopies, labelling, near-infrared, duplex, triplex, triplex forming oligonucleotides, hybridization properties, Tm.

Equipe « oligonucléotides modifiés : synthèse et applications »

Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301

Rue Charles-Sadron 45071 Orleans Cedex 2