



HAL
open science

Utilisation de gabarits peptidiques pour le contrôle de l'auto-assemblage de dérivés de la Guanine : Des tétrades de guanines aux quadruplexes d'acides nucléiques.

Pierre Murat

► **To cite this version:**

Pierre Murat. Utilisation de gabarits peptidiques pour le contrôle de l'auto-assemblage de dérivés de la Guanine : Des tétrades de guanines aux quadruplexes d'acides nucléiques.. Chimie. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT : . tel-00540497

HAL Id: tel-00540497

<https://theses.hal.science/tel-00540497>

Submitted on 26 Nov 2010

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 DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité **Chimie - Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

Pierre MURAT

le **10 Novembre 2010**

**Utilisation de gabarits peptidiques pour le contrôle
de l'auto-assemblage de dérivés de la Guanine :
Des tétrades de guanines aux quadruplexes d'acides
nucléiques.**

Thèse dirigée par le **Pr. Eric Defrancq** et codirigée par le **Dr. Nicolas Spinelli**

Soutenue publiquement devant le jury composé de :

Dr. Anne Imberty , CNRS UPR 5301, Grenoble	Président
Dr. Jean-Louis Mergny , INSERM U869, Bordeaux	Rapporteur
Dr. Jean-Marc Escudier , CNRS UMR 5068, Toulouse	Rapporteur
Pr. Sylvie Ricard-Blum , CNRS UMR 5086, Lyon	Examineur
Dr. Angéline Van der Heyden , UJF UMR 5250, Grenoble	Examineur
Pr. Eric Defrancq , UJF UMR 5250, Grenoble	Examineur

Thèse préparée au sein du Département de Chimie Moléculaire dans l'Ecole Doctorale
Chimie et Science du Vivant.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Pascal Dumy, directeur du Département de Chimie Moléculaire, responsable de l'équipe « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires » pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche pour le financement de ce travail.

Je remercie tout particulièrement le Pr. Eric Defrancq et le Dr. Nicolas Spinelli, mes directeurs de thèse, pour m'avoir encadré, conseillé et accordé leur confiance.

Je souhaite également remercier les personnes qui ont rapporté ou examiné ce travail et formé le jury lors de ma soutenance :

- Dr. Anne Imberty, Directeur de Recherche au Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales de Grenoble.
- Dr. Jean-Louis Mergny, Directeur de Recherche à l'Institut de Chimie et Biologie de Bordeaux.
- Dr. Jean-Marc Escudier, Chargé de Recherche au Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique à Toulouse.
- Pr. Sylvie Ricard-Blum, Professeur à l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines de Lyon.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Dr. Rémy Lartia, en charge de la Plateforme de Synthèse, pour sa disponibilité et pour les nombreuses discussions scientifiques si enrichissantes.

Je remercie le Dr. Angéline Van der Heyden et le Pr. Pierre Labbé pour leur accueil sur la Plateforme Caractérisation des Interactions, leur formation et l'aide qu'ils m'ont apportée ces dernières années.

Je remercie également les membres de l'équipe « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires », permanents et étudiants, pour leur aide et leur bonne humeur.

Pour finir, je veux dédier ces travaux à mes proches : tout d'abord à mes parents, pour leur confiance et leur soutien, puis à ma femme, Marie Laure, qui a partagé avec moi ces années de thèse.

Avant-propos

Ce travail a été réalisé sous la direction du Pr. Eric Defrancq et du Dr. Nicolas Spinelli au sein du laboratoire « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires », CNRS UMR 5250, Département de Chimie Moléculaire, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Les différentes études effectuées ont donné lieu aux publications suivantes :

Pierre Murat, Delphine Cressend, Nicolas Spinelli, Angéline Van der Heyden, Pierre Labbé, Pascal Dumy, and Eric Defrancq, A Novel Conformationally Constrained Parallel G-Quadruplex, *ChemBioChem*, **2008**, 9, 2588-2591.

Pierre Murat, Nicolas Spinelli, Pascal Dumy, and Eric Defrancq, Efficient conjugation of oligonucleotides through aromatic oxime formation, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 6534-6537.

Liana Ghizdavu, Frédéric Pierard, Stéphane Rickling, Sabrina Aury, Mathieu Surin, David Beljonne, Roberto Lazzaroni, Pierre Murat, Eric Defrancq, Cécile Moucheron, and Andrée Kirsch-De Mesmaeker, Oxidizing Ru(II) Complexes as Irreversible and Specific Photo-Cross-Linking Agents of Oligonucleotide Duplexes, *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 10988-10994.

Stéphane Rickling, Liana Ghizdavu, Frédéric Pierard, Pascal Gerbaux, Mathieu Surin, Pierre Murat, Eric Defrancq, Cécile Moucheron, and Andrée Kirsch-De Mesmaeker, A rigid dinuclear Ru(II) complex as efficient photo-activable agent for bridging two guanine bases of a duplex or quadruplex oligonucleotide, *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 3951-3961.

Pierre Murat, Romaric Bonnet, Angéline Van der Heyden, Nicolas Spinelli, Pierre Labbé, David Monchaud, Marie-Paule Teulade-Fichou, Pascal Dumy, and Eric Defrancq, Template Assembled Synthetic G-Quadruplex (TASQ): A useful system for investigating the interactions of ligands with constrained quadruplex topologies, *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 6106-6114.

Yashveer Singh, Pierre Murat, and Eric Defrancq, Recent developments in oligonucleotide conjugation, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 2054-2070.

Pierre Murat, Béatrice Gennaro, Julian Garcia, Nicolas Spinelli, Pascal Dumy, and Eric Defrancq, Template-Assembled synthetic G-quartets (TASQs): Control of a H-bonded pattern in water, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2010**, submitted.

Communications orales à des congrès :

Pierre Murat, Nicolas Spinelli, Angéline Van der Heyden, Pierre Labbé, Pascal Dumy, and Eric Defrancq, Conformationally Constrained Parallel G-quadruplex, *Perspectives on Nucleic Acid Chemistry for Therapy*, **June 17-20 2008**, Sesimbra, Portugal.

Communications par posters à des congrès :

Pierre Murat, Eric Defrancq, Nicolas Spinelli, and Pascal Dumy, Mise au point d'un mime de G-quadruplexes pour le criblage de molécules anticancéreuses, *RECOB 12*, **16-20 March 2008**, Aussois, France.

Pierre Murat, Nicolas Spinelli, Angéline Van der Heyden, Pierre Labbé, Pascal Dumy, and Eric Defrancq, Conformationally Constrained Parallel G-quadruplex, *Perspectives on Nucleic Acid Chemistry for Therapy*, **17-20 June 2008**, Sesimbra, Portugal.

Pierre Murat, Romaric Bonnet, Nicolas Spinelli, Angéline Van der Heyden, Pierre Labbé, Pascal Dumy, and Eric Defrancq, Template Assisted Synthesis of G-quadruplex (TASQ), *Annual meeting of the doctoral school of Chemistry and Life Sciences*, **16 June 2009**, Grenoble, France.

Pierre Murat, Romaric Bonnet, Nicolas Spinelli, Angéline Van der Heyden, Pierre Labbé, Pascal Dumy, and Eric Defrancq, Template Assisted Synthesis of G-quadruplex (TASQ), *Self-Assembly of Guanosine Derivatives: From Biological Systems to Nanotechnological Applications*, **20-25 June 2009**, Obergurgl, Austria.

Pierre Murat, Romaric Bonnet, Nicolas Spinelli, Angéline Van der Heyden, Pierre Labbé, Pascal Dumy, and Eric Defrancq, Template Assisted Synthesis of G-quadruplex (TASQ): A useful system for investigating G-quadruplex/ligands interactions, *Fundamentals of Guanosine Self-assembly and Quadruplex Formation*, **27-29 October 2009**, Ischia, Italy.

Pierre Murat, Romaric Bonnet, Nicolas Spinelli, Angéline Van der Heyden, Pierre Labbé, Pascal Dumy, and Eric Defrancq, Template Assisted Synthesis of G-quadruplex (TASQ): A useful system for investigating G-quadruplex/ligands interactions, *RECOB 13*, **21-25 March 2010**, Aussois, France.

SOMMAIRE

Abréviations	10
Numérotation.....	11
Nomenclature	12
Liste des bases nucléiques.....	13
Liste des acides aminés naturels.....	13
Introduction	15
1/ Les acides nucléiques en chimie et en biologie.....	17
1-1 L'histoire de la découverte des acides nucléiques	17
1-2 La découverte de la structure de l'ADN	18
2/ Diversité structurale des acides nucléiques.....	19
2-1 Structure primaire des acides nucléiques	19
2-2 L'hélice à double brins.....	21
2-3 Structures nucléiques complexes	22
a) <i>Les autres structures secondaires des acides nucléiques</i>	22
b) <i>Liaisons hydrogène alternatives</i>	23
3/ Les quadruplexes d'acides nucléiques.....	25
3-1 Les tétrades de guanines	25
3-2 Les quadruplexes de guanines	25
3-3 Les quadruplexes de cytosines : i-motif.....	27
4/ Caractérisation de la structure secondaire des acides nucléiques par dichroïsme circulaire.	28
5/ Gabarits et châssis moléculaires	30
5-1 Concept de préorganisation en chimie supramoléculaire	30
a) <i>Concept de préorganisation</i>	30
b) <i>Notion de gabarit ou châssis moléculaire</i>	31
5-2 Utilisation de peptides cycliques comme châssis moléculaire	33
a) <i>Le concept du TASP</i>	33
b) <i>Exemple d'utilisation de gabarits cyclodécapeptidiques</i>	34
6/ Projet de recherche	35
Chapitre I : TETRADES DE GUANINES SYNTHETIQUES.....	37
I-1/ Rappel Bibliographique.....	39
I-1-1 Auto-assemblage de guanines en solution	39
a) <i>Les tétrades de guanosines</i>	40
b) <i>Structure supramoléculaire des dérivés lipophiles de la guanine</i>	41
I-1-2 Tétrades de guanine synthétiques.....	45
I-2 Synthèse et caractérisation de tétrades de guanines synthétiques hydrosolubles.....	48
I-2-1 Introduction	48
I-2-2 Stratégie de synthèse et études préliminaires	48
a) <i>Présentation</i>	48
b) <i>Études préliminaires</i>	48

c) <i>Sélection des candidats 4 et 5</i>	50
I-2-3 Tétrades de guanines synthétiques hydrosolubles.....	51
a) <i>Synthèse des composés 4 et 5</i>	51
b) <i>Caractérisation par RMN ¹H</i>	53
I-2-4 Détermination structurale du composé 4.....	55
I-2-5 Étude du composé 5.....	60
I-2-6 Caractérisation par dichroïsme circulaire.....	61
I-2-7 Modélisation moléculaire.....	63
I-2-8 Initiation d'agrégats de G-quartets en solution.....	65
I-3/ Bilan	69
I-4/ Partie Expérimentale	70
I-4-1 Materials and equipments.....	70
a) <i>Reagents and solvents</i>	70
b) <i>RP-HPLC</i>	70
c) <i>Mass spectrometry</i>	70
d) <i>NMR spectroscopy</i>	70
e) <i>Distance restraints and molecular modeling</i>	71
f) <i>CD spectroscopy</i>	72
I-4-2 Synthesis procedures.....	72
a) <i>General procedures for the synthesis of peptides</i>	72
b) <i>Synthesis of compound 14</i>	73
c) <i>Synthesis of compounds 4 and 5</i>	75
Chapitre II : MIMES D'ADN QUADRUPLEXE	79
II-1/ Rappels bibliographiques	81
II-1-1 Prévalence biologique des motifs quadruplexes d'acides nucléiques.....	81
a) <i>Mise en évidence de l'existence in vivo de l'ADN quadruplexe</i>	81
b) <i>Analyses génomiques</i>	82
c) <i>Télomères et télomérase</i>	82
d) <i>Promoteurs de gènes</i>	88
e) <i>Régions « switch » des immunoglobulines</i>	92
f) <i>Régions répétées, ADN_r et centromère</i>	92
g) <i>Quadruplexe et ARN</i>	93
II-1-2 Polymorphisme des motifs quadruplexes.....	95
a) <i>Base structurale du motif quadruplexe</i>	95
b) <i>Diversité structurale des motifs quadruplexe issus de la séquence télomérique humaine</i>	99
c) <i>Implication biologique du polymorphisme de l'ADN G-quadruplexe</i>	103
II-1-3 Ligands d'ADN quadruplexe.....	104
a) <i>Modes d'interaction</i>	104
b) <i>Interaction par empilement</i>	105
c) <i>Ligands du sillon et des boucles</i>	114
d) <i>Protéines</i>	119
e) <i>Contrôle de fonctions biologiques via l'utilisation de ligands de G₄</i>	121
II-1-4 Méthode d'études des interactions.....	122
a) <i>Méthodes spectroscopiques optiques</i>	122
b) <i>Dialyse par compétition</i>	126
c) <i>Cristallographie aux rayons X (RX)</i>	127
d) <i>Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)</i>	128

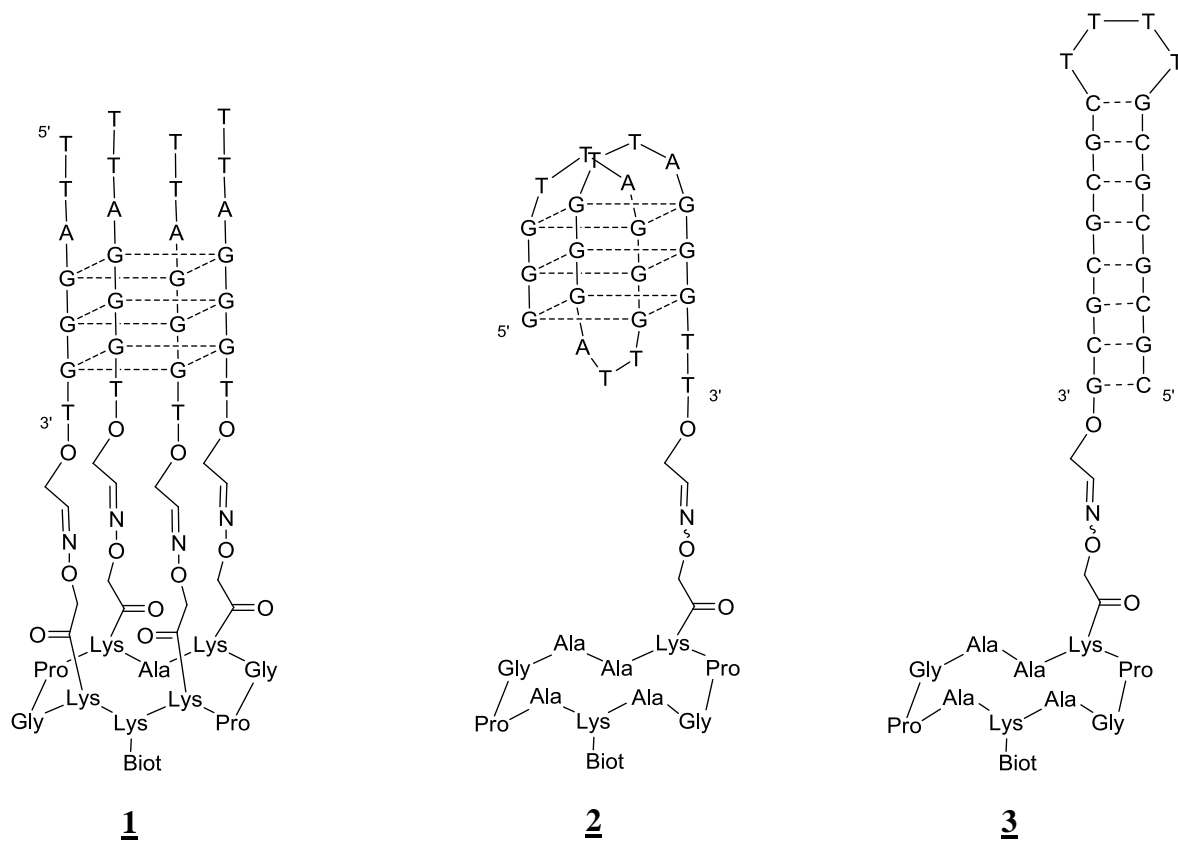
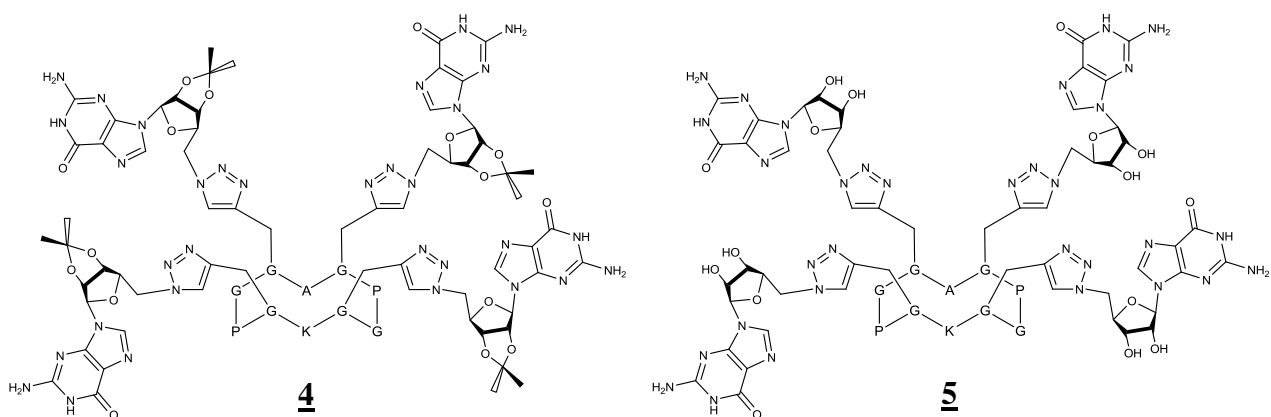
e)	<i>Spectroscopie de masse (ESI-MS)</i>	130
f)	<i>Calorimétrie de titration isotherme (ITC)</i>	131
g)	<i>Résonnance plasmonique de surface (SPR)</i>	132
h)	<i>Études des interactions d'un ligand-modèle : la TMPyP4</i>	136
II-2/ Mime d'ADN quadruplexe parallèle		138
II-2-1 Introduction.....		138
II-2-2 Synthèse et caractérisation d'un mime contraint d'ADN G-quadruplexe parallèle		140
a)	<i>Résumé de l'article 1 en français</i>	140
b)	<i>Article 1 : « A Novel Conformationally Constrained Parallel G Quadruplex », published in ChemBioChem</i>	140
c)	<i>Études complémentaires</i>	155
II-2-3 Etudes de l'affinité de ligands d'ADN quadruplexe par SPR.....		157
a)	<i>Résumé de l'article 2 en français</i>	157
b)	<i>Article 2 : « Template-Assembled Synthetic G-Quadruplex (TASQ) : A useful System for Investigating the Interactions of Ligands with Constrained Quadruplex Topologies », published in Chem. Eur. J.</i>	157
c)	<i>Études complémentaires</i>	182
d)	<i>Études thermodynamiques comparatives par SPR et ITC des interactions quadruplexes / TMPyP4</i>	182
e)	<i>Criblage de nouveaux ligands d'ADN quadruplexe</i>	188
II-3/ Mime d'ADN quadruplexe antiparallèle		194
II-3-1 Mime de quadruplexe de cytosine (i-motif).....		194
a)	<i>Synthèse</i>	194
b)	<i>Études physico chimiques</i>	198
II-3-2 Conception de mime d'ADN quadruplexe antiparallèle.....		201
a)	<i>Conception</i>	201
b)	<i>Synthèse</i>	201
c)	<i>Études physico chimique</i>	202
II-4/ Bilan		205
II-5/ Partie expérimentale		206
II-5-1 Materials and equipments		206
a)	<i>Reagents and solvents</i>	206
b)	<i>RP-HPLC</i>	206
c)	<i>Isothermal Titration Calorimetry (ITC)</i>	206
II-5-2 Synthesis procedures.....		206
a)	<i>General procedures for the synthesis of oligonucleotides</i>	206
b)	<i>Synthesis of i-motif mimics</i>	206
II-5-3 General procedures for SPR experiments		212
Conclusion et perspectives		217
Annexe		223
Bibliographie		227

Abréviations

Ac	Acétyl	NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
AcOH	Acide acétique	NOE	Nuclear Overhauser Effect
AcONa	Acétate de sodium	NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
AcONH₄	Acétate d'ammonium	ODN	Oligodéoxyribonucléotide
ADN	Acide Désoxyribonucléique	PBS	Phosphate Buffer Saline
AFM	Atomic Force Microscopy	PCR	Polymerase Chain Reaction
ARN	Acide Ribonucléique	PEG	Polyethylene glycol
OAl	Allyl ester	PNA	Peptide Nucleic Acids
Alloc	Allyloxycarbonyl	PyBOP[®]	(Benzotriazol-1-yloxy) tris(pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate
ARN	Acide Ribonucléique	RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Template
ARNm	ARN messenger	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Boc	<i>Tert</i> -butyloxycarbonyl	RP-HPLC	Reverse Phase - High-Performance Liquid Chromatography
CD	Dichroïsme Circulaire	RT	Room temperature
CPG	Controlled Pore Glass	RU	Resonance Units
CuAAC	Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition	RX	Cristallographie par diffraction des rayons X
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide	SAM	Self-Assembled Monolayer
DCM	Dichlorométhane	SASRIN[®]	Super Acid Sensitive Resin
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine	siRNA	Small interfering RNA
DLS	Dynamic Light Scattering	SM	Spectrométrie de masse
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide	SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
DMSO	Diméthylsulfoxyde	SPR	Surface Plasmon Resonance
DO	Densité optique	STM	Scanning Tunneling Microscopy
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy	Su	Succinimidyde ester
DQF-COSY	Double-Quantum Filtered Correlated Spectroscopy	TASP	Template Assembled Synthetic Protein
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique	TASQ	Template Assembled Synthetic G-Quartets ou Template Assembled Synthetic G-Quadruplexes
eq	Équivalent molaire	TBA	Thrombin Binding Aptamer
ESI	Electrospray Ionisation	<i>t</i>Bu	<i>Tertio</i> -butyl
EtOAc	Acetate d'éthyl	TFA	Acide trifluoroacétique
Et₂O	Éther diéthylique	TIS	Triisopropylsilane
EtOH	Éthanol	T_m	Température de dénaturation
Fmoc	9-Fluorénylméthoxyoxycarbonyl	TNBS	Acide trinitrobenzènesulfonique
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer	TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
G₄	Quadruplexe d'acide nucléique	TRAP	Telomere Repeat Amplification Protocol
G₄-BMI	G-quadruplex Binding Mode Index	UV	Ultraviolet
G₄-FID	G-quadruplex Fluorescent Intercalator Displacement	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
GMP	Guanosine monophosphate	VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
HBTU	<i>O</i> -Benzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl-uronium-hexafluorophosphate		
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique		
IgM	Immunoglobuline M		
IR	Infrarouge		
ITC	Isothermal Titration Calorimetry		
k_a	Constante cinétique d'association		
k_d	Constante cinétique de dissociation		
K_a	Constante d'association		
K_d	Constante de dissociation		
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption		
MeOH	Méthanol		
MS	Mass Spectroscopy		

Numérotation

L'ensemble des résultats décrit dans ce manuscrit repose principalement sur la synthèse, l'étude et l'utilisation de cinq composés. Pour faciliter la lecture de ce manuscrit, la structure de ces composés, ainsi que la numérotation utilisée pour y référer sont précisées ici. Certains de ces composés figurent dans les articles intégrés dans le corps de ce manuscrit et il est important de noter que la numérotation utilisée dans les articles n'est valable que pour les articles et les parties expérimentales de ceux-ci. Pour le reste du manuscrit on utilisera la numérotation introduite ici.



Nomenclature

Une partie de ce manuscrit s'intéresse à la description de structures formées par l'association inter- ou intramoléculaire de brins nucléiques. Pour faciliter la compréhension du lecteur, il est rappelé ici la nomenclature utilisée pour décrire une séquence nucléique :

- (1) Toutes les séquences nucléiques sont notées du 5' au 3' dans le sens de la lecture.
- (2) Des parenthèses sont utilisées pour décrire des motifs formés par le repliement intramoléculaire d'une séquence donnée. Par exemple lorsque l'on décrit le motif quadruplexe formé par la séquence d(TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA), on fait référence au quadruplexe intramoléculaire formé par cette séquence. Lors de l'étude d'une séquence constituée d'une répétition on utilisera la notation d((TTAGGG)₄TTA) par exemple.
- (3) Des crochets sont utilisés pour décrire des motifs formés par l'association intermoléculaire de plusieurs brins nucléiques. Par exemple le motif d[TTAGGGT]₄ réfère au quadruplexe intermoléculaire formé par l'association de quatre brins de séquence d(TTAGGGT).

Liste des bases nucléiques

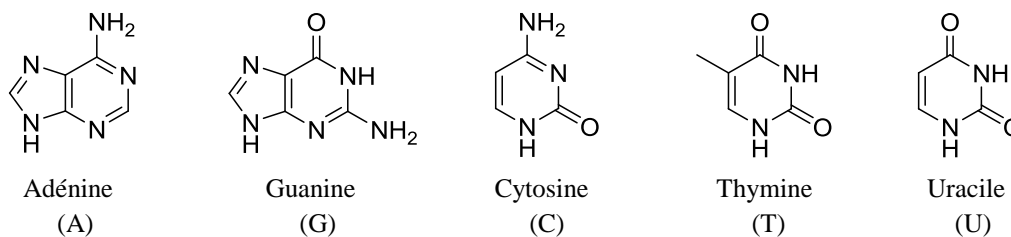


Figure 1 – Structures des cinq bases nucléiques les plus communes (code à une lettre).

Liste des acides aminés naturels

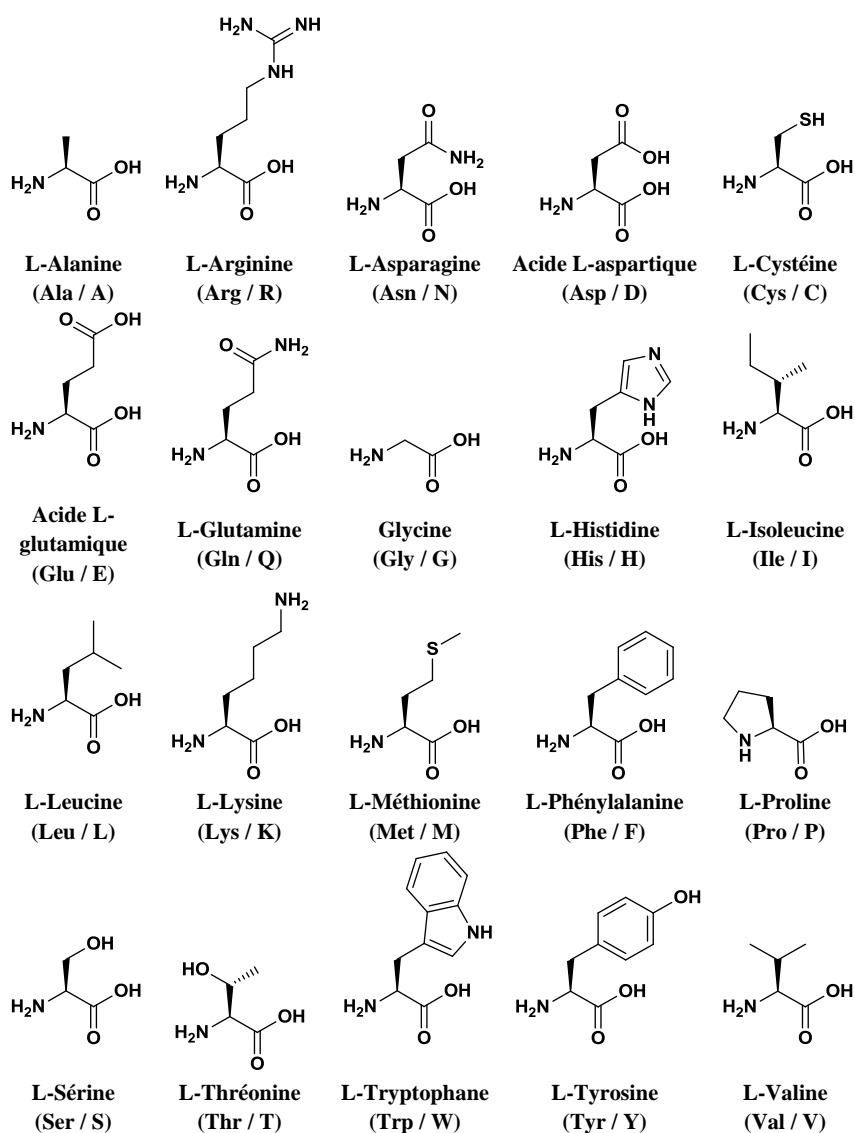


Figure 2 – Structures des 20 acides aminés naturels (codes à trois et une lettre).

Introduction

1/ Les acides nucléiques en chimie et en biologie

La chimie et la biologie sont, de nos jours, tellement imbriquées qu'il est difficile d'imaginer une de ces disciplines sans l'autre. Les acides nucléiques en sont la preuve : de par la complexité et la modularité de leurs structures, ils offrent un perpétuel défi aux chimistes qui essaient de comprendre les lois régissant leur structuration ou qui tentent de développer des outils chimiques pour synthétiser des analogues. Ils représentent également pour les biologistes une constante énigme pour ceux qui essaient de comprendre les mécanismes biologiques dans lesquels ils interviennent et la façon dont le chercheur peut influencer sur son comportement. Pour bien comprendre les recherches actuelles, il est nécessaire de commencer par étudier l'histoire des acides nucléiques et des chercheurs qui ont permis le développement des connaissances aujourd'hui disponibles.

Afin d'offrir un rapport exhaustif sur l'histoire des acides nucléiques, il est important de bien comprendre l'importance du rôle des acides nucléiques dans la maintenance, la réplication et l'expression du matériel génétique chez l'ensemble des organismes vivants. En effet les acides nucléiques sont le support de l'information génétique et participent ainsi à de nombreux processus cellulaires vitaux.

1-1 L'histoire de la découverte des acides nucléiques

Depuis plus de 140 ans maintenant, une multitude de chercheurs ont participé à la découverte et à l'étude de l'ADN. L'histoire de l'ADN commence en 1868, lorsque F. Miescher, travaillant dans les laboratoires de l'université de Tübingen, s'intéresse à la physiologie des cellules lymphatiques humaines. Il commence à étudier des cellules de pus humain qu'il obtient en quantité abondante par l'intermédiaire de l'hôpital local le plus proche. En traitant ces cellules avec une solution de pepsine provenant de l'estomac de cochon, il obtient un précipité pur de noyaux de cellules. F. Miescher obtient finalement, après un traitement acido-basique de ces cellules, un précipité riche en phosphore qu'il nomme nucléine.¹ Le précipité obtenu est en fait un extrait de nucléoprotéines (chromatine). En 1889, R. Altmann obtient à partir de sperme de saumon le premier extrait pur (sans trace de protéine) qui est une substance fortement acide. Il décide donc de nommer cette substance acide nucléique. En 1880, W. Flemming s'intéresse à la coloration des noyaux des cellules en utilisant des dérivés de l'aniline.² Il se rend compte de l'apparition de courts segments observables dans le noyau seulement à certains stades de la division cellulaire. W. Flemming suppose alors que la nature de ces entités, qu'il nomme chromosomes (à cause de leur propriété à fixer les colorants), est identique à la substance que F. Miescher a baptisée nucléine. Il faut attendre 1900 pour qu'E. B. Wilson confirme ce résultat.³

Les chercheurs du début du XX^{ème} siècle sont alors intrigués par ces acides nucléiques et tentent de déterminer leurs structures. En 1909, P. A. Levene et W. A. Jacobs de l'institut

1. Dahm, R., Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum. Genet.* **2008**, *122* (6), 565-81.

2. Paweletz, N., Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2001**, *2* (1), 72-5.

3. Wilson, E. B., The Structure of Protoplasm. *Science* **1899**, *10* (237), 33-45.

Rockefeller, commencent une réinvestigation de la structure des nucléotides et identifient le désoxyribose en 1928.⁴ On parlera par la suite d'acide désoxyribonucléique.

L'importance du rôle biologique de l'ADN se révèle en 1944, lorsque O. Avery et son groupe de l'institut Rockefeller à New York montrent qu'une souche non virulente de *R pneumococci* (pneumocoque) peut être transformée irréversiblement en une souche virulente par un traitement avec un échantillon pur d'ADN de haut poids moléculaire.⁵ O. Avery tire comme conclusion de ses expériences que l'ADN est responsable de cette transformation. Comme conséquences à cette découverte, des chercheurs du monde entier concentrèrent leur attention sur l'étude des acides nucléiques en comprenant très rapidement l'importance d'une telle molécule.

1-2 La découverte de la structure de l'ADN

En 1951, F. Crick et J. Watson rejoignent les laboratoires Cavendish à Cambridge avec pour but de déterminer la structure de l'ADN. Tous les deux sont persuadés que le modèle proposé par L. Pauling et R. B. Corey semblable à une hélice α , que l'on retrouve dans les protéines et peptides, peut correspondre pour l'ADN. C'est en comparant et en croisant les résultats publiés et non publiés d'autres équipes, en proposant et réfutant une grande variété de modèles qu'ils proposent un modèle répondant à tous les critères.⁶ Parallèlement L. Pauling et R. B. Corey proposent un modèle présentant une double hélice avec un noyau regroupant les groupements phosphate et les bases présentées à l'extérieur.⁷ Mais c'est sans compter avec les observations de M. Wilkins, qui montrent l'importance de garder les fibres d'ADN à l'humidité, et l'obtention de clichés aux rayons X de ces fibres par R. Franklin, qui prouvent l'existence d'une forme d'ADN A à faible humidité et d'une forme B à forte humidité.⁸ R. Franklin conclut ainsi que ce comportement requiert l'exposition des groupements phosphate vers l'extérieur de la double hélice. Il reste alors à J. Watson et à F. Crick à résoudre le dernier problème, c'est-à-dire construire le cœur de l'hélice en disposant les bases nucléiques. C'est en étudiant les résultats d'E. Chargaff⁹, prouvant le ratio 1 : 1 purine/pyrimidine, que F. Crick eut l'idée d'organiser les bases liées de manière complémentaire deux à deux. F. Crick et J. Watson proposent alors le modèle de l'appariement des bases nucléiques A : T et G : C (Figure 3).

4. Tipson, R. S., Phoebus Aaron Theodor Levene, 1869-1940. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1957**, 12, 1-12.

5. Avery, O. T.; Macleod, C. M.; McCarty, M., Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III. *J. Exp. Med.* **1944**, 79 (2), 137-158.

6. Watson, J. D.; Crick, F. H., Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**, 171 (4356), 737-8.

7. Pauling, L.; Corey, R. B., A Proposed Structure For The Nucleic Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1953**, 39 (2), 84-97.

8. (a) Wilkins, M. H.; Gosling, R. G.; Seeds, W. E., Physical studies of nucleic acid. *Nature* **1951**, 167 (4254), 759-60; (b) Franklin, R. E.; Gosling, R. G., Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* **1953**, 171 (4356), 740-1.

9. Chargaff, E.; Zamenhof, S.; Green, C., Composition of human desoxyribose nucleic acid. *Nature* **1950**, 165 (4202), 756-7.

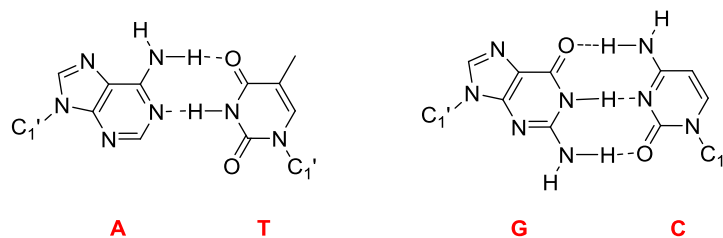


Figure 3 – Paires Watson-Crick A : T avec ses deux liaisons hydrogène et G : C avec ses trois liaisons hydrogène.

Francis Crick, Jim Watson et Maurice Wilkins se voient récompensés du prix Nobel de Chimie en 1962 pour leur découverte, seulement quatre ans après la mort prématurée de Rosalind Franklin.

2/ Diversité structurale des acides nucléiques

L'ADN et l'ARN peuvent, en fonction de leur séquence et des conditions environnementales, adopter une grande variété de structures secondaires comme des hélices à deux, trois ou quatre brins, des « bulges », « hairpins », des branches à trois ou quatre jonctions. La structure des acides nucléiques leur confère la capacité à s'associer de manières très différentes et très complexes. Ces différentes structures seront présentées et commentées dans les paragraphes suivants. Le lien entre caractéristique structurale et rôle biologique sera commenté. L'accent sera bien entendu mis sur les structures nucléiques à quatre brins en hélice, communément nommées quadruple d'acide nucléique, qui sont le centre de cette thèse.

2-1 Structure primaire des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont des macromolécules, polymères de nucléotides qui sont composés de trois unités : une base hétérocyclique azotée, un sucre dérivé du pentose et d'un résidu phosphate. Les principales bases nucléiques sont des pyrimidines (cytosine, thymine et uracile) et des purines (adénine et guanine). Les nucléosides sont formés par la création d'une liaison entre les bases nucléiques (N_9 des purines ou N_1 des pyrimidines) et le carbone $C_{1'}$ d'un dérivé cyclique du pentose, le ribose, selon une liaison glycosidique en β (Figure 4). Les nucléosides de l'ADN sont composés de 2'-désoxy-*D*-ribose et l'ARN du *D*-ribose. L'ajout d'un groupement phosphate sur les fonctions alcools des carbones $C_{5'}$ ou $C_{3'}$ forment les nucléotides. Les acides nucléiques sont ainsi constitués d'un squelette constitué de l'enchaînement ribose, phosphate, ribose ...

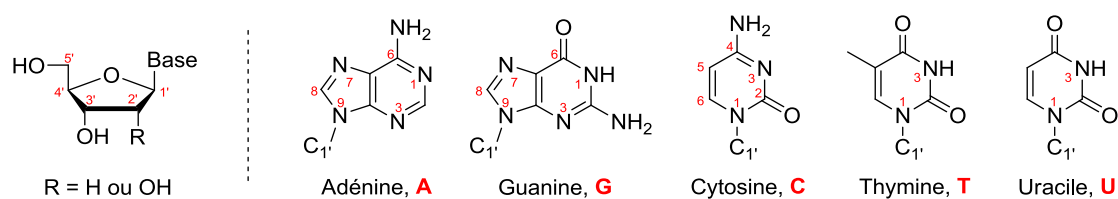


Figure 4 – Structure et numérotation des riboses et des principales bases composants l'ADN et l'ARN.

Les acides nucléiques forment en solution des structures complexes régies par de nombreuses interactions non covalentes. Pour décrire la conformation des brins d'acides nucléiques une série d'angles est couramment utilisée. Les angles de torsion α , β , γ , δ , ϵ et ζ décrivent la conformation locale de la structure. La conformation du sucre est décrite par l'ensemble des angles θ_0 à θ_4 et l'angle χ décrit l'angle de torsion glycosidique (Figure 5). Comme l'ensemble de ces angles sont interdépendants, la conformation globale est généralement décrite par quatre paramètres : la conformation du sucre, l'angle de torsion glycosidique, l'orientation C_4' - C_5' et la géométrie de la liaison phosphodiester.¹⁰

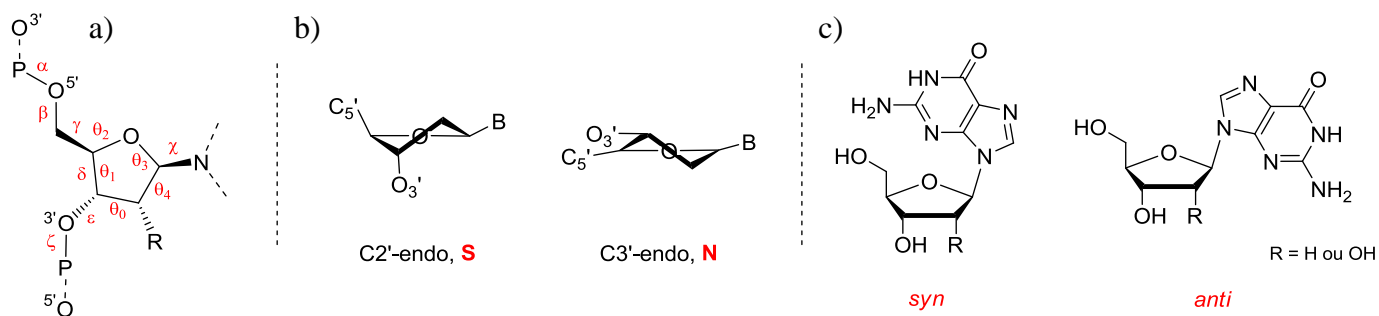


Figure 5 – a) Angles de torsion glycosidiques, b) structure des conformations C_2' -endo (Sud) et C_3' -endo (Nord) des riboses et c) Exemple de conformations *syn* et *anti* de la guanosine.

L'encombrement stérique amené par les différents substituants des furanoses force les riboses dans une conformation distordue. Cette déformation (connue sous le terme de « sugar puckering ») est caractérisée par le déplacement des carbones C_2' et C_3' en dehors du plan C_1' - O_4' - C_4' (Figure 5b). Les deux conformations extrêmes obtenues sont dénommées : conformation C_2' -endo ou *Sud* (lorsque le déplacement *endo* du C_2' est le plus marqué) et conformation C_3' -endo ou *Nord* (lorsque le déplacement *endo* du C_3' est le plus marqué). En solution ces deux conformations sont en équilibre, mais l'équilibre peut être déplacé et influencé par les substituants du sucre. Par exemple, la présence d'un groupement alcool sur le C_2' (structure ARN) favorise la conformation C_3' -endo par la création de liaisons hydrogène intramoléculaires entre le O_2' d'un résidu et le O_4' du résidu suivant. La liaison glycosidique influe également sur la conformation du ribose. Une conformation *syn* favorise une conformation C_2' -endo alors qu'une conformation *anti* favorise une conformation C_3' -endo (Figure 5c).

De par la grande flexibilité des acides nucléiques, une grande variété de structures peut être obtenue. L'auto-association de deux ou plusieurs brins forme en solution des structures complexes qui de par leur géométrie ou leur séquence spécifique interviennent dans de nombreux phénomènes biologiques. La formation de ces superstructures est régie par deux phénomènes : l'appariement de deux ou plusieurs bases *via* la création de liaisons hydrogène et la stabilisation de ces appariements par des interactions de type empilement ou « π -stacking ». Certaines des structures connues vont être rapidement décrites afin de montrer la complexité et la diversité des architectures accessibles par les acides nucléiques.

10. Blackburn, G. M.; Gait, M. J., *Nucleic acids in chemistry and biology*. Second ed.; Oxford University Press: 1996.

2-2 L'hélice à double brins

La structure la plus usuelle de l'ADN est une hélice droite à double brin avec un squelette chargé négativement (désoxyribose phosphate) présenté vers l'extérieur et un empilement de paires de bases nucléiques au cœur de l'hélice. Communément les bases s'auto-associent *via* des liaisons hydrogène de types Watson-Crick. L'hélice est composée par l'association de deux brins en antiparallèle (Figure 6).

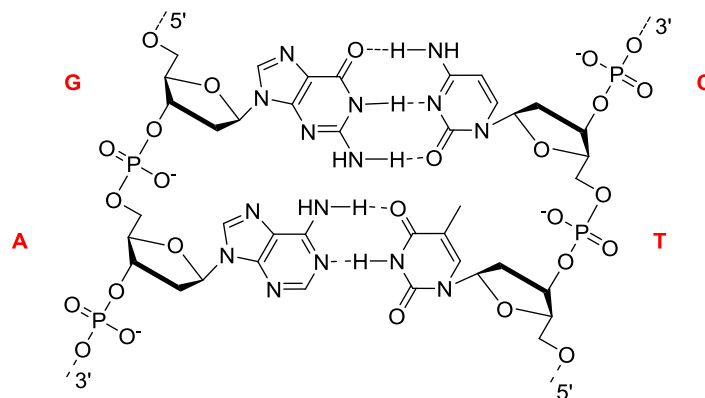


Figure 6 – Structure chimique de la double hélice d'ADN.

Les premières études de diffraction aux rayons X ont identifiées deux conformations distinctes de la double hélice d'ADN. Pour un faible taux d'humidité (et haute concentration en sels), la forme favorisée est l'ADN-A alors que pour un fort taux d'humidité (et faible concentration en sels) la forme prépondérante est l'ADN-B (Figure 7a et b).¹¹ De nos jours, un grand nombre de topologies de double hélice à hélicité droite est connu et ce polymorphisme structural est dénoté en utilisant les lettres A à T. On pourra citer les ADN A, A', B, α -B', β -B', C, C', D, E et T.¹² Chacune de ces formes appartient aux familles représentées par les formes A et B. La famille A est caractérisée par une conformation des riboses en C_{3'}-endo et la famille B est caractérisée par une conformation des riboses en C_{2'}-endo. Cette distinction crée des caractéristiques géométriques particulières : les bases de l'ADN-B sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice, alors que les bases de l'ADN-A sont inclinées par rapport à l'axe de l'hélice. En 1979, A. Wang montre que la séquence d(CGCGCG) forme une hélice à deux brins présentant une hélicité gauche baptisée ADN-Z (Figure 7c).¹³ L'ensemble des paramètres décrivant ces trois topologies est résumé dans le tableau présenté avec la Figure 7.

11. Dickerson, R. E.; Drew, H. R.; Conner, B. N.; Wing, R. M.; Fratini, A. V.; Kopka, M. L., The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* **1982**, *216* (4545), 475-85.

12. Dickerson, R. E., DNA structure from A to Z. *Adv. Enzymol.* **1992**, *211*, 67-111.

13. Wang, A. H.; Quigley, G. J.; Kolpak, F. J.; Crawford, J. L.; van Boom, J. H.; van der Marel, G.; Rich, A., Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* **1979**, *282* (5740), 680-6.

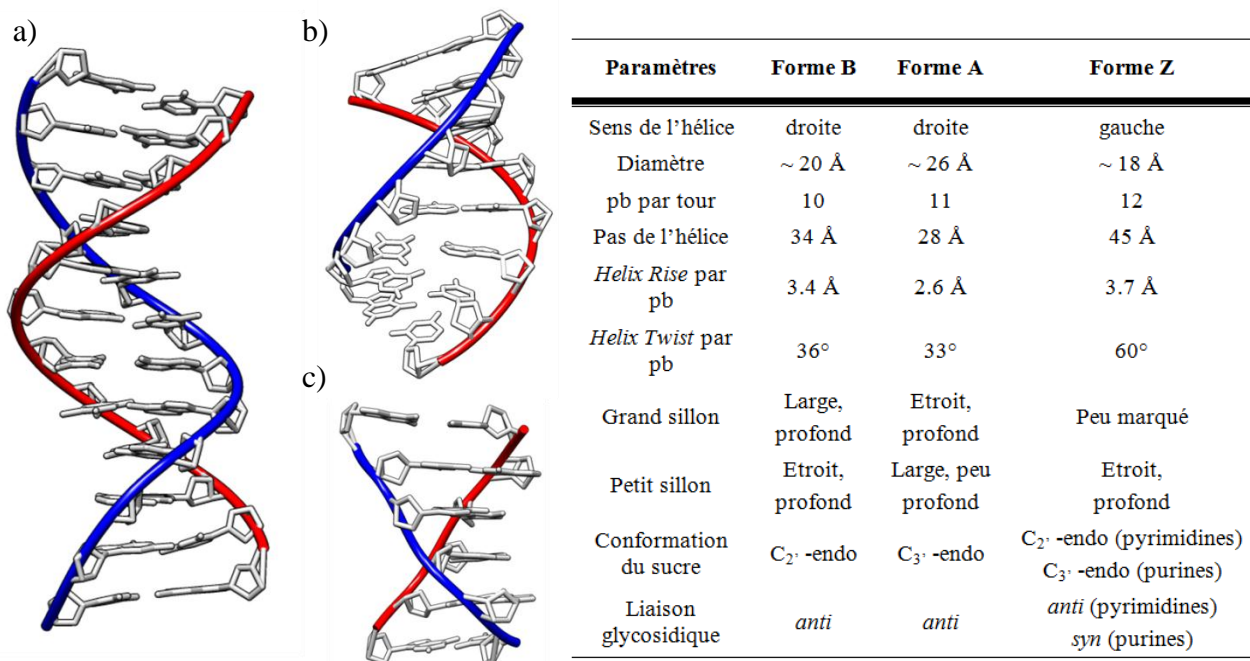


Figure 7 – Représentation des différentes conformations de l'ADN duplexe. a) Forme B (code PDB : 1BNA), b) forme A (code PDB : 1VJ4) et c) forme Z (code PDB : 2DCG). Le tableau recense les principaux paramètres des conformations présentées. pb : paire de bases, *Helix Rise* : distance séparant deux paliers de paire de bases, *Helix Twist* : Angle de rotation par palier de paire de bases.

L'hélice à double brins est la structure principale de l'ADN chromosomique. Cette hélice est ainsi le support du matériel génétique et sa conformation particulière sert d'élément recruteur des enzymes nécessaires à la traduction et à la réplication de l'ADN chromosomique. Il serait néanmoins réducteur de penser que le rôle des acides nucléiques se limite à ce rôle. En effet, il est maintenant connu que l'ADN intervient dans de nombreux autres processus biologiques. Afin de remplir son rôle, l'ADN va utiliser de nombreuses formes différentes pour se spécifier. Le prochain paragraphe va montrer, à travers quelques exemples, que grâce à leur flexibilité, les acides nucléiques peuvent effectuer de nombreuses tâches.

2-3 Structures nucléiques complexes

a) Les autres structures secondaires des acides nucléiques

La géométrie adoptée par un brin nucléique peut être un outil de signalisation. La structuration d'un simple brin en une conformation tige-boucle ou « hairpin » représente la structure secondaire dominante dans la structuration de l'ARN. Les structures tige-boucles sont des sites de reconnaissance des enzymes à reconnaissance d'ARN, elles déterminent les interactions nécessaires à l'activité des enzymes à ARN (ribozymes) et protège l'ARNm des phénomènes de dégradation.¹⁴ Cette structure est formée par le repliement d'un simple brin pour s'auto-apparier selon un schéma Watson-Crick (Figure 8a). L'ARN peut également jouer le rôle d'enzyme et le site catalytique nécessaire sera déterminé par l'établissement d'une

14. Varani, G., Exceptionally stable nucleic acid hairpins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 379-404.

structure tertiaire particulière. L'exemple des ribozymes à tête de marteau (« hammerhead ») montre que l'arrangement complexe de deux brins d'ARN (Figure 8b) permet de conférer aux acides nucléiques une activité d'auto-clivage *via* la formation d'un site propice à une réaction de transestérification.¹⁵ L'hybridation d'un brin d'ADN dans le grand sillon d'une double hélice préexistante permet d'inhiber l'expression d'un gène (Figure 8c). Cette approche connue sous le nom de stratégie « antigène » utilise la formation d'un triplex d'ADN.¹⁶ La formation d'un complexe mettant en jeu quatre brins d'ADN, connue sous le nom de jonction de Holliday (Figure 8d), est l'intermédiaire formé lors des phénomènes de recombinaison génétique homologe.¹⁷

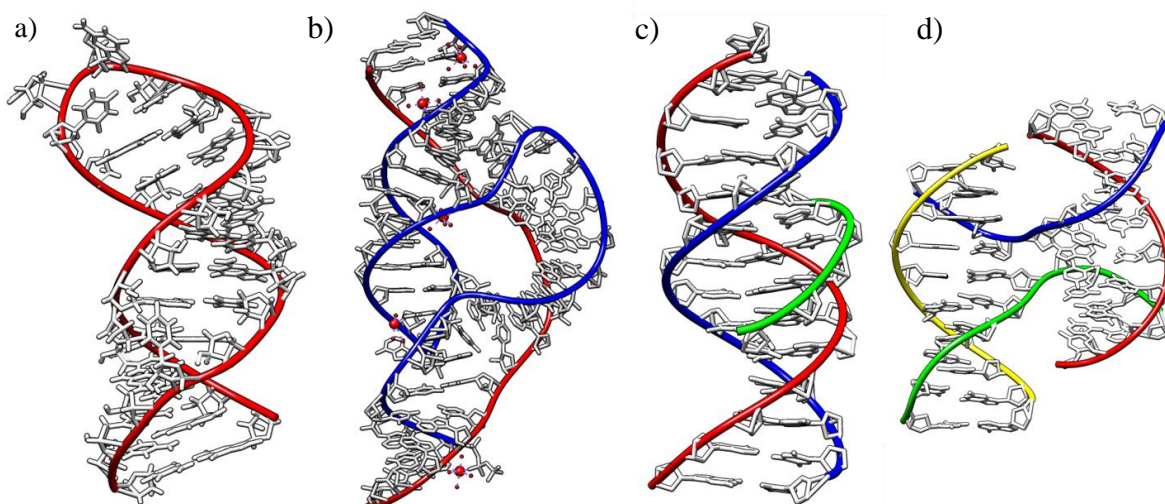


Figure 8 – Exemples de structures secondaires de l'ADN. a) duplexe tige-boucle (code PDB : 2K5Z), b) ribozyme à tête de marteau (« hammerhead ») (code PDB : 2OEU), c) ADN triplex (code PDB : 1BWG) et d) jonction de Holliday (code PDB : 3GNK).

Tous ces exemples montrent que les acides nucléiques sont capables de former des complexes impliquant un ou plusieurs brins et que la topologie adoptée par le complexe régit l'activité biologique de celui-ci. La formation de ces structures est contrôlée uniquement par l'appariement de deux ou plusieurs bases nucléiques et la structure obtenue est stabilisée par les forces d'empilement. Il est à remarquer que de nombreux métaux (monovalents et divalents) participent à la structuration des acides nucléiques. En plus de l'effet de sel agissant sur la compacité de l'édifice obtenu, les cations stabilisent les structures formées.¹⁸

b) Liaisons hydrogène alternatives

L'appariement des bases selon des liaisons hydrogène de type Watson-Crick ne suffit pas, seul, à induire la formation de topologies complexes comme celles présentées précédemment. La formation d'ADN triplex nécessite l'invasion du grand sillon d'une double hélice d'ADN par un troisième brin. Le brin additionnel crée alors des liaisons

15. Doudna, J. A.; Cech, T. R., The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **2002**, 418 (6894), 222-8.

16. Thuong, N. T.; Helene, C., Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32 (5), 666-690.

17. Lilley, D. M.; Clegg, R. M., The structure of the four-way junction in DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, 22, 299-328.

18. Egli, M., DNA-cation interactions: quo vadis? *Chem. Biol.* **2002**, 9 (3), 277-86.

hydrogène additionnelles avec les bases pré-appariées selon un schéma Watson-Crick. Ce nouveau type de liaisons hydrogène est baptisé liaison hydrogène de type Hoogsteen (Figure 9) et peut être directe (les deux sucres sont du même côté de l'axe de la paire de base) ou inverse (les deux sucres sont situés de part et d'autre de l'axe de la paire de base).¹⁹ Le troisième brin invasif reconnaît ainsi le grand sillon du duplexe et s'installe en parallèle (s'il est riche en pyrimidines) ou en antiparallèle (s'il est riche en purine) du brin reconnu. Cette capacité a longtemps été étudiée et exploitée, car cette reconnaissance invasive empêche les polymérases de traduire le brin codant et inhibe l'expression d'un gène ciblé. Cette stratégie est connue sous le nom de thérapie génique « antigène ». Ce type de motif existe également sous forme intramoléculaire et cette conformation, découverte en 1985, est nommée ADN-H.²⁰

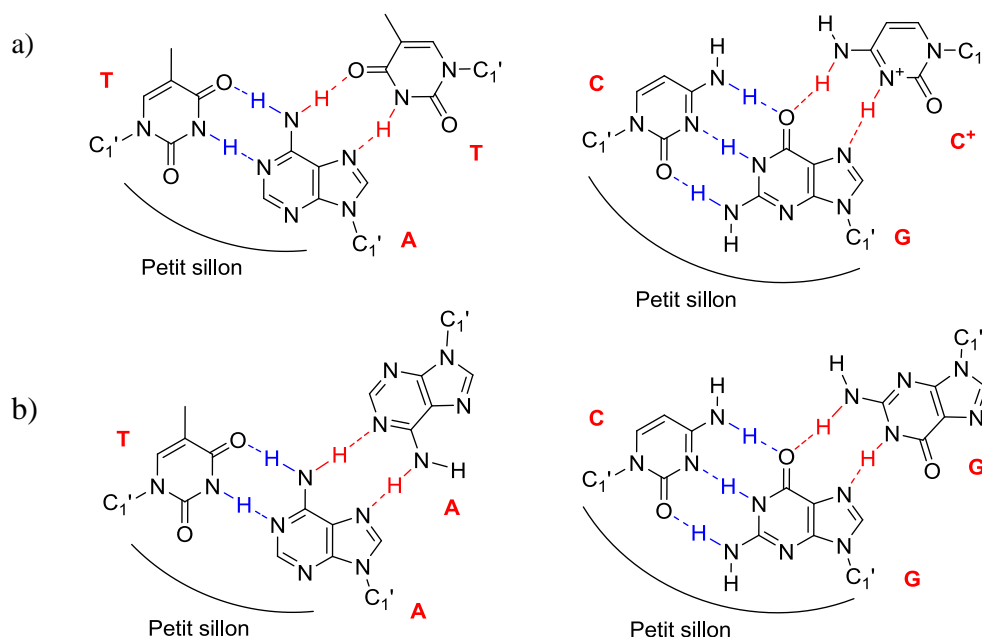


Figure 9 – Liaisons hydrogène de type Hoogsteen (en rouge) directes pour a) T : A x T et C : G x C⁺ et de type Hoogsteen inverses pour b) T : A x A et C : G x G. Les liaisons hydrogènes de type Watson-Crick figurent en bleu.

On retrouve également des liaisons hydrogène d'un type autre que Watson-Crick dans la structure des ARNs de transfert (ARNt). Cet autre type d'appariement explique la dégénérescence du code génétique (les 20 acides aminés sont codés par 61 triplets de nucléotides). En 1966, Francis Crick propose que les ARNt décodent le génome en reconnaissant plus qu'un codon et cette reconnaissance se fait par des appariements de type « wobble » ou bancal (Figure 10).²¹ On remarquera l'appariement de type « wobble » entre l'adénine et l'inosine qui est le premier nucléotide de l'anticodon de l'alanine de l'ARNt chez les levures.

19. Ghosal, G.; Muniyappa, K., Hoogsteen base-pairing revisited: resolving a role in normal biological processes and human diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *343* (1), 1-7.

20. Frank-Kamenetskii, M. D.; Mirkin, S. M., Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 65-95.

21. Agris, P. F.; Vendeix, F. A.; Graham, W. D., tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J. Mol. Biol.* **2007**, *366* (1), 1-13.

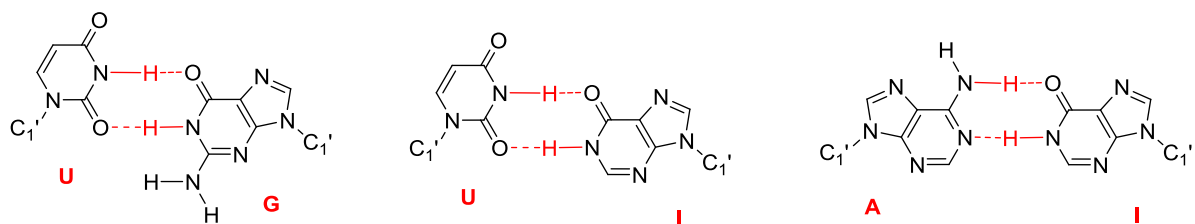


Figure 10 – Liaisons hydrogènes de type « Wobble ».

Ces liaisons hydrogènes particulières permettent ainsi l'accès aux acides nucléiques à des topologies complexes. Nous allons maintenant nous intéresser aux motifs qui sont le centre de ce manuscrit, à savoir la formation de tétrades de guanines par les dérivés de la guanosine.

3/ Les quadruplexes d'acides nucléiques

3-1 Les tétrades de guanines

La guanine est une base nucléique très particulière qui possède un squelette adéquat pour établir de nombreuses liaisons hydrogène à la fois de type Watson-Crick et Hoogsteen. Cette caractéristique lui confère la possibilité de s'auto-associer pour former des structures stables. Quatre guanines peuvent ainsi s'associer *via* la création de liaisons hydrogène de type Hoogsteen pour former un plateau de guanines appelé tétrade ou quartet de guanines (Figure 11). Le motif formé est stabilisé par huit liaisons hydrogène et par un cation qui se coordine au centre de la structure pour diminuer les forces de répulsions dues à la proximité des quatre atomes d'oxygène O₆. Les caractéristiques et les propriétés de ce type de motif seront détaillées dans le *Chapitre 1*.

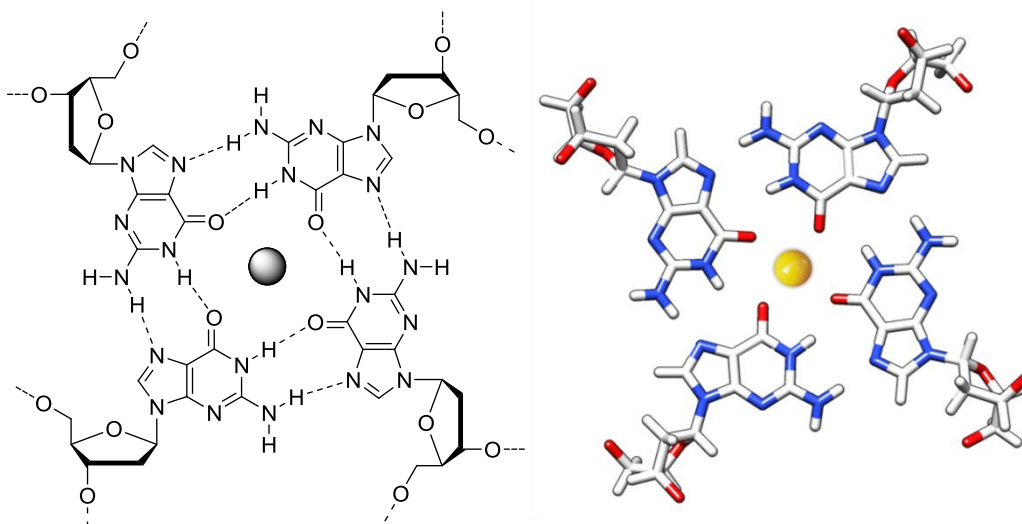


Figure 11 – Structure et représentation moléculaire de l'arrangement de quatre guanosines en tétrade.

3-2 Les quadruplexes de guanines

Les acides nucléiques possédant une séquence riche en guanines sont capables de former en solution des structures complexes composées par l'empilement de tétrades de

guanines (Figure 12) nommées quadruplexe de guanines.²² Ces structures peuvent se former à partir d'un seul brin continu (quadruplexes intramoléculaires) ou à partir de l'association de plusieurs brins (quadruplexes intermoléculaires). Tous les motifs d'ADN et d'ARN quadruplexe possèdent également des bases non appariées qui peuvent former des boucles qui relient les tétrades entre elles. L'ADN quadruplexe intervient dans de nombreux phénomènes biologiques et les topologies accessibles sont nombreuses et variées. La topologie adoptée par un motif quadruplexe dépend du nombre de brins d'ODN intervenant dans la formation du motif, de leur orientation ainsi que de la longueur et de la séquence des boucles reliant ces brins. L'ensemble des caractéristiques de l'ADN quadruplexe sera développé dans le *Chapitre 2*.

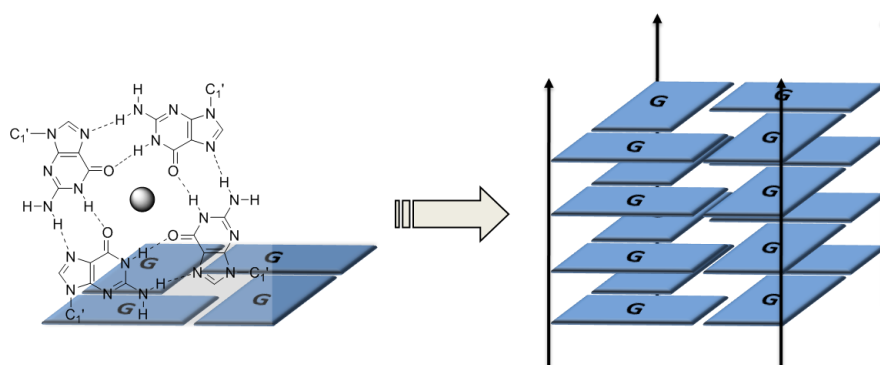


Figure 12 – Représentation schématique d'un empilement de tétrades de guanine formant un motif d'ADN quadruplexe.

La formation, la stabilisation et les caractéristiques des motifs quadruplexes dépendent de la nature des cations en solution. La cavité créée par la formation d'une tétrade de guanines est un site de fixation de cations monovalents. La taille des cations (rayon de Van der Waals) va déterminer le site exact de fixation, par exemple K^+ se positionnera entre deux tétrades alors que Na^+ se positionnera dans le plan d'une tétrade (Figure 13a et b).

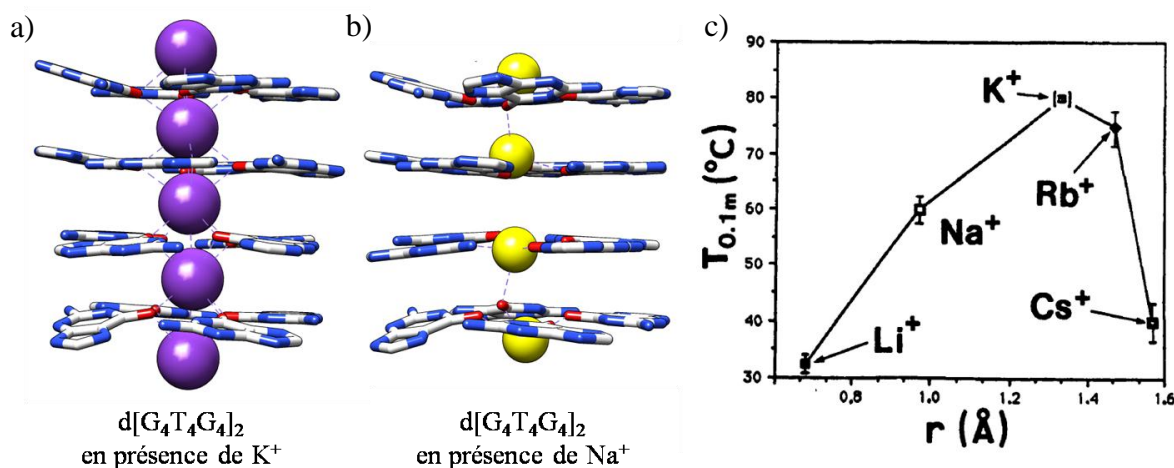


Figure 13 – Localisation des cations a) K^+ (code PDB : 1JPQ) et b) Na^+ (code PDB : 1JB7) dans un motif quadruplexe $d[G_4T_4G_4]_2$ (seules les guanines sont représentées). c) Graphe représentant la température à laquelle 10% du quadruplexe intermoléculaire formé par la séquence $d(CGCGGGGCG)$ est dénaturé en fonction du rayon de Van der Waals de certains cations présents dans le milieu.

Leur capacité à stabiliser un motif quadruplexe dépend également de leur taille. Le graphique présenté sur la Figure 13c montre l'influence de la taille des cations sur la stabilisation d'un motif quadruplexe. Généralement on observe l'effet de stabilisation suivant : K^+ (1.38 Å) > Rb^+ (1.49 Å) ~ Na^+ (1.02Å) > Cs^+ (1.70 Å) > Li^+ (0.74 Å).²³

3-3 Les quadruplexes de cytosines : i-motif

Les séquences riches en cytosines sont capables de former en solution des structures complexes appelées quadruplexe de cytosines ou plus communément i-motif. Ces structures, découvertes par l'équipe de M. Guéron en 1993, sont composées par l'interaction de quatre brins appariés deux à deux par la création de liaisons hydrogènes C.C⁺, les deux « duplexes » se positionnant en antiparallèle.²⁴ La structure formée par l'intercalation des paires C.C⁺ est pH dépendante, dû à la nécessité que l'une des cytosines soit sous forme protonée.

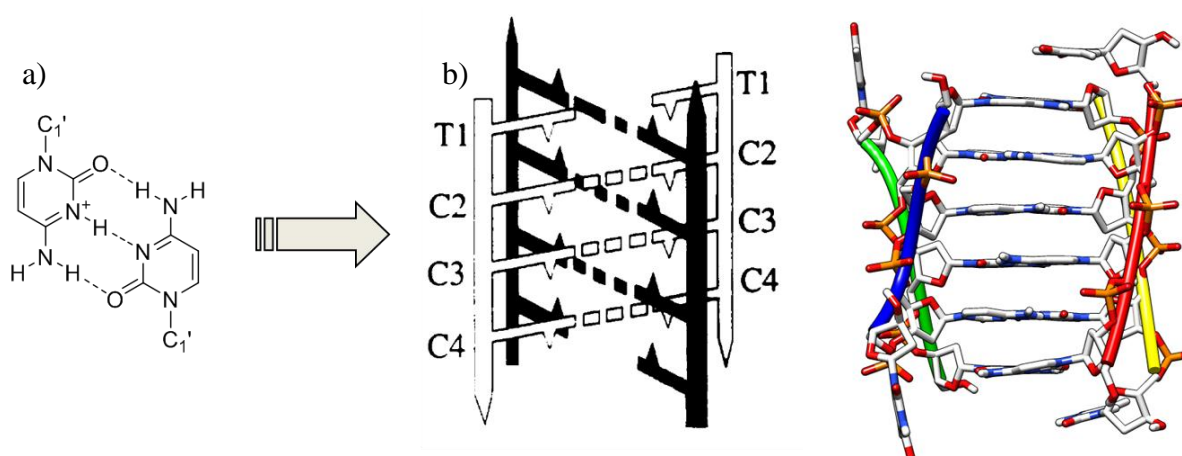


Figure 14 – a) Appariement C.C⁺ responsable de la formation des i-motifs. b) Représentation schématique et modélisation moléculaire du quadruplexe de cytosine d[TCCC]₄ (code PDB : 191D).

Des complexes tétramoléculaires peuvent être formés par l'association intermoléculaire de courts extraits nucléiques riches en cytosine comme d(TCCC) ou d(TCCCCC),²⁵ mais également par le repliement intramoléculaire de séquences plus longues comme la séquence télomérique de *Tetrahymena* d((CCCCAA)₃CCCC).²⁶ L'implication de tel motif dans des phénomènes biologiques reste encore incertaine, mais des séquences particulières du génome ont montré la capacité de former des i-motifs. En plus de la séquence télomérique citée auparavant, on peut citer les séquences d(CCCCTGTCCCC) du minisatellite du gène humain codant pour l'insuline²⁷ ou la séquence d(TCCCGTTTCCA), un

23. Hardin, C. C.; Watson, T.; Corregan, M.; Bailey, C., Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d(CGCG3GCG). *Biochemistry* **1992**, *31* (3), 833-41.

24. (a) Gehring, K.; Leroy, J. L.; Gueron, M., A tetrameric DNA structure with protonated cytosine.cytosine base pairs. *Nature* **1993**, *363* (6429), 561-5; (b) Gueron, M.; Leroy, J. L., The i-motif in nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10* (3), 326-31.

25. Kang, C. H.; Berger, I.; Lockshin, C.; Ratliff, R.; Moyzis, R.; Rich, A., Crystal structure of intercalated four-stranded d(C3T) at 1.4 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91* (24), 11636-40.

26. Leroy, J. L.; Gueron, M.; Mergny, J. L.; Helene, C., Intramolecular folding of a fragment of the cytosine-rich strand of telomeric DNA into an i-motif. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (9), 1600-6.

27. Catasti, P.; Chen, X.; Deaven, L. L.; Moyzis, R. K.; Bradbury, E. M.; Gupta, G., Cytosine-rich strands of the insulin minisatellite adopt hairpins with intercalated cytosine+.cytosine pairs. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272* (3), 369-82.

fragment de la répétition présente au niveau du satellite α centromérique humain qui est reconnu par la protéine CENP-B.²⁸

4/ Caractérisation de la structure secondaire des acides nucléiques par dichroïsme circulaire.

Nous avons montré dans les paragraphes précédents que les acides nucléiques sont capables d'adopter une grande variété de topologies. Le dichroïsme circulaire (Circular Dichroism : CD) est une technique de caractérisation physicochimique très utile et très employée pour caractériser les structures secondaires des acides nucléiques. Ce paragraphe va s'intéresser à présenter cette technique, ainsi que la caractérisation de quelques structures afin de montrer l'apport du CD dans l'étude des acides nucléiques.

Le dichroïsme circulaire est un phénomène physique qui se produit lorsqu'une lumière polarisée circulairement traverse un échantillon contenant un ou plusieurs composés chiraux. Les molécules chirales ne montrent pas la même capacité d'absorption de la lumière polarisée circulairement à gauche et celle polarisée circulairement à droite. Cette différence d'absorption est appelée CD. En pratique, la traversée d'un échantillon chiral par une lumière polarisée circulairement donne en sortie une lumière polarisée elliptiquement. Pour quantifier l'effet CD, nous nous intéresserons à l'ellipticité de la lumière sortante exprimée en milli degrés (mdeg) et notée Θ . On peut également le quantifier grâce à l'expression $\Delta\varepsilon = \varepsilon_G - \varepsilon_D$ [$M^{-1}.cm^{-1}$], où ε_G est le coefficient d'absorption molaire de la lumière polarisée circulairement à droite et ε_D est le coefficient d'absorption molaire de la lumière polarisée circulairement à gauche.

Les exemples et les spectres montrés par la suite sont extraits d'une étude effectuée par l'équipe de J. Kypr.²⁹

Le CD est habituellement utilisé pour obtenir une « signature » de la conformation de l'acide nucléique obtenue. Comme des topologies similaires donnent des spectres CD d'allure similaires, en termes de maxima et de minima, la détermination d'une topologie peut-être effectuée par comparaison des spectres CD.

L'ADN-B est la conformation la plus usuelle des duplexes et son spectre CD est caractérisé par un maximum entre 260 et 280 nm (qui est la longueur d'onde d'absorption maximale des bases nucléiques) et un minimum vers 245 nm. Comme l'absorption de l'ADN dépend de sa composition en bases, la valeur du maximum varie en fonction de la séquence. Le $\Delta\varepsilon$ obtenu est généralement faible car sa géométrie (disposition des bases nucléiques perpendiculaire à l'axe de l'hélice) lui confère une faible chiralité. L'ADN-A, possédant une chiralité plus prononcée, montre un $\Delta\varepsilon$ plus intense. La forme A est caractérisée par un

28. Gallego, J.; Chou, S. H.; Reid, B. R., Centromeric pyrimidine strands fold into an intercalated motif by forming a double hairpin with a novel T:G:G:T tetrad: solution structure of the d(TCCCGTTTCCA) dimer. *J. Mol. Biol.* **1997**, 273 (4), 840-56.

29. Kypr, J.; Kejnovska, I.; Renciuk, D.; Vorlickova, M., Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37 (6), 1713-25.

maximum vers 260 nm et un minimum vers 210 nm. La transition entre l'ADN-B et l'ADN-A est représentée sur la Figure 15A. L'ADN-Z qui possède une hélicité gauche (inverse à celle de l'ADN-B) possède un spectre CD opposé. La forme Z est caractérisée par un maximum vers 260 nm et un minimum vers 290 nm. La transition entre l'ADN-B et l'ADN-Z est représentée sur la Figure 15B.

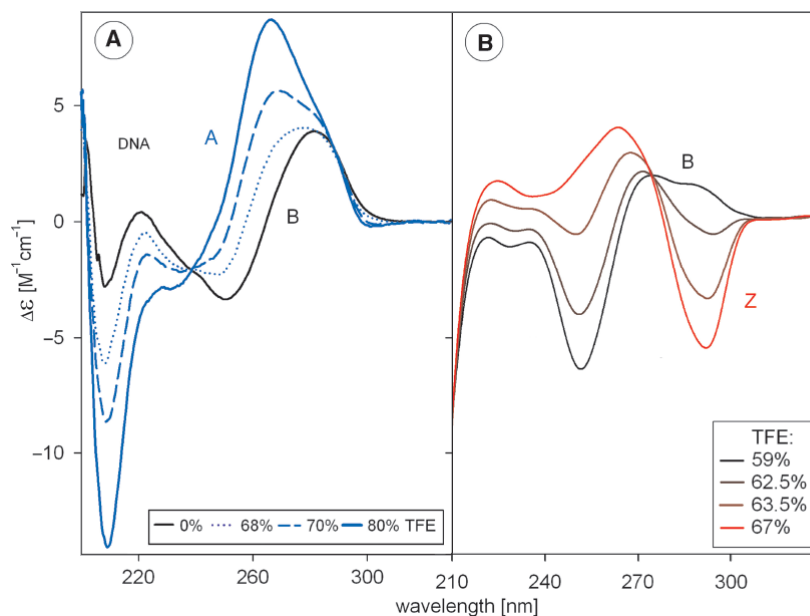


Figure 15 – Transition des formes B à A et B à Z de la double hélice d'ADN induite par l'ajout de TFE suivie par CD. A) Etude du duplexe de séquence d(GCGGCGACTGGTGAGTACGC) et son complémentaire, B) étude d'un duplexe poly[d(GC)].

Les quadruplexes d'acides nucléiques possèdent des spectres CD très caractéristiques utilisables pour déterminer leurs topologies. De par l'ensemble des données expérimentales, une loi empirique a été établie et on différencie deux types de structures particulières : les quadruplexes parallèles (où l'ensemble des brins composant la structure ont la même orientation) et les quadruplexes antiparallèles (où certains brins possèdent des orientations inversées). Le spectre CD d'un quadruplexe parallèle sera caractérisé par un maximum à 260 nm et un minimum à 240 nm et le spectre CD d'un quadruplexe antiparallèle sera caractérisé par un maximum à 290 nm et un minimum à 260 nm. Ces caractéristiques se retrouvent sur le spectre CD du quadruplexe parallèle d[GGGG]₄ et sur les spectres CD du quadruplexe antiparallèles de guanine d[GGGGTTTTGGGG]₂ et du quadruplexe antiparallèle de cytosines formé par la séquence d(TCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCACCCTCCCCA) (Figure 16).

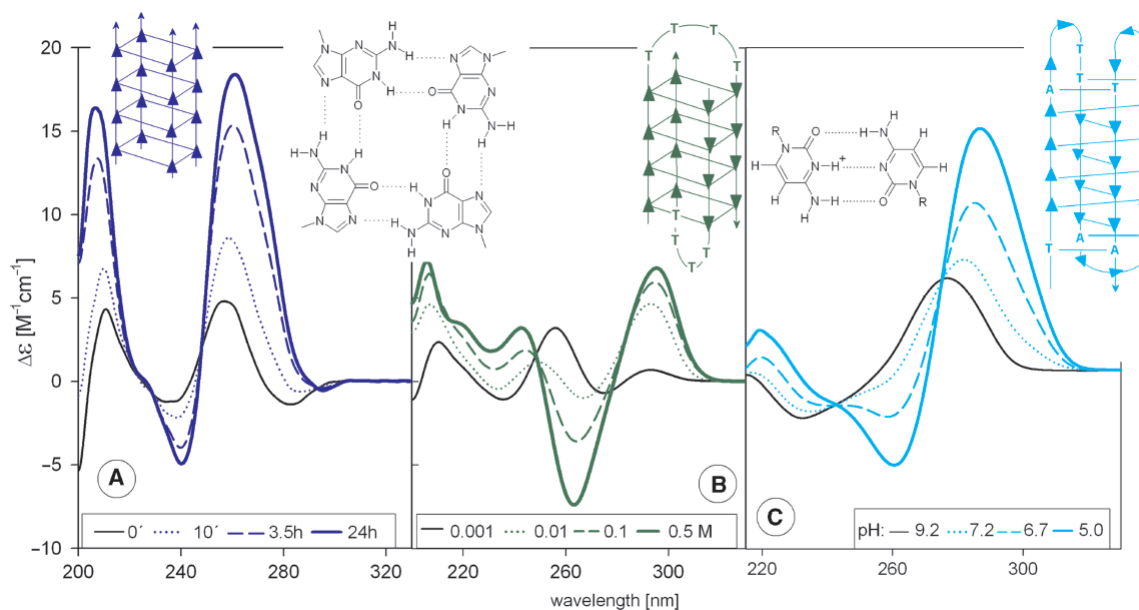


Figure 16 – Spectres CD de motifs quadruplexe. A) Suivi de la formation d'un quadruplexe tétramoléculaire parallèle de guanines d(GGG) stabilisé par 16 mM K^+ . B) Effet de la concentration en Na^+ sur la formation d'un quadruplexe de guanines bimoléculaire antiparallèle d[GGGGTTTGGGG]₂. C) Effet du pH sur la formation d'un quadruplexe de cytosines intramoléculaire à partir de la séquence d(TCCCCACCTTCCCCACCTCCCCACCTCCCCA).

5/ Gabarits et châssis moléculaires

5-1 Concept de préorganisation en chimie supramoléculaire

a) Concept de préorganisation

Les structures présentées précédemment doivent leur structure unique et leur fonction à l'établissement d'interactions non covalentes. Les chimistes organiciens se sont intéressés, ces dernières années, à comprendre et à imiter les structures créées par la nature. La prise de conscience de l'ensemble des interactions non covalentes a mené à la création d'une nouvelle discipline en chimie, baptisée chimie supramoléculaire par Jean-Marie Lehn.³⁰ Dans ce cadre, de nombreuses super architectures ont été synthétisées et étudiées.

Dans la chimie organique « classique », la création de liaisons covalentes est régie principalement par l'enthalpie et les liaisons formées sont généralement cinétiquement stables (bien qu'elles aient pu être formées par des réactions réversibles). Les concepts d'énergie de liaison et d'interaction stéréoelectronique composent le vocabulaire de cette discipline, et la qualité d'une réaction peut être quantifiée par un rendement. En chimie supramoléculaire, les produits sont des structures en équilibre. Ils reflètent un équilibre entre l'enthalpie et l'entropie et les produits formés sont évalués en termes d'énergie thermodynamique minimum. Afin de favoriser la formation des structures voulues, il est possible d'agir sur l'enthalpie et l'entropie des systèmes étudiés. Dans le cas où le but est de synthétiser des architectures qui miment un phénomène biologique, il est difficile de modifier l'enthalpie

30. Lehn, J. M., *Supramolecular Chemistry - Scope and perspectives molecules, supermolecules, and molecular devices*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27 (1), 89-112.

mise en jeu sans modifier la nature des interactions. Il est alors intéressant d'agir sur l'entropie du système en préorganisant les différents partenaires mis en jeu dans la formation des complexes. Ce concept de préorganisation a été introduit par D. J. Cram dans le cadre de la recherche et le développement de petites molécules pour former un complexe ligand-accepteur.³¹ La formation de ce complexe est entropiquement défavorisée de par la liberté de rotation et de translation du ligand par rapport à l'accepteur. La rigidification du système *via* l'introduction de contraintes permet prédisposer les différents partenaires dans une position favorable à une interaction. Ce processus permet de favoriser l'interaction sans en modifier sa nature.

b) Notion de gabarit ou châssis moléculaire

Cette notion de préorganisation a donné lieu, ces dernières années, au développement de châssis ou gabarit moléculaire utilisable pour orienter et disposer dans l'espace de façon contrôlée les différents participants. La Figure 17 présente la structure de différents gabarits utilisés pour développer des protéines synthétiques dont la structure tertiaire est contrôlée. Les gabarits présentés peuvent être classés en trois familles : les gabarits flexibles, les gabarits rigides à présentation plane (les molécules greffées sont dans le plan du châssis) et les gabarits rigides à présentation axiale (les molécules greffées sont perpendiculaires au plan du châssis). Le choix du gabarit permet ainsi de contrôler la force de contrainte exercée sur les éléments ancrés, ainsi que leur disposition dans l'espace. Ces gabarits ont été utilisés pour contraindre des peptides à former des mimes de protéines (anticorps, métalloprotéine, hémoprotéine, ...) en contrôlant la formation d'hélices α (« Helix Bundle Proteins »). La nature des châssis peut être assez diverse allant des oligosaccharides,³² porphyrines,³³ cyclodextrines,³⁴ calixarènes³⁵ aux complexes métalliques.³⁶

31. Cram, D. J., The Design of Molecular Hosts, Guests, and Their Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1009-1020.

32. Jensen, K. J.; Brask, J., Carbohydrates as templates for control of distance-geometry in de novo-designed proteins. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2002**, *59* (5), 859-69.

33. Sasaki, T.; Kaiser, E., Helichrome: Synthesis and Enzymatic Activity of a Designed Hemeprotein. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 380.

34. Villalonga, R.; Cao, R.; Fragoso, A., Supramolecular chemistry of cyclodextrins in enzyme technology. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (7), 3088-116.

35. (a) Hamuro, Y.; Calama, M. C.; Park, H. S.; Hamilton, A. D., A Calixarene with Four Peptide Loops: An Antibody Mimic for Recognition of Protein Surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36* (23), 2680-2683; (b) Huttunen-Hennelly, H. E.; Sherman, J. C., An investigation into the native-like properties of de novo designed cavitation-based four-helix bundle proteins. *Biopolymers* **2008**, *90* (1), 37-50.

36. Ghadiri, M. R.; Soares, C.; Choi, C., Design of an Artificial Four-Helix Bundle Metalloprotein via a Novel Ruthenium(II)-Assisted Self-Assembly Process. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4000-4002.

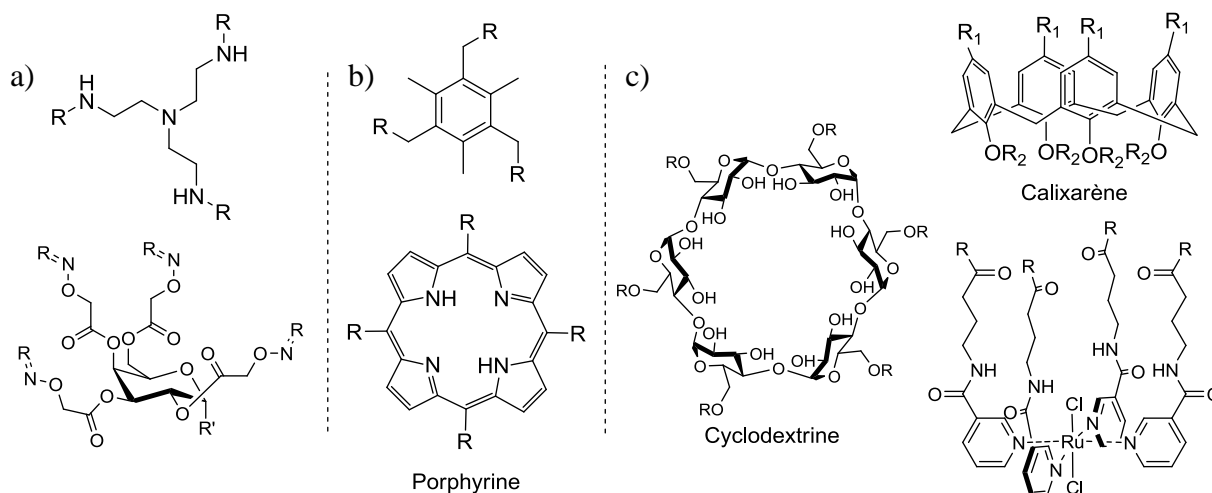


Figure 17 – Structure chimique de molécules utilisées comme gabarits. a) gabarit flexible, b) gabarit rigide à présentation plane et c) gabarit rigide à présentation axiale.

L'utilisation de gabarits permet également de contrôler l'organisation de petites molécules. On pourra citer en exemple, une étude menée par l'équipe de G. M. Whitesides qui utilise un gabarit fonctionnalisé par des mélamines (analogues de nucléobases) pour contrôler la formation de rosettes en solution (Figure 18).³⁷

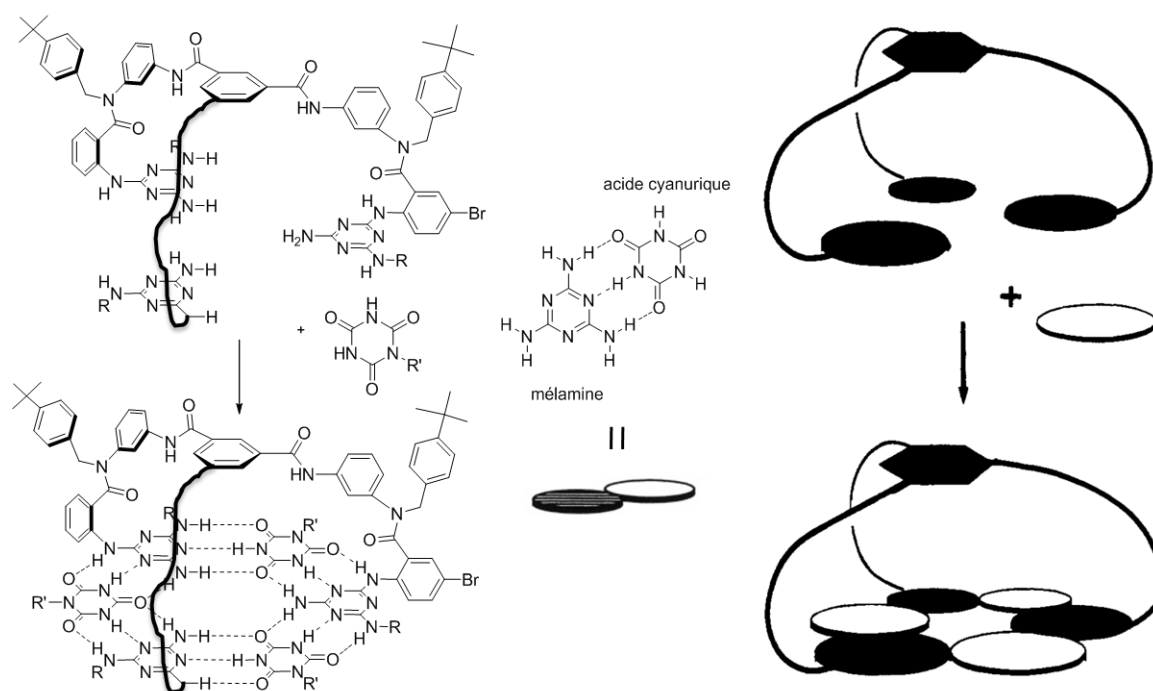


Figure 18 - Système de gabarit trivalent utilisé par l'équipe de G. M. Whitesides pour le contrôle de la formation de rosettes induite par la reconnaissance supramoléculaire de la mélamine (disque noir) et de l'acide cyanurique (disque blanc).

37. Whitesides, G. M.; Simanek, E. E.; Mathias, J. P.; Seto, C. T.; Chin, D. N.; Mammen, M.; Gordon, D. M., Noncovalent Synthesis: Using Physical-Organic Chemistry To Make Aggregates. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 37-44.

De nombreuses équipes se sont intéressées à la stabilisation de structures d'acides nucléiques en utilisant des bras espaceurs synthétiques pour prédisposer les différents brins participant à la formation du complexe. Par exemple, la ligation covalente de deux brins d'ODNs permet de prédisposer à proximité ces deux brins et le duplexe formé montre une meilleure stabilité (Figure 19).³⁸ La liaison covalente peut être créée *via* la formation d'un pont disulfure entre deux fonctions thiol introduites par l'utilisation de bases nucléiques modifiées. Une autre approche consiste à agir sur la géométrie des brins nucléiques. Pour cela, l'utilisation de nucléotides modifiés par des sucres ou analogues de sucre rigides favorisant une conformation adéquate au complexe ciblé a été développée. Un grand nombre d'analogues de sucres ont été synthétisés ces dernières années, on pourra citer, par exemple, les bicyclo-DNAs de C. Leumann,³⁹ les LNAs (« Locked Nucleic Acids ») de J. Wengel⁴⁰ ou les CNAs (« Constrained Nucleic Acids ») de J.-M. Escudier.⁴¹



Figure 19 – Stabilisation de duplexe d'ADN via l'introduction de pont disulfure.

5-2 Utilisation de peptides cycliques comme châssis moléculaire

a) Le concept du TASP

En 1989, l'équipe de M. Mutter propose l'utilisation de gabarits peptidiques cycliques pour la conception de protéines synthétiques. Il baptise le concept envisagé : TASP (Template Assembled Synthetic Protein).⁴² Les peptides utilisés sont des cyclodécapeptides contraints par deux coudes β de type II Proline-Glycine qui induisent une structuration en feuillet β antiparallèle (Figure 21).⁴³ Une étude structurale par diffraction des rayons X montre que les l'ensemble des liaisons peptidiques sont de conformation *trans* avec un repliement du peptide en feuillet β stabilisé par des liaisons hydrogène intramoléculaires. Ce repliement en feuillet β confère une certaine rigidité au gabarit. Les chaînes latérales des six résidus centraux sont orientées de part et d'autre du plan moyen du cycle, ce qui crée deux faces distinctes. La modularité de la synthèse peptidique (choix d'acides aminés et de groupements protecteurs orthogonaux) permet une fonctionnalisation régiosélective et ce type de gabarit permet de

38. Stevens, S. Y.; Swanson, P. C.; Voss, E. W.; Glick, G. D., Evidence for Induced Fit in Antibody-DNA Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1586-1588.

39. Tarköy, M.; Leumann, C., Synthesis and Pairing Properties of Decanucleotides from (3'S,5'R)-2'-Deoxy-3', 5'-ethano β -D-ribofuranosyladenine and -thymine. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32* (10), 1432-1434.

40. Petersen, M.; Wengel, J., LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21* (2), 74-81.

41. Dupouy, C.; Iche-Tarrat, N.; Durrieu, M. P.; Rodriguez, F.; Escudier, J. M.; Vigroux, A., Watson-Crick base-pairing properties of nucleic acid analogues with stereocontrolled alpha and beta torsion angles (alpha,beta-D-CNAs). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45* (22), 3623-7.

42. (a) Mutter, M.; Vuilleumier, S., A chemical approach to protein design - Template Assembled Synthetic Proteins (TASP). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28* (5), 535-554; (b) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G., Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as functional mimetics of proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35* (13-14), 1482-1485.

43. Peluso, S.; Ruckle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M., Crystal structure of a synthetic cyclodécapeptide for template-assembled synthetic protein design. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2001**, *2* (6), 432-7.

contrôler la position et l'orientation des composés greffés. Ce châssis est également connu sous l'acronyme RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template).

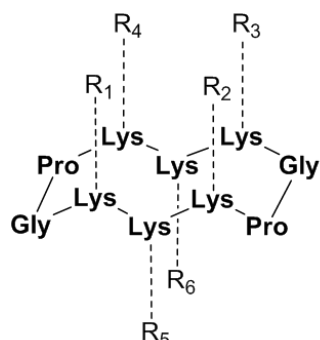


Figure 21 – Structure et représentation tridimensionnelle d'un cyclodécapeptide cyclique $\text{cyclo(L-Lys-L-Lys-L-Lys-L-Pro-L-Gly-L-Lys-L-Lys-L-Lys-L-Pro-L-Gly)}$ « TASP » utilisé comme gabarit pour la conception de protéine synthétique.

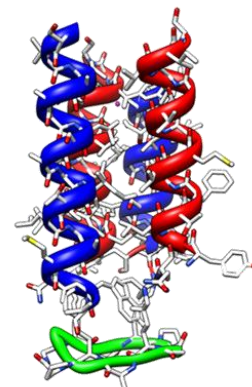
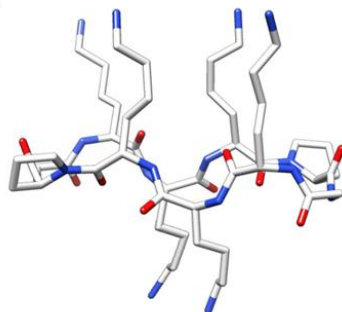


Figure 20 – Contrôle de la formation d'hélice α *via* la préorganisation de peptides utilisant un gabarit peptidique (le ruban vert indique le châssis peptidique).

Ce type de gabarit a été utilisé entre autre par l'équipe de W. Haehnel pour préorganiser des peptides afin d'induire la formation d'hélice α . Le composé obtenu s'avère être un mime du cytochrome b (Figure 20).⁴⁴

b) Exemple d'utilisation de gabarits cyclodécapeptidiques

Ces dernières années, l'équipe *Ingénierie et Interactions BioMoléculaires* (I2BM) du *Département de Chimie et Moléculaire* (DCM), s'est intéressée au développement de l'utilisation de gabarits cyclodécapeptidiques. Deux principes se sont imposés : (1) l'utilisation du châssis comme support multivalent de ligands à intérêt biologique et (2) utilisation du châssis pour la contrainte et la présentation contrôlée de biomolécules (Figure 22). Ainsi ce type de châssis a été utilisé pour la présentation multivalente de carbohydrates de type GalNac pour l'activation des cellules NK⁴⁵ et de conjugués c-RGD pour la vectorisation de composés *via* la reconnaissance des intégrines $\alpha_v\beta_3$.⁴⁶ Ces gabarits ont également été utilisés pour préorganiser des peptides et pour la conception de mimes de fibres amyloïdes.⁴⁷

44. Rau, H. K.; Haehnel, W., Design, synthesis, and properties of a novel cytochrome b model. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (3), 468-476.

45. Renaudet, O.; Krennek, K.; Bossu, I.; Dumy, P.; Kadek, A.; Adamek, D.; Vanek, O.; Kavan, D.; Gazak, R.; Sulc, M.; Bezouska, K.; Kren, V., Synthesis of Multivalent Glycoconjugates Containing the Immunoactive LELTE Peptide: Effect of Glycosylation on Cellular Activation and Natural Killing by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (19), 6800-6808.

46. Boturny, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P., Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (18), 5730-5739.

47. Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J., Control of amyloid beta-peptide protofibril formation by a designed template assembly. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45* (17), 2699-2702.

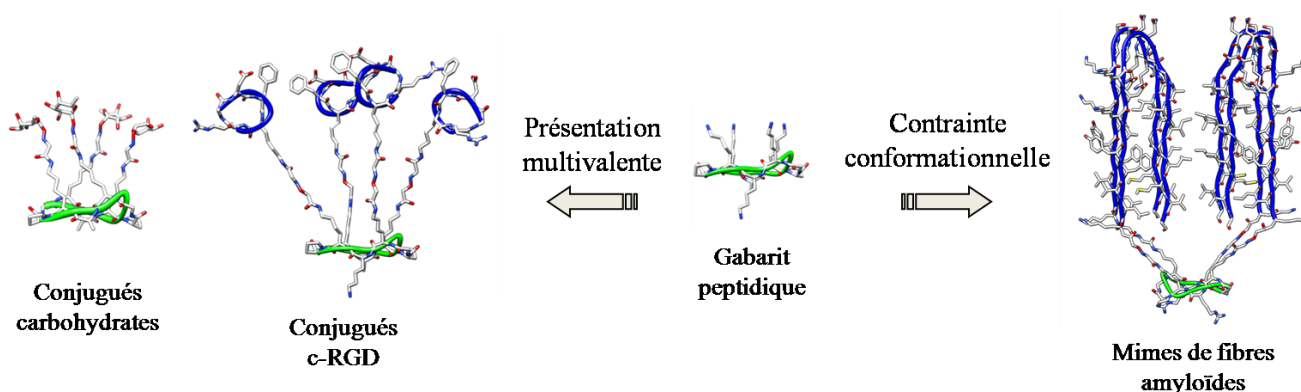


Figure 22 – Utilisations des gabarits TASP et RAFT.

6/ Projet de recherche

Comme décrit auparavant, les acides nucléiques représentent des nano-objets capables de générer des architectures complexes, en particulier par le biais des propriétés d'auto-assemblage de la guanine. Dans ce cadre, mes travaux de thèse visent à utiliser des gabarits cyclodécapeptidiques afin de contraindre la topologie des systèmes basés sur l'auto-assemblage de la guanine.

La première partie de ce manuscrit concerne l'utilisation d'un châssis pour la conception de tétrades de guanines synthétiques. Dans ce but, quatre résidus guanosines ont été adressés sur un gabarit cyclodécapeptidique pour contraindre la formation de liaisons hydrogène entre les nucléobases et favoriser la formation d'une tétrade de guanines en solution dans l'eau (qui est un solvant compétiteur). Notre approche utilise, comme réaction clef, une cycloaddition 1, 3 dipolaire de type Huisgen entre des fonctions alcynes, présentes sur le gabarit peptidique, et des fonctions azides, présentes en 5' d'une guanosine. Les composés obtenus ont, par la suite, été caractérisés par RMN et CD. Une détermination structurale complète a permis de construire un modèle moléculaire présentant les caractéristiques des architectures formées en solution. L'ensemble des résultats concernant cette étude sont présentés dans le *Chapitre 1*.

La deuxième partie de ce manuscrit concerne la conception, la synthèse et la caractérisation de mimes de quadruplexes d'acides nucléiques. Dans ce but, différents ODNs riches en guanines ou en cytosines ont été adressés sur un gabarit cyclodécapeptidique afin de contraindre la formation de motifs quadruplexes de façon contrôlée. Dans un premier temps, nous décrivons la synthèse et la caractérisation d'un mime de quadruplexe intermoléculaire parallèle utilisant la chimie des éthers d'oximes. L'utilisation du gabarit peptidique permet d'immobiliser le mime synthétisé sur une surface afin d'étudier les interactions de petites molécules organiques avec le mime de quadruplexe conçu par Résonance Plasmonique de Surface (SPR). Dans un second temps, nous décrivons l'utilisation de deux chimies orthogonales (chimie des éthers d'oximes et les cycloadditions 1, 3 dipolaires) pour la synthèse de mimes de quadruplexes antiparallèles de cytosines et de guanines. L'ensemble des résultats concernant ces études est présenté dans le *Chapitre 2*.

Le projet de recherche développé dans ce manuscrit de thèse est schématisé sur la Figure 23.

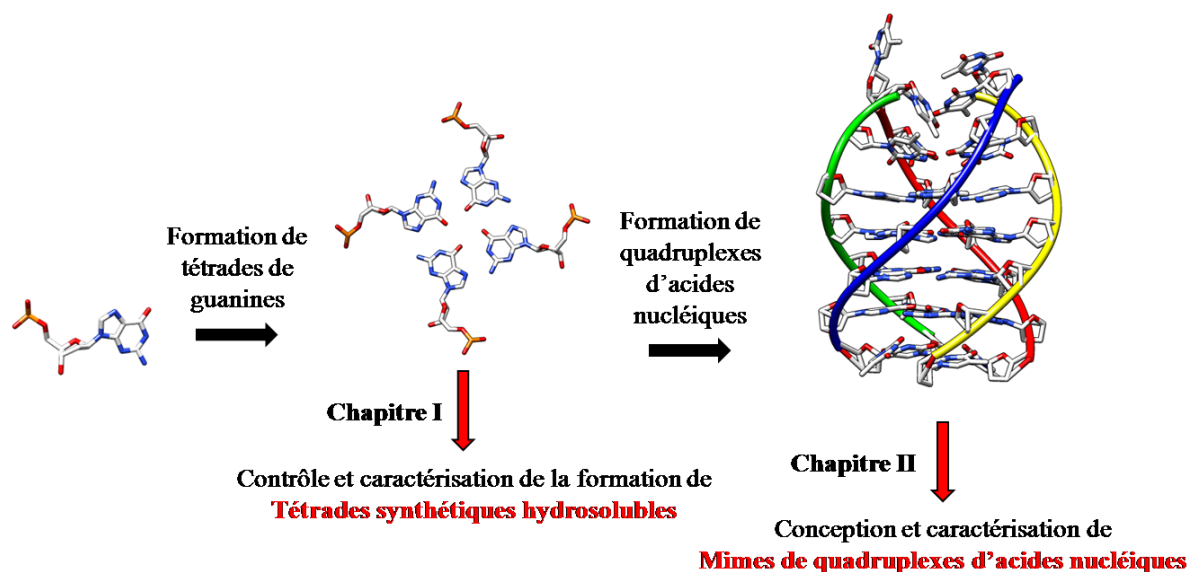


Figure 23 – Schéma illustrant le projet de recherche.

Le travail de recherche effectué montre ainsi que l'utilisation d'un châssis moléculaire permet de contrôler la structuration d'architectures basées sur la formation de liaisons hydrogène. Ces différentes études montrent comment la chimie supramoléculaire et la chimie biomimétique peuvent être utilisées en synergie pour comprendre et étudier des phénomènes complexes intervenant dans des processus biologiques pertinents.

Chapitre I : TETRADES DE GUANINES SYNTHETIQUES

I-1/ Rappel Bibliographique

I-1-1 Auto-assemblage de guanines en solution

Les zoologistes savent depuis longtemps que le noyau purique de la guanine ou de ses dérivés est responsable de la coloration argentée de la peau de certains animaux.⁴⁸ Des cristaux de guanines se retrouvent dans des cellules épidermiques appelées guanophores ou guanocytes. Chez certaines espèces d'araignées, par exemple, *Tetragnatha*, *Leucage* (Tétragnathidae), *Argyrodes* (Thériidiidae), et *Theriddiosoma* (Théridiosomatidae), la guanine se trouve sous la forme de fines plaques qui donnent à l'araignée une couleur argentée (Figure 24).⁴⁹ La contraction (ou la rétractation) des guanophores semble être la cause du changement de couleur de ces araignées.⁵⁰ Ainsi la guanine peut sous certaines conditions former des structures ordonnées qui sont responsables de la coloration de la peau de certains animaux.

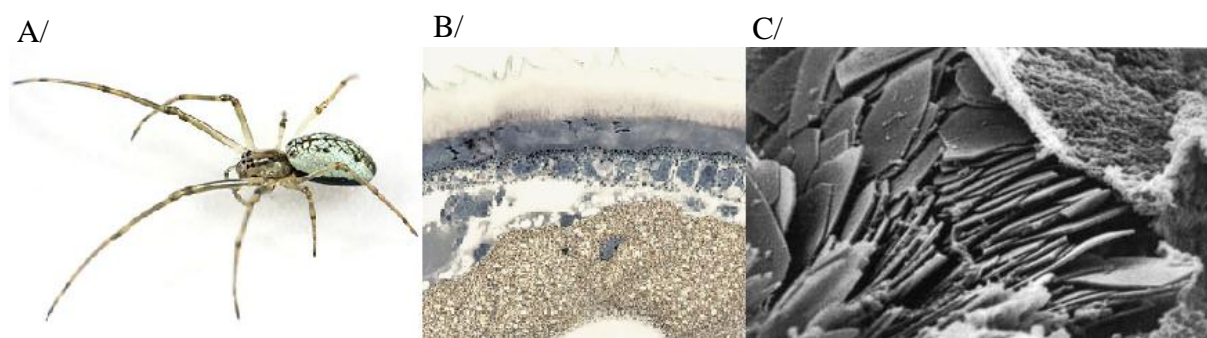


Figure 24 – A/ Photo d'une *Tetragnatha*. B/ Microscopie optique d'une section dorsale de l'opisthosome. C/ Microscopie électronique de cristaux de guanines (approximativement $4 \times 2 \mu\text{m}$).

En 1962, M. Gellert et *coll.* observent que des solutions concentrées (25.0 mg/mL) en acide guanylique (5'-GMP et 3'-GMP sous forme de sel disodique) à pH 5 sont extrêmement visqueuses et forment des gels à basse température.⁵¹ D'après les propriétés optiques des gels et le diagramme de diffraction aux rayons-X des fibres obtenues par le séchage des gels, ce phénomène peut être expliqué par la formation d'une structure hélicoïdale par l'acide guanylique. M. Gellert et *coll.* concluent par l'existence en solution de tétramères planaires formés par l'auto-association de quatre guanines selon des liaisons hydrogène de type Hoogsteen (G-quartet). Les agrégats observés sont formés par l'empilement de ces structures et stabilisés par des liaisons hydrogène entre les sucres et les groupements phosphate. Ces travaux décrivent pour la première fois, les caractéristiques d'auto-association de la guanosine.

48. Sumner, F. B., Vision and Guanine Production in Fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1944**, 30 (10), 285-94.

49. Insausti, T. C.; Casas, J., The functional morphology of color changing in a spider: development of ommochrome pigment granules. *J. Exp. Biol.* **2008**, 211 (Pt 5), 780-9.

50. Oxford, G. S.; Gillespie, R. G., Evolution and ecology of spider coloration. *Annu Rev Entomol* **1998**, 43, 619-43.

51. Gellert, M.; Lipsett, M. N.; Davies, D. R., Helix formation by guanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, 48, 2013-8.

Quarante ans plus tard, J. T. Davis publie une revue décrivant toutes les recherches et innovations découlant de cette découverte.⁵² Cette partie bibliographique va décrire certaines structures ordonnées générées par des dérivés de la guanosine.

a) *Les tétrades de guanosines*

Dix ans après la découverte de M. Gellert, l'équipe de T. Pinnavaia s'intéresse à la formation de G-quartets à pH neutre (ou légèrement basique) et étudie par RMN les paramètres stabilisant ce type de structure. Il observe tout d'abord, en 1975, pour des concentrations importantes en $\text{Na}_2(5'-\text{GMP})$ ($C > 0.4\text{M}$) dans l'eau, des structures ordonnées qui peuvent s'expliquer par l'arrangement hélicoïdal de tétrades de guanines.⁵³ Puis en 1978, il montre que les quartets de guanines sont stabilisés par Na^+ et K^+ .⁵⁴ Ces cations se coordinent aux oxygènes des fonctions carbonyle de chaque quartet. Il propose alors que $\text{Na}_2(5'-\text{GMP})$ forme un octamère en présence de K^+ c'est à dire deux tétrades prenant en sandwich un cation. Pendant longtemps les agrégats formés de cette façon ont été décrits comme petits, principalement composés d'octamères, de dodécamères (trois tétrades de guanines), ou d'hexadécamères (quatre tétrades de guanines). En 1992, l'équipe de W. Eimer montre, par des expériences de diffusion de la lumière (Depolarized Dynamic Light Scattering, DDLS), que les agrégats forment des cylindres de 26Å de diamètre.⁵⁵ Finalement en 2005, l'équipe de G. Wu démontre la forme exacte des architectures formées en solution par RMN DOSY.⁵⁶ Les structures formées sont des cylindres d'un diamètre de 26Å. Pour des concentrations de $\text{Na}_2(5'-\text{GMP})$ comprises entre 18 et 34 %m (pourcentage massique), les cylindres formés ont des longueurs moyennes de 8 à 30 nm, ce qui correspond à l'empilement de 24 à 87 tétrades de guanines (Figure 25). La longueur de ces cylindres augmente lorsque la concentration en GMP augmente. Il est intéressant de constater que la taille des agrégats est insensible à l'ajout de NaCl, bien que la quantité de quartets augmente. L'équipe de L. Spindler montre que les sels de $\text{NH}_4(5'-\text{dGMP})$ forment en solution des architectures similaires et que la présence de K^+ induit la formation de ces structures.⁵⁷

52. Davis, J. T., G-quartets 40 years later: From 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43 (6), 668-698.

53. Pinnavaia, T. J.; Miles, H. T.; Becker, E. D., Self-assembled 5'-guanosine monophosphate. Nuclear magnetic resonance evidence for a regular, ordered structure and slow chemical exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97 (24), 7198-200.

54. Pinnavaia, T. J.; Marshall, C. L.; Mettler, C., Alkali Metal Ion Specificity in the Solution Ordering of a Nucleotide, 5'-Guanosine Monophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100 (11), 3625-3628.

55. Eimer, W.; Dorfmueller, T., Self-Aggregation of Guanosine 5'-Monophosphate Studied by Dynamic Light Scattering Techniques. *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 6790-6800.

56. Wong, A.; Ida, R.; Spindler, L.; Wu, G., Disodium guanosine 5'-monophosphate self-associates into nanoscale cylinders at pH 8: a combined diffusion NMR spectroscopy and dynamic light scattering study. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (19), 6990-8.

57. (a) Spindler, L.; Drevensek-Olenik, I.; Copic, M.; Romith, R.; Cerar, J.; Skerjanc, J.; Mariani, P., Dynamic light scattering and ³¹P NMR spectroscopy study of the self-assembly of deoxyguanosine 5'-monophosphate. *Eur. Phys. J. E. Soft. Matter.* **2002**, 7, 95-102; (b) Spindler, L.; Drevensek-Olenik, I.; Copic, M.; Cerar, J.; Skerjanc, J.; Mariani, P., Dynamic light scattering and ³¹P NMR study of the self-assembly of deoxyguanosine 5'-monophosphate: the effect of added salt. *Eur. Phys. J. E. Soft. Matter.* **2004**, 13 (1), 27-33.

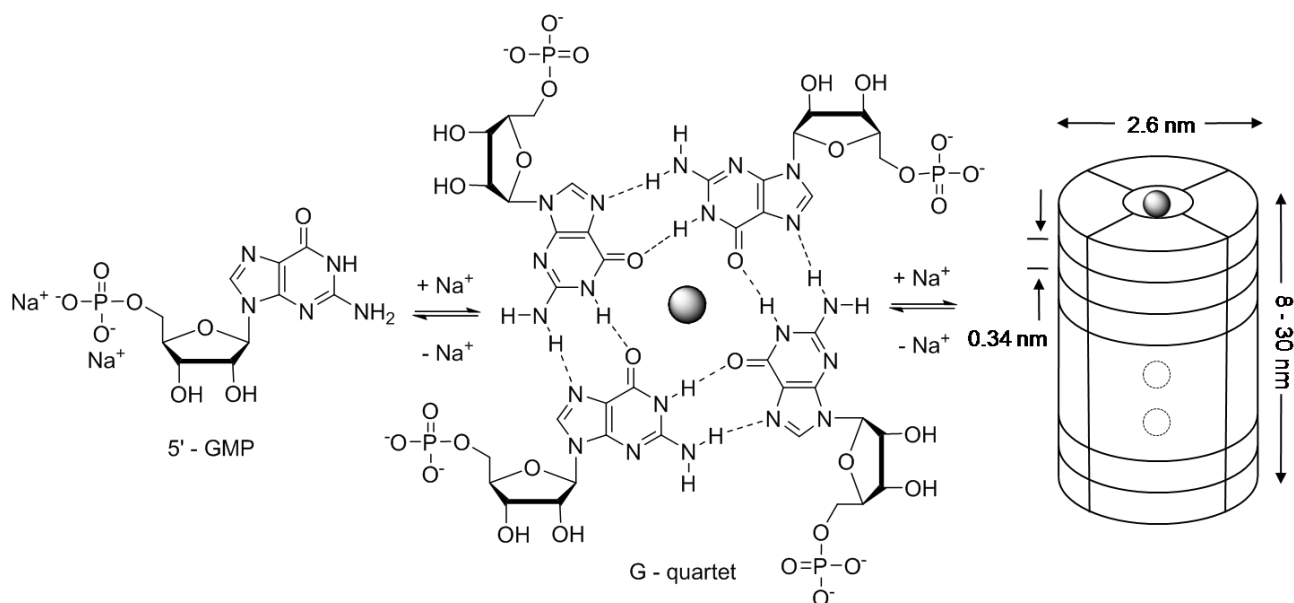


Figure 25 – Représentation schématique des cylindres moléculaires formés par l'auto-association de la Na₂(5'-GMP).

Ces différentes études montrent que les dérivés de la guanosine peuvent former dans l'eau des tétrades de guanines et que leurs empilements donnent accès à d'imposantes architectures supramoléculaires. Néanmoins, la présence de l'eau comme solvant (solvant hautement compétiteur pour l'établissement de liaisons hydrogène) oblige à travailler avec de très hautes concentrations en guanosine ou en présence d'une forte concentration en sel pour stabiliser les édifices formés. Pour étudier plus précisément l'empilement des tétrades de guanines, de nombreuses équipes se sont alors intéressées à développer des analogues lipophiles de la guanosine pour travailler dans des solvants organiques.

b) Structure supramoléculaire des dérivés lipophiles de la guanine

L'équipe de G. P. Spada rapporte que la 3',5'-didécanyol-2'-dG est capable d'extraire le picrate de K⁺ de l'eau dans le CHCl₃ pour former un octamère [dG]₈.K⁺.Pic⁻. Le cation est alors essentiel pour former l'octamère lipophile (Figure 26).⁵⁸

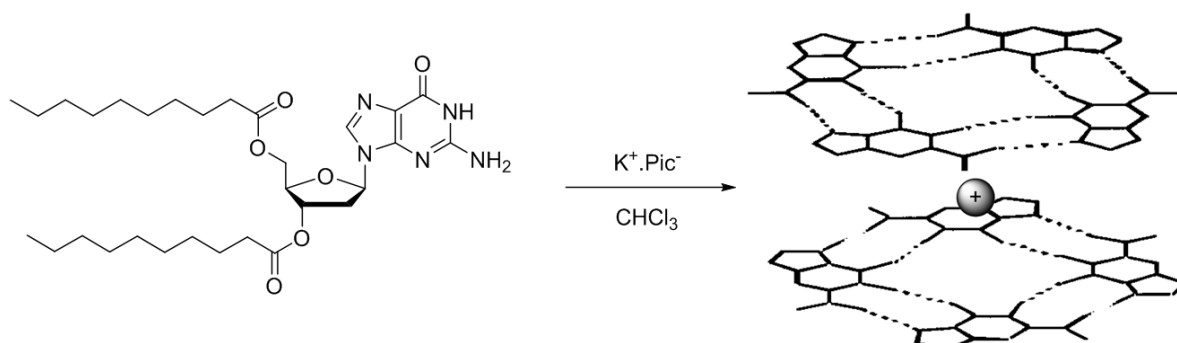


Figure 26 – Octamère lipophile [dG]₈.K⁺ formé par un dérivé lipophile de la guanosine par l'extraction du picrate de potassium de l'eau.

58. Davis, J. T.; Spada, G. P., Supramolecular architectures generated by self-assembly of guanosine derivatives. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36 (2), 296-313.

Afin de mieux comprendre comment les quartets de guanines s'organisent, l'équipe de J. T. Davis en collaboration avec l'équipe de G. Gottarelli s'intéresse à la détermination structurale des édifices formés par des dérivés lipophiles de la guanosine. En 1999, ils montrent par une étude RMN que l'octamère $[dG]_8.KI$ formé par la 3',5'-didécanoyl-2'-dG existe sous la forme d'un unique diastéréoisomère présentant un K^+ coordonné entre deux tétrades, dont une présentant toutes les bases en *syn* et l'autre les présentant en *anti*.⁵⁹ En 2000, une structure aux rayons X montre que les quadruplexes lipophiles sont formés avec une grande diastéréosélectivité dans les solvants organiques. Le complexe généré par la 5'-silyl-2',3'-isopropylidene guanosine, *via* l'extraction de l'eau du picrate de K^+ , est composé de quatre tétrades empilées $[G]_{16}.3K^+.Cs^+.4Pic^-$ (Figure 27).⁶⁰ En plus de la stabilisation amenée par le cation, les quatre anions picrates forment des liaisons hydrogène avec le groupe amino N2 des guanines composant les deux tétrades du centre de la structure. Le G-quadruplexe lipophile ainsi formé ressemble à un canal ionique et cette particularité va être utilisée pour développer des nanostructures fonctionnelles.

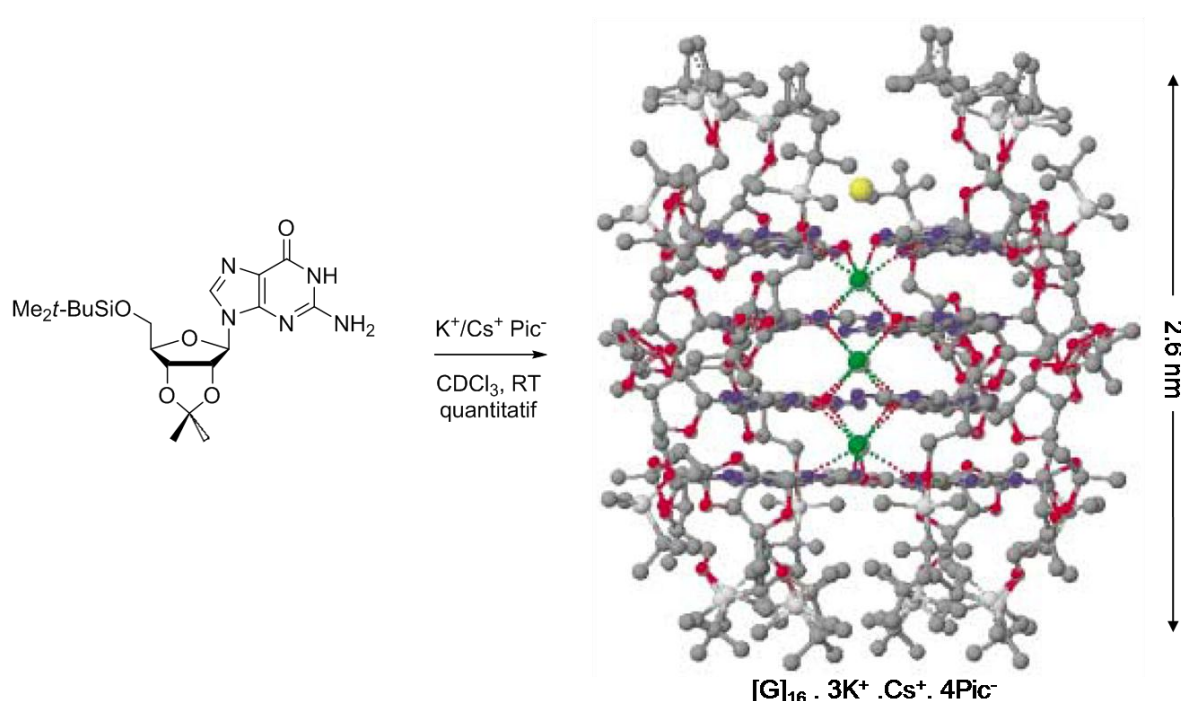


Figure 27 – Structure cristalline de l'édifice formé par la 5'-silyl-2',3'-isopropylidene guanosine. Les atomes de carbone sont représentés en gris, les oxygènes en rouge, les azotes en bleu, le potassium en vert et l'atome de césium en jaune.

La formation de telle structure est très dépendante de la présence et de l'absence de cation. En effet en absence de cation, les dérivés lipophiles, comme la 3',5'-didécanoyl-2'-dG, s'organisent en structure totalement différente appelée « ruban de guanines ». Ainsi en changeant les substituants ou la nature du solvant, on peut avoir accès à deux types de motifs

59. Marlow, A. L.; Mezzina, E.; Spada, G. P.; Masiero, S.; Davis, J. T.; Gottarelli, G., Cation-Templated Self-Assembly of a Lipophilic Deoxyguanosine: Solution Structure of a K^+ -dG₈ Octamer. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5116-5123.

60. Forman, S. L.; Fettingner, J. C.; Pieraccini, S.; Gottarelli, G.; Davis, J. T., Toward Artificial Ion Channels: A Lipophilic G-Quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4060-4067.

représentés sur la Figure 28.⁶¹ Ce type de structure trouve des applications dans le domaine de l'électronique moléculaire.⁶²

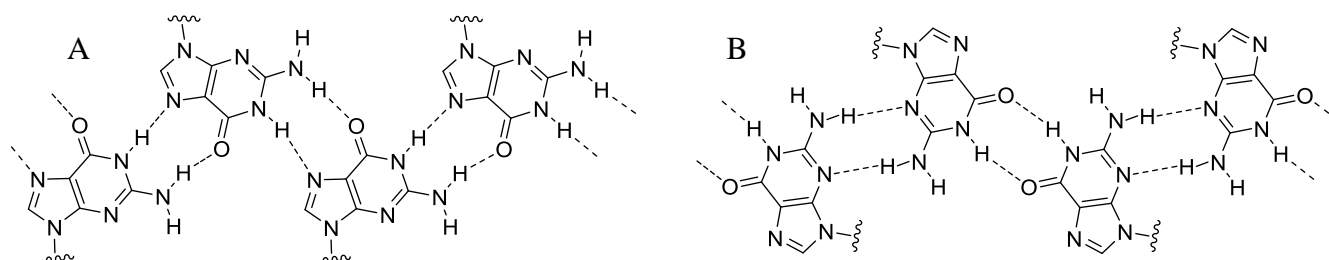


Figure 28 – Deux assemblages différents de rubans de guanines formés par des dérivés lipophiles de la guanosine en absence de cations. En fonction de la nature des substituants, on peut obtenir des arrangements de type ruban A ou B.

L'équipe de J. Sessler montre, en 2000, que des dérivés lipophiles de guanosine contraints en conformation *syn* peuvent néanmoins former des tétrades en l'absence de cation.⁶³ L'addition d'un groupement encombrant comme la diméthylaniline en C8 de la guanine permet de bloquer la conformation de la base en *syn*. L'utilisation de la 2',3',5'-(isobutyryl)-8-(*N,N*-diméthylaniline)guanosine permet d'obtenir exclusivement des structures en G-quartet (Figure 29). Cette étude permet de montrer que la formation d'une tétrade est possible en l'absence de cation et que la conformation *syn* défavorise la formation de structure en ruban.

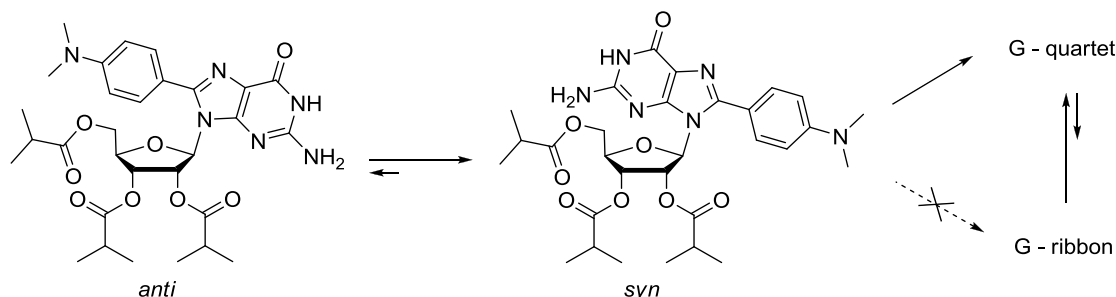


Figure 29 – Dérivé de guanosine contraint en conformation *syn* qui forme en absence de cation exclusivement des structures en quartet.

Néanmoins, étant donné l'importance des cations dans ce type de structure, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'étude des sites de coordination de ces cations. Par exemple, l'équipe de G. Wu a identifié par RMN du solide du ^{23}Na et ^{39}K la spécificité des

61. Giorgi, T.; Grepioni, F.; Manet, I.; Mariani, P.; Masiero, S.; Mezzina, E.; Pieraccini, S.; Saturni, L.; Spada, G. P.; Gottarelli, G., Gel-like lyomesophases formed in organic solvents by self-assembled guanine ribbons. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8 (9), 2143-52.

62. Rinaldi, R.; Maruccio, G.; Biasco, A.; Arima, V.; Cingolani, R.; Giorgi, T.; Masiero, S.; Spada, G. P.; Gottarelli, G., Hybrid molecular electronic devices based on modified deoxyguanosines. *Nanotechnology* **2002**, 13, 398-403.

63. Sessler, J. L.; Sathiosatham, M.; Doerr, K.; Lynch, V. V.; Abboud, K. A., A G-Quartet Formed in the Absence of a Templating Metal Cation: A New 8-(*N,N*-diméthylaniline)guanosine Derivative. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39 (7), 1300-1303.

cations pour le canal ionique formé par des dérivés lipophiles de la guanosine.⁶⁴ Ces études permettent de montrer que les sites de fixation peuvent être très différents et représentent un modèle pour déterminer les tenants et aboutissants de l'interaction de Na^+ et K^+ avec les motifs d'ADN quadruple. L'équipe de J. T. Davis montre qu'une structure similaire à celle décrite Figure 27 peut être stabilisée par des cations divalents comme Ba^{2+} et Sr^{2+} .⁶⁵ Les complexes obtenus peuvent s'avérer être plus stables que ceux formés avec des cations monovalents. Cette meilleure stabilisation est attribuée à la création de dipôles plus forts entre les cations et les oxygènes des nucléobases.

Cette dépendance aux cations permet de développer des systèmes supramoléculaires dynamiques. Récemment, l'équipe de P. Samori montre que le passage d'une structure de type G-quartet à une structure de type ruban de guanines est possible *via* le contrôle de la disponibilité des cations en solution.⁶⁶ Un dérivé lipophile de guanosine (Figure 30) forme en solution une structure de type ruban A, cette structuration peut être imagée par des études en microscopie STM (Scanning Tunneling Microscopy). Lors de l'ajout de cations (K^+), la guanosine lipophile forme spontanément une structure en G-quartet. Cette conversion réversible peut être contrôlée par l'ajout d'un cryptand qui en piégeant le cation va déplacer l'équilibre en faveur des rubans de guanines.

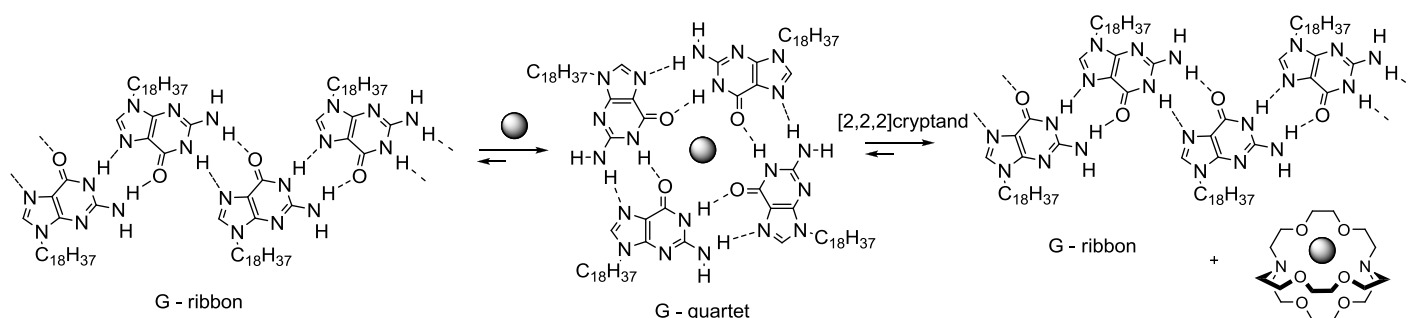


Figure 30 – Représentation schématique du processus d'interconversion réversible entre une structure en ruban de guanine et une structure en G-quartet par le contrôle de la disponibilité de K^+ par un cryptand.

Ces différents travaux montrent que les dérivés lipophiles de guanosine peuvent former en solution des structures complexes, comme des tétrades de guanines ou des rubans de guanines. La présence d'un cation semble être nécessaire dans la majorité des cas et permet de contrôler la structure. Il est intéressant de constater qu'une tétrade de guanines isolée semble ne pas être thermodynamiquement stable en solution et qu'un octamère ou de plus

64. (a) Wong, A.; Fettingner, J. C.; Forman, S. L.; Davis, J. T.; Wu, G., The sodium ions inside a lipophilic G-quadruplex channel as probed by solid-state ^{23}Na NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (5), 742-743; (b) Wu, G.; Wong, A.; Gan, Z.; Davis, J. T., Direct detection of potassium cations bound to G-quadruplex structures by solid-state ^{39}K NMR at 19.6 T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (24), 7182-7183.

65. Shi, X.; Mullaugh, K. M.; Fettingner, J. C.; Jiang, Y.; Hofstadler, S. A.; Davis, J. T., Lipophilic G-quadruplexes are self-assembled ion pair receptors, and the bound anion modulates the kinetic stability of these complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (36), 10830-41.

66. Ciesielski, A.; Lena, S.; Masiero, S.; Spada, G. P.; Samori, P., Dynamers at the solid-liquid interface: controlling the reversible assembly/reassembly process between two highly ordered supramolecular guanine motifs. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49* (11), 1963-6.

grandes structures sont toujours observés. En effet l'empilement de plusieurs tétrades stabilise les édifices formés.

I-1-2 Tétrades de guanine synthétiques

Pour stabiliser une tétrade isolée, différentes équipes ont proposé l'utilisation de gabarit moléculaire pour contraindre quatre guanosines en quartet. Le premier exemple vient de l'équipe de J. T. Davis qui, en 2003, propose l'utilisation d'un conjugué calixarène-guanosine pour contraindre la formation de tétrade.⁶⁷ Le composé synthétisé se présente sous la forme d'un calixarène 1,3-alterné présentant quatre guanosines fixées *via* un lien amide (Figure 31). Le composé obtenu présente une faible solubilité dans le CDCl_3 anhydre et son spectre RMN ^1H montre que les guanosines ne sont pas organisées. En présence d'eau (CDCl_3 saturé en eau), le produit est beaucoup plus soluble et son spectre RMN ^1H montre un dédoublement du pic de la région imino traduisant la formation d'un dimère. Le dimère obtenu possède la propriété d'extraire des sels, comme NaCl ou KBr, d'une phase aqueuse dans la phase organique. Le dimère se comporte ainsi comme un récepteur de paire d'ions et présente une légère sélectivité pour K^+ vs Na^+ et pour Br^- vs Cl^- . Les cations vont se complexer au niveau de la tétrade de guanines et les anions grâce au NH des fonctions amides. Plus intéressant l'addition de NaBPh_4 mène à un phénomène de polymérisation et de précipitation.

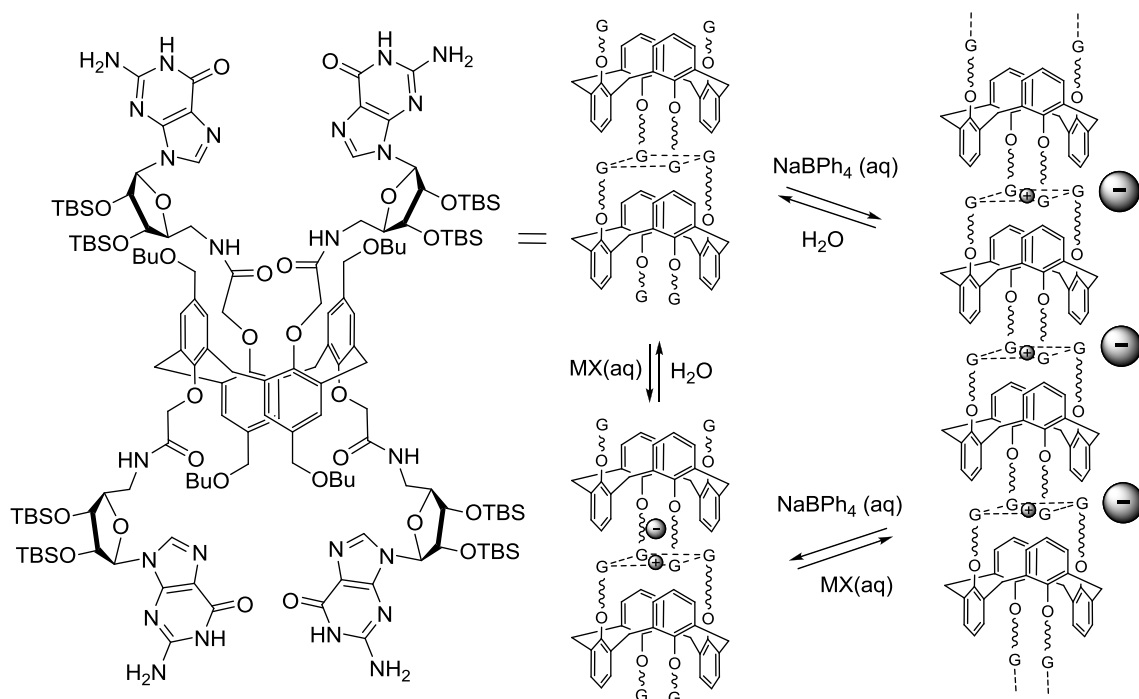


Figure 31 – Tétrade synthétique contrainte par l'utilisation d'un calixarène 1,3-alterné.

67. Kotch, F. W.; Sidorov, V.; Lam, Y. F.; Kayser, K. J.; Li, H.; Kaucher, M. S.; Davis, J. T., Water-mediated association provides an ion pair receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (49), 15140-50.

Cette étude montre qu'une tétrade de guanines peut se former en l'absence de cation en utilisant une molécule d'eau pour combler la cavité formée par le quartet. Le dimère formé peut être utilisé comme récepteur ditopique en présence d'anions de petites tailles. L'utilisation d'anions de grande taille induit la polymérisation des complexes. Finalement cette étude montre que l'utilisation d'un gabarit pour préorganiser les nucléobases permet l'obtention de quartet isolé.

Ce principe de préorganisation qui est un des piliers de la chimie supramoléculaire va être utilisé par l'équipe de J. Sherman pour mettre au point une tétrade synthétique. En 2008, il propose l'utilisation d'un cavitand pour la présentation contrainte de quatre guanosines (Figure 32).⁶⁸ Le concept a été baptisé TASQ (Template-Assembled Synthetic G-Quartets) et le composé préparé possède la propriété de former une tétrade de guanines dans le CDCl_3 en l'absence de cation. La tétrade formée se montre stable pour des températures allant jusqu'à 50°C . Néanmoins dans le $\text{DMSO}[D_6]$ (solvant compétiteur pour l'établissement de liaisons hydrogène), le composé n'est pas structuré.

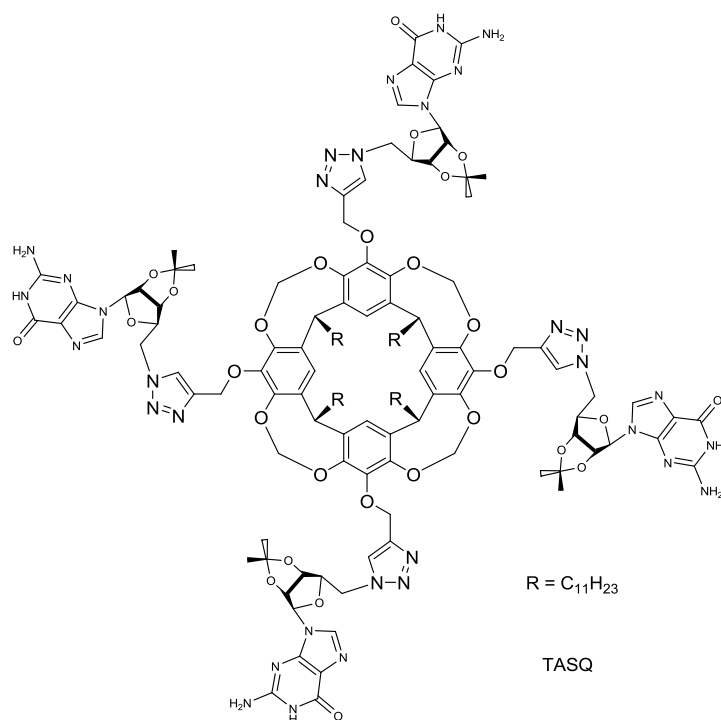


Figure 32 – Tétrade synthétique TASQ proposée par Sherman et coll.

Cette étude fournit le premier exemple de tétrade isolée sans cation dans un solvant organique. Par la suite, l'équipe de Sherman s'est intéressée à l'étude de la complexation de différents cations.⁶⁹ Le TASQ montre la sélectivité suivante : $\text{Sr}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$. Mais le comportement du TASQ et les structures obtenues dépendent de la nature du cation. Si la fixation de Na^+ et de Sr^{2+} ne modifie que très peu la structure du composé, la présence de K^+

68. Nikan, M.; Sherman, J. C., Template-assembled synthetic G-quartets (TASQs). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47 (26), 4900-2.

69. Nikan, M.; Sherman, J. C., Cation-complexation behavior of template-assembled synthetic G-quartets. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (15), 5211-8.

et de Cs^+ permet la formation d'un dimère en solution. Lors de cette étude les spectres CD du TASQ, libre et complexé, ont été enregistrés dans le chloroforme et dans le DMSO (Figure 33). La publication précise que les spectres CD du TASQ montrent un minimum à 260 nm et deux maxima à 240 nm et 290 nm dans le chloroforme quel que soit le complexe et seule l'intensité des pics varie en fonction de la nature du cation. Néanmoins on peut remarquer que l'espèce libre présente un épaulement vers 285nm (non précisé dans la publication) qui n'est pas présent pour les autres espèces. Comme le cavitand et les triazoles sont deux chromophores qui absorbent dans la même région que la guanine, leur contribution au spectre n'est pas négligeable et les bandes observées ne peuvent pas être attribuées seulement à la tétrade de guanines. Finalement il est intéressant de constater que le spectre dans le DMSO ne montre aucun pic particulier, ce qui montre que la présence d'un solvant polaire détruit toute organisation.

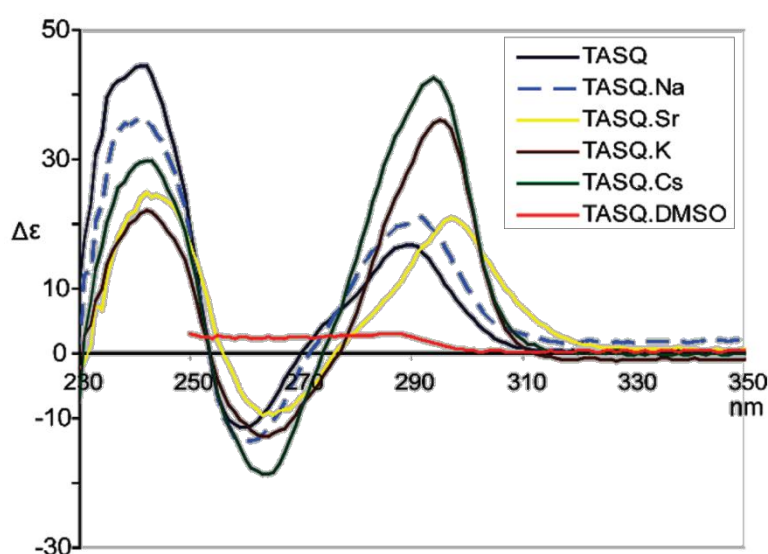


Figure 33 – Spectres CD du TASQ, enregistrés par l'équipe de Sherman, libre et complexé par différents cations dans CHCl_3 et DMSO.

I-2 Synthèse et caractérisation de tétrades de guanines synthétiques hydrosolubles.

I-2-1 Introduction

Le contrôle et l'étude d'architectures du type tétrades de guanines représentent un défi pour le chimiste. De nombreuses équipes se sont intéressées aux paramètres influant sur la formation des tétrades de guanosines et au développement de systèmes capables de former ce type de motifs. Les rappels bibliographiques précédents nous montrent qu'il est possible d'utiliser des gabarits pour contrôler et forcer l'autoassociation de dérivés de la guanosine. Néanmoins toutes ces études ont été réalisées dans des solvants organiques et ceci pour une raison principale : l'eau est un solvant compétiteur pour l'établissement de liaisons hydrogène. Ainsi l'utilisation d'un solvant organique apolaire favorise la formation de structures discrètes basées sur la reconnaissance de motifs accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène. Nous nous sommes intéressés au développement de systèmes similaires mais possédant la capacité de se structurer en milieu aqueux. Cette partie s'intéresse à la synthèse, la caractérisation et à la modélisation de composés synthétiques hydrosolubles induisant la formation de tétrades de guanines dans l'eau.

I-2-2 Stratégie de synthèse et études préliminaires

a) Présentation

Les gabarits cyclodécapeptidiques, de type TASP, ont montré leur capacité à structurer et organiser les éléments greffés. Ils possèdent également l'avantage de posséder une bonne solubilité dans l'eau, grâce à leur structure polypeptidique. De plus, ils possèdent, sur leur face supérieure (voir Figure 21), quatre résidus fonctionnalisables. Nous avons alors décidé d'utiliser ce type de gabarit pour contrôler la disposition de quatre guanosines, greffées sur un gabarit peptidique, pour les contraindre à former une tétrade. Pour cela, il a été nécessaire de choisir une chimie compatible à la fois pour les peptides et les nucléosides. Différents essais ont été effectués et sont présentés par la suite.

b) Études préliminaires

Différentes stratégies de synthèse ont été envisagées pour la conception de tétrades de guanines synthétiques. Ces voies, au nombre de quatre, sont présentées sur la Figure 34.

La première voie de synthèse envisagée (voie A) utilise la réactivité de groupements alcool primaire présents sur le gabarit **6** possédant quatre sérines (Figure 34A). La réaction de phosphorylation avec le 5'-diméthoxytrityl-*N*-isobutyryl-2'-déoxyguanosine,3'-[(2-cyanoéthyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite **7**, doit conduire au composé **8** par la formation de quatre liens phosphodiesters. Les conditions de couplage classique ont été utilisées,⁷⁰ mais des problèmes de solubilité du gabarit n'ont pas permis d'observer un

70. Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H., Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22 (20), 1859-1862.

couplage. L'utilisation de la chimie des phosphoramidates a été par la suite envisagée (voie B). Pour cela, le gabarit **9** présentant quatre fonctions amines a été synthétisé (Figure 34B). Les tentatives de couplage avec le 5'-diméthoxytrityl-*N*-isobutyryl-2'-deoxyguanosine,3'-(2-cyanoéthyl)-H-phosphonate **10**, selon une réaction d'oxydation amidative dans le CCl_4 ,⁷¹ ont également échoué à cause de problèmes de solubilité et le composé **11** n'a pas pu être isolé.

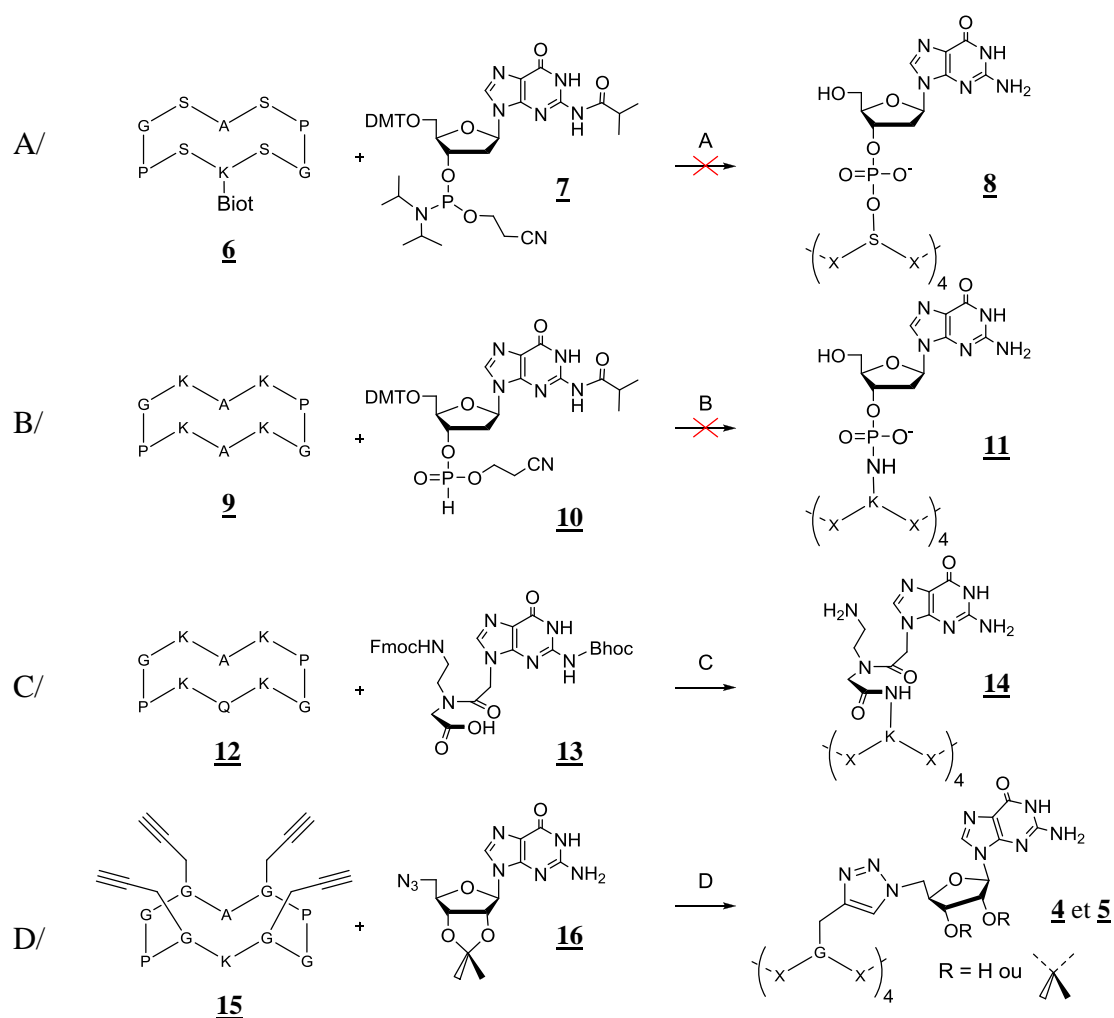


Figure 34 – Architectures envisagées pour le développement et l'étude de tétrades de guanines synthétiques. Chacune des voies envisagées utilise une chimie différente. Voie A : Utilisation de phosphoramidites pour la création de liens phosphodiesters, Voie B : Utilisation de H-phosphonates pour la création de liens phosphoramidates, Voie C : Utilisation de monomère de PNA pour la création de liens peptidiques et voie D : Ligations chimiosélectives.

Pour résoudre ces problèmes de solubilité, nous avons décidé d'utiliser les analogues de nucléosides que sont les monomères d'acide nucléique peptidique (Peptide Nucleic Acids PNA). Le composé **14** est alors obtenu *via* un couplage peptidique entre le gabarit **12** présentant quatre fonctions amines et le monomère *N*-((*N*2-(Benzhydryloxycarbonyl)guan-9-yl)acétyl)-*N*-(2-Fmoc-aminoéthyl)glycine **13** (Fmoc-PNA-G(Bhoc)-OH). Le couplage s'effectue dans le DMF en utilisant HBTU comme agent de couplage. Après déprotection et purification par RP-HPLC le produit **14** est obtenu avec 36% de rendement (voir la *Partie expérimentale* pour les détails de synthèse).

71. Abraham, T. W.; Wagner, C. R., A Phosphoramidite-Based Synthesis of Phosphoramidate Amino Acid Diesters of Antiviral Nucleosides. *Nucleosides & Nucleotides* **1994**, *13* (9), 1891-1903.

La capacité du composé **14** à former une tétrade en solution a été évaluée par des expériences RMN. Malheureusement, les expériences réalisées montrent que les guanines greffées sur le gabarit restent désordonnées. Le spectre RMN ^1H du composé **14** dans le DMSO est représentatif des dérivés de guanosines libres en solution avec les protons imino qui résonnent sous forme de singulet à $\delta = 10.71$ ppm (Figure 35a). Dans l'eau et en présence de cations (KCl 1M), le signal correspondant aux protons imino n'est plus observable, ce qui montre que ces protons sont en échange rapide avec le solvant et donc qu'ils ne participent pas à la formation de liaisons hydrogène. Le composé **14** ne montre ainsi aucune structuration particulière en solution.

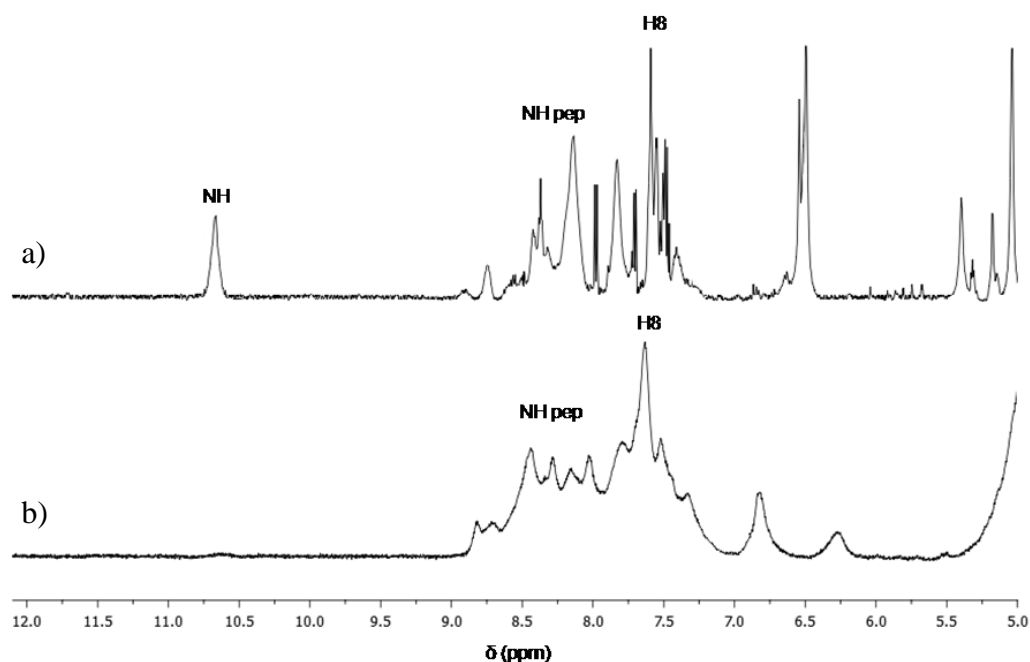


Figure 35 – Spectre RMN ^1H à 10°C du composé **14** dans a) le DMSO[D6] et b) dans un mélange H₂O/D₂O (90/10, v:v), KCl 1M.

c) *Sélection des candidats **4** et **5***

L'incapacité du composé **14** à se structurer en solution peut être due à deux phénomènes : (1) les bras espaceurs reliant les guanosines et le gabarit sont trop longs et trop flexibles (chaîne latérale de la lysine plus le corps du monomère PNA), (2) la conformation des guanosines n'est pas contrôlée et la prédisposition souhaitée n'est pas effective. Afin de raccourcir les bras espaceurs, nous avons décidé de travailler avec un acide aminé présentant la chaîne latérale la plus courte possible et d'utiliser une ligature chimique adéquate. Le choix s'est finalement porté sur la fixation des guanosines sur des résidus propargyle glycine *via* une réaction de cycloaddition 1, 3 dipolaire de type Huisgen. Afin de contraindre les guanosines dans une conformation adéquate à la formation d'une tétrade un groupement isopropylidène a été introduit sur les riboses. En effet la présence de ce type de groupement est connue pour induire une conformation C_{3'}-endo qui favorise un angle de torsion glycosidique en *syn*, qui favorise lui-même la formation de tétrades de guanines.⁶³

I-2-3 Tétrades de guanines synthétiques hydrosolubles

Les composés obtenus selon la voie D (Figure 34D), sont capables de former des tétrades en solution et les paragraphes suivants vont décrire la synthèse et les études de caractérisation menées sur ce type d'architecture.

a) Synthèse des composés **4** et **5**

Les composés **4** et **5** sont obtenus à partir du gabarit peptidique **15** présentant quatre fonctions alcyne (Figure 36). Ces fonctions alcyne sont introduites lors de la synthèse en phase solide (SPPS) du peptide linéaire **17** via l'introduction d'un acide aminé modifié, la propargylglycine (*Pra*). La synthèse du peptide linéaire est réalisée sur une résine Fmoc-Gly-Sasrin[®] et les acides aminés sont incorporés lors de la SPPS en stratégie Fmoc/*t*Bu. La synthèse du peptide est initiée à partir d'un résidu glycine achiral de façon à éviter les phénomènes d'épimérisation qui peuvent se produire lors de l'étape de cyclisation. Le résidu lysine est introduit pour augmenter la solubilité de l'édifice final dans l'eau et permettre une fonctionnalisation ultérieure. Après la séparation du peptide **17** du support solide en milieu acide, le peptide linéaire **18** est cyclisé en solution pour obtenir **19**. La cyclisation se fait en milieu très dilué pour éviter toute réaction de polymérisation intermoléculaire et une étape de déprotection finale donne le gabarit peptidique cyclique **15**. Seul le produit final nécessite une purification par RP-HPLC avant les étapes suivantes.

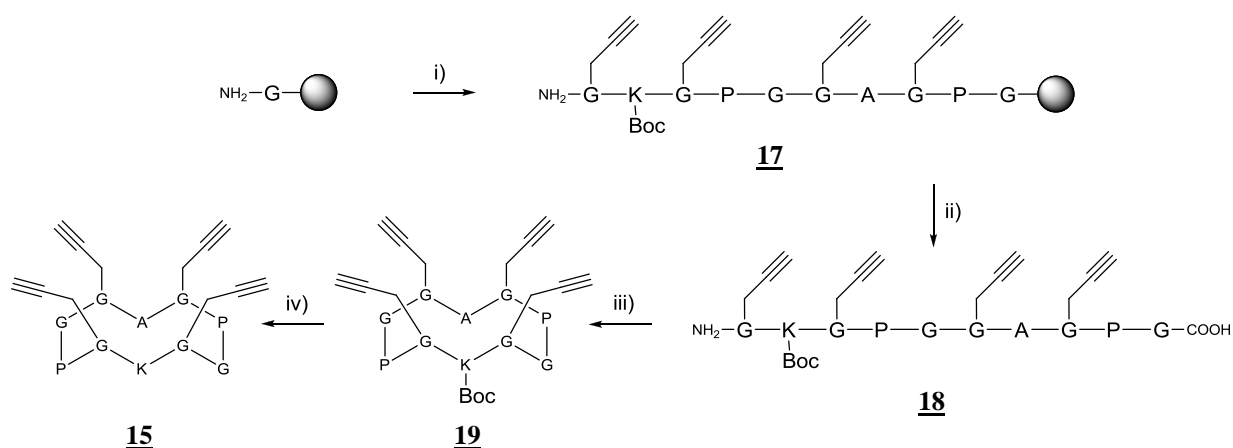


Figure 36 – Synthèse du gabarit peptidique pour la synthèse des tétrades synthétiques **4** et **5**. i) SPPS selon une stratégie Fmoc/*t*Bu, ii) TFA/DCM (1:99, v:v), iii) PyBOP, DIEA, DCM, iv) TFA/DCM (50:50, v:v).

Le dérivé de guanosine utilisé pour la fonctionnalisation du gabarit peptidique est la 5'-azido-2',3'-*O*-isopropylidèneguanosine **16**.⁷² Sa synthèse est décrite sur la Figure 37. Sa synthèse nécessite trois étapes à partir de la guanosine. La première étape consiste en la protection des alcools secondaires *via* l'introduction d'un groupement isopropylidène pour fournir la 2',3'-*O*-isopropylidèneguanosine **20**. La réaction s'effectue dans l'acétone, avec du diméthoxy-2,2-propane (forme activée de l'acétone) et l'APTS comme catalyseur. L'alcool en 5' est ensuite transformé en groupement partant *via* l'introduction d'un groupement tosyl pour

72. Stout, M. G.; Robins, M. J.; Olsen, R. K.; Robins, R. K., Purine nucleosides. XXV. Synthesis of certain derivatives of 5'-amino-5'-deoxy- and 5'-amino-2',5'-dideoxy-beta-D-ribofuranosylpurines as purine nucleotide analogs. *J. Med. Chem.* **1969**, *12* (4), 658-662.

fournir la 5'-*O*-tosyl-2',3'-*O*-isopropylidèneguanosine **21**. Une substitution nucléophile par l'azoture de sodium donne accès au produit désiré : la 5'-azido-2',3'-*O*-isopropylidèneguanosine **16**.

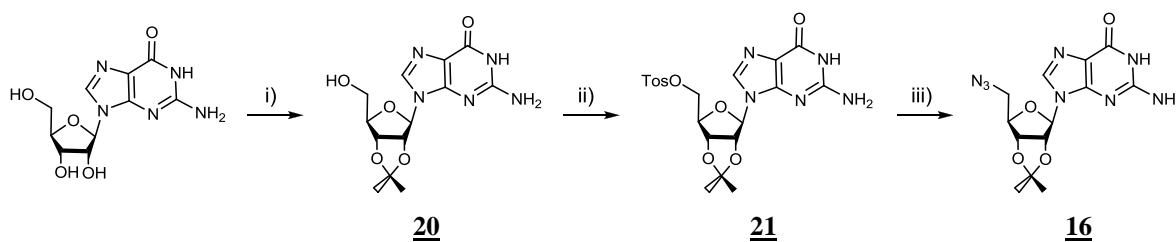


Figure 37 – Synthèse de la 5'-azido-2',3'-*O*-isopropylidèneguanosine **16**. i) diméthoxy-2,2-propane, APTS, acétone, ii) TosCl, pyridine, iii) NaN₃, DMF.

Le composé **4** est alors obtenu par réaction de la 5'-azido-2',3'-*O*-isopropylidèneguanosine **16** sur le gabarit peptidique **15** en effectuant une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysé par le Cu^I (Figure 38). Les deux partenaires ayant des propriétés de solubilité différente, la réaction s'effectue dans une solution aqueuse tamponnée contenant du DMSO. Le tampon PBS utilisé est enrichi en Na⁺, pour favoriser la réaction selon un effet de préorganisation des dérivés de la guanosine. Plusieurs conditions ont été testées pour générer le Cu^I. La première condition utilise un système CuSO₄/aspartate de sodium pour générer le Cu^I par la réduction de Cu^{II}. Ce système ne fournit malheureusement pas le produit souhaité et l'on récupère les produits de départ au bout de 24 h. La deuxième condition utilise l'oxydation spontanée du Cu⁰ en solution pour générer le Cu^I. Le produit souhaité est alors formé mais en très faible quantité. Finalement les conditions sélectionnées utilisent du Cu⁰ et un cosolvant, le *tert*-butanol, pour complexer et stabiliser le Cu^I formé.⁷³ Le composé **4** est alors obtenu de façon quantitative (transformation totale) après une nuit de réaction à 60°C. On obtient alors le composé **4** avec un rendement de 79% après purification. Le composé **5** est alors obtenu *via* la déprotection des groupements isopropylidènes par un traitement de **4** par une solution aqueuse acide (TFA/H₂O, 50:50, *v:v*). Le composé final **5** est obtenu avec un rendement de 69% après purification.

73. Wan, Q.; Chen, J.; Chen, G.; Danishefsky, S. J., A potentially valuable advance in the synthesis of carbohydrate-based anticancer vaccines through extended cycloaddition chemistry. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (21), 8244-9.

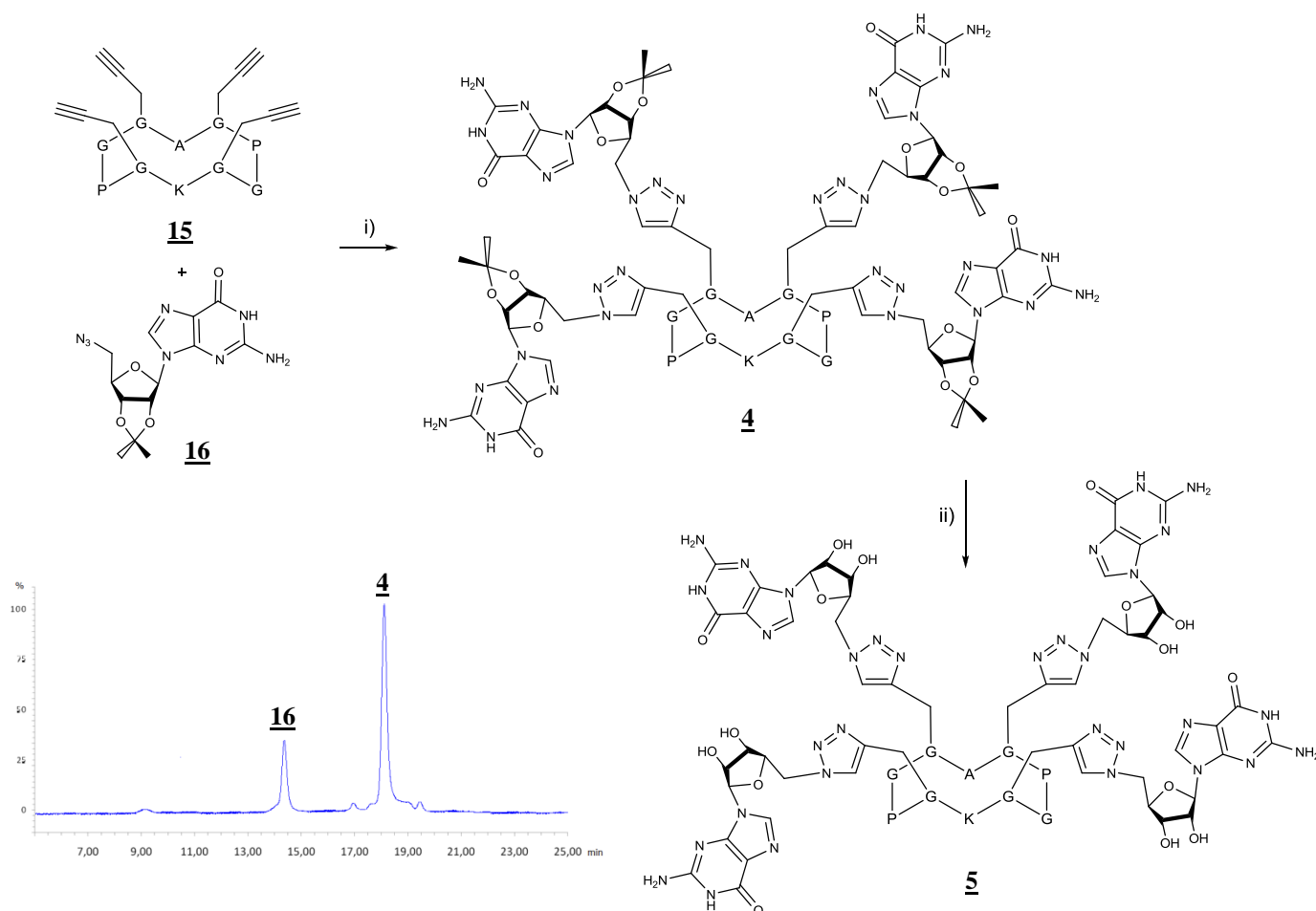


Figure 38 – Synthèse des architectures **4** et **5**. i) Cu⁰, PBS/DMSO/tBuOH (50:40:10) (10mM PBS, 0.15M NaCl, pH=8.0), 60°C. ii) TFA/H₂O (50:50). En insert le chromatogramme obtenu lors de la réaction i) enregistré à 260 nm.

Le composé **5** est totalement soluble en milieu aqueux, mais le composé **4** ne l'est que partiellement. Ainsi les différentes études seront réalisées dans un mélange H₂O/CH₃CN (50:50) pour le composé **4**. Les deux composés ont été caractérisés par ESI-MS et une étude par RMN a été réalisée afin de caractériser le comportement des deux composés en solution.

b) Caractérisation par RMN ¹H

La capacité des produits **4** et **5** à former une tétrade en solution a été évaluée par des expériences de RMN. Avant de préparer les échantillons, les deux composés ont été dessalés par chromatographie d'exclusion de taille sur des colonnes NAP-10 et lyophilisés quatre fois. Le pH des échantillons est ajusté à 5.8 par l'ajout d'une solution aqueuse de HCl. Ce pH est en effet optimal pour l'observation des signaux des protons imino et amino des guanines. Les spectres RMN ¹H ont été enregistrés et sont représentés sur la Figure 39.

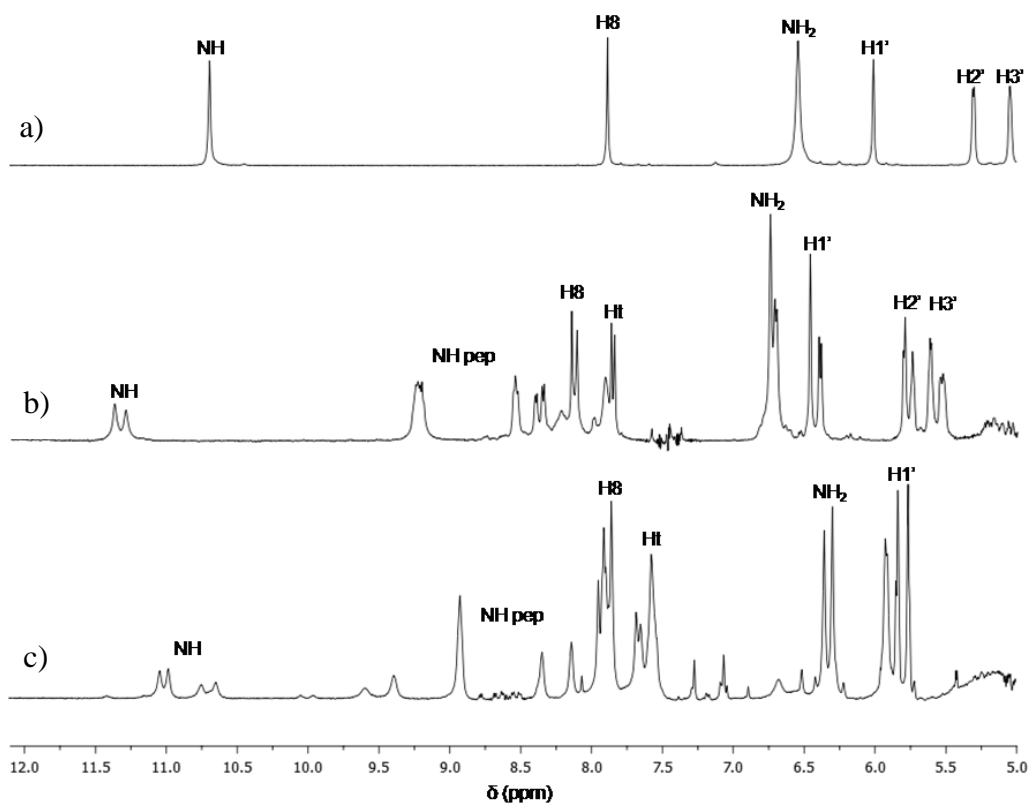


Figure 39 – Spectre RMN ^1H à 10°C de a) la 5'-azido-2',3'-*O*-isopropylidèneguanosine **16** dans le DMSO[D6], b) du composé **4** dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ (50/50, v:v) et c) du composé **5** dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10, v:v).

Le spectre RMN ^1H de la 5'-azido-2',3'-*O*-isopropylidèneguanosine **16** est représenté sur la Figure 39a pour donner un point de comparaison. Le spectre obtenu dans le DMSO est représentatif des dérivés de guanosine libre en solution. Le proton imino et le proton H8 de la guanine résonnent sous forme de singulet à $\delta = 10.69$ ppm et $\delta = 7.88$ ppm respectivement.

Le spectre RMN ^1H du composé **4** dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ (50/50) montre un comportement totalement différent (Figure 39b). En effet on observe deux pics centrés à $\delta = 11.33$ ppm pour les protons iminos. L'observation de ce type de signal montre que ces protons interviennent dans la formation d'une liaison hydrogène, puisque dans l'eau les protons échangeables libres ne sont pas observables. De plus, le fort déblindage observé confirme ce résultat ; des déplacements chimiques supérieurs à 11 ppm sont couramment observés pour les protons imino de guanines impliqués dans des liaisons hydrogène.⁷⁴ Le dédoublement observé montre que la structure obtenue est assez complexe. L'observation de deux corrélations entre les protons H₈ et H_{1'} sur le spectre NOESY (Figure 40a) permet deux conclusions. Premièrement ces corrélations indiquent que les bases sont exclusivement en conformation *syn*. Cette conformation est connue pour empêcher la formation de structure de style ruban de guanines.⁶³ Deuxièmement le fait d'observer deux corrélations montrent que les bases ne sont pas toutes équivalentes.

74. Gavathiotis, E.; Searle, M. S., Structure of the parallel-stranded DNA quadruplex d(TTAGGGT)₄ containing the human telomeric repeat: evidence for A-tetrad formation from NMR and molecular dynamics simulations. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (10), 1650-6.

Le spectre RMN ^1H du composé **5** (Figure 39c) présente quant à lui un dédoublement de la région correspondant aux protons iminos à $\delta = 11.01$ ppm et $\delta = 10.70$ ppm. Le pic centré à $\delta = 11.01$ ppm est caractéristique des protons intervenant dans la tétrade de guanines, mais le pic à $\delta = 10.70$ ppm est suffisamment blindé pour indiquer un environnement électronique particulier. Le dédoublement de signaux est également observable sur le spectre NOESY (Figure 40b), où l'on observe quatre corrélations entre les protons H_8 et H_1 .

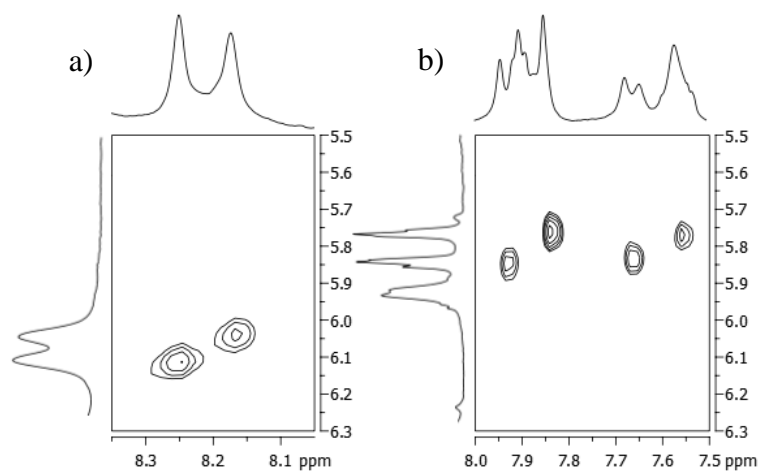


Figure 40 - Agrandissement des spectres NOESY correspondant aux corrélations H_8/H_1 , du a) composé **4** dans $\text{H}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ (50/50, v:v) à -10°C et c) du composé **5** dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10, v:v) à 10°C .

Ces différentes observations, basées sur l'exploitation de la RMN ^1H des composés **4** et **5**, permettent de proposer que les deux composés forment en solution aqueuse une tétrade de guanines. Il est à noter que les différentes expériences ont été réalisées sans ajout de cation pour stabiliser la structure. Ainsi l'introduction du gabarit peptidique permet de contraindre les dérivés de guanosine en tétrade de guanines. Néanmoins les spectres obtenus montrent que les structures obtenues sont plus complexes qu'attendu initialement. Nous nous sommes alors intéressés à la détermination structurale complète de ces deux composés.

*I-2-4 Détermination structurale du composé **4***

L'acquisition des spectres TOCSY, DQF-COSY et NOESY permet l'attribution complète des signaux pour la détermination structurale du composé **4**. Pour cela, une nomenclature a été établie pour nommer chacun des protons de la structure. Cette nomenclature est précisée sur la formule développée du composé **4** représentée sur la Figure 41.

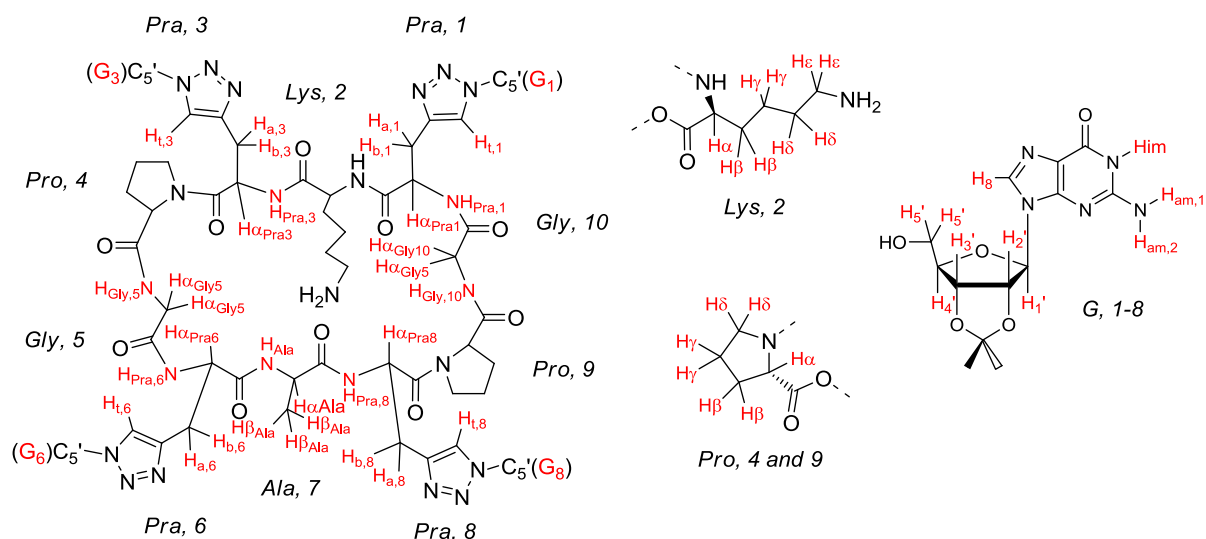


Figure 41 – Structure chimique complète du composé **4** ainsi que la nomenclature utilisée pour l’attribution des signaux par RMN.

Les Figure 42, Figure 43, Figure 44 et Figure 45 présentent un agrandissement des spectres NOESY qui permettent d’identifier les enchaînements de corrélations représentatives de la molécule **4**. La Figure 43 montre les corrélations entre les protons NH et H α des acides aminés qui permettent l’attribution séquentielle de l’enchaînement des acides aminés du gabarit peptidique. Cette attribution permet d’identifier sur le spectre NOESY les différents acides aminés. Il est intéressant de constater que le gabarit ne présente aucune symétrie et que les quatre propargylglycines (sur lesquelles sont greffées les guanosines) ne sont pas équivalentes. Néanmoins *Pra*¹ montre des déplacements chimiques proches de *Pra*⁶ et *Pra*³ montre des déplacements chimiques proches de *Pra*⁸. Ainsi bien qu’aucun acide aminé ne soit équivalent les couples *Pra*¹/*Pra*⁶ et *Pra*³/*Pra*⁸ ont des environnements électroniques similaires. Ce phénomène se retrouve au niveau des guanosines puisque chaque signal correspondant aux protons des riboses est dédoublé et un des signaux correspond au couple *G*¹/*G*⁶ et l’autre au couple *G*³/*G*⁸ (Figure 45). Ainsi les guanosines sont équivalentes deux à deux.

Si les guanosines sont équivalentes deux à deux, chacun des couples est dans un environnement électronique très différent. La Figure 42 présente un agrandissement du spectre NOESY du composé **4** enregistré à -10°C. A cette température l’évolution de conformation de la molécule est suffisamment ralentie pour que de nouvelles corrélations apparaissent. Ces corrélations expliquent la dissymétrie observée de la molécule. On observe les corrélations H₈^{1,6} / H₄^{1,6} et NH_{*Pra*}^{3,8} / H₄^{3,8}, qui montrent que le ribose des guanosines 3 et 8 sont proches du gabarit peptidique, alors que les riboses des guanosines 1 et 6 sont plus éloignés. On retrouve également les corrélations H₈ / H₁ qui montrent que les guanosines sont exclusivement dans une conformation *syn*.

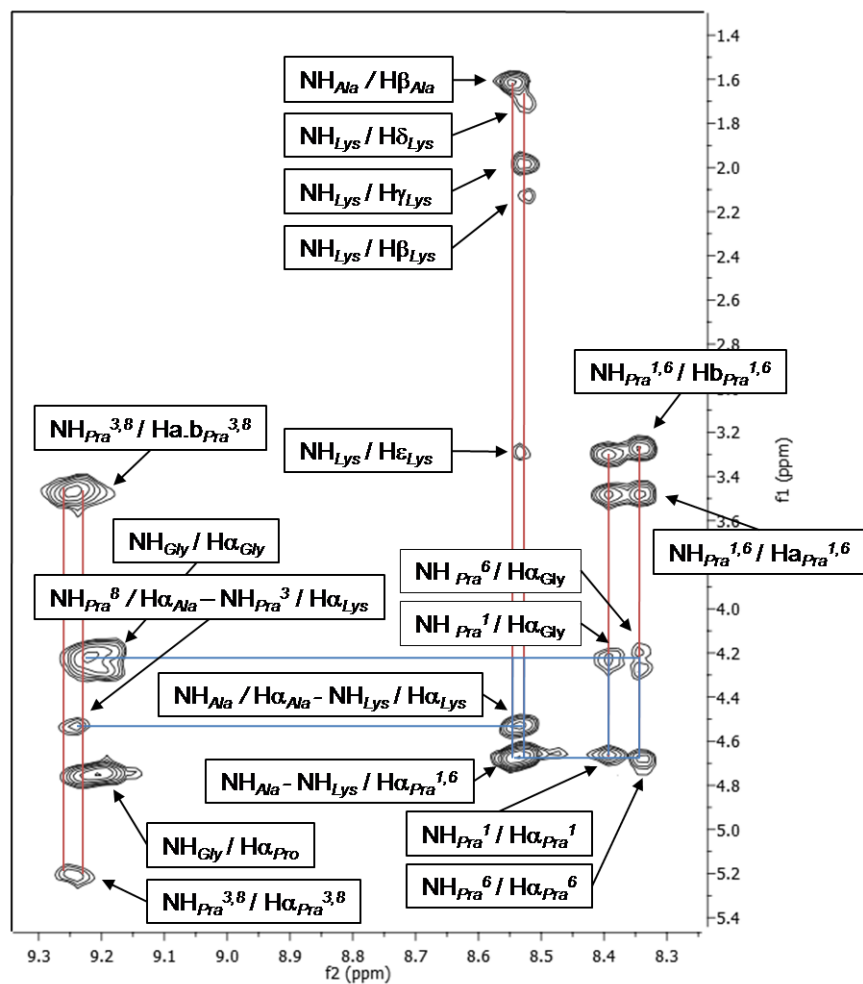


Figure 43 – Agrandissement du spectre NOESY du composé **4** montrant les corrélations entre les protons NH et H α des acides aminés du gabarit peptidique. En bleu figure l'attribution séquentielle du squelette peptidique et en rouge figurent les corrélations utilisées pour l'attribution des protons des chaînes latérales. Le spectre est enregistré dans H₂O / CD₃CN (50:50) à 10°C.

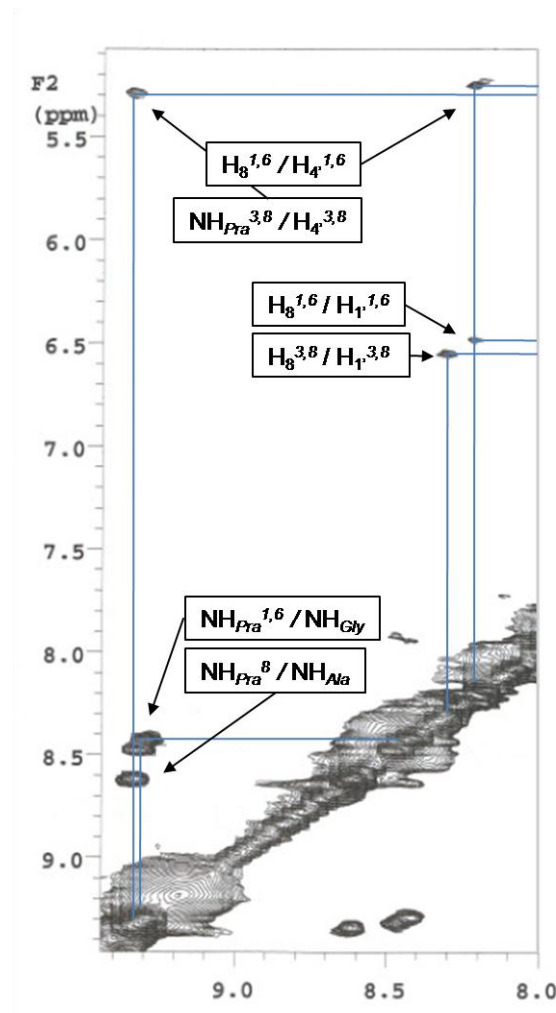


Figure 42 - Agrandissement du spectre NOESY du composé **4** montrant les corrélations entre les protons H₈ / H₁ des guanosines, H₈^{1,6} / H₄^{1,6} et NH_{Pro}^{3,8} / H₄^{3,8} (ces deux dernières corrélations sont la cause de la dissymétrie de la molécule observée). Le spectre est enregistré dans H₂O / CD₃CN (50:50) à -10°C.

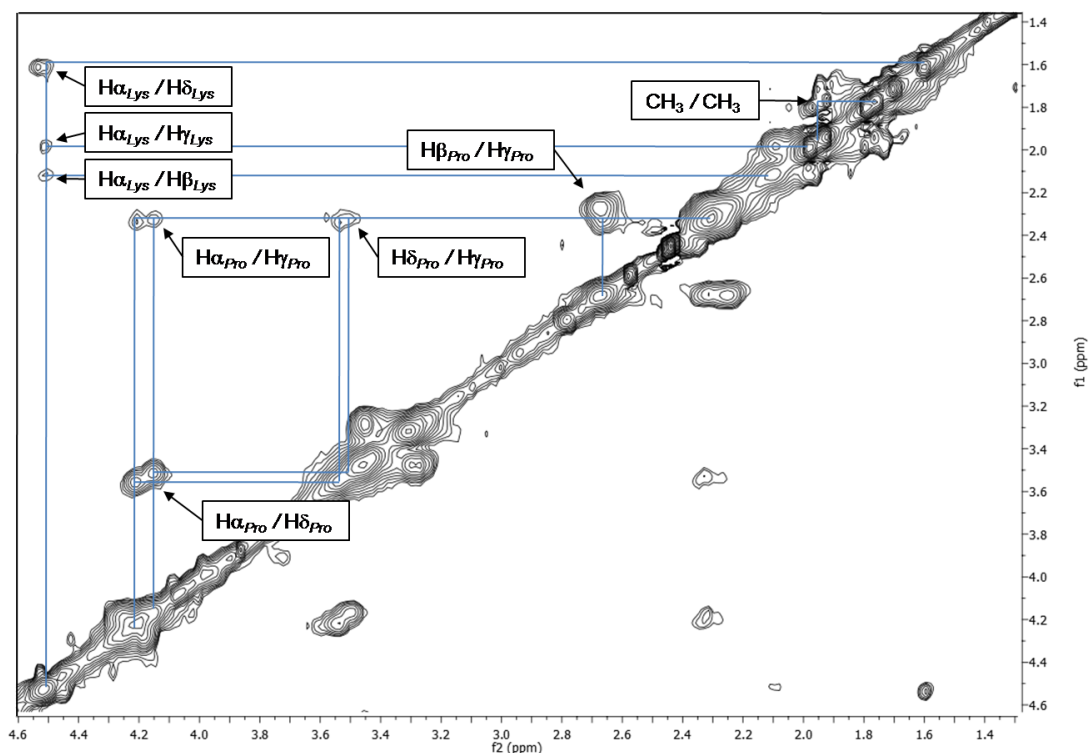


Figure 44 - Agrandissement du spectre NOESY du composé **4** montrant les corrélations entre les protons des chaînes latérales de la lysine et des prolines. On remarque également la corrélation entre les deux groupements $-CH_3$ non équivalents des isopropylidènes. Le spectre est enregistré dans H_2O / CD_3CN (50:50) à $10^\circ C$.

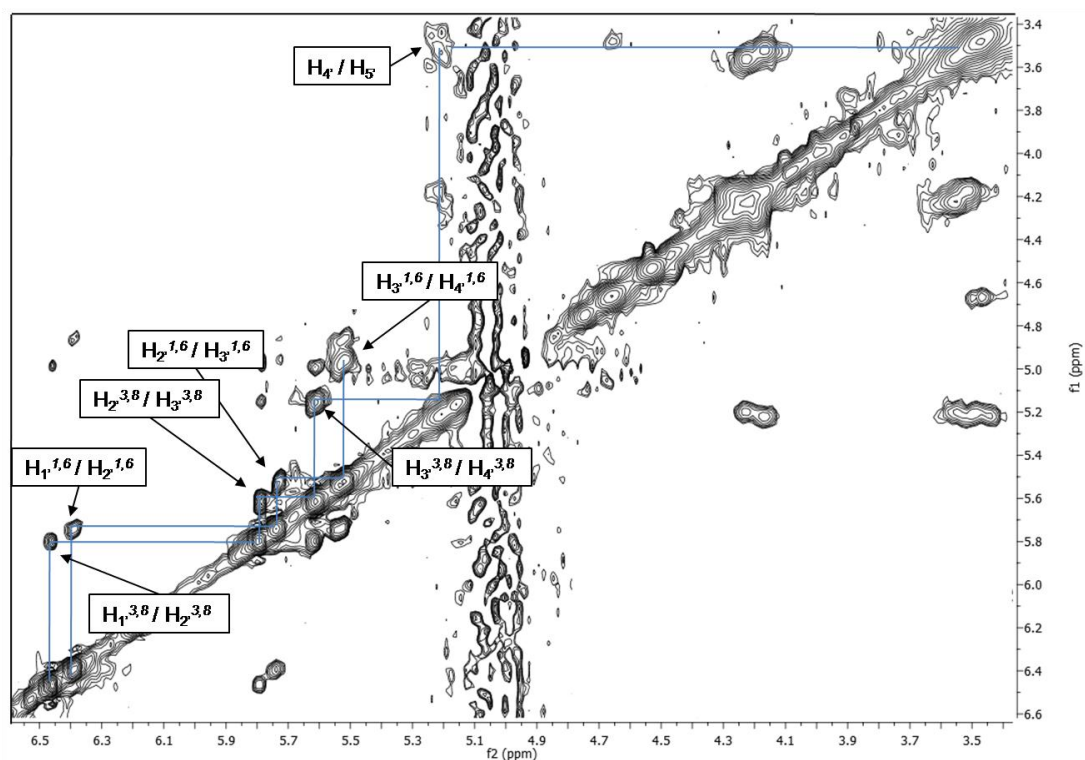


Figure 45 - Agrandissement du spectre NOESY du composé **4** montrant les corrélations entre les protons des riboses. Le spectre est enregistré dans H_2O / CD_3CN (50:50) à $10^\circ C$.

L'attribution des différents déplacements chimiques a été effectuée et les résultats sont présentés dans le Tableau 1.

Résidu	Proton	Déplacement chimique (ppm)	Corrélations NOE
<i>Pra 1 et 6</i> <i>G 1 et 6</i>	H ₁ '	6.39	H ₈ <i>Pra 1, 6</i>
	H ₂ '	5.75	
	H ₃ '	5.53	
	H ₄ '	5.00	H ₈ <i>Pra 1, 6</i>
	H ₅ '	3.46	
	H ₈	8.11	H ₁ ' <i>Pra 1, 6</i> , H ₄ ' <i>Pra 1, 6</i>
	H _{im}	11.29	
	H _{am}	6.71, <i>n.d.</i>	
	H _t	7.84	
	H _a , H _b	3.48, 3.27	
	H α _{Pra}	4.68, 4.66	
NH _{Pra}	8.39, 8.35		
<i>Lys 2</i>	H α _{Lys}	4.51	
	H β _{Lys}	2.13	
	H γ _{Lys}	1.99	
	H δ _{Lys}	1.71	
	H ϵ _{Lys}	3.32	
	NH ₂	<i>n.d.</i>	
	NH _{Lys}	8.52	
<i>Pra 3 et 8</i> <i>G 3 et 8</i>	H ₁ '	6.46	H ₈ <i>Pra 3, 8</i>
	H ₂ '	5.80	
	H ₃ '	5.62	
	H ₄ '	5.16	NH _{<i>Pra 3, 8</i>}
	H ₅ '	3.46	
	H ₈	8.15	H ₁ ' <i>Pra 3, 8</i>
	H _{im}	11.38	
	H _{am}	6.75, <i>n.d.</i>	
	H _t	7.87	
	H _a , H _b	3.47	
	H α _{Pra}	5.21	
NH _{Pra}	9.25	H ₄ ' <i>Pra 3, 8</i>	
<i>Pro 4 et 9</i>	H α _{Pro}	4.22, 4.17	
	H β _{Pro}	2.69, 2.68	
	H γ _{Pro}	2.34	
	H δ _{Pro}	3.57, 3.53	
<i>Gly 5 et 10</i>	H α _{Gly}	4.22	
	NH _{Gly}	9.22	
<i>Ala 7</i>	H α _{Ala}	4.53	
	H β _{Ala}	1.62	
	NH _{Ala}	8.56	

Tableau 1 – Attribution des déplacements chimiques utilisant la nomenclature décrite sur la Figure 41. Seules les corrélations NOE utilisées pour la modélisation sont précisées.

I-2-5 Étude du composé **5**

La complexité du spectre RMN ^1H du composé **5** laisse supposer que plusieurs structures coexistent en solution. Ce constat est confirmé par des spectres RMN à deux dimensions complexes. Par exemple, la région du spectre NOESY correspondant au domaine de corrélation des protons NH / H α du gabarit peptidique présente des signaux supérieurs en nombre à ce qui est attendu (résultats non montrés). De plus, on observe quatre corrélations correspondant au couplage entre les protons H $_8$ et H $_1$ (Figure 40). Nous avons alors supposé que le composé **5** est capable de former un dimère en solution. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons alors vérifié le nombre et les caractéristiques des espèces en solution. Pour cela des expériences de diffusion par RMN (DOSY) ont été réalisées. La DOSY permet de séparer les composés en mélange en solution en fonction de leur coefficient de diffusion. Les expériences DOSY qualitatives sont couramment réalisées pour séparer les espèces d'un mélange.

Afin d'évaluer la taille des différents produits présents en solution, des expériences de RMN par diffusion (DOSY) ont été effectuées. L'acquisition de différents spectres RMN ^1H à des valeurs de gradient de champ différentes ont permis d'identifier différents produits coexistant en solution. L'ensemble des spectres obtenus est représenté sur la Figure 46a.

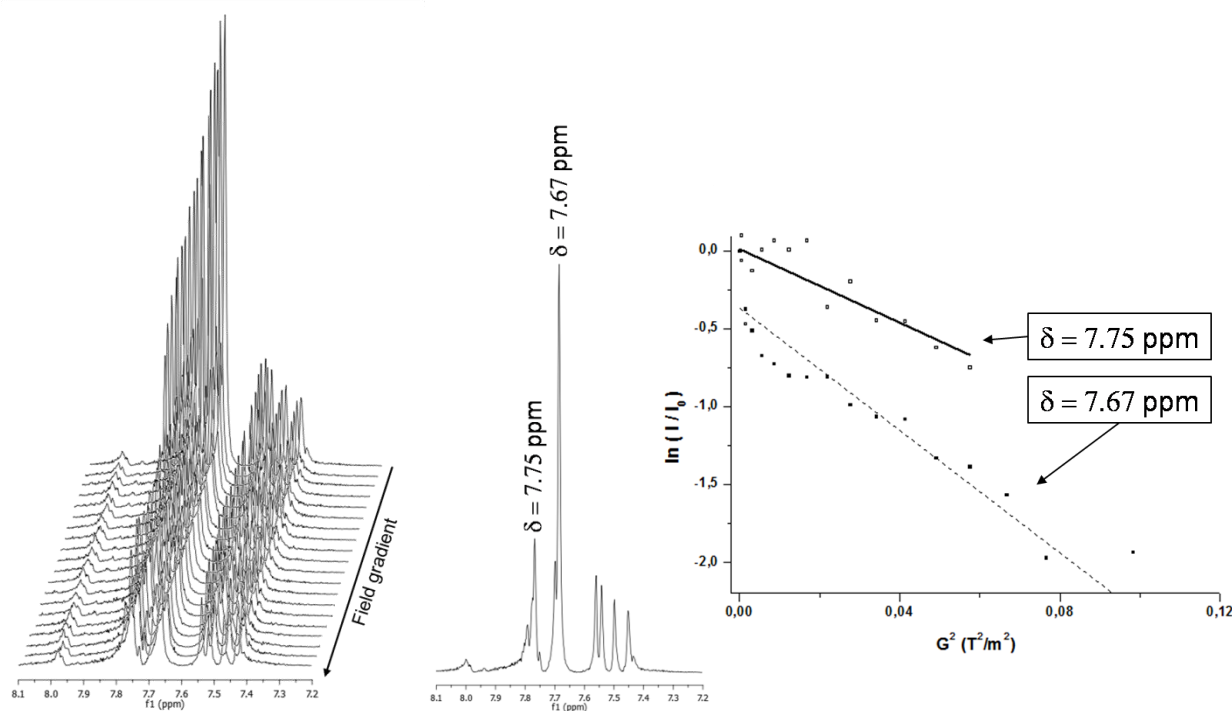


Figure 46 – a) Empilement des spectres RMN ^1H obtenus lors de l'expérience de diffusion du composé **5** enregistré dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90 :10), b) Agrandissement du spectre RMN ^1H correspondant à la région aromatique (sont précisés les deux types de protons H $_8$ à $\delta=7,75\text{ppm}$ et $\delta=7,67\text{ppm}$), c) Représentation graphique de la variation de $\ln(I/I_0)$ en fonction de G^2 pour ces deux protons.

À partir des données collectées, deux produits distincts ont pu être identifiés et leur capacité à diffuser dans le milieu a été évaluée en suivant l'intensité du signal correspondant aux protons H $_8$ de chacun des composés. Ces deux espèces distinctes possèdent un proton H $_8$ à $\delta = 7,75\text{ppm}$ et $\delta = 7,67\text{ppm}$ respectivement (Figure 46b). L'intensité de ces deux pics en

fonction de la valeur du champ appliquée permet d'évaluer le coefficient de diffusion de ces deux espèces. En effet les données peuvent être modélisées par l'équation suivante :⁷⁵

$$I = I_0 \exp [-d_t \cdot G^2] \quad \text{eq(1)}$$

où I représente l'intensité du signal, I_0 l'intensité du signal initial ($G=0$), d_t est la vitesse de disparition apparente (valeur proportionnelle au coefficient de diffusion D_t) et G la force du gradient appliqué à l'échantillon. Pour cette expérience le champ G varie de 0 à 36,86 G.cm⁻¹ et cette équation permet de déterminer d_t grâce au graphique représentant la variation de $\ln(I/I_0)$ vs G^2 . De plus l'équation de Stokes-Einstein permet de déterminer le rayon hydrodynamique R_h d'une molécule assimilée à une sphère à partir de son coefficient de diffusion :

$$D_t = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_h} \quad \text{eq(2)}$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température et η la viscosité du milieu. À partir des équations 1 et 2, on peut déduire que :

$$\frac{R_{h2}}{R_{h1}} = \frac{D_{t1}}{D_{t2}} = \frac{d_{t1}}{d_{t2}} \quad \text{eq(3)}$$

Les données expérimentales permettent de déterminer les vitesses de disparition apparentes suivantes, pour la première espèce $d_{t1} = -11,8 \text{ T}^{-2} \cdot \text{m}^{-2}$ et pour la deuxième espèce $d_{t2} = -19,7 \text{ T}^{-2} \cdot \text{m}^{-2}$. Les deux espèces en solution présentent un rapport $R_{h1}/R_{h2} = 1,7$. Ainsi la deuxième espèce est approximativement deux fois plus grande que la première.

Ces expériences de diffusion par RMN mettent en évidence la coexistence de deux produits, l'un étant approximativement deux fois plus gros que le premier. Ce résultat confirme la capacité qu'a le composé X à former un dimère en solution. Ce résultat permet alors de mieux comprendre le spectre RMN ¹H enregistré. Les deux massifs observés à $\delta = 11.01$ ppm et $\delta = 10.70$ ppm (Figure 39c) correspondent aux protons iminos du monomère et du dimère. Les protons imino du dimère, subissant l'influence d'une tétrade empilée, subissent un effet de blindage et donc présentent le déplacement chimique le plus petit. Ainsi le massif à $\delta = 11.01$ ppm appartient au monomère et le massif $\delta = 10.70$ ppm appartient au dimère. Ce résultat permet alors de conclure sur la symétrie du dimère formé. En effet, puisqu'un seul signal est observé pour les deux tétrades composant le dimère cela signifie que les deux tétrades de guanines sont homotopiques et que le dimère possède une symétrie D_4 .

Ce résultat est également corroboré par des expériences par CD.

I-2-6 Caractérisation par dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une technique spectroscopique optique qui peut donner des informations sur la structuration d'architectures complexes en solution. Les informations obtenues par cette technique ne sont que des preuves indirectes et ne peuvent pas remplacer

75. Wilkins, D. K.; Grimshaw, S. B.; Receveur, V.; Dobson, C. M.; Jones, J. A.; Smith, L. J., Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry* **1999**, *38* (50), 16424-31.

des études structurales. Néanmoins l'allure d'un spectre CD est généralement assimilée à la signature d'une structure secondaire particulière et deux produits présentant un spectre CD similaire présentent une structure similaire. Bien qu'il n'existe pas de nombreuses données dans la littérature décrivant le spectre CD de tétrades synthétiques, nous allons montrer que la spectroscopie par dichroïsme circulaire s'avère particulièrement utile dans l'étude des composés **4** et **5**.

Les spectres CD du composé **4** à différentes températures ont été enregistrés dans les mêmes conditions de solvant et de concentration que lors des études RMN. Les spectres obtenus sont présentés sur la Figure 47. Quelle que soit la température, les spectres CD sont caractérisés par un minimum à 230 nm, un épaulement à 265 nm et un maximum à 281 nm. Le minimum à 230 nm peut être attribué au feuillet β formé par le gabarit peptidique. Les spectres obtenus sont similaires à ceux obtenus par l'équipe de J. Sherman pour leurs tétrades synthétiques.⁶⁹ Ayant peu de point de comparaison, ce résultat ne peut confirmer la formation d'une tétrade mais confirme la présence d'une structure organisée. Néanmoins des transitions peuvent être identifiées sur les courbes de dénaturation enregistrées à 265 nm et à 303 nm, ce qui confirme l'existence d'une structuration initiale. Ainsi la stabilité de la tétrade de guanine (seule structure pouvant être désorganisée) est évaluée à 28.7°C ce qui correspond aux observations faites lors des expériences par RMN.

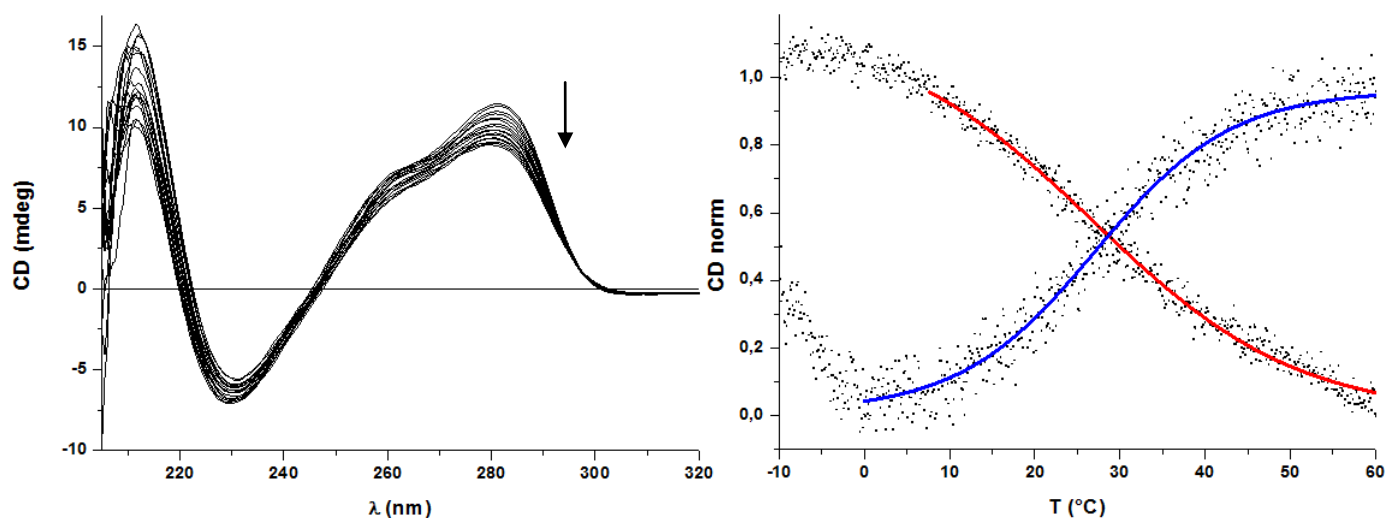


Figure 47 – a) Spectre CD du composé **4** dans H₂O/CH₃CN (50:50, v/v) à des températures variables (de -10°C à 60°C), b) courbes de dénaturation normalisées enregistrées à 265 nm (en rouge) et à 303 nm (en bleu).

Les spectres CD du composé **5** à différentes températures ont également été enregistrés dans les mêmes conditions de solvant et de concentration que lors des études RMN et sont présentés sur la Figure 48. Les spectres obtenus sont très différents de ceux du composé **4**. En effet, le spectre CD à 10°C est caractérisé par un épaulement à 230 nm, deux minima à 240 nm et à 278 nm et deux maxima à 260 nm et 288,5 nm. La dénaturation thermique de la structure initiale conduit à une modification plus importante du spectre CD. Le minimum à 240 nm disparaît en faveur d'un minimum à 230 nm (feuillet β du gabarit

peptidique) et le minimum à 278 nm disparaît en faveur d'un maximum local à 281 nm (que l'on trouve sur les spectres CD de **4**). Ainsi à faible température, les spectres CD de **4** et de **5** sont très différents, alors que pour de plus hautes températures, ils sont similaires. De plus l'allure générale du spectre est en accord avec les spectres obtenus pour des empilements de tétrades de guanines présentant une symétrie D_4 .²⁸³ Le spectre CD à 10°C est similaire à ceux obtenus par l'équipe de G. P. Spada lors de l'étude de l'auto association de dérivés lipophiles de guanosines qui forment des structures de type G-quartet dans des solvants organiques connus sous le nom d'octamères.⁷⁶ La seule différence réside dans l'observation du maximum à 288.5 nm, mais l'on verra par la suite que ce maximum peut être expliqué par la présence des noyaux triazol qui jouent un rôle important dans la structuration du composé.

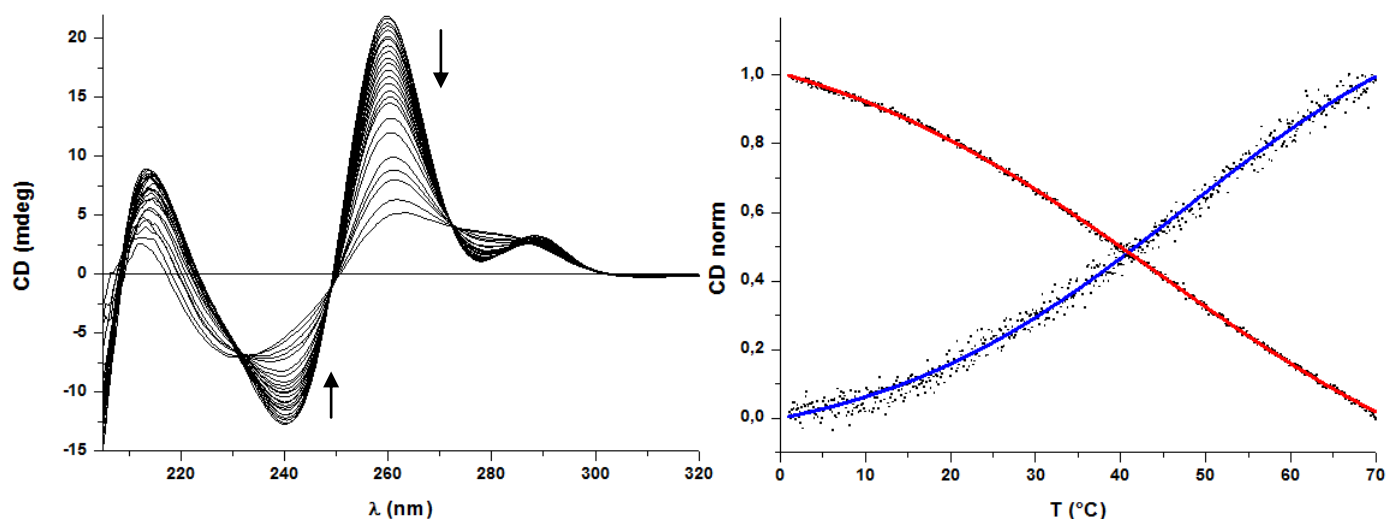


Figure 48 - a) Spectre CD du composé **5** dans H₂O à des températures variables (de 1°C à 70°C), b) courbes de dénaturation normalisées enregistrées à 260 nm (en rouge) et à 278 nm (en bleu).

Ainsi l'ensemble des données expérimentales montre que le composé **4** forme une tétrade de guanines dans l'eau sans ajout de cation et que le composé **5** coexiste sous forme d'un monomère et d'un dimère dans les mêmes conditions. Il est à remarquer que le composé **4** doit certainement pouvoir former un dimère, mais la présence de l'acétonitrile (solvant apolaire) dans le milieu défavorise les interactions de style empilement.

I-2-7 Modélisation moléculaire

Pour comprendre tous les phénomènes intervenant dans l'organisation de ces deux composés, nous avons été intéressés par la modélisation de ces structures. Les données structurales relatives au composé **4** nous ont permis de déterminer la structure exacte du composé en solution. Le modèle a tout d'abord été construit et la structure a été contrainte en utilisant les corrélations observées lors des expériences NOESY. En premier lieu, la distance entre deux protons montrant une corrélation NOE a été fixée pour être inférieure à

76. Graziano, C.; Masiero, S.; Pieraccini, S.; Lucarini, M.; Spada, G. P., A cation-directed switch of intermolecular spin-spin interaction of guanosine derivatives functionalized with open-shell units. *Org. Lett.* **2008**, *10* (9), 1739-42.

3.8Å puisqu'il s'agit de la distance limite observable par l'effet Overhauser. Une série de contraintes a également été utilisée pour fixer les guanines dans une position adéquate pour former la tétrade. Bien que les corrélations classiques justifiant la formation de la tétrade ne soient pas observables (corrélation H_8/H_{am} et H_{im}/H_{am}) dans les conditions d'études (principalement dû aux échanges avec le solvant), les expériences réalisées confirment sa formation. Puis la structure construite a été soumise à un processus de minimisation d'énergie afin de déterminer la structure de moindre énergie. Une fois la structure obtenue, la preuve de sa justesse a été obtenue *via* des études dynamiques. De l'énergie a été fournie au modèle obtenu sous forme de température (600 K) pour étudier son évolution. Un refroidissement lent (par palier de 100 K, avec un temps de stabilisation de 30ps) permet de retrouver la structure initiale, ce qui confirme la justesse du modèle proposé. Le résultat obtenu est présenté sur la Figure 49a et b. Finalement afin de vérifier de nouveau l'exactitude du modèle proposé nous avons comparé les distances de certains protons obtenues grâce à la modélisation et à la RMN. Les contrôles effectués confirment bien que la modélisation est en accord avec les expériences RMN. Par exemple, les distances $H_8/H_{1'}$ (des deux couples de guanines équivalentes) sont estimées à 2.87 et 2.82Å par RMN et à 2.85 et 2.81Å par modélisation.

L'obtention du modèle moléculaire permet de mieux comprendre les observations obtenues lors des expériences RMN. Les conclusions sont les suivantes :

- Les guanines sont deux à deux équivalentes de par leur disposition par rapport au gabarit peptidique. La vue de dessus (Figure 49a) montre que deux guanines (G_3 et G_8) sont alignées dans le plan défini par le gabarit peptidique, alors que les deux autres (G_1 et G_6) sont à l'extérieur de la structure. Ce résultat explique le dédoublement de tous les signaux RMN relatifs aux guanosines observé (Figure 39b).
- Les noyaux triazoles participent activement à la structuration du composé **4**. Les quatre noyaux triazole sont organisés et forment une tétrade qui sert de support à la formation de la tétrade de guanines. On observe que chacune des guanines s'empile sur un noyau triazole. La distance séparant la tétrade de triazole et la tétrade de guanine a été évaluée à 3.6Å qui est une valeur que l'on retrouve communément pour l'espacement de deux paires de bases dans l'ADN-B par exemple.
- Les groupements isopropylidène bloquent bien les riboses des guanosines en conformation *nord* et forcent les bases à adopter une conformation *syn*.

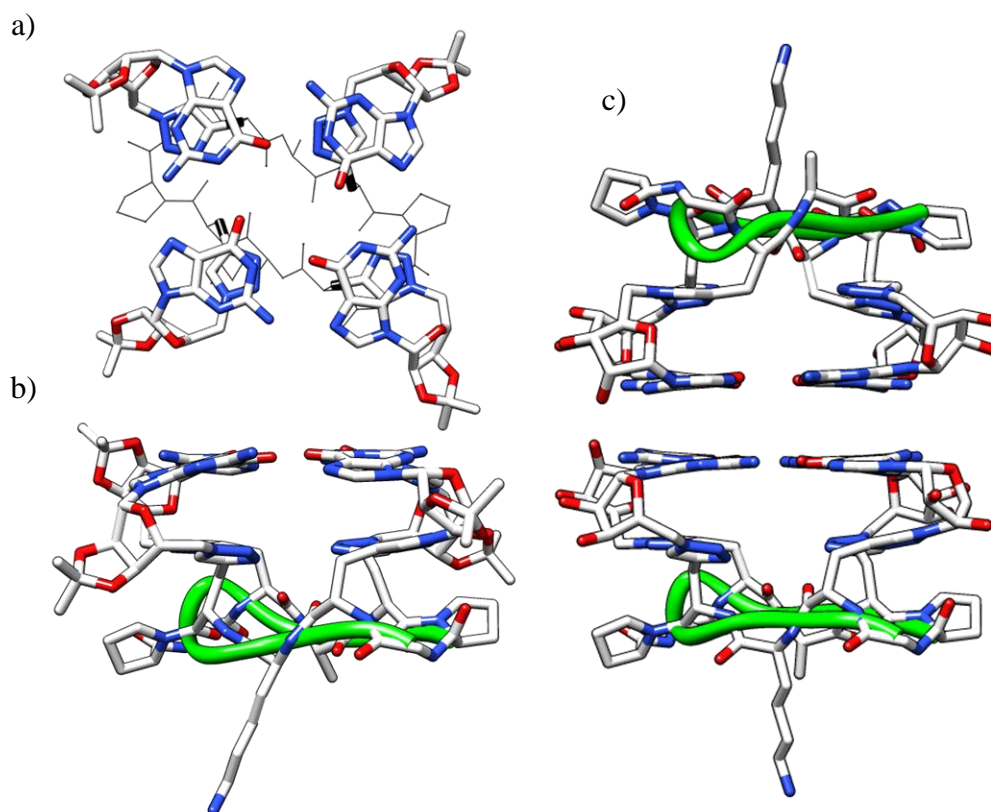


Figure 49 – Modélisations moléculaires obtenues en utilisant les contraintes RMN. a) Vue de dessus et b) vue de côté du monomère **4**. c) vue de côté du dimère **5**. Sur la vue présentée en a), le gabarit peptidique est représenté en fil pour améliorer la lisibilité. Les atomes de carbone figurent en blanc, ceux d’azote en bleu et d’oxygène en rouge. Les atomes d’hydrogène ont été omis pour améliorer la lisibilité.

Le dimère formé par le composé **5** a également été modélisé. Bien qu’une détermination structurale complète n’ait pas été effectuée (rendu très complexe par le mélange de signaux observé), l’ensemble des renseignements collectés permet de proposer un modèle. Premièrement, certaines corrélations observables pour **4** ne le sont plus pour **5**. Par exemple, les corrélations, $H_8^{1,6} / H_4^{1,6}$ et $NH_{pra}^{3,8} / H_4^{3,8}$, ne sont plus observées et rendent la structure plus flexible. Ces contraintes ont ainsi été relâchées. Une première minimisation a été effectuée sur le monomère avec les nouvelles contraintes, puis le dimère a été assemblé. Les études RMN précisent que le dimère formé a une symétrie D_4 , donc deux monomères identiques ont été utilisés et leur position respective a été obtenue *via* le calcul du champ de forces. On obtient les deux tétrades empilées et séparées d’une distance de 3.5Å . De plus l’angle entre deux tétrades (« helical twist ») est évalué à 32° . Ces paramètres correspondent à ceux qui sont mesurés dans une structure de type ADN quadruplexe. Par exemple, on trouve $3.5 \pm 0.2\text{Å}$ et $29 \pm 2^\circ$ pour le quadruplexe intermoléculaire parallèle $d[\text{TTAGGGT}]_4$.⁷⁴

I-2-8 Initiation d’agrégats de G-quartets en solution

Il est connu que les molécules de guanosine 5’-monophosphate (GMP) sont capables de s’auto-associer en structures ordonnées dans l’eau à un pH neutre ou légèrement basique. Les structures formées sont composées d’empilement de tétrades constituées de quatre

molécules de GMP (voir *Rappel Bibliographique*). Ces édifices sont stabilisés par des cations monovalents comme Na^+ et K^+ . L'équipe de Gang Wu a récemment montré que des solutions concentrées en $\text{Na}_2(5'-\text{GMP})$ à pH 8 (concentration supérieure à 17%*m*) sont propices à la formation d'agrégats composés d'empilement de plus de 80 tétrades.⁵⁶ Comme le composé **4** forme une tétrade en solution aqueuse, nous avons voulu montrer que cette préorganisation est propice à l'initiation et/ou la catalyse de la formation de ce type d'agrégat. Les résultats préliminaires sont décrits ci-dessous.

Nous avons dans un premier temps étudié la capacité de la $\text{Na}_2(5'-\text{GMP})$ à former des agrégats en solution en absence et en présence du composé **4**. Pour cela, nous avons utilisé la RMN ^{31}P qui permet de décrire l'état de la GMP en solution, sans être perturbé par les signaux du composé **4** (qui ne possède pas d'atomes de phosphore). Les expériences réalisées sont résumées sur la Figure 50.

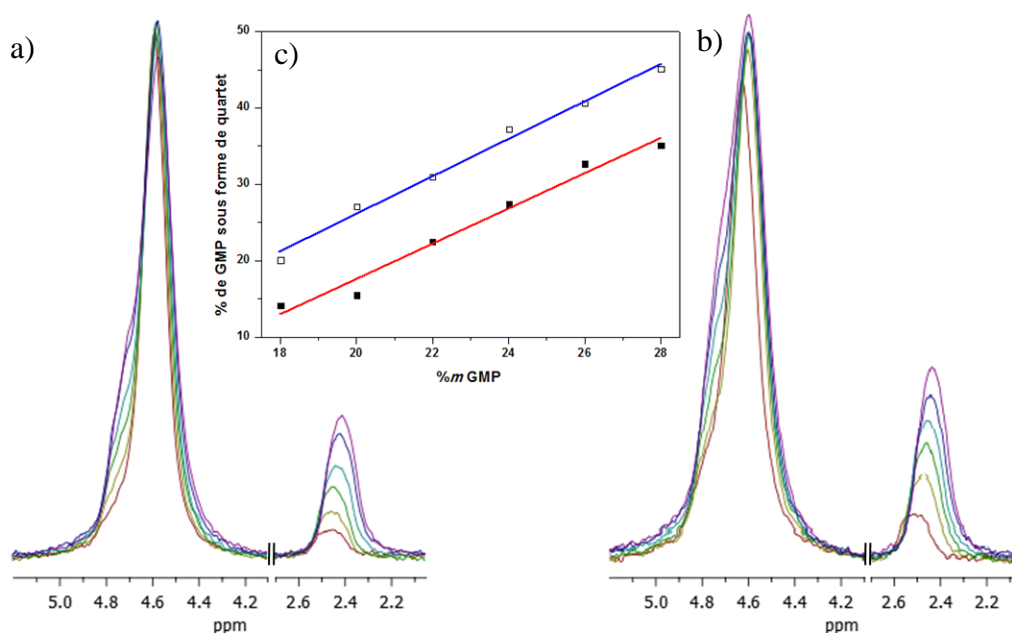


Figure 50 – Spectre RMN ^{31}P de solutions a) contenant une concentration croissante de GMP (de 18 à 28 %*m*) et b) une concentration croissante de GMP (de 18 à 28 %*m*) avec 0.1% de composés **4**. c) Graphe représentant le pourcentage de GMP sous forme de quartet en solution en fonction de la concentration en GMP avec 0.1 %*m* de composés X (en bleu) et sans (en rouge). Spectres acquis dans H_2O (pH 8) à 25°C.

Lorsque la GMP est libre en solution, son spectre RMN ^{31}P découplé est caractérisé par un pic unique à 4.67 ppm. Lorsqu'on augmente la concentration, on va observer la formation d'agrégats composés de monomères de GMP et de tétrades de GMP. Les agrégats de monomères de GMP vont garder le même déplacement chimique alors que l'empilement des tétrades va modifier l'environnement électronique du phosphore dans les agrégats de quartets. La formation de tétrades de guanines va être caractérisée par l'apparition de nouveaux pics (Figure 50a), dans nos conditions à $\delta = 4.71$ ppm (épaulement) et à $\delta = 2.45$ ppm (les valeurs de ces déplacements chimiques changent légèrement en fonction de la taille des édifices formés). La mesure de l'aire relative de ces nouveaux pics permet d'estimer le pourcentage de GMP impliquée dans la formation d'une tétrade en solution. Les mesures du

pourcentage de GMP sous forme de quartet en fonction du pourcentage massique de GMP ont été effectuées avec ou sans composé **4** et on remarque que la présence de 0.1 %*m* de composé **4** influe légèrement sur la quantité de tétrades formées. Le graphe, présenté sur la Figure 50c, permet de montrer que la présence de 0.1 %*m* de composé **4** induit la formation d'agrégats de quartets. Par exemple, pour une concentration de 22 %*m* en GMP, 22,5 % de GMP sont impliquées dans la formation d'une tétrade, alors qu'en présence de 0.1 %*m* de **4**, 31 % de GMP sont impliquées. Des études DOSY sont en cours pour vérifier si l'introduction du composé **4** modifie la taille des agrégats formés.

L'effet observé est certes faible, mais traduit néanmoins une participation du composé **4** dans la formation de ce type d'agrégat. Des expériences ont été réalisées en augmentant la teneur en **4** des échantillons mais pour des concentrations supérieures à 0.1 %*m*, on observe la précipitation de fibres dans le tube RMN. Il est connu que ce type de précipitation est caractéristique de la formation de polymère non covalent.⁷⁷ Il est intéressant de constater que plus la teneur en **4** est importante, plus la précipitation est rapide. Cette observation laisse supposer que le composé **4** est responsable de la polymérisation de la GMP observée et nous avons alors voulu vérifier cette hypothèse.

En augmentant la force ionique de la solution (*via* l'ajout de KCl), la formation des agrégats est stabilisée. Nous avons alors poursuivi les expériences en présence de KCl pour étudier la capacité du composé **4** à extraire de la solution les agrégats de G-quartet. Différents tubes RMN ont été préparés avec une solution de GMP à 22 %*m* avec 50mM de KCl et une concentration croissante de **4** (jusqu'à 0.75 %*m*). Dès l'ajout du composé **4** dans le tube, le processus de précipitation commence et les spectres RMN ³¹P sont alors enregistrés. Comme la RMN ne transcrit que les informations des molécules en solution, les spectres obtenus ne prennent pas en compte le précipité formé. En l'absence du composé **4**, on observe un pic à 4.67 ppm (caractéristique des monomères de GMP) et quatre pics à 5.22, 5.02, 3.4 et 2.3 ppm caractérisant les agrégats de tétrades. Le pourcentage de GMP intervenant dans la formation de tétrades de guanines peut alors être évalué grâce à l'aire relative de ces pics. Lors de l'ajout du composé **4** on observe une diminution des pics relatifs aux tétrades (voir Figure 51).

77. Brunsveld, L.; Folmer, B. J.; Meijer, E. W.; Sijbesma, R. P., Supramolecular polymers. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (12), 4071-98.

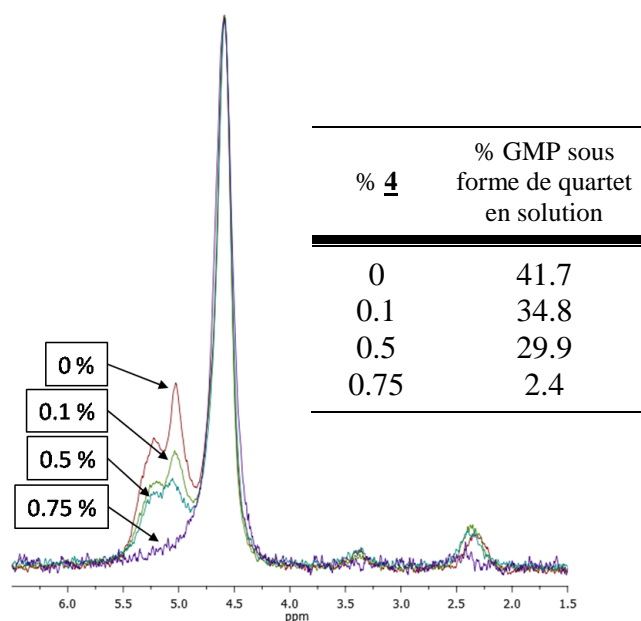


Figure 51 – Spectre RMN ^{31}P de solutions contenant 22 %*m* de GMP, 50mM de KCl et une teneur croissante de composé **4** (0, 0.1, 0.5 et 0.75%*m*). Spectres acquis dans H_2O (pH 8) à 25°C. En insert figure le % de GMP sous forme de quartet en solution en fonction de la teneur en composés **4**.

Le tableau présenté sur la Figure 51 quantifie la disparition des tétrades de guanines en solution. Pour une teneur de 0.75 %*m* en **4**, on observe quasiment plus qu'un pic unique relatif à la GMP libre en solution. Il semble ainsi que le composé **4** possède la capacité d'extraire les agrégats de tétrades de GMP en les faisant précipiter. Des expériences sont actuellement en cours pour confirmer ce comportement. Entre autres, des expériences par AFM en solution ont été mises en œuvre pour visualiser l'extraction ou la polymérisation des agrégats de tétrades sur surface. La surface d'étude a été fonctionnalisée *via* un couplage entre l'amine libre de la lysine du gabarit du composé **4** et des fonctions acides introduites par la construction de SAM (Self-Assembled Monolayer) sur une surface d'or.

I-3/ Bilan

L'utilisation de gabarits permet de préorganiser des nucléobases et de contraindre la formation de structures discrètes basées sur la formation de liaisons hydrogène. Les tétrades de guanines, formées par l'arrangement planaire de quatre guanosines selon un schéma de liaisons hydrogène de type Hoogsteen, représentent un bon exemple de structure complexe. De nombreuses équipes se sont intéressées à reproduire ce type de motif *via* la synthèse et le développement de composés lipophiles. Néanmoins les différentes études effectuées ont toujours été limitées au contrôle de la formation de tétrades synthétiques dans des solvants organiques, ceci à cause de la compétition dans l'établissement de liaisons hydrogène par l'eau.

Nous avons montré que l'utilisation raisonnée d'un gabarit cyclodécapeptidique hydrosoluble permet le contrôle de la formation d'une tétrade de guanines dans l'eau sans ajout de cation pour stabiliser la structure formée. Deux composés, **4** et **5**, ont été synthétisés *via* une réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen entre des fonctions alcynes (introduites dans le gabarit peptidique *via* l'acide aminé modifié : propargylglycine) et des fonctions azide (introduites *via* la modification en 5' de la guanosine). Un intérêt tout particulier a été apporté au choix des espaceurs utilisés. L'introduction d'un lien triazole permet de structurer les tétrades et de les stabiliser.

Les composés synthétisés, **4** et **5**, malgré des similitudes de structure montrent un comportement différent en solution. Le composé **4** forme en solution (H₂O/CH₃CN) une tétrade isolée. Des études structurales ont permis de déterminer la structure exacte de l'architecture formée par le composé **4** et la modélisation de la tétrade synthétique permet d'observer et de comprendre les interactions mises en jeu lors de la formation de la tétrade. La structuration de ce composé représente le premier exemple de tétrade isolée dans un solvant aqueux formé en l'absence de cation pour stabiliser la structure. La participation des résidus triazole a été mise en évidence par l'observation de l'empilement des bases nucléiques sur la « tétrade » formée par les quatre noyaux aromatiques.

Le composé **5** donne en solution (H₂O) un mélange de monomère et de dimère. Le dimère formé est composé de l'empilement de deux tétrades synthétiques selon une symétrie *D*₄. Bien que des études structurales soient rendues très difficiles à réaliser, à cause de la présence d'un mélange de structures, les différentes informations récoltées ont permis de construire un modèle. Le modèle proposé montre l'empilement de deux tétrades, créant une structure à hélicité droite similaire à une structure nucléique de type quadruplexe.

I-4/ Partie Expérimentale

Les parties expérimentales du manuscrit seront décrites en anglais afin de permettre son utilisation par tous les utilisateurs du laboratoire, y compris les collaborateurs étrangers. Elles constituent par ailleurs un outil pour la rédaction des publications relatant nos travaux.

Chacun des chapitres de ce manuscrit possède leur partie expérimentale par souci de clarté. Néanmoins les protocoles décrits dans cette partie sont également utilisés pour la synthèse des composés décrits dans le *Chapitre II*.

I-4-1 Materials and equipments

a) Reagents and solvents

Protected amino acids were obtained from Bachem Biochimie SARL (Voisins-les-Bretonneux, France), Acros Organics (Noisy-le-Grand, France) or Calbiochem-Novabiochem (Merck Biosciences - VWR, Limonest, France). PyBOP[®] was purchased from Calbiochem-Novabiochem. Fmoc-Gly-SASRIN[®] resin from Bachem Biochimie SARL. Other reagents were obtained from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), Acros Organics (Noisy-le-Grand, France), Eurogentec (Angers, France) and Link Technologies (Bellshill, Scotland).

b) RP-HPLC

RP-HPLC analyses were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller, a Waters 2487 Dual Absorbance Detector and a Waters In-Line Degasser. The analytical column used was the Nucleosil 120 Å 3 µm C₁₈ particles, 30 × 4 mm² operated at 1.3 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 15 min run time (classical program 5 to 100 % B in 15 min). UV monitoring was performed most of the time at 214 nm and 250 nm. Solvent A consisted of H₂O containing 0.1% TFA and solvent B of CH₃CN containing 9.9% H₂O and 0.1% TFA. Solvent A consisted of 20 mM ammonium acetate buffer containing 5% CH₃CN and solvent B consisted of CH₃CN containing 5% H₂O). Water was of Milli-Q quality and was obtained after filtration of distilled water through a Milli-Q[®] cartridge system. CH₃CN and TFA were of HPLC use quality. RP-HPLC purifications were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller and a Waters 2487 Dual Absorbance Detector. Degassing of solvents was performed with 50 mL.min⁻¹ nitrogen. The preparative column, Delta-Pak[™] 300 Å 15 µm C₁₈ particles, 200 × 25 mm² was operated at 22 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 30 min run time. Solvents A and B were the same than the ones used in RP-HPLC analysis.

c) Mass spectrometry

Electron spray ionization (ESI-MS) mass spectra were obtained on an Esquire 3000 (Bruker).

d) NMR spectroscopy

NMR spectra were obtained at 500 MHz with a Varian Unity plus spectrometer. All spectra were referenced with external TSP-d₄. Prior to NMR samples preparation compounds **4** and **5** were desalted by size-exclusion chromatography on a NAP-10 column (GE

Healthcare) and lyophilized 4 times. Compounds were dissolved in a mixture of H₂O/CD₃CN (50:50) for **4** and H₂O/D₂O (90:10) for **5** to a final concentration of 2 mM. The pH of the sample was adjusted to 5.8 with an aqueous solution of HCl. A set of two-dimensional (2D) spectra, including TOCSY, DQF-COSY and NOESY were acquired with 1.5 s steady state recovery time, mixing times (t_m) of 60 ms for TOCSY and 250 ms for NOESY. Water suppression was achieved by appending an excitation-sculpting module to the non-selective detection pulse and with selective Gaussian-shaped pulses of 3-5 ms. The spin-lock mixing of the TOCSY experiment was obtained with a DIPSI-2 pulse train at $\gamma B_2/2\pi = 9-10$ kHz. The acquisitions were performed over a spectral width of 10 ppm or 15 ppm in both dimensions, with matrix size of 2048 data points in t_2 and 256-512 points in t_1 , and 32-64 scans/ t_1 .

The 2D-DOSY experiments were run using a modified version of the Bruker ledbpg2s pulse sequence at 400MHz on a Bruker Avance spectrometer, with stimulated echo, longitudinal eddy current compensation, bipolar gradient pulses and a linear gradient stepped between 2% and 95%. 16 scans were recorded for each gradient step. Data processing was performed using maximum entropy algorithm from Bruker's TopSpin NMR software package and MestReNova software.

The ³¹P NMR spectra were obtained at 121.5 MHz on a Bruker Avance spectrometer. All spectra were referenced with external H₃PO₄. NMR samples containing Na₂(5'-GMP) were prepared from a 34 %m stocked solution by dilution with doubly distilled deionized water. A stock solution of compound **4** was prepared at 5%*m* in H₂O/CD₃CN (50:50) and added in the samples prior to use.

e) Distance restraints and molecular modeling

Approximate interproton distance restraints were calculated using the isolated two-spin approximation relationship, $r_{ij} = r_{kl} (\sigma_{kl} / \sigma_{ij})^{1/6}$, where σ_{ij} and σ_{kl} are the NOE intensities for the atom pairs i, j and k, l separated by distances r_{ij} and r_{kl} , respectively. A total of 16 distance restraints were used for compound **4**. Restrained energy minimizations were performed with the Insight II/Discover software (Version 2005, Accelrys, San Diego, CA, USA), using the set of distance restraints determined by NMR. The selected force field was CVFF, and, to shorten the range of Coulomb interaction, a distance-dependent relative dielectric constant, ϵ_r , was used ($\epsilon_r = 4r$). The structure was subjected to 15000 iterations of VA09A minimization, followed by 15000 iterations of conjugate gradient minimization and 1000 iterations of steepest descent minimization, the convergence of minimization was followed until the RMS derivative was less than 0.01 kcal mol⁻¹. In order to more widely explore conformational space, we used a high temperature simulated annealing protocol for rMD simulations. Calculations were performed *in vacuo* and the energy of the system was calculated by the consistent CVFF forcefield. In the simulations, starting structures were subjected to the following protocol with appropriate restraint weights which were modulated by multiplying the force constants with a scaling factor. The starting structures were first subjected to 100 cycles of rEM with conjugate gradients. The initial velocities were assigned with a Maxwell distribution at 600 K. The system was gradually heated from 0 K to 600 K during the first 2 ps and then maintained at 600 K for the next 40 ps. The step size of the

integrator was set to 1 fs. During this phase of the simulation, force constants were gradually increased by a factor of 2 in the first 10 ps and then held constant at this level during the high-temperature phase. The system was slowly cooled to 300 K, in steps of 100 K, for 30 ps and then maintained at 300 K for an additional 20 ps. During the cooling and equilibrium phases, distance and dihedral angle force constants were gradually decreased to their initial value. The last 10 coordinate sets, were averaged and subjected to a final 1000 steps of restrained energy minimization to generate the restrained structures.

f) CD spectroscopy

CD spectra were recorded on a Jasco J-810 circular dichroism spectropolarimeter using 10mm path length quartz cuvette. Scans were performed at controlled temperature over a wavelength range of 205-350nm (only 220-320nm is show), with response time of 4s, 0.5nm pitch, 4nm bandwidth and a scanning speed of 100nm/min. Blank spectra were subtracted from collected data. The CD spectra represent an average of two scans and are zero-corrected at 350nm. Melting experiments are conducted using the same parameters using a temperature slope of 15°C/h.

I-4-2 Synthesis procedures

a) General procedures for the synthesis of peptides

Assembly of all linear protected peptides was performed manually or automatically by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl/tertbutyl (Fmoc/*t*Bu) protection strategy. In manual SPPS, device consisted in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit. The latter allowed elimination of excess reagents and solvents under compressed air. Before use, the vessel was treated for 12 h (typically overnight) with (CH₃)₂SiCl₂ as lubricant to prevent resin beads from sticking to the glass inner wall during the synthesis. It was then carefully washed with CH₂Cl₂ until complete acid trace clearance. At the beginning of the synthesis and after each ether washing, the resin was washed and swollen twice with CH₂Cl₂ (20 mL/g resin) for 15 min and once with DMF (20 mL/g resin) for 15 min. Coupling reactions were performed using, relative to the resin loading, 1.5-2 eq. of *N*_α-Fmoc-protected amino acid *in situ* activated with 1.5-2 eq. PyBOP and 3-4 eq. DIEA in DMF (10 mL/g resin) for 30 min. The resin was then washed twice with DMF (20 mL/g resin) for 1 min and twice with CH₂Cl₂ (20 mL/g resin) for 1 min. The completeness of amino acid coupling reaction was checked by the TNBS test. TNBS test required : a solution of 1% trinitrobenzenesulfonic acid in DMF and a solution of DIEA/DMF (1:9). Three drops of each solution were added to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was left at r.t. for 1 min. Remaining of free amino functions resulted in a bright orange-red coloration of the resin beads (positive TNBS test). Coupling reaction with the protected amino acid should then be repeated until the beads remain colourless (negative TNBS test). *N*_α-Fmoc protecting groups were removed by treatment with piperidine/DMF (1:4) (10 mL/g resin) for 10 min. The process was repeated three times and the resin was further washed five times with DMF (10 mL/g resin) for 1 min. The completeness of the deprotection was checked by UV measurement. Indeed, Fmoc groups releasing afforded dibenzofulvene whose adduct with piperidine absorbs light in the UV range ($\lambda = 299 \text{ nm}$, $\epsilon =$

7800 M⁻¹.cm⁻¹). Cleavage and washing solutions were thus together collected and the volume of the solution was adjusted to a known value (V) with MeOH. Absorbance of this solution at 299 nm gave the amount of Fmoc protecting groups released from the cleavage according to the Beer- Lamber relation: $n_{\text{Fmoc}} = (\text{OD}_{299\text{nm}} \times V) / (\epsilon_{299\text{nm}} \times l)$ (with l = length of optical path). This method was commonly used for the following of SPPS and to determine, in an indirect manner, the loading of the resin.

Automated syntheses of peptide are performed on a ABI 433 A1 Peptide Synthesizer (Applied Biosystems) using standard solid-phase methods or on a 348 Ω Synthesizer (Advance ChemTech) using the same conditions as manual procedure.

*b) Synthesis of compound **14***

The synthesis of compound **14** involved the solid phase synthesis of the peptidic scaffold **12** and the solution coupling of the PNA monomer Fmoc-PNA-G-Bhoc)-OH **13**. The synthesis pathway is depicted on Figure 52.

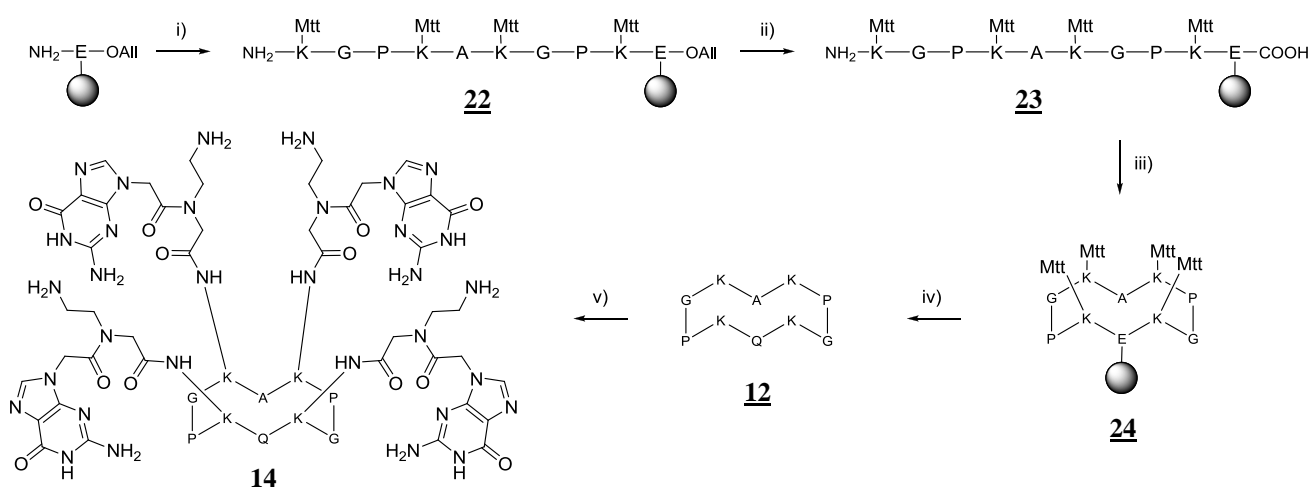
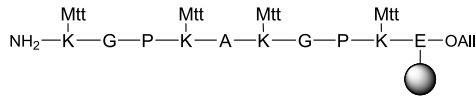
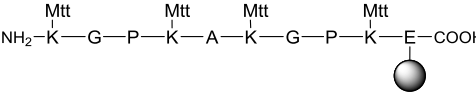
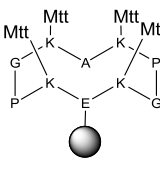


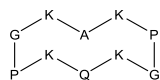
Figure 52 – Synthesis of compound **14**. i) SPPS using classical Fmoc/tBu strategy, ii) Pd(PPh₃)₄, PhSiH, DCM, iii) PyBOP, DIEA, DMF, iv) TFA, TIS, DCM (95:2.5:2.5, v:v:v), v) **13**, HBTU, DIEA, DMF, then piperidine/DMF (20:80, v:v), then TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5, v:v:v).

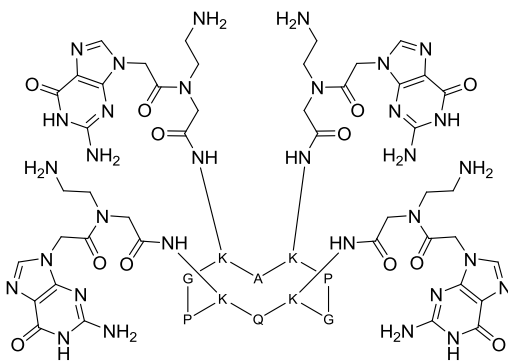
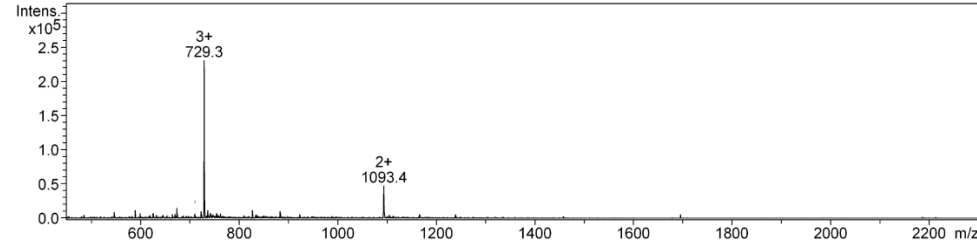
The experimental procedures for the synthesis of each compound are developed thereafter:

H-Lys(Mtt)-Gly-Pro- Lys(Mtt)-Ala- Lys(Mtt)-Gly-Pro- Lys(Mtt)-Glu(Rink Amide)- OAll	<u>22</u>
$\text{NH}_2\text{-}\overset{\text{Mtt}}{\text{K}}\text{-G-P-}\overset{\text{Mtt}}{\text{K}}\text{-A-}\overset{\text{Mtt}}{\text{K}}\text{-G-P-}\overset{\text{Mtt}}{\text{K}}\text{-E-OAll}$ 	An aliquot of the resin was treated with a solution of DCM/ TFA (5:95). ESI-MS, positive mode, Fully deprotected peptide : m/z calcd: 1078.3 g.mol ⁻¹ m/z found: 1078.9 g.mol ⁻¹
The synthesis was performed automatically using Fmoc/tBu strategy on a Rink Amide resin using HBTU as activating agent using the classical protocol.	

H-Lys(Mtt)-Gly-Pro- Lys(Mtt)-Ala- Lys(Mtt)-Gly-Pro- Lys(Mtt)-Glu-Rink Amide	<u>23</u>
$\text{NH}_2\text{-}\overset{\text{Mtt}}{\text{K}}\text{-G-P-}\overset{\text{Mtt}}{\text{K}}\text{-A-}\overset{\text{Mtt}}{\text{K}}\text{-G-P-}\overset{\text{Mtt}}{\text{K}}\text{-E-COOH}$ 	An aliquot of the resin was treated with a solution of DCM/ TFA (5:95). ESI-MS, positive mode, Fully deprotected peptide : m/z calcd: 1038.3 g.mol ⁻¹ m/z found: 1038.8 g.mol ⁻¹
The peptide on resin <u>22</u> was treated by a solution of Pd(PPh ₃) ₄ (0.2 eq) and PhSiH (100 eq) in anhydrous DCM for 45 min under inert atmosphere (Argon). The resin is then washed with DCM (×2) and dioxane/H ₂ O (9:1) (×2).	

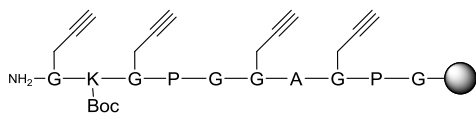
c[-Lys(Mtt)-Gly-Pro- Lys(Mtt)-Ala- Lys(Mtt)-Gly-Pro- Lys(Mtt)-Glu(Rink Amide)]	<u>24</u>
	An aliquot of the resin was treated with a solution of DCM/ TFA (5:95). ESI-MS, positive mode, Fully deprotected peptide : m/z calcd: 1020.2 g.mol ⁻¹ m/z found: 1020.6 g.mol ⁻¹
The peptide on resin <u>23</u> was treated by a solution of PyBOP (1.5 eq) and DIEA (to obtain pH 8-9) in DMF for 1 h. The resin is then washed with DMF (×4) and with DCM.	

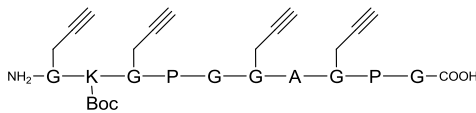
c[-Lys(Mtt)-Gly-Pro- Lys(Mtt)-Ala- Lys(Mtt)-Gly-Pro- Lys(Mtt)-Gln]	<u>12</u>
	ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 1020.2 g.mol ⁻¹ m/z found: 1020.4 g.mol ⁻¹
The peptide <u>24</u> was released from the resin using a solution of TFA/DCM/TIS (95:2.5:2.5, v:v:v). After evaporation under vacuum, the peptide was precipitated with ether. Peptide <u>12</u> was then purified using RP-HPLC.	

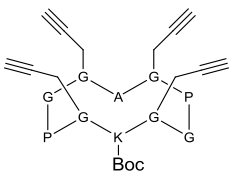
	<p><u>14</u></p> <p>Yield : 36%</p> <p>ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 2185.3 g.mol⁻¹ m/z found: 2185.9 g.mol⁻¹</p>
<p>Peptide 12 (1 eq), Fmoc-PNA-G(Bhoc)-OH (4.8 eq) 13, HBTU (4.7 eq) and DIEA (to obtain pH 8-9) were stirred overnight at RT in DMF. The solvent was removed under vacuum and the product was precipitated with ether. The crude was dissolved in piperidine/DMF (20:80, v:v) and stirred for 1h. The solvent was removed under vacuum and the product was precipitated with ether. Finally the crude was dissolved in TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5, v:v:v) and stirred for 1h. The solvent was removed under vacuum and compound 14 was then purified using RP-HPLC.</p>	
	

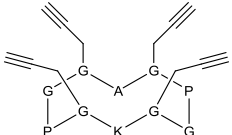
c) *Synthesis of compounds **4** and **5***

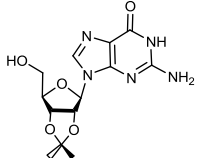
Compounds **4** and **5** were synthesized according to the pathways presented on Figure 36, Figure 37 and Figure 38.

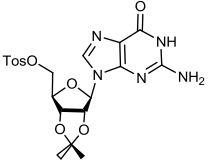
<p>H-Pra-Lys(Boc)-Pra-Pro-Gly-Pra-Ala-Pra-Pro-Gly-Sasrin[®]</p>	<p><u>17</u></p>
	
<p>The synthesis was performed manually using Fmoc/tBu strategy on a Sasrin[®] resin using PyBOP as activating agent using the classical protocol.</p>	

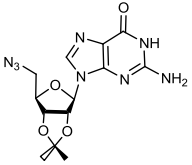
H-Pra-Lys(Boc)-Pra-Pro-Gly-Pra-Ala-Pra-Pro-Gly-OH	18
	ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 1006.2 g.mol ⁻¹ m/z found: 1006.6 g.mol ⁻¹
The peptide 17 was released from the resin using a solution of TFA/DCM (1:99, v:v). After evaporation under vacuum, the peptide was precipitated with ether. The crude material was used without additional purification.	

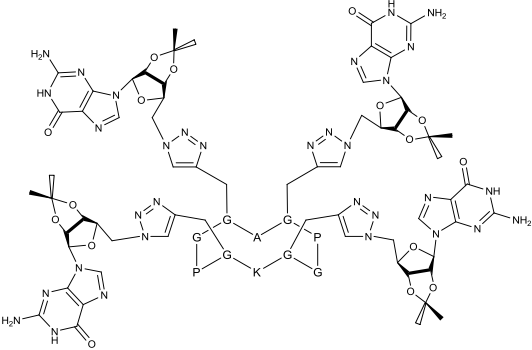
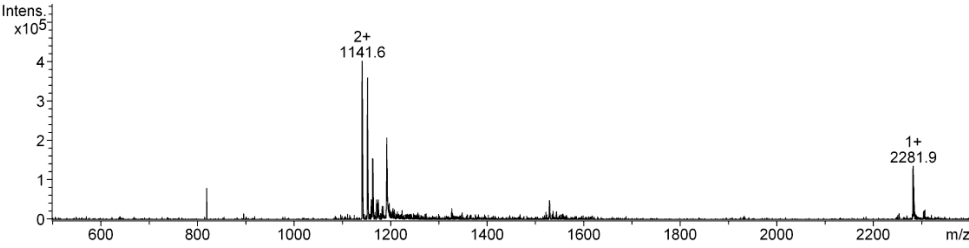
c[-Pra-Lys(Boc)-Pra-Pro-Gly-Pra-Ala-Pra-Pro-Gly-]	19
	ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 988.1 g.mol ⁻¹ m/z found: 988.7 g.mol ⁻¹
Linear peptide 18 (1 eq) was dissolved in DCM (0.5 mM) then PyBOP (1.5 eq) and DIEA (to obtain pH 8-9) were added. The solution was stirred at RT for 2 h and the solvent was removed under vacuum and the peptide 19 was then precipitated with ether.	

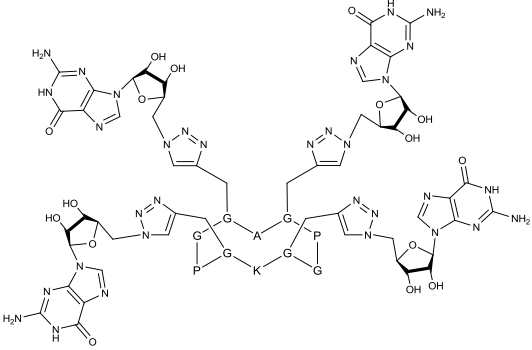
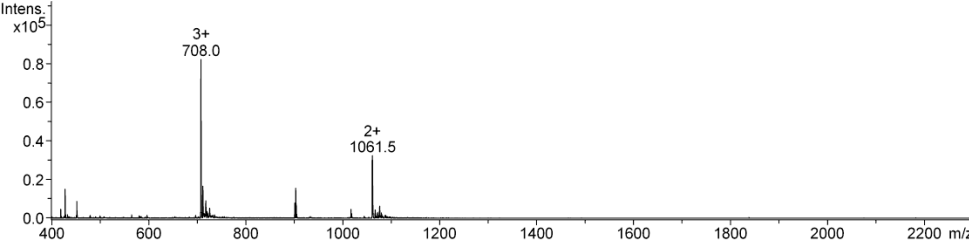
c[-Pra-Lys-Pra-Pro-Gly-Pra-Ala-Pra-Pro-Gly-]	15
	ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 888.0 g.mol ⁻¹ m/z found: 888.6 g.mol ⁻¹
Peptide 19 was dissolved in DCM/TFA (1:1, v:v) and stirred at RT for 1h. The solvent was removed under vacuum and the peptide 15 was precipitated with ether. Peptide 15 was then purified using RP-HPLC.	

2',3'-O-isopropylidenguanosine	20
	Yield : 80% ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 323.3 g.mol ⁻¹ m/z found: 323.5 g.mol ⁻¹ ¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO) δ (ppm) 10.7 (s, 1H), 7.9 (s, 1H), 6.5 (s, 2H), 5.9 (d, 1H), 5.0 (m, 2H), 4.1 (t, 1H), 3.5 (d, 2H), 1.4 (s, 3H), 1.2 (s, 3H)
A mixture of guanosine (1eq), p-toluenesulfonic acid (1.2eq) and dimethoxy-2,2 propane (8eq) in acetone is stirred for 6h at RT. The solvent is removed under vacuum and the crude product is dissolved in an aqueous solution containing 1% NH ₄ OH. The solution is kept at 4°C for a night and the precipitate is recovered by filtration. The 2',3'-O-isopropylidenguanosine 20 is obtain as a white powder.	

5'- <i>O</i> -Tosyl-2',3'- <i>O</i> -isopropylidene- <i>guanosine</i>	<u>21</u>
	<p>Yield : 68%</p> <p>ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 477.5 g.mol⁻¹ m/z found: 477.8 g.mol⁻¹</p> <p>¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO) δ (ppm) 10.7 (s, 1H), 7.7 (s, 1H), 7.6 (d, 2H), 7.2 (d, 2H), 6.5 (s, 2H), 6.0 (d, 1H), 5.1 (m, 2H), 4.2 (t, 1H), 3.4 (m, 2H), 2.4 (s, 3H), 1.5 (s, 3H), 1.3 (s, 3H)</p>
<p>A mixture of 2',3'-<i>O</i>-isopropylidene-<i>guanosine</i> <u>20</u> (1eq) and tosyl chloride (1.25eq) in pyridine is stirred for 3h at RT. The solvent was evaporated. The crude product is dissolved in ethyl acetate and wash with water (3×). The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated. The crude product was purified using a silica gel column (cyclohexane:EtOAc, 1:8, v:v) to afford product 5'-<i>O</i>-Tosyl-2',3'-<i>O</i>-isopropylidene-<i>guanosine</i> <u>21</u> as an oil.</p>	

5'-azido-2',3'- <i>O</i> -isopropylidene- <i>guanosine</i>	<u>16</u>
	<p>Yield : 53%</p> <p>ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 348.3 g.mol⁻¹ m/z found: 348.2 g.mol⁻¹</p> <p>¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO) δ (ppm) 10.7 (s, 1H), 7.9 (s, 1H), 6.5 (s, 2H), 6.0 (s, 1H), 5.3 (d, 1H), 5.0 (t, 1H), 4.2 (p, 1H), 3.5 (m, 2H), 1.5 (s, 3H), 1.3 (s, 3H)</p>
<p>A mixture of 5'-<i>O</i>-Tosyl-2',3'-<i>O</i>-isopropylidene-<i>guanosine</i> <u>21</u> (1eq) and NaN₃ (10eq) in DMF was stirred for 24h at 50°C. The hot mixture was filtered and the filtrate was evaporated to dryness. The crude product was treated with boiling water for 15min and then filtered while hot. The insoluble 5'-azido-2',3'-<i>O</i>-isopropylidene-<i>guanosine</i> <u>16</u> is obtain as a white powder.</p>	

	<p>4</p> <p>Yield : 79%</p> <p>ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 2281.3 g.mol⁻¹ m/z found: 2280.9 g.mol⁻¹</p>
<p>Peptide 15 (1 eq) and 5'-azido-2',3'-O-isopropylidene-guanosine 16 (10 eq) were mixed in the following buffer : PBS 10mM, NaCl 0.15M in H₂O/DMSO/tBuOH (4:4:1, v:v:v) pH 8.0. Then a catalytic amount of copper (Cu⁰, 99%, 45 μm powder) was added to the solution. The solution was stirred overnight at 60°C. The crude mixture was purified by RP-HPLC to afford product 1 as a white powder</p>	
	

	<p>5</p> <p>Yield : 79%</p> <p>ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 2121.0 g.mol⁻¹ m/z found: 2121.0 g.mol⁻¹</p>
<p>The product 4 was dissolved in a solution of H₂O/TFA (1:1, v:v) and stirred at RT for 3h. The crude mixture was then purified by RP-HPLC to afford product 2 as a white powder.</p>	
	

Chapitre II : MIMES D'ADN QUADRUPLEXE

II-1/ Rappels bibliographiques

II-1-1 Prévalence biologique des motifs quadruplexes d'acides nucléiques

Bien que l'existence des structures de types ADN quadruplexes *in vivo* est encore sujette à discussions, de nombreuses études montrent que de telles structures semblent jouer un rôle biologique au niveau cellulaire tant au niveau de la régulation, de l'expression de gènes que de la réplication, de la recombinaison ou de la division cellulaire. Après une description de quelques expériences amenant une preuve de la possible existence du motif quadruplexe *in vivo*, les phénomènes biologiques dans lequel l'ADN quadruplexe interviendrait seront décrits.

a) Mise en évidence de l'existence *in vivo* de l'ADN quadruplexe

Une des preuves les plus évidentes de l'existence des motifs G-quadruplexe *in vivo* vient des expériences de l'équipe de A. Plückthun.⁷⁸ En 2001, son équipe génère des anticorps synthétiques simple chaîne (Ab) spécifiquement dirigée contre deux types de motifs quadruplexe. Deux anticorps sont alors produits : l'un (Sty3) spécifique d'un quadruplexe intermoléculaire parallèle et l'autre (Sty49) capable de reconnaître à la fois un quadruplexe intermoléculaire parallèle et un quadruplexe intramoléculaire antiparallèle issus de la séquence télomérique du protozoaire cilié *Stylonychia lemnae* d(T₄G₄)_n. Lorsque ces deux anticorps synthétiques sont introduits dans le macronoyau (compartiment comportant un grand nombre de chromosomes et donc de télomères), seul l'anticorps Sty49 produit un signal (immunofluorescence). Les auteurs concluent de cette observation que seuls les quadruplexes de type intramoléculaire antiparallèle sont présents dans l'ADN chromosomique. En 2005, le même laboratoire (H. J. Lipps) montre que l'inactivation par ARN interférence des protéines α TBP et β TBP (telomere end-binding proteins) ne permet plus l'obtention d'un marquage du macro-noyau par l'anticorps Sty49.⁷⁹ Les auteurs concluent ainsi que la présence des deux protéines est nécessaire pour la formation de motif quadruplexe *in vivo*. En 2004, l'équipe de N. Maizels montre que l'utilisation d'un plasmide contenant un insert dérivé de la répétition de la séquence télomérique TTAGGG humaine chez *Escherichia Coli* permet la formation de structure de type quadruplexe observable par microscopie électronique.⁸⁰ Finalement, en 2005 l'équipe de F. Boussin utilise un ligand sélectif de l'ADN quadruplexe ³H-360A ((2,6-*N,N'*-methyl-quinolonio-3-yl)-pyridine dicarboxamide) marqué au tritium pour localiser par radiographie la partie de l'ADN chromosomique humain où interagit le ligand.⁸¹ Les auteurs localisent le site d'interaction principal au niveau des télomères et apportent ainsi une preuve supplémentaire de l'existence du motif quadruplexe *in vivo*.

78. Schaffitzel, C.; Berger, I.; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H. J.; Pluckthun, A., In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98 (15), 8572-7.

79. Paeschke, K.; Simonsson, T.; Postberg, J.; Rhodes, D.; Lipps, H. J., Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures *in vivo*. *Nat Struct Mol Biol* **2005**, 12 (10), 847-54.

80. Duquette, M. L.; Handa, P.; Vincent, J. A.; Taylor, A. F.; Maizels, N., Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes Dev.* **2004**, 18 (13), 1618-29.

81. Granotier, C.; Pennarun, G.; Riou, L.; Hoffschir, F.; Gauthier, L. R.; De Cian, A.; Gomez, D.; Mandine, E.; Riou, J. F.; Mergny, J. L.; Mailliet, P.; Dutrillaux, B.; Boussin, F. D., Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33 (13), 4182-90.

b) *Analyses génomiques*

De récentes études bioinformatiques sur le génome humain ont permis de mettre en évidence un grand nombre de séquences capables de former un motif quadruplexe et d'étudier leur disposition au sein du génome. L'équipe de S. Balasubramanian a développé un algorithme « Quadparser » qui recherche les séquences supposées capables de former un quadruplexe intramoléculaire dans des conditions physiologiques.⁸² L'algorithme est basé sur la recherche de séquences de type $d(G_{3+}N_{1-7}G_{3+}N_{1-7}G_{3+}N_{1-7}G_{3+})$, séquences qui possèdent une répétition de trois guanines ou plus encadrant une succession de une à sept bases N. Le nombre de bases composant les boucles des candidats quadruplexes a été fixé à sept, car un nombre supérieur aboutirait à des quadruplexes instables. Cet algorithme a permis d'identifier près de 376 000 séquences non chevauchantes capables de former un motif quadruplexe intramoléculaire. L'équipe de S. Neidle a développé un algorithme similaire pour la recherche de séquences de type $d(G_{3-7}N_{1-7}G_{3-7}N_{1-7}G_{3-7}N_{1-7}G_{3-7})$ et a identifié de cette manière un nombre similaire de candidats.⁸³ L'équipe de N. Maizels a développé également un algorithme « G4P Calculator » pour quantifier le potentiel de formation du motif quadruplexe (G4P) parmi 16654 gènes référencés dans la base de données RefSeq.⁸⁴ L'algorithme utilisé identifie les séquences de longueur inférieure à cent bases possédant au moins quatre répétitions non contiguës de plus de trois guanines. Cette étude a permis de mettre en évidence une corrélation entre le G4P et la fonction des gènes. On constate ainsi que les gènes suppresseurs de tumeurs sont caractérisés par un faible potentiel à former des G_4 alors que les proto-oncogènes possèdent un fort potentiel. Certains gènes associés à des fonctions comme les récepteurs à la protéine G, la perception sensorielle, l'assemblage de nucléosomes, le cycle de l'ubiquitine, l'adhésion ou encore la division cellulaire sont caractérisés par un faible G4P. D'autres gènes associés à des fonctions comme le développement, la réponse immunitaire, l'activité des facteurs de transcriptions, la signalisation cellulaire, la contraction des muscles, les facteurs de croissance ou bien les cytokines sont caractérisés par un fort G4P. Cette étude montre que les gènes susceptibles de former des motifs quadruplexes sont associés à des fonctions biologiques bien particulières. Ainsi la bioinformatique montre l'implication supposée de l'ADN quadruplexe dans de nombreux processus biologiques importants.

c) *Télomères et télomérase*

L'extrémité des chromosomes des espèces eucaryotes est constituée de séquences d'ADN non codantes, qui associées à de nombreuses protéines, est connue sous le nom de télomère. Mis en évidence par B. McClintock dès 1939,⁸⁵ les télomères protègent l'extrémité des chromosomes de nombreux processus problématiques, comme la fusion d'extrémité non

82. Huppert, J. L.; Balasubramanian, S., Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2908-16.

83. Todd, A. K.; Johnston, M.; Neidle, S., Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2901-7.

84. Eddy, J.; Maizels, N., Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (14), 3887-96.

85. McClintock, B., The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1939**, *25* (8), 405-16.

homologue (fusion des chromosomes), la formation par recombinaison de chromosomes dicentriques ou la dégradation par des nucléases endogènes.⁸⁶ Le prix Nobel de médecine 2009 a été décerné à E. Blackburn, C. Greider et J. Szostak pour la découverte du mécanisme de protection des chromosomes par les télomères et le rôle de la télomérase dans la maintenance de ces structures.

Structures des télomères : L'ADN télomérique est composé par la répétition de séquences simples. Chez l'homme, les télomères ont une longueur de 6 à 8Kb pour des cellules somatiques et de 10 à 20Kb pour les cellules germinales. L'extrémité 3' de l'ADN télomérique est composée d'une extension simple brin d'une longueur de 100 à 200b (Figure 53).⁸⁷

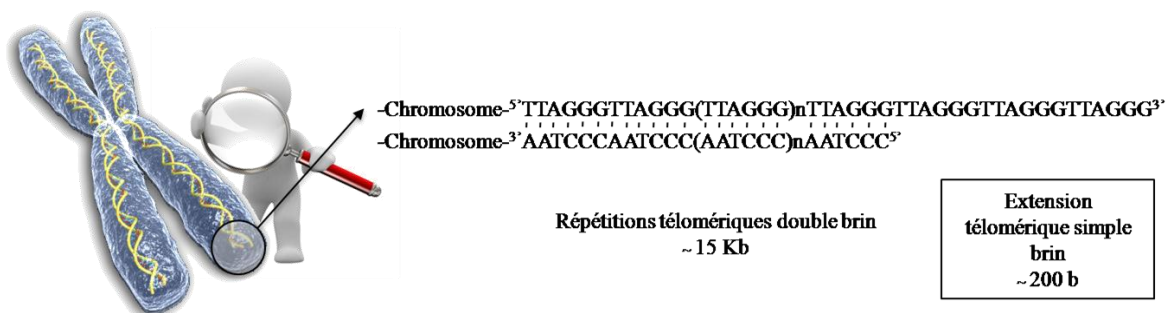


Figure 53 – Structure primaire de l'ADN télomérique humain. L'ADN télomérique humain est constitué d'une région double brin d'une longueur variant de 10 à 20Kb (pour des cellules germinales) et une extension simple brin d'environ 100 à 200 bases.

Homologie des séquences télomériques : Les séquences de l'ADN télomérique de nombreux organismes ont été déterminées (Tableau 2). Ces séquences montrent la particularité de posséder un brin riche en guanines.⁸⁸ Les séquences télomériques des vertébrés d(TTAGGG) ont été conservées tout le long de l'évolution. La conservation des résidus guanine dans l'ADN télomérique peut refléter l'importance des motifs quadruplexes que ces structures peuvent adopter. On verra par la suite que ces structures dynamiques peuvent être contrôlées et utilisées pour inhiber l'action de la télomérase, dont l'activité est liée à la structure des télomères.

86. Blackburn, E. H., Switching and signaling at the telomere. *Cell* **2001**, *106* (6), 661-73.

87. Wright, W. E.; Tesmer, V. M.; Huffman, K. E.; Levene, S. D.; Shay, J. W., Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.* **1997**, *11* (21), 2801-9.

88. Zakian, V. A., Telomeres: beginning to understand the end. *Science* **1995**, *270* (5242), 1601-7.

Organisme	Séquence
Protozoaires	
<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG
<i>Paramecium</i>	TT _T ^G GGG
<i>Oxytricha</i>	TTTTGGGG
<i>Plasmodium</i>	TT _C ^T AGGG
<i>Trypanosoma</i>	TTAGGG
<i>Giardia</i>	TAGGG
Myxomycètes	
<i>Physarum</i>	TTAGGG
<i>Didymium</i>	TTAGGG
<i>Dictyostelium</i>	AG ₁₋₈
Champignons	
<i>Saccharomyces</i>	T ₁₋₆ GTG ₂₋₃
<i>Schizosaccharomyces</i>	T ₁₋₂ ACA ₀₋₁ C ₀₋₁ G ₁₋₆
<i>Neurospora</i>	TTAGGG
<i>Podospora</i>	TTAGGG
<i>Cryptococcus</i>	AG ₃₋₅ TT
<i>Cladosporium</i>	TTAGGG
Invertébrés	
<i>Caenorhabditis</i>	TTAGGC
<i>Ascaris</i>	TTAGGC
<i>Bombyx</i> et autres insectes	TTAGG
Vertébrés	TTAGGG
Plantes	
<i>Chlamydomonas</i>	TTTTAGGG
<i>Chlorella</i>	TTTAGGG
<i>Arabidopsis</i>	TTTAGGG
Tomates	TT _T ^A AGGG

Tableau 2 – Séquence de l'ADN télomérique de quelques organismes. Les séquences présentées sont celles du brin riche en purines et sont écrites du 5' au 3'.

La richesse en guanine des séquences télomériques laisse supposer que cette propriété influe sur le rôle et le comportement des télomères *in vivo*.

Maintenance et évolution des télomères : Comme ces différentes séquences ne sont pas rigoureusement identiques, leurs séquences seules ne suffisent pas à expliquer leurs fonctions. On remarque en effet que de nombreuses protéines interviennent dans la maintenance des télomères. Chez l'homme une trentaine de protéines intervient dans leur structuration et leur protection. Ce complexe protéique est appelé shelterine ou télosome.⁸⁹ Parmi les plus importantes, on peut citer les protéines TRF1 et TRF2 (Telomeric Repeat Binding Factor 1 et 2) qui structurent l'extrémité des télomères en une forme repliée, appelée « t-loop » (Figure 54). Cette boucle télomérique est constituée par le repliement du brin télomérique sur lui-même et stabilisée par l'invasion de l'extension 3' simple brin dans le double brin adjacent. La protéine Pot1 (Protection of telomeres 1) protège l'extrémité 3'. Ce type de structure a été visualisé par microscopie électronique.⁹⁰

89. de Lange, T., Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **2005**, *19* (18), 2100-10.

90. Stansel, R. M.; de Lange, T.; Griffith, J. D., T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *Embo J.* **2001**, *20* (19), 5532-40.

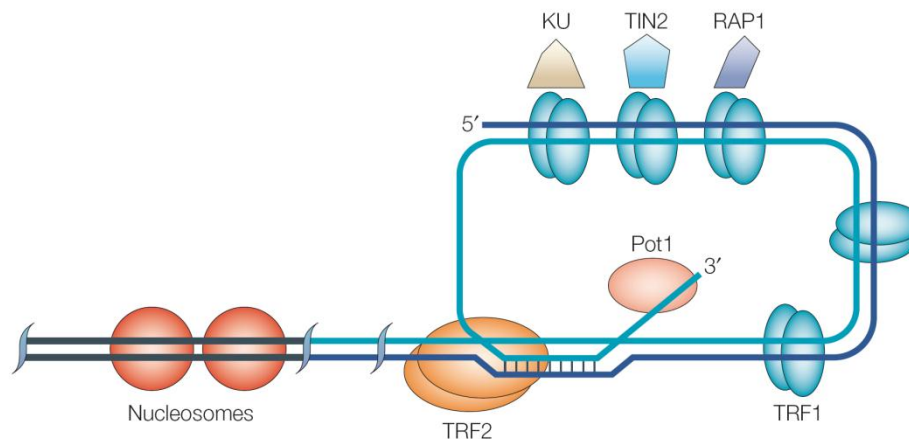


Figure 54 – Représentation schématique de la structure repliée (ou structure « t-loop ») des télomères humains. Certaines protéines associées clés sont indiquées. Figure extraite de la réf 91.

Dans les cellules somatiques, la taille des télomères décroît progressivement à chaque division cellulaire à cause de l'incapacité de l'ADN polymérase endogène à répliquer totalement les séquences télomériques. Ce processus, connu sous le nom de « end-replication effect », entraîne la perte de 50 à 200 bases à chaque réplication. Lorsqu'une taille critique est atteinte, la limite de Hayflick, après 20 à 30 générations, les cellules arrêtent de se diviser (sénescence répliquative) et entament un processus d'apoptose qui mène à la mort de ces cellules.⁹¹

Rôle et mode d'action de la télomérase : La télomérase est l'enzyme la plus active dans la maintenance des télomères des cellules tumorales. C'est une enzyme (170kDa chez l'homme) ribonucléoprotéique composée d'une partie transcriptase inverse hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) et d'une sous-unité ARN hTR (human Telomerase Reverse) servant de matrice pour la synthèse de séquences télomériques. La matrice ARN joue le rôle crucial de capture par hybridation de l'extrémité 3' du simple brin du télomère. Le site catalytique de la télomérase, hTERT, possède une homologie de séquence avec les transcriptases inverses virales. Le mécanisme d'action de la télomérase est décrit sur la Figure 55 et se déroule en trois étapes. La télomérase se fixe par hybridation sur l'extrémité 3' du télomère grâce à sa matrice ARN, le brin d'ADN télomérique simple brin est élongé par synthèse du brin complémentaire de la matrice hTR grâce à l'activité enzymatique de hTERT, puis *via* la translocation de l'enzyme une nouvelle répétition GGTTAG peut être ajoutée.⁹²

91. Neidle, S.; Parkinson, G., Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2002**, *1* (5), 383-93.

92. Mergny, J. L.; Riou, J. F.; Mailliet, P.; Teulade-Fichou, M. P.; Gilson, E., Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (4), 839-65.

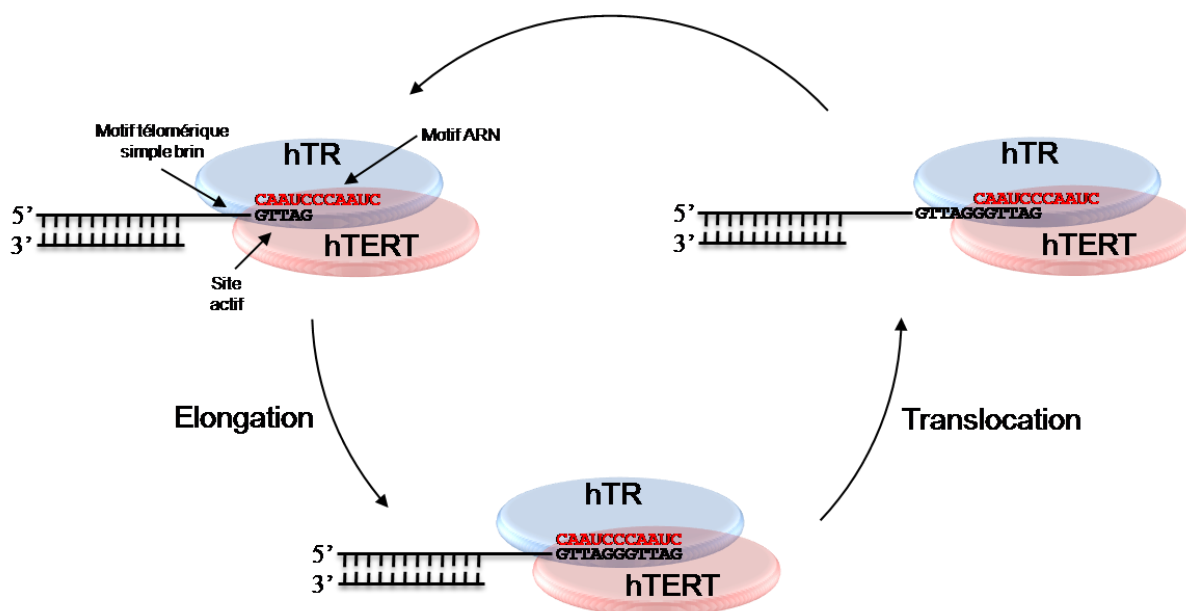


Figure 55 – Mécanisme d'action de la télomérase.

Comme expliqué précédemment, à chaque division cellulaire la longueur des télomères de l'ADN chromosomique des cellules somatiques diminue jusqu'à atteindre une longueur critique. Or la télomérase est faiblement active dans les cellules germinales et surexprimée dans les cellules cancéreuses (dans 85% des cas de cancers).⁹¹ La télomérase réplique ainsi les séquences perdues lors de la réplication de l'ADN chromosomique. Les télomères des cellules cancéreuses n'atteignent donc jamais la taille critique de Hayflick, ce qui résulte en l'immortalisation et la réplication anarchique des cellules cancéreuses.⁹³ Cette enzyme est donc une cible intéressante pour le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses sélectives.

Stratégie d'inhibition de la télomérase : Les « thérapies anti-télomérase » présentent l'avantage d'affecter uniquement les cellules cancéreuses qui sont les seules à surexprimer cette protéine. Ainsi, les inhibiteurs de la télomérase ne devraient pas présenter les problèmes de cytotoxicité rencontrés habituellement dans les thérapies anticancéreuses conventionnelles. La première

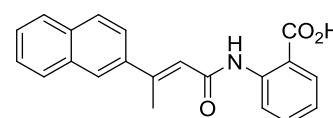


Figure 56 – Structure chimique du BIBR 1532

stratégie d'inhibition de la télomérase consiste à inhiber le site catalytique de hTERT. hTERT étant une transcriptase inverse les inhibiteurs nucléosidiques classiques comme l'AZT (azidothymidine) présentent des effets d'inhibition conséquents (IC₅₀ de 500nM).⁹⁴ D'autres composés non nucléosidiques ont également été développés, en outre, le BIBR 1532 qui

93. Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W., Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **1994**, 266 (5193), 2011-5.

94. Strahl, C.; Blackburn, E. H., The effects of nucleoside analogs on telomerase and telomeres in Tetrahymena. *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22 (6), 893-900.

présente une IC_{50} de 93nM (Figure 56).⁹⁵ Une deuxième stratégie consiste à inhiber l'action de la sous-unité ARN hTR en utilisant des oligonucléotides antisens. Cette stratégie rencontre les mêmes problèmes que les stratégies antisens classiques, à savoir une mauvaise biodisponibilité de l'oligonucléotide thérapeutique, ainsi que des phénomènes de dégradation par les nucléases. Néanmoins certaines chimères donnent de bon résultat, par exemple, le 2'-OMe ARN CAGUUAGGGUUAG (les nucléotides soulignés possèdent des liens phosphorothioates) présente une IC_{50} de 3nM.⁹⁶ La troisième stratégie consiste à inhiber indirectement la télomérase par action sur le brin d'ADN télomérique à élonger. En effet la télomérase n'est active uniquement lorsque le télomère à allonger est en conformation simple brin. La formation de motifs quadruplexe bloque par encombrement stérique l'action de la télomérase. En 1991, l'équipe de A. Zahler montre que la formation de quadruplexe d'ADN en présence d'une concentration adéquate de K^+ inactive la télomérase.⁹⁷ L'ADN télomérique étant en équilibre entre une forme linéaire et repliée (équilibre régi par des résolvas), toute molécule stabilisant les motifs quadruplexes pourrait être un inhibiteur de la télomérase et donc un anticancéreux potentiel (Figure 57).

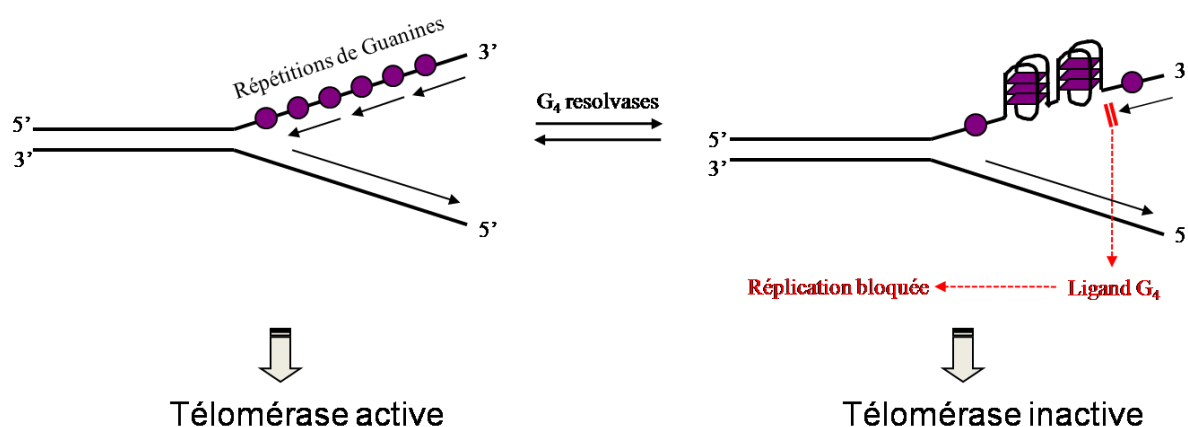


Figure 57 – Mécanisme d'inhibition de la télomérase par la formation de motifs d'ADN quadruplexe au sein de l'ADN télomérique. La stabilisation de ces motifs par de petites molécules organiques déplace l'équilibre vers la forme repliée du télomère.

Les différents motifs quadruplexes formés par la séquence télomérique humaine (voir la partie II-1-2 Polymorphisme) et les différents ligands susceptibles de stabiliser ces motifs (voir II-1-3 Ligands) seront décrits par la suite.

95. Pascolo, E.; Wenz, C.; Lingner, J.; Hael, N.; Priepke, H.; Kauffmann, I.; Garin-Chesa, P.; Rettig, W. J.; Damm, K.; Schnapp, A., Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (18), 15566-72.

96. Pitts, A. E.; Corey, D. R., Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95 (20), 11549-54.

97. Zahler, A. M.; Williamson, J. R.; Cech, T. R.; Prescott, D. M., Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* **1991**, 350 (6320), 718-20.

Tests d'inhibition de la télomérase : Deux tests ont été mis au point afin d'évaluer l'aptitude d'un ligand à inhiber la processivité de la télomérase *in vitro* via la stabilisation de l'ADN quadruplexe. Le premier, qui consiste en une observation directe, utilise un oligonucléotide marqué au ^{32}P en 5' et un extrait de télomérase humaine (typiquement extraite de cellules HeLa) pour quantifier l'élongation de la séquence télomérique en présence du ligand à étudier.⁹⁸ Ce test est difficile à mettre en œuvre à cause de la grande quantité de télomérase nécessaire. Le test TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol) utilise une étape de PCR pour amplifier la nouvelle séquence télomérique synthétisée.⁹⁹ Récemment l'équipe de J.-L. Mergny a mis en évidence l'apparition de faux positifs au cours de ce test due à l'interaction des ligands étudiés avec la polymérase Taq utilisée lors de la PCR.¹⁰⁰ Afin d'éviter ce problème l'équipe de Stephen Neidle a amélioré ce test en proposant le test TRAP-LIG dans lequel le ligand est retiré du milieu (par filtration) avant l'étape de PCR.¹⁰¹ Ces tests permettent l'obtention de la valeur IC_{50} -TRAP qui correspond à la concentration en ligand nécessaire à inhiber 50% de l'activité de la télomérase. Certaines valeurs obtenues peuvent être sous-évaluées mais l'ordre de grandeur reste néanmoins correct.

d) *Promoteurs de gènes*

La présence de structures de types ADN G-quadruplexe a été décrite dans certains promoteurs de gènes. Les régions promotrices de gènes sont souvent caractérisées par une plus grande richesse en guanines et une sensibilité aux nucléases, suggérant une ouverture possible de l'ADN B dans ces régions. La formation de motifs quadruplexes a été caractérisée dans la région promotrice des gènes présentés dans le Tableau 3.

98. Fajkus, J., Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clin. Chim. Acta.* **2006**, 371 (1-2), 25-31.

99. De Cian, A.; Lacroix, L.; Douarre, C.; Temime-Smaali, N.; Trentesaux, C.; Riou, J. F.; Mergny, J. L., Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie* **2008**, 90 (1), 131-55.

100. De Cian, A.; Cristofari, G.; Reichenbach, P.; De Lemos, E.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M. P.; Shin-Ya, K.; Lacroix, L.; Lingner, J.; Mergny, J. L., Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104 (44), 17347-52.

101. Reed, J.; Gunaratnam, M.; Beltran, M.; Reszka, A. P.; Vilar, R.; Neidle, S., TRAP-LIG, a modified telomere repeat amplification protocol assay to quantitate telomerase inhibition by small molecules. *Anal. Biochem.* **2008**, 380 (1), 99-105.

Gène	Séquence formant le motif quadruplexe (5' vers 3')	Position de la séquence par rapport au codon « start » de transcription.
Chicken β -globin	<u>GGGGGGGGGGGGGGGGCGGGTGGTGG</u>	-195 à -170
Human sMtCK	CTGAGGAGGGGCTGGAGGGACCAC	-320 à -296
Mouse MCK	TCCGGAGGGGCAGGCTGAGGGCGGC	-1045 à -1021
Mouse $\alpha 7$ integrin	AAAGGTGGGGCGGCAGGGCGCAAGGCAAT	-215 à -186
Human <i>c-myc</i>	TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG	-142 à -115
Human <i>c-kit</i>	CCCGGGCGGGCGCGAGGGAGGGGAGG	-163 à -137
Human <i>bcl-2</i>	AGGGGCGGGCGCGGGAGGAAGGGGGCGGGAGCGGGGCTG	-1386 à -1423
Human <i>VEGF</i>	<u>GGGGCGGGCCGGGGCGGGGTCCCGGCGGGGCGGAG</u>	-85 à -50
Human <i>K-ras</i>	GGGCGGTGTGGAAGAGGAAGAGGGGGAG	-327 à -296
Human RET	AGCGGGTAGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGTCC	-59 à -25
Human Rb	CGGGGGTTTTGGGCGGC	<i>n.d.</i>
Human <i>chl1</i>	<u>CGGGCGGGGAAGGGGTGGGA</u>	-863 à -844

Tableau 3 – Séquence et position de région promotrice de gène formant un motif quadruplexe *in vitro*. Sont soulignées les guanines intervenants ou pouvant intervenir dans la formation d'une tétrade.

L'étude du gène β -globine du poulet (chicken β -globin) offre la première preuve de l'implication de motif quadruplexe dans le contrôle de la réplication d'un gène. En 1994, l'équipe de K. Usdin montre la possible formation d'un motif quadruplexe dans la région promotrice de ce gène.¹⁰² De plus la protéine BGP1 (poly(dG)-binding protein) se montre sélective de la séquence de la β -globine et peut activer l'expression du gène.¹⁰³ Similairement la protéine MyoD (Myogenic Determination protein) se lie spécifiquement à des structures quadruplexes.¹⁰⁴ Des séquences présentes dans les régions promotrices de gènes spécifiques à la maintenance des muscles comme les gènes sMtCK et MCK (Mitochondrial creatine kinase) chez l'homme et la souris ou le gène $\alpha 7$ integrin chez la souris sont capables également d'adopter des conformations de type quadruplexe.¹⁰⁵

Ces dernières années l'étude de certains oncogènes ont permis de mettre en évidence l'importance des motifs quadruplexe dans la régulation et l'expression des gènes. L'exemple le plus documenté est le proto-oncogène *c-myc*. Le gène *c-myc* est responsable de la prolifération des cellules cancéreuses quand il est surexprimé. En 2002, l'équipe de L. Hurley

102. (a) Woodford, K. J.; Howell, R. M.; Usdin, K., A novel K(+)-dependent DNA synthesis arrest site in a commonly occurring sequence motif in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269 (43), 27029-35; (b) Howell, R. M.; Woodford, K. J.; Weitzmann, M. N.; Usdin, K., The chicken beta-globin gene promoter forms a novel "cinched" tetrahelical structure. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (9), 5208-14.

103. Clark, S. P.; Lewis, C. D.; Felsenfeld, G., Properties of BGP1, a poly(dG)-binding protein from chicken erythrocytes. *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18 (17), 5119-26.

104. Etzioni, S.; Yafe, A.; Khateb, S.; Weisman-Shomer, P.; Bengal, E.; Fry, M., Homodimeric MyoD preferentially binds tetraplex structures of regulatory sequences of muscle-specific genes. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (29), 26805-12.

105. Yafe, A.; Etzioni, S.; Weisman-Shomer, P.; Fry, M., Formation and properties of hairpin and tetraplex structures of guanine-rich regulatory sequences of muscle-specific genes. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33 (9), 2887-900.

met en évidence la présence d'un motif quadruplexe dans la région NHE III₁ (nuclease hypersensitivity element III₁) promotrice de l'oncogène *c-myc*.¹⁰⁶ La séquence étudiée possède cinq séries de guanines et peut donc former deux quadruplexes intramoléculaires différents, mais seul un possède une signification biologique (mise en évidence par un test de mutation). De plus l'utilisation d'un ligand qui stabilise la conformation en quadruplexe de NHE III₁ réprime l'expression du gène. Ainsi le mécanisme présenté sur la Figure 58 est proposé : la région NHE III₁ est en équilibre entre la forme duplexe et quadruplexe. Cet équilibre est certainement régit par la protéine NM23-H2. Sous forme duplexe, NHE III₁ est accessible pour fixer les protéines CNBP (sur le brin riche en purine), hnRNP K et TBP (sur le brin riche en pyrimidines). Ces protéines activent directement la RNA polymérase II pour la transcription du brin. La formation du motif quadruplexe empêche la fixation de ces protéines bloquant ainsi la transcription. L'utilisation d'une petite molécule TMPyP4, ligand d'ADN G-quadruplexe, permet de stabiliser le quadruplexe et donc déplace l'équilibre dans le sens de l'inhibition de la transcription. La structure exacte du quadruplexe formée par *c-myc* sera élucidée en 2004 par D. Patel.¹⁰⁷

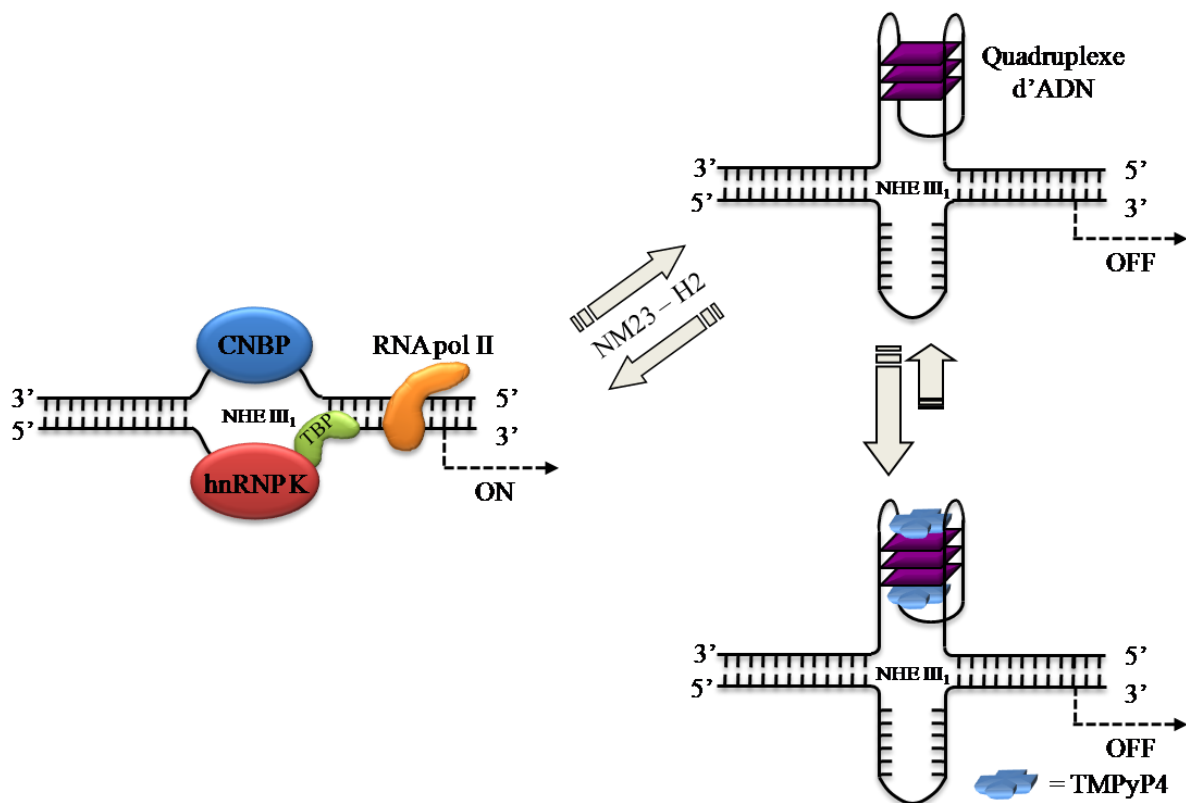


Figure 58 – Mécanisme proposé pour l'activation et la répression de la transcription du gène *c-myc*. L'interaction de la porphyrine TMPyP4 avec le motif quadruplexe stabilise la forme réprimée du gène en bloquant la conversion quadruplexe/duplexe.

106. Siddiqui-Jain, A.; Grand, C. L.; Bearss, D. J.; Hurley, L. H., Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress *c-MYC* transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (18), 11593-8.

107. Phan, A. T.; Modi, Y. S.; Patel, D. J., Propeller-type parallel-stranded G-quadruplexes in the human *c-myc* promoter. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (28), 8710-6.

La découverte d'un motif quadruplexe dans la région promotrice d'un oncogène a motivé de nombreuses équipes à lancer des investigations plus poussées. Aujourd'hui on dénombre plusieurs oncogènes possédant un tel motif dans leur région promotrice. On peut citer les oncogènes *c-kit*,¹⁰⁸ *bcl-2*,¹⁰⁹ VEGF,¹¹⁰ *K-ras*,¹¹¹ RET¹¹², Rb¹¹³ et *chll*.¹¹⁴ Le gène *c-kit* code pour un récepteur de type tyrosine kinase qui est surexprimé dans les tumeurs gastro-intestinales. Le quadruplexe formé par la séquence *c-kit* est de type intramoléculaire parallèle contenant quatre boucles où un résidu guanine isolé participe à la formation d'une tétrade.¹¹⁵ La protéine *bcl-2* agit comme inhibiteur de l'apoptose cellulaire et la séquence contenue dans la région promotrice du gène codant adopte une conformation en quadruplexe mixte parallèle/antiparallèle.¹¹⁶ VEGF (vascular endothelial growth factor) est un régulateur clé de l'angiogénèse et joue un rôle important dans la survie des tumeurs, la séquence issue de la région promotrice du gène adopte une structure de type quadruplexe intramoléculaire parallèle.¹¹⁰ Le gène KRAS code pour une protéine intervenant également dans les phénomènes d'angiogénèse et la séquence située dans sa région promotrice adopte une structure de type quadruplexe intramoléculaire parallèle.¹¹¹ Le gène *RET* code pour un récepteur de type tyrosine kinase qui est surexprimé dans les tumeurs de la thyroïde, il adopte une conformation de type quadruplexe intramoléculaire parallèle et sa séquence complémentaire peut former un quadruplexe de cytosine (i-motif) dans les conditions de pH adéquates.¹¹² Le gène Rb (Retinoblastoma) code pour une phosphoprotéine nucléaire qui agit comme suppresseur de tumeur et sa séquence complémentaire peut également former un motif de type i-motif.¹¹³ Le gène *chll* code pour une hélicase qui est capable de dérouler un motif G-quadruplexe et sa structure a été récemment déterminée.¹¹⁴

Ainsi les motifs quadruplexes présents au niveau des régions promotrices des oncogènes fonctionnent comme des interrupteurs contrôlant la transcription du gène correspondant. Le contrôle de ces interrupteurs par le biais de petites molécules organiques semble aujourd'hui être une voie intéressante pour développer de nouvelles stratégies

108. Fernando, H.; Reszka, A. P.; Huppert, J.; Ladame, S.; Rankin, S.; Venkitaraman, A. R.; Neidle, S.; Balasubramanian, S., A conserved quadruplex motif located in a transcription activation site of the human *c-kit* oncogene. *Biochemistry* **2006**, *45* (25), 7854-60.

109. Dai, J.; Dexheimer, T. S.; Chen, D.; Carver, M.; Ambrus, A.; Jones, R. A.; Yang, D., An intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel G-strands formed in the human BCL-2 promoter region in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (4), 1096-8.

110. Guo, K.; Gokhale, V.; Hurley, L. H.; Sun, D., Intramolecularly folded G-quadruplex and i-motif structures in the proximal promoter of the vascular endothelial growth factor gene. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (14), 4598-608.

111. Cogoi, S.; Xodo, L. E., G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (9), 2536-49.

112. Guo, K.; Pourpak, A.; Beetz-Rogers, K.; Gokhale, V.; Sun, D.; Hurley, L. H., Formation of pseudosymmetrical G-quadruplex and i-motif structures in the proximal promoter region of the RET oncogene. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (33), 10220-8.

113. Xu, Y.; Sugiyama, H., Formation of the G-quadruplex and i-motif structures in retinoblastoma susceptibility genes (Rb). *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (3), 949-54.

114. Kuryavyi, V.; Patel, D. J., Solution structure of a unique G-quadruplex scaffold adopted by a guanosine-rich human intronic sequence. *Structure* **2010**, *18* (1), 73-82.

115. Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Burge, S.; Neidle, S.; Patel, D. J., Structure of an unprecedented G-quadruplex scaffold in the human *c-kit* promoter. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (14), 4386-92.

116. Dai, J.; Chen, D.; Jones, R. A.; Hurley, L. H.; Yang, D., NMR solution structure of the major G-quadruplex structure formed in the human BCL2 promoter region. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (18), 5133-44.

anticancéreuses. Nous verrons par la suite que cette notion d'interrupteur-quadruplexe se retrouve dans d'autres processus biologiques.

e) Régions « switch » des immunoglobulines

Les régions « switch » des chaînes lourdes des immunoglobulines sont des séquences de 2 à 10kb correspondant à des sites de recombinaison. Il a été montré, par exemple, que la recombinaison de la séquence codant pour la formation de la chaîne lourde des IgM chez les murins, *via* l'élimination des séquences en ADN circulaire, conduit à l'expression de la chaîne lourde des IgG1 (Figure 59).¹¹⁷ Les séquences S μ , S γ 3, S γ 1 et S α sont des séquences riches en guanine¹¹⁸ et certaines sont capables d'adopter des structures de type quadruplexe.¹¹⁹ Les motifs quadruplexes jouent ainsi un rôle de signalisation indiquant les régions à éliminer et celles à conserver.

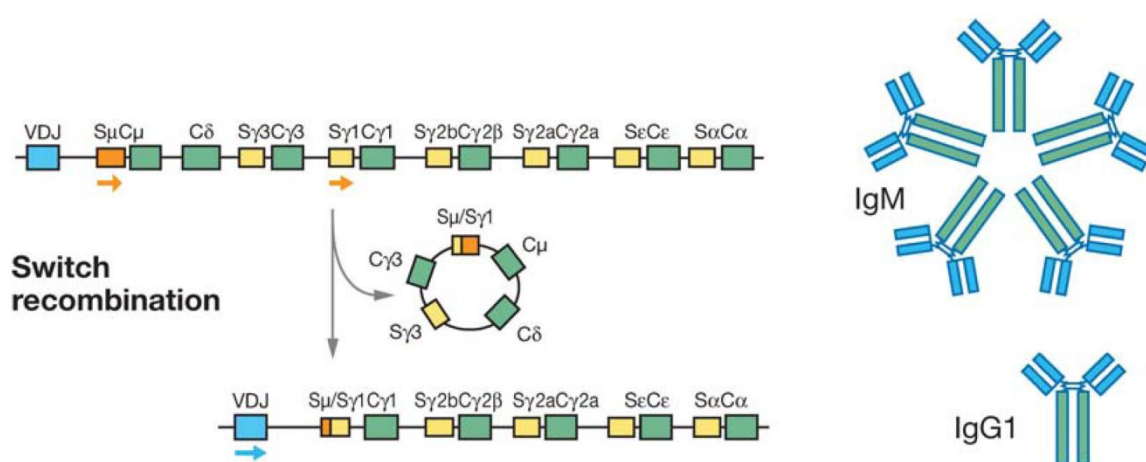


Figure 59 – Mécanisme de recombinaison des régions « switch » des chaînes lourdes des immunoglobulines (extrait de la réf. 117).

f) Régions répétées, ADN_r et centromère

Beaucoup de régions non codantes du génome humain sont constituées de séquences répétitives et présentent une influence biologique importante. Certaines de ces structures satellites possèdent des répétitions en tandem de séquences riches en guanines. On retrouve la répétition du trinuécléotide d(CGG) dans la région 5' non traduite dans le premier exon du gène FMR1 (Fragile X Mental Retardation 1) qui est responsable du syndrome de l'X fragile. L'équipe de D. Patel montre en 1995 qu'une séquence constituée de cette répétition peut générer un quadruplexe formé par l'empilement de tétrade G.C.G.C.¹²⁰ Le minisatellite de la région ILPR (Insulin-Linked Polymorphic Region) est constitué de la séquence d(ACAG₄GGTG₄) répétée de 40 à 50 fois dans la région précédant le gène humain de

117. Maizels, N., Immunoglobulin gene diversification. *Annu. Rev. Genet.* **2005**, 39, 23-46.

118. Dunnick, W.; Hertz, G. Z.; Scappino, L.; Gritzmacher, C., DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21 (3), 365-72.

119. Sen, D.; Gilbert, W., Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* **1988**, 334 (6180), 364-6.

120. Kettani, A.; Kumar, R. A.; Patel, D. J., Solution structure of a DNA quadruplex containing the fragile X syndrome triplet repeat. *J. Mol. Biol.* **1995**, 254 (4), 638-56.

l'insuline. En 1996, l'équipe de G. Gupta montre que la séquence d(G₄TGTG₄ACAG₄TGTG₄) peut adopter une conformation de quadruplexe intramoléculaire antiparallèle *in vitro*.¹²¹ L'ADN ribosomal contient également des régions riches en guanines susceptibles de former *in vitro* des motifs quadruplexes.¹²² Finalement en 2001, l'équipe de J.-L. Leroy montre que la séquence d(CCATTCATTCCTTTCC) qui est un fragment du satellite III centromérique humain est capable de former deux types de structures basées sur des quadruplexes de cytosines (i-motif) en fonction du pH.¹²³ L'ensemble de ces résultats tend à prouver que le motif quadruplexe sert de régulateur de fonctions biologiques importantes.

g) Quadruplexe et ARN

Les mécanismes moléculaires qui régissent la régulation de l'expression des gènes peuvent se produire avant et après la transcription. Les informations concernant la régulation post-transcription sont contenues dans la séquence de l'ARN transcrit. Il a été proposé récemment que des motifs quadruplexe d'ARN puissent participer au contrôle de la régulation. J. Huppert a utilisé l'algorithme « Quadparser », précédemment utilisé pour la recherche de séquences d'ADN génomique capables de former un motif quadruplexe, pour la recherche de séquences d'ARN issues de la base de données Ensembl susceptibles de former un motif de type ARN quadruplexe.¹²⁴ Ces analyses ont mis en évidence 2922 gènes contenant une séquence capable de former un motif quadruplexe dans leur région 5' non-traduite (5' UTR : untranslated region). Un mécanisme de régulation est proposé (Figure 60) : la présence d'un motif d'ARN quadruplexe stable dans la région proche du site de fixation du complexe d'initiation de la traduction pourrait soit empêcher la formation du complexe soit empêcher la lecture du brin par encombrement stérique. Un mécanisme similaire est proposé également pour les motifs que l'on retrouve dans les régions 3'UTR. L'équipe de S. Balasubramanian a montré que le contrôle de ce quadruplexe permet bien de contrôler la traduction du gène étudié.¹²⁵ La région 5' UTR du proto-oncogène NRAS (responsable de la prolifération des cellules cancéreuses) possède la séquence (GGGAGGGGCGGGUCUGGG) qui adopte une structure en ARN quadruplexe de type intramoléculaire parallèle. L'insertion de cette séquence dans la région 5'UTR de l'ARNm d'une chimère codant pour l'expression de la luciférase permet de réguler l'expression de la luciférase dans une cellule. L'utilisation de petites molécules permet également le contrôle de la translation d'un ARNm.¹²⁶

121. Catasti, P.; Chen, X.; Moyzis, R. K.; Bradbury, E. M.; Gupta, G., Structure-function correlations of the insulin-linked polymorphic region. *J. Mol. Biol.* **1996**, *264* (3), 534-45.

122. Hanakahi, L. A.; Sun, H.; Maizels, N., High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (22), 15908-12.

123. Nonin-Lecomte, S.; Leroy, J. L., Structure of a C-rich strand fragment of the human centromeric satellite III: a pH-dependent intercalation topology. *J. Mol. Biol.* **2001**, *309* (2), 491-506.

124. Huppert, J. L.; Bugaut, A.; Kumari, S.; Balasubramanian, S., G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (19), 6260-8.

125. Kumari, S.; Bugaut, A.; Huppert, J. L.; Balasubramanian, S., An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (4), 218-21.

126. Bugaut, A.; Rodriguez, R.; Kumari, S.; Hsu, S. T.; Balasubramanian, S., Small molecule-mediated inhibition of translation by targeting a native RNA G-quadruplex. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (12), 2771-6.

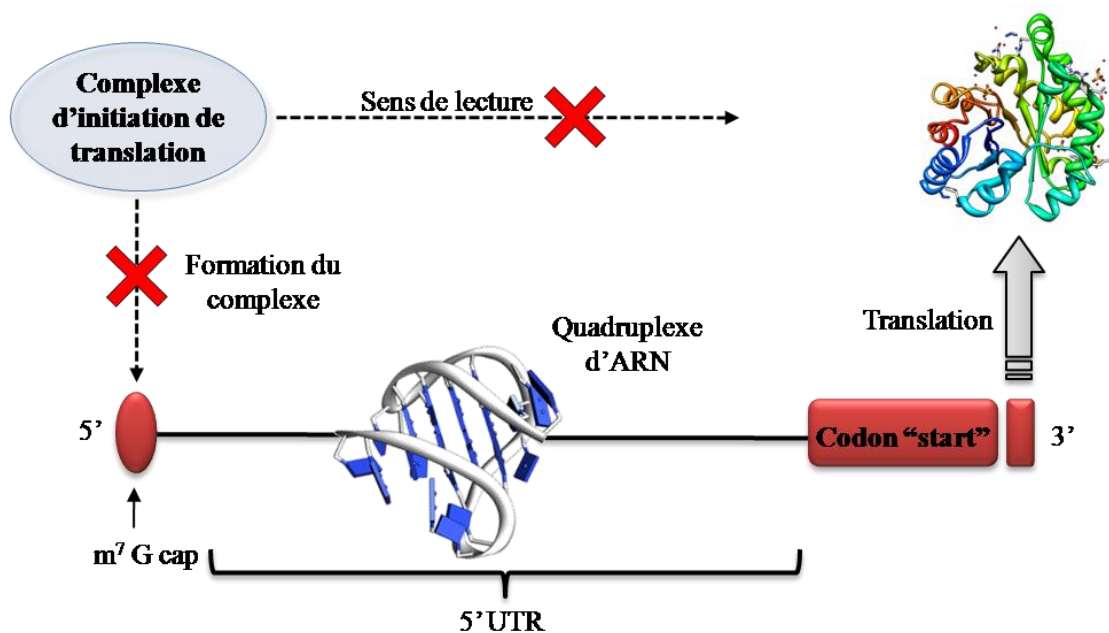


Figure 60 – Mécanisme proposé de la régulation de la traduction d'un ARN par un motif d'ARN quadruplexe. La présence d'un d'ARN quadruplexe stable près de la région de fixation du complexe d'initiation de la traduction peut bloquer par encombrement stérique la fixation de ce complexe ou la lecture du brin.

On retrouve également le motif sc1, (GGAAGGAGUGGCUGGG), dans les régions 5'UTR et 3'UTR de certains gènes et qui est capable de former un motif quadruplexe à deux plateaux.¹²⁷ Le motif sc1 sous forme G₄ est la cible de la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) qui joue un rôle dans la régulation de la traduction de ces ARNm, en transportant ces ARNm par l'intermédiaire de la fixation au motif quadruplexe.¹²⁸ L'ARN codant pour les protéines sémaphorine 3F et histone H4 possèdent également le motif sc1.¹²⁹

Des quadruplexes d'ARN ont également été observés chez le rétrovirus de l'immunodéficience humaine (VIH). L'ARN génomique du virus est enveloppé dans un virion sous forme de dimère et forme un complexe avec la protéine gag. La dimérisation des deux brins identiques est rendue possible par la formation d'une structure en ARN quadruplexe.¹³⁰

127. Riou, J. F.; Gomez, D.; Lemarteleur, T.; Trentesaux, C., G-quadruplex DNA: myth or reality? *Bull Cancer* **2003**, *90* (4), 305-13.

128. Darnell, J. C.; Jensen, K. B.; Jin, P.; Brown, V.; Warren, S. T.; Darnell, R. B., Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* **2001**, *107* (4), 489-99.

129. Menon, L.; Mihailescu, M. R., Interactions of the G quartet forming semaphorin 3F RNA with the RGG box domain of the fragile X protein family. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (16), 5379-92.

130. (a) Marquet, R.; Baudin, F.; Gabus, C.; Darlix, J. L.; Mougel, M.; Ehresmann, C.; Ehresmann, B., Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19* (9), 2349-57; (b) Sundquist, W. I.; Heaphy, S., Evidence for interstrand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90* (8), 3393-7.

II-1-2 Polymorphisme des motifs quadruplexes

a) Base structurale du motif quadruplexe

L'auto-association de quatre résidus guanine est la condition nécessaire et suffisante pour la formation d'un motif G-quadruplexe de guanines. Néanmoins de tels motifs peuvent adopter une grande variété de topologie en fonction du nombre de brins d'ADN participant à la structure, leur direction, ainsi que la longueur et la disposition des boucles nécessaires pour maintenir ce motif. Ce paragraphe présente les différentes topologies accessibles ainsi que leurs caractéristiques.

Quadruplexes tétramoléculaires : La topologie la plus simple est formée par l'auto-association de quatre brins en solution contenant de courtes séquences répétées de guanines :



avec X_n une séquence de n'importe quel nucléotide de longueur n et G_p une répétition de guanines de longueur p qui formeront p tétrades. De telles structures peuvent théoriquement adopter cinq conformations différentes en fonction de l'orientation des brins (parallèle ou antiparallèle) et de l'angle de torsion glycosidique (*syn* ou *anti*). Ces différentes structures sont présentées sur la Figure 61. La nature de l'angle de torsion glycosidique est régie par l'orientation des brins dans la structure. Deux brins adjacents parallèles présenteront leurs bases selon des angles de torsion similaires (*syn/syn* ou *anti/anti*), alors que deux brins adjacents antiparallèles présenteront des angles de torsion opposés (*syn/anti*), ceci pour permettre l'appariement et l'établissement de liaisons hydrogène.

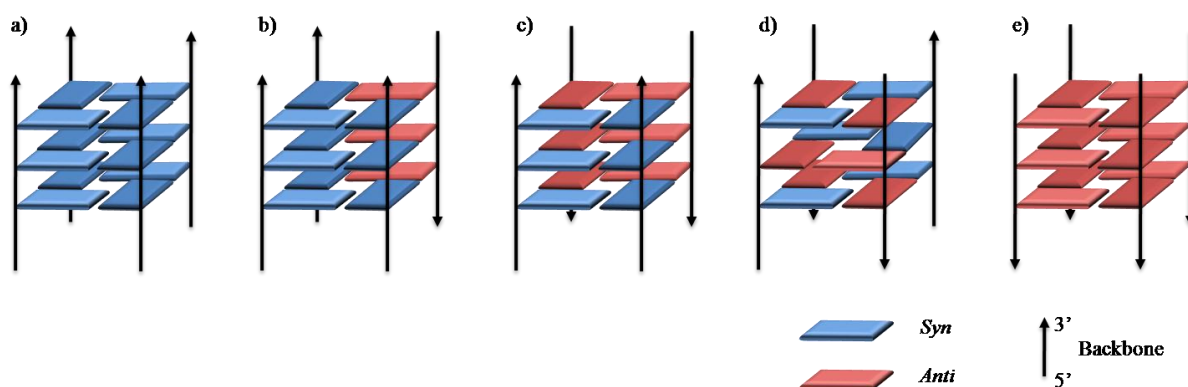


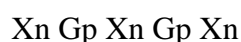
Figure 61 – Représentation schématique montrant l'orientation des brins ainsi que les angles de torsion glycosidique pour des conformations de type quadruplexes tétramoléculaires.

Cependant l'existence de toutes ces structures n'a pas été démontrée. La conformation de quadruplexe de type tétramoléculaire, la plus représentée, présente l'association de quatre brins tous parallèles avec les bases en *anti* (Figure 61e). On pourra citer en exemple le quadruplexe formé par la séquence d[$TGGGGT$]₄ issue de la séquence télomérique d'*Oxytricha nova*¹³¹ et la séquence d[$TTAGGGT$]₄ issue de la séquence télomérique humaine.⁷⁴ On remarquera que des bases nucléiques alternatives doivent encadrer la répétition

131. Laughlan, G.; Murchie, A. I.; Norman, D. G.; Moore, M. H.; Moody, P. C.; Lilley, D. M.; Luisi, B., The high-resolution crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex. *Science* **1994**, 265 (5171), 520-4.

de guanines pour prévenir l'empilement des tétrades en solution et la formation de structures plus complexes. Ainsi la séquence d(GGGT) forme une structure complexe composée de huit brins qui forment deux quadruplexes imbriqués l'un dans l'autre. Un autre type de conformation a également été observé récemment, la double répétition du motif télomérique humain d(TTAGGGTTAGGG) peut former un quadruplexe intramoléculaire antiparallèle du type Figure 61c.¹³²

Quadruplexes bimoléculaires : Des structures plus complexes peuvent être formées par l'association de deux brins contenant chacun deux répétitions de guanines séparées par d'autres bases, par exemple :



L'association de deux brins de ce type forme un quadruplexe dimérique dont la conformation est contrôlée par la disposition des boucles formées. On peut théoriquement de cette façon accéder aux topologies représentées sur la Figure 62. Les boucles ainsi formées peuvent se disposer soit au-dessus ou au-dessous d'une tétrade reliant les brins les plus proches (boucles latérales), soit reliant les brins plus éloignés (boucles diagonales), soit en se positionnant à l'extérieur de la structure (boucles externes).

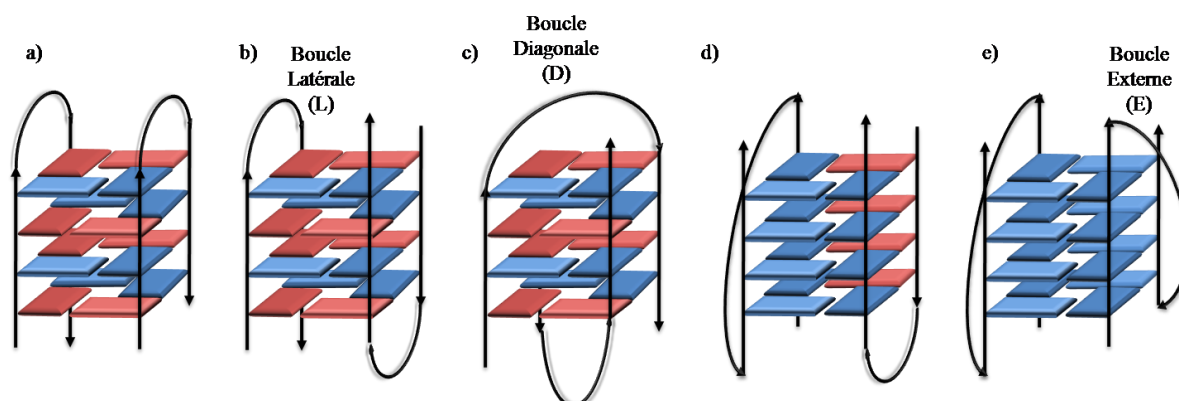


Figure 62 – Représentations schématiques montrant l'orientation des brins, les angles de torsion glycosidiques ainsi que la disposition des boucles dans des conformations de type quadruplexes bimoléculaires.

Un quadruplexe bimoléculaire présentant des boucles latérales est formé par la séquence d[TGGGGTTGGGGT]₂ issue de la séquence télomérique de *Tetrahymena*. Cette séquence forme en solution et en présence de Na⁺ un mélange de structures de topologie présentée sur les Figure 62a et Figure 62b.¹³³ La séquence d[GGGGTTTTGGGG]₂ forme un quadruplexe bimoléculaire de conformation présentée sur la Figure 62c.¹³⁴ La séquence d[TAGGGTTAGGGT]₂ forme en solution en présence de K⁺ un mélange de conformations

132. Kaushik, M.; Bansal, A.; Saxena, S.; Kukreti, S., Possibility of an antiparallel (tetramer) quadruplex exhibited by the double repeat of the human telomere. *Biochemistry* **2007**, *46* (24), 7119-31.

133. Phan, A. T.; Modi, Y. S.; Patel, D. J., Two-repeat Tetrahymena telomeric d(TGGGGTTGGGGT) Sequence interconverts between asymmetric dimeric G-quadruplexes in solution. *J. Mol. Biol.* **2004**, *338* (1), 93-102.

134. Horvath, M. P.; Schultz, S. C., DNA G-quartets in a 1.86 Å resolution structure of an *Oxytricha nova* telomeric protein-DNA complex. *J. Mol. Biol.* **2001**, *310* (2), 367-77.

représentées sur les Figure 62b et Figure 62e.¹³⁵ Il est intéressant de constater qu'un petit changement dans la séquence peut induire une grande différence dans la topologie du quadruplexe obtenu. L'équipe de J. Plavec montre en 2003 que les quadruplexes d[GGGTTTTGGGG]₂ et d[GGGGTTTTGGG]₂ adoptent des conformations très différentes.¹³⁶ Si le quadruplexe d[GGGGTTTTGGG]₂ présente une conformation classique similaire à celle adoptée par le quadruplexe d[GGGTTTTGGGG]₂, la conformation du quadruplexe bimoléculaire d[GGGTTTTGGGG]₂ présente une topologie originale contenant les trois types de boucles (latérale, diagonale et externe). Ainsi la structuration des motifs quadruplexes semble extrêmement sensible aux modulations de séquence. Cette aptitude se confirme avec des structures plus complexes.

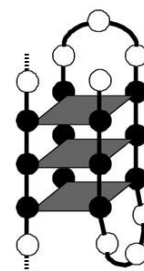
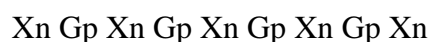


Figure 63 –
Quadruplexe
bimoléculaire
hybride (3+1).

Des structures bimoléculaires peuvent être également obtenues à partir d'oligonucléotides présentant trois répétitions de guanines. La séquence d(GGGTTAGGGTTAGGGT) forme un quadruplexe composé de deux brins, toutes les guanines d'un des brins participent à la formation des tétrades alors que seules les guanines d'une répétition du second brin participent. On obtient ainsi une association hybride (3+1) (Figure 63).¹³⁷

Quadruplexes intramoléculaires : Les topologies les plus complexes sont obtenues par l'autoassociation d'un seul brin riche en guanines. Ces séquences plus pertinentes au niveau biologique sont de type :



Les possibilités de repliement de telles structures sont nombreuses et les topologies théoriquement accessibles sont très variées. Quelques exemples de topologies sont présentés sur la Figure 64. Pour de telles structures la disposition des boucles va contrôler la topologie. Certaines topologies ne sont pas accessibles à cause d'encombrements stériques inhérents à la disposition des boucles, par exemple, les topologies qui possèdent deux boucles diagonales successives ou celles possédant l'enchaînement de boucles diagonale-latérale-diagonale. En ne tenant pas compte de ces topologies hautement improbables on décompte 26 combinaisons possibles.

135. Phan, A. T.; Patel, D. J., Two-repeat human telomeric d(TAGGGTTAGGGT) sequence forms interconverting parallel and antiparallel G-quadruplexes in solution: distinct topologies, thermodynamic properties, and folding/unfolding kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (49), 15021-7.

136. Crnugelj, M.; Sket, P.; Plavec, J., Small change in a G-rich sequence, a dramatic change in topology: new dimeric G-quadruplex folding motif with unique loop orientations. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (26), 7866-71.

137. Zhang, N.; Phan, A. T.; Patel, D. J., (3 + 1) Assembly of three human telomeric repeats into an asymmetric dimeric G-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (49), 17277-85.

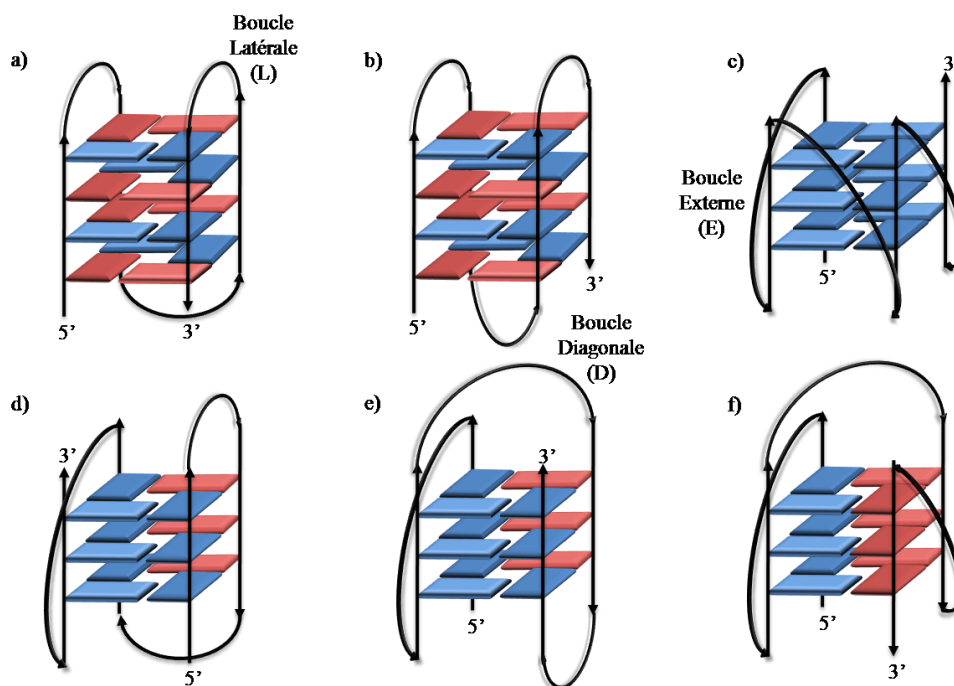


Figure 64 – Quelques représentations schématiques possibles montrant l'orientation des brins, les angles de torsion glycosidiques ainsi que la disposition des boucles pour des conformations de type quadruplexes unimoléculaires.

L'ensemble de ces combinaisons est décrit par M. Webba da Silva qui propose un formalisme géométrique du repliement des ADN quadruplexes intramoléculaires.¹³⁸ Il est intéressant de constater que la disposition des boucles va contrôler l'angle glycosidique des guanines participant à la création des tétrades. En effet, par exemple, la présence d'une boucle latérale dans la structure oblige l'existence de deux brins en antiparallèle et la disposition des guanines en *cis*, puis en *trans* pour établir les liaisons hydrogène nécessaires à la création des tétrades (voir Figure 64a).

Les angles glycosidiques régissent la largeur des sillons du quadruplexe formé. La forme et la profondeur du sillon des motifs quadruplexes sont également une caractéristique de ce type de motifs secondaires. Les topologies formées donnent accès à trois types de sillon : étroit, moyen et large. La variation de l'angle glycosidique des guanines donne accès à 16 tétrades de guanines différentes toutes représentées sur la Figure 65.

138. Webba da Silva, M., Geometric formalism for DNA quadruplex folding. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13* (35), 9738-45.

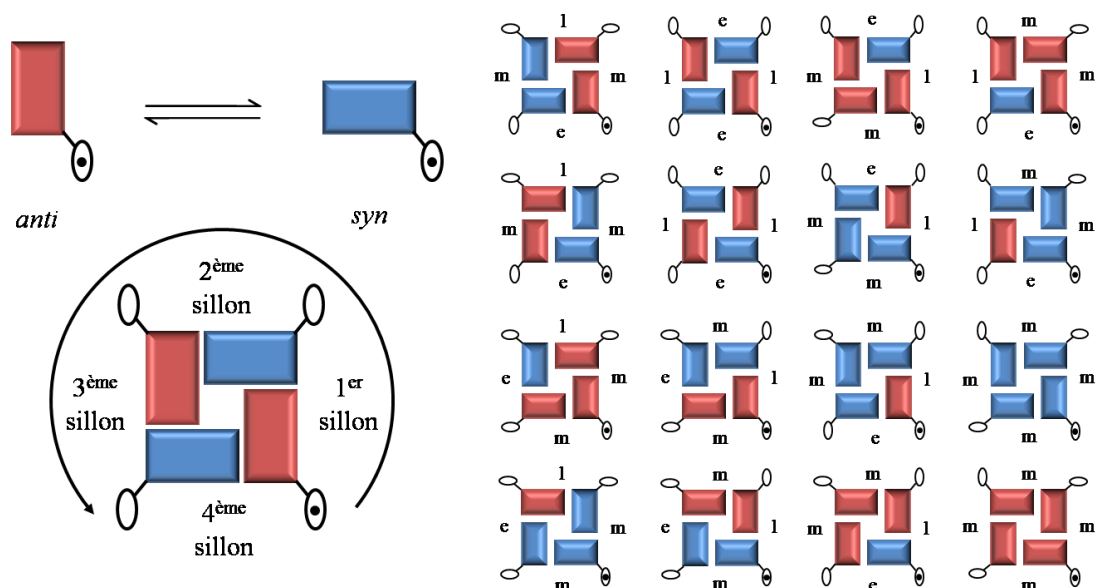


Figure 65 – Combinaisons possibles des angles glycosidiques pour une tétrade de guanines. La taille des sillons ainsi définis peut être étroite (e), moyen (m) ou large (l).

L'ensemble de ces résultats montre que les oligonucléotides riches en guanines sont capables de former en solution des structures très diverses. En particulier, les séquences issues de l'ADN télomérique humain sont capables d'adopter des conformations de type intramoléculaire et le paragraphe suivant s'intéresse à la description des différentes structures et topologies connues.

b) Diversité structurale des motifs quadruplexe issus de la séquence télomérique humaine.

L'ADN télomérique humain consiste en une répétition de la séquence $d(\text{TTAGGG})_n$. Les molécules capables de stabiliser l'ADN télomérique sous sa forme quadruplexe ont montré une activité d'inhibition de la télomérase. Ainsi ces régions de l'ADN chromosomique et les molécules reconnaissant les motifs quadruplexes de ces régions semblent être des cibles intéressantes pour le développement de thérapie anticancéreuse. Néanmoins pour pouvoir développer des molécules sélectives de tels motifs de manière rationnelle (étude QSAR, quantitative structure-activity relationship), il est nécessaire de connaître la conformation adoptée par ces séquences dans des conditions physiologiques ; tâche compliquée par le fait que les séquences issues de l'ADN télomérique humain se montrent hautement polymorphiques.

Polymorphisme dû à une variation de séquence : À cause de la haute concentration intracellulaire de K^+ (~70mM), de nombreuses équipes se sont intéressées à la conformation adoptée par de courtes séquences issues de la séquence télomérique humaine en présence de ce cation. L'ensemble des séquences étudiées ainsi que leur conformation ont été décrites

dans une publication récente de l'équipe de D. Yang.¹³⁹ Ces séquences et leurs conformations obtenues en présence de K⁺ sont résumées dans le Tableau 4.

om	Séquence																											Conformation majoritaire
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
wtTel27	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	Hybride-2
wtTel26	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	Hybride-2
Tel26	A	A	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	A	A	A	Hybride-1
wtTel25b		T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	Hybride-2
wtTel24b			A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	Hybride-2
wtTel25a	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T			Hybride-2
wtTel24a		T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T			Hybride-2 / 1
wtTel23a			A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T			Hybride-2
wtTel24	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G				Hybride-1
wtTel23		T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G				Hybride-1
wtTel22			A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G				Parallèle
wtTel21				G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G	T	T	A	G	G	G				/

Tableau 4 – Séquences et conformations de certaines séquences issues de la séquence télomérique humaine en présence de K⁺. Les séquences figurant en gras ont fait l'objet d'une étude structurale complète.

Il est intéressant de constater qu'une petite variation de la séquence provoque un grand changement dans la conformation obtenue. En présence de K⁺, on distingue trois conformations majoritaires, chacune très différente les unes des autres (voir Figure 66). En 2002, l'équipe de S. Neidle publie la structure aux rayons X obtenue pour l'étude de la séquence wtTel22.¹⁴⁰ Le quadruplexe formé présente une structure où tous les brins sont parallèles. Toutes les guanines présentent un angle de torsion glycosidique en *anti* et les boucles présentent un enchaînement E-E-E (voir Figure 64c). En 2006, l'équipe de D. Yang publie la structure Hybride-1 formée par la séquence Tel26 en solution.¹⁴¹ Le quadruplexe formé présente trois brins en parallèle et un en antiparallèle et les boucles présentent un enchaînement E-L-L. En 2007, la même équipe montre que la séquence wtTel26 adopte une structure très différente. Il publie en effet la structure Hybride-2 composée de trois brins en parallèle et un en antiparallèle avec un enchaînement des boucles L-L-E.¹⁴² La barrière énergétique entre les structures hybride-1 et hybride-2 est basse et une interconversion est possible grâce à l'énergie apportée, par exemple, par la fixation d'un ligand.

139. Dai, J.; Carver, M.; Yang, D., Polymorphism of human telomeric quadruplex structures. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1172-83.

140. Parkinson, G. N.; Lee, M. P.; Neidle, S., Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* **2002**, *417* (6891), 876-80.

141. (a) Ambrus, A.; Chen, D.; Dai, J.; Bialis, T.; Jones, R. A.; Yang, D., Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (9), 2723-35; (b) Dai, J.; Punchihewa, C.; Ambrus, A.; Chen, D.; Jones, R. A.; Yang, D., Structure of the intramolecular human telomeric G-quadruplex in potassium solution: a novel adenine triple formation. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (7), 2440-50.

142. Dai, J.; Carver, M.; Punchihewa, C.; Jones, R. A.; Yang, D., Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K⁺ solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (15), 4927-40.

espèces est possible, notamment par le contrôle de la force ionique. L'équipe de D. Yang montre que l'ajout de K^+ à une solution de Tel26 contenant 150mM de Na^+ permet la conversion d'une structure totalement antiparallèle (caractérisée par un maximum proche de 295 nm en CD) à une structure plus complexe (caractérisée par l'apparition d'un épaulement proche de 260 nm). Cette conversion peut être caractéristique du passage d'une conformation de type « basket » à la conformation de type hybride-2. Par contre la conversion inverse n'est pas possible (voir Figure 67).

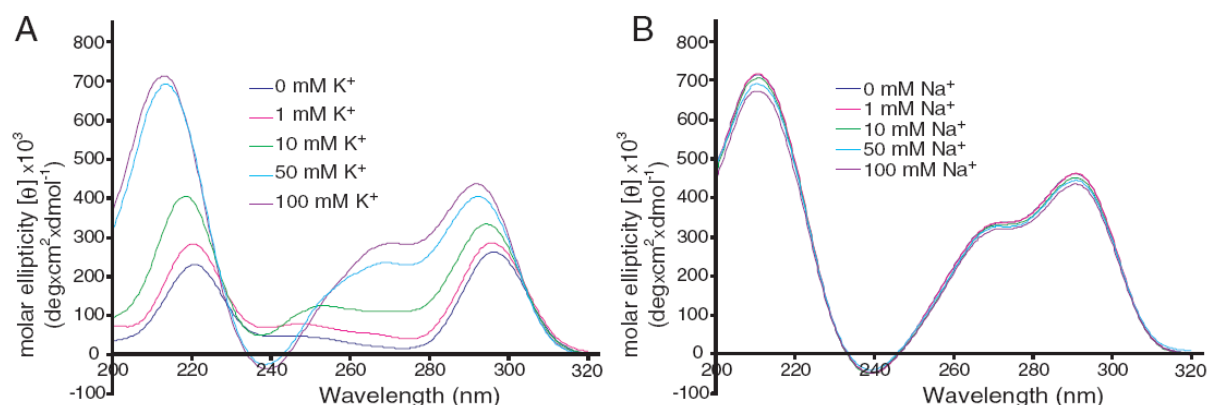


Figure 67 – Expérience de titration de Tel26 par A) K^+ en présence de 150mM Na^+ et par B) Na^+ en présence de 100mM K^+ . Figure reproduite de la référence 141a.

L'équipe de Z. Tan montre que l'ajout de PEG200 (poly éthylène glycol) permet la transition structurale d'un motif hybride à un motif parallèle de la séquence wtTel21 en présence de K^+ alors qu'une telle transition n'est pas observable en présence de Na^+ (voir Figure 68).¹⁴⁵ De telles conditions permettent de mettre en évidence l'existence possible en solution de structures totalement parallèles, comme celle décrite par l'équipe de S. Neidle,¹⁴⁰ en présence de PEG qui mime un état condensé.

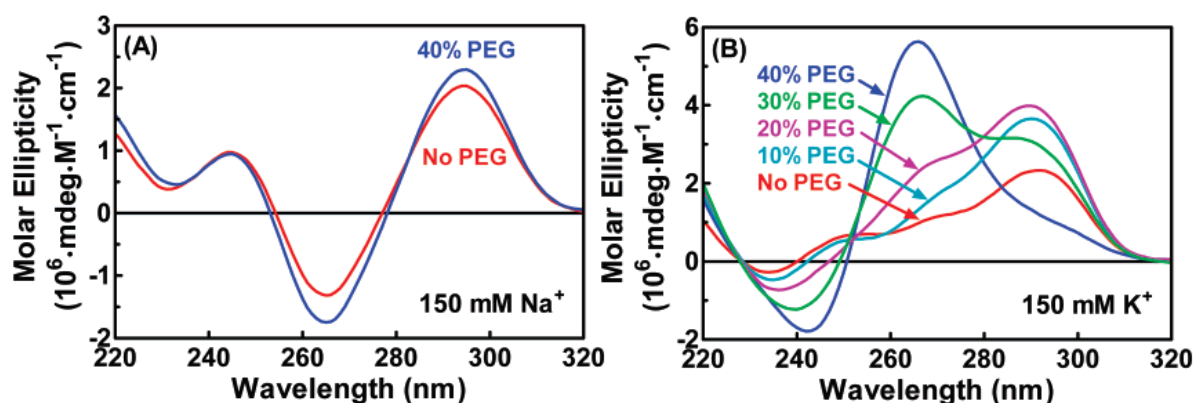


Figure 68 – Conversion structurale de la séquence wtTel21 en présence de PEG 200. Le spectre CD est acquis à des concentrations croissantes en PEG 200 à partir de solutions contenant A) 150mM Na^+ et B) 150mM K^+ . Figure reproduite de la référence 145.

145. Xue, Y.; Kan, Z. Y.; Wang, Q.; Yao, Y.; Liu, J.; Hao, Y. H.; Tan, Z., Human telomeric DNA forms parallel-stranded intramolecular G-quadruplex in K^+ solution under molecular crowding condition. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (36), 11185-91.

Cette modularité des motifs quadruplexes doit être certainement représentative du rôle biologique de ces motifs dans les processus de régulation de la réplication cellulaire.

c) Implication biologique du polymorphisme de l'ADN G-quadruplexe

Les paragraphes précédents ont mis en évidence le haut degré de polymorphisme de séquences issues de la région télomérique humaine. Chacun des motifs quadruplexe étudiés possède ses propres caractéristiques. À partir d'un simple brin d'ADN des structures secondaires présentant des topologies très différentes peuvent être obtenues. Certains exemples sont présentés sur la Figure 69.

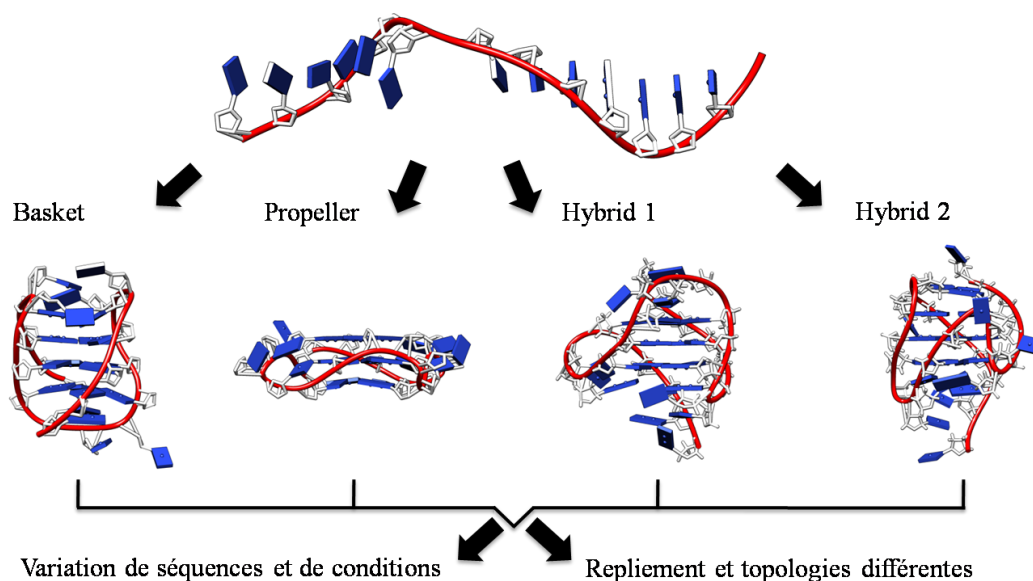


Figure 69 - Exemple de topologie adoptée par des extraits issue de la séquence télomérique humaine. La structure « basket » est extraite de la détermination structurale par RMN (code PDB : 143D), la structure « propeller » d'une étude aux rayons X (code PDB : 1KF1) et les structures hybrides d'études RMN (code PDB : 2HY9 et 2JPZ respectivement).

Ces différentes topologies sont la preuve de l'importance du dynamisme de telles structures. Chaque topologie peut ainsi avoir son importance biologique dans la régulation de la réplication de l'ADN chromosomique. Les différentes études tendent à prouver que l'ADN télomérique adopte une conformation compacte (de type parallèle ou « propeller ») lorsqu'il se trouve dans un environnement compact (études RX ou en présence de PEG) et une conformation plus libre (« basket », hybride-1 ou hybride-2) lorsqu'il se trouve dans un environnement plus diffus (études RMN). Cette dépendance traduit peut-être l'existence de différentes formes de l'ADN télomérique lors de la vie cellulaire. Il peut alors être intéressant de développer des ligands (petites molécules organiques, protéines, anticorps monoclonaux, ...) sélectifs de ces différentes conformations pour contrôler la vie cellulaire.

Cette notion de polymorphisme s'étend à tous les types de motifs quadruplexe identifiés. En ce qui concerne les motifs étudiés au niveau des régions promotrices des oncogènes, il est intéressant de constater que s'ils sont tous issus du repliement d'une séquence simple brin, ils adoptent néanmoins des topologies différentes. La Figure 70 présente les structures du motif quadruplexe des oncogènes *c-myc*, *c-kit*, *bcl-2* et *chl1*.

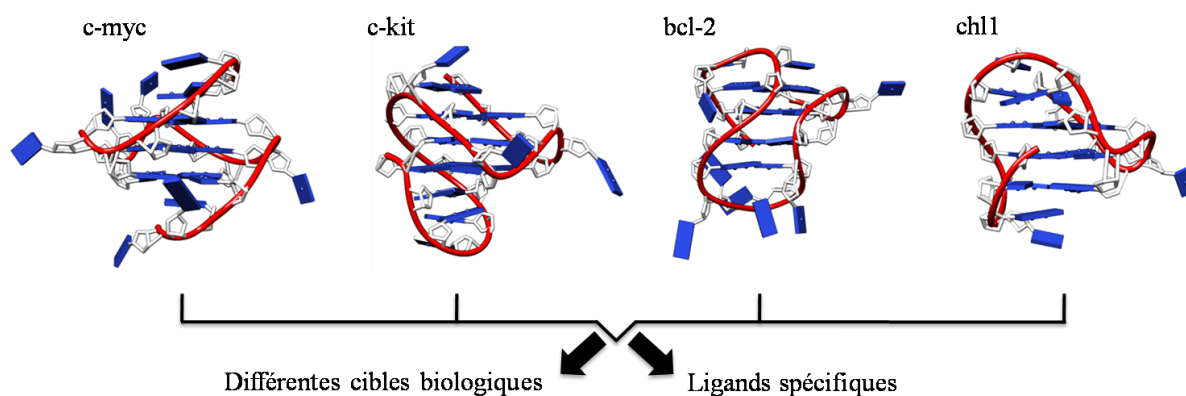


Figure 70 – Exemple de topologie adoptée par des séquences issues de régions promotrices d’oncogènes. Chacune des structures adoptées par *c-myc* (code PDB : 1XAV), *c-kit* (code PDB : 2O3M), *bcl-2* (code PDB : 2F8U) et *chl1* (code PDB : 2KPR) présentent des caractéristiques topologiques très différentes.

Chaque topologie est caractérisée par une forme caractéristique et le développement de ligands sélectifs permettrait le contrôle spécifique de l’extinction du gène étudié.

II-1-3 Ligands d’ADN quadruplexe

De par l’importance que l’ADN quadruplexe semble jouer dans les processus de maintenance de l’ADN génomique, il est intéressant de développer des molécules capables de reconnaître sélectivement et de stabiliser de tels motifs. Ces dernières années le nombre de nouveaux ligands n’a cessé de croître et ce chapitre s’intéresse à la présentation et la comparaison de ces molécules qui présentent un potentiel en tant qu’anticancéreux.

a) Modes d’interaction

L’ADN quadruplexe se distingue des autres conformations de l’ADN par des caractéristiques structurales qui peuvent être ciblées pour rendre les molécules développées les plus sélectives possibles pour ce type de conformation (Figure 71). L’élément le plus caractéristique de l’ADN quadruplexe reste l’empilement de tétrades de guanines qui définissent dans la structure des quadruplexes des régions planes et hydrophobes idéales pour une reconnaissance de type empilement (π -stacking) par des molécules aromatiques. L’ensemble des quadruplexes intramoléculaires présente des boucles qui relient les différentes tétrades, lesquelles peuvent être utilisées pour cibler sélectivement une conformation de quadruplexe particulière. Le sillon de l’ADN quadruplexe présente également des caractéristiques propres à ses différentes conformations.

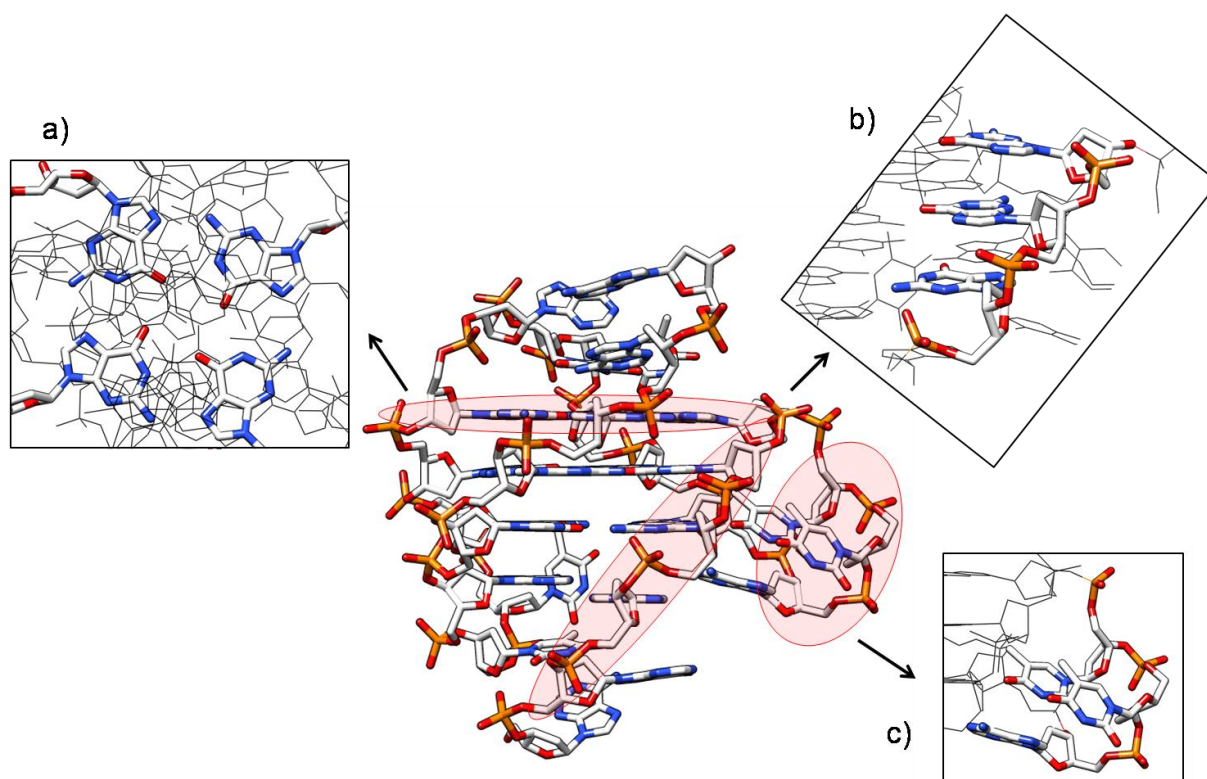


Figure 71 - Caractéristiques structurales d'un ADN quadruplexe déterminant les zones cibles pour le développement de nouveaux ligands a) tétrade de guanines, b) squelette sucre-phosphate des sillons et c) bases dans les boucles. (code PDB : 2HY9).

Une présentation non exhaustive de petites molécules organiques capables de se lier à l'ADN quadruplexe est détaillée par la suite.

b) Interaction par empilement

La classe de ligands à visée G-quadruplexe la plus étudiée concerne les molécules capables de s'empiler sur les tétrades de guanines. Ces molécules doivent donc être constituées d'un large noyau aromatique capable de recouvrir la surface d'une tétrade de guanines, tout en conservant une solubilité dans l'eau acceptable. En d'autres mots, les molécules se doivent de posséder à la fois un caractère hydrophobe et hydrophile. Pour cela, l'introduction de chaînes protonables (*e. g.* groupes aminés) autour d'un noyau aromatique est très utilisée. Un avantage de l'utilisation des chaînes protonables est l'addition d'interactions supplémentaires, avec les liaisons phosphodiester présentes dans les sillons, qui stabilisent l'interaction. Ces quinze dernières années, de nombreuses équipes ont synthétisé et étudié de nombreuses molécules aromatiques capables de stabiliser les motifs quadruplexe. Le paragraphe suivant s'intéressera à la présentation des molécules les plus représentatives de ce domaine de recherche. De récentes revues présentent un aperçu de tous ces ligands.¹⁴⁶

146. (a) Monchard, D.; Teulade-Fichou, M. P., A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (4), 627-36; (b) Ou, T. M.; Lu, Y. J.; Tan, J. H.; Huang, Z. S.; Wong, K. Y.; Gu, L. Q., G-quadruplexes: targets in anticancer drug design. *ChemMedChem* **2008**, *3* (5), 690-713; (c) Georgiades, S. N.; Abd Karim, N. H.; Suntharalingam, K.; Vilar, R., Interaction of metal complexes with G-quadruplex DNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49* (24), 4020-34.

Les premiers ligands de quadruplexes ont été développés en 1997 par l'équipe de S. Neidle (Figure 72). Elles présentent un noyau anthraquinone disubstitué en position 2 et 6.¹⁴⁷ Malgré des affinités correctes (de l'ordre du micromolaire), leur développement a dû être abandonné à cause d'une toxicité trop importante pour des études en milieu biologique. Pour circonvenir ce problème, le noyau fluorénone a été choisi et des dérivés disubstitués en position 2 et 7 ont été synthétisés.¹⁴⁸ Les interactions de ce type de composé avec les motifs quadruplexes ont été étudiées par des études RMN ¹H et l'évaluation de leurs activités biologiques par le test TRAP. Ces composés sont globalement actifs et présentent des IC₅₀-TRAP de l'ordre du micromolaire (IC₅₀-TRAP_{min} = 8μM).

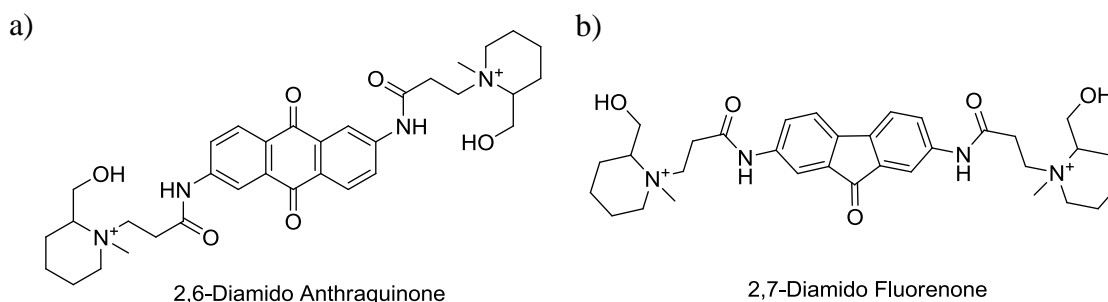


Figure 72 – Structures chimiques des dérivés a) d'Anthraquinones et b) de Fluorénones les plus actifs.

Parmi les aromatiques à trois cycles, l'équipe de S. Neidle s'est également intéressé au développement de ligands possédant un noyau acridine (Figure 73). L'utilisation de noyaux bi- (en 3 et 6) ou tri-substitués (en 3, 6 et 9) permet de mieux comprendre les phénomènes intervenant dans la reconnaissance des motifs quadruplexes.¹⁴⁹ L'addition d'un troisième bras en position 9 de l'acridine permet d'augmenter l'affinité pour les motifs quadruplexes et la sélectivité par rapport à un duplexe. Par exemple, BRACO-19 possède des affinités, $K_A = 1,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ pour un G₄ et $K_A = 4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ pour un duplexe, alors que son équivalent non substitué en 9 possède des affinités, $K_A = 1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ pour un G₄ et $K_A = 1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ pour un duplexe. BRACO-19 possède une IC₅₀-TRAP de 20nM. Malheureusement, l'utilisation de BRACO-19 en milieu physiologique semble compromise à cause de l'hydrolyse des fonctions amides *in vivo* ainsi que la désamination de l'amine tertiaire qui diminue considérablement son pouvoir inhibiteur.¹⁵⁰ Depuis peu, l'interaction de BRACO-19 a été caractérisée par une

147. Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B. E.; Salazar, M.; Kerwin, S. M.; Trent, J. O.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; Hurley, L. H., Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (14), 2113-6.

148. Perry, P. J.; Read, M. A.; Davies, R. T.; Gowan, S. M.; Reszka, A. P.; Wood, A. A.; Kelland, L. R.; Neidle, S., 2,7-Disubstituted amidofluorenone derivatives as inhibitors of human telomerase. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (14), 2679-84.

149. Harrison, R. J.; Cuesta, J.; Chessari, G.; Read, M. A.; Basra, S. K.; Reszka, A. P.; Morrell, J.; Gowan, S. M.; Incles, C. M.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S., Trisubstituted acridine derivatives as potent and selective telomerase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (21), 4463-76.

150. Taetz, S.; Murdter, T. E.; Zapp, J.; Boettcher, S.; Baldes, C.; Kleideiter, E.; Piotrowska, K.; Schaefer, U. F.; Klotz, U.; Lehr, C. M., Decomposition of the telomere-targeting agent BRACO19 in physiological media results in products with decreased inhibitory potential. *Int. J. Pharm.* **2008**, *357* (1-2), 6-14.

structure aux rayons X et bien que son mode d'interaction principal soit l'empilement sur une tétrade extérieure, l'importance des bases composant les boucles a été mise en évidence.¹⁵¹

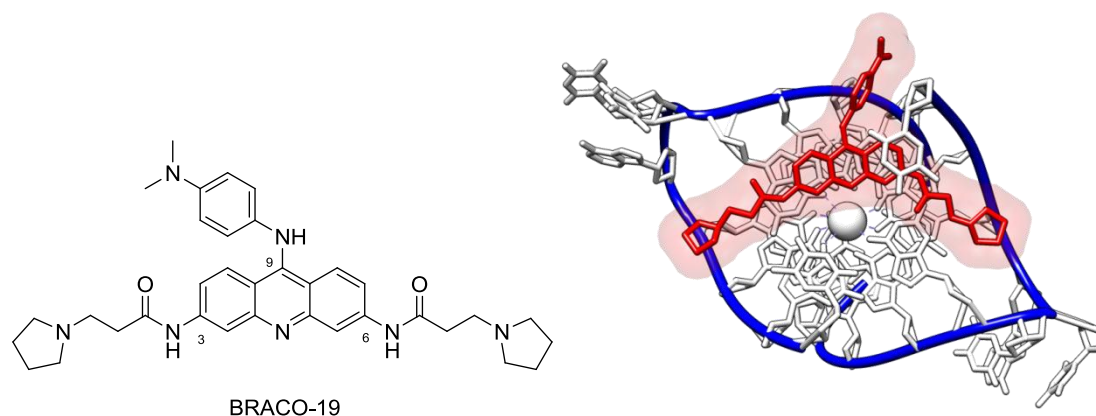


Figure 73 – Structure chimique de BRACO-19 et structure aux rayons X du complexe BRACO-19 / d[TAGGGTTAGGGT]₂.

L'équipe de M. Stevens a proposé, en 2000, l'utilisation de noyaux acridine condensés à 4 ou 5 cycles.¹⁵² Parmi ces composés, le RHPS4 (Figure 74) présente le meilleur potentiel. L'équipe de M. Searle propose une structure RMN décrivant son interaction avec un quadruplexe tétramoléculaire d[TTAGGGT]₄.¹⁵³ Le ligand s'empile sur les deux tétrades de guanines extérieures. Son activité *in vivo* a été démontrée soit seule ou en synergie avec d'autres composés utilisés en chimiothérapie. RHPS4 montre une IC₅₀-TRAP de 0,33μM.

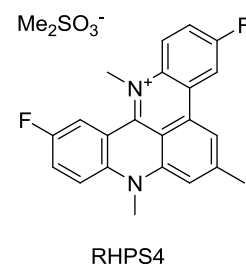


Figure 74 - Structure chimique du ligand RHPS4

En 2001, l'équipe de M.-P. Teulade-Fichou propose l'utilisation de composés polyaromatiques condensés, les dibenzophénanthrolines pentacycliques (quinacridines) (Figure 75). Ces molécules originellement développées pour la reconnaissance de l'ADN triplexe possèdent un noyau aromatique coudé idéal pour recouvrir la surface d'une tétrade de guanines. La fonctionnalisation de ce type de noyau par des chaînes poly-aminées adéquates pour interagir avec les sillons de l'ADN quadruplexe en font des ligands idéals pour la reconnaissance de ce type de motif. Une structure RMN du complexe MMQ3 / d[TTAGGGT]₄, montre le recouvrement de la tétrade par le noyau aromatique et la participation des chaînes aminées.¹⁵⁴ Le ligand MMQ3 montre une IC₅₀-TRAP de 28nM et

151. Campbell, N. H.; Parkinson, G. N.; Reszka, A. P.; Neidle, S., Structural basis of DNA quadruplex recognition by an acridine drug. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (21), 6722-4.

152. Stanslas, J.; Hagan, D. J.; Ellis, M. J.; Turner, C.; Carmichael, J.; Ward, W.; Hammonds, T. R.; Stevens, M. F., Antitumor polycyclic acridines. 7. Synthesis and biological properties of DNA affinic tetra- and pentacyclic acridines. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (8), 1563-72.

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

154. Hounsou, C.; Guittat, L.; Monchaud, D.; Jourdan, M.; Saettel, N.; Mergny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P., G-quadruplex recognition by quinacridines: a SAR, NMR, and biological study. *ChemMedChem* **2007**, *2* (5), 655-66.

une très bonne capacité à stabiliser les motifs quadruplexe. Ces ligands ont été encore améliorés en proposant un modèle dimérique BOQ1, qui augmente nettement la sélectivité de ce type de composé pour l'ADN quadruplexe.¹⁵⁵ Plus récemment, l'utilisation d'un composé quinacridine conjugué avec un dérivé du cisplatine permet de créer des adduits covalents sur les guanines d'un motif quadruplexe.¹⁵⁶ Ce type de conjugué permet de combiner deux modes d'interactions : interaction par empilement et création de lien covalent.

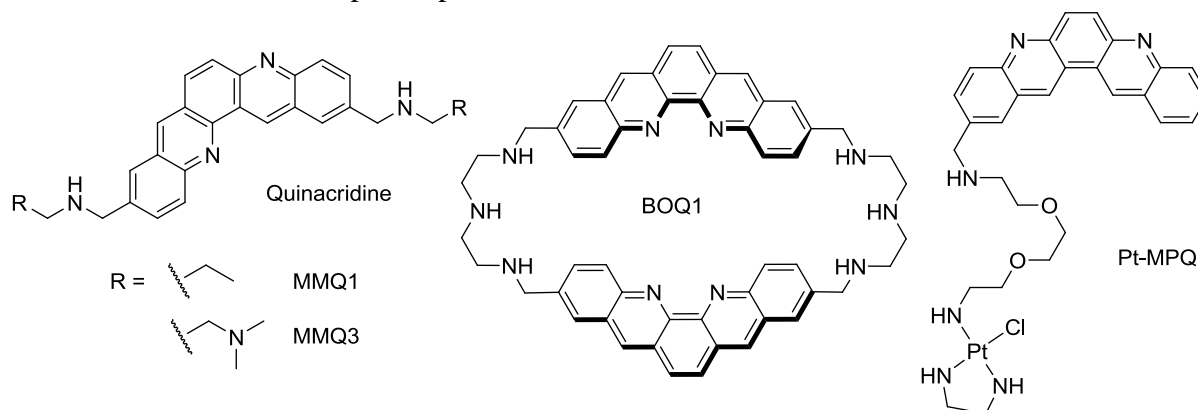


Figure 75 – Structure chimique des ligands MMQ1, MMQ3, BOQ1 et Pt-MPQ.

La recherche de noyaux aromatiques capables de recouvrir la plus grande surface des tétrades mènera l'équipe de L. Hurley à proposer, en 1998, l'utilisation de porphyrines cationiques. Le TMPyP4 (5, 10, 15, 20 tétra-*N*-méthyl-4-pyridyl)porphyrine (Figure 76), est l'une des molécules les plus utilisées en tant que ligand de quadruplexe.¹⁵⁷ Le TMPyP4 est relativement efficace pour inhiber la télomérase, avec une IC₅₀-TRAP de 6,25 μM. Ce ligand montre une bonne affinité pour les motifs quadruplexes avec une préférence pour les motifs tétramoléculaires, elle peut également induire la formation d'un motif quadruplexe. Un grand nombre de dérivés a été synthétisé et étudié.¹⁵⁸ Néanmoins elle n'est absolument pas sélective des G₄. Son mode d'interaction avec les motifs quadruplexes reste assez obscur (voir partie III-1-4). Pour pallier les problèmes de photoactivité et de cytotoxicité de TMPyP4, l'équipe de L. Hurley s'est aussi intéressée au développement de porphyrines étendues, comme le Se2SAP (Figure 76).¹⁵⁹ Ce ligand possède un cœur aromatique plus large qu'une porphyrine classique grâce à l'introduction d'un cycle aromatique supplémentaire ce qui permet d'augmenter la surface de la tétrade de guanines recouverte. L'introduction d'atomes de sélénium permet de baisser le rendement quantique de fluorescence et donc de baisser la

155. Teulade-Fichou, M. P.; Carrasco, C.; Guittat, L.; Bailly, C.; Alberti, P.; Mergny, J. L.; David, A.; Lehn, J. M.; Wilson, W. D., Selective recognition of G-Quadruplex telomeric DNA by a bis(quinacridine) macrocycle. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (16), 4732-40.

156. Bertrand, H.; Bombard, S.; Monchard, D.; Teulade-Fichou, M. P., A platinum-quinacridine hybrid as a G-quadruplex ligand. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12* (7), 1003-14.

157. Wheelhouse, R. T.; Sun, D.; Han, H.; Han, F. X.; Hurley, L. H., Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: the Interaction of Tetra-(*N*-methyl-4-pyridyl)porphine with Quadruplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3261-3262.

158. Shi, D. F.; Wheelhouse, R. T.; Sun, D.; Hurley, L. H., Quadruplex-interactive agents as telomerase inhibitors: synthesis of porphyrins and structure-activity relationship for the inhibition of telomerase. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (26), 4509-23.

159. Seenisamy, J.; Bashyam, S.; Gokhale, V.; Vankayalapati, H.; Sun, D.; Siddiqui-Jain, A.; Streiner, N.; Shiny, K.; White, E.; Wilson, W. D.; Hurley, L. H., Design and synthesis of an expanded porphyrin that has selectivity for the c-MYC G-quadruplex structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (9), 2944-59.

d'agrégation en solution qui est contrôlé par le pH du milieu d'étude.¹⁶³ L'équipe de M. Franceschin propose l'utilisation du noyau coronène qui présente une plus grande surface aromatique pour le recouvrement d'une tétrade de guanines.¹⁶⁴ Les composés ainsi développés induisent la formation des motifs quadruplexes, en exprimant une sélectivité pour les quadruplexes de type intramoléculaire.

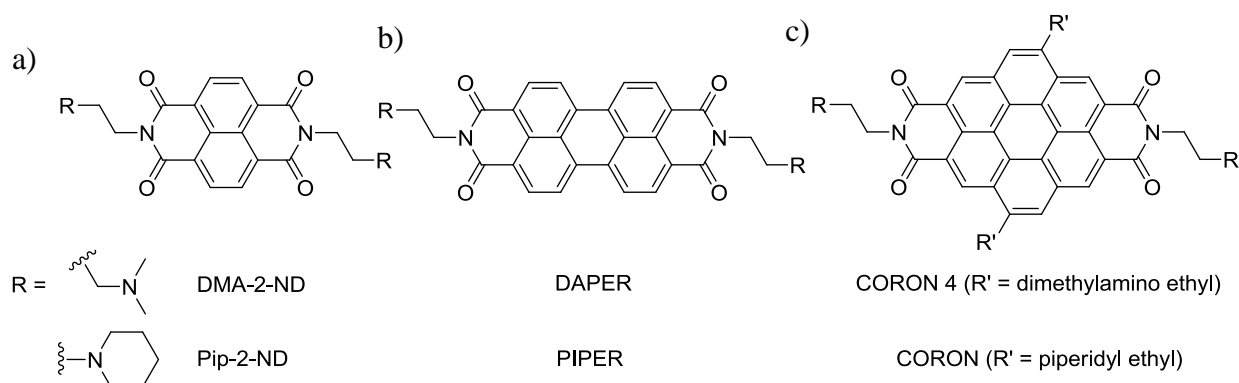


Figure 77 – Structure chimique de dérivés de a) naphthalènes, b) pérylènes et c) coronènes diimides.

L'introduction de ligands possédant une forme en V permet de recouvrir presque totalement la surface d'une tétrade de guanines. De bons exemples de ligands possédant ce type de structure sont les molécules 360A et Phen-DC3 qui possèdent deux noyaux quinoliniums chargés (Figure 78).¹⁶⁵ La forme en V est assurée par des liaisons hydrogène intramoléculaires qui stabilisent le ligand en conformation fermée. Ces deux ligands possèdent un très fort pouvoir de stabilisation des motifs quadruplexes et possèdent des IC₅₀-TRAP de l'ordre de 300nM. De plus, ils possèdent une excellente sélectivité vis-à-vis des duplexes. Ils sont également capables d'inhiber la prolifération cellulaire et d'induire une apoptose massive sur certaines lignées de cellules cancéreuses en déstabilisant la structure des télomères.¹⁶⁶ Le ligand 360A montre aussi la capacité à chélater le Cu(II), phénomène qui a pour conséquence de lui faire adopter une forme linéaire qui ne se lie plus à un quadruplexe. L'utilisation d'un système alternant la présence de Cu(II) (déstabilisant le ligand et le quadruplexe) et d'EDTA (complexant du Cu(II)) permet de créer une machine moléculaire basée sur la formation et la déstabilisation du motif quadruplexe.¹⁶⁷ Le ligand 12459 (Figure 78) possède lui aussi deux unités quinoliniums mais branchées sur un aromatique de type

163. Kern, J. T.; Thomas, P. W.; Kerwin, S. M., The relationship between ligand aggregation and G-quadruplex DNA selectivity in a series of 3,4,9,10-perylenetetracarboxylic acid diimides. *Biochemistry* **2002**, *41* (38), 11379-89.

164. Franceschin, M.; Alvino, A.; Casagrande, V.; Mauriello, C.; Pascucci, E.; Savino, M.; Ortaggi, G.; Bianco, A., Specific interactions with intra- and intermolecular G-quadruplex DNA structures by hydrosoluble coronene derivatives: a new class of telomerase inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15* (4), 1848-58.

165. De Cian, A.; Delemos, E.; Mergny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P.; Monchaud, D., Highly efficient G-quadruplex recognition by bisquinolinium compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (7), 1856-7.

166. Pennarun, G.; Granotier, C.; Gauthier, L. R.; Gomez, D.; Hoffschir, F.; Mandine, E.; Riou, J. F.; Mergny, J. L.; Mailliet, P.; Boussin, F. D., Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. *Oncogene* **2005**, *24* (18), 2917-28.

167. Monchaud, D.; Yang, P.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M. P.; Mergny, J. L., A metal-mediated conformational switch controls G-quadruplex binding affinity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47* (26), 4858-61.

triazine. Ce ligand présente des propriétés biologiques intéressantes, avec une IC_{50} -TRAP de l'ordre de 130nM. Il est capable d'induire la sénescence et le raccourcissement des télomères (qui se traduit par la diminution de la taille de tumeurs) chez des lignées de cellules cancéreuses.¹⁶⁸

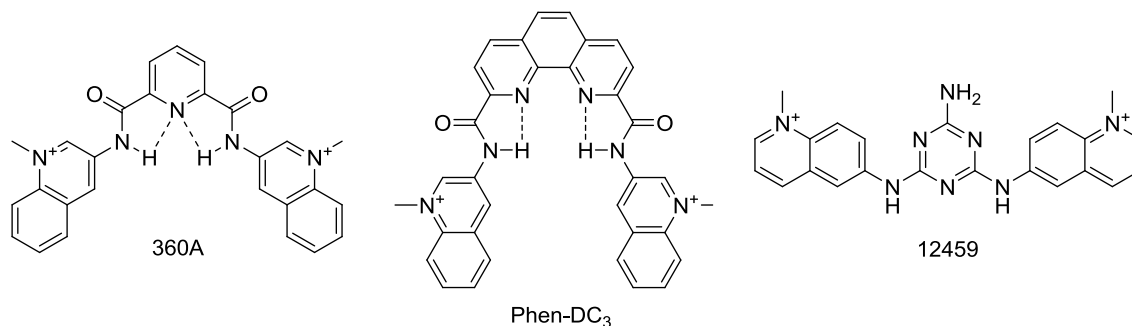


Figure 78 – Structure chimique des composés 360A, Phen-DC3 et 12459

La télomestatine est un produit naturel extrait du champignon *Streptomyces annulatus* 3533-SV4. Il est composé d'un macrocycle possédant une unité thiazoline et sept unités oxazoles (Figure 79). Découverte en 2001, par l'équipe de K. Shin-ya, elle montre rapidement un très bon potentiel d'inhibition de la télomérase.¹⁶⁹ Elle est actuellement l'inhibiteur de la télomérase le plus puissant *in vitro* avec une IC_{50} -TRAP de 5nM et possède une très bonne sélectivité pour les motifs quadruplexes (d'un facteur 70). De plus elle semble montrer une préférence pour les motifs quadruplexe intramoléculaires et plus particulièrement pour une séquence de type $d(AG_3(T_2AG_3)_3)$.¹⁷⁰ La télomestatine étant difficile à extraire et sa synthèse rendue fastidieuse par sa structure complexe, de nombreuses équipes se sont intéressées à développer des analogues. L'équipe de J. Rice propose des analogues composés de deux motifs trioxazoles liés par des liaisons peptidiques. Le HXDV (Figure 79) représente un bon candidat qui stabilise le quadruplexe issu de la séquence $d(TTAGGG)_4$ sans stabiliser les structures duplexes et triplexes. Son mode d'interaction est principalement l'empilement de deux molécules de HXDV sur les tétrades externes du quadruplexe.¹⁷¹ L'équipe de S. Balasubramanian s'intéresse à la synthèse de macrocycles peptidiques à base d'unités oxazoles (Figure 79). Ces molécules se montrent très sélectives pour les motifs quadruplexes.¹⁷²

168. Riou, J. F.; Guittat, L.; Mailliet, P.; Laoui, A.; Renou, E.; Petitgenet, O.; Megnin-Chanet, F.; Helene, C.; Mergny, J. L., Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99 (5), 2672-7.

169. Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Matsuo, K.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H., Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (6), 1262-3.

170. Kim, M. Y.; Vankayalapati, H.; Shin-Ya, K.; Wierzba, K.; Hurley, L. H., Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (10), 2098-9.

171. Barbieri, C. M.; Srinivasan, A. R.; Rzuczek, S. G.; Rice, J. E.; LaVoie, E. J.; Pilch, D. S., Defining the mode, energetics and specificity with which a macrocyclic hexaoxazole binds to human telomeric G-quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35 (10), 3272-86.

172. Jantos, K.; Rodriguez, R.; Ladame, S.; Shirude, P. S.; Balasubramanian, S., Oxazole-based peptide macrocycles: a new class of G-quadruplex binding ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (42), 13662-3.

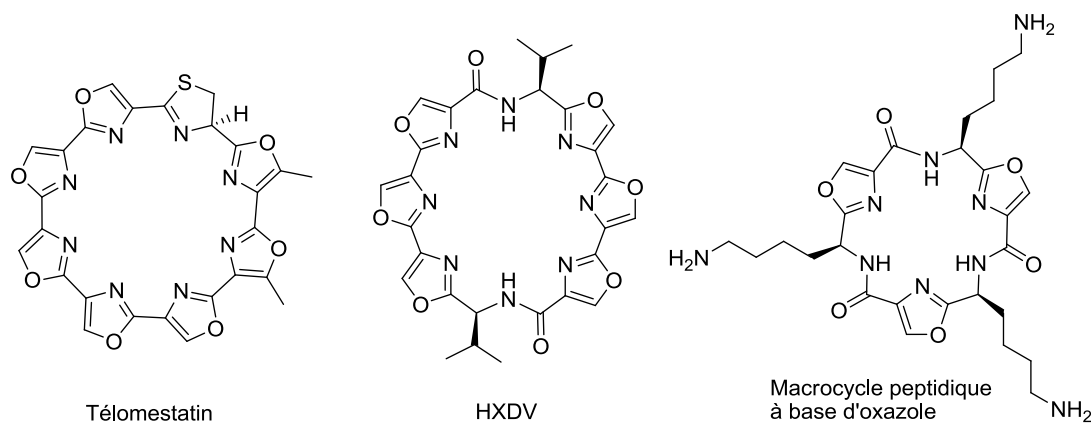


Figure 79 – Structure chimique de la Télomestatine, HXDV et d'un macrocycle peptidique à base d'oxazole.

L'utilisation de complexes métalliques permet d'obtenir des ligands de géométrie contrôlable à partir de synthons simples. L'équipe de M.-P. Teulade-Fichou a montré récemment l'importance de la nature du métal et de sa géométrie pour la reconnaissance des motifs G₄.¹⁷³ L'utilisation de ligand tridentate comme la toluyl-terpyridine (4'-(4-methylphenyl)-2,2':2'',6'-terpyridine, tppy) permet l'obtention de complexes avec divers métaux comme le cuivre, le platine, le zinc ou le ruthénium (Figure 80). Parmi toutes ces molécules le Pt-tppy, possédant une géométrie plan carré, présente la meilleure affinité pour un motif G₄. Néanmoins le Cu-tppy, possédant une géométrie trigonale bipyramidale, présente le meilleur compromis entre affinité et sélectivité. L'équipe de R. Vilar propose l'utilisation de motif salphen complexé au Ni(II) présentant une géométrie plan carré.¹⁷⁴ Le ligand obtenu présente une IC₅₀-TRAP de 140nM et une très bonne sélectivité pour les motifs quadruplexes. L'équipe de H. Sleiman propose l'utilisation de complexe à base de phenanthroimidazole Pt (II), présentant une géométrie plan carré, et insiste sur la modularité introduite par l'utilisation de tel complexe métallique.¹⁷⁵

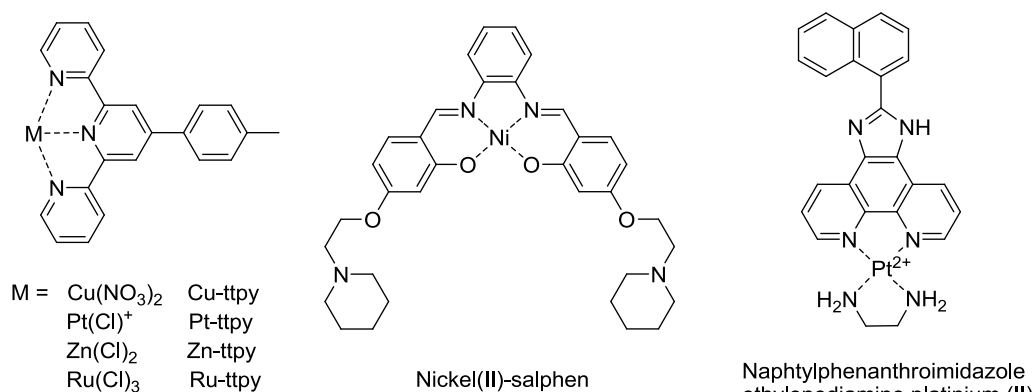


Figure 80 – Structure chimique de complexes métalliques ligands de G₄, M-tppy, Ni(II)-salphen et Naphtylphenanthroimidazole ethylenediamine platinum (II).

173. Bertrand, H.; Monchaud, D.; De Cian, A.; Guillot, R.; Mergny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P., The importance of metal geometry in the recognition of G-quadruplex-DNA by metal-terpyridine complexes. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5 (16), 2555-9.

174. Reed, J. E.; Arnal, A. A.; Neidle, S.; Vilar, R., Stabilization of G-quadruplex DNA and inhibition of telomerase activity by square-planar nickel(II) complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (18), 5992-3.

175. Kieltyka, R.; Fakhoury, J.; Moitessier, N.; Sleiman, H. F., Platinum phenanthroimidazole complexes as G-quadruplex DNA selective binders. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14 (4), 1145-54.

L'ensemble des molécules précédemment présentées utilise leur capacité à s'empiler sur une tétrade de guanines pour reconnaître les motifs quadruplexe. La fonctionnalisation des noyaux aromatiques par des chaînes protonables permet la reconnaissance du sillon des quadruplexes et améliore leur spécificité. Une autre caractéristique structurale des motifs quadruplexe peut être exploitée pour augmenter la sélectivité : la cavité centrale occupée normalement par un cation. L'équipe de S. Balasubramanian montre que la fonctionnalisation d'un noyau anthracène par un résidu diéthylène triamine, nommé DETA-Anthracene (Figure 81), permet de développer un ligand qui va reconnaître la cavité centrale d'un quadruplexe.¹⁷⁶ Ce ligand induit la formation exclusive d'un quadruplexe intramolécule parallèle à partir d'une séquence télomérique humaine.

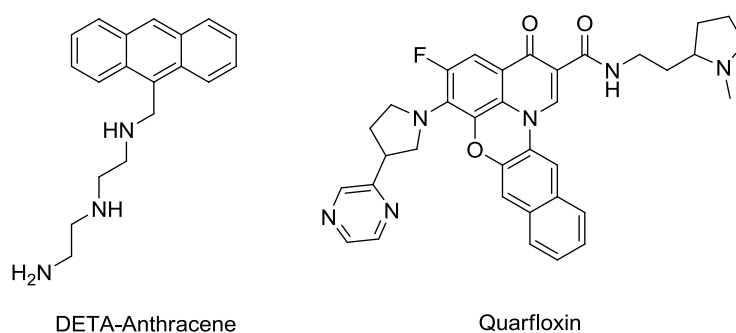


Figure 81 – Structure chimique du DETA-Anthracène et de la Quarfloxin.

Tous ces développements ont permis le développement de la Quarfloxin (aussi connu sous le nom CX-3543) (Figure 81), qui est aujourd'hui la seule molécule qui interagit avec l'ADN quadruplexe en étude clinique.¹⁷⁷ Originellement développée par l'équipe de L. Hurley, son potentiel pour le traitement de tumeurs leucémiques, carcinoïdes et neuroendocriniennes a été à l'initiative de la création d'une start-up (Cylene Pharmaceutical) destiné au développement et l'étude clinique de ce composé. La Quarfloxin déstabilise un complexe formé entre la nucléoline et un quadruplexe d'ARN ribosomal dans le nucléole, ce qui inhibe la transcription de la protéine Pol I et induit l'apoptose des cellules cancéreuses. Il est aujourd'hui en phase II des études cliniques (malheureusement son utilisation semble être compromise à cause d'effets secondaires importants).

176. Rodriguez, R.; Pantos, G. D.; Goncalves, D. P.; Sanders, J. K.; Balasubramanian, S., Ligand-driven G-quadruplex conformational switching by using an unusual mode of interaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46* (28), 5405-7.

177. Drygin, D.; Siddiqui-Jain, A.; O'Brien, S.; Schwaebe, M.; Lin, A.; Bliesath, J.; Ho, C. B.; Proffitt, C.; Trent, K.; Whitten, J. P.; Lim, J. K.; Von Hoff, D.; Anderes, K.; Rice, W. G., Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer. Res.* **2009**, *69* (19), 7653-61.

c) *Ligands du sillon et des boucles*

La recherche et le développement de ligands de quadruplexe se sont concentrés sur des molécules aromatiques capables de s'empiler sur une tétrade de guanines. Néanmoins le ciblage du sillon de l'ADN quadruplexe présente une alternative intéressante. En effet les différences structurales entre les sillons d'un duplexe et les sillons d'un quadruplexe permettent le développement de ligands spécifiques de motifs G₄. De plus chaque topologie de quadruplexe présente des sillons de taille différente et ce qui permet de développer des ligands sélectifs d'une topologie particulière.

Un premier exemple de ligand du sillon est la Distamycin A, qui est une molécule connue pour se lier dans le petit sillon de l'ADN duplexe.¹⁷⁸ Ses interactions avec différents quadruplexes ont également été étudiées, entre autres avec les quadruplexes d[TG₄T]₄, d[G₄T₄G₄]₂ et d(AG₃(T₂AG₃)₃). Trois modèles ont été proposés pour décrire l'interaction de la Distamycin A avec les motifs quadruplexes : le ligand interagit dans les sillons sous forme de dimères (deux molécules qui se positionnent tête-bêche),¹⁷⁹ le ligand s'empile sur une tétrade extérieure¹⁸⁰ ou un mode mixte (une partie s'empile et l'autre se fixe dans le sillon).¹⁸¹ Cependant, des études RMN récentes tendent à conclure que le mode principal d'interaction est la reconnaissance du sillon sous forme de dimère pour un ratio G₄ : ligand de 1 : 4.¹⁸² Un grand nombre de dérivés a été synthétisé pour améliorer l'affinité et la sélectivité de ce type de motif pour l'ADN quadruplexe (Figure 82). L'équipe d'A. Randazzo s'est intéressée à l'ajout d'unités *N*-méthylpyrrole dans la structure pour la rendre plus sélective de l'ADN G-quadruplexe (en effet les structures plus longues déstabilisent l'ADN duplexe et l'affinité est optimum pour trois unités pyrrole). Ils obtiennent par exemple le dérivé MEN 10716 (Figure 82) qui montre une affinité de $K_A = 2.0 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ pour un quadruplexe d[TGGGGT]₄.¹⁷⁹ L'équipe de S. Neidle a essayé de moduler la longueur de la molécule, mais également de modifier la position de l'acétamide terminal et la nature de la tête polaire : la famille des AcPy_nβAlaDp a ainsi été synthétisée.¹⁸¹ Tous ces ligands, s'ils stabilisent plus ou moins bien les motifs quadruplexes, ne se montrent pas sélectifs de ce type de structure. Une étude intéressante utilise la chimie combinatoire dynamique (CCD) pour trouver le meilleur ligand de type oligoamide à base d'unité *N*-méthylpyrrole.¹⁸³ Bien que le ligand identifié de cette manière ne stabilise pas particulièrement le quadruplexe étudié, une telle approche montre que la CCD est une technique intéressante pour le développement de nouveaux ligands de l'ADN.

178. Coll, M.; Frederick, C. A.; Wang, A. H.; Rich, A., A bifurcated hydrogen-bonded conformation in the d(A.T) base pairs of the DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) and its complex with distamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84* (23), 8385-9.

179. Pagano, B.; Virno, A.; Mattia, C. A.; Mayol, L.; Randazzo, A.; Giancola, C., Targeting DNA quadruplexes with distamycin A and its derivatives: an ITC and NMR study. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1224-32.

180. Cocco, M. J.; Hanakahi, L. A.; Huber, M. D.; Maizels, N., Specific interactions of distamycin with G-quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (11), 2944-51.

181. Moore, M. J.; Cuenca, F.; Searcey, M.; Neidle, S., Synthesis of distamycin A polyamides targeting G-quadruplex DNA. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (18), 3479-88.

182. Martino, L.; Virno, A.; Pagano, B.; Virgilio, A.; Di Micco, S.; Galeone, A.; Giancola, C.; Bifulco, G.; Mayol, L.; Randazzo, A., Structural and thermodynamic studies of the interaction of distamycin A with the parallel quadruplex structure [d(TGGGGT)]₄. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (51), 16048-56.

183. Ladame, S.; Whitney, A. M.; Balasubramanian, S., Targeting nucleic acid secondary structures with polyamides using an optimized dynamic combinatorial approach. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44* (35), 5736-9.

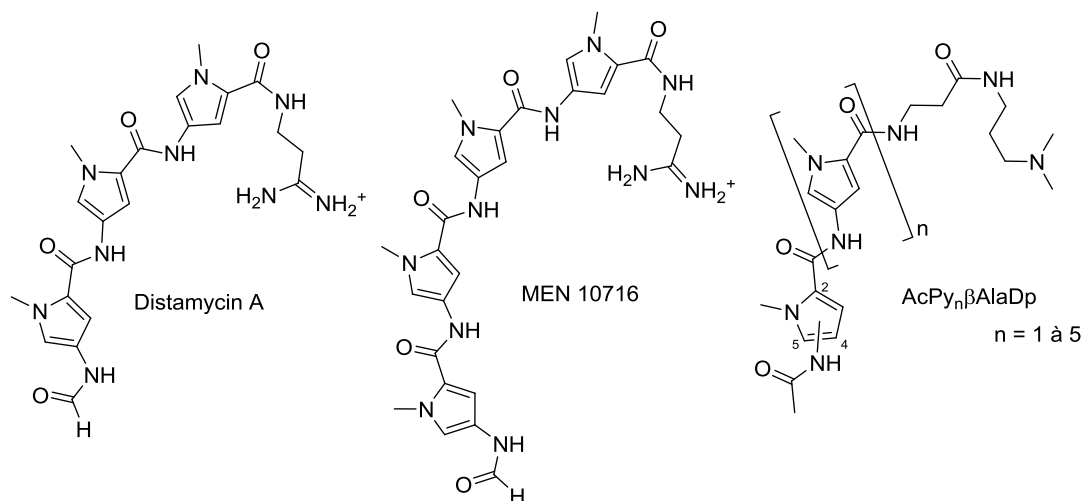


Figure 82 - Structure chimique de la Distamycin A et de quelques dérivés.

Le noyau benzimidazole est un résidu que l'on retrouve dans de nombreux produits naturels biologiquement actifs. Le dérivé Hoechst 33258 (2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bisbenzimidazole) est composé de deux unités benzimidazole et connu pour reconnaître le sillon de duplexes riches en paires de bases AT (Figure 83).¹⁸⁴ L'équipe de S. Chowdury rapporte la capacité du Hoechst 33258 à interagir avec le quadruplex formé dans la région promotrice de l'oncogène *c-myc*. Comme ce dérivé est connu pour reconnaître les séquences riches en AT, il a été proposé que le Hoechst 33258 interagisse avec les boucles du quadruplexe de séquence AAGGT.¹⁸⁵ Récemment ce même composé a été décrit comme stabilisant le motif quadruplexe issu de la séquence télomérique humaine. Cette étude menée par l'équipe de Z. Tan montre que ce composé perd toutes ses aptitudes de stabilisation en milieu condensé (présence de PEG200).¹⁸⁶ Comme un changement de conformation de cette séquence est induit dans un milieu condensé, les boucles et sillons ne présentent plus la même topologie et la reconnaissance devient impossible. Intéressée par le potentiel des dérivés du benzimidazole l'équipe de S. Bhattacharya a développé des ligands à visée de l'ADN quadruplexe. L'utilisation de dérivés de Phénylene-bis(piperazinyl benzimidazole) permet le contrôle de la présentation des résidus benzimidazoles (Figure 83). Cette approche permet le développement de ligands linéaires ou présentant une conformation en V ; la géométrie du ligand va alors influencer sur ses propriétés. Alors que le composé linéaire *p*-Phenbbim est capable de stabiliser un quadruplexe de séquence d(TTGGGG)₄ en présence de Na⁺, l'isomère présentant une conformation en V, le *m*-Phenbbim, induit un changement dans la

184. Tawar, U.; Jain, A. K.; Chandra, R.; Singh, Y.; Dwarakanath, B. S.; Chaudhury, N. K.; Good, L.; Tandon, V., Minor groove binding DNA ligands with expanded A/T sequence length recognition, selective binding to bent DNA regions and enhanced fluorescent properties. *Biochemistry* **2003**, *42* (45), 13339-46.

185. Maiti, S.; Chaudhury, N. K.; Chowdhury, S., Hoechst 33258 binds to G-quadruplex in the promoter region of human *c-myc*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *310* (2), 505-12.

186. Chen, Z.; Zheng, K. W.; Hao, Y. H.; Tan, Z., Reduced or diminished stabilization of the telomere G-quadruplex and inhibition of telomerase by small chemical ligands under molecular crowding condition. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (30), 10430-8.

conformation du quadruplexe dosé.¹⁸⁷ Bien que le mode principal de reconnaissance proposé soit l'empilement sur une tétrade externe, ce changement de conformation est certainement dû à une interaction avec les boucles formées par le repliement du G₄. Le ligand *m*-Phenbbim est également capable d'induire la formation du motif quadruplexe de la séquence simple brin en absence de cations. L'introduction d'un troisième bras confère au ligand de nouvelles propriétés. Le ligand EtBzEt présente des propriétés intéressantes : pour de grand ratio G₄ : EtBzEt, on observe l'apparition d'un signal induit traduisant l'interaction du composé dans le sillon du quadruplexe (voir Figure 91).¹⁸⁸ Des ligands très similaires développés par l'équipe de X. Zhou présentent des caractéristiques similaires.¹⁸⁹

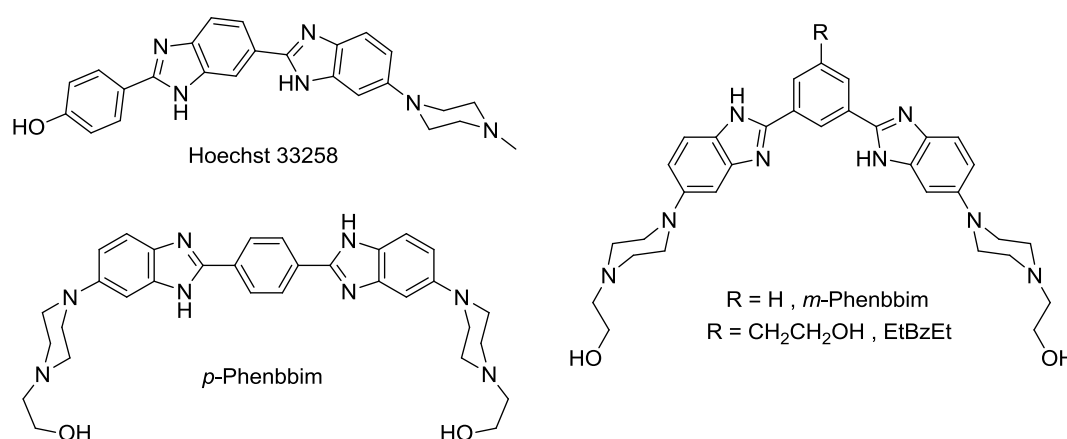


Figure 83 - Structure chimique du Hoechst 33258 et de quelques dérivés.

La famille des colorants à base de carbocyanine (DOC, DODC, DTC, ..., Figure 84) représente une autre classe de composés qui interagissent avec le sillon de l'ADN quadruplexe. Initialement connus pour reconnaître le petit sillon de l'ADN duplexe sous forme de dimère,¹⁹⁰ ces composés ont été utilisés et optimisés pour la reconnaissance de motif G₄. Des études spectroscopiques ont montré que le DODC (*N,N'*-diéthylloxacarbo-cyanine) se lie dans le sillon d'un quadruplexe dimérique possédant deux boucles diagonales de séquences d[G₄T₄G₄]₂.¹⁹¹ Cette étude menée par l'équipe de R. Shafer tend à montrer que le DODC se lie dans le sillon du quadruplexe, mais à proximité des boucles du G₄. En effet le composé ne montre pas les mêmes propriétés quand il interagit avec un quadruplexe tétramoléculaire ne possédant aucune boucle. Une étude de l'équipe de J. Chaires montre que

187. Bhattacharya, S.; Chaudhuri, P.; Jain, A. K.; Paul, A., Symmetrical Bisbenzimidazoles with Benzenediyl Spacer: The Role of the Shape of the Ligand on the Stabilization and Structural Alterations in Telomeric G-Quadruplex DNA and Telomerase Inhibition. *Bioconjug. Chem.* **2010**.

188. Jain, A. K.; Reddy, V. V.; Paul, A.; K, M.; Bhattacharya, S., Synthesis and evaluation of a novel class of G-quadruplex-stabilizing small molecules based on the 1,3-phenylene-bis(piperazinyl benzimidazole) system. *Biochemistry* **2009**, *48* (45), 10693-704.

189. Li, G.; Huang, J.; Zhang, M.; Zhou, Y.; Zhang, D.; Wu, Z.; Wang, S.; Weng, X.; Zhou, X.; Yang, G., Bis(benzimidazole)pyridine derivative as a new class of G-quadruplex inducing and stabilizing ligand. *Chem. Commun.* **2008**, (38), 4564-6.

190. Garoff, R. A.; Litzinger, E. A.; Connor, R. E.; Fishman, I.; Armitage, B. A., Helical Aggregation of Cyanine Dyes on DNA Templates: Effect of Dye Structure on Formation of Homo- and Heteroaggregates. *Langmuir* **2002**, *18* (16), 6330-6337.

191. Chen, Q.; Kuntz, I. D.; Shafer, R. H., Spectroscopic recognition of guanine dimeric hairpin quadruplexes by a carbocyanine dye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93* (7), 2635-9.

le DODC montre une meilleure affinité pour les structures de types triplexes,¹⁹² ce qui réfute l'intercalation comme mode d'interaction et la tendance qu'a le DODC à se fixer dans le sillon des quadruplexe est confirmé par des études par spectroscopie (Satellite hole spectroscopy).¹⁹³ Bien que le mode de fixation exacte ne soit pas connu (pas d'étude structurale), les différentes études tendent à montrer qu'une partie se fixe dans le sillon et une autre dans une des boucles du quadruplexe. Plusieurs dérivés de carbocyanine reconnaissent également les structures d'ADN quadruplexe. Entre autres le DTC (*N,N'*-diéthylthiacarbocyanine) se lie dans le sillon du quadruplexe d[T₂G₅T]₄.¹⁹⁴ Le DTDC (*N,N'*-diéthylthiadicarboxyanine) a récemment été utilisé par l'équipe de P. Bolton comme sonde de quadruplexes pour le développement d'un test de criblage par fluorescence.¹⁹⁵ Récemment un dérivé de cyanine plus complexe, le ETC (*N,N'*-di(3-sulfopropyl)-4,5,4',5'-dibenzo-9-ethylthiacarbocyanine), a été utilisé pour la reconnaissance de quadruplexes issus de la séquence télomérique humaine.¹⁹⁶ Il est intéressant de constater que le colorant MKT-077 dérivé de la Rhodocyanine montre une capacité à inhiber la télomérase.¹⁹⁷

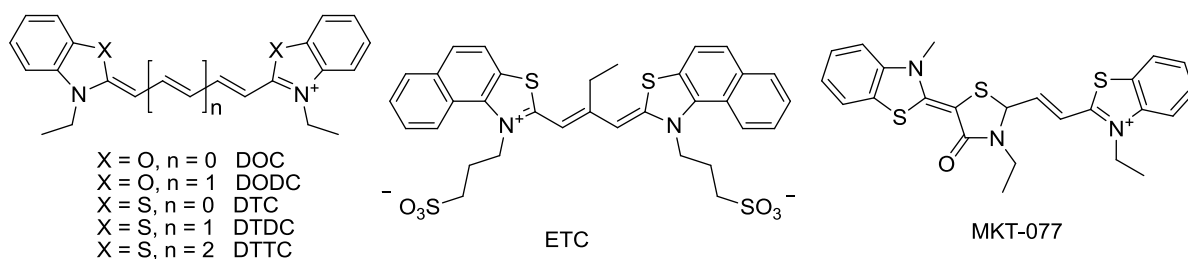


Figure 84 - Structure chimique de quelques dérivés de colorants carbocyanine.

En 2003, l'équipe de S. Balasubramanian sélectionne par chimie combinatoire trois tétrapeptides qui reconnaissent le sillon d'un quadruplexe de séquence d(GTTAGG)₅.¹⁹⁸ Ces peptides montrent une très bonne capacité à discriminer les structures de type duplexe en faveur des quadruplexes. Pour augmenter l'affinité de ces peptides, ils sont conjugués à un résidu hémicyanine (Figure 85). Les conjugués obtenus possèdent une affinité de l'ordre du micromolaire, et le plus sélectif (possédant la séquence FRHR) montre une sélectivité supérieure à 600. Cette approche est également utilisée pour fonctionnaliser des noyaux acridines et acridones et permet d'améliorer la sélectivité des ligands pour l'ADN

192. Ren, J. S.; Chaires, J. B., Preferential binding of 3,3'-diethyloxadiazocarbocyanine to triplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (2), 424-425.

193. Cheng, J. Y.; Lin, S. H.; Chang, T. C., Vibrational investigation of DODC cation for recognition of guanine dimeric hairpin quadruplex studied by satellite holes. *J. Phys. Chem. B.* **1998**, *102* (28), 5542-5546.

194. David, W. M.; Brodbelt, J.; Kerwin, S. M.; Thomas, P. W., Investigation of quadruplex oligonucleotide-drug interactions by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (9), 2029-33.

195. Paramasivan, S.; Bolton, P. H., Mix and measure fluorescence screening for selective quadruplex binders. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (17), e106.

196. Yang, Q.; Xiang, J.; Yang, S.; Zhou, Q.; Li, Q.; Tang, Y.; Xu, G., Verification of specific G-quadruplex structure by using a novel cyanine dye supramolecular assembly: I. recognizing mixed G-quadruplex in human telomeres. *Chem. Commun.* **2009**, (9), 1103-5.

197. Naasani, I.; Seimiya, H.; Yamori, T.; Tsuruo, T., Screening for antitelomerase agents with the aid of CONTARE analysis. *P. Am. Assoc. Canc. Res.* **1998**, *39*, 3854-3857.

198. Schouten, J. A.; Ladame, S.; Mason, S. J.; Cooper, M. A.; Balasubramanian, S., G-quadruplex-specific peptide-hemicyanine ligands by partial combinatorial selection. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (19), 5594-5.

quadruplexe.¹⁹⁹ La fonctionnalisation par ces séquences peptidiques permet également de développer des ligands sélectifs d'une conformation particulière de G₄. Par exemple, le peptide KRSR augmente la sélectivité pour un quadruplexe issu de la séquence de l'oncogène *N-ras*.²⁰⁰ Les équipes de D. Graves et de H.-J. Park se sont intéressées à l'étude de l'interaction du produit naturel Actinomycine D avec les quadruplexes issus de la séquence télomérique humaine et de *c-myc*. Le noyau phenoxazone s'empile sur une tétrade de guanines et les deux peptides cycliques interagissent directement avec le sillon du quadruplexe.²⁰¹

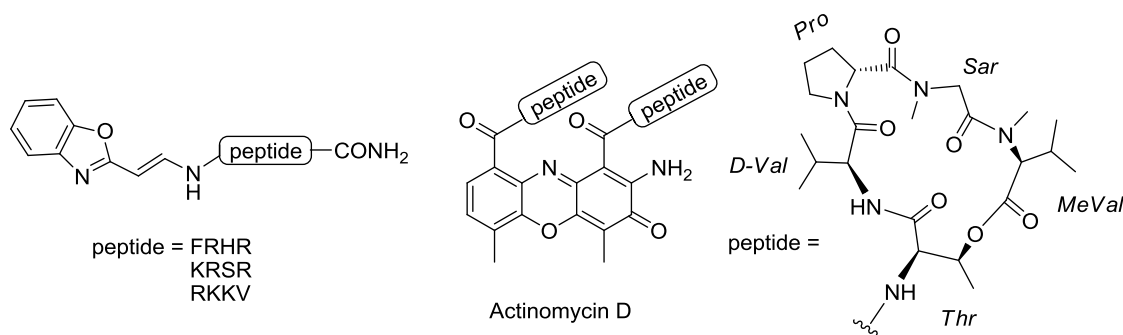


Figure 85 – Structure chimique de dérivés d'hémicyanine et de phenoxazone utilisant des fragments peptidiques pour la reconnaissance des sillons.

Il est intéressant de constater que si une bonne affinité pour les motifs quadruplexes est conférée par un noyau aromatique adéquat (capable de recouvrir la surface d'une tétrade de guanine), la sélectivité peut être améliorée par la conjugaison de ces noyaux avec des fragments de molécules reconnaissant le sillon du G₄. C'est pour cela que la recherche de nouveaux ligands du sillon semble si importante : même si de manière générale les ligands du sillon possèdent une affinité modeste, ils peuvent être la source d'optimisation des ligands traditionnels.

C'est également des ligands du sillon qui présentent les meilleures sélectivités vis à vis des conformations quadruplexes. Récemment l'équipe de S. Balasubramanian a proposé des dérivés de bis-phenylethynyl amide (Figure 86) comme ligand sélectif de l'ADN quadruplexe vis-à-vis de l'ADN duplexe et comme ligands sélectif du quadruplexe *c-kit*.²⁰² L'équipe de X. Xu propose les deux produits naturels, Peimine et Peiminine, comme ligand du sillon du quadruplexe d[TTAGGGT]₄. Finalement l'équipe d'A. Randazzo utilise le logiciel *Autodoc 4* pour effectuer un criblage virtuel, elle identifie six produits qui interagissent avec le sillon du

199. Ladame, S.; Schouten, J. A.; Stuart, J.; Roldan, J.; Neidle, S.; Balasubramanian, S., Tetrapeptides induce selective recognition for G-quadruplexes when conjugated to a DNA-binding platform. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2 (20), 2925-31.

200. Redman, J. E.; Granadino-Roldan, J. M.; Schouten, J. A.; Ladame, S.; Reszka, A. P.; Neidle, S.; Balasubramanian, S., Recognition and discrimination of DNA quadruplexes by acridine-peptide conjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7 (1), 76-84.

201. (a) Hudson, J. S.; Brooks, S. C.; Graves, D. E., Interactions of actinomycin D with human telomeric G-quadruplex DNA. *Biochemistry* **2009**, 48 (21), 4440-7; (b) Kang, H. J.; Park, H. J., Novel molecular mechanism for actinomycin D activity as an oncogenic promoter G-quadruplex binder. *Biochemistry* **2009**, 48 (31), 7392-8.

202. Dash, J.; Shirude, P. S.; Hsu, S. T.; Balasubramanian, S., Diarylethynyl amides that recognize the parallel conformation of genomic promoter DNA G-quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (47), 15950-6.

quadruplexe d[TGGGGT]₄ (interactions confirmées par RMN). Parmi ces ligands, le F1031-0066 est le seul qui ne présente aucune charge et qui doit donc développer un réseau de liaisons hydrogène pour stabiliser l'interaction.

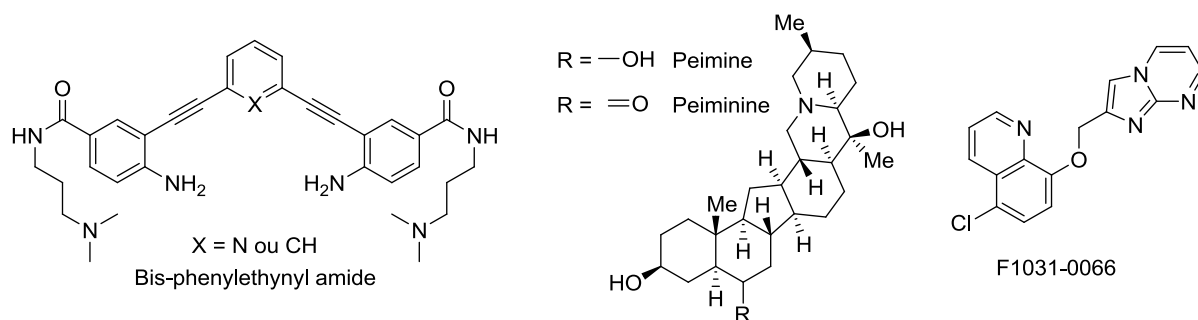


Figure 86 – Structure chimique de ligands du sillon spécifique de l'ADN quadruplexe.

d) Protéines

Quelques laboratoires ont identifié des protéines issues de différents organismes capables d'interagir sélectivement avec l'ADN quadruplexe.²⁰³ Certaines de ces interactions peuvent déclencher des réactions biologiques, ce qui renforce l'hypothèse de l'existence du motif quadruplexe *in-vivo* et son implication biologique dans la maintenance de l'ADN génomique. Ces protéines peuvent être classées en cinq groupes qui vont être décrit par la suite.

La première catégorie regroupe les protéines capables d'interagir et de stabiliser le motif quadruplexe. Ces protéines ont une affinité allant du picomolaire au nanomolaire et améliorent la stabilité du tétramère formé. Parmi celles-ci on trouve un grand nombre de protéines extraites des murins, comme la qTBP42, qui se lie à un quadruplexe de séquence d(TTAGGG)_n avec une affinité de l'ordre du nanomolaire et augmente sa stabilité à la digestion par des nucléases.²⁰⁴ La protéine HIV-1 nucléocapside (NCP) reconnaît le quadruplexe formé par la séquence d(TTGGGGGGTACAGTGCA) issue du génome de HIV-1. La reconnaissance s'effectue *via* l'interaction de doigts de zinc.²⁰⁵ La protéine humaine MutSa reconnaît l'ADN quadruplexe formé par la région S lors de la transcription de l'ADN des lymphocytes B qui intervient dans le réarrangement et l'expression des chaînes variables des immunoglobulines.²⁰⁶

La deuxième catégorie regroupe les protéines capables d'induire la formation de motifs quadruplexe. La sous-unité β de la protéine « telomere-binding » d'*Oxytrichia nova* induit la formation *in vivo* dans des conditions physiologiques de structure de type quadruplexe de la séquence d(TTGGGGTTGGGG) issue de la séquence télomérique de

203. Fry, M., Tetraplex DNA and its interacting proteins. *Front Biosci* **2007**, *12*, 4336-51.

204. Sarig, G.; Weisman-Shomer, P.; Erlitzki, R.; Fry, M., Purification and characterization of qTBP42, a new single-stranded and quadruplex telomeric DNA-binding protein from rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (7), 4474-82.

205. Lyonnais, S.; Gorelick, R. J.; Mergny, J. L.; Le Cam, E.; Mirambeau, G., G-quartets direct assembly of HIV-1 nucleocapsid protein along single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (19), 5754-63.

206. Larson, E. D.; Duquette, M. L.; Cummings, W. J.; Streiff, R. J.; Maizels, N., MutSalphalpha binds to and promotes synapsis of transcriptionally activated immunoglobulin switch regions. *Curr. Biol.* **2005**, *15* (5), 470-4.

Oxytricha et *Tetrahymena*.²⁰⁷ La topoisomérase 1 humaine est également capable d'induire la formation de quadruplexe et se lie à des quadruplexes intramoléculaire de séquence d(GGG(TTAGGG)₃).²⁰⁸

Les protéines de type hélicase, qui sont capables de dérouler (« unwind ») sélectivement l'ADN quadruplexe, composent la troisième catégorie. Les protéines les plus sélectives se retrouvent chez le virus simien 40 (SV40), les levures et les cellules humaines. L'hélicase T-antigène de SV40 déroule sélectivement les quadruplexes tétramoléculaires et les quadruplexes bimoléculaires en présence d'ATP.²⁰⁹ La protéine WRN, de la famille des hélicases RecQ, qui est codée par le gène responsable de la maladie de Werner (vieillesse prématurée), reconnaît les quadruplexes bimoléculaires formés par la séquence d(CGG)₇.²¹⁰ L'hélicase codée par le gène BLM, également de la famille des hélicases RecQ et responsable du syndrome de Bloom (croissance retardée), peut également dérouler l'ADN quadruplexe en présence d'ATP.²¹¹

La quatrième catégorie est composée des protéines capables de déstabiliser l'ADN quadruplexe. Certaines de ces protéines se retrouvent dans les cellules humaines et ont une activité biologique importante. Parmi celles-ci on peut citer la protéine humaine hPOT1 (protection of telomeres 1) qui intervient dans la régulation de la longueur des télomères.²¹² hPOT1 est capable de déstabiliser le quadruplexe formé par la séquence d[GGG(TTAGGG)₃] et pourrait *in vivo* permettre d'initier l'élongation des télomères par la télomérase. La protéine RPA (replication protein A), qui joue un rôle important dans les processus de transcription et de réplication de l'ADN, possède des capacités similaires.²¹³

La dernière catégorie est composée des nucléases sélectives de l'ADN quadruplexe. La protéine GQN1 (G quartet nuclease 1) coupe sélectivement un simple brin d'ADN situé près d'un ADN quadruplexe indépendamment de la séquence qui compose celui-ci. Inversement il ne dégrade pas l'ADN duplexe, simple brin ou les quadruplexes d'ARN.²¹⁴

Bien que le rôle biologique de ces protéines et l'importance des interactions avec l'ADN quadruplexe n'ait pas encore été précisément démontrés, ces différentes observations laissent présupposer de l'importance des motifs quadruplexes dans la maintenance de l'ADN génomique.

207. Fang, G.; Cech, T. R., The beta subunit of *Oxytricha* telomere-binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA. *Cell* **1993**, *74* (5), 875-85.

208. Arimondo, P. B.; Riou, J. F.; Mergny, J. L.; Tazi, J.; Sun, J. S.; Garestier, T.; Helene, C., Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (24), 4832-8.

209. Baran, N.; Pucshansky, L.; Marco, Y.; Benjamin, S.; Manor, H., The SV40 large T-antigen helicase can unwind four stranded DNA structures linked by G-quartets. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (2), 297-303.

210. Kamath-Loeb, A. S.; Loeb, L. A.; Johansson, E.; Burgers, P. M.; Fry, M., Interactions between the Werner syndrome helicase and DNA polymerase delta specifically facilitate copying of tetraplex and hairpin structures of the d(CGG)_n trinucleotide repeat sequence. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (19), 16439-46.

211. Sun, H.; Karow, J. K.; Hickson, I. D.; Maizels, N., The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (42), 27587-92.

212. Zaug, A. J.; Podell, E. R.; Cech, T. R., Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102* (31), 10864-9.

213. Salas, T. R.; Petrusseva, I.; Lavrik, O.; Bourdoncle, A.; Mergny, J. L.; Favre, A.; Saintome, C., Human replication protein A unfolds telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (17), 4857-65.

214. Sun, H.; Yabuki, A.; Maizels, N., A human nuclease specific for G4 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98* (22), 12444-12449.

e) *Contrôle de fonctions biologiques via l'utilisation de ligands de G₄.*

Ces dernières années, les chimistes ont synthétisé de nombreuses molécules qui interagissent avec l'ADN quadruplexe et les biologistes ont identifié différentes protéines qui contrôlent la stabilité de ces motifs. Tous ces nouveaux outils sont aujourd'hui utilisés pour déterminer le rôle exact que peut avoir l'ADN quadruplexe dans la vie cellulaire. Dans ce paragraphe, nous allons développer des exemples représentatifs de l'utilisation de ligands de G₄.

En 2004, l'équipe de S. Neidle s'intéresse à l'utilisation de BRACO-19 pour l'inhibition de la croissance des tumeurs dans le cancer de la prostate. Cette étude montre que l'action du ligand est complexe. En stabilisant les motifs quadruplexes présents au niveau des télomères, BRACO-19 inhibe l'action de la télomérase et induit la sénescence des cellules cancéreuses. Néanmoins la sénescence observée est trop rapide pour être expliquée par ce seul mécanisme. S. Neidle montre alors qu'un traitement avec BRACO-19 provoque la fusion de l'extrémité des chromosomes, résultat qui confirme la déstabilisation du complexe shelterine / télomère.²¹⁵

L'équipe de S. Balasubramanian montre, en 2007, que l'utilisation de dérivés d'isoalloxazines (Figure 87) permet de contrôler l'expression de l'oncogène *c-kit*.²¹⁶ La capacité des différents ligands synthétisés à inhiber l'expression du gène *c-kit* a été évaluée sur des lignées cellulaires cancéreuses du sein MCF-7. Le traitement de ces lignées avec de tels composés permet l'inhibition totale de l'expression de *c-kit* en moins de 6h.

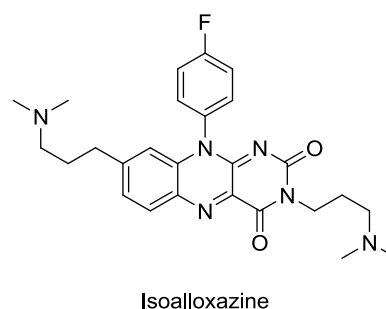


Figure 87 – Structure chimique d'un dérivé d'isoalloxazine.

Très récemment en 2010, l'équipe de P. Calsou met en évidence la présence d'un motif quadruplexe dans la région 5'-UTR d'un ARNm codant pour la protéine TRF2.²¹⁷ La protéine TRF2 joue un rôle important dans le complexe de la shelterine qui assure l'intégrité des télomères. L'utilisation de ligands de quadruplexes comme le 360A ou le Phen-DC3 permet de contrôler la stabilité de ce quadruplexe d'ARN et de moduler l'expression de l'ARNm. L'interaction de ces ligands avec le G₄ d'ARN réprime la translation de l'ARNm et donc l'expression de TRF2 dans des cellules humaines.

En 2008, l'équipe de S. Ladame met en évidence l'interaction fonctionnelle de la protéine Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 humaine (hPARP-1) avec l'ADN quadruplexe.²¹⁸

215. Incles, C. M.; Schultes, C. M.; Kempinski, H.; Koehler, H.; Kelland, L. R.; Neidle, S., A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3* (10), 1201-6.

216. Bejugam, M.; Sewitz, S.; Shirude, P. S.; Rodriguez, R.; Shahid, R.; Balasubramanian, S., Trisubstituted isoalloxazines as a new class of G-quadruplex binding ligands: small molecule regulation of *c-kit* oncogene expression. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (43), 12926-7.

217. Gomez, D.; Guedin, A.; Mergny, J. L.; Salles, B.; Riou, J. F.; Teulade-Fichou, M. P.; Calsou, P., A G-quadruplex structure within the 5'-UTR of TRF2 mRNA represses translation in human cells. *Nucleic Acids Res.* **2010**.

218. Soldatenkov, V. A.; Vetcher, A. A.; Duka, T.; Ladame, S., First evidence of a functional interaction between DNA quadruplexes and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *ACS Chem Biol* **2008**, *3* (4), 214-9.

hPARP-1 se lie au motif quadruplexe intramoléculaire formé par la séquence *c-kit* avec une très bonne affinité et une très bonne sélectivité. De plus cette interaction active la protéine et le motif quadruplexe semble agir comme un agent recruteur de la hPARP-1. Cette étude constitue le premier exemple d'interaction G4 / protéine fonctionnelle et montre qu'un motif quadruplexe peut être à la source d'un mécanisme de régulation de la transcription.

Ces quelques exemples permettent de montrer que de petites molécules organiques ou des protéines peuvent interagir et contrôler les motifs quadruplexes d'ADN ou d'ARN présents au niveau des télomères ou des régions promotrices d'oncogènes. Si l'on considère que les motifs quadruplexe fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires contrôlant un phénomène biologique, toutes ces molécules permettent d'actionner ces interrupteurs.

II-1-4 Méthode d'études des interactions

Étant donné l'importance des motifs quadruplexes dans le génome, l'ADN et l'ARN G-quadruplexe sont des cibles biologiques de choix. De nombreuses équipes ont développé ces dernières années une multitude de petites molécules organiques capables de reconnaître ces séquences plus ou moins sélectivement. Pour améliorer ces molécules ou en découvrir de nouvelles, il faut tout d'abord comprendre les mécanismes mis en jeu dans la reconnaissance de l'ADN quadruplexe par de petites molécules organiques. Cette partie s'intéresse ainsi aux différentes techniques qui ont été développées pour étudier ces interactions. Ces techniques présentent des avantages et des inconvénients et peuvent être complémentaires. Le choix de la technique à utiliser sera bien entendu fonction des informations et précisions attendues : pour une étude de criblage de nouveaux ligands des affinités seront certainement suffisantes alors que pour une étude SAR (relation structure-activité) des constantes cinétiques ou des paramètres thermodynamiques seront nécessaires.

Les paramètres qui peuvent être intéressants à déterminer sont : l'affinité et la sélectivité quadruplexes vs duplexes, les constantes cinétiques et thermodynamiques de l'interaction et la stœchiométrie des partenaires mis en jeu. Mais de par le haut degré de polymorphisme que présente l'ADN quadruplexe, il est aussi important de déterminer le site de fixation ainsi que le mode de fixation (empilement, reconnaissance du sillon, des boucles ou un mélange). Chacune des méthodes présentées par la suite est plus ou moins contraignante en termes de temps et de manipulations. L'expérimentateur doit alors choisir un compromis en fonction du résultat qu'il attend.

a) Méthodes spectroscopiques optiques

Parmi les méthodes spectroscopiques optiques utilisées pour l'étude des interactions entre petites molécules organiques et l'ADN-quadruplexe, on trouve la spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis), la spectroscopie de fluorescence et le dichroïsme circulaire

(CD). Ces méthodes développées pour l'étude des ligands avec l'ADN duplexe ont été adaptées à l'étude de la reconnaissance de l'ADN quadruplexe.²¹⁹

La variation de l'absorbance (à 260nm ou 295nm), du signal en CD (à 260 ou 295nm), de la fluorescence (d'oligonucléotides marqués) est couramment utilisée pour étudier la stabilité des motifs quadruplexes en mesurant la température de dénaturation T_m (melting temperature) du système étudié.²²⁰ En pratique, l'évolution d'un signal caractéristique de la formation d'un motif quadruplexe en fonction de la température permet de déterminer la valeur de la température à laquelle 50% de l'acide nucléique est sous sa forme organisée. Cette température, T_m , caractérise ainsi la stabilité thermique du complexe étudié. Cette approche peut alors être utilisée pour déterminer en quelle proportion un ligand donné est capable de stabiliser ce type de structure. Classiquement le T_m de l'oligonucléotide étudié est mesuré en absence et en présence du ligand à tester et la différence entre les T_m obtenues, ΔT_m , représente la capacité d'un ligand à stabiliser le motif étudié. La Figure 88 représente une expérience de mesure de T_m en suivant la variation du signal CD à 260nm (caractéristique d'un quadruplexe parallèle) en l'absence ou en présence d'un ligand. Ainsi l'enregistrement d'une courbe de dénaturation donne accès à une estimation de la capacité d'un ligand à stabiliser un motif d'acides nucléiques.

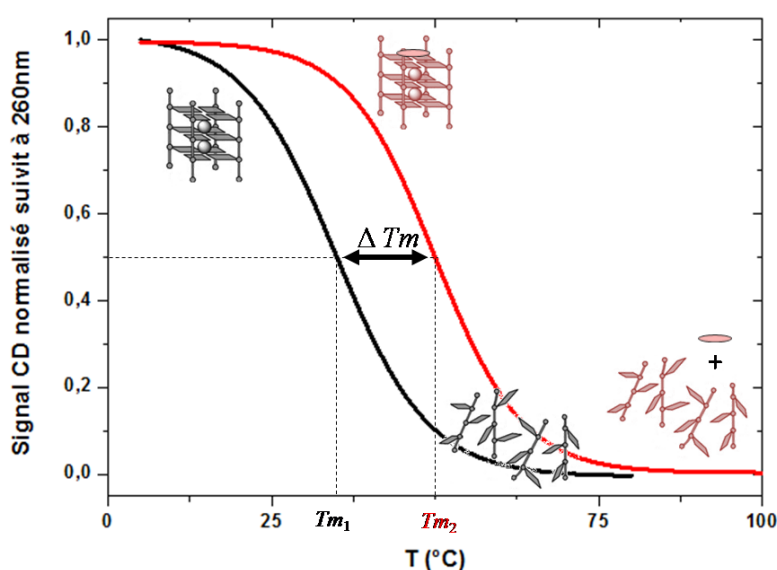


Figure 88 – Représentation schématique d'une expérience de dénaturation thermique suivie par CD. La courbe noire est obtenue en l'absence de ligand et la courbe rouge est obtenue en présence d'un ligand.

Une limitation de la détermination de T_m par les méthodes spectroscopiques usuelles est la faible variation d'intensité du signal observée qui peut conduire à des courbes peu précises.

219. Demeunynck, M.; Bailly, C.; Wilson, W. D., *DNA and RNA Binders*. Wiley-VCH: 2003.

220. Rachwal, P. A.; Fox, K. R., Quadruplex melting, *Methods* **2007**, 43 (4), 291-301.

Pour pallier à ce problème, l'équipe de J.-L. Mergny a développé un test utilisant la variation de la fluorescence d'oligonucléotides marqués basé sur le phénomène de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).²²¹ Des oligonucléotides capables d'adopter une conformation de type quadruplexe intramoléculaire sont marqués en 3' et 5' par un fluorophore et un « quencher » (généralement 5'-fluorescéine et 3'-tetraméthylrhodamine). Lorsque le quadruplexe est formé le fluorophore et le « quencher » sont proches dans l'espace et on obtient une extinction de fluorescence. Lors de la dénaturation de l'oligonucléotide les deux partenaires s'éloignent et la fluorescence est rétablie (Figure 89). La mesure de la température de transition en l'absence ou en présence d'un ligand permet comme par UV ou CD la détermination de sa capacité à se lier à sa cible. La sélectivité duplexe vs quadruplexe peut être estimée en répétant cette expérience en plaçant en présence dans le milieu un duplexe qui joue le rôle de compétiteur pour la fixation du ligand. Les caractéristiques de très nombreux ligands ont été étudiées de cette façon.²²² Cette méthode permet de travailler avec une plus faible quantité d'oligonucléotide (car l'émission de fluorescence est facilement observable) et permet l'automatisation des mesures *via* l'utilisation de lecteurs de plaques multipuits.

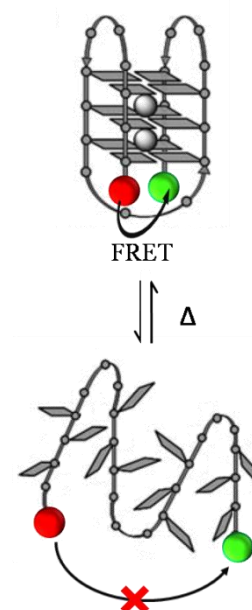


Figure 89 – Représentation schématique d'une expérience de dénaturation suivit par fluorescence.

Ces dernières années l'apparition de nombreux nouveaux ligands a montré la nécessité de développer des tests rapides et automatisables qui permettent de comparer leurs propriétés. L'équipe de M.-P. Teulade-Fichou propose alors un test basé sur la mesure de perte de fluorescence induite par le déplacement du Thiazole Orange (TO) intercalé dans un acide nucléique par le ligand étudié. Ce test, G4-FID (G-quadruplex fluorescent intercalator displacement), a été largement optimisé pour le criblage et l'étude de nouveaux ligands potentiels.²²³ Le TO est une sonde des acides nucléiques particulièrement intéressante parce que son rendement quantique est très faible lorsqu'il est libre en solution et il est multiplié par un facteur 1000 lorsqu'il est lié à l'ADN. Il ne montre pas de sélectivité particulière pour les diverses structures de l'ADN et présente une affinité de l'ordre du micromolaire. Lorsqu'un ligand de meilleure

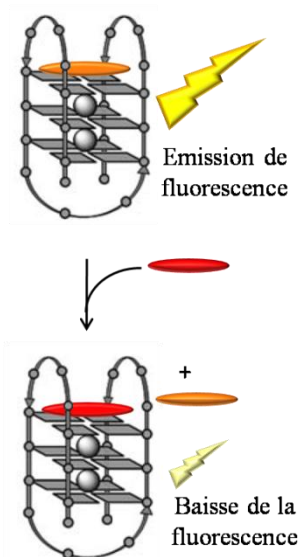


Figure 90 – Représentation schématique du test G4-FID.

221. Mergny, J. L.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M. P.; Hounsou, C.; Guittat, L.; Hoarau, M.; Arimondo, P. B.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M.; Riou, J. F.; Garestier, T.; Helene, C., Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98* (6), 3062-7.

222. De Cian, A.; Guittat, L.; Kaiser, M.; Sacca, B.; Amrane, S.; Bourdoncle, A.; Alberti, P.; Teulade-Fichou, M. P.; Lacroix, L.; Mergny, J. L., Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands. *Methods* **2007**, *42* (2), 183-195.

223. Monchaud, D.; Allain, C.; Bertrand, H.; Smargiasso, N.; Rosu, F.; Gabelica, V.; De Cian, A.; Mergny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P., Ligands playing musical chairs with G-quadruplex DNA: a rapid and simple displacement assay for identifying selective G-quadruplex binders. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1207-23.

affinité est en présence d'un complexe TO / ADN, le ligand va déplacer le TO en solution et il va en résulter une baisse de la fluorescence (Figure 90). Ce test répété sur différents types d'acides nucléiques et différentes conformations permet la détermination des différentes constantes d'affinité et la sélectivité du ligand pour chacun des systèmes. Cette méthode a été appliquée avec succès ces dernières années pour l'étude de nombreux ligands dont le mode principal d'interaction est l'intercalation ou l'empilement.

Le dichroïsme circulaire, habituellement utilisé pour déterminer la conformation de l'acide nucléique étudié peut s'avérer utile pour l'étude des interactions entre G4 et ligands.²²⁴ En effet, le spectre CD de l'ADN quadruplexe dosé peut évoluer au cours du dosage et cette évolution peut être caractéristique des propriétés du ligand étudié. Récemment plusieurs équipes ont publié des molécules capables de conduire à de telle transition. L'équipe de S. Bhattacharya propose une nouvelle classe de ligand basé sur un noyau 1,3-phenylène-bis(piperazinyl benzimidazole) et étudie leur interaction avec un quadruplexe issu de la séquence télomérique de *Tetrahymena thermophila* d(T₂G₄)₄.¹⁸⁸ Les auteurs décident de doser le quadruplexe dans un tampon contenant du Li⁺, qui est connu pour former un quadruplexe sans le stabiliser. Le spectre CD initial présente un maximum à 260 nm et un autre à 295 nm ce qui est caractéristique d'un quadruplexe hybride (3 brins sont parallèles et le dernier est antiparallèle). L'addition du ligand EtBzMe change radicalement l'allure du spectre (Figure 91): on observe la diminution puis la disparition des pics initiaux à la faveur de l'apparition d'un nouveau maximum à 266 nm et d'un minimum à 240 nm (caractéristique d'une structure parallèle). Au-delà de 10 équivalents d'ajout le pic à 266 nm commence à diminuer et celui à 400 nm à augmenter. Mais plus intéressant un nouveau pic à 325 nm apparaît. Ce nouveau pic correspond à un signal induit par la fixation du ligand EtBzMe dans les sillons du quadruplexe. Ainsi un simple dosage CD montre que le ligand étudié est capable jusqu'à un ratio de 1 : 10 d'opérer un changement de conformation du quadruplexe dosé (passage d'une structure antiparallèle à une structure parallèle) puis pour un ratio supérieur à se lier dans le sillon du quadruplexe et à modifier totalement la conformation initiale.

224. Paramasivan, S.; Rujan, I.; Bolton, P. H., Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods* **2007**, *43* (4), 324-31.

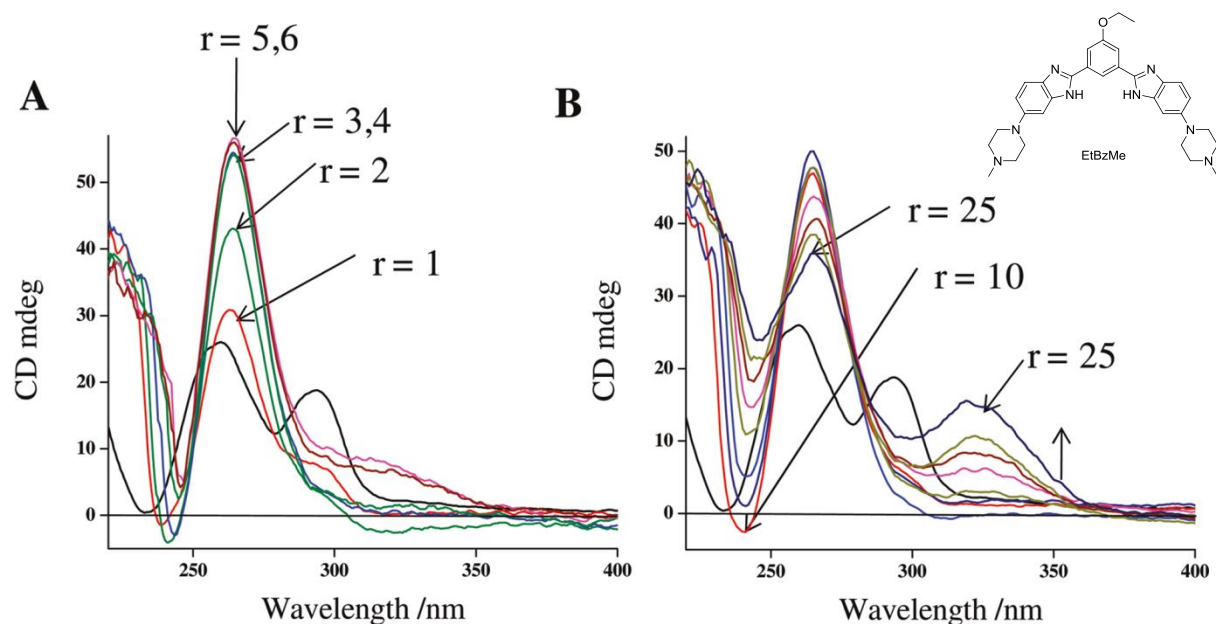


Figure 91 – Titration CD du quadruplexe d(T₂G₄)₄ dans un tampon 10mM cacodylate de sodium avec 100mM LiCl et 0.1 mM EDTA par EtBzMe. Titration de 1 à 6 équivalents (A) et de 10 à 25 équivalents (B).

Une étude CD peut ainsi montrer rapidement et simplement lorsqu'un ligand se lie dans le sillon de l'acide nucléique étudié (apparition d'un signal induit à la longueur d'onde d'adsorption du ligand). Des dérivés d'amide de diaryléthynyl, en sont un bon exemple et montrent la capacité de se lier dans le sillon du quadruplexe formé par la séquence *c-kit2*.²⁰²

b) Dialyse par compétition

La dialyse par compétition est une méthode introduite par W. Muller et D. M. Crothers en 1975.²²⁵ Cette méthode a été utilisée pour étudier la préférence d'un ligand pour reconnaître une paire de bases GC ou AT. Adaptée à l'étude des interactions ligands / quadruplexe par J. B. Chaires, elle semble très efficace pour déterminer la conformation de l'ADN (duplexe, triplex ou quadruplexe) optimale reconnue par un type de ligand.²²⁶ Cette technique consiste à placer différents récepteurs (*i.e.* différentes conformations d'ADN) dans des boudins de dialyse (dont la porosité est adaptée pour laisser diffuser les ligands tout en retenant les ODNs), tous les boudins sont placés dans le même récipient qui contient une solution du ligand à étudier (Figure 92). Lorsque l'équilibre est atteint, la concentration du ligand dans chaque boudin est mesurée. Une sélectivité peut alors être rapidement déterminée. La méthode est rapide et peut-être effectuée dans un dispositif contenant jusqu'à 96 chambre de dialyse. Une constante d'affinité apparente peut être également déterminée.

225. Muller, W.; Crothers, D. M., Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 1. The influence of heteroatoms and polarizability on the base specificity of intercalating ligands. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *54* (1), 267-77.

226. Ragazzon, P.; Chaires, J. B., Use of competition dialysis in the discovery of G-quadruplex selective ligands. *Methods* **2007**, *43* (4), 313-23.

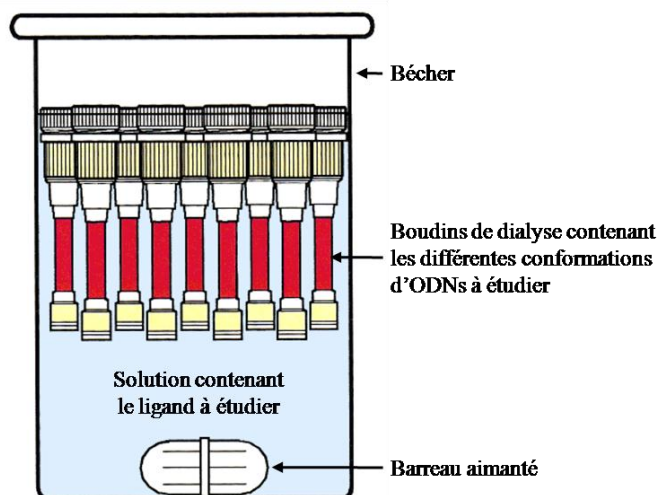


Figure 92 – Schéma représentant le dispositif expérimental de la dialyse par compétition : les boudins de dialyse contenant les différentes cibles (différentes conformations d'ODNs) sont immergés dans une solution contenant le ligand à étudier. Figure extraite de la réf 227.

c) Cristallographie aux rayons X (RX)

La cristallographie aux rayons X permet l'accès à des déterminations structurales au niveau atomique.²²⁸ L'acquisition se fait à l'état solide (c'est-à-dire en utilisant un cristal du composé en interaction avec un motif quadruplexe) et traduit donc l'état de la matière dans un état extrêmement condensé. Les premières structures de ligands cocrystallisés avec de l'ADN quadruplexe ont permis de comprendre les bases de la reconnaissance moléculaire entre ligand et quadruplexe. En 2003, la structure du complexe formé par le quadruplexe bimoléculaire antiparallèle issu de la séquence télomérique d'*Oxytrichia nova* d(GGGGTTTTGGGG) et un dérivé d'acridine BSU6039 (3,6-bis-[3-pyrrolidino-propionamide] acridine) a été décrit.²²⁹ La structure révèle que le dérivé d'acridine s'empile sur une tétrade extérieure du quadruplexe et est stabilisé par la présence d'un résidu thymine des boucles. La formation du complexe est possible grâce à une combinaison d'interactions d'empilement et de liaisons hydrogène spécifiques avec les bases des boucles. En 2007, S. Neidle détermine une structure du complexe formé par un quadruplexe bimoléculaire issu de la séquence télomérique humaine d(TAGGGTTAGGG) et une porphyrine TMPyP4 qui montre un mode d'interaction inhabituel.²³⁰ La porphyrine se lie par deux types d'interactions de type empilement mais il n'y a aucune interaction entre la porphyrine et les tétrades de guanines. Le ligand s'empile sur des paires de base formées au niveau des boucles latérales (Figure 93). Les auteurs proposent alors que ce mode d'interactions soit responsable de la non-sélectivité de TMPyP4 pour les structures de types quadruplexes.

227. Ren, J.; Chaires, J. B., Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *Biochemistry* **1999**, *38* (49), 16067-75.

228. Neidle, S.; Parkinson, G. N., Quadruplex DNA crystal structures and drug design. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1184-96.

229. Haider, S. M.; Parkinson, G. N.; Neidle, S., Structure of a G-quadruplex-ligand complex. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326* (1), 117-25.

230. Parkinson, G. N.; Ghosh, R.; Neidle, S., Structural basis for binding of porphyrin to human telomeres. *Biochemistry* **2007**, *46* (9), 2390-7.

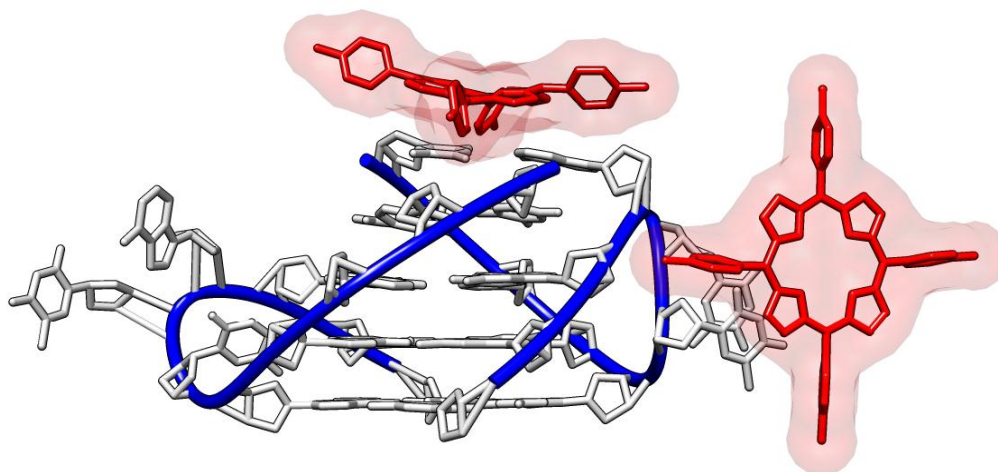


Figure 93 – Structure cristallographique du complexe TMPyP4 / d[TAGGGTTAGGG]₂. Code PDB : 2HRI.

La cristallographie se révèle être un outil particulièrement utile pour déterminer et visualiser les liaisons hydrogène mises en jeu dans les interactions : la structure cristalline du complexe BRACO-19 / d[TAGGGTTAGGG]₂ montre que les chaînes latérales de l'acridine établissent des liaisons hydrogène avec les boucles du quadruplexe (Figure 73).¹⁵¹ Une étude de l'interaction entre d'autres dérivés d'acridine et un autre motif quadruplexe d[GGGGTTTTGGGG]₂ montre que la topologie des boucles du quadruplexe a une influence significative sur la sélectivité d'un ligand pour une conformation particulière de G₄. La cristallographie peut ainsi servir pour le développement rationnel de chaîne utilisée pour la substitution de noyaux aromatiques afin de créer des ligands sélectifs.²³¹ Les RX ont également été utilisés pour étudier les différences d'interactions entre ligands et quadruplexes d'ADN ou ARN.²³² La présence de groupement –OH en 2' modifie alors l'interaction en empêchant certaines liaisons hydrogène de se former. Cette étude permet alors de montrer qu'il est possible de synthétiser des molécules capables de discriminer quadruplexes d'ADN et quadruplexes d'ARN. Néanmoins ce type d'étude s'avère généralement long à mettre en place (il faut en premier lieu trouver les conditions adéquates pour cristalliser le complexe) et les structures obtenues ne reflètent que l'arrangement des différents partenaires à l'état solide.

d) Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La RMN est un outil essentiel pour l'étude des acides nucléiques. Elle permet la détermination structurale à un niveau atomique de structures complexes. L'acquisition est effectuée en solution et permet donc l'étude dynamique de l'interaction entre deux partenaires. Cependant une détermination structurale complète nécessite un travail long et rigoureux qui passe par l'étude de chaque interaction qu'elle soit inter- ou intramoléculaire. Par exemple pour déterminer la conformation exacte d'un ADN quadruplexe, il faut

231. Campbell, N. H.; Patel, M.; Tofa, A. B.; Ghosh, R.; Parkinson, G. N.; Neidle, S., Selectivity in Ligand Recognition of G-Quadruplex Loops. *Biochemistry* **2009**, *48*, 1675-1680.

232. Collie, G.; Reszka, A. P.; Haider, S. M.; Gabelica, V.; Parkinson, G. N.; Neidle, S., Selectivity in small molecule binding to human telomeric RNA and DNA quadruplexes. *Chem. Commun.* **2009**, (48), 7482-4.

déterminer précisément les angles de torsions glycosidiques. Néanmoins il s'agit de la technique de détermination structurale la plus complète et elle est appliquée avec succès à l'étude des interactions ligands / G₄.²³³ Le principal but d'une étude RMN est de déterminer les corrélations entre les signaux attribuables aux ligands et ceux attribuables à l'acide nucléique afin de déterminer les zones de contact, pour cela des études NOESY sont incontournables. La première détermination structurale d'un complexe ligand / quadruplexe apparaît en 1998. L'équipe de L. H. Hurley propose la structure du complexe PIPER / [dTTAGGT]₄.²³⁴ La structure est basée sur une modélisation moléculaire utilisant des contraintes RMN NOESY. Le complexe se présente sous la forme d'un dimère de quadruplexes tétramoléculaires de type quadruplexe / PIPER / quadruplexe. Le spectre RMN du quadruplexe semble identique à celui obtenue sans le PIPER exceptés les protons imino de la tétrade supérieure dont le signal est perturbé. Une structure proposée par l'équipe de M. S. Searle montre l'intercalation du ligand RHSP4 dans ce même quadruplexe.²³⁵ Le ligand s'intercale dans la structure tétramérique pour s'empiler sur les deux tétrades extérieures. L'équipe de J. Schaefer propose la structure du complexe d'un dérivé de quinobenzoxazine QQ58 / [dTAGGsGTTA]₄ (comprenant un lien phosphorothioate).²³⁶ L'utilisation d'une thymine radio-marquée au C₁₃ permet une détermination plus précise. En 2005, l'équipe de D. J. Patel s'intéresse au complexe formé par la porphyrine TMPyP4 / quadruplexe *c-myc*.²³⁷ La structure élucidée montre que la porphyrine s'intercale et s'empile sur une des tétrades (Figure 94). La structure obtenue montre donc un comportement totalement différent à celui montré par S. Neidle par RX.²³⁰ Néanmoins cette structure est la première montrant les caractéristiques d'une interaction avec le quadruplexe *c-myc*. Une structure similaire est également proposée pour l'interaction TMPyP4 / [dTTAGGG]₄.²³⁸

233. Webba da Silva, M., NMR methods for studying quadruplex nucleic acids. *Methods* **2007**, *43* (4), 264-77.

234. Fedoroff, O. Y.; Salazar, M.; Han, H.; Chemeris, V. V.; Kerwin, S. M.; Hurley, L. H., NMR-Based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA. *Biochemistry* **1998**, *37* (36), 12367-74.

235. Gavathiotis, E.; Heald, R. A.; Stevens, M. F. G.; Searle, M. S., Recognition and stabilization of quadruplex DNA by a potent new telomerase inhibitor: NMR studies of the 2 : 1 complex of a pentacyclic methylacridinium cation with d(TTAGGGT)(4). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40* (24), 4749-4751.

236. Mehta, A. K.; Shayo, Y.; Vankayalapati, H.; Hurley, L. H.; Schaefer, J., Structure of a quinobenzoxazine-g-quadruplex complex by REDOR NMR. *Biochemistry* **2004**, *43* (38), 11953-11958.

237. Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Gaw, H. Y.; Patel, D. J., Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human MYC promoter. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1* (3), 167-73.

238. Mita, H.; Ohyama, T.; Tanaka, Y.; Yamamoto, Y., Formation of a complex of 5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)-21H,23H-porphyrin with G-quadruplex DNA. *Biochemistry* **2006**, *45* (22), 6765-72.

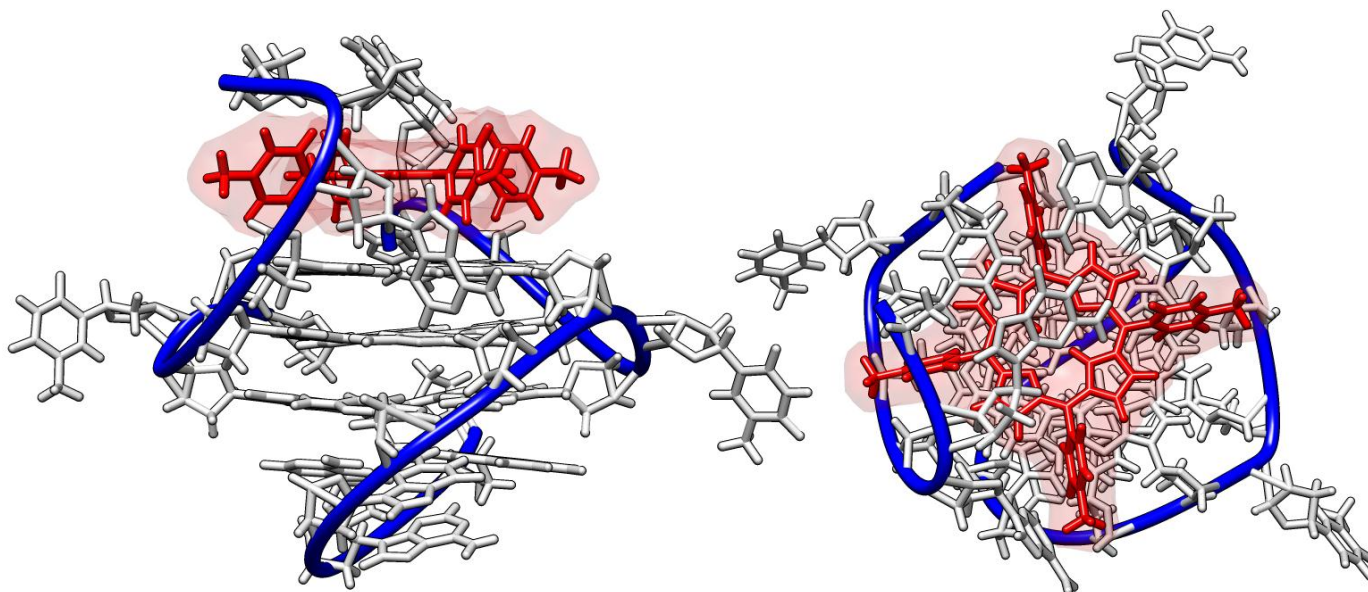


Figure 94 – Structure RMN du complexe TMPyP4 / quadruplexe *cmyc*. Vue de face et vue de dessus. Code PDB : 2A5R

L'équipe de M.-P. Teulade-Fichou confirme la tendance qu'ont les ligands contenant un noyau aromatique à s'empiler sur une tétrade externe d'un motif quadruplexe en proposant la structure du complexe formée par un dérivé de quinacridines MMQ1 et le tétramère [dTTAGGGT]₄.²³⁹ L'équipe d'A. Randazzo montre l'utilité de la RMN dans la compréhension des phénomènes d'interactions en déterminant la structure du complexe distamycine A / [dTTAGGGT]₄.¹⁸² En effet plusieurs études précédentes ont présenté la distamycine A s'empilant sur une tétrade, la RMN montre alors que le complexe obtenu est formé par deux distamycines se liant dans le sillon du quadruplexe. Finalement la même équipe prouve l'utilité de la RMN couplée à un criblage virtuel pour trouver de nouveaux ligands du sillon de l'ADN.²⁴⁰

e) Spectroscopie de masse (ESI-MS)

La spectroscopie de masse de type ESI (Electrospray ionisation) est devenue une technique couramment utilisée pour l'étude de complexes non covalents. C'est pourquoi certaines équipes s'intéressent à l'étude des complexes ligands / quadruplexe par ESI-MS. L'étude se fait en phase gazeuse, mais il est couramment accepté que les résultats qualitatifs obtenus décrivent les interactions en solution.²⁴¹ Les expériences nécessitent peu de produit et permettent l'analyse de mélanges complexes. Néanmoins la difficulté réside à relier l'intensité du signal obtenu en MS et la concentration des solutés injectés. Des modèles ont été

239. Hounsou, C.; Guittat, L.; Monchaud, D.; Jourdan, M.; Saettel, N.; Mergny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P., G-quadruplex recognition by quinacridines: a SAR, NMR, and biological study. *ChemMedChem* **2007**, 2 (5), 655-666.

240. Cosconati, S.; Marinelli, L.; Trotta, R.; Virno, A.; Mayol, L.; Novellino, E.; Olson, A. J.; Randazzo, A., Tandem Application of Virtual Screening and NMR Experiments in the Discovery of Brand New DNA Quadruplex Groove Binders. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (45), 16336-+.

241. Rosu, F.; De Pauw, E.; Gabelica, V., Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions. *Biochimie* **2008**, 90 (7), 1074-87.

développés pour obtenir des constantes précises.²⁴² Ainsi des études récentes ont montré l'efficacité de la spectroscopie de masse pour l'obtention de constante d'affinité et la stœchiométrie des complexes obtenus. L'équipe de M. Franceschin utilise la spectroscopie de masse pour l'étude de ligands de type triazatruxene.²⁴³ L'étude par ESI-MS des complexes formés par le ligand Azatrux et un quadruplexe formé par un extrait de la séquence télomérique humaine permet de déterminer la stœchiométrie des complexes accessibles ainsi que les constantes d'affinité (Figure 95). V. Gabelica montre également l'intérêt de ces méthodes pour l'étude des interactions de dérivés d'acridine (BRACO19) et de dérivés de naphthalène avec de l'ADN et de l'ARN quadruplexe.²³²

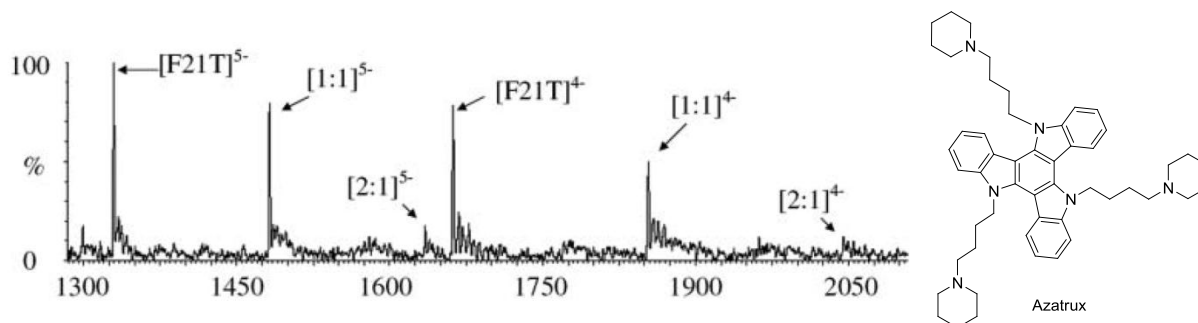


Figure 95 – Spectre de masse du quadruplexe formé par la séquence F21T d(GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG) en présence d'Azatrux dans un ratio 1 : 1. Les flèches indiquent les pics correspondants à l'ODN seul et aux complexes Azatrux / G4 pour un ratio 1 : 1 et 2 : 1. La structure de l'Azatrux est précisée également. La figure est extraite de la réf 243.

f) Calorimétrie de titration isotherme (ITC)

La calorimétrie de titration isotherme (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) est une technique bien établie pour l'étude des interactions biologiques en solution. Le grand avantage d'une telle technique est la possibilité de la mesure en direct de la variation d'enthalpie et d'entropie dû à l'interaction étudiée et la détermination de la stœchiométrie de l'interaction. Les paramètres thermodynamiques donnent accès à la constante d'équilibre. L'ITC a été très utilisée pour l'étude des ligands de l'ADN duplexe.²⁴⁴ L'équipe de Concetta Giancola utilise l'ITC pour la mesure des paramètres thermodynamiques des interactions ligands / G₄. Les interactions de la distamycine A et de quelques dérivés ont été étudiées grâce à cette technique.¹⁷⁹ Cette étude montre que la nature des cations présents en solution affecte la stœchiométrie et les paramètres thermodynamiques des interactions. Par exemple lors de la titration du quadruplexe d[TGGGGT]₄ par la distamycine A, la stœchiométrie du complexe obtenue est de 4 : 1 en présence de K⁺ alors qu'elle est de 2 : 1 en présence de Na⁺. De plus l'interaction présente une grande composante entropique en présence de K⁺ et une plus petite en présence de Na⁺. La même équipe a récemment étudié les interactions entre la porphyrine TMPyP4 et plusieurs séquences issues de la séquence télomérique humaine diluée

242. Gabelica, V.; Rosu, F.; De Pauw, E., A simple method to determine electrospray response factors of noncovalent complexes. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (16), 6708-15.

243. Ginnari-Satriani, L.; Casagrande, V.; Bianco, A.; Ortaggi, G.; Franceschin, M., A hydrophilic three side-chained triazatruxene as a new strong and selective G-quadruplex ligand. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (12), 2513-6.

244. Buurma, N. J.; Haq, I., Advances in the analysis of isothermal titration calorimetry data for ligand-DNA interactions. *Methods* **2007**, *42* (2), 162-72.

en solution ou en condition condensée (40% PEG 200).²⁴⁵ Les résultats des études ITC montrent que le processus d'interaction, dans les deux conditions, résulte dans la formation d'un complexe en deux étapes avec une stœchiométrie finale de quatre molécules de TMPyP4 pour un quadruplexe. De plus TMPyP4 montre une meilleure constante d'affinité pour les quadruplexes placés en condition condensée.

g) Résonance plasmonique de surface (SPR)

La résonance plasmonique de surface est devenue ces dernières années une méthode très populaire pour l'étude cinétique et thermodynamique des interactions intermoléculaires.²⁴⁶ Cette technique a été utilisée pour étudier les interactions ligands / ADN quadruplexe.²⁴⁷ Introduit par H. Raether et K. Welford dans les années 1970, le principe physique de la SPR est basé sur les propriétés particulières de l'interaction entre une lumière polarisée et une surface constituée d'une couche de verre recouverte d'une fine couche métallique.²⁴⁸ La SPR est une technique optique qui utilise le phénomène d'onde évanescente pour mesurer la variation de l'indice de réfraction d'un milieu donné à proximité de la surface métallique d'étude. Des films d'aluminium, d'argent ou d'or d'une épaisseur variant de 2.5 à quelques dizaines de nm peuvent être utilisés.

Le phénomène de résonance plasmonique de surface s'observe quand une lumière polarisée, sous des conditions de réflexions internes totales, frappe une couche de métal électriquement conductrice à l'interface entre deux milieux d'indice de réfraction différents. Le dispositif expérimental utilisé pour la technologie BIAcore[®] (Figure 96) utilise une interface verre (surface du capteur – indice de réfraction élevé) et liquide (solution contenant les objets d'études – indice de réfraction bas). Lorsque le faisceau lumineux arrive à cette interface, une partie de la lumière incidente est réfléchi et une autre partie est réfractée à travers la surface. Dans les conditions de réflexion totale, une composante électromagnétique de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. La zone ainsi balayée est appelée champ évanescent. L'onde évanescente entre en résonance avec les électrons délocalisés de la couche électronique périphérique de l'or (plasmon), phénomène qui se traduit par une chute d'intensité du rayon réfléchi. L'angle auquel l'intensité est minimale est appelé angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent. L'échantillon n'étant pas soumis à la lumière directement, les analyses peuvent être donc réalisées sur des échantillons opaques, colorés ou turbides.

245. Martino, L.; Pagano, B.; Fotticchia, I.; Neidle, S.; Giancola, C., Shedding light on the interaction between TMPyP4 and human telomeric quadruplexes. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, *113* (44), 14779-86.

246. Rich, R. L.; Myszka, D. G., Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008: 'The Mighty Binders'. *J. Mol. Recognit.* **2010**, *23* (1), 1-64.

247. Redman, J. E., Surface plasmon resonance for probing quadruplex folding and interactions with proteins and small molecules. *Methods* **2007**, *43* (4), 302-12.

248. Pockrand, I.; Raether, H., Surface plasma oscillations at sinusoidal silver surfaces. *Appl. Opt.* **1977**, *16* (7), 1784-6.

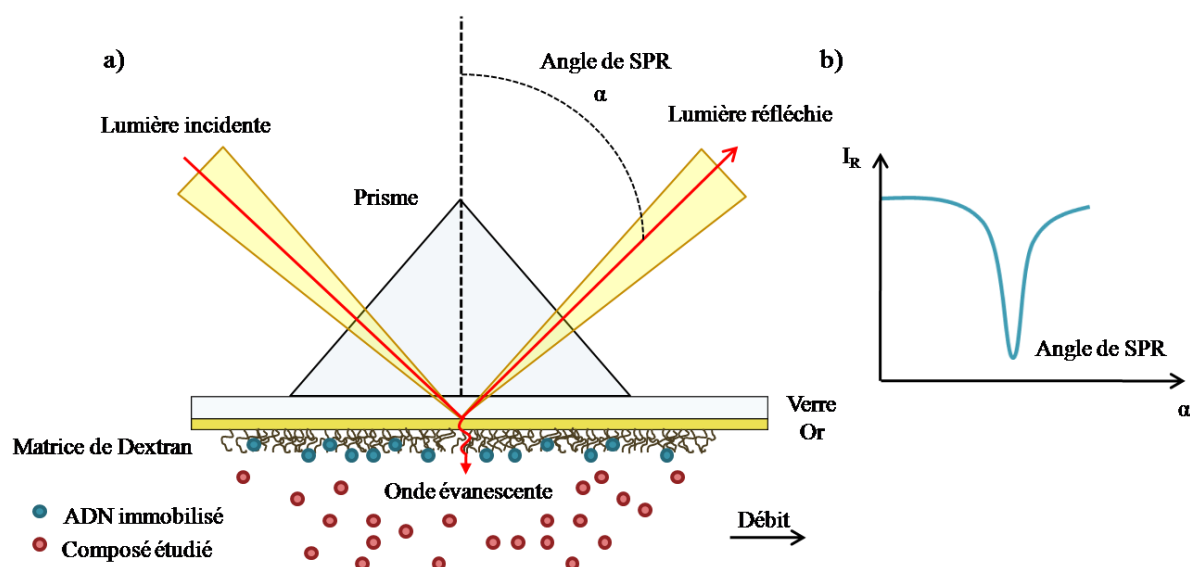


Figure 96 – a) Dispositif expérimental utilisé par la technologie Biacore®, b) variation de l'intensité de la lumière réfléchi en fonction de l'angle de SPR α .

Pour les études d'interactions, un des partenaires (le ligand) est immobilisé sur la surface et le second partenaire (l'analyte) est dilué en solution et injecté sur la surface fonctionnalisée. Les changements de masse et les variations d'indice de réfraction induits par l'association ou la dissociation des complexes formés par les deux partenaires modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance. Le suivi de la valeur de cet angle permet ainsi d'enregistrer en temps réel la fixation des molécules injectées sur la surface.

L'angle est communément exprimé en termes d'unité arbitraire de résonance RU (Resonance Units), pour lequel une variation d'angle de résonance de 0.1° est égale à 1000RU. La représentation graphique de la variation de RU en fonction du temps est appelée un sensorgramme. Les études d'interactions sont effectuées en flux continu selon la technologie BIAcore®. L'ensemble de l'étude s'effectue généralement dans un seul tampon de travail, noté WB (Working buffer), afin d'éviter la présence de fort saut de signal (effet tampon) dû aux changements de milieu. L'étude cinétique comporte quatre étapes (Figure 97) : une étape de stabilisation du signal, une étape d'association où le ligand à étudier est injecté sur la surface, une étape où l'équilibre thermodynamique est atteint et une dernière étape de dissociation du ligand. Afin de pouvoir effectuer plusieurs cycles d'association/dissociation successifs à des concentrations de ligands croissantes, une étape de régénération est souvent nécessaire pour récupérer à la fin d'un cycle la surface dans son état initial.

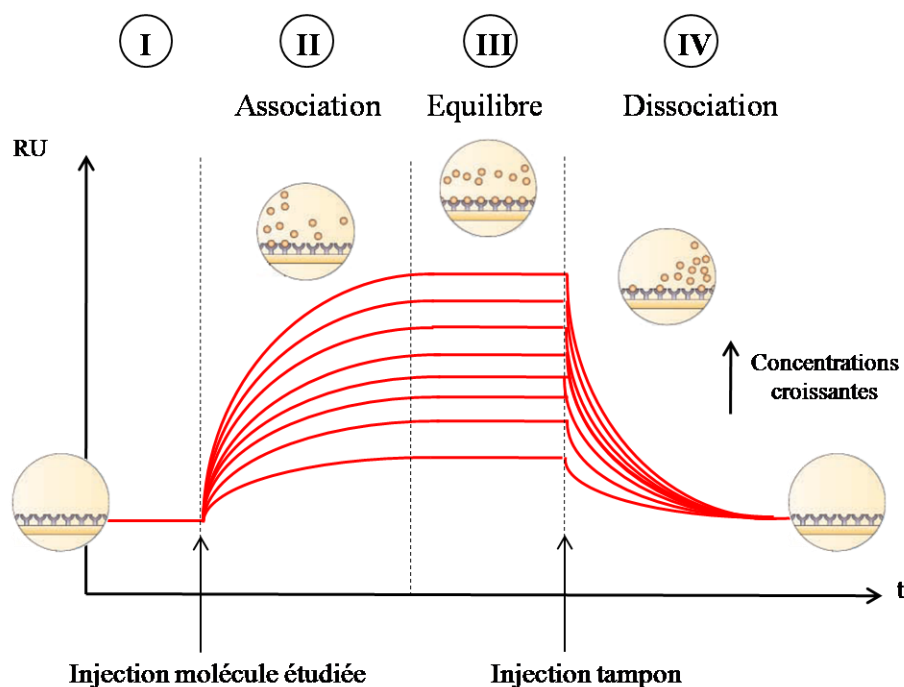


Figure 97 – Sensorgrammes type obtenues lors de l'étude de l'interaction entre deux partenaires. I) phase d'équilibration, II) étape d'association, III) équilibre thermodynamique et IV) phase de dissociation et/ou de régénération.

Les sensorgrammes peuvent être interprétés selon deux approches, une approche cinétique et une approche thermodynamique. Si l'on considère les cinétiques d'interactions, les phases d'association et de dissociation peuvent être modélisées en utilisant des modèles mathématiques adéquats. Ce traitement permet l'accès aux constantes cinétiques d'association et de dissociation, notées respectivement k_a et k_d et exprimées en $M^{-1}.s^{-1}$ pour k_a et s^{-1} pour k_d (cf. eq 4). La connaissance de ces paramètres permet l'obtention de la constante d'association K_a et de dissociation K_d selon l'équation :

$$K_a = \frac{k_a}{k_d} = \frac{1}{K_d} \quad \text{eq(4)}$$

Si l'on étudie les états à l'équilibre (traitement thermodynamique), on s'intéressera à la variation de la valeur de RU obtenue à l'état d'équilibre RU_{eq} en fonction de la concentration du ligand injecté. La valeur de RU_{eq} atteint un maximum RU_{max} lorsque tous les récepteurs de la surface sont saturés. La valeur théorique peut être obtenue selon l'équation :

$$RU_{max} = RU_L \cdot \frac{MW_A}{MW_L} \cdot \frac{(\partial n / \partial C)_A}{(\partial n / \partial C)_L} \quad \text{eq(5)}$$

où RU_L est la quantité de ligand immobilisé exprimée en RU, MW_A et MW_L la masse molaire de l'analyte et du ligand respectivement, $(\partial n / \partial C)_A$ et $(\partial n / \partial C)_L$ la variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration de l'analyte et du ligand respectivement. Les constantes d'affinité sont obtenues par la modélisation mathématique de la variation de RU_{eq} en fonction de la concentration. Le choix du modèle à utiliser sera décrit par la suite (voir Article 2).

Ces dernières années les affinités de nombreux ligands ont été évaluées grâce à la SPR. La séquence de l'ADN quadruplexe à immobiliser dépend bien entendu du but de l'étude et la bibliographie donne beaucoup d'exemples de séquences étudiées. Il s'agit uniquement de séquences formant des quadruplexes de type intramoléculaire dû à la limitation évidente qui est la dissociation de quadruplexes intermoléculaires lors de la régénération de la surface. Il existe de nombreux moyens d'accrocher un oligonucléotide sur une surface (lien amide, pont disulfure, lien thioéther, ...), mais les études réalisées utilisent exclusivement un accrochage *via* un résidu biotine fixé en 5' d'un oligonucléotide reconnu par de la streptavidin immobilisée sur la surface. Parmi les séquences utilisées on peut citer l'étude de l'interaction de la séquence 5'-biotine-d(AG₃(TTAGGG)₃) issue de la séquence télomérique humaine avec des dérivés de porphyrines²⁴⁹, d'acridines^{149,250}, de pyridocarbazoles,²⁵¹ de phénylcarbazoles²⁵², de quinacrines¹⁵⁵, avec la télomestatine²⁵³ et tout type de ligands cationiques²⁵⁴. Mais aussi d'autres séquences issues de la séquence télomérique humaine comme 5'-biotine-d(GTTA(GGGTTA)₄GG)²⁵⁵, 5'-biotine-d(GGTTA(GGGTTA)₄G)²⁵⁶ ou 5'-biotine-d(G₃(TTAGGG)₃)²⁵⁷. D'autres types de quadruplexes ont également été étudiés comme la séquence 5'-biotine-d(ATGCATGCGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGGTGGGG)¹⁸⁵ et 5'-biotine-

249. Dixon, I. M.; Lopez, F.; Esteve, J. P.; Tejera, A. M.; Blasco, M. A.; Pratviel, G.; Meunier, B., Porphyrin derivatives for telomere binding and telomerase inhibition. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2005**, *6* (1), 123-32.

149. Harrison, R. J.; Cuesta, J.; Chessari, G.; Read, M. A.; Basra, S. K.; Reszka, A. P.; Morrell, J.; Gowan, S. M.; Incles, C. M.; Tanius, F. A.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S., Trisubstituted acridine derivatives as potent and selective telomerase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (21), 4463-76; 250. (a) Read, M.; Harrison, R. J.; Romagnoli, B.; Tanius, F. A.; Gowan, S. H.; Reszka, A. P.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S., Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98* (9), 4844-9; (b) Moore, M. J.; Schultes, C. M.; Cuesta, J.; Cuenca, F.; Gunaratnam, M.; Tanius, F. A.; Wilson, W. D.; Neidle, S., Trisubstituted acridines as G-quadruplex telomere targeting agents. Effects of extensions of the 3,6- and 9-side chains on quadruplex binding, telomerase activity, and cell proliferation. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (2), 582-99.

251. Carrasco, C.; Rosu, F.; Gabelica, V.; Houssier, C.; De Pauw, E.; Garbay-Jaureguiberry, C.; Roques, B.; Wilson, W. D.; Chaires, J. B.; Waring, M. J.; Bailly, C., Tight binding of the antitumor drug ditercalinium to quadruplex DNA. *ChemBioChem* **2002**, *3* (12), 1235-41.

252. Dias, N.; Jacquemard, U.; Baldeyrou, B.; Tardy, C.; Lansiaux, A.; Colson, P.; Tanius, F.; Wilson, W. D.; Routier, S.; Merour, J. Y.; Bailly, C., Targeting DNA with novel diphenylcarbazoles. *Biochemistry* **2004**, *43* (48), 15169-78.

253. Rezler, E. M.; Seenisamy, J.; Bashyam, S.; Kim, M. Y.; White, E.; Wilson, W. D.; Hurley, L. H., Telomestatin and diseleno sapphyrin bind selectively to two different forms of the human telomeric G-quadruplex structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (26), 9439-47.

254. White, E. W.; Tanius, F.; Ismail, M. A.; Reszka, A. P.; Neidle, S.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D., Structure-specific recognition of quadruplex DNA by organic cations: influence of shape, substituents and charge. *Biophys. Chem.* **2007**, *126* (1-3), 140-53.

255. (a) Goncalves, D. P.; Rodriguez, R.; Balasubramanian, S.; Sanders, J. K., Tetramethylpyridiniumporphyrazines--a new class of G-quadruplex inducing and stabilising ligands. *Chem. Commun.* **2006**, (45), 4685-7; (b) Goncalves, D. P.; Ladame, S.; Balasubramanian, S.; Sanders, J. K., Synthesis and G-quadruplex binding studies of new 4-N-methylpyridinium porphyrins. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (17), 3337-42.

256. Ladame, S.; Schouten, J. A.; Roldan, J.; Redman, J. E.; Neidle, S.; Balasubramanian, S., Exploring the recognition of quadruplex DNA by an engineered Cys2-His2 zinc finger protein. *Biochemistry* **2006**, *45* (5), 1393-9.

257. Wang, P.; Ren, L.; He, H.; Liang, F.; Zhou, X.; Tan, Z., A phenol quaternary ammonium porphyrin as a potent telomerase inhibitor by selective interaction with quadruplex DNA. *ChemBioChem* **2006**, *7* (8), 1155-9.

d(ACGTACGTGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGGAAGGTGGGG)²⁵⁸ de la région promotrice de l'oncogène *c-myc*, d(GGTTGGTGTGGTTGG) du TBA (Thrombin Binding Aptamer), d[TTGGGG]₄ de la séquence télomérique de *Tetrahymena* ou d((GGTTTT)₃GG) d'un quadruplexe de type panier (« basket ») (la méthode d'immobilisation des trois dernières séquences n'est pas explicitement décrite)¹⁵⁹.

h) Études des interactions d'un ligand-modèle : la TMPyP4.

La 5, 10, 15, 20-tétrakis-(1-méthyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphyrine, connu sous le nom de TMPyP4 (Figure 76), est une molécule qui est souvent prise comme modèle de ligand de quadruplexe malgré une mauvaise sélectivité. Néanmoins son mode d'interaction n'est pas encore totalement connu et l'utilisation de l'ensemble des techniques décrites précédemment apporte un grand nombre de renseignements. Ce paragraphe a pour but de montrer que l'utilisation de plusieurs techniques est souvent nécessaire pour déterminer précisément le mode d'interactions d'une molécule. Ce paragraphe sera aussi prétexte à l'introduction de techniques moins souvent utilisées, mais néanmoins capitales.

Deux études structurales complètes présentant les interactions de TMPyP4 avec un motif quadruplexe sont disponibles aujourd'hui. La première, effectuée par diffraction des rayons X par l'équipe de S. Neidle, montre que la porphyrine interagit avec les thymines du complexe d[TAGGGTTAGGG]₂ sans établir de contact avec les tétrades de guanines (Figure 93).²³⁰ La deuxième, effectuée par RMN par l'équipe de D. Patel, montre la porphyrine empilée sur la tétrade externe du quadruplexe *c-myc* (Figure 94).²³⁷ Bien que ces deux études ne soient pas effectuées avec les mêmes motifs quadruplexe, elles montrent deux types d'interactions différentes. Pour déterminer quelle est l'interaction la plus représentative du comportement de TMPyP4 en solution, des études complémentaires sont disponibles.

Une étude RMN, couplée à de la modélisation moléculaire, effectuée par l'équipe de Y. Yamamoto, montre que TMPyP4 est capable de s'empiler sur une tétrade externe du complexe tétramoléculaire d[TTAGGG]₄ (entre A et G).²⁵⁹ Les études RMN sont souvent couplées à de la modélisation moléculaire, ce qui évite une attribution complète des signaux RMN. La modélisation moléculaire dynamique peut, à elle seule, donner des résultats très intéressants. Très récemment l'équipe de Z.-S. Li s'est intéressée à la modélisation du complexe TMPyP4/d((GGGTTA)₃GGG) en présence de K⁺.²⁶⁰ Différents complexes ont été modélisés en positionnant une porphyrine qui s'empile sur chacune des tétrades, sur les thymines des boucles ou qui interagit dans les sillons. Les calculs d'énergies libres de ces différents modèles permettent de montrer que le mode d'interaction préféré de TMPyP4 est la reconnaissance d'une tétrade externe (avec une forte affinité et une bonne stabilité), puis le second mode de reconnaissance préféré est l'empilement sur les boucles externes (moins forte

258. Halder, K.; Chowdhury, S., Kinetic resolution of bimolecular hybridization versus intramolecular folding in nucleic acids by surface plasmon resonance: application to G-quadruplex/duplex competition in human *c-myc* promoter. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (14), 4466-74.

259. Mita, H.; Ohyama, T.; Tanaka, Y.; Yamamoto, Y., Formation of a Complex of 5,10,15,20-Tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)-21H,23H-porphyrin with G-Quadruplex DNA. *Biochemistry* **2006**, *45* (22), 6765-6773.

260. Li, M.-H.; Luo, Q.; Li, Z.-S., Molecular Dynamics Study on the Interactions of Porphyrin with Two Antiparallel Human Telomeric Quadruplexes. *J. Phys. Chem. B.* **2010**, *114*, 6216-6224.

affinité). La reconnaissance des sillons et l'intercalation entre deux tétrades sont les deux modes d'interactions les moins probables, car ils donnent accès à des structures très flexibles.

Des expériences de photoclivage sont proposées par l'équipe de L. Hurley.²⁶¹ Le complexe TMPyP4/d[GTGGGTGTGTGTGGGTG]₄ est irradié et, grâce aux propriétés photoactivables des porphyrines, les brins d'ODNs sont coupés. La position de coupure donne une indication sur le site de fixation de la porphyrine. Cette étude montre que le site d'interaction majoritaire de TMPyP4 se situe sur une tétrade externe du quadruplexe étudié. L'équipe de T. Majima propose l'utilisation d'ODNs modifiés par l'introduction de 2-aminopurine pour déterminer le site de fixation de TMPyP4 sur un quadruplexe d(AGGG(TTAGGG))₃.²⁶² Lorsque la porphyrine se trouve à proximité d'une 2-aminopurine l'émission de fluorescence intrinsèque de cette dernière est augmentée, cette propriété permet de positionner TMPyP4 dans le quadruplexe en modulant la position de la 2-aminopurine dans la structure. Cette étude montre que le site de fixation se trouve à proximité d'une tétrade externe encombrée par une boucle diagonale.

Finalement des études par spectroscopies optiques classiques permettent d'obtenir des renseignements importants. L'équipe de C. Li, montre en 2009, par des études de titrations par UV et fluorescence, que deux molécules de TMPyP4 se lient sur deux sites différents du quadruplexe formé par la séquence d(AGGG(TTAGGG))₃.²⁶³ La stoechiométrie est obtenue par la construction de graphes de Job et la différence de la nature des sites d'interactions est déduite de l'apparition de deux pics distincts sur le spectre de fluorescence de TMPyP4 en présence de l'ADN-quadruplexe. Les sites de fixation sont déterminés en mesurant la durée de temps de vie de l'état excité (time-resolved fluorescence spectroscopy) de TMPyP4 dans les complexes formés. En effet, le temps de vie peut-être directement corrélé avec l'environnement de la porphyrine. Les valeurs des temps de vie obtenues correspondent à des valeurs caractéristiques de phénomènes d'empilement sur une tétrade externe et de reconnaissance du sillon du quadruplexe. Les mêmes expériences sont alors réalisées dans un milieu encombré. En présence de PEG, une molécule de porphyrine est empilée entre deux motifs quadruplexes et une deuxième reconnaît le sillon d'un G₄.

Toutes ces études montrent que la reconnaissance des motifs quadruplexe par la TMPyP4 est complexe et nécessite de nombreuses techniques pour en déterminer le mode d'interaction principal. Les études structurales disponibles ne suffisent pas, à cause de certaines caractéristiques de ces techniques. La cristallographie aux rayons X étudie les interactions à l'état solide ce qui ne peut pas traduire les interactions en solution. Mais dans un milieu encombré (présence de PEG) on ne retrouve pas les mêmes résultats. La détermination structurale par RMN peut être limitée par le choix de la séquence d'étude. Par exemple, dans le cas des études sur de courts extraits nucléiques issus de la séquence télomérique humaine, un grand nombre de séquences ne sont pas adéquates, car elles forment

261. Han, H.; Langley, D. R.; Rangan, A.; Hurley, L. H., Selective Interactions of Cationic Porphyrins with G-Quadruplex Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8902-8913.

262. Kimura, T.; Kawai, K.; Fujitsuka, M.; Majima, T., Detection of the G-quadruplex-TMPyP4 complex by 2-aminopurine modified human telomeric DNA. *Chem. Commun.* **2006**, 401-402.

263. Wei, C.; Jia, G.; Zhou, J.; Han, G.; Li, C., Evidence for the binding mode of porphyrins to G-quadruplex DNA. *Phys Chem Chem Phys* **2009**, *11*, 4025-4032.

en solution un mélange de complexes ce qui rend l'interprétation des spectres trop ardue. Finalement, l'ensemble des études menées tend à prouver que la porphyrine reconnaît des quadruplexes issus de la séquence télomérique humaine selon deux modes d'interaction. La principale interaction (plus forte affinité) est la reconnaissance d'une tétrade externe du quadruplexe, la seconde interaction est la reconnaissance des boucles *via* l'empilement probable sur une thymine. Ces deux sites sont *a priori* indépendants.

II-2/ Mime d'ADN quadruplexe parallèle

II-2-1 Introduction

Nous avons pu voir que l'ADN G-quadruplexe intervient dans de nombreux phénomènes biologiques et que l'utilisation de molécules reconnaissant spécifiquement ce type de motif permet de moduler l'expression de ces phénomènes. L'inhibition de la télomérase par la stabilisation des motifs quadruplexe formés par les télomères semblent être une stratégie anticancéreuse prometteuse. De nombreuses molécules sont déjà disponibles, mais certaines limitations, comme la sélectivité, compromettent l'utilisation de ces molécules comme médicaments. Pour développer de meilleurs candidats, il est nécessaire de bien comprendre les phénomènes intervenant dans les interactions petites molécules/G₄ pour optimiser la sélectivité quadruplexe *vs* duplexe. Nous avons également montré que l'ADN quadruplexe est hautement polymorphique. Les différentes études des interactions ligand / G₄ sont ainsi compliquées par un mélange de conformations en solution de la séquence utilisée (l'exemple le plus flagrant est la porphyrine TMPyP4).

Afin de contrôler la topologie des quadruplexes étudiés, le développement de quadruplexes synthétiques contraints semble être une solution adéquate. En effet l'utilisation d'espaceurs synthétiques permet de prédisposer les brins dans la conformation envisagée. Ce concept a été récemment utilisé par l'équipe de G. Piccialli, qui, en 2006, propose l'utilisation de tétramères dont l'extrémité de chaque brin est covalentement liée à un espaceur tétravalent.²⁶⁴ Ces architectures ont été initialement synthétisées pour créer des modèles simples et stables de quadruplexes tétramoléculaires utilisables pour des études structurales. Deux types de mimes sont alors obtenus, l'un où les ODNs sont reliés en 3' et l'autre où les ODNs sont reliés en 5'. L'obtention des deux mimes, représentés (Figure 98), nécessite la synthèse d'un support modifié présentant quatre fonctions alcool utilisées pour la synthèse automatisée d'oligonucléotides. L'orientation des brins est contrôlée, grâce à l'utilisation lors de la synthèse de 3' ou 5' phosphoramidites. Les mimes obtenus s'avèrent beaucoup plus stables (les T_m sont estimés être supérieurs à 90°C) que le complexe naturel d[TGGGGT]₄.

264. Oliviero, G.; Amato, J.; Borbone, N.; Galeone, A.; Petraccone, L.; Varra, M.; Piccialli, G.; Mayol, L., Synthesis and characterization of monomolecular DNA G-quadruplexes formed by tetra-end-linked oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17* (4), 889-98.

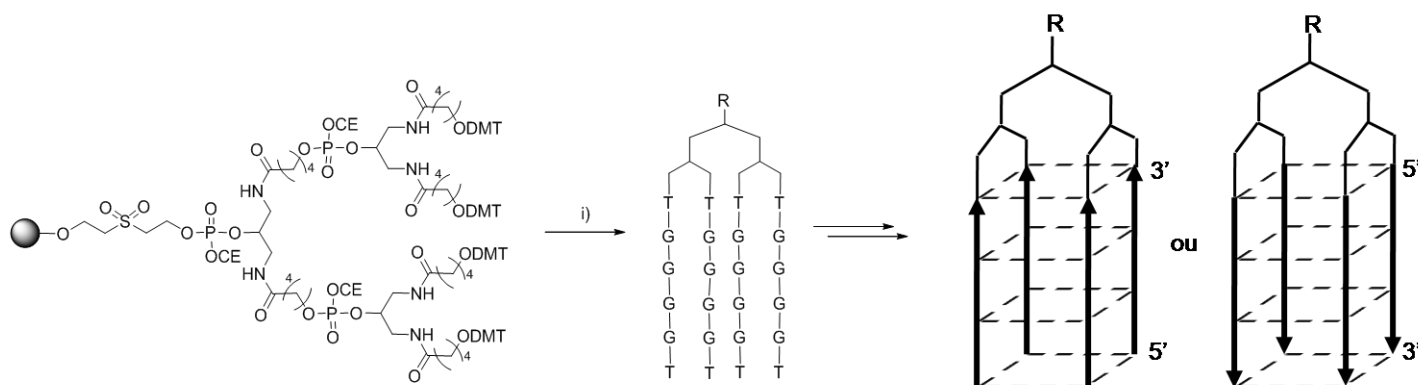


Figure 98 - Synthèse des tétramères contraints proposé par l'équipe de G. Picciali. i) Synthèse automatisée utilisant des 3' ou 5' phosphoramidites.

Notre équipe s'intéresse ainsi au développement de molécules-modèles mimant des conformations particulières de l'ADN quadruplexe. Le but est d'obtenir des mimes de quadruplexes qui sont utilisables pour la fonctionnalisation d'une surface et entreprendre l'étude des interactions entre petites molécules organiques et les mimes développés. Nous avons alors décidé d'utiliser un gabarit peptidique comme support d'une architecture quadruplexe. Le cyclodécapeptide utilisé a précédemment prouvé sa capacité à préorganiser les éléments greffés dessus (voir *Introduction* et *Chapitre I*). La stratégie envisagée est présentée sur la Figure 99.

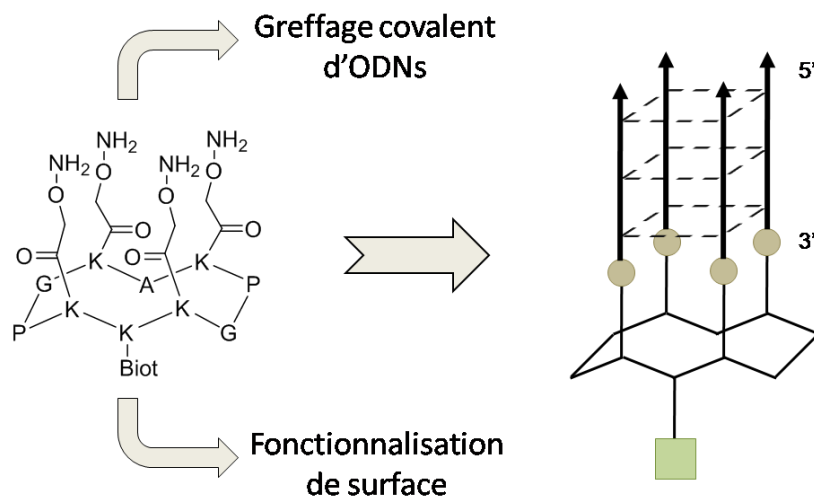


Figure 99 - Stratégie envisagée pour le développement de mime contraint de quadruplexe intermoléculaire.

Notre projet de recherche consiste en l'utilisation d'un gabarit pour contrôler la topologie du quadruplexe (voir *Introduction*). Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la conception d'un mime présentant quatre brins issus de la séquence télomérique d[TTAGGGT] greffés en 3' sur le gabarit peptidique. La chimie des oximes, qui est une ligation chimiosélective couramment utilisée pour la conception de conjugués oligonucléotide-peptide, a été sélectionnée pour la synthèse de ce mime.²⁶⁵ Le gabarit peptidique a également été fonctionnalisé par un résidu biotine en anticipant sa future immobilisation sur une surface fonctionnalisée par de la streptavidine.

II-2-2 Synthèse et caractérisation d'un mime contraint d'ADN G-quadruplexe parallèle

a) Résumé de l'article 1 en français

L'utilisation d'un gabarit peptidique permet de contrôler la disposition d'oligonucléotides et de contraindre la formation de motif G-quadruplexe. Pour valider cette hypothèse, un mime de quadruplexe intermoléculaire parallèle **1** a été synthétisé en utilisant la chimie des oximes. Le mime obtenu se montre particulièrement stable et forme un motif quadruplexe parallèle même en l'absence de cation normalement nécessaire à la stabilisation d'un tel motif. Finalement le mime obtenu a été greffé sur une surface pour l'étude des interactions par SPR d'un dérivé hydrosoluble de pérylène, le *N,N'*-bis-(2-(diméthylamino)éthyl-3,4,9,10-pérylène)tétracarboxylique acide diimide.

Des études complémentaires ont également été réalisées et seront présentées à la suite de l'article.

b) Article 1 : « A Novel Conformationally Constrained Parallel G Quadruplex », published in ChemBioChem

265. (a) Defrancq, E.; Singh, Y.; Spinelli, N., Chemical Strategies for Oligonucleotide-Conjugates Synthesis. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12* (4), 263-290; (b) Singh, Y.; Murat, P.; Defrancq, E., Recent developments in oligonucleotide conjugation. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (6), 2054-2070.

A Novel Conformationally Constrained Parallel G Quadruplex

Pierre Murat, Delphine Cressend, Nicolas Spinelli, Angéline Van der Heyden, Pierre Labbé, Pascal Dumy, and Eric Defrancq*^[a]

Guanine-rich DNA sequences are known to form highly ordered structures called G quadruplexes.^[1] These structures play an important role in many relevant biological processes, such as telomere stabilization,^[2] oncogene activation,^[3] and the regulation of the immunoglobulin switch region.^[4] The G-quadruplex motif is based on the association of planar G quartets of four guanine residues that are held together by eight Hoogsteen-type hydrogen bonds (Figure 1A). The G-quadruplex motif requires monovalent cations, such as Na⁺ and K⁺, for stabilization. A wide variety of topologies can be adopted depending on the number of strands involved in the structure, the strand direction, as well as variations in loop size and sequence (Figure 1).^[5] The structure of parallel-stranded as well as antiparallel-stranded quadruplexes have been extensively

studied by using different methods, such as NMR spectroscopy,^[6] X-ray diffraction^[7] and circular dichroism,^[8] but the exact conformation present in vivo is still under discussion. The design of small molecules that can bind to G quadruplexes has thus received attention because these nucleic acid motifs represent valuable pharmaceutical targets. For this purpose, a large number of small molecules has been evaluated for their binding with these particular DNA structures.^[9] However, as mentioned, the G quadruplex can adopt different topologies that can confuse the study of recognition phenomena. The design of a system that is able to mimic a well-defined conformation of G quadruplex is thus of great interest to precisely study the molecular interactions that can occur with small organic molecules.

In 1985, Mutter proposed the TASP concept (template-assembled synthetic proteins) for the design of folded proteins.^[10] These pioneering works described the use of a cyclodecapeptide that allows the preparation of artificial proteins with a predetermined three-dimensional structure. Despite a large number of examples that use this template, to our knowledge, it has not been applied for the design of a specific folded structure of nucleic acid.^[11]

With this in mind, we investigated the use of a peptidic scaffold as a topological template that directs the intramolecular assembly of covalently attached oligonucleotides into a single characteristic folding topology of G quadruplex. We anticipated that the scaffold should permit the preorganization of the DNA strands and the stabilization of the quadruplex structure. We report herein the synthesis and characterization of the novel water-soluble peptidic scaffold–oligonucleotide conjugate **1** that mimics the parallel-stranded conformation of G quadruplex (Scheme 1). We demonstrate that the use of the scaffold allows the precise control of the conformation of the quadruplex and dramatically increases the stability of the motif—all the more so as the formation of the quadruplex motif is possible even without the addition of any monovalent cations, such as K⁺. We also show that mimic **1** can be used for surface functionalization, and this permits the study of the molecular interaction with G-quadruplex ligands by using surface plasmon resonance (SPR).

The scaffold used for the synthesis of mimic **1** is a cyclic decapeptide with two independently functionalizable faces, which are due to the orientation of the lysine side-chains. On one side, the four oligonucleotides derived from the human telomeric sequence d⁽⁵⁾TTAGGGT⁽³⁾ were anchored by using oxime bond formation, and a biotin residue was incorporated on the other side for attachment to streptavidin-immobilized surfaces. Earlier work from our laboratory has demonstrated that the oxime coupling strategy allows the efficient preparation of peptide–oligonucleotide conjugates.^[12]

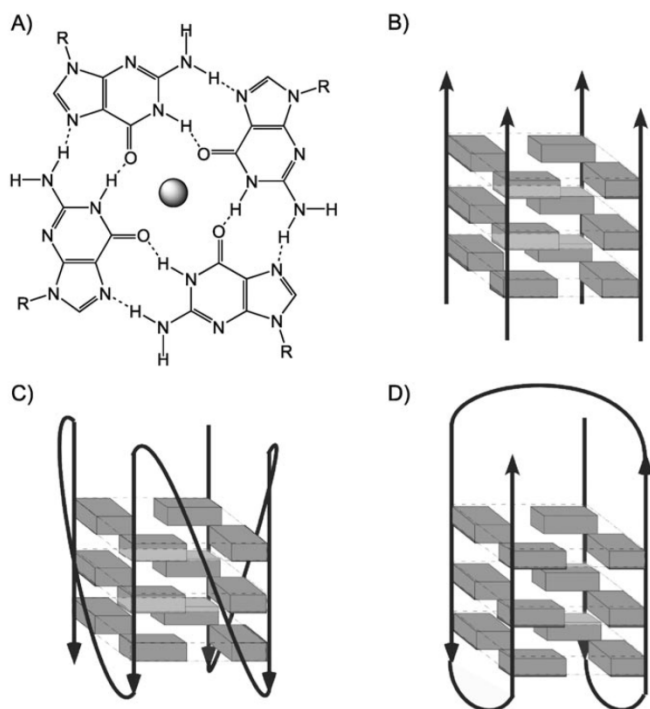
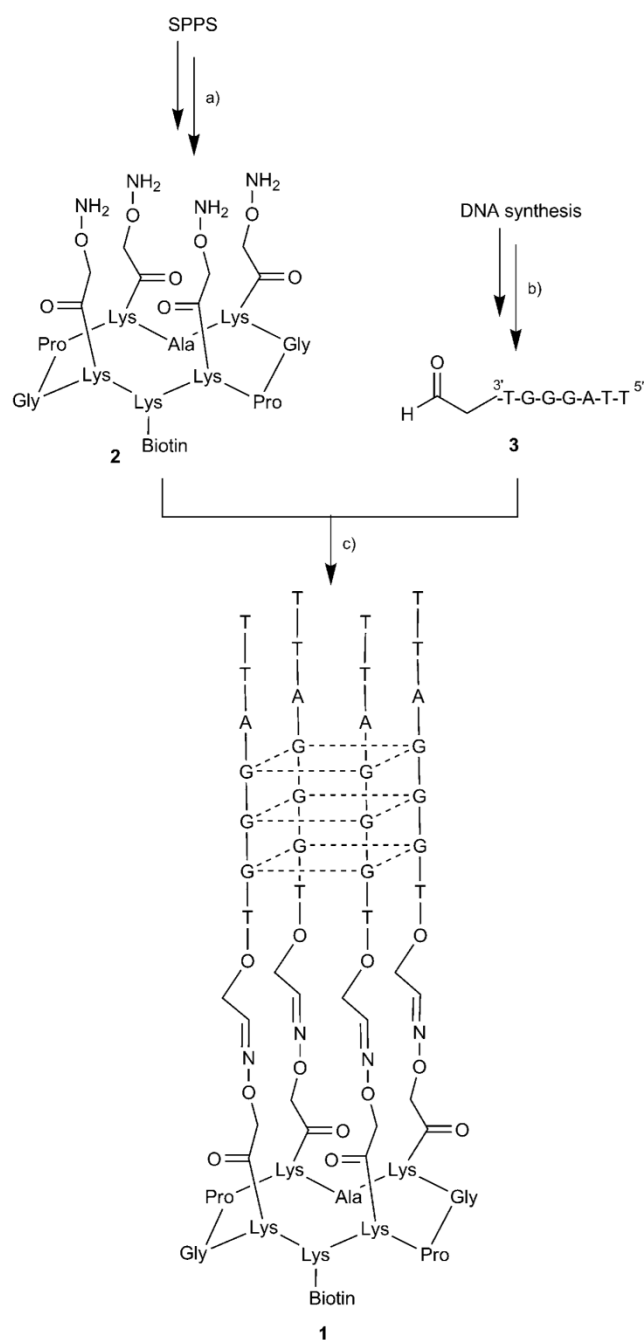


Figure 1. G-quartet motif and possible folded structures of the G quadruplex. A) G quartet; B) intermolecular parallel form; C) intramolecular parallel form; D) intramolecular antiparallel form.

[a] P. Murat, D. Cressend, Dr. N. Spinelli, Dr. A. Van der Heyden, Prof. P. Labbé, Prof. P. Dumy, Prof. E. Defrancq
Département de Chimie Moléculaire UMR CNRS 5250
Université Joseph Fourier BP 53
38041 Grenoble cedex 9
Fax: (+33) 4-76-51-49-46
E-mail: eric.defrancq@ujf-grenoble.fr

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chembiochem.org> or from the author.



Scheme 1. Synthesis of the G quadruplex mimic 1. a) 1) SPPS by using a Fmoc/*t*Bu strategy, then head-to-tail cyclization in solution, 2) cleavage of the Boc group under acidic conditions, 3) functionalization by an oxymino linker, then acidic deprotection; b) automated DNA synthesis on a glyceryl resin then NaIO₄ oxidation; c) coupling reaction in 10 mM ammonium acetate buffer (see the Supporting Information).

The preparation of mimic 1 involves the synthesis of the cyclodecapeptide 2 that possesses lysines on the upper face, each of which is functionalized on the side-chain by an oxymino group, and a subsequent coupling reaction with an aldehyde that contains the desired sequence of oligonucleotides (Scheme 1, see also the Supporting Information). Briefly, the peptide was prepared by using standard Fmoc/*t*Bu solid-phase peptide synthesis on an acid-labile Sasrin® resin, and by head-

to-tail cyclization in solution by adapting the previously described procedures.^[13] After deprotection of the side-chains of the lysine residues under acidic conditions, the oxymino groups were introduced by using 2-(1-ethoxyethylideneaminoxy)acetic acid.^[14] Final acidic deprotection provided the key intermediate 2. The oligonucleotide d(5'-TTAGGGTX^{3'}) 3, in which X represents the 3'-aldehyde linker, was synthesized as previously reported.^[12b] The coupling reaction was carried out in ammonium acetate buffer (pH 4) by using a slight excess of the aldehyde-containing oligonucleotide 3 and was monitored by anion-exchange HPLC. The reaction proceeded to completion to yield conjugate 1 as the major product (see the Supporting Information). Purification was performed by anion-exchange chromatography; it was noted that RP-HPLC was unsuitable. Mimic 1 was obtained in satisfactory yields (50%) and characterized by MALDI-ToF MS analysis, which showed excellent agreement between the experimentally determined molecular weight and the calculated value.

Circular dichroism (CD) spectroscopy was used to determine the topology adopted by the four oligonucleotides in quadruplex mimic 1. Previous studies have shown that different topologies of G quadruplex DNA can be associated with a specific CD signature.^[15] CD spectra of mimic 1 display a characteristic positive peak at 263 nm and a negative peak at 240 nm (Figure 2A), both of which are expected when a parallel-stranded quadruplex structure is formed. More interestingly, the parallel-stranded quadruplex structure could still be observed even in the absence of cations (Na⁺ or K⁺).

The thermal stability of G quadruplex conformation was then evaluated by CD spectroscopic denaturation studies (Figure 2B). The samples were incubated at each temperature to achieve equilibrium before recording the CD signal. As shown in Table 1, a dramatic stabilization was observed for mimic 1 in comparison with the parallel-stranded quadruplex formed by the intermolecular association of four strands of sequence d(5'-TTAGGGT^{3'}). In fact, a melting temperature (*T*_m) of 87 °C was measured in the presence of 100 mM of KCl for mimic 1, whereas the intermolecular quadruplex (d(5'-TTAGGGT^{3'})₄) showed a *T*_m of 55 °C under the same conditions.^[16] The use of the scaffold thus improved the thermal stability of the quadruplex significantly by maintaining the four oligonucleotides bonded together. We also checked whether mimic 1 forms an intra- or intermolecular quadruplex. As expected, the melting temperature of quadruplex mimic 1 was independent of the concentration; this demonstrates the formation of an intramolecular quadruplex (Supporting Information).

The thermodynamic parameters were calculated from the CD spectroscopic denaturation–renaturation studies by using the classical Van't Hoff relation and were compared to those obtained with sequence d(5'-TTAGGGT^{3'})₄. This latter can fold to an intramolecular quadruplex and is usually considered to be a model of the human telomeric sequence. The calculated values are given in Table 1 (see also the Supporting Information). For both systems the quadruplex is the predominant form at physiological temperature whenever Δ*G* < 0. The *T*_m was higher in KCl than in NaCl, which is a well-known property of G quadruplexes.^[17] The peptidic scaffold, however, confers a

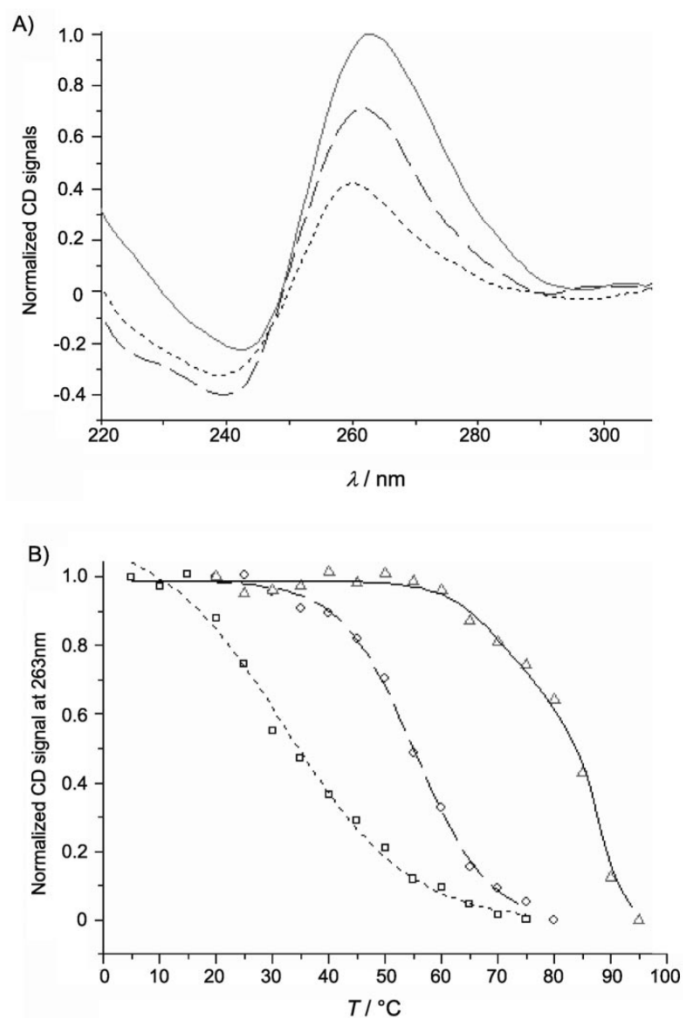


Figure 2. A) CD spectra of mimic 1, spectra were obtained in 10 mM Tris-HCl buffer with 100 mM KCl (—), 100 mM NaCl (---), and without salt (----) at pH 7.4 at 20 °C; B) thermal denaturation profiles of quadruplex mimic 1; denaturation was performed in 10 mM Tris-HCl buffer with 100 mM KCl (Δ), 100 mM NaCl (\circ), and without addition of salt (\square).

Table 1. T_m values and thermodynamic parameters from CD denaturation studies. ^[a]					
Quadruplex	Conditions	T_m [°C]	ΔG [kcal mol ⁻¹]	ΔH° [kcal mol ⁻¹]	ΔS° [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]
1	–	32	–0.7	–17	–56
	NaCl	56	–2.5	–29	–88
$d(5^{\prime}\text{TTAGGG}^3)_4$	KCl	87	–5.9	–37	–106
	NaCl	45	–2.2	–32	–99
$d(5^{\prime}\text{TTAGGGT}^3)\times 4$	KCl	51	–3.3	–41	–128
	NaCl	24 ^[b]	n.d.	n.d.	n.d.
	KCl	55 ^[b]	n.d.	n.d.	n.d.

[a] Conditions: quadruplexes were annealed by heating the oligonucleotides and mimic 1 at 90 °C for 10 min in Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.4) with 100 mM KCl or NaCl, or without cations, and cooled slowly to room temperature to favor the thermodynamically stable form. The samples were prepared at 2.5 μM according to UV measurements. All the parameters were determined at 298 K. [b] From ref. [16], n.d.: not determined. The melting transition was found to be reversible.

greater stability on the quadruplex and allows the formation of the quadruplex motif in the absence of cations to stabilize the structure. The entropy values of mimic 1 and the intramolecular G quadruplex $d(5^{\prime}\text{TTAGGG}^3)_4$ are quite similar; this demonstrates that the formation of quadruplex conformation in 1 is entropically driven due to the preorganization afforded by the scaffold.

Surface plasmon resonance (SPR) is a powerful method for investigating molecular interactions. A number of quadruplex sequences, including the human telomeric quadruplex, the Tetrahymena telomeric quadruplex, the c-MYC promoter quadruplex, the thrombin binding aptamer, and a G_2T_4 basket quadruplex have been immobilized on surfaces for SPR studies.^[18] All these quadruplexes consist of an intramolecular folded single strand; this can complicate the interpretation of the results due to the propensity of quadruplex sequences for adopting different topologies. To our knowledge there is no published attempt to immobilize intermolecular quadruplexes on a SPR sensor. Indeed an obvious limitation is that denaturation can occur during the course of SPR experiments. In this way, we examined the ability of mimic 1 to interact with known G-quadruplex ligands. The use of mimic 1 should provide a good way to specifically study the interaction of small molecules with an intermolecular-like quadruplex constrained in a parallel structure. Furthermore, additional structures that could prevent unspecific interactions, such as a loop, are not present in our mimic.

We chose an easily accessible ligand (*N,N'*-bis-(2-(dimethylamino)ethyl)-3,4,9,10-perylene-tetracarboxylic acid diimide) to test this concept.^[19] Biotinylated mimic 1 was efficiently immobilized on streptavidin-coated SPR biochips. Optimized experimental conditions allowed clear sensorgrams to be collected and interpreted (Figure 3, see also the Supporting Information). We found that the perylene derivative ligand exhibits a high affinity for mimic 1, and the affinity constant was estimated to be 10^9 M^{-1} .^[20] Thus, mimic 1 represents an interesting tool to

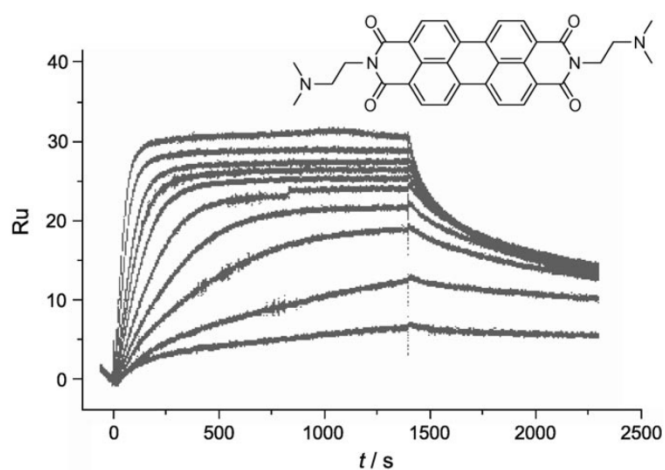


Figure 3. SPR sensorgrams for the interaction of ligand with mimic 1, which was immobilized on a streptavidin-coated surface. The ligand concentration was varied from 1 nM (bottom curve) to 50 nM (top curve); inset: structure of perylene derivative ligand.

select ligands and to study their interactions with the parallel-stranded conformation of the G quadruplex.

Our studies represent the first template-assembled synthesis of the G quadruplex. We demonstrated that this template allows the formation of a very stable G-quadruplex motif in a unique conformation, in aqueous medium. NMR spectroscopic studies are in progress to determine the exact folding of the DNA strands. Mimic 1 was also anchored on surfaces for SPR studies. This technique should permit the analysis of molecular interactions of various ligands for a single conformation of G quadruplex. The possibility of extending the use of the scaffold to the formation of other specific conformations of DNA (antiparallel G quadruplex, i motifs) is also under investigation.

Acknowledgements

This work was supported by the Center National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Ministère de la Recherche. The authors are grateful to the NanoBio program for the facilities of the Synthesis and Surface Characterization platforms and to Andrea Molero for technical help. The Cluster de Recherche Chimie de la Région Rhône-Alpes is duly acknowledged for financial support.

Keywords: biosensors • DNA structures • G quadruplexes • surface plasmon resonance • template synthesis

- [1] For general reviews on quadruplexes, see: a) J. T. Davis, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 684–716; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 668–698; b) *Quadruplex Nucleic Acids* (Eds.: S. Neidle, S. Balasubramanian), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2006**.
- [2] a) A. M. Zahler, J. R. Williamson, T. R. Cech, D. M. Prescott, *Nature* **1991**, *350*, 718–720; b) T. M. Fletcher, D. Sun, M. Salazar, L. H. Hurley, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5536–5541; c) A. J. Zaug, E. R. Podell, T. R. Cech, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 10864–10869.
- [3] a) A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11593–11598; b) M. Bejugam, S. Sewitz, P. S. Shirude, R. Rodriguez, R. Shahid, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12926–12927.
- [4] M. L. Duquette, P. Pham, M. F. Goodman, N. Maizels, *Oncogene* **2005**, *24*, 5791–5798.
- [5] M. A. Keniry, *Biopolymers* **2001**, *56*, 123–146.
- [6] a) Y. Wang, D. J. Patel, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8112–8119; b) Y. Wang, D. J. Patel, *Structure* **1993**, *1*, 263–282; c) G. N. Parkinson, M. P. H. Lee, S. Neidle, *Nature* **2002**, *417*, 876–880; d) Y. Wang, D. J. Patel, *Structure* **1994**, *2*, 1141–1156; e) A. T. Phan, Y. S. Modi, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8710–8716.
- [7] a) K. Phillips, Z. Dauter, A. I. H. Murchie, D. M. J. Lilley, B. Luisi, *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 171–182; b) S. Haider, G. N. Parkinson, S. Neidle, *J. Mol. Biol.* **2002**, *320*, 189–200.
- [8] a) M. Lu, Q. Guo, N. R. Kallenbach, *Biochemistry* **1992**, *31*, 2455–2459; b) P. Balagurumoorthy, S. K. Brahmachari, D. Mohanty, M. Bansal, V. Sasi-sekharan, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4061–4067; c) P. Balagurumoorthy, S. K. Brahmachari, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 21858–21869; d) M. Lu, Q. Guo, N. R. Kallenbach, *Biochemistry* **1993**, *32*, 598–601.
- [9] For recent reviews, see: a) A. De Cian, L. Lacroix, C. Douarre, N. Temime-Smaali, C. Trentesaux, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, *Biochimie* **2008**, *90*, 131–155; b) D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 627–636.
- [10] a) M. Mutter, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 639–654; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 639–653; b) M. Mutter, P. Dumy, P. Garrouste, C. Lehman, M. Mathieu, C. Peggion, S. Peluso, A. Razaname, G. Tuchscherer, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1588–1591; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1482–1485.
- [11] Use of other nonpeptidic scaffold: a) M. Nikan, J. C. Sherman, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4978–4980; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4900–4902; b) G. Oliviero, J. Amato, N. Borbone, A. Galeone, L. Petraccone, M. Varra, G. Piccialli, L. Mayol, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 889–898.
- [12] a) D. Forget, D. Boturyn, E. Defrancq, J. Lhomme, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3976–3984; b) O. P. Edupuganti, Y. Singh, E. Defrancq, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5988–5995; c) Y. Singh, N. Spinelli, E. Defrancq, *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 263–290.
- [13] E. Garanger, D. Boturyn, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2402–2410.
- [14] S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983–991.
- [15] For some recent examples, see: a) D. Monchaud, P. Yang, L. Lacroix, M.-P. Teulade-Fichou, J.-L. Mergny, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4936–4939; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4858–4861; b) V. Dapic, V. Abdomerovic, R. Murrington, J. Peberdy, A. Rodger, J. O. Trent, P. J. Bates, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2097–2107; c) R. Rodriguez, G. D. Pantos, D. P. N. Gonçalves, J. K. M. Sanders, S. Balasubramanian, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5501–5503; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5405–5407; d) P. A. Rachwal, T. Brown, K. R. Fox, *Biochemistry* **2007**, *46*, 3036–3044.
- [16] J.-L. Mergny, A. De Cian, A. Ghelab, B. Saccà, L. Lacroix, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 81–94.
- [17] J.-L. Mergny, A.-T. Phan, L. Lacroix, *FEBS Lett.* **1998**, *435*, 74–78.
- [18] For general reviews on the use of SPR for the study of quadruplex–ligand interactions see: a) J. E. Redman, *Methods* **2007**, *43*, 302–312; b) M.-P. Teulade-Fichou, C. Carrasco, L. Guittat, C. Bailly, P. Alberti, J.-L. Mergny, A. David, J.-M. Lehn, D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4732–4740; c) J. Seenisamy, S. Bashyam, V. Gokhale, H. Vankayalapati, D. Sun, A. Siddiqui-Jain, N. Streiner, K. Shin-ya, E. White, W. D. Wilson, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2944–2959.
- [19] J. T. Kern, P. W. Thomas, S. M. Kerwin, *Biochemistry* **2002**, *41*, 11379–11389.
- [20] Comparable affinities have been observed for similar perylene derivatives see: R. Samudrala, X. Zhang, R. M. Wadkins, D. L. Mattern, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 186–193.

Received: July 7, 2008

Published online on September 26, 2008

CHEMBIOCHEM

Supporting Information

for

Novel Conformationally Constrained Parallel G Quadruplex

Pierre Murat, Delphine Cressend, Nicolas Spinelli, Angéline Van der Heyden,
Pierre Labbé, Pascal Dumy, and Eric Defrancq*

Table of contents

Abbreviations.....	S2
Synthesis of mimic 1	S2
<i>General</i>	S2
<i>Linear peptide 4</i>	S3
<i>Cyclic peptide 5</i>	S4
<i>N ε-free cyclic peptide 6</i>	S4
<i>Protected aminoxy peptide 8</i>	S4
<i>Aminoxy peptide 2</i>	S4
³ <i>Diol containing oligonucleotide 9</i>	S4
³ <i>Aldehyde containing oligonucleotide 3</i>	S4
<i>Conjugate 1</i>	S5
SAX-HPLC chromatogram of crude conjugate 1	S5
MALDI-ToF MS spectrum of purified conjugate 1	S6
Circular dichroism (CD) studies.....	S6
<i>Thermal denaturation studies</i>	S6
<i>Influence of the concentration on the melting temperature</i>	S7
<i>Thermodynamic studies</i>	S7
SPR measurements.....	S8

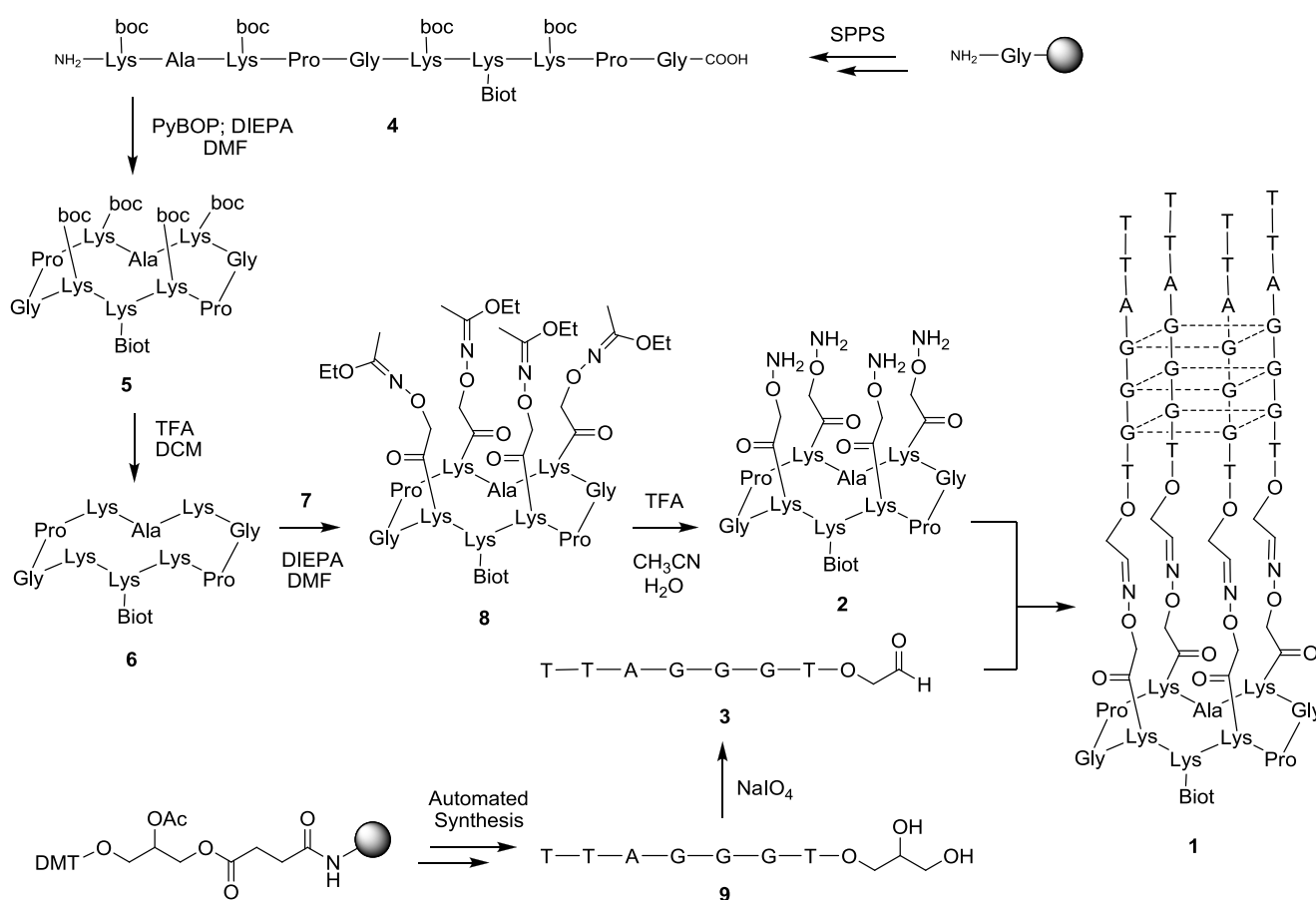
Abbreviations.

Biot: biotine; boc: *tert*-butyloxycarbonyl; CPG: controlled pore glass; DCM: dichloromethane; DIEA: diisopropylethylamine; ESI MS: electrospray ionisation mass spectrometry; Fmoc: fluorenylmethyloxycarbonyl; MALDI-Tof MS: matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; ODN: oligodeoxyribonucleotide; PyBOP: (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate; TEA: triethylamine; TFA: trifluoroacetic acid; Tris HCl: Tris (hydroxymethyl) amino-methane hydrochloride; RP-HPLC: reversed-phase high pressure liquid chromatography; SAX-HPLC: strong anion exchange high pressure liquid chromatography.

Synthesis of mimic 1

General. All solvents and reagents used were of highest purity commercially available. *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -biotinyl-*L*-lysine was obtained from VWR International (Fontenay sous Bois, France). *N*-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-ethoxyethylideneaminoxy) acetate **7** was synthesized as previously described (see below). 3'-aldehyde containing oligonucleotide **3** was prepared as previously described from 3'-diol containing oligonucleotide **9** (see below). RP-HPLC and SAX-HPLC analysis and purification were performed on a Waters HPLC system with dual wavelength detector. RP-HPLC analysis of oligonucleotides **3** and **9** was performed on a Nucleosil C18 column (Macherey Nagel, 250 x 4.6 mm, 5 μ m) using the following solvent system: solvent A, 50 mM triethylammonium acetate buffer containing 5% acetonitrile; solvent B, acetonitrile containing 5% water; flow rate of 1 mL.min⁻¹; a linear gradient of 0-30 % B was applied in 20 minutes. UV absorbance was monitored at 260 nm and 280 nm simultaneously. Purification was performed on a μ -Bondapak C-18 column (Macherey-Nagel Nucleosil, 10 x 250 mm, 7 μ m) with similar gradient at a flow rate of 4 mL.min⁻¹. RP-HPLC analysis of peptides **2**, **4**, **5**, **6** and **8** was performed on a Nucleosil C18 column (Macherey Nagel, 120 Å, 30 x 4.6 mm, 3 μ m) using the following solvent system: solvent A, water containing 1% TFA; solvent B, acetonitrile containing 1% TFA and 10% H₂O; flow rate of 1.3 mL.min⁻¹ was employed with a linear gradient (5 to 100% B in 15 min.). UV absorbance was monitored at 214 nm and 250 nm simultaneously. Semipreparative column (Delta-Pak™ 100 Å, 200 x 2.5 mm, 15 μ m) were used to purify peptides by using an identical solvent system at a flow rate of 22 mL.min⁻¹. Conjugate **1** was analyzed and purified on a Nucleogel anion exchange column (Macherey Nagel, SAX 1000-8 VA 50/4.6) using the following solvent system: solvent A,

Tris HCl buffer 20 mM; solvent B, Tris HCl buffer 20 mM, 1 M NaCl; flow rate of 3 mL min⁻¹; a linear gradient of 0-100% B was applied in 30 min. ESI mass spectra of **4**, **5**, **8** and **9** were measured on an Esquire 3000 spectrometer from Bruker. The analyses were performed in negative mode for **9** and in positive mode for **4**, **5** and **8**. Aqueous acetonitrile (50%) was used as eluent for **4**, **5** and **8** and a 2% TEA aqueous acetonitrile solution (49%) was used as eluent for **9**. MALDI-ToF mass spectrum of **1** was performed on an Autoflex Bruker using hydropiccolinic acid (HPA, 45 mg; ammonium citrate 4 mg in 500 μ L H₂O/CH₃CN) as matrix. Prior to MALDI-ToF analysis, samples were exchanged on DOWEX 50 W X8 resin (ammonium form).



Scheme 1. Synthesis of the G-quadruplex mimic **1**.

Linear peptide 4. The synthesis was performed on an Advance ChemTech 3480 synthesizer using Fmoc/tBu strategy on a SASRIN[®] resin. **4** was released from the resin using a solution of TFA/DCM (1/99). After evaporation under vacuum, peptide **4** was precipitated in ether. ESI-MS (+): m/z calcd: 1665.0, m/z found: 1664.9 [$M+H$]⁺.

Cyclic peptide 5. Linear peptide **4** (1 equiv) was dissolved in DCM (0.5 mmol.L⁻¹) then PyBOP (1.5 equiv) and DIEA (to obtain pH 8-9) were added. The solution was stirred at RT for 2h and the solvent was removed under vacuum and the peptide **5** precipitated with ether. ESI-MS (+): *m/z* calcd: 1647.0, *m/z* found: 1647.4 [M+H]⁺.

N-ε-free cyclic peptide 6. Peptide **5** was dissolved in DCM / TFA (1:1) and stirred at RT for 1 h. The solvent was removed under vacuum and the peptide **6** precipitated with ether. ESI-MS (+): *m/z* calcd: 1246.7, *m/z* found: 1247.0 [M+H]⁺.

Protected aminoxy peptide 8. Peptide **6** was dissolved in anhydrous DMF (0.01 mol L⁻¹) in presence of DIEA (to obtain pH 8-9) and *N*-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-ethoxyethylideneaminoxy) acetate **7** (4.5 equiv) was then added. The solution was stirred at RT for 2 h and the solvent was removed under vacuum. The peptide was purified using RP-HPLC and freeze-dried. ESI-MS (+): *m/z* calcd: 1819.0, *m/z* found: 1819.6 [M+H]⁺.

For a complete description of the synthesis of **7**, see: S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturny, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983- 991.

Aminoxy peptide 2. Peptide **8** was dissolved in a solution of TFA/CH₃CN/H₂O (25: 25:50) and stirred at RT for 10 min. The solution was concentrated under vacuum and used for the coupling without further purification.

³Diol containing oligonucleotide 9. Automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides was performed on a 3400 DNA synthesizer from Applied Biosystems by using standard β-cyanoethyl phosphoramidite chemistry on a 3'-glyceryl CPG resin (from Eurogentec). The resin was cleaved with an aqueous ammoniac solution (28%) for 16h at 55°C and the ODNs were purified on a C₁₈ column. Removal of the dimethoxytrityl ether was carried out by dissolving the crude in an aqueous acetic acid solution (80%) for 1h at RT. After freeze-drying the residue was dissolved in water and washed with ether. ESI-MS (-): *m/z* calcd: 2304.4, *m/z* observed: 2303.9 [M-H]⁻.

³Aldehyde containing oligonucleotide 3. The oligonucleotide was dissolved in an aqueous solution of sodium metaperiodate (20 equiv) to reach a concentration of 10⁻³ M. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h then the aldehyde was purified on a C₁₈ column.

For some examples of synthesis and use of ^{3'}aldehyde containing oligonucleotides, see: O. P. Edupuganti, Y. Singh, E. Defrancq, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 5988 – 5995.

Conjugate 1. 3'-Aldehyde containing oligonucleotide **3** (0.268 μmol, 5 equiv) was dissolved in an ammonium acetate buffer (0.4 M) at a concentration at 10⁻³M, then the peptide **2** (0.053 μmmol, 1 equiv) was added. The solution was stirred at 50°C for 20 h. The crude mixture was purified by anion exchange-HPLC and desalted on a C₁₈ column. The mimic **1** was obtained in a 51% yield (0.027 μmol). MALDI-ToF: *m/z* calcd: 10554.3, *m/z* observed: 10550.2 [*M-H*].

SAX-HPLC chromatogram of Crude conjugate 1

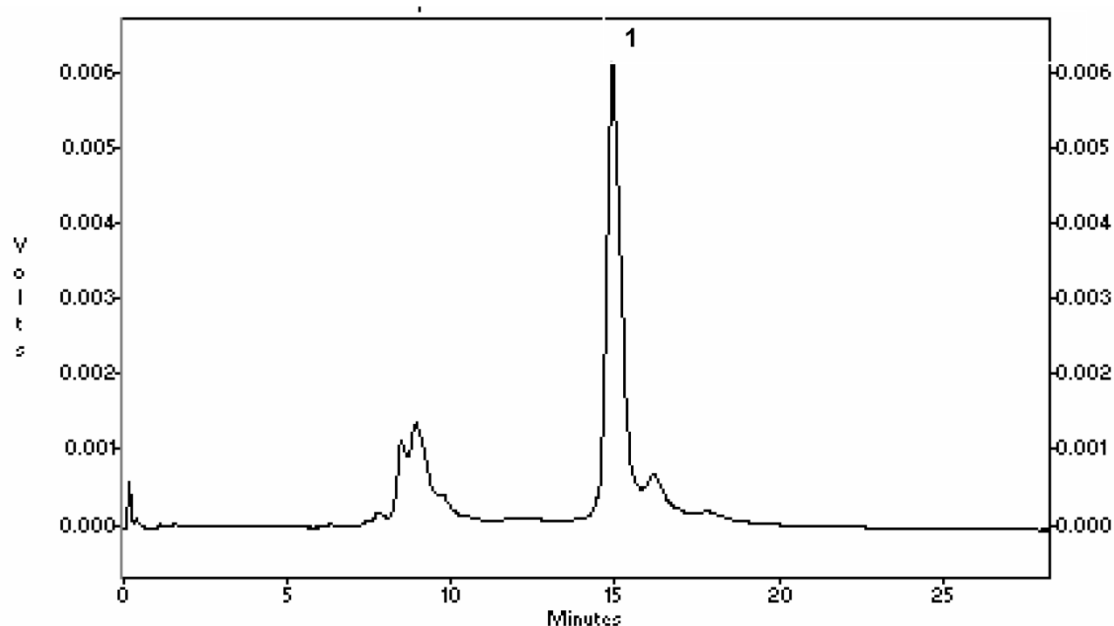


Figure S1. SAX-HPLC chromatogram of crude conjugate 1.

MALDI-ToF MS spectrum of purified conjugate 1

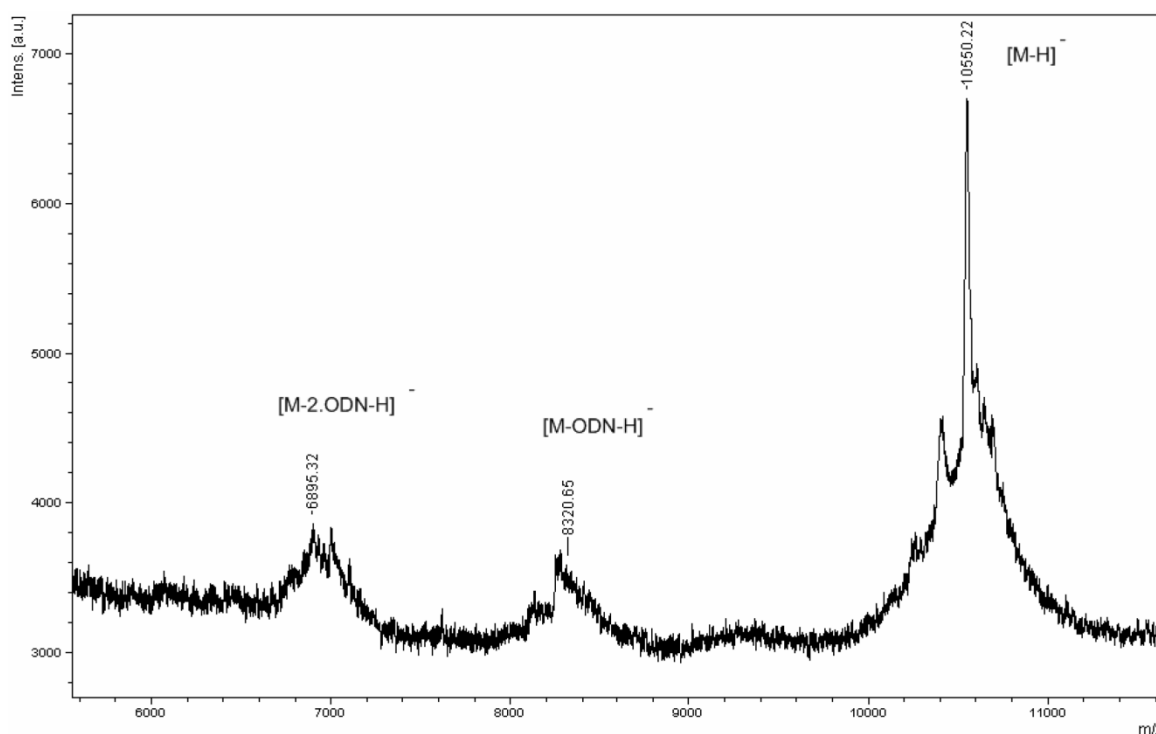


Figure S2. MALDI-ToF Ms spectrum (HPA) of purified conjugate **1**. m/z (calcd) 10552.

Circular Dichroism (CD) studies

CD spectra were recorded on a Jasco J-810 circular dichroism spectropolarimeter using 10 mm path length quartz cuvette. Scans were performed at controlled temperature (20°C) over a wavelength range of 200-340 nm (only 220-320 nm is shown), with response time of 0.5 s, 1 nm pitch, 4 nm bandwidth and a scanning speed of 200 nm min⁻¹. Blank spectra of sample containing buffer were subtracted from collected data. The CD spectra represent an average of five scans and are zero-corrected at 340 nm.

Quadruplexes were annealed by heating the oligonucleotides and the mimic **1** at 90°C for 10 min in a Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.4) with 100mM of KCl or NaCl or without any cations added, and cooled slowly to room temperature to favor the thermodynamic form. The samples were prepared at 2.5 μM according to UV measurements.

Thermal denaturation studies. The samples prepared as described above were incubated at each temperature for a suitable time to achieve the equilibrium before re-

ording the CD spectra. The whole spectrum was recorded to follow the behavior of the quadruplex. The denaturation curves were constructed by reporting the intensity of the maximum peak in function of the temperature. The mimic **1** displayed a maximum peak at 263 nm and a minimum peak at 239 nm in the different salt conditions. The intramolecular quadruplex based on the sequence d(5' TTAGGG^{3'})₄ displayed a maximum peak at 295 nm and a minimum peak at 265 nm in presence of Na⁺, and a maximum peak at 295 nm, a shoulder at 260 nm and a minimum peak at 240 nm in presence of K⁺.

Influence of the concentration on the melting temperature. In order to check if the mimic **1** forms an intramolecular or an intermolecular quadruplex, we compared the melting temperatures in function of the concentration of the mimic. As expected the melting temperature is concentration-independent and thus confirmed that the mimic is an intramolecular quadruplex (see Figure S3).

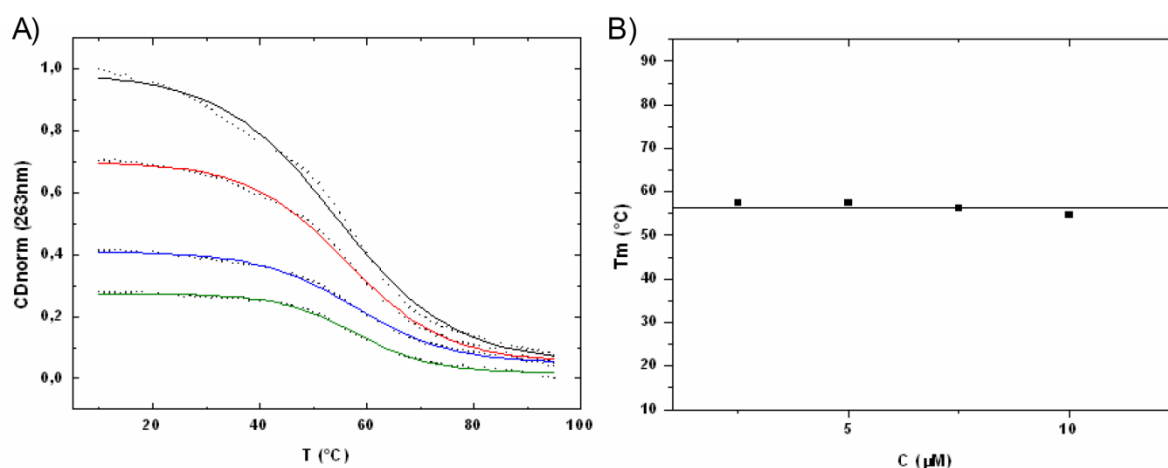


Figure 3. A) Melting curves for the mimic **1** in Tris.HCl pH 7.4 10mM + 100mM NaCl at different concentrations 2.5 (green), 5 (blue), 7.5 (red) and 10μM (black); B) $T_m = f(C)$

Thermodynamic studies

Principles: In the case of intramolecular equilibrium, the ΔH° could not be derived from the classical concentration dependency of the T_m (the melting temperature is concentration-independent), therefore some thermodynamic analysis of the denaturation profile was performed in this sense. From the classical Van't Hoff relation $\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ one can deduce that $\ln K = -(\Delta H^\circ/R)(1/T) + (\Delta S^\circ/R)$. Thus, $\ln K$ can be expressed as a linear function of $1/T$. The equilibrium constant K can be

written as $K = \alpha / (1 - \alpha)$ for an intramolecular equilibrium where α is the fraction of folded oligonucleotide. The use of this model leads to straight lines ($r > 0.99$), the slope of which is $-\Delta H^\circ/R$ and y intercept $\Delta S^\circ/R$.

For a complete article, see: J.-L. Mergny, A. T. Phan, L. Lacroix, *FEBS Lett.* **1998**, 435, 74-78.

Protocol: The melting curves of the different systems are constructed as described above and fitted using Origin software and a Boltzmann sigmoid. All the fitted sigmoid were obtained with a correct approximation ($r > 0.99$). The melting temperatures T_m were obtained with the derivative of the melting curve and the different thermodynamic parameters with the plot of $\ln K = f(1/T)$ (see Figure S4).

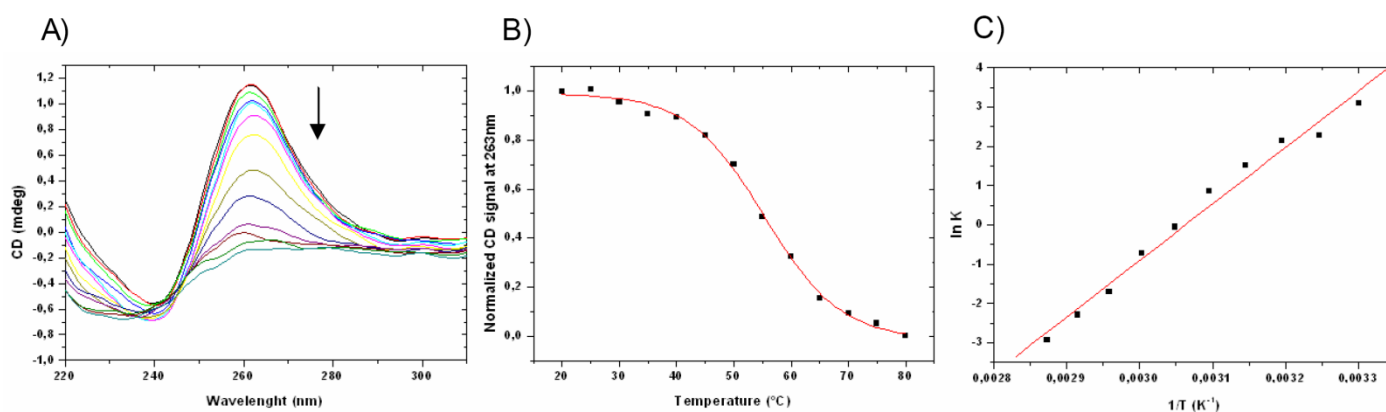


Figure S4. Thermodynamics studies of the mimic **1** in Tris.HCl pH 7.4 10mM + 100mM NaCl; A) CD spectra at different temperatures (20-80°C), B) Melting curve, C) $\ln K = f(1/T)$.

SPR measurement

The SPR measurements were performed with a BIAcore T100 (Biacore AB, Sweden) operated with BIAcore T100 evaluation Software 1.1. All measurements were performed at 25°C, using a working buffer (W.B.) composed of HEPES buffered saline 0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v surfactant P20 and 0.2 M KCl. G quadruplex mimic **1** was immobilized on a streptavidin-coated surface (SA sensor chip, Biacore AB). After conditioning the surface with a 1 min injection of a 5 M NaCl/ 0.2 M NaOH solution of mimic **1** (50 nM in W.B.) was injected at 2 $\mu\text{L min}^{-1}$ until a final response of 400 RU.

Binding experiments were conducted at $15 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ by injection of ligand, the *N,N'*-Bis-(2-(dimethylamino)ethyl)-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic acid diimide, dissolved in W.B at concentrations of 1 - 50 nM (injection time: 1400 s, dissociation time: 900 s). Regeneration of the surface was achieved by four successive injections (300 s , $30 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) of glycine 10 mM pH 2. A non-modified channel was used as reference. Curves obtained on the reference surface were deduced from the curves recorded on the recognition one, allowing elimination of refractive index changes due to buffer effects. A linear Scatchard binding plot as well as the non dependence of the dissociation curves to the association time (see Figure S5) support the use of a 1:1 interaction model to fit the SPR data. Equilibrium dissociation constant, $K_D = 3.35 \text{ nM}$, was thus obtained by fitting the steady-state response versus the concentration by using BIAcore T100 evaluation Software 1.1(see Figure S6).

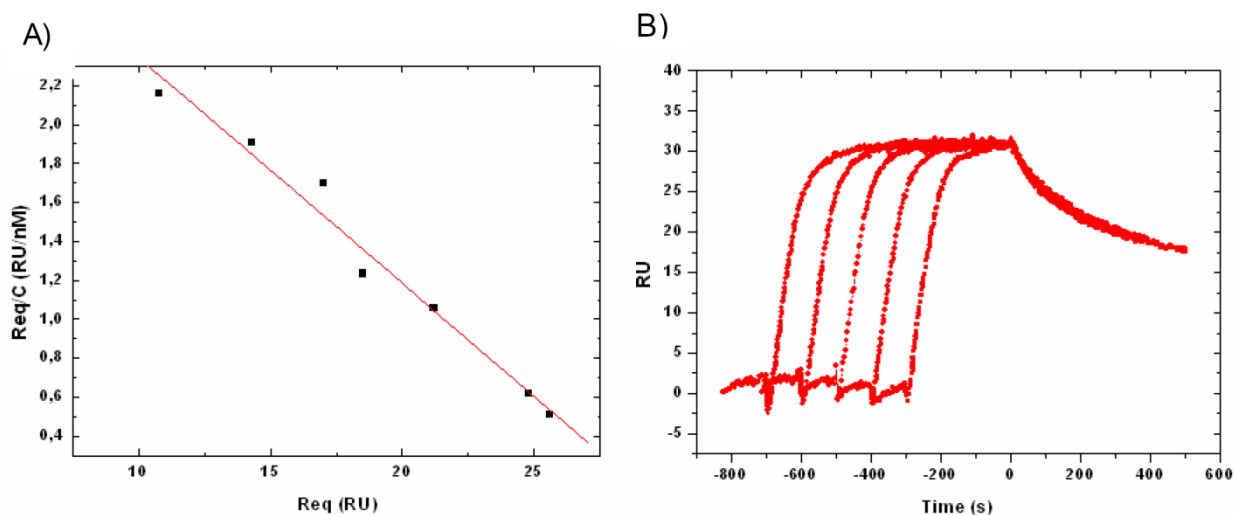


Figure S5. a) Scatchard binding plot of the interaction between ligand and mimic **1** immobilized on surface. Req is the response obtained from the sensorgram (presented in the manuscript, Figure 3) for the steady state and C the concentration of the ligand solutions injected b) Association/dissociation curves obtained for various injection times (from left to right: 300, 400, 500, 600 and 700 s) of a 25 nM ligand solution at $30 \mu\text{L}/\text{min}$.

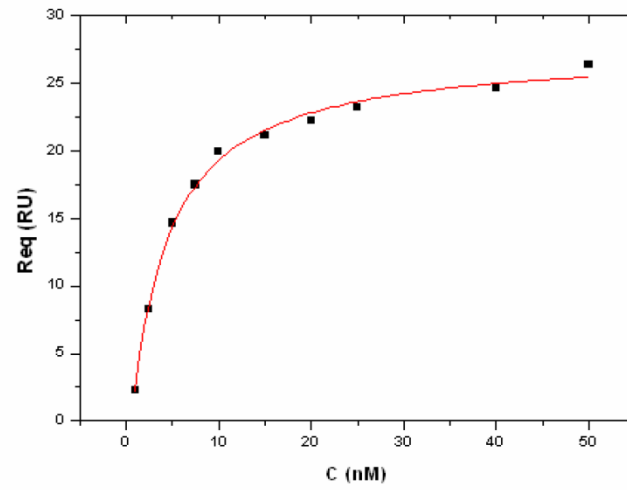


Figure S6. Determination of the dissociation constant (K_D) for ligand /mimic **1** interaction according to Langmuir model.

c) Études complémentaires

Spectre RMN ^1H :

Afin de confirmer la formation d'un motif quadruplexe par le mime **1**, une étude par RMN a été envisagée. Malheureusement une détermination structurale complète nécessitant trop de produit, seul un spectre RMN ^1H est aujourd'hui disponible. Le spectre obtenu, dans un milieu contenant du KCl (70mM), est présenté sur la Figure 100.

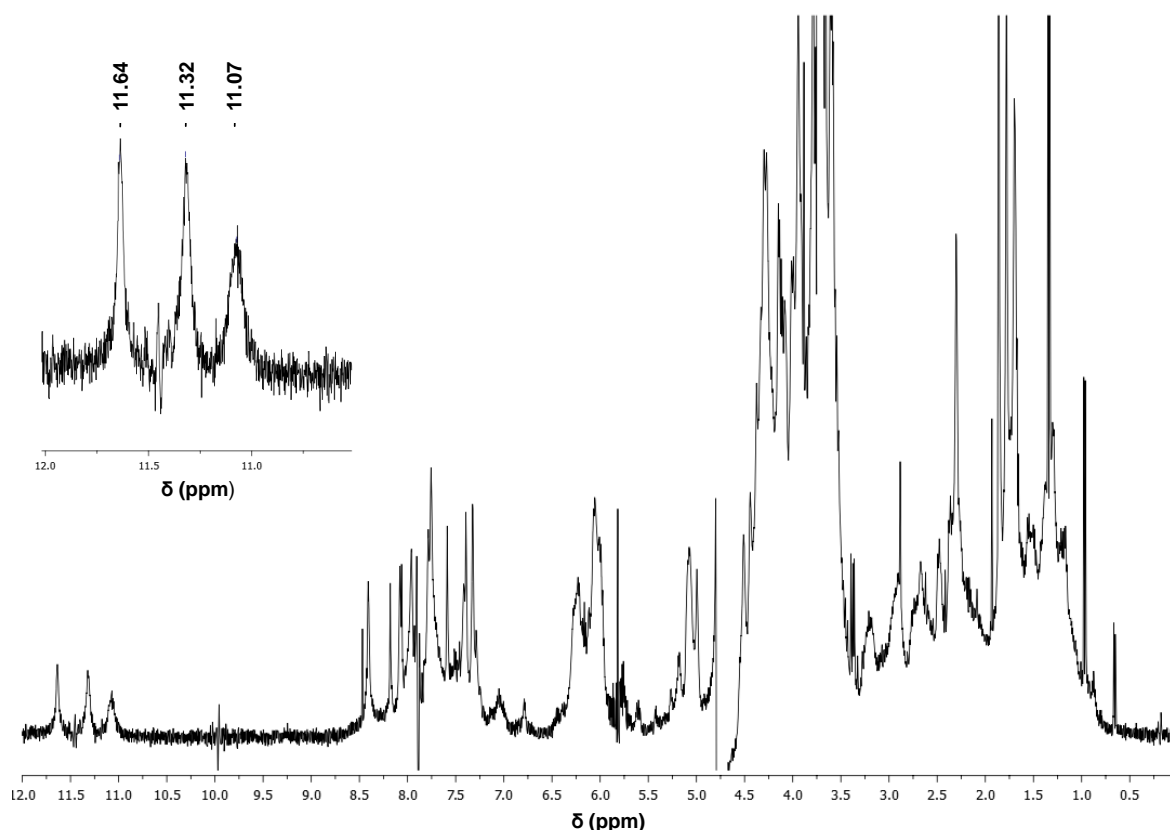


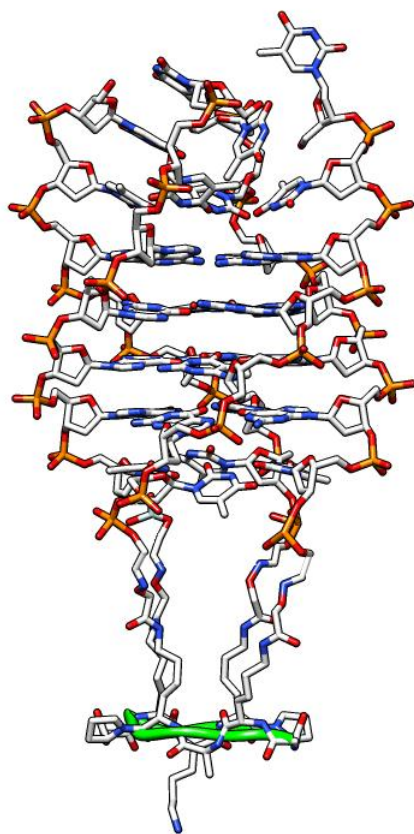
Figure 100 - Spectre RMN ^1H du composé **1**. En insert l'agrandissement de la zone correspondant aux protons iminos. Le spectre a été enregistré sur un spectromètre de 500MHz à 20°C. Le mime **1** (82 μM) est dissous dans un tampon PBS (25mM), KCl (70mM), D₂O (10%), pH 7.

La structure du quadruplexe tétramoléculaire d[TTAGGGT]₄ ayant déjà été étudiée et totalement résolue par l'équipe de M. Searle,⁷⁴ le spectre RMN obtenu sur le mime **1** permet d'obtenir par comparaison des informations intéressantes. L'observation de trois pics à $\delta = 11.07$, 11.32 et 11.64 ppm permet de confirmer la formation de trois tétrades au sein de la structure. Les déplacements chimiques obtenus sont totalement en accord avec ceux obtenus par l'équipe de M. Searle, ce qui confirme que la présence du gabarit peptidique ne perturbe pas l'environnement électronique des tétrades de guanines. Il est intéressant de constater que l'un des pics ($\delta = 11.07$ ppm) est plus large et moins intense, ce qui montre que l'une des tétrades présente des protons imino plus échangeables (c'est-à-dire moins protégé du solvant). La région du spectre allant de 7.3 à 8.5 ppm regroupe l'ensemble des protons -NH du gabarit

peptidique et les protons aromatiques des bases. Cette zone du spectre est ainsi trop complexe pour permettre l'attribution des pics avec le seul spectre ^1H disponible. Néanmoins cette complexité confirme la présence du gabarit peptidique et confirme la nature du mime **1**.

Modélisation moléculaire :

De part l'ensemble des résultats obtenus sur la structure du mime de quadruplexe intermoléculaire **1**, nous nous sommes intéressés à modéliser cette architecture. Les études physico-chimiques et structurales menées permettent de conclure que le motif quadruplexe obtenu se comporte comme celui formé par le complexe d[TTAGGGT]₄ et que la seule différence réside dans la grande stabilité du mime *via* le gain entropique apporté par le gabarit peptidique. La structure proposée par l'équipe de M. Searle (code PDB : 1NP9) a servi de point de départ à cette modélisation. De plus une structure RMN du gabarit peptidique étant disponible,²⁶⁶ le travail a consisté à relier les différents domaines et à minimiser l'énergie du



complexe ainsi obtenu. Le résultat obtenu est présenté sur la Figure 101. La structuration en feuillet β du gabarit peptide permet la présentation des quatre brins nucléiques dans la même direction et les prédispose en une conformation adéquate pour l'appariement. Il est intéressant de constater que les chaînes latérales des lysines qui définissent la longueur des espaceurs utilisés pour lier de manière covalente les oligonucléotides pourraient être raccourcis afin d'augmenter encore la stabilité du motif quadruplexe. De plus les fonctions oximes formées, qui sont des fonctions riches en électrons, créent une cavité susceptible d'accepter un cation. Les études CD (voir *Article 1*) montrent que le gain de stabilité est particulièrement important en présence de potassium, ce qui laisse à penser que cette cavité peut complexer un atome de potassium.

Figure 101 - Modélisation du mime de quadruplexe intermoléculaire **1**. Le ruban vert représente le cyclodécapeptide utilisé comme gabarit. Les atomes d'hydrogène ne figurent pas pour améliorer la lisibilité.

266. Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M., Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates: an NMR and restrained molecular dynamics investigation. *Biopolymers* **1996**, 39 (3), 297-308.

II-2-3 Etudes de l'affinité de ligands d'ADN quadruplexe par SPR

a) Résumé de l'article 2 en français

La recherche de nouveaux ligands de l'ADN quadruplexe est un domaine de recherche très actif. De nouvelles molécules paraissent régulièrement et de nombreuses équipes s'intéressent à la compréhension des phénomènes intervenant dans la reconnaissance des motifs G₄ par ces ligands. Afin d'améliorer ces ligands et d'en développer de nouveaux, il est nécessaire d'étudier les interactions de ces molécules avec différentes conformations de l'ADN quadruplexe. Parmi les différentes techniques disponibles, la Résonance Plasmonique de Surface (SPR) a l'avantage d'apporter des renseignements sur la cinétique et la thermodynamique des interactions étudiées. Malheureusement jusqu'à maintenant, seule l'étude de séquences capables d'un repliement intramoléculaire était possible à cause d'une limitation évidente qui est la perte des différents brins constituant un quadruplexe intermoléculaire lors des étapes de régénération inhérentes à la SPR. L'utilisation du mime de quadruplexe intermoléculaire **1** est ainsi le premier exemple de quadruplexe présentant une topologie semblable à un quadruplexe intermoléculaire à être immobilisé sur surface pour des études SPR. Une fois ses caractéristiques physico-chimiques et structurales déterminées (voir *Article 1*), nous nous sommes intéressés au développement d'un test par SPR capable d'étudier les interactions de petites molécules organiques avec deux topologies différentes de l'ADN quadruplexe et avec un ADN duplexe. Pour cela un mime de quadruplexe intramoléculaire **2** (issu de la séquence télomérique humaine) et un mime de duplexe **3** (riche en guanines) ont été développés et synthétisés en utilisant un gabarit peptidique similaire (pour que les trois architectures étudiées soient semblables) et les différents mimes ont été immobilisés sur une surface pour une étude par SPR. Une série de ligand-modèle (TMPyP4, MMQ1, MMQ3, le peptide FRHR, la Distamycin A et le DODC) présentant des modes d'interaction différents ont été sélectionnés pour comparer les différentes réponses obtenues sur les systèmes développés. L'ensemble de cette étude est décrit dans l'*Article 2*. Le test mis au point permet de déterminer les caractéristiques des interactions de ces molécules avec deux topologies différentes de l'ADN quadruplexe et avec un ADN duplexe. Les différentes constantes de dissociation et les paramètres cinétiques ont été déterminés afin de déterminer l'affinité pour chacun des systèmes et établir la sélectivité des molécules étudiées vis-à-vis de chaque conformation par rapport aux autres. On remarquera que la sélectivité quadruplexe intermoléculaire vs quadruplexe intramoléculaire varie en fonction de la nature du ligand et peut être directement corrélée avec le type de mode d'interaction (empilement, interaction dans les sillons ou dans les boucles,...) du ligand étudié.

b) Article 2 : « Template-Assembled Synthetic G-Quadruplex (TASQ) : A useful System for Investigating the Interactions of Ligands with Constrained Quadruplex Topologies », published in Chem. Eur. J.

Template-Assembled Synthetic G-Quadruplex (TASQ): A Useful System for Investigating the Interactions of Ligands with Constrained Quadruplex Topologies

Pierre Murat,^[a] Romaric Bonnet,^[a] Angéline Van der Heyden,^[a] Nicolas Spinelli,^[a] Pierre Labbé,^[a] David Monchaud,^[b, c] Marie-Paule Teulade-Fichou,^[b] Pascal Dumy,^[a] and Eric Defrancq*^[a]

Abstract: A new biomolecular device for investigating the interactions of ligands with constrained DNA quadruplex topologies, using surface plasmon resonance (SPR), is reported. Biomolecular systems containing an intermolecular-like G-quadruplex motif **1** (parallel G-quadruplex conformation), an intramolecular G-quadruplex **2**, and a duplex DNA **3** have been designed and developed. The method is based on the concept of template-assembled synthetic G-quadruplex (TASQ), whereby quadruplex DNA structures are assembled on a template that allows precise control of the parallel G-quadruplex conformation. Various known G-quadruplex ligands have been used to investigate the affinities of ligands for inter-

molecular **1** and intramolecular **2** DNA quadruplexes. As anticipated, ligands displaying a π -stacking binding mode showed a higher binding affinity for intermolecular-like G-quadruplexes **1**, whereas ligands with other binding modes (groove and/or loop binding) showed no significant difference in their binding affinities for the two quadruplexes **1** or **2**. In addition, the present method has also provided information about the selectivity of ligands for G-quadruplex DNA over the duplex DNA. A numerical parameter,

termed the G-quadruplex binding mode index (G4-BMI), has been introduced to express the difference in the affinities of ligands for intermolecular G-quadruplex **1** against intramolecular G-quadruplex **2**. The G-quadruplex binding mode index (G4-BMI) of a ligand is defined as follows: $G4-BMI = K_D^{intra}/K_D^{inter}$, where K_D^{intra} is the dissociation constant for intramolecular G-quadruplex **2** and K_D^{inter} is the dissociation constant for intermolecular G-quadruplex **1**. In summary, the present work has demonstrated that the use of parallel-constrained quadruplex topology provides more precise information about the binding modes of ligands.

Keywords: DNA • quadruplex • recognition • surface plasmon resonance • template assembly

Introduction

DNA has long been considered as an ideal target for developing novel classes of therapeutic agents. Until recently, the focus has been on double-stranded DNA structures (duplex DNA), in which two sequences of DNA are held together in an antiparallel double-helical architecture through canonical Watson–Crick A/T and G/C base pairing. The targeting of duplex DNA has mainly been realized through intercalators (i.e., small molecules that interact with DNA by intercalating between two adjacent base pairs) or groove binders (i.e., small molecules that interact with DNA in the minor and/or major groove regions).^[1] More recently, the targeting of alternative DNA architectures has been increasingly pursued; in particular, the more interesting G-quadruplex DNA architecture comprising a four-stranded structure of stacked

[a] P. Murat, R. Bonnet, Dr. A. Van der Heyden, Dr. N. Spinelli, Prof. Dr. P. Labbé, Prof. Dr. P. Dumy, Prof. Dr. E. Defrancq
Département de Chimie Moléculaire, UMR CNRS 5250
Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9 (France)
Fax: (+33)476-51-49-46
E-mail: Eric.Defrancq@ujf-grenoble.fr

[b] Dr. D. Monchaud, Dr. M.-P. Teulade-Fichou
Institut Curie, CNRS, UMR 176, Centre Universitaire Paris XI
91405 Orsay (France)

[c] Dr. D. Monchaud
Current address: Institut de Chimie Moléculaire, CNRS UMR 5260
Université de Bourgogne, 21000 Dijon (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200903456>.

guanine tetrads formed by the coplanar arrangement of four guanines, and held together by Hoogsteen bonds.^[2] These quadruplexes can adopt a wide variety of topologies depending on the number of strands involved in the structure, the strand direction, and variations in loop size and sequence (Figure 1).^[3]

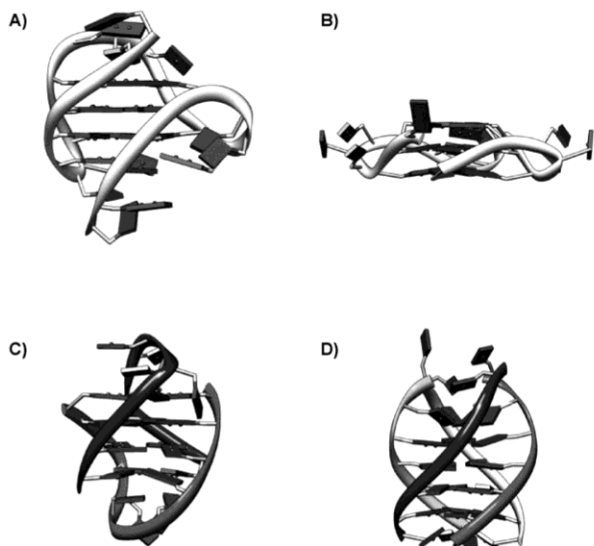


Figure 1. Folded G-quadruplex structures: A) intramolecular quadruplex with antiparallel-stranded conformation (PDB entry: 2HY9); B) intramolecular quadruplex with parallel-stranded conformation (PDB entry: 1KF1); C) bimolecular quadruplex (PDB entry: 156D); and D) tetramolecular quadruplex (PDB entry: 1NP9).

DNA sequences with the potential to form G-quadruplex structures have been reported at numerous places throughout the genome,^[4] both at the chromosomal extremities (i.e., the telomeres)^[5] and the intra-chromosomal regions (i.e., oncogenic promoters).^[6] The formation of quadruplex structures is hypothesized to have consequences at the cellular level, and such structures have been invoked in the control of the expression of certain genes involved in carcinogenesis (“c-Myc”, “c-Kit”, “K-ras”, etc.) as well as in the perturbation of telomeric organization.^[7] Furthermore, the formation of a quadruplex structure inhibits telomere extension by the telomerase enzyme, the activity of which is up-regulated in cancer cells.^[8] The stabilization or induction of G-quadruplex architectures is currently being investigated as a strategy for limiting the growth of cancer cells. A number of small molecules (called G-quadruplex ligands), displaying varying degrees of affinity and more importantly selectivity (i.e. the ability to interact only with quadruplex DNA and not with duplex DNA), have been designed to target G-quadruplex DNA.^[9] This small-molecule approach is not only directed towards the discovery of new anticancer agents, but also the generation of chemical tools for elucidating the biological functions of quadruplexes.

The success of the abovementioned small-molecule approach depends on the development of *in vitro* assays for

monitoring the interaction of ligands with G-quadruplexes. Techniques such as fluorescence resonance energy transfer (FRET) melting,^[10] ESI-MS,^[11] equilibrium dialysis,^[12] and fluorescence-based assays have hitherto been developed.^[13] Even though some of these techniques enable the evaluation of the affinity and selectivity of the ligands, they rarely provide insights into the thermodynamic and kinetic parameters that control the efficiency of the ligand–quadruplex interactions. The use of surface plasmon resonance (SPR) for monitoring the interaction of ligands with quadruplexes has generated significant research interest because it provides information on both the thermodynamic and kinetic parameters of ligand interactions. SPR has been extensively used for studying the interactions of ligands with duplex DNA as well as G-quadruplex DNA.^[14] Unfortunately, the use of SPR for monitoring the interaction of ligands with quadruplex structures has been largely limited to oligonucleotides that can intramolecularly fold into quadruplex by immobilizing a single biotinylated oligonucleotide on the sensor chip. Thus, even though it is very useful, the SPR technique has hitherto been limited to intramolecular quadruplexes, and there is an urgent need to adapt it to other quadruplex structures. We were interested in broadening the scope of the SPR technique by employing it to monitor ligand interactions with other kinds of DNA quadruplexes. Consequently, we turned our attention to tetramolecular quadruplexes, which are a sub-family of intermolecular quadruplex DNA.^[15] These tetramolecular quadruplexes have mainly been used for fundamental studies, most notably for investigating the kinetics of quadruplex formation.^[16] Tetramolecular quadruplexes are interesting from an architectural point of view because, unlike the intramolecular quadruplexes, they offer four identical and fully accessible grooves as well as external tetrads (completely devoid of any connecting loop that might hinder accessibility to both grooves and tetrads).

Our group, along with others, have proposed the use of scaffolds for designing folded DNA structures.^[17] Our strategy is based on the use of a cyclic peptidic scaffold as a topological template for directing the intramolecular assembly of anchored oligonucleotides into a single G-quadruplex topology (Figure 2). It has been conclusively shown that the use of such a peptidic scaffold allows precise control of the parallel-stranded conformation and imparts increased stability to the quadruplex structure.^[17a]

In the present work, three biomolecular systems **1–3**, containing different DNA architectures, have been developed on a peptidic scaffold (Figure 2) and investigated by SPR to obtain key information (thermodynamic/kinetic parameters) on DNA–ligand interactions. As previously reported, **1** forms exclusively a parallel-stranded G-quadruplex.^[17a] The system **2** contains an intramolecular folded quadruplex and represents the control for comparison with previously reported data,^[18] whereas **3** contains duplex DNA. The intramolecular folded quadruplex **2** and the hairpin DNA **3** were both conjugated to the peptidic scaffold so as to obtain a similar surface for the SPR study, allowing direct and reliable

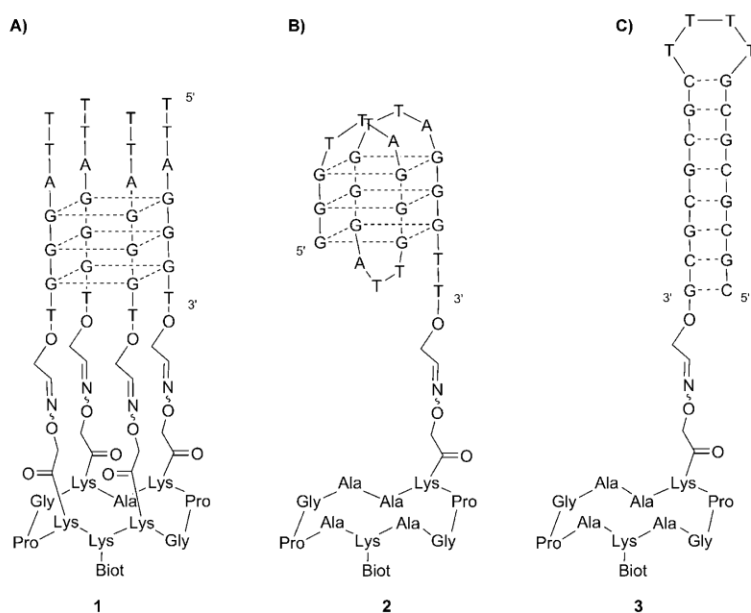


Figure 2. Biomolecular systems **1–3** containing different DNA structures: A) parallel-stranded quadruplex **1**; B) intramolecular folded quadruplex **2**; and C) duplex **3**.

ble comparison between the three systems. A G-rich sequence was chosen for the duplex structure for comparison with G-quadruplex sequences. It was anticipated that G-quadruplex ligands would interact differently with the four-stranded parallel and the single-stranded conformations, a determination that is particularly interesting given the fact that comparable evaluations have only been performed in a few studies.^[11,12] The molecular devices **1–3** enabled concomitant study of the affinity for G-quadruplex (systems **1** and **2**), the selectivity for quadruplex over duplex DNA (**1** and **2** vs. **3**), and the intra-quadruplex selectivity (**1** vs. **2**) for a given ligand.

The aim of the present study has been to facilitate the analysis of the interactions of ligands with different G-quadruplex conformations. Therefore, a representative set of G-quadruplex ligands (see below), each of them being characterized by a typical binding mode (tetrad, groove or loop recognition, or a combination thereof) has been studied to verify the concept. SPR studies showed varying affinities of these ligands for various DNA architectures, thereby pointing to a critical structural requirement that governs their interaction with DNA. A numerical parameter, the G-quadruplex binding mode index (G4-BMI), has been introduced to further exploit the SPR-monitored differential binding of ligands to various DNA architectures. A similar parameter has previously been reported for discriminating between external binders, minor groove binders, and base-pair intercalators of double-stranded DNA by NMR spectroscopy.^[19] The G4-BMI of a ligand, as used in the present work, is defined as follows: $G4-BMI = K_D^{intra}/K_D^{inter}$, where K_D^{intra} is the dissociation constant for intramolecular conformation **2** and K_D^{inter} is the dissociation constant for intermolecular-like conformation **1**. This binding index could be conveniently

used to obtain valuable information about the binding modes of different ligands, in particular for discriminating between those ligands showing a tetrad-stacking mode and those classified as groove and/or loop binders (see below).

Results

The G-quadruplex ligands were carefully chosen so as to cover the full domain of possible binding modes (Figure 3). The ligands TMPyP4, MMQ1, and MMQ3 have been reported to recognize the quadruplex mainly by tetrad stacking. On the other hand, the binding modes of the other three ligands FRHR, distamycin A, and DODC are not known with

certainty, but they are considered to have different main binding modes (see below). Therefore, the first three ligands were anticipated to show significantly different interactions with the four-stranded parallel conformation **1** and the single-stranded conformation **2**, owing to the presence of loops in **2** that may perturb the accessibility of the ligand to the external tetrad. The latter three ligands, on the contrary, were expected to show similar interactions with both of the systems.

To establish a clear comparison between the intermolecular-like **1** and the intramolecular quadruplex **2**, SPR experiments were carried out in buffer containing Na^+ and K^+ cations. Similar immobilization levels of **1–3** were used, and each ligand was injected simultaneously on all channels to permit direct comparison of the recorded responses. A channel containing the unmodified peptidic scaffold (without anchored DNA) was used as a control, and no significant interaction between the ligands and the peptidic scaffold was observed (see Figure S6 in the Supporting Information).^[20] Association/dissociation curves (sensorgrams) were recorded for each ligand, and a typical example is shown in Figure 4. A steady-state plateau was reached for each concentration, which permitted the determination of the equilibrium response, R_{eq} , and subsequent isotherm analysis (see the Supporting Information).

Study of porphyrin TMPyP4 (a π -stacking ligand): TMPyP4 is a tetracationic porphyrin that has been extensively studied by Hurley and co-workers.^[21] TMPyP4 displays a flat aromatic core with four *N*-methylated pyridinium appendages, which increases the π -stacking ability of the ligand (due to a reduction in the electron density of the aromatic part) and the overall quadruplex affinity of the ligand (due to electro-

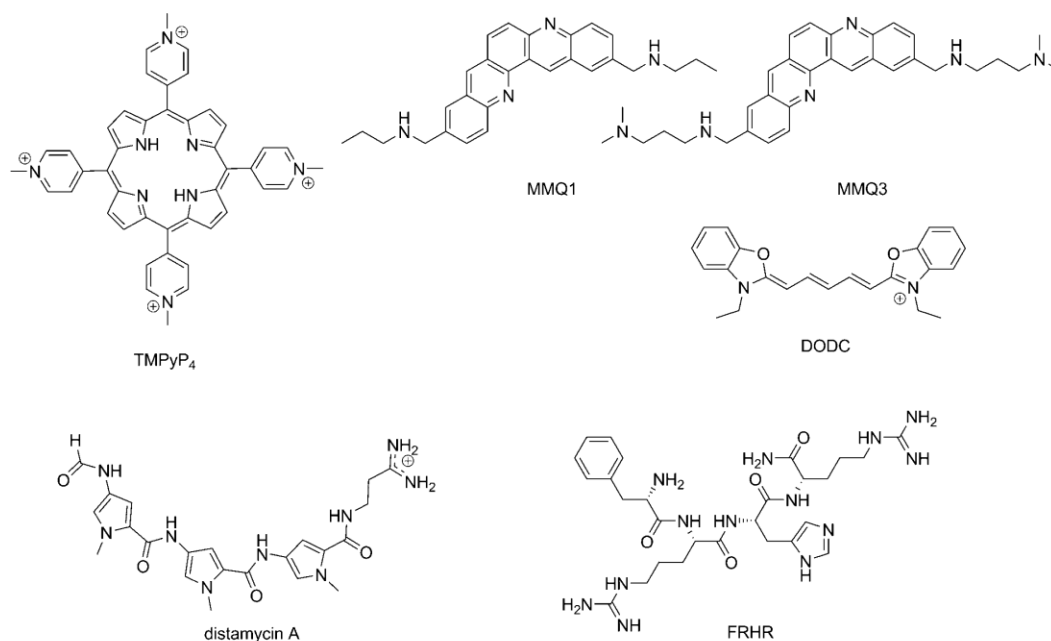


Figure 3. Structures of the different ligands used in the present study.

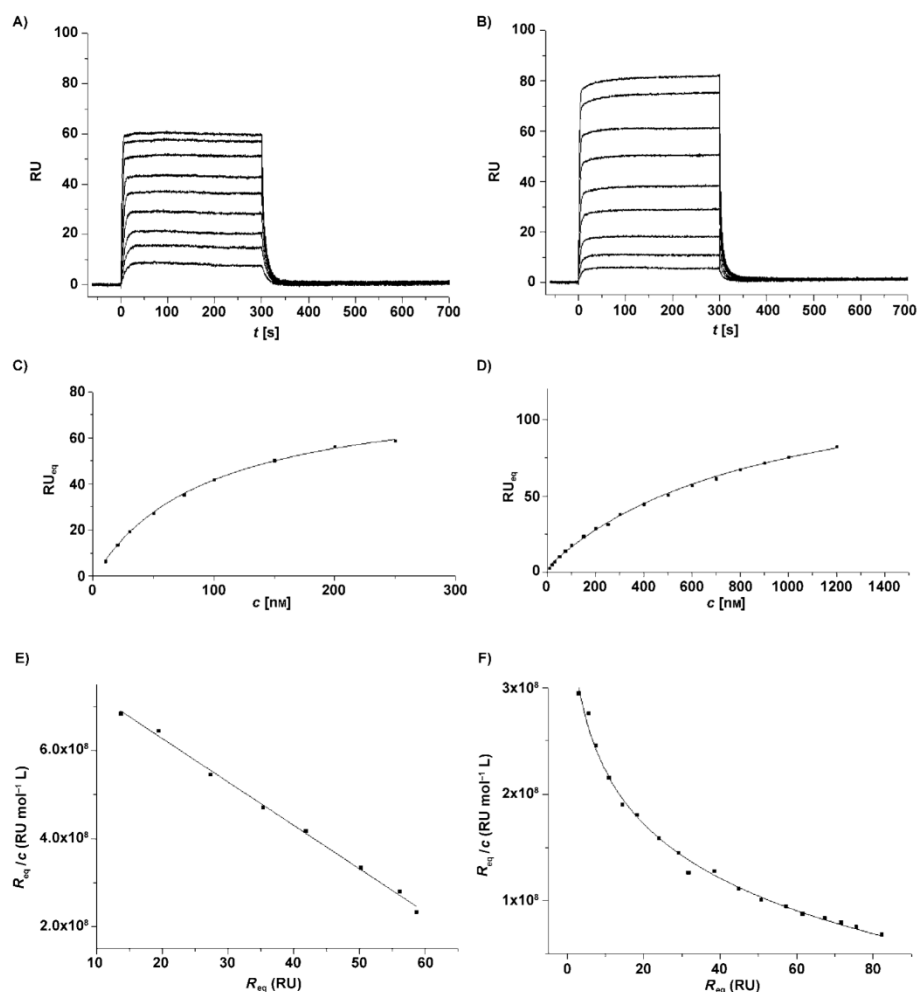
static interactions of the pyridinium groups with the phosphate backbone). The interaction of TMPyP4 with G-quadruplex DNA has been thoroughly investigated by several techniques, including NMR spectroscopy, X-ray studies, and photocleavage experiments.^[22] From the location of the damage resulting from photochemical irradiation, it was deduced that the porphyrin interacts with G-quadruplex DNA by stacking on the last guanine quartet, a finding later confirmed by NMR studies.^[22a] Although evidence for side-interaction with quadruplex loops was identified in one particular study (X-ray structure determined by Parkinson et al.),^[22b] there is overall agreement that the major contribution to quadruplex binding by the TMPyP4 porphyrin comes from π - π stacking. Besides, interaction of TMPyP4 in the groove of quadruplex DNA seems highly unlikely in view of the large, rigid porphyrinic skeleton of this compound. Consequently, the tetracationic porphyrin was chosen as a representative model for the end-stacking mode.

Thermodynamic analysis: Sensorgrams and the resulting isotherm plots for the interactions of TMPyP4 with **1** and **2** are depicted in Figure 4. The dissociation constants K_D^{eq} for the interactions of TMPyP4 with the three DNA conformations **1–3** were estimated from Langmuir analysis of the isotherms (analysis of the systems at equilibrium using a 1:1 interaction model)^[23] (Table 1). The first-approximation analysis revealed that TMPyP4 displayed eight-fold selectivity for G-quadruplex conformation **1** as compared to G-quadruplex conformation **2**. However, the sensorgrams were found to be slightly different, suggesting a disparity between the two interactions (Figure 4a, b). A larger quantity of TMPyP4 was required to reach the saturation level for **2** ($R_{max} \approx 115$)

in comparison to that for **1** ($R_{max} \approx 80$). This result demonstrates that more TMPyP4 is bound to the intramolecular quadruplex **2** in comparison to the intermolecular-like quadruplex **1**.

Kinetic analysis: The Scatchard plot ($R_{eq}/C = f(R_{eq})$; see the Supporting Information) obtained for **1** was quite linear, reflecting a simple 1:1 interaction (Figure 4e). Hence, a 1:1 model was applied for fitting the sensorgrams and to obtain the kinetic rates (dissociation rate k_d and association rate k_a). This kinetic analysis allowed another mode of determination of dissociation constants (as K_D^{kin} in Table 1), yielding in this case an estimated value of 9.7×10^{-8} M, which is close to the value obtained from the Langmuir isotherms ($K_D^{eq} = 9.4 \times 10^{-8}$ M). The agreement between the two values suggests that the interaction of TMPyP4 with quadruplex conformation **1** (parallel-stranded) is indeed a simple 1:1 interaction. The Scatchard plot for **2** was nonlinear (Figure 4f), underlining the fact that there are more complex interactions between TMPyP4 and quadruplex conformation **2** instead of a simple 1:1 interaction. Consequently, the sensorgrams were fitted with a heterogeneous ligand model, and two dissociation constants were estimated from the ratio of the dissociation rate k_d to the association rate k_a as $K_D^{kin} = 8.1 \times 10^{-7}$ M and 1.0×10^{-6} M. The lower dissociation constant ($K_D^{kin} = 8.1 \times 10^{-7}$ M) is in close agreement with the thermodynamic constant obtained from the Langmuir isotherm ($K_D^{eq} = 9.1 \times 10^{-7}$ M).

Due to these more complex interactions in the case of **2**, further SPR experiments were carried out under different ionic conditions (i.e., in buffers containing only Na^+ or K^+ cations, respectively). For system **1**, no significant change



was observed upon thermodynamic and kinetic determination of dissociation constants: Scatchard plots were found to be linear, reflecting a simple 1:1 interaction, and dissociation constants were found to be similar to those obtained in a buffer containing both Na⁺ and K⁺ cations (Table 1). For system **2**, however, the Scatchard plots were found to be slightly different depending on the presence of Na⁺ or K⁺. In a buffered solution containing only K⁺ cations, the Scatchard plot obtained for **2** was nonlinear, whereas in a buffered solution containing only Na⁺ cations the Scatchard plot was quite linear (see Figure S4 in the Supporting Information). These results might be rationalized in terms of system **2** potentially being a mixture of parallel/antiparallel structures (with the possible formation of 3+1 or 1+3 mixed parallel/antiparallel forms) in K⁺ buffer, whereas in Na⁺-containing buffer the structure of the quadruplex is probably antiparallel. Nevertheless, in all cases, the obtained dissociation constants K_D^{eq} and K_D^{kin} were similar to those obtained in buffer solution containing both Na⁺ and K⁺ cations (Table 1).

Figure 4. SPR sensorgrams for the interaction of TMPyP4 (ligand) with the following DNA structures: A) intermolecular quadruplex system **1**, B) intramolecular quadruplex system **2**. The ligand concentration was varied from 10 nM (bottom curve) to 250 nM (top curve) for A) and from 10 nM (bottom curve) to 1200 nM (top curve) for B). C) Adsorption isotherm (fitted with a Langmuir model) for the interaction of TMPyP4 with quadruplex **1**, D) adsorption isotherm (fitted with a Langmuir model) for the interaction of TMPyP4 with quadruplex **2**; E) Scatchard binding plot of the interaction between TMPyP4 and **1**, F) Scatchard binding plot of the interaction between TMPyP4 and **2**.

Table 1. Interaction of different ligands with quadruplex DNA structures **1** and **2** and with duplex DNA **3**. K_D^{eq} = dissociation constants obtained from Langmuir analysis of isotherms; k_a = association rates; k_d = dissociation rates; K_D^{kin} = dissociation constants from fitting of the sensorgrams.

	Intermolecular quadruplex 1				Intramolecular quadruplex 2				Duplex 3			
	K_D^{eq} [M]	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D^{kin} [M]	K_D^{eq} [M]	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D^{kin} [M]	K_D^{eq} [M]	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D^{kin} [M]
TMPyP4	9.4×10^{-8}	1.3×10^6	0.12	9.7×10^{-8}	9.1×10^{-7}	2.0×10^5	0.16	8.1×10^{-7} [a]	8.1×10^{-7}	3.0×10^5	0.23	7.8×10^{-7}
TMPyP4 [b]	8.0×10^{-8}	1.2×10^6	0.09	7.9×10^{-8}	7.7×10^{-7}	3.2×10^5	0.16	5.1×10^{-7} [a]	7.7×10^{-7}	6.7×10^5	0.46	6.9×10^{-7}
TMPyP4 [c]	9.5×10^{-8}	1.1×10^6	0.12	1.0×10^{-7}	8.5×10^{-7}	2.8×10^5	0.22	7.6×10^{-7}	9.9×10^{-7}	2.6×10^5	0.23	9.0×10^{-7}
MMQ1	8.0×10^{-7}	6.8×10^4	0.028	4.1×10^{-7}	1.1×10^{-6}	4.1×10^4	0.057	1.6×10^{-6}	1.8×10^{-5}	7482	0.17	2.4×10^{-5}
MMQ3	6.4×10^{-8}	2.7×10^6	0.153	5.7×10^{-8}	2.8×10^{-7}	2.6×10^6	0.351	1.3×10^{-7} [a]	1.2×10^{-6}	7.0×10^4	0.082	1.2×10^{-6}
FRHR	4.0×10^{-3}	n.d.	n.d.	n.d.	4.2×10^{-3}	n.d.	n.d.	n.d.	5.3×10^{-3}	n.d.	n.d.	n.d.
distamycin A	1.9×10^{-4}	2.3×10^3	0.471	2.1×10^{-4}	2.1×10^{-4}	7.3×10^2	0.190	2.6×10^{-4}	2.9×10^{-4}	717.2	0.222	3.1×10^{-4}
DODC	1.3×10^{-5}	9.2×10^4	0.903	9.8×10^{-6}	7.9×10^{-6}	4.6×10^4	0.246	5.3×10^{-6}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

[a] The curves were fitted with a heterogeneous receptor model; values given correspond to the interaction related to the lowest dissociation constant. The measurements were performed at 25 °C using a running buffer (HEPES-buffered saline), which was prepared using 0.01 M HEPES (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 0.2 M KCl, 3 mM EDTA, and 0.05 % (v/v) surfactant P20. [b] The measurements were performed at 25 °C using a running buffer (HEPES-buffered saline), which was prepared using 0.01 M HEPES (pH 7.4), 0.35 M KCl, 3 mM EDTA, and 0.05 % (v/v) surfactant P20. [c] The measurements were performed at 25 °C using a running buffer (HEPES-buffered saline), which was prepared using 0.01 M HEPES (pH 7.4), 0.35 M NaCl, 3 mM EDTA, and 0.05 % (v/v) surfactant P20.

The differences in the recognition of TMPyP4 by quadruplex systems **1** and **2** were also evident from the association and dissociation rates (Table 1; see Figure S5 in the Supporting Information). The association rate, k_a , for the interaction of TMPyP4 with **1** ($1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) was found to be higher than the association rate obtained for its interaction with **2** ($2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), and this increase could be attributed to easier access to the binding site of **1** on account of its parallel-stranded conformation. On the contrary, the dissociation rate for **1** (0.12 s^{-1}) was lower than that obtained for **2** (0.16 s^{-1}), and this decrease could result from stabilization of the π -stacking mode for **1**. These two effects (i.e., easier access to the binding site and stabilization of the π -stacking mode for **1**) result in an eight-fold enhanced affinity of TMPyP4 for **1** as compared to **2**. The G4-BMI, as described in an earlier section, was thus found to be around 8. The above results corroborate Hurley's work:^[24] TMPyP4 is known to preferentially facilitate the formation of intermolecular G-quadruplex, and it displays selectivity for intermolecular G-quadruplex over intramolecular G-quadruplex. The better affinity for the intermolecular-like quadruplex **1** can be explained in terms of better access to the terminal tetrad where the porphyrin is stacked. From a conformational point of view, it is reasonable to propose that the external tetrad of a tetramolecular loop-free quadruplex is more accessible than that of an intramolecular quadruplex with loops, since the presence of loops is expected to somewhat hamper the access of ligands to the tetrad.

Selectivity for quadruplex over duplex DNA: TMPyP4 is one of the most studied G-quadruplex ligands, despite the fact that it is known to show poor selectivity for quadruplex DNA in comparison to duplex DNA.^[12a,14b,25] Therefore, it was of interest to study the interaction of TMPyP4 with **3**. The duplex DNA–TMPyP4 interactions were studied by following the same procedure as described above for quadruplex DNA. The Scatchard plot was linear, and the values of the dissociation constant determined from the thermodynamic and kinetic analyses were $8.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ and $7.8 \times 10^{-7} \text{ M}$, respectively, in buffer containing Na^+ and K^+ cations (Table 1). A comparison of the dissociation constants obtained for the interactions of TMPyP4 with quadruplex **2** and duplex **3** confirms the poor selectivity of this ligand for quadruplex over the duplex. It is worth mentioning that the dissociation constants reported in the present work are in close agreement with the values reported in the literature.^[21]

The above studies concerning the interactions of TMPyP4 with duplex and quadruplex DNA structures led to the following conclusions: 1) the dissociation constants determined for the interactions of TMPyP4 with quadruplex **2** and duplex **3** are in close agreement with the values reported in the literature,^[21] thus confirming that the recognition phenomena are not influenced by the peptidic template; 2) comparison of the interactions of TMPyP4 with **2** and **3** enables characterization of the selectivity of the ligand towards quadruplex or duplex DNA structures; and 3) the intermolecular quadruplex system **1** with a single G-quadruplex

conformation provides easy access to ligands that interact in a π -stacking binding mode. The stabilization of the interactions of TMPyP4 with the quadruplex structure is further evidenced by the G4-BMI value of about 8.

MMQ1 and MMQ3 (mixed π -stacking/groove-binding ligands): The MMQs are characterized by a pentacyclic quinacridine core that is suitably predisposed for quartet π -overlapping, and bear long amino-containing side-chains that actively participate in quadruplex recognition through electrostatic interactions in the grooves.^[26] MMQ1 and MMQ3 differ from each other in their side chains; MMQ1 has only secondary amine groups in its side-chains, whereas MMQ3 has both secondary and tertiary amine groups in its side-chains (Figure 3). The nature of the side-chain governs the overall charge of the ligand; for instance, MMQ1 and MMQ3 are dicationic and tricationic, respectively, at pH 7.4. This difference has an impact on both their affinities and selectivities for quadruplex DNA. Since MMQ1 and MMQ3 have the same aromatic core but different side chains, these ligands were chosen to compare the abilities of different side chains to interact with the grooves of G-quadruplex DNA structures **1** and **2**.

The affinities of MMQ1 and MMQ3 for DNA structures **1–3** were investigated using the same protocol as described above for TMPyP4. The Scatchard plots were found to be linear for both of these ligands (see Figures S7 and S8 in the Supporting Information), indicating 1:1 interactions.^[27] Furthermore, both the ligands showed higher affinity for the intermolecular quadruplex **1** in comparison to the intramolecular quadruplex **2** (Table 1). Unlike with TMPyP4, similar amounts of both ligands were needed to reach the saturation level (see the Supporting Information), suggesting that the nature of the interaction is similar for both quadruplexes.^[28] The G4-BMI values for MMQ1 and MMQ3 were estimated as 3.9 and 2.2, respectively, which attest to the abilities of both the ligands to stack on G-quadruplex DNA. The introduction of additional amino moieties in MMQ3 appears to increase the affinity of the ligand for both the G-quadruplexes, as has previously been indicated by FRET-melting and G4-FID assays.^[13b] The increased affinity is due to the fact that the additional amino moieties create additional interactions in the groove regions of the two quadruplexes. However, it should be noted that the enhancement in the affinity was more noticeable for the quadruplex system **2** than for **1**. Also, the G4-BMI value for MMQ3 was smaller than that for MMQ1, thus suggesting that MMQ3 is more likely to establish stronger interactions in G-quadruplex grooves due to the presence of the additional amino moieties. In terms of ligand selectivity for quadruplex over duplex DNA structure, MMQ1 showed 21.6-fold higher selectivity for the quadruplex structure, whereas MMQ3 showed only 8.9-fold higher selectivity (Table 2). Again, the obtained results are in good agreement with earlier reports,^[26d] and can be explained by the fact that the more highly cationic nature of MMQ3 results in a higher propensity for association with DNA through random electrostatic interactions.

Table 2. Selectivities and G4-BMI values for the different ligands used in this study.

	Selectivity (quadruplex 2 vs. duplex 3)	G4-Binding mode index
TMPyP4	1.0	8.35
MMQ1	21.6	3.9
MMQ3	8.9	2.2
FRHR	1.2	1.0
distamycin A	0.5	1.2
DODC	n.d.	0.5

Tetrapeptide FRHR and distamycin A: The short FRHR peptide, discovered by combinatorial selection from a tetrapeptide library, is currently used to functionalize aromatic cores, such as acridine or acridone, to increase the selective recognition of G-quadruplex DNA.^[29] Molecular modelling results have shown that the tetrapeptide lies in the groove of G-quadruplex DNA. The dissociation constants of the FRHR peptide with systems **1** and **2** have been evaluated as 4.0 mM and 4.2 mM, respectively (Table 1).^[30] As expected for such a molecule with no π -stacking character, the ligand affinity is quite similar for both the systems **1** and **2**: a G4-BMI equal to 1.0 was obtained. The results evidenced the poor affinity of this ligand alone for DNA (it also showed poor affinity for duplex DNA). Indeed, tetrapeptide FRHR had to be appended to heterocyclic platforms to enhance its affinity.

Distamycin A is a small molecule with antibiotic properties, which binds to the minor groove of the B-form of DNA with high affinity and shows good selectivity for the AT sequence. Distamycin A has been shown to interact with four-stranded parallel DNA quadruplex to form oligonucleotides. Three models have been proposed for distamycin A–quadruplex complexes, in which the ligands bind as head-to-tail dimers in the grooves,^[31] on the terminal tetrad,^[32] or through a dual-mode involving groove binding and tetrad stacking.^[33] However, recent studies have led to a consensus that distamycin A interacts mainly by groove binding. The affinities of distamycin A for the systems **1** and **2** were found to be quite similar, and the G4-BMI value was estimated as 1.2. The above results clearly suggest that distamycin A displays no selectivity for either the intermolecular or intramolecular G-quadruplex, and hence that the π -stacking binding mode is not significantly involved in distamycin A–quadruplex interactions. The results obtained in the present work are in good agreement with those of Randazzo and co-workers, pointing to recognition in the groove region as the major binding mode for distamycin A.^[31] Furthermore, SPR studies have shown that distamycin A has poor selectivity for G-quadruplex over duplex DNA structures.^[34]

DODC: The binding mode of DODC remains unclear, but it has been proposed that it interacts with quadruplex DNA by groove binding,^[14b] single-loop recognition,^[13a] or multi-point anchorage involving grooves and loops.^[35] Therefore, it was reasonable to assume that loops may have an impact on the binding ability of DODC towards DNA structures.

The results showed that DODC has two-fold higher selectivity for quadruplex **2** than for quadruplex **1**. This observation is in agreement with the results of competitive dialysis studies performed by Chaires and co-workers.^[36] The absence of loops in quadruplex **1** decreases the affinity of DODC, leading to a G4-BMI value of 0.5. Furthermore, the absence of a response for concentrations below 50 μ M on the channel functionalized by the duplex DNA **3** (very poor affinity) suggests a high selectivity of DODC for G-quadruplex DNA over double-stranded DNA.

Discussion

The SPR studies provided crucial information about the binding modes of ligands to quadruplex DNA structures. This was used to determine the affinities of ligands for the intermolecular and intramolecular G-quadruplexes **1** and **2**, respectively, the ligand selectivity for quadruplex structures **1** or **2** in comparison to duplex DNA structure **3**, and the intra-quadruplex selectivity (**1** vs. **2**). The selectivity of ligands for intermolecular **1** or intramolecular **2** quadruplexes was used to estimate the numerical parameter G4-BMI. This parameter gives the propensity of a ligand to interact with the external tetrad of the quadruplex, as the design characteristics of quadruplex **1** provide easy access to ligands with a π -stacking binding mode, as opposed to quadruplex **2**, in which the presence of loops impedes the ligand accessibility. In other words, ligand selectivity for intermolecular-like quadruplex **1** could be taken as a signature for the π -stacking binding mode. This concept was verified by using the ligands TMPyP4, MMQ1, and MMQ3, which display π -stacking as their main binding mode, as has been established in previous interaction studies. G4-BMI values higher than two were obtained for these three ligands (Table 2). In fact, all of the abovementioned ligands showed greater affinity for parallel-stranded quadruplex **1** in comparison to antiparallel quadruplex **2**, probably because of their greater accessibility to the quadruplex recognition elements (i.e. external G-tetrad) in **1** as compared to **2**. Furthermore, the SPR studies allowed a more precise quantification of the ability of the side-chains present in the MMQ ligands to interact in the grooves.

The ligands FRHR, distamycin A, and DODC showed G4-BMI values close to 1, which suggest negligible intra-quadruplex selectivity (**1** vs. **2**). The absence of intra-quadruplex selectivity for FRHR, distamycin A, and DODC ligands is consistent with the fact that they do not interact with G-quadruplex through π -stacking as their main binding mode. A G4-BMI value of less than 1 was obtained for DODC, suggesting stronger interaction with quadruplex **2** than with **1**. This stronger interaction with **2** might be attributed to the presence of loops, which is in agreement with earlier results that showed a possible contribution of loops in the recognition of DODC by G-quadruplexes.^[35]

SPR studies also provided valuable information about the kinetics of ligand–quadruplex interactions. The association

(k_a) and dissociation (k_d) constants were estimated for each ligand with the exception of FRHR (Table 1). It was observed that in all cases the association constants k_a were greater for quadruplex **1** than for **2**, suggesting that the guanine tetrads and grooves are more accessible in the intermolecular-like quadruplex **1** in comparison to **2**. The presence of loops in **2** hinders the ligand accessibility. The dissociation constants (k_d), on the other hand, showed different behaviour depending on the ligand binding characteristics. The dissociation constants were found to be greater for quadruplex **2** with the ligands TMPyP4, MMQ1, and MMQ3, which represent those displaying π -stacking as their main binding mode. These observations suggest that, despite the presence of loops, the intramolecular G-quadruplex shows easier dissociation, and that the conformation of quadruplex **1** is more amenable to π -stacking interactions. On the contrary, the ligands distamycin A and DODC gave higher dissociation constants (k_d) for quadruplex **1** than for **2**, which again underlines the importance of loops in generating additional ligand–quadruplex interactions.

Conclusion

Biomolecular devices comprising intermolecular and intramolecular G-quadruplexes and duplex DNA have been designed based on the TASQ concept. Combined with SPR, these devices can be employed as powerful tools for investigating the interactions of different ligands with DNA G-quadruplexes. The present study has provided critical information about ligand interactions with DNA quadruplexes. In addition to ligand affinity for G-quadruplex DNA and selectivity for G-quadruplex DNA against duplex DNA, the present study has also afforded useful insights into the binding modes employed by the ligands in ligand–quadruplex interactions. The introduction of a numerical parameter, G4-BMI, helps to evaluate the binding mode of ligands without any structural studies. A high G4-BMI value correlates with π -stacking as the major binding mode, whereas a low G4-BMI value suggests that π -stacking is not the major binding mode. It should also be noted that the G4-BMI results reported in this work are in good agreement with those of previously reported structural or comparative affinity studies for ligand–quadruplex interactions. Further studies are in progress with several other ligands to determine whether G4-BMI values can be correlated with quadruplex selectivity, since selectivity can originate from multiple and optimized structural interactions of ligands with the DNA target. Other specific constrained conformations of G-quadruplex DNA, such as the antiparallel form, are to be included in these studies.

Experimental Section

The biomolecular systems **1–3** were prepared, as previously reported, by condensation of a peptidic scaffold bearing aminoxy groups with oligo-

nucleotides containing a 3'-aldehyde functionality.^[17a] The ODNs ⁵TTAGGGTX³, ⁵GGG(TTAGGG)₃TTX³, and ⁵CGCGCGCGTTTTTCGCGCGCGX³, in which X represents the 3'-aldehyde-containing linker, were anchored on the peptidic scaffold to obtain systems **1**, **2**, and **3**, respectively (see the Supporting Information). Concentrations were determined using molar extinction coefficients ($\epsilon_{260\text{ nm}} = 276\,800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{260\text{ nm}} = 231\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, and $\epsilon_{260\text{ nm}} = 166\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ for **1**, **2**, and **3**, respectively) calculated using the nearest-neighbour method. TMPyP4, MMQ1, and MMQ3 were synthesized as described previously.^[21c,26c] The tetrapeptide FRHR was synthesized using classical Fmoc/tBu chemistry on a Rink amide resin using commercially available amino acids from Novabiochem. The peptide was cleaved from the resin and deprotected with TFA/triisopropylsilane/H₂O (95:2.5:2.5) for 3 h. The crude peptide was purified by RP-HPLC and then characterized by ESI-MS. DODC and distamycin A were obtained from Fluka and Sigma, respectively.

SPR measurements were performed on a BIAcore T100 (Biacore AB, Sweden) operated with BIAcore T100 evaluation Software 2.0.1. All measurements were performed at 25 °C using a running buffer (HEPES-buffered saline), which was prepared using 0.01 M HEPES (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 0.2 M KCl, 3 mM EDTA, and 0.05 % (v/v) surfactant P20. Intermolecular-like quadruplex **1**, intramolecular quadruplex **2**, and duplex **3** were immobilized on streptavidin-coated surfaces (SA sensor chip, BIAcore AB), as reported previously.^[17a] After conditioning the surface with three 1 min injections of 1 M NaCl/0.05 M NaOH, a solution of **1–3** (50 nM in R.B.) was injected at 2 $\mu\text{L min}^{-1}$ until the attainment of final responses of 647 RU, 648 RU, and 643 RU for **1**, **2**, and **3**, respectively. Binding experiments were performed by injecting different ligands in the four channels at a rate of 30 $\mu\text{L min}^{-1}$ (the duration time of the injection was determined by the nature of the ligand under study). Surfaces were regenerated by injecting glycine solution (10 mM, pH 2). Unmodified peptidic scaffold was also immobilized on surfaces for control studies. Curves obtained on the control surfaces were deducted from the curves obtained on the surfaces bearing the quadruplex and duplex structures to eliminate the effect of refractive index changes and to apply a correction for non-specific interactions. The absence of a mass transport limitation on the experiments was checked on each surface by separately running one injection of each ligand for 120 s at different flow rates ranging from 10 to 70 $\mu\text{L min}^{-1}$. The curves obtained could be overlaid, confirming the kinetic control of the experiments.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Ministère de la Recherche. The authors are grateful for access to synthesis and surface characterization platforms as part of the NanoBio program, and to C. Bücher for the preparation of TMPyP4. The Cluster de Recherche Chimie de la Région Rhône-Alpes is acknowledged for financial support. The authors wish to thank Prof. Y. Singh for careful reading of the manuscript.

- [1] a) L. H. Hurley, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 188–200; b) D. Roeland Boer, A. Canals, M. Coll, *Dalton Trans.* **2009**, 399–414.
- [2] S. Balasubramanian, S. Neidle, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 345–353.
- [3] a) S. Neidle, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 239–250; b) J. Dai, M. Carver, D. Yang, *Biochimie* **2008**, *90*, 1172–1183; c) S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5402–5415.
- [4] a) A. K. Todd, M. Johnston, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2901–2907; b) J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2908–2916; c) J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 406–413.
- [5] E. H. Blackburn, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 113–129.
- [6] Y. Qin, L. H. Hurley, *Biochimie* **2008**, *90*, 1149–1171.

- [7] a) S. Neidle, *FEBS J.* **2010**, *277*, 1118–1125; b) A. De Cian, L. Lacroix, C. Douarre, N. Temine-Smaali, C. Trentesaux, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, *Biochimie* **2008**, *90*, 131–155; c) L. Oganessian, J. Karlseder, *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 4013–4025.
- [8] a) L. Oganessian, T. M. Bryan, *BioEssays* **2007**, *29*, 155–165; b) N. Maizels, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 1055–1059; c) L. Kelland, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4960–4963; d) A. De Cian, G. Cristofari, P. Reichenbach, E. DeLemos, D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, K. Shin-ya, L. Lacroix, J. Lingner, J.-L. Mergny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17347–17352.
- [9] For recent reviews, see: a) M. Franceschin, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2225–2238; b) A. Arola, R. Vilar, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1405–1415; c) D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 627–636.
- [10] A. De Cian, L. Guittat, M. Kaiser, B. Saccà, S. Amrane, A. Bourdoncle, P. Alberti, M.-P. Teulade-Fichou, L. Lacroix, J.-L. Mergny, *Methods* **2007**, *42*, 183–195.
- [11] F. Rosu, E. de Pauw, V. Gabelica, *Biochimie* **2008**, *90*, 1074–1087.
- [12] a) J. Ren, J. B. Chaires, *Biochemistry* **1999**, *38*, 16067–16075; b) P. A. Ragazzon, N. C. Garbett, J. B. Chaires, *Methods* **2007**, *42*, 173–182; c) P. A. Ragazzon, J. B. Chaires, *Methods* **2007**, *43*, 313–323.
- [13] a) S. Paramasivan, P. H. Bolton, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, e106; b) D. Monchaud, C. Allain, H. Bertrand, N. Smargiasso, F. Rosu, V. Gabelica, A. De Cian, J.-L. Mergny, M.-P. Teulade-Fichou, *Biochimie* **2008**, *90*, 1207–1223.
- [14] a) J. E. Redman, *Methods* **2007**, *43*, 302–312; b) E. W. White, F. Taniouss, M. A. Ismail, A. P. Reszka, S. Neidle, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *Biophys. Chem.* **2007**, *126*, 140–153; c) L. Wang, C. Bailly, A. Kumar, D. Ding, M. Bajic, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 12–16; d) E. M. Rezler, J. Seenisamy, S. Basyam, M.-Y. Kim, E. White, W. D. Wilson, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9439–9447.
- [15] a) D. Sen, W. Gilbert, *Nature* **1988**, *334*, 364–366; b) D. Sen, W. Gilbert, *Nature* **1990**, *344*, 410–414; c) L. Oganessian, I. K. Moon, T. M. Bryan, M. B. Jarstfer, *EMBO J.* **2006**, *25*, 1148–1159; d) L. Oganessian, M. E. Graham, P. J. Robinson, T. M. Bryan, *Biochemistry* **2007**, *46*, 11279–11290.
- [16] a) J.-L. Mergny, A. De Cian, A. Ghelab, B. Saccà, L. Lacroix, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 81–94; b) C. Bardin, J.-L. Leroy, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *36*, 477–488; c) A. De Cian, J.-L. Mergny, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2483–2493.
- [17] a) P. Murat, D. Cressend, N. Spinelli, A. Van der Heyden, P. Labbé, P. Dumy, E. Defrancq, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2588–2591; b) M. Nikan, J. C. Sherman, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4978–4980; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4900–4902; c) M. Nikan, J. C. Sherman, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5211–5218; d) G. Oliviero, J. Amato, N. Borbone, A. Galeone, L. Petraccone, M. Varra, G. Piccialli, L. Mayol, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 889–898; e) J. Amato, G. Oliviero, N. Borbone, S. D'Errico, G. Piccialli, P. Mailliet, F. Rosu, E. De Pauw, V. Gabelica, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 165–166; f) G. Oliviero, N. Borbone, J. Amato, S. D'Errico, A. Galeone, G. Piccialli, M. Varra, L. Mayol, *Biopolymers* **2009**, *91*, 466–477.
- [18] The sequence (TTAGGG)₄ has been thoroughly studied with regard to its structure and ligand binding.
- [19] S. Di Micco, C. Bassarello, G. Bifulco, R. Riccio, L. Gomez-Paloma, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 230–234; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 224–228.
- [20] SPR studies have already been performed with the same intramolecular G-quadruplex sequence using MMQ1. Similar dissociation constants were obtained, further confirming that the peptidic scaffold has no significant impact on the recognition properties.
- [21] a) F. Xiaoguang, H. Han, R. T. Wheelhouse, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3561–3570; b) E. Izbicka, R. T. Wheelhouse, E. Raymond, K. K. Davidson, R. A. Lawrence, D. Sun, B. E. Windle, L. H. Hurley, D. D. Von Hoff, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 639–644; c) D.-F. Shi, R. T. Wheelhouse, D. Sun, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4509–4523; d) A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11593–11598; e) D. Sun, K. Guo, J. J. Rusche, L. H. Hurley, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6070–6080; f) K. Guo, A. Pourpak, K. Beetz-Rogers, V. Gokhale, D. Sun, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10220–10228; g) R. T. Wheelhouse, D. Sun, H. Han, F. Xiaoguang, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3261–3262; h) I. M. Dixon, F. Lopez, J.-P. Esteve, A. M. Tejera, M. A. Blasco, G. Pratiel, B. Meunier, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 123–132.
- [22] a) A. T. Phan, V. Kuryavyi, H. Y. Gaw, D. J. Patel, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 167–173; b) G. N. Parkinson, R. Ghosh, S. Neidle, *Biochemistry* **2007**, *46*, 2390–2397.
- [23] In a 1:1 interaction model, the different sites for anchoring are presumed to be equivalent and independent (no allosteric effect is involved).
- [24] M.-Y. Kim, M. Gleason-Guzman, E. Izbicka, D. Nishioka, L. H. Hurley, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3247–3256.
- [25] a) A. De Cian, L. Guittat, K. Shin-ya, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2005**, *49*, 235–236; b) D. Monchaud, C. Allain, M.-P. Teulade-Fichou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4842–4845; c) A. Granzhan, H. Ihmels, K. Jager, *Chem. Commun.* **2009**, 1249–1251; d) P. Wang, L. Ren, H. He, F. Liang, X. Zhou, Z. Tan, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1155–1159.
- [26] a) O. Baudoin, M.-P. Teulade-Fichou, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5458–5470; b) J.-L. Mergny, L. Lacroix, M.-P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittat, M. Hoarau, P. B. Arimondo, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, J.-F. Riou, T. Garestier, C. Hélène, Guittat, D. Monchaud, M. Jourdan, N. Saettel, J.-L. Mergny, M.-P. Teulade-Fichou, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 655–666; d) M.-P. Teulade-Fichou, C. Carrasco, L. Guittat, C. Bailly, P. Alberti, J.-L. Mergny, A. David, J.-M. Lehn, W. D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4732–4740.
- [27] For MMQ3, despite a linear Scatchard plot, the sensorgrams were found to be unsuitable for fitting with a 1:1 model for kinetic analysis. Therefore, a heterogeneous model was used, which afforded two dissociation constants K_D^{kin} . Only the one that was consistent with K_D^{eq} was taken into consideration.
- [28] It should be noted that these results confirm that similar immobilization levels were achieved for the different systems, thus validating the previous study with TMPyP4.
- [29] a) J. A. Schouten, S. Ladame, S. J. Mason, M. A. Cooper, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5594–5595; b) S. Ladame, J. A. Schouten, J. Stuart, J. Roldan, S. Neidle, S. Balasubramanian, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2925–2931; c) J. E. Redman, J. M. Granadino-Roldan, J. A. Schouten, S. Ladame, A. P. Reszka, S. Neidle, S. Balasubramanian, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 76–84.
- [30] It should be noted that the sensorgrams were found to be unsuitable for fitting for kinetic analysis due to significant injection peaks.
- [31] a) L. Martino, A. Virno, B. Pagano, A. Virgilio, S. Di Micco, A. Galeone, C. Giancola, G. Bifulco, L. Mayol, A. Randazzo, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 16048–16056; b) B. Pagano, A. Virno, C. A. Mattia, L. Mayol, A. Randazzo, C. Giancola, *Biochimie* **2008**, *90*, 1224–1232.
- [32] M. J. Cocco, L. A. Hanakahi, M. D. Huber, N. Maizels, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2944–2951.
- [33] J. B. Moore, F. Cuenca, M. Searcey, S. Neidle, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3479–3488.
- [34] It should be noted that the affinity of distamycin A for duplex DNA is underestimated. Indeed, distamycin A is expected to bind with higher affinity to the AT duplex sequence. Consequently, the selectivity for G-quadruplex versus duplex is lower than that specified (Table 2).
- [35] Q. Chen, I. D. Kuntz, R. H. Shafer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2635–2639.
- [36] J. Ren, J. B. Chaires, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 424–425.

Received: December 17, 2009
Revised: February 23, 2010
Published online: April 15, 2010

Template Assembled Synthetic G-Quadruplex (TASQ): A useful system for investigating the interactions of ligands with constrained quadruplex topologies.

Pierre Murat, Romaric Bonnet, Angéline Van der Heyden, Nicolas Spinelli, Pierre Labbé, David Monchaud, Marie-Paule Teulade-Fichou, Pascal Dumy and Eric Defrancq

Supporting information

Table of contents

Abbreviations.....	p2
Synthesis of the mimics 1-3.....	p2
<i>General</i>	p2
<i>Linear peptide 4</i>	p4
<i>Cyclic peptide 5</i>	p4
<i>Unprotected cyclic peptide 6</i>	p4
<i>Protected aminoxy peptide 7</i>	p4
<i>Aminoxy peptide 8</i>	p4
<i>3'Diol containing oligonucleotides 9 and 10</i>	p4
<i>3'Aldehyde containing oligonucleotides 11 and 12</i>	p5
<i>Mimics 2 and 3</i>	p5
Studies by Surface Plasmon Resonance (SPR).....	p6
TMPyP ₄	p7
MMQ ₁	p11
MMQ ₃	p12
FRHR.....	p13
Distamycin A.....	p14
DODC.....	p15

Abbreviations

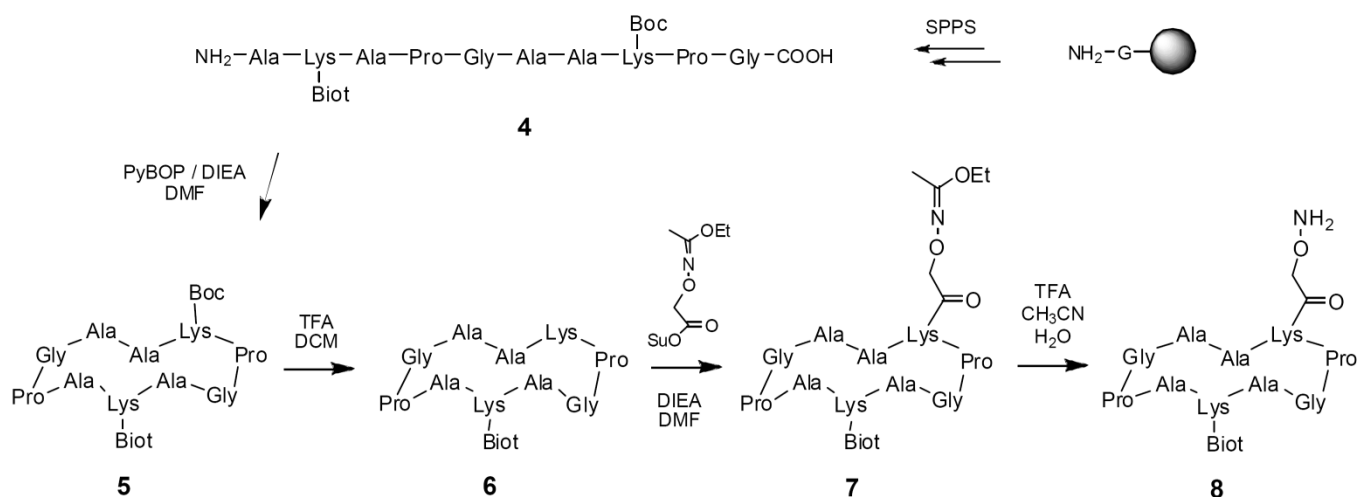
Biot: biotine; Boc: *tert*-butyloxycarbonyl; LCAA-CPG: long chain alkyl amine controlled pore glass; DCM: dichloromethane; DIEA: diisopropylethylamine; ESI-MS: electrospray ionisation mass spectrometry; Fmoc: fluorenylmethyloxycarbonyl; MALDI-ToF MS: matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry; ODN: oligodeoxyribonucleotide; PyBOP: (benzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate; RP-HPLC: reversed-phase high pressure liquid chromatography; RT: room temperature; Su: succinimidyl ester; TFA: trifluoroacetic acid.

Synthesis of the DNA mimics 1- 3

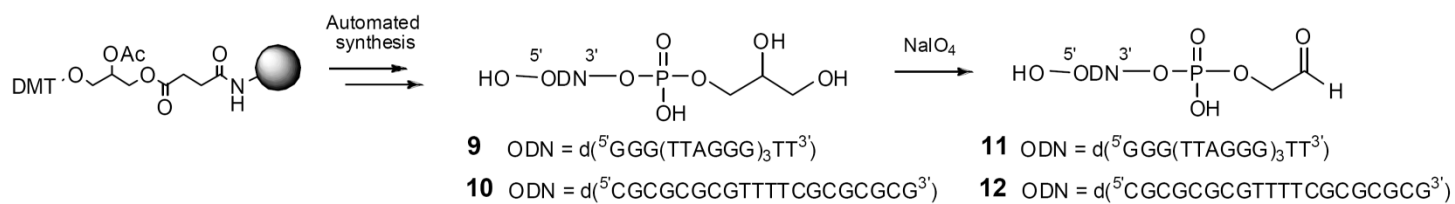
General. All solvents and reagents used were of highest purity commercially available. *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -biotinyl-*L*-lysine was obtained from VWR International (Fontenay sous Bois, France). RP-HPLC analyses and purifications were performed on a Gilson HPLC system with dual wavelength detector. RP-HPLC analyses of oligonucleotides were performed on a Nucleosil C18 column (Macherey Nagel, 250 x 4.6 mm, 5 μ m) using the following solvent system: solvent A, 50 mM triethylammonium acetate buffer containing 5% acetonitrile; solvent B, acetonitrile containing 5% water; flow rate of 1 mL.min⁻¹; a linear gradient of 0-45 % B was applied in 20 minutes. UV absorbance was monitored at 260 nm and 280 nm simultaneously. Purifications were performed on a μ -Bondapak C-18 column (Macherey-Nagel Nucleosil, 10 x 250 mm, 7 μ m) with similar gradient at a flow rate of 4 mL.min⁻¹. RP-HPLC analyses of peptides were performed on a Nucleosil C18 column (Macherey Nagel, 120 Å, 30 x 4.6 mm, 3 μ m) using the following solvent system: solvent A, water containing 1% TFA; solvent B, acetonitrile containing 1% TFA and 10% H₂O; flow rate of 1.3 mL.min⁻¹ was employed with a linear gradient (5 to 100% B in 15 min.). UV absorbance was monitored at 214 nm and 250 nm simultaneously. Semipreparative column (Delta -Pak™ 100 Å, 200 x 2.5 mm, 15 μ m) were used to purify peptides by using an identical solvent system at a flow rate of 22 mL.min⁻¹. ESI mass spectra were measured on an Esquire 3000 spectrometer from Bruker. MALDI-ToF mass spectra were performed on an Autoflex Bruker using hydropiccolinic acid (HPA, 45 mg; ammonium citrate 4 mg in 500 μ L H₂O/CH₃CN) as matrix. Prior to MALDI-ToF analysis, samples were exchanged on DOWEX 50 W X8 resin (ammonium form).

The intermolecular-like quadruplex **1** has been synthesized as previously described (Murat, P., Cressend, D., Spinelli, N., Van der Heyden, A., Labbé, P., Dumy, P. and Defrancq, E. (2008) A novel Conformationally constrained parallel G quadruplex. *ChemBioChem*, **9**, 2588-2591).

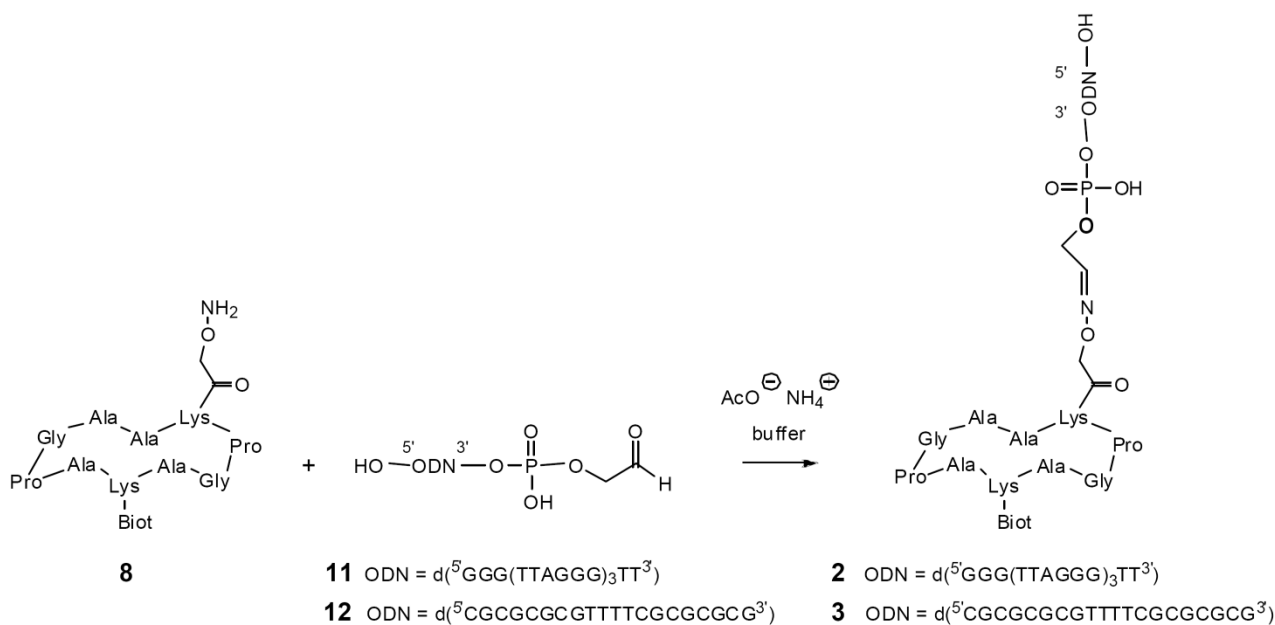
The intramolecular quadruplex **2** and the ds-DNA mimic **3** have been synthesized by adapting the previous method (Scheme S1, S2 and S3).



Scheme S1 – Synthesis of the peptidic scaffold.



Scheme S2 – Synthesis of the 3'-aldehyde containing oligonucleotides.



Scheme S3 – Synthesis of the systems **2** and **3**.

Linear peptide 4. The synthesis was performed on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer using Fmoc/tBu strategy on a SASRIN[®] resin. The peptide **4** was released from the resin using a solution of TFA/DCM (1/99, v/v). After evaporation under vacuum, peptide **4** was precipitated with ether. ESI-MS (+): m/z calcd: 1193.4, m/z found: 1193.5 [M+H]⁺.

Cyclic peptide 5. Linear peptide **4** (1 equiv) was dissolved in DCM (0.5 mmol.L⁻¹) then PyBOP (1.5 equiv) and DIEA (to obtain pH 8-9) were added. The solution was stirred at RT for 2h, the solvent was removed under vacuum and the peptide **5** was precipitated with ether.

ESI-MS (+): m/z calcd: 1174.6, m/z found: 1174.5 [M+H]⁺.

Unprotected cyclic peptide 6. Peptide **5** was dissolved in DCM / TFA (1:1, v/v) and stirred at RT for 1 h. The solvent was removed under vacuum and the peptide **6** precipitated with ether. ESI-MS (+): m/z calcd: 1074.4, m/z found: 1074.5 [M+H]⁺.

Protected aminoxy peptide 7. Peptide **6** was dissolved in anhydrous DMF (0.01 mol.L⁻¹) in presence of DIEA (to obtain pH 8-9) and *N*-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-ethoxyethylidenaminoxy) acetate (4.5 equiv) was added. The solution was stirred at RT for 2 h and the solvent was removed under vacuum. The peptide was purified using RP-HPLC and freeze-dried.

ESI-MS (+): m/z calcd: 1217.7, m/z found: 1217.4 [M+H]⁺.

For a complete description of the synthesis of *N*-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-ethoxyethylidenaminoxy) acetate, see: Foillard, S., Rasmussen, M. O., Razkin, J., Boturyn, D. and Dumy, P. (2008) 1-Ethoxyethylidene, a New Group for the Stepwise SPPS of Aminoxyacetic Acid Containing Peptides. *J. Org. Chem.*, **73**, 983- 991.

Aminoxy peptide 8. Peptide **7** was dissolved in a solution of TFA/CH₃CN/H₂O (25:25:50, v/v/v) and stirred at RT for 10 min. The solution was then concentrated under vacuum and used for the coupling reaction without further purification.

³Diol oligonucleotides 9 and 10. Automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides was performed on a 3400 DNA synthesizer from Applied Biosystems by using standard β-cyanoethyl phosphoramidite chemistry on a 3'-glyceryl LCAA-CPG resin (from Eurogentec). After the ODN chain elongation, the ODNs were cleaved from the resin and deprotected with an aqueous ammoniac solution (28%) for 16 h at 55°C and the ODNs were purified by using RP-HPLC. Removal of the 5'-dimethoxytrityl ether protecting group was carried out by dissolving the ODNs in an aqueous acetic acid solution (80%) for 1h at RT. After freeze-drying the residue was dissolved in water and washed thoroughly with ether.

For **9**, ESI-MS (-): m/z calcd: 7415.8, m/z observed: 7418.7 [M-H]⁻.

For **10**, MALDI-ToF: m/z calcd: 6256.1, m/z observed: 6252.4 [M-H]⁻.

3' Aldehyde oligonucleotides **11** and **12**. The oligonucleotides were dissolved in an aqueous solution of sodium metaperiodate (20 equiv) to reach a concentration of 10^{-3} M. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h then the *3'*aldehyde containing ODNs were purified using size exclusion chromatography on NAP10 column.

Systems 2 and 3. *3'*-Aldehyde containing oligonucleotides **11** and **12** were dissolved in an ammonium acetate buffer (0.4 M, pH 4.5) at a concentration at 10^{-3} M, then peptide **8** (1.2 equiv) was added. The solution was stirred at 50°C for 24 h. The crude mixture was purified by RP-HPLC. **2** and **3** were obtained in a 37% and 66% yield, respectively.

For **2**, MALDI-ToF: m/z calcd: 8515.1, m/z observed: 8515.2 [M-H]⁻.

For **3**, MALDI-ToF: m/z calcd: 7354.4, m/z observed: 7354.4 [M-H]⁻.

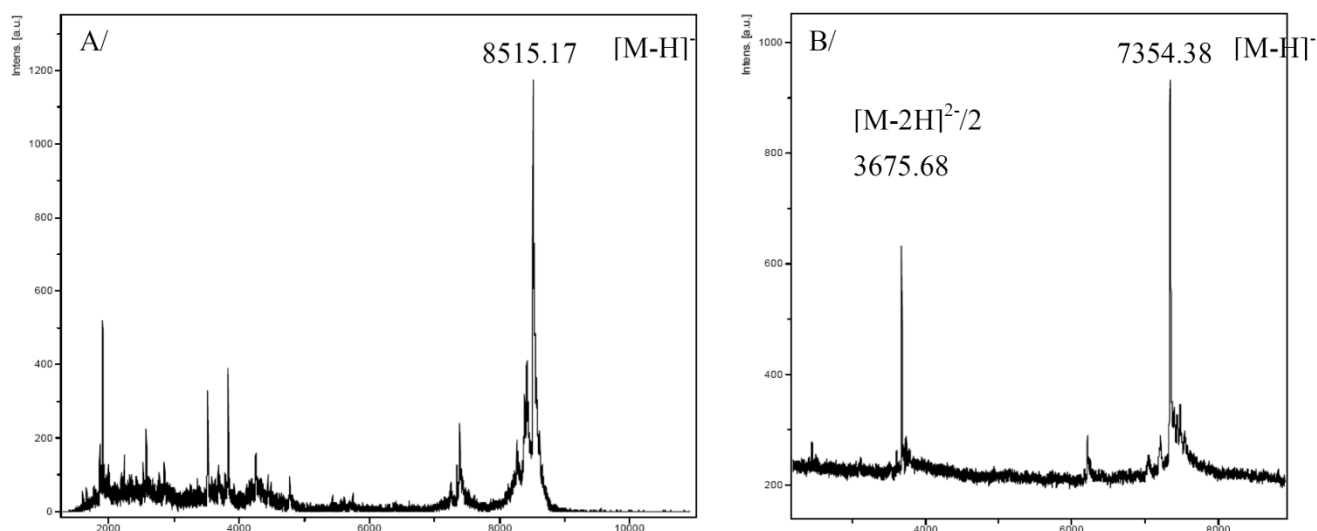


Figure S1 - MALDI-ToF Ms spectrum (HPA) of A/ purified conjugate **2**, B/ purified conjugate **3**

Data Evaluation of the SPR System

The dissociation constant, $K_{Deq} = 1 / K_A$, of G-quadruplex DNA/ligands interactions is evaluated by fitting data of the steady state response level, Req , to the Langmuir adsorption equation: $Req/Rmax = K_A.C_{free} / (1 + K_A.C_{free})$, where Req and $Rmax$ denote the SPR signal corresponding to the steady state response and to the complete saturation of immobilized acceptor with analyte, respectively, and C_{free} to the concentration of the ligand in solution. A mathematical transformation of this equation affords the model used for the construction of Scatchard plots: $Req / C = n.K_A.Rmax - K_A.Req$, where n denotes the stoichiometry of the interaction. A linear Scatchard plot will indicate a 1:1 interaction (the presence of one interaction site or the presence of multiple independent and equivalent interaction sites), a non linear Scatchard plot will indicate a more complex interaction (due to the presence of non-equivalent or non-independent (allosteric effect) sites). This information is crucial to determine the model that will be used for the kinetic analyses.

The rate constant of G-quadruplex DNA/ligands interactions were calculated by a non-linear analysis of the association and dissociation curves using the SPR kinetic evaluation software BIAevaluation 2.0.1 (BIACORE). The kinetic data of 1:1 interactions were interpreted in the context of a first order kinetic model: $A + B = AB$, where A is the studied ligands and B the G-quadruplex receptor. From the analysis of the sensorgrams of the dissociation phase, dissociation rate constants (k_d) were calculated: $\ln (R_t / R_0) = - k_d (t - t_0)$, where R_t and R_0 represent the SPR signal expressed in RU at time t and at the starting time of dissociation, t_0 , respectively. For the association phase, the slope value in a plot of $\ln (dR / dt)$ against t is expressed as $- k_s$. Based on this value, the association rate constant (k_a) was calculated: $k_s = C.k_a + k_d$, where C denotes the concentration of the studied ligand. The value of the kinetic dissociation constant (K_{Dkin}) was calculated from the values of the association rate constant and the dissociation rate constant: $K_{Dkin} = k_d / k_a$. The kinetic data of more complex interactions were interpreted in the context of the heterogeneous receptor model: $A + BB' + A = ABB' + A = ABB'A$, where A is the studied ligands and BB' represents the G-quadruplex receptor possessing two interaction sites B and B' . From the analysis of the sensorgrams the association constants, k_{a1} and k_{a2} , and the dissociation constants, k_{d1} and k_{d2} , were calculated. Finally, the two dissociation constants were calculated as $K_{Dkin1} = k_{d1} / k_{a1}$ and $K_{Dkin2} = k_{d2} / k_{a2}$.

The self-consistency of the data obtained from the SPR system was confirmed when the K_{Dkin} values were found to be approximately equal to those of the equilibrium constants, K_{Deq} .

TMPyP4 in buffer containing NaCl and KCl

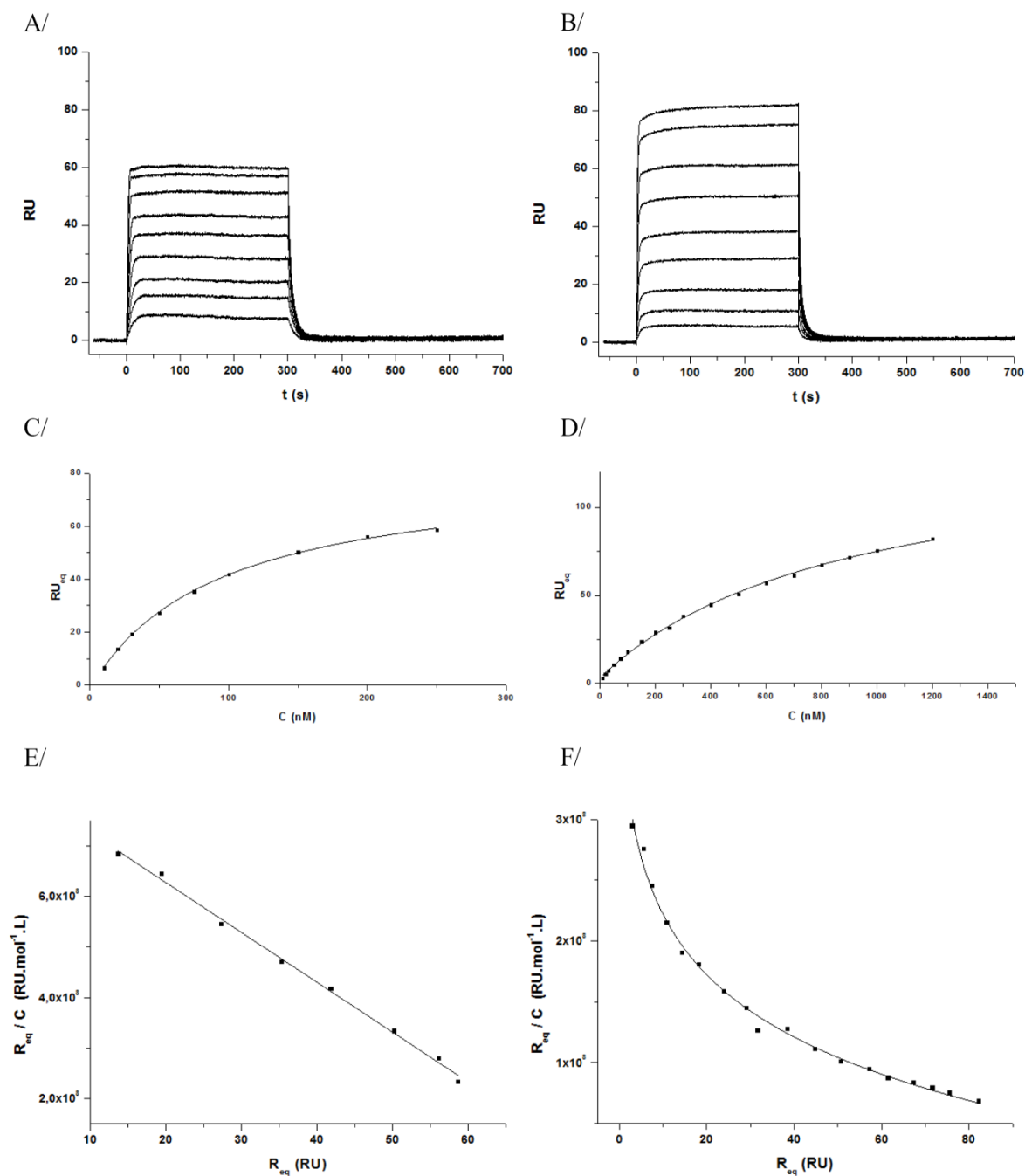


Figure S2 - SPR sensorgrams for the interaction of TMPyP4 with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2**. The ligand concentration was varied from 10nM (bottom curve) to 250nM (top curve) for A) and from 10nM (bottom curve) to 1200nM (top curve) for B). Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of TMPyP4 with C) the intermolecular-like quadruplex **1**, D) the intramolecular quadruplex **2**. Scatchard binding plots of the interaction between TMPyP4 and E) the intermolecular-like quadruplex **1** (the curve is a linear fitting), F) the intramolecular quadruplex **2** (the curve is only shown for better clarity).

TMPyP4 in buffer containing only KCl

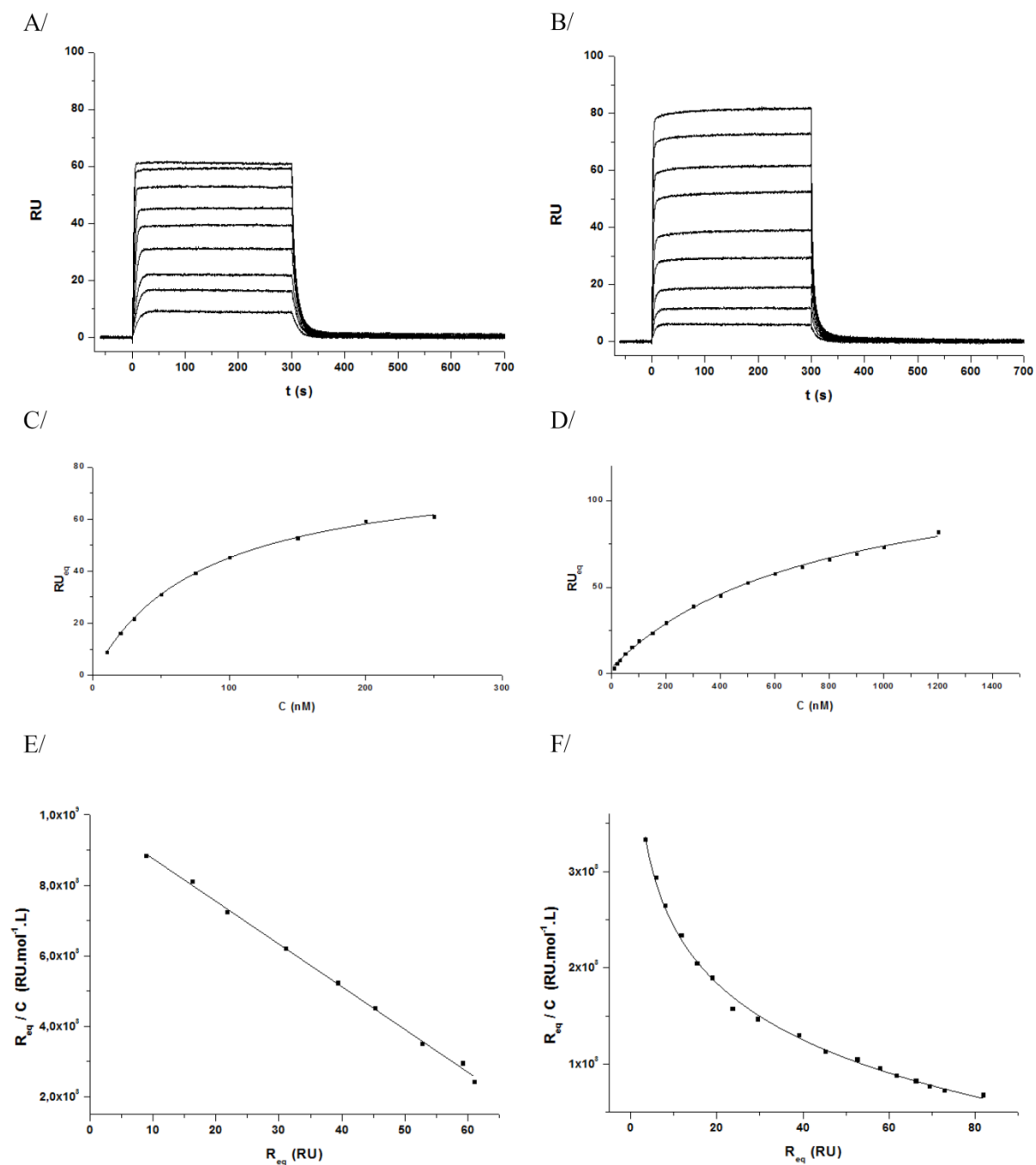


Figure S3 - SPR sensorgrams for the interaction of TMPyP4 with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2**. The ligand concentration was varied from 10nM (bottom curve) to 250nM (top curve) for A) and from 10nM (bottom curve) to 1200nM (top curve) for B). Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of TMPyP4 with C) the intermolecular-like quadruplex **1**, D) the intramolecular quadruplex **2**. Scatchard binding plots of the interaction between TMPyP4 and E) the intermolecular-like quadruplex **1** (the curve is a linear fitting), F) the intramolecular quadruplex **2** (the curve is only shown for better clarity).

TMPyP4 in buffer containing only NaCl

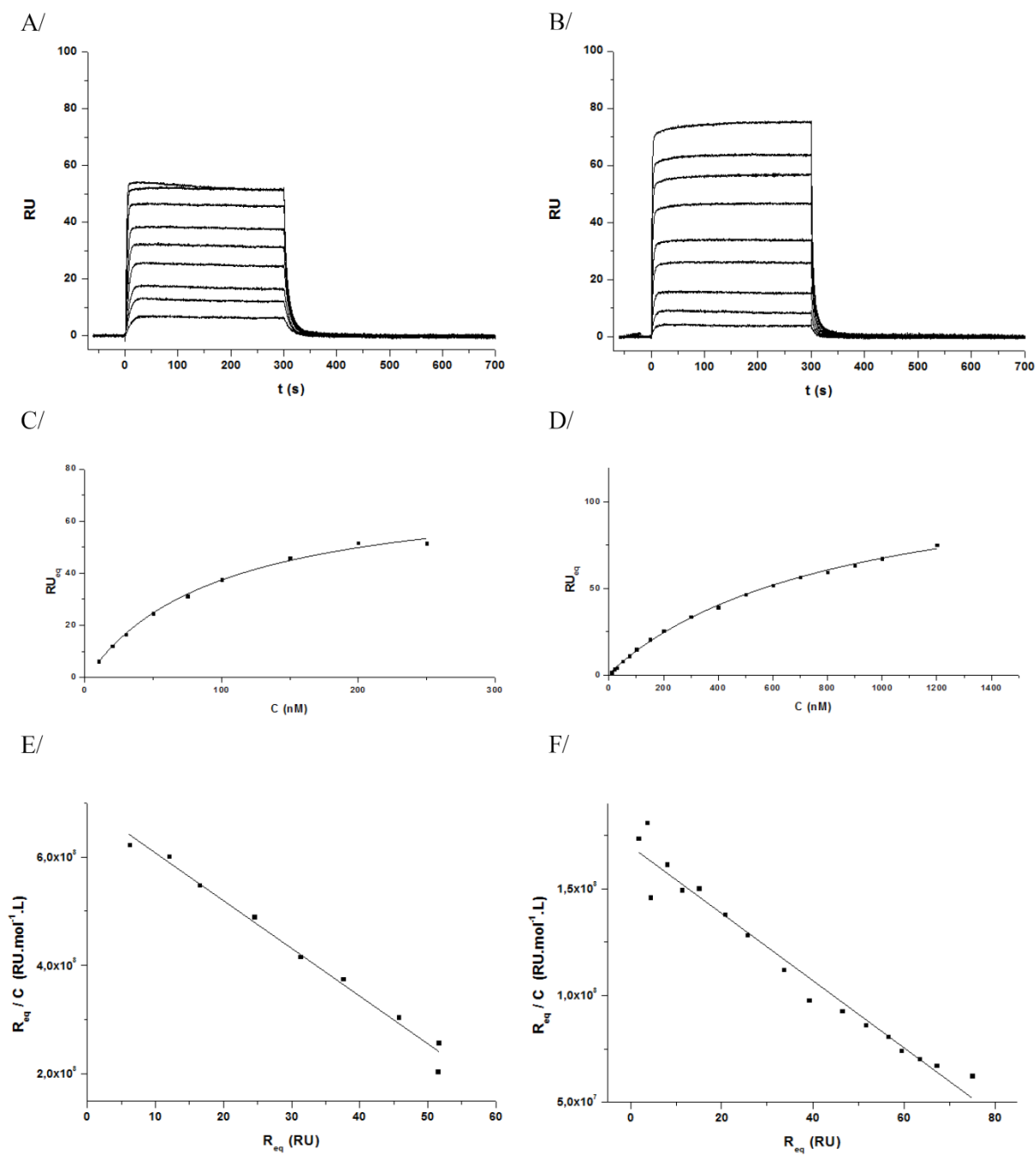


Figure S4 - SPR sensorgrams for the interaction of TMPyP4 with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2**. The ligand concentration was varied from 10nM (bottom curve) to 250nM (top curve) for A) and from 10nM (bottom curve) to 1200nM (top curve) for B). Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of TMPyP4 with C) the intermolecular-like quadruplex **1**, D) the intramolecular quadruplex **2**. Scatchard binding plots and linear fitting of the interaction between TMPyP4 and E) the intermolecular-like quadruplex **1**, F) the intramolecular quadruplex **2**.

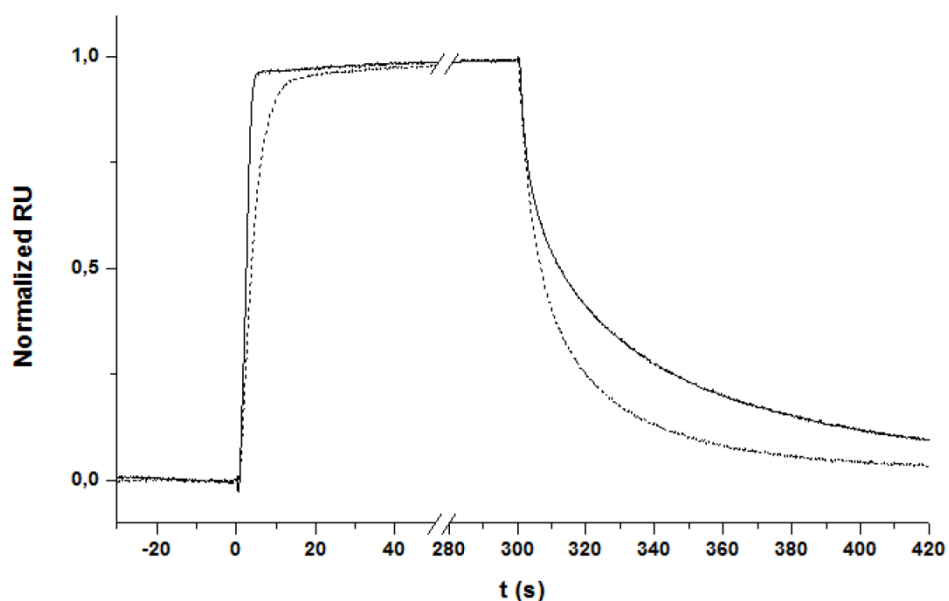


Figure S5 - Comparison of the association and dissociation profile for the interaction of TMPyP4 400nM with the intermolecular-like **1** (straight line) and the intramolecular **2** quadruplex (dot line). The sensorgrams have been normalized for clearer comparison.

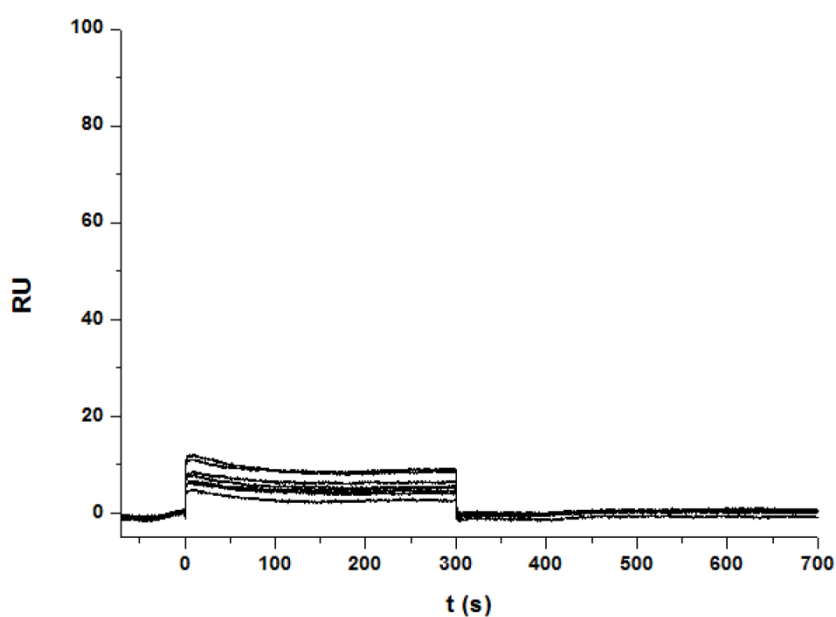


Figure S6 – Typical SPR sensorgrams for the study of TMPyP4 on the reference channel (concentration was varied from 10nM to 250nM). The leap of the signal is due to the refractive index change during the injection. The collected sensorgrams on the active channels are corrected by subtracting those signals.

MMQ1

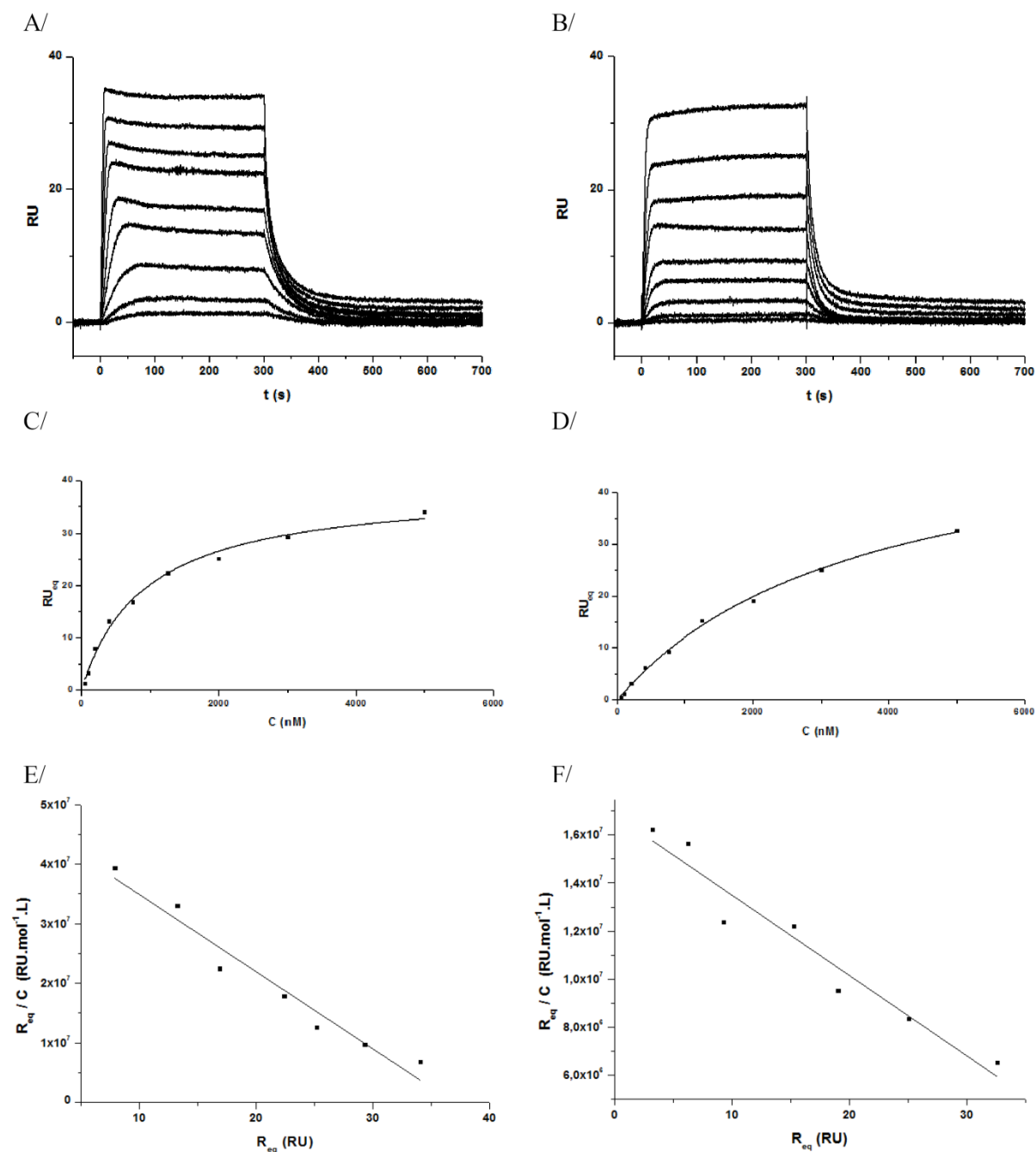


Figure S7 - SPR sensorgrams for the interaction of MMQ1 with A) the intermolecular-like quadruplex 1, B) the intramolecular quadruplex 2. The ligand concentration was varied from 50nM (bottom curve) to 5000nM (top curve). Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of MMQ1 with C) the intermolecular-like quadruplex 1, D) the intramolecular quadruplex 2. Scatchard binding plots and linear fitting of the interaction between MMQ1 and E) the intermolecular-like quadruplex 1, F) the intramolecular quadruplex 2.

MMQ3

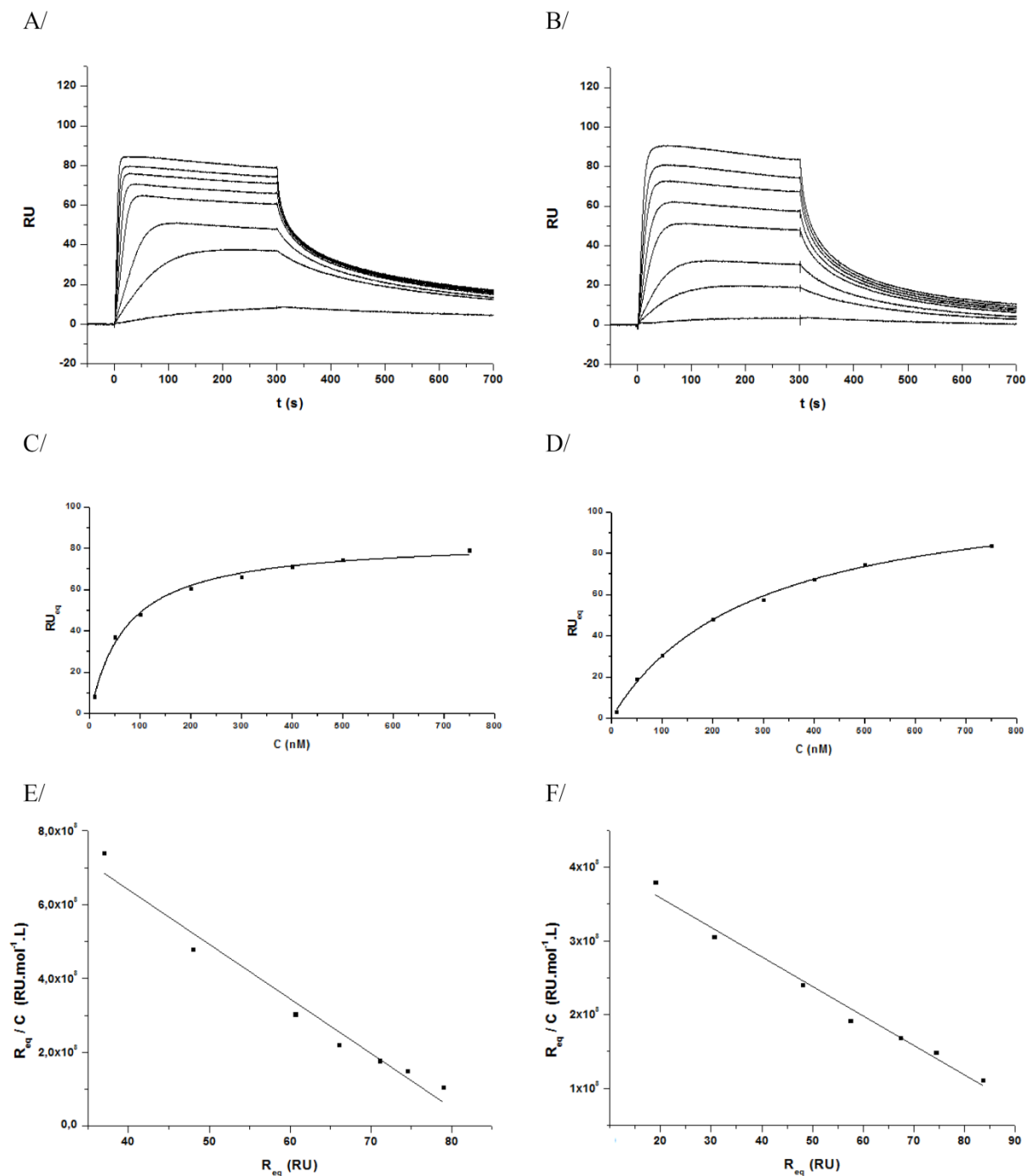


Figure S8 - SPR sensorgrams for the interaction of MMQ3 with A) the intermolecular-like quadruplex 1, B) the intramolecular quadruplex 2. The ligand concentration was varied from 10nM (bottom curve) to 750nM (top curve). Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of MMQ3 with C) the intermolecular-like quadruplex 1, D) the intramolecular quadruplex 2. Scatchard binding plots and linear fitting of the interaction between MMQ3 and E) the intermolecular-like quadruplex 1, F) the intramolecular quadruplex 2.

FRHR

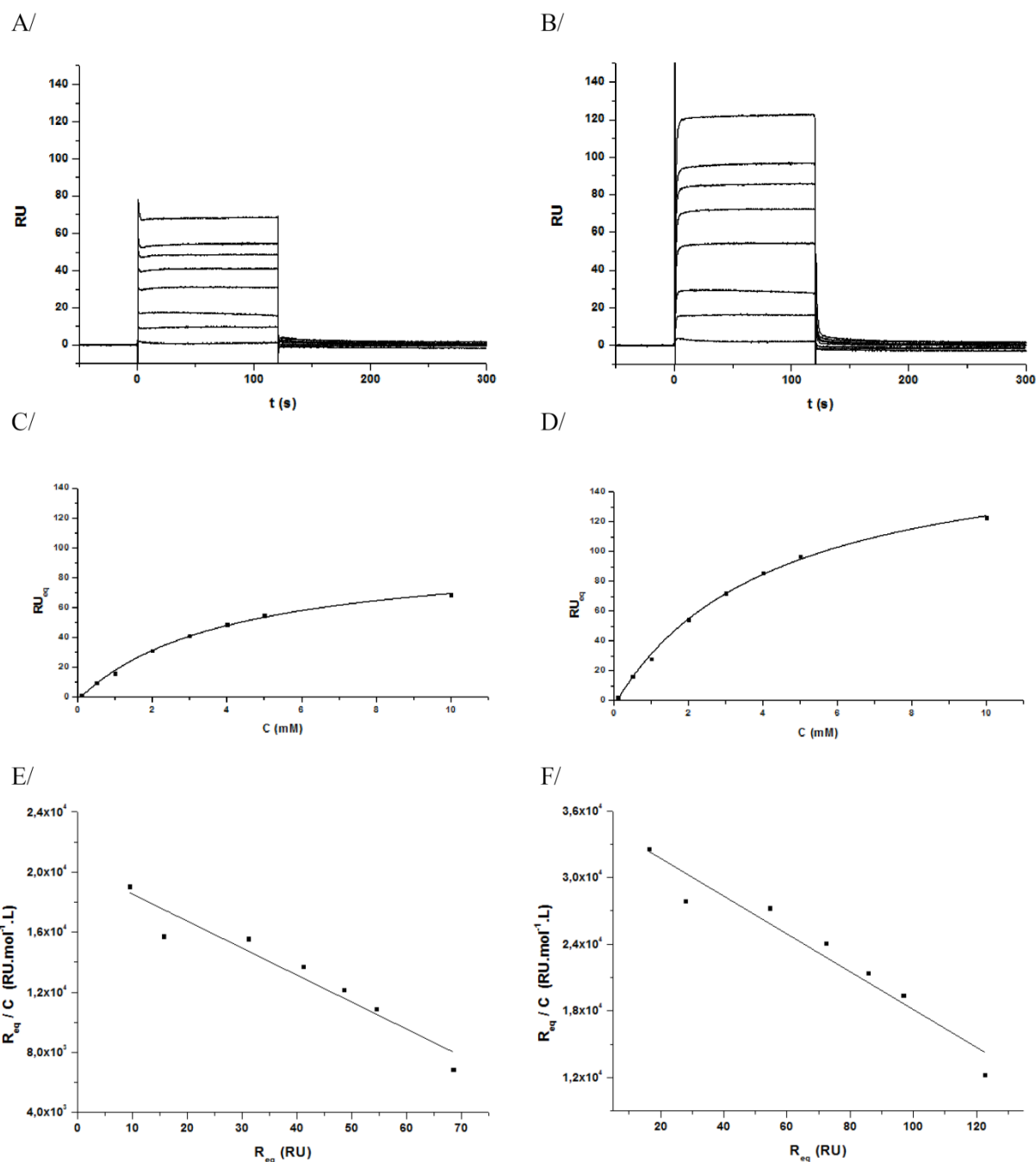


Figure S9 - SPR sensorgrams for the interaction of FRHR with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2**. The ligand concentration was varied from 0.1mM (bottom curve) to 10mM (top curve). Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of FRHR with C) the intermolecular-like quadruplex **1**, D) the intramolecular quadruplex **2**. Scatchard binding plots and linear fittings of the interaction between FRHR and E) the intermolecular-like quadruplex **1**, F) the intramolecular quadruplex **2**.

Distamycin A

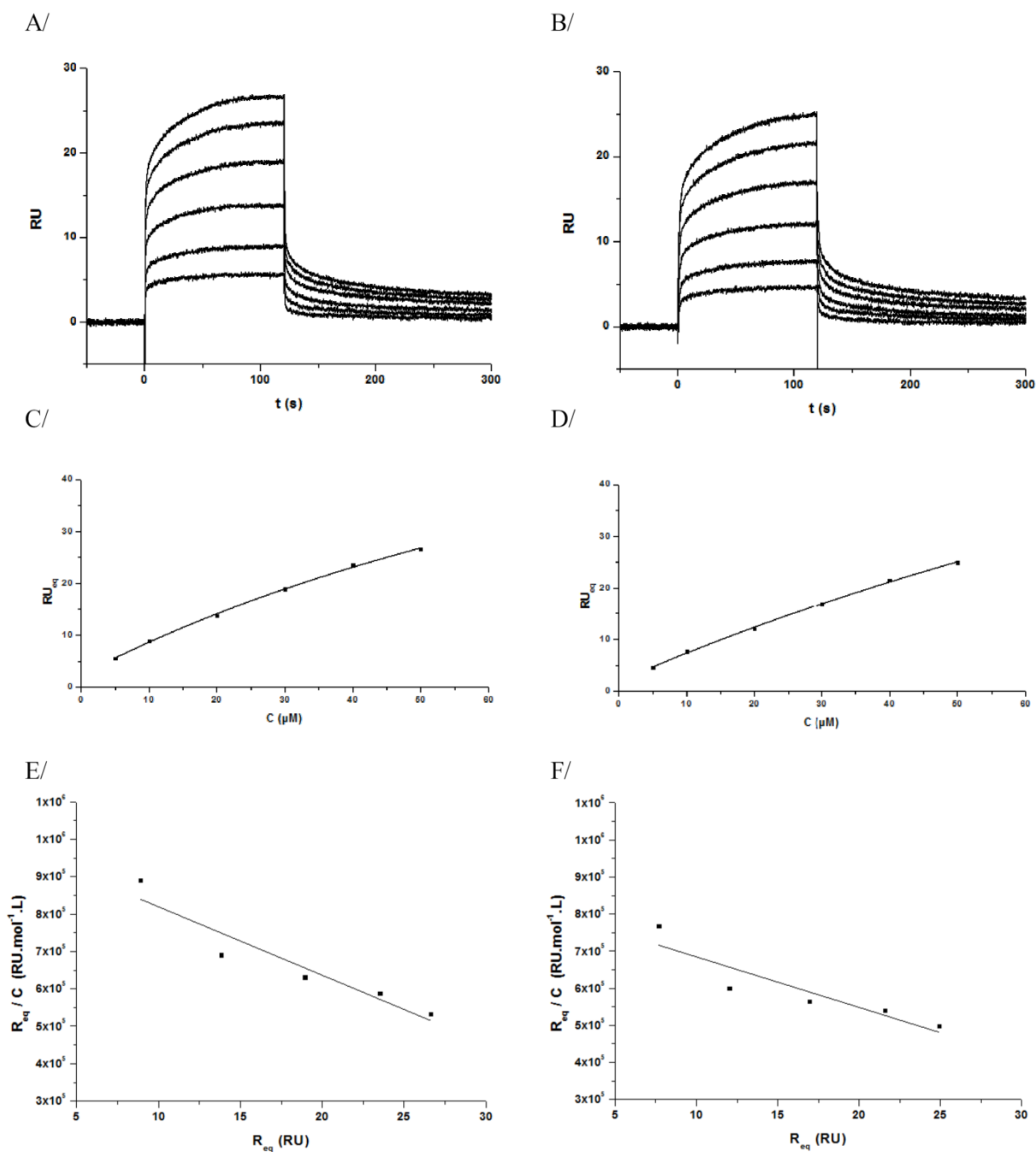


Figure S10 - SPR sensorgrams for the interaction of Distamycin A with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2**. The ligand concentration was varied from 5 μ M (bottom curve) to 50 μ M (top curve). Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of Distamycin A with C) the intermolecular-like quadruplex **1**, D) the intramolecular quadruplex **2**. Scatchard binding plots and linear fittings of the interaction between Distamycin A and E) the intermolecular-like quadruplex **1**, F) the intramolecular quadruplex **2**.

DODC

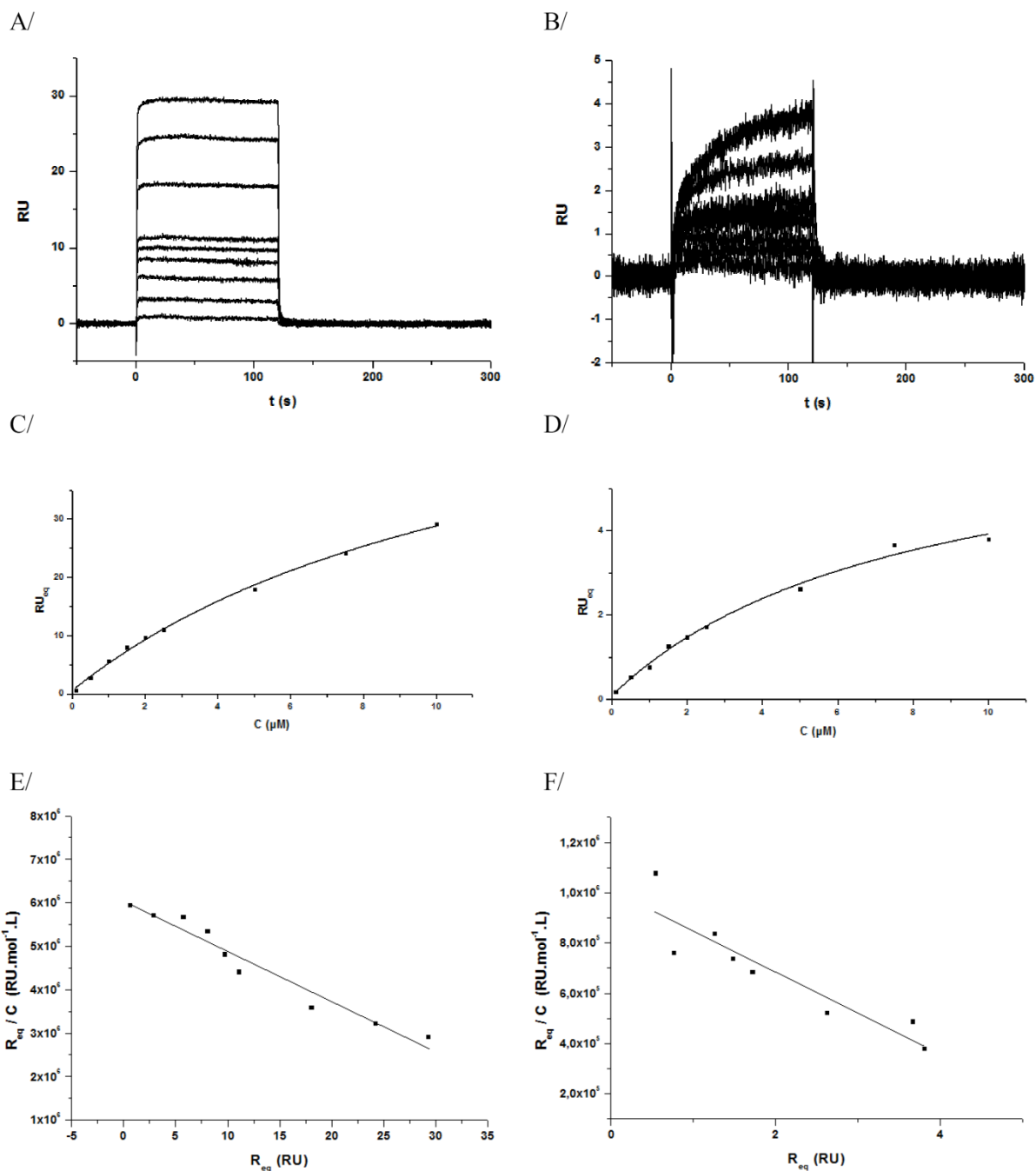


Figure S11 - SPR sensorgrams for the interaction of DODC with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2**. The ligand concentration was varied from 0.1 μM (bottom curve) to 10 μM (top curve). Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of DODC with C) the intermolecular-like quadruplex **1**, D) the intramolecular quadruplex **2**. Scatchard binding plots and linear fittings of the interaction between DODC and E) the intermolecular-like quadruplex **1**, F) the intramolecular quadruplex **2**.

c) Études complémentaires

Suite à ces études, nous nous sommes intéressés à une étude plus poussée de l'interaction TMPyP4/quadruplexe notamment à la détermination des paramètres thermodynamiques relatifs à celle-ci. Pour cela, nous avons utilisé de nouveau la SPR et complété les résultats obtenus grâce à des études utilisant la calorimétrie de titration isotherme (ITC). Cette étude permet également de montrer que la SPR peut être très utile pour ce type d'études et qu'elle peut s'avérer complémentaire à l'ITC.

Finalement le système développé dans l'Article 2 a également été utilisé pour le criblage de nouveaux ligands de G₄. Bien que la SPR, de la façon dont on l'utilise, ne soit pas l'outil adéquat au criblage à haut débit, l'étude menée permet de montrer qu'en peu de temps des molécules intéressantes peuvent être identifiées.

d) Études thermodynamiques comparatives par SPR et ITC des interactions quadruplexes / TMPyP4

La SPR et l'ITC sont deux techniques qui donnent accès aux paramètres thermodynamiques des interactions étudiées, de manière directe pour l'ITC et indirecte pour la SPR. Si l'ITC est couramment utilisée (voir paragraphe II-1-4-f), la SPR n'est que très peu utilisée pour les études thermodynamiques. Ceci parce que, lors des expériences en SPR, l'interaction étudiée est souvent limitée à deux dimensions (en fonction du type de surface utilisée) à cause de la présentation de l'ADN immobilisé sur la surface. En conséquence, l'entropie de réaction déterminée par SPR est souvent sous-évaluée.²⁶⁷ Néanmoins, des études thermodynamiques par SPR peuvent être réalisées et données de bons résultats si on utilise des surfaces à présentation tridimensionnelle (puce à matrice dextran).²⁶⁸

Afin d'étudier plus précisément l'interaction TMPyP4/quadruplexe et de comparer les résultats obtenus par les deux techniques, nous avons effectué la titration des deux mimes de quadruplexe **1** et **2** par la TMPyP4 par ITC et étudié ces interactions par SPR à différentes températures. Le paragraphe suivant présente les résultats obtenus.

Les expériences ITC ont été effectuées dans un tampon HBS-EP (10mM HEPES, 100mM NaCl, 100mM KCl, 3mM EDTA, pH 7,4) avec les différents mimes présents à la concentration initiale de 10µM dans la cuve à 25°C. Étant donné la nature des composés étudiés, la quantité de produit nécessaire pour obtenir les concentrations nécessaires est plutôt difficile à atteindre. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 102. L'allure des thermogrammes suggère des interactions plutôt complexes qui peuvent être modélisées par

267. Schubert, F.; Zettl, H.; Hafner, W.; Krauss, G.; Krausch, G., Comparative thermodynamic analysis of DNA-protein interactions using surface plasmon resonance and fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* **2003**, *42* (34), 10288-94.

268. Navratilova, I.; Papalia, G. A.; Rich, R. L.; Bedinger, D.; Brophy, S.; Condon, B.; Deng, T.; Emerick, A. W.; Guan, H. W.; Hayden, T.; Heutmekers, T.; Hoorelbeke, B.; McCroskey, M. C.; Murphy, M. M.; Nakagawa, T.; Parmeggiani, F.; Qin, X.; Rebe, S.; Tomasevic, N.; Tsang, T.; Waddell, M. B.; Zhang, F. F.; Leavitt, S.; Myszka, D. G., Thermodynamic benchmark study using Biacore technology. *Anal. Biochem.* **2007**, *364* (1), 67-77.

des interactions à plusieurs sites. Ainsi, les valeurs thermodynamiques ont été extraites à partir des données expérimentales en utilisant un modèle considérant deux sites indépendants (voir *Annexe*). Ce modèle exclu tout effet d'allostérie mais donne néanmoins des résultats satisfaisants. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5.

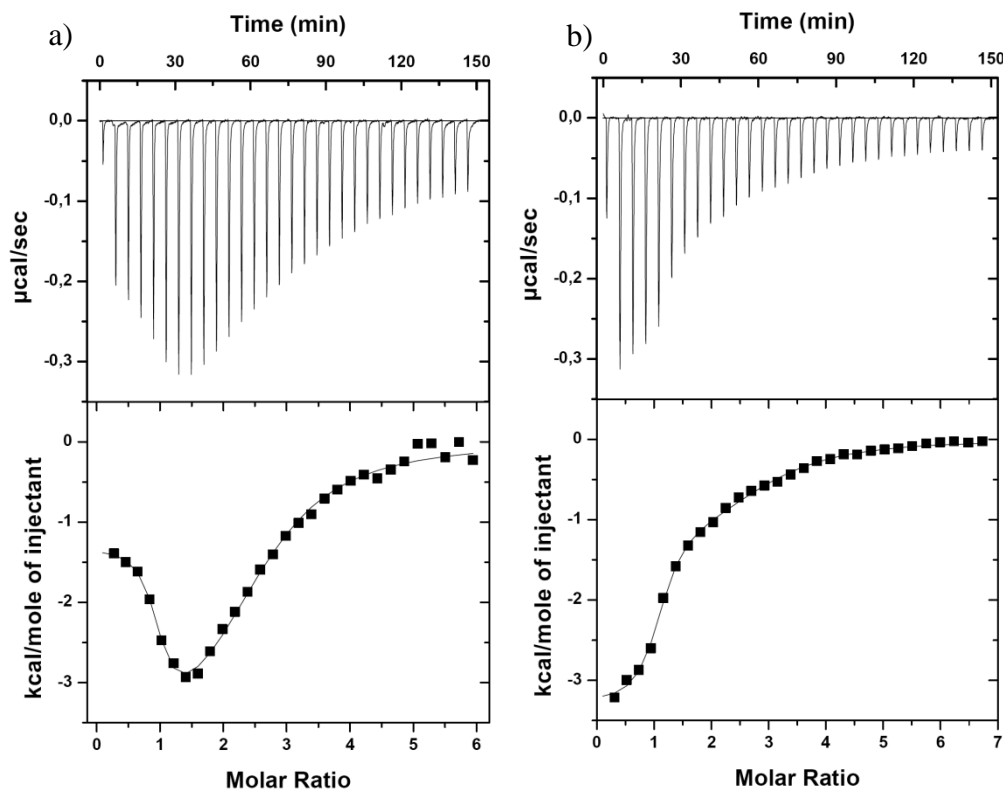


Figure 102 – Thermogrammes obtenus lors de la titration par la TMPyP4 du a) mîme de quadruplexe intermoléculaire 1 et b) du mîme de quadruplexe intramoléculaire 2.

Pour la détermination des paramètres thermodynamiques par SPR, on s'intéresse à la variation de la valeur de la constante de dissociation en fonction de la température. En effet, la relation classique de Van't Hoff postule que pour des états d'équilibre thermodynamiques :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_A = RT \ln K_D = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{eq(6).}$$

où ΔG° est la variation de l'enthalpie libre de réaction, R la constante des gaz parfait et K_A et K_D les constantes d'association et de dissociation de la réaction étudiée. Cette relation simplifiée suppose que H° (enthalpie de réaction) est indépendante de la température et ne prend pas en compte la variation de la valeur des capacités calorifiques, C_p° , des réactifs et du produit ($\Delta C_p^\circ = \delta(\Delta H^\circ) / \delta T$). En tenant compte de cette variation la relation de Van't Hoff devient :

$$RT \ln K_D = \Delta H_{T_0}^\circ - T\Delta S_{T_0}^\circ + \Delta C_p^\circ (T - T_0) - T\Delta C_p^\circ \ln \left(\frac{T}{T_0} \right) \quad \text{eq(7).}$$

où T_0 représente la température de référence, prise égale à 25°C (298.15 K)

Les interactions de TMPyP4 avec le mime intermoléculaire **1** et intramoléculaire **2** ont été étudiées aux températures de 5, 10, 15 et 20°C pour des concentrations en ligand allant de 10 à 1000 nM. Les différentes constantes d'affinités et cinétiques caractérisant ces interactions ont été extraites en utilisant une modélisation mathématique traduisant des interactions de type 1 :1 (isotherme de Langmuir). La variation de $\ln K_D$ en fonction de $1/T$ pour les deux systèmes est représentée sur la Figure 103. Cette variation est modélisée avec un modèle de Van't Hoff non linéaire décrit précédemment (eq (7)).

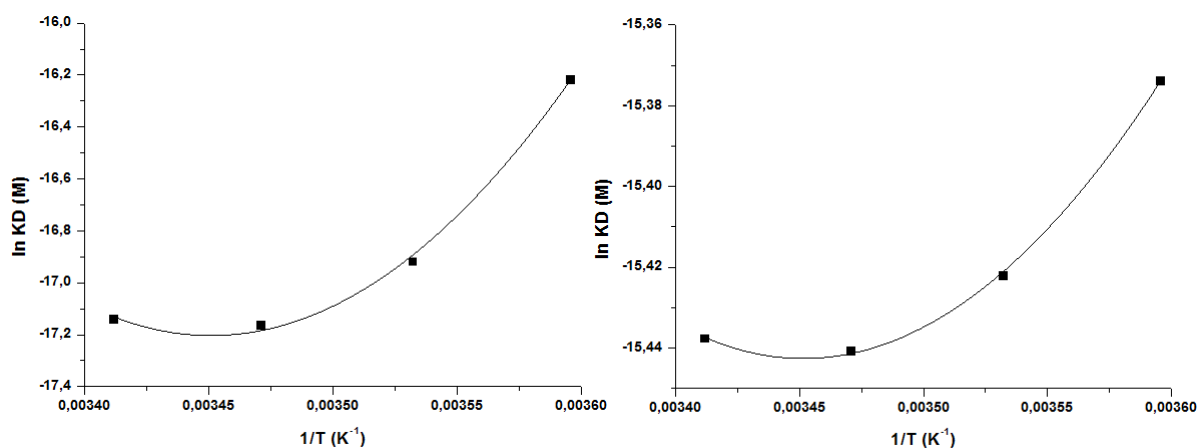


Figure 103 – Graphiques représentant la variation de $\ln K_D$ en fonction de $1/T$ décrivant l'interaction de TMPyP4 avec a) le mime intermoléculaire **1** et b) le mime intramoléculaire **2**.

Les différents paramètres thermodynamiques de ces interactions sont résumés dans le Tableau 5. L'utilisation d'un modèle de Van't Hoff non linéaire donne également accès aux ΔC_p° , on obtient ainsi ΔC_p° (intermoléculaire) = - 450 cal.mol⁻¹.K⁻¹ et ΔC_p° (intramoléculaire) = - 160 cal.mol⁻¹.K⁻¹. Les deux valeurs obtenues sont très différentes et peuvent être corrélées à la modification des surfaces accessibles aux solvants.²⁶⁹ En résumé, plus la valeur absolue du ΔC_p° est grande, plus la surface mise en jeu lors de l'interaction est accessible au solvant. Ainsi la surface du site d'interaction du mime de quadruplexe intermoléculaire est plus accessible par le solvant que la surface du site d'interaction du mime de quadruplexe intramoléculaire. Les deux valeurs alors obtenues permettent de confirmer que la tétrade externe d'un quadruplexe intermoléculaire est plus accessible (aux solvants et donc aux ligands) que la tétrade externe d'un quadruplexe intramoléculaire.

L'ensemble des paramètres thermodynamiques mesurés par les études en ITC et SPR sont présentés dans le tableau suivant :

269. Ren, J.; Jenkins, T. C.; Chaires, J. B., Energetics of DNA intercalation reactions. *Biochemistry* **2000**, 39 (29), 8439-47.

	Expérience	K_{D1} (M) ^a	ΔH_1° (kcal.mol ⁻¹)	ΔS_1° (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	n_1	K_{D2} (M) ^a	ΔH_2° (kcal.mol ⁻¹)	ΔS_2° (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	n_2
Quadruplexe intermoléculaire 1	ITC	1.5×10^{-8}	-3.2	25.1	1	5.8×10^{-6}	-10.3	-10.8	1
	SPR	2.1×10^{-8}	-3.1	23.7	/	/	/	/	/
Quadruplexe intramoléculaire 2	ITC	1.9×10^{-7}	-1.4	20.4	1	3.2×10^{-6}	-3.2	22.8	1.8
	SPR ^b	2.8×10^{-7}	-1.4	26.3	/	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	/
Séquence télomérique	ITC	2.5×10^{-7}	-1.9	23.8	1	2.0×10^{-6}	-4.2	23.0	2

Tableau 5 – Paramètres thermodynamiques décrivant l'interaction de TMPyP4 avec les mimes de G4 intermoléculaire **1** et intramoléculaire **2**. Les valeurs obtenues sont comparées également avec des données bibliographiques, à savoir l'étude des interactions de TMPyP4 avec la séquence télomérique humaine d(GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG).²⁷⁰ a) La valeur des constantes de dissociation est précisée pour 25°C. b) Bien que l'interaction de TMPyP4 avec le mime de G4 intramoléculaire **2** ne peut être complètement décrite par un modèle 1 : 1, la gamme de concentrations étudiées donne accès uniquement à la première interaction.

Ces différents résultats permettent de comprendre les événements mis en jeu lors de l'interaction de TMPyP4 avec les deux topologies de quadruplexes. En ce qui concerne l'étude de l'interaction avec le mime de quadruplexe intermoléculaire **1**, il est étonnant d'observer deux interactions distinctes en ITC alors qu'une seule interaction est caractérisable par SPR. La grande différence entre ces deux techniques est que lors de l'étude par ITC, l'oligonucléotide est libre en solution, alors que pour l'étude par SPR, il est fixé sur une surface. Ainsi il est raisonnable de penser que la deuxième interaction identifiable en ITC est due à l'interaction d'une molécule de TMPyP4 avec deux quadruplexes libres en solution *via* la création d'un dimère de quadruplexe.²³⁴ Ce résultat est confirmé par une valeur négative de l'entropie caractérisant cette deuxième interaction. Cette interaction ne se produit pas lors de l'étude SPR, car le quadruplexe est suffisamment dilué à la surface pour empêcher la participation de deux motifs quadruplexe. Néanmoins les mêmes paramètres thermodynamiques sont déterminés pour la première interaction correspondant à l'empilement d'une molécule de TMPyP4 sur la tétrade externe du quadruplexe.

En ce qui concerne l'étude des interactions avec le mime de G4 intramoléculaire l'étude ITC permet de retrouver des résultats très similaires à l'étude menée par l'équipe de S. Maiti,²⁷⁰ ce qui confirme que le gabarit peptidique ne participe pas aux différentes interactions. La première interaction, caractérisée par la meilleure affinité, se retrouve également par l'étude SPR. Néanmoins le traitement utilisé lors de l'étude SPR ne donne pas accès aux caractéristiques du deuxième type d'interaction, mais transcrit bien la première interaction.

Finalement l'ensemble de ces études tend à montrer que la fixation de TMPyP4 sur un motif quadruplexe est un phénomène dirigé par l'entropie. La faible contribution enthalpique à l'interaction montre clairement que le processus d'interaction n'est pas dirigé par la formation de nouvelles interactions entre le ligand et la structure nucléique, mais

270. Arora, A.; Maiti, S., Effect of loop orientation on quadruplex-TMPyP4 interaction. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, *112* (27), 8151-9.

principalement par une relaxation de la structure. Dans le cas du mime de quadruplexe intermoléculaire **1**, l'interaction supplémentaire (uniquement caractérisable par ITC), montre que le TMPyP4 est capable de promouvoir l'empilement de structure quadruplexe. Lors de cet événement, la contribution entropique opposée suggère que le nouvel édifice formé est plus rigide que le quadruplexe libre initial. L'ensemble de ces résultats est corroboré par l'étude menée par l'équipe de C. Giancola,²⁴⁵ notamment la stoechiométrie des complexes observés.

Un des grands avantages de la SPR est la possibilité d'étudier la cinétique d'une interaction. La variation des valeurs des constantes d'associations, ka , et de dissociation, kd , en fonction de la température donne accès à une caractérisation des états de transition. L'équation d'Eyring, (ou équation d'Eyring-Polanyi) relie la vitesse de réaction (association ou dissociation) à la température. Cette théorie découle de la théorie de l'état de transition (ou complexe activé) et correspond à un modèle théorique basé sur la thermodynamique statistique. De façon similaire à l'équation d'Arrhenius, elle relie k_a ou k_b à ΔG^\ddagger , la variation de l'enthalpie libre d'activation :

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad \text{eq(8).}$$

où k_B est la constante de Boltzmann et h la constante de Planck. On peut la reformuler comme suit :

$$k = \left(\frac{k_B T}{h}\right) \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) \quad \text{eq(9).}$$

ce qui permet d'obtenir la forme linéaire de l'équation d'Eyring :

$$\ln \frac{k}{T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad \text{eq(10).}$$

Les valeurs des ka et kd , déterminé comme précédemment, permet l'obtention des graphiques présentés sur la Figure 104.

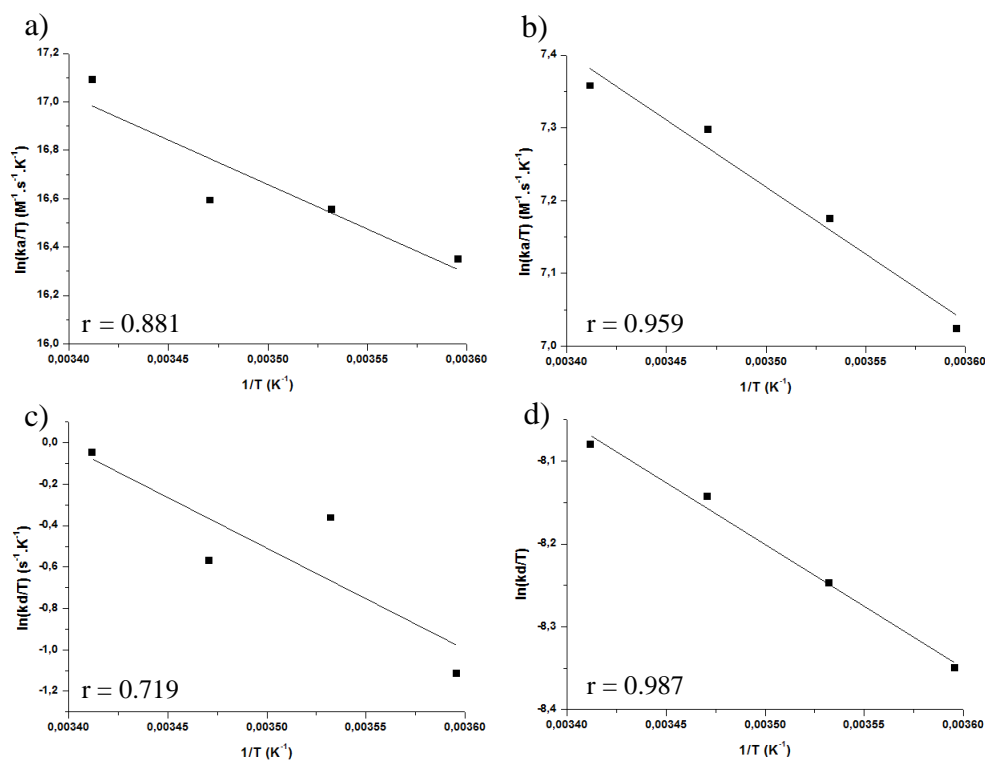


Figure 104 – Variation de $\ln(ka/T)$ et de $\ln(kd/T)$ en fonction de $1/T$ pour l'interaction de TMPyP4 avec, a) et c) le mime de quadruplexe intermoléculaire 1, b) et d) le mime de quadruplexe intramoléculaire 2.

L'ensemble des résultats expérimentaux a été modélisé par l'équation d'Eyring afin de déterminer les paramètres thermodynamiques décrivant les états de transition lors de l'association et de la dissociation de la porphyrine sur les motifs quadruplexes étudiés. Ces résultats sont reportés dans le Tableau 6. Ces différentes valeurs ne prennent en compte qu'un type d'interaction qui est l'empilement de TMPyP4 sur une tétrade externe du quadruplexe.

Étape	Valeurs thermodynamiques	Quadruplexe intermoléculaire <u>1</u>	Quadruplexe intramoléculaire <u>2</u>
Association	$\Delta H^{\circ\ddagger}$ (kcal.mol ⁻¹)	7.4	3.5
	$\Delta S^{\circ\ddagger}$ (cal.K ⁻¹ mol ⁻¹)	11.5	-20.1
	$\Delta G^{\circ\ddagger}$ (kcal.mol ⁻¹)	3.8	9.6
Dissociation	$\Delta H^{\circ\ddagger}$ (kcal.mol ⁻¹)	9.8	2.9
	$\Delta S^{\circ\ddagger}$ (cal.K ⁻¹ mol ⁻¹)	-14.1	-52.6
	$\Delta G^{\circ\ddagger}$ (kcal.mol ⁻¹)	13.8	18.9

Tableau 6 – Valeurs des différents paramètres thermodynamiques relatifs aux états de transitions lors de l'association et la dissociation de la TMPyP4 sur les mimés de quadruplexes intermoléculaire 1 et intramoléculaire 2.

Les valeurs obtenues montrent que la phase d'association et la phase de dissociation sont principalement dirigées par des phénomènes entropiques. La composante enthalpique est très inférieure et confirme que la formation du complexe TMPyP4/G4 est contrôlée par la relaxation de la structure. Pour la phase d'association, il est intéressant de constater que

l'interaction avec le mime de quadruplexe intramoléculaire présente une composante entropique opposée à la formation du complexe activé, ce qui montre la nécessité d'une réorganisation du site d'interaction importante. Ce résultat confirme encore une fois que la tétrade du quadruplexe intramoléculaire est moins accessible et que l'interaction est probablement gênée par la présence de boucles. On retrouve ce résultat pour la phase de dissociation : bien que les entropies de dissociation soient négatives pour les deux systèmes, celle obtenue pour le mime de quadruplexe intramoléculaire **2** est bien plus grande que celle obtenue pour le mime de quadruplexe intermoléculaire **1**. Finalement, on remarque que si l'étape de dissociation semble mettre en jeu les mêmes quantités d'énergie ($\Delta G_{\text{diss}}^{\circ\ddagger}$ semblable pour les deux systèmes), la formation du complexe activé lors de l'association nécessite une dépense d'énergie plus faible pour le mime de quadruplexe intermoléculaire **1**.

Grâce aux très faibles quantités de produits nécessaires pour des études par SPR, cette technique peut s'avérer être un bon compromis à l'ITC pour la mesure des paramètres thermodynamiques des interactions. Néanmoins son défaut principal est la difficulté à déterminer la stœchiométrie d'interaction (n). Les différents travaux menés par l'équipe de D. Wilson montrent l'importance de la variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration pour la détermination précise de cette stœchiométrie *via* l'utilisation des relations suivantes :²⁷¹

$$n = \frac{RU_{\text{max,exp}}}{RU_{\text{max,th}}} \quad \text{or} \quad RU_{\text{max,th}} = RU_L \cdot \frac{MW_A}{MW_L} \cdot \frac{(\partial n / \partial C)_A}{(\partial n / \partial C)_L} \quad \text{eq(11).}$$

où $RU_{\text{max,exp}}$ est le nombre de RU obtenu à saturation lors de l'expérience et $RU_{\text{max,th}}$ est le nombre de RU que l'on doit obtenir théoriquement dans le cas où il y a un seul site d'interaction. Ainsi la connaissance des rapports $\partial n / \partial C$ (du ligand et de l'oligonucléotide) donne accès à la stœchiométrie. Pour des molécules similaires, par exemple lors de l'étude de l'interaction entre deux protéines ou d'une protéine avec un oligonucléotide, le rapport $(\partial n / \partial C)_A / (\partial n / \partial C)_L$ peut être pris en approximation égal à 1. Mais pour l'étude de l'interaction de petites molécules organiques avec des oligonucléotides ce rapport doit être mesuré. Pour le déterminer, il faut un réfractomètre différentiel, appareil non disponible actuellement au laboratoire.

e) Criblage de nouveaux ligands d'ADN quadruplexe.

Le système mis au point précédemment (voir *Article 2*) a été utilisé pour le criblage de nouveaux ligands de l'ADN quadruplexe. Les molécules sélectionnées pour ce criblage sont des produits commerciaux disponibles au laboratoire ou des produits de synthèses généreusement prêtés par nos collègues. La majorité de ces produits présente des noyaux aromatiques susceptibles de reconnaître les tétrades de guanines (comme l'Azure B ou le Basic Red 2) et certains d'entre eux sont des produits naturels (comme la Castanospermine ou

271. Davis, T. M.; Wilson, W. D., Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data. *Anal. Biochem.* **2000**, *284* (2), 348-53.

la Rifampicine). Une trentaine de produits a été étudiée et la structure des plus représentatifs est présentée sur la Figure 105.

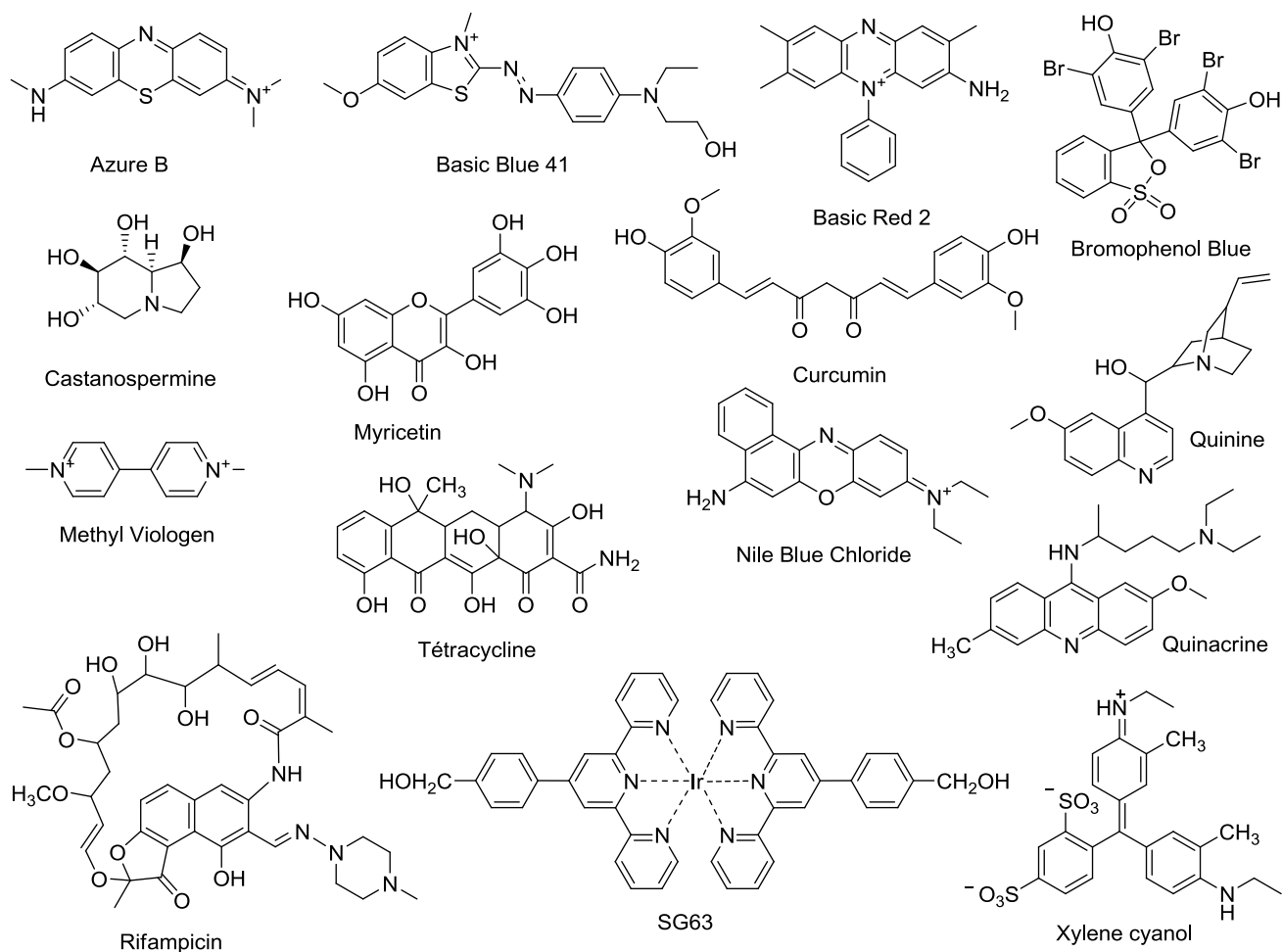


Figure 105 – Structures chimiques de certains composés étudiés lors du criblage par SPR.

La majorité des composés connus pour leur affinité avec l'ADN quadruplexe ont une affinité comprise entre 10nM et 100µM, c'est pourquoi une solution de chaque produit a été préparée à quatre concentrations tests (0.1, 1, 10 et 100µM) dans un tampon HBS-EP (10mM HEPES, 100mM NaCl, 100mM KCl, 3mM EDTA, pH 7,4, 0.05% P₂₀) et testée sur une surface similaire à celle décrite dans l'Article 2. Une première limitation apparaît alors à cette étape : certains candidats sont rapidement éliminés à cause de leur faible solubilité dans le tampon d'étude. Ceci est le cas pour un certain nombre de composés de la famille des flavonoïdes (parmi les molécules sélectionnées de cette famille seule la myricétine présente une solubilité suffisante). Chacune des concentrations préparées est alors injectée et la réponse est enregistrée. La Figure 106 présente un exemple d'expérience menée avec la molécule Basic Blue 41.

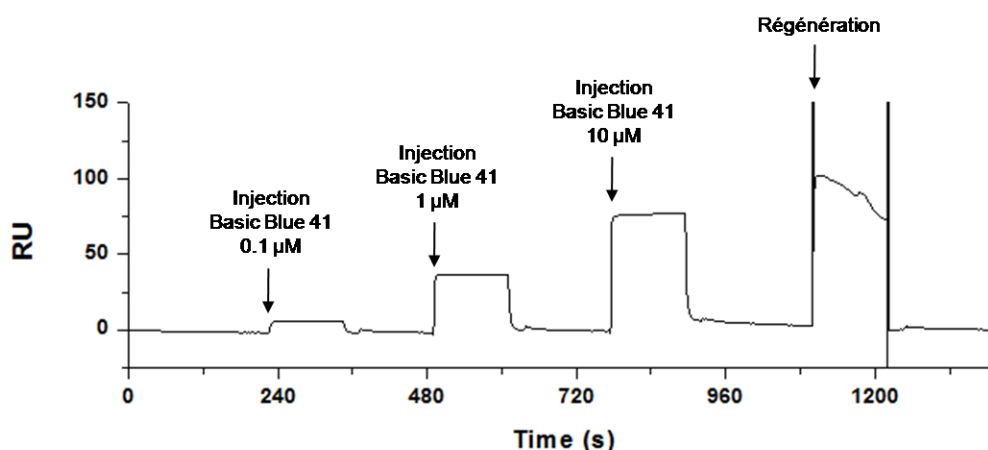


Figure 106 – Exemple de sensorgramme obtenus lors des expériences de criblage sur le mime intermoléculaire **1**. Dans cet exemple, le ligand est injecté à trois concentrations différentes (0.1, 1, 10μM) successivement et une phase de régénération est effectuée en fin d'analyse.

Chacun de ces tests prend une quinzaine de minutes et permet très rapidement d'évaluer l'affinité d'une molécule pour l'ADN quadruplexe. Les réponses obtenues pour quelques composés sont reportés sous forme d'histogrammes dans la Figure 107. Il est important de noter qu'une réponse intense (hautes valeurs de RU) n'est pas synonyme de forte affinité, en effet la réponse est fonction des propriétés optiques des molécules. Inversement dans le cas où on n'observe aucune réponse, deux conclusions sont possibles : soit le ligand ne possède aucune affinité pour l'ADN quadruplexe, soit la technique ne permet pas de détecter l'interaction. Par exemple, le Méthyl Viologen a une masse molaire de 186 g/mol et cette masse se retrouve à la limite de détection de l'appareil utilisé (Biacore T100). Finalement des ligands qui donnent une réponse faible peuvent avoir une bonne affinité pour l'ADN quadruplexe, par exemple, on peut voir que le Nile Blue Chloride (voir Figure 107) possède une bonne affinité dans la mesure où la réponse pour une concentration de 100μM est quasi égale à celle obtenue pour une concentration de 10μM, ce qui signifie que cette dernière concentration est suffisante pour saturer la surface et on peut d'ores et déjà estimer une affinité de l'ordre du micromolaire pour ce composé.

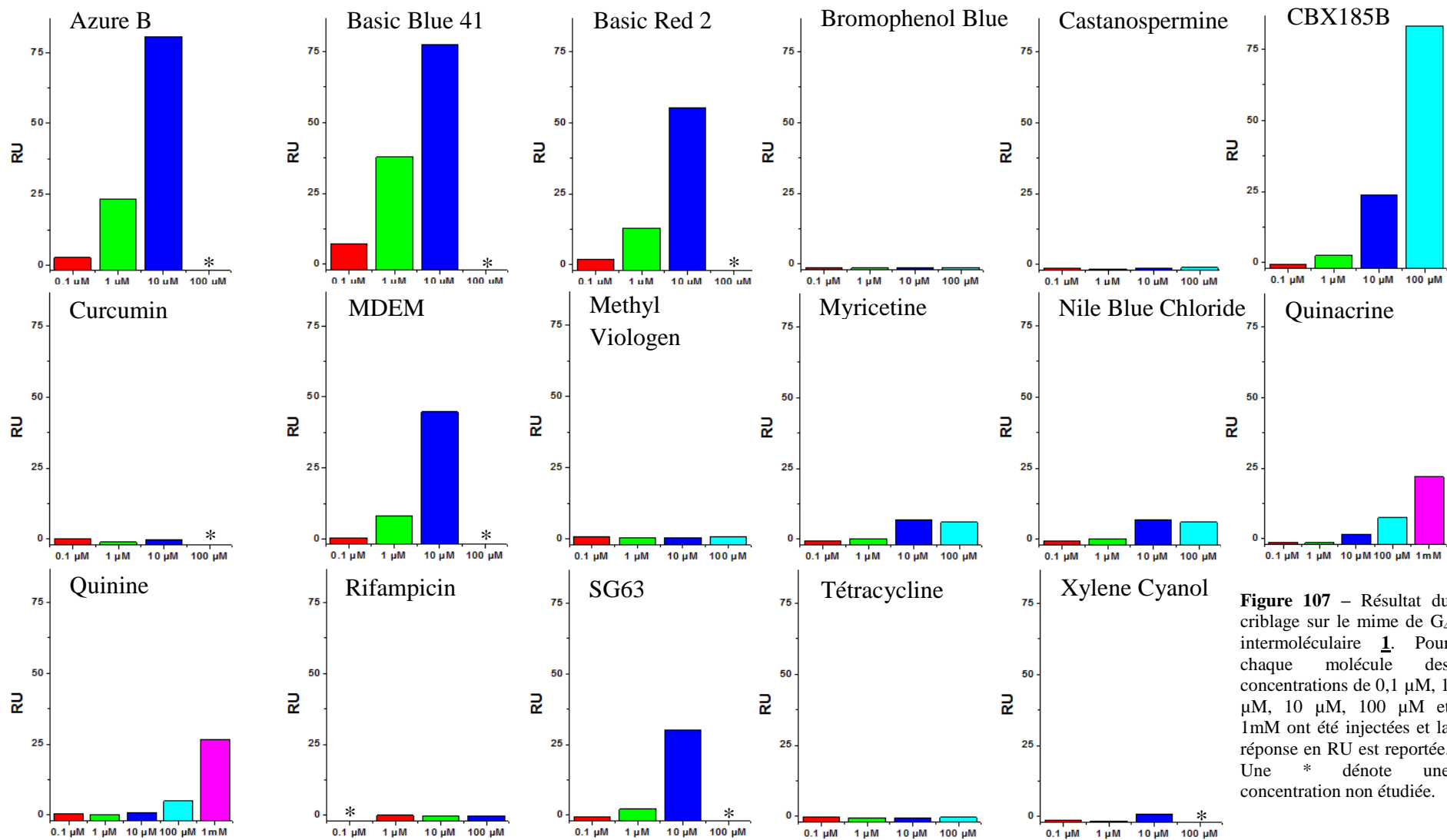


Figure 107 – Résultat du criblage sur le mîme de G_4 intermoléculaire 1. Pour chaque molécule des concentrations de 0,1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM et 1mM ont été injectées et la réponse en RU est reportée. Une * dénote une concentration non étudiée.

Parmi les ligands identifiés comme ayant une affinité pour les motifs quadruplexes lors de ce criblage, quatre d'entre eux ont par la suite été étudiés plus précisément. Ces ligands ont été sélectionnés pour leurs propriétés particulières. Il s'agit de l'Azure B, du Basic Blue 41, du Basic Red 2 et du Nile Blue Chloride. L'Azure B est un colorant, possédant un noyau thiazine méthylé, dont la coloration change en fonction du pH. Il est utilisé couramment en biologie pour colorer les chromosomes (en vert), le nucléole (en bleu) et les compartiments où s'accumulent les mucopolysaccharides (en rouge).²⁷² Le Basic Blue 41 est un colorant utilisé couramment en chimie des matériaux pour créer des matériaux capables de photocatalyse.²⁷³ Le Basic Red 2 (aussi connu sous le nom de Safranine T) est un colorant utilisé dans le domaine de la biologie pour colorer les cellules.²⁷⁴ Le Nile Blue est un colorant utilisé couramment en tant que sonde électrochimique.²⁷⁵ Les résultats obtenus lors des études SPR sont résumés dans le Tableau 7. Ces quatre molécules montrent une bonne affinité pour l'ADN quadruplexe en général (de l'ordre du micromolaire). La sélectivité pour l'ADN quadruplexe vs l'ADN duplexe, pour l'Azure B, le Basic Blue 41 et le Basic Red 2 est plutôt modérée (Tableau 8). Par contre le Nile Blue montre une très bonne sélectivité pour les G4 dans la mesure où aucune réponse pour le duplexe **3** n'a été détectée pour des concentrations de l'ordre du millimolaire. Ainsi sa sélectivité est estimée être supérieure à 180. La détermination de la valeur de leur G4-BMI (voir *Article 2*) montre que ces ligands interagissent principalement par empilement, mais qu'une interaction différente (certainement *via* la reconnaissance des sillons par interactions électrostatiques) se produit. Ce constat est d'autant plus vrai pour le Nile Blue qui se rapproche plus d'un ligand du sillon malgré une structure aromatique idéale pour l'empilement.

Ces quatre molécules partagent une propriété commune : ils sont tous quatre électroactifs. Ces propriétés sont actuellement utilisées pour développer un test d'étude des interactions petites molécules / G4 en utilisant l'électrochimie. Une sonde oligonucléotidique est immobilisée sur une surface d'or via l'utilisation de SAM (Self-Assembled Monolayer) fonctionnalisé par de la streptavidine. L'enregistrement des courants faradiques de réduction de chaque molécule à des concentrations croissantes donne accès à des isothermes d'adsorption qui permettent l'obtention des constantes d'affinité de chaque molécule (Figure 108). Ce travail effectué par Hajra Basit a permis de retrouver un $K_D = 2.7 \times 10^{-6}$ M pour l'Azure B sur le système de mime de quadruplexe intramoléculaire **2**. Cette nouvelle méthode est en cours de développement et permettra d'étudier les interactions de tous ligands électroactifs.

272. Marshall, P. N., Romanowsky-type stains in haematology. *Histochem. J.* **1978**, *10* (1), 1-29.

273. Stathatos, E.; Petrova, T.; Panagiotis, L., Study of the efficiency of visible-light photocatalytic degradation of Basic Blue adsorbed on pure and doped mesoporous titania films. *Langmuir* **2001**, *20* (17), 5025-5030.

274. Huang, C. Z.; Li, Y. F.; Liu, Y., Determination of nucleic acids at nanogram levels with safranin T by a resonance light-scattering technique. *Anal. Chim. Acta.* **1998**, *375*, 89-97.

275. Kuramitz, H.; Sugawara, K.; Kawasaki, M.; Hasebe, K.; Nakamura, H.; Tanaka, S., Electrocatalytic reduction of Hemoglobin at a self-assembled monolayer electrode containing redox dye, Nile Blue as an electron-transfer mediator. *Anal. Sci.* **1999**, *15*, 589-593.

	Quadruplexe intermoléculaire <u>1</u>				Quadruplexe intramoléculaire <u>2</u>				Duplexe <u>3</u>			
	K_D^{eq}	k_a	k_d	K_D^{kin}	K_D^{eq}	k_a	k_d	K_D^{kin}	K_D^{eq}	k_a	k_d	K_D^{kin}
	(M)	($M^{-1}.s^{-1}$)	(s^{-1})	(M)	(M)	($M^{-1}.s^{-1}$)	(s^{-1})	(M)	(M)	($M^{-1}.s^{-1}$)	(s^{-1})	(M)
Azure B	4.3×10^{-6}	1.2×10^5	0.78	6.3×10^{-6}	9.3×10^{-6}	4.8×10^4	0.69	1.4×10^{-5}	2.9×10^{-5}	4.4×10^4	0.98	3.0×10^{-5}
Basic Blue 41	4.5×10^{-6}	9.8×10^4	0.35	3.6×10^{-6}	1.7×10^{-5}	3.5×10^4	0.53	1.5×10^{-5}	7.2×10^{-5}	2.2×10^4	1.1	5.2×10^{-5}
Basic Red 2*	7.6×10^{-6}	8.9×10^4	0.60	6.7×10^{-6}	2.7×10^{-5} /	3.3×10^4 0.14×10^2	0.62 0.02	1.9×10^{-5} 1.5×10^{-4}	5.7×10^{-5}	2.5×10^4	1.0	4.5×10^{-5}
Nile Blue Chloride	4.8×10^{-6}	5.8×10^4	0.16	2.8×10^{-6}	5.4×10^{-6}	3.3×10^4	0.15	4.5×10^{-6}	$> 10^{-3}$	n.d.	n.d.	$> 10^{-3}$

Tableau 7 – Caractéristiques des interactions de différents ligands issues des expériences de criblage avec le mime de quadruplexe intermoléculaire 1, le mime de quadruplexe intramoléculaire 2 et le duplexe 3. * Deux interactions différentes sont identifiables pour la reconnaissance du quadruplexe intramoléculaire 2 par Basic Red 2 (seule celle de meilleure affinité est prise en compte).

	Sélectivité quadruplexe intramoléculaire <u>2</u> vs duplexe <u>3</u>	G4-BMI Sélectivité quadruplexe intermoléculaire <u>1</u> vs quadruplexe intramoléculaire <u>2</u>
Azure B	2.1	2.3
Basic Blue 41	4.2	3.8
Basic Red 2	2.1	3.5
Nile Blue Chloride	≥ 180	1.2

Tableau 8 – Sélectivité et G4-BMI des ligands issus des expériences de criblage.

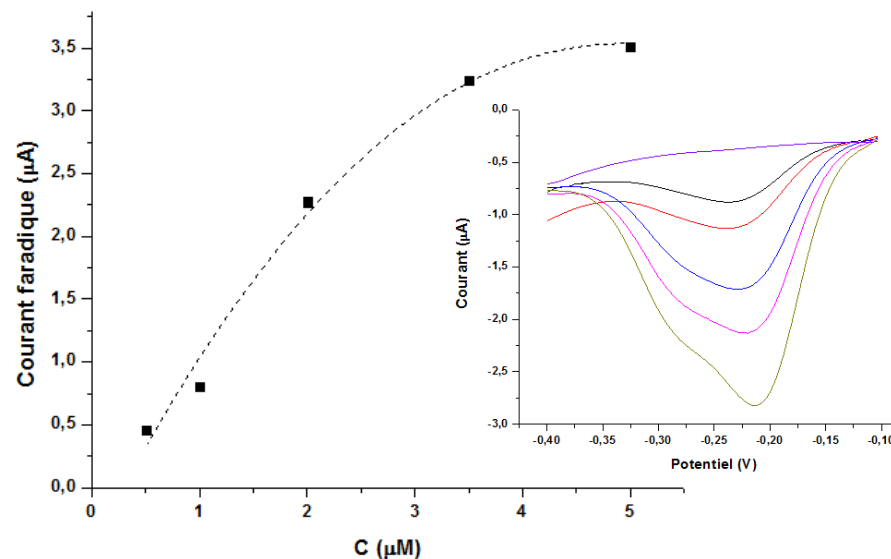


Figure 108 – Isotherme de Langmuir obtenu par électrochimie lors de l'étude des interactions Azure B / mime intramoléculaire 2. En insert, données brutes de l'enregistrement des courants faradiques pour des concentrations variant de 0.5 à 5 µM.

II-3/ Mime d'ADN quadruplexe antiparallèle

Le paragraphe précédent décrit la conception, la synthèse et l'étude d'un mime de quadruplexe intermoléculaire parallèle **1**. De par l'intérêt que montre un tel mime, nous nous sommes par la suite intéressés à développer des molécules plus complexes mimant d'autres conformations de l'ADN quadruplexe. L'utilisation de gabarits peptidiques similaires peut donner accès à des conformations de type antiparallèle, ceci en greffant des brins riches en guanines en 3' et en 5'. L'accès à de telles molécules demande de mettre au point deux chimies complémentaires et chimiosélectives pour fonctionnaliser le gabarit peptidique avec les brins en antiparallèles. Les deux types de chimie choisis sont la chimie des oximes (précédemment utilisée) et la cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée par le Cu^I (utilisé au *Chapitre I*). La compatibilité de ces deux chimies a récemment été montrée pour la synthèse d'architectures peptidiques²⁷⁶ et de conjugués d'oligonucléotides.²⁷⁷ Ce paragraphe s'intéresse à la description de la synthèse et des expériences de caractérisation des mimes obtenus.

II-3-1 Mime de quadruplexe de cytosine (i-motif)

Dans un premier temps, la stratégie de synthèse a été appliquée à la préparation de quadruplexe de cytosines (ou i-motifs) pour des facilités de mise au point. Les i-motifs sont des arrangements de quatre brins nucléiques *via* l'association deux à deux de quatre brins riches en cytosines (voir *Introduction*). Ces structures tétramériques présentent certaines similitudes avec les motifs quadruplexes de guanines. Bien que leur intérêt biologique ne soit pas encore prouvé, il est logique de penser que leur implication est étroitement liée à l'ADN quadruplexe, puisque le brin complémentaire des séquences capable de former un motif G4 (brin riche en guanines) est riche en cytosines et montre une prédisposition à former une structure de type i-motif. Par exemple, l'équipe de Laurence Hurley a montré que le brin complémentaire de la séquence promotrice de l'oncogène *RET* (qui est capable de former un motif quadruplexe) est capable de former *in vitro* un i-motif.¹¹² La recherche de petites molécules organiques interagissant et stabilisant ce type de motif présente ainsi un certain intérêt et le développement d'outil pour le criblage ou l'étude des interactions peut conduire à la découverte de ce type de ligands.

a) Synthèse

Le mime d'i-motif **35** est synthétisé en suivant une stratégie similaire à celle utilisée pour la synthèse du mime d'ADN quadruplexe intermoléculaire parallèle **1**. La première étape consiste à développer un gabarit peptidique présentant les fonctions réactives utilisées par la suite pour greffer les brins nucléiques. La première fonction chimique employée est une

276. Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D., One-pot approach to well-defined biomolecular assemblies by orthogonal chemoselective ligations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48* (14), 2576-9.

277. Meyer, A.; Spinelli, N.; Dumy, P.; Vasseur, J. J.; Morvan, F.; Defrancq, E., Oligonucleotide sequential bis-conjugation via click-oxime and click-Huisgen procedures. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (11), 3927-30.

fonction oxyamine et son introduction est faite par le greffage d'un « linker » présentant cette fonction protégée sur une lysine du gabarit peptidique. Cette fonction sera par la suite utilisée pour greffer un oligonucléotide présentant une fonction aldéhyde en 3' selon un protocole similaire à celui décrit dans l'Article 1. La deuxième fonction chimique est un groupement azide qui sera utilisé pour effectuer une réaction de CuAAC avec un oligonucléotide présentant une fonction alcyne en 5'. L'impossibilité de l'introduction d'une fonction azide sur un oligonucléotide dirige cette approche. En effet les groupements azide sont incompatibles avec la synthèse des oligonucléotides, car ils forment des iminophosphoranes *via* une réaction de Staudinger avec les phosphoramidites.²⁷⁸ Pour introduire cette fonction sur le châssis, un acide aminé modifié a été synthétisé et introduit directement lors de la synthèse peptidique en phase solide. La lysine modifiée **23** est obtenue *via* une réaction de diazo-transfert sur l'acide aminé commercial en utilisant l'azoture d'imidazole-1-sulfonyle **22** comme agent de diazo-transfert en présence d'une quantité catalytique de Cu^{II} (Figure 109).²⁷⁹

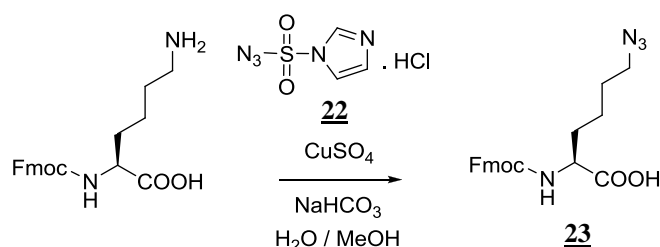


Figure 109 – Synthèse du synthon Lysine modifié présentant une fonction azide.

L'acide aminé ainsi obtenu est stable dans les conditions de SPPS et il est directement utilisé pour synthétiser le gabarit peptidique **30**. Celui-ci est obtenu selon le schéma classique de SPPS, suivi d'une étape de cyclisation, de fonctionnalisation et de déprotection en solution (Figure 110). Seul le peptide final **30** est purifié par RP-HPLC.

278. Jawalekar, A. M.; Meeuwenoord, N.; Cremers, J. S.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Rutjes, F. P.; van Delft, F. L., Conjugation of nucleosides and oligonucleotides by [3+2] cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (1), 287-90.

279. Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V., An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. *Org. Lett.* **2007**, *9* (19), 3797-800.

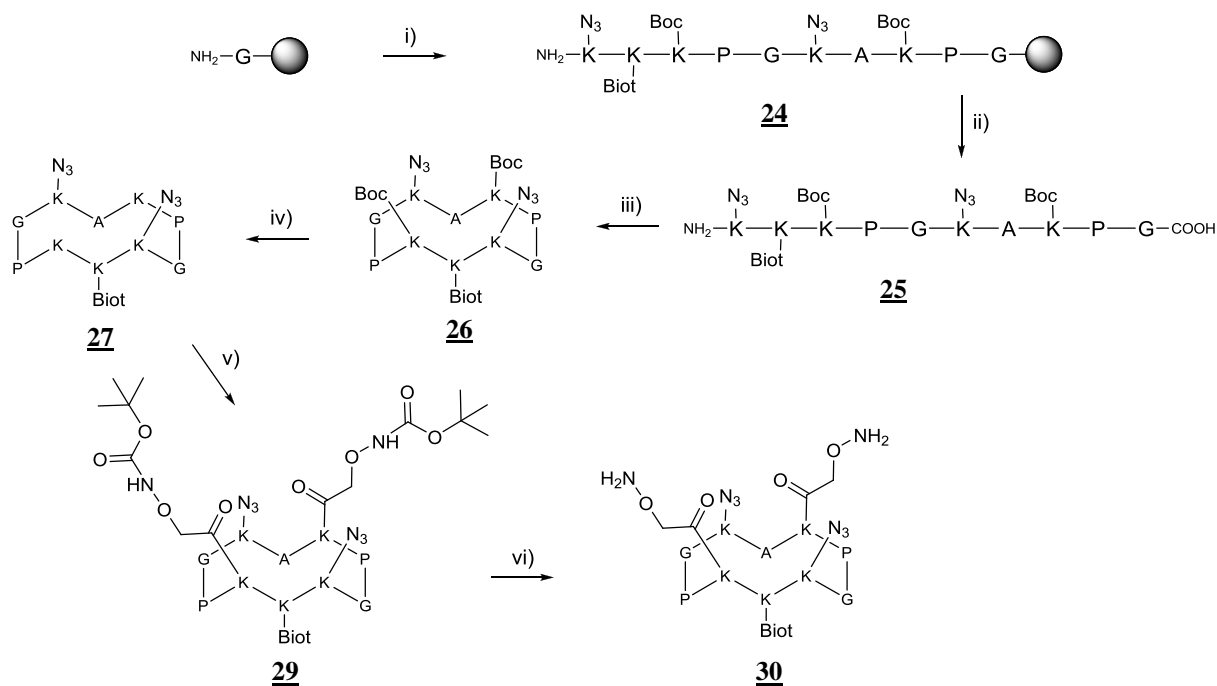


Figure 110 – Synthèse du gabarit peptidique **30** utilisé pour la conception du mème d'i-motif. i) SPPS, ii) TFA/DCM (1/90, v:v), iii) PyBOP, DIEA, DCM, iv) TFA/DCM (50/50, v:v), v) *N*-Hydroxysuccinimidyl 2-((tert-butoxy-carbonyl)aminoxy) acétate **28**, vi) TFA/DCM/TIS (50/40/10, v:v:v).

Pour fonctionnaliser le gabarit peptidique, deux types d'oligonucléotides ont été synthétisés. Le premier présentant une fonction alcyne en 5' est obtenue par synthèse automatisée sur résine succinyl *via* l'introduction lors du dernier couplage du phosphoramidite 5'-hexynyl commercial (Figure 111).

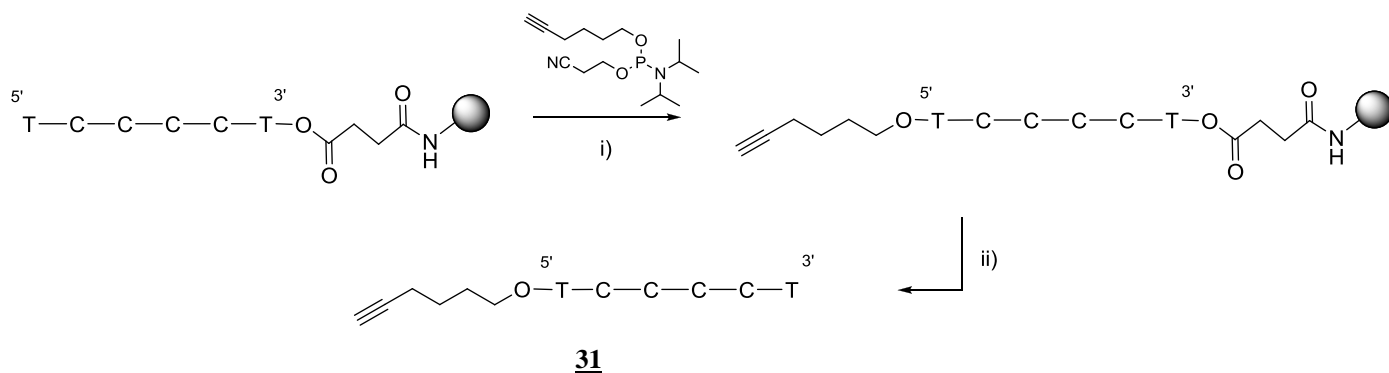


Figure 111 – Synthèse de l'ODN 5'-Alcyne **31** utilisé pour la conception du mème d'i-motif. i) Synthèse automatisée sur résine succinyl, ii) NH_4OH , 55°C.

Le deuxième type d'ODN **33** présentant une fonction aldéhyde en 3' est obtenu selon la méthode utilisée pour la synthèse du mème de quadruplexe intermoléculaire **1** (voir *Article I*). Le mème d'i-motif **35** est alors obtenu en deux étapes à partir du gabarit peptidique **30** et des deux oligonucléotides **31** et **33** (Figure 112). La première étape effectuée est la formation de l'éther d'oxime, car la nécessité de déprotéger les fonctions oxyamines en milieu acide (TFA/DCM, 50:50) empêche d'effectuer la réaction de CuAAC en premier lieu (instabilité des ODNs en milieu acide). On effectue ainsi en premier lieu la condensation des fonctions

oxyamines présentes sur le peptide **30** sur la fonction aldéhyde présentée en 3' de l'oligonucléotide **33**. Cette étape se fait en milieu acide (tampon AcONH₄ 0.4M pH 4.5) et on obtient l'intermédiaire **34** avec 44% de rendement après purification par RP-HPLC. Le produit final **35** est obtenu en effectuant la réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen entre les fonctions azide présentes sur le gabarit peptidique du composé **34** et les résidus alcyne des ODNs **31**. La réaction s'effectue en présence de CuSO₄ et d'ascorbate de sodium pour générer le Cu^I nécessaire à la catalyse de la réaction. La réaction s'effectue sous activation micro-onde pour améliorer le rendement et diminuer le temps de réaction. Le mime d'i-motif **35** est obtenu avec un rendement de 78% après purification.

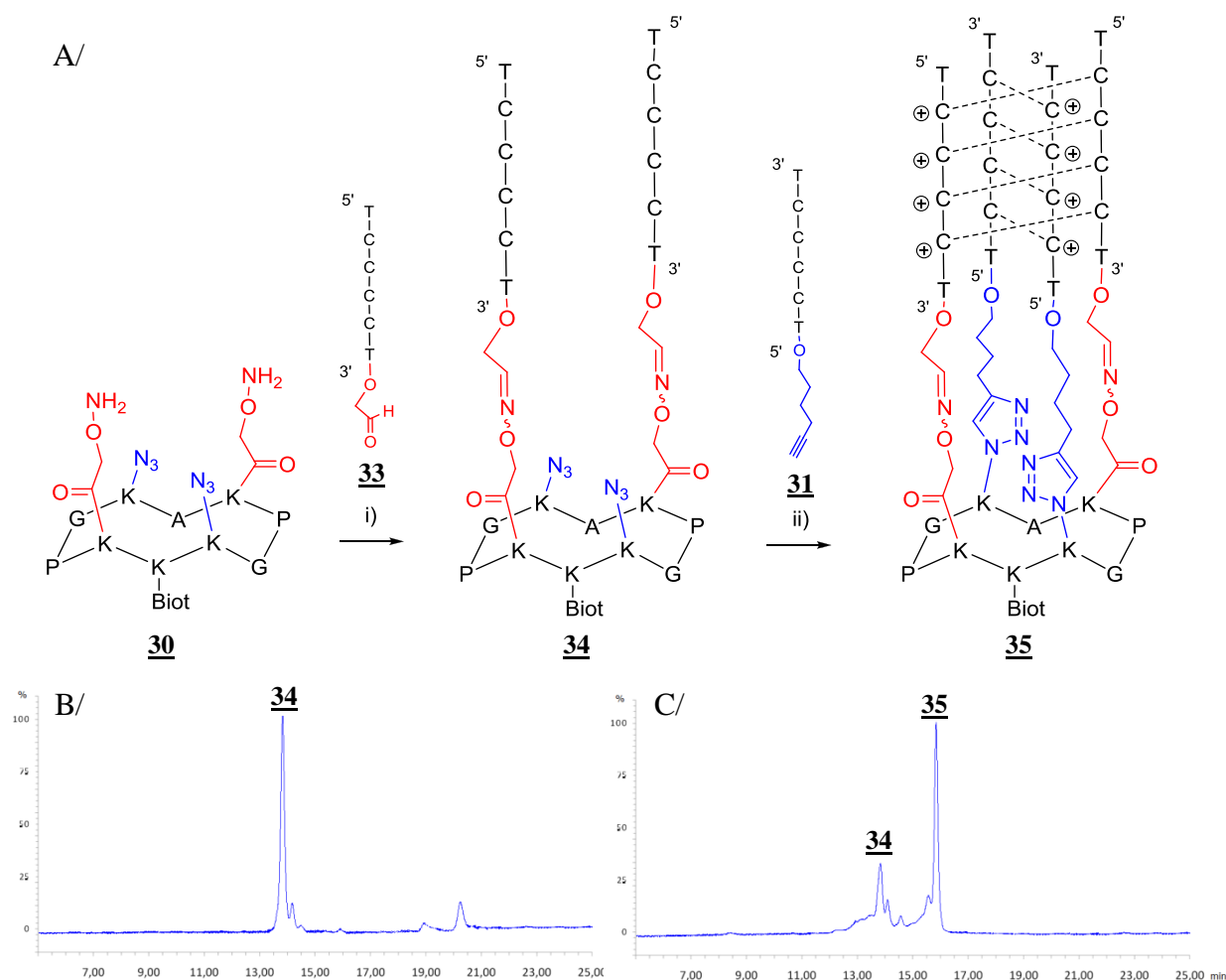


Figure 112 – A/ Synthèse du mime d'i-motif **35**. i) ODN **33**, tampon AcONH₄ 0.4M pH 4.5, ii) ODN **31**, CuSO₄, ascorbate de sodium, M.W. B/ et C/ Chromatogrammes suivis à 260nm obtenus lors des étapes i) et ii) respectivement.

Cette méthode de synthèse est actuellement en cours d'optimisation. Ces réactions pourraient être effectuées en une seule étape (« one-pot ») en modifiant le pH avant l'ajout des ODNs alcyne et les réactifs nécessaires à la CuAAC.²⁷⁷ En effet la réaction de formation d'oxime est catalysée en milieu acide (formation d'une base de Schiff en présence d'AcONH₄) alors que la réaction de CuAAC se déroule en milieu légèrement basique (pour l'étape de déprotonation de l'alcyne). On peut noter que la voie d'accès actuelle permet l'obtention de l'intermédiaire **34** qui peut théoriquement former une structure de type i-motif

via une association intermoléculaire bimoléculaire. Le prochain paragraphe s'intéresse alors à la caractérisation physico-chimique des édifices obtenus.

b) *Études physico chimiques*

La capacité des deux mimes **34** et **35** à former une structure i-motif a été évaluée par dichroïsme circulaire. Les spectres obtenus ont également été comparés avec l'i-motif formé par l'association intermoléculaire de quatre brins de séquence d(TCCCCT). Les spectres CD normalisés sont présentés sur la Figure 113. Le spectre CD du complexe non modifié d[TCCCCT]₄ à pH 4.5 montre un maximum à 286.5 nm et un minimum à 264 nm. Le spectre CD du mime d'i-motif intermoléculaire **34** présente deux maxima à 284 nm et 254 nm et deux minima à 263.5 nm et 235.5 nm. Le spectre CD du mime d'i-motif **35** présente un maximum à 282.5 nm et deux épaulements à 259 nm et 246.5 nm.

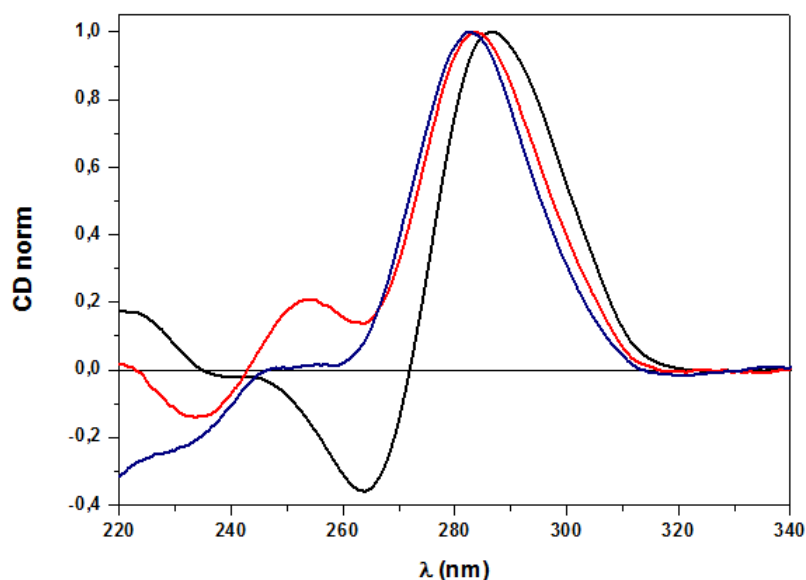


Figure 113 – Spectres CD normalisés à pH 4.5 et 20°C du complexe d[TCCCCT]₄ (en noir), du mime d'i-motif intermoléculaire **34** (en rouge) et du mime d'i-motif intramoléculaire **35** (en bleu). Les analyses sont effectuées dans un tampon PBS 10mM, NaCl 0.3M.

Les mimes **34** et **35** ont un spectre CD similaire au spectre du complexe d[TCCCCT]₄ (notamment un maximum vers 285 nm), ce qui confirme que les différentes architectures sont capables de former une structure en i-motif. Néanmoins les spectres obtenus sont suffisamment différents pour traduire une différence dans la structuration de chacune des architectures. Pour quantifier la participation du gabarit peptidique dans la structuration des architectures étudiées, l'influence de la température sur le signal CD a été étudiée. Les spectres CD de chacun des composés pour des températures variant de 5 à 70°C ont été enregistrés à pH 4.5. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 114.

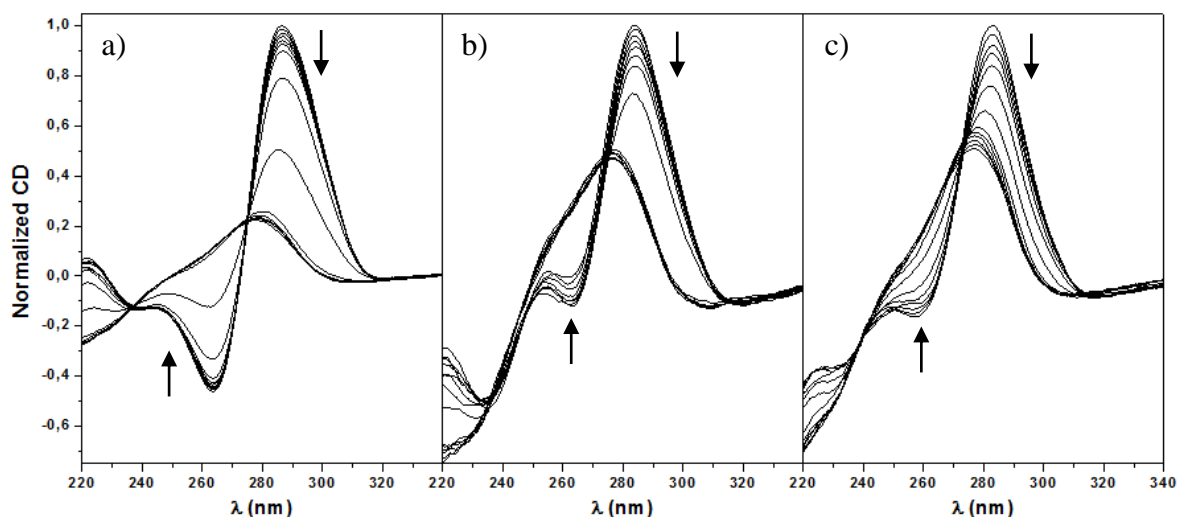


Figure 114 – Spectres CD normalisés pour des températures variables allant de 5 à 70°C des complexes a) d[TCCCCT]₄, b) du mime d'i-motif intermoléculaire **34** et c) du mime d'i-motif intramoléculaire **35**.

Les expériences réalisées permettent de remarquer que les spectres CD obtenus à 70°C, c'est-à-dire quand toutes les structures secondaires sont dénaturées, ont le même profil et présentent un maximum à 277.5 nm. Ainsi après dénaturation les oligonucléotides sont dans le même environnement. On peut également constater que la variation du profil CD des mimes d'i-motif intermoléculaire **34** et d'i-motif intramoléculaire **35**, en fonction de la température, est similaire. Ainsi l'influence du gabarit peptidique dans ces deux structures est identique. Les courbes de dénaturation obtenues en suivant la variation du signal CD au λ_{\max} sont représentées sur la Figure 115a et permettent d'estimer la stabilité des complexes formés.

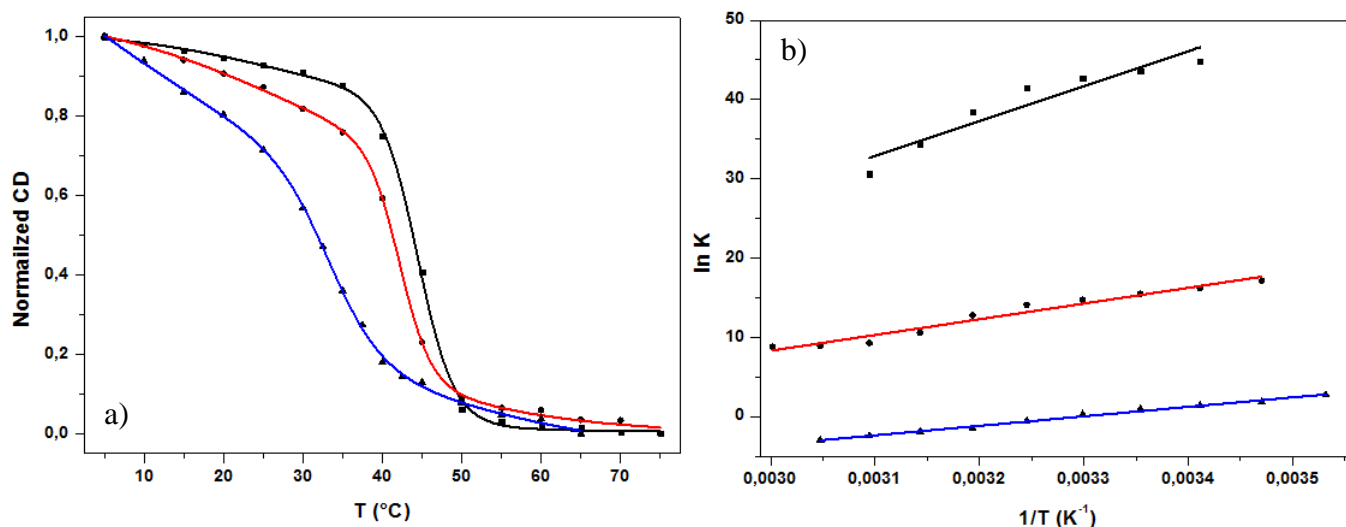


Figure 115 – a) Courbes de dénaturation et b) Variation de $\ln K=f(1/T)$ pour le complexe d[TCCCCT]₄ (en noir), du mime d'i-motif intermoléculaire **34** (en rouge) et du mime d'i-motif intramoléculaire **35** (en bleu). Les expériences de dénaturation ont été effectuées en suivant le signal CD à 286.5 nm pour d[TCCCCT]₄, à 284 nm pour **34** et à 282.5 nm pour **35**.

Les stabilités des différents complexes ont été évaluées en mesurant les T_m . On obtient ainsi pour le complexe d[TCCCCT]₄ un T_m de 44.6°C, pour le mime d'i-motif intermoléculaire un T_m de 42.5°C et pour le mime d'i-motif intramoléculaire un T_m de 33.3°C. Il est intéressant de constater que contrairement au cas du mime de quadruplexe intermoléculaire **1**, l'introduction du gabarit peptidique déstabilise l'i-motif formé. La structuration de ce type de motif étant régie par l'état de protonation des cytosines de la structure, il est possible que la présence du gabarit peptidique qui force la proximité des brins nucléiques modifie localement le pKa des cytosines et déstabilise la structure formée. Des études supplémentaires sont nécessaires pour vérifier si l'influence du gabarit est le même quel que soit le pH ou si pour des pH plus élevés on retrouve l'effet stabilisateur du gabarit. Un traitement thermodynamique des courbes de dénaturation a été effectué. Comme expliqué dans l'Article 1, les différents paramètres peuvent être obtenus à partir des droites représentant $\ln(K) = f(1/T)$ (Figure 115b). Pour les systèmes étudiés la constante d'équilibre K va s'exprimer différemment en fonction du type de processus étudié. Pour l'i-motif intramoléculaire **35**, $K = \Theta / (1-\Theta)$, pour l'i-motif intermoléculaire **34** (structure bimoléculaire), $K = \Theta / (2.c_o.(1-\Theta)^2)$ et pour le complexe d[TCCCCT]₄ (structure tétramoléculaire), $K = \Theta / (4.c_o^3.(1-\Theta)^4)$, où Θ représente la fraction d'oligonucléotides structurés ($0.04 \leq \Theta \leq 0.96$) et c_o la concentration initiale en ODN. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le Tableau 9.

	T_m (°C)	ΔH° (kcal.mol ⁻¹)	ΔS° (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔG° (kcal.mol ⁻¹)	r
d[TCCCCT] ₄	44.6	-174	-206	-26.1	0.889
Mime d'i-motif intermoléculaire 34	42.5	-39	-102	-8.7	0.959
Mime d'i-motif intramoléculaire 35	33.3	-24	-78	-0.4	0.991
d(TCCTCCTTTTCCTCCT) ^{c)}	38	-38	-120	-2.8	/

Tableau 9 – Paramètres thermodynamiques des différents i-motifs (pH 4.5). a) La valeur de ΔG° est précisée pour 298K, b) r représente la valeur du coefficient de corrélation obtenue par linéarisation des points expérimentaux. c) Les valeurs obtenues pour cette séquence formant un i-motif intramoléculaire sont données à titre indicatif et sont extraites de la réf 280.

Les coefficients de corrélation r obtenus permettent d'estimer la précision des valeurs obtenues. Ainsi dans le cas du complexe d[TCCCCT]₄, les valeurs calculées ne sont pas très précises mais permettent une comparaison avec les autres systèmes. Pour améliorer ces valeurs, il faudrait déterminer les paramètres thermodynamiques *via* l'étude de l'influence de la concentration initiale en ODN sur le T_m . Néanmoins les valeurs calculées permettent de montrer que la composante entropique est la plus favorable dans le cas d'un processus intramoléculaire et que l'instabilité de l'i-motif intramoléculaire **35** est principalement due à une faible enthalpie de formation. Une comparaison avec les paramètres thermodynamiques obtenus pour l'i-motif formé par la séquence d(TCCTCCTTTTCCTCCT) permet de

280. Mergny, J. L.; Lacroix, L.; Han, X.; Leroy, J. L.; Hélène, C., Intramolecular Folding of Pyrimidine Oligodeoxynucleotides into an i-DNA Motif. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (35), 8887-8898.

remarquer que l'introduction du gabarit peptidique apporte néanmoins un gain d'énergie sous forme entropique.

L'ensemble des résultats décrits dans ce paragraphe ne constitue que les résultats préliminaires d'une étude plus importante. En effet l'influence du pH et de la concentration initiale en ODNs sur la stabilité des architectures formées est en cours.

Le gabarit peptidique utilisé est fonctionnalisé par un résidu biotine pour permettre le greffage du mime d'i-motif intramoléculaire **35** sur une surface et l'étude des interactions entre petites molécules organiques et ce type de motif. Des candidats ont déjà été sélectionnés et des études par SPR seront réalisées.

II-3-2 Conception de mime d'ADN quadruplexe antiparallèle

L'utilisation d'une chimie similaire à celle décrite précédemment peut donner accès à de nombreuses topologies de structure quadruplexe. Cette dernière partie présente les études préliminaires effectuées par Romaric Bonnet (dans le cadre de sa première année de thèse) pour le développement de mime d'ADN quadruplexe contraint. Ces résultats sont décrits dans ce manuscrit pour montrer la modularité de l'approche utilisée précédemment pour la conception de mime d'ADN quadruplexe.

a) Conception

De courts extraits nucléiques issus de la séquence télomérique humaine sont capables d'adopter des conformations de type G-quadruplexe. Mais la topologie adoptée dépend du nombre de brins, de leurs orientations, ainsi que de la nature des cations présents en solution (voir le *Rappel Bibliographique*). Ce haut degré de polymorphisme et la difficulté à contrôler la topologie souhaitée peuvent poser problème lors de l'étude de l'interaction de ligands avec ce type de structure. Le concept introduit précédemment permet théoriquement l'accès contrôlé à toutes les topologies souhaitées *via* la synthèse d'un gabarit peptidique adéquat. Toutes les architectures développées présentent également l'avantage de présenter un point d'ancrage pour la fonctionnalisation d'une surface et l'étude des interactions par SPR. Les résultats préliminaires présentés par la suite nous montrent que malheureusement le contrôle de ces structures n'est pas aussi simple que prévu et nécessite encore un développement assidu.

b) Synthèse

Les structures actuellement ciblées sont des mimes de quadruplexes intramoléculaires ne présentant aucune boucle. Actuellement trois types de structures ont été synthétisées selon trois topologies accessibles : un mime de quadruplexe antiparallèle **36** présentant les brins d'orientations similaires selon la diagonale du gabarit peptidique, un mime de quadruplexe antiparallèle **37** présentant les brins d'orientations similaires sur un côté du gabarit, et un mime de quadruplexe hybride **38** présentant trois brins selon la même orientation et le dernier selon une orientation inverse. Les structures des mimes synthétisés sont présentées sur la Figure 116.

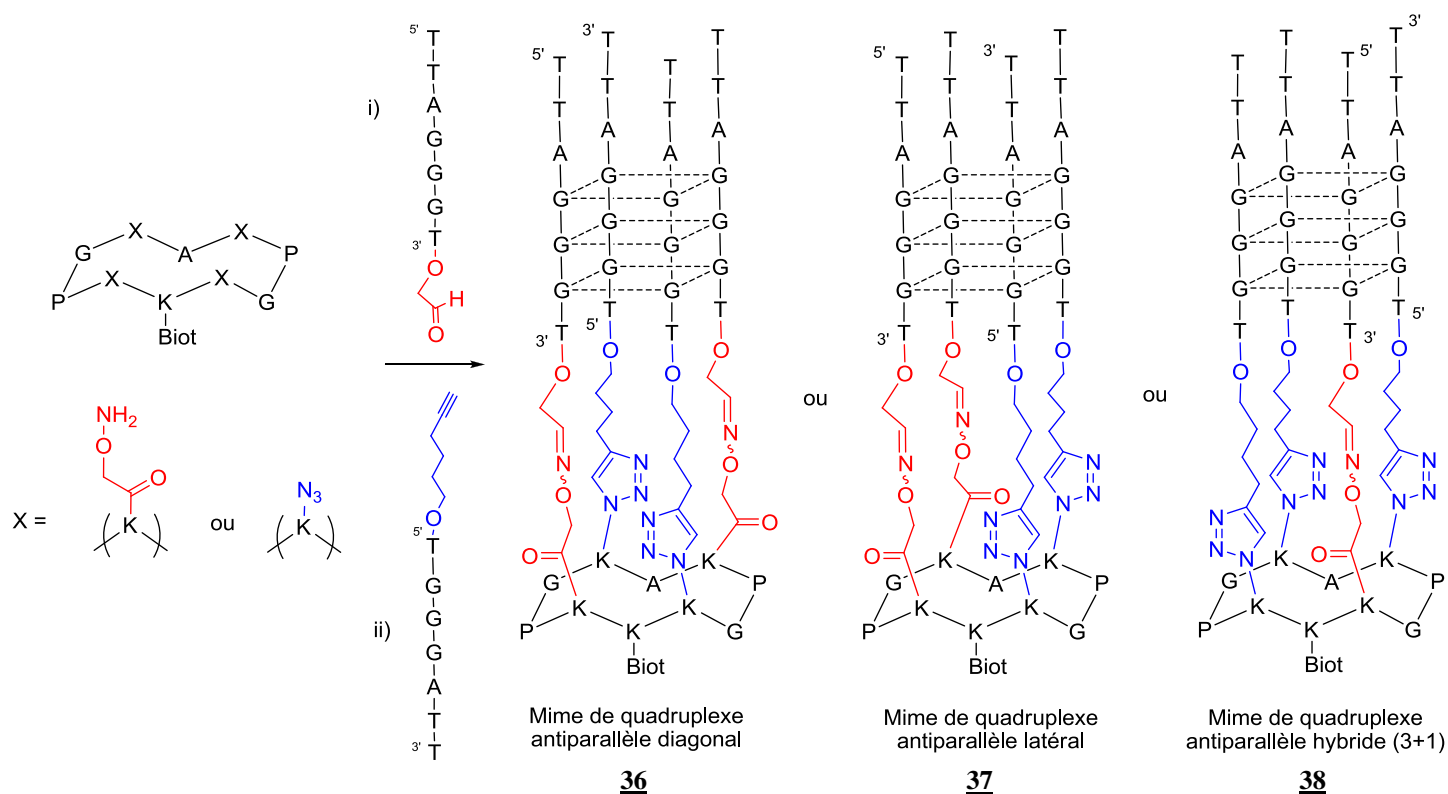


Figure 116 – Structure chimique et synthèse des mimes de quadruplexe antiparallèle diagonal **36**, latéral **37** et hybride **38**.

Ces différents mimes sont obtenus *via* une synthèse similaire à celle décrite pour le mime d'i-motif **35**. La synthèse d'un gabarit peptidique présentant de façon contrôlée des fonctions oxyamine et azide, permet d'obtenir les mimes souhaités en deux étapes *via* la condensation d'ODNs présentant une fonction aldéhyde en 3' et la réaction de CuAAC avec des ODNs présentant une fonction alcyne en 5'. Les mimes sont obtenus en deux étapes avec des rendements allant de 11 à 18%. Ces faibles rendements sont principalement dus à des problèmes de purifications.

c) Études physico chimique

La capacité des mimes **36**, **37** et **38** à former une structure quadruplexe a été évaluée par dichroïsme circulaire. L'ensemble des spectres enregistrés est présenté sur la Figure 117. Le spectre du mime de quadruplexe antiparallèle diagonal **36** présente un minimum à 232 nm et un maximum à 255 nm. Le spectre du mime de quadruplexe antiparallèle latéral **37** présente un minimum à 236.5 nm, un maximum à 256 nm et un épaulement à 272.5 nm. Le spectre du mime de quadruplexe hybride **38** présente un épaulement à 229 nm, un minimum à 241.5 nm et un maximum à 267. Les résultats obtenus sont assez inattendus, puisque les spectres obtenus semblent proches des spectres CD « classiques » de quadruplexes parallèles. Le mime de quadruplexe antiparallèle latéral **37** présente un spectre CD encore plus étonnant avec un épaulement à 272.5 nm qui traduit une structuration complexe.

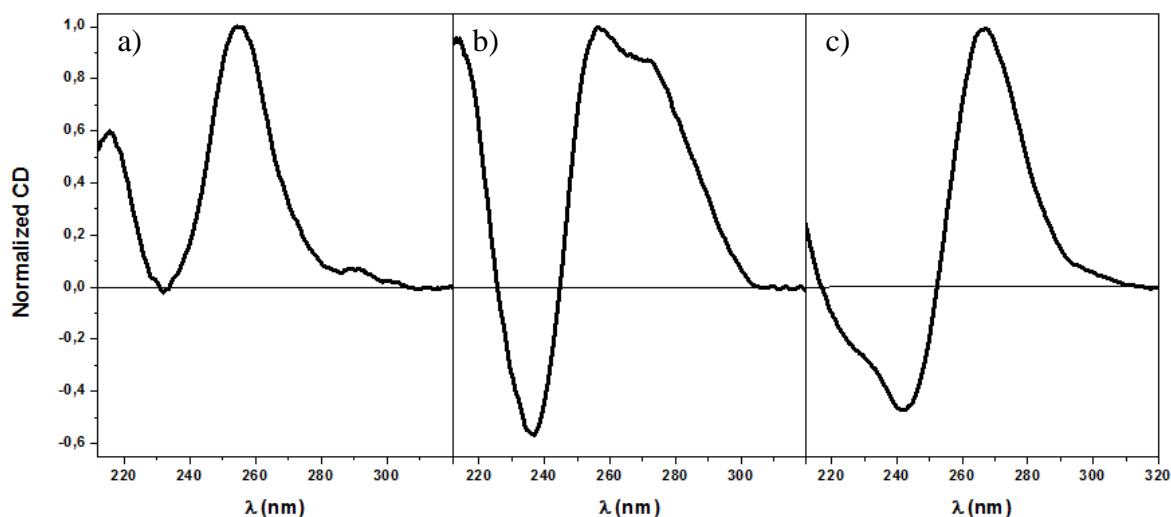


Figure 117 – Spectre CD des mimes de quadruplexe antiparallèle a) diagonal **36**, b) latéral **37** et c) hybride **38**. Les spectres sont enregistrés dans un tampon Tris.HCl 10mM pH 7,4, 100mM KCl à une concentration de 5 μ M en ODNs et à 20°C.

Tous les mimes synthétisés présentent une structuration particulière en solution, mais l'interprétation des spectres CD obtenus semble complexe. Si l'on considère la relation empirique classique (maximum à 260 nm et minimum à 240 nm \rightarrow quadruplexe parallèle et maximum à 295 nm et minimum à 260 nm \rightarrow quadruplexe antiparallèle), on en déduit que les mimes synthétisés adoptent en solution une structure de type quadruplexe parallèle. Cette conclusion paraît étonnante, mais la flexibilité de la molécule peut certainement permettre ce type de structuration. En effet la présence de bras espaceurs flexibles et la présence de bases non appariées (autres que les guanines) pourrait donner suffisamment de liberté à la molécule pour replier les brins nucléiques dans une conformation parallèle. Ce phénomène est observé par l'équipe de G. Piccialli qui observe des structures parallèles pour des structures contraintes par un espaceur flexible en antiparallèle.²⁸¹

Néanmoins, ces dernières années cette règle simple d'interprétation des spectres CD ne semble plus satisfaire à l'interprétation de structures complexes et synthétiques. L'exemple le plus représentatif est le complexe $d[\text{TG}^{\text{Br}}\text{GGT}]_4$ (ou G^{Br} représente une 8-bromodéoxyguanine) qui forme en solution un quadruplexe intermoléculaire parallèle (étude structurale à l'appui), mais dont le spectre CD présente deux maxima à 296 nm et 263 nm.²⁸² Ainsi l'orientation des brins ne suffit pas à expliquer l'allure du spectre CD. A. Randazzo et G. P. Spada ont proposé récemment une théorie d'interprétation des spectres CD basée sur l'inversion de polarité des tétrades empilées et l'orientation des guanines (*syn* ou *anti*) des

281. Oliviero, G.; Borbone, N.; Amato, J.; D'Errico, S.; Galeone, A.; Piccialli, G.; Varra, M.; Mayol, L., Synthesis of quadruplex-forming tetra-end-linked oligonucleotides: effects of the linker size on quadruplex topology and stability. *Biopolymers* **2009**, *91* (6), 466-77.

282. Esposito, V.; Randazzo, A.; Piccialli, G.; Petraccone, L.; Giancola, C.; Mayol, L., Effects of an 8-bromodeoxyguanosine incorporation on the parallel quadruplex structure $[\text{d}(\text{TGGGT})]_4$. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 313.

tétrades présentes dans la structure quadruplexe.²⁸³ Cette approche du dichroïsme circulaire permet de montrer que des architectures complexes peuvent avoir des spectres CD inattendus. Dans le cas de nos structures contraintes par un gabarit rigide, il est tout à fait possible d'envisager que les mimes synthétisés forment des quadruplexes de type antiparallèle, mais possédant un spectre CD de quadruplexe « parallèle ». Seule une étude structurale permettrait de confirmer cette hypothèse.

283. Masiero, S.; Trotta, R.; Pieraccini, S.; De Tito, S.; Perone, R.; Randazzo, A.; Spada, G. P., A non-empirical chromophoric interpretation of CD spectra of DNA G-quadruplex structures. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *2010* (8), 2683-2692.

II-4/ Bilan

Dans ce chapitre, la mise au point, la synthèse et l'étude de mimes de quadruplexes d'acides nucléiques ont été présentées. Le premier mime introduit utilise un gabarit peptidique pour l'adressage contrôlé de quatre courtes séquences d'ADN extraites de la séquence télomérique humaine. Le composé **1** obtenu forme en solution un motif quadruplexe de type parallèle. L'utilisation du gabarit permet de contraindre la conformation et de stabiliser un motif quadruplexe. L'introduction d'une contrainte permet la formation d'un motif quadruplexe même en l'absence de cation pour stabiliser la structure. Les caractéristiques de ce mime de quadruplexe intermoléculaire sont développées dans l'*Article 1*. Un des avantages du gabarit peptidique est la présence d'un résidu lysine sur la face inférieure du châssis qui permet de fonctionnaliser une surface. Cette particularité a été utilisée pour développer un test par SPR pour étudier l'interaction de petites molécules organiques avec différentes conformations d'ADN quadruplexe. L'utilisation du mime de quadruplexe **1** représente le premier exemple de quadruplexe intermoléculaire immobilisé sur une surface pour des études SPR.

Afin de développer ce test, un mime de quadruplexe intramoléculaire **2** et un mime de duplexe **3** ont tous deux été synthétisés. Les deux conjugués sont greffés sur un gabarit peptidique afin d'avoir des objets comparables. Le test SPR mis au point permet de déterminer l'affinité et la sélectivité de différents ligands pour deux systèmes d'ADN quadruplexes (une conformation contrôlée et une séquence « naturelle ») et pour un système d'ADN duplexe. Il est intéressant de constater que le rapport des affinités d'un ligand pour le quadruplexe intramoléculaire **2** et pour le quadruplexe intermoléculaire **1** permet de déterminer le principal mode d'interaction du ligand étudié.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'interaction d'un ligand particulier, la TMPyP4, sur les deux systèmes introduits précédemment. L'étude thermodynamique des interactions, réalisée par ITC et SPR, montre que la porphyrine a un comportement bien différent selon la conformation du quadruplexe. D'un point de vue méthodologique, cette étude montre que la SPR et l'ITC peuvent être deux techniques complémentaires pour l'étude des interactions petites molécules organiques/ADN. Finalement, le système développé a été utilisé pour effectuer le criblage de nouveaux ligands. Parmi les résultats positifs, quatre molécules électroactives ont été identifiées, et leurs propriétés particulières sont actuellement utilisées pour développer une technique d'étude des affinités par électrochimie.

Récemment, l'utilisation de gabarits peptidiques et de deux chimies orthogonales ont permis la synthèse de mimes de quadruplexes antiparallèles. Pour mettre au point les conditions de synthèse, un mime d'i-motif a été développé et étudié. Des mimes d'ADN-quadruplexe antiparallèles sont actuellement en cours de développement. Les résultats préliminaires montrent que ces différents mimes ont des comportements inattendus et que des études plus poussées sont nécessaires pour appréhender complètement les différents paramètres impliqués dans la structuration de ces différents mimes.

II-5/ Partie expérimentale

La partie expérimentale de cette partie fait appel à des protocoles décrits précédemment. Le lecteur devra ainsi se reporter également à la partie expérimentale de la *Partie A*. Seuls les protocoles particuliers à cette partie seront décrits ici. De plus, de nombreux renseignements sont également disponibles dans les « Supporting Information » des *Article 1* et *2* et ne seront pas rappelés ici.

II-5-1 Materials and equipments

a) Reagents and solvents

All solvents and reagents used were of highest purity commercially available. β -cyanoethyl phosphoramidites and CPG resins were purchased from BioSolve BV (Valkenswaard, Netherlands) or Eurogentec (Angers, France).

b) RP-HPLC

RP-HPLC analyses and purifications were performed on a Gilson HPLC system with dual wavelength detector. RP-HPLC analyses of oligonucleotides were performed on a Nucleosil C18 column (Macherey Nagel, 250 x 4.6 mm, 5 μ m) using the following solvent system: solvent A, 50 mM triethylammonium acetate buffer containing 5% acetonitrile; solvent B, acetonitrile containing 5% water; flow rate of 1 mL.min⁻¹; a linear gradient of 0-45 % B was applied in 20 minutes. UV absorbance was monitored at 260 nm and 280 nm simultaneously. Purifications were performed on a μ -Bondapak C-18 column (Macherey-Nagel Nucleosil, 10 x 250 mm, 7 μ m) with similar gradient at a flow rate of 4 mL.min⁻¹.

c) Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

ITC experiments have been performed on a Microcal VP-ITC apparatus. Each samples were prepared on a HBS-EP buffer (100mM NaCl, 100mM KCl, EDTA 3mM, HEPES 10mM, pH 7.4) and were degassed prior to use. Quadruplex mimics **1** and **2** were introduced in the sample cell at a concentration of 10 μ M. TMPyP4 was titrated into the sample by a series of 10 μ L injections each 300 s of a 225 μ M or a 300 μ M stock solution for **1** and **2** respectively. Blank thermograms were subtracted from collected data. Experimental curves were fitted with Origin 7.0.

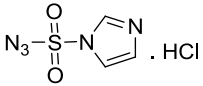
II-5-2 Synthesis procedures

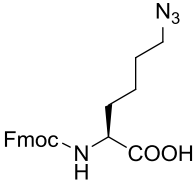
a) General procedures for the synthesis of oligonucleotides

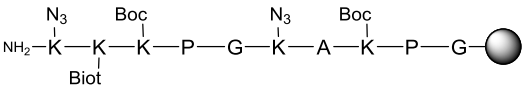
Automated syntheses of oligonucleotides were performed on a 3400 DNA Synthesizer (Applied Biosystems) using standard solid phase methods on succinyl or glyceryl support. Cleavage of the support and full déprotection of nucleobases were performed by a NH₄OH treatment at 55°C overnight.

b) Synthesis of i-motif mimics

The procedures used to synthesize the different intermediates of the mimics **34** and **35** will be described here.

Imidazole-1-sulfonyl azide chlorhydrate salt	<u>22</u>
	<p>Yield : 69 %</p> <p>ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 173.0 g.mol⁻¹ m/z found: 173.2 g.mol⁻¹</p> <p>¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 9.53 (dd, 1H), 8.09 (dd, 1H), 7.68 (dd, 1H)</p>
<p>Sulfonyl chloride (1 eq) was added drop-wise to an ice-cooled suspension of NaN₃ (1 eq) in CH₃CN and the mixture stirred overnight at room temperature. Imidazole (2 eq) was added to the ice-cooled mixture and the resulting mixture was stirred for 3 h at RT. The mixture was diluted with EtOAc. The organic layer was washed with H₂O, saturated aqueous NaHCO₃, dried over MgSO₄ and filtered. A solution of HCl in EtOH (obtained by the drop-wise addition of AcCl (1.5 eq) to ice-cooled dry ethanol) was added drop-wise to the filtrate with stirring, the mixture chilled in an ice-bath, filtered and washed with EtOAc. The chlorhydrate salt <u>22</u> is obtained as a white powder.</p>	

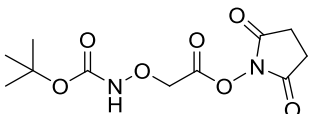
Fmoc-azidolysine	<u>23</u>
	<p>Yield : 91 %</p> <p>ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 394.4 g.mol⁻¹ m/z found: 394.2 g.mol⁻¹</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.75 (d, 2H), 7.60 (d, 2H), 7.38 (t, 2H), 7.29 (t, 2H), 5.3 (d, 1H), 4.2 (d, 2H), 4.12 (t, 1H), 3.8 (m, 1H), 3.2 (t, 2H), 1.5 (m, 6H)</p>
<p>To a stirred mixture of Fmoc-lysine (1 eq) and CuSO₄ (0.02 eq) in methanol/water (8:2) was added NaHCO₃ (3.5 eq) followed by imidazole-1-sulfonyl azide chlorhydrate salt <u>22</u> (1.2 eq). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of NaHCO₃. The reaction mixture was stirred overnight at RT and the pH was acidified at 2 using HCl 3M. The mixture was extract with EtOAc and the combined organic phase was washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in order to obtain the building block as a yellowish oil which was used without further purification</p>	

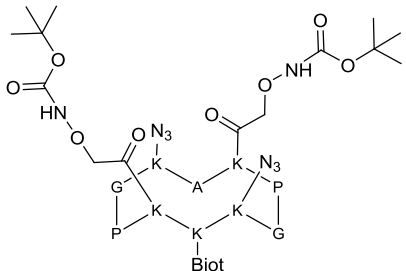
H-K(N ₃)-K(Biot)-K(Boc)-P-G-K(N ₃)-A-K(Boc)-P-G-Sasrin [®]	<u>24</u>
	
<p>The synthesis was performed manually using Fmoc/tBu strategy on a Sasrin[®] resin using PyBOP as activating agent and Fmoc-azidolysine <u>23</u> using the classical protocol.</p>	

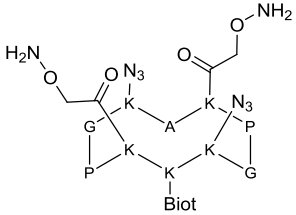
H-K(N ₃)-K(Biot)- K(Boc)-P-G- K(N ₃)-A- K(Boc)-P-G-OH	<u>25</u>
$ \begin{array}{cccccccccccc} & \text{N}_3 & & \text{Boc} & & & \text{N}_3 & & \text{Boc} & & & & \\ & & & & & & & & & & & & \\ \text{NH}_2 & -\text{K} & -\text{K} & -\text{K} & -\text{P} & -\text{G} & -\text{K} & -\text{A} & -\text{K} & -\text{P} & -\text{G} & -\text{COOH} \\ & & & & & & & & & & & & \\ & & & \text{Biot} & & & & & & & & & \end{array} $	ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 1516.8 g.mol ⁻¹ m/z found: 1516.8 g.mol ⁻¹
The peptide <u>24</u> was released from the resin using a solution of TFA/DCM (1:99, v:v). After evaporation under vacuum, the peptide <u>25</u> was precipitated with ether. The crude material was used without additional purification.	

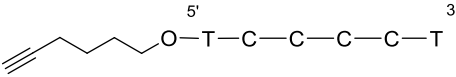
c[-K(N ₃)-K(Biot)- K(Boc)-P-G- K(N ₃)-A- K(Boc)-P-G-]	<u>26</u>
$ \begin{array}{ccccccc} & \text{N}_3 & & \text{Boc} & & \text{N}_3 & \\ & & & & & & \\ \text{Boc} & -\text{K} & -\text{A} & -\text{K} & -\text{N}_3 & -\text{P} & \\ & & & & & & \\ \text{G} & -\text{K} & -\text{K} & -\text{K} & -\text{G} & -\text{P} & \\ & & & & & & \\ & & & \text{Biot} & & & \end{array} $	ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 1498.8 g.mol ⁻¹ m/z found: 1498.7 g.mol ⁻¹
Linear peptide <u>25</u> (1 eq) was dissolved in DCM (0.5 mM) then PyBOP (1.5 eq) and DIEA (to obtain pH 8-9) were added. The solution was stirred at RT for 2 h and the solvent was removed under vacuum and the peptide <u>26</u> was then precipitated with ether.	

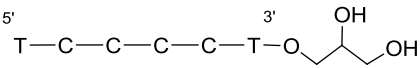
c[-K(N ₃)-K(Biot)- K-P-G- K(N ₃)-A- K-P-G-]	<u>27</u>
$ \begin{array}{ccccccc} & \text{N}_3 & & & & \text{N}_3 & \\ & & & & & & \\ \text{G} & -\text{K} & -\text{A} & -\text{K} & -\text{N}_3 & -\text{P} & \\ & & & & & & \\ \text{P} & -\text{K} & -\text{K} & -\text{K} & -\text{G} & -\text{P} & \\ & & & & & & \\ & & & \text{Biot} & & & \end{array} $	ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 1298.6 g.mol ⁻¹ m/z found: 1298.3 g.mol ⁻¹
Peptide <u>26</u> was dissolved in DCM/TFA (1:1, v:v) and stirred at RT for 1h. The solvent was removed under vacuum and the peptide <u>27</u> was precipitated with ether.	

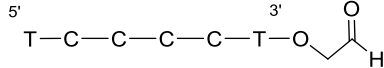
<i>N'</i> -hydroxysuccinimidyl <i>N</i> -Boc-aminoxyacetate	<u>28</u>
	<p>Yield : 83%</p> <p>ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 288.1 g.mol⁻¹ m/z found: 288.7 g.mol⁻¹</p> <p>¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.66 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 2.87 (s, 4H), 1.49 (s, 9H)</p>
<p>To a stirred solution of <i>N</i>-Boc-aminoxyacetic acid (1 eq) in ethyl acetate/dioxane (1:1) cooled on an ice bath were added <i>N</i>-hydroxysuccinimide (1.1 eq) and DCC (1.1 eq). The resulting mixture was stirred at RT for 5 h and was then filtered through a pad of celite, and the filtrate was concentrated under vacuum. The obtained residue was redissolved in ethyl acetate and washed with 5% aqueous NaHCO₃, water and brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄ and evaporated in vacuo. The crude solid was recrystallized from CH₂Cl₂/Et₂O/pentane, thereby providing pure compound <u>28</u> as a white solid.</p>	

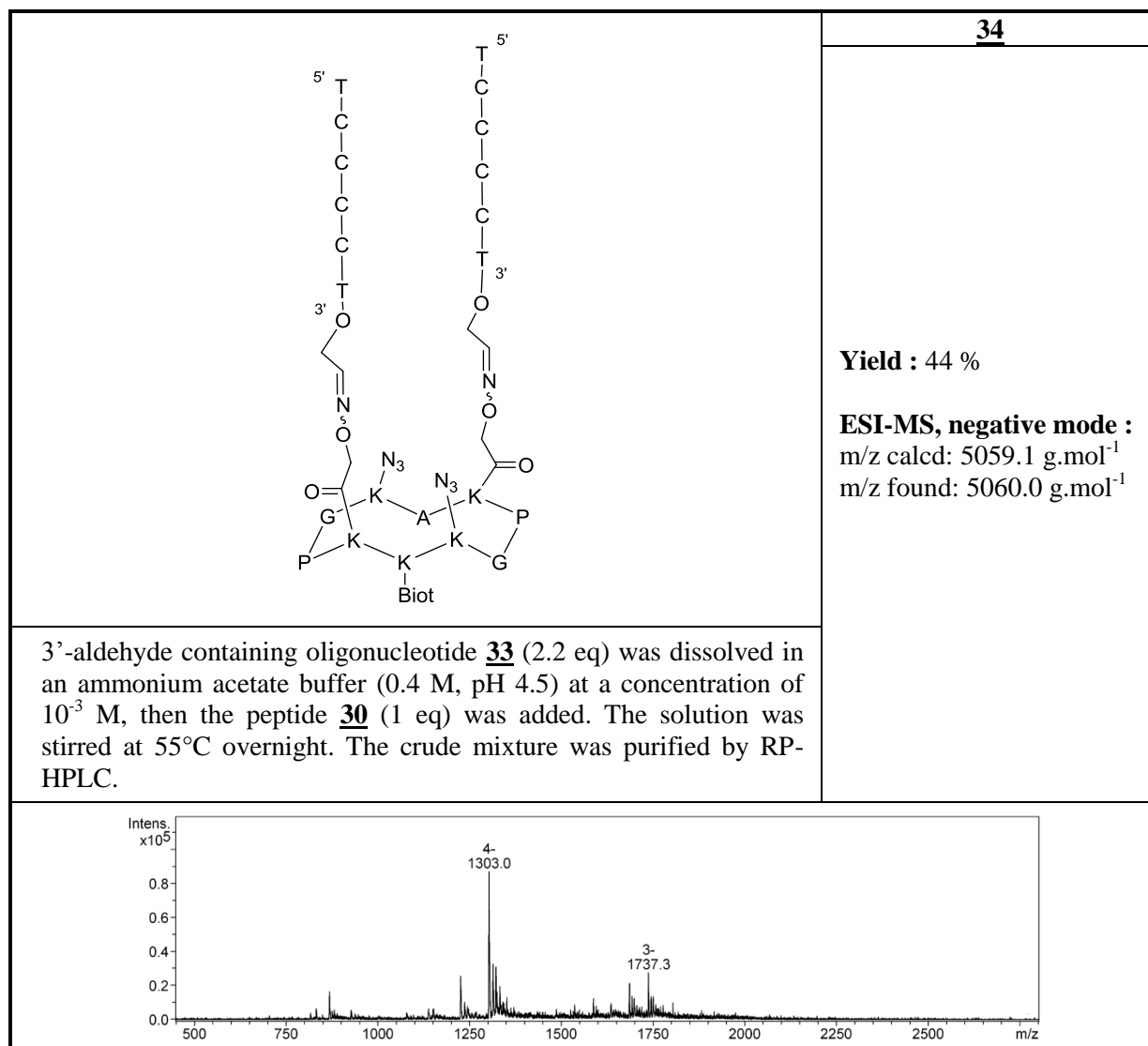
c[-K(N ₃)-K(Biot)- K(CO-CH ₂ -O-NH-Boc)-P-G- K(N ₃)-A- K(CO-CH ₂ -O-NH-Boc)-P-G-]	<u>29</u>
	<p>ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 1644.9 g.mol⁻¹ m/z found: 1644.6 g.mol⁻¹</p>
<p>Peptide <u>27</u> (1 eq) was dissolved in anhydrous DMF in presence of DIEA (to obtain pH 8-9) and <i>N'</i>-hydroxysuccinimidyl <i>N</i>-Boc-aminoxyacetate <u>28</u> (2.2 eq) was then added. The solution was stirred at RT for 2h and the solvent was removed under vacuum. The peptide <u>29</u> was then precipitated with ether.</p>	

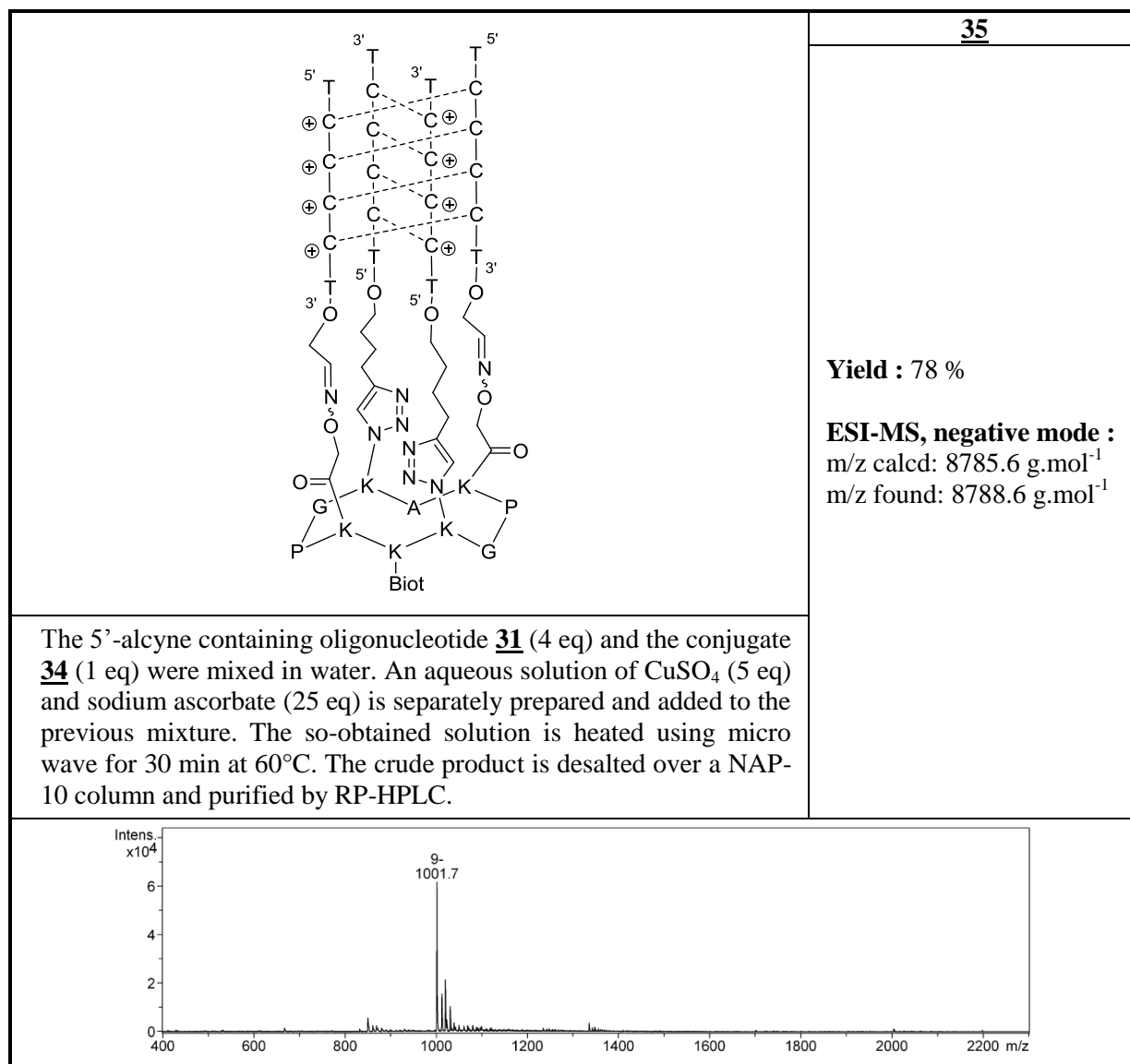
c[-K(N ₃)-K(Biot)- K(CO-CH ₂ -O-NH ₂)-P-G- K(N ₃)-A- K(CO-CH ₂ -O-NH ₂)-P-G-]	<u>30</u>
	<p>ESI-MS, positive mode : m/z calcd: 1444.7 g.mol⁻¹ m/z found: 1444.2 g.mol⁻¹</p>
<p>Peptide <u>29</u> was dissolved in a solution of TFA/DCM/TIS/H₂O (50:45:2.5:2.5) and stirred at RT for 1h. The peptide was purified using RP-HPLC and freeze-dried.</p>	

5'-Hexynyl-d(TCCCCT)	<u>31</u>
	ESI-MS, negative mode : m/z calcd: 1863.3 g.mol ⁻¹ m/z found: 1864.0 g.mol ⁻¹
Automated synthesis of ODNs was performed on a 3'-succinyl CPG resin and the modified hexynyl phosphoramidite was added during the last coupling. The resin was cleaved with an aqueous ammoniac solution (28%) for 16 h at 55°C and the 5'-alkyne containing oligonucleotide <u>31</u> was purified by RP-HPLC.	

d(TCCCCT)-3'-diol	<u>32</u>
	ESI-MS, negative mode : m/z calcd: 1857.2 g.mol ⁻¹ m/z found: 1857.9 g.mol ⁻¹
Automated synthesis of ODNs was performed on a 3'-glyceryl CPG resin. The resin was cleaved with an aqueous ammoniac solution (28%) for 16 h at 55°C and the 3'-diol containing oligonucleotide <u>X</u> was purified by RP-HPLC. Removal of the dimethoxytrityl ether was carried out by dissolving the crude in an aqueous acetic acid solution (80%) for 1 h at RT. After freeze-drying the residue was dissolved in water and washed with ether.	

d(TCCCCT)-3'-aldehyde	<u>33</u>
	Yield : 92 % ESI-MS, negative mode : m/z calcd: 1825.2 g.mol ⁻¹ m/z found: 1825.6 g.mol ⁻¹
The 3'-diol containing oligonucleotide <u>32</u> (1 eq) was dissolved in an aqueous solution of sodium metaperiodate (20 eq) to reach a concentration of 10 ⁻³ M. The reaction mixture was stirred at RT for 1.5 h then the aldehyde <u>33</u> was desalted over a NAP-10 column.	





II-5-3 General procedures for SPR experiments

SPR experiments have been performed on a Biacore[®] T100. Experiments have been run at 25°C on a SA chip in the following HBS-EP running buffer: 10mM HEPES, 100mM NaCl, 100mM KCl, 3mM EDTA, pH 7,4. Binding experiments were conducted at 30 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ by injection of the ligands, Azure B, Basic Blue 41, Basic Red 2 and Nile Blue Chloride, dissolved in the running buffer at concentrations of 0.1 – 80 μM (injection time: 180 or 240 s, dissociation time: 240s). Regeneration of the surface was achieved by an injection (30s, 30 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) of MgCl₂ 4 M. A non-modified channel was used as reference. Curves obtained on the reference surface were deduced from the curves recorded on the recognition one, allowing elimination of refractive index changes due to buffer effects. A linear Scatchard binding plot was found for the studied interactions, except for the interaction of Basic Red 2 on the mimic **2**. The absence of a mass transport limitation on the experiments was checked on each surface by separately running one injection of each ligand for 180 s at different flow rates ranging from 10 to 70 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The so-obtained curves could be overlaid, confirming the kinetic control of the experiments.

Azure B

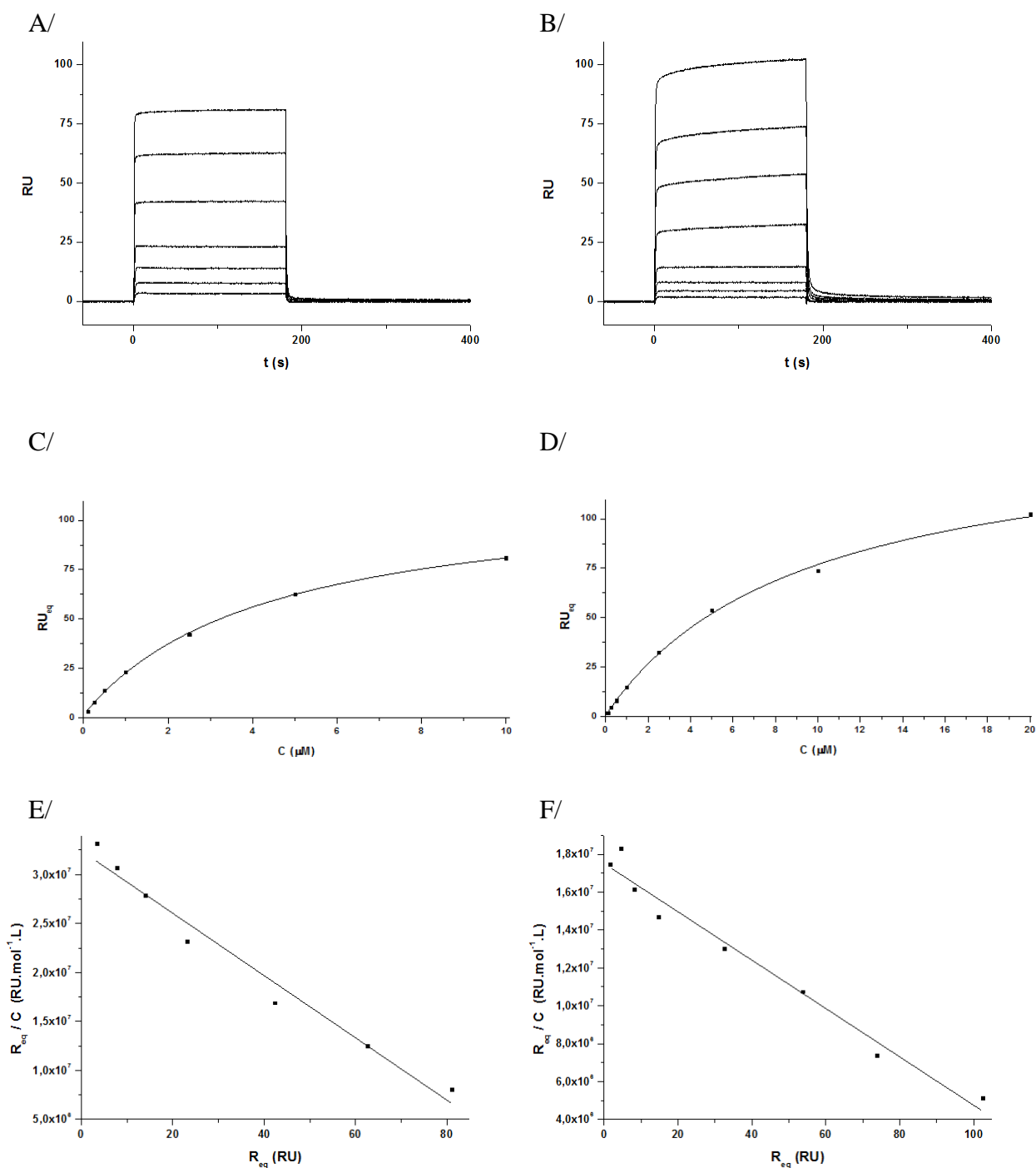


Figure 118 - SPR sensorgrams for the interaction of Azure B with A) the intermolecular-like quadruplex 1, B) the intramolecular quadruplex 2. The ligand concentration was varied from 0.1 μM (bottom curve) to 10 μM or 20 μM (top curve). Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of Azure B with C) the intermolecular-like quadruplex 1, D) the intramolecular quadruplex 2. Scatchard binding plots and linear fitting of the interaction between Azure B and E) the intermolecular-like quadruplex 1, F) the intramolecular quadruplex 2.

Basic Blue 41

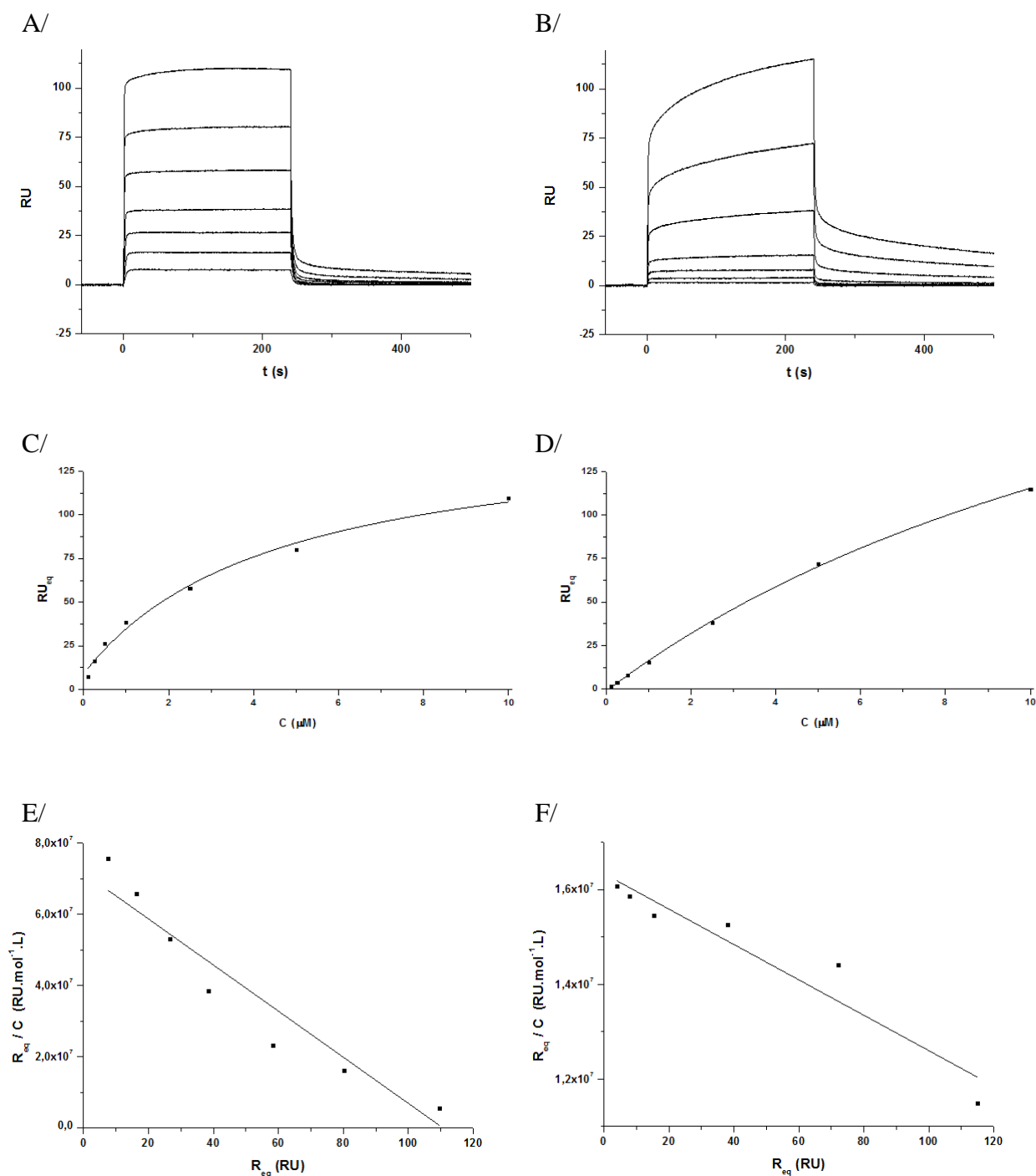


Figure 119 - SPR sensorgrams for the interaction of Basic Blue 41 with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2**. The ligand concentration was varied from 0.1μ M (bottom curve) to 10μ M (top curve). Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of Basic Blue 41 with C) the intermolecular-like quadruplex **1**, D) the intramolecular quadruplex **2**. Scatchard binding plots and linear fitting of the interaction between Basic Blue 41 and E) the intermolecular-like quadruplex **1**, F) the intramolecular quadruplex **2**.

Basic Red 2

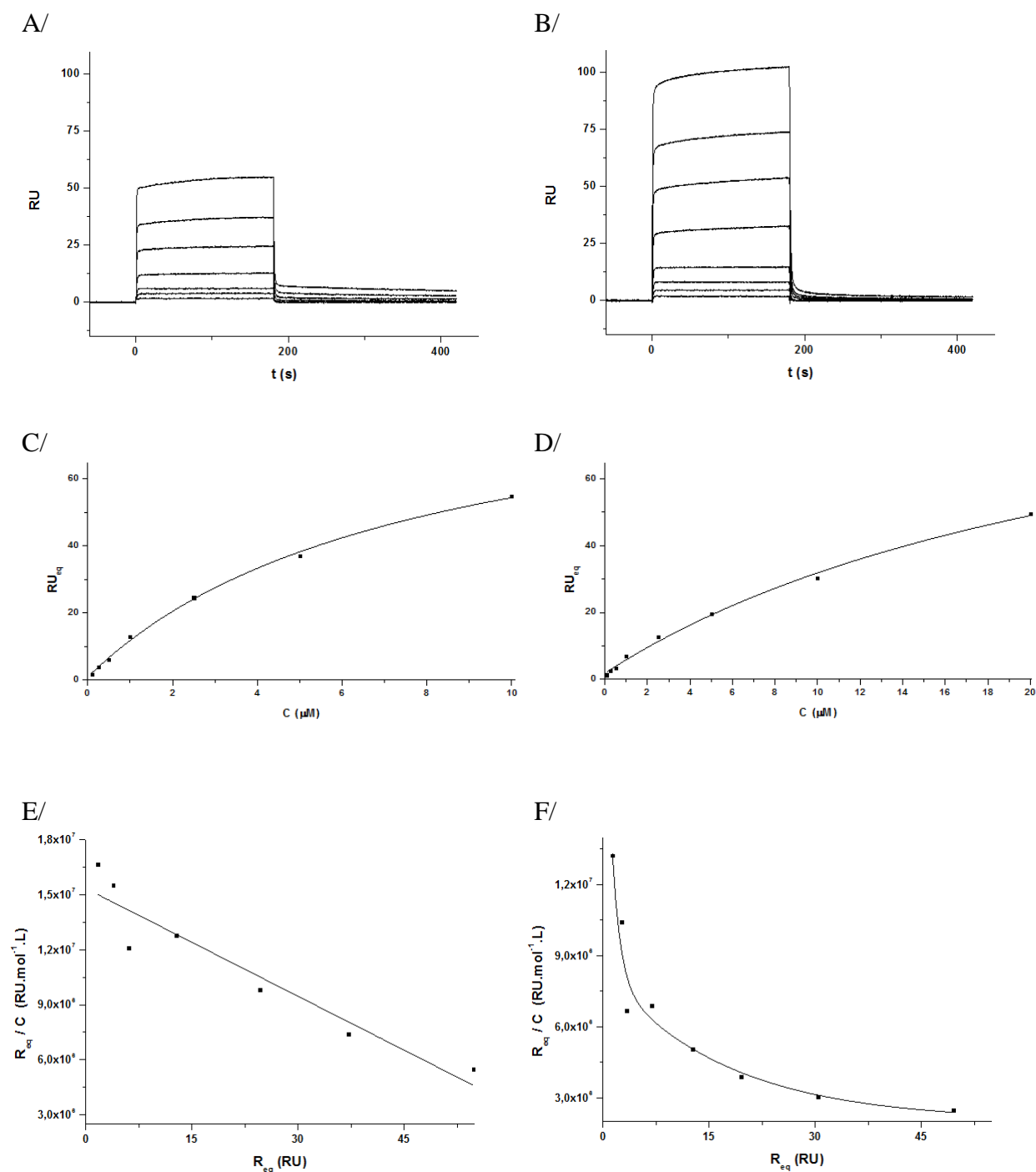


Figure 120 - SPR sensorgrams for the interaction of Basic Red 2 with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2**. The ligand concentration was varied from 0.1 μM (bottom curve) to 10 μM or 20 μM (top curve). Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of Basic Red 2 with C) the intermolecular-like quadruplex **1**, D) the intramolecular quadruplex **2**. Scatchard binding plots and linear fitting of the interaction between Basic Red 2 and E) the intermolecular-like quadruplex **1**, F) the intramolecular quadruplex **2**.

Nile Blue Chloride

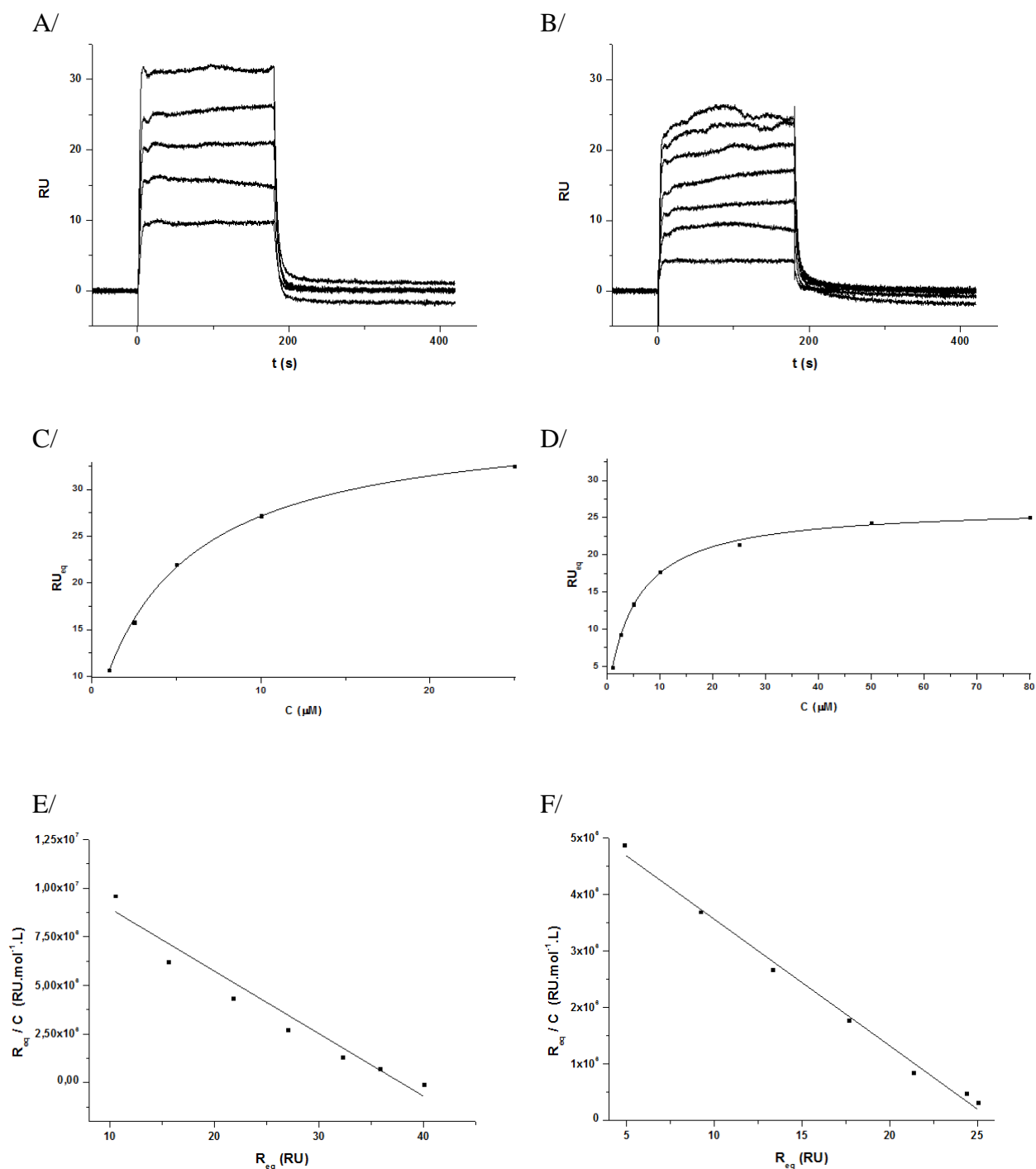


Figure 121 - SPR sensorgrams for the interaction of Nile Blue Chloride with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2**. The ligand concentration was varied from 1 μM (bottom curve) to 25 μM or 80 μM (top curve). Adsorption isotherms fitted with a Langmuir model for the association of Nile Blue Chloride with C) the intermolecular-like quadruplex **1**, D) the intramolecular quadruplex **2**. Scatchard binding plots and linear fitting of the interaction between Nile Blue Chloride and E) the intermolecular-like quadruplex **1**, F) the intramolecular quadruplex **2**.

Conclusion et perspectives

Le travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans le développement d'architectures synthétiques supramoléculaires et biomimétiques. Pour cela, l'utilisation de gabarit cyclodécapeptidique de type TASP, permet le contrôle de la formation de structures de type tétrades de guanines ou quadruplexes d'acides nucléiques *via* la préorganisation de dérivés de guanosines. Ces résultats montrent que le principe de préorganisation est un élément crucial pour le contrôle de la formation d'architectures complexes.

Chapitre 1 : Les deux architectures obtenues grâce aux composés synthétisés **4** et **5** montrent que la formation de tétrades de guanines dans un environnement défavorable (solvant aqueux) et en l'absence de cation pour stabiliser la structure peut être contrôlée *via* l'utilisation d'un gabarit peptidique. L'ensemble des études ayant été réalisées en l'absence de cation, une attention toute particulière sera consacrée à l'étude de la complexation de différents cations avec les architectures obtenues. Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux tétrades composés par quatre guanines, car elles présentent un intérêt crucial de par leur implication dans la formation des quadruplexes d'acides nucléiques. Néanmoins il a été montré qu'il existe d'autres types de tétrades formées par l'association de quatre nucléobases. Certains motifs quadruplexes mettent en évidence la formation de tétrades formées par l'association de deux guanines et de deux cytosines (G:C:G:C), ou de deux thymines et deux adénines (T:A:T:A), ou par quatre adénines (A:A:A:A) et par quatre thymines (T:T:T:T) (Figure 122).²⁸⁴ Ces tétrades sont stabilisées dans les motifs quadruplexes par leurs empilements sur les tétrades de guanines. Nous envisageons ainsi d'utiliser le système mis au point pour synthétiser et étudier ces autres types de tétrades. Un gabarit cyclodécapeptidique permettrait alors de contraindre ces tétrades qui sont thermodynamiquement moins stables et la présence des noyaux triazoles permettrait de stabiliser la tétrade formée. Dans le cas des tétrades formées par plusieurs types de nucléobases, la mise au point et l'utilisation de deux chimies orthogonales introduira un nouveau défi synthétique.

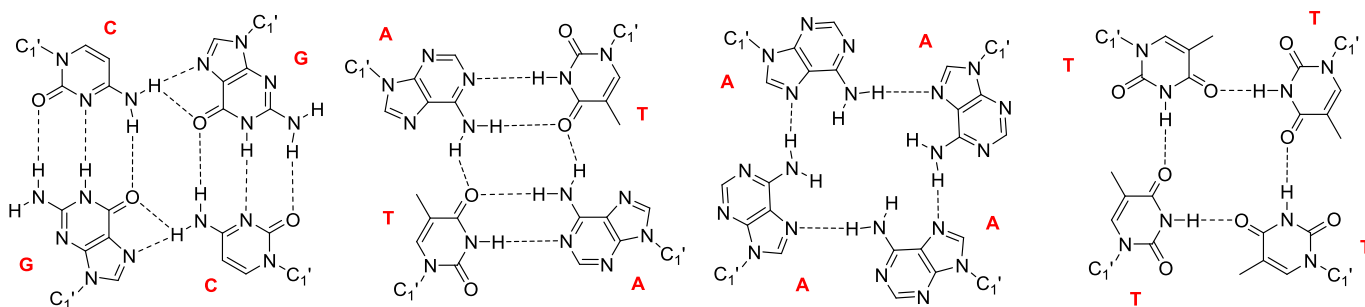


Figure 122 – Possibles arrangements de nucléobases pour la formation de tétrades G:C:G:C, T:A:T:A, A:A:A:A, T:T:T:T.

284. (a) Zhang, N.; Gorin, A.; Majumbar, A.; Kettani, A.; Chernichenko, N.; Skripkin, E.; Patel, D. J., Crystal Structure of an RNA Purine-Rich Tetraplex Containing Adenine Tetrads: Implications for Specific Binding in RNA Tetraplexes. *J. Mol. Biol.* **2001**, *312*, 1073-1088; (b) Pan, B.; Xiong, Y.; Shi, K.; Deng, J.; Sundaralingam, M., Crystal Structure of an RNA Purine-Rich Tetraplex Containing Adenine Tetrads: Implications for Specific Binding in RNA Tetraplexes. *Structure* **2003**, *11*, 815-823; (c) Webba da Silva, M., Experimental Demonstration of T:(G:G:G:G):T Hexad and T:A:A:T Tetrad Alignments within a DNA Quadruplex Stem. *Biochemistry* **2005**, *44*, 3754-3764.

Une fois ces structures obtenues, il sera intéressant d'étudier les interactions de ligands de quadruplexes avec ces différentes tétrades afin de caractériser les différents types d'empilements possibles. Ces différents modèles permettraient ainsi le développement de ligands sélectifs d'un type de tétrades particulier.

Finalement une dernière approche envisageable est l'utilisation de ce type d'architecture pour la conception de nanostructures. Il est bien entendu prévu de continuer et d'améliorer les études commencées sur le contrôle de la formation d'agrégats de GMP en utilisant le composé **4** comme initiateur et/ou catalyseur. Ces études seront réalisées en solution et sur surface *via* l'adressage du composé **4** sur une surface. La présence de deux faces distinctes sur les gabarits peptidiques permet également la création de réseaux en greffant deux guanosines sur la face supérieure et deux guanosines sur la face inférieure du châssis. Cette stratégie permettrait d'obtenir des polymères non-covalents similaires à ceux observés par J. T. Davis.⁶⁷

Chapitre 2 : La seconde partie de ce mémoire décrit l'utilisation de gabarits peptidiques pour la conception de mimes de quadruplexes d'acides nucléiques. Le premier composé obtenu **1**, montre que les châssis utilisés permettent de contraindre des ODNs dans la conformation désirée. De plus le gabarit apporte une stabilité accrue par un gain entropique et la formation du motif quadruplexe est possible en l'absence de cation. La possibilité d'adresser ce mime sur une surface a permis d'étudier, pour la première fois, l'interaction de petites molécules organiques avec un motif d'ADN quadruplexe de type intermoléculaire par SPR. Le test SPR mis en place a permis de déterminer l'affinité de certains ligands pour deux conformations de quadruplexes d'ADN différentes et pour un duplexe d'ADN. Le test, effectué sur une seule puce, permet d'obtenir la sélectivité des ligands étudiés pour chacun de ces motifs et la différence de comportement de chacun des ligands lors de leurs interactions avec un G₄ de type intermoléculaire **1** et de type intramoléculaire **2** permet de déterminer son mode d'interaction principal avec l'ADN quadruplexe. Cette approche a récemment été utilisée pour la conception de mime de quadruplexe antiparallèle (i-motif et quadruplexes de guanines) et les résultats obtenus sont pour le moment surprenant. En effet les gabarits peptidiques utilisés ne semblent pas être aussi efficaces que dans l'exemple précédent. Des études sont actuellement en cours pour caractériser entièrement les différents édifices obtenus.

Dans le cas des quadruplexes d'ADN antiparallèle **36**, **37** et **38**, il est important de bien caractériser les différentes conformations obtenues. En effet il est nécessaire tout d'abord de bien comprendre les informations apportées par les études CD. Des études structurales (RMN) seront certainement nécessaires pour caractériser entièrement ces architectures. Si les structures visées ne sont pas obtenues, il sera nécessaire de modifier le gabarit peptidique utilisé en raccourcissant, par exemple, les bras espaceurs afin d'augmenter la contrainte exercée sur les ODNs.

Il est également prévu d'étendre cette approche à d'autres types de structures et conformations de quadruplexes. Un des avantages de cette approche est la modularité des châssis peptidiques utilisés. En effet grâce à l'utilisation de chimies orthogonales l'accès à de nombreuses structures est possible. Par exemple ces dernières années, un grand nombre

Conclusion et perspectives

d'équipes a mis en évidence la participation des boucles dans les phénomènes de reconnaissance, il peut alors être intéressant de développer des mimes présentant des boucles de façon contrôlée. La Figure 123 présente le type de structures accessibles, utilisant trois ligations chimiosélectives pour la présentation de boucles latérales et diagonales sur un motif quadruplexe de guanines. Ces structures permettraient de déterminer l'influence de la topologie des boucles sur la reconnaissance de la tétrade externe d'un quadruplexe. Les informations collectées permettraient de développer des ligands plus affins et plus sélectifs d'une topologie donnée.

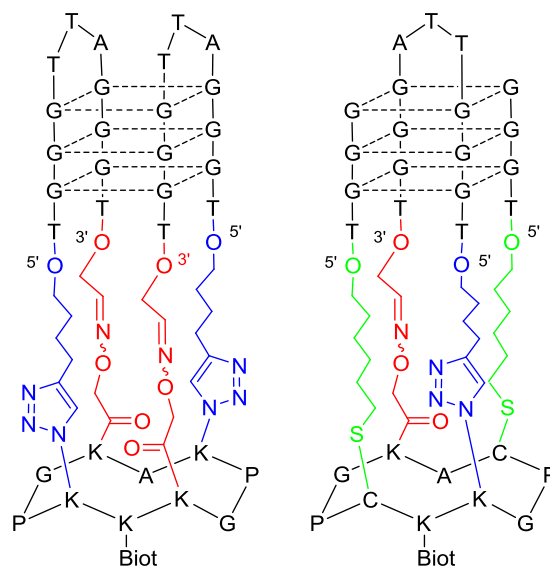


Figure 123 – Structures de mimes de quadruplexes envisageables présentant des boucles latérales et diagonales contrôlées.

Finalement l'ensemble des mimes développés seront synthétisés en série ARN pour répondre à l'intérêt croissant porté aux quadruplexes d'ARN. L'obtention de mimes d'ARN quadruplexe nécessitera une mise au point de la chimie utilisée, car la stabilité et l'intégrité de l'ARN est relativement différente de celle de l'ADN.

Le développement de l'ensemble de ces mimes permettrait la création d'un nouvel outil d'analyse et de criblage par SPR. La technologie développée par la société Biacore permet aujourd'hui l'utilisation de puces présentant jusqu'à 16 pistes (Biacore™ 4000) permettant d'étudier les interactions d'un ligand avec 16 conformations de quadruplexes en simultanée. L'ensemble des mimes obtenus permettrait de découper les interactions complexes en un ensemble d'interactions simplifiées (empilement sur une tétrade externe, interaction avec les sillons ou les boucles du motif quadruplexe). Ces études permettraient de comprendre précisément l'ensemble des paramètres intervenant dans la reconnaissance des motifs quadruplexes et fourniraient aux chimistes de synthèse des informations cruciales pour développer de nouveaux ligands plus performants.

Annexe

Equations used for fitting ITC Data

General consideration: It will be assumed throughout that the macromolecule M is in the cell at an initial bulk concentration M_i^0 (moles.L⁻¹) before the first injection, and the ligand X to be injected is initially at zero concentration in the cell. The working volume (cross-hatched area below) of the lollipop-shaped cell is V_o , the size of the i^{th} injection is ΔV_i and the total liquid which has been injected at any point during the experiment, ΔV , is simply the sum of the individual ΔV_i for all injections.

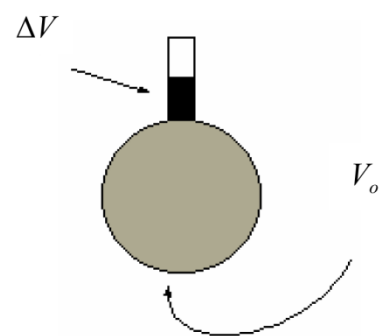


Figure 124 – Experimental set-up for ITC experiments.

At the beginning of an experiment, both the cell and the long communication tube are filled with macromolecule solution, but it is only that contained within V_o that is sensed calorimetrically. Because of the total-fill nature of the cell each injection acts to drive liquid out of the working volume and up into the inactive tube as shown by the darkened portion representing ΔV . Thus, the concentration of macromolecule in V changes a small amount with each injection since the total number of moles of macromolecule initially in V at the beginning of the experiment is later distributed in a larger volume, $V_o + \Delta V$. Since the average bulk concentration of macromolecule in ΔV is the mean of the beginning concentration M_i^0 and the present concentration M_i in the active volume, then conservation of mass requires that:

$$M_i^0 V_o = M_i V_o + \frac{1}{2} (M_i + M_i^0) \Delta V \quad \text{eq(12)}$$

so that

$$M_i = M_i^0 \left(\frac{1 - \frac{\Delta V}{2V_o}}{1 + \frac{\Delta V}{2V_o}} \right) \quad \text{eq(13)}$$

Using similar reasoning, it is easily shown that the actual bulk concentration of ligand in V_o , X_i , is related to the hypothetical bulk concentration X_i^0 (assuming that all of the injected ligand remained in V_o) as follows:

$$X_i^0 V_o = X_i V_o + \frac{1}{2} X_i \Delta V \quad \text{eq(14)}$$

so that

$$X_i = X_i^0 \left(1 - \frac{\Delta V}{2V_o} \right) \quad \text{eq(15)}$$

The above expressions for M_i and X_i are used by Origin to correct for displaced volume effects which occur with each injection.

Two sets of independent sites model: The experimental ITC data have been fitted with a model that consider two independent sites. In the following equations, K = binding constant, n = number of sites, V_o = active cell volume, M_t and $[M]$ are bulk and free concentration of macromolecule in V_o , X_t and $[X]$ are bulk and free concentration of ligand, and Θ = fraction of sites occupied by ligand X .

$$K_1 = \frac{\Theta_1}{(1-\Theta_1)[X]} \quad K_2 = \frac{\Theta_2}{(1-\Theta_2)[X]} \quad \text{eq(16)}$$

$$X_t = [X] + M_t(n_1\Theta_1 + n_2\Theta_2) \quad \text{eq(17)}$$

Solving equation (16) for Θ_1 and Θ_2 and then substituting into equation (17) gives

$$X_t = [X] + \frac{n_1 M_t [X] K_1}{1 + [X] K_1} + \frac{n_2 M_t [X] K_2}{1 + [X] K_2} \quad \text{eq(18)}$$

Clearing equation (18) of fractions and collecting like terms leads to a cubic equations of the form:

$$[X]^3 + p[X]^2 + q[X] + r = 0 \quad \text{eq(19)}$$

where

$$p = \frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_2} + (n_1 + n_2)M_t - X_t, \quad q = \left(\frac{n_1}{K_2} + \frac{n_2}{K_1} \right) M_t - \left(\frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_2} \right) X_t + \frac{1}{K_1 K_2}, \quad r = \frac{-X_t}{K_1 K_2}$$

Equations (19) can be solved for $[X]$ either in closed form or (as done in Origin) numerically by using Newton's method if parameters n_1 , n_2 , K_1 , and K_2 are assigned. Both Θ_1 and Θ_2 may then be obtained from equation (16) above.

The heat content after any injection i is equal to:

$$Q = M_t V_o (n_1 \Theta_1 \Delta H_1 + n_2 \Theta_2 \Delta H_2) \quad \text{eq(20)}$$

After a similar correction for displaced volume, the pertinent calculated heat effect for the i injections is:

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_o} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad \text{eq(21)}$$

which may be used in the Marquardt algorithm to obtain best values for the six fitting parameters.

Bibliographie

Bibliographie

1. Dahm, R., Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum. Genet.* **2008**, *122* (6), 565-81.
2. Paweletz, N., Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2001**, *2* (1), 72-5.
3. Wilson, E. B., The Structure of Protoplasm. *Science* **1899**, *10* (237), 33-45.
4. Tipson, R. S., Phoebus Aaron Theodor Levene, 1869-1940. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1957**, *12*, 1-12.
5. Avery, O. T.; Macleod, C. M.; McCarty, M., Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III. *J. Exp. Med.* **1944**, *79* (2), 137-158.
6. Watson, J. D.; Crick, F. H., Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737-8.
7. Pauling, L.; Corey, R. B., A Proposed Structure For The Nucleic Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1953**, *39* (2), 84-97.
8. (a) Wilkins, M. H.; Gosling, R. G.; Seeds, W. E., Physical studies of nucleic acid. *Nature* **1951**, *167* (4254), 759-60; (b) Franklin, R. E.; Gosling, R. G., Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* **1953**, *171* (4356), 740-1.
9. Chargaff, E.; Zamenhof, S.; Green, C., Composition of human desoxypentose nucleic acid. *Nature* **1950**, *165* (4202), 756-7.
10. Blackburn, G. M.; Gait, M. J., *Nucleic acids in chemistry and biology*. Second ed.; Oxford University Press: 1996.
11. Dickerson, R. E.; Drew, H. R.; Conner, B. N.; Wing, R. M.; Fratini, A. V.; Kopka, M. L., The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* **1982**, *216* (4545), 475-85.
12. Dickerson, R. E., DNA structure from A to Z. *Adv. Enzymol.* **1992**, *211*, 67-111.
13. Wang, A. H.; Quigley, G. J.; Kolpak, F. J.; Crawford, J. L.; van Boom, J. H.; van der Marel, G.; Rich, A., Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* **1979**, *282* (5740), 680-6.
14. Varani, G., Exceptionally stable nucleic acid hairpins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 379-404.
15. Doudna, J. A.; Cech, T. R., The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **2002**, *418* (6894), 222-8.
16. Thuong, N. T.; Helene, C., Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32* (5), 666-690.
17. Lilley, D. M.; Clegg, R. M., The structure of the four-way junction in DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22*, 299-328.
18. Egli, M., DNA-cation interactions: quo vadis? *Chem. Biol.* **2002**, *9* (3), 277-86.
19. Ghosal, G.; Muniyappa, K., Hoogsteen base-pairing revisited: resolving a role in normal biological processes and human diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *343* (1), 1-7.
20. Frank-Kamenetskii, M. D.; Mirkin, S. M., Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 65-95.
21. Agris, P. F.; Vendeix, F. A.; Graham, W. D., tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J. Mol. Biol.* **2007**, *366* (1), 1-13.
22. Neidle, S.; Balasubramanian, S., *Quadruplex Nucleic Acids*. RSC Publishing: 2006.
23. Hardin, C. C.; Watson, T.; Corregan, M.; Bailey, C., Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d(CGCG3GCG). *Biochemistry* **1992**, *31* (3), 833-41.
24. (a) Gehring, K.; Leroy, J. L.; Gueron, M., A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs. *Nature* **1993**, *363* (6429), 561-5; (b) Gueron, M.; Leroy, J. L., The i-motif in nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10* (3), 326-31.
25. Kang, C. H.; Berger, I.; Lockshin, C.; Ratliff, R.; Moyzis, R.; Rich, A., Crystal structure of intercalated four-stranded d(C3T) at 1.4 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91* (24), 11636-40.
26. Leroy, J. L.; Gueron, M.; Mergny, J. L.; Helene, C., Intramolecular folding of a fragment of the cytosine-rich strand of telomeric DNA into an i-motif. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (9), 1600-6.
27. Catasti, P.; Chen, X.; Deaven, L. L.; Moyzis, R. K.; Bradbury, E. M.; Gupta, G., Cytosine-rich strands of the insulin minisatellite adopt hairpins with intercalated cytosine+cytosine pairs. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272* (3), 369-82.

28. Gallego, J.; Chou, S. H.; Reid, B. R., Centromeric pyrimidine strands fold into an intercalated motif by forming a double hairpin with a novel T:G:G:T tetrad: solution structure of the d(TCCCGTTTCCA) dimer. *J. Mol. Biol.* **1997**, *273* (4), 840-56.
29. Kypr, J.; Kejnovska, I.; Renciuik, D.; Vorlickova, M., Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (6), 1713-25.
30. Lehn, J. M., Supramolecular Chemistry - Scope and perspectives molecules, supermolecules, and molecular devices. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27* (1), 89-112.
31. Cram, D. J., The Design of Molecular Hosts, Guests, and Their Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1009-1020.
32. Jensen, K. J.; Brask, J., Carbohydrates as templates for control of distance-geometry in de novo-designed proteins. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2002**, *59* (5), 859-69.
33. Sasaki, T.; Kaiser, E., Helichrome: Synthesis and Enzymatic Activity of a Designed Hemeprotein. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 380.
34. Villalonga, R.; Cao, R.; Fragoso, A., Supramolecular chemistry of cyclodextrins in enzyme technology. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (7), 3088-116.
35. (a) Hamuro, Y.; Calama, M. C.; Park, H. S.; Hamilton, A. D., A Calixarene with Four Peptide Loops: An Antibody Mimic for Recognition of Protein Surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36* (23), 2680-2683; (b) Huttunen-Hennelly, H. E.; Sherman, J. C., An investigation into the native-like properties of de novo designed cavitand-based four-helix bundle proteins. *Biopolymers* **2008**, *90* (1), 37-50.
36. Ghadiri, M. R.; Soares, C.; Choi, C., Design of an Artificial Four-Helix Bundle Metalloprotein via a Novel Ruthenium(II)-Assisted Self-Assembly Process. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4000-4002.
37. Whitesides, G. M.; Simanek, E. E.; Mathias, J. P.; Seto, C. T.; Chin, D. N.; Mammen, M.; Gordon, D. M., Noncovalent Synthesis: Using Physical-Organic Chemistry To Make Aggregates. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 37-44.
38. Stevens, S. Y.; Swanson, P. C.; Voss, E. W.; Glick, G. D., Evidence for Induced Fit in Antibody-DNA Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1586-1588.
39. Tarköy, M.; Leumann, C., Synthesis and Pairing Properties of Decanucleotides from (3'S,5'R)-2'-Deoxy-3', 5'-ethanoß-D-ribofuranosyladenine and -thymine. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32* (10), 1432-1434.
40. Petersen, M.; Wengel, J., LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21* (2), 74-81.
41. Dupouy, C.; Iche-Tarrat, N.; Durrieu, M. P.; Rodriguez, F.; Escudier, J. M.; Vigroux, A., Watson-Crick base-pairing properties of nucleic acid analogues with stereocontrolled alpha and beta torsion angles (alpha,beta-D-CNAs). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45* (22), 3623-7.
42. (a) Mutter, M.; Vuilleumier, S., A chemical approach to protein design - Template Assembled Synthetic Proteins (TASP). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28* (5), 535-554; (b) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G., Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as functional mimetics of proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35* (13-14), 1482-1485.
43. Peluso, S.; Ruckle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M., Crystal structure of a synthetic cyclodecapeptide for template-assembled synthetic protein design. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2001**, *2* (6), 432-7.
44. Rau, H. K.; Haehnel, W., Design, synthesis, and properties of a novel cytochrome b model. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (3), 468-476.
45. Renaudet, O.; Krenek, K.; Bossu, I.; Dumy, P.; Kadek, A.; Adamek, D.; Vanek, O.; Kavan, D.; Gazak, R.; Sulc, M.; Bezouska, K.; Kren, V., Synthesis of Multivalent Glycoconjugates Containing the Immunoactive LELTE Peptide: Effect of Glycosylation on Cellular Activation and Natural Killing by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (19), 6800-6808.
46. Boturyn, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P., Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (18), 5730-5739.
47. Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J., Control of amyloid beta-peptide protofibril formation by a designed template assembly. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45* (17), 2699-2702.
48. Sumner, F. B., Vision and Guanine Production in Fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1944**, *30* (10), 285-94.

49. Insausti, T. C.; Casas, J., The functional morphology of color changing in a spider: development of ommochrome pigment granules. *J. Exp. Biol.* **2008**, *211* (Pt 5), 780-9.
50. Oxford, G. S.; Gillespie, R. G., Evolution and ecology of spider coloration. *Annu Rev Entomol* **1998**, *43*, 619-43.
51. Gellert, M.; Lipsett, M. N.; Davies, D. R., Helix formation by guanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, *48*, 2013-8.
52. Davis, J. T., G-quartets 40 years later: From 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43* (6), 668-698.
53. Pinnavaia, T. J.; Miles, H. T.; Becker, E. D., Self-assembled 5'-guanosine monophosphate. Nuclear magnetic resonance evidence for a regular, ordered structure and slow chemical exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97* (24), 7198-200.
54. Pinnavaia, T. J.; Marshall, C. L.; Mettler, C., Alkali Metal Ion Specificity in the Solution Ordering of a Nucleotide, 5'-Guanosine Monophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100* (11), 3625-3628.
55. Eimer, W.; Dorfmueller, T., Self-Aggregation of Guanosine 5'-Monophosphate Studied by Dynamic Light Scattering Techniques. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 6790-6800.
56. Wong, A.; Ida, R.; Spindler, L.; Wu, G., Disodium guanosine 5'-monophosphate self-associates into nanoscale cylinders at pH 8: a combined diffusion NMR spectroscopy and dynamic light scattering study. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (19), 6990-8.
57. (a) Spindler, L.; Drevensek-Olenik, I.; Copic, M.; Romith, R.; Cerar, J.; Skerjanc, J.; Mariani, P., Dynamic light scattering and ³¹P NMR spectroscopy study of the self-assembly of deoxyguanosine 5'-monophosphate. *Eur. Phys. J. E. Soft. Matter.* **2002**, *7*, 95-102; (b) Spindler, L.; Drevensek-Olenik, I.; Copic, M.; Cerar, J.; Skerjanc, J.; Mariani, P., Dynamic light scattering and ³¹P NMR study of the self-assembly of deoxyguanosine 5'-monophosphate: the effect of added salt. *Eur. Phys. J. E. Soft. Matter.* **2004**, *13* (1), 27-33.
58. Davis, J. T.; Spada, G. P., Supramolecular architectures generated by self-assembly of guanosine derivatives. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (2), 296-313.
59. Marlow, A. L.; Mezzina, E.; Spada, G. P.; Masiero, S.; Davis, J. T.; Gottarelli, G., Cation-Templated Self-Assembly of a Lipophilic Deoxyguanosine: Solution Structure of a K⁺-dG₈ Octamer. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5116-5123.
60. Forman, S. L.; Fettingner, J. C.; Pieraccini, S.; Gottarelli, G.; Davis, J. T., Toward Artificial Ion Channels: A Lipophilic G-Quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4060-4067.
61. Giorgi, T.; Grepioni, F.; Manet, I.; Mariani, P.; Masiero, S.; Mezzina, E.; Pieraccini, S.; Saturni, L.; Spada, G. P.; Gottarelli, G., Gel-like lyomesophases formed in organic solvents by self-assembled guanine ribbons. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8* (9), 2143-52.
62. Rinaldi, R.; Maruccio, G.; Biasco, A.; Arima, V.; Cingolani, R.; Giorgi, T.; Masiero, S.; Spada, G. P.; Gottarelli, G., Hybrid molecular electronic devices based on modified deoxyguanosines. *Nanotechnology* **2002**, *13*, 398-403.
63. Sessler, J. L.; Sathiosatham, M.; Doerr, K.; Lynch, V. V.; Abboud, K. A., A G-Quartet Formed in the Absence of a Templating Metal Cation: A New 8-(N,N-dimethylaniline)guanosine Derivative. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39* (7), 1300-1303.
64. (a) Wong, A.; Fettingner, J. C.; Forman, S. L.; Davis, J. T.; Wu, G., The sodium ions inside a lipophilic G-quadruplex channel as probed by solid-state ²³Na NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (5), 742-743; (b) Wu, G.; Wong, A.; Gan, Z.; Davis, J. T., Direct detection of potassium cations bound to G-quadruplex structures by solid-state ³⁹K NMR at 19.6 T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (24), 7182-7183.
65. Shi, X.; Mullaugh, K. M.; Fettingner, J. C.; Jiang, Y.; Hofstadler, S. A.; Davis, J. T., Lipophilic G-quadruplexes are self-assembled ion pair receptors, and the bound anion modulates the kinetic stability of these complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (36), 10830-41.
66. Ciesielski, A.; Lena, S.; Masiero, S.; Spada, G. P.; Samori, P., Dynamers at the solid-liquid interface: controlling the reversible assembly/reassembly process between two highly ordered supramolecular guanine motifs. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49* (11), 1963-6.
67. Kotch, F. W.; Sidorov, V.; Lam, Y. F.; Kayser, K. J.; Li, H.; Kaucher, M. S.; Davis, J. T., Water-mediated association provides an ion pair receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (49), 15140-50.
68. Nikan, M.; Sherman, J. C., Template-assembled synthetic G-quartets (TASQs). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47* (26), 4900-2.

69. Nikan, M.; Sherman, J. C., Cation-complexation behavior of template-assembled synthetic G-quartets. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (15), 5211-8.
70. Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H., Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (20), 1859-1862.
71. Abraham, T. W.; Wagner, C. R., A Phosphoramidite-Based Synthesis of Phosphoramidate Amino Acid Diesters of Antiviral Nucleosides. *Nucleosides & Nucleotides* **1994**, *13* (9), 1891-1903.
72. Stout, M. G.; Robins, M. J.; Olsen, R. K.; Robins, R. K., Purine nucleosides. XXV. Synthesis of certain derivatives of 5'-amino-5'-deoxy- and 5'-amino-2',5'-dideoxy-beta-D-ribofuranosylpurines as purine nucleotide analogs. *J. Med. Chem.* **1969**, *12* (4), 658-662.
73. Wan, Q.; Chen, J.; Chen, G.; Danishefsky, S. J., A potentially valuable advance in the synthesis of carbohydrate-based anticancer vaccines through extended cycloaddition chemistry. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (21), 8244-9.
74. Gavathiotis, E.; Searle, M. S., Structure of the parallel-stranded DNA quadruplex d(TTAGGGT)₄ containing the human telomeric repeat: evidence for A-tetrad formation from NMR and molecular dynamics simulations. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (10), 1650-6.
75. Wilkins, D. K.; Grimshaw, S. B.; Receveur, V.; Dobson, C. M.; Jones, J. A.; Smith, L. J., Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry* **1999**, *38* (50), 16424-31.
76. Graziano, C.; Masiero, S.; Pieraccini, S.; Lucarini, M.; Spada, G. P., A cation-directed switch of intermolecular spin-spin interaction of guanosine derivatives functionalized with open-shell units. *Org. Lett.* **2008**, *10* (9), 1739-42.
77. Brunsveld, L.; Folmer, B. J.; Meijer, E. W.; Sijbesma, R. P., Supramolecular polymers. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (12), 4071-98.
78. Schaffitzel, C.; Berger, I.; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H. J.; Pluckthun, A., In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylylonychia lemnae* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98* (15), 8572-7.
79. Paeschke, K.; Simonsson, T.; Postberg, J.; Rhodes, D.; Lipps, H. J., Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo. *Nat Struct Mol Biol* **2005**, *12* (10), 847-54.
80. Duquette, M. L.; Handa, P.; Vincent, J. A.; Taylor, A. F.; Maizels, N., Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes Dev.* **2004**, *18* (13), 1618-29.
81. Granotier, C.; Pennarun, G.; Riou, L.; Hoffschir, F.; Gauthier, L. R.; De Cian, A.; Gomez, D.; Mandine, E.; Riou, J. F.; Mergny, J. L.; Mailliet, P.; Dutrillaux, B.; Boussin, F. D., Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (13), 4182-90.
82. Huppert, J. L.; Balasubramanian, S., Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2908-16.
83. Todd, A. K.; Johnston, M.; Neidle, S., Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2901-7.
84. Eddy, J.; Maizels, N., Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (14), 3887-96.
85. McClintock, B., The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1939**, *25* (8), 405-16.
86. Blackburn, E. H., Switching and signaling at the telomere. *Cell* **2001**, *106* (6), 661-73.
87. Wright, W. E.; Tesmer, V. M.; Huffman, K. E.; Levene, S. D.; Shay, J. W., Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.* **1997**, *11* (21), 2801-9.
88. Zakian, V. A., Telomeres: beginning to understand the end. *Science* **1995**, *270* (5242), 1601-7.
89. de Lange, T., Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **2005**, *19* (18), 2100-10.
90. Stansel, R. M.; de Lange, T.; Griffith, J. D., T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *Embo J.* **2001**, *20* (19), 5532-40.
91. Neidle, S.; Parkinson, G., Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (5), 383-93.

92. Mergny, J. L.; Riou, J. F.; Mailliet, P.; Teulade-Fichou, M. P.; Gilson, E., Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (4), 839-65.
93. Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W., Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **1994**, *266* (5193), 2011-5.
94. Strahl, C.; Blackburn, E. H., The effects of nucleoside analogs on telomerase and telomeres in Tetrahymena. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (6), 893-900.
95. Pascolo, E.; Wenz, C.; Lingner, J.; Huel, N.; Priepke, H.; Kauffmann, I.; Garin-Chesa, P.; Rettig, W. J.; Damm, K.; Schnapp, A., Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (18), 15566-72.
96. Pitts, A. E.; Corey, D. R., Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95* (20), 11549-54.
97. Zahler, A. M.; Williamson, J. R.; Cech, T. R.; Prescott, D. M., Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* **1991**, *350* (6320), 718-20.
98. Fajkus, J., Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clin. Chim. Acta.* **2006**, *371* (1-2), 25-31.
99. De Cian, A.; Lacroix, L.; Douarre, C.; Temime-Smaali, N.; Trentesaux, C.; Riou, J. F.; Mergny, J. L., Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie* **2008**, *90* (1), 131-55.
100. De Cian, A.; Cristofari, G.; Reichenbach, P.; De Lemos, E.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M. P.; Shin-Ya, K.; Lacroix, L.; Lingner, J.; Mergny, J. L., Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104* (44), 17347-52.
101. Reed, J.; Gunaratnam, M.; Beltran, M.; Reszka, A. P.; Vilar, R.; Neidle, S., TRAP-LIG, a modified telomere repeat amplification protocol assay to quantitate telomerase inhibition by small molecules. *Anal. Biochem.* **2008**, *380* (1), 99-105.
102. (a) Woodford, K. J.; Howell, R. M.; Usdin, K., A novel K(+)-dependent DNA synthesis arrest site in a commonly occurring sequence motif in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (43), 27029-35; (b) Howell, R. M.; Woodford, K. J.; Weitzmann, M. N.; Usdin, K., The chicken beta-globin gene promoter forms a novel "cinched" tetrahelical structure. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (9), 5208-14.
103. Clark, S. P.; Lewis, C. D.; Felsenfeld, G., Properties of BGP1, a poly(dG)-binding protein from chicken erythrocytes. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18* (17), 5119-26.
104. Etzioni, S.; Yafe, A.; Khateb, S.; Weisman-Shomer, P.; Bengal, E.; Fry, M., Homodimeric MyoD preferentially binds tetraplex structures of regulatory sequences of muscle-specific genes. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (29), 26805-12.
105. Yafe, A.; Etzioni, S.; Weisman-Shomer, P.; Fry, M., Formation and properties of hairpin and tetraplex structures of guanine-rich regulatory sequences of muscle-specific genes. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2887-900.
106. Siddiqui-Jain, A.; Grand, C. L.; Bearss, D. J.; Hurley, L. H., Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (18), 11593-8.
107. Phan, A. T.; Modi, Y. S.; Patel, D. J., Propeller-type parallel-stranded G-quadruplexes in the human c-myc promoter. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (28), 8710-6.
108. Fernando, H.; Reszka, A. P.; Huppert, J.; Ladame, S.; Rankin, S.; Venkitaraman, A. R.; Neidle, S.; Balasubramanian, S., A conserved quadruplex motif located in a transcription activation site of the human c-kit oncogene. *Biochemistry* **2006**, *45* (25), 7854-60.
109. Dai, J.; Dexheimer, T. S.; Chen, D.; Carver, M.; Ambrus, A.; Jones, R. A.; Yang, D., An intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel G-strands formed in the human BCL-2 promoter region in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (4), 1096-8.
110. Guo, K.; Gokhale, V.; Hurley, L. H.; Sun, D., Intramolecularly folded G-quadruplex and i-motif structures in the proximal promoter of the vascular endothelial growth factor gene. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (14), 4598-608.
111. Cogoi, S.; Xodo, L. E., G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (9), 2536-49.

112. Guo, K.; Pourpak, A.; Beetz-Rogers, K.; Gokhale, V.; Sun, D.; Hurley, L. H., Formation of pseudosymmetrical G-quadruplex and i-motif structures in the proximal promoter region of the RET oncogene. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (33), 10220-8.
113. Xu, Y.; Sugiyama, H., Formation of the G-quadruplex and i-motif structures in retinoblastoma susceptibility genes (Rb). *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (3), 949-54.
114. Kuryavyi, V.; Patel, D. J., Solution structure of a unique G-quadruplex scaffold adopted by a guanosine-rich human intronic sequence. *Structure* **2010**, *18* (1), 73-82.
115. Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Burge, S.; Neidle, S.; Patel, D. J., Structure of an unprecedented G-quadruplex scaffold in the human c-kit promoter. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (14), 4386-92.
116. Dai, J.; Chen, D.; Jones, R. A.; Hurley, L. H.; Yang, D., NMR solution structure of the major G-quadruplex structure formed in the human BCL2 promoter region. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (18), 5133-44.
117. Maizels, N., Immunoglobulin gene diversification. *Annu. Rev. Genet.* **2005**, *39*, 23-46.
118. Dunnick, W.; Hertz, G. Z.; Scappino, L.; Gritzmacher, C., DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21* (3), 365-72.
119. Sen, D.; Gilbert, W., Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* **1988**, *334* (6180), 364-6.
120. Kettani, A.; Kumar, R. A.; Patel, D. J., Solution structure of a DNA quadruplex containing the fragile X syndrome triplet repeat. *J. Mol. Biol.* **1995**, *254* (4), 638-56.
121. Catasti, P.; Chen, X.; Moyzis, R. K.; Bradbury, E. M.; Gupta, G., Structure-function correlations of the insulin-linked polymorphic region. *J. Mol. Biol.* **1996**, *264* (3), 534-45.
122. Hanakahi, L. A.; Sun, H.; Maizels, N., High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (22), 15908-12.
123. Nonin-Lecomte, S.; Leroy, J. L., Structure of a C-rich strand fragment of the human centromeric satellite III: a pH-dependent intercalation topology. *J. Mol. Biol.* **2001**, *309* (2), 491-506.
124. Huppert, J. L.; Bugaut, A.; Kumari, S.; Balasubramanian, S., G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (19), 6260-8.
125. Kumari, S.; Bugaut, A.; Huppert, J. L.; Balasubramanian, S., An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (4), 218-21.
126. Bugaut, A.; Rodriguez, R.; Kumari, S.; Hsu, S. T.; Balasubramanian, S., Small molecule-mediated inhibition of translation by targeting a native RNA G-quadruplex. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (12), 2771-6.
127. Riou, J. F.; Gomez, D.; Lemarteleur, T.; Trentesaux, C., G-quadruplex DNA: myth or reality? *Bull Cancer* **2003**, *90* (4), 305-13.
128. Darnell, J. C.; Jensen, K. B.; Jin, P.; Brown, V.; Warren, S. T.; Darnell, R. B., Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* **2001**, *107* (4), 489-99.
129. Menon, L.; Mihalescu, M. R., Interactions of the G quartet forming semaphorin 3F RNA with the RGG box domain of the fragile X protein family. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (16), 5379-92.
130. (a) Marquet, R.; Baudin, F.; Gabus, C.; Darlix, J. L.; Mougel, M.; Ehresmann, C.; Ehresmann, B., Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19* (9), 2349-57; (b) Sundquist, W. I.; Heaphy, S., Evidence for interstrand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90* (8), 3393-7.
131. Laughlan, G.; Murchie, A. I.; Norman, D. G.; Moore, M. H.; Moody, P. C.; Lilley, D. M.; Luisi, B., The high-resolution crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex. *Science* **1994**, *265* (5171), 520-4.
132. Kaushik, M.; Bansal, A.; Saxena, S.; Kukreti, S., Possibility of an antiparallel (tetramer) quadruplex exhibited by the double repeat of the human telomere. *Biochemistry* **2007**, *46* (24), 7119-31.
133. Phan, A. T.; Modi, Y. S.; Patel, D. J., Two-repeat Tetrahymena telomeric d(TGGGGTTGGGGT) Sequence interconverts between asymmetric dimeric G-quadruplexes in solution. *J. Mol. Biol.* **2004**, *338* (1), 93-102.
134. Horvath, M. P.; Schultz, S. C., DNA G-quartets in a 1.86 Å resolution structure of an *Oxytricha nova* telomeric protein-DNA complex. *J. Mol. Biol.* **2001**, *310* (2), 367-77.
135. Phan, A. T.; Patel, D. J., Two-repeat human telomeric d(TAGGGTTAGGGT) sequence forms interconverting parallel and antiparallel G-quadruplexes in solution: distinct topologies, thermodynamic properties, and folding/unfolding kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (49), 15021-7.

136. Crnugelj, M.; Sket, P.; Plavec, J., Small change in a G-rich sequence, a dramatic change in topology: new dimeric G-quadruplex folding motif with unique loop orientations. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (26), 7866-71.
137. Zhang, N.; Phan, A. T.; Patel, D. J., (3 + 1) Assembly of three human telomeric repeats into an asymmetric dimeric G-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (49), 17277-85.
138. Webba da Silva, M., Geometric formalism for DNA quadruplex folding. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13* (35), 9738-45.
139. Dai, J.; Carver, M.; Yang, D., Polymorphism of human telomeric quadruplex structures. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1172-83.
140. Parkinson, G. N.; Lee, M. P.; Neidle, S., Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* **2002**, *417* (6891), 876-80.
141. (a) Ambrus, A.; Chen, D.; Dai, J.; Bialis, T.; Jones, R. A.; Yang, D., Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (9), 2723-35; (b) Dai, J.; Punchihewa, C.; Ambrus, A.; Chen, D.; Jones, R. A.; Yang, D., Structure of the intramolecular human telomeric G-quadruplex in potassium solution: a novel adenine triple formation. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (7), 2440-50.
142. Dai, J.; Carver, M.; Punchihewa, C.; Jones, R. A.; Yang, D., Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K⁺ solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (15), 4927-40.
143. Wang, Y.; Patel, D. J., Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex. *Structure* **1993**, *1* (4), 263-82.
144. Li, J.; Correia, J. J.; Wang, L.; Trent, J. O.; Chaires, J. B., Not so crystal clear: the structure of the human telomere G-quadruplex in solution differs from that present in a crystal. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (14), 4649-59.
145. Xue, Y.; Kan, Z. Y.; Wang, Q.; Yao, Y.; Liu, J.; Hao, Y. H.; Tan, Z., Human telomeric DNA forms parallel-stranded intramolecular G-quadruplex in K⁺ solution under molecular crowding condition. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (36), 11185-91.
146. (a) Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M. P., A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (4), 627-36; (b) Ou, T. M.; Lu, Y. J.; Tan, J. H.; Huang, Z. S.; Wong, K. Y.; Gu, L. Q., G-quadruplexes: targets in anticancer drug design. *ChemMedChem* **2008**, *3* (5), 690-713; (c) Georgiades, S. N.; Abd Karim, N. H.; Suntharalingam, K.; Vilar, R., Interaction of metal complexes with G-quadruplex DNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49* (24), 4020-34.
147. Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B. E.; Salazar, M.; Kerwin, S. M.; Trent, J. O.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; Hurley, L. H., Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (14), 2113-6.
148. Perry, P. J.; Read, M. A.; Davies, R. T.; Gowan, S. M.; Reszka, A. P.; Wood, A. A.; Kelland, L. R.; Neidle, S., 2,7-Disubstituted amidofluorenone derivatives as inhibitors of human telomerase. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (14), 2679-84.
149. Harrison, R. J.; Cuesta, J.; Chessari, G.; Read, M. A.; Basra, S. K.; Reszka, A. P.; Morrell, J.; Gowan, S. M.; Incles, C. M.; Tanius, F. A.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S., Trisubstituted acridine derivatives as potent and selective telomerase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (21), 4463-76.
150. Taetz, S.; Murdter, T. E.; Zapp, J.; Boettcher, S.; Baldes, C.; Kleideiter, E.; Piotrowska, K.; Schaefer, U. F.; Klotz, U.; Lehr, C. M., Decomposition of the telomere-targeting agent BRACO19 in physiological media results in products with decreased inhibitory potential. *Int. J. Pharm.* **2008**, *357* (1-2), 6-14.
151. Campbell, N. H.; Parkinson, G. N.; Reszka, A. P.; Neidle, S., Structural basis of DNA quadruplex recognition by an acridine drug. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (21), 6722-4.
152. Stanslas, J.; Hagan, D. J.; Ellis, M. J.; Turner, C.; Carmichael, J.; Ward, W.; Hammonds, T. R.; Stevens, M. F., Antitumor polycyclic acridines. 7. Synthesis and biological properties of DNA affinic tetra- and pentacyclic acridines. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (8), 1563-72.
153. Gavathiotis, E.; Heald, R. A.; Stevens, M. F.; Searle, M. S., Recognition and Stabilization of Quadruplex DNA by a Potent New Telomerase Inhibitor: NMR Studies of the 2:1 Complex of a Pentacyclic Methylacridinium Cation with d(TTAGGGT)₄. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40* (24), 4749-4751.
154. Hounsou, C.; Guittat, L.; Monchaud, D.; Jourdan, M.; Saettel, N.; Mergny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P., G-quadruplex recognition by quinacridines: a SAR, NMR, and biological study. *ChemMedChem* **2007**, *2* (5), 655-66.

155. Teulade-Fichou, M. P.; Carrasco, C.; Guittat, L.; Bailly, C.; Alberti, P.; Mergny, J. L.; David, A.; Lehn, J. M.; Wilson, W. D., Selective recognition of G-Quadruplex telomeric DNA by a bis(quinacridine) macrocycle. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (16), 4732-40.
156. Bertrand, H.; Bombard, S.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M. P., A platinum-quinacridine hybrid as a G-quadruplex ligand. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12* (7), 1003-14.
157. Wheelhouse, R. T.; Sun, D.; Han, H.; Han, F. X.; Hurley, L. H., Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: the Interaction of Tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphine with Quadruplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3261-3262.
158. Shi, D. F.; Wheelhouse, R. T.; Sun, D.; Hurley, L. H., Quadruplex-interactive agents as telomerase inhibitors: synthesis of porphyrins and structure-activity relationship for the inhibition of telomerase. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (26), 4509-23.
159. Seenisamy, J.; Bashyam, S.; Gokhale, V.; Vankayalapati, H.; Sun, D.; Siddiqui-Jain, A.; Streiner, N.; Shin-Ya, K.; White, E.; Wilson, W. D.; Hurley, L. H., Design and synthesis of an expanded porphyrin that has selectivity for the c-MYC G-quadruplex structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (9), 2944-59.
160. Dixon, I. M.; Lopez, F.; Tejera, A. M.; Esteve, J. P.; Blasco, M. A.; Pratviel, G.; Meunier, B., A G-quadruplex ligand with 10000-fold selectivity over duplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (6), 1502-3.
161. Cuenca, F.; Greciano, O.; Gunaratnam, M.; Haider, S.; Munnur, D.; Nanjunda, R.; Wilson, W. D.; Neidle, S., Tri- and tetra-substituted naphthalene diimides as potent G-quadruplex ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (5), 1668-73.
162. Han, H.; Cliff, C. L.; Hurley, L. H., Accelerated assembly of G-quadruplex structures by a small molecule. *Biochemistry* **1999**, *38* (22), 6981-6.
163. Kern, J. T.; Thomas, P. W.; Kerwin, S. M., The relationship between ligand aggregation and G-quadruplex DNA selectivity in a series of 3,4,9,10-perylenetetra-carboxylic acid diimides. *Biochemistry* **2002**, *41* (38), 11379-89.
164. Franceschin, M.; Alvino, A.; Casagrande, V.; Mauriello, C.; Pascucci, E.; Savino, M.; Ortaggi, G.; Bianco, A., Specific interactions with intra- and intermolecular G-quadruplex DNA structures by hydrosoluble coronene derivatives: a new class of telomerase inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15* (4), 1848-58.
165. De Cian, A.; Delemos, E.; Mergny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P.; Monchaud, D., Highly efficient G-quadruplex recognition by bisquinolinium compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (7), 1856-7.
166. Pennarun, G.; Granotier, C.; Gauthier, L. R.; Gomez, D.; Hoffschir, F.; Mandine, E.; Riou, J. F.; Mergny, J. L.; Mailliet, P.; Boussin, F. D., Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. *Oncogene* **2005**, *24* (18), 2917-28.
167. Monchaud, D.; Yang, P.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M. P.; Mergny, J. L., A metal-mediated conformational switch controls G-quadruplex binding affinity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47* (26), 4858-61.
168. Riou, J. F.; Guittat, L.; Mailliet, P.; Laoui, A.; Renou, E.; Petitgenet, O.; Megnin-Chanet, F.; Helene, C.; Mergny, J. L., Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (5), 2672-7.
169. Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Matsuo, K.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H., Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (6), 1262-3.
170. Kim, M. Y.; Vankayalapati, H.; Shin-Ya, K.; Wierzba, K.; Hurley, L. H., Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (10), 2098-9.
171. Barbieri, C. M.; Srinivasan, A. R.; Rzuczek, S. G.; Rice, J. E.; LaVoie, E. J.; Pilch, D. S., Defining the mode, energetics and specificity with which a macrocyclic hexaoxazole binds to human telomeric G-quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (10), 3272-86.
172. Jantos, K.; Rodriguez, R.; Ladame, S.; Shirude, P. S.; Balasubramanian, S., Oxazole-based peptide macrocycles: a new class of G-quadruplex binding ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (42), 13662-3.
173. Bertrand, H.; Monchaud, D.; De Cian, A.; Guillot, R.; Mergny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P., The importance of metal geometry in the recognition of G-quadruplex-DNA by metal-terpyridine complexes. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (16), 2555-9.
174. Reed, J. E.; Arnal, A. A.; Neidle, S.; Vilar, R., Stabilization of G-quadruplex DNA and inhibition of telomerase activity by square-planar nickel(II) complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (18), 5992-3.

175. Kieltyka, R.; Fakhoury, J.; Moitessier, N.; Sleiman, H. F., Platinum phenanthroimidazole complexes as G-quadruplex DNA selective binders. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (4), 1145-54.
176. Rodriguez, R.; Pantos, G. D.; Goncalves, D. P.; Sanders, J. K.; Balasubramanian, S., Ligand-driven G-quadruplex conformational switching by using an unusual mode of interaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46* (28), 5405-7.
177. Drygin, D.; Siddiqui-Jain, A.; O'Brien, S.; Schwaebe, M.; Lin, A.; Bliesath, J.; Ho, C. B.; Proffitt, C.; Trent, K.; Whitten, J. P.; Lim, J. K.; Von Hoff, D.; Anderes, K.; Rice, W. G., Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer. Res.* **2009**, *69* (19), 7653-61.
178. Coll, M.; Frederick, C. A.; Wang, A. H.; Rich, A., A bifurcated hydrogen-bonded conformation in the d(A.T) base pairs of the DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) and its complex with distamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84* (23), 8385-9.
179. Pagano, B.; Virno, A.; Mattia, C. A.; Mayol, L.; Randazzo, A.; Giancola, C., Targeting DNA quadruplexes with distamycin A and its derivatives: an ITC and NMR study. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1224-32.
180. Cocco, M. J.; Hanakahi, L. A.; Huber, M. D.; Maizels, N., Specific interactions of distamycin with G-quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (11), 2944-51.
181. Moore, M. J.; Cuenca, F.; Searcey, M.; Neidle, S., Synthesis of distamycin A polyamides targeting G-quadruplex DNA. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (18), 3479-88.
182. Martino, L.; Virno, A.; Pagano, B.; Virgilio, A.; Di Micco, S.; Galeone, A.; Giancola, C.; Bifulco, G.; Mayol, L.; Randazzo, A., Structural and thermodynamic studies of the interaction of distamycin A with the parallel quadruplex structure [d(TGGGGT)]₄. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (51), 16048-56.
183. Ladame, S.; Whitney, A. M.; Balasubramanian, S., Targeting nucleic acid secondary structures with polyamides using an optimized dynamic combinatorial approach. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44* (35), 5736-9.
184. Tawar, U.; Jain, A. K.; Chandra, R.; Singh, Y.; Dwarakanath, B. S.; Chaudhury, N. K.; Good, L.; Tandon, V., Minor groove binding DNA ligands with expanded A/T sequence length recognition, selective binding to bent DNA regions and enhanced fluorescent properties. *Biochemistry* **2003**, *42* (45), 13339-46.
185. Maiti, S.; Chaudhury, N. K.; Chowdhury, S., Hoechst 33258 binds to G-quadruplex in the promoter region of human c-myc. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *310* (2), 505-12.
186. Chen, Z.; Zheng, K. W.; Hao, Y. H.; Tan, Z., Reduced or diminished stabilization of the telomere G-quadruplex and inhibition of telomerase by small chemical ligands under molecular crowding condition. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (30), 10430-8.
187. Bhattacharya, S.; Chaudhuri, P.; Jain, A. K.; Paul, A., Symmetrical Bisbenzimidazoles with Benzenediyl Spacer: The Role of the Shape of the Ligand on the Stabilization and Structural Alterations in Telomeric G-Quadruplex DNA and Telomerase Inhibition. *Bioconjug. Chem.* **2010**.
188. Jain, A. K.; Reddy, V. V.; Paul, A.; K, M.; Bhattacharya, S., Synthesis and evaluation of a novel class of G-quadruplex-stabilizing small molecules based on the 1,3-phenylene-bis(piperazinyl benzimidazole) system. *Biochemistry* **2009**, *48* (45), 10693-704.
189. Li, G.; Huang, J.; Zhang, M.; Zhou, Y.; Zhang, D.; Wu, Z.; Wang, S.; Weng, X.; Zhou, X.; Yang, G., Bis(benzimidazole)pyridine derivative as a new class of G-quadruplex inducing and stabilizing ligand. *Chem. Commun.* **2008**, (38), 4564-6.
190. Garoff, R. A.; Litzinger, E. A.; Connor, R. E.; Fishman, I.; Armitage, B. A., Helical Aggregation of Cyanine Dyes on DNA Templates: Effect of Dye Structure on Formation of Homo- and Heteroaggregates. *Langmuir* **2002**, *18* (16), 6330-6337.
191. Chen, Q.; Kuntz, I. D.; Shafer, R. H., Spectroscopic recognition of guanine dimeric hairpin quadruplexes by a carbocyanine dye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93* (7), 2635-9.
192. Ren, J. S.; Chaires, J. B., Preferential binding of 3,3'-diethyloxadiazocarbocyanine to triplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (2), 424-425.
193. Cheng, J. Y.; Lin, S. H.; Chang, T. C., Vibrational investigation of DODC cation for recognition of guanine dimeric hairpin quadruplex studied by satellite holes. *J. Phys. Chem. B.* **1998**, *102* (28), 5542-5546.
194. David, W. M.; Brodbelt, J.; Kerwin, S. M.; Thomas, P. W., Investigation of quadruplex oligonucleotide-drug interactions by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (9), 2029-33.
195. Paramasivan, S.; Bolton, P. H., Mix and measure fluorescence screening for selective quadruplex binders. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (17), e106.

196. Yang, Q.; Xiang, J.; Yang, S.; Zhou, Q.; Li, Q.; Tang, Y.; Xu, G., Verification of specific G-quadruplex structure by using a novel cyanine dye supramolecular assembly: I. recognizing mixed G-quadruplex in human telomeres. *Chem. Commun.* **2009**, (9), 1103-5.
197. Naasani, I.; Seimiya, H.; Yamori, T.; Tsuruo, T., Screening for antitelomerase agents with the aid of CONTARE analysis. *P. Am. Assoc. Canc. Res.* **1998**, 39, 3854-3857.
198. Schouten, J. A.; Ladame, S.; Mason, S. J.; Cooper, M. A.; Balasubramanian, S., G-quadruplex-specific peptide-hemicyanine ligands by partial combinatorial selection. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (19), 5594-5.
199. Ladame, S.; Schouten, J. A.; Stuart, J.; Roldan, J.; Neidle, S.; Balasubramanian, S., Tetrapeptides induce selective recognition for G-quadruplexes when conjugated to a DNA-binding platform. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2 (20), 2925-31.
200. Redman, J. E.; Granadino-Roldan, J. M.; Schouten, J. A.; Ladame, S.; Reszka, A. P.; Neidle, S.; Balasubramanian, S., Recognition and discrimination of DNA quadruplexes by acridine-peptide conjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7 (1), 76-84.
201. (a) Hudson, J. S.; Brooks, S. C.; Graves, D. E., Interactions of actinomycin D with human telomeric G-quadruplex DNA. *Biochemistry* **2009**, 48 (21), 4440-7; (b) Kang, H. J.; Park, H. J., Novel molecular mechanism for actinomycin D activity as an oncogenic promoter G-quadruplex binder. *Biochemistry* **2009**, 48 (31), 7392-8.
202. Dash, J.; Shirude, P. S.; Hsu, S. T.; Balasubramanian, S., Diarylethynyl amides that recognize the parallel conformation of genomic promoter DNA G-quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (47), 15950-6.
203. Fry, M., Tetraplex DNA and its interacting proteins. *Front Biosci* **2007**, 12, 4336-51.
204. Sarig, G.; Weisman-Shomer, P.; Erlitzki, R.; Fry, M., Purification and characterization of qTBP42, a new single-stranded and quadruplex telomeric DNA-binding protein from rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (7), 4474-82.
205. Lyonnais, S.; Gorelick, R. J.; Mergny, J. L.; Le Cam, E.; Mirambeau, G., G-quartets direct assembly of HIV-1 nucleocapsid protein along single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31 (19), 5754-63.
206. Larson, E. D.; Duquette, M. L.; Cummings, W. J.; Streiff, R. J.; Maizels, N., MutSalpa binds to and promotes synapsis of transcriptionally activated immunoglobulin switch regions. *Curr. Biol.* **2005**, 15 (5), 470-4.
207. Fang, G.; Cech, T. R., The beta subunit of Oxytricha telomere-binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA. *Cell* **1993**, 74 (5), 875-85.
208. Arimondo, P. B.; Riou, J. F.; Mergny, J. L.; Tazi, J.; Sun, J. S.; Garestier, T.; Helene, C., Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28 (24), 4832-8.
209. Baran, N.; Pucshansky, L.; Marco, Y.; Benjamin, S.; Manor, H., The SV40 large T-antigen helicase can unwind four stranded DNA structures linked by G-quartets. *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25 (2), 297-303.
210. Kamath-Loeb, A. S.; Loeb, L. A.; Johansson, E.; Burgers, P. M.; Fry, M., Interactions between the Werner syndrome helicase and DNA polymerase delta specifically facilitate copying of tetraplex and hairpin structures of the d(CGG)_n trinucleotide repeat sequence. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (19), 16439-46.
211. Sun, H.; Karow, J. K.; Hickson, I. D.; Maizels, N., The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273 (42), 27587-92.
212. Zaugg, A. J.; Podell, E. R.; Cech, T. R., Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102 (31), 10864-9.
213. Salas, T. R.; Petrusseva, I.; Lavrik, O.; Bourdoncle, A.; Mergny, J. L.; Favre, A.; Saintome, C., Human replication protein A unfolds telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34 (17), 4857-65.
214. Sun, H.; Yabuki, A.; Maizels, N., A human nuclease specific for G4 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98 (22), 12444-12449.
215. Incles, C. M.; Schultes, C. M.; Kempfski, H.; Koehler, H.; Kelland, L. R.; Neidle, S., A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, 3 (10), 1201-6.
216. Bejugam, M.; Sewitz, S.; Shirude, P. S.; Rodriguez, R.; Shahid, R.; Balasubramanian, S., Trisubstituted isoalloxazines as a new class of G-quadruplex binding ligands: small molecule regulation of c-kit oncogene expression. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (43), 12926-7.
217. Gomez, D.; Guedin, A.; Mergny, J. L.; Salles, B.; Riou, J. F.; Teulade-Fichou, M. P.; Calsou, P., A G-quadruplex structure within the 5'-UTR of TRF2 mRNA represses translation in human cells. *Nucleic Acids Res.* **2010**.

218. Soldatenkov, V. A.; Vetcher, A. A.; Duka, T.; Ladame, S., First evidence of a functional interaction between DNA quadruplexes and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *ACS Chem Biol* **2008**, *3* (4), 214-9.
219. Demeunynck, M.; Bailly, C.; Wilson, W. D., *DNA and RNA Binders*. Wiley-VCH: 2003.
220. Rachwal, P. A.; Fox, K. R., Quadruplex melting. *Methods* **2007**, *43* (4), 291-301.
221. Mergny, J. L.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M. P.; Hounsou, C.; Guittat, L.; Hoarau, M.; Arimondo, P. B.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M.; Riou, J. F.; Garestier, T.; Helene, C., Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98* (6), 3062-7.
222. De Cian, A.; Guittat, L.; Kaiser, M.; Sacca, B.; Amrane, S.; Bourdoncle, A.; Alberti, P.; Teulade-Fichou, M. P.; Lacroix, L.; Mergny, J. L., Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands. *Methods* **2007**, *42* (2), 183-195.
223. Monchaud, D.; Allain, C.; Bertrand, H.; Smargiasso, N.; Rosu, F.; Gabelica, V.; De Cian, A.; Mergny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P., Ligands playing musical chairs with G-quadruplex DNA: a rapid and simple displacement assay for identifying selective G-quadruplex binders. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1207-23.
224. Paramasivan, S.; Rujan, I.; Bolton, P. H., Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods* **2007**, *43* (4), 324-31.
225. Muller, W.; Crothers, D. M., Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 1. The influence of heteroatoms and polarizability on the base specificity of intercalating ligands. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *54* (1), 267-77.
226. Ragazzon, P.; Chaires, J. B., Use of competition dialysis in the discovery of G-quadruplex selective ligands. *Methods* **2007**, *43* (4), 313-23.
227. Ren, J.; Chaires, J. B., Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *Biochemistry* **1999**, *38* (49), 16067-75.
228. Neidle, S.; Parkinson, G. N., Quadruplex DNA crystal structures and drug design. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1184-96.
229. Haider, S. M.; Parkinson, G. N.; Neidle, S., Structure of a G-quadruplex-ligand complex. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326* (1), 117-25.
230. Parkinson, G. N.; Ghosh, R.; Neidle, S., Structural basis for binding of porphyrin to human telomeres. *Biochemistry* **2007**, *46* (9), 2390-7.
231. Campbell, N. H.; Patel, M.; Tofa, A. B.; Ghosh, R.; Parkinson, G. N.; Neidle, S., Selectivity in Ligand Recognition of G-Quadruplex Loops. *Biochemistry* **2009**, *48*, 1675-1680.
232. Collie, G.; Reszka, A. P.; Haider, S. M.; Gabelica, V.; Parkinson, G. N.; Neidle, S., Selectivity in small molecule binding to human telomeric RNA and DNA quadruplexes. *Chem. Commun.* **2009**, (48), 7482-4.
233. Webba da Silva, M., NMR methods for studying quadruplex nucleic acids. *Methods* **2007**, *43* (4), 264-77.
234. Fedoroff, O. Y.; Salazar, M.; Han, H.; Chemeris, V. V.; Kerwin, S. M.; Hurley, L. H., NMR-Based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA. *Biochemistry* **1998**, *37* (36), 12367-74.
235. Gavathiotis, E.; Heald, R. A.; Stevens, M. F. G.; Searle, M. S., Recognition and stabilization of quadruplex DNA by a potent new telomerase inhibitor: NMR studies of the 2 : 1 complex of a pentacyclic methylacridinium cation with d(TTAGGGT)(4). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40* (24), 4749-4751.
236. Mehta, A. K.; Shayo, Y.; Vankayalapati, H.; Hurley, L. H.; Schaefer, J., Structure of a quinobenzoxazine-g-quadruplex complex by REDOR NMR. *Biochemistry* **2004**, *43* (38), 11953-11958.
237. Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Gaw, H. Y.; Patel, D. J., Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human MYC promoter. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1* (3), 167-73.
238. Mita, H.; Ohyama, T.; Tanaka, Y.; Yamamoto, Y., Formation of a complex of 5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)-21H,23H-porphyrin with G-quadruplex DNA. *Biochemistry* **2006**, *45* (22), 6765-72.
239. Hounsou, C.; Guittat, L.; Monchaud, D.; Jourdan, M.; Saettel, N.; Mergny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P., G-quadruplex recognition by quinacridines: a SAR, NMR, and biological study. *ChemMedChem* **2007**, *2* (5), 655-666.
240. Cosconati, S.; Marinelli, L.; Trotta, R.; Virno, A.; Mayol, L.; Novellino, E.; Olson, A. J.; Randazzo, A., Tandem Application of Virtual Screening and NMR Experiments in the Discovery of Brand New DNA Quadruplex Groove Binders. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (45), 16336-+.
241. Rosu, F.; De Pauw, E.; Gabelica, V., Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions. *Biochimie* **2008**, *90* (7), 1074-87.

242. Gabelica, V.; Rosu, F.; De Pauw, E., A simple method to determine electrospray response factors of noncovalent complexes. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (16), 6708-15.
243. Ginnari-Satriani, L.; Casagrande, V.; Bianco, A.; Ortaggi, G.; Franceschin, M., A hydrophilic three side-chained triazatruxene as a new strong and selective G-quadruplex ligand. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (12), 2513-6.
244. Buurma, N. J.; Haq, I., Advances in the analysis of isothermal titration calorimetry data for ligand-DNA interactions. *Methods* **2007**, *42* (2), 162-72.
245. Martino, L.; Pagano, B.; Fotticchia, I.; Neidle, S.; Giancola, C., Shedding light on the interaction between TMPyP4 and human telomeric quadruplexes. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, *113* (44), 14779-86.
246. Rich, R. L.; Myszka, D. G., Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008: 'The Mighty Binders'. *J. Mol. Recognit.* **2010**, *23* (1), 1-64.
247. Redman, J. E., Surface plasmon resonance for probing quadruplex folding and interactions with proteins and small molecules. *Methods* **2007**, *43* (4), 302-12.
248. Pockrand, I.; Raether, H., Surface plasma oscillations at sinusoidal silver surfaces. *Appl. Opt.* **1977**, *16* (7), 1784-6.
249. Dixon, I. M.; Lopez, F.; Esteve, J. P.; Tejera, A. M.; Blasco, M. A.; Pratviel, G.; Meunier, B., Porphyrin derivatives for telomere binding and telomerase inhibition. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2005**, *6* (1), 123-32.
250. (a) Read, M.; Harrison, R. J.; Romagnoli, B.; Tanious, F. A.; Gowan, S. H.; Reszka, A. P.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S., Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98* (9), 4844-9; (b) Moore, M. J.; Schultes, C. M.; Cuesta, J.; Cuenca, F.; Gunaratnam, M.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D.; Neidle, S., Trisubstituted acridines as G-quadruplex telomere targeting agents. Effects of extensions of the 3,6- and 9-side chains on quadruplex binding, telomerase activity, and cell proliferation. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (2), 582-99.
251. Carrasco, C.; Rosu, F.; Gabelica, V.; Houssier, C.; De Pauw, E.; Garbay-Jaureguiberry, C.; Roques, B.; Wilson, W. D.; Chaires, J. B.; Waring, M. J.; Bailly, C., Tight binding of the antitumor drug ditercalinium to quadruplex DNA. *ChemBioChem* **2002**, *3* (12), 1235-41.
252. Dias, N.; Jacquemard, U.; Baldeyrou, B.; Tardy, C.; Lansiaux, A.; Colson, P.; Tanious, F.; Wilson, W. D.; Routier, S.; Merour, J. Y.; Bailly, C., Targeting DNA with novel diphenylcarbazoles. *Biochemistry* **2004**, *43* (48), 15169-78.
253. Rezler, E. M.; Seenisamy, J.; Bashyam, S.; Kim, M. Y.; White, E.; Wilson, W. D.; Hurley, L. H., Telomestatin and diseleno sapphyrin bind selectively to two different forms of the human telomeric G-quadruplex structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (26), 9439-47.
254. White, E. W.; Tanious, F.; Ismail, M. A.; Reszka, A. P.; Neidle, S.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D., Structure-specific recognition of quadruplex DNA by organic cations: influence of shape, substituents and charge. *Biophys. Chem.* **2007**, *126* (1-3), 140-53.
255. (a) Goncalves, D. P.; Rodriguez, R.; Balasubramanian, S.; Sanders, J. K., Tetramethylpyridiniumporphyrazines--a new class of G-quadruplex inducing and stabilising ligands. *Chem. Commun.* **2006**, (45), 4685-7; (b) Goncalves, D. P.; Ladame, S.; Balasubramanian, S.; Sanders, J. K., Synthesis and G-quadruplex binding studies of new 4-N-methylpyridinium porphyrins. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (17), 3337-42.
256. Ladame, S.; Schouten, J. A.; Roldan, J.; Redman, J. E.; Neidle, S.; Balasubramanian, S., Exploring the recognition of quadruplex DNA by an engineered Cys2-His2 zinc finger protein. *Biochemistry* **2006**, *45* (5), 1393-9.
257. Wang, P.; Ren, L.; He, H.; Liang, F.; Zhou, X.; Tan, Z., A phenol quaternary ammonium porphyrin as a potent telomerase inhibitor by selective interaction with quadruplex DNA. *ChemBioChem* **2006**, *7* (8), 1155-9.
258. Halder, K.; Chowdhury, S., Kinetic resolution of bimolecular hybridization versus intramolecular folding in nucleic acids by surface plasmon resonance: application to G-quadruplex/duplex competition in human c-myc promoter. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (14), 4466-74.
259. Mita, H.; Ohyama, T.; Tanaka, Y.; Yamamoto, Y., Formation of a Complex of 5,10,15,20-Tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)-21H,23H-porphyrin with G-Quadruplex DNA. *Biochemistry* **2006**, *45* (22), 6765-6773.
260. Li, M.-H.; Luo, Q.; Li, Z.-S., Molecular Dynamics Study on the Interactions of Porphyrin with Two Antiparallel Human Telomeric Quadruplexes. *J. Phys. Chem. B.* **2010**, *114*, 6216-6224.

261. Han, H.; Langley, D. R.; Rangan, A.; Hurley, L. H., Selective Interactions of Cationic Porphyrins with G-Quadruplex Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8902-8913.
262. Kimura, T.; Kawai, K.; Fujitsuka, M.; Majima, T., Detection of the G-quadruplex-TMPyP4 complex by 2-aminopurine modified human telomeric DNA. *Chem. Commun.* **2006**, 401-402.
263. Wei, C.; Jia, G.; Zhou, J.; Han, G.; Li, C., Evidence for the binding mode of porphyrins to G-quadruplex DNA. *Phys Chem Chem Phys* **2009**, *11*, 4025-4032.
264. Oliviero, G.; Amato, J.; Borbone, N.; Galeone, A.; Petraccone, L.; Varra, M.; Piccialli, G.; Mayol, L., Synthesis and characterization of monomolecular DNA G-quadruplexes formed by tetra-end-linked oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17* (4), 889-98.
265. (a) Defrancq, E.; Singh, Y.; Spinelli, N., Chemical Strategies for Oligonucleotide-Conjugates Synthesis. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12* (4), 263-290; (b) Singh, Y.; Murat, P.; Defrancq, E., Recent developments in oligonucleotide conjugation. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (6), 2054-2070.
266. Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M., Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates: an NMR and restrained molecular dynamics investigation. *Biopolymers* **1996**, *39* (3), 297-308.
267. Schubert, F.; Zettl, H.; Hafner, W.; Krauss, G.; Krausch, G., Comparative thermodynamic analysis of DNA-protein interactions using surface plasmon resonance and fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* **2003**, *42* (34), 10288-94.
268. Navratilova, I.; Papalia, G. A.; Rich, R. L.; Bedinger, D.; Brophy, S.; Condon, B.; Deng, T.; Emerick, A. W.; Guan, H. W.; Hayden, T.; Heutmekers, T.; Hoorelbeke, B.; McCroskey, M. C.; Murphy, M. M.; Nakagawa, T.; Parmeggiani, F.; Qin, X.; Rebe, S.; Tomasevic, N.; Tsang, T.; Waddell, M. B.; Zhang, F. F.; Leavitt, S.; Myszka, D. G., Thermodynamic benchmark study using Biacore technology. *Anal. Biochem.* **2007**, *364* (1), 67-77.
269. Ren, J.; Jenkins, T. C.; Chaires, J. B., Energetics of DNA intercalation reactions. *Biochemistry* **2000**, *39* (29), 8439-47.
270. Arora, A.; Maiti, S., Effect of loop orientation on quadruplex-TMPyP4 interaction. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, *112* (27), 8151-9.
271. Davis, T. M.; Wilson, W. D., Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data. *Anal. Biochem.* **2000**, *284* (2), 348-53.
272. Marshall, P. N., Romanowsky-type stains in haematology. *Histochem. J.* **1978**, *10* (1), 1-29.
273. Stathatos, E.; Petrova, T.; Panagiotis, L., Study of the efficiency of visible-light photocatalytic degradation of Basic Blue adsorbed on pure and doped mesoporous titania films. *Langmuir* **2001**, *20* (17), 5025-5030.
274. Huang, C. Z.; Li, Y. F.; Liu, Y., Determination of nucleic acids at nanogram levels with safranin T by a resonance light-scattering technique. *Anal. Chim. Acta.* **1998**, *375*, 89-97.
275. Kuramitz, H.; Sugawara, K.; Kawasaki, M.; Hasebe, K.; Nakamura, H.; Tanaka, S., Electrocatalytic reduction of Hemoglobin at a self-assembled monolayer electrode containing redox dye, Nile Blue as an electron-transfer mediator. *Anal. Sci.* **1999**, *15*, 589-593.
276. Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D., One-pot approach to well-defined biomolecular assemblies by orthogonal chemoselective ligations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48* (14), 2576-9.
277. Meyer, A.; Spinelli, N.; Dumy, P.; Vasseur, J. J.; Morvan, F.; Defrancq, E., Oligonucleotide sequential bis-conjugation via click-oxime and click-Huisgen procedures. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (11), 3927-30.
278. Jawalekar, A. M.; Meeuwenoord, N.; Cremers, J. S.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Rutjes, F. P.; van Delft, F. L., Conjugation of nucleosides and oligonucleotides by [3+2] cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (1), 287-90.
279. Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V., An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. *Org. Lett.* **2007**, *9* (19), 3797-800.
280. Mergny, J. L.; Lacroix, L.; Han, X.; Leroy, J. L.; Hélène, C., Intramolecular Folding of Pyrimidine Oligodeoxynucleotides into an i-DNA Motif. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (35), 8887-8898.
281. Oliviero, G.; Borbone, N.; Amato, J.; D'Errico, S.; Galeone, A.; Piccialli, G.; Varra, M.; Mayol, L., Synthesis of quadruplex-forming tetra-end-linked oligonucleotides: effects of the linker size on quadruplex topology and stability. *Biopolymers* **2009**, *91* (6), 466-77.

282. Esposito, V.; Randazzo, A.; Piccialli, G.; Petraccone, L.; Giancola, C.; Mayol, L., Effects of an 8-bromodeoxyguanosine incorporation on the parallel quadruplex structure [d(TGGGT)]₄. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 313.
283. Masiero, S.; Trotta, R.; Pieraccini, S.; De Tito, S.; Perone, R.; Randazzo, A.; Spada, G. P., A non-empirical chromophoric interpretation of CD spectra of DNA G-quadruplex structures. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *2010* (8), 2683-2692.
284. (a) Zhang, N.; Gorin, A.; Majumbar, A.; Kettani, A.; Chernichenko, N.; Skripkin, E.; Patel, D. J., Crystal Structure of an RNA Purine-Rich Tetraplex Containing Adenine Tetrads: Implications for Specific Binding in RNA Tetraplexes. *J. Mol. Biol.* **2001**, *312*, 1073-1088; (b) Pan, B.; Xiong, Y.; Shi, K.; Deng, J.; Sundaralingam, M., Crystal Structure of an RNA Purine-Rich Tetraplex Containing Adenine Tetrads: Implications for Specific Binding in RNA Tetraplexes. *Structure* **2003**, *11*, 815-823; (c) Webba da Silva, M., Experimental Demonstration of T:(G:G:G:G):T Hexad and T:A:A:T Tetrad Alignments within a DNA Quadruplex Stem. *Biochemistry* **2005**, *44*, 3754-3764.