



Sondes fluorescentes vinyl-triphénylamine optimisées pour la microscopie biphotonique : Etude des interactions non covalentes avec l'ADN et la HSA et application à l'imagerie cellulaire

Blaise Dumat

► To cite this version:

Blaise Dumat. Sondes fluorescentes vinyl-triphénylamine optimisées pour la microscopie biphotonique : Etude des interactions non covalentes avec l'ADN et la HSA et application à l'imagerie cellulaire. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112319 . tel-01124061

HAL Id: tel-01124061

<https://theses.hal.science/tel-01124061>

Submitted on 6 Mar 2015

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.

Thèse

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur en sciences de l’Université Paris-Sud

Spécialité : chimie

par

Blaise Dumat

Sondes fluorescentes vinyl-triphénylaminés
optimisées pour la microscopie biphotonique :

Etude des interactions non covalentes avec l’ADN et la HSA et
application à l’imagerie cellulaire.

Soutenue le 07 décembre 2012

Devant le jury composé de :

Dr. Casimir BLONSKI	Examineur
Dr. Jean-François CONSTANT	Rapporteur
Dr. Christophe ESCUDE	Examineur
Pr. Gilles LEMERCIER	Rapporteur
Dr. Florence MAHUTEAU-BETZER	co-Directrice de thèse
Dr. Marie-Paule TEULADE-FICHO	Directrice de thèse

Sondes fluorescentes vinyl-triphénylamine optimisées pour la microscopie biphotonique :

Etude des interactions non covalentes avec l'ADN ou la HSA et application à l'imagerie cellulaire.

Mots-clés : triphénylamine ; fluorescence ; microscopie biphotonique ; ADN ; HSA ; interactions non covalentes ; vectorisation cellulaire ; théranostique.

Résumé : L'avènement de la microscopie biphotonique et des techniques dites de « super-résolution » ont permis d'améliorer les performances de la microscopie de fluorescence et de l'appliquer à l'imagerie intravitale et à l'analyse des tissus biologiques. Ces techniques requièrent néanmoins l'emploi de sondes aux propriétés optiques et biologiques optimisées.

Plusieurs séries de colorants cationiques basés sur le motif vinyl-triphénylamine (TP) ont été développés pour le marquage d'ADN. Ces fluorophores rouges ou jaunes dont l'émission de fluorescence est commutée par l'interaction avec l'ADN sont des ligands de petit sillon de l'hélice B et possèdent des sections efficaces d'absorption à deux photons élevées.

Les TP marquent l'ADN du noyau des cellules fixées ou en apoptose avec une intensité et un contraste élevés. Elles sont non-cytotoxiques, photostables et sont perméables à la membrane cellulaire. L'optimisation des propriétés a permis d'obtenir la TP-2Bzim, qui possède une brillance biphotonique parmi les plus élevées rapportées dans la littérature pour des molécules de faible poids moléculaire (383 GM) et permet une détection en microscopie biphotonique à basse concentration et à faible puissance d'excitation. En cellules vivantes, les TP sont localisées dans les mitochondries mais, sous excitation mono- ou bi-photonique constante, elles déclenchent l'apoptose de la cellule et se relocalisent dans le noyau. Le phénomène peut être imagé par fluorescence, et les TP pourraient donc être employées comme photosensibilisateurs théranostiques.

Enfin, une stratégie de synthèse pour fonctionnaliser la TP-2Bzim a été développée. Elle a ainsi pu être couplée à des oligonucléotides et à un PNA pour la détection d'hybridation par fluorescence et à l'acide folique et à la spermidine pour le ciblage de cellules cancéreuses.

Vinyl-triphenylamine dyes optimized for two-photon microscopy: Non covalent interactions with DNA or HSA and cellular imaging

Keywords: triphenylamine; fluorescence; two-photon microscopy; DNA; HSA; non covalent interactions; cellular targeting; theranostics.

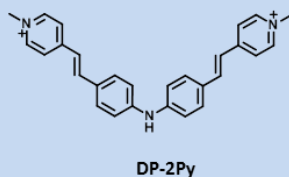
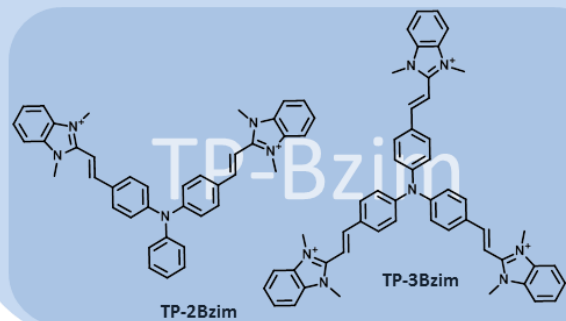
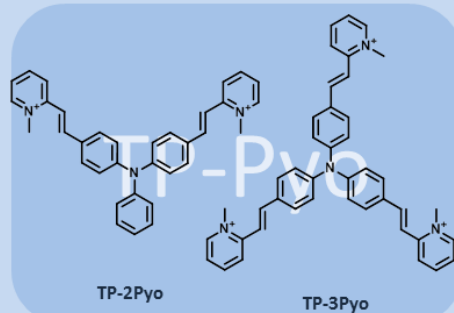
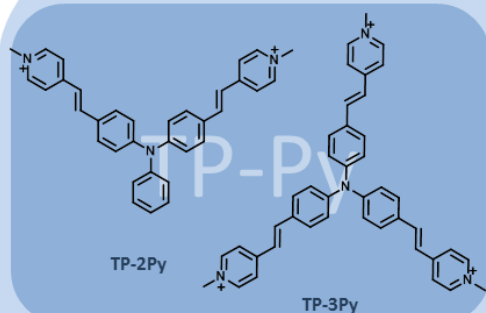
Summary: Significant advances were made in the field of *in vivo* fluorescence imaging thanks to the recent development of biphotonic microscopy and super-resolution techniques, rendering intravital imaging and biological tissues analysis possible. Those techniques however require the use of new probes with optimized optical and biological properties.

Several series of cationic dyes for DNA staining were developed based on the vinyl-triphenylamine (TP) scaffold. Those new switchable yellow or red fluorophores bind in the minor-groove of DNA and display high two-photon absorption cross-sections. Two anionic derivatives were also designed for staining HSA.

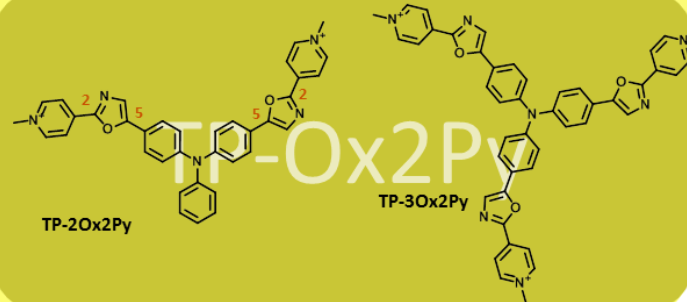
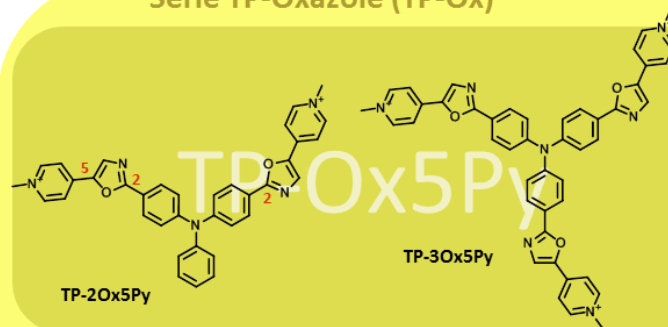
In fixed or apoptotic cells, the cationic dyes stain nuclear DNA with a high brightness and contrast. They are non-cytotoxic, photostable and cell permeant. The molecule with the most optimized properties, TP-2Bzim, has one of the highest two-photon brightness to date (383 GM in DNA), allowing sensible detection in biphotonic microscopy at low concentration and excitation power. In live cells, the dyes are localized in the mitochondria, but it appears that upon constant mono- or bi-photon excitation they trigger cell apoptosis within a few minutes and are released in the nucleus. Since the phenomenon can be imaged by fluorescence microscopy, the TP dyes could thus be used as photosensitizers for theranostics.

A synthetic pathway was also developed to functionalize the TP-2Bzim. It was then coupled by "click-chemistry" to short oligonucleotides or PNA sequences for fluorescence *in situ* hybridization, and to folic acid and spermidine for cancer cells targeting.

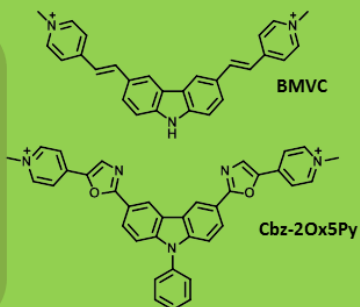
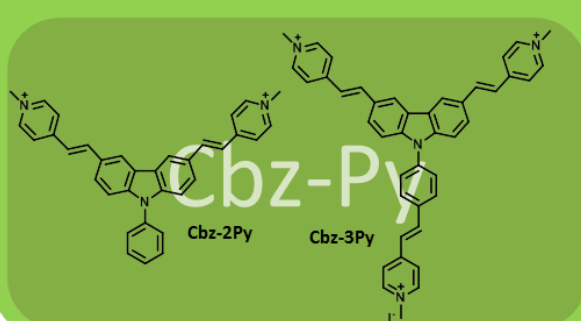
Série vinyl-triphénylamine (TP)



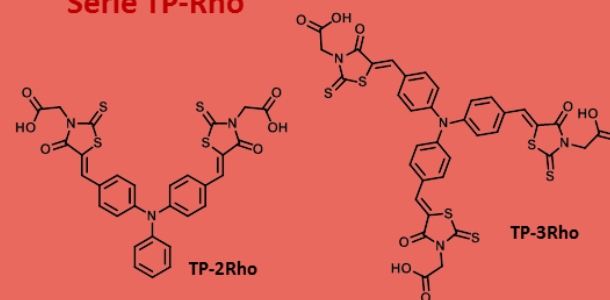
Série TP-Oxazole (TP-Ox)



Série carbazole (Cbz)



Série TP-Rho



Récapitulatif des principales structures étudiées.

										Brillance		Brillance	
			λ_{abs} (nm)	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Φ_F	monophotonique		λ_{2PA}^a (nm)	δ^a (GM)	biphotonique	
								$\epsilon \times \Phi_F$ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	τ_F (ns)			$\delta \times \Phi_F$ (GM)	
Ligands d'ADN	triphénylamines	TP-2Py	glycerol	496	37 400	649	153	0.11	4 114	0.34	800	390	43
			drewAT	509	31 400	656	147	0.07	2 198	0.67	820	450	35
		TP-3Py	glycerol	492	66 000	666	174	0.13	8 580	0.31	820	780	101
			drewAT	499	51 000	684	185	0.01	510	0.51 ^a	800	940	9
		TP-2Pyo	glycerol	476	47 200	633	157	0.23	10 856	0.42	820	460	106
			drewAT	478	41 500	627	149	0.22	9 130	1.69	820	760	134
		TP-3Pyo	glycerol	466	63 500	632	166	0.22	13 970	0.33	800	310	68
			drewAT	476	65 100	634	158	0.09	5 859	1.27 ^a	800	910	73
		TP-2Bzim	glycerol	448	40 400	602	154	0.35	14 140	1.00	780	270	95
			drewAT	476	44 400	585	109	0.54	23 976	2.35	820	710	383
	TP-3Bzim	glycerol	440	57 200	604	164	0.42	24 024	0.79	760	240	101	
		drewAT	468	62 400	591	123	0.34	21 216	2.03 ^a	800	810	275	
	carbazoles	Cbz-2Py	glycerol	444	28 700	575	131	0.33	9 471	1.05	800	190	64
			drewAT	441	21 700	545	94	0.58	12 586	2.50	800	210	121
		Cbz-3Py	glycerol	437	61 100	581	144	0.16	9 776	0.77	760	540	84
			drewAT	441	44 200	552	111	0.03	1 326	1.87	820	320	11
		Cbz-2Ox5Py	glycerol	410	30 550	560	150	0.29	6 416	nd	nd	nd	nd
	drewAT		415	19 500	-	-	-	-	-	-	-	-	
	TP-oxazoles	TP-2Ox2Py	drewAT	485	14700	-	-	-	-	-	-	-	-
		TP-3Ox2Py	glycerol	477	48700	690	213	0.022	1071	nd	nd	nd	nd
			drewAT	482	35000	-	-	-	-	-	-	-	-
		TP-2Ox5Py	glycerol	454	45300	636	182	0.053	2401	nd	nd	nd	nd
			drewAT	466	21800	631	165	0.038	500	nd	nd	nd	nd
		TP-3Ox5Py	glycerol	447	58500	634	188	0.11	3393	nd	nd	nd	nd
			drewAT	444	45500	606	165	0.031	1459	nd	nd	nd	nd
autres	DP-2Py	drewAT	470	70 800	645	175	0.01	708	nd	nd	nd	nd	
	BMVC	drewAT	435	51 000	560	125	0.13	6 630	nd	nd	nd	nd	
Ligands de HSA	TP-2Rho	glycerol	500	76 300	615	115	0.09	6 867	nd	nd	nd	nd	
		dichloromethane	500	78 800	600	100	0.16	12 608	1.08	870	379	61	
		HSA	500	58 900	584	84	0.028	1 649	0.55	870	464	13	
	TP-3Rho	glycerol	490	78 200	625	135	0.07	5 343	nd	nd	nd	nd	
		dichloromethane	490	78 500	597	107	0.13	10 205	1.62	820	425	55	
		HSA	486	68 900	620	134	0.015	1 034	0.69	820	773	12	

Tableau récapitulatif des propriétés optiques.

λ_{abs} et $\lambda_{ém}$: longueurs d'ondes maximales d'absorption et d'émission, ϵ : coefficient d'absorption molaire à λ_{abs} , $\Delta\lambda$ déplacement de Stokes, Φ_F : rendement quantique de fluorescence, τ_F : temps de vie de fluorescence, λ_{2PA} : longueur d'onde maximale d'absorption à deux photons, δ : section efficace d'absorption à deux photons,

^a Mesures effectuées dans l'ADN de hareng au lieu du drewAT.

PREAMBULE

Ce travail de thèse, effectué au sein de l'UMR176 à l'institut Curie sous la direction de Florence Mahuteau-Betzer et Marie-Paule Teulade-Fichou, porte sur le développement de marqueurs moléculaires pour la microscopie de fluorescence excitée à deux photons. La fluorescence est une technique d'imagerie peu invasive qui possède de nombreux avantages parmi lesquels :

- Une résolution élevée (de l'ordre de 200 μ M).
- Une variabilité de l'émission de fluorescence en fonction de l'environnement qui permet de retirer des informations à la fois structurales et fonctionnelles.
- Une grande sensibilité de détection.

L'utilisation d'une source excitatrice infrarouge tirant avantage des propriétés d'absorption non linéaire des fluorophores a donné naissance à la microscopie biphotonique dans les années 1990 et a rendu possible l'imagerie en profondeur dans les échantillons biologiques en évitant l'absorption et la diffraction de la lumière incidente par les tissus. Cette technique est encore en plein essor notamment pour le développement de l'imagerie intravitale sur le petit animal mais nécessite de disposer de sondes aux propriétés d'absorption non linéaire optimisées. C'est donc l'objectif de cette thèse de développer une famille de fluorophores regroupant toutes les propriétés optiques et pharmacochimiques nécessaires pour améliorer l'offre de marqueurs existant pour l'imagerie biphotonique. Elle fait suite à deux thèses de chimie et une de physique, qui ont permis de mettre au point plusieurs séries de marqueurs d'ADN basés sur le noyau triphénylamine et aux propriétés d'absorption à deux photons optimisées. Ces travaux à l'interface entre la chimie, la physique et la biologie ont été effectués en collaboration avec l'équipe de nanophotonique de Fabrice Charra et Céline Fiorini au CEA et avec l'équipe de Patrick Tauc et Eric Deprez à l'institut d'Alembert de l'ENS Cachan.

La famille de molécules discutée dans ce travail est basée sur un squelette triphénylamine substitué par deux ou trois groupements accepteurs conjugués par un lien vinylique et sur ses variations structurales (Figure 1). Un résumé des principales structures étudiées ainsi qu'un tableau récapitulatif de leurs propriétés optiques sont disponibles en début de manuscrit pour faciliter la lecture.

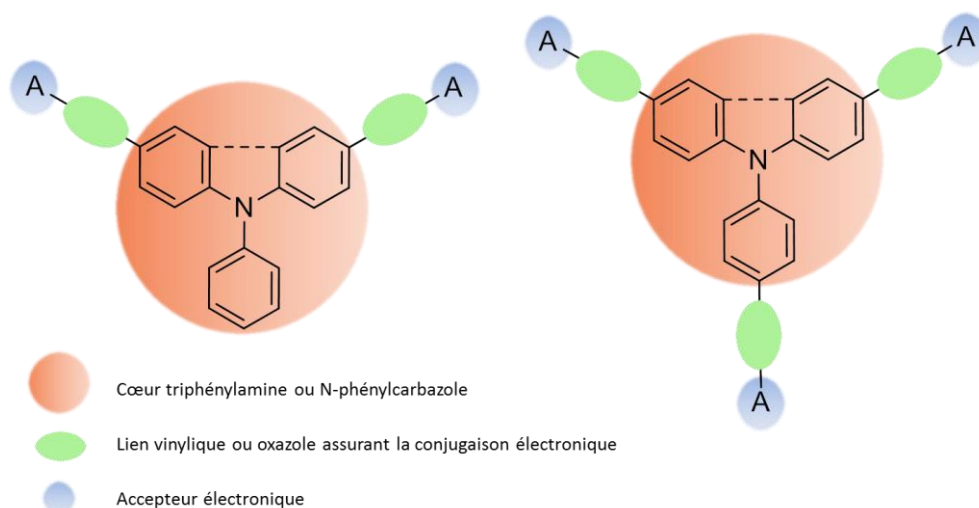


Figure 1. Structure générale des marqueurs étudiés.

Les molécules seront nommées en fonction de la nature du cœur ainsi que du nombre et de la nature des accepteurs. Ainsi la triphénylamine substituée par deux accepteurs pyridinium portés par un lien vinylique sera notée **TP-2Py** et celle portant trois accepteurs pyridinium **TP-3Py**. Le remplacement du cœur triphénylamine par un N-phénylcarbazole donnera la notation **Cbz-2Py** et **Cbz-3Py**. La liaison entre le cœur et les accepteurs sera par défaut un vinyle et ne sera pas indiquée sauf dans les quelques cas où le vinyle est remplacé par un oxazole. Ainsi la **TP-2Ox5Py** fera référence à la triphénylamine portant deux accepteurs pyridinium, la liaison étant assurée par un cycle oxazole. Le chiffre 5 indique la position de la pyridine sur le cycle oxazole (voir aussi le récapitulatif des structures).

Dans le cas des marqueurs cationiques, les intermédiaires neutres seront notés selon la même nomenclature avec un *n* indiquant qu'il s'agit des composés non chargés. Par exemple, le précurseur de la **TP-2Py** avant la méthylation des groupements pyridine sera noté **TP_n-2Py**.

Les molécules pourront aussi être regroupées par famille. Ainsi, la mention **TP-Py** fera référence à la **TP-2Py** et à la **TP-3Py**. La série **TP** regroupe tous les marqueurs vinyl-triphénylamines cationiques et la série **Cbz** tous les marqueurs possédant un cœur N-phénylcarbazole. Les différentes familles ou séries sont indiquées sur l'encart résumant les principales structures étudiées.

Après une introduction sur la fluorescence et les sondes moléculaires pour la microscopie mono- et bi-photonique, le **premier chapitre** de la thèse sera consacré à l'étude approfondie de l'interaction des fluorophores de la famille triphénylamine et de leurs dérivés avec l'ADN à l'aide de techniques spectroscopiques. Deux nouveaux analogues anioniques pour le marquage non covalent de l'albumine seront également discutés. Après cette première étude en cuve, le **Chapitre 2** traitera de l'application des molécules à la microscopie biphotonique. Enfin, le troisième et **dernier chapitre** sera consacré à la fonctionnalisation des marqueurs triphénylamines pour permettre le couplage covalent à des oligonucléotides ou bien le ciblage cellulaire.

L'emploi de la langue française a été privilégié autant que possible ; lorsque l'usage de termes anglais s'est révélé nécessaire, ceux-ci ont été notés en italique. Une attention toute particulière a également été portée à

la correction orthographique et grammaticale, il est malheureusement inévitable que certaines erreurs subsistent et je m'en excuse tout en vous souhaitant une bonne lecture.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide déoxyribonucléique

└ ssDNA : *single-stranded DNA*, ADN simple brin
└ dsDNA : *double-stranded DNA*, ADN double brin

ARN : acide ribonucléique

BSA : *bovine serum albumine*, albumine du sérum bovin

DBU : 1,8-diazabicycloundec-7-ene

DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide

DMAP : diméthylaminopyridine

DMF : *N,N*-diméthylformamide

FISH : *fluorescence in situ Hybridization*

FLIM : *fluorescence lifetime imaging*, imagerie par temps de vie de fluorescence

G4 : ADN quadruplex

HPLC : *High performance liquid chromatography*, chromatographie liquide haute performance

HSA : *human serum albumine*, albumine du sérum humain

IBX : acide 2-iodoxybenzoïque

IRM : imagerie par résonance magnétique nucléaire

LC-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

MS : spectrométrie de masse

PBS : *phosphate buffer saline*, tampon phosphate salin

PEG : polyéthylène glycol

└ TEG : tétraéthylène glycol
└ TriEG : triéthylène glycol

THF : tétrahydrofurane

TABLE DES MATIERES

Préambule	1
Liste des abréviations	4
Table des matières	5
Introduction	11
A. Microscopie(s) de fluorescence	12
I. La fluorescence moléculaire	12
1. Historique	12
2. Aspects théoriques	13
a. <i>Diagramme de Jablonski</i>	13
b. <i>Grandeurs caractéristiques</i>	14
3. Facteurs influençant la fluorescence	15
a. <i>Structure moléculaire</i>	15
b. <i>Polarité</i>	15
c. <i>Processus intermoléculaires</i>	16
II. Absorption à deux photons	17
1. Principe	17
2. Caractéristiques de l'absorption biphotonique	18
III. Microscopie de fluorescence	18
1. Microscopie d'épifluorescence	20
2. Microscopie confocale	20
3. Microscopie biphotonique	20
4. Résolution	21
5. Microscopies de super-résolution	22
a. <i>STimulated Emission Depletion microscopy (STED)</i>	23
b. <i>Localisation de fluorophores uniques</i>	23
Conclusion	24
B. Ingénierie moléculaire : Design de fluorophores biphotoniques	26
I. Relation structure activité	26
1. Structure quadrupolaire	26
2. Structure octupolaire	28
II. Sondes fluorescentes biphotoniques utilisées en microscopie	29
III. Complexes métalliques et lanthanides	31
Conclusion	32

C.	Méthodes spectroscopiques pour l'analyse des interactions ADN-ligand	33
I.	Absorption UV-Vis et fluorescence	33
1.	UV-melting	34
2.	Titration fluorimétrique	34
II.	Dichroïsme circulaire	35
D.	Historique des travaux du laboratoire	37
I.	Première génération de marqueurs : TP-Py	37
II.	Deuxième génération de marqueurs : cœur N-phénylcarbazole	39
III.	Troisième génération de marqueurs : TP-Pyo et TP-Bzim	40
IV.	Interaction avec l'ADN et mode de liaison	41
V.	Microscopie confocale et biphotonique	41
VI.	Objectifs de la thèse	43
	Chapitre 1 : Marquage non covalent de biomolécules	45
	PARTIE 1 : Marquage d'ADN	47
A.	Introduction	48
I.	Structure de l'ADN	48
1.	Structure primaire	48
2.	Structure secondaire	49
3.	Structures secondaires non usuelles : l'ADN G-quadruplex	50
4.	L'ADN au sein de la cellule : structure tertiaire	51
II.	Interactions non-covalentes ADN-petite molécule	52
1.	Agents intercalants	53
2.	Ligands de petit sillon	54
a.	<i>Dérivés de nétropsine et distamycine</i>	54
b.	<i>Berenil® et dérivés</i>	55
c.	<i>Bisbenzimidazoles : Hoechst et dérivés</i>	56
d.	<i>Autres ligands de petit sillons</i>	57
3.	Marquage fluorescent d'ADN	58
a.	<i>Fluorophores commerciaux usuels</i>	58
b.	<i>Autres fluorophores</i>	59
c.	<i>Marqueurs biphotoniques</i>	60
B.	Synthèse & Caractérisation des ligands	63
I.	Synthèse	63
1.	Optimisation de la synthèse de la série Bzim	63
2.	Variation du lien vinylique : TP-oxazole	64
3.	Synthèse des Cbz-2Ox5Py et Cbz-2Bzim	66
a.	<i>Synthèse du Cbz-2Bzim</i>	66
b.	<i>Synthèse du Cbz-2Ox5Py</i>	68
4.	Synthèse de la DP-2Py et du BMVC	68
II.	Propriétés optiques	69
1.	Préambule : mesure des rendements quantiques de fluorescence	69

2.	Série Vinyl-triphénylamine	71
a.	<i>Propriétés linéaires</i>	71
b.	<i>Propriétés non linéaires</i>	73
3.	Série TP-oxazole	74
4.	Série N-phenylcarbazole	75
5.	DP-2Py et BMVC	76
C.	Interaction avec l'ADN	78
I.	Titration fluorimétriques et mesures d'affinités	78
1.	Choix du modèle mathématique	78
2.	Application à la série TP	81
II.	Sélectivité et mode de liaison	85
1.	Sélectivité structurale	85
a.	<i>Sélectivité optique vs. affinité</i>	85
b.	<i>Série triphénylamine</i>	86
c.	<i>Série N-phénylcarbazole</i>	88
d.	<i>Série TP-Oxazole</i>	90
e.	<i>DP-2Py et BMVC</i>	91
2.	UV-melting.	92
3.	Dichroïsme circulaire et modélisation	94
a.	<i>Série TP</i>	94
b.	<i>Série Cbz : mode de liaison dépendant de la séquence</i>	96
c.	<i>Série TP-oxazole</i>	97
PARTIE 2 :	TP anioniques, vers le marquage de protéines	99
A.	Introduction : Marquage fluorescent de protéines	100
I.	Marquage direct de protéine : détection sur gel et en solution	100
II.	Protéines modifiées : observation intracellulaire par microscopie	101
1.	Protéines de fusion	102
a.	<i>Protéines autofluorescentes</i>	102
b.	<i>Marquage enzymatique et non covalent</i>	103
2.	Marquage chimique	104
	Conclusion	105
B.	Design et synthèse des marqueurs anioniques	106
I.	Albumine du sérum humain (HSA)	107
II.	Synthèse	108
C.	Propriétés des TP-Rho	110
I.	Propriétés optiques	110
1.	Propriétés linéaires	110
2.	Propriétés non linéaires	112
II.	Interaction avec la HSA	112
1.	Titration fluorimétriques	112
a.	<i>Stœchiométrie-diagramme de Job</i>	112
b.	<i>Affinités</i>	114
2.	Titration compétitives-Site de liaison	114

3. Comparaison avec les marqueurs d'ADN cationiques	115
Conclusion	116
Chapitre 2 Application en imagerie cellulaire par microscopie de fluorescence	117
A. Imagerie en cellules fixées par microscopie confocale et biphotonique	118
I. Expériences préliminaires	119
1. Autofluorescence	119
2. Cytotoxicité	120
3. Pénétration et localisation intracellulaire	120
II. Microscopie biphotonique	123
1. Séries TP & Cbz	123
a. Sensibilité	123
b. Photostabilité	125
c. Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)	125
d. Série TP-oxazole	127
2. Série TP-Rho	127
Conclusion	128
B. Imagerie en cellules vivantes : Vers de nouveaux agents théranostiques	129
I. Comportement en cellules vivantes	129
1. Localisation en cellules vivantes	129
2. Influence de la lumière	130
II. Activité thérapeutique photoinduite	131
1. La thérapie photodynamique (PDT)	131
a. Principe	131
b. PDT deux photons	131
2. Phototoxicité	131
3. Propriétés pharmacologiques	133
a. Influence de l'irradiance	133
b. Dose-réponse	133
Conclusion	134
Chapitre 3 : Triphénylaminés Fonctionnalisés	
Marquage Covalent d'ADN et Vectorisation Cellulaire	135
A. Synthèse des marqueurs fonctionnalisables	136
I. Introduction	136
1. « Chimie Click »	136
2. Objectifs et composés cibles	137
II. Synthèse de la TP-2Bzim dérivatisée	137
1. Synthèse linéaire	138
2. Synthèse convergente	139
III. Synthèse de la TP-2Rho dérivatisée	141

B. Détection d'hybridation	143
I. Introduction	143
1. Oligonucléotides marqués	143
2. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)	144
3. Objectifs	146
II. Hybridation <i>in situ</i>	146
1. Structure	146
2. Sélectivité d'hybridation et fluorescence	147
a. <i>Propriétés de fluorescence</i>	149
b. <i>Sélectivité</i>	150
C. Vectorisation cellulaire	154
I. Conjugué TP-2Bzim-spermidine	154
1. Polyamines	154
a. <i>Structure et fonction cellulaire</i>	154
b. <i>Application à la vectorisation</i>	155
2. Synthèse du conjugué	155
II. Conjugué TP-2Bzim-acide folique	157
1. Acide folique : structure et propriétés de vectorisation	157
a. <i>Structure et fonction cellulaire</i>	157
b. <i>Exemple de chromophores vectorisés par l'acide folique</i>	158
2. Synthèse du conjugué TP-2Bzim-acide folique (TP-2Bzim-FA)	159
Conclusion	162
Conclusion Générale	163
Publications	169
Bibliographie	171
Partie expérimentale	185
A. Synthesis	186
I. Materials and methods	186
1. Chemicals	186
2. Analyses and purifications	186
II. Procedures	187
B. Biophysical experiments	211
I. Samples preparation	211
II. Optical spectroscopies	212
1. Quantum yield measurements	212
2. Fluorimetric titrations	212
3. CD experiments	213
4. UV-melting	213
5. Two-photon absorption cross-section measurements (CEA, Saclay)	213
III. Molecular modeling	214

C.	Cell culture and cellular imaging	215
I.	Cell culture	215
II.	Cellular imaging (Institut Curie)	215
III.	Cellular imaging (ENS Cachan)	216
1.	Cytotoxicity and phototoxicity assays	216
2.	Fluorescence imaging	216
	Annexes	217
A.	Modélisation des courbes de titrations: Résultats des calculs	218
B.	Calculs de docking dans le drewAT	219

INTRODUCTION

A. MICROSCOPIE(S) DE FLUORESCENCE

La fluorescence fait partie des différents phénomènes de photoluminescence durant lesquels une molécule absorbe un photon pour en réémettre un autre. La fluorescence implique le passage de la molécule dans un état excité lors de l'absorption du photon, suivi d'une désexcitation par émission d'un photon d'énergie inférieure en raison des dissipations d'énergie (Figure 2). D'autres phénomènes de luminescence existent, qui diffèrent par leur mode d'excitation (électrique, thermique, chimique, biologique...), mais l'émission peut en général se ramener à la phosphorescence ou à la fluorescence.

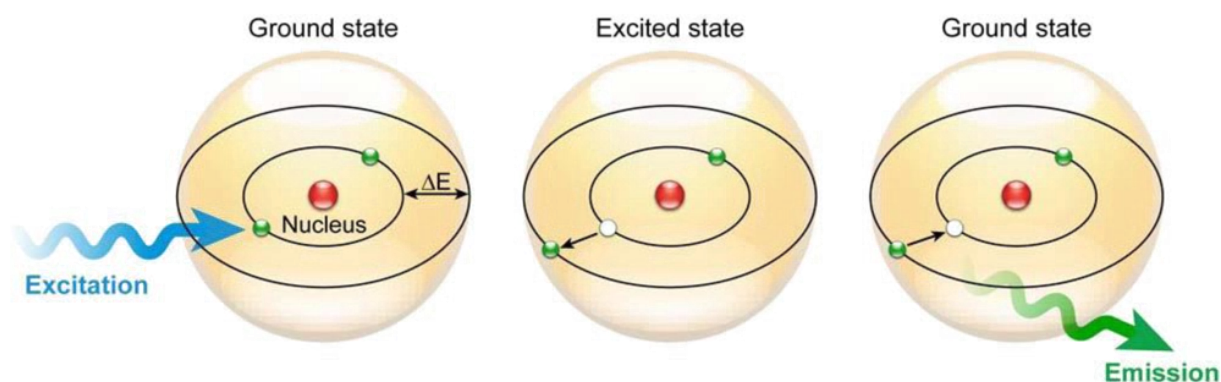


Figure 2. Schéma de principe de la fluorescence à partir du modèle atomique de Bohr.

Image tirée de la réf. [1].

Les molécules possédant des propriétés de fluorescence sont appelées fluorophores ou fluorochromes.

I. La fluorescence moléculaire

1. Historique

Les phénomènes de luminescence sont connus depuis l'antiquité puisqu'on les retrouve dans certains phénomènes naturels (vers luisants). La première mention du phénomène de fluorescence remonte à 1565 avec l'émission d'une infusion de bois, c'est néanmoins à Stokes que l'on attribue l'introduction du terme de fluorescence en 1853. Il avait alors observé qu'une solution de sulfate de quinine sous illumination UV émettait

une lumière de longueur d'onde supérieure. Le changement de longueur d'onde entre la lumière incidente et la lumière émise est d'ailleurs appelé **déplacement de Stokes**.

Les propriétés d'émission d'un fluorophore sont sensibles à son environnement, et la fluorescence est donc largement employée en chimie analytique pour sonder les propriétés d'un milieu (pH, polarité) ou observer des interactions moléculaires. Elle bénéficie de nombreux avantages, notamment une **sensibilité élevée** permettant de détecter des analytes en faible concentration (jusqu'au nano voire picomolaire), un **temps de réponse rapide** (nanoseconde), une **bonne résolution spatiale** (100 – 500 nm) et une grande **polyvalence** d'application [2].

2. Aspects théoriques

a. Diagramme de Jablonski

Le phénomène de fluorescence peut être schématisé par le diagramme de Jablonski qui résume les différents phénomènes mis en jeu lors de l'absorption d'un photon par une molécule (Figure 3).

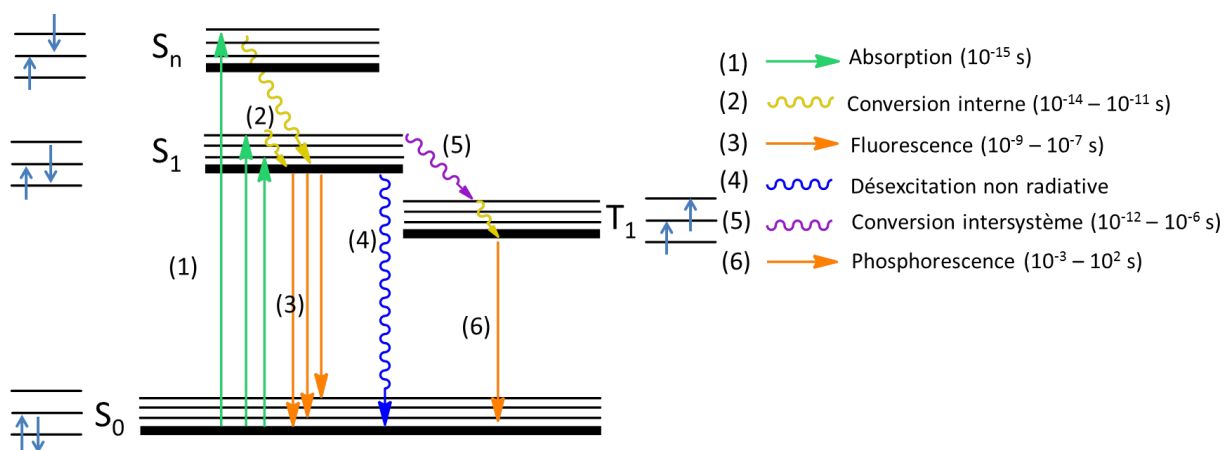


Figure 3. Diagramme de Jablonski d'une molécule.

Les différents phénomènes sont indiqués avec leur temps caractéristique. L'état de spin est indiqué à côté de chaque niveau d'énergie

Lorsqu'une molécule à l'état fondamental singulet (spin total nul) S_0 interagit avec la lumière, elle absorbe un photon d'énergie et passe dans l'état excité S_1 . L'absorption est le résultat de l'interaction entre le champ électromagnétique incident et les électrons de la molécule. Elle n'a lieu que si l'énergie du rayonnement correspond à l'énergie entre deux niveaux d'énergie de la molécule. Si l'énergie est plus élevée, une partie de l'énergie est transformée en énergie de vibration et de rotation. La molécule peut également absorber à partir d'un niveau vibrationnel supérieur de l'état S_0 . L'ensemble de ces transitions constitue le spectre d'absorption de la molécule. Plus la molécule dispose de niveaux vibrationnels rapprochés, plus ce spectre sera large car les transitions vers des niveaux vibrationnels supérieurs seront favorisées. Lorsque la molécule est excitée dans un niveau vibrationnel supérieur de l'état S_1 , elle se désexcite rapidement jusqu'au niveau vibrationnel le plus bas par conversion interne. L'énergie correspondante est alors dissipée sous forme de chaleur. Plusieurs transitions étant possible en absorption, la molécule peut également passer à un niveau S_n . Dans la plupart des cas elle va, là encore, se désexciter par conversion interne vers le niveau S_1 .

Les phénomènes d'absorption et de conversion interne étant très rapide, une molécule excitée se retrouve presque instantanément au niveau d'énergie vibrationnel le plus bas de l'état S_1 , quelle que soit la transition de départ. Le temps de vie de l'état excité est de l'ordre de la nanoseconde et la molécule peut ensuite se désexciter vers l'état S_0 de plusieurs manières. Elle peut émettre un photon, on parlera alors de fluorescence, ou bien se désexciter de manière non radiative. Elle peut également opérer une conversion intersystème avec changement d'état de spin pour passer à l'état triplet (spin total égal à 1) T_1 . Ces transitions sont interdites du fait de ce changement de spin et sont donc peu probables ; elles sont favorisées lorsque le temps de vie de l'état S_1 est élevé. De l'état triplet la molécule peut revenir à l'état singulet et fluorescer, on parlera alors de fluorescence retardée, ou bien se désexciter par phosphorescence de l'état triplet T_1 à l'état singulet S_0 . Les transitions $T_1 \rightarrow S_0$ étant interdites, la cinétique est beaucoup plus lente et le temps caractéristique de la phosphorescence est de l'ordre de la milliseconde et peut aller jusqu'à plusieurs secondes. La désexcitation par fluorescence a lieu vers les différents états vibrationnels du niveau S_0 et comme pour l'absorption, plus ces états vibrationnels seront proches, plus le spectre d'émission de la molécule sera large.

b. *Grandeurs caractéristiques*

Coefficient d'absorption molaire ϵ (mol.L⁻¹.cm⁻¹) :

Caractérise la force de l'absorption linéaire d'un composé. C'est une caractéristique intrinsèque d'un composé dans un milieu donné. Il obéit à la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon lc$, où A est l'absorbance, l la longueur de la cuve et c la concentration du composé.

Temps de vie de fluorescence τ (s) :

Temps moyen de résidence d'un électron dans l'état excité avant le retour à l'état fondamental. La dépopulation du niveau excité par les processus radiatifs et non radiatifs suit une loi exponentielle dont τ est le temps caractéristique et le déclin de fluorescence peut s'écrire :

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \text{ où } \tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

Où k_r est la constante de désexcitation radiative et k_{nr} la constante de désexcitation non radiative.

Dans le cas de phénomènes complexes où une molécule peut adopter plusieurs conformations dans l'état excité, ce déclin peut être polyexponentiel.

Rendement quantique ϕ_F :

Le rendement quantique est le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés et représente donc la proportion prise par les phénomènes radiatifs dans la désexcitation de la molécule. Il quantifie l'intensité de l'émission d'un fluorophore. On peut écrire :

$$\phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

La mesure de ϕ_F et τ permet de connaître k_r et k_{nr} .

Déplacement de Stokes :

Différence entre les longueurs d'onde d'absorption et d'émission. Généralement exprimé en nombre d'onde (cm⁻¹), il sera pour des raisons de clarté exprimé en nanomètre dans ce manuscrit et noté $\Delta\lambda$.

3. Facteurs influençant la fluorescence

a. Structure moléculaire

Les chromophores sont pour la plupart des molécules aromatiques conjuguées, et de manière générale, l'extension de la conjugaison π entraîne un déplacement de l'absorption et de l'émission vers le rouge ainsi qu'une augmentation du rendement quantique. Dans de tels systèmes, la transition de plus basse énergie (HOMO-LUMO)¹ est la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ qui se caractérise par un coefficient d'absorption important et un rendement quantique souvent élevé. Dans le cas des hétérocycles aromatiques qui possèdent donc un doublet non liant impliqué dans le système π , la transition la plus basse est la transition $n \rightarrow \pi^*$ qui se caractérise elle par un coefficient d'absorption faible et une durée de vie radiative plus élevée de l'ordre de 10^{-6} s. Dans ce cas, la fluorescence n'entre pas en compétition avec les phénomènes de désexcitation non radiatifs, plus rapides, et le rendement quantique est faible. C'est le cas des composés de type pyridine ou acridine qui sont peu fluorescents. Cependant, la capacité à former des liaisons hydrogènes dans les solvants protiques peut modifier la HOMO qui devient l'orbitale π et la transition la plus basse est alors la $\pi \rightarrow \pi^*$, ce qui augmente fortement le rendement quantique de tels composés. Ces quelques règles sont également à tempérer par l'importance des effets des substituants sur les propriétés optiques des cycles ou hétérocycles aromatiques, et de nombreux colorants très fluorescents sont hétérocycliques comme les coumarines, les rhodamines ou la fluorescéine. La présence d'un atome lourd (Br, I) est connue pour favoriser la conversion intersystème et donc inhiber la fluorescence (effet d'atome lourd interne).

b. Polarité

Le solvant et notamment sa polarité ont une grande influence sur les propriétés d'émission d'un fluorochrome car il peut modifier les niveaux d'énergie de la molécule. L'influence de la polarité du solvant est extrêmement visible dans le cas de molécules qui subissent un transfert de charge intramoléculaire durant l'excitation. Dans ces molécules qui sont souvent du type donneur-accepteur conjugué les orbitales HOMO et LUMO sont distantes et lors du passage à l'état excité, le transfert d'un électron entraîne une variation du moment dipolaire qui est souvent plus élevé dans l'état excité que dans l'état fondamental. Dans le cas d'un milieu polaire, l'état excité n'est alors plus en équilibre avec le solvant. Il s'opère donc une réorganisation des molécules du solvant autour du fluorophore excité qui atteint un état de transfert de charge intramoléculaire (*Intramolecular Charge Transfert*, ICT) stabilisé (Figure 4). La vitesse de ce phénomène dépend de la viscosité du solvant mais est de l'ordre de 10^{-10} s, donc plus rapide que la fluorescence. Plus le temps de vie de fluorescence d'une molécule est élevé, plus l'émission aura lieu à partir de l'état excité relaxé. La stabilisation et donc le déplacement bathochrome de la longueur d'onde d'émission qui lui est associé augmentent avec la polarité du solvant. Les fluorophores dont les propriétés sont particulièrement sensibles à la polarité peuvent être utilisés comme sondes de polarité.

¹ **HOMO** : Higher Occupied Molecular Orbital, **LUMO** : Lower Unoccupied Molecular Orbital

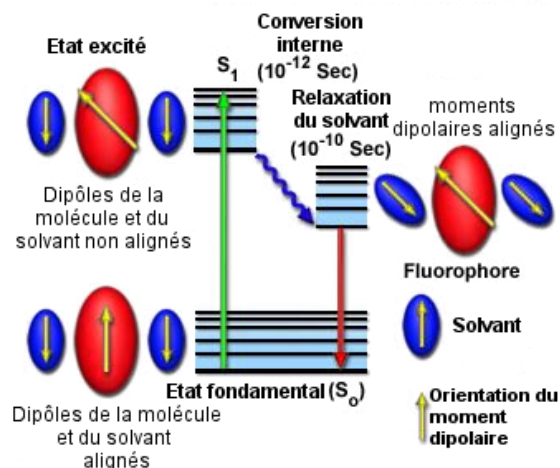


Figure 4. Effet de stabilisation du solvant sur l'état excité.

D'après www.olympusmicro.com.

L'état fondamental est en général plan car cela favorise la conjugaison électronique et l'état excité l'est donc aussi, mais pour certaines molécules, l'état ICT s'accompagne d'une rotation autour des liaisons pour former ce que l'on appelle un état TICT (*Twisted Intramolecular Charge Transfer*). Ces molécules seront plus sensibles à la viscosité du milieu puisque la formation de l'état relaxé pourra être défavorisée par l'inhibition des rotations moléculaires, et pourront donner des spectres d'émission duals en émettant à la fois à partir de l'état excité et de l'état TICT.

c. Processus intermoléculaires

Des réactions chimiques et des transferts d'énergie intermoléculaires peuvent se produire dans l'état excité et modifier les propriétés de fluorescence d'un composé. La plupart du temps, ces processus sont en compétition avec la désexcitation radiative et donc éteignent le signal de fluorescence. La durée de vie de fluorescence est ici capitale puisque pour entrer en compétition avec la fluorescence, les processus d'inhibition (*quenching*) doivent avoir un temps caractéristique plus faible. On distinguera les processus de quenching statique, lorsque l'inhibiteur est en excès et donc en contact avec le fluorophore et de quenching dynamique lorsque l'inhibiteur n'est pas en excès. Dans ce dernier cas, le phénomène est contrôlé par la diffusion et les deux partenaires doivent pouvoir se rencontrer pendant la durée de vie de l'état excité.

- **Transfert d'électrons photoinduit (PET)** : Les propriétés oxydante ou réductrice d'une molécule peuvent être exaltées à l'état excité, et le PET est souvent responsable de l'inhibition de fluorescence. Les guanines par exemple sont des bases de l'ADN riches en électrons et sont connues pour inhiber la fluorescence par ce mécanisme [3].
- **Transfert de proton photoinduit** : Le pH peut avoir une influence sur la fluorescence en modifiant l'état fondamental. Il peut aussi agir sur l'état excité, les propriétés acido-basiques d'une molécule étant alors modifiées. Ces phénomènes très étudiés sont à l'origine des sondes de pH [4,5].
- **Transfert d'énergie radiatif** : Le transfert d'énergie radiatif implique l'émission d'un photon par le donneur qui est ensuite réabsorbé par un accepteur en cas de recouvrement spectral des deux

partenaires. Il entraîne un effet de filtre ou d'écran qui diminue l'intensité de la fluorescence émise. Une molécule peut aussi s'écranter elle-même.

- **Transfert d'énergie non radiatif** : Il se produit sans émission de photons par le donneur, mais implique aussi le recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur pour permettre un couplage des transitions électroniques entre les deux molécules. On parlera alors de transfert résonant. Il peut être la conséquence de diverses interactions et notamment du recouvrement des orbitales moléculaires, mais le cas le plus étudié, décrit par Förster, implique des interactions dipolaires. Le FRET (*Förster Resonant Energy Transfer*) est très utilisé en imagerie pour étudier les interactions entre molécules et notamment les distances et les interactions intermoléculaires puisque le rendement de FRET diminue en $1/r^6$ et n'a lieu que pour une distance intermoléculaire (r) de l'ordre de 15 à 60 Å.

II. Absorption à deux photons

1. Principe

L'absorption à deux photons est le passage d'une molécule de l'état fondamental S_0 à un état excité S_n par absorption simultanée de deux photons de même énergie en passant par un niveau électronique virtuel (Figure 5).

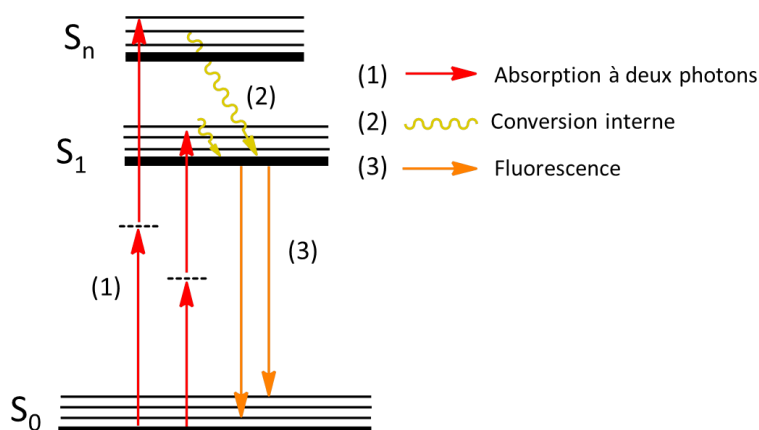


Figure 5. Absorption à deux photons

Le phénomène non linéaire d'absorption à deux photons a d'abord été décrit de façon théorique par Maria Göppert-Mayer en 1931 et a été mis en évidence expérimentalement dans les années 1961 avec l'apparition des premiers lasers. Maria Göppert-Mayer a obtenu pour ses travaux le prix Nobel de physique en 1963 et a donné son nom à l'unité de la **section efficace d'absorption à deux photons** (δ). Cette dernière par analogie avec le coefficient d'absorption molaire ϵ caractérise la force de l'absorption biphotonique. Elle s'exprime donc en Göppert-Mayer (GM) : $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$. Contrairement à l'absorption monophotonique qui augmente linéairement avec l'intensité incidente, l'absorption biphotonique faisant intervenir deux photons est proportionnelle au carré de l'intensité incidente. On parle d'**absorption non linéaire**.

Si les transitions à un et deux photons sont les mêmes, la longueur d'onde d'absorption à deux photons sera deux fois la longueur d'onde d'absorption linéaire mais le passage par un état de transition intermédiaire

peut modifier les règles de sélection. Ainsi pour toutes les molécules centrosymétriques, les transitions à un photon sont toujours interdites à deux photons et réciproquement [6]. Cependant, même si les absorptions à un et deux photons peuvent ne pas amener la molécule au même état excité, les phénomènes de conversion interne font que les spectres de fluorescence excitée à un et deux photons sont en général les mêmes.

2. Caractéristiques de l'absorption biphotonique

L'absorption à deux photons requiert l'interaction quasi-simultanée (10^{-18} s) de deux photons. La probabilité d'un tel phénomène est faible et nécessite donc une densité de photons importante. En pratique, l'excitation biphotonique s'effectue à l'aide de lasers pulsés fournissant une intensité locale élevée tout en permettant de conserver une puissance moyenne acceptable pour l'échantillon. En conséquence de la dépendance quadratique du phénomène et de la focalisation du laser, l'absorption biphotonique diminue avec la puissance quatrième de la distance le long de l'axe optique à partir du point focal [7]. L'intérêt majeur de l'absorption non linéaire, dont tirent parti nombres de ses applications, est donc le confinement spatial de l'excitation au point focal avec un volume d'analyse de l'ordre du femtolitre (Figure 6).

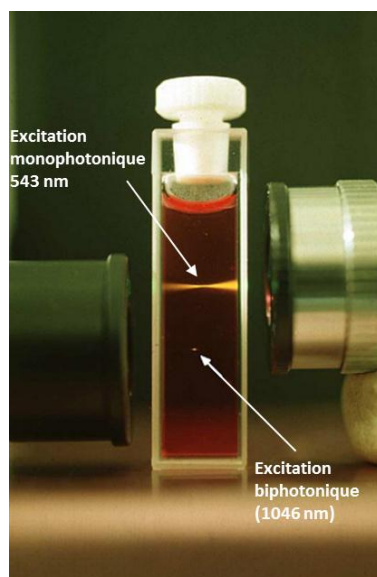


Figure 6. Solution de Safranin O excitée par un laser continu vert (543 nm, excitation monophotonique) et par un laser pulsé infrarouge (1046 nm, excitation biphotonique).

Image adaptée de la réf. [7].

III. Microscopie de fluorescence

Pour les raisons invoquées au paragraphe I.1, et notamment pour sa sensibilité et sa résolution élevée, la fluorescence est devenue une technique incontournable en imagerie cellulaire par microscopie. Plus récemment elle a également été utilisée pour l'imagerie de tissus biologiques ou du petit animal et pour guider des opérations chirurgicales. Si la microscopie de fluorescence permet la détection d'éléments structuraux et de phénomènes dynamiques indiscernables en microscopie optique classique, elle nécessite le marquage préalable de l'échantillon par des colorants fluorescents, même si elle peut également exploiter les propriétés d'autofluorescence de molécules endogènes.

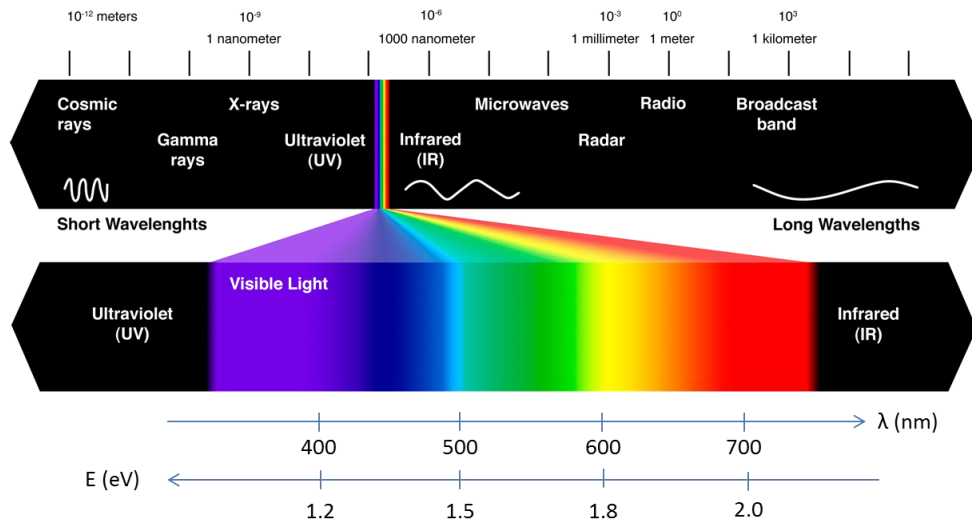


Figure 7. Spectre électromagnétique.

Le paramètre détectable principal est bien sûr l'intensité du signal émis par le fluorophore dans la gamme visible du spectre électromagnétique mais il est également possible de mesurer les temps de vie de fluorescence (*Fluorescence Lifetime Imaging*, FLIM) ou l'anisotropie de fluorescence (non discutée ici). D'autres méthodes d'imagerie existent qui exploitent d'autres régions de longueurs d'ondes (imagerie infrarouge, rayon X, scintigraphie par rayon gamma) (Figure 7), ou bien des émissions de particules comme la TEP (tomographie par émission de positrons). Des techniques non optiques existent aussi, comme la microscopie électronique, ou l'échographie qui exploite les ondes acoustiques.

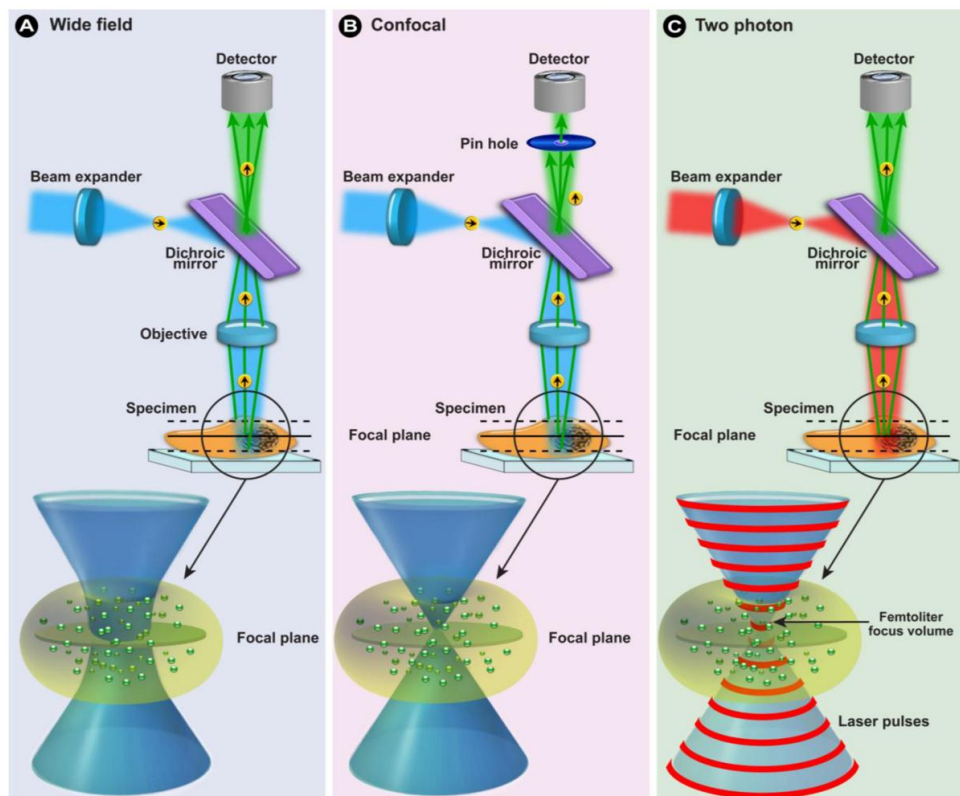


Figure 8. Représentation schématique des microscopes à épifluorescence (wide field, A), confocal (B) et biphotonique (C).
Image tirée de la réf. [1].

Il existe trois techniques de microscopie de fluorescence qui diffèrent par l'instrumentation : la microscopie d'épifluorescence (dite à champ large), la microscopie confocale et la microscopie biphotonique (Figure 8). Des techniques dérivées comme le FLIM peuvent être mises en œuvre à partir des mêmes montages expérimentaux.

1. Microscopie d'épifluorescence

Un montage de microscopie de fluorescence doit permettre de détecter l'émission de fluorescence de l'échantillon en s'affranchissant totalement de la lumière incidente. Le premier microscope développé est le microscope à épifluorescence (Figure 8A). Il est basé sur un miroir dichroïque qui permet d'envoyer la lumière incidente sur l'échantillon et de ne laisser passer dans l'autre sens que la fluorescence émise. La source lumineuse utilisée est une lampe, le plus souvent au mercure, et la longueur d'onde d'excitation souhaitée est sélectionnée à l'aide d'un filtre. L'échantillon est alors éclairé sur une large surface, et le signal émis est également filtré avant d'être envoyé vers un récepteur qui est en général une caméra CCD. Cette technique permet donc de visualiser de vraies couleurs. Le principal défaut de la microscopie d'épifluorescence est que la fluorescence émise en dehors du plan focal va être récoltée également. Même si le bruit de fond peut être partiellement supprimé par un traitement informatique de l'image, l'épifluorescence n'est véritablement résolue qu'à deux dimensions dans le plan xy.

2. Microscopie confocale

La microscopie confocale (Figure 8B) a été mise au point pour contourner la limitation de la microscopie par épifluorescence. Dans ce montage, la source laser est focalisée sur un point et l'image est obtenue en scannant l'échantillon point par point d'où l'appellation *Laser Scanning Confocal Microscopy* (LSCM). Un *pinhole* installé devant le récepteur permet par ailleurs de ne récolter que la lumière émise à partir du plan focal. La microscopie confocale est ainsi résolue dans les trois dimensions de l'espace et permet par des coupes successives de réaliser des reconstructions d'images en 3D. Plus le *pinhole* est fermé, moins la lumière parasite est récoltée, mais l'intensité du signal sera d'autant plus faible. Le détecteur en microscopie confocale est donc un photomultiplicateur qui compte les photons et amplifie le signal. Celui-ci est paramétré pour récolter le signal sur une gamme spectrale définie par l'utilisateur, mais il ne distingue pas les longueurs d'ondes et les images sont codées en niveau de gris ou en fausses couleurs.

3. Microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique a été mise au point par Webb en 1990 [8]. Le dispositif est sensiblement identique au confocal (Figure 8C) et les deux techniques sont réalisées sur les mêmes montages. La microscopie biphotonique utilise une source d'excitation laser infrarouge pulsée qui permet d'exciter l'échantillon à deux photons. Comme nous l'avons vu au paragraphe II.2, le volume d'excitation est alors très faible et l'utilisation d'un *pinhole* n'est plus nécessaire puisque la fluorescence n'est émise qu'au point focal du laser. La microscopie biphotonique permet d'avoir une meilleure résolution en z même sans dispositif confocal mais son

principal intérêt réside dans l'utilisation d'une source infrarouge pour exciter l'échantillon. L'obstacle principal au développement de la microscopie de fluorescence sur l'animal a pendant longtemps été la dispersion de la lumière visible, due à l'absorption et à la diffraction par les tissus biologiques, qui ne permet pas une pénétration suffisante de la lumière incidente dans l'échantillon. Néanmoins si l'on regarde l'absorption des tissus biologiques, il existe entre 700 et 1000 nm une fenêtre de relative transparence et l'utilisation d'une source lumineuse infrarouge permet une excitation en profondeur dans les échantillons (Figure 9) [9].

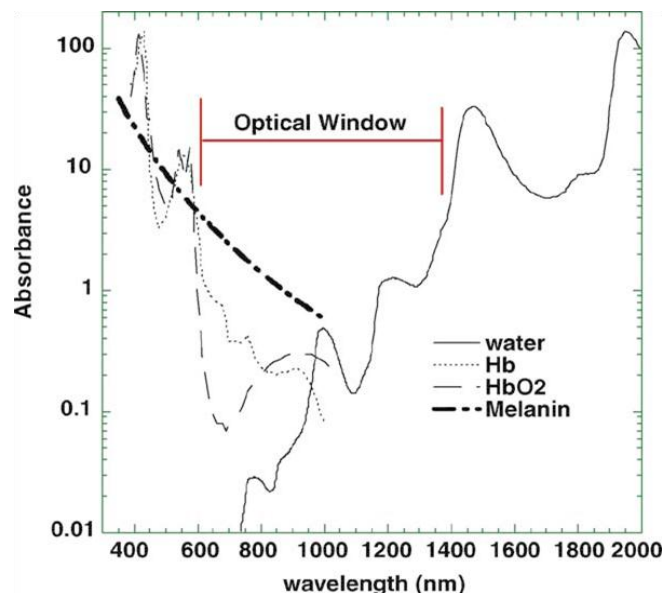


Figure 9. Absorption des tissus biologiques avec la fenêtre de transparence entre 700 et 1400 nm.
Hémoglobine (Hb), oxyhémoglobine (HbO₂), eau (H₂O) et mélanine.

C'est le développement de la microscopie biphotonique qui a permis d'appliquer la microscopie de fluorescence à l'imagerie intravitale² [10].

La microscopie biphotonique présente également l'avantage d'utiliser un rayonnement incident moins énergétique qui cause donc potentiellement moins de dommage à l'échantillon. A l'opposé du spectre visible, la lumière UV est connue pour être très nocive, entraînant notamment des dommages à l'ADN.

La faible probabilité du phénomène d'absorption biphotonique nécessite une très forte puissance laser pour exciter les fluorophores classiques, qui possèdent des sections efficaces d'absorption faibles. Même avec un rayonnement de plus faible énergie, une puissance trop élevée peut causer des dommages thermiques à l'échantillon et il est donc nécessaire de disposer de fluorophores optimisés pour la microscopie biphotonique, c'est-à-dire ayant des sections efficaces d'absorption à deux photons élevées.

4. Résolution

La résolution est la distance minimale entre deux points en deça de laquelle ils ne peuvent plus être distingués. Abbe a observé en 1873 qu'une lumière focalisée donnait, en raison de la diffraction de la lumière, un point flou dont la taille impose une limite de résolution intrinsèque à la microscopie de fluorescence (Figure 10). La résolution latérale dans le plan xy est donnée par l'expression $d = \lambda/2NA$ où λ est la longueur d'onde de

² Microscopie intravitale : microscopie réalisée *in situ* sur le petit animal vivant.

la lumière incidente et NA l'ouverture numérique (*Numeric Aperture*) de l'objectif utilisé. Pour un objectif ayant une ouverture de 1.4 (utilisé dans ces travaux) on obtient donc une résolution de 174 nm pour une excitation à 488 nm et une résolution de 286 nm pour une excitation biphotonique à 800 nm. La microscopie biphotonique présente donc l'avantage d'une excitation localisée et d'une meilleure pénétration dans les tissus mais elle a une résolution inférieure.

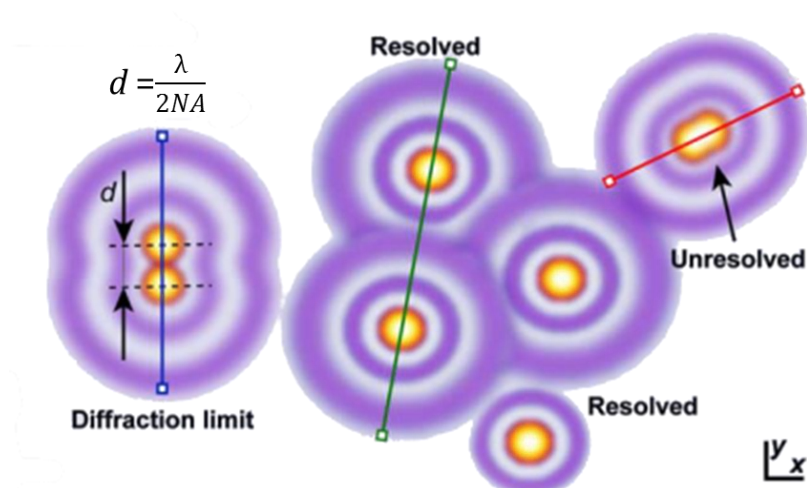


Figure 10. Limite de résolution imposée par la diffraction de la lumière.

Violet : figures de diffraction du faisceau incident (motifs d'Airy). Jaune et rouge : fluorescence.

La microscopie de fluorescence reste une méthode d'imagerie avec une résolution très élevée (Tableau 1). Les microscopies RX et électronique possèdent des résolutions supérieures mais ne sont pas applicables à l'imagerie *in vivo*.

Tableau 1. Résolution de différentes techniques d'imagerie.

TEP : tomographie par émission de positrons, IRM : imagerie par résonance magnétique.

Méthode	d
TEP	1 cm
IRM	100 μm
Fluorescence	200 nm
Microscopie RX	30 nm
Microscopie électronique	0.08 nm

5. Microscopies de super-résolution

Pour augmenter la résolution de la microscopie optique, il est nécessaire de surmonter la barrière de la diffraction de la lumière. Un certain nombre de techniques ont été développées parmi lesquelles le STED (*STimulated Emission Depletion Microscopy*) qui repose sur la modification de la distribution du signal émis par un point (normalement une gaussienne) et le PALM (*PhotoActivated Localization Microscopy*) ou le STORM (*Stochastic Optical Reconsatruction Microscopy*) qui permettent de reconstruire une image précise grâce à la localisation de molécules uniques [11]. Des résolutions de l'ordre de 50 nm ont ainsi pu être atteintes.

a. *STimulated Emission Depletion microscopy (STED)*

La microscopie STED repose sur l'utilisation de deux faisceaux laser incidents, le premier étant un laser classique servant à exciter les fluorophores. La fluorescence sur la région extérieure du disque d'Airy (disque central du motif de diffraction du spot laser, Cf. Figure 10) est ensuite inhibée par un deuxième faisceau en forme d'anneau. Ce deuxième laser sert à provoquer la désexcitation de la molécule par émission stimulée. L'émission stimulée étant émise uniquement dans la direction de la lumière incidente, le signal ainsi émis n'est pas collecté et le volume d'excitation correspond à la soustraction des deux faisceaux avec donc un disque d'Airy plus petit [12] (Figure 11).

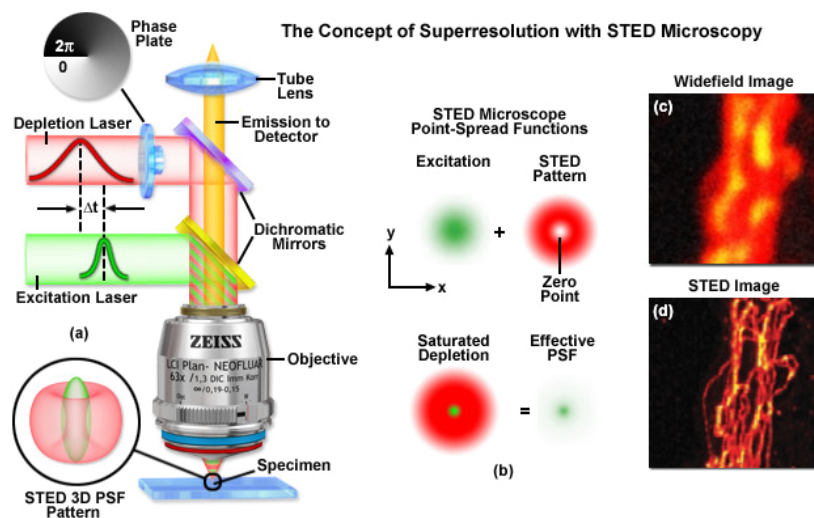


Figure 11. Schéma de principe de la microscopie STED.

PSF : Point-Spread Function, fonction de distribution du signal de fluorescence

Crédit image : Zeiss.

b. *Localisation de fluorophores uniques*

La deuxième famille de techniques permettant d'augmenter la résolution en microscopie (PALM et STORM entre autres) repose sur la localisation de molécules uniques [13]. Ces techniques reposent sur la capacité à éteindre et à allumer de façon séquentielle les fluorophores. En effet, si deux fluorophores très proches émettent en même temps, ils ne pourront pas être distingués en raison de la limite de résolution. En revanche, s'ils sont allumés l'un après l'autre, il sera alors possible de déterminer leurs positions individuelles et de reconstruire une image complète où les deux points sont séparés (Figure 12a).

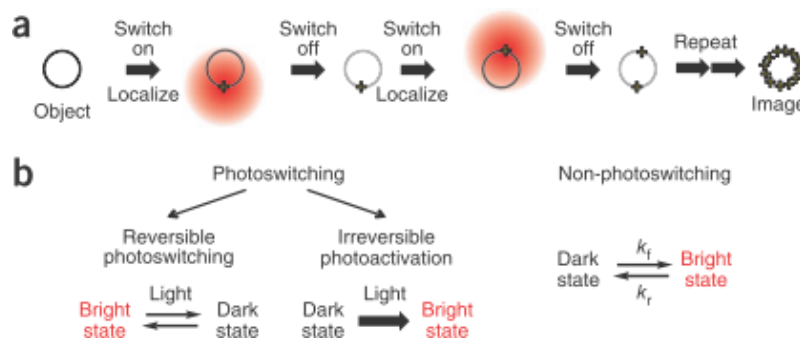


Figure 12. Principe de la microscopie de super résolution par localisation de molécules uniques.

a : allumage séquentiel des fluorophores permettant leur localisation individuelle. b : le passage de l'état allumé (*bright state*) à l'état éteint (*dark state*) peut s'effectuer par photoactivation (*photoswitching*) réversible ou non ou par des méthodes non photophysiques (*non-photoswitching*, interaction non covalente avec un ligand fluorescent, réaction chimique).

Image tirée de la réf. [13].

La commutation des fluorophores entre deux états peut s'effectuer par photoactivation, les états peuvent alors être les niveaux S_0 et S_1 , qui sont les plus évidents ou bien S_0 et T_1 ou encore d'autres états atteints par des réactions à l'état excité (phénomènes d'isomérisation par exemple), qui peuvent être réversibles ou irréversibles [14]. Plus rarement, elle peut s'effectuer par une réaction chimique ou par une interaction non covalente qui active la fluorescence (Figure 12b). L'allumage et l'extinction des fluorophores se fait de manière aléatoire et il faut un grand nombre de cycles pour reconstruire une image, ce qui ralentit l'acquisition.

Les techniques de super résolution reposent sur l'extinction de certains fluorophores que ce soit de façon localisée en STED ou de façon aléatoire pour les techniques de PALM et de STORM. Les propriétés nécessaires des fluorophores pour les microscopies super-résolues ont été amplement étudiées [13,15], et il ressort de ces études que la seule caractéristique véritablement indispensable est la possibilité de détecter les fluorophores individuellement. Les autres paramètres importants sont : la capacité des fluorophores à commuter entre les deux états, le nombre de photons émis pendant un cycle et le nombre de cycles qu'ils peuvent subir. Ils doivent donc être très brillants et photostables.

Conclusion

La microscopie de fluorescence est une technique d'imagerie structurale et fonctionnelle largement employée en biologie qui combine une excellente sensibilité avec une résolution élevée par rapport aux autres techniques d'imagerie mais limitée par la diffraction. L'avènement de l'excitation biphotonique a permis d'étendre la microscopie aux tissus biologiques épais et même au petit animal, ouvrant une nouvelle voie à l'observation de phénomènes dynamiques *in vivo*. Néanmoins la microscopie biphotonique nécessite la mise au point de fluorophores spécifiques présentant des brillances non linéaires (et donc des sections efficaces d'absorption à deux photons) élevées. Des techniques plus récentes développées dans les années 90 permettent également de surmonter la limite de résolution imposée par la diffraction mais nécessitent des fluorophores très brillants. Les propriétés d'absorption non linéaires ne sont pas ici indispensables même si les deux avantages peuvent être combinés comme c'est le cas pour la microscopie STED excitée à deux photons

[16]. Les fluorophores pour être utilisables efficacement en microscopie de fluorescence *in vivo* doivent donc satisfaire un certain nombre de propriétés optiques mais aussi physico-chimiques et biologiques :

- **Hydrosolubilité** : Le premier critère pour une utilisation en milieu physiologique est une bonne solubilité dans l'eau. Les molécules de faibles poids moléculaires et chargées seront donc privilégiées.
- **Toxicité** : le fluorophore doit être peu ou pas toxique pour ne pas perturber le fonctionnement de la cellule marquée pendant la durée de l'observation.
- **Pénétration cellulaire** : il doit pénétrer en cellules vivantes sans perméabilisation de membranes.
- **Brillance ($\epsilon\Phi_F$ ou $\delta\Phi_F$)** : Le coefficient molaire d'absorption (ou la section efficace d'absorption à deux photons) et le rendement quantique doivent être élevés pour assurer une bonne brillance.
- **Photostabilité** : La photostabilité permet une manipulation plus facile des échantillons et l'observation dans le temps de phénomènes dynamiques.
- **Absorption (et émission) dans l'infrarouge** : La fenêtre de transparence des tissus est exploitable par excitation biphotonique mais aussi monophotonique, si les molécules absorbent linéairement dans le rouge ou l'IR. Pour pouvoir récolter le signal de fluorescence qui est aussi soumis à la diffraction et à la diffusion dans les tissus, le fluorophore doit émettre à une longueur d'onde la plus élevée possible.

Tous ces critères représentent le fluorophore idéal et ne sont pas forcément indispensables en fonction de l'utilisation souhaitée mais chaque manquement réduira le champ d'application de la molécule. Nous allons maintenant nous intéresser aux règles d'ingénierie moléculaire pour la mise au point de fluorophores biphotoniques pour l'imagerie *in vivo*.

B. INGENIERIE MOLECULAIRE : DESIGN DE FLUOROPHORES BIPHOTONIQUES

De multiples marqueurs fluorescents existent pour la spectroscopie ou la microscopie de fluorescence [17], certains spécifiques de structures biologiques particulières et d'autres qui nécessitent une vectorisation. Aucune molécule en revanche ne satisfait à tous les critères requis pour la microscopie intravitale. Certains manquements peuvent être compensés par l'intégration des marqueurs dans des systèmes moléculaires plus complexes : l'encapsulation dans des micelles permet le transport de molécules non hydrosolubles et la vectorisation améliore la spécificité des marqueurs et leur pénétration cellulaire. En revanche, la plupart des fluorophores classiques ont une section efficace d'absorption de l'ordre de quelques GM seulement [18,19] et émettent donc faiblement en fluorescence excitée à deux photons. Depuis 20 ans et l'introduction de la microscopie biphotonique, la recherche s'est donc attachée à développer des molécules aux sections efficaces d'absorption optimisées pour le développement de la microscopie sur les tissus biologiques ou l'animal. Marder, Belfield, Blanchard-Desce, Nicoud et Bong Rae Cho entre autres ont, depuis plusieurs années, contribué à alimenter le domaine, nous nous sommes concentré ici sur quelques travaux fondateurs et sur les avancées les plus récentes, mais ne prétendons pas faire une bibliographie exhaustive du sujet.

I. Relation structure activité

De nombreuses études ont été menées sur l'optimisation des propriétés d'absorption non linéaires [6] dont il ressort que les systèmes aromatiques conjugués permettant un transfert de charge durant l'excitation sont de bons absorbeurs à deux photons. Deux modèles structuraux sont en particulier ressortis : les structures quadrupolaire et octupolaire.

1. Structure quadrupolaire

Marder, Perry, Webb *et al.* ont mis en évidence dans l'une des premières études de structure activité sur le sujet que l'introduction de groupements donneurs (D) ou accepteurs (A) sur le *trans*-stilbène augmentait considérablement sa section efficace d'absorption [20]. Après avoir apporté une première optimisation avec le

système D- π -D, ils ont montré que l'ajout de groupements A ou D au milieu de la molécule pour former des systèmes centrosymétriques conjugués de types D- π -A- π -D ou A- π -D- π -A permettait d'optimiser encore la section efficace d'absorption (Figure 13). Des calculs de modélisation ont relié l'augmentation de la section efficace d'absorption à un transfert de charge de la périphérie de la molécule vers son centre ou inversement lors de l'absorption du premier photon qui entraîne une augmentation du moment dipolaire de transition, lui-même corrélé à la section efficace d'absorption.

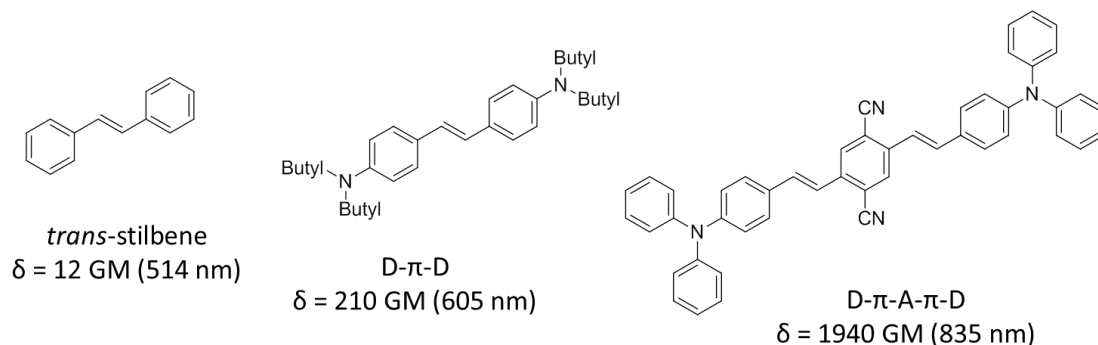


Figure 13. Quelques structures étudiées par Marder, Perry, Webb et al. [20].

Ce modèle de deux dipôles couplés qui forment une structure quadripolaire a servi de modèle à de nombreuses molécules possédant des sections efficaces d'absorption élevées (Figure 14) [6,21,22]. Blanchard-Desce a montré sur des fluorophores basés sur un motif fluorène qu'il était possible de contrôler finement les propriétés de fluorescence excitée à deux photons en jouant sur les groupements donneurs [23]. De manière générale, la section efficace d'absorption augmente avec le caractère donneur ou accepteur des substituants [24]. De même l'extension de la conjugaison du système π permet d'augmenter la section efficace d'absorption [25].

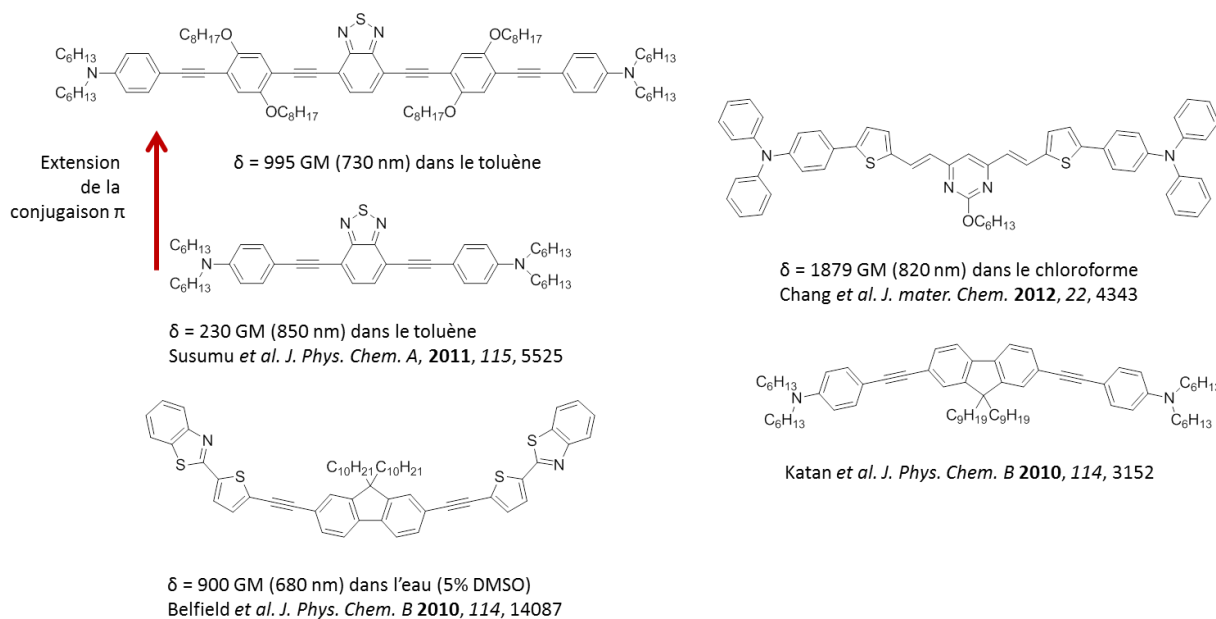


Figure 14. Exemples de chromophores quadripolaires.

2. Structure octupolaire

L'étude des propriétés non linéaires des systèmes octupolaires initiée par Zyss et Ledoux [26] a provoqué un fort intérêt pour la mise au point de fluorophore biphotonique de par la section efficace améliorée qu'elle confère aux molécules par rapport à leurs analogues dipolaire ou quadrupolaire [27]. Les études se sont notamment portées sur les systèmes de symétrie C_3 composés de trois dipôles couplés (Figure 15).

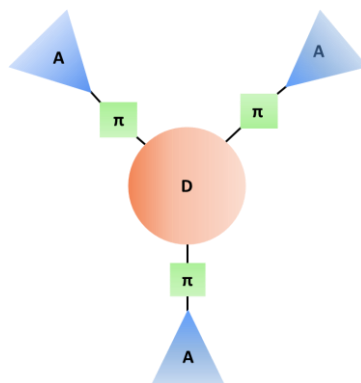


Figure 15. Structure générale d'un système octupolaire de symétrie C_3 .

D : groupement donneur, A : accepteur, π : système électronique π conjugué.

Les sections efficaces d'absorption à deux photons élevées des composés octupolaires de symétrie C_3 ont été attribuées par Prasad à une coopération entre les branches qui augmente l'absorption biphotonique même si les trois branches ne sont pas électroniquement conjuguées : l'absorption à deux photons d'un composé octupolaire est supérieure à trois fois celle de la molécule dipolaire correspondante [28]. Comme pour les quadrupoles, augmenter les caractères attracteur ou donneur des substituants augmente la section efficace d'absorption [29].

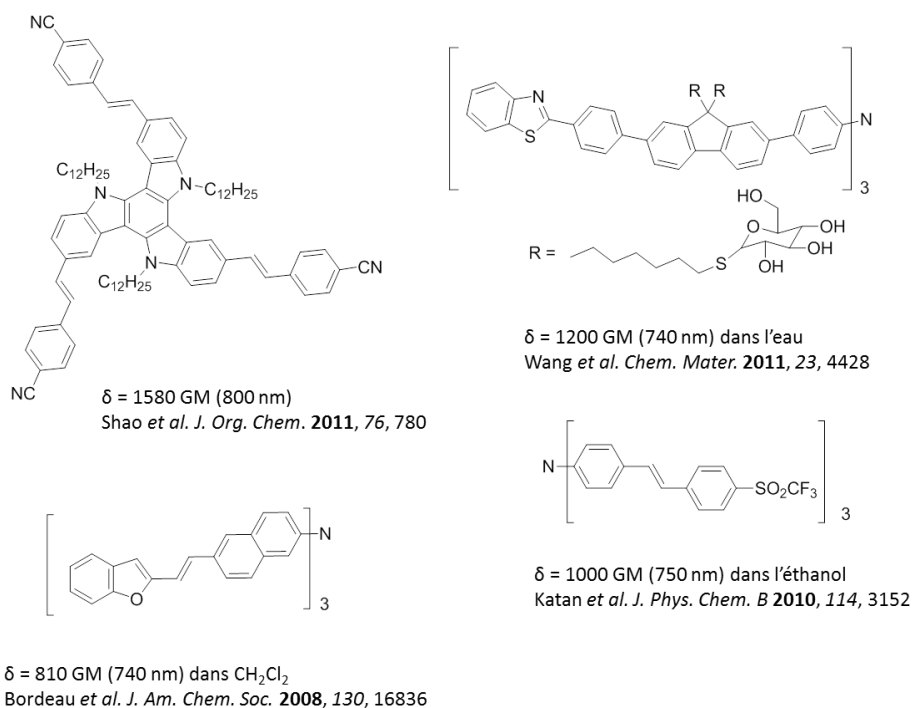


Figure 16. Exemples de chromophores octupolaires.

La triphénylamine (TP) est un motif riche en électron de symétrie C_3 et a donc été fréquemment utilisée comme cœur donneur pour la construction de composés octupolaires. Blanchard-Desce *et al.* ont notamment étudié les propriétés photophysiques de tels composés de façon approfondie [27,30] (Figure 16). Plus récemment, Wang *et al.* ont publié une TP octupolaire glycosilée pour l'imagerie biphotonique avec une section efficace de 1200 GM dans l'eau (Figure 16). Comme pour les composés quadrupolaires la modification des groupements attracteurs branchés sur le cœur triphénylamine permet de contrôler les propriétés de fluorescence excitée à deux photons [23]. L'augmentation du caractère donneur du cœur améliore la section efficace des composés et d'autres cœurs ont donc été utilisés, comme des trinaphtylamines [31] ou des triazatruxènes [32] (Figure 16) même si cette stratégie est plus complexe synthétiquement que la modification des groupements attracteurs branchés sur le cœur TP.

II. Sondes fluorescentes biphotoniques utilisées en microscopie

Quel que soit le modèle retenu, les règles pour augmenter la section efficace d'un composé sont les mêmes :

- **Augmentation du transfert de charge** lors de l'excitation par l'introduction de groupements conjugués aux caractères donneur ou accepteur les plus élevés possibles.
- **Extension du système π .**

Ces règles a priori simples sont cependant contraignantes dès lors que l'on cherche à développer des marqueurs pour l'imagerie *in vivo* car elles mènent en général à des structures aromatiques étendues peu solubles en milieu aqueux. En synthétisant des dendrimères, il est même possible d'obtenir des molécules avec des sections efficaces de plusieurs milliers de GM [33], mais une telle stratégie est difficilement applicable pour des molécules à visée biologique, même s'il existe des méthodes comme l'encapsulation dans des micelles [34,35] ou des nanoparticules pour contourner ces limitations. L'équipe de Kevin Belfield a par exemple récemment mis au point des nanoparticules de silice fonctionnalisée par l'acide folique et encapsulant une sonde fluorescente infrarouge excitable à deux photons insoluble dans l'eau pour l'imagerie ciblée de cellules cancéreuses [36]. Un autre système plus simple composé d'une sonde de type squaraine encapsulée dans des micelles a été utilisé en imagerie biphotonique [37] (Figure 17). L'intégration des sondes biphotoniques dans ces systèmes si elle permet de les solubiliser n'est pas sans conséquence sur leur propriétés optiques. Ainsi la sonde squaraine développée par Belfield a une section efficace étonnamment élevée de 20 000 GM à 800 nm dans le DMSO mais son rendement quantique chute drastiquement lorsqu'elle est incorporée dans une micelle, passant de 0.11 dans le DMSO à 0.005, ce qui donne finalement une brillance moyenne de 100 GM, à supposer que la section efficace d'absorption à deux photons ne soit pas également modifiée dans la micelle.

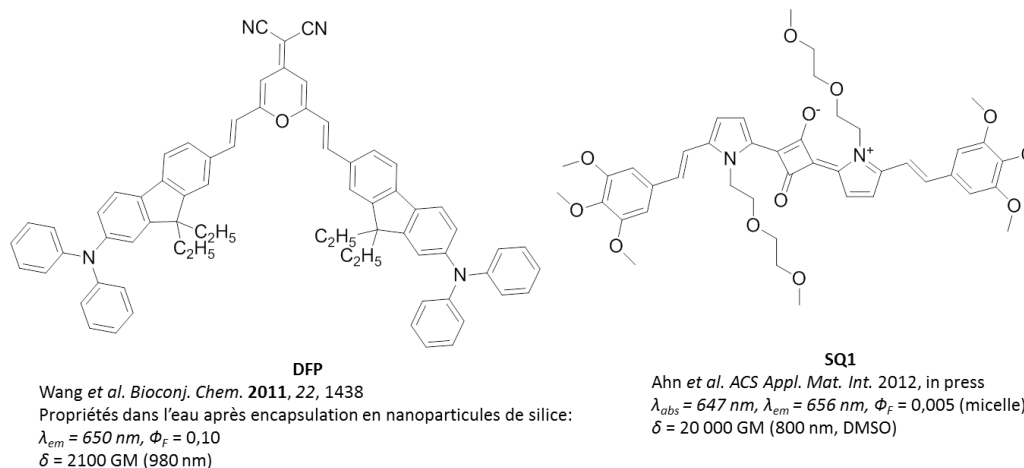


Figure 17. Sondes fluorescentes développées par K. Belfield et intégrées dans des micelles ou des nanoparticules.

De petites molécules organiques hydrosolubles et donc utilisable en l'état ont cependant été développées. L'équipe de Bong-Rae Cho a notamment mis au point un grand nombre de sondes pour l'imagerie biphotonique (Figure 18) parmi lesquelles on peut citer un marqueur de mitochondries basé sur un motif naphthyl-benzothiazole avec une brillance $\delta\Phi_F$ de 80 GM. Cette sonde permet par réaction intracellulaire de détecter soit les thiols [38] soit H_2O_2 [39] en fonction de sa fonctionnalisation et a permis d'imager des tissus à 190 μM de profondeur. Ils ont également développé deux marqueurs de lysosomes CLT-blue et CLT-yellow émettant dans le bleu et le jaune avec des brillances biphotoniques de 50 GM environ. B. R. Cho s'est également beaucoup intéressé aux marqueurs d'ions métalliques biphotoniques, qui consistent en général à allier une partie chélatante à une partie chromophore excitable à deux photons [40].

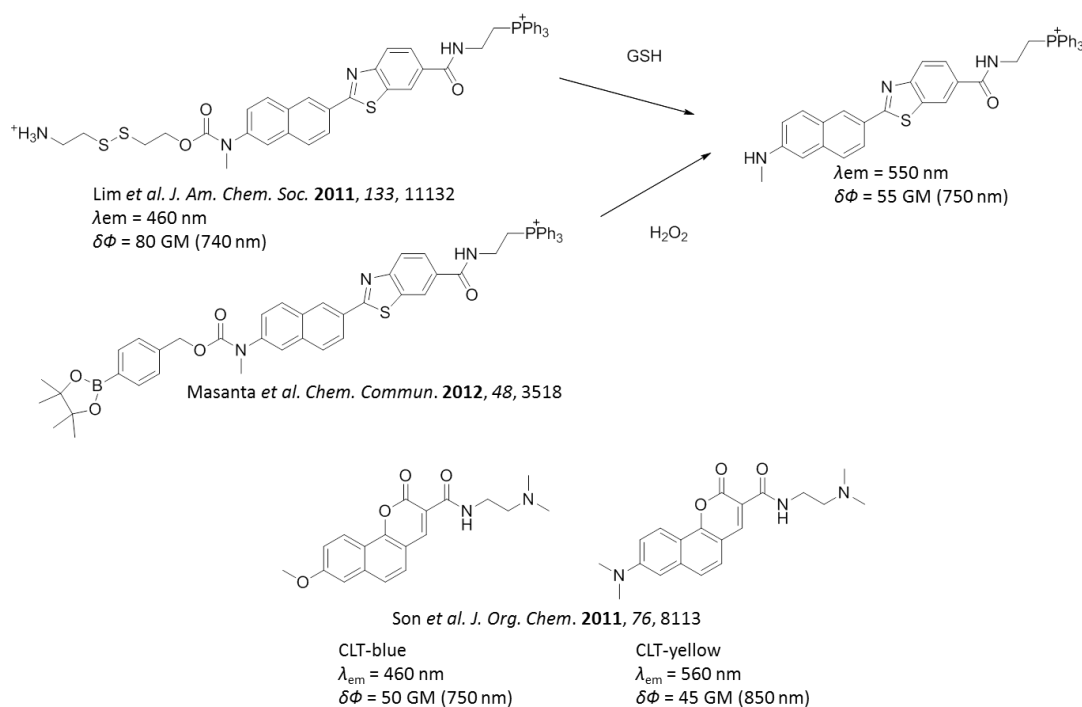


Figure 18. Exemple de biomarqueurs biphotoniques développés par l'équipe de Bong Rae Cho.

Kevin Belfield a également fortement contribué au domaine avec ses travaux sur les dérivés de fluorène. Ces composés neutres ont pu être rendus solubles par addition de chaînes hydrophiles [41]. Il a ainsi développé un fluorène portant une chaîne polyéthylène glycol et une fonction réactive des amines (NHS-ester) ou des thiols (thioesters) pour la conjugaison avec des biomolécules [42]. Ce composé de structure quadrupolaire présente une section efficace d'absorption élevée de l'ordre de 1000 GM à 740 nm. Il a également décrit un fluorène conjugué à un anticorps pour cibler avec succès les cellules exprimant le récepteur VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor*) [43] (Figure 19).

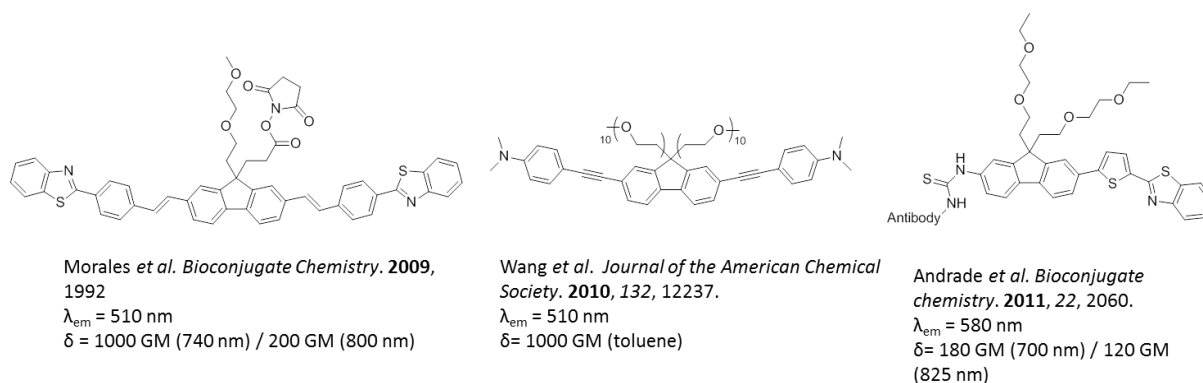


Figure 19. Exemples de marqueurs biphotoniques développés par K. Belfield et son équipe.

Ce dernier exemple illustre bien les règles de relation structure-activité décrites plus haut. Les fluorènes quadrupolaires présentent des sections efficaces d'absorption de 1000 GM parmi les plus élevées pour des composés de cette taille alors que le fluorène dipolaire conjugué à un anticorps a une absorption non linéaire beaucoup plus faible de l'ordre de 100 à 200 GM.

Une molécule quadrupolaire composée d'un cœur central accepteur quinolininium et de branches donneuses méthoxybenzyles conjuguées par un pont vinylique avec une section efficace d'absorption élevée de 1140 GM a également été décrite récemment (Figure 20). Cette molécule marque l'ADN en cuve mais est localisée en cellules dans les mitochondries.

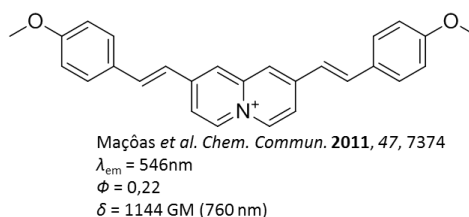


Figure 20. Marqueur biphotonique de mitochondrie.

D'autres marqueurs utilisés en microscopie biphotoniques plus spécifiquement pour le marquage d'ADN ou de protéines seront évoqués au chapitre suivant.

III. Complexes métalliques et lanthanides

Les propriétés photophysiques des complexes organométalliques permettent des applications variées en photovoltaïque par exemple mais aussi comme sondes luminescentes en microscopie [44,45]. L'une des

caractéristiques des complexes organométalliques est leur capacité à passer dans un état triplet par couplage spin-orbite malgré les règles de sélection et donc à émettre par phosphorescence ou fluorescence retardée. Les propriétés des complexes de lanthanides sont particulièrement intéressantes pour la fluorescence résolue en temps ou le FLIM car leur temps de vie peut atteindre une milliseconde [46,47]. Ceci permet de s'affranchir totalement de l'autofluorescence des composés endogènes des cellules qui ont des temps de vie faibles.

Des complexes métalliques pour la microscopie biphotonique ont également été mis au point. On trouve par exemple un complexe d'iridium phosphorescent avec une section efficace de 350 GM à 750 nm qui marque l'appareil de Golgi [48] et un complexe de zinc avec une section efficace de 200 GM à 840 nm qui marque différentes organelles [49]. On peut également citer des complexes de ruthénium aux propriétés d'absorption biphotonique utilisés en PDT excitée à deux photons [50] et en limitation optique non linéaire [51]. Chantale Andraud et son équipe ont développé un complexe d'Europium possédant une section efficace de 100 GM en l'associant à un ligand absorbant à deux photons, qui par effet d'antenne augmente l'absorption non linéaire du complexe [52]. Sur le même principe, un autre complexe d'Europium a été développé pour la microscopie excitée à deux photons [53].

Conclusion

Malgré l'abondance d'études sur le sujet et des résultats préliminaires de microscopie encourageants, la difficulté de combiner propriétés optiques et biologiques n'a pas réellement permis qu'une sonde biphotonique soit utilisée en imagerie biphotonique médicale et les catalogues de fournisseurs comme Invitrogen (ex-Molecular Probes) ne proposent pour la microscopie biphotonique que des fluorophores peu optimisés ($\delta\Phi_F = 180$ GM au mieux). En pratique, la microscopie intravitale excitée à deux photons utilise le plus souvent les fluorophores endogènes dans les tissus pigmentés [10,54] ou bien des rapporteurs fluorescents génétiquement encodés [55], qui ont dans les deux cas des sections efficaces d'absorption faibles. Ils restent donc de nombreux progrès à faire dans le design de sondes fluorescentes biphotoniques répondant aux cahiers des charges de la microscopie intravitale.

C. METHODES SPECTROSCOPIQUES POUR L'ANALYSE DES INTERACTIONS ADN-LIGAND

De nombreuses techniques existent pour l'étude des interactions non covalentes entre un ligand et l'ADN : des techniques d'analyse de chimie classique comme la spectrométrie de masse ou la RMN et des techniques biophysiques comme la calorimétrie, la dialyse et les spectroscopies optiques (absorption UV-Visible, fluorescence et dichroïsme circulaire). Il est ainsi possible de déterminer la stœchiométrie et la constante de formation du complexe ligand-ADN, voire parfois aussi d'étudier des phénomènes cinétiques ou d'obtenir des informations structurales sur le mode d'interaction. La calorimétrie permet également d'obtenir des informations thermodynamiques plus précises, donnant accès aux valeurs d'enthalpie et d'entropie. Le choix d'une méthode va dépendre des propriétés physico-chimiques du ligand et de son affinité pour l'ADN (Cf. chapitre 1 partie 1 sur le calcul des constantes d'affinité). En effet la concentration de travail doit être de l'ordre de la constante de dissociation du complexe étudié. Plus la constante d'affinité est élevée, plus l'étude nécessitera une technique sensible.

I. Absorption UV-Vis et fluorescence

Nos travaux portant sur des ligands fluorescents, l'utilisation des spectroscopies d'absorption et de fluorescence s'est imposée pour l'étude des interactions de nos composés avec l'ADN. Ces techniques présentent deux avantages essentiels sur les autres techniques qui sont la sensibilité et la rapidité de mise en œuvre. Elles ne nécessitent que peu de matière et des équipements couramment disponibles dans les laboratoires. Nous les avons complétées par des mesures de dichroïsme circulaire pour obtenir des informations structurales sur le complexe et déterminer le mode de liaison des composés à l'ADN.

L'absorption et surtout la fluorescence sont sensibles à l'environnement et l'évolution des signaux en l'absence et en présence d'ADN renseigne sur le complexe formé, permettant de mesurer constante d'affinité et stœchiométrie. Pour des composés fortement fluorescents, les mesures de fluorescence se font typiquement à 1 μM environ contre 5 à 10 μM pour l'absorption UV-Vis, nous avons donc utilisé la titration fluorimétrique comme mode de mesure des constantes d'affinités car elle utilise moins de matière et les

variations de signal sont en général plus importantes et donc la mesure plus précise. La fluorescence est néanmoins sensible à de nombreux paramètres (polarité, concentration, pH) qui peuvent gêner les mesures. Ces dernières ont donc été complétées par des mesures de dénaturation thermique de l'ADN suivie par UV (*UV-melting*).

1. UV-melting

L'*UV-melting* est une technique alternative non quantitative de mesure d'affinités. Lors de la dénaturation thermique d'un oligonucléotide, le désempilement des bases de l'ADN entraîne un hyperchromisme important qui peut être suivi par spectroscopie UV. La courbe dite de melting obtenue permet par dérivation de mesurer au point d'inflexion de la courbe une température de fusion T_m . Lors de l'ajout d'un ligand, l'oligonucléotide est stabilisé et la température de fusion est augmentée en corrélation avec l'affinité du ligand (Figure 21). Cette technique ne permet pas de mesurer une constante d'affinité mais elle permet de mesurer qualitativement les affinités relatives d'une série de ligands. L'affinité est exprimée en différence de température de demi-fusion, ΔT_m . Les variations sont souvent assez faibles et ne permettent pas toujours une mesure précise. Cette technique présente aussi l'inconvénient de ne pas être isotherme et l'affinité, reliée à l'enthalpie libre par la formule $\Delta G = -RT \ln(K)$, est dépendante de la température.

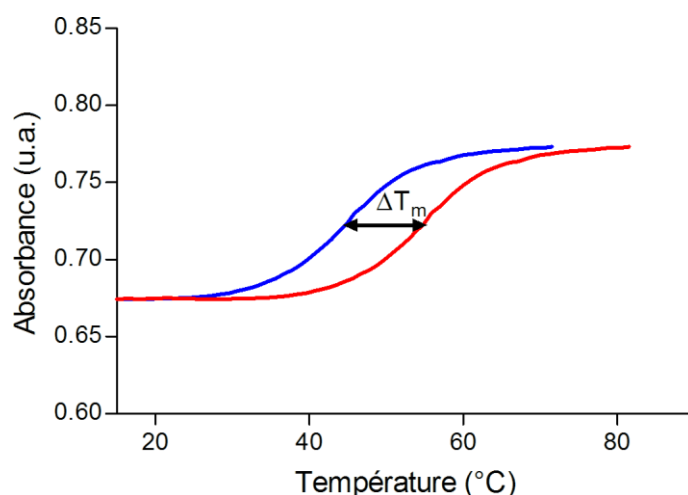


Figure 21. Exemple général de courbes d'UV-melting pour un ADN seul (courbe bleue) et en présence d'un ligand (courbe rouge).

Suivi de l'absorbance à 260 nm en fonction de la température.

2. Titration fluorimétrique

Lors d'une titration fluorimétrique, l'un des partenaires (ADN ou ligand) est maintenu à concentration constante, et la variation du signal de fluorescence est mesurée lorsque le deuxième est ajouté. En pratique "l'hôte" et "l'invité" sont interchangeables, et nous avons choisi de travailler à concentration constante en fluorophore pour mieux mettre en évidence la variation de son signal de fluorescence lors de l'ajout d'ADN. La courbe de titration fluorimétrique est obtenue en traçant l'évolution de la fluorescence F/F_0 en fonction de la concentration ajoutée d'ADN, où F est la fluorescence du complexe intégrée sur le spectre de longueur d'onde

et F_0 la fluorescence initiale du ligand libre intégrée. La modélisation de cette courbe par un modèle mathématique approprié permet de déterminer la stœchiométrie et la constante de dissociation du complexe.

II. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) consiste à mesurer l'absorption différentielle entre une lumière polarisée circulairement à gauche et à droite par un composé chiral optiquement actif. Lorsqu'une lumière polarisée circulairement traverse un milieu chiral, les lumières polarisées droite et gauche sont absorbées différemment et c'est cette différence d'absorption en fonction de la longueur d'onde qui constitue le spectre de CD (Figure 22).

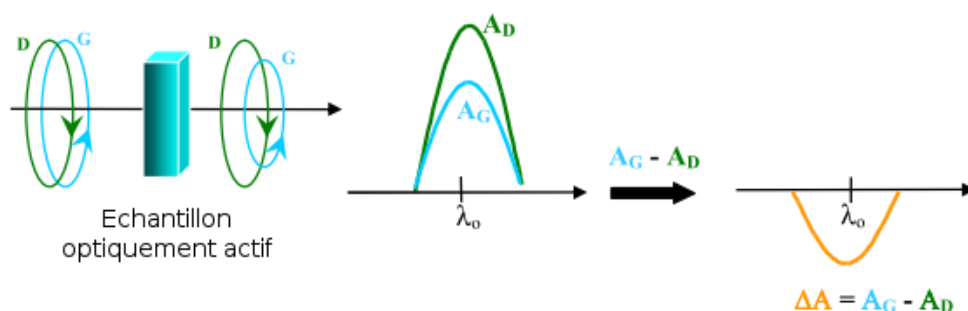


Figure 22. Principe du dichroïsme circulaire.

Différence d'absorption (ΔA) entre les lumières polarisées droite (A_D) et gauche (A_G).

Cette technique est couramment utilisée pour l'étude de la structure des protéines ou de l'ADN : leurs structures secondaires (hélices α ou feuillets β pour les protéines, duplex ou quadruplex pour l'ADN) forment en effet des édifices chiraux qui donneront chacun un signal de CD caractéristique [56] (Figure 23).

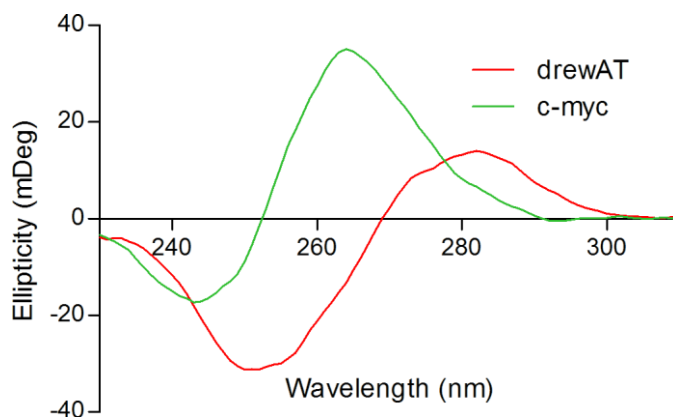


Figure 23. Spectres de dichroïsme circulaire d'une structure duplex (drewAT) et d'une séquence quadruplex (c-myc).

Pour les séquences, se référer à la partie expérimentale.

Le dichroïsme peut également être employé pour étudier les interactions non covalentes avec un ligand achiral. Ce dernier ne donnera *a priori* pas de signal de CD mais lors de l'interaction avec l'ADN, le ligand va former un complexe chiral avec l'ADN et un signal de dichroïsme circulaire dit « induit » (ICD) va apparaître dans la zone d'absorption du ligand, résultant du couplage entre les moments de transition électroniques de la molécule et des bases de l'ADN. La variation du signal de CD induit peut être utilisée pour mesurer des constantes d'affinité mais cette technique est beaucoup moins sensible et précise que la fluorescence [57]. Par

contre, le signal d'ICD dépend de l'orientation du moment de transition de la molécule par rapport aux bases de l'ADN et donne donc des informations précieuses sur le mode de liaison du ligand à l'ADN [58].

Nous disposons donc de deux techniques spectroscopiques (absorbance et fluorescence) permettant à la fois de mesurer les propriétés optiques de nos fluorophores et d'étudier leur interaction avec l'ADN et d'une technique supplémentaires, le CD pour mettre en évidence le mode de liaison à l'ADN (Chapitre 1.1). Nous avons également appliqué ces techniques à l'étude de l'interaction de ligands avec l'albumine (Chapitre 1.2).

D. HISTORIQUE DES TRAVAUX DU LABORATOIRE

Ce sujet a déjà fait l'objet de deux thèses en chimie, au Collège de France puis à l'institut Curie, consacrées à l'ingénierie des marqueurs fluorescents biphotoniques [59,60] et d'une thèse en physique en collaboration avec le CEA centrée sur l'étude et la mesure des propriétés optiques non linéaires [61]. Ces travaux sont résumés brièvement ici pour poser les bases qui sous-tendent cette thèse mais pour des raisons de clarté les propriétés des composés seront reprises en détails dans ce manuscrit avec les nouvelles études qui auront été effectuées.

I. Première génération de marqueurs : TP-Py

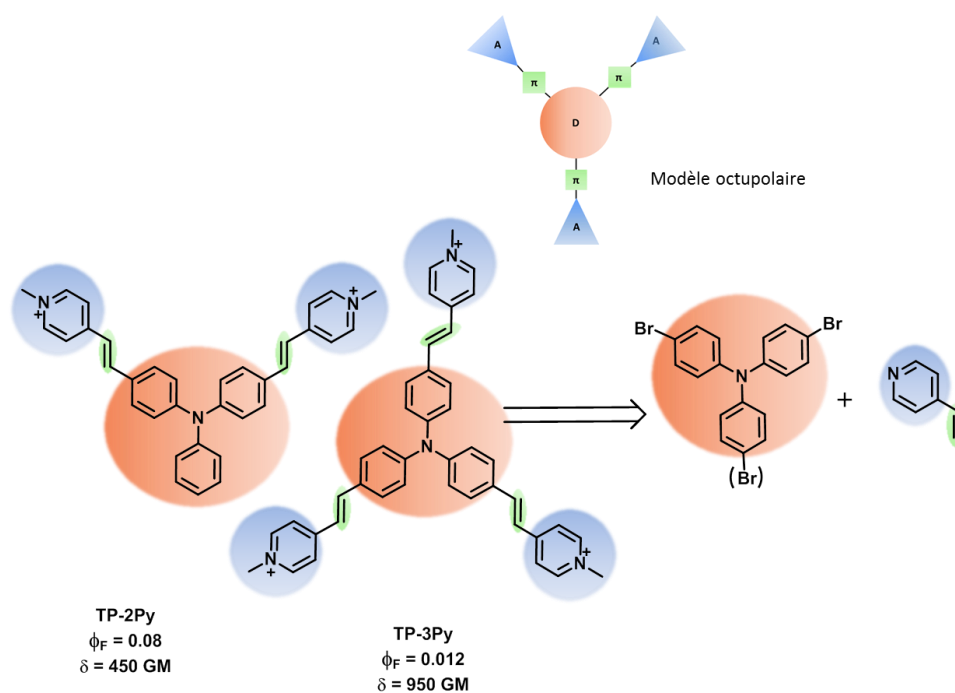


Figure 24. Structure et propriétés de la TP-2Py et la TP-3Py.

Φ_F (rendement quantique de fluorescence) et δ (section efficace d'absorption) mesurés en présence de 30 équivalents en paires de bases d'ADN de hareng (tampon cacodylate de sodium 10 mM, pH 7.2, 100 mM NaCl).

A l'origine du projet, une première génération de marqueurs biphotoniques, basée sur un noyau donneur vinyltriphénylamine et des accepteurs pyridinium a été mise au point lors de la thèse de Clémence Allain. Un composé à trois branches, la **TP-3Py**, respectant le modèle octupolaire décrit précédemment ainsi que ses analogues à une et deux branches les **TP-1Py** (non montrée ici) et **TP-2Py**, ont été synthétisés par réaction de Heck entre la bromotriphénylamine correspondante et la 4-vinylpyridine (Figure 24) [62]. Ces composés cationiques de faible poids moléculaire ($<1000 \text{ g.mol}^{-1}$) sont solubles dans l'eau, forment des systèmes électroniques de type « *push-pull* » et respectent donc les premiers critères essentiels pour former des sondes fluorescentes biphotoniques. En accord avec la théorie, la **TP-3Py** s'est révélée un très bon absorbeur à deux photons au regard de son faible poids moléculaire, et la section efficace des molécules de la série baisse avec le nombre de branche passant de 780 GM pour la **TP-3Py** octupolaire dans le glycérol à 390 GM pour la **TP-2Py** dont la structure en V formée par les deux dipôles non conjugués est proche de celle d'un quadrupôle [27]. La **TP-1Py** de structure dipolaire ne montre pas de propriété d'absorption non linéaire remarquable.

Les molécules absorbent vers 500 nm et sont fluorescentes dans le rouge (ca. 650 nm) avec des rendements quantiques d'environ 10%. Parmi les propriétés caractéristiques de ces composés, des spectres d'absorption et d'émission larges ainsi que des déplacements de Stokes élevés ($> 100 \text{ nm}$) se retrouveront dans tous les analogues développés par la suite. Dans l'eau ou le méthanol en revanche seul un signal de fluorescence résiduel très faible est mesuré. En présence d'ADN duplex, la fluorescence est restaurée avec des facteurs d'exaltation (rapport entre la fluorescence à l'état libre et la fluorescence en présence d'ADN) d'environ 20 et des rendements quantiques dans l'ADN de hareng de 0.08 et 0.012 pour la **TP-2Py** et la **TP-3Py** respectivement (Figure 25). Cette restauration de fluorescence est la preuve d'une interaction avec le biopolymère pour les composés à deux et trois branches, la **TP-1Py** en revanche reste très peu fluorescente dans l'ADN. Les propriétés d'absorption biphotonique sont conservées dans l'ADN avec même des sections efficaces légèrement supérieures à celles mesurées dans le glycérol, atteignant 950 GM pour la **TP-3Py** (Figure 24 et Tableau récapitulatif). En outre, les **TP-Py** se sont révélées sélectives de l'ADN-B duplex et la restauration de la fluorescence n'a pas pu être observée dans d'autres formes d'acides nucléiques (ADN simple brin, quadruplexe, ARN), ou alors de façon bien moins importante.

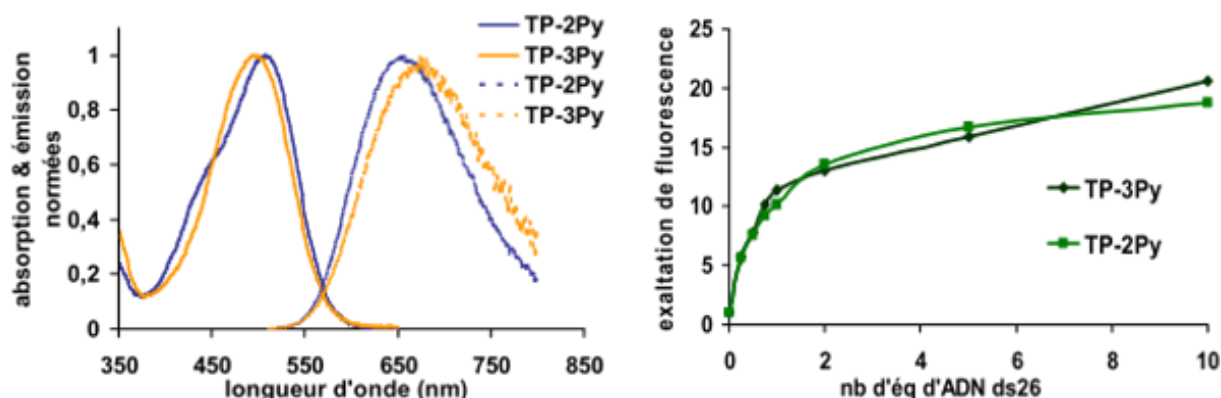


Figure 25. Gauche : Absorption et émission de la TP-2Py et la TP-3Py normée en présence d'un oligomère duplex d'ADN ds26 : d(CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG)₂

Droite : Exaltation de fluorescence des TP-Py (1 μM) en fonction de la quantité de ds26 ajoutée (tampon cacodylate de sodium 10 mM pH 7.2, 100 mM NaCl).

Thèse Guillaume Bordeaux.

Les **TP-Py** sont donc la première génération de fluorophores marquant sélectivement l'ADN duplex et possédant des sections efficaces d'absorption à deux photons optimisées du fait de leurs structures octupolaire ou à caractère quadrupolaire. La fluorescence des **TP-Py** est sensible à la viscosité et à la polarité du solvant : elles ne sont pas fluorescentes dans l'eau ou le méthanol alors que dans le glycérol ou dans une matrice biopolymère telle que l'ADN elles émettent dans le rouge. On parlera donc de ligands d'ADN fluorescents commutables. Les rendements quantiques des TP-Py étant assez modestes dans l'ADN, des modifications structurales ont été réalisées pour optimiser leurs propriétés optiques. Cette optimisation a été l'objet de la thèse de Guillaume Bordeaux qui a modifié séquentiellement les paramètres clés des triphénylamines :

- Cœur donneur : N-phénylcarbazole et trinaphtyle
- Accepteurs : *ortho*-pyridinium et benzimidazolium

II. Deuxième génération de marqueurs : cœur N-phénylcarbazole

Par analogie avec le glycérol, la restauration de la fluorescence des **TP-Py** dans l'ADN a été attribuée dans un premier temps à l'inhibition des phénomènes de désexcitation non radiatifs par le blocage des mouvements de rotation et de vibration moléculaire dans la matrice polymère. Pour cette raison, la première modification envisagée pour améliorer leur rendement quantique a été de rigidifier le cœur triphénylamine en le remplaçant par un cœur N-phénylcarbazole. Deux analogues des **TP-Py**, le **Cbz-2Py** et le **Cbz-3Py** ont ainsi été obtenus selon la même stratégie de synthèse, par réaction de Heck (Figure 26). Le comportement de ces marqueurs est similaire à celui des TP : ils ne fluorescent qu'en présence d'ADN ou dans le glycérol. Le cœur carbazole joue le rôle attendu en augmentant fortement le rendement quantique fluorescence qui passe de 0.08 pour la **TP-2Py** à 0.58 pour le **Cbz-2Py**. En revanche le **Cbz-3Py** a un rendement quantique de seulement 0.03 contre 0.012 pour la TP-3Py. Il apparaît ici un premier signe de l'influence marquée du nombre de branches sur les propriétés des marqueurs. Il est également à noter que bien que difficilement quantifiable, la fluorescence résiduelle dans l'eau des dérivés **Cbz** est plus importante que celle des **TP**.

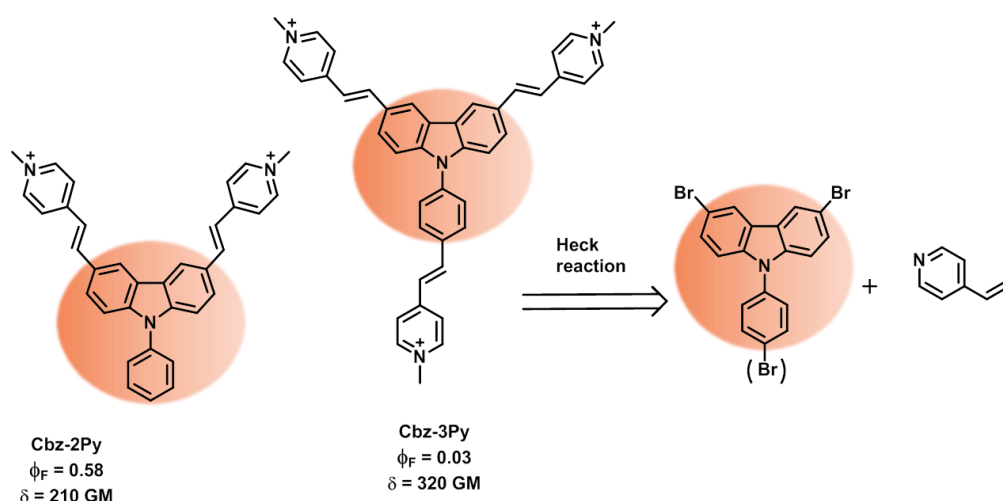


Figure 26. Structure et propriétés des Cbz-2Py et Cbz-3Py.

ϕ_F (rendement quantique de fluorescence) et δ (section efficace d'absorption) mesurés en présence de 30 équivalents en paires de bases d'ADN de hareng (tampon cacodylate de sodium 10 mM, pH 7.2, 100 mM NaCl).

Si le cœur N-phénylcarbazole a permis d'augmenter fortement le rendement quantique de fluorescence, il a en revanche entraîné une chute assez importante des sections efficaces d'absorption à deux photons. Dans l'ADN, ces dernières passent de 450 et 940 GM pour les **TP-2Py** et **TP-3Py** à 210 et 320 GM pour les **Cbz-2Py** et **Cbz-3Py** respectivement. Le remplacement du cœur TP par un cœur trinaphtyle (TN) pour augmenter son caractère donneur a permis d'améliorer fortement les sections efficaces d'absorption mais toute affinité pour l'ADN est alors perdue sans doute à cause de l'encombrement stérique dû à la taille plus importante du cœur TN [31]. La modification des accepteurs a donc ensuite été envisagée pour tenter d'optimiser le rendement quantique sans nuire ni aux propriétés d'absorption non linéaire ni à l'interaction avec l'ADN.

III. Troisième génération de marqueurs : TP-Pyo et TP-Bzim

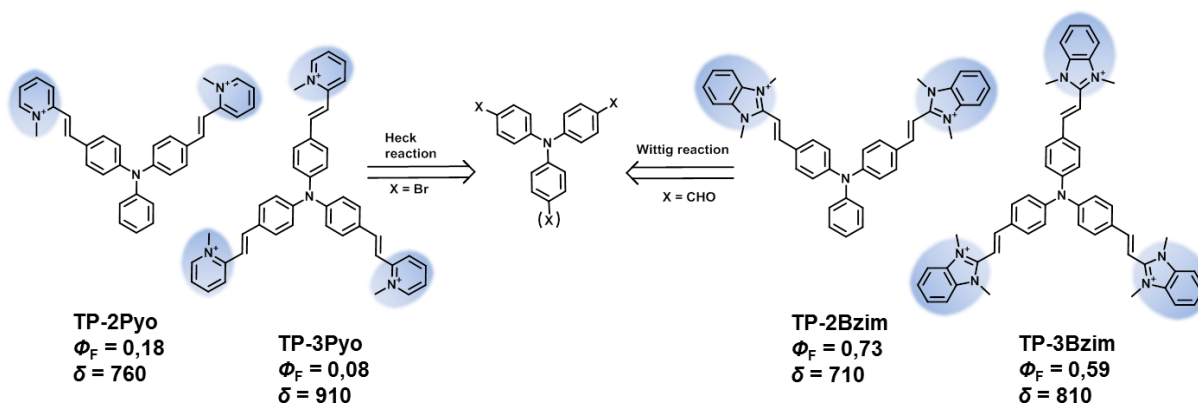


Figure 27. Structure et propriétés des TP-Pyo et TP-Bzim.

Φ_F (rendement quantique de fluorescence) et δ (section efficace d'absorption) mesurés en présence de 30 équivalents en paires de bases d'ADN de hareng (tampon cacodylate de sodium 10 mM, pH 7.2, 100 mM NaCl).

A la place des pyridines, des ortho-pyridines ont été introduites par réaction de Heck et des Benzimidazole par réaction de Wittig, permettant ainsi d'obtenir, après méthylation des azotes, une troisième génération de marqueurs composées de quatre composés à deux et trois branches (Figure 27). Ces derniers présentent bien des propriétés de fluorescence commutable dans l'ADN avec des rendements quantiques supérieurs à ceux des **TP-Py** tout en conservant la capacité d'absorption à deux photons, celle-ci étant même améliorée dans le cas des composés à deux branches (Figure 27 et Tableau récapitulatif).

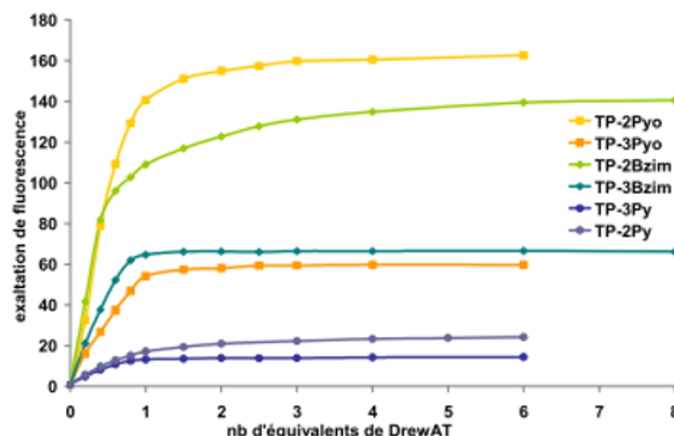


Figure 28. Titration fluorimétrique des analogues des TP-Py par l'oligonucléotide duplex drewAT : d(CGCGAAATTCGCG)₂.

[TP] = 1 μ M dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (CacoNa 10 mM, NaCl 100 mM).

Thèse Guillaume Bordeaux.

La mesure des exaltations de fluorescence F/F_0 dans un oligonucléotide duplex d(CGCGAAATTCGCG)₂ dérivé du dodécamère de Drew-Dickerson (structure PDB 2BNA) et appelé drewAT a également mis en évidence une forte optimisation des propriétés avec des valeurs atteignant jusque 160 pour la **TP-2Py** contre 15 à 20 pour les **TP-Py** (Figure 28).

IV. Interaction avec l'ADN et mode de liaison

L'étude des propriétés de fluorescence des trois générations de composés dans différentes formes d'acides nucléiques a permis de mettre en évidence une fixation spécifique des composés à deux branches sur l'ADN duplex. En particulier, des titrations dans le poly(dG.dC)₂ et le poly(dA.dT)₂ ont montrées une préférence marquée pour les séquences AT. A l'inverse, les dérivés à trois branches ne présentent pas de spécificité d'interaction particulière en cuve. Cette sélectivité, estimée à partir des exaltations de fluorescence n'est qu'une sélectivité optique puisque une interaction sans exaltation de fluorescence est toujours envisageable. L'affinité envers le drewAT a été estimée autour de 10^6 M^{-1} par titration fluorimétrique. Cependant, pour les composés les plus affins, notamment le **Cbz-2Py** et les **TP-2Bzim**, celle-ci n'a pas pu être mesurée précisément.

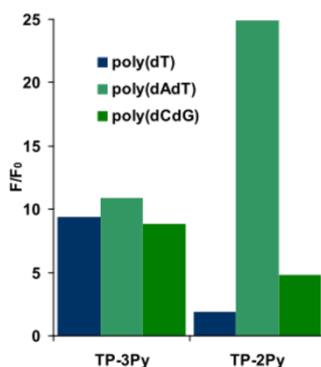


Figure 29. Exaltation de fluorescence des TP-Py (1 μM) mesurées à 50 équivalents en paires de base de polynucléotides
 Tampon cacodylate de sodium 10 mM, pH 7.2, NaCl 100 mM.
 Thèse Guillaume Bordeaux

Considérant la forme de nos ligands et la préférence marquée des dérivés dicationiques pour les zones riches en AT, nous avons émis l'hypothèse que l'interaction de ces marqueurs avec l'ADN s'effectue par insertion du motif en V formé par deux branches des composés dans le petit sillon de la forme ADN-B. Cette hypothèse reste cependant à confirmer.

V. Microscopie confocale et biphotonique

Le comportement des composés a ensuite été étudié en microscopie confocale et biphotonique sur des cellules fixées. En accord avec la sélectivité observée en cuve, la colocalisation avec le DAPI a mis en évidence un marquage spécifique de l'ADN du noyau par les marqueurs vinyl-triphénylamine et carbazoles. L'absence de marquage dans le cytoplasme et dans les nucléoles donne un excellent contraste (Figure 30). A l'encontre des mesures effectuées en cuve, les composés à trois branches sont tout aussi sélectifs de l'ADN nucléaire en cellules que leurs analogues à deux branches.

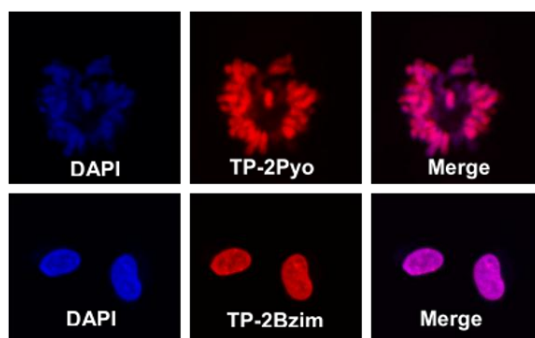


Figure 30. Images de microscopie confocale de cellules MRC-5 fixées co-marquées par le DAPI et les TP (incubation 2 heures en cellules fixées). Images codées en fausses couleurs.

DAPI (1.5 μ M, λ_{exc} = 405 nm, détection = 420-470 nm), TP-2Pyo (2 μ M, λ_{exc} = 488 nm, détection = 520-750 nm), TP-2Bzim (2 μ M, λ_{exc} = 488 nm, détection = 520-750 nm).

Thèse Guillaume Bordeaux

La même spécificité de marquage est observée sous excitation biphotonique, avec toujours un très bon contraste (Figure 31).

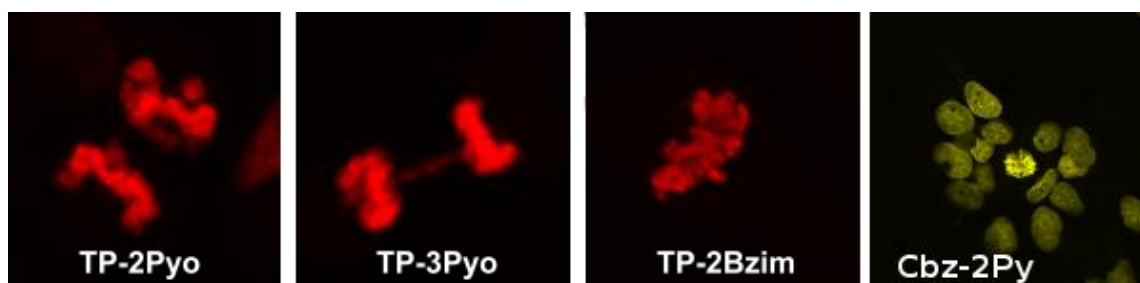


Figure 31. Images de microscopie sous excitation biphotonique de cellules MRC-5 fixées.

[Colorant] = 2 μ M, λ_{exc} = 780 nm (TP-Pyo), 820 nm (TP-2Bzim), 790 nm (Cbz-2Py), λ_{em} = 510-750 nm).

Thèse Guillaume Bordeaux.

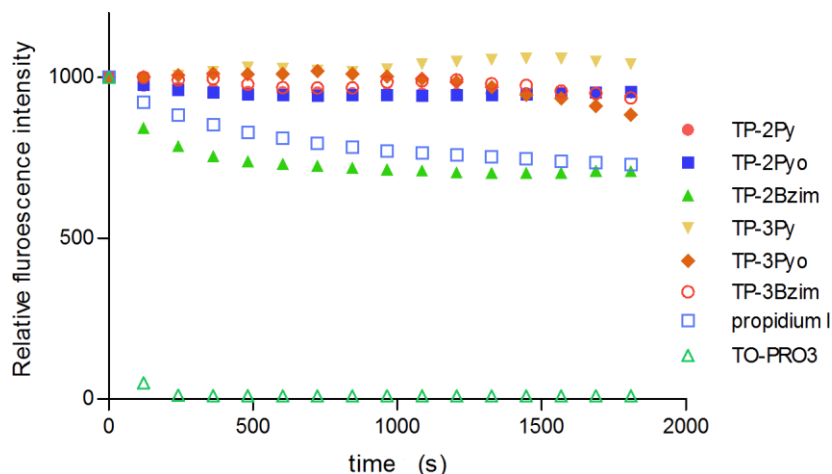


Figure 32. Intensité de fluorescence relative mesurée en microscopie confocale sur cellules MRC-5 fixées sur une période 30 min.

TO-PRO3® (2 μ M, λ_{exc} = 633 nm, détection = 650-750 nm), PI (2 μ M, λ_{exc} = 561 nm, détection = 580-750 nm), TPs (2 μ M, λ_{exc} = 488 nm, détection = 520-750 nm).

La photostabilité a été mesurée sous microscopie confocale sur une période de 30 min. Les triphénylaminés sont globalement très stables notamment par comparaison au TO-PRO3® qui photoblanchit en moins d'une minute. Seule la **TP-2Bzim** montre un léger déclin de fluorescence comparable à celui de l'iodure de propidium (Figure 32).

VI. Objectifs de la thèse

Nous disposions donc au début de ces travaux d'une famille prometteuse de marqueurs fluorescents d'ADN optimisés pour la microscopie biphotonique. Ces molécules, sélectives de l'ADN duplex en cuve et en cellules donnent en microscopie confocale et biphotonique un marquage sélectif et contrasté de l'ADN nucléaire en cellules fixées et sont particulièrement photostables.

Le premier objectif de ce travail a été de poursuivre l'étude du comportement dans l'ADN. Avec le recul donné par ces travaux nous avons donc repris les mesures en cuves de façon à disposer d'un ensemble de données cohérent permettant de comparer facilement entre elles les séries de molécules. Nous avons commencé par optimiser la synthèse de la série benzimidazolium (Bzim) qui n'avait pu être étudiée en détails en raison d'un schéma de synthèse peu efficace. Nous nous sommes ensuite attachés à déterminer précisément les constantes d'affinités et étudier le mode de liaison dans l'ADN par modélisation et dichroïsme circulaire. De nouvelles molécules combinant des modifications de cœur, d'accepteurs et de lien conjugué π ont aussi été synthétisées et étudiées pour approfondir l'étude des relations structure-activité. La série Cbz étant très proche du BMVC développé par l'équipe de Chang pour le marquage de l'ADN quadruplexe [63], une étude détaillée a également été menée sur la sélectivité des Cbz entre les formes duplex et quadruplex.

Le deuxième objectif de a été de développer les applications pratiques en microscopie des marqueurs vinyl-triphénylaminés. Une stratégie de dérivation a été mise au point pour permettre le ciblage cellulaire par couplage avec des vecteurs ciblant les cellules cancéreuses et le développement de sondes pour la « détection de fluorescence *in situ* par hybridation » (FISH) par couplage avec des oligonucléotides. L'étude des performances des TP et des Cbz en microscopie a été poursuivie, avec notamment l'étude de leur comportement en cellules vivantes.

CHAPITRE 1

MARQUAGE NON COVALENT DE BIOMOLECULES

PARTIE 1 : MARQUAGE D'ADN

A. INTRODUCTION

L'acide déoxyribonucléique (ADN) est le support héréditaire de l'information génétique chez tous les êtres cellulaires. Transcrit en ARNm (ARN messager) lui-même traduit en protéine, l'ADN code donc pour toutes les fonctions vitales. Sa structure chimique ainsi que la première évidence de son implication dans une transmission héréditaire d'information génétique chez les bactéries ont été découvertes en 1944 (Cf. I.1). En 1953 Watson et Crick obtiennent la première structure cristalline de l'ADN par rayon X et décrivent l'appariement des bases par liaisons hydrogènes qui porte leur nom (Cf. I.2). Au-delà de la séquence des bases de l'ADN, des mécanismes de régulation de l'expression des gènes existent pour permettre le développement et la différenciation de cellules portant pourtant le même génome ou pour répondre à des facteurs environnementaux. Ces mécanismes, qui constituent le champ d'étude de l'épigénétique, sont principalement la méthylation de l'ADN et des histones qui lui sont associées et l'architecture de la chromatine (Cf. I.4).

I. Structure de l'ADN

1. Structure primaire

Klein et Thannhauser en 1935 puis Todd en 1944 ont mis en évidence que la structure de l'ADN était composée de quatre déoxyribonucléotides assemblés par des esters de phosphates entre les groupes hydroxyles en position 3' et 5' des sucres (Figure 33). Il n'existe pas dans la structure usuelle de l'ADN de liaison 3'-3' ou 5'-5'. La structure primaire de l'ADN est donnée par sa séquence de base 5'-3'.

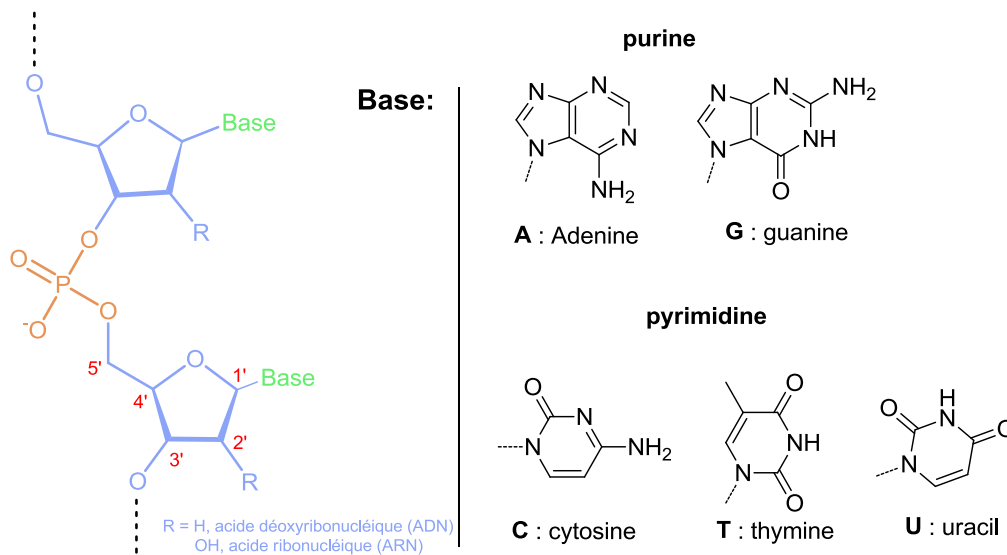


Figure 33. Structure primaire des acides nucléiques ADN et ARN et des bases les composant.

La structure primaire de l'ARN (acide ribonucléique) est identique à celle de l'ADN hormis la présence d'une fonction hydroxyle en position 2' du sucre et le remplacement de la thymine par l'uracil (Figure 33).

2. Structure secondaire

En 1953, Watson et Crick obtiennent la première structure en trois dimensions de l'ADN par diffraction des rayons X. Ils montrent que celui-ci adopte structure hélicoïdale composée de deux brins d'ADN. Cette association est permise par la formation de liaisons hydrogènes entre les bases selon le modèle dit de Watson-Crick où seul A et T d'un côté et C et G de l'autre peuvent s'apparier (Figure 34).

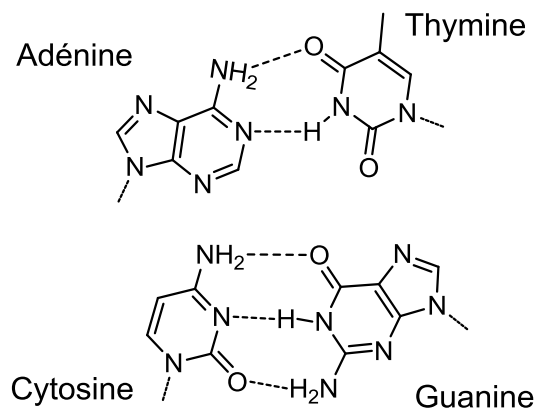


Figure 34. Appariement de Watson-Crick des bases A-T et C-G par liaison hydrogène.

Deux formes principales en double hélice droite A et B ont été identifiées, dont la formation dépend des conditions. A un faible taux d'humidité, c'est l'hélice A qui est favorisée, alors que par fort taux d'humidité, c'est l'hélice B (Figure 35). Une troisième hélice gauche Z plus rare a été identifiée, favorisée par les enchaînements purine-pyrimidine et observée notamment sur la séquence poly(dG.dC)₂.

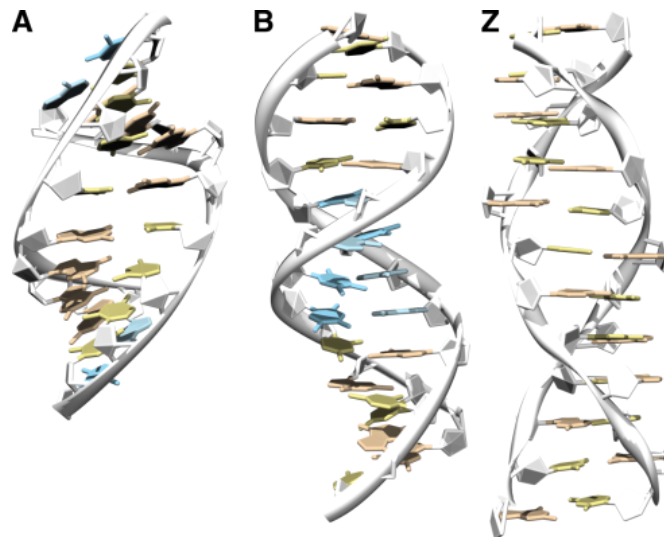


Figure 35. Structures secondaires en double hélice A B et Z de l'ADN.

L'ADN-B est la structure la plus abondante en conditions physiologiques et représente la forme canonique de l'ADN. Néanmoins la structure secondaire reste très dépendante de la séquence de bases et des conditions environnementales comme le montrent les hélices A B et Z et des appariements de bases différents de celui de Watson-Crick rendent également possible la formation d'architectures hélicoïdales d'ordre supérieur comme l'ADN triplex ou G-quadruplex.

3. Structures secondaires non usuelles : l'ADN G-quadruplex

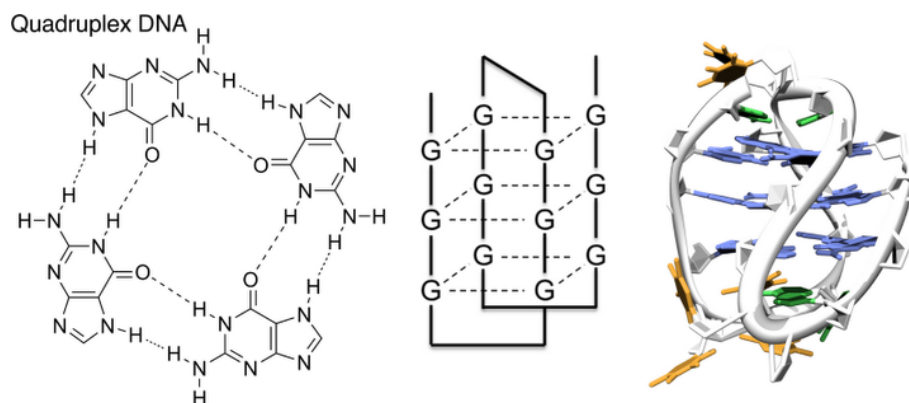


Figure 36. Appariement de Hoogsteen des guanines et empilement de G-quartet (thèse Eric Largy).

Les séquences d'ADN contenant des répétitions de bases ont une propension à former des structures non canoniques d'ADN et peuvent ainsi perturber les processus liés à la transcription et la recombinaison de l'ADN et entraîner des mutations génétiques. Les guanines notamment sont fortement susceptibles de se réarranger entre elles en cas de répétition pour former l'ADN G-quadruplex beaucoup étudié depuis quelques années pour son implication potentielle dans les mécanismes de la cancérogenèse. En effet les répétitions de guanine se retrouvent au niveau de nombreux oncogènes et des télomères qui sont impliqués dans le vieillissement et les mécanismes de mort cellulaire. Les guanines peuvent s'apparier par liaison hydrogène de Hoogsteen pour former des quartets (G-quartet) qui forment le motif de base de l'ADN G4. Les G-quartets peuvent s'empiler par π -stacking (Cf. II) pour former une structure quadruplex. Entre chaque tétrade s'intercale un cation

métallique alcalin monovalent potassium (K^+) ou sodium (Na^+) qui se coordonne aux atomes d'oxygène de la guanine adjacente et assure la stabilisation de l'édifice (Figure 36).

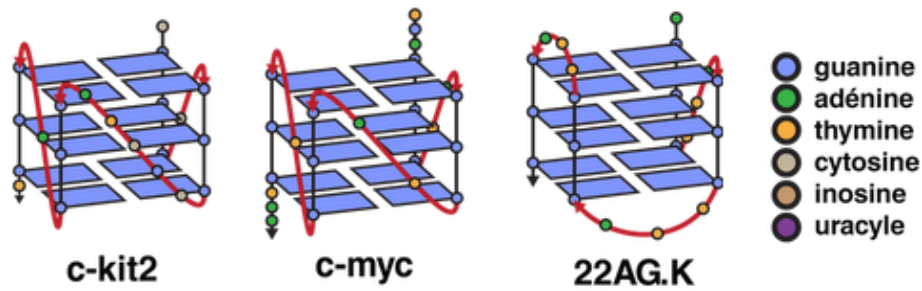


Figure 37. Structure des quadruplexes intramoléculaires c-kit2, c-myc et 22AG.K.

Les quadruplex peuvent se former à partir de un, deux ou quatre brins d'ADN possédant des répétitions de guanine. Les possibilités de structures différentes sont donc multiples, d'autant qu'elles peuvent aussi différer par l'orientation respective des brins d'ADN (parallèle ou antiparallèle). Trois structures d'ADN quadruplex intramoléculaires seront utilisées par la suite dans ce chapitre (Figure 37) :

- c-kit2 (parallèle) : séquence tirée du promoteur d'oncogène *c-kit*.
- c-myc (parallèle) : séquence tirée du promoteur d'oncogène *c-myc*.
- 22AG.K (mixte) : séquence télomérique humaine.

4. L'ADN au sein de la cellule : structure tertiaire

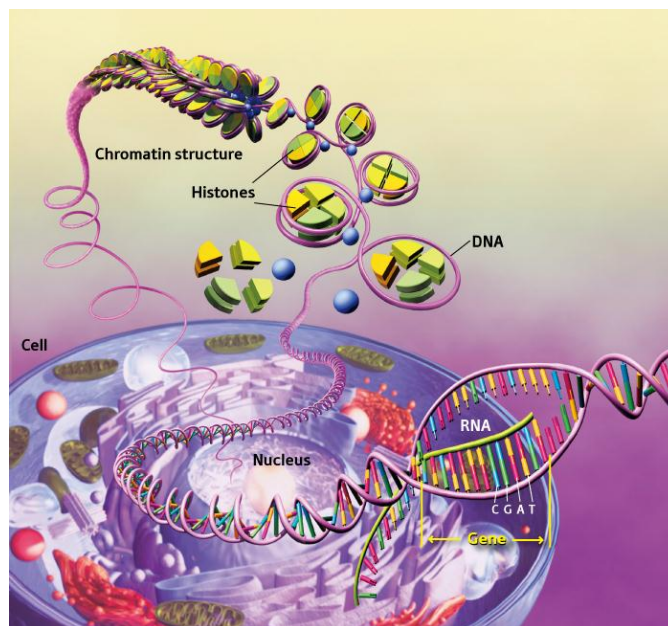


Figure 38. L'ADN au sein de la cellule (www.rikenresearch.riken.jp)

In vivo l'ADN est essentiellement présent dans le noyau dans lequel il est associé à des protéines basiques les histones pour former la structure tertiaire. La double hélice s'enroule autour d'un octamère formé par quatre histones pour former un nucléosome qui est le motif de base de la chromatine (Figure 38).

Une cinquième histone interagit avec l'ADN entre les nucléosomes et est responsable de l'architecture de la chromatine et notamment de la formation des chromosomes. La chromatine existe sous deux formes

l'euchromatine et l'hétérochromatine. La première est une forme relaxée dans laquelle l'ADN est accessible à la transcription et donc où l'expression des gènes est possible, la seconde à l'inverse est une structure condensée ne permettant pas la transcription.

Les histones possèdent une chaîne en position N-terminale pouvant être méthylée ou acétylée par des mécanismes enzymatiques. L'acétylation des histones permet de diminuer l'affinité des histones pour l'ADN et de décondenser l'hétérochromatine et ainsi de réguler la transcription des gènes. La méthylation de l'ADN et des histones, ainsi que le contrôle de l'architecture de la chromatine constituent les principaux mécanismes de l'épigénétique régulant l'expression des gènes en fonction de stimuli extérieurs ou pour permettre la différenciation des cellules.

II. Interactions non-covalentes ADN-petite molécule

Les interactions moléculaires non covalentes font intervenir quatre forces ou interactions principales :

- **Force électrostatique** : interaction entre deux charges ponctuelles dont le potentiel obéissant à la loi de Coulomb est proportionnel à $1/r$ où r est la distance entre les deux charges. L'énergie caractéristique de ces interactions est élevée, de l'ordre de $250 \text{ kcal.mol}^{-1}$. En comparaison, l'énergie d'une liaison covalente C-C est de 348 kJ.mol^{-1} .
- **Force de Van der Waals** : Liaison de faible énergie (quelques kJ.mol^{-1}) résultant de l'interaction entre deux dipôles permanents ou induits qui regroupe en fait un ensemble d'interactions intermoléculaires qui ne sont ni des liaisons covalentes ou hydrogènes ni des interactions électrostatiques. La force de Van der Waals dont le potentiel décroît en $1/r^6$ est une interaction à courte distance. Le potentiel présente une position d'équilibre au-delà de laquelle la force est attractive, et en-deçà de laquelle elle est fortement répulsive. Dans le cas de deux dipôles induits, l'énergie de liaison peut atteindre 30 kJ.mol^{-1} .
- **Liaison hydrogène** [64] : La liaison hydrogène de type $\text{XH}\cdots\text{Y}$ est une liaison entre l'hydrogène et un atome plus électronégatif ($\text{Y} = \text{O}, \text{N}, \text{halogènes}$). C'est une liaison directionnelle et linéaire qui est d'autant plus forte que l'angle $\text{XH}\cdots\text{Y}$ est proche de 180° . Son énergie peut aller de 2 à 40 kJ.mol^{-1} et dépend également de la polarisation de la liaison covalente X-H ; elle est d'autant plus grande que X est électronégatif.
- **Interactions aromatiques (π -stacking)** [65] : le π -stacking est une force de liaison faible entre deux noyaux aromatiques empilés due majoritairement à des forces de Van der Waals. Elle a une importance capitale en biologie où elle entre en jeu dans l'empilement des bases de l'ADN et dans le repliement des protéines. L'énergie mesurée dans le cas de deux molécules de benzène est de l'ordre de 10 kJ.mol^{-1} .

Il existe deux modes principaux par lesquels une molécule organique peut interagir avec l'ADN, l'intercalation entre deux paires de bases et l'insertion dans le petit sillon de la double hélice. L'intercalation met en jeu principalement le π -stacking et sera favorisée dans le cas des aromatiques condensés. La reconnaissance du petit sillon se fait elle par des liaisons hydrogènes et une stabilisation par des forces à courte portée de type Van der Waals avec les parois du sillon, elle sera donc favorisée par une complémentarité de forme entre le ligand et le sillon. L'ADN possède un squelette glycoposphate anionique et un troisième mode d'interaction purement électrostatique est donc possible avec des molécules cationiques. Ce mode de liaison

est non spécifique et ne fait pas intervenir la structure et/ou la géométrie du ligand. On parlera alors de liaison sur la sphère extérieure (*outer sphere binding*) [66]. Plus rarement il est observé des fixations dans le grand sillon de l'ADN (Figure 39).

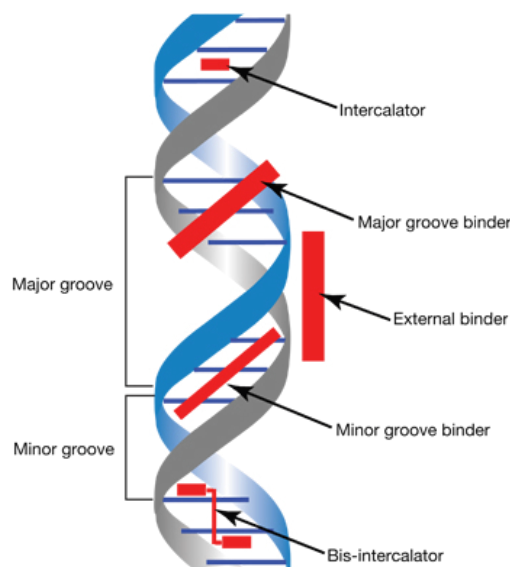


Figure 39. Différents modes de liaison à l'ADN possibles.

1. Agents intercalants

Les agents intercalant de l'ADN présentent souvent des structures aromatiques condensées étendues [67]. Parmi eux se retrouvent les marqueurs d'ADN bromure d'éthidium et iodure de propidium, ainsi que les inhibiteurs de topoisomérase camptothécine et daunorubicine commercialisés comme anticancéreux (Figure 40) [68].

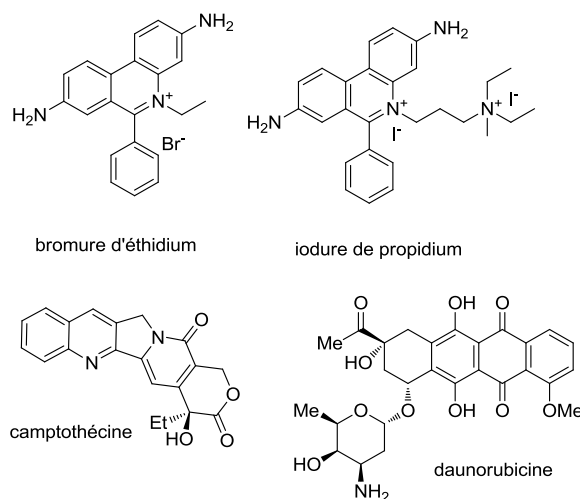


Figure 40 Exemple d'agents intercalant de l'ADN

L'intercalation d'une molécule aromatique entre deux paires de bases entraîne une légère ouverture de la structure d'ADN qui rend les intercalants toxiques. Ces derniers ont une faible sélectivité en terme de séquence, qui ne dépasse pas 2 à 3 paires de bases consécutives, et complique la mise au point de thérapies

ciblées pour contourner cette cytotoxicité importante [69]. Dans le cas de marqueurs EtBr et PI, toute utilisation en cellules vivantes est impossible.

2. Ligands de petit sillon

Le ciblage de l'ADN est une stratégie de choix pour la thérapie anticancéreuse, mais peut entraîner des effets mutagènes importants et nécessite de cibler au maximum l'action cytotoxique. C'est vers les ligands de sillon que s'est donc tournée la recherche scientifique pour mettre au point des molécules sélectives de séquences d'ADN données et moins toxiques. Les ligands de sillon possèdent des structures polyaromatiques non condensées où les rotations autour des liaisons permettent d'adapter la géométrie du ligand à la forme du sillon en perturbant le moins possible la structure de l'ADN. La préférence des petites molécules organiques pour le petit sillon par rapport au grand sillon s'explique par les dimensions de ces derniers (Tableau 2).

Tableau 2. Dimensions des sillons de l'ADN.

Moyennes indépendantes de la séquence.

	grand sillon	petit sillon
largeur	11.6 Å	6.0 Å
profondeur	8.5 Å	8.2 Å

C'est l'étroitesse du petit sillon par rapport au grand sillon qui stabilise les molécules venant se fixer à l'intérieur par des forces de contacts de type Van der Waals. D'autres forces comme les liaisons hydrogènes entrent aussi en jeu et sont importantes dans la sélectivité de séquence. Les valeurs du tableau 2 sont des moyennes indépendantes de la séquence et dans les séquences riches en AT, la largeur du petit sillon peut descendre jusque 3-4 Å. Comme par ailleurs dans les séquences GC la fonction amine des guanines pointe vers l'intérieur du sillon et entraîne une gêne stérique, les ligands de petits sillons purs ont une préférence intrinsèque pour les séquences AT [69]. La mise au point de molécules faisant des liaisons hydrogènes avec les bases de l'ADN permet cependant d'établir une sélectivité beaucoup plus fine.

a. Dérivés de nétropsine et distamycine

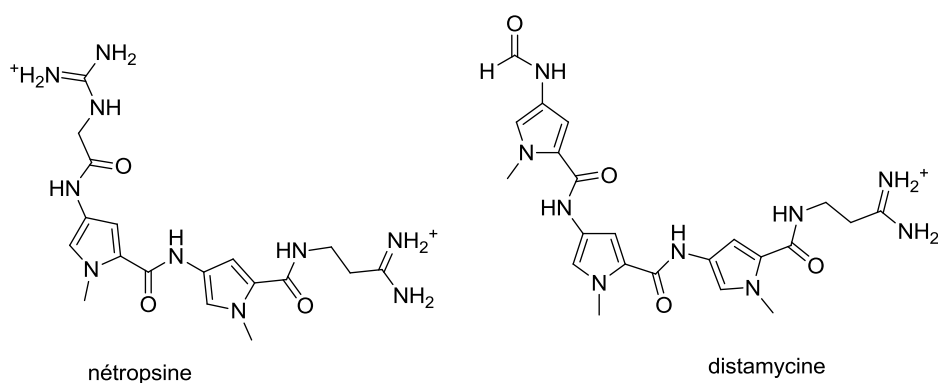


Figure 41. Structures de la nétropsine et de la distamycine.

La nétropsine découverte en 1951 et la distamycine sont deux ligands de petit sillon de l'ADN d'origine naturelle aux propriétés antibiotiques (Figure 41). Ces molécules très étudiées interagissent avec l'ADN en formant plusieurs liaisons hydrogènes (Figure 42A) et ont permis la compréhension des mécanismes impliqués

dans l'interaction avec le petit sillon et notamment la mise en évidence de la sélectivité pour les séquences AT et ont servi de modèle à de nombreux analogues [69,70]. Les lexitropsines sont des molécules composées d'enchaînements de pentacycles aromatiques liés par des liaisons amides dérivés de la nétropsine et la distamycine. En remplaçant le pyrrole par d'autres cycles (pyrazoles, furane, imidazoles, thiophène) et donc en modifiant les enchaînements de donneurs et d'accepteurs d'hydrogène, il est possible de rendre ces composés sélectifs d'une séquence d'ADN entre 5 et 10 paires de bases [71–73].

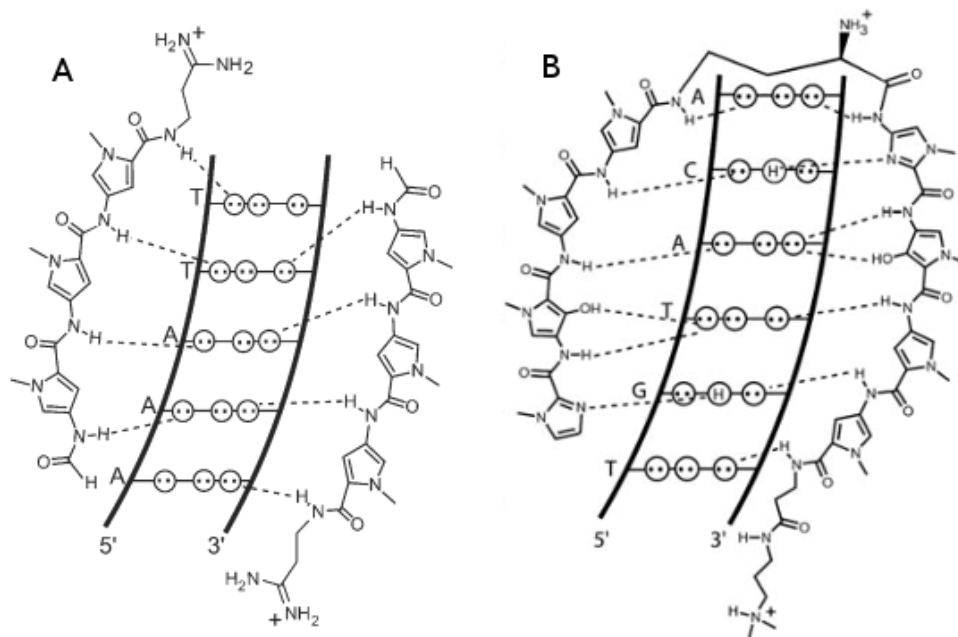


Figure 42. Interaction de la distamycine (A) et d'un polyamide *hairpin* (B) avec leur séquence cible.

Les liaisons hydrogènes (en pointillés) avec chaque base assurent la sélectivité de séquence. Figure adaptée de la référence [74].

Les composés dit microgonotropens obtenus à partir de la distamycine par le remplacement de la fonction diamidine par des chaînes polyaminées ont permis d'augmenter l'affinité pour l'ADN [75].

La présence d'accepteurs de liaison hydrogène permet également d'obtenir des ligands de petit sillon possédant une bonne affinité pour les séquences contenant des GC. L'amine des guanines qui pointe dans le sillon n'est plus alors un obstacle à l'interaction puisqu'elle crée une liaison hydrogène. Ainsi Wilson et son équipe ont réalisé des polyamides spécifiques de la séquence 5'-ACGCGT-3' [76].

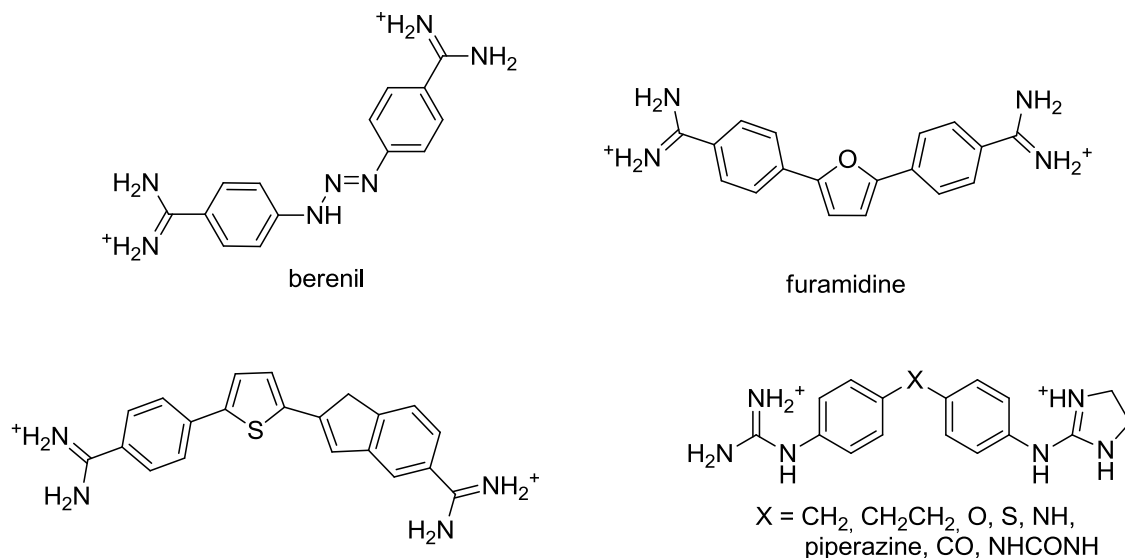
En remarquant que la distamycine et les lexitropsines interagissent souvent avec l'ADN selon une stœchiométrie 2:1 (Figure 42A), Peter Dervan a développé des polyamides, enchaînement de pyrroles et d'imidazoles, en forme d'épingle à cheveux (*hairpin*) permettant une double reconnaissance de la séquence d'ADN avec une sélectivité et une affinité accrue [74] (Figure 42B).

Par leur grande sélectivité de séquence, les polyamides *hairpin* [77] et les lexitropsines [71] ont servi de vecteurs pour des chromophores ou des agents thérapeutiques pour le ciblage de séquences d'ADN données.

b. Berenil® et dérivés

De nombreux ligands de petit sillon sont basés sur le motif bisphénylamidinium du Berenil®, une petite molécule qui se lie dans le petit sillon des zones AT ayant des propriétés antibactérienne [69]. Les analogues

ont essentiellement été obtenus par modification du pont reliant les deux phénylamidines et présentent comme leur modèle des propriétés antibactériennes (Figure 43) [78–80].



Mallena *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13659

Nagle *et al.* *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 5558

Figure 43. Structure du berenil et de ses dérivés.

Les dérivés de carbazole sont couramment rencontrés en chimie médicinale et l'activité de ces composés tient notamment à leur capacité à s'intercaler dans l'ADN [81,82]. L'équipe de Wilson a cependant synthétisé des carbazoles dicationiques substitués en positions 2,7 ou 3,6 par des diamidines ou des imidazoles qui se lient dans le petit sillon des zones AT (Figure 44) [83,84].

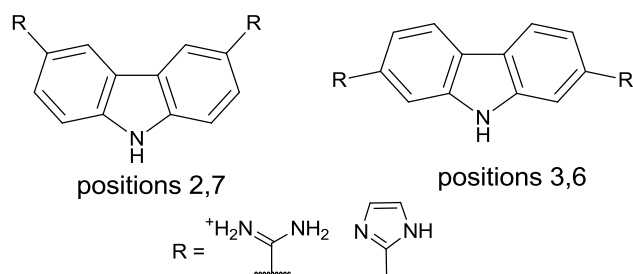


Figure 44. Structure des carbazoles dicationiques.

Par la suite, ils ont justement montré que ces mêmes carbazoles pouvaient également s'intercaler dans les séquences GC [85].

c. Bisbenzimidazoles : Hoechst et dérivés

Le Hoechst 33258 mis au point par la société Hoechst AG dans les années 1960 est un marqueur fluorescent d'ADN très largement employé. Il a été montré que cette molécule interagissait avec l'ADN par insertion dans le petit sillon des zones AT (Figure 45) [86].

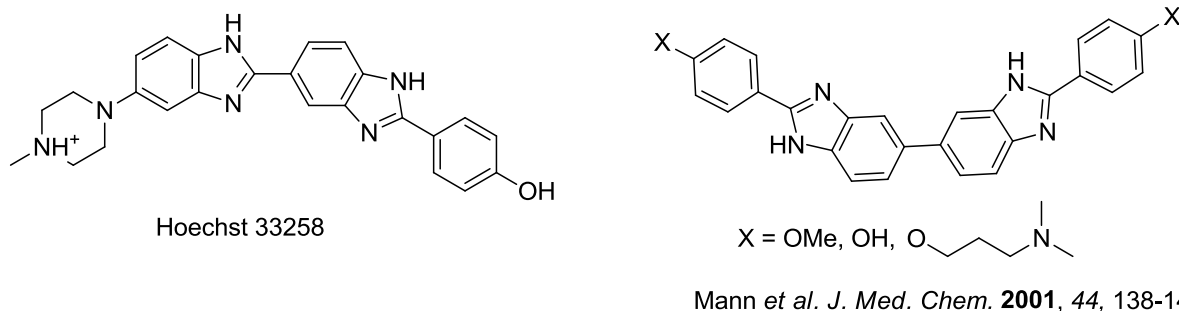
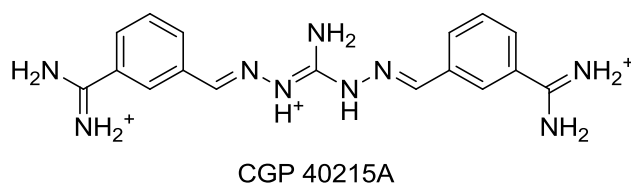


Figure 45. Structure du Hoechst 33258 et de ses dérivés bisbenzimidazoles.

L'équipe de Neidle a réussi à développer des analogues bisbenzimidazoles qui conservent la spécificité AT du hoechst et présentent des propriétés antitumorales (Figure 45) [87]. Wilson de son côté a mis en évidence l'importance des molécules d'eau dans l'insertion de cette classe de composé dans le petit sillon. La présence d'atomes d'oxygènes sur les chaînes latérales permet la formation de liaison hydrogène avec une molécule d'eau qui elle-même donne un hydrogène en liaison avec une base du petit sillon et assure donc le pont entre la molécule et l'ADN. En conséquence, les composés présentant un oxygène sur les deux chaînes latérales ont une affinité accrue par rapport au Hoechst 33258 [88].

d. Autres ligands de petit sillon

Malgré la diversité des structures des ligands de petit sillon certaines caractéristiques restent inchangées. Ces sont en général des molécules présentant des hétérocycles non condensés dont la forme épouse celle du petit sillon et tous ont une préférence marquée pour les zones AT de l'ADN avec éventuellement des sélectivités plus fines de séquence, notamment pour les lexitropsines. Comme pour tout dogme, il existe cependant des exceptions notables. Récemment, Wilson et son équipe ont montré que grâce à l'intervention de molécules d'eau, il était possible d'avoir des ligands de sillons ne respectant pas la courbure du sillon [89,90]. Ils ont ainsi obtenu une diamidine linéaire se liant avec une forte affinité dans le petit sillon des ADN de séquences AT (Figure 46) [91].



Nguyen *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13680

Figure 46. Diamidine linéaire se liant dans le petit sillon des zones AT de l'ADN.

Poursuivant leur étude sur les diamidines ils ont aussi synthétisé une classe de ligands de sillons reconnaissant spécifiquement les séquences riches en GC [92].

La structure activité des ligands de petits sillons de l'ADN montre bien qu'il est possible de moduler assez finement la sélectivité de séquence de ces molécules, ce qui fait d'eux de bonnes sondes structurales et dynamiques de l'ADN. L'insertion dans le petit sillon est aussi un moyen d'interaction privilégié pour former des

molécules thérapeutiques agissant sur l'ADN, en témoigne le grand nombre de ligands de petit sillon aux propriétés antitumorales [93] ou antibiotiques [94].

3. Marquage fluorescent d'ADN

Il existe trois principales méthodes pour marquer l'ADN :

- **Marquage covalent par voie chimique** : comprend plusieurs techniques dont l'utilisation de bases modifiées fluorescentes [95,96], le couplage à des quantum dots ou des nanoparticules [97,98], les oligonucléotides couplés à des marqueurs fluorescents (Cf. Chapitre 3).
- **Marquage covalent par voie enzymatique** : Introduction de fluorophores ou de quantum dots sur l'ADN en utilisant une alkyltransférase modifiée [99,100].
- **Marquage non covalent** : Fluorophore présentant une affinité spontanée pour l'ADN et dont le signal peut être modifié lors de la liaison permettant la différenciation entre marqueur libre et lié.

Les techniques de marquage covalent ont l'avantage de permettre le contrôle spatial de la liaison ADN-fluorophore mais sont plus difficiles à mettre en œuvre notamment *in vivo* et nécessitent une modification structurale de l'ADN. Le marquage non covalent ne permet pas une sélectivité de séquence aussi précise, mais il ne nécessite pas de modification chimique de l'ADN et est facile à mettre en œuvre *in vivo* pour peu que le fluorophore soit perméable à la membrane cellulaire et soit non toxique, ce qui est néanmoins déjà restrictif. C'est sur cette facette du marquage d'ADN que nous nous concentrerons dans cette partie. Le couplage covalent des fluorophores à des oligonucléotides sera abordé dans le Chapitre 3 de ce manuscrit.

a. Fluorophores commerciaux usuels

Parmi les marqueurs fluorescents d'ADN, nous avons déjà vu les intercalants de l'ADN bromure d'éthidium et iodure de propidium (Figure 40) et le ligand de petit sillon Hoechst 33258 (Figure 45) et ses dérivés [101]. Parmi les autres ligands, le DAPI et les cyanines sont également très couramment utilisés (Figure 47). Les cyanines sont des fluorophores composés de deux azotes pouvant faire partie d'un hétérocycle, l'un tertiaire et l'autre quaternaire, reliés par un pont polyméthine plus ou moins étendu. La variation de la conjugaison permet d'obtenir des cyanines émettant sur tout le spectre visible.

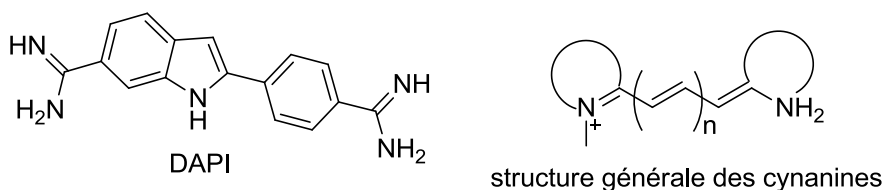


Figure 47. Structure du DAPI et des cyanines.

Le DAPI peut interagir avec l'ADN par insertion dans le petit sillon dans les zones AT ou par intercalation dans les séquences GC. Les cyanines, elles, interagissent de multiples façons selon leurs structures et bien que largement employées ne sont souvent pas spécifiques de l'ADN. Elles ont d'ailleurs nombres d'autres applications, notamment dans le marquage de protéines [102]. Les Cy3 et Cy5 par exemple sont fluorescentes à l'état libre et n'ont pas d'affinité particulière pour une biomolécule, elles sont donc très utilisées pour le

marquage par couplage covalent. Parmi celles utilisées plus spécifiquement pour le marquage d'ADN, on peut citer le thiazole orange (TO), le TO-PRO-3 et le SYBR green (Figure 48).

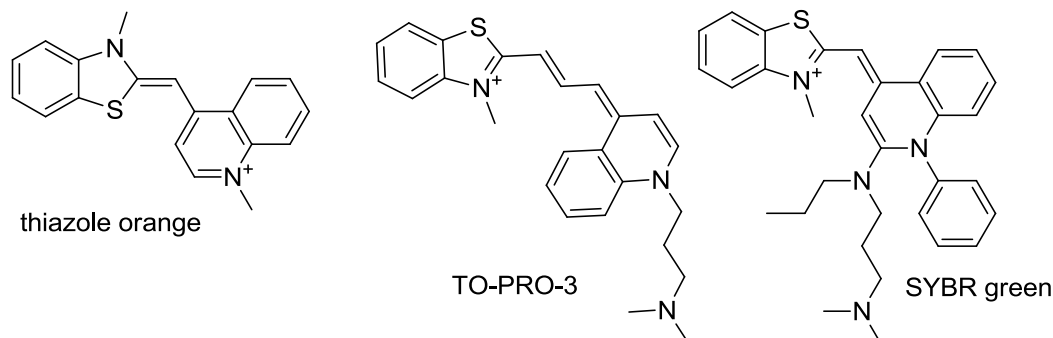


Figure 48. Structure du TO, du TO-PRO-3 et du SYBR green.

Le tableau 3 résume les propriétés optiques de ces molécules dans l'ADN. Le Hoechst et le DAPI sont des marqueurs Off/On de l'ADN duplex qui ont de bons rendements quantiques mais nécessitent des longueurs d'ondes d'excitation dans l'UV dommageables pour les échantillons biologiques. Les cyanines permettent d'exciter sur des gammes plus larges allant jusqu'au rouge mais elles ne sont en général pas sélectives de l'ADN duplex et ont des déplacements de Stokes faibles qui rend leur utilisation en spectroscopie délicate et nécessite des couples de filtres très précis pour chaque molécule. L'EtBr et le PI ont des propriétés optiques intéressantes mais sont très toxiques et marquent indifféremment tous les acides nucléiques (double et simple brin, ARN).

Tableau 3. Propriétés optiques des marqueurs d'ADN commerciaux en présence d'ADN duplex.

λ_{abs} : Longueur d'onde d'absorption, λ_{em} : longueur d'onde d'émission, Φ_F : rendement quantique de fluorescence, ss : dsDNA : rapport des intensités de fluorescence dans l'ADN simple brin et l'ADN double brin.

	λ_{abs}	λ_{em}	Φ_F	ss:dsDNA
Hoechst 33258^a	349	458	0.42	0.48
DAPI^a	356	455	0.34	0.55
SYBR green^a	496	522	0.57	0.57
TO^b	508	525	0.11	≈ 1
EtBr^a	520	608	0.35	1
PI^a	536	624	0.13	0.93
TO-PRO-3	642	661	0.11	-

^a : réf. [103], ^b : réf. [104].

b. Autres fluorophores

Malgré l'abondance de fluorophores commerciaux capables de marquer l'ADN, aucun ne regroupe toutes les exigences nécessaires pour une bonne sonde fluorescente utilisable *in vivo*. La recherche reste donc importante pour optimiser les propriétés de ces marqueurs. On trouve par exemple des dérivés d'acridine [105] marquant l'ADN et l'albumine, un dérivé du TO (DEAB-TO-3) fluoresçant dans le rouge et pénétrant en cellules vivantes [106], ou un dérivé de pentamidine fluorescent sélectif des séquences AT [107] (Figure 49).

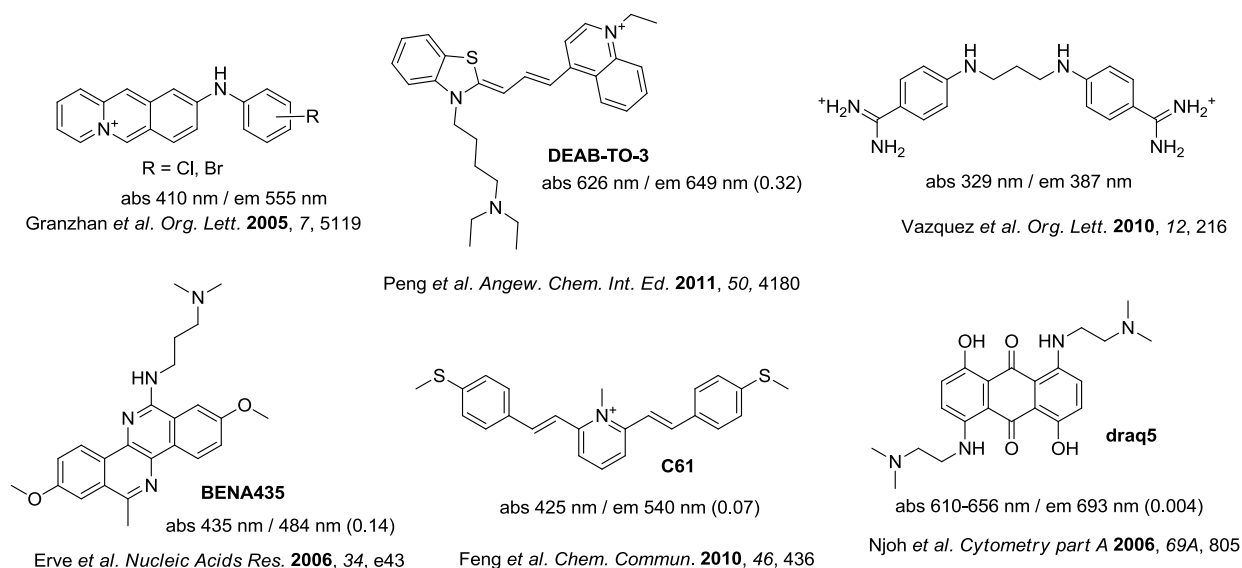


Figure 49. Structure et propriétés optiques des ligands d'ADN.

Propriétés : longueur d'onde d'absorption (abs) et d'émission (em) dans l'ADN. Le rendement quantique de fluorescence est indiqué entre parenthèse lorsqu'il a été mesuré.

Le BENA435 [108], le C61 [109] et le draQ5 [110] (Figure 49) sont des molécules permettant de marquer l'ADN en cellules vivantes. Cependant, le BENA435 et le C61 sont des marqueurs verts peu indiqués pour la microscopie tissulaire. Ce dernier au vu de sa structure quadrupolaire pourrait néanmoins avoir des propriétés d'absorption à deux photons qui augmenterait ses performances *in vivo* mais elles n'ont pas été étudiées. Le draQ5 est fluorescent dans le rouge mais a un rendement quantique très faible et n'est pas un ligand off/on de l'ADN.

Les complexes métalliques notamment le cis-platine sont connus comme agents de cross-linking dans l'ADN mais il existe aussi des complexes métalliques fluorescents de ruthénium capables de marquer l'ADN de façon non covalente par fluorescence [111,112].

c. Marqueurs biphotoniques

La troisième classe de marqueurs d'ADN qui nous intéresse particulièrement dans ce travail est celle des marqueurs utilisés en fluorescence excitée à deux photons (Figure 50).

Yashchuk et Prasad ont utilisé avec succès la cyanine Cyan 40 pour marquer les acides nucléiques par microscopie biphotonique en cellules vivantes [113]. Elle interagit avec l'ADN et l'ARN et semble avoir une préférence pour ce dernier en cellules. Aucune section efficace n'a été mesurée pour ce composé. Sur le même modèle Yashchuk a ensuite développé une cyanine Bos-3 portant une chaîne latérale polyaminée et son dimère DBos-21. Ces deux molécules dont la fluorescence est fortement exaltée en présence d'ADN duplex, possèdent néanmoins des sections efficaces assez peu élevées et marquent essentiellement le cytoplasme en cellules vivantes [114].

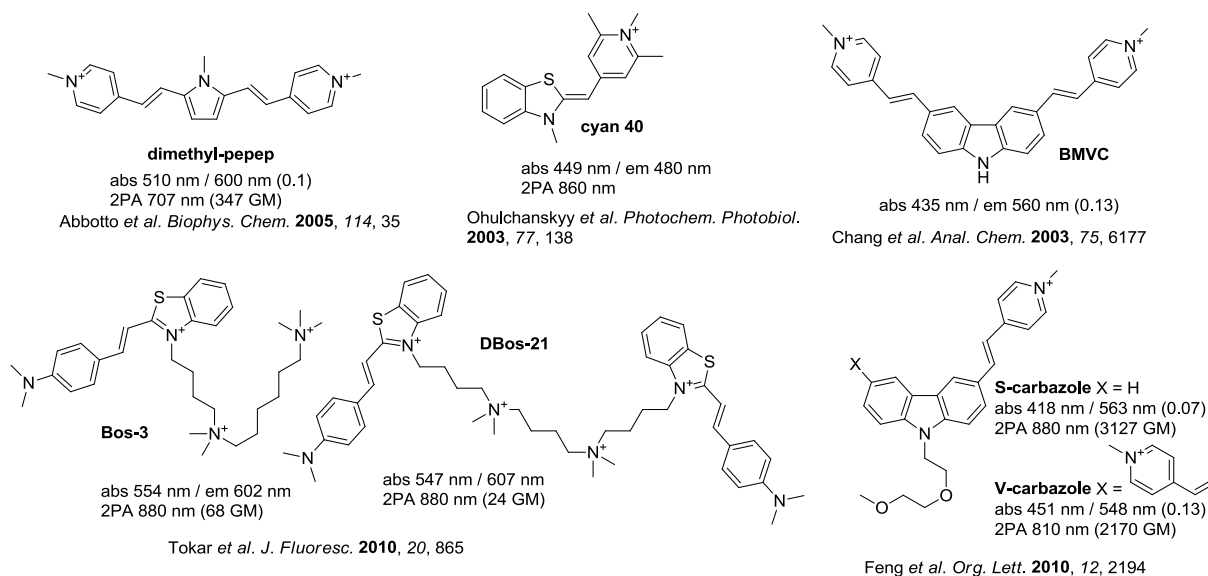


Figure 50. Marqueurs d'ADN utilisés en microscopie biphotonique.

Propriétés optiques : longueur d'onde d'absorption (abs) et d'émission (em) dans l'ADN. Le rendement quantique de fluorescence est indiqué entre parenthèse lorsqu'il a été mesuré. 2PA : longueur d'onde d'absorption à deux photons et section efficace associée (en GM) lorsqu'elle a été mesurée.

Le BMVC a été développé par T.-C. Chang pour la détection d'ADN quadruplex. Il marque à la fois le duplex et le G4 mais avec de légers déplacements de la longueur d'onde d'émission permettant de distinguer les différentes structures [63]. Le BMVC a été utilisé en microscopie biphotonique et en imagerie de temps de vie de fluorescence même si aucune section efficace d'absorption n'a été mesurée [115]. Deux ligands dérivés du BMCV ont été aussi rapporté, le S-carbazole et le V-carbazole. Leurs propriétés optiques linéaires sont similaires à celles du BMVC et leurs sections efficaces d'absorption sont très élevées dans l'ADN, avec de façon surprenante une section efficace plus élevée pour le carbazole monosubstitué par rapport à son analogue disubstitué. Ils ont été testés en microscopie excitée à deux photons et par FLIM en cellules vivantes, où ils marquent essentiellement le cytoplasme [116]. Le dimethyl-pep est un autre marqueur de type bis-vinylpyridinium avec un cœur pyrrole. Ce ligand fluoresce dans le rouge présente une section efficace d'absorption élevée de 347 GM et se lie à l'ADN avec une affinité de l'ordre de 10^6 M^{-1} . Il pénètre en cellules vivantes et marque le noyau et dans une moindre mesure les mitochondries, avec cependant une brillance assez faible due à son rendement quantique modéré de 0.1 [117].

Les nombreux fluorophores marqueurs d'ADN existants couvrent tout le spectre visible, du Hoechst et DAPI fluoresçant dans le bleu aux cyanines type TO-PRO-3 et dérivés émettant dans le rouge. Certains d'entre eux sont peu sélectifs, comme le PI et l'EtBr, mais il est possible *in vitro* de marquer l'ADN duplex en différentes couleurs avec une bonne spécificité et une forte brillance. En microscopie sur cellules vivantes en revanche, la plupart des fluorophores ne remplissent pas les exigences citées en introduction de ce manuscrit. Parmi les fluorophores biphotoniques notamment seul le dimethyl-pep émet dans le rouge avec une section efficace véritablement optimisée et marque l'ADN en cellules vivantes. Il a cependant un rendement quantique faible et sa cytotoxicité reste à déterminer. La plupart des autres composés présentent au moins une ou plusieurs entorses au cahier des charges (émission dans le bleu ou vert, section efficace ou rendement quantique faibles,

déplacement de Stokes faible pour les cyanines). En outre, pour la plupart, la cytotoxicité n'a pas été déterminée et lorsqu'ils pénètrent en cellules vivantes ils marquent essentiellement le cytoplasme.

Nous avons donc poursuivi l'étude des marqueurs vinyl-triphénylamine et de leurs dérivés pour essayer de mettre au point des marqueurs qui présentent une forte affinité pour l'ADN tout en respectant les exigences de la microscopie biphotonique. Dans ce chapitre, nous présenterons d'abord les synthèses qui ont permis d'obtenir de nouveaux composés ou d'optimiser les procédés existants puis nous étudierons les propriétés optiques des fluorophores et leur mode d'interaction avec l'ADN. Le comportement des marqueurs d'ADN en microscopie sera vu au Chapitre 2.

Pour faciliter l'étude des propriétés des composés, nous avons décidé de nous baser sur un oligonucléotide modèle, dérivé du dodécamère drew-dickerson, de séquence d(GCGCAAATTTGCGC)₂. Appelé drewAT, cet oligomère autoccomplémentaire qui forme un duplex présentant un site A₃T₃ central a été choisi pour favoriser l'insertion dans le petit sillon et limiter les interactions multiples afin de faciliter les mesures des constantes d'affinités et la détermination du mode de liaison. Des comparaisons seront aussi effectuées avec d'autres oligonucléotides de séquences et de structures différentes pour donner un aperçu de la sélectivité des marqueurs triphénylamine et de leurs dérivés.

B. SYNTHÈSE & CARACTÉRISATION DES LIGANDS

I. Synthèse

1. Optimisation de la synthèse de la série Bzim

Les **TP-2Bzim** et **TP-3Bzim** sont les deux molécules les plus prometteuses par leurs rendements quantiques élevés dans l'ADN. Cette famille n'a cependant pas pu être étudiée de façon approfondie car la première méthode de synthèse employée n'a permis d'obtenir que quelques milligrammes des composés. Ces rendements très faibles sont dus à la dernière étape de méthylation. La présence d'une amine secondaire sur le noyau benzimidazole a en effet nécessité l'emploi de bicarbonate de potassium pour la déprotoner (Schéma 1) [60]. L'utilisation d'une base minérale a donné au final un mélange de sels séparables uniquement par HPLC semi-préparative, seule méthode de séparation en phase inverse disponible au laboratoire.

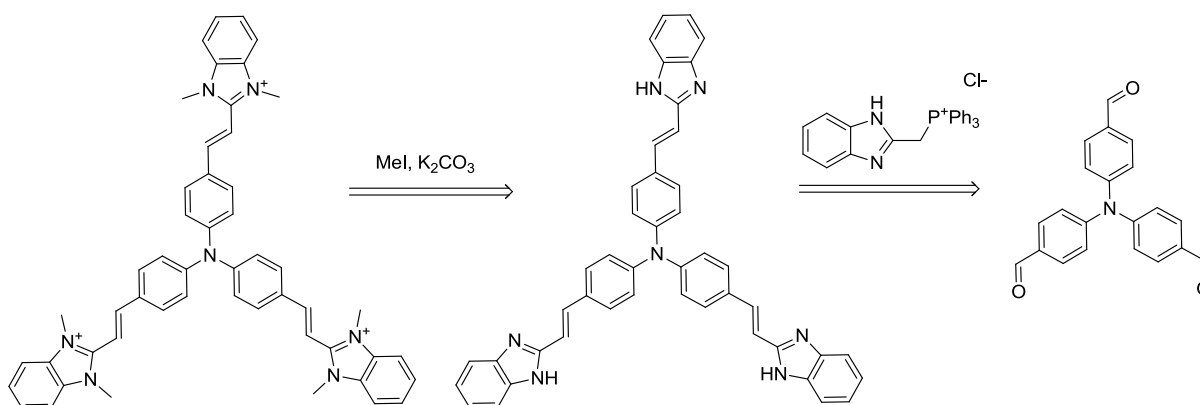


Schéma 1. Première méthode de synthèse des TP-Bzim (thèse Guillaume Bordeaux).

Pour contourner ce problème nous avons gardé la même stratégie générale de synthèse par réaction de Wittig, mais en reconstruisant un sel de phosphonium où l'amine secondaire du noyau benzimidazole est préalablement méthylée (Schéma 2). La méthylation finale ne nécessite alors plus de base et le produit attendu est obtenu pur par précipitation.

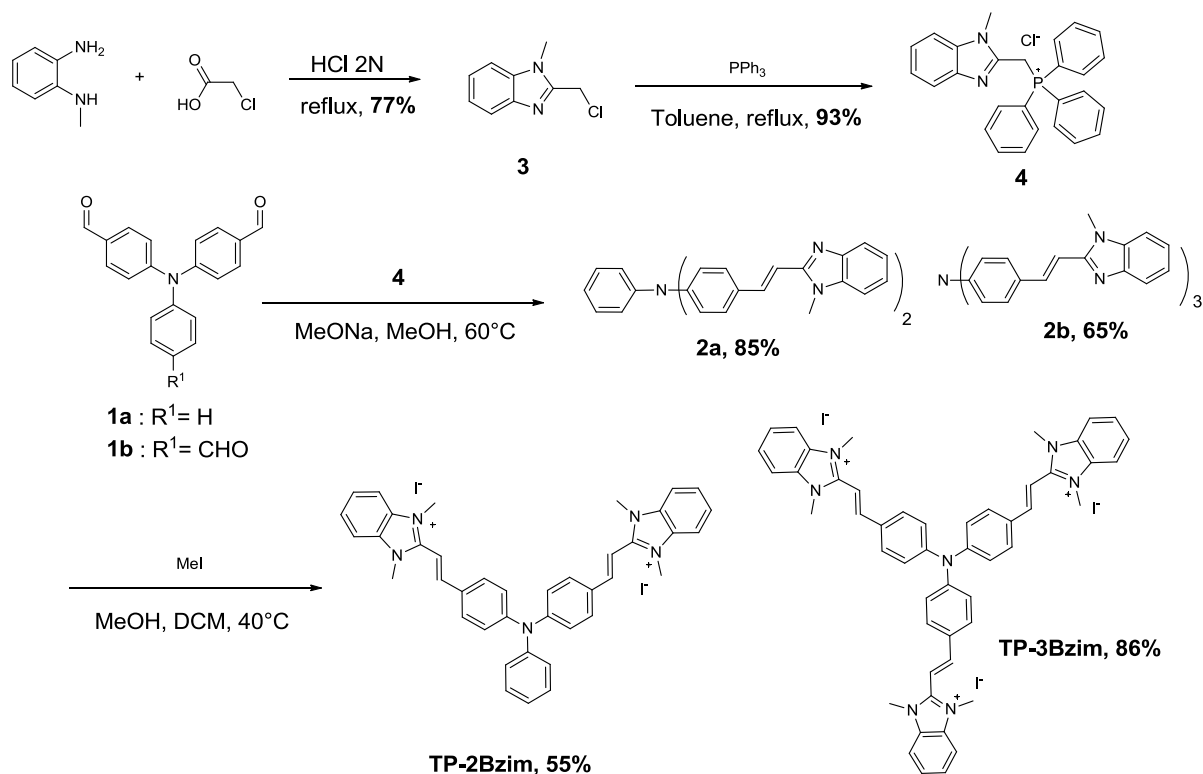


Schéma 2. Synthèse optimisée des TP-Bzim

La condensation entre l'acide chloroacétique et la 2-méthylaminoaniline suivie d'une substitution nucléophile par la triphénylphosphine a permis d'obtenir le sel de phosphonium **4** nécessaire avec un rendement de 72 % sur les deux étapes. Une réaction de Wittig entre le phosphonium **4** et la bis- ou triformyltriphénylamine a donné les intermédiaires neutre **2a** et **2b**, avec un noyau benzimidazole monométhylé. Lors de l'étape finale de méthylation par l'iodure de méthyle dans un mélange dichlorométhane : méthanol 1:1, la **TP-2Bzim** et la **TP-3Bzim** précipitent spontanément et sont donc obtenues pures sans purification avec des rendements globaux de 47% et 56% respectivement. Alors que la réaction de Wittig donne logiquement un meilleur rendement pour le composé disubstitué que pour le trisubstitué, ce dernier est plus facilement méthylé lors de l'étape finale. Cette différence marquée (55 % contre 86 % lors de la méthylation) est probablement due au fait que le composé chargé tricationique précipite plus volontiers que son équivalent dicationique et tire donc la réaction vers la complétion.

La synthèse optimisée des **TP-Bzim** ne nécessitant plus de purification finale a permis d'obtenir ces deux composés en quantité suffisante pour approfondir leur étude.

2. Variation du lien vinylique : TP-oxazole

Après la variation du cœur donneur et des accepteurs électroniques, nous avons modifié la conjugaison entre eux. Le pont vinylique a été remplacé par un oxazole, par analogie avec le (2-pyridinyl)(5-phényl)oxazole aussi appelé PyPo qui est un fluorophore et un ligand d'ADN connu (Figure 51) [118,119]. Le PyPo a également été étudié comme sonde de pH et sous forme protonée présente une section efficace d'absorption à deux photons de 70 GM à 710 nm [120].

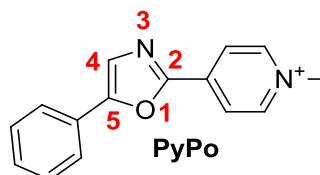


Figure 51. Structure du PyPo

Le cycle oxazole possède deux positions préférentielles (2 et 5) fonctionnalisable par arylation directe (Figure 51). Nous avons donc choisi cette méthode de synthèse pour obtenir deux séries de composés TP-oxazoles qui diffèrent par le sens de branchement entre le cœur et les accepteurs :

- TP en position 2 et pyridine en 5 : série TP-Ox5Py.
- TP en position 5 et pyridine en 2 : série TP-Ox2Py.

Sandrine Piguel et Florence Mahuteau-Betzer ont développé au sein de l'UMR176 une stratégie d'arylation de la position 2 de l'oxazole par activation C-H catalysée au palladium que nous avons appliquée à nos molécules [121]. Dans le cas des **TP-Ox2Py** une réaction de Van Leusen entre la bis- ou tris-(4-formyl)triphénylamine et le TosMIC a permis de former la TP branchée en position 5 sur le cycle oxazole (**5a** et **5b**). La position 2 a ensuite été introduite selon la méthode citée précédemment, par une arylation catalysée au palladium *tetrakis*-triphénylphosphine en présence de *tert*-butoxide de lithium avec des rendements de 50% et 21% pour la **TPn-2Ox2Py** et la **TPn-3Ox2Py** respectivement, ce qui donne un rendement de 65% par couplage. Les intermédiaires neutres ont ensuite été méthylés en utilisant un agent plus doux que l'iodure de méthyle, le tosylate de méthyle, pour éviter la méthylation des azotes des cycles oxazoles (Schéma 3).

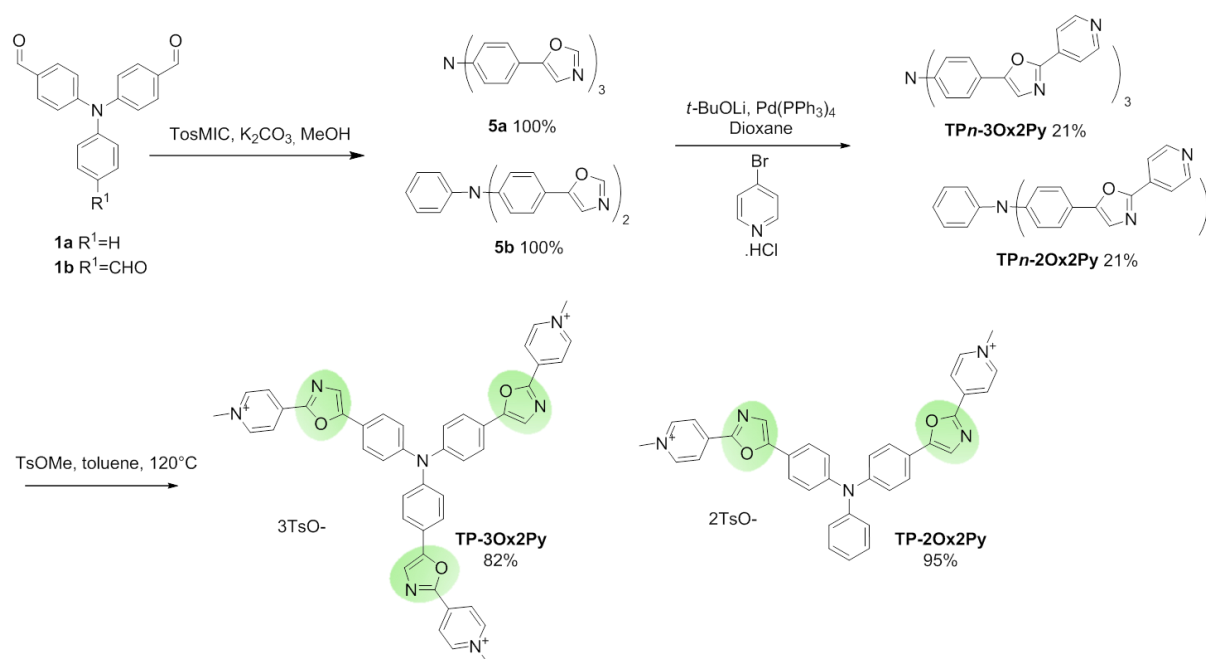


Schéma 3. Synthèse des TP-Ox2Py

Pour la série **TP-Ox5Py**, le 5-(4-pyridinyl)oxazole a été synthétisé par réaction de Van Leusen entre l'isonicotinaldéhyde et le TosMIC puis arylé en position 2 par réaction avec les bromotriphénylamine **6a** et **6b** selon la méthode précédente pour donner les **TPn-2Ox5Py** et **TPn-3Ox5Py** avec des rendements de 36% et 35%

respectivement. La méthylation par le tosylate de méthyle a ensuite donné les produits finaux attendus **TP-2Ox5Py** et la **TP-3Ox-5Py** avec des rendements de 89% et 71% (Schéma 4).

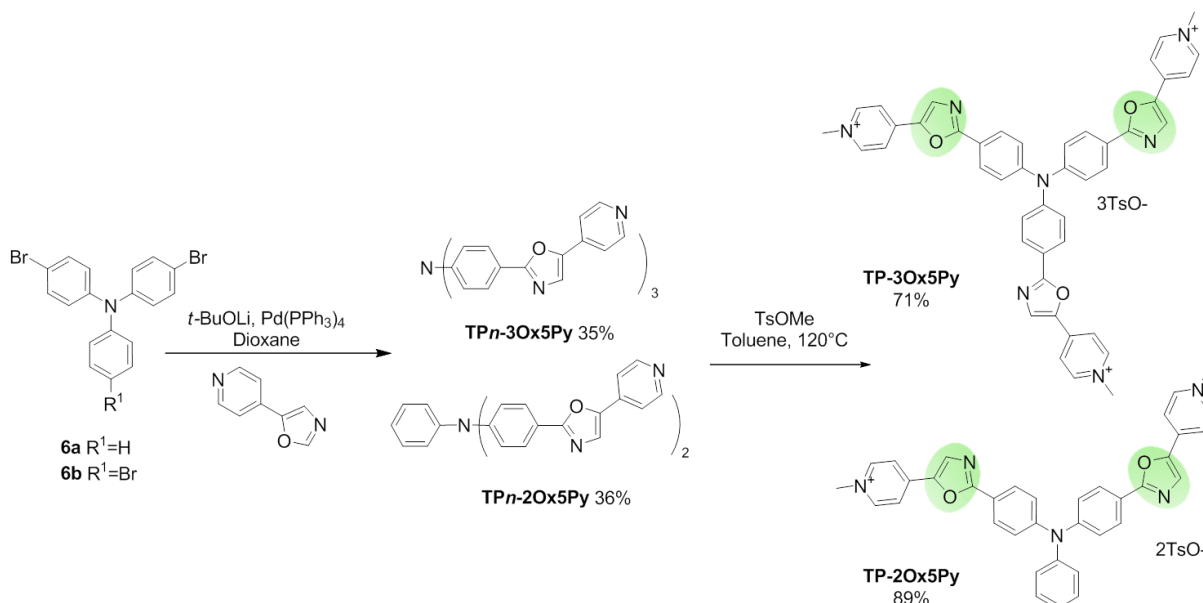


Schéma 4. Synthèse des TP-Ox5Py

3. Synthèse des Cbz-2Ox5Py et Cbz-2Bzim

Dans la lignée des travaux effectués sur les triphénylamines, nous avons tenté d'appliquer les mêmes modifications structurales à la série carbazole, le **Cbz-2Py** et la **TP-2Bzim** ayant une brillance beaucoup plus importante que la **TP-2Py**, il paraissait pertinent de combiner les modifications du cœur et des accepteurs. Nous avons tenté d'obtenir le **Cbz-2Bzim** puisque le benzimidazolium est l'accepteur donnant les meilleurs résultats en série TP. Par ailleurs, dans la lignée des TP-Oxazoles, nous avons synthétisé le **Cbz-2Ox5Py**.

a. Synthèse du Cbz-2Bzim

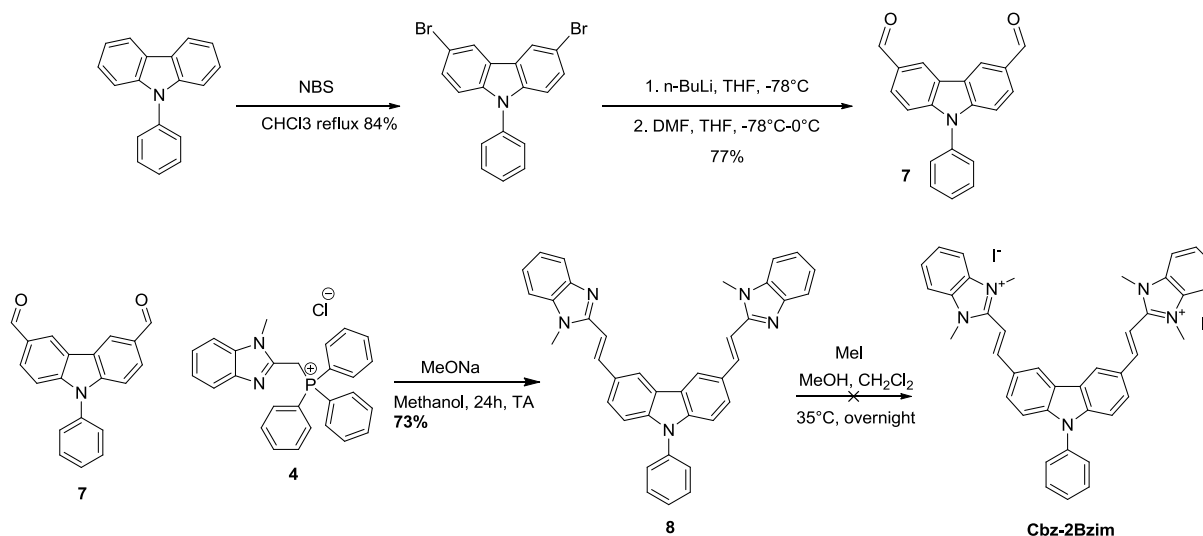


Schéma 5. Synthèse du Cbz-2Bzim par réaction de Wittig

La première approche a été d'appliquer la procédure par réaction de Wittig mise au point pour les triphénylaminés (Schéma 5). Le carbazole dialdéhyde **7** a été obtenu par une bromation au N-bromosuccinimide du N-phénylcarbazole suivie d'une formylation de Vilsmeier-Haack avec un rendement global de 65%. La réaction de Wittig avec le phosphonium **4** a permis d'obtenir l'intermédiaire **8** avec un rendement de 73 %, mais la méthylation de dernier est restée incomplète après plusieurs tentatives, donnant un mélange de produits mono et bis-méthylés dans des proportions 1:1 environ (Figure 52).

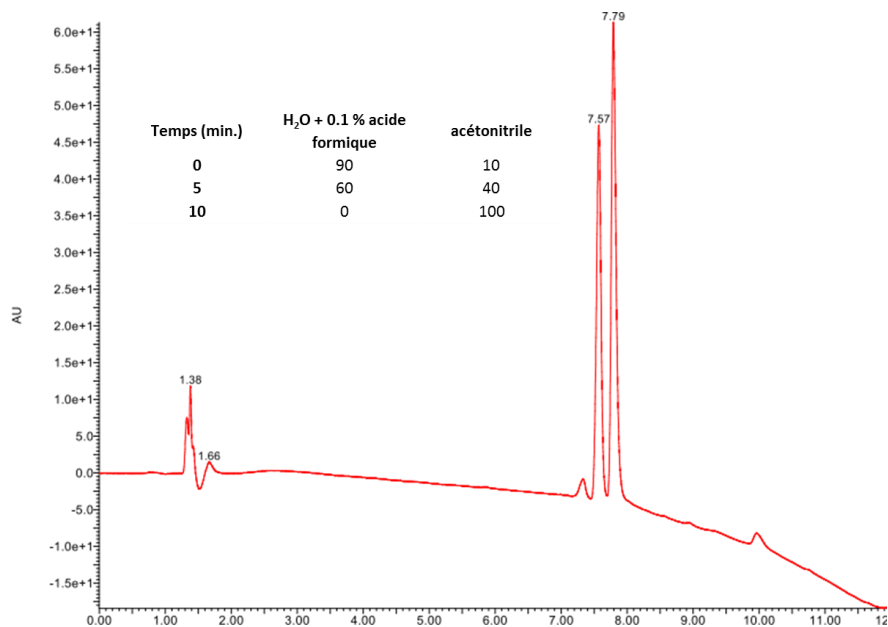


Figure 52. Analyse par HPLC du Cbz-2Bzim obtenu après méthylation.
Gradient linéaire d'eau (0.1% acide formique) et acétonitrile, conditions sur la figure.

Nous avons donc cherché à mettre au point une méthode permettant d'obtenir le **Cbz-2Bzim** en une étape à partir du carbazole dialdéhyde, pour éviter l'étape de méthylation. Nous avons opté pour une condensation de Knoevenagel entre le dialdéhyde et l'iodure de 1,2,3-triméthylbenzimidazolium **8** (Schéma 6).

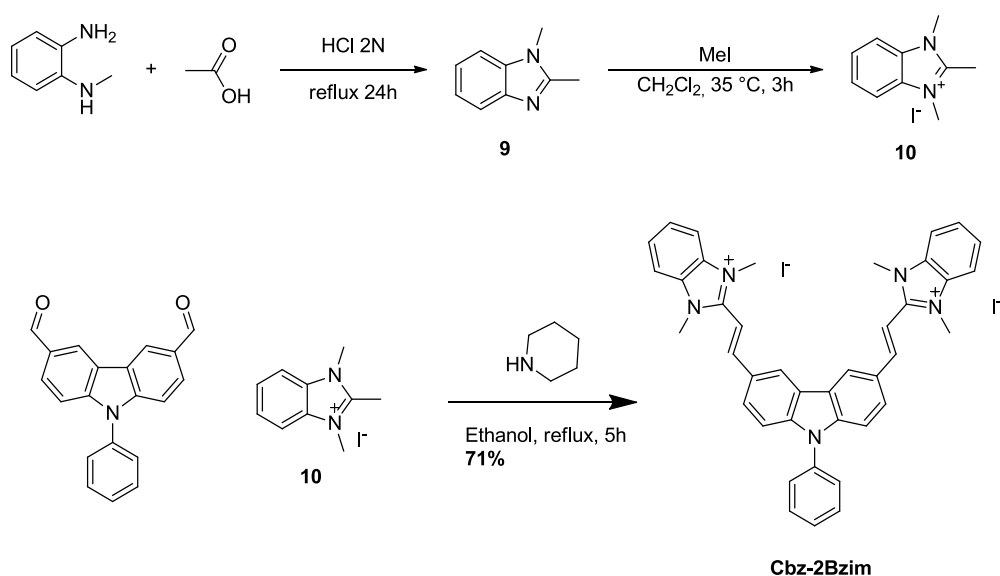


Schéma 6. Synthèse du Cbz-2Bzim par réaction de Knoevenagel

La condensation entre la 2-méthylaminoaniline et l'acide acétique en milieu acide a permis d'obtenir le 1,2-diméthylbenzimidazole **9** qui, après méthylation par l'iodure de méthyle, a donné le sel attendu **10**. La réaction de Knoevenagel entre le carbazole dialdéhyde **7** et le sel de benzimidazolium **10** a finalement permis d'obtenir le **Cbz-2Bzim** par précipitation avec un rendement de 71 %. Le composé obtenu s'est cependant révélé instable : après 24h dans le DMSO la déméthylation du composé est observable par RMN. Cette instabilité explique par ailleurs les difficultés rencontrées pour méthyler le composé **8**. La déméthylation est vraisemblablement le fait de l'eau présente dans le DMSO comme cela a pu être observé avec d'autres dérivés et le **Cbz-2Bzim** est par conséquent inutilisable en milieu aqueux pour marquer l'ADN. Une étude préliminaire par spectrométrie UV a mis en évidence une interaction avec l'ADN, mais le composé n'a pas été étudié plus avant.

b. Synthèse du Cbz-2Ox5Py

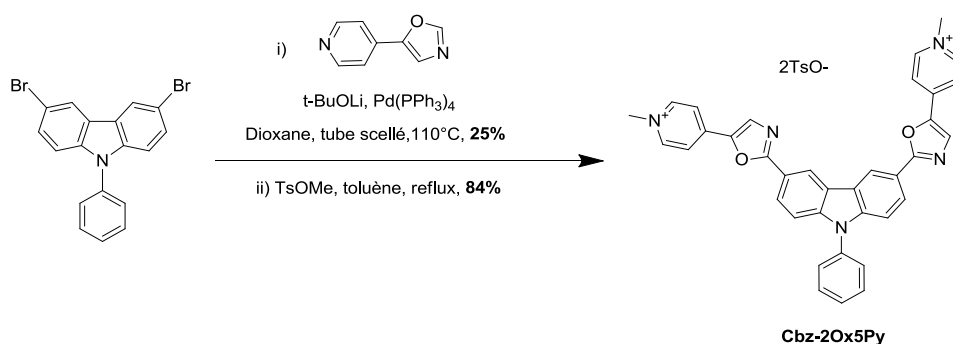


Schéma 7. Synthèse du Cbz-2Ox5Py

Le **Cbz-2Ox5Py** a été obtenu par la même stratégie que les TP-Oxazoles, par arylation directe du dibromo-N-phénylcarbazole par le 5-(4-pyridinyl)oxazole en présence de Pd(0) et de *tert*-butoxide de lithium avec un rendement de 25 %, suivie d'une méthylation par le tosylate de méthyle avec un rendement de 84% (Schéma 7).

4. Synthèse de la DP-2Py et du BMVC

Le BMVC étant un ligand connu d'ADN et plus particulièrement de G4 (Cf. p.60), nous avons dans le cadre d'un stage de M1 décidé de comparer les propriétés du **Cbz-2Py** et du BMVC, et pour compléter l'étude de structure-activité sur l'influence du groupe phényle sur les propriétés photophysiques et/ou de liaison à l'ADN, nous avons également synthétisé la **DP-2Py** pour la comparer à la **TP-2Py**.

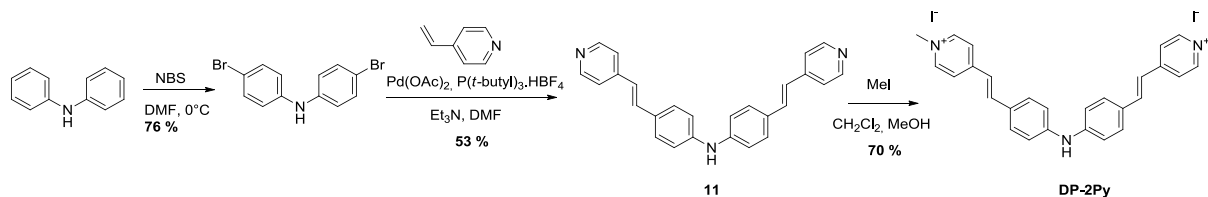


Schéma 8. Synthèse de la DP-2Py

Le BMVC a été synthétisé selon la méthode rapportée dans la littérature par réaction de Heck [122]. La **DP-2Py** a été obtenue selon la même stratégie (Schéma 8) ; l'intermédiaire neutre **11** a été obtenu par un couplage de Heck entre la bis(4-bromophényl)amine et la 4-vinylpyridine avec un rendement de 53%. Une méthylation par l'iodure de méthyle a ensuite mené à la **DP-2Py** cationique avec un rendement de 70%.

II. Propriétés optiques

Pour disposer d'un ensemble de données cohérentes pour chaque famille, nous avons donc remesuré leurs propriétés optiques dans l'oligonucléotide duplex d'AT de séquence d(CGCGAAATTCGCG)₂ qui tire parti de la préférence des marqueurs pour les séquences riches en AT.

1. Préambule : mesure des rendements quantiques de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence est une valeur dont la mesure peut donner lieu à des erreurs importantes. Nous avons donc essayé dans le même temps d'optimiser la mesure de cette propriété. La méthode précédemment employée consistait à mesurer l'absorbance et la fluorescence de deux solutions de concentrations différentes et ce à trois longueurs d'onde : au maximum d'absorption et à 10 nm au-dessus et en dessous [60]. Ces six mesures moyennées donnent alors une valeur de rendement quantique. Cette méthode a l'avantage de permettre la vérification de l'invariance du rendement quantique avec la longueur d'onde, cependant les mesures à $\lambda_{\text{max}} \pm 10$ nm sauf cas exceptionnel donnent des valeurs semblables et la moyenne ne porte donc véritablement que sur trois points.

Nous avons donc adopté une autre technique de mesure du rendement quantique, tirée de la méthode par comparaison de Williams [123]. Cette méthode repose sur la mesure de l'absorbance et de la fluorescence pour cinq solutions de concentrations croissantes à une longueur d'onde donnée. Le tracé de l'intensité de fluorescence intégrée sur le spectre en fonction de l'absorbance doit donner une droite si aucun phénomène d'aggrégation ou d'autoécrantage ne se produit. Le rendement quantique de fluorescence est alors donné par la formule suivante :

$$\phi_x = \phi_{\text{ref}} \frac{\text{Grad}_x \eta_x^2}{\text{Grad}_{\text{ref}} \eta_{\text{ref}}^2}$$

où l'indice x est relatif à l'échantillon et ref à la référence, Grad représente la pente de la droite $I = f(A)$ et η l'indice de réfraction du milieu.

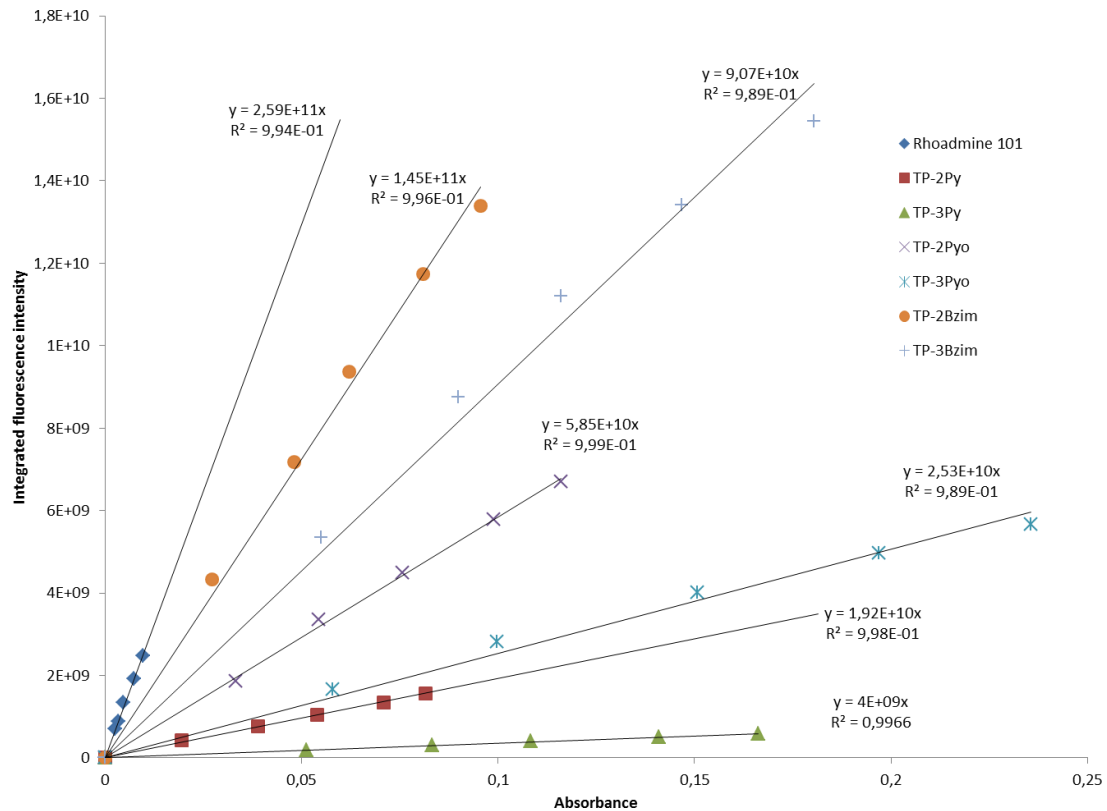


Figure 53. Mesure des rendements quantiques de fluorescence des TP : tracé de l'intensité de fluorescence intégrée sur le spectre en fonction de l'absorbance et régression linéaire sous Excel.

Cette méthode a le désavantage de ne pas vérifier l'invariance du rendement quantique avec la longueur d'onde, mais ceci est communément admis. Elle permet par contre par une régression linéaire sur cinq points de vérifier directement la validité de la mesure (Figure 53). Il est difficile de comparer les deux techniques puisque les rendements quantiques de fluorescence ont été remesuré dans le drewAT et non l'ADN de hareng mais globalement les deux jeux de valeurs sont cohérents entre eux. Pour les séries TP-Py et TP-Pyo, les valeurs mesurées dans le drewAT sont légèrement supérieures mais sensiblement identiques à celles mesurées dans l'ADN de hareng. Pour la série TP-Bzim, les valeurs dans le drewAT, elles sont par contre largement inférieures à celle dans l'ADN de hareng : 0.54 contre 0.73 pour la **TP-2Bzim** et 0.34 contre 0.59 pour la **TP-3Bzim**. Ces différences ne sont pas vraisemblablement dues à une différence dans l'interaction entre l'ADN de hareng et le drewAT mais bien à une meilleure précision de la nouvelle méthode de mesure. Compte tenu du caractère plus délicat des mesures d'absorption biphotonique, qui sont réalisées en collaboration avec le CEA, et de la nécessité de disposer d'un montage expérimental sur banc optique dédié, les valeurs de sections efficaces d'absorption à deux photons n'ont pas été remesurées dans le drewAT et seront données dans l'ADN de hareng.

2. Série Vinyl-triphénylamine

a. Propriétés linéaires

Les triphénylamines absorbent quel que soit le milieu sur une large gamme de longueur d'onde, de 400 à 600 nm environ, avec des maxima variant selon la famille de composés de 450 nm à 500 nm. Les coefficients d'absorption molaire à ces maxima sont de l'ordre de 30 à 40 000 M⁻¹.cm⁻¹ pour les composés à deux branches et de 50 à 60 000 M⁻¹.cm⁻¹ pour les trois branches. Lorsque l'on passe des pyridinium, aux *o*-pyridinium et aux benzimidazolium, l'absorption est à chaque fois déplacée vers le bleu. Dans l'ADN, le maximum d'absorption passe de 509 nm pour la **TP-2Py** à 476 pour la **TP-2Bzim**. Enfin, de manière générale, l'absorption dans l'ADN est légèrement plus faible que dans le glycérol et elle est déplacée vers le rouge de façon plus ou moins marquée selon les familles. C'est pour les dérivés benzimidazoliums que cette différence est la plus marquée avec un déplacement de 30 nm pour la **TP-2Bzim** alors qu'il n'est que de 2 nm pour la **TP-2Pyo** (Tableau 4).

Tableau 4. Propriétés optiques linéaires des marqueurs TP dans le glycérol et dans l'ADN.

λ_{abs} : longueur d'onde d'absorption maximale, ϵ : coefficient d'absorption molaire à λ_{abs} , λ_{em} : longueur d'onde d'émission maximale, $\Delta\lambda$: déplacement de Stokes en nanomètres, Φ_F : rendement quantique de fluorescence, $\epsilon\Phi_F$: brillance monophotonique, τ_F : temps de vie de fluorescence.

		λ_{abs} (nm)	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Φ_F	$\epsilon\Phi_F$ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	τ_F (ns)
TP-2Py	glycérol	496	37 400	649	153	0.11	4 114	0.34
	drewAT	509	31 400	656	147	0.07	2 198	0.67
TP-3Py	glycérol	492	66 000	666	174	0.13	8 580	0.31
	drewAT	499	51 000	684	185	0.01	510	0.51
TP-2Pyo	glycérol	476	47 200	633	157	0.23	10 856	0.42
	drewAT	478	41 500	627	149	0.22	9 130	1.69
TP-3Pyo	glycérol	466	63 500	632	166	0.22	13 970	0.33
	drewAT	476	65 100	634	158	0.09	5 859	1.27
TP-2Bzim	glycérol	448	40 400	602	154	0.35	14 140	1.00
	drewAT	476	44 400	585	109	0.54	23 976	2.35
TP-3Bzim	glycérol	440	57 200	604	164	0.42	24 024	0.79
	drewAT	468	62 400	591	123	0.34	21 216	2.03

Quasiment non émissive en milieu aqueux, les triphénylamines émettent dans le glycérol ou bien en présence d'ADN un signal de fluorescence situé plutôt dans le jaune-rouge, avec des spectres d'émission couvrant une large gamme de longueur d'onde allant de 550 nm à 800 nm environ et un déplacement de stokes supérieur à 100 nm, pouvant même atteindre 185 nm pour la **TP-3Py**. La Figure 54 montre les spectres d'absorption et d'émission des triphénylamines lors de l'addition de drewAT, mettant en évidence l'interaction avec l'ADN et l'exaltation de fluorescence. Les déplacements de longueurs d'ondes observés en absorption sont respectés en émission et en passant des TP-Bzim, aux TP-Pyo et enfin aux TP-Py, le signal de fluorescence est de plus en plus déplacé vers le rouge. Comme nous l'avons vu en introduction de ce manuscrit, les séries Pyo et surtout Bzim ont permis d'optimiser fortement les rendements quantiques, qui passent de 0.07 pour la **TP-2Py** à 0.54 pour la **TP-2Bzim** dans le drewAT.

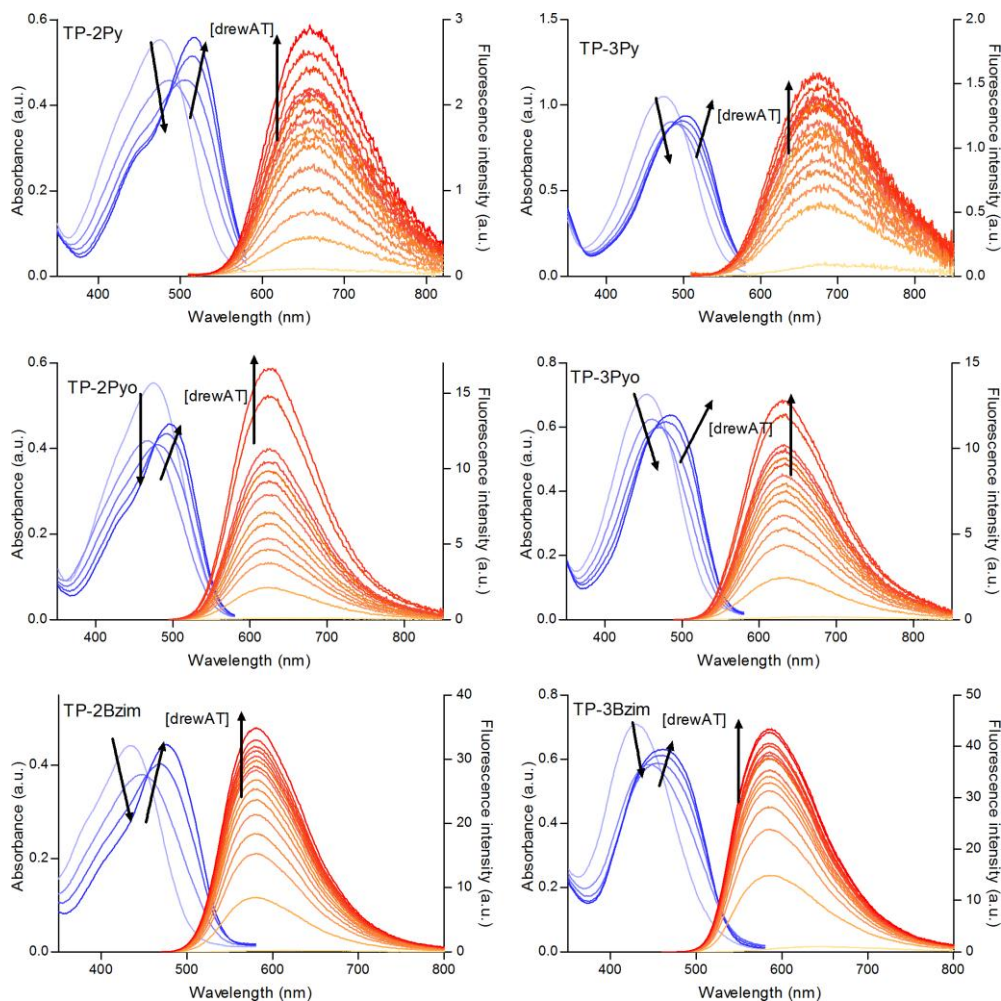


Figure 54. Spectres d'absorption et de fluorescence des triphénylamine en présence de quantités croissantes de drewAT.

Conditions : tampon cacodylate de sodium 10 mM pH 7.2. **Absorbance:** [TP] = 10 μ M, [drewAT] = 0-10 μ M, [NaCl] = 100 mM. **Fluorescence:** [TP] = 1 μ M, [drewAT] = 0 - 5 μ M, [NaCl] = 100 mM.

Dans le glycérol, les composés à trois branches ont des rendements quantiques similaires à leurs analogues à deux branches, mais dans l'ADN des disparités importantes apparaissent. En effet les rendements quantiques mesurés dans le drewAT pour les composés tricationiques sont toujours plus faibles que ceux de leurs analogues dicationiques. L'hypothèse que nous démontrerons en étudiant plus en détail les interactions dans l'ADN est que le motif de reconnaissance de l'ADN est constitué par deux branches formant un V et que donc la troisième laissée libre hors de la matrice ADN entraîne une chute du rendement quantique. Pour les deux branches, aucune tendance nette ne se dessine. La **TP-2Py** a un rendement quantique plus faible dans le drewAT que dans le glycérol, alors que c'est l'inverse pour la **TP-2Bzim**. Ceci montre bien que l'effet de l'ADN sur les propriétés spectroscopiques ne se résume pas à une inhibition des rotations autour des liaisons comme c'est le cas dans le glycérol. L'ADN impose une conformation fixe aux triphénylamine et améliore la planéité des branches et donc la délocalisation électronique. Les interactions électroniques avec les bases (interactions entre aromatiques, Van der Waals), et l'environnement hydrophobe de l'ADN, entrent sans doute aussi en jeu. Cas particulier, la **TP-2Pyo** voit ses propriétés d'absorption et d'émission inchangées dans les deux milieux, ce qui semble indiquer dans ce cas une configuration identique dans le drewAT et dans le glycérol et donc peu

d'interactions spécifiques avec l'ADN. Nous verrons plus tard que ces observations sont corrélées avec une affinité plus faible de la **TP-2Pyo** pour l'ADN.

Le facteur déterminant pour la microscopie est la brillance, produit de l'absorption et du rendement quantique, qui déterminera l'intensité de fluorescence d'un marqueur. En considérant ce facteur, l'optimisation des performances des triphénylaminés est évidente, avec une brillance supérieure à 20 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ pour la série **TP-Bzim** alors qu'elle n'était que de 2 200 $M^{-1}.cm^{-1}$ pour la **TP-2Py** et 510 pour la **TP-3Py**. Pour la série TP-Pyo, l'optimisation bien qu'assez nette par rapport à la série TP-Py originelle est surtout visible dans le glycérol avec des brillances supérieures à 10 000 alors que dans l'ADN les performances chutent légèrement et restent bien inférieures à celles de la série Bzim. Ceci montre bien la difficulté d'optimiser les propriétés optiques des composés tout en conservant les propriétés d'interactions avec l'ADN, qui sont indépendantes.

b. Propriétés non linéaires

Les spectres d'absorption à deux photons des TP ont été mesurés entre 760 et 830 nm. Les dérivés à trois branches ont un maximum d'absorption à 800 nm et les deux branches à 820 nm, à l'exception de la TP-3Bzim dont le maxima est à 760 nm (Figure 55).

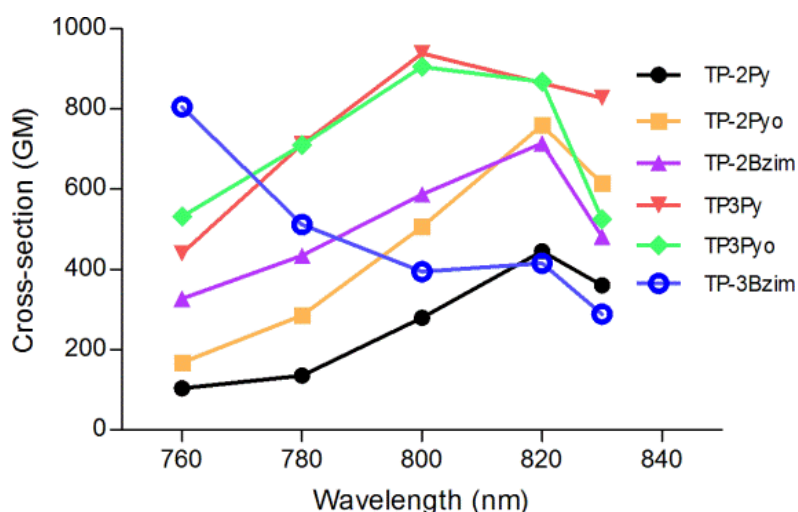


Figure 55. Sections efficaces d'absorption des triphénylaminés en présence de 30 équivalents en paires de bases d'ADN de hareng (tampon cacodylate de sodium 10 mM, pH 7.2, NaCl 100 mM)

La variation des accepteurs a permis d'optimiser les rendements quantiques mais aussi les sections efficaces d'absorption. Aucune molécule n'a une section efficace plus élevée que la **TP-3Py** (940 GM), cependant si l'on s'intéresse aux composés à deux branches, les **TP-2Pyo** et **TP-2Bzim** ont des sections efficaces d'absorption plus élevées que la **TP-2Py** (760 et 710 GM contre 450 GM respectivement, (Tableau 5).

Les molécules ont toutes une section efficace d'absorption plus élevée dans l'ADN que dans le glycérol. Cette différence peut être attribuée au blocage de la conformation et donc de l'angle dièdre qui pourrait améliorer la coopérativité entre les branches.

La brillance biphotonique (*action cross-section*, $\delta x \Phi_F$) permet de classer les composés. Selon ce critère, la série TP-Bzim se distingue nettement avec des brillances de 383 GM et 275 GM pour les **TP-2Bzim** et **TP-3Bzim**.

Ensuite la brillance chute à 134 GM pour la **TP-2Pyo**, ces valeurs étant à comparer avec la brillance de 30 GM environ de la série TP-Py d'origine.

Tableau 5. Propriétés optiques non linéaires des marqueurs TP dans le glycérol et dans l'ADN de hareng.

λ_{2PA} : longueur d'onde d'absorption à deux photons maximale, δ : section efficace d'absorption à λ_{2PA} , $\delta\chi\Phi_F$: brillance biphotonique.

		λ_{2PA} (nm)	δ (GM)	$\delta\chi\Phi_F$ (GM)
TP-2Py	glycérol	800	390	43
	ADN de hareng	820	450	35
TP-3Py	glycérol	820	780	101
	ADN de hareng	800	940	9
TP-2Pyo	glycérol	820	460	106
	ADN de hareng	820	760	134
TP-3Pyo	glycérol	800	310	68
	ADN de hareng	800	910	73
TP-2Bzim	glycérol	780	270	95
	ADN de hareng	820	710	383
TP-3Bzim	glycérol	760	240	101
	ADN de hareng	800	810	275

3. Série TP-oxazole

Par rapport aux TP-Py, les TP-OxPy ont globalement une absorption déplacée vers le bleu avec des coefficients d'absorption molaire plus faibles d'environ 25%. S'il est possible de dégager une tendance générale sur l'influence de l'oxazole, il existe cependant des différences importantes en fonction du sens de liaison de l'oxazole (Tableau 6).

Tableau 6. Propriétés optiques linéaires des TP-oxazoles dans le drewAT et la ds26.

		λ_{abs} (nm)	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Φ_F	$\epsilon\chi\Phi_F$ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
TP-2Ox2Py	drewAT	485	14700	-	-	-	-
TP-3Ox2Py	glycérol	477	48700	690	213	0.022	1071
	drewAT	482	35000	-	-	-	-
TP-2Ox5Py	glycérol	454	45300	636	182	0.053	2401
	drewAT	466	21800	631	165	0.038	500
TP-3Ox5Py	glycérol	447	58500	634	188	0.11	3393
	drewAT	444	45500	606	165	0.031	1459

Les TP-Ox2Py absorbent vers 480 nm en moyenne et les TP-Ox5Py vers 440 nm. Ces disparités se retrouvent également dans les propriétés d'émission. Dans le glycérol, la **TP-3Ox5Py** émet vers 690 nm contre 640 nm pour les TP-Ox5Py, avec des rendements quantiques de fluorescence plus faibles que leurs analogues TP-Py. Dans l'ADN, les TP-Ox5Py conservent la fluorescence commutable des TP-Py avec une émission éteinte dans l'eau et restaurée par ajout d'ADN (Figure 56). La **TP-2Ox5Py** a un rendement quantique plus faible dans le drewAT que la **TP-2Py** (0.038 vs. 0.11) avec une émission vers 631 nm contre 656 nm. Contrairement à la tendance observée en série TP entre les deux et trois branches, il n'y a pas vraiment de baisse du rendement quantique entre la **TP-2Ox5Py** et la **TP-3Ox5Py** et l'émission de cette dernière est déplacée vers le bleu de 25 nm. Nous pouvons donc nous attendre à une interaction légèrement différente qui peut s'expliquer par le fait que les TP-oxazoles contrairement aux vinylo-TP possèdent des accepteurs de liaison hydrogène.

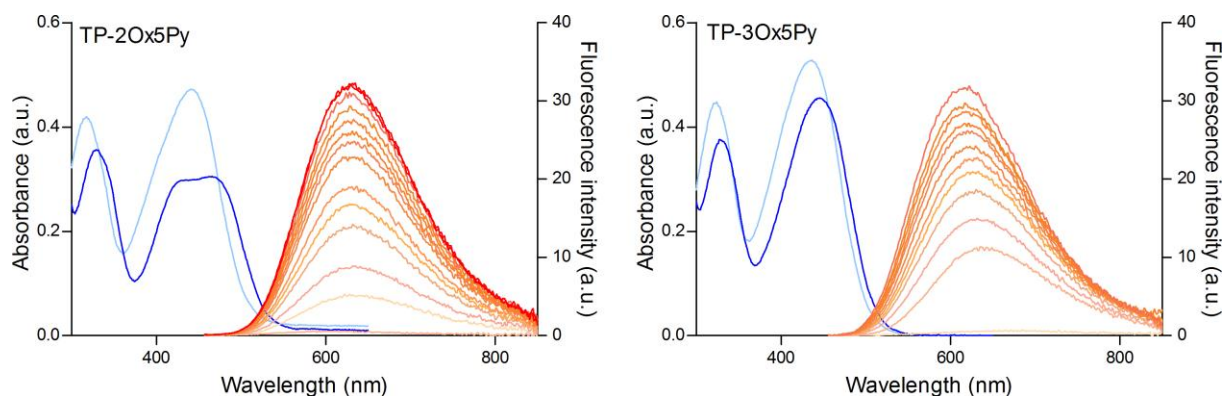


Figure 56. Spectres d'absorption et d'émission des TP-oxazoles en présence de drewAT (I).

Conditions : tampon cacodylate de sodium 10 mM pH 7.2, 100 mM NaCl. **Absorbance :** [TP-Ox5Py] = 10 μ M, TP-Ox5Py libre en solution (bleu ciel) et en présence de 1 équivalents molaire de drewAT (bleu foncé).

Fluorescence : [TP-Ox5Py] = 1 μ M, [drewAT] = 0 - 10 μ M, du rouge pâle au rouge foncé.

Les TP-Ox2Py ont un comportement radicalement différent puisque aucun signal de fluorescence n'est observé lors de l'ajout d'ADN, nous nous intéresserons donc essentiellement aux TP-Ox5Py dans la suite de ce travail.

4. Série N-phenylcarbazole

Pour un même accepteur pyridinium, la rigidification du cœur, obtenue en remplaçant la triphénylamine par un N-phénylcarbazole, donne de meilleurs fluorophores, avec des rendements quantiques dans le glycérol plus élevé (0.33 pour le **Cbz-2Py** contre 0.11 pour la **TP-2Py**). Dans le drewAT, leur comportement est comparable à celui des triphénylamines ; la fluorescence du **Cbz-3Py** est partiellement éteinte alors que le rendement quantique du **Cbz-2Py** est augmenté (Tableau 7).

Tableau 7. Propriétés optiques des marqueurs Cbz dans le glycérol et l'ADN.

		λ_{abs} (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Φ_F	$\epsilon\chi\Phi_F$ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	τ_F (ns)	λ_{2PA}^a (nm)	δ^a (GM)	$\delta\chi\Phi_F$ (GM)
Cbz-2Py	glycérol	444	28 700	575	131	0.33	9 471	1.05	800	190	64
	drewAT	441	21 700	545	94	0.58	12 586	2.50	800	210	121
Cbz-3Py	glycérol	437	61 100	581	144	0.16	9 776	0.77	760	540	84
	drewAT	441	44 200	552	111	0.03	1 326	1.87	820	320	11
Cbz-2Ox5Py	glycérol	410	30 550	560	150	0.29	6 416	nd	nd	nd	nd
	drewAT	415	19 500	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Mesures effectuées dans l'ADN de hareng au lieu du drewAT.

Les dérivés Cbz absorbent moins que les analogues TP et l'absorption est déplacée vers le bleu avec un maximum à 441 nm pour le **Cbz-2Py** dans le drewAT contre 509 nm pour la **TP-2Py**. En émission ils ont comme les TP une fluorescence commutable dans le drewAT, avec des déplacements de Stokes légèrement plus faibles, et émettent environ 100 nm en dessous des triphénylamines, donc dans le vert-jaune (Figure 57).

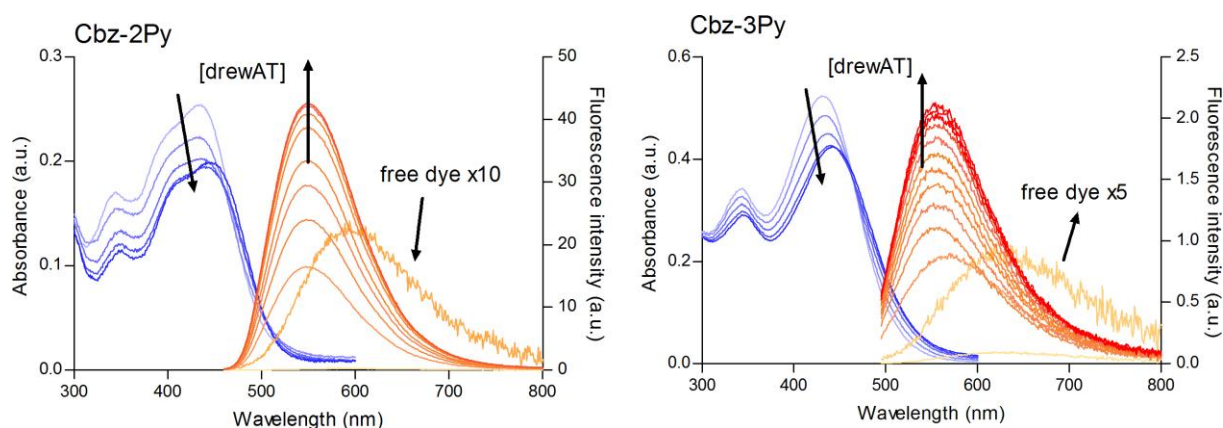


Figure 57. Spectres d'absorption et de fluorescence du Cbz-2Py en présence de drewAT.

Conditions : tampon cacodylate de sodium 10 mM pH 7.2, 100 mM NaCl. **Absorption :** [TP] = 10 μ M, [drewAT] = 0 - 10 μ M. **Fluorescence :** [TP] = 1 μ M, [drewAT] = 0 - 15 μ M.

Le remplacement du pont vinylique par un oxazole a peu d'incidence dans le glycérol. Le **Cbz-2Ox5Py** reste un bon fluorophore avec un rendement quantique de 0.29. Son absorption est encore déplacée vers le bleu par rapport au **Cbz-2Py**, comme cela avait pu être observé entre la **TP-2Ox5Py** et la **TP-2Py**. L'interaction avec l'ADN est par contre radicalement modifiée et la fluorescence du composé n'est pas rétablie en présence d'ADN.

Les propriétés d'absorption à deux photons des Cbz sont moins bonnes que celles des triphénylaminés. La section efficace d'absorption chute en effet de plus de moitié entre les **Cbz-2Py** et **3Py** et les **TP-2Py** et **3Py**. Les valeurs de brillance illustrent bien ces observations ; si l'on considère la brillance monophotonique, le **Cbz-2Py** se classe comme l'un des tous meilleurs marqueurs d'ADN de cet ensemble de molécules, alors que sa brillance à deux photons de 121 GM bien qu'excellente par rapport à la plupart des fluorophores classiques est bien inférieure à celle des TP-Bzim.

5. DP-2Py et BMVC

Nous avons vu que de manière générale, les composés à deux branches présentent de meilleures propriétés optiques dans l'ADN que leurs analogues à trois branches. La **DP-2Py** et le BMVC ont permis également d'évaluer l'influence du groupement phényle pour les composés à deux branches .

Tableau 8. Propriétés optiques de la DP-2Py et du BMVC dans le drewAT.

	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Φ_F	$\epsilon\chi\Phi_F$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
DP-2Py	470	70 800	645	175	0.01	708
BMVC	435	51 000	560	125	0.13	6 630

Le spectre d'absorption de la DP-2Py présente un maximum à 470 nm, soit 40 nm en dessous de la **TP-2Py**, avec un coefficient molaire d'absorption nettement supérieur de 70 800 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit presque que deux fois plus que dans le cas de la **TP-2Py** (Tableau 8). Elle émet à 645 nm, soit presque à la même longueur d'onde que la **TP-2Py** et présente donc un déplacement de Stokes plus important, avec cependant un rendement quantique de fluorescence dix fois plus faible (Figure 58). Le BMVC absorbe presque à la même longueur d'onde que le **Cbz-2Py** mais par contre émet plus haut de 15 nm (560 contre 545 nm). Comme pour la **DP-2Py**,

le BMVC a un coefficient d'absorption molaire plus élevé (51 000 contre 21 700 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour le **Cbz-2Py**) et un rendement quantique plus faible (0.13 contre 0.58 pour le **Cbz-2Py**). L'absence du groupement phényle entraîne donc une modification importante des propriétés optiques des fluorophore et notamment une chute importante de la brillance.

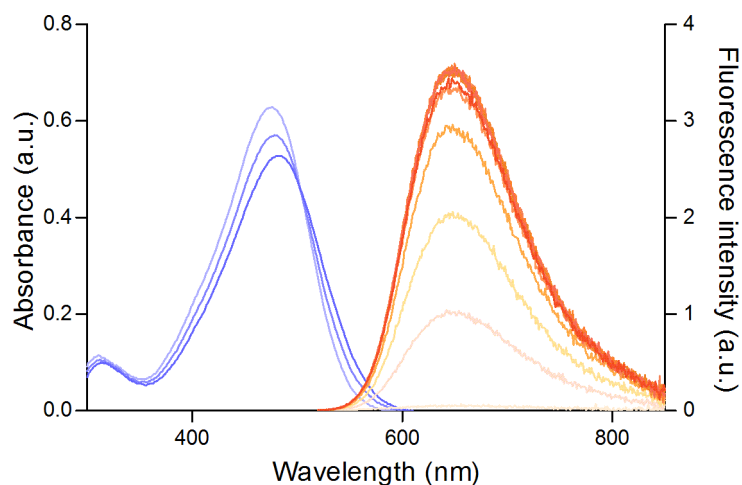


Figure 58. Spectres d'absorption et d'émission de la DP-2Py en présence de drewAT.

UV : [DP-2Py] = 10 μM , [drewAT] = 0 (bleu clair) – 10 μM (bleu foncé). Fluorescence : [DP-2Py] = 1 μM , [drewAT] = 0 (orange) – 10 μM (rouge). Tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa, 100 mM NaCl).

Les deux composés conservent néanmoins les mêmes propriétés relatives que les triphénylaminés et les N-phénylcarbazoles (Tableau 8) :

- Absorption plus faible et déplacée vers les basses longueurs d'ondes pour le carbazole par rapport à la diphenylamine
- Emission de la **DP-2Py** dans le rouge et du BMVC dans le jaune
- Rendement quantique du BMVC plus élevé que celui de la **DP-2Py**.

Cette étude montre bien la difficulté d'optimiser simultanément les propriétés de fluorescence et d'absorption à deux photons des fluorophores, tout en conservant leur capacité à fluorescer sélectivement dans l'ADN. Si le cœur N-phénylcarbazole a permis effectivement d'augmenter le rendement quantique, cela n'a pas compensé la chute des valeurs de section efficace d'absorption à deux photons. De plus la série Cbz a perdu l'émission dans le rouge de la **TP-2Py**, facteur important pour l'imagerie. En revanche la variation des accepteurs a permis d'obtenir la série TP-Bzim possédant des brillances mono- et bi-photoniques optimisées. Pour une série donnée, c'est le composé à deux branches qui donnent les meilleures performances dans l'ADN, mais la suppression du groupement phényle entraîne une chute radicale du rendement quantique.

Nous avons ensuite étudié l'interaction de ces composés avec l'ADN pour déterminer leur sélectivité et leur affinité envers différentes formes d'ADN ainsi que leur mode de liaison.

C. INTERACTION AVEC L'ADN

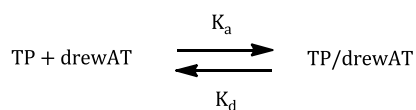
I. Titrations fluorimétriques et mesures d'affinités

1. Choix du modèle mathématique

Devant la complexité des interactions non covalentes, il est délicat de déterminer une équation prenant en compte tous les paramètres possibles (stœchiométrie et coopérativité notamment) pour modéliser un équilibre et calculer des constantes d'affinités. Nous avons cherché à mettre en place une équation mathématique simple, tirant parti de la structure modèle de l'oligonucléotide duplex drewAT nous permettant de modéliser les titrations fluorimétriques de nos composés dans l'ADN pour en tirer des valeurs de constantes d'affinités. De nombreux modèles issus de la biochimie puis repris par la chimie supramoléculaire ont été décrits, depuis le modèle simple de Scatchard [124], à ceux plus complexes de Benesi-Hildebrand [125] et McGee-Von Hippel [126] mis au point pour prendre en compte la coopérativité. Ces modèles élaborés avant l'arrivée des ordinateurs et des logiciels de modélisation non linéaire reposent tous sur une linéarisation des données expérimentales.

Comme tout modèle est perfectible, le sujet fait toujours l'objet de discussion aujourd'hui et il ressort des plus récentes avancées sur le sujet que les méthodes de linéarisation de données sont à éviter. Il est préférable de modéliser directement la valeur physico-chimique mesurée par des équations non linéaires pour prévenir les erreurs numériques inhérentes à la linéarisation [127]. Dans le cas d'un système 1:1, la modélisation non linéaire ne pose pas de problème avec des logiciels de modélisation graphique comme Graphad mais dans des cas plus complexes elle peut nécessiter des logiciels de calcul plus poussés.

Plaçons-nous dans le cas de la réaction entre une triphénylamine (TP) et le drewAT : ce dernier a été choisi de façon à ne donner qu'un seul site de liaison, nous pouvons donc écrire l'équation de réaction suivante :



Le complexe TP/drewAT sera noté « Comp », et nous pouvons introduire les notations suivantes :

- $[X]$: concentration en espèce libre en solution.
- $[X]_0$: concentration en espèce X initiale (ou totale).
- K_a : constante d'affinité du complexe.
- K_d : constante de dissociation du complexe.

Avec :

$$K_a = \frac{[Comp]}{[TP][drewAT]} = \frac{1}{K_d} \quad (1)$$

Les titrations fluorimétriques ont été effectuées à concentration en marqueur constante, celle en ADN étant variable, nous nous placerons donc dans ce cas.

En remarquant que :

$$[TP]_0 = [TP] + [Comp]$$

alors,

$$\frac{[Comp]}{[TP]_0} = \frac{[Comp]}{[TP] + [Comp]} = \frac{\frac{[Comp]}{[TP]}}{1 + \frac{[Comp]}{[TP]}} \quad (2)$$

En combinant les équations (1) et (2), on obtient alors l'équation (3) décrivant l'isotherme de liaison dans le cas d'une stoechiométrie 1:1.

$$\frac{[Comp]}{[TP]_0} = \frac{K_a[drewAT]}{1 + K_a[drewAT]} \quad (3)$$

Dans le cas de la fluorescence, on peut se ramener au paramètre mesuré en écrivant la fluorescence d'une espèce X :

$$F = k_x[X],$$

où k_x est une constante ne dépendant que de l'espèce X pour un appareillage donné.

Ici, cela donne :

$$F_0 = k_{TP}[TP]_0 \quad (4)$$

$$F = k_{TP}[TP] + k_{comp}[Comp] \quad (5)$$

en supposant qu'il n'y a pas de quenching dynamique et que donc le facteur k_{TP} ne varie pas lors de l'ajout d'ADN.

En combinant les équations (4) et (5) et avec l'aide de (3), on obtient l'équation (6) décrivant l'évolution de F/F_0 en fonction de la concentration en ADN.

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1 + A * K_a[drewAT]}{1 + K_a[drewAT]} \quad (6)$$

où A qui vaut k_{comp}/k_{TP} est une constante.

A ce stade, $[drewAT]$ est la solution de l'équation quadratique (7), qui donne une unique solution positive (8).

$$[\text{drewAT}]^2 - [\text{drewAT}]([\text{drewAT}]_0 - [\text{TP}]_0 - K_d) - K_d [\text{drewAT}]_0 = 0 \quad (7)$$

$$[\text{drewAT}] = \frac{([\text{drewAT}]_0 - [\text{TP}]_0 - K_d) + \sqrt{([\text{drewAT}]_0 - [\text{TP}]_0 - K_d)^2 + 4K_d[\text{drewAT}]_0}}{2} \quad (8)$$

Il est courant pour simplifier le problème d'assimiler $[\text{drewAT}]$ et $[\text{drewAT}]_0$, c'est-à-dire de considérer que seule une petite partie de l'ADN s'est liée au marqueur. Cette hypothèse peut être correcte dans des conditions diluées et/ou lorsque les constantes d'affinités sont faibles mais est fautive dans un cas général.³

Dans notre cas il est possible d'estimer simplement la valeur de $[\text{drewAT}]$. A partir des équations (4) et (5), on peut écrire :

$$F - F_0 = B[\text{Comp}] \text{ avec } B = k_{\text{comp}} - k_{\text{TP}} \quad (9)$$

En supposant qu'à saturation en ADN tout la triphénylamine est liée à l'ADN, la concentration en drewAT complexé est alors égale à $[\text{TP}]_0$, ce qui donne l'équation (10).

$$F_{\text{max}} - F_0 = B[\text{TP}]_0, \text{ d'où } B = (F_{\text{max}} - F_0)/[\text{TP}]_0 \quad (10)$$

Sachant que :

$$[\text{drewAT}] = [\text{drewAT}]_0 - [\text{Comp}],$$

on obtient avec les équations (9) et (10) l'expression de $[\text{drewAT}]$:

$$[\text{drewAT}] = [\text{drewAT}]_0 - f[\text{TP}]_0 \text{ avec } f = \frac{F - F_0}{F_{\text{max}} - F_0} \quad (11)$$

Nous disposons donc d'un modèle mathématique pour traiter nos courbes de titrations $F/F_0 = f([\text{drewAT}]_0)$ (équations (6) et (8)) reposant sur deux hypothèses :

- La stœchiométrie de la réaction est 1:1.
- Pas de quenching dynamique de la fluorescence des marqueurs libres en solution lors de l'ajout d'ADN.

Par ailleurs il est possible de calculer la concentration en drewAT libre sans passer par la résolution de l'équation quadratique à partir de l'équation (11) en faisant une troisième hypothèse : à saturation, toute la triphénylamine est liée à l'ADN et chaque molécule contribue également à la fluorescence.

L'hypothèse de la stœchiométrie est plausible car l'oligonucléotide utilisé pour les titrations a été choisi pour n'offrir qu'un site de fixation. Le diagramme de Job [128] permet de vérifier expérimentalement la stœchiométrie mais n'est véritablement valable que pour les équilibres 1:1. La meilleure méthode pour établir la stœchiométrie reste la cohérence du modèle. Si ce dernier coïncide bien avec les points expérimentaux et converge vers un seul jeu de valeurs réalistes pour les paramètres avec des erreurs standards faibles, l'hypothèse de stœchiométrie de départ est validée [127].

Négliger un possible quenching dynamique n'est pas un réel problème étant donnée la contribution négligeable des marqueurs libres à la fluorescence dès le premier ajout d'ADN.

³ La mise en place des équations (1) à (8) est tirée de la référence [127] où certaines erreurs mathématiques - où ce qui nous est apparu comme tel - ont été corrigées.

La troisième hypothèse est correcte s'il n'y a pas d'interactions non spécifiques sur un site autre que celui qui nous intéresse. Le calcul de $[drewAT]$ par l'équation (11) ne sera de toute façon pas utilisé directement pour modéliser les courbes.

2. Application à la série TP

L'étude détaillée de l'affinité et la sélectivité des marqueurs sera présentée en détails dans le II de cette section, et nous allons ici simplement prendre comme exemple la série triphénylamine pour regarder en détail l'application du modèle précédent. Toutes les titrations ont été effectuées à pH 7.2 dans un tampon cacodylate de sodium 10 mM. Nous avons d'abord titré les TP à 1 μ M par le drewAT avec une force ionique maintenue constante par une concentration en NaCl de 100 mM (Figure 59).

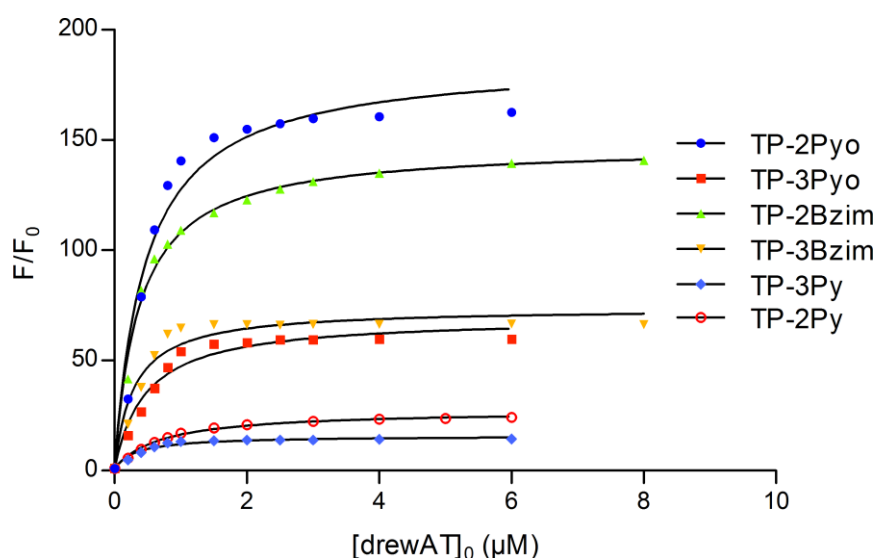


Figure 59. Courbes de titrations fluorimétriques des TP-Py, TP-Pyo et TP-Bzim à 1 μ M par le drewAT.

Conditions : tampon cacodylate de sodium 10 mM (pH 7.2), 100 mM NaCl.

Les courbes noires représentent la modélisation par l'équation (6) en supposant que $[drewAT] = [drewAT]_0$.

A l'aide du logiciel Graphpad 5.0, les titrations ont été modélisées avec l'équation (6) en faisant l'hypothèse que $[drewAT] = [drewAT]_0$. Le cohérence entre le modèle et les courbes expérimentales est à première vue correct, le modèle suit globalement les point expérimentaux et les coefficients de corrélation sont tous supérieurs à 0.9 (Tableau 9).

Tableau 9. Paramètre de fitting des courbes de la Figure 59.

	K_d (μ M)	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95%	R^2
TP-2Py	0.72	0.044 (6%)	0.62-0.82	0.9634
TP-3Py	0.34	0.061 (18%)	0.20-0.48	0.9639
TP-2Pyo	0.46	0.083 (18%)	0.27-0.65	0.9953
TP-3Pyo	0.48	0.086 (18%)	0.28-0.67	0.9626
TP-2Bzim	0.37	0.028 (8%)	0.31-0.43	0.9918
TP-3Bzim	0.29	0.062 (21%)	0.15-0.42	0.9435

Il est cependant nécessaire de regarder aussi l'erreur standard sur le K_d et l'intervalle de confiance à 95%. Ces données représentent l'erreur estimée par le logiciel sur le calcul des paramètres et l'intervalle dans lequel la valeur exacte a 95% de chances de se trouver. Si l'erreur est élevée et l'intervalle large, le logiciel a convergé vers un jeu de solutions mais n'a pas pu déterminer avec précision la valeur des paramètres et la modélisation n'est pas satisfaisante. C'est le cas ici, où malgré une convergence correcte du modèle, l'incertitude sur K_d est élevée.

Nous avons donc calculé dans le cas de la **TP-2Bzim** et de la **TP-2Pyo** la concentration effective en drewAT libre en solution ($[drewAT]$) par l'équation (11). Si l'on compare cette valeur à la concentration en drewAT ajoutée ($[drewAT]_0$), il y a une différence importante qui explique l'échec de la modélisation (Figure 60). Certaines valeurs négatives aberrantes montrent bien que l'ADN est majoritairement sous forme complexée au moins au début de la titration et que $[drewAT] = [drewAT]_0$ est une hypothèse fausse.

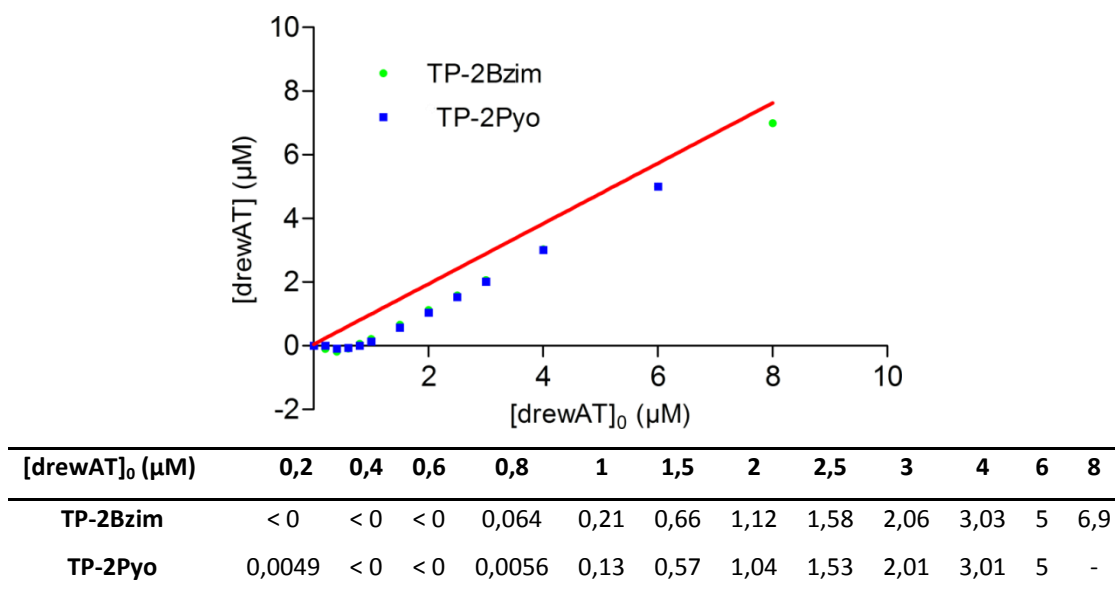


Figure 60. Concentration réelle en drewAT libre en solution en fonction de la concentration en drewAT ajoutée lors des titrations des TP-2Bzim et TP-2Pyo à 1µM.

La droite rouge représente le cas idéal où $[drewAT] = [drewAT]_0$.

Pour pallier cette erreur, nous avons écrit à partir des formules (6) et (8) une nouvelle équation prenant en compte la valeur réelle du drewAT libre en solution et non plus la concentration ajoutée. Cette fonction a été définie comme suit dans Graphpad 5.0 :

$$\begin{aligned}
 B &= X - L_0 - K_d \\
 D &= 4 * K_d * X \\
 C &= 0.5 * (B + \sqrt{B^2 + D}) \\
 Y &= (K_d + F_{max} * C) / (K_d + C)
 \end{aligned}$$

Où L_0 est la concentration en ligand initiale à définir, X la concentration en drewAT ajouté, Y F/F_0 et K_d et F_{max} le couple de paramètres à déterminer. Dans la suite de ce manuscrit, toute modélisation de courbe sera effectuée par cette équation.

Il est d'entrée visible que la nouvelle équation coïncide moins bien avec les points expérimentaux (Figure 61). Si l'on regarde plus précisément les résultats du calcul pour la **TP-2Pyo** et la **TP-2Bzim**, les erreurs

standards sont effectivement très élevées et en plus le logiciel inclut dans l'intervalle de confiance, et donc dans les valeurs acceptables de K_d , des valeurs négatives (Tableau 10).

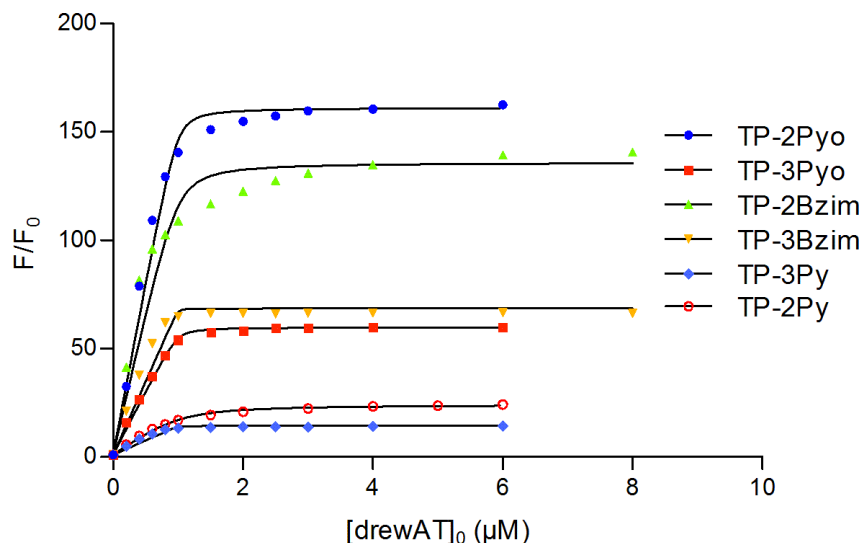


Figure 61. Courbes de titration des TP en fonction de la concentration en drewAT ajoutée.

Courbes noires : modélisation prenant en compte de la concentration réelle en drewAT libre en solution. Mêmes conditions que la Figure 59.

Tableau 10. Paramètre de fitting des courbes de la Figure 61.

	K_d (μM)	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95%	R^2
TP-2Bzim	0.02393	0.007278 (30%)	0.007148-0.04071	0.9698
TP-2Pyo	0.005129	0.002308 (45%)	(-0.0001922)-0.01045	0.8549

Il a été montré que pour déterminer avec précision une constante d'affinité, une titration doit être effectuée à une concentration de l'ordre du K_d , sinon la variation du paramètre mesuré est trop brutale et la partie exploitable de la courbe (avant saturation) est trop faible [2,127]. A partir des valeurs précédentes (Tableau 9) qui sont sans doute sous-estimées, il est possible d'évaluer le K_d des triphénylaminés en dessous de 1 μM . Connaissant cet ordre de grandeur, il est nécessaire avant d'éventuellement appliquer un autre modèle d'optimiser les conditions expérimentales pour appliquer notre modèle d'équilibre 1:1 dans des conditions acceptables.

Les titrations ont donc été reproduites à une concentration en triphénylamine de 0.25 μM . Par ailleurs, la concentration en NaCl a été portée à 400 mM pour augmenter la force ionique et limiter ainsi les interactions électrostatiques non spécifiques en écrantant la charge du ligand. De plus, lors de la fixation dans le petit sillon, le ligand doit déplacer les cations jouant le rôle de contre-ions des phosphates de l'ADN. Ce déplacement va être rendu plus difficile si la force ionique est élevée. Ainsi nous espérons nous placer dans des conditions où seule l'interaction spécifique dans le petit sillon de l'ADN sera détectée et diminuer légèrement l'affinité apparente des ligands pour améliorer la modélisation des courbes. Avec ces nouvelles conditions expérimentales, le modèle coïncide parfaitement avec les données expérimentales (Figure 62).

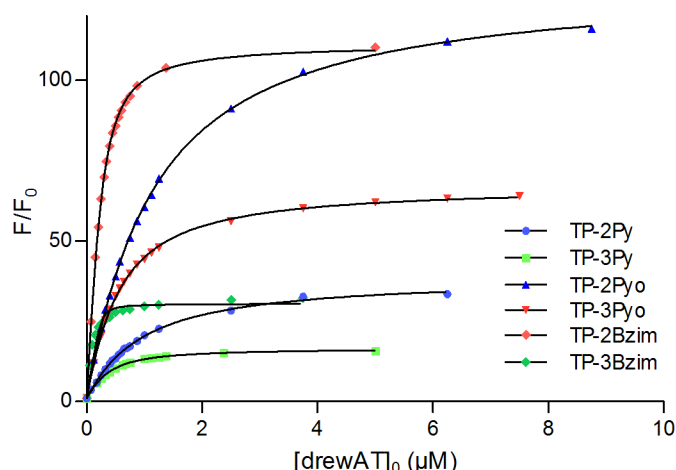


Figure 62. Courbes de titrations fluorimétriques des TP-Py, TP-Pyo et TP-Bzim à 0.25 µM par le drewAT.
Tampon cacodylate de sodium 10 mM (pH 7.2), 400 mM NaCl.
Les courbes noires représentent la modélisation par l'équation (6).

Les paramètres de fitting sont excellents avec des erreurs standard faibles, à la seule exception de la **TP-3Bzim** qui est encore trop affine et dont le K_d ne peut qu'être estimé comme inférieur à 10 nM (Tableau 11). Cette nouvelle mesure rend mieux compte des différences d'affinité entre les composés avec une gamme de valeurs plus étendues. Il y a par exemple un écart d'un ordre de grandeur entre la série TP-Py et la série TP-Bzim. Pour les molécules les moins affines comme les TP-Py, la différence entre cette mesure et la précédente est faible. En effet, plus l'affinité est faible et plus l'hypothèse $[drewAT] = [drewAT]_0$ est valide. Par contre pour les TP-Bzim l'affinité était largement sous-évaluée.

Tableau 11. Paramètres de fit des courbes de la figure 9.

	K_d (µM)	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95%	R^2
TP-2Py	0.8262	0.02309 (2.8%)	0.7775-0.8749	0.9983
TP-3Py	0.2350	0.004516 (1.9%)	0.2252-0.2447	0.9996
TP-2Pyo	1.208	0.01164 (1.0%)	1.003-1.052	0.9998
TP-3Pyo	0.4255	0.006156 (1.4%)	0.4125- 0.4386	0.9996
TP-2Bzim	0.08841	0.002573 (1.4%)	0.08293-0.09389	0.9994
TP-3Bzim	0.01353	0.009187 (68%)	-0.006052-0.03310	0.9086

La **TP-2Pyo** est un cas particulier intéressant, car elle apparaissait comme l'une des molécules les plus affines dans la première mesure et est finalement après optimisation des conditions la molécule la moins affine. Graphiquement cela se traduit par une exaltation de fluorescence beaucoup plus progressive et l'absence de plateau de saturation. Lors de la première titration, on peut supposer que l'augmentation de fluorescence était la traduction d'une interaction majoritairement non spécifique. Ceci est cohérent avec les propriétés optiques de la **TP-2Pyo** inchangées entre le glycérol et l'ADN et qui semblent indiquer que l'interaction avec l'ADN ne change pas la conformation de la **TP-2Pyo**. En diminuant la concentration et en augmentant la force ionique, nous avons supprimé cette interaction non spécifique et observé l'interaction spécifique de plus faible affinité.

Nous disposons donc maintenant d'une méthode de mesure des constantes d'affinités de nos marqueurs dans le drewAT, que nous allons pouvoir transposer à d'autres séquences et structures d'acides nucléiques pour étudier leur sélectivité structurale. Dans la suite du manuscrit, l'analyse des courbes de titrations ne sera plus détaillée et seules les valeurs de constantes d'affinités seront données. Les résultats complets des modélisations non linéaires sont néanmoins disponibles en annexe A.

II. Sélectivité et mode de liaison

Par titrations fluorimétriques dans différentes structures et séquences d'ADN duplex, simple brin et quadruplex, nous avons étudié la sélectivité structurale de nos composés. Par ailleurs des mesures de dichroïsme circulaire nous ont permis de caractériser le mode liaison de nos molécules et de rationaliser les préférences structurales observées. Les séquences étudiées et leur structure secondaire sont répertoriées dans le Tableau 12.

Tableau 12. Séquences et structures des oligonucléotides étudiés.

	Séquence (5' → 3')	Structure
misTA	GGG-TTA-CTA-CGA-ACT-GG	Simple brin
ds26	CAA-TCG-GAT-CG A-ATT-CGA-TCC-GAT-TG	ADN-B
drewAT	CGC-GAA-ATT-TCG-CG	ADN-B
c-kit2	GGG-CGG-GCG-CGA-GGG-AGG-GG	G-4
22AG	AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-GTT-AGGG	G-4
c-myc	TGA-GGG-TGG-GTA-GGG-TGG-GTAA	G-4

1. Sélectivité structurale

a. Sélectivité optique vs. affinité

Pour déterminer la sélectivité structurale, deux paramètres peuvent être pris en compte, l'exaltation de fluorescence à saturation en ADN (F/F_0 , rapport des intensités de fluorescence du complexe F et du marqueur libre F_0 , intégrées sur le spectre) et la constante d'affinité. Cette dernière donne une mesure quantitative de l'affinité mais ne peut pas toujours être calculée avec un modèle simple, nous regarderons donc essentiellement l'exaltation de fluorescence associée à la liaison à une structure d'acides nucléiques pour déterminer la sélectivité structurale des marqueurs. Il est à noter cependant que l'interaction avec l'ADN d'un chromophore ne s'accompagne pas nécessairement d'une variation du signal de fluorescence et qu'un marqueur fluorescent peut interagir fortement avec l'ADN ou une autre matrice biologique en fluoresçant peu et inversement. L'amplitude de l'exaltation et/ou le rendement quantique de fluorescence dans l'ADN ne sont donc pas nécessairement proportionnels à l'affinité. Néanmoins, le paramètre pertinent en microscopie est la brillance du fluorophore sur sa cible et le contraste par rapport au fluorophore libre ou lié sur des cibles secondaires, il est donc légitime d'estimer la sélectivité en fonction des valeurs d'exaltation de fluorescence. Nous parlerons alors de *sélectivité optique*. Nous dirons donc par convention que si une molécule fluoresce dans une structure d'ADN et pas dans l'autre elle est sélective de la première même si fréquemment il y a au moins une interaction électrostatique non spécifique avec la seconde due aux charges nettes positives portées par les fluorophores.

La famille des TP-OxPy illustre bien cette différence entre l'affinité réelle caractérisée par la valeur de la constante d'affinités K_a , et la sélectivité optique quantifiée par l'exaltation de fluorescence. Pour des structures très proches, les TP-Ox5Py sont fluorescentes dans l'ADN et les TP-Ox2Py non. Par contre la **TP-2Ox2Py** en présence d'ADN donne un signal de dichroïsme circulaire induit caractéristique d'une interaction avec l'ADN (Figure 63). Les deux séries de molécules interagissent donc avec l'ADN mais seule l'une d'elles est fluorescente pour des raisons photophysiques qui restent inexplicées.

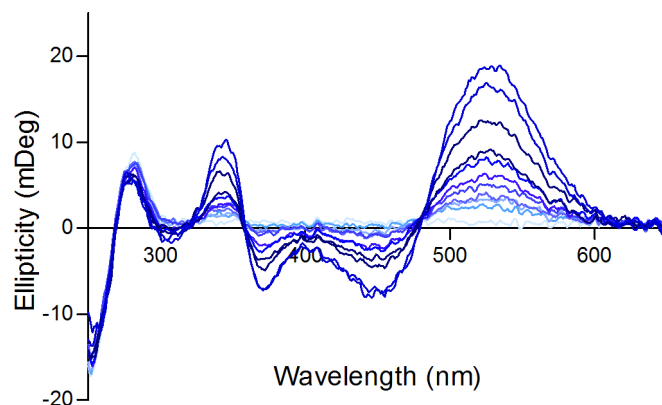


Figure 63. Spectre de dichroïsme circulaire du drewAT lors de l'addition de TP-2Ox2Py.

[drewAT] = 3 μ M, [ligand] = 0 μ M (bleu clair) – 20 μ M (bleu foncé) dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa, 100 mM NaCl).

b. Série triphénylamine

La sélectivité optique des TP-Py pour l'ADN duplex et en particulier les zones AT a déjà été mise en évidence. La série TP a été étudiée par titration fluorimétrique dans l'ARN total (extrait du foie de veau, noté cIRNA pour *calf liver* RNA), dans un oligonucléotide simple brin (ssDNA, noté aussi misTA) ne formant pas de structure secondaire particulière- et dans deux oligonucléotides duplex :

- drewAT : duplex court (14 bp) présentant un seul site de fixation **AAATTT**
- ds26 : duplex long (26 bp) présentant plusieurs sites potentiels et notamment un site **AATT**.

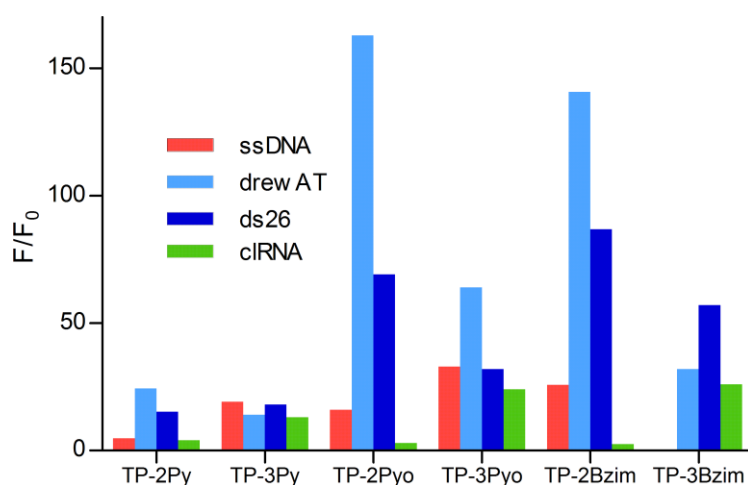


Figure 64. Exaltation de fluorescence F/F_0 des TP en présence de différentes formes d'acides nucléiques.

F = intensité de fluorescence du complexe TP/ADN intégrée sur le spectre, F_0 = intensité de fluorescence intégrée de la TP libre avant l'ajout d'ADN.

[TP] = 1 μ M dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa, 100 mM NaCl).

En regardant les exaltations de fluorescence (*ie* la sélectivité optique) les composés à deux branches ont une sélectivité très nette pour l'ADN duplex par rapport à l'ARN ou au simple brin (Figure 64). En revanche les fluorophores à trois branches n'ont pas cette sélectivité et interagissent pareillement avec l'ARN et l'ADN simple ou double brin, sans doute par des interactions électrostatiques dues à la charge supplémentaire. A l'exception de la **TP-3Py** et de la **TP-3Bzim**, on observe également une préférence pour le *drewAT* et son motif AAATTT par rapport au *ds26* et son motif AATT, à supposer que dans ce dernier cas le site AT soit bien le site de fixation préférentiel. L'affinité des marqueurs de la série TP dans le *ds26* a été mesurée par titration fluorimétrique en employant dans les mêmes conditions expérimentales que pour le *drewAT* (Figure 65). Là encore, le modèle de stœchiométrie 1:1 coïncide avec les courbes expérimentales malgré la longueur plus importante de l'oligonucléotide qui possède plus de sites de liaison potentiels. Comme dans le *drewAT*, les TP interagissent donc avec le *ds26* pour former des complexes 1:1 avec cependant des constantes d'affinités plus faibles d'un ordre de grandeur environ (Tableau 13). A l'exception des **TP-3Bzim** et **TP-3Py**, il semblerait que, pour une molécule donnée, la baisse de l'exaltation de fluorescence d'un ADN à l'autre soit bien corrélée à une affinité moindre.

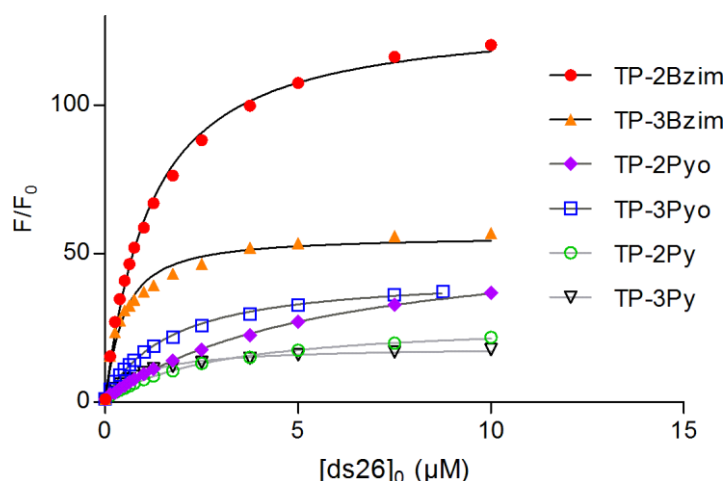


Figure 65. Titrations fluorimétriques des TP par le *ds26*.

[TP] = 0.25 μM dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM *CacoNa*, 400 mM *NaCl*).

Tableau 13. Exaltations de fluorescence à saturation en ADN et constantes d'affinités des TP mesurées par titrations fluorimétriques dans diverses formes d'acides nucléiques.

	ssDNA	cRNA	ds26		drewAT	
	F/F_0	F/F_0	F/F_0	$K_a (10^6 \text{ M}^{-1})$	F/F_0	$K_a (10^6 \text{ M}^{-1})$
TP-2Py	4	4	15	0.35	24	1.2
TP-3Py	19	13	18	1.2	14	4.4
TP-2Pyo	15	2	70	0.18	162	1.1
TP-3Pyo	33	24	32	0.65	64	2.4
TP-2Bzim	25	2	86	0.97	140	12
TP-3Bzim	-	26	57	2.9	32	-

En regardant chaque ADN duplex indépendamment, il apparaît clairement dans les deux cas que les TP-Bzim sont les plus affines devant les TP-Pyo et TP-Py. La série TP-Pyo est néanmoins un peu à part puisque la **TP-2Pyo** est la molécule la moins affine alors que la **TP-3Pyo** fait partie des plus affines juste derrière les deux

TP-Bzim (Tableau 13). Ces observations illustrent bien l'absence de corrélation systématique entre exaltation de fluorescence et affinité réelle puisque la **TP-2Py** présente les exaltations parmi les plus élevées.

Les marqueurs triphénylaminés dicationiques présentent donc une sélectivité optique marquée pour l'ADN duplex associée à une affinité élevée avec des K_a tous supérieurs à 10^6 M^{-1} dans le drewAT. Ce sont également des ligands préférentiels des zones riches en AT : en passant du drewAT au ds26 dont la séquence est mixte (50% GC / 50% AT environ, avec néanmoins un site de fixation AATT favorable) on observe à deux exceptions près (**TP-3Py** et **TP-3Bzim**) une baisse de l'exaltation de fluorescence de près de moitié et dans tous les cas on mesure une affinité environ 10 fois plus faible. En passant de la série Py originelle à la série Bzim, nous avons non seulement largement augmenté le rendement quantique mais aussi l'affinité, puisque la **TP-2Bzim** présente une affinité 10 fois plus élevée que la **TP-2Py** et semble être la molécule la plus prometteuse.

c. Série N-phénylcarbazole

Le comportement de la série carbazole entre ADN simple et double brin est similaire à celui de la série TP (Figure 66) :

- Sélectivité du **Cbz-2Py** pour l'ADN duplex par rapport à l'ADN simple brin (malgré une exaltation plus importante que pour la **TP-2Py**, la sélectivité du **Cbz-2Py** n'est pas meilleure car la fluorescence dans l'ADN simple brin est aussi plus élevée)
- Préférence du **Cbz-2Py** pour le drewAT par rapport au ds26
- Pas de sélectivité du **Cbz-3Py**.

Par ailleurs la similarité de structure entre le **Cbz-2Py** et le BMCV nous a poussé à étudier plus en détails l'interaction entre les dérivés Cbz et l'ADN G4. Trois séquences ont été étudiées, c-myc, c-kit2 et 22AG (Figure 37).

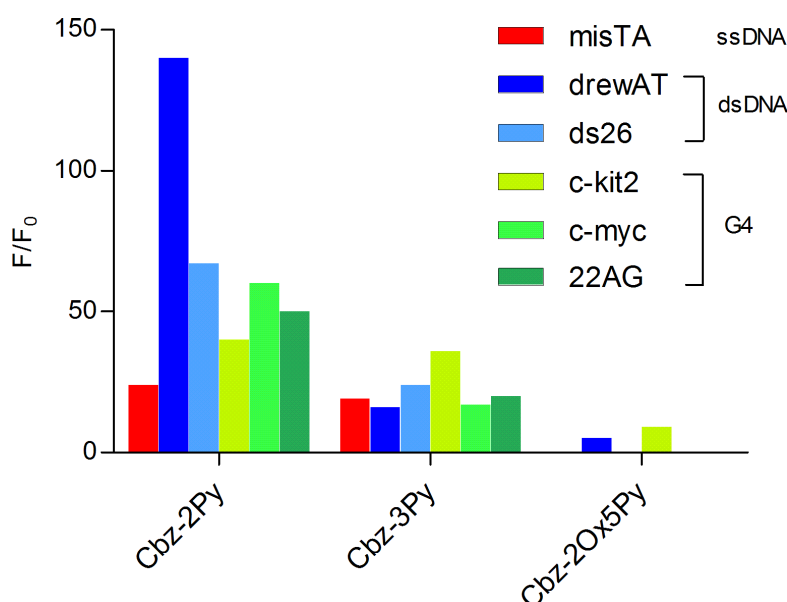


Figure 66. Exaltations de fluorescence des composés Cbz mesurées à saturation en présence de diverses formes d'acides nucléiques.

[Cbz] = 1 μM dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM Cacodylate, 100 mM NaCl).

Les deux dérivés interagissent bien avec les quadruplexes sans discriminer véritablement entre les trois structures. Pour le **Cbz-2Py**, l'exaltation dans les G4 est de l'ordre de 50 environ, ce qui reste plus de deux fois plus faible que dans le drewAT ($F/F_0 = 140$) mais est de l'ordre du ds26 ($F/F_0 = 67$) (Figure 66). La sélectivité du **Cbz-2Py** pour le duplex sur le G4 est donc dépendante de la structure. Le **Cbz-3Py** n'est pas plus sélectif du G4 qu'il ne l'est du simple brin et donne des exaltations comparables dans toutes les structures et séquence, avec toutefois une exaltation légèrement plus forte dans c-kit2 (Figure 66).

Les titrations ont été effectuées dans les deux duplex drewAT et ds26 (Figure 67) et dans les trois structures G4 (Figure 68) à 1 μM en Cbz-Py avec 100 mM de NaCl. L'affinité élevée dans le drewAT a nécessité d'optimiser les conditions de concentration et de force ionique et les mesures ont été répétées pour le drewAT seulement à 0.25 μM en Cbz avec 400 mM de NaCl.

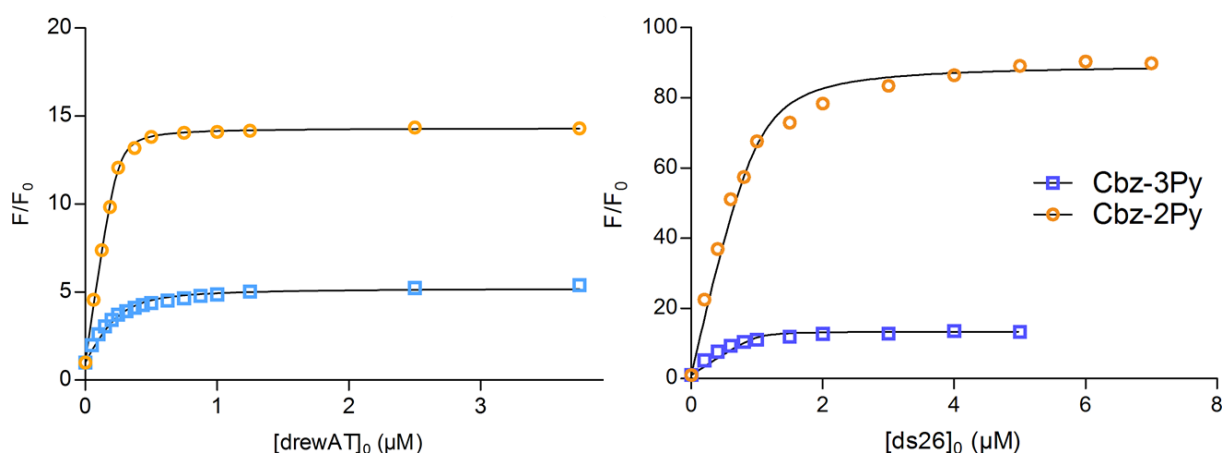


Figure 67. Titrations fluorimétriques des Cbz par les oligonucléotides duplexes drewAT et ds26.

DrewAT : [Cbz] = 0.25 μM , 400 mM NaCl ; ds26 : [Cbz] = 1 μM , 100 mM NaCl. Tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa).

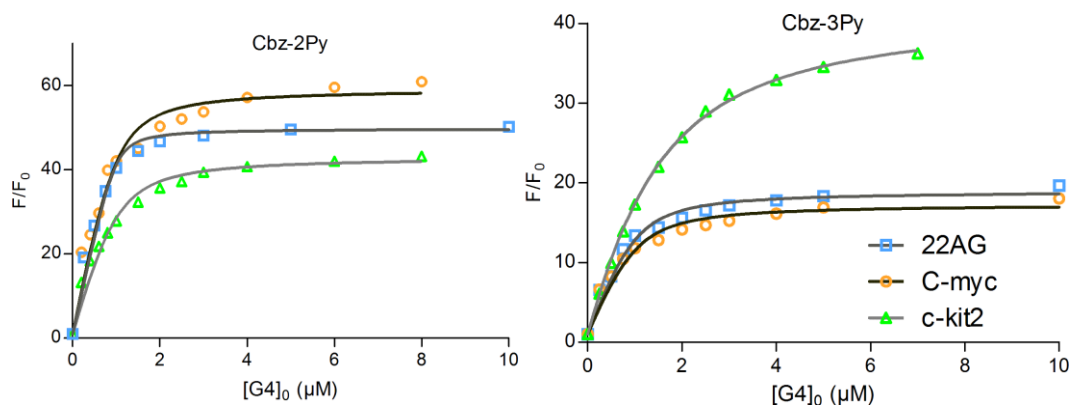


Figure 68. Titrations fluorimétriques des Cbz par de l'ADN G4.

[Cbz] = 1 μM dans un tampon cacodylate de lithium pH 7.2 (10 mM CacoLi, 100 mM KCl).

La série Cbz-Py est globalement plus affine pour l'ADN que la série TP avec des affinités dans le drewAT de $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ et $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, pour le **Cbz-2Py** et le **Cbz-3Py** (Tableau 14). En accord avec les exaltations observées, les Cbz-Py sont également de bons ligands de quadruplexes avec des affinités de l'ordre de 10^6 M^{-1} .

Tableau 14. Constantes d'affinités K_a en M^{-1} des **Cbz-2Py** et **Cbz-3Py** pour les différentes formes d'ADN mesurées par titrations fluorimétriques.

	drewAT	ds26	C-myc	C-kit2	22AG
Cbz-2Py	1.0×10^8	1.1×10^7	7.6×10^6	5.5×10^6	-
Cbz-3Py	1.7×10^7	4.3×10^7	5.1×10^6	1.1×10^6	5.6×10^6

Le **Cbz-3Py** n'est pas optiquement sélectif du duplex par rapport au G4, mais les constantes d'affinités montrent qu'il est bien préférentiellement un ligand de duplex. Il ne discrimine cependant pas entre drawAT et ds26. Dans le cas du **Cbz-2Py**, la sélectivité optique corrèle assez bien avec les affinités mesurées. Il est un ligand d'ADN duplex interagissant préférentiellement avec les séquences AT comme le montre la préférence pour le drawAT sur le ds26. Par ailleurs, c'est aussi un bon ligand de G4 et même si l'affinité mesurée est plus élevée dans le ds26, il ne discrimine pas optiquement entre G4 et ds26.

En plus de présenter un rendement quantique optimisé, les Cbz présentent donc des affinités plus élevées que leur analogues TP-Py. Comme pour la série TP, seul le dérivé à deux branches, **Cbz-2Py**, présente une sélectivité optique pour l'ADN duplex par rapport au simple brin. Les Cbz sont également de bons ligands d'ADN quadruplex et la sélectivité du **Cbz-2Py** pour le duplex par rapport au quadruplex est dépendante de la séquence du duplex.

d. Série TP-Oxazole

Le remplacement de la liaison vinylique par un oxazole n'améliore pas le rendement quantique par rapport aux vinyl-triphénylaminés. Cependant, grâce à une fluorescence résiduelle plus faible dans l'eau les TP-Ox5Py donnent des exaltations de fluorescence plus élevées que les TP-Py et donc potentiellement un meilleur contraste en microscopie.

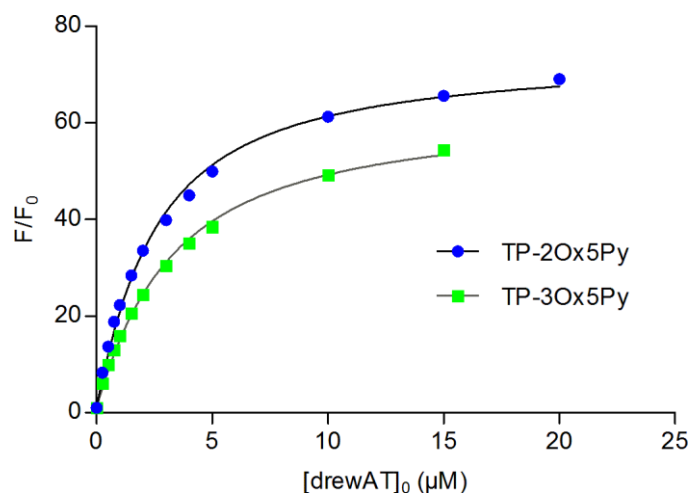


Figure 69. Titrations fluorimétriques des TP-Ox5Py par le drawAT.

[TP-Ox5Py] = 1 μM dans un tampon cacodylate pH7.2 (10 mM CaCoNa, 400 mM NaCl).

Tableau 15. Constantes d'affinités des TP-Ox5Py mesurées dans le drawAT

	K_a (M^{-1})
TP-2Ox5Py	5.0×10^5
TP-3Ox5Py	3.7×10^5

Le signal de fluorescence des TP-Ox5Py étant plus faible, elles ont été titrées par le drewAT à une concentration de 1 μM mais avec concentration élevée en NaCl de 400 mM (Figure 69). Les affinités mesurées sont plus faibles que pour les vinyl-triphénylaminés avec un facteur 10 de différence environ (Tableau 15). Il n'y a pas non plus de différence notable entre la **TP-2Ox5Py** et la **TP-3Ox5Py**.

La variation de la liaison vinylique est donc peu efficace pour optimiser les propriétés optiques, alors que les variations de cœur et d'accepteurs ont donné de très bons résultats et la présence d'accepteurs de liaisons hydrogène n'augmente pas non plus l'affinité des ligands pour l'ADN.

e. *DP-2Py* et *BMVC*

Malgré des rendements quantiques plus faibles dans l'ADN la **DP-2Py** et le **BMVC** ont des exaltations de fluorescence plus élevées que leurs analogues portant un phényle (Figure 70). On peut donc supposer que l'absence du phényle entraîne une chute plus importante du rendement quantique de la molécule libre que de celui dans l'ADN.

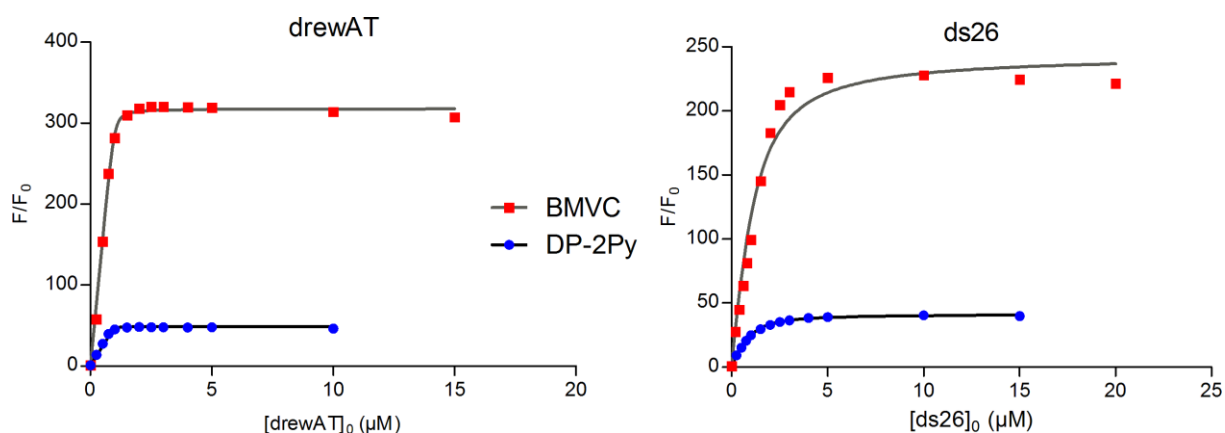


Figure 70. Titrations fluorimétriques de la **DP-2Py** et du **BMVC** par le **drewAT** et le **ds26**.

[Marqueur] = 1 μM dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa, 100 mM NaCl).

La **DP-2Py** et le **BMCV** ont été titrés par le **drewAT** et le **ds26** dans des conditions standards (1 μM en ligand et 100 mM en NaCl) (Figure 70). Les deux ligands ont une affinité apparemment très élevée pour le **drewAT**, et l'optimisation des conditions n'ayant pas été effectuée, la constante de formation du complexe n'a pas pu être calculée dans le cas de la **DP-2Py** et reste soumise à une incertitude importante pour le **BMVC**. Leur affinité dans le **ds26** est en revanche plus faible et des valeurs de constantes d'affinités fiables ont pu être mesurées. (Tableau 16).

Tableau 16. Exaltations de fluorescence à saturation en ADN et constantes d'affinités de la **DP-2Py** et du **BMVC** dans le **drewAT** et le **ds26** mesurées par titrations fluorimétrique.

	ds26		drewAT	
	F/F_0	$K_a (10^6 M^{-1})$	F/F_0	$K_a (10^6 M^{-1})$
DP-2Py	41	3.4	48	-
BMVC	243	1.7	318	89

La comparaison avec la **TP-2Py** ou le **Cbz-2Py** est biaisée par les conditions expérimentales différentes, on peut cependant remarquer que l'absence du groupe phényle ne change pas radicalement l'interaction avec l'ADN. Qualitativement, la **DP-2Py** semble même avoir une affinité plus importante que la **TP-2Py**. Il est aussi

intéressant de noter que au contraire de la **TP-2Py** qui était moins affine que le **Cbz-2Py**, il n'y a pas de différence significative d'affinité entre la **DP-2Py** et le BMVC.

La **DP-2Py** et le BMVC sont donc moins fluorescents dans l'ADN mais aussi visiblement à l'état libre, ce qui leur confère des exaltations de fluorescence plus importantes que pour les **TP-2Py** et **Cbz-2Py**. L'influence du groupement phényle sur l'interaction avec l'ADN est moins évidente mais il semblerait que l'affinité de la **DP-2Py** et du BMVC soit augmentée par rapport à leurs analogues portant un phényle.

2. UV-melting.

Bien que ne permettant pas une mesure quantitative de l'affinité, l'*UV-melting* permet de contrôler qualitativement les constantes de formation calculées à partir des courbes de titrations par une méthode indépendante de la fluorescence. La titration fluorimétrique peut en effet ne pas révéler certaines interactions durant lesquelles l'émission du ligand n'est pas modifiée et demande d'être corroborée par une méthode complémentaire. Nous avons donc mesuré la température de fusion du drewAT seul et en présence des ligands **TP-2Py**, **TP-2Pyo**, **TP-2Bzim** et **Cbz-2Py** (Figure 71).

L'absorbance de l'ADN à 260 nm est mesurée entre 20°C et 90°C puis de nouveau de 90°C à 20°C. De manière inattendue, le drewAT subit deux transitions lors de la dénaturation thermique comme le montre les deux points d'inflexion de la courbe, avec des T_m de 41°C et de 62°C. Lors de la redescente en température, seule une transition, la deuxième, subsiste avec le même T_m de 62°C.

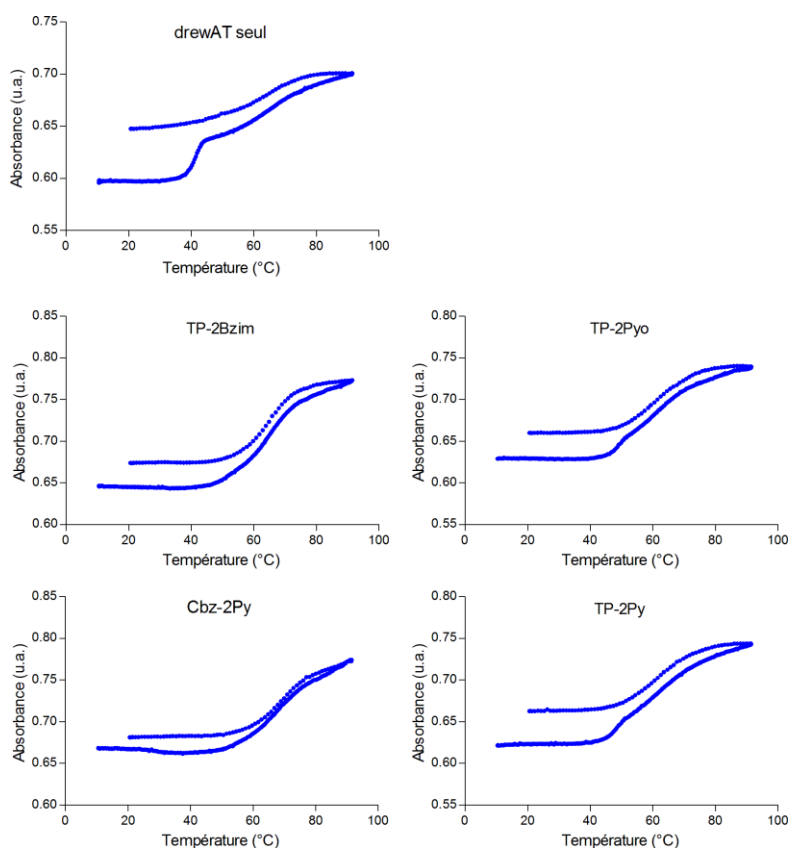


Figure 71. Courbe d'UV melting du drewAT seul et en présence des ligands TP-2Bzim, TP-2Pyo, TP-2Py, TP-2Py et Cbz-2Py.
[drewAT] = 4 μ M, [ligands] = 4 μ M dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (CacoNa 10 mM, NaCl 20 mM).
Absorbance à 260 nm.

La mesure des ΔT_m montre que l'ajout des ligands affecte très différemment les deux transitions :

- **La première transition** est fortement stabilisée, avec des ΔT_m cohérent avec les affinités mesurées par fluorescence. Pour les ligands les plus affins, à savoir la **TP-2Bzim** et le **Cbz-2Py**, la première transition n'est plus discernable et se confond avec la seconde. Les ΔT_m ne peuvent donc pas être mesurés mais sont supérieurs à 10°C. Pour la **TP-2Pyo** et la **TP-2Py**, le ΔT_m est de 7 °C.
- **La seconde transition** que ce soit lors de la montée ou de la descente en température ne semble pas affectée par les ligands.

La forme de la première transition et la valeur du T_m de 40 °C, qui correspond à la valeur théorique attendue, montrent qu'elle correspond à la fusion du duplex. Nous avons attribué la deuxième transition au passage par une structure intramoléculaire intermédiaire de type *hairpin*. Le *drewAT* est en effet autoccomplémentaire et peut former un hairpin de séquence CGCG avec une boucle AAATTT stable (Figure 72). La transition assez lente et la température de fusion de 60°C environ correspondent assez bien à celles rapportées pour un hairpin assez similaire de séquence d(CGCGTTTTTCGCG)₂ [129]. Le *drewAT* duplex se dénature donc à 41 °C pour former d'abord un hairpin puis perdre ensuite vers 60°C toute structure secondaire.



Figure 72. Transition duplex-hairpin du drawAT.
En rouge, les sites de fixation potentiels.

Lorsque le *drewAT* est hybridé en duplex avant utilisation, la concentration en simple brin est en général autour de 200-300 μM . Dans l'expérience d'UV-melting la concentration est de 4 μM seulement (soit 8 μM en simple brin) et favorise la formation d'une structure intramoléculaire de type hairpin, ce qui explique que seule cette dernière se reforme lors de la descente de température. Cette hypothèse expliquerait alors pourquoi la deuxième transition n'est pas stabilisée par les ligands. En effet, le hairpin potentiellement formé a une séquence d(CGCG)₂ et nos ligands ont une préférence pour les séquences riches en AT.

Les mesures de température de fusion sont perturbées par le comportement atypique du *drewAT* mais permette néanmoins de retrouver approximativement les affinités relatives observées en fluorescence : le **Cbz-2Py** apparaît bien comme le ligand le plus affin devant la **TP-2Bzim** avec pour les deux des $\Delta T_m > 10^\circ\text{C}$ et la **TP-2Py** et la **TP-2Pyo** ont toutes les deux des ΔT_m de 8°C. Cette expérience semble aussi confirmer la préférence des TP pour l'ADN riche en AT si l'hypothèse du passage par une forme *hairpin* s'avère vraie.

3. Dichroïsme circulaire et modélisation

Pour essayer d'expliquer les différences d'affinités et d'exaltations de fluorescence observées dans les différentes structures et séquences, et confirmer l'hypothèse d'une insertion dans le petit sillon, nous avons effectué des mesures de dichroïsme circulaire (CD) et des expériences de modélisation moléculaire.

a. Série TP

Le CD requérant une plus grande quantité de matière que la fluorescence, les titrations par CD ont été effectuées à concentration constante en oligonucléotide. Les TP et Cbz sont achiraux et ne donnent pas de signal à l'état libre ; en présence de drewAT en revanche, un signal de CD induit (ICD) est observé dans la zone d'absorption de la molécule (Figure 73).

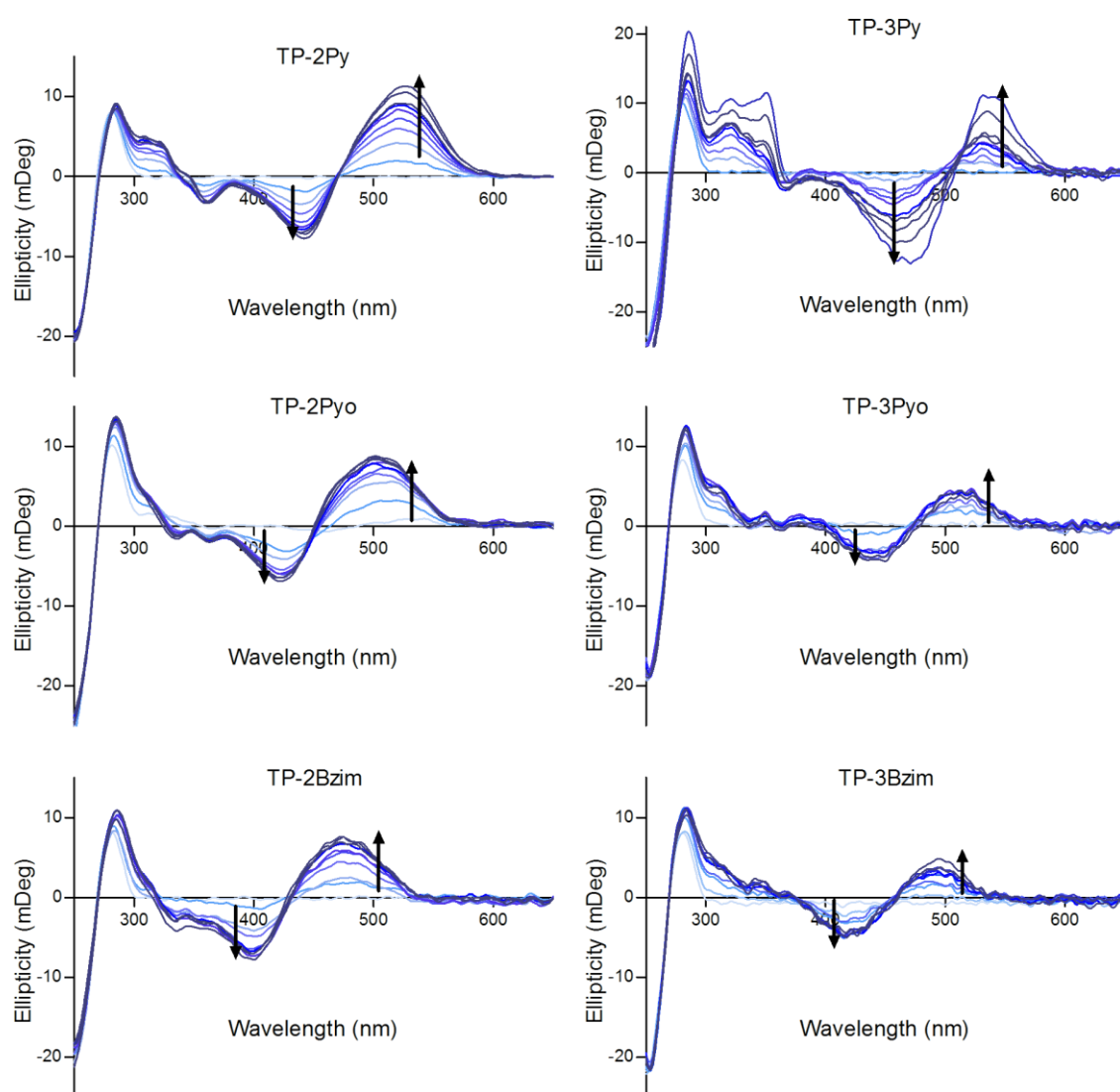


Figure 73. Spectres de dichroïsme circulaire du drewAT lors de l'addition de ligands TP.

[drewAT] = 3 μ M, [TP] = 0 μ M (bleu clair) – 18 μ M (bleu foncé) dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa, 100 mM NaCl).

Le signal ICD va dépendre de l'orientation des moments de transition électroniques du ligand avec le plan formé par une paire de base. Dans le cas des intercalants, l'angle entre le moment de transition et ce plan est

presque nul et donne en général des signaux de CD induit faible et négatif. Dans le cas des ligands de petits sillons, si le moment de transition est orienté le long du petit sillon on obtiendra un fort signal ICD positif [58].

Les molécules de la série triphénylamine donnent un signal de CD induit positif dans la région d'absorption du ligand, ce qui confirme l'hypothèse qu'elles interagissent par insertion dans le petit sillon de l'ADN-B. La faible modification du signal de CD de l'ADN va également dans ce sens puisque l'intercalation a tendance à modifier la structure de l'ADN et donc son signal (Figure 73). Le signal ICD possède aussi une composante négative ; ce phénomène ayant été attribué dans certains cas à la formation d'un dimère dans le petit sillon [58]. Lorsque deux chromophores sont proches, il peut se produire entre leur moment de transition électronique un couplage excitonique responsable de ces signaux duals. Dans notre cas nous avons montré que la stœchiométrie du complexe TP/ADN était de 1:1 et cette hypothèse n'est donc pas recevable. En revanche, les deux branches de nos molécules insérées dans le petit sillon possèdent chacune un moment de transition, ce qui peut par analogie être assimilé à la formation d'un dimère et être à l'origine de ce phénomène (Figure 74).

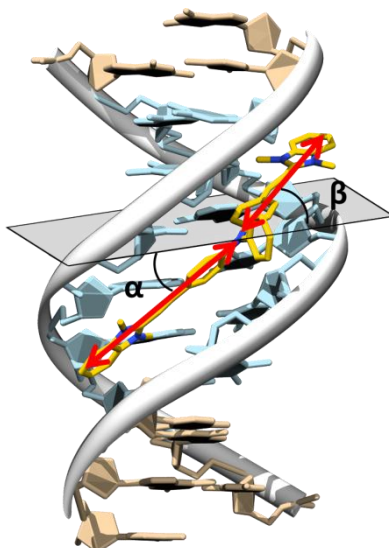


Figure 74. Orientation des ligands TP et de leurs moments de transition dans le petit sillon de l'ADN, exemple de la TP-2Bzim.

Les deux moments de transition électronique de la TP-2Bzim sont orientés avec deux angles opposés par rapport au plan formé par une paire de base.

Le couplage excitonique au sein d'une même molécule possédant deux moments de transition a déjà été observé dans le cas de dimère de porphyrine ou de binaphtyle par exemple et il dépend de l'angle dièdre entre les deux transitions [130,131]. Il s'agit toutefois de molécules possédant une chiralité et donc un signal de CD intrinsèque et ceci n'a pas été observé à notre connaissance en CD induit dans l'ADN.

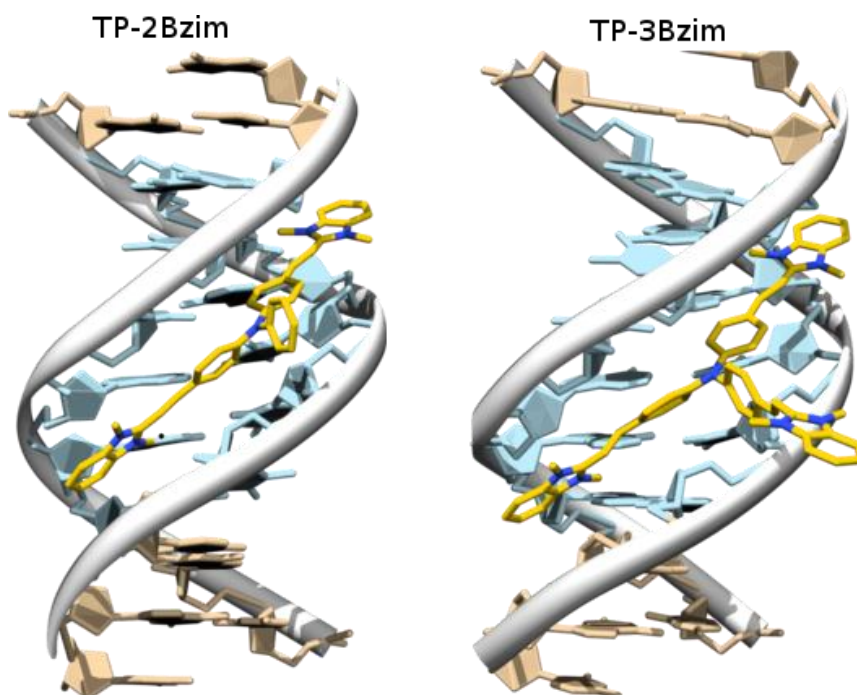


Figure 75. Docking des TP-Bzim dans le drewAT.

Des calculs de *docking* des ligands de la série TP à partir d'une séquence drewAT construite par le logiciel SYBYL-X 2.0 (module Biopolymer builder) ont également permis de confirmer les observations faites par dichroïsme circulaire (Figure 75 & Annexe B). Les résultats de la minimisation de l'énergie en autorisant la flexibilité de la structure de l'ADN montre une insertion du motif en V formé par deux branches des ligands dans le petit sillon de l'hélice B de l'ADN. La flexibilité offerte par le noyau triphénylamine permet à chaque branche de s'insérer au mieux dans le sillon tout en conservant sa planéité pour assurer la conjugaison électronique.

b. Série Cbz : mode de liaison dépendant de la séquence

Le **Cbz-2Py** et le **Cbz-3Py** donnent les mêmes résultats que les TP dans le drewAT, mais ne donnent presque pas de signal ICD dans le ds26 (Figure 76). Seul un faible signal est observé à un ratio 6:1 **Cbz-2Py**:ds26. Par ailleurs lors de l'ajout de Cbz, le signal se brouille dans la zone de l'ADN, ce qui peut être signe d'une perturbation de la structure. Le mode de liaison des carbazoles dépend donc de la séquence d'ADN, ce qui n'est pas le cas pour les TP (Figure 76). Les deux familles TP et Cbz ont toutes les deux une différence d'affinités entre le ds26 et le drewAT avec une préférence pour le drewAT riche en AT, mais dans le cas des Cbz, cette différence va de pair avec un mode d'interaction différent. Comme pour les carbazoles diamidinium décrits par W. David Wilson [85], il est possible que le **Cbz-2Py** s'insère dans le petit sillon AT du drewAT et s'intercale dans le ds26.

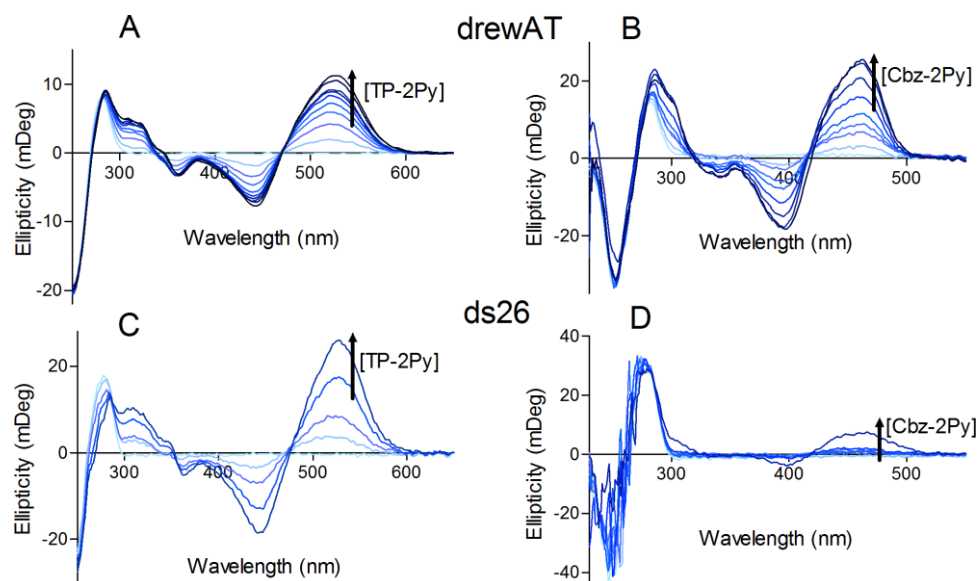


Figure 76. Spectres de dichroïsme circulaire du drewAT (A,B) et du ds26 (C,D) lors de l'addition des ligands TP-2Py (A,C) et Cbz-2Py (B,D).

[drewAT] = 3 μ M (A) et 5 μ M (B), [ds26] = 2 μ M (C) et 2.5 μ M (D) ; [ligand] = 0 (bleu clair) à 6 équivalents molaire (bleu foncé) dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa, 100 mM NaCl).

c. Série TP-oxazole

Le comportement de la **TP-2Ox5Py** dans le drewAT est semblable à celui de la **TP-2Py**. La **TP-3Ox5Py** donne bien, elle aussi, un signal de CD induit signe d'une insertion dans le petit sillon mais avec une modification du signal de l'ADN vers 260 nm importante que l'on n'observe pas dans les autres cas à l'exception de la **TP-3Py** (Figure 77).

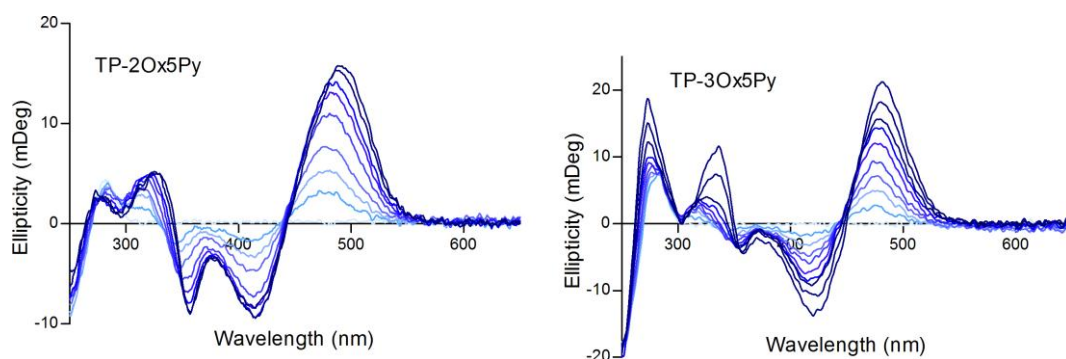


Figure 77. Spectres de dichroïsme circulaire du drewAT lors de l'addition des ligands TP-Ox5Py.

[drewAT] = 2 μ M, [ligand] = 0 μ M (bleu clair) – 12 μ M (bleu foncé) dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa, 100 mM NaCl).

Au vu de leurs spectres de CD induit, les TP-Ox5Py et les TP-Ox2Py interagissent avec l'ADN de la même manière, en s'insérant dans le petit sillon (Figure 63 & Figure 77). Ainsi, malgré des structures quasi-identiques et un mode d'interactions similaire, les TP-Ox2Py ne sont pas fluorescentes dans l'ADN contrairement aux TP-Ox5Py.

PARTIE 2 : TP ANIONIQUES, VERS LE MARQUAGE DE PROTEINES

A. INTRODUCTION : MARQUAGE FLUORESCENT DE PROTEINES

Les protéines, produites à partir des 21 acides aminés naturels lors de la traduction de l'ARN, sont des macromolécules assurant la plupart des fonctions cellulaires. Elles peuvent être des composants structuraux de la cellule (actine), des catalyseurs de biosynthèse (enzymes), des régulateurs de la transcription des gènes.

L'étude des fonctions des protéines, de leur régulation, et de leur implication dans certaines pathologies est donc capitale pour la compréhension des mécanismes cellulaires et le développement de nouvelles thérapies. A cette fin, il est important de développer des sondes permettant de suivre les protéines *in vivo* et de visualiser les interactions protéines/protéines et protéines/ADN qui sont d'une importance particulière. La microscopie de fluorescence est particulièrement pertinente pour de telles applications car elle permet d'imager des phénomènes dynamiques [132–134].

La diversité du protéome rend très difficile la mise au point de marqueurs fluorescents spécifiques d'une protéine ou famille de protéines. Des fluorophores existent pour la détection des protéines sur gel d'électrophorèse ou en solution et la découverte de marqueurs spécifiques est aidée ces dernières années par le développement du criblage haut débit de bibliothèques de protéines et/ou de ligands potentiels. En microscopie en revanche, le marquage direct par des fluorophores organiques de protéines natives n'est pas applicable. L'immunomarquage a pendant longtemps été le seul moyen de visualiser les protéines en cellules mais les biologistes et biochimistes ont développé des techniques de modifications génétiques et enzymatiques des protéines permettant leur observation *in vivo* [135–137].

I. Marquage direct de protéine : détection sur gel et en solution

La révélation par fluorescence des protéines sur gel est possible par marquage purement électrostatique avec par exemple les cyanines, cependant des techniques de marquage plus spécifique, covalent ou non ont également été développées. Ces techniques sont résumées dans la revue de Wayne Patton de chez Molecular Probes Inc [138].

Le marquage covalent utilise la réactivité des thiols (cystéine) ou des amines primaires (lysine) des protéines. Les fonctions réactives portées par les fluorophores peuvent être alors un maléimide pour les thiols [139] et un NHS-ester pour les amines par exemple.

Les marqueurs de la famille Sypro dont la structure n'est pas publique sont utilisés pour le marquage non covalent de protéine en gel. Les complexes métalliques fluorescents sont également employés, comme le Sypro Ruby de structure également inconnue, conçu pour améliorer la sensibilité et la linéarité de la réponse pour la quantification de protéines. Un complexe de Ru(II) tout aussi efficace a été publié par Rabilloud *et al.* comme alternative au Sypro Ruby commercial et coûteux [140].

En 2009, l'équipe de Che a publié un complexe de platine permettant le marquage non covalent de l'immunoglobuline G, de l'albumine du sérum humain ou de la transferrine (Figure 78) [141]. Ce complexe a pu être appliqué à la quantification de protéines sur gel et à l'imagerie cellulaire, même si la nature du marquage *in vivo* reste à déterminer.

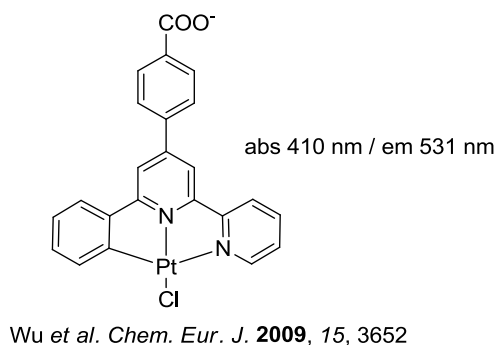


Figure 78. Complexe de platine développé par l'équipe de Che.

Le développement de méthodes combinatoires pour la synthèse de nouveaux fluorophores associé au criblage haut débit de cibles biologiques permettra potentiellement de découvrir d'autres marqueurs non covalents de protéines natives [142]. Ainsi Andrew Hamilton a développé une librairie de porphyrines qui interagissent avec la surface des protéines pour leur détection sélectives sur puce [143].

II. Protéines modifiées : observation intracellulaire par microscopie

La détection de protéines en cellules nécessite l'emploi de méthodes plus complexes pour garantir la sélectivité du marquage. Les biologistes et biochimistes ont donc développé des protéines de fusion (Figure 79.A) ou des protéines recombinantes (Figure 79.B) pour donner des protéines fluorescentes ou bien permettre un marquage enzymatique ou chimique sélectif.

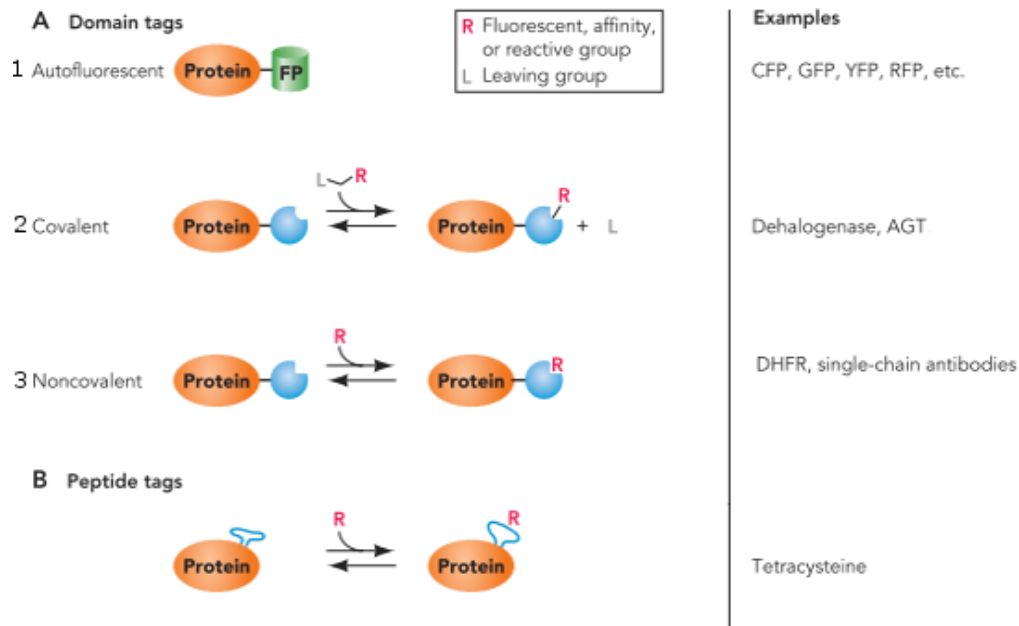


Figure 79. Différents modes de marquage des protéines.

A : protéine fusionnée avec un domaine autofluorescent (**A1**) ou un domaine permettant la reconnaissance spécifique d'un fluorophore par réaction enzymatique (**A2**) ou marquage non covalent (**A3**). **B** : Protéine fusionnée avec un marqueur peptidique réagissant avec un fluorophore. Image adaptée de la réf. [136].

1. Protéines de fusion

a. Protéines autofluorescentes

Depuis la découverte en 1962 de la *Green Fluorescent Protein* (GFP) un grand nombre de protéines fluorescentes aux propriétés optiques optimisées et émettant dans des gammes de longueurs d'ondes variées ont été mises au point. Ces protéines peuvent être exprimées génétiquement et fusionnées avec une protéine d'intérêt au sein d'une cellule, permettant ainsi d'observer par microscopie les interactions et la dynamiques des protéines en cellules vivantes (Figure 79.A1) [144,145].

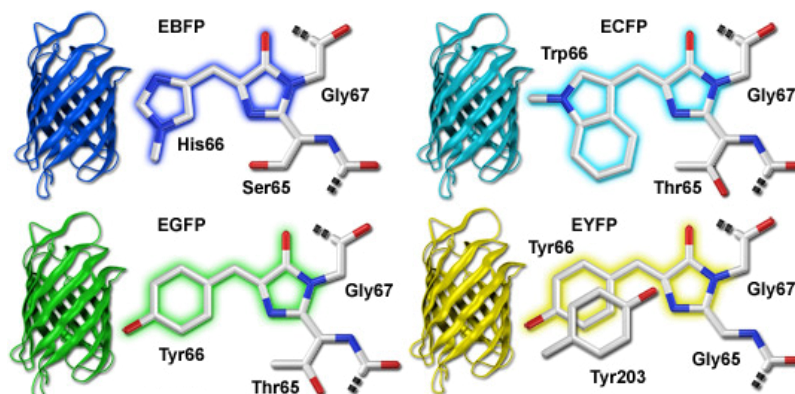


Figure 80. Structure des chromophores de la GFP et de ses variantes.

EBFP : enhanced blue fluorescent protein, **ECFP**, enhanced cyan fluorescent protein, **EGFP** : enhanced green fluorescent protein, **EYFP** : enhanced yellow fluorescent protein. Image adaptée de (www.olympusmicro.com)

La protéine autofluorescente GFP contient un chromophore interne *p*-hydroxybenzylidene-imidazolidone qui se forme par une réaction d'oxydation entraînant la cyclisation de deux acides aminés. De nombreuses

variantes de la GFP ont depuis été développées pour améliorer ses propriétés optiques ainsi que d'autres protéines autofluorescentes formant des fluorophores émettant à différentes longueurs d'ondes (Figure 80).

Les protéines fluorescentes sont des outils très performants, couvrant tout le spectre du visible avec des rendements quantiques élevés. Elles ont cependant des sections efficaces d'absorption à deux photons faibles [146] et une photostabilité moyenne à faible [145] (Tableau 17).

Tableau 17. Propriétés optiques des protéines fluorescentes.

λ_{abs} : longueur d'onde maximale d'absorption, ϵ : coefficient d'absorption molaire à λ_{abs} , λ_{em} : longueur d'onde maximale d'émission, Φ_F : rendement quantique de fluorescence, λ_{2PA} : longueur d'onde maximale d'absorption à deux photons, δ : section efficace d'absorption à deux photons à λ_{2PA} .

	λ_{abs} (nm) ^a	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹) ^a	λ_{em} (nm) ^a	Φ_F ^a	λ_{2PA} (nm) ^b	δ (GM) ^b
EBFP	383	29 000	445	0.31	750	13
ECFP	439	32 500	476	0.40	857	23
GFP	395/475	21 000	509	0.77	nd	nd
EGFP	484	56 000	507	0.60	927	39
EYFP	514	83 400	527	0.61	nd	nd

^a d'après (www.olympusmicro.com) et réf. [145], ^b d'après réf. [146].

b. Marquage enzymatique et non covalent

Il est également possible de fusionner la protéine d'intérêt avec un domaine non fluorescent mais qui permettra d'introduire un fluorophore par réaction enzymatique ou par affinité spontanée (marquage non covalent). Le marquage covalent enzymatique par la méthode du SNAP-tag, développée par l'équipe de Kai Johnsson, utilise la fusion de la protéine d'intérêt avec l'enzyme hAGT⁴, capable de transférer un fluorophore porté par une O⁶-benzylguanine sur un de ses dérivés cystéine (Figure 79.A2) [147]. Un *CLIP-tag* reconnaissant une O⁶-benzylcytosine, a aussi été développé pour le marquage orthogonal de deux protéines par des couleurs différentes [148].

La fusion avec eDHFR⁵ est, elle, utilisée pour le marquage non covalent. L'affinité intrinsèque du triméthoprime pour eDHFR sert ensuite à adresser un fluorophore sur la protéine d'intérêt (Figure 79.A3).

La fusion des protéines d'intérêts avec un SNAP-tag ou l'eDHFR permet de conjuguer virtuellement tous les fluorophores à des protéines d'intérêts. De nombreux rapporteurs fluorescents ont ainsi pu être greffé aux protéines, basés sur les chromophores classiques tels les cyanines, la fluorescéine ou les bodipy, autorisant un grand nombre d'applications, du FRET à la microscopie de super résolution [149,150]. L'eDHFR a été utilisé pour introduire un chromophore excitable à deux photons (BC575) par couplage avec le triméthoprime (TMP) (Figure 81). Ce composé a été à l'origine décrit comme un ligand fluorescent sensible aux ions magnésium et excitable à deux photons [151], mais conjugué au TMP il a permis d'imager avec succès des protéines intracellulaires sous microscopie biphotonique [152].

⁴ **hAGT** : O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, protéine de réparation de l'ADN, capable de transférer le groupe alkyl d'une O⁶-alkylguanine sur un de ses dérivés cystéine.

⁵ **eDHFR** : *E. Coli* dihydrofolate reductase

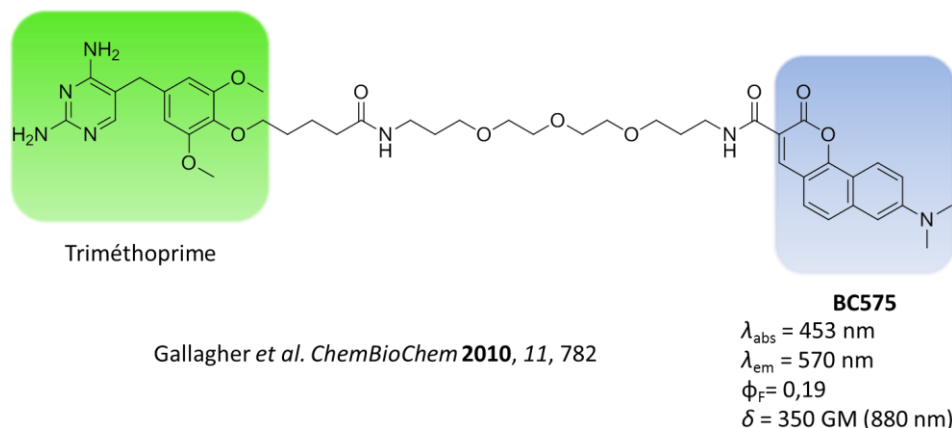


Figure 81. Structure et propriétés du conjugué triméthopime / BC575.
propriétés optiques du BC575 dans l'eau tirées de la réf. [153].

Les protéines fluorescentes bien que largement optimisées par ingénierie moléculaire présentent encore des lacunes que le *SNAP-tag* ou l'eDHFR comblent en permettant en théorie le marquage d'une protéine par n'importe quel marqueur fluorescent. En pratique, l'utilisation de ces techniques est tout de même limitée par l'obligation de modifier génétiquement les protéines d'intérêts avec des domaines de taille importante (≈ 30 kDa) qui peuvent modifier leurs fonctions *in vivo*.

2. Marquage chimique

Comme alternative aux protéines de fusion, des fluorophores ont été développés spécialement pour le marquage de protéines recombinantes exprimant un marqueur peptidique (*peptide tag*) (Figure 79.B). De taille réduite par rapport aux domaines exogènes précédents, ces peptides d'une dizaine d'acides aminés perturbent moins l'activité des protéines d'intérêt et sont conçus pour réagir spécifiquement avec des marqueurs judicieusement fonctionnalisés. Les techniques les plus courantes utilisent la réactivité nucléophile des fonctions thiols des cystéines. Ainsi, le composé fluorescent vert diarsénié FIAsh [154] et ses analogues bleu et rouge CHOxAsH et ReAsH [155], dérivés de la fluorescéine, réagissent par complexation avec un peptide contenant un motif tétracystéine (Figure 82). D'autres fluorophores utilisant la chélation de complexes métalliques par les acides aminés ont aussi été décrits [156]. Sur le même modèle Y.-T. Chang a développé un bodipy-diacrylate capable de reconnaître un peptide contenant deux paires Arg-Cys, par addition nucléophile du thiol de la cystéine sur l'acrylate et la complexation du carboxylate par la diamidine de l'arginine, réussissant ainsi à marquer une protéine sur gel d'agarose et en cellules vivantes [157] (Figure 82). La faible abondance naturelle des cystéines dans les protéines et la forte nucléophilie des thiols par rapport aux résidus aminés permet par ces techniques un marquage spécifique des protéines d'intérêt exprimant le *tag* peptidique.

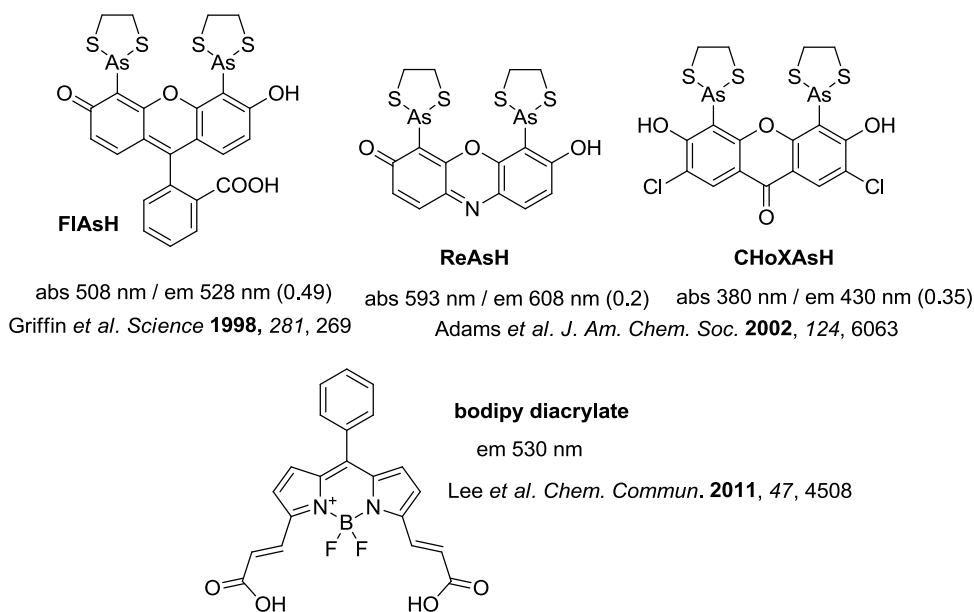


Figure 82. Structure et propriétés de quelques fluorophores utilisés pour le marquage de protéine.

Propriétés optiques mesurées après complexation à la protéine : Longueur d'onde maximale d'absorption (abs) et d'émission (em). Le rendement quantique de fluorescence est indiqué entre parenthèses lorsqu'il a été mesuré.

Conclusion

L'observation des protéines, leur quantification, l'étude de leur localisation et de leurs interactions en cellules ou dans des milieux modèles sont essentielles pour comprendre leur structure et leurs fonctions. En ce qui concerne le marquage par fluorescence, il faut distinguer deux méthodes principales : le marquage direct par des fluorophores organiques applicables en solution ou sur gel d'électrophorèse et le marquage impliquant une modification encodée génétiquement de la protéine d'intérêt pour la microscopie *in vivo*. La première méthode bien qu'ancienne nécessite encore d'être améliorée pour développer des sondes plus sélectives de protéines données et des progrès ont été faits récemment avec l'utilisation de techniques de criblages à haut débit et de puces à protéines. La seconde, plus récente, a permis énormément de découvertes sur les protéines par leur observation *in vivo*. Des progrès peuvent sans doute encore être faits pour arriver au marquage spécifique de protéines d'intérêt avec une modification de leur structure la plus mineure possible mais techniquement n'importe quel marqueur peut être adressé sur une protéine par les méthodes enzymatiques ou chimiques décrites ci-dessus. Le rôle du chimiste est donc de développer des fluorophores les plus performants possibles compatibles avec le milieu physiologique et dont les propriétés de fluorescence ne sont pas perturbées ou même idéalement sont exaltées dans les protéines.

B. DESIGN ET SYNTHÈSE DES MARQUEURS ANIONIQUES

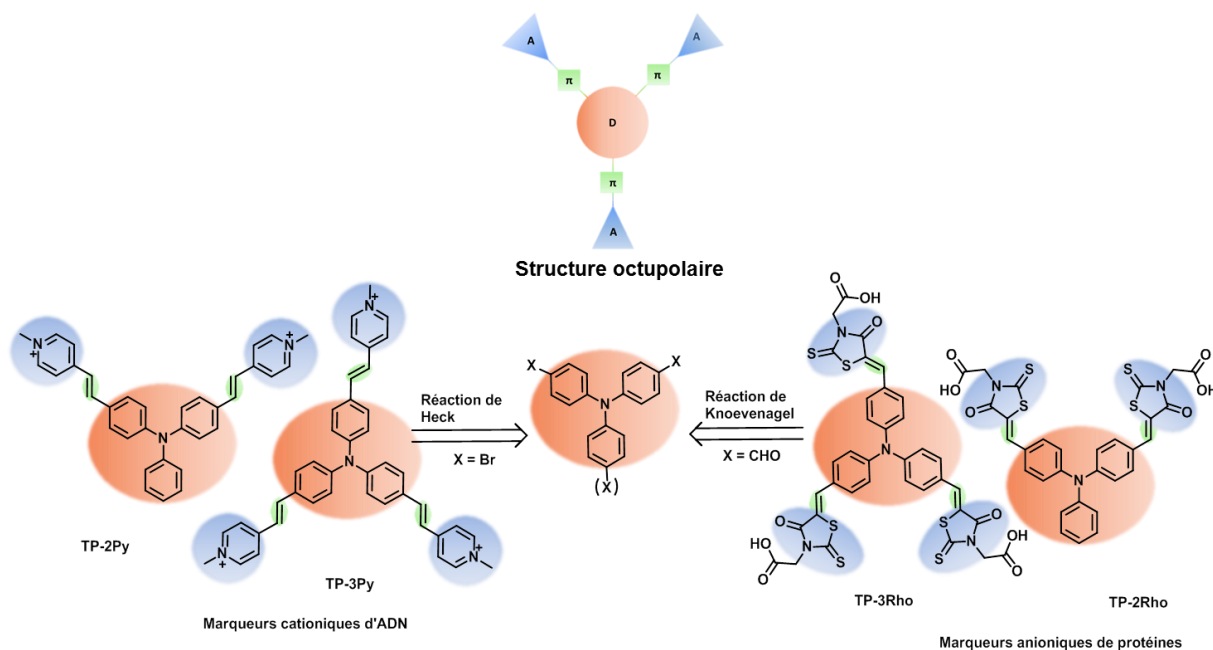


Figure 83. Structure des TP-Py et des TP-Rho

L'étude de structure-activité des marqueurs d'ADN a montré que le motif le plus pertinent pour optimiser l'absorption biphotonique était le motif vinyltriphénylamine et que les modifications du cœur ou du lien vinyl entraînaient une chute de la section efficace d'absorption. Dans le but d'étendre le champ d'application de nos marqueurs et notamment de développer des marqueurs fluorescents biphotoniques de protéines, nous avons donc exploré l'espace structural autour du noyau vinyltriphénylamine. Deux composés à deux et trois branches nommés **TP-2Rho** et **TP-3Rho** chargés négativement en milieu physiologique ont été obtenus en remplaçant les accepteurs cationiques par des groupements 4-rhodanine acide acétique (Figure 83). Ces deux molécules qui absorbent fortement ont déjà été décrites pour des applications photovoltaïques [158]. Les TP-Rho ont une

structure vinyltriphénylamine identique aux TP cationiques et respectent les modèles donneur-accepteur quadrupolaire et octupolaire.

Pour ces études préliminaires, nous avons étudié les TP-Rho dans l'albumine qui a été choisie comme protéine modèle car elle est connue pour se lier facilement aux petites molécules organiques et elle est disponible commercialement et utilisable sans purification.

I. Albumine du sérum humain (HSA)

L'albumine, qui représente 60% du contenu total en protéine dans le sérum, est une protéine de transport capable par conséquent d'interagir avec quantité de ligands endogènes et exogènes [159–162]. Elle peut ainsi modifier fortement les propriétés pharmacocinétiques d'une drogue, comme sa solubilité, sa métabolisation et sa distribution corporelle. Par exemple, l'albumine solubilise et inactive la bilirubine, un ligand endogène de l'albumine, qui est un métabolite toxique de l'hème [162,163]. L'étude de l'interaction entre une drogue et la HSA est donc capitale pour évaluer son comportement *in vivo*. Lors de ses travaux fondateurs sur le sujet, l'équipe de Sudlow a identifié en 1975 deux familles de molécules, la plupart étant des acides carboxyliques, pouvant interagir avec deux sites distincts sur l'albumine, appelés site I et site II [164,165]. Depuis, la HSA a été longuement étudiée et sa structure élucidée ; elle est composée de trois domaines structurellement similaires (I, II et III), chacun étant lui-même divisé en deux sous-domaine A et B. Les sites I et II ont été localisés sur les sous-domaines IIA et IIIA respectivement [166] (Figure 84). D'autres sites pouvant lier des acides gras ou des ions métalliques ont été identifiés ainsi que de multiples sites secondaires non spécifiques [162].

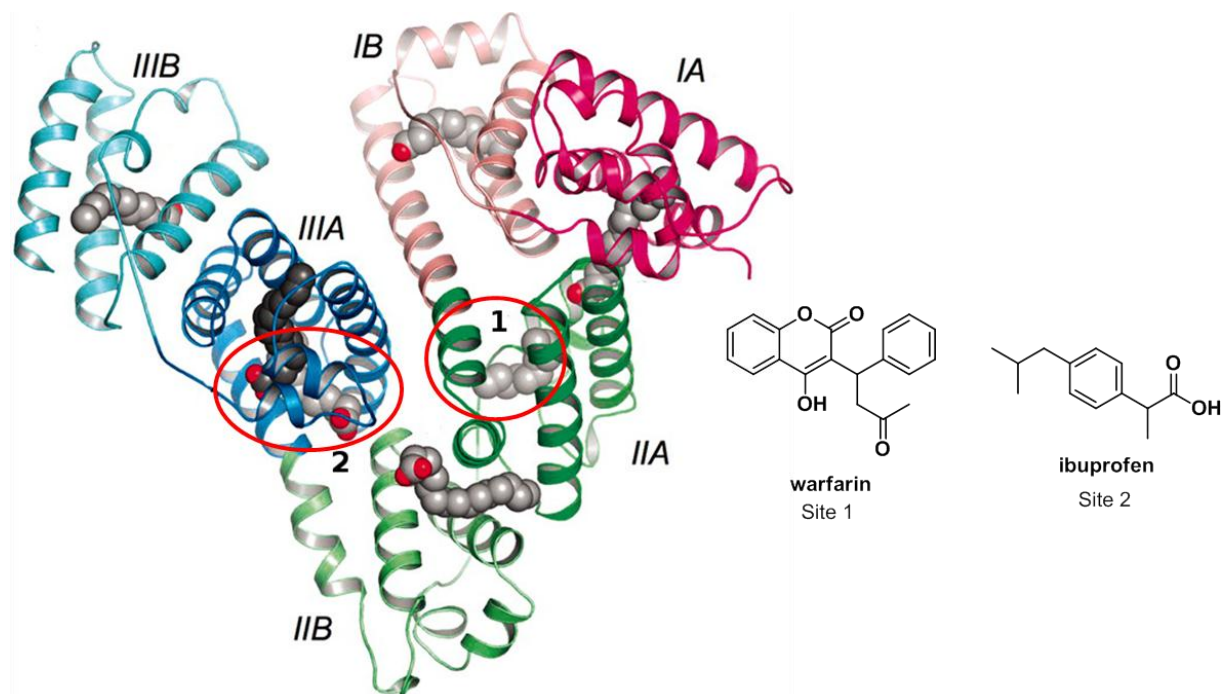


Figure 84. Structure de la HSA et de ses ligands warfarine et ibuprofène.

La plupart des ligands de HSA sont des molécules globalement hydrophobes présentant une partie hydrophile, le plus souvent une fonction acide carboxylique. Les sites de liaison agissent comme des poches hydrophobes où les ligands peuvent s'insérer pendant que les fonctions acides chargées négativement peuvent

interagir avec des résidus cationiques à la surface de la protéine. La diversité structurale des ligands de HSA ne permet pas d'établir une relation de structure-activité claire pour rationaliser leur design. Cependant, devant la quantité de ligands étudiés, un certain nombre de règles généralement vérifiées ont pu être dégagées. Les ligands de site I sont des aromatiques condensés possédant une charge négative centrale et souvent délocalisée (type Warfarine) tandis que les ligands de site II présentent des structures aromatiques étendues avec une charge négative située à l'une des extrémités (type Ibuprofène) [163] (Figure 84).

Devant le grand nombre de ligands potentiels de HSA ou BSA, plusieurs marqueurs fluorescents sélectifs des sites I et/ou II ont pu être mis au point, parmi lesquels, des squaraines (Figure 85) [167] et des analogues du chromophore de la GFP [168]. Les squaraines, faiblement fluorescentes à l'état libre, émettent dans le rouge avec des déplacements de Stokes très faibles et un rendement quantique de 0.12 en interagissant avec le site II de l'albumine. Une petite molécule neutre fluorescente, le DPDAME, se liant sur le site I a été utilisée avec succès comme sonde de conformation de la BSA [169]. Il existe aussi un fluorophore commercial, l'Albumin 580, pour le marquage de l'albumine et d'autres protéines (Figure 85).

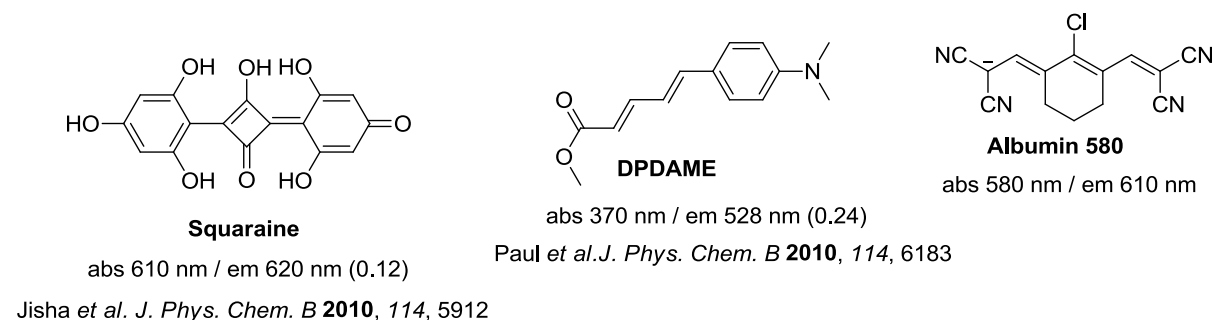


Figure 85. Ligands fluorescents spécifiques de l'albumine.

Propriétés dans l'albumine : Longueur d'onde maximale d'absorption (abs) et d'émission (em). Le rendement quantique de fluorescence est indiqué entre parenthèses.

Certains colorants cationiques comme les triarylméthanés peuvent également marquer la HSA, vraisemblablement par fixation sur des sites secondaires ou par des interactions de surface [105,170].

Avec leur structure aromatique portant des fonctions acides carboxyliques, les TP-Rho répondent aux règles d'ingénierie moléculaire des ligands de HSA. Par ailleurs, la rhodanine est un motif pharmacophore très utilisé [171] dont plusieurs dérivés sont connus pour inhiber des protéines [172,173]. Par ailleurs la structure benzyldène-rhodanine n'est pas sans rappeler la structure du chromophore de la GFP (Figure 80), dont il a été montré qu'il peut fluorescer lorsqu'il interagit de façon non covalente avec d'autres protéines, et notamment la BSA [168]. Les TP-Rho présentent donc toutes les caractéristiques pour donner des marqueurs non covalents de protéines cationiques excitables à deux photons et nous avons étudié leur interaction avec la HSA.

II. Synthèse

Les TP-Rho ont été synthétisées par réaction de Knoevenagel selon la méthode rapportée dans la littérature. La réaction entre la bis- ou tris-(4-formyl)triphénylamine et l'acide 4-rhodanine acétique en présence d'acétate d'ammonium dans l'acide acétique glacial à reflux a donné la **TP-2Rho** et la **TP-3Rho** avec des rendements de 87% et 69% respectivement.

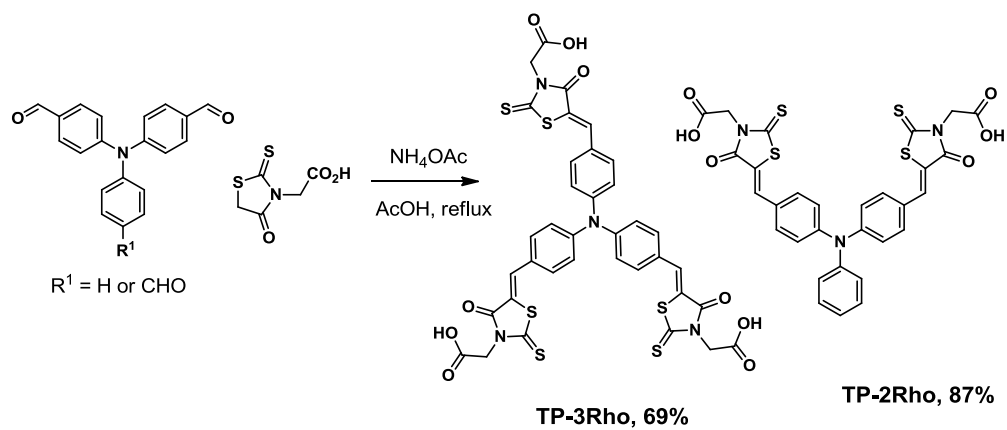


Schéma 9. Synthèse des TP-Rho.

C. PROPRIETES DES TP-RHO

I. Propriétés optiques

1. Propriétés linéaires

Les propriétés optiques ont d'abord été étudiées dans les solvants organiques glycérol et dichlorométhane (Tableau 18). Les deux molécules absorbent vers 500 nm avec des coefficients d'absorption molaire élevés de l'ordre de $78000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Il est intéressant de noter que malgré la forte différence de polarité et de viscosité entre les deux solvants, les propriétés d'absorption ne sont pas du tout affectées. Les TP-Rho émettent vers 620 nm dans le glycérol avec un léger solvatochromisme sur la longueur d'onde d'émission lors du passage au dichlorométhane où elles émettent vers 600 nm. Cependant, c'est surtout sur le rendement quantique que la polarité semble avoir une influence, avec des rendements quantiques de fluorescence qui passent de 8% dans le glycérol à 15% environ dans le dichlorométhane. C'est donc sur l'état excité que l'environnement semble avoir le plus d'influence avec des molécules plus fluorescentes en milieu apolaire.

Tableau 18. Propriétés optiques des TP-Rho dans le glycérol et le dichlorométhane.

Coefficient d'absorption molaire ϵ , rendement quantique Φ_F et section efficace d'absorption δ . Les longueurs d'ondes maximales d'absorption et d'émission sont indiquées entre parenthèses.

	$\epsilon (\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1})$		Φ_F		$\delta (\text{GM})$	
	dichloromethane	glycerol	dichloromethane	glycerol	dichloromethane	glycerol
TP-2Rho	78 800 (500 nm)	76 300 (500 nm)	0.16 (600 nm)	0.09 (615 nm)	379 (870 nm)	n.d.
TP-3Rho	78 500 (490 nm)	78 200 (490 nm)	0.13 (597 nm)	0.07 (625 nm)	425 (820 nm)	n.d.

En présence d'albumine, les TP-Rho absorbent toujours aux mêmes longueurs d'ondes avec seulement un léger hypochromisme, ce qui confirme l'insensibilité des propriétés d'absorption au milieu (Tableau 19).

Tableau 19. Propriétés optiques des TP-Rho en présence de 5 équivalents molaires de HSA.

Tampon cacodylate de sodium 10 mM à pH 7.2.

	$\epsilon (\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1})$	Φ_F	$\delta (\text{GM})$
TP-2Rho	58 900 (500 nm)	0.028 (585 nm)	464 (870 nm)
TP-3Rho	68 900 (486 nm)	0.015 (620 nm)	773 (820 nm)

Comme pour les TP cationiques avec l'ADN, elles ne sont pas fluorescentes en solution dans l'eau, mais le signal est restauré en présence d'albumine avec cependant des comportements différents pour les deux

ligands. Lors de l'ajout d'albumine, le signal de la **TP-2Rho** est progressivement restauré jusqu'à saturation à environ 1 équivalent en HSA ; elle émet alors à 585 nm avec un rendement quantique de 0.028 (Tableau 19 & Figure 86). La fluorescence de la **TP-3Rho** augmente jusqu'à 1 équivalent puis diminue avant de se stabiliser à 2 équivalents en HSA avec une émission à 620 nm et un rendement quantique de fluorescence de 0.015 (Tableau 19 & Figure 87).

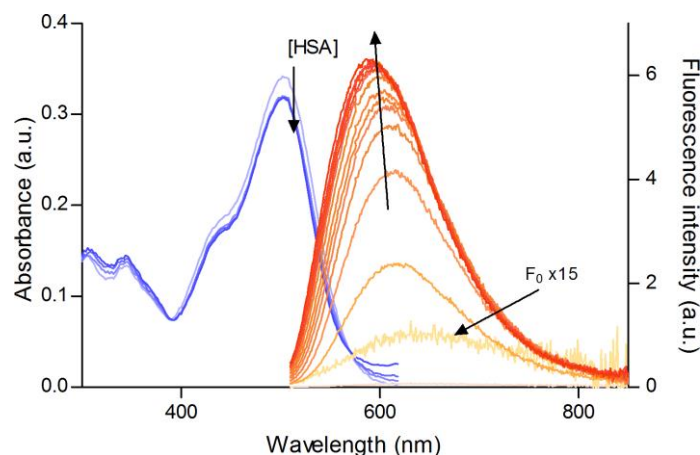


Figure 86. Spectres d'absorption et d'émission de la TP-2Rho lors de l'ajout de HSA.

[TP-2Rho] = 0.25 μ M, [HSA] = 0 – 2.5 μ M, tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa).

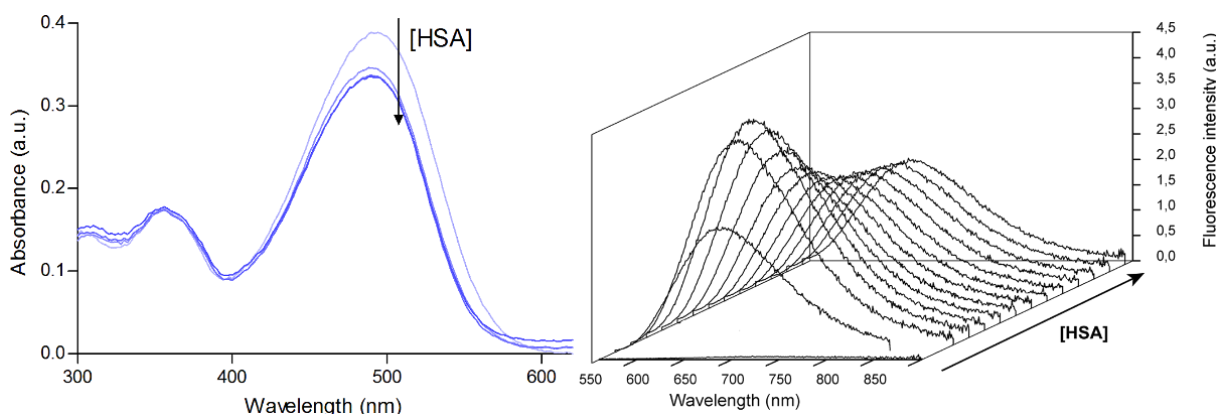


Figure 87. Spectres d'absorption (gauche) et d'émission (droite) de la TP-3Rho lors de l'ajout de HSA.

[TP-3Rho] = 0.25 μ M, [HSA] = 0 – 2.5 μ M, tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa).

Contrairement à ce que nous avons pu supposer pour les ligands d'ADN, l'étude dans le glycérol et le dichlorométhane montre que la fluorescence n'est pas due seulement à l'immobilisation dans la matrice biologique, mais aussi aux interactions hydrophobes : la molécule insérée dans la poche de la protéine est isolée de l'eau et redevient fluorescente. La **TP-2Rho** par sa taille plus réduite est sans doute mieux protégée que la **TP-3Rho**, ce qui explique la différence de rendement quantique entre les deux même si la **TP-3Rho** semble moins fluorescente que la **TP-2Rho** quel que soit le milieu. Cette hypothèse est cohérente avec les longueurs d'ondes d'émission puisque la **TP-3Rho** émet à des longueurs d'onde plus hautes que la **TP-2Rho**, signe qu'elle est dans un environnement plus polaire.

2. Propriétés non linéaires

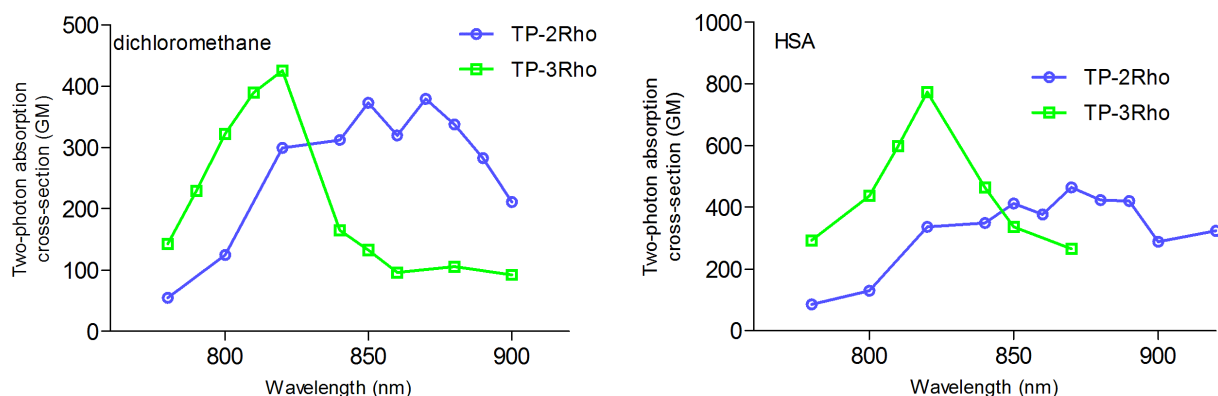


Figure 88. Sections efficaces d'absorption δ des TP-Rho mesurées dans le dichlorométhane et en présence de 5 équivalents molaires de HSA.

Les spectres d'absorption biphotonique mesurés entre 780 et 920 nm dans le dichlorométhane et en milieu aqueux en présence de HSA ont montré que les TP-Rho conservent les propriétés d'absorption à deux photons caractéristiques des TP, avec des sections efficaces vers 400 GM dans le dichlorométhane et allant jusqu'à 800 GM dans la HSA (Figure 88). Pour une molécule donnée, la forme des spectres est similaire dans les deux milieux avec des maximums d'absorption identiques, à 820 nm pour la TP-3Rho et 870 nm pour la TP-2Rho. Les deux molécules absorbent cependant plus fortement dans la HSA. Comme en série cationique, la molécule à trois branches octupolaire absorbe plus fortement que son analogue à deux branches, même si la différence est assez peu marquée dans le dichlorométhane.

En inversant la charge nette des ligands, nous sommes passés d'une famille de fluorophores commutables dans l'ADN à des fluorophores commutables dans la HSA. La charge négative n'étant pas conjuguée avec le système aromatique, l'inversion de charge n'a pas affecté le caractère « push-pull » du système, et les TP-Rho conservent des sections efficaces d'absorption à deux photons comparables à celles des TP-Py.

II. Interaction avec la HSA

1. Titrations fluorimétriques

a. Stœchiométrie-diagramme de Job

Les titrations fluorimétriques mettent en évidence des comportements différents pour les deux molécules. Alors que la **TP-2Rho** donne une courbe classique d'équilibre 1:1 avec une saturation à 1 équivalent de HSA environ, la **TP-3Rho** donne une courbe biphasique avec une augmentation de la fluorescence jusqu'à un équivalent en HSA suivie d'une décroissance avec une saturation à environ 4 équivalents en HSA (Figure 89). La HSA est un système plus complexe qu'un oligonucléotide, présentant au moins deux sites de fixation favorables pour les TP-Rho. La courbe de titration biphasique de la **TP-3Rho** révèle la présence de plusieurs équilibres lors de sa fixation à la HSA.

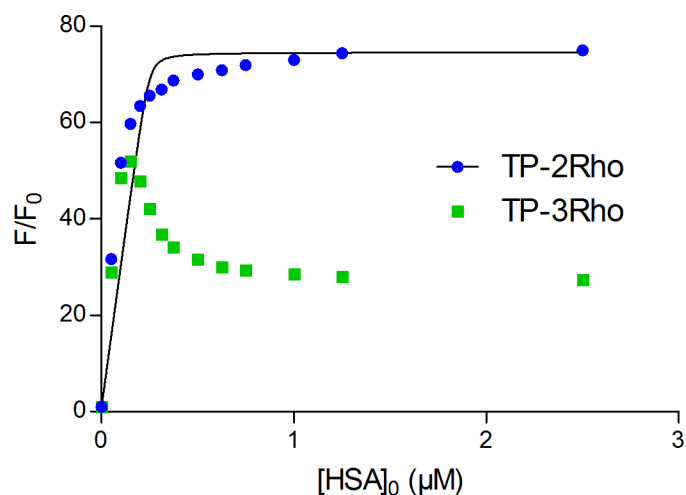


Figure 89. Titration fluorimétrique des TP-Rho par la HSA.

[TP-Rho] = 0.25 μM dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa). La courbe noire est la modélisation de la courbe de la TP-2Rho par l'équation (6).

Il est donc nécessaire, avant d'entamer une étude approfondie des complexes formés, d'estimer leur stœchiométrie. Pour cela nous avons tracé l'évolution de l'intensité de la fluorescence en fonction de la fraction molaire en HSA, la somme des concentrations des deux partenaires étant maintenue constante et égale à 2 μM. Ces courbes appelées diagramme de Job (*Job plot*) présente normalement un maximum à la fraction molaire correspondant au complexe. Pour un complexe 1:1, on aura donc un maximum à 0.5, pour un complexe 2 : 1 à 0.33 et ainsi de suite. Dans le cas de la **TP-2Rho** le maximum est à 0.42 environ, ce qui coïncide le mieux avec une stœchiométrie 1:1, et pour la **TP-3Rho** à 0.2, ce qui correspondrait à une stœchiométrie 5:1 (Figure 90). Cependant dans ce dernier cas, la titration fluorimétrique montre bien que toutes les espèces en présence ne contribuent pas également à la fluorescence puisque celle-ci augmente pour ensuite diminuer avec l'ajout de **TP-3Rho**. Il n'y a donc pas de garantie que le maximum donne la stœchiométrie du complexe. Dans ce cas le diagramme n'est pas interprétable et cet exemple illustre bien les limitations déjà évoquées plus haut de cette technique pour la détermination de la stœchiométrie en dehors d'un système simple 1:1.

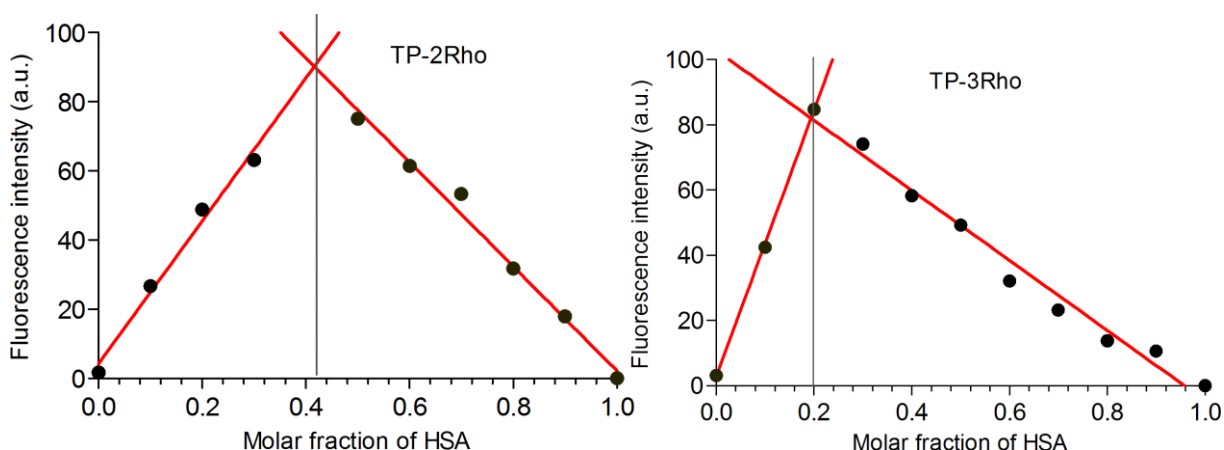


Figure 90. Diagramme de Job des TP-Rho dans la HSA.

[TP-Rho] + [HSA] = 2 μM dans un tampon cacodylate de sodium pH7.2 (10 mM CacoNa).

b. Affinités

Connaissant la stœchiométrie du complexe **TP-2Rho**/HSA, nous avons appliqué notre modèle d'équilibre 1:1 pour déterminer sa constante de formation. A 1 μM , il a été impossible de le faire coïncider avec les points expérimentaux, nous avons donc réitéré l'expérience à 0.25 μM (Figure 89). Là encore il n'a pas été possible d'obtenir une convergence satisfaisante, signe de l'affinité très forte de la **TP-2Rho** pour la HSA et nous n'avons pu qu'estimer le K_d autour du nanomolaire.

La courbe biphasique de la **TP-3Rho** n'a pas pu être modélisée et nous n'avons pas pu en tirer de constantes d'affinités. Il est vraisemblable que la **TP-3Rho** se fixe sur plusieurs sites de la HSA. Par ailleurs la décroissance de la fluorescence après la phase d'exaltation montre que la fixation sur les sites secondaires modifie les molécules déjà fixées et que nous sommes donc en présence d'un système coopératif. L'étude d'un tel système nécessite la mise en place de modèles complexes et a déjà été étudiée [174], nous n'avons cependant pas souhaité approfondir la question.

2. Titrations compétitives-Site de liaison

Pour déterminer le site de liaison des TP-Rho sur la HSA, nous avons effectué des titrations compétitives en présence des ligands de site 1 et de site 2 warfarine et Ibuprofène. En titrant un complexe de TP-Rho/HSA par l'un de ses ligands, nous aurions dû observer une décroissance de fluorescence due au déplacement du ligand fluorescent par le ligand non fluorescent, si ceux-ci interagissent dans le même site. La très forte affinité de nos ligands n'a cependant pas permis leur déplacement ni par la warfarine, ni par l'Ibuprofène qui ont des K_d de l'ordre du micromolaire.

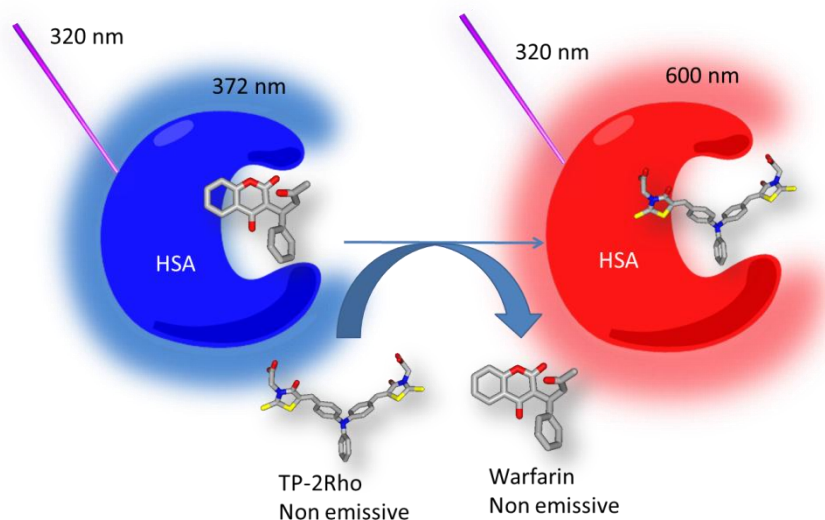


Figure 91. Schéma de principe de l'expérience de titration compétitive

La warfarine est cependant également un ligand fluorescent de la HSA avec une émission entre 340 et 500 nm. Les spectres d'émission de nos composés et celui de la warfarine ne se recouvrant pas, il a été possible d'effectuer l'expérience inverse, à savoir le déplacement de la warfarine par les TP-Rho, selon une technique rapportée dans la littérature (Figure 91) [175]. Dans notre cas, il nous a été possible en excitant le système à

320 nm de suivre simultanément la décroissance de la fluorescence de la warfarine et l'augmentation de la fluorescence de la TP-Rho (Figure 92).

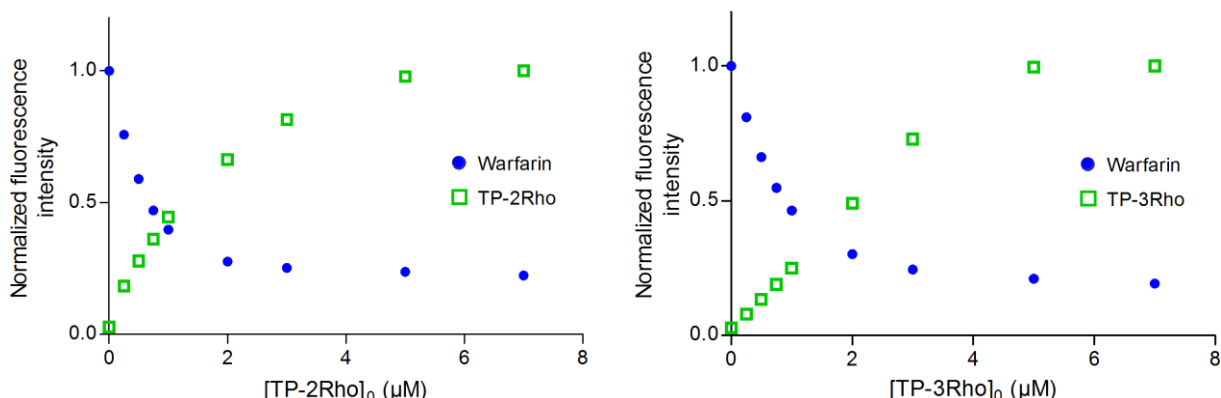


Figure 92. Titration fluorimétrique compétitive de la HSA par les TP-Rho en présence de warfarine.

[HSA] = [warfarine] = 2 μM dans un tampon cacodylate pH7.2 (10 mM CacoNa). λ_{exc} = 320 nm, λ_{em} = 340 – 500 nm (warfarine) et 500 – 600 nm (TP-Rho).

Dans le cas de la **TP-2Rho**, le déplacement presque complet de la warfarine montre bien que nous sommes en présence d'un ligand de site 1. Par ailleurs, cette expérience confirme l'hypothèse d'une stœchiométrie 1:1 car les courbes de fluorescence se croisent approximativement à 0.5, pour une concentration ajoutée de **TP-2Rho** de 1 μM, soit la moitié de la concentration initiale en warfarine.

La **TP-3Rho** donne des courbes plus difficilement interprétables. Elle semble interagir également avec le site 1, puisque la warfarine est bien déplacée mais la courbe de fluorescence de la **TP-3Rho** montre bien une interaction plus complexe puisqu'elle n'augmente pas en corrélation avec la diminution du signal de la warfarine.

L'expérience confirme et enrichit les observations faites lors des titrations fluorimétriques. La TP-2Rho se fixe dans le site 1 de la HSA pour former un complexe de stœchiométrie 1:1 ayant une constante de formation de l'ordre de 10^8 - 10^9 M⁻¹. La **TP-3Rho** donne une interaction plus complexe, avec une fixation principale dans le site 1 et des interactions sur des sites secondaires qui entraînent une modification de la fluorescence du complexe et empêchent toute analyse quantitative avec les moyens dont nous disposons.

3. Comparaison avec les marqueurs d'ADN cationiques

La HSA possède plusieurs sites capables de lier des espèces cationiques, notamment des cations métalliques, et pour véritablement valider le design des TP-Rho et l'inversion de la charge comme source de l'affinité pour la HSA, il est nécessaire de vérifier que les ligands cationiques d'ADN TP et Cbz ne marquent pas la HSA. Nous avons donc titré les TP-Py et le **Cbz-2Py** par la HSA. Seule la **TP-2Py** a montré une exaltation de fluorescence dans la protéine (Figure 93). Cette exaltation est même plus importante que dans l'ADN, néanmoins la constante d'affinité calculée par l'équation (6) n'est que de 8.4×10^4 M⁻¹, soit environ 100 fois plus faible que dans le drewAT. La **TP-2Py** fait donc bien montre d'une sélectivité structurale pour l'ADN duplex par rapport à la HSA. La **TP-3Py** et le **Cbz-2Py** n'ont pas montré de modification significative de leurs propriétés de fluorescence en présence de HSA.

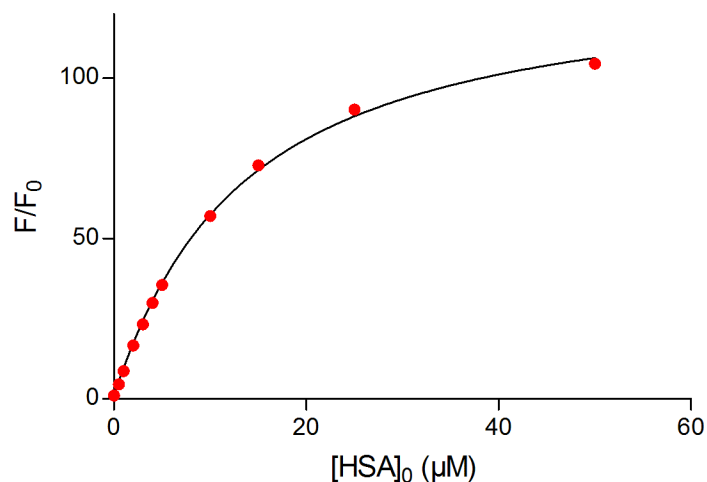


Figure 93. Titration fluorimétrique de la TP-2Py par la HSA.

[TP-2Py] = 2.5 μM dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa). Courbe noire : modélisation par l'équation (6).

Conclusion

La **TP-2Rho** interagit donc avec la HSA par insertion dans le site 1 en formant un complexe de stœchiométrie 1:1 avec un K_d de l'ordre du nanomolaire. La **TP-3Rho**, elle, semble avoir une affinité également forte mais qui n'a pas pu être calculée à cause d'interactions multiples : si elle semble se lier essentiellement dans le site 1 de la HSA, les courbes de titrations montre qu'elle interagit aussi avec des sites secondaires. Malgré des rendements quantiques assez modestes, les deux molécules sont adaptées à la détection d'albumine en solution et potentiellement en gel. Il serait également intéressant des cribler diverses protéines pour identifier de nouvelles cibles. Par ailleurs, les TP-Rho présentent des sections efficaces d'absorption à deux photons très élevées, et correctement vectorisées pourraient être appliquées à l'imagerie à deux photons des protéines *in vivo*. Elles représenteraient alors une alternative aux protéines autofluorescentes dont les sections efficaces d'absorption sont faibles.

Les TP-Rho n'interagissent pas avec l'ADN, et réciproquement les TP et Cbz n'interagissent pas ou faiblement avec la HSA. L'affinité respective de nos marqueurs pour l'ADN ou la HSA est donc d'abord liée à leur charge nette. Les deux familles de molécules ne sont pourtant pas des marqueurs purement électrostatiques et d'autres interactions comme les forces de contacts ou les liaisons hydrogènes sont à l'origine du mode d'interaction unique et de la sélectivité des fluorophores : l'insertion dans le petit sillon de l'ADN duplex pour les cationiques et dans le site 1 de la HSA pour la TP-2Rho.

CHAPITRE 2

APPLICATION EN IMAGERIE CELLULAIRE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

A. IMAGERIE EN CELLULES FIXEES PAR MICROSCOPIE CONFOCALE ET BIPHOTONIQUE

Les résultats préliminaires de microscopie sur cellules fixées obtenu par Guillaume Bordeaux montraient une localisation des marqueurs TP et Cbz-Py dans le noyau (Figure 94). Nous avons poursuivi ces études de manière à mettre en évidence la pénétration cellulaire et la sensibilité de nos fluorophores pour souligner l'optimisation de leurs propriétés optiques.

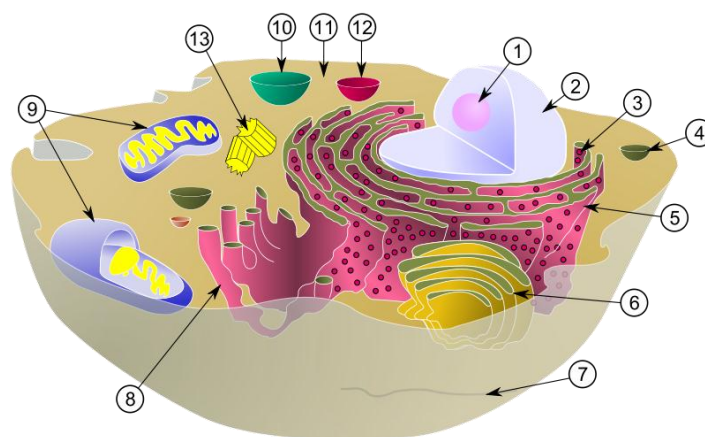


Figure 94. Structure d'une cellule eucaryote type.

1 : nucléole, 2 : noyau, 3 : ribosome, 4 : vésicule, 5 : réticulum endoplasmique rugueux, 6 : appareil de golgi, 7 : cytosquelette, 8 : réticulum endoplasmique lisse, 9 : mitochondries, 10 : vacuole, 11 : cytosol, 12 : lysosome, 13 : centriole.

Les marqueurs d'ADN et d'albumine ont été testés en microscopie sur cellules fixées : la fixation consiste à stopper le développement des cellules en culture par ajout de *p*-formaldéhyde. L'imagerie sur cellules fixées nécessite moins de précautions que pour les cellules vivantes et les échantillons peuvent être conservés dans le temps, en revanche certaines informations fonctionnelles sont perdues puisque la fixation entraîne l'arrêt des fonctions cellulaires et peut perméabiliser certaines membranes. Deux protocoles de marquage ont été utilisés. Dans le premier protocole, les cellules sont cultivées sur une lamelle de microscopie, fixées puis à incubées avec les marqueurs pendant 15 minutes. Comme la fixation perméabilise la membrane cellulaire, cette

méthode permet de s'affranchir des problèmes de pénétration cellulaire pour simplement évaluer les performances photophysiques des marqueurs. Dans le deuxième protocole, les cellules sont incubées vivantes avec les produits pendant deux heures avant d'être lavées puis fixées (voir aussi la partie expérimentale). Ce dernier protocole permet d'évaluer simplement la pénétration en cellules vivantes même si la localisation intracellulaire peut être modifiée par la fixation.

I. Expériences préliminaires

Avant d'étudier en détails les performances des marqueurs TP en imagerie cellulaire par fluorescence, nous avons mesuré l'autofluorescence des cellules comme témoin négatif et déterminé les propriétés biologiques de base de nos marqueurs :

- cytotoxicité
- pénétration cellulaire
- localisation intracellulaire.

1. Autofluorescence

Nous avons enregistré sous microscopie confocale le signal de fluorescence sans marqueur à différentes longueurs d'ondes et puissance d'excitation (Figure 95).

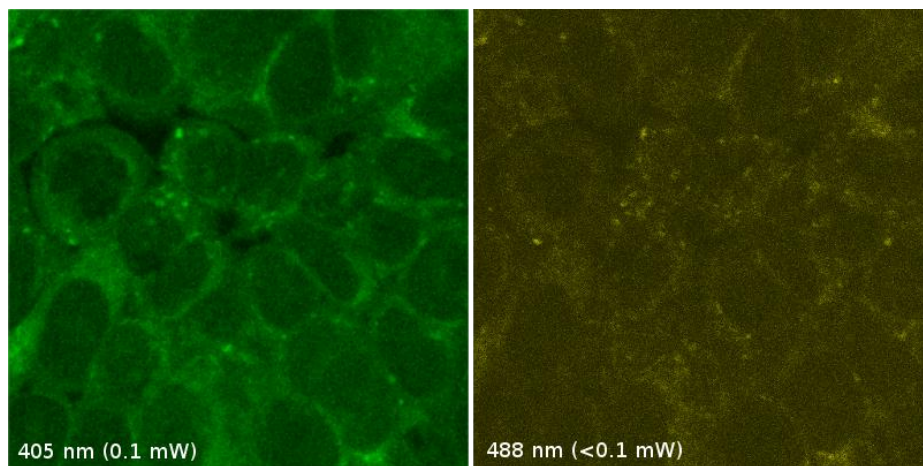


Figure 95. Autofluorescence des cellules HT29 (carcinome du côlon humain) fixées à différentes longueurs d'ondes d'excitation.

$\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, détection = 420 – 600 nm ; $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, détection : 500 - 750 nm.

Entre parenthèse est donnée la puissance en sortie d'objectif.

Images codées en fausses couleurs.

Même sans marqueur, la fluorescence des cellules est loin d'être négligeable, cependant elle tend à diminuer lorsque l'on augmente la longueur d'onde d'excitation. A 405 nm l'autofluorescence est importante même à faible puissance, alors qu'à 488 nm, dans les conditions employées pour exciter et visualiser les marqueurs TP, elle est beaucoup plus faible. Cette expérience montre bien l'intérêt de développer des marqueurs dans le proche infra-rouge et/ou biphotonique. Aucun signal d'autofluorescence n'a en effet été enregistré dans le visible sous excitation biphotonique à 800 nm.

2. Cytotoxicité

Pour la série de marqueurs d'ADN, la cytotoxicité a été déterminée par nos collaborateurs à l'institut d'Alembert de l'ENS Cachan sur une lignée cellulaire 3T3 par test MTT (Figure 96).

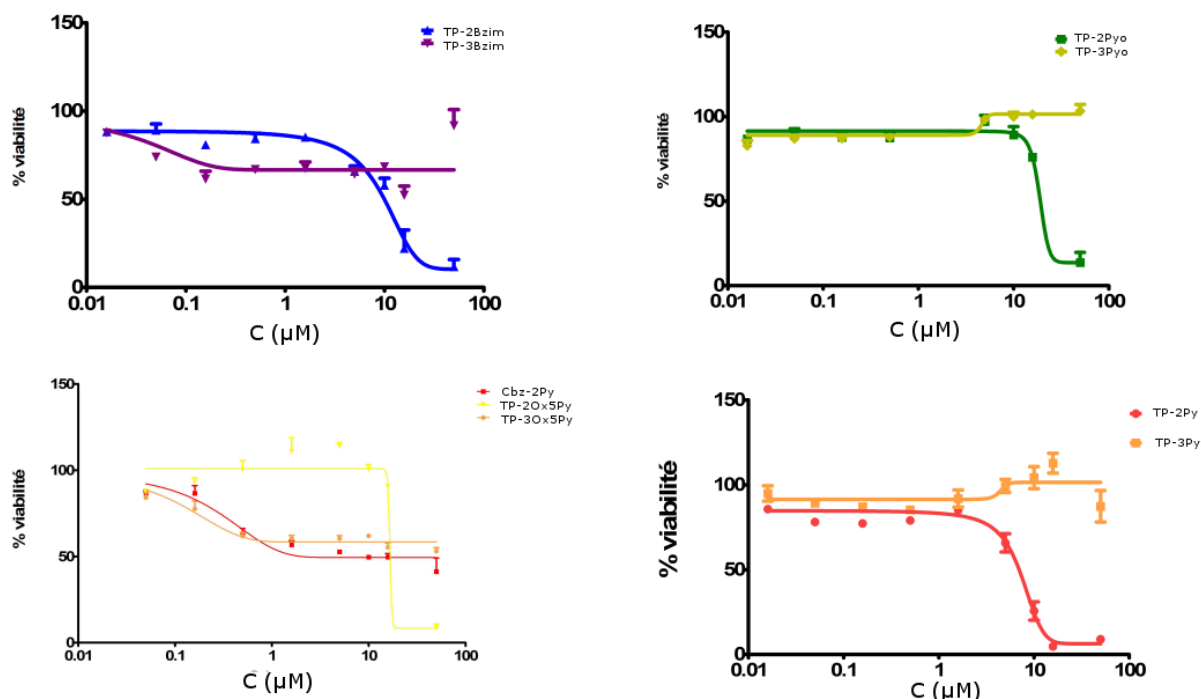


Figure 96. Cytotoxicité des marqueurs d'ADN sur la lignée cellulaire 3T3 (fibroblaste murin).

Pourcentage de viabilité des cellules en fonction de la concentration en marqueur C (μM).

Quelle que soit la série de marqueurs, ces derniers sont très peu cytotoxiques. En série TP, les composés à deux branches ont une IC_{50} vers 10 μM tout comme le **Cbz-2Py**, soit bien au-dessus des concentrations utilisées en microscopie alors que les trois branches ne sont pas cytotoxiques du tout. En série TP-oxazole, une légère baisse de la viabilité cellulaire est observée, mais pas suffisante pour calculer une IC_{50} .

La cytotoxicité des **TP-2Rho** et **TP-3Rho** a été mesurée par le service de criblage cellulaire de l'ICSN sur deux concentrations seulement, à 1 μM et 10 μM. Sur les deux lignées cellulaires testées, HT29 et MRC-5, aucune cytotoxicité n'a été observée aux deux concentrations.

3. Pénétration et localisation intracellulaire

Pour les séries TP et Cbz, la localisation dans le noyau et le marquage spécifique de l'ADN duplex en cellules fixées ont déjà été mis en évidence et ont été évoqués dans l'introduction. En revanche, le protocole utilisé ne permettait pas de mettre en évidence la pénétration en cellules vivantes, d'autant que l'absence de toxicité aurait pu laisser penser que les molécules ne pénétraient pas en cellule sans perméabilisation préalable. Les molécules ont donc été observées sur des cellules HT29 fixées après incubation en cellules vivantes (protocole 1). Lors de l'incubation, les cellules sont donc vivantes et aucun détergent ou produit n'est employé pour perméabiliser les membranes ou faciliter la pénétration des molécules. Les images obtenues sont très semblables en termes de brillance et de localisation à celles obtenues par incubation en cellules fixées et

montrent donc bien que les cellules pénètrent parfaitement en cellules vivantes (Figure 97). Cette expérience n'est toutefois pas une preuve de localisation intracellulaire, puisque l'étape de fixation peut entraîner une relocalisation des molécules.

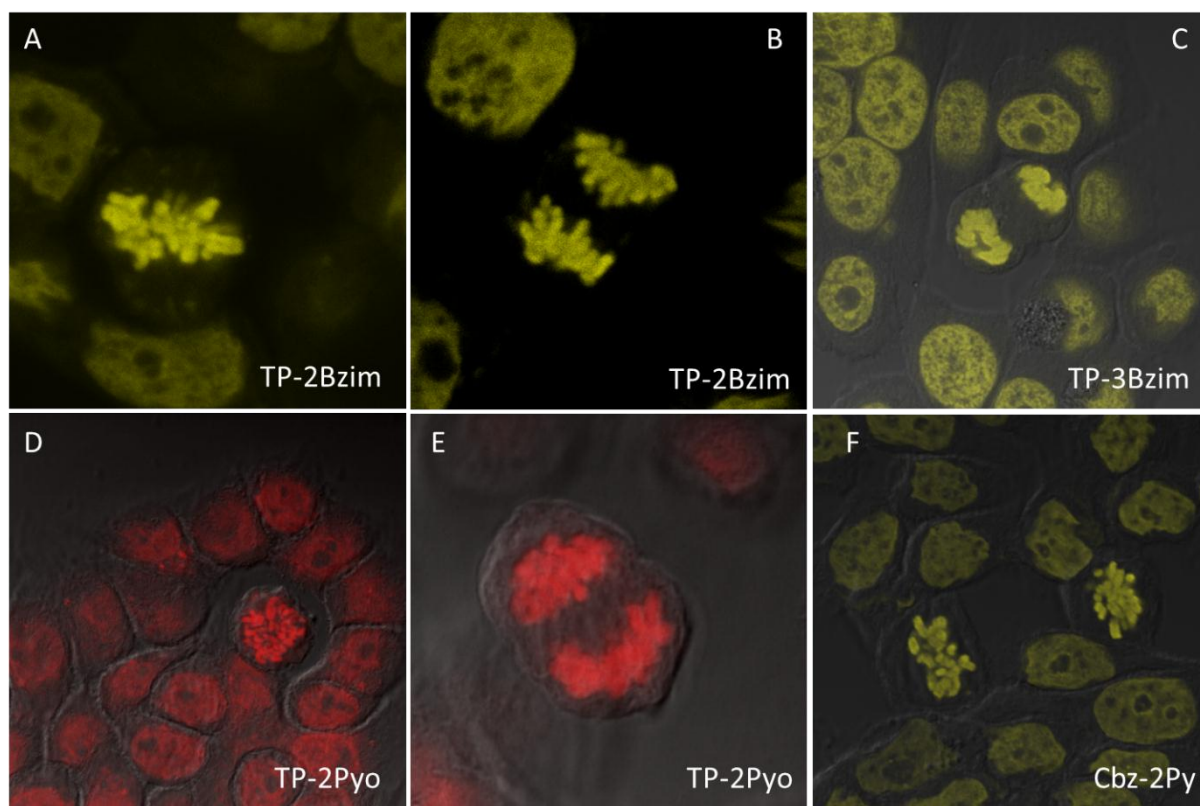


Figure 97. Cellules HT29 fixées après incubation en cellules vivantes avec les marqueurs observées par microscopie confocale.

$\lambda_{exc} = 488$ nm, détection : 500 - 750 nm. **A** : TP-2Bzim 2 μ M, fluorescence ; **B** : TP-2Bzim 1 μ M, fluorescence ; **C** : TP-3Bzim 2 μ M, fluorescence + DIC (*differential interference contrast*) ; **D** : TP-2Pyo 2 μ M, fluorescence + DIC ; **E** : TP-2Pyo 2 μ M, fluorescence + DIC ; **F** : Cbz-2Py 1 μ M, fluorescence + DIC. Images codées en fausses couleurs.

Le comportement des TP-oxazoles est légèrement différent. En cellules fixées, la **TP-2Ox5Py** marque l'ADN nucléaire avec un bon contraste comme pour la série TP. En cellule vivante en revanche, la **TP-3Ox5Py** donne un marquage plus diffus, essentiellement localisé dans le noyau mais avec une fluorescence résiduelle importante dans le cytoplasme (Figure 98). Les TP-oxazole pénètrent donc en cellules vivantes, mais marquent moins spécifiquement le noyau que lors d'une incubation en cellules fixées.

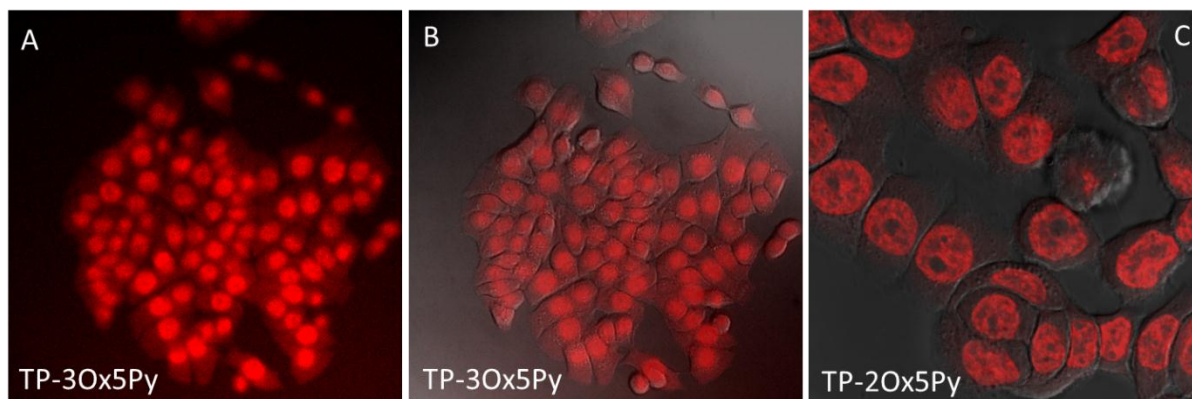


Figure 98. Cellules HT29 fixées marquées par les TP-oxazoles après incubation en cellules vivantes (A,B) et fixées (C) observées par microscopie confocale.

$\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, détection : 500 - 750 nm. **TP-3Ox5Py** 2 μM : (A) fluorescence, (B) fluorescence + DIC ; **TP-2Ox5Py** 2 μM : (C) fluorescence + DIC. Images codées en fausses couleurs.

Enfin, la **DP-2Py** pénètre également en cellules vivantes et marque le noyau comme son analogue **TP-2Py**. La brillance plus faible mesurée en cuve se retrouve bien en microscopie avec un signal de fluorescence moins intense. Des points brillants sont aussi observables dans le cytoplasme, qui peuvent être dus à des agrégats ou au marquage d'une organelle cytoplasmique (Figure 99).

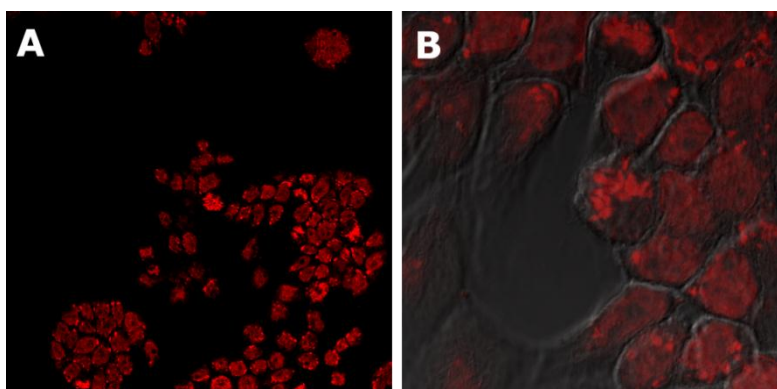


Figure 99. Cellules HT29 fixées marquées par la DP-2Py à 2 μM après incubation en cellules vivantes observées par microscopie confocale.

$\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, détection : 500 - 750 nm. A : fluorescence, B : fluorescence + DIC.

Les dérivés anioniques TP-Rho ont en revanche un comportement très différent en cellules selon qu'ils sont incubés en cellules vivantes ou fixées. Après incubation en cellule vivantes (protocole 1), la **TP-2Rho** marque le cytoplasme avec une faible intensité et des points brillants, qui peuvent être dus soit à des agrégats soit au marquage spécifique d'une organelle. Après incubation en cellules fixées (protocole 2), un marquage identique mais beaucoup plus intense est observé (Figure 100). Les TP-Rho pénètrent donc beaucoup moins bien en cellules que leurs analogues cationiques. En cellules fixées cependant, une fluorescence intense est observée dans le cytoplasme avec des points brillants indiquant le marquage d'une organelle qui reste à déterminer.

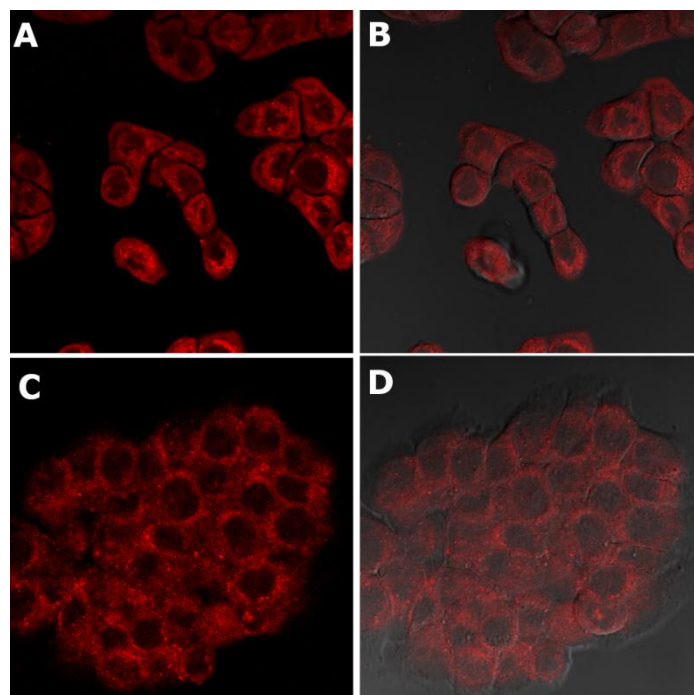


Figure 100. Cellules HT29 fixées marquée par la TP-2Rho à 2 μ M après incubation en cellules fixées (A,B) et vivantes (C,D).

$\lambda_{exc} = 496$ nm, détection : 510 - 750 nm. TP-2Rho 2 μ M : fluorescence (A,C) ; fluorescence + DIC (B,D).

Les TP et leurs dérivés cationiques sont des marqueurs d'ADN performants sous excitation monophotonique, marquant sélectivement l'ADN en cellules fixées, pénétrant en cellules vivantes et non cytotoxiques. Les TP anioniques, elles, ne marquent pas l'ADN et pénètrent moins bien en cellules. Elles donnent néanmoins dans le cytoplasme un marquage brillant dont la spécificité reste à déterminer.

L'intérêt principal de ces marqueurs reste leurs propriétés biphotoniques, et nous allons maintenant mettre en évidence les possibilités offertes par l'optimisation des propriétés optiques en microscopie de fluorescence excitée à deux photons.

II. Microscopie biphotonique

1. Séries TP & Cbz

a. Sensibilité

Après incubation en cellules vivantes des TP et des Cbz, il est possible d'observer sous excitation biphotonique le même marquage de l'ADN nucléaire observé en microscopie confocale, avec une brillance et un contraste tout aussi important. La brillance biphotonique optimisée des composés permet de garder la puissance d'excitation à 3 ou 4 % de la puissance totale disponible soit une puissance en sortie d'objectif de l'ordre de 1 mW. A cette puissance, l'excitation n'occasionne pas de dommage pour l'échantillon et permet d'imager dans la durée. La sélectivité pour l'ADN assure un excellent contraste et aucune fluorescence n'est enregistrée dans le cytoplasme (Figure 101).

Le protocole de routine de montage des lames de microscopie utilise en général une concentration en marqueur de 2 μM . Il est ici possible sans perte visible de contraste ou d'intensité de diminuer la concentration en marqueur à 1 μM (Figure 101).

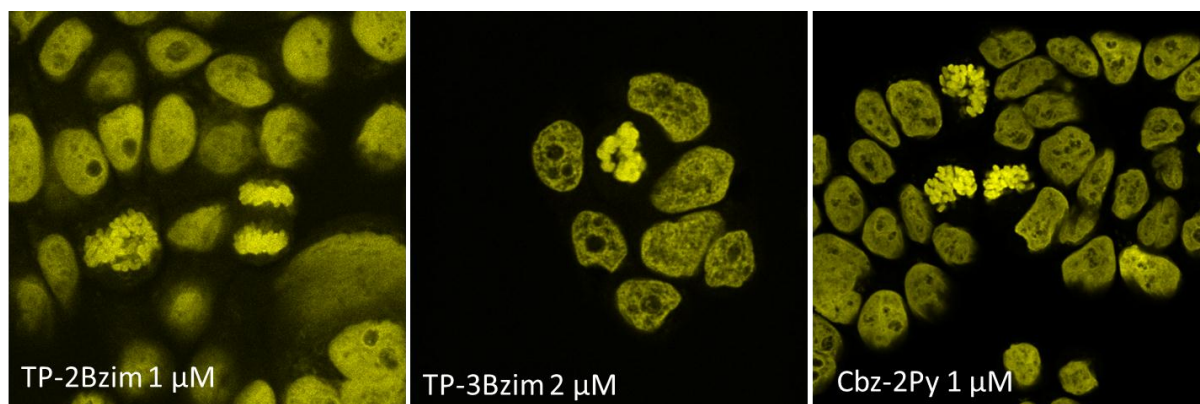


Figure 101. Cellules HT29, incubées vivantes avec les marqueurs puis fixées, observées par microscopie biphotonique.
 $\lambda_{\text{exc}} = 800 \text{ nm}$, détection : 500 – 750 nm.

Pour le marqueur le plus brillant, la **TP-2Bzim**, nous avons testé la limite de détection en abaissant la concentration en marqueur 0.1 μM . Malgré une perte visible d'intensité et un marquage plus diffus, le signal de la **TP-2Bzim** reste facilement détectable avec des puissances d'excitation raisonnables en augmentant le gain du photomultiplicateur utilisé en détection (Figure 102).

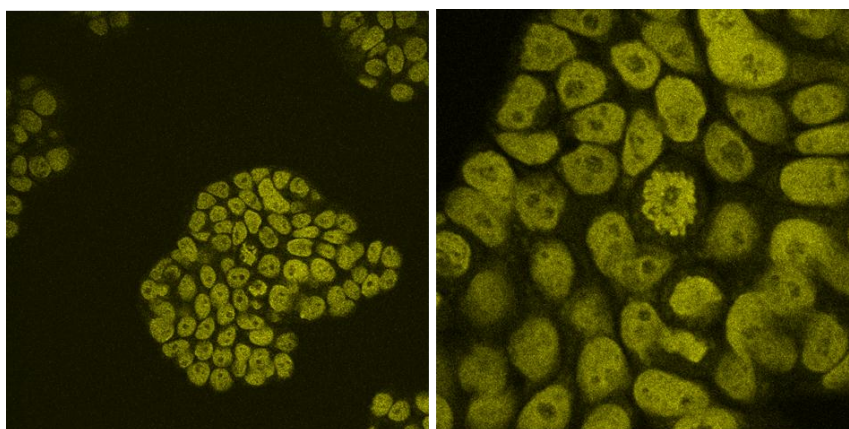


Figure 102. Variation de la concentration en TP-2Bzim à 0.1 μM en microscopie biphotonique.
 Cellules HT29 incubées avec la TP-2Bzim puis fixées. $\lambda_{\text{exc}} = 800 \text{ nm}$, détection : 500 – 750 nm.

L'optimisation des propriétés optiques des marqueurs triphénylamine permet donc d'abaisser fortement la concentration en marqueur par rapport aux concentrations généralement utilisées en microscopie (de l'ordre du micromolaire voire plus) sans avoir à augmenter la puissance d'excitation au-delà d'un seuil où l'échantillon serait endommagé. Même si les TP sont *a priori* non cytotoxiques, ceci permet de limiter l'impact sur l'échantillon de la toxicité éventuelle du marqueur et des dommages causés par la lumière et est un premier pas vers la mise au point de marqueurs les moins invasifs possibles pour la microscopie intravivante.

b. Photostabilité

Un autre facteur déterminant pour un marqueur fluorescent est sa photostabilité. Nous avons vu en introduction que les TP étaient stables sous excitation monophotonique, avec une variation quasi nulle du signal sur une période de 30 minutes. En microscopie excitée à deux photons, les TP se révèlent tout aussi stable. Sur une période de 10 minutes d'excitation à 800 nm, le signal de fluorescence de la **TP-2Bzim** et de la **TP-3Bzim** reste constant, de même que celui du marqueur commercial Hoechst 33258. Le **Cbz-2Py** reste relativement stable mais voit quand même son signal chuter d'environ 20% sur la même période.

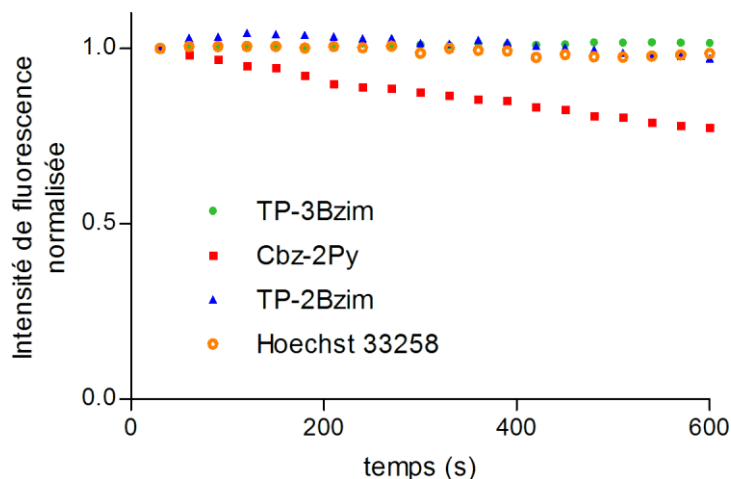


Figure 103. Photostabilité des marqueurs TP-2Bzim, TP-3Bzim, Cbz-2Py et Hoechst 33258 mesurée par microscopie sous excitation biphotonique

Cellules HT29 fixées. Incubation en cellules vivantes avec 2 μ M de marqueur. λ_{exc} = 800 nm.

c. Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM)

La technique de FLIM consiste à mesurer le temps de décroissance de la fluorescence pour chaque pixel de l'image et à construire une carte de temps de vie pour donner une image où les couleurs codent pour un temps de vie donné. Le temps de vie de fluorescence étant très sensible à l'environnement le FLIM est particulièrement intéressant pour l'imagerie fonctionnelle et peut donner des informations les caractéristiques physiologiques d'un échantillon.

Plusieurs techniques d'imagerie de temps de vie de fluorescence existent. A l'institut Curie nous disposons d'un montage de FLIM-TCSPC (*Time-Related Single Photon Counting*) avec un laser pulsé infrarouge (l'excitation est donc biphotonique). Ce dernier envoie des impulsions lumineuses à une fréquence de 80 Hz entre lesquelles une photodiode collecte les photons et mesure le temps de déclin de la fluorescence pour chaque pixel permettant ensuite de reconstruire l'image. Cette méthode qui repose sur le comptage de photons individuels nécessite un signal important et donc une durée de collecte potentiellement élevée de l'ordre de plusieurs minutes. Pour être utilisable en FLIM, un fluorophore doit donc répondre à deux critères :

- Avoir une brillance à deux photons élevée pour donner un nombre de photons suffisant.
- Être très photostable pour qu'une variation de l'intensité dans le temps ne vienne pas perturber la mesure.

Par ailleurs, le temps de réponse de la photodiode est de l'ordre de 10 ps de sorte que théoriquement tout temps de vie supérieur à 10 ps est mesurable. En pratique, pour éviter d'avoir à déconvoluer le signal par rapport à la réponse instrumentale, il est préférable d'avoir des temps de vie bien supérieurs.

Avec des temps de vie de l'ordre de la nanoseconde, une brillance à deux photons élevée et une très bonne photostabilité non linéaire, nos marqueurs répondent à ces critères et la **TP-3Bzim** et le **Cbz-2Py** ont été testés en FLIM. Comme attendu, le signal de fluorescence excitée à deux photons est suffisamment stable et intense pour permettre la mesure. En 150 secondes, un signal suffisant est collecté pour dresser une carte de temps de vie de fluorescence, ce paramètre n'a cependant pas été optimisé et un temps plus court suffirait peut-être. La répartition des temps de vie donne des valeurs légèrement plus faibles que celle mesurées en cuve mais reste cohérente : 1.5 ns pour la **TP-3Bzim** (contre 2.03 ns en cuve) et 2.1 ns pour le **Cbz-2Py** (contre 2.5 ns en cuve) (Figure 104).

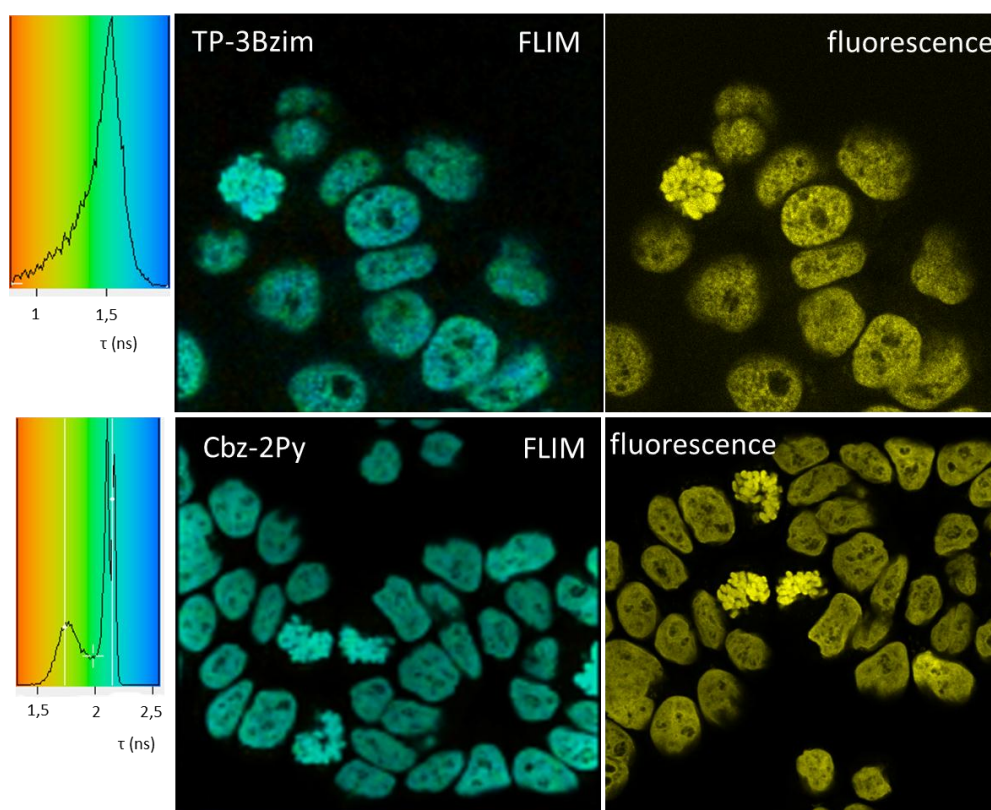


Figure 104. Imagerie cellulaire en temps de vie de fluorescence avec le Cbz-2Py et la TP-3Bzim avec l'image de fluorescence correspondante.

Cellule HT29 incubées vivantes avec le Cbz-2Py (1 μ M) et la TP-3Bzim (2 μ M) puis fixées. λ_{exc} = 800 nm, détection : 500 - 750 nm. Temps de collecte en FLIM : 150 s. La courbe sur la légende couleur du FLIM donne la distribution des temps de vie mesurés

Contrairement à la **TP-3Bzim** qui donne un pic unique vers 1.5 ns, le **Cbz-2Py** en revanche semble plus sensible à son environnement et donne trois pics, dont deux principaux assez proches vers 2.1 ns (Figure 104). Ces différents temps de vie peuvent correspondre aux différents modes d'interactions du **Cbz-2Py** avec l'ADN, et donc à des structures ou des séquences différentes, et s'ils venaient à être identifiés pourraient fournir de précieuses informations.

Le FLIM excité à deux photons est une technique prometteuse pour l'imagerie fonctionnelle de tissus biologiques [176] et ces expériences préliminaires montrent que nos marqueurs possèdent bien les propriétés photophysiques nécessaires pour cette application. La difficulté reste de relier la valeur du temps de vie et sa variation éventuelle à un phénomène physiologique.

d. Série TP-oxazole

Bien que les sections efficaces d'absorption des TP-oxazoles n'aient pas été mesurées, cette famille répond au modèle des fluorophores biphotoniques, nous avons donc testé la **TP-2Ox5Py** en microscopie excitée à deux photons (Figure 105).

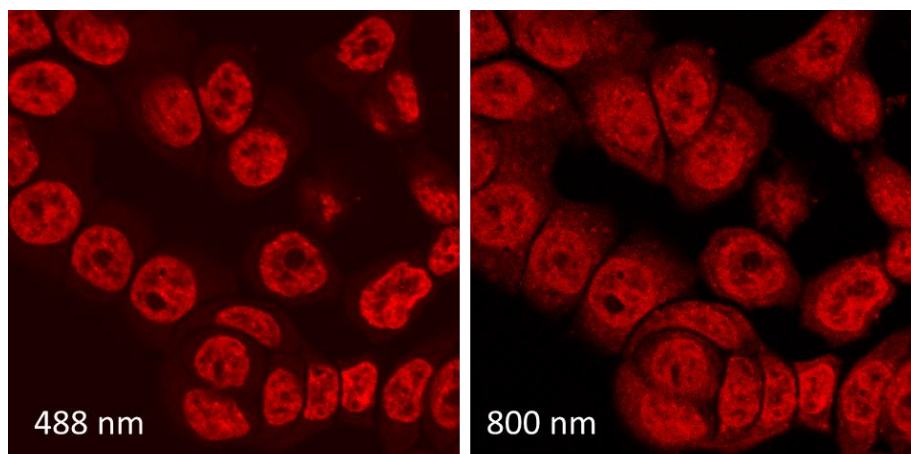


Figure 105. Cellules HT29 fixées marquées par la TP-2Ox5Py à 2 μ M sous excitation mono (488 nm) et biphotonique (800 nm).

La **TP-2Ox5Py** donne bien une image de fluorescence, mais avec un contraste beaucoup moins bon que sous excitation monophotonique. La faible brillance non linéaire nécessite d'augmenter fortement le gain du photomultiplicateur ce qui diminue le contraste entre le noyau et la fluorescence résiduelle du cytoplasme. Cette expérience illustre l'importance de l'optimisation de la section efficace d'absorption pour pouvoir obtenir des images de microscopie biphotonique contrastée.

2. Série TP-Rho

La **TP-2Rho** possède une section efficace d'absorption à deux photons élevée qui compense partiellement un rendement quantique assez faible, et donne en microscopie excitée à deux photons un signal de fluorescence intense semblable à celui observé en microscopie confocale (Figure 106).

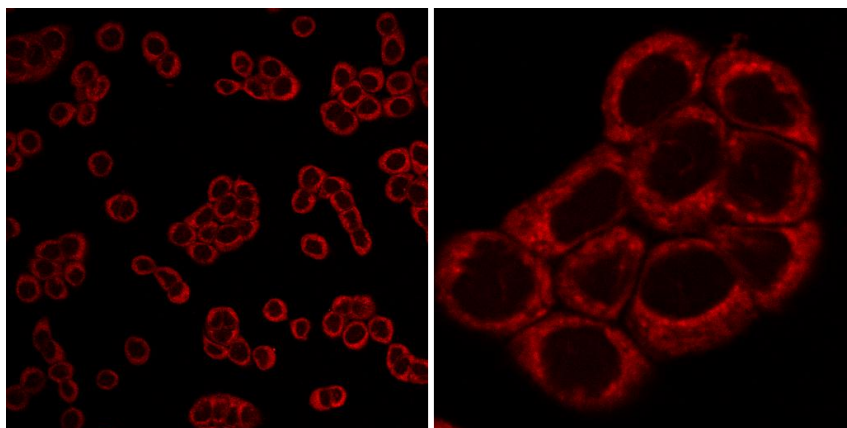


Figure 106. Cellules HT29 fixées puis incubées avec 2 μM de TP-2Rho observées sous microscopie excitée à deux photons.
 $\lambda_{\text{exc}} = 800 \text{ nm}$, détection : 500 – 750 nm.

Conclusion

L'optimisation des propriétés optiques effectuée en explorant l'espace structural autour du noyau vinyl-triphénylamine a abouti aux séries TP-Bzim et Cbz qui présentent un ensemble de propriétés à notre connaissance rarement rassemblées pour la microscopie de fluorescence *in vivo* :

- **Pénétration en cellules vivantes.**
- **Brillance élevée** : Possibilité d'imager avec une faible puissance incidente et/ou à des concentrations faibles (0.1 μM voire moins).
- **Photostabilité excellente** : Facilite la manipulation et la conservation des lames de microscopie. Imagerie dans la durée sans perte de signal (observation de phénomènes dynamiques, FLIM).
- **Pas de cytotoxicité** : Ne perturbent pas le cycle cellulaire, d'autant que la concentration en marqueur nécessaire est très faible.
- **Optimisation pour l'excitation biphotonique** : Excitation des molécules dans l'infrarouge pour l'imagerie tissulaire ou intravitale, avec des brillances biphotoniques parmi les meilleures rapportées jusqu'à présent ($\delta\Phi_F = 383 \text{ GM}$ pour la **TP-2Bzim**).

Les TP-Rho, obtenues en inversant la charge globale des composés et qui marquent l'albumine en cuve, donnent en microscopie confocale et biphotonique un marquage brillant dans le cytoplasme. Leur comportement en cellules reste à étudier plus précisément, notamment leur localisation, pour déterminer si elles peuvent servir à la détection de protéines intracellulaires.

B. IMAGERIE EN CELLULES VIVANTES : VERS DE NOUVEAUX AGENTS THERANOSTIQUES

L'étude en cellule fixées a permis de confirmer les qualités observées en cuve des marqueurs optimisés, notamment les séries TP-Bzim et Cbz-Py, à savoir leur sélectivité pour l'ADN et leurs excellentes propriétés photophysiques (brillance biphotonique et photostabilité). L'intérêt principal de l'excitation biphotonique est cependant de contribuer au développement de la microscopie de fluorescence intravitale, nous avons donc étudié les propriétés des fluorophores en cellules vivantes.

L'étude a été effectuée en collaboration avec Eric Deprez et Patrick Tauc du laboratoire d'Alembert de l'ENS Cachan.

I. Comportement en cellules vivantes

1. Localisation en cellules vivantes

En cellules fixées, indépendamment de la méthode (incubation avant ou après fixation), les marqueurs triphénylamine et carbazoles sont localisés dans le noyau de la cellule où ils marquent l'ADN, en accord avec la sélectivité observée *in vitro*. En cellules vivantes en revanche, les molécules apparaissent localisées dans le cytoplasme mais le marquage n'est pas diffus comme cela peut être le cas avec des fluorophores non spécifiques (Figure 107). Nous avons vu que les TP nécessitent une fixation dans une matrice biologique pour émettre un signal et en effet les point lumineux dans le cytoplasme sont bien la preuve du marquage d'un ou plusieurs composants intracellulaires. Pour déterminer la ou les organelles marquées, nous avons procédé à un comarquage des cellules par la **TP-2Py** et un marqueur de lysosomes (lysotracker) ou de mitochondries (mitotracker green). Dans le cas du lysotracker, aucune colocalisation n'a été observée (résultats non montrés), en revanche le comarquage avec le mitotracker green a mis en évidence une localisation de la **TP-2Py** dans les mitochondries (Figure 107).

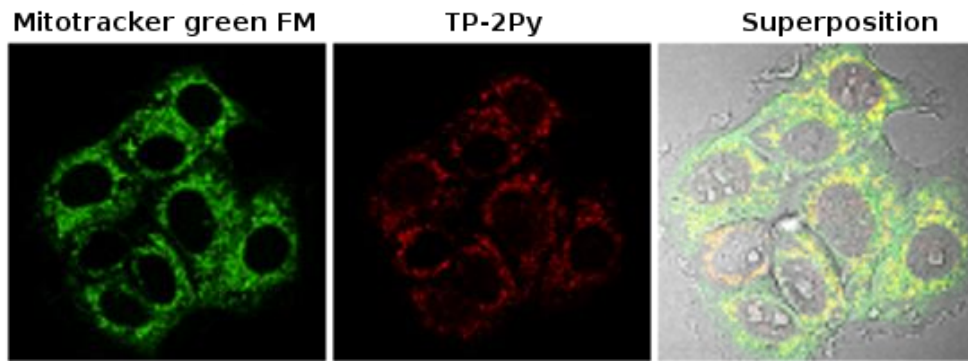


Figure 107. Comarquage de cellules MCF-7 (cancer du sein) vivantes par le Mitotracker green FM et la TP-2Py en microscopie confocale.
Mitotracker green FM 2 μM : λ_{exc} = 458 nm, détection = 500 – 550 nm ; TP-2Py 2 μM : λ_{exc} = 488 nm, détection : 560 – 720 nm.

Les mitochondries (Figure 94), qui contiennent de l'ADN, sont des organelles responsables de la production d'énergie dans les cellules et sont donc indispensables pour la vie cellulaire. Elles représentent une cible de choix pour les agents thérapeutiques, une rupture de la membrane mitochondriale ou une perte de son potentiel membranaire entraînant une mort cellulaire par apoptose [177].

2. Influence de la lumière

Lorsque les cellules sont maintenues sous illumination, les marqueurs se relocalisent assez rapidement dans le noyau pour donner des images semblables à ce que l'on peut observer en cellules fixées (Figure 108). La poursuite de l'observation met en évidence une perte de l'intégrité de la structure cellulaire et une apparente perméabilisation de la membrane cellulaire.

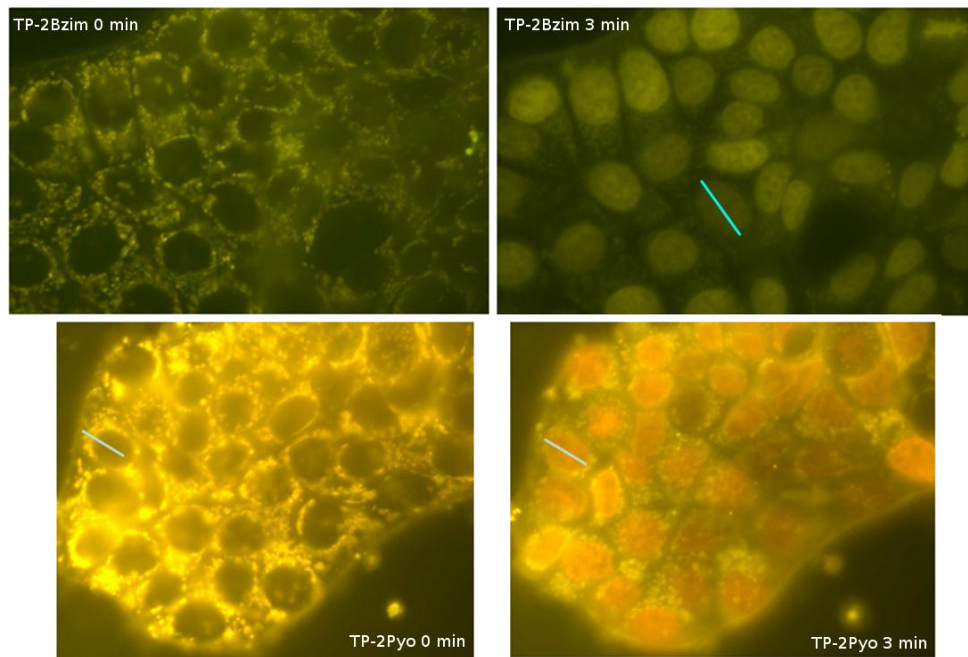


Figure 108. Cellules MCF-7 vivantes incubées avec 2 μM de TP-2Bzim ou TP-2Pyo observée par microscopie d'épifluorescence sur une période de 3 minutes d'irradiation constante.
 λ_{exc} = 450 – 490 nm, détection = 515 – 700 nm

Le phénomène a été observé avec tous les composés ligands d'ADN. A chaque fois une illumination de quelques minutes entraîne la mort cellulaire et une relocalisation des fluorophores dans le noyau. La cytotoxicité des triphénylaminés qui est normalement nulle peut donc être activée par la lumière et ouvre donc la voie à la mise au point d'agent photothérapeutique. Le phénomène est également observé sous excitation biphotonique et a été étudié en détails avec la **TP-2Py** et la **TP-3Bzim**.

II. Activité thérapeutique photoinduite

1. La thérapie photodynamique (PDT)

a. Principe

La photothérapie dynamique (PDT) est une technique consistant à traiter une tumeur en injectant un photosensibilisateur (PS) qui, sous l'action de la lumière va détruire les tissus tumoraux souvent par production d'espèces oxydantes réactives comme l'oxygène singulet [178]. On recense deux principales familles de photosensibilisateur, les chlorines et les porphyrines [179] qui ont comme caractéristiques de présenter des bandes d'absorption monophotonique dans le rouge voire le proche infrarouge qui permettent un traitement en profondeur des tissus biologiques.

La synthèse des porphyrines, même si elle a été grandement améliorée, est complexe, basée sur des étapes statistiques donnant des mélanges difficilement séparables. Par ailleurs les photosensibilisateurs commerciaux comme le Photofrin® ou le Foscan® sont très sensibles à la lumière puisqu'une très faible intensité suffit à produire de l'oxygène singulet. Le patient traité doit donc rester à l'abri de la lumière du jour pendant une durée qui peut atteindre un mois avec le Foscan®. La PDT reste la seule alternative pour le traitement de certains cancers mais la synthèse et les effets indésirables des photosensibilisateurs demandent des améliorations. Des avancées ont été faites avec l'arrivée du 5ala (acide 5-aminolevulinique) qui permet de synthétiser un PS *in situ* grâce à la voie de biosynthèse des porphyrines. Le problème de synthèse ne se pose donc plus et il est par ailleurs rapidement éliminé par l'organisme et cause moins d'effets secondaires.

b. PDT deux photons

Malgré la possibilité d'exciter les PS de type porphyrine dans le rouge, la PDT excitée à deux photons est en développement pour améliorer encore la pénétration dans les tissus avec une excitation infrarouge et permettre un traitement plus localisé grâce à l'absorption non linéaire. Spangler en couplant des triphénylaminés à des porphyrines ($\delta \approx 2000$ GM) a réussi à faire de la PDT deux photons *in vivo* [180]. Parmi les PS deux photons en développement, on trouve également des porphyrines associées au BMVC qui agit comme une antenne deux photons par TC Chang [181] et des complexes de ruthénium ($\delta \approx 40$ GM) par l'équipe de Gilles Lemerrier [50].

2. Phototoxicité

Le phénomène de relocalisation des molécules suivi de mort cellulaire a été reproduit sur différentes lignées cellulaires : HeLa (cancer du col de l'utérus), MCF-7 (cancer du sein), PC3 (cancer de la prostate) et

HCT116 (cancer colorectal). Pour quantifier le phénomène, la phototoxicité des **TP-2Py** et **TP-3Bzim** a été mesurée par un test MTT sous irradiation par une lampe au mercure. Le temps d'irradiation nécessaire pour obtenir une toxicité de 50 % à une concentration de 2 μM en composés a d'abord été déterminé pour les lignées MCF-7 et HeLa (Figure 109). Ce temps est sensiblement identique quelle que soit la lignée mais il est différent pour les deux composés : la **TP-3Bzim** est en effet plus active avec un temps de 15 min environ contre 30 min pour la **TP-2Py**.

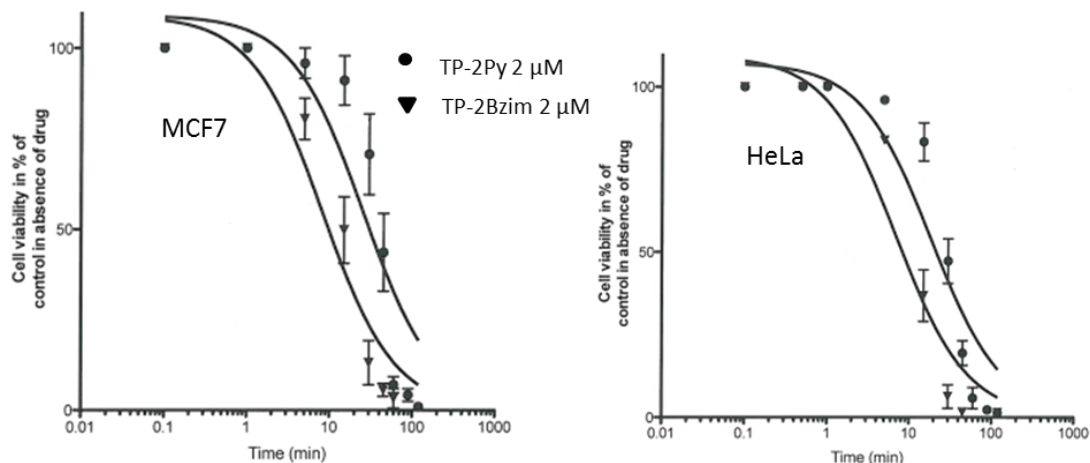


Figure 109. Cytotoxicité de la TP-2Py et la TP-3Bzim à 2 μM sous éclairage au cours du temps.

Irradiation par une lampe au mercure avec un filtre à 452 nm (± 45 nm), irradiance : 60mW/cm².

La cytotoxicité des molécules a ensuite pu être mesurée sur des cellules HeLa dans le noir et après une irradiation par une lampe au mercure pendant les temps mesurés précédemment (Figure 110). Sans irradiation, les deux composés ne sont pas toxiques même à de fortes concentrations. Lorsque les cellules sont irradiées en revanche, les molécules ont des IC₅₀ similaires d'environ 2 μM .

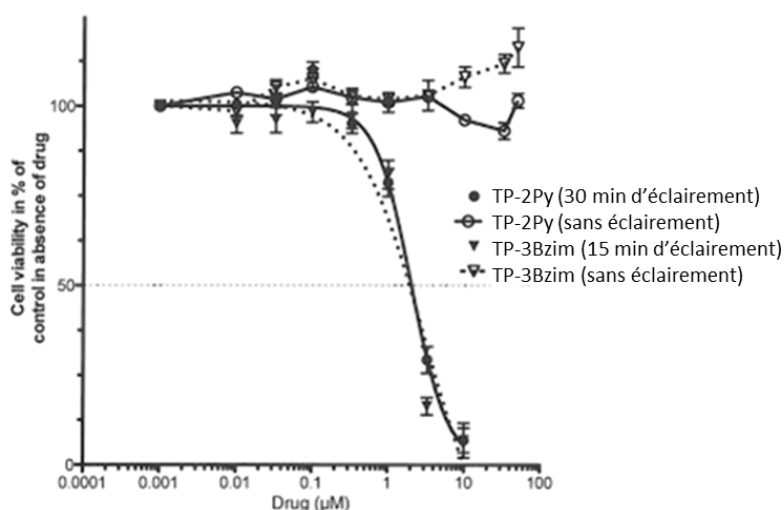


Figure 110. Cytotoxicité de la TP-2Py et de la TP-3Bzim avec et sans éclairage mesurée sur des cellules HeLa (cancer du col de l'utérus).

Irradiation par une lampe au mercure avec un filtre à 452 nm (± 45 nm), irradiance : 60mW/cm².

Les **TP-2Py** et **TP-3Bzim** sont donc de potentiels photosensibilisateurs avec un excellent index thérapeutique puisqu'ils ne présentent aucune toxicité dans le noir.

3. Propriétés pharmacologiques

L'irradiation entraîne une relocalisation des composés dans le noyau ainsi que la mort cellulaire comme le montre la formation de bulles sur la membrane des cellules (Figure 111 & Figure 112). Il a été mis en évidence que le mécanisme impliqué est l'apoptose, soit la mort cellulaire programmée (résultats non montrés). Les TP sont moins sensibles à la lumière que les PS porphyriniques avec des doses de 100 J.cm^{-2} en un photon et 300 J.cm^{-2} en deux photons nécessaires pour déclencher le phénomène contre seulement 1 J.cm^{-2} environ pour les PS classiques. Ceci est néanmoins loin d'être un défaut puisque cela n'entraînerait pas de sensibilisation des patients à la lumière du jour tandis que les puissances requises, bien que plus élevées, restent non dangereuses. Les propriétés de dépendance à la puissance incidente et la dose-réponse ont été étudiées dans le cas de la TP-2Py sur des cellules MCF-7.

a. Influence de l'irradiance

Le temps de déclenchement du processus d'apoptose est visiblement corrélé à la puissance incidente : sous une irradiance élevée de 30 mW.cm^{-2} il se déclenche au bout de 16 min contre 83 minutes (soit environ 5 fois plus longtemps) sous une irradiance de 5.6 mW.cm^{-2} (soit environ 5 fois plus faible) (Figure 111). L'activité dépend donc linéairement de la puissance lumineuse incidente.

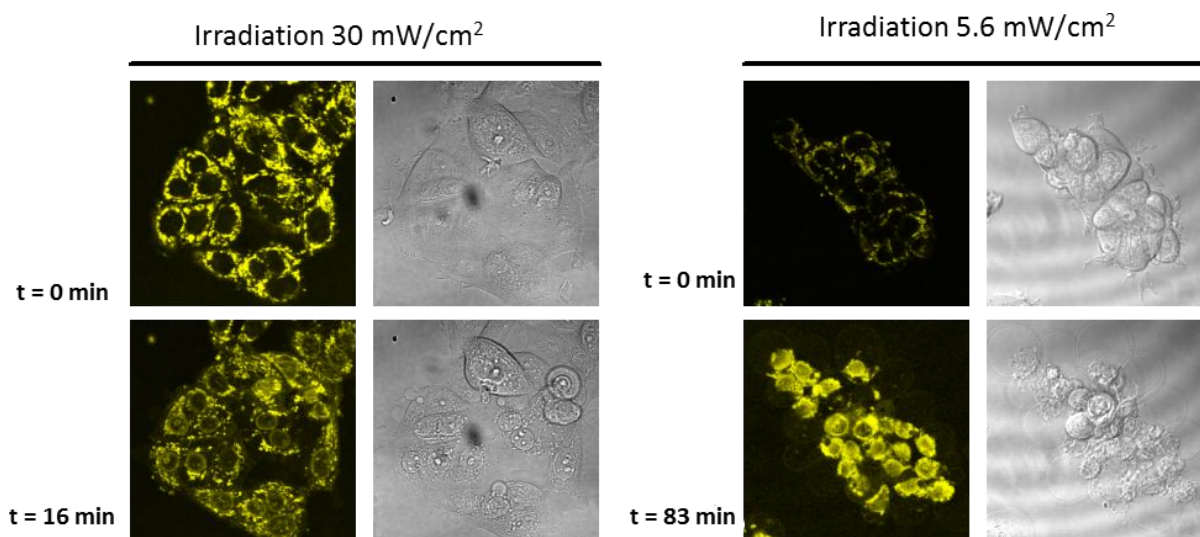


Figure 111. Effet de l'intensité d'irradiation sur l'activité de la TP-2Py à concentration constante (2 µM).

Microscopie confocale : Cellules MCF7 traitée avec 2 µM de TP-2Py, fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$, détection = 560 – 720 nm) et contraste de phase.

b. Dose-réponse

On observe également un effet dose réponse très clair en faisant varier la concentration en **TP-2Py** et en gardant une irradiation constante. A 2 µM, l'apoptose se déclenche à 16 min contre 2h45 pour une concentration de 200 nM (Figure 112). La **TP-2Py** est même active à des concentrations où son signal de fluorescence est indétectable : à une concentration de 20 nM, il est possible d'observer en transmission la

formation des bulles à la surface des membranes mettant en évidence l'activité, même si la relocalisation du fluorophore ne peut être observée.

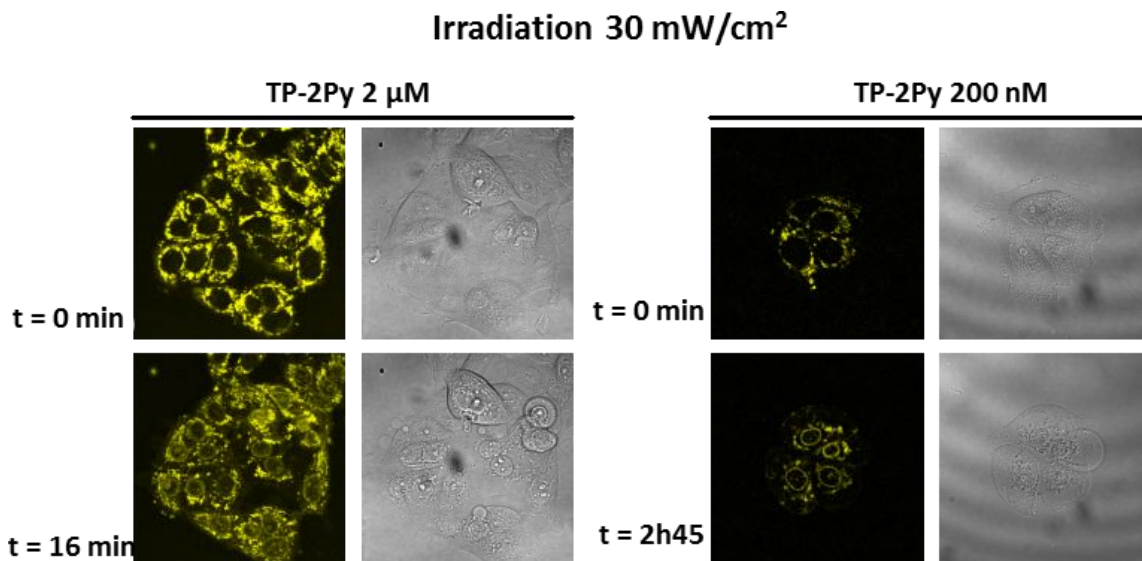


Figure 112. Effet de la concentration sur l'activité de la TP-2Py à irradiation constante.

Microscopie confocale : Cellules MCF7 traitée par la TP-2Py, $\lambda_{exc} = 458$ nm, détection : 560 – 720 nm.

Conclusion

La **TP-2Py** et la **TP-3Bzim** et potentiellement tous les marqueurs d'ADN cationiques décrits dans ces travaux sont donc une famille de nouveaux agents thérapeutiques photoactivables à un ou deux photons. Leur mode d'action exact reste à déterminer, mais la localisation des TP dans les mitochondries en cellules vivantes cause sous réserve d'une irradiation prolongée de quelques minutes une mort cellulaire par apoptose et la relocalisation des fluorophores dans le noyau.

Employés comme sondes de microscopie biphotonique, les TP et Cbz peuvent donc être employé comme marqueurs d'ADN en cellules fixées et comme marqueurs de mitochondries ou d'apoptose en cellules vivantes. Associés à un processus de photoactivation en cellules vivantes, ce sont des agents de photothérapie présentant un index thérapeutique élevé, insensibles à la lumière du jour dont l'activité est observable par microscopie de fluorescence.

Ces nouveaux marqueurs optimisés pour la microscopie biphotonique sont donc de potentiels agents théranostiques. Ce concept émergent qui désigne des agents permettant à la fois le diagnostic par imagerie et le traitement fait le plus souvent appel à des nanoobjets multifonctionnalisés [182,183] complexes à fabriquer et dont la toxicité fait débat. La simplicité de synthèse et d'utilisation des TP est donc un net avantage par rapport aux nanoparticules.

La possibilité de fonctionnaliser les TP offre encore plus de possibilités : il est par exemple envisageable par vectorisation de cibler les cellules cancéreuses pour l'imagerie et le traitement de tumeurs. Les marqueurs vectorisés pourraient notamment servir à détecter les tissus tumoraux qui subsistent toujours après une chirurgie et qui posent souvent des problèmes de récidence. Une fois détectés, ces tissus seraient détruits très localement et sans dommages collatéraux par photoactivation biphotonique.

CHAPITRE 3

TRIPHENYLAMINES FONCTIONNALISEES : MARQUAGE COVALENT D'ADN ET VECTORISATION CELLULAIRE

A. SYNTHÈSE DES MARQUEURS FONCTIONNALISABLES

Les vinyl-triphénylamine en combinant une affinité spontanée pour l'ADN ou la HSA et d'excellentes propriétés de fluorescence sont des molécules à fort potentiel en imagerie. Néanmoins pour développer d'autres applications, nous avons donc mis au point une stratégie de synthèse pour fonctionnaliser la **TP-2Bzim** et la **TP-2Rho**. L'objectif est de pouvoir vectoriser la **TP-2Bzim** vers des cellules cancéreuses et aussi de la coupler à des oligonucléotides pour la détection d'hybridation par fluorescence. La **TP-2Rho** fonctionnalisée pourrait, elle, être utilisée pour le marquage covalent de protéine.

I. Introduction

1. « Chimie Click »

Le terme générique de « chimie click » a été introduit en 2001 par Sharpless [184] et regroupe un ensemble de réactions à hauts rendements, à économie d'atomes, insensibles à l'eau et à l'oxygène, favorisées thermodynamiquement et fonctionnant sur une large gamme de substrats. Parmi ces réactions, on trouve la réaction de Staudinger entre une phosphine et un azoture ou la cyclisation [3+2] de Huisgen catalysée par le cuivre entre un alcyne et un azoture. La facilité de mise en œuvre de ces réactions et leur compatibilité avec l'eau a entraîné un vif intérêt pour la chimie click dans le domaine du marquage covalent de biomolécules en solution ou même en cellules, d'autant que les fonctions mises en jeu sont orthogonales des fonctions présentes en milieu biologique et garantissent l'absence de réactions parasites [185]. La réaction la plus populaire pour ces applications est le couplage [3+2] de Huisgen qui a cependant comme inconvénient de nécessiter la présence de cuivre catalytique qui est potentiellement toxique et facilement chélaté par les amines présentes en milieu biologique. Pour contourner ce problème, l'équipe de Bertozzi a développé un couplage sans cuivre à partir d'alcyne cycliques contraints pour effectuer des réactions directement en cellules sans catalyseur [186].

2. Objectifs et composés cibles

Un première méthode de dérivatisation des composés triphénylamine à trois branches avait été développée au laboratoire [187]. Cette stratégie de synthèse assez complexe permet d'introduire un bras espaceur fonctionnalisé sur le noyau phényle en position *mé*ta de l'amine. Néanmoins, le motif de reconnaissance de l'ADN est le V formé par deux des branches des triphénylamine, et dans la HSA également nous avons observé une interaction mieux définie avec la TP-2Rho qu'avec la TP-3Rho. Pour des raisons de complémentarité structurale et de charge nette, les composés à deux branches sont donc globalement plus efficaces et possèdent un groupement phényle libre permettant de développer une stratégie de fonctionnalisation plus simple. Nous avons donc cherché à introduire sur ce phényle un bras espaceur polyéthylène glycol (PEG) fonctionnalisé par des groupements alcyne, azoture et acide carboxylique (Figure 113). Les fonctions ont été choisies pour permettre le plus d'applications possibles ; elles permettent en effet le couplage à de nombreuses biomolécules par « chimie click » ou par amidation, les amines étant fréquemment présentes en milieu biologique. Le bras PEG quant à lui apporte de la solubilité.

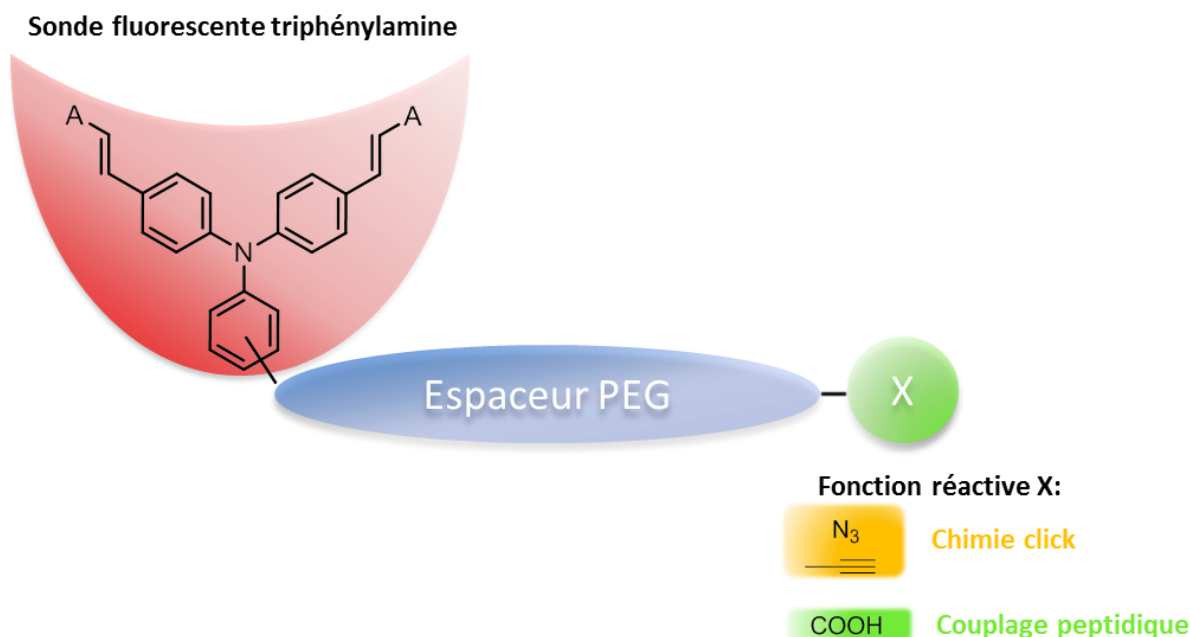


Figure 113. Structure générale des marqueurs dérivatisés cibles

II. Synthèse de la TP-2Bzim dérivatisée

Le noyau clé pour la synthèse de ces composés est la 4,4'-bisformyl-4''-hydroxytriphénylamine **13** qui permet par ses deux aldéhydes d'accrocher les groupements électroattracteurs et par son groupe phénol de greffer les chaînes PEG fonctionnalisées (Schéma 10). Ce composé est facilement préparé à partir de la 4-méthoxytriphénylamine commerciale par une réaction de Vilsmeier-Haack suivie d'une déprotection du groupe méthoxy par le tribromure de bore. A partir de ce noyau, deux stratégies de synthèse ont été essayées.

1. Synthèse linéaire

Tout d'abord, nous avons effectué une synthèse linéaire des composés en greffant successivement la chaîne PEG puis le noyau benzimidazole.

Premièrement, un triéthylèneglycol (TriEG) bis- ou mono-chloré a été couplé à la 4,4'-bisformyl-4''-hydroxytriphénylamine par une réaction de Williamson pour donner les intermédiaires **14** et **15** avec des rendements de 78 et 55%.

Le composé **16** portant la fonction azoture est ensuite obtenu par réaction de **15** avec l'azoture de sodium. Le benzimidazole est ensuite introduit par réaction de Wittig. Les conditions utilisées pour synthétiser la TP-2Bzim "nue" se sont révélées inapplicables ici. En effet le dérivé PEGylé forme une huile non miscible dans l'éthanol et réagit très peu. Nous avons donc appliqué une méthode alternative, utilisant le DBU comme base dans un mélange éthanol:THF 1:1 avec un rendement de 60%.

A partir de **14**, nous avons pu introduire une fonction alcyne par substitution nucléophile sur le bromure de propargyle en présence de NaH pour donner le composé **17**. Le rendement est cependant plus faible et nous avons obtenu peu de produit. Lors de la réaction de Wittig, le produit attendu a été détecté dans le brut, mais n'a pas pu être isolé car les quantités engagées étaient faibles et la conversion non totale.

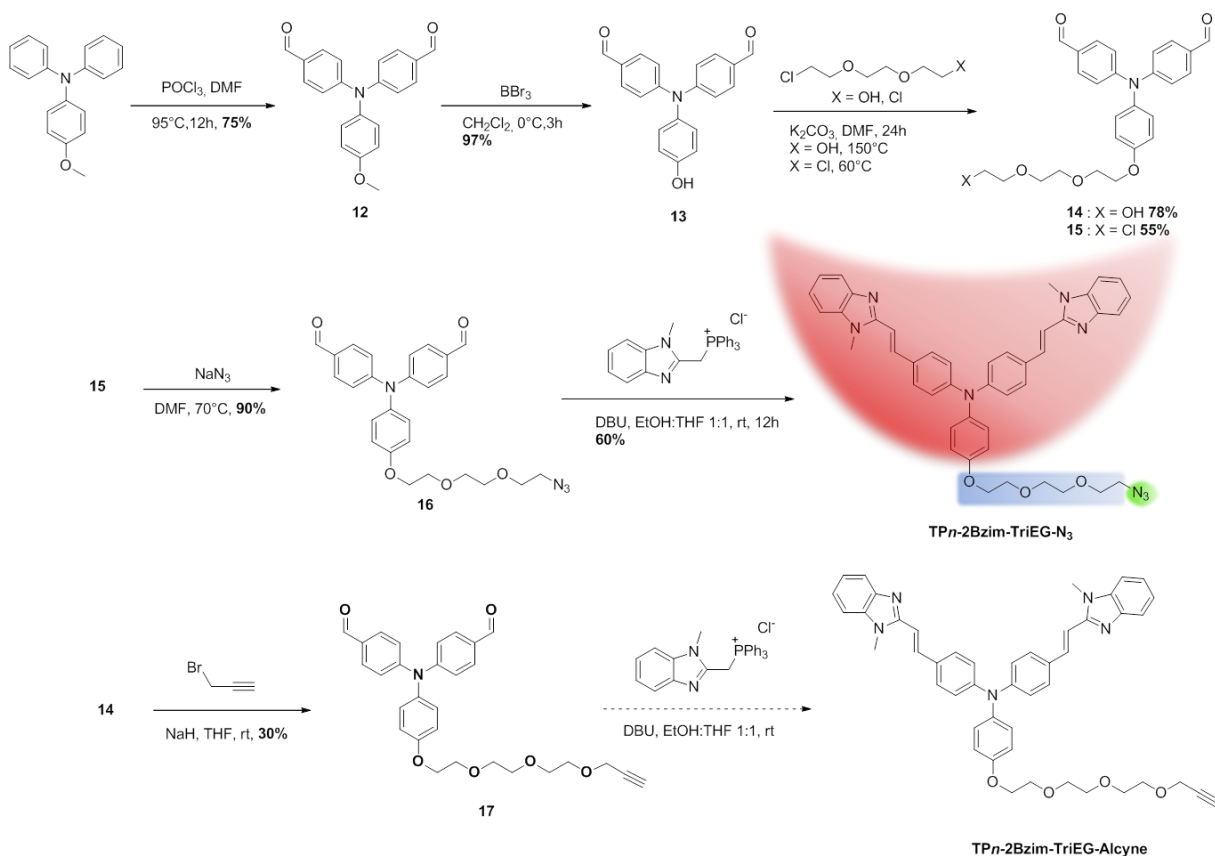


Schéma 10. Synthèse linéaire des TP-2Bzim dérivatisées.

Cette première voie de synthèse vers les marqueurs fonctionnalisés a donc permis d'obtenir la **TPn-2Bzim-TriEG-N₃**, mais les premiers essais pour obtenir les dérivés acide carboxylique et alcyne ont échoué. Plutôt que

de chercher à optimiser cette synthèse, nous avons préféré développer une deuxième méthodologie plus convergente pour obtenir de meilleurs rendements globaux.

2. Synthèse convergente

Selon la première méthodologie, les synthèses divergent très tôt en fonction du composé final attendu. Nous avons donc cherché à développer une nouvelle voie qui soit convergente et qui ait le plus grand nombre d'étapes communes à tous les composés cibles pour augmenter les quantités de matière engagées et les rendements globaux de synthèse.

Les parties TP et PEG ont d'abord été synthétisée séparément. Nous avons pris comme intermédiaire clé la **TPn-2Bzim** avec un groupement hydroxyl sur le phenyl libre que nous avons appelé la **TPn-2Bzim-OH** (Schéma 11).

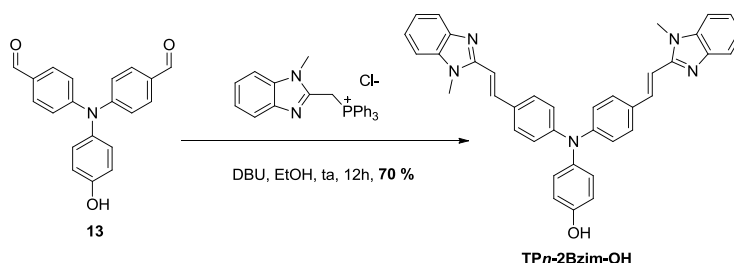


Schéma 11. Synthèse de la **TPn-2Bzim-OH**.

La synthèse par réaction de Wittig avec le DBU comme base dans l'éthanol a permis d'obtenir le précurseur neutre en grande quantité avec un rendement de 70%. Ici encore une fois, aucune purification n'est nécessaire, puisque le composé peut être précipité par addition d'éther et de pentane.

Les PEG étant une matière première peu coûteuse, nous avons pu également synthétiser en grande quantité les espaceurs bifonctionnels avec d'un côté la fonction désirée et de l'autre un groupement tosylate permettant le couplage à la **TPn-2Bzim-OH** par réaction de Williamson (Schéma 12). Le groupement tosylate a été choisi pour activer les PEG car il permet de les détecter en UV et facilite grandement les étapes de purification. La première étape a été de monotosyler le TEG dans le dichlorométhane en présence de triéthylamine pour obtenir le composé **18**. Pour éviter la double addition, un défaut de chlorure de tosylate est utilisé et le rendement par rapport au tétraéthylène glycol est donc faible malgré une conversion totale. Cependant, le TEG est peu coûteux et facilement séparable du produit final, nous en avons donc engagé 100 grammes pour obtenir une grande quantité de TEG monotosylé. L'intermédiaire **18** a ensuite été oxydé en aldéhyde par l'IBX [188]. Le passage à l'acide carboxylique **19** a ensuite été effectué par une oxydation de Lindgren par le chlorite de sodium en milieu tamponné par NaH_2PO_4 , selon la méthode décrite par Dalcanale et Montanari [189]. Les ions hypochlorites formés lors de la réaction et qui sont de puissants oxydants sont piégés par H_2O_2 pour éviter les réactions parasites. Ces deux oxydations successives en conditions douces ont permis de passer de l'alcool à l'acide carboxylique avec un rendement de 54% sur les deux étapes. Toujours à partir de l'intermédiaire **18**, l'addition d'azoture de sodium suivie d'une deuxième tosylation a permis d'obtenir l'azoture **20** avec 65% de rendement sur les deux étapes.

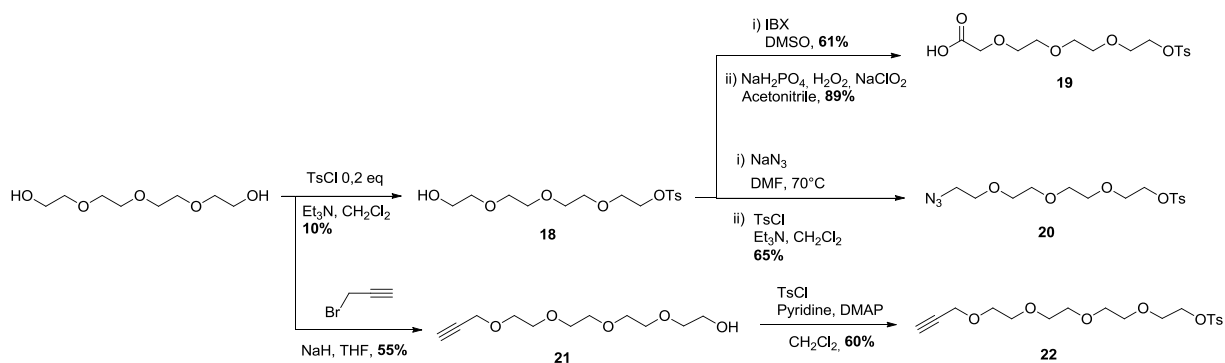


Schéma 12. Synthèse des chaînes TEG bifonctionnelles.

L'alcyne a lui été ajouté directement sur le TEG par réaction avec le bromure de propargyle. Le composé **21** obtenu a été ensuite tosylé en présence de pyridine et de DMAP pour donner le composé bifonctionnels **22** attendu.

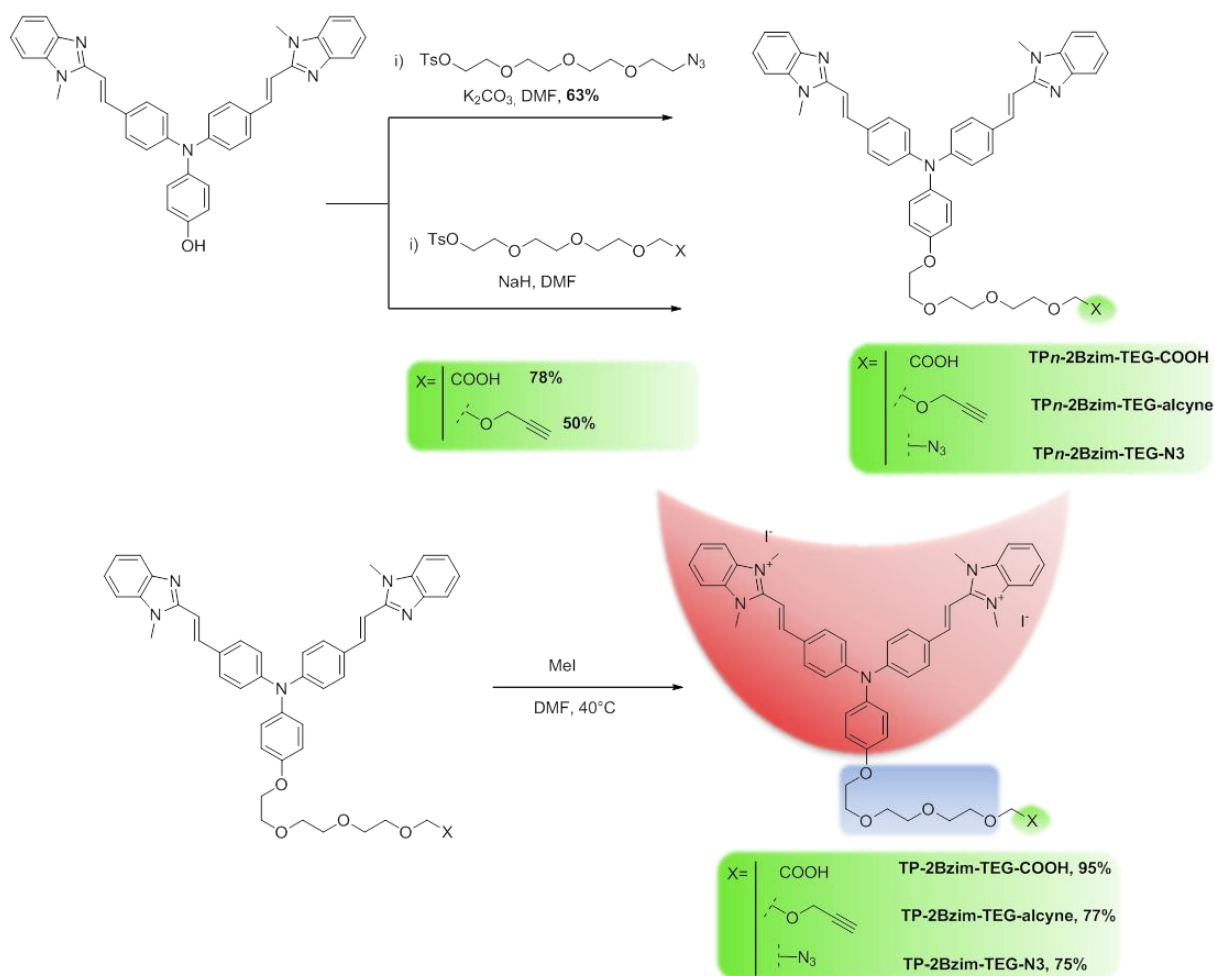


Schéma 13. Synthèse des TP-2Bzim fonctionnalisées.

Les chaînes bifonctionnelles obtenues ont ensuite été conjuguées à la **TPn-2Bzim-OH** par réaction de Williamson (Schéma 13). Dans le cas de l'azoture, des conditions classiques pour un phénol (K₂CO₃ dans le DMF à 60°C) ont permis d'obtenir le composé attendu avec un rendement de 63%. Pour l'alcyne et l'acide

carboxylique, cette méthode n'a pas abouti aux produits attendus malgré plusieurs tentatives effectuées en augmentant la quantité de K_2CO_3 pour compenser la présence de protons acides supplémentaires. L'utilisation de NaH en revanche a donné de bons résultats avec des rendements de 50% pour l'alcyne et 78% pour l'acide.

Les intermédiaires neutres ont ensuite été méthylés selon la méthode usuelle à l'iodure de méthyle dans le DMF pour donner les produits attendus.

La mise au point d'une méthode de synthèse convergente en cinq étapes a donc permis l'obtention, avec de bons rendements, de la TP-2Bzim conjuguée à une chaîne TEG fonctionnalisée pour le couplage à des biomolécules par "chimie click" et couplage peptidique. Selon les méthodes envisagées, les composés neutres ou méthylés pourront être employés.

III. Synthèse de la TP-2Rho dérivatisée

Nous avons voulu en suivant le même schéma synthétiser une **TP-2Rho** fonctionnalisée pour le marquage covalent de protéine ou par exemple l'étude des interactions récepteurs/protéines en couplant la TP-Rho au récepteur. Cette dernière application devrait faire l'objet d'une collaboration future.

La première étape consistant à synthétiser la **TP-2Rho-OH**, c'est-à-dire la **TP-2Rho** portant une fonction hydroxy sur le phényle a été effectuée par réaction de Knoevenagel entre l'acide rhodanine-3-acétique et la 4,4'-bisformyl-4''-hydroxytriphenylamine **13** pour donner le produit attendu avec un rendement de 84% (Schéma 14).

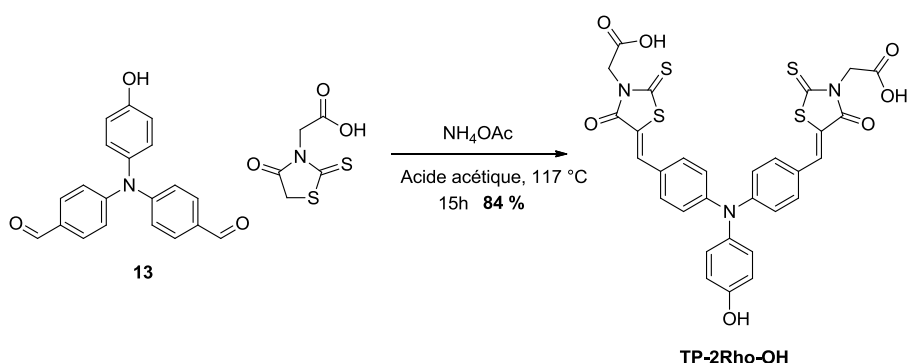


Schéma 14. Synthèse de la TP-2Rho-OH

La réaction de Williamson sur les TEG fonctionnalisés dans les différentes conditions utilisées ci-dessus n'a cependant pas fonctionné. Un suivi HPLC des réactions n'a montré aucune conversion et la **TP-2Rho-OH** est parfaitement soluble dans l'eau ce qui rend difficile l'extraction et l'analyse de la réaction ou simplement la récupération du produit de départ. Pour fonctionnaliser la **TP-2Rho**, nous sommes donc retournés vers une synthèse linéaire où le groupement rhodanine est introduit lors de l'étape finale (Schéma 15).

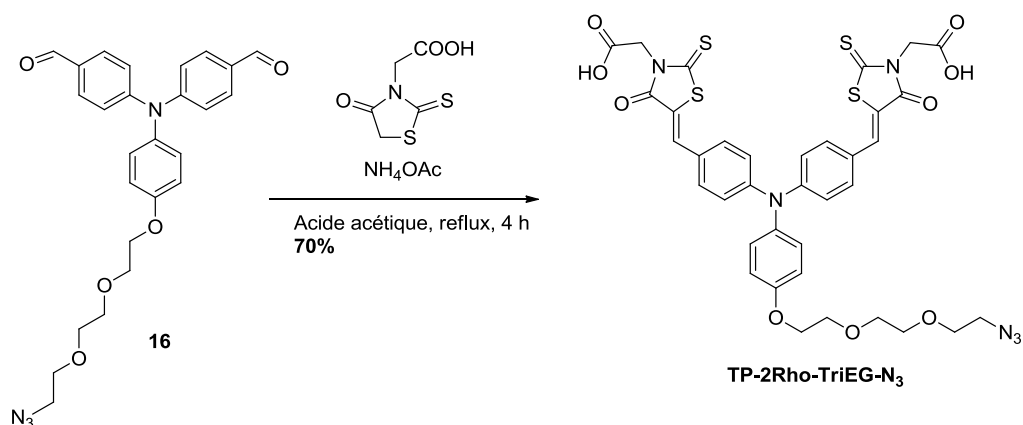


Schéma 15. Synthèse de la TP-2Rho-TriEG-N₃.

A partir du dialdéhyde **16**, dont la synthèse est décrite plus haut, il ne restait donc plus qu'à greffer la rhodanine acide acétique par réaction de Knoevenagel dans l'acide acétique au reflux en présence d'acétate d'ammonium. La réaction a permis d'obtenir simplement après précipitation du produit la TP-2Rho-TriEG-N₃ pure avec un rendement de 70 %.

B. DETECTION D'HYBRIDATION

I. Introduction

La détection d'ADN par FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) est une technique largement employée en biologie pour effectuer des caryotypes, cartographier l'ADN ou effectuer des diagnostics génétiques, entre autres exemples [190,191]. Elle permet de détecter des séquences spécifiques d'ADN, à l'échelle d'un chromosome ou sur des séquences courtes, pour des applications de criblages ou de diagnostic génétique. Elle nécessite de disposer de sondes oligonucléotidiques ou ADN marquées par un système fluorescent, qui peuvent être employées en solution ou fixés sur des surfaces pour former des puces à ADN.

1. Oligonucléotides marqués

Pour améliorer le rapport signal sur bruit et éviter des étapes de lavage, la détection d'hybridation nécessite des sondes dont l'émission est modifiée lors de l'association avec la cible, et emploie donc le plus souvent des systèmes binaires [192,193]. Ces derniers peuvent être constitués d'une paire donneur/accepteur dont le signal est modifié par FRET (Förster Resonance Energy Transfer), d'une paire fluorophore/quencher dont l'agencement est modifié lors de l'hybridation [194], restaurant ainsi le signal du fluorophore, ou de deux chromophores comme les pyrènes pouvant modifier leur signal de fluorescence en formant des excimères [195,196].

Il est également possible de conjuguer un oligonucléotide à un fluorophore qui voit son signal modifié dans l'ADN, comme le cas des chromophores commutables. Ainsi des conjugués entre un oligonucléotide et des cyanines ont été utilisés [197]. Néanmoins si l'hybridation de ces conjugués a été mise en évidence par une stabilisation mesurée par dénaturation thermique, seuls de faibles changements dans le signal de fluorescence ont été observés.

Les performances des sondes d'hybridation ont été fortement optimisées par l'emploi de PNA (*Peptide Nucleic Acids*) à la place des oligonucléotides. Les PNA sont des analogues d'ADN où l'enchaînement phosphate-ribose a été remplacé par des liaisons peptidiques (Figure 114). Ils sont capables de s'hybrider avec un brin complémentaire d'ADN ou de PNA en formant des structures hélicoïdales semblables à l'ADN duplex

classique mais du fait de l'absence de charge et donc de répulsion électrostatique entre les brins, les duplex PNA/ADN sont plus stables que les duplex ADN/ADN. Grâce à cette affinité accrue, les PNA sont capables d'envahir un double brin d'ADN ou de former des triplex si les séquences sont favorables et donc de détecter une séquence d'ADN duplexe sans dénaturation préalable (Figure 114) [198].

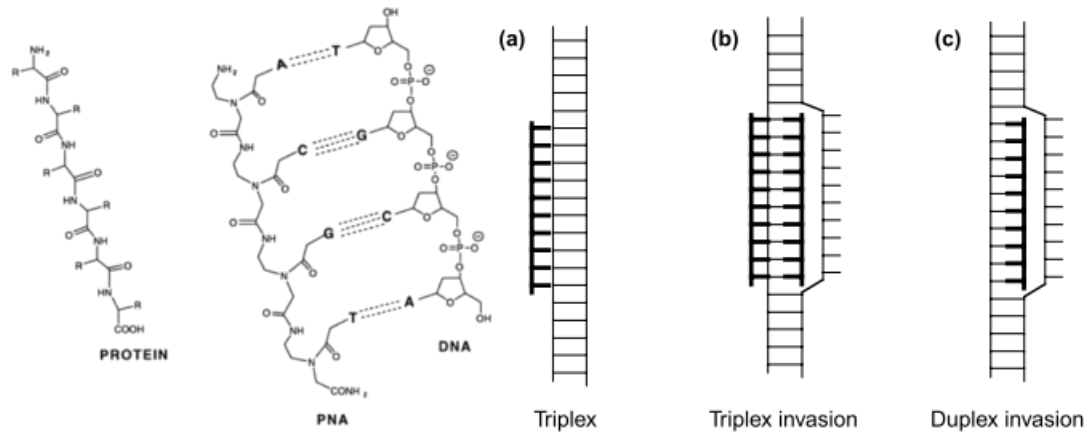


Figure 114. Structure des PNA et mode d'interaction avec l'ADN duplex

a) : formation d'un triplex classique, b) formation d'un triplex PNA/DNA/PNA par invasion du double brin, c) : invasion du duplex (image adaptée de la réf. [198]).

Des sondes composées d'un PNA conjugué au thiazole orange développées par Kubista et appelées « *Light-up Probes* » peuvent reconnaître spécifiquement une séquence de 10 paires de bases et présentent lors de l'hybridation des exaltations de fluorescence de l'ordre de 50 [199].

2. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

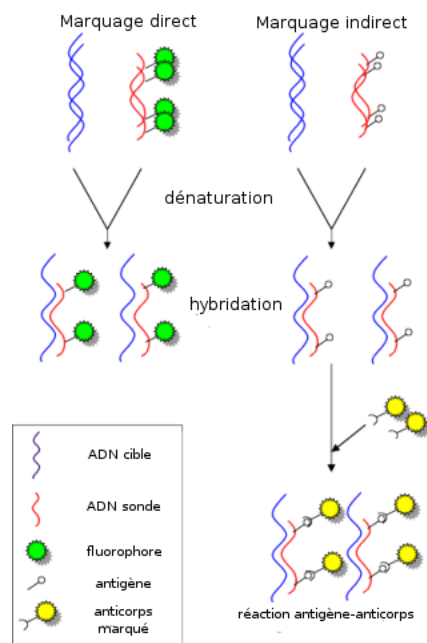


Figure 115. Schéma de principe de la technique de FISH.

Image adaptée de la réf. [200].

La technique de FISH a été développée dans les années 1980 pour la détection spécifique de séquences d'ADN [201]. Elle utilise des fragments d'ADN marqués directement par un ou plusieurs fluorophores ou par

des cibles telle la biotine pouvant ensuite être reconnues par des anticorps marqués fluorescents. Les mesures sont effectuées sur des chromosomes fixés sur du verre. L'ADN-cible est ensuite dénaturé pour permettre l'hybridation avec l'ADN-sonde. De multiples lavages permettent de retirer l'ADN-sonde non hybridé pour ne visualiser que la séquence cible marquée (Figure 115).

Différents types d'ADN-sondes peuvent être employés selon la séquence cible [202] :

- Oligonucléotides : marquage de séquences d'ADN abondantes.
- ADN double ou simple brin : marquage de séquences uniques. Les sondes sont obtenues par amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) avec des bases modifiées pour permettre la détection.

La longueur de l'ADN-sonde peut varier, allant jusqu'à 1000 paires de bases mais plus la sonde est grande plus sa spécificité d'hybridation est faible, la séquence de la sonde ayant des chances plus élevées de se retrouver au moins en partie sur plusieurs sites de la cible. La technique de FISH peut être utilisée avec des sondes longues pour marquer des chromosomes entiers (*whole-chromosome painting*) permettant ainsi de compter les chromosomes et d'effectuer des caryotypes [203]. En utilisant différents marqueurs chaque chromosome peut être marqué d'une couleur différente. Des sondes plus courtes seront utilisées pour détecter certaines régions particulières de l'ADN, et mettre en évidence des mutations ou des anomalies génétiques. Les fluorophores employés pour la FISH sont des fluorophores classiques comme les cyanines ou la fluoresceine [202]. Des expériences de FISH à deux photons ont été décrites, mais aucune n'employait de marqueurs optimisés [200,204] (Figure 116). L'excitation biphotonique peut être utilisée dans le cas d'un marquage multicolore pour exciter tous les fluorophores à la même longueur d'onde infrarouge et/ou pour tirer parti du confinement de l'excitation au point focal du laser. De nombreuses variantes de la méthode de FISH ont été développées pour les différentes applications [205], parmi lesquelles le PNA-FISH employant des PNA marqués à la place des oligonucléotides [206,207].

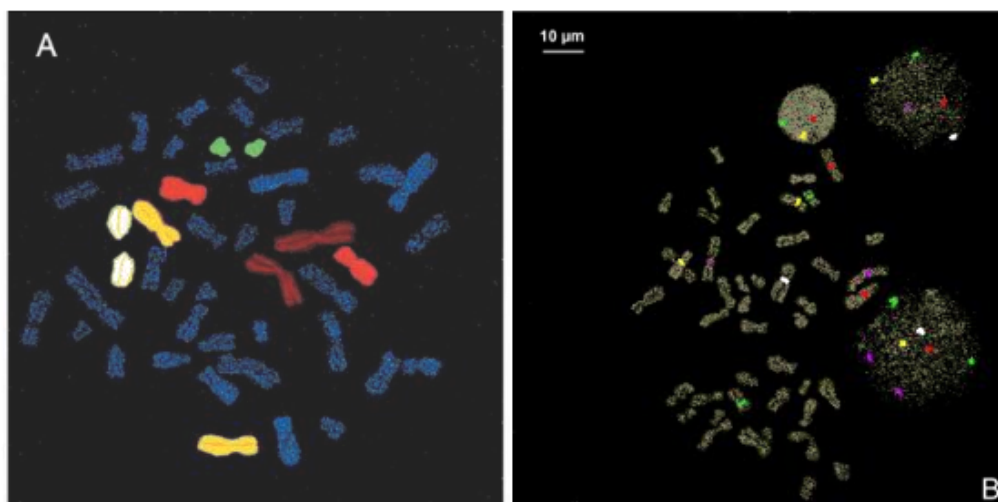


Figure 116. FISH excitée à deux photons.

A : *Whole-chromosome painting*, 5 chromosomes humains en métaphase marqués par 5 sondes de couleurs différentes (d'après la réf. [204]), **B :** Centromères de chromosomes humains en métaphase marqués par FISH. Chaque couleur correspond à un chromosome différent (d'après la réf. [200]).

3. Objectifs

Nous avons donc cherché à conjuguer la **TP-2Bzim**, qui est notre marqueur le plus performant, sur des oligonucléotides ou des PNA pour la détection d'hybridation, avec au final l'idée de les appliquer en FISH. Les triphénylaminés ne sont fluorescents que dans l'ADN double brin, nous espérons donc que le conjugué oligo-TP libre ne sera pas fluorescent, et que lors de l'hybridation, la **TP-2Bzim** pourra s'insérer dans le petit sillon formé et fluorescer. En cas de succès, les conjugués oligo-triphénylaminés présenteraient plusieurs avantages par rapport aux procédés existants :

- Modification du signal de la triphénylamine lors de l'hybridation, ne nécessite donc pas de système binaire complexe
- Brilliance élevée pour la détection de molécule unique
- Déplacement de Stokes élevés (notamment par rapport aux cyanines)
- Optimisation pour le deux photons
- Absence de photoblanchiment

Le couplage de la **TP-2Bzim** aux oligonucléotides ou au PNA a été effectué par le Dr. Rémy Lartia de l'université Joseph Fourier de Grenoble à partir des molécules portant un bras espaceur fonctionnalisé décrites ci-dessus.

II. Hybridation *in situ*

1. Structure

Les oligonucléotides et le PNA sont obtenus par synthèse peptidique ou oligonucléotidique sur support solide. Dans le cas du couplage à un PNA, la réaction avec la TP-2Bzim-TEG-COOH qui aurait permis d'effectuer le couplage en position N-terminale dans le synthétiseur sur phase solide et donc d'éviter une étape de purification par HPLC n'a pas marché. Nous nous sommes donc tournés vers la chimie click comme méthode de couplage alternative, qui nécessite cependant de purifier le conjugué final pour éliminer la **TP-2Bzim** non couplée.

Quatre dérivés synthétisés par le Dr. Rémy Lartia ont donc pu être obtenus à partir de la **TP-2Bzim-TEG-N₃** (Figure 117):

- Trois conjugués avec un oligonucléotide de séquence T₁₂, la **TP-2Bzim** étant branchée en position 5' (**T₁₂-5'-TP-2Bzim**) de l'oligonucléotide ou sur un phosphate intermédiaire donnant deux isomères (**T₆-TP-2Bzim-T₆ iso 1 & 2**).
- Un conjugué avec un PNA T₁₂, où la **TP-2Bzim** est branchée en position N-terminale (**pT₁₂-TP-2Bzim**).

Les oligonucléotides et le PNA T₁₂ ont été obtenus par synthèse automatisée sur support solide. Les conjugués oligonucléotidiques ont ensuite été synthétisés en introduisant une fonction alcyne sur le phosphate terminal 5' ou sur un phosphate intermédiaire puis en cliquant la **TP-2Bzim-TEG-N₃**. La **pT₁₂-TP-2Bzim** a été obtenue en couplant par chimie click la TP-2Bzim-TEG-N₃ sur un PNA T₁₂ portant une fonction alcyne sur la

position N-terminale. Deux lysines ont également été introduites en position C-terminale pour assurer la solubilité, les PNA ayant pour inconvénient d'être peu solubles dans l'eau (Figure 117).

La fonction alcyne a été introduite en position N-terminale du PNA par couplage sur support solide de l'acide 4-pentynoïque et en position 5' de l'oligonucléotide par couplage du phosphoramidite du 5-hexynol dans les conditions classiques de synthèse oligonucléotidique. Les oligonucléotides modifiés en position internucléotidique ont été obtenus par couplage du H-phosphonate de la thymine en 7^{ème} position de la chaîne oligonucléotidique suivie d'une oxydation par CCl_4 /propargylamine [208]. La chaîne a ensuite été rallongée des 5 nucléobases restantes. La séparation des isomères par RP-HPLC a été réalisée sur les produits couplés à la **TP-2Bzim**.

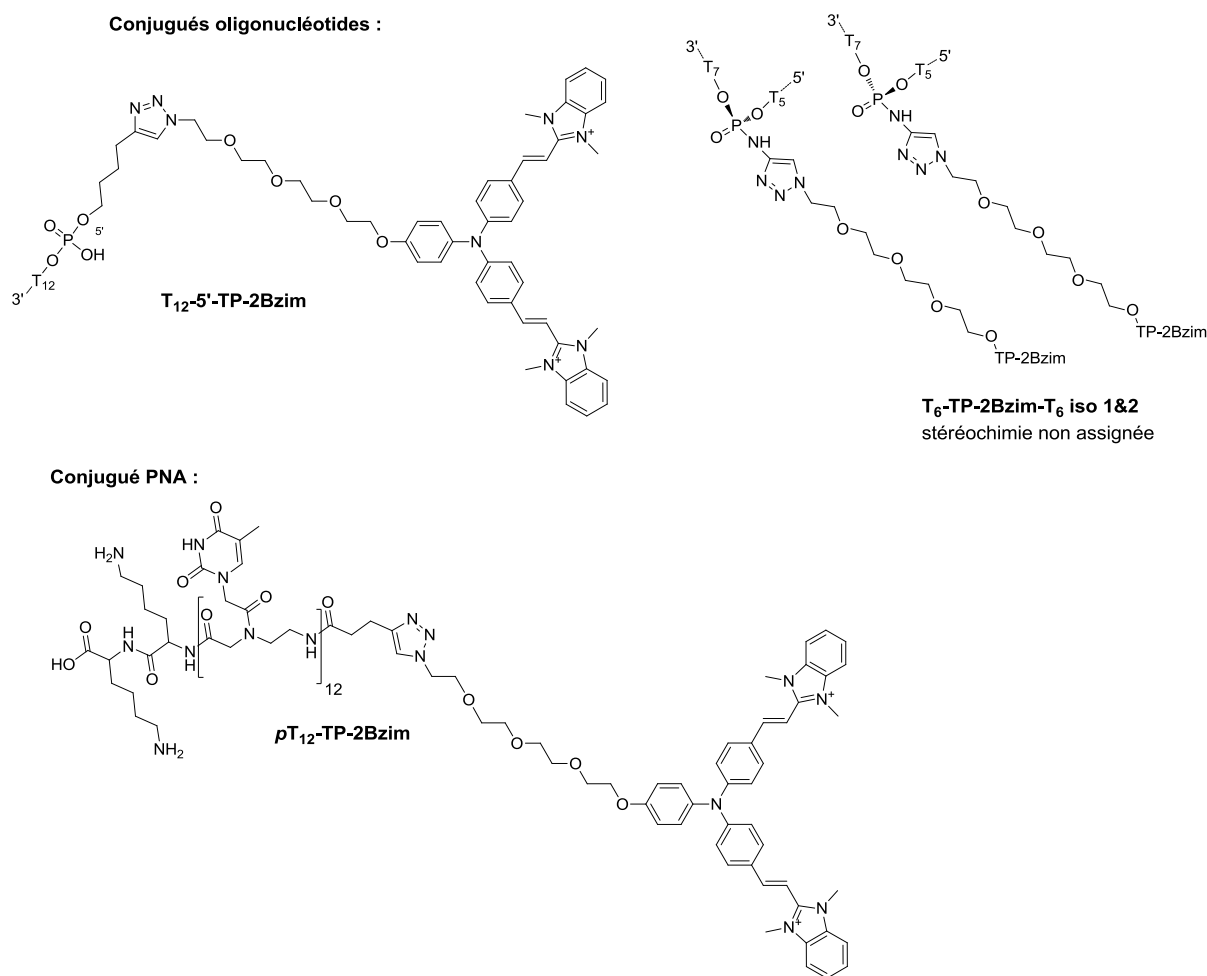


Figure 117. Structure chimique des conjugués.

2. Sélectivité d'hybridation et fluorescence

Les tests d'hybridation *in situ* ont été effectués sur deux séries d'oligonucléotides :

- Une première série composée d'un oligonucléotide simple brin d(A)_{25} nommé simplement A_{25} et d'un duplex $\text{d(A)}_{25} \cdot \text{d(T)}_{25}$ nommé par la suite $\text{A}_{25}\text{T}_{25}$. Ces oligonucléotides cibles présentent deux fois la séquence complémentaire de l'oligonucléotide sonde T_{12} et favorisent *a priori* l'hybridation des conjugués **TP-2Bzim**. Ces derniers peuvent interagir par hybridation avec le simple brin ou avec

le duplex par invasion ou formation de triplex. Les séquences des différents oligonucléotides permettent en effet la formation de structures triplex de type T.A.T. Le ds26 qui ne présente pas de séquence complémentaire sera utilisé comme contrôle négatif.

- Une deuxième série composée d'un oligonucléotide simple brin de séquence d(CGCGA₁₂CGCG) nommé A₁₂ et d'un duplex d(CGCGA₁₂CGCG).d(GCGCT₁₂GCGC) nommé A₁₂T₁₂. Ces derniers ne comportent qu'une seule fois chacun la séquence complémentaire des sondes et la série impose donc plus de contrainte à la reconnaissance complète des douze paires de base des conjugués fluorescents que la précédente. Un simple brin d(GCGCT₁₂GCGC) nommé T₁₂ sera utilisé comme contrôle négatif.

Les quatre conjugués peuvent interagir de différentes façons avec l'ADN cible selon la structure de la sonde (PNA ou oligonucléotide) et le branchement de la TP-2Bzim (position terminale ou intermédiaire) (Figure 118).

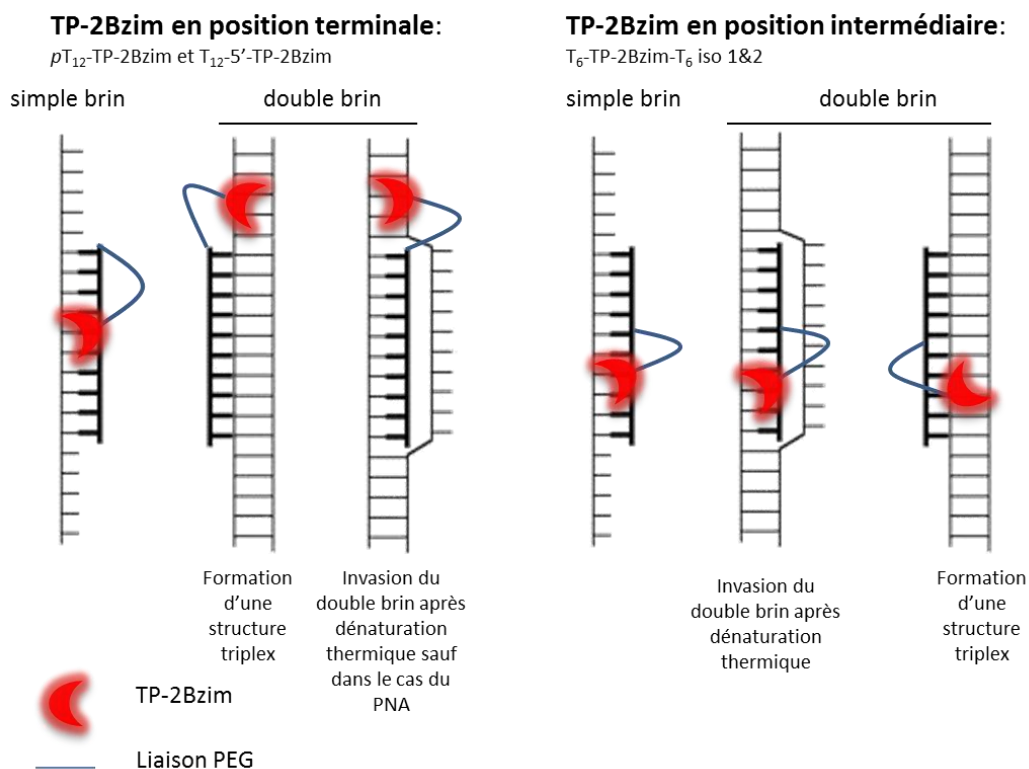


Figure 118. Représentation schématique des différents modes de liaison possibles des sondes fluorescentes oligonucléotidiques et PNA à l'ADN.

Les conjugués peuvent s'hybrider avec un simple brin par hybridation et avec un duplex de séquence AT en formant une structure triplex de séquence TAT ou en envahissant le double brin. Ce dernier mode de liaison nécessite une étape préalable de dénaturation thermique, les oligonucléotides ne pouvant pas spontanément envahir un double brin d'ADN. Cette étape n'est pas nécessaire pour le PNA. La **TP-2Bzim** doit ensuite pouvoir s'insérer dans le petit sillon d'une structure ADN duplex pour fluorescer. Dans le cas d'une interaction avec un simple brin, la **TP-2Bzim** va donc se replier dans le duplex formé par les deux simples brins de la sonde et de la cible. Ce repliement devrait être favorisé par le branchement en position intermédiaire de la **TP-2Bzim** et, s'il n'est pas possible, aucune variation du signal de fluorescence ne devrait être observée. Lors de l'interaction

avec une cible de structure duplex, deux cas sont possibles. Lorsque la **TP-2Bzim** est branchée en position terminale, celle-ci va certainement se lier préférentiellement dans la séquence duplex adjacente, alors que, dans le cas d'un branchement en position intermédiaire, elle va se replier dans le petit sillon de la séquence complémentaire détectée par l'oligonucléotide sonde (Figure 118). L'affinité de la **TP-2Bzim** pour l'ADN étant fortement dépendante de la séquence, ces différents modes d'interactions peuvent être influencés par les différentes séquences d'ADN mises en jeu, mais aussi par la nature et la rigidité du lien espaceur entre l'oligonucléotide ou le PNA et la **TP-2Bzim**.

a. Propriétés de fluorescence

La première observation est que, pour les quatre conjugués, la fluorescence à l'état libre en solution aqueuse est beaucoup plus importante que pour la **TP-2Bzim** non conjuguée (Figure 119). Il y a donc des interactions avec l'oligonucléotide sonde T_{12} et formation d'une structure permettant la fluorescence de la **TP-2Bzim**. Ce phénomène est connu pour les conjugués PNA ou oligo-cyanines de type « *light-up probes* » [209]. La forme générale du spectre de fluorescence à l'état libre est très proche de celle de la **TP-2Bzim** pour les conjugués oligonucléotides, avec un maximum vers 590 nm, alors que celle du conjugué PNA est significativement déplacée vers le rouge avec un maximum d'émission à 620 nm.

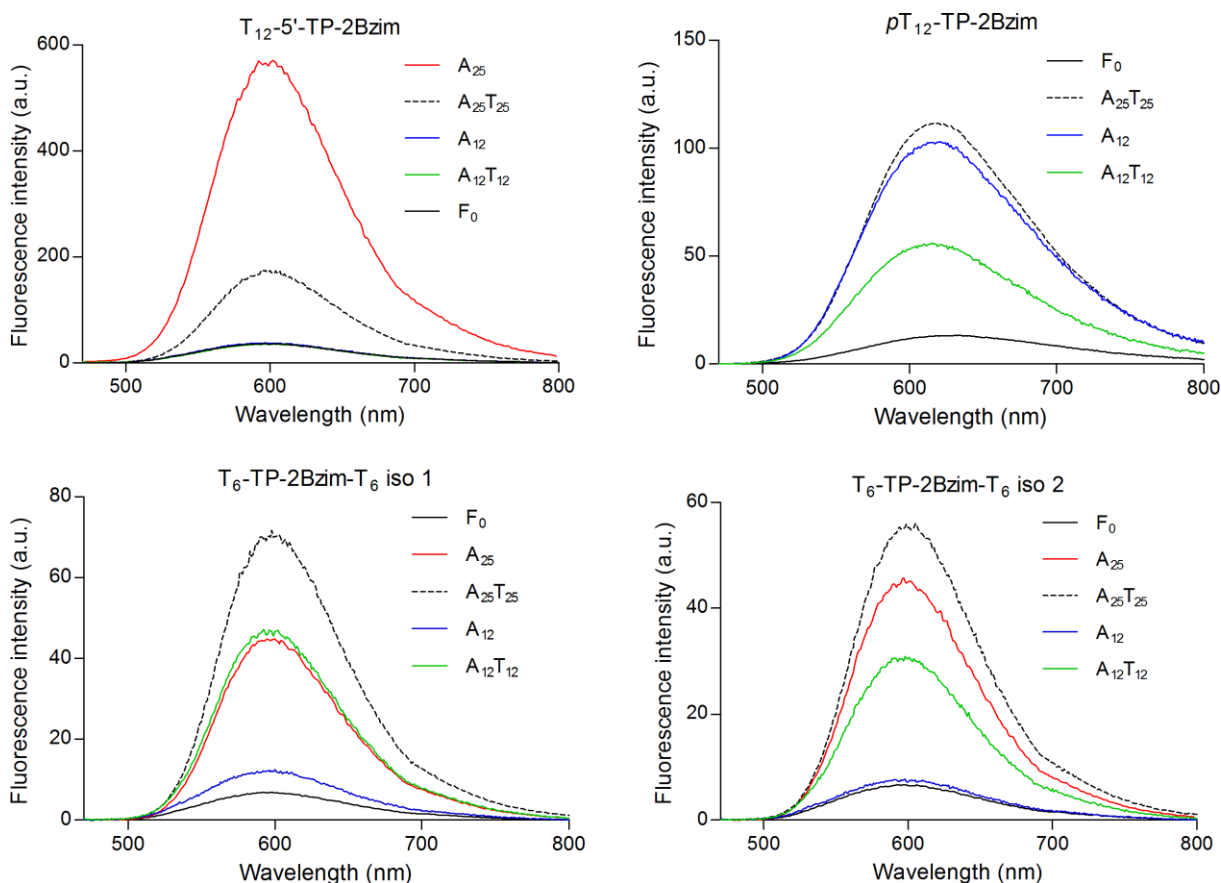


Figure 119. Spectres d'émission de fluorescence des différents conjugués T_{12} -TP-2Bzim libres en solution (F_0) et en présence de différents oligonucléotides complémentaires.

$\lambda_{exc} = 448$ nm.

Les intensités relatives entre les composés ne peuvent être comparées, les conditions de mesures étant différentes. Se référer à la Figure 120 pour les exaltations de fluorescence et les conditions de mesures détaillées.

En présence des oligonucléotides cibles, la fluorescence des **TP-2Bzim** conjuguées est exaltée, avec une amplitude et une sélectivité qui varient fortement en fonction du composé et de sa cible. Dans le cas des conjugués oligonucléotides, le maximum d'émission après hybridation reste inchangé à 590 nm alors que pour le conjugué PNA il passe de 620 nm à l'état libre à 610 nm en présence de l'ADN cible.

b. Sélectivité

En présence d'ADN A_{25} et $A_{25}T_{25}$, la fluorescence des trois conjugués oligonucléotides est exaltée avec des facteurs d'exaltations F/F_0 variant entre 3 et 8 (Figure 120). Ces derniers sont assez faibles par rapport à l'exaltation de la **TP-2Bzim** non conjuguée dans l'ADN (F/F_0 entre 100 et 150 selon la séquence, Cf. chapitre 1.1), mais cela est dû essentiellement au signal de fluorescence important du conjugué à l'état libre (F_0) et le signal de fluorescence après hybridation est suffisamment intense pour permettre une détection aisée. Le rendement quantique des conjugués après hybridation n'a pas été calculé précisément mais peut être qualitativement estimé autour de 0.1 - 0.2 par comparaison avec l'intensité de fluorescence de composés similaires comme la **TP-2Py** qui a un rendement quantique de 0.07 dans le drewAT. Il reste en tout cas plus faible que la **TP-2Bzim** non conjuguée dans le drewAT ($\Phi_F = 0.54$). L'exaltation de fluorescence est globalement plus importante lorsque la **TP-2Bzim** est branchée en position intermédiaire (composés iso 1&2, $F/F_0 = 6-8$) que lorsqu'elle est accrochée en position 5'-terminale ($F/F_0 = 3-4$). C'est le composé **T₆-TP-2Bzim-T₆ iso 1** qui donne l'exaltation la plus importante avec un facteur d'exaltation de 8 dans $A_{25}T_{25}$. Pour les trois conjugués oligonucléotides l'exaltation est plus forte en présence de duplex $A_{25}T_{25}$ qu'en présence de simple brin. Aucune exaltation n'est observée en présence des oligonucléotides non complémentaires simple brin T_{25} et double brin ds26. Le conjugué PNA testé dans le duplex $A_{25}T_{25}$ a donné une exaltation de fluorescence de 7, soit assez proche de la meilleure exaltation observée pour les conjugués oligonucléotides. De manière plus inattendue, il a donné le même résultat dans le ds26 qui ne présente pourtant pas de séquence complémentaire.

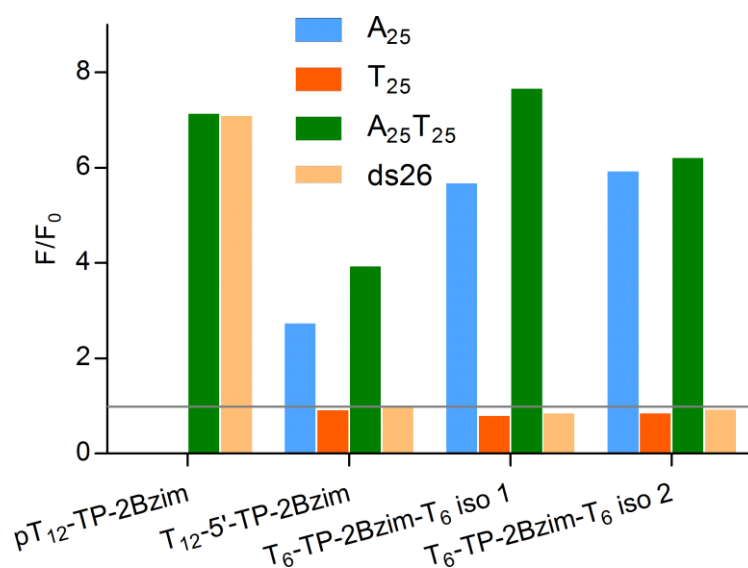


Figure 120. Exaltations de fluorescence des sondes oligonucléotides et PNA conjuguées à la TP-2Bzim en présence des oligonucléotides cibles A_{25} , T_{25} , $A_{25}T_{25}$ et ds26.

$[pT_{12}\text{-TP-2Bim}] = [T_{12}\text{-5'-TP-2Bzim}] = 2 \mu\text{M}$, $[T_6\text{-TP-2Bzim-T}_6 \text{ iso 1\&2}] = 1 \mu\text{M}$, en présence de 2 équivalents molaires d'ADN cible. Tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa, 100 mM NaCl).

$\lambda_{\text{exc}} = 448 \text{ nm}$, détection : 470 – 800 nm.

Les signaux de fluorescence ont été mesurés avant et après une étape de dénaturation de l'oligonucléotide cible pour permettre l'hybridation avec la sonde : le mélange a été porté à 90°C pendant 5 minutes avant un refroidissement lent sur trois heures jusqu'à température ambiante. Aucune différence n'a été observée, ce qui laisse supposer que les conjugués oligonucléotides interagissent avec le duplex en formant des structures triplex puisque l'ouverture du duplex n'est pas nécessaire pour observer la fluorescence. Le PNA peut lui envahir le duplex sans dénaturation thermique préalable, il est donc difficile de savoir s'il forme un duplex ou un triplex.

Les exaltations de fluorescence dans les oligonucléotides cibles ne comportant qu'une seule fois la séquence complémentaire sont très différentes. Le conjugué T_{12} -5'-TP-2Bzim ne donne aucune exaltation de fluorescence quelle que soit la séquence cible (Figure 121). Ceci n'indique pas forcément l'absence d'hybridation. En effet dans l'hypothèse où celle-ci aurait bien lieu, la TP-2Bzim pourrait se retrouver insérée dans la partie de l'oligonucléotide cible de séquence GC, cette dernière étant moins favorable à la liaison et à la fluorescence de la TP-2Bzim qu'une séquence AT. Les deux isomères portant la TP-2Bzim branchée sur une position intermédiaire de l'oligonucléotide T_{12} donnent des exaltations de l'ordre de 3 à 4 dans le duplex $A_{12}T_{12}$. Il est à noter que cette exaltation est légèrement plus forte après une étape de dénaturation thermique. Il est vraisemblable que, lors de l'hybridation, la sonde ne reconnaît pas forcément directement les douze paires complémentaires de la cible, et cette hybridation partielle peut défavoriser la fluorescence de la TP-2Bzim.

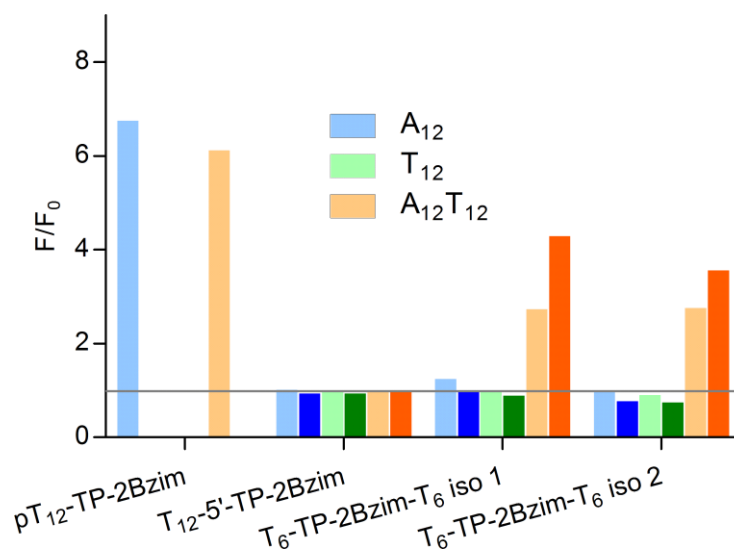


Figure 121. Exaltations de fluorescence des sondes oligonucléotides et PNA conjuguées à la TP-2Bzim en présence des oligonucléotides cibles A_{12} , T_{12} et $A_{12}T_{12}$ avant (couleur claire) et après (couleur foncée) dénaturation thermique.

[pT₁₂-TP-2Bim] = 2 μ M, [T₁₂-5'-TP-2Bzim] = 1 μ M, [T₆-TP-2Bzim-T₆ iso 1&2] = 0.5 μ M, en présence de 2 équivalents molaires d'ADN cible. Tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CacoNa, 100 mM NaCl). λ_{exc} = 448 nm, détection = 470 – 800 nm.

Après dénaturation thermique en revanche, le refroidissement lent conduit à la formation de la structure thermodynamiquement la plus stable où les douze bases de la sonde sont hybridées sur la cible augmentant légèrement le signal de fluorescence. L'émission des deux composés iso 1&2 n'est par contre pas modifiée en présence du simple brin A_{12} même après une étape de dénaturation thermique et, comme attendu, les trois conjugués oligonucléotides ne donnent pas non plus d'exaltation de fluorescence avec le contrôle négatif T_{12}

simple brin. Dans le simple brin A_{12} et le duplex $A_{12}T_{12}$, la fluorescence du **pT12-TP-2Bzim** est exaltée avec des facteurs d'exaltations entre 6 et 7 légèrement plus importants que pour les composés iso 1 et iso 2 et du même ordre que ceux observés dans $A_{25}T_{25}$ et le ds26.

Les conjugués oligos et PNA peuvent donc être employés pour la détection d'hybridation *in situ* par fluorescence mais l'avantage de l'émission commutable des marqueurs TP est assez modéré ici, étant donné que la fluorescence des conjugués à l'état libre est plus élevée que celle des TP libres. De plus, la fluorescence de la **TP-2Bzim** reste sensible à la séquence cible et aux bases adjacentes, comme le montre l'exemple du conjugué **T₁₂-5'-TP-2Bzim** dont la fluorescence est potentiellement éteinte par les paires de base GC. Le branchement de la **TP-2Bzim** sur une position intermédiaire de l'oligonucléotide sonde donne cependant de bien meilleurs résultats et les composés **T₆-TP-2Bzim-T₆ iso 1&2** donnent, après hybridation avec les oligonucléotides A_{25} , $A_{25}T_{25}$ et $A_{12}T_{12}$ des signaux de fluorescence intenses aisément détectables et avec un facteur d'exaltation qui varie entre 5 et 7. Dans l'ensemble, les trois conjugués oligonucléotides T_{12} semblent plus adaptés à la détection de structure duplex d(A).d(T) par formation d'une structure triplex qu'à la détection de séquences complémentaires simple brin.

L'emploi d'un conjugué PNA a donné des exaltations de fluorescence globalement meilleures que dans le cas des conjugués oligonucléotides, mais toute discrimination de séquence est perdue. Le PNA s'hybride et donne des exaltations de fluorescence comparables quelle que soit la séquence, même si celle-ci n'est pas complémentaire comme c'est le cas du ds26. Le PNA n'a donc pas de sélectivité optique, mais si l'on regarde l'évolution de la fluorescence en fonction de la quantité d'ADN ajoutée dans le cas des oligos $A_{25}T_{25}$ et ds26, il apparaît clairement que l'affinité du composé **pT₁₂-TP-2Bzim** est bien plus élevée pour le duplex $A_{25}T_{25}$ que pour le duplex ds26 (Figure 122).

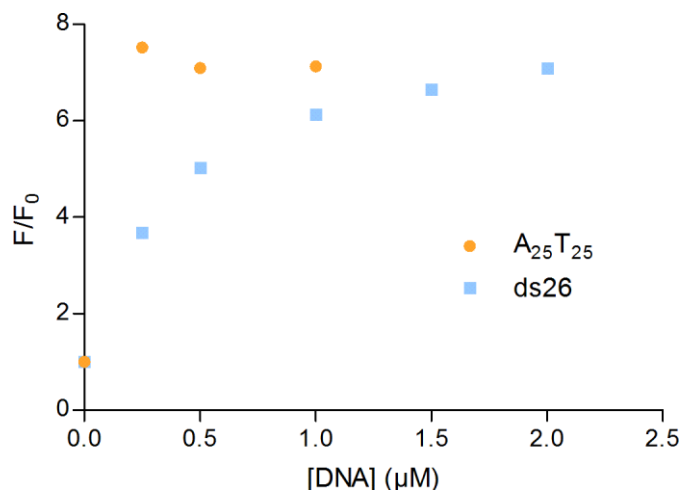


Figure 122. Evolution de la fluorescence d'une solution de pT12-TP-2Bzim à 2 µM en fonction de la concentration en ADN A25T25 ou ds26 ajoutée.

$[pT_{12}\text{-TP-2Bzim}] = 2 \mu\text{M}$ dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.2 (10 mM CaCO₃, 100 mM NaCl).

$\lambda_{\text{exc}} = 448 \text{ nm}$, détection : 470 – 800 nm.

Le comportement des conjugués oligonucléotides et PNA reste difficile à rationaliser et des études complémentaires en dichroïsme circulaire et des mesures de température de fusion sont nécessaires pour

étudier plus finement l'affinité des différents conjugués avec les oligonucléotides cibles et leur mode d'hybridation (passage par une forme duplex ou triplex).

Malgré des exaltations de fluorescence peu élevées, les quatres sondes décrites sont brillantes et les propriétés d'absorption à deux photons de la **TP-2Bzim** les rendent tout à fait intéressante pour le développement de la technique de FISH excitée à deux photons. Les avantages de la microscopie biphotonique peuvent en effet bénéficier à la détection d'hybridation par fluorescence : l'excitation dans l'infrarouge permet de limiter la photodégradation des échantillons et l'autofluorescence et le confinement de l'excitation à un volume de l'ordre du femtolitre permet d'obtenir des informations sur l'architecture des chromosomes dans les trois dimensions [204]. Elle reste cependant très peu utilisée car à notre connaissance, aucun fluorophore spécialement optimisé pour l'absorption non linéaire n'a jamais été développé pour la technique de FISH.

Des variations de structure pourront être apportées notamment au niveau du lien entre la **TP-2Bzim** et l'oligonucléotide ou le PNA pour essayer de limiter la fluorescence du conjugué libre et augmenter les facteurs d'exaltation F/F_0 . Il a en effet été montré que la taille [210] et la lipophilie [211] du bras espaceur sont des facteurs importants de la fluorescence à l'état libre et aussi lors de l'hybridation. Enfin il conviendra aussi d'étudier plus finement leur sélectivité d'hybridation et leur sensibilité aux mésappariements de bases en faisant varier les séquences oligonucléotidiques des sondes et des cibles.

C. VECTORISATION CELLULAIRE

L'affinité intrinsèque des marqueurs vinyl-triphénylamines pour l'ADN est à l'origine de leur localisation intracellulaire, il est cependant nécessaire pour l'imagerie au niveau tissulaire de disposer d'un moyen de vectorisation cellulaire. Nous nous sommes notamment intéressé à la conception de conjugués sélectifs de cellules tumorales pour l'imagerie tissus cancéreux. De tels conjugués sont aujourd'hui utilisés notamment en chirurgie guidée par fluorescence pour mettre en évidence les cellules cancéreuses lors de l'ablation de tumeurs (référence). Les deux vecteurs que nous avons sélectionnés pour les conjuguer à nos marqueurs sont l'acide folique et les polyamines.

I. Conjugué TP-2Bzim-spermidine

1. Polyamines

a. Structure et fonction cellulaire

Les polyamines (spermine, spermidine et putrescine, Figure 123) sont des composants intracellulaires aux fonctions multiples et parfois encore mal connues. Elles sont notamment impliquées dans la régulation des gènes, la progression du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire [212,213].

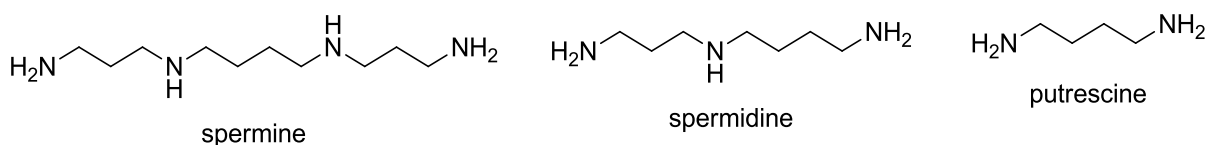


Figure 123. Structure des polyamines spermine, spermidine et putrescine.

Les polyamines tirent leur activité biologique de leur capacité à interagir avec les acides nucléiques. Leurs azotes sont en effet entièrement chargés en milieu physiologiques et les polyamines peuvent interagir de manière électrostatique avec l'ADN mais sont surtout présentes sous forme de complexe avec l'ARN. On les trouve dans tous les types cellulaires, mais leur concentration est plus élevée dans les tissus à renouvellement rapide et en particulier dans les cellules tumorales. Ce sont des composants essentiels à la cellule mais une

concentration trop élevée entraîne la mort cellulaire par apoptose. Cette concentration est régulée par un système complexe qui passe notamment par la biosynthèse et un système d'incorporation cellulaire ATP-dépendant, et elle varie au cours du cycle cellulaire : elle augmente lors de la réplication de l'ADN et diminue lors de la mitose. La capacité des polyamines à réguler le cycle cellulaire et la réplication des gènes tient vraisemblablement à leur capacité à influencer sur la conformation de l'ADN en modulant la stabilité de la chromatine. Elles interagissent préférentiellement dans les zones riches en GC et peuvent aussi induire des transitions de l'hélice B vers l'hélice Z même si la signification biologique de ce phénomène reste mal connue. Les polyamines servent également de régulateur à la synthèse de protéine en interagissant avec l'ARNm.

b. Application à la vectorisation

Les polyamines agissent comme régulateur à deux niveaux, la réplication de l'ADN et la synthèse des protéines, et sont indispensables à la prolifération cellulaire. L'inhibition de leur biosynthèse est donc une cible potentielle pour la thérapie anticancéreuse mais n'a jamais abouti à un médicament. En revanche les polyamines représentent un bon moyen de vectorisation d'agents thérapeutiques vers les cellules cancéreuses de par leur accumulation dans les tumeurs et leur système de transport transmembranaire actif qui améliore la pénétration cellulaire des conjugués. Des chromophores conjugués à la spermine ont ainsi été mis au point comme sondes du système de transport des polyamines [214]. Ils ont montré une bonne sélectivité et ont permis d'étudier la cytotoxicité de drogues vectorisées par ce système de transport. Plus récemment, des conjugués de naphthalène anticancéreux et de polyamines ont montré une meilleure activité sur les cellules cancéreuses et une limitation des effets secondaires sur les cellules saines par rapport à la drogue seule [215].

2. Synthèse du conjugué

La synthèse de la **TP-2Bzim** conjuguée à la spermidine a été effectuée en collaboration avec le Dr. Guillaume Garcia selon une stratégie décrite dans la littérature qui utilise l'amine secondaire de la spermidine comme point d'ancrage pour le fluorophore [216]. Cette technique permet de jouer sur la différence de réactivité des amines primaires et secondaires pour protéger sélectivement les premières et introduire sur la seconde un bras aminopropyle pour accrocher ensuite la **TPn-2Bzim-TEG-COOH** par couplage peptidique. La conjugaison de la TP-2Bzim sur une position terminale de la spermidine et donc sur une amine primaire a été envisagée mais entraîne des difficultés de synthèse et des couplages multiples sur les deux amines primaires.

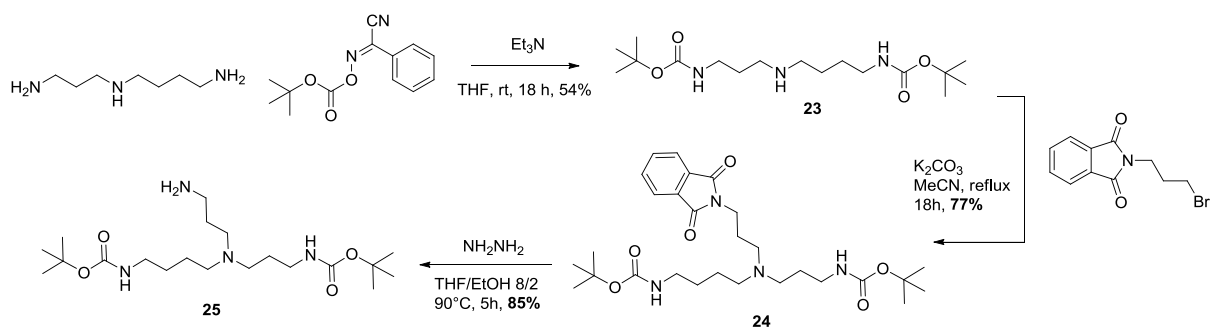


Schéma 16. Synthèse du synthon polyamine.

La polyamine protégée et portant une chaîne propylamine a été préparée séparément (Schéma 16) avant d'être couplée à la **TPn-2Bzim-TEG-COOH**. Les amines primaires de la spermidine ont été sélectivement protégées par un groupement Boc par réaction avec le Boc-ON dans le THF en présence de triéthylamine à température ambiante pour donner le composé **23** avec un rendement de 54%. Les étapes suivantes de la synthèse se passent en conditions basiques dans lesquelles le groupement Boc est stable, mais il est par contre facilement déprotégé en conditions acides. Le composé **23** a ensuite été mis à réagir avec un phthalimide N-bromopropane en présence de K_2CO_3 comme base pour donner le produit **24** avec un rendement de 77%. La déprotection du groupement phthalimide par l'hydrazine avec un rendement de 85% a ensuite conduit à la polyamine attendue **25**.

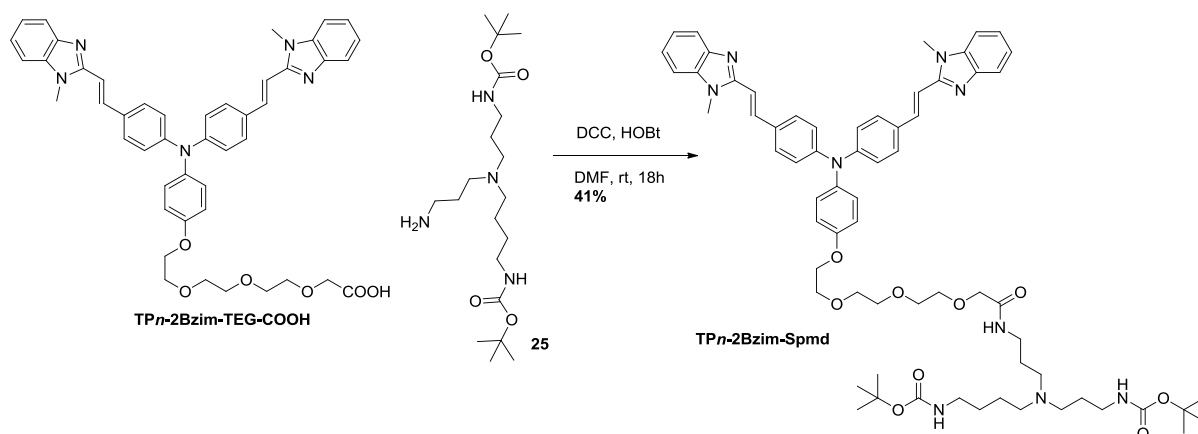


Schéma 17. Couplage peptidique entre la polyamine **23** et la **TPn-2Bzim-TEG-COOH**.

Le couplage peptidique entre la **TPn-2Bzim-TEG-COOH** et la polyamine **25** en présence de DCC et de HOBT a ensuite permis d'obtenir le conjugué entre la **TP-2Bzim** et la spermidine **TPn-2Bzim-Spmid** avec un rendement de 41% (Schéma 17). Il est cependant encore nécessaire à ce stade pour obtenir le composé potentiellement actif de quaternariser les azotes des groupements benzimidazole et de déprotéger les amines primaires de la spermidine.

Nous avons tout d'abord essayé de méthylmer la **TP-n2Bzim-Spmid** par la méthode habituellement utilisée lors de la synthèse de nos marqueurs, à savoir en utilisant l'iodure de méthyle en large excès (Schéma 18).

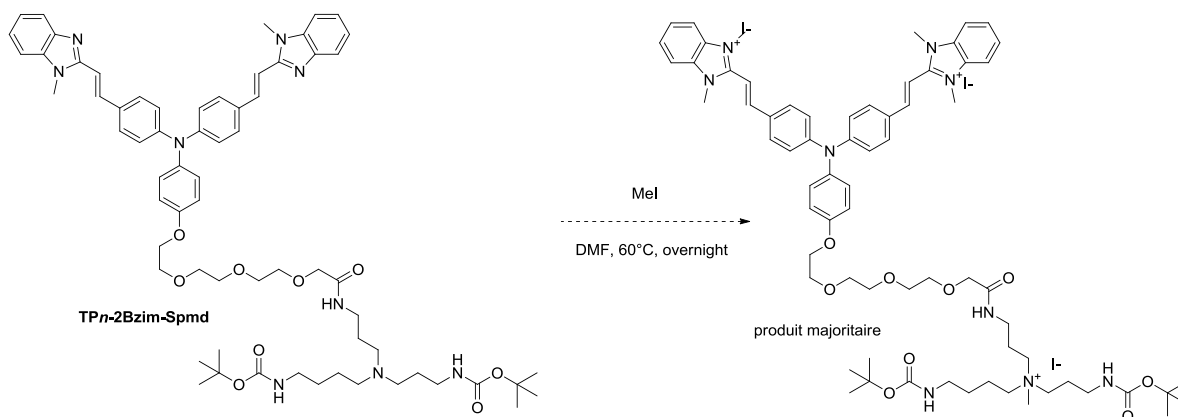


Schéma 18. Tentative de méthylation de la **TPn-2Bzim-Spmid**.

Cette méthode a conduit à un mélange de composés inséparables. L'analyse par LC-MS du mélange a révélé la présence des produits mono bis et, étonnamment, triméthylé, le troisième méthyle étant porté par l'amine tertiaire de la chaîne polyamine. Ce dernier est même majoritaire d'après le profil HPLC. Plusieurs tentatives pour contrôler la réaction ont été effectuées en vain. Le suivi de la réaction par HPLC montre une apparition rapide au bout de deux heures du produit triméthylé avant même la disparition totale du produit de départ, ce qui est inattendu mais peut-être dû aux différences de solubilité des différents composants du mélange dans le milieu réactionnel (Figure 124).

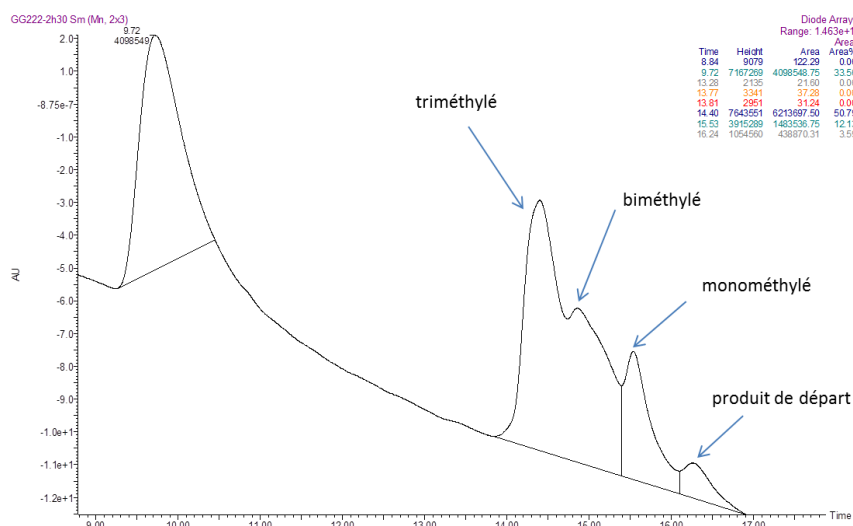


Figure 124. Analyse HPLC de la réaction de méthylation de la TPn-2Bzim-Spm d'après 2h30 d'agitation.

Produits identifiés par LC-MS.

Gradient linéaire d'eau (0.1% acide formique) et d'acétonitrile. 98/2 (0 min) – 60/40 (15 min) – 0/100 (30 min).

Avant de procéder à la déprotection des groupements Boc à l'acide trifluoroacétique et aux tests en cellules, il est donc nécessaire de mettre au point une méthode de méthylation sélective permettant d'obtenir uniquement le produit attendu. L'utilisation d'agents alkylants plus doux comme le tosylate de méthyle n'a pas non plus permis d'obtenir le produit attendu. Une méthode de méthylation par l'iodure de méthyle dans le DMF avec un chauffage par micro-ondes a été décrite récemment pour alkyler sélectivement des amines aromatiques en présence d'amines aliphatiques et reste à tester [217].

II. Conjugué TP-2Bzim-acide folique

1. Acide folique : structure et propriétés de vectorisation

a. Structure et fonction cellulaire

L'acide folique, qui n'est autre que la vitamine B9 (Figure 125), est un composant indispensable pour la survie des cellules. Les récepteurs à l'acide folique (folate receptor FR) ne présentent pas normalement d'affinité pour l'acide folique conjugué et ne reconnaissent donc pas les drogues vectorisées par l'acide folique. En revanche il existe un isoforme du récepteur (FR- α) qui est surexprimé à la surface des cellules tumorales dans 40% des cancers humains qui permet la reconnaissance de ces conjugués.

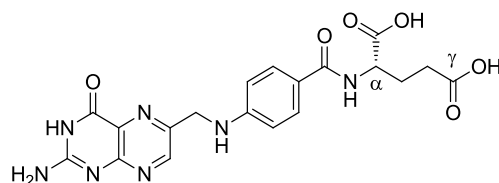


Figure 125. Structure de l'acide folique

L'acide folique est donc un vecteur privilégié pour l'imagerie ou la thérapie tumorale ciblée, d'autant qu'il a un poids moléculaire relativement faible ($M = 441 \text{ g.mol}^{-1}$) qui permet une bonne pénétration dans les tumeurs et un mode d'internalisation cellulaire par endocytose *via* le récepteur FR qui permet par conjugaison de rendre perméable à la membrane cellulaire des drogues qui, libres, ne le sont pas (Figure 126). Par ailleurs l'affinité élevée des FR pour l'acide folique ($K_d \approx 100 \text{ pM}$), qui assure une saturation des récepteurs par l'agent thérapeutique même lorsque les récepteurs ne sont présents qu'en faible quantité à la surface de la protéine, et la clairance rapide des conjugués d'acide folique dans les tissus FR⁻ ($t_{1/2} < 10 \text{ min}$) garantissent une vectorisation efficace et sélective [218,219].

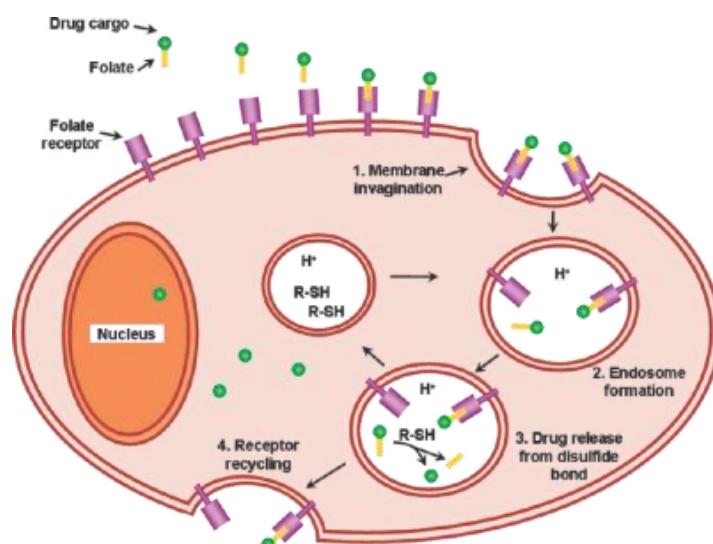


Figure 126. Mécanisme de l'endocytose médiée par les récepteurs à l'acide folique.

Image adaptée de la ref. [220].

L'acide folique présente deux fonctions acides carboxyliques pour la conjugaison et est un composé peu coûteux qui permet de mettre au point des conjugués à relativement bas prix comparé aux anticorps marqués par exemple.

b. Exemple de chromophores vectorisés par l'acide folique

La stratégie de vectorisation par l'acide folique a été utilisée dans de nombreux conjugués à visée thérapeutique ou pour l'imagerie. Le premier conjugué testé sur l'homme est un complexe de ^{111}In pour la scintigraphie. Il a permis de mettre en évidence une accumulation dans les tissus cancéreux et dans les reins pour les patients sains. En ce qui concerne les fluorophores, un conjugué de fluorescéine [221] a permis d'imager des biopsies de cerveau de souris sur des tissus qui, bien que sains, surexpriment également les récepteurs FR. Un autre conjugué avec une cyanine NIR2 [222] qui émet dans le proche infra-rouge a permis d'imager des tumeurs en profondeur sur des souris anesthésiées (Figure 127).

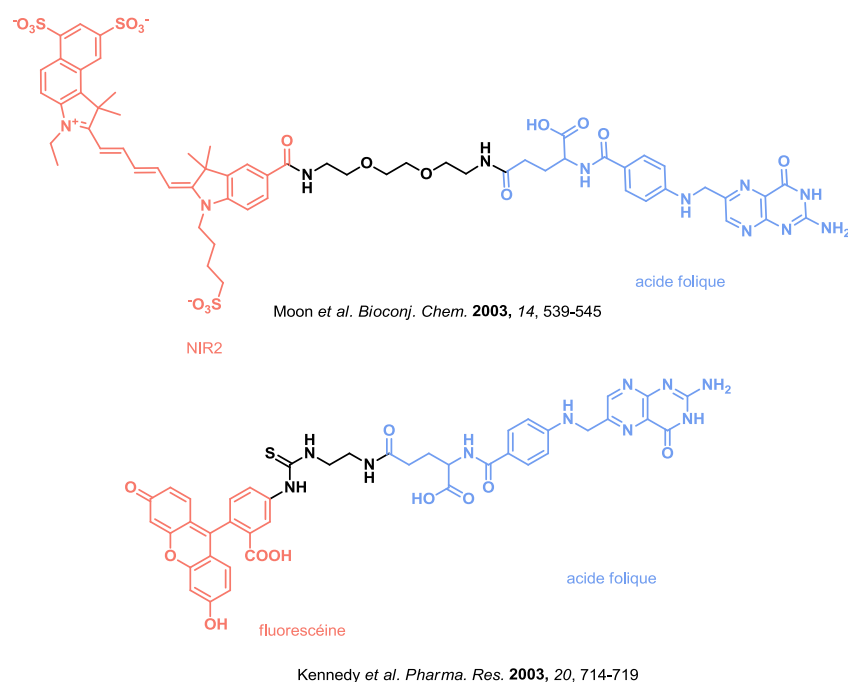


Figure 127. Structure de chromophores conjugués à l'acide folique pour l'imagerie tissulaire.

D'autres conjugués plus complexes comme des systèmes trifonctionnels pour une action combinée imagerie-thérapie ou des systèmes photoactivables pour libérer la drogue en cellule ont également été décrits [223,224].

Dans tous les cas, les études montrent bien une accumulation dans les tissus cancéreux ou surexprimant les récepteurs à folate et une élimination rapide dans les tissus sains, et valident donc la stratégie de vectorisation par l'acide folique.

2. Synthèse du conjugué TP-2Bzim-acide folique (TP-2Bzim-FA)

Il est difficile en pratique de contrôler la réactivité des deux fonctions acides carboxyliques de l'acide folique lors des réactions de couplage, et souvent un mélange de régioisomères α et γ (Figure 125) est obtenu avec également des adduits de diaddition [223]. Les affinités relatives des deux isomères varient selon les conjugués, elles peuvent être similaires [225], mais dans certains cas le régioisomère α n'interagit pas avec les récepteurs [226]. Dans tous les cas, le régioisomère γ semble être le plus affiné et il convient de mettre au point une stratégie de synthèse permettant d'obtenir majoritairement ce dernier.

En plus de conduire à des mélanges de produits inséparables lors des couplages, l'acide folique est un composé peu soluble dans l'eau et les solvants organiques et il n'a donc pas une bonne réactivité. La réaction d'une **TP-2Bzim** fonctionnalisée par une fonction amine directement sur l'acide folique par couplage peptidique n'a donc pas été envisagée car elle aurait vraisemblablement entraîné une perte de matière importante en **TP-2Bzim** fonctionnalisée, qui demande elle-même plusieurs étapes de synthèse. Nous avons donc choisi d'introduire sur l'acide folique une fonction azoture pour ensuite faire réagir la **TP-2Bim-TEG-alcyne** par « chimie click » qui donne *a priori* de meilleurs rendements que l'amidation.

La fonction azoture a été introduite sur l'acide folique par réaction avec la 3-azidopropylamine (Schéma 19), cette dernière pouvant être synthétisée en grande quantité à partir de la 3-bromopropylamine et de l'azoture de sodium.

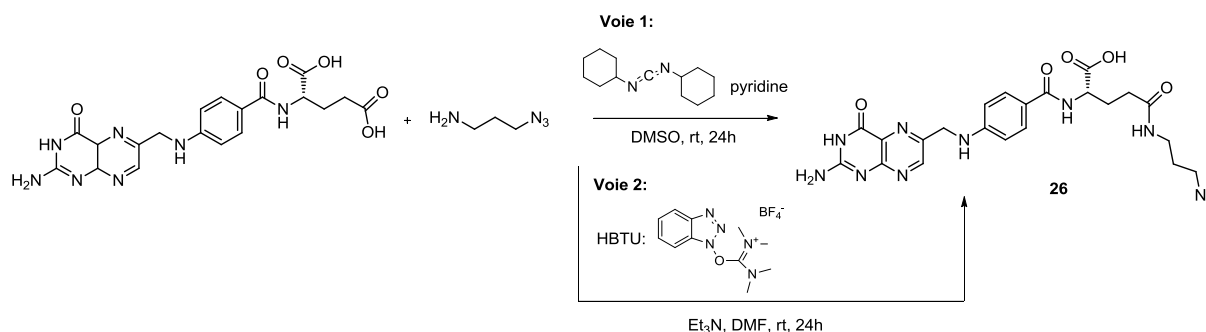


Schéma 19. Couplage peptidique entre la 3-azidopropylamine et l'acide folique.

Deux stratégies ont été testées avec, comme agents de couplage, le DCC en présence de pyridine selon la méthode décrite par Papot *et al.* (voie 1) [223] ou le HBTU en présence de triéthylamine (voie 2). Les deux méthodes ont fourni des mélanges contenant les produits mono- et bisubstitués ainsi que le produit de départ, comme le montrent les analyses LC-MS des bruts de réaction (Figure 128).

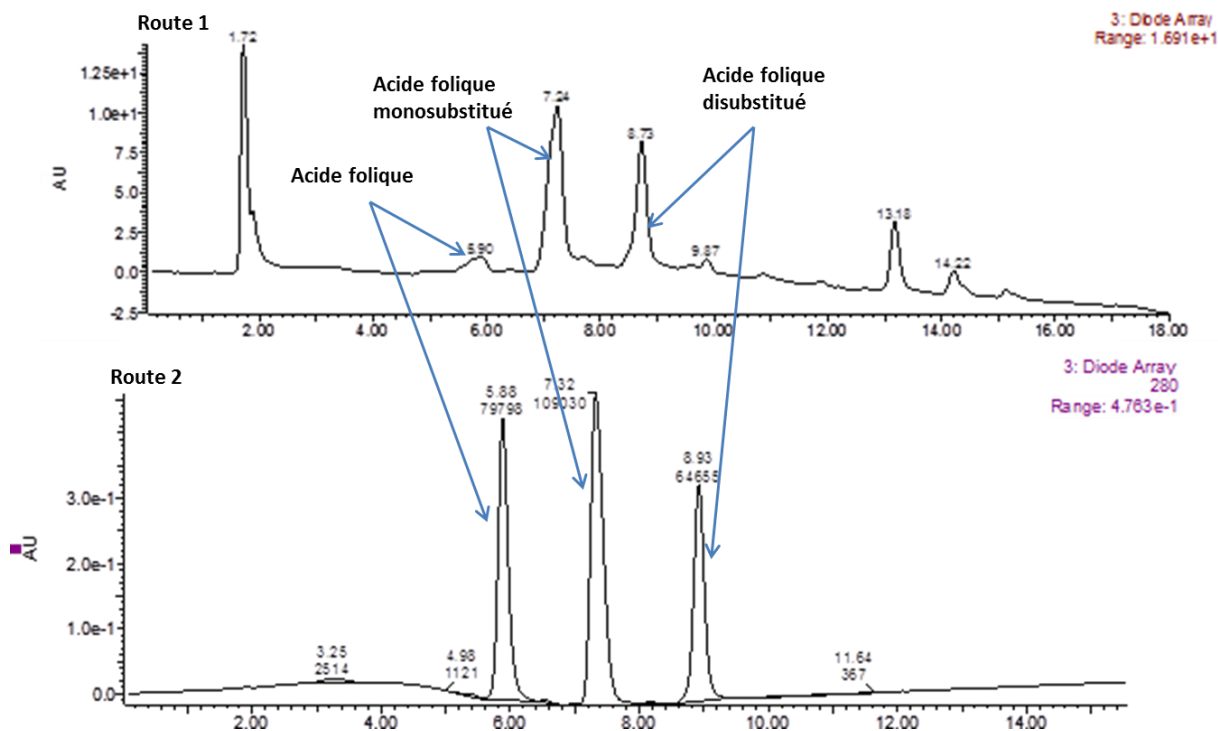


Figure 128. Profils HPLC des bruts réactionnels des deux méthodes testées pour coupler l'acide folique à la 3-azidopropylamine.

HPLC couplée à un spectromètre de masse pour identifier les produits (spectres de masse non montrés).

Par la première méthode, l'acide folique réagit entièrement pour donner le produit monosubstitué et le produit disubstitué dans des proportions quasi équivalente. Le produit attendu **26** est cependant légèrement majoritaire. La conversion de la deuxième méthode est en revanche loin d'être totale et l'acide folique ainsi

que les deux produits mono et disubstitués sont présents dans des proportions comparables. La méthode la plus efficace semble donc la voie 1 qui utilise le DCC en présence de pyridine.

Le produit monosubstitué synthétisé par la première méthode a pu être isolé par HPLC semi-préparative avant d'être engagé dans l'étape de couplage avec la **TP-2Bzim-TEG-N₃** (Figure 129).

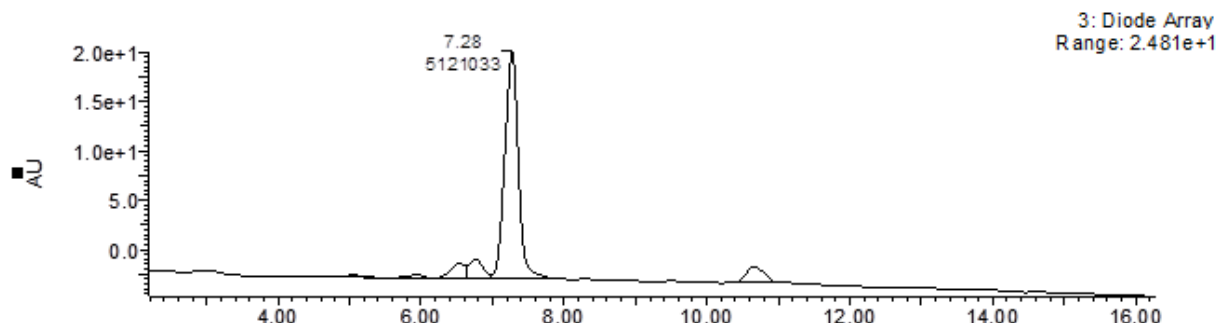


Figure 129. Spectre HPLC du composé 25 purifié.

Seul un pic est observé sur le spectre HPLC hors, d'après la littérature [223], un mélange inséparable des deux produits substitués sur les positions α et γ aurait dû être obtenu. Les deux composés sortent très proches en HPLC et leurs pics respectifs peuvent donc se recouvrir. Le produit majoritaire obtenu par cette méthode est normalement le régioisomère γ , la position étant moins encombrée stériquement et donc plus réactive, et il est possible que dans notre cas particulier seul celui-ci soit obtenu.

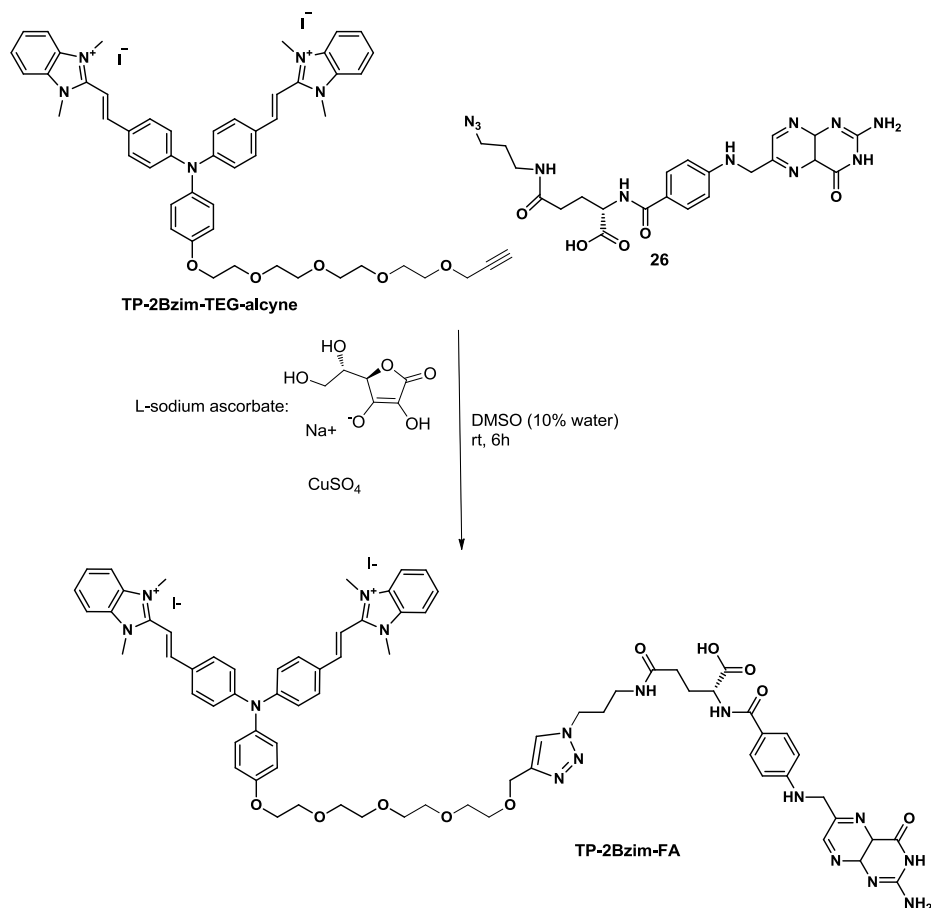
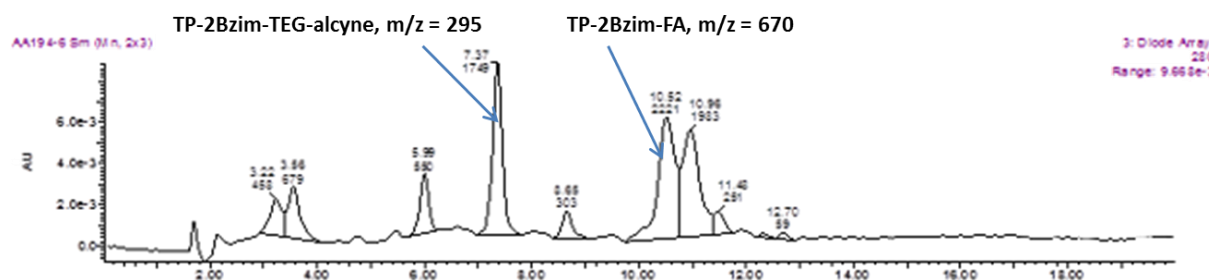


Schéma 20. Couplage par « chimie click » de la TP-2Bzim-TEG-alkyne au composé 26.

Le couplage par chimie click a été exécuté selon les conditions classiques utilisant du cuivre II (CuSO_4). Ce dernier est réduit *in situ* par le L-ascorbate de sodium en cuivre I qui est l'espèce catalytique (Schéma 20).

A cause de sa faible solubilité, le composé **24** brut n'a pu être chargé sur la colonne qu'en petite quantité lors de la purification par HPLC semi-préparative et seuls une dizaine de milligrammes de produit pur ont pu être obtenus. Le couplage avec la **TP-2Bzim** n'a donc été réalisé qu'à très petite échelle et le produit final **TP-2Bzim-FA** n'a pas pu être complètement isolé et caractérisé. Néanmoins, l'analyse du brut de réaction par LC-MS a bien mis en évidence la présence du produit attendu (Figure 130).



CONCLUSION GENERALE

La microscopie de fluorescence est une technique couramment employée en biologie pour l'imagerie cellulaire et de nombreux fluorophores existent déjà pour le marquage, direct ou indirect, des différents composants cellulaires. Malgré son ancienneté⁶, elle reste cependant en constant développement. En effet, les qualités inégalées de l'imagerie par fluorescence, notamment sa sensibilité et sa résolution, ont poussé les chercheurs à adapter la technique à l'imagerie intravitale, jusqu'à présent réservée à la radiographie et à l'IRM. L'avènement de la microscopie biphotonique et, plus récemment, des techniques de microscopie super-résolues (STED, PALM, STORM) exige cependant une optimisation importante des propriétés optiques linéaires et non linéaires des fluorophores. Par ailleurs, pour permettre le développement de l'imagerie *in vivo*, les marqueurs doivent aussi répondre à un certain nombre de critères pharmacologiques. Les fluorophores commerciaux classiquement utilisés sont fréquemment toxiques et ne répondent plus à ce cahier des charges, avec notamment de faibles sections efficaces d'absorption à deux photons.

L'objectif de cette thèse a été de poursuivre le développement d'une série de marqueurs vinyl-triphénylamine fluorescents pour la microscopie biphotonique (Figure 131).

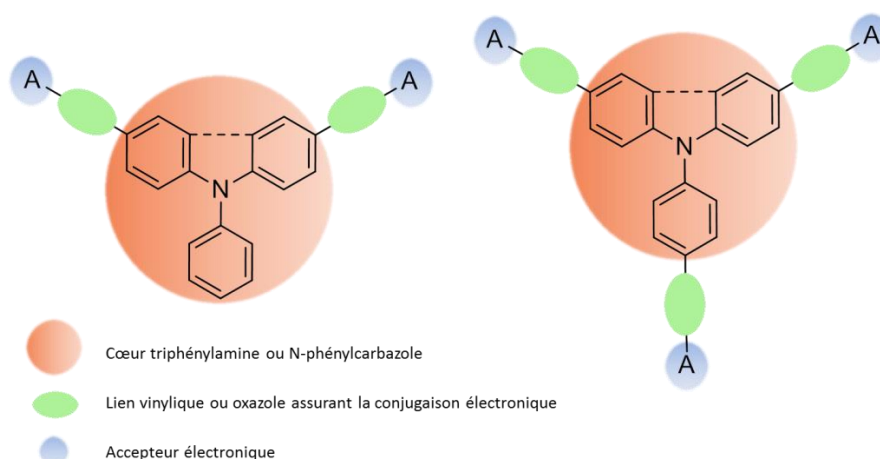


Figure 131. Rappel de la structure générale des marqueurs TP et Cbz.

La première partie de ce travail a consisté à approfondir et à conclure l'étude des relations de structure-activité des marqueurs biphotonique d'ADN vinyl-triphénylamine entamée lors des thèses de Clémence Allain et Guillaume Bordeaux.

De nouvelles molécules ont d'abord été obtenues en remplaçant la conjugaison vinylique par un cycle oxazole et la synthèse de la série TP-Bzim a été optimisée. Les propriétés optiques linéaires de toutes les molécules disponibles ont ensuite été étudiées dans un oligonucléotide duplex modèle d(CGCGAAATTCGCG)₂ afin de s'affranchir des variations dues à la séquence de l'ADN natif et de faciliter la comparaison systématique entre les séries. Toutes les molécules cationiques (à l'exception des TP-Ox2Py et du **Cbz-2Ox5Py** qui sont peu fluorescents) sont des fluorophores dont l'émission est commutée dans l'ADN. Néanmoins en fonction des caractéristiques structurales de chaque molécule, les propriétés optiques et les exaltations de fluorescence dans l'ADN sont très variables. Les TP-oxazoles présentent des rendements quantiques assez faibles dans l'ADN

⁶ Le premier microscope par fluorescence a été développé par Otto Heimstädt et Heinrich Lehmann vers 1911.

($\Phi_F \approx 0.03$) tandis que celui du **Cbz-2Py** est fortement optimisé ($\Phi_F = 0.58$) par rapport aux TP-Py originelles. En revanche, la section efficace d'absorption à deux photons de ce dernier est plus basse ($\delta = 210$ GM contre 450 GM pour la **TP-2Py**). La variation des groupements accepteurs d'électrons a permis, en conservant le noyau vinyl-triphénylamine, d'optimiser le rendement quantique de fluorescence tout en conservant les propriétés d'absorption non linéaire des TP-Py. La série TP-Bzim est la plus efficace, avec une brillance non linéaire de 383 GM pour la **TP-2Bzim** et de 275 GM pour la **TP-3Bzim**. Ces valeurs sont parmi les plus élevées rapportées dans la littérature pour de petites molécules organiques ($M < 1000$ g.mol⁻¹). Les dérivés à trois branches avec leur structure octupolaire ont des sections efficaces d'absorption à deux photons plus élevées que leurs homologues disubstitués, cependant une comparaison systématique sur toutes les familles a permis de mettre en évidence des rendements quantiques de fluorescence dans l'ADN plus élevés pour les dérivés à deux branches. Ces derniers sont donc globalement de meilleurs fluorophores pour l'ADN, avec des brillances linéaires et non linéaires supérieures.

Nous avons ensuite étudié l'interaction des molécules avec l'ADN. Elles ont été testées dans différentes séquences d'acides nucléiques et structures secondaires. Les dérivés de la série vinyl-triphénylamine se sont révélés sélectifs de l'ADN duplex avec une préférence marquée pour les séquences riches en AT. Les deux dérivés **Cbz-2Py** et **Cbz-3Py** sont en revanche moins sélectifs et peuvent notamment interagir avec des structures d'ADN quadruplex. Les constantes d'affinités des ligands pour un oligonucléotide duplex d(CGCGAAATTCGCG)₂ ont été mesurées par titration fluorimétrique après optimisation des conditions expérimentales et mise au point d'une équation mathématique permettant de modéliser la formation d'un complexe de stoechiométrie 1:1. Les résultats ont montré que les ligands TP et Cbz formaient bien des complexes 1:1 avec l'ADN, avec des constantes d'affinités élevées entre 10⁶ et 10⁸ M⁻¹. Parmi les ligands d'ADN, la **TP-2Bzim**, la **TP-3Bzim** et le **Cbz-2Py** se sont révélés être les molécules les plus affines. De façon remarquable, l'optimisation des propriétés optiques a donc permis d'améliorer également l'affinité pour l'ADN, ce qui n'était pas acquis comme le montre l'exemple de la **TP-2Pyo**. Des mesures de dichroïsme circulaire ont mis en évidence une interaction des ligands avec le petit sillon de l'ADN duplex par insertion du motif en V formé par deux branches des triphénylamine. Ceci explique la préférence des ligands pour les séquences AT, qui est une caractéristique des ligands de petit sillon et les meilleures propriétés optiques des dérivés à deux disubstitués, car seules deux branches suffisent pour interagir avec l'ADN. Les molécules de la famille Cbz avec leur structure aromatique condensée sont susceptibles d'interagir également par intercalation entre les bases de l'ADN, ce qui explique leur sélectivité moindre pour la forme duplex ou les séquences AT.

Les molécules ont ensuite été appliquées à l'imagerie cellulaire par microscopie biphotonique. En cellules fixées, les molécules sont localisées dans le noyau cellulaire qui contient l'ADN, en accord avec la sélectivité observée en cuve. Le marquage est très brillant et contrasté, avec une absence de fluorescence dans le cytoplasme ou les nucléoles qui contiennent entre autre de l'ARN. L'optimisation des propriétés non linéaires se traduit, avec la **TP-2Bzim** ou le **Cbz-2Py**, par des signaux intenses avec une puissance d'excitation faible ($\approx 4\%$ de la puissance nominale du laser) qui n'endommage ni l'échantillon ni les fluorophores qui sont photostables. Les marqueurs les plus brillants ont également pu être détectés à une concentration de 0.1 μ M beaucoup plus faible que les conditions habituelles de la microscopie.

A partir du motif vinyl-triphénylamine et après plusieurs optimisations structurales, trois fluorophores ont été mis au point, la **TP-2Bzim**, la **TP-3Bzim** et le **Cbz-2Py**, dont les brillances biphotoniques sont parmi les plus élevées rapportées dans la littérature à l'exception des dendrimères et des nanostructures. Ces molécules hydrosolubles et non toxiques sont par ailleurs des ligands sélectifs de l'ADN duplex, en présence duquel ils deviennent fluorescents après s'être insérés dans le petit sillon de l'hélice B. En microscopie biphotonique, à basse concentration et sous une faible puissance d'excitation, ces fluorophores donnent un marquage très fin de l'ADN nucléaire, permettant de distinguer la structure des chromosomes et les zones de l'ADN riches en AT (Figure 132).

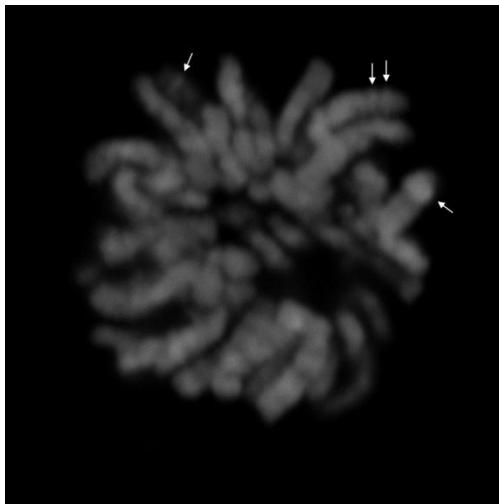


Figure 132. Mise en évidence du phénomène de *chromosome-banding* par marquage préférentiel des zones riches en AT par la TP-2Bzim.

Crédit : J.Y. Thuret, DSV-CEA.

En cellules vivantes en revanche, les TP et les Cbz ne marquent pas le noyau et sont piégés dans les mitochondries, soit dans la membrane, soit dans l'ADN mitochondrial. Il a été montré que, sous illumination constante pendant quelques minutes, les fluorophores provoquent la mort cellulaire par apoptose, le phénomène pouvant être déclenché par excitation mono- ou bi-photonique. Le phénomène peut être suivi par microscopie de fluorescence puisqu'il s'accompagne d'une translocation des marqueurs des mitochondries vers le noyau. Les TP, qui ne sont pas toxiques sans excitation lumineuse prolongée, sont donc de potentiels photosensibilisateurs alliant activité thérapeutique capacité d'imagerie et en ce sens peuvent être considérés comme de nouveaux agents théranostique. Selon leur localisation intracellulaire, les TP et Cbz permettent par ailleurs de distinguer les cellules saines des cellules en apoptose.

Pour étendre le champ d'application des marqueurs vinyl-triphénylamines, nous avons inversé la charge globale des marqueurs cationiques de façon à éviter la fixation sur l'ADN et développer des ligands potentiels de protéines cationiques. Nous avons ainsi synthétisé deux marqueurs anioniques **TP-2Rho** et **TP-3Rho**. Pour étudier le comportement de ces molécules, nous avons choisi l'albumine du sérum humain (HSA) comme modèle. L'inversion de la charge nette des ligands a bien permis de complètement supprimer l'affinité pour l'ADN, par contre les TP-Rho sont des ligands très affins de la HSA. Des titrations fluorimétriques avec et sans compétiteur ont permis de montrer que les TP-Rho se liaient dans le site 1 de la HSA avec des constantes

d'affinités supérieurs à 10^8 M^{-1} . Comme dans le cas des marqueurs cationiques d'ADN, le dérivé à deux branches **TP-2Rho** a une interaction avec le biopolymère mieux définie et plus facile à modéliser que son homologue à trois branches **TP-3Rho**. Ces deux molécules possèdent également des sections efficaces d'absorption à deux photons élevées, comparables à celles de leurs analogues cationiques et elles ont été utilisées avec succès pour marquer le cytoplasme de cellules fixées en microscopie de fluorescence excitée à deux photons. Par contre, les TP-Rho pénètrent mal en cellules vivantes et leur localisation intracellulaire reste à étudier plus précisément. Cette nouvelle famille de marqueurs anioniques pourra être développée pour le marquage de protéine sur gel mais également en cellule par marquage covalent ou enzymatique où elle pourrait remplacer avantageusement les fluorophores actuellement utilisés en microscopie biphotonique.

Le dernier axe important de cette thèse a été de mettre au point une stratégie de synthèse pour permettre la fonctionnalisation des vinyl-triphénylaminés. Des chaînes PEG fonctionnalisées portant des fonctions acides carboxyliques, azoture ou alcyne ont été introduites sur la **TP-2Bzim**. Ces fonctions très génériques ont été choisies pour permettre le couplage covalent de la TP-2Bzim à diverses molécules d'intérêt par « chimie-click » ou amidation.

La TP-2Bzim a d'abord été couplée à des séquences oligonucléotidiques ou PNA pour détecter les séquences complémentaires en observant le changement dans l'émission de la TP-2Bzim lors de l'hybridation. Les sondes obtenues n'ont pas eu l'efficacité escomptée car leur fluorescence à l'état libre est beaucoup plus importante que celle de la **TP-2Bzim** « nue ». Néanmoins il a été possible de détecter une exaltation de fluorescence avec un rapport F/F_0 de 8 lors de l'hybridation. La stratégie de synthèse développée pourra être appliquée pour apporter des modifications de taille et de lipophilie au bras espaceur entre la **TP-2Bzim** et les sondes oligonucléotidiques pour tenter d'optimiser ce ratio. .

Ensuite nous avons envisagé le couplage de la **TP-2Bzim** à l'acide folique ou à une polyamine pour cibler les cellules cancéreuses. Ce choix s'est appuyé d'une part sur la surexpression des récepteurs de l'acide folique dans les cellules tumorales et d'autre part sur l'accumulation naturelle des polyamines dans les tumeurs. Les composés cibles n'ont pas encore pu être obtenus en quantité et pureté suffisantes pour être testés et leur synthèse est actuellement en cours d'optimisation.

Ces travaux, qui font le bilan d'une décennie d'optimisations structurales et d'études de propriétés, ont mis en évidence l'intérêt du noyau vinyl-triphénylamine pour le design de marqueurs biphotoniques biocompatibles. La **TP-2Bzim** notamment présente un énorme potentiel pour l'imagerie par fluorescence excitée à deux photons, mais aussi pour la photothérapie. Elle est rapidement obtenue en trois étapes de synthèse, présente une combinaison de propriétés optiques et biologiques exceptionnelle et peut être facilement fonctionnalisée. A l'avenir, il sera intéressant d'appliquer les marqueurs triphénylaminés à l'imagerie tissulaire par microscopie biphotonique pour vraiment tirer parti de leurs propriétés optiques non linéaires. L'obtention des composés vectorisés permettra par exemple de réaliser un ciblage cellulaire de lignées cancéreuses et ils pourront être utilisés pour la détection et le traitement de tumeurs. Par ailleurs, des modifications structurales apportées aux marqueurs TP pourraient aussi permettre d'obtenir des marqueurs d'ADN non toxiques en cellules vivantes en modifiant leur localisation intracellulaire.

Ces travaux ont fait l'objet de plusieurs publications dans des journaux à comité de lecture et d'un brevet.

- **Publications dans des journaux à comité de lecture :**

G. Bordeaux, **B. Dumat**, F. Mahuteau-Betzer, G. Metgé, F. Charra, C. Fiorini-Debuisschert, and M.-P. Teulade-Fichou, **Novel triphenylamine-based fluorescent DNA minor-groove binders optimized for two-photon microscopy**, en preparation.

B. Dumat, G. Bordeaux, A. I. Aranda, F. Mahuteau-Betzer, Y. El Harfouch, G. Metgé, F. Charra, C. Fiorini-Debuisschert and M.-P. Teulade-Fichou **Vinyl-triphenylamine dyes, a new family of switchable fluorescent probes for targeted two-photon cellular imaging: from DNA to protein labeling** *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6054–6061.

B. Dumat, G. Bordeaux, E. Faurel-Paul, F. Mahuteau-Betzer, N. Saettel, M. Bombled, G. Metgé, F. Charra, C. Fiorini-Debuisschert, and M.-P. Teulade-Fichou, **N-phenyl-carbazole-based two-photon fluorescent probes: Strong sequence dependence of the duplex vs quadruplex selectivity** *Biochimie* **2011**, *93*, 1209-1218.

- **Brevet européen (en collaboration avec l'ENS Cachan) :**

E. Deprez, P. Tauc, N. Gagey, H. Boughera, **B. Dumat**, F. Mahuteau-Betzer and M.-P. Teulade-Fichou **Cationic triphenylamines derivatives activable by visible and infrared light for inducing and imaging apoptosis in cancer cells**, **2012**, EP12306133.5.

- **Acte de conférence :**

B. Dumat; G. Bordeaux; E. Faurel-Paul; F. Mahuteau-Betzer; G. Metge; C. Fiorini-Debuisschert; F. Charra; M.-P. Teulade-Fichou, **Novel triphenylamine-based DNA minor groove binders for use in two-photon excited microscopy** , *Proceedings of the XVth symposium on Chemistry of Nucleic Acids Components*, Cesky Krumlov, Czech Republic, June 5-10 2011. *Collection Symposium Series*, **2011**, *12*, 325-326.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ishikawa-Ankerhold HC, Ankerhold R, Drummen GPC: **Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM**. *Molecules* 2012, **17**:4047–132.
2. Demchenko AP: *Introduction to fluorescence sensing*. Springer; 2009.
3. Heinlein T, Knemeyer J-P, Piestert O, Sauer M: **Photoinduced Electron Transfer between Fluorescent Dyes and Guanosine Residues in DNA-Hairpins**. *J. Phys. Chem. B* 2003, **107**:7957–7964.
4. Charier S, Ruel O, Baudin J-B, Alcor D, Allemand J-F, Meglio A, Jullien L, Valeur B: **Photophysics of a series of efficient fluorescent pH probes for dual-emission-wavelength measurements in aqueous solutions**. *Chem. Eur. J.* 2006, **12**:1097–113.
5. Han J, Burgess K: **Fluorescent indicators for intracellular pH**. *Chem. Rev.* 2010, **110**:2709–28.
6. Pawlicki M, Collins HA, Denning RG, Anderson HL: **Two-photon absorption and the design of two-photon dyes**. *Angew. Chem.* 2009, **48**:3244–66.
7. Oheim M, Michael DJ, Geisbauer M, Madsen D, Chow RH: **Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches**. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2006, **58**:788–808.
8. Denk W, Strickler J, Webb W: **Two-photon laser scanning fluorescence microscopy**. *Science* 1990, **248**:73–76.
9. Zipfel WR, Williams RM, Webb WW: **Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences**. *Nature Biotechnol.* 2003, **21**:1369–77.
10. Wang B-G, König K, Halbhauer K-J: **Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research**. *J. Microsc.* 2010, **238**:1–20.
11. Fernández-Suárez M, Ting AY: **Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells**. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008, **9**:929–43.
12. Hell SW, Wichmann J: **Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy**. *Opt. Lett.* 1994, **19**:780–2.
13. Dempsey G, Vaughan J, Chen K, Bates M: **Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging**. *Nat. Methods* 2011, **8**:1027–36.
14. Hell SW: **Microscopy and its focal switch**. *Nat. Methods* 2009, **6**:24–32.
15. Vogelsang J, Steinhauer C, Forthmann C, Stein IH, Person-Skegro B, Cordes T, Tinnefeld P: **Make them blink: probes for super-resolution microscopy**. *ChemPhysChem* 2010, **11**:2475–90.
16. Bianchini P, Harke B, Galiani S, Vicidomini G, Diaspro A: **Single-wavelength two-photon excitation-stimulated emission depletion (SW2PE-STED) superresolution imaging**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012, **109**:6390–3.
17. Sabnis RW: *Hanbook of Biological Dyes and Stains*. Wiley; 2010.
18. Xu C, Webb WW: **Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm**. *J. Opt. Soc. Am. B* 1996, **13**:481–491.
19. Xu C, Zipfel W, Shear JB, Williams RM, Webb WW: **Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996, **93**:10763–8.
20. Albota M, Beljonne D, Brédas J-L, Ehrlich JE, Fu J-Y, Heikal AA, Hess SE, Kogej T, Levin MD, Marder SR, et al.: **Design of Organic Molecules with Large Two-Photon Absorption Cross Sections**. *Science* 1998, **281**:1653–1656.
21. Chen D, Zhong C, Dong X, Liu Z, Qin J: **A new building block, bis(thiophene vinyl)-pyrimidine, for constructing excellent two-photon absorption materials: synthesis, crystal structure and properties**. *J. Mater. Chem.* 2012, *in press*, doi:10.1039/c2jm14766a.

22. Belfield KD, Andrade CD, Yanez CO, Bondar MV, Hernandez FE, Przhonska OV: **New two-photon-absorbing probe with efficient superfluorescent properties.** *J. Phys. Chem. B* 2010, **114**:14087–95.
23. Katan C, Charlot M, Mongin O, Le Droumaguet C, Jouikov V, Terenziani F, Badaeva E, Tretiak S, Blanchard-Desce M: **Simultaneous control of emission localization and two-photon absorption efficiency in dissymmetrical chromophores.** *J. Phys. Chem. B* 2010, **114**:3152–69.
24. Lee W-H, Cho M, Jeon S-J, Cho BR: **Two-Photon Absorption and Second Hyperpolarizability of the Linear Quadrupolar Molecule** *J. Phys. Chem. A* 2000, **104**:11033–11040.
25. Susumu K, Fisher J a N, Zheng J, Beratan DN, Yodh AG, Therien MJ: **Two-photon absorption properties of proquinoidal D-A-D and A-D-A quadrupolar chromophores.** *J. Phys. Chem. A* 2011, **115**:5525–39.
26. Zyss J, Ledoux I: **Nonlinear optics in multipolar media: theory and experiments.** *Chem. Rev.* 1994, **94**:77–105.
27. Katan C, Terenziani F, Mongin O, Werts MHV, Porrès L, Pons T, Mertz J, Tretiak S, Blanchard-Desce M: **Effects of (multi)branching of dipolar chromophores on photophysical properties and two-photon absorption.** *J. Phys. Chem. A* 2005, **109**:3024–37.
28. Chung S-J, Kim K-S, Lin T-C, He GS, Swiatkiewicz J, Prasad PN: **Cooperative Enhancement of Two-Photon Absorption in Multi-branched Structures.** *J. Phys. Chem. B* 1999, **103**:10741–10745.
29. Lee WH, Lee H, Kim J a, Choi JH, Cho M, Jeon SJ, Cho BR: **Two-photon absorption and nonlinear optical properties of octupolar molecules.** *J. Am. Chem. Soc.* 2001, **123**:10658–67.
30. Porrès L, Mongin O, Katan C, Charlot M, Pons T, Mertz J, Blanchard-Desce M: **Enhanced two-photon absorption with novel octupolar propeller-shaped fluorophores derived from triphenylamine.** *Org. Lett.* 2004, **6**:47–50.
31. Bordeau G, Lartia R, Metge G, Fiorini-Debuisschert C, Charra F, Teulade-Fichou M-P: **Trinaphthylamines as robust organic materials for two-photon-induced fluorescence.** *J. Am. Chem. Soc.* 2008, **130**:16836–7.
32. Shao J, Guan Z, Yan Y, Jiao C, Xu Q-H, Chi C: **Synthesis and characterizations of star-shaped octupolar triazatruxenes-based two-photon absorption chromophores.** *J. Org. Chem.* 2011, **76**:780–90.
33. Wei P, Bi X, Wu Z, Xu Z: **Synthesis of triphenylamine-cored dendritic two-photon absorbing chromophores.** *Org. Lett.* 2005, **7**:3199–202.
34. Andrade CD, Yanez CO, Qaddoura M a, Wang X, Arnett CL, Coombs S a, Yu J, Bassiouni R, Bondar MV, Belfield KD: **Two-photon fluorescence lysosomal bioimaging with a micelle-encapsulated fluorescent probe.** *J. Fluoresc.* 2011, **21**:1223–30.
35. Gallavardin T, Maurin M, Marotte S, Simon T, Gabudean A-M, Bretonnière Y, Lindgren M, Lerouge F, Baldeck PL, Stéphan O, et al.: **Photodynamic therapy and two-photon bio-imaging applications of hydrophobic chromophores through amphiphilic polymer delivery.** *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011, **10**:1216–25.
36. Wang X, Morales AR, Urakami T, Zhang L, Bondar MV, Komatsu M, Belfield KD: **Folate receptor-targeted aggregation-enhanced near-IR emitting silica nanoprobe for one-photon in vivo and two-photon ex vivo fluorescence bioimaging.** *Bioconj. Chem.* 2011, **22**:1438–50.
37. Ahn H-Y, Yao S, Wang X, Belfield KD: **Near-Infrared-Emitting Squaraine Dyes with High 2PA Cross-Sections for Multiphoton Fluorescence Imaging.** *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2012, *in press* doi:10.1021/am300467w.
38. Lim CS, Masanta G, Kim HJ, Han JH, Kim HM, Cho BR: **Ratiometric detection of mitochondrial thiols with a two-photon fluorescent probe.** *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**:11132–5.
39. Masanta G, Heo CH, Lim CS, Bae SK, Cho BR, Kim HM: **A mitochondria-localized two-photon fluorescent probe for ratiometric imaging of hydrogen peroxide in live tissue.** *Chem. Commun.* 2012, **48**:3518–20.
40. Kim HM, Cho BR: **Two-photon probes for intracellular free metal ions, acidic vesicles, and lipid rafts in live tissues.** *Acc. Chem. Res.* 2009, **42**:863–72.

41. Wang X, Nguyen DM, Yanez CO, Rodriguez L, Ahn H-Y, Bondar MV, Belfield KD: **High-fidelity hydrophilic probe for two-photon fluorescence lysosomal imaging.** *J. Am. Chem. Soc.* 2010, **132**:12237–9.
42. Morales AR, Yanez CO, Schafer-hales KJ, Marcus AI, Belfield KD: **Biomolecule Labeling and Imaging with a New Fluorenyl Two-Photon Fluorescent Probe.** *Bioconj. Chem.* 2009, **20**:1999–2000.
43. Andrade CD, Yanez CO, Ahn H-Y, Urakami T, Bondar MV, Komatsu M, Belfield KD: **Two-Photon Fluorescence Vascular Bioimaging with New Bioconjugate Probes Selective toward the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2.** *Bioconj. Chem.* 2011, **22**:2060–71.
44. Thorp-Greenwood FL: **An Introduction to Organometallic Complexes in Fluorescence Cell Imaging: Current Applications and Future Prospects.** *Organometallics* 2012, **31**:5686–5692.
45. Baggaley E, Weinstein J a., Williams J a. G: **Lighting the way to see inside the live cell with luminescent transition metal complexes.** *Coord. Chem. Rev.* 2012, **256**:1762–1785.
46. D'Aléo A, Pompidor G, Elena B, Vicat J, Baldeck PL, Toupet L, Kahn R, Andraud C, Maury O: **Two-photon microscopy and spectroscopy of lanthanide bioprobes.** *ChemPhysChem* 2007, **8**:2125–32.
47. New EJ, Parker D, Smith DG, Walton JW: **Development of responsive lanthanide probes for cellular applications.** *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2010, **14**:238–46.
48. Ho C-L, Wong K-L, Kong H-K, Ho Y-M, Chan CT-L, Kwok W-M, Leung KS-Y, Tam H-L, Lam MH-W, Ren X-F, et al.: **A strong two-photon induced phosphorescent Golgi-specific in vitro marker based on a heteroleptic iridium complex.** *Chem. Commun.* 2012, **48**:2525–7.
49. Hai Y, Chen J-J, Zhao P, Lv H, Yu Y, Xu P, Zhang J-L: **Luminescent zinc salen complexes as single and two-photon fluorescence subcellular imaging probes.** *Chem. Commun.* 2011, **47**:2435–7.
50. Boca SC, Four M, Bonne A, van der Sanden B, Astilean S, Baldeck PL, Lemerrier G: **An ethylene-glycol decorated ruthenium(II) complex for two-photon photodynamic therapy.** *Chem. Commun.* 2009, **30**:4590–2.
51. Four M, Riehl D, Mongin O, Blanchard-Desce M, Lawson-Daku LM, Moreau J, Chauvin J, Delaire J a, Lemerrier G: **A novel ruthenium(II) complex for two-photon absorption-based optical power limiting in the near-IR range.** *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011, **13**:17304–12.
52. Picot A, Malvolti F, Le Guennic B, Baldeck PL, Williams J a G, Andraud C, Maury O: **Two-photon antenna effect induced in octupolar europium complexes.** *Inorg. Chem.* 2007, **46**:2659–65.
53. D'Aléo A, Bourdolle A, Brustlein S, Fauquier T, Grichine A, Duperray A, Baldeck PL, Andraud C, Brasselet S, Maury O: **Ytterbium-Based Bioprobes for Near-Infrared Two-Photon Scanning Laser Microscopy Imaging.** *Angew. Chem.* 2012, **51**:6622–5.
54. Hu W, Zhao G, Wang C, Zhang J, Fu L: **Nonlinear optical microscopy for histology of fresh normal and cancerous pancreatic tissues.** *PloS one* 2012, **7**:e37962.
55. Mittmann W, Wallace DJ, Czabayko U, Herb JT, Schaefer AT, Looger LL, Denk W, Kerr JND: **Two-photon calcium imaging of evoked activity from L5 somatosensory neurons in vivo.** *Nat. Neurosci.* 2011, **14**:1089–93.
56. Kypr J, Kejnovská I, Renciuik D, Vorlícková M: **Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA.** *Nucleic Acids Res.* 2009, **37**:1713–25.
57. Garbett NC, Ragazzon P a, Chaires JB: **Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions.** *Nat. Protoc.* 2007, **2**:3166–72.
58. Eriksson M, Nordén B: **Linear and circular dichroism of drug-nucleic acid complexes.** In *Methods in enzymology*. Edited by Chaires JB, Waring MJ. Academic Press; 2001:68–98.
59. Allain C: **Sonde fluorescente pour l'ADN : Marquages covalent et non-covalents.** Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, 2006.
60. Bordeau G: **Nouvelles triarylamines pour la microscopie biphotonique : applications au marquage des acides nucléiques.** Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, 2009.

61. Metge G: **Optimisation de dérivés triphénylamine pour le marquage d'ADN : de l'étude des propriétés de fluorescence à deux photons à l'analyse structurales de brins d'ADN**. Thèse de doctorat, Université Paris-Sud 11, 2010.
62. Allain C, Schmidt F, Lartia R, Bordeau G, Fiorini-Debuisschert C, Charra F, Tauc P, Teulade-Fichou M-P: **Vinyl-Pyridinium Triphenylamines: Novel Far- Red Emitters with High Photostability and Two- Photon Absorption Properties for Staining DNA**. *ChemBioChem* 2007, **8**:424 – 433.
63. Chang C-C, Wu J-Y, Chien C-W, Wu W-S, Liu H, Kang C-C, Yu L-J, Chang T-C: **A fluorescent carbazole derivative: high sensitivity for quadruplex DNA**. *Anal. Chem.* 2003, **75**:6177–83.
64. Arunan E, Desiraju GR, Klein R a., Sadlej J, Scheiner S, Alkorta I, Clary DC, Crabtree RH, Dannenberg JJ, Hobza P, et al.: **Definition of the hydrogen bond**. *Pure Appl. Chem.* 2011, **83**:1637–1641.
65. Hunter CA, Sanders JKM: **The nature of .pi.-.pi. interactions**. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, **112**:5525–5534.
66. Blackburn GM, Gait MJ, Loakes D, Williams DM (Eds): *Nucleic acids in chemistry and biology 3rd edition*. RSC publishing (Cambridge, UK); 2006.
67. Teulade-Fichou M-P, Vigneron J-P: **Interactions of macrocyclic compounds with nucleic acids**. In *DNA and RNA binders*. Edited by Demeunynck M, Bailly C, Wilson WD. Wiley VCH. 2003:278–314.
68. Strekowski L, Wilson B: **Noncovalent interactions with DNA: an overview**. *Mutat. Res.* 2007, **623**:3–13.
69. Neidle S: **DNA minor-groove recognition by small molecules (up to 2000)**. *Nat. prod. Rep.* 2001, **18**:291–309.
70. Nunn CM, Garman E, Neidle S: **Crystal structure of the DNA decamer d(CGCAATTGCG) complexed with the minor groove binding drug netropsin**. *Biochemistry* 1997, **36**:4792–9.
71. Bailly C, Chaires JB: **Sequence-specific DNA minor groove binders. Design and synthesis of netropsin and distamycin analogues**. *Bioconj. Chem.* 1998, **9**:513–38.
72. Satz AL, Bruice TC: **Recognition of Nine Base Pairs in the Minor Groove of DNA by a Tripyrrole Peptide-Hoechst Conjugate**. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, **123**:7636–7644 .
73. Khalaf AI, Anthony N, Breen D, Donoghue G, Mackay SP, Scott FJ, Suckling CJ: **Amide isosteres in structure-activity studies of antibacterial minor groove binders**. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, **46**:5343–55.
74. Dervan PB, Poulin-Kerstien AT, Fechter EJ, Edelson BS: **Regulation of gene expression by synthetic DNA-binding ligands**. *Top. Curr. Chem.* 2005, **253**:1-31.
75. Satz AL, Bruice TC: **Recognition in the minor groove of double-stranded DNA by microgonotropens**. *Acc. Chem. Res.* 2002, **35**:86–95.
76. Satam V, Babu B, Chavda S, Savagian M, Sjöholm R, Tzou S, Liu Y, Kiakos K, Lin S, David Wilson W, et al.: **Novel diamino imidazole and pyrrole-containing polyamides: Synthesis and DNA binding studies of mono- and diamino-phenyl-ImPy*Im polyamides designed to target 5'-ACGCGT-3'**. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, **20**:693–701.
77. Rucker V, Foister S, Melander C, Dervan PB: **Sequence specific fluorescence detection of double strand DNA [Internet]**. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, **125**:1195–1202.
78. Mallena S, Lee MPH, Bailly C, Neidle S, Kumar A, Boykin DW, Wilson WD: **Thiophene-based diamidine forms a "super" at binding minor groove agent**. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, **126**:13659–69.
79. Nagle PS, Quinn SJ, Kelly JM, O'Donovan DH, Khan AR, Rodriguez F, Nguyen B, Wilson WD, Rozas I: **Understanding the DNA binding of novel non-symmetrical guanidinium/2-aminoimidazolinium derivatives**. *Org. Biomol. Chem.* 2010, **8**:5558–67.
80. Wilson WD, Tanious F a, Mathis A, Tevis D, Hall JE, Boykin DW: **Antiparasitic compounds that target DNA**. *Biochimie* 2008, **90**:999–1014.
81. Asche C, Demeunynck M: **Antitumor carbazoles**. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2007, **7**:247–267.

82. Bailly C: **Targeting DNA and topoisomerase I with indolocarbazole antitumor agents**. In *DNA and RNA binders*. Edited by Demeunynck M, Bailly C, Wilson WD. Wiley VCH. 2003:538–575.
83. Tanious FA, Ding D, Patrick DA, Tidwell RR, Wilson WD: **A new type of DNA minor-groove complex: carbazole dication-DNA interactions**. *Biochemistry* 1997, **36**:15315–25.
84. Tanious FA, Ding D, Patrick DA, Bailly C, Tidwell RR, Wilson WD: **Effects of compound structure on carbazole dication-DNA complexes: tests of the minor-groove complex models**. *Biochemistry* 2000, **39**:12091–101.
85. Tanious FA, Wilson WD, Patrick DA, Tidwell RR, Colson P, Houssier C, Tardy C, Bailly C: **Sequence-dependent binding of bis-amidine carbazole dications to DNA**. *Eur. J. Biochem.* 2001, **268**:3455–64.
86. Jin R, Breslauer KJ: **Characterization of the minor groove environment in a drug-DNA complex: bisbenzimidazole bound to the poly[d(AT)].poly[d(AT)]duplex**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988, **85**:8939–42.
87. Mann J, Baron A, Opoku-Boahen Y, Johansson E, Parkinson G, Kelland LR, Neidle S: **A New Class of Symmetric Bisbenzimidazole-Based DNA Minor Groove-Binding Agents Showing Antitumor Activity**. *J. Med. Chem.* 2001, **44**:138–144.
88. Bailly C, Chessari G, Carrasco C, Joubert A, Mann J, Wilson WD, Neidle S: **Sequence-specific minor groove binding by bis-benzimidazoles: water molecules in ligand recognition**. *Nucleic Acids Res.* 2003, **31**:1514–1524.
89. Nguyen B, Neidle S, Wilson WD: **A role for water molecules in DNA-ligand minor groove recognition**. *Acc. Chem. Res.* 2009, **42**:11–21.
90. Liu Y, Kumar A, Depauw S, Nhili R, David-Cordonnier M-H, Lee MP, Ismail MA, Farahat AA, Say M, Chackal-Catoen S, et al.: **Water-mediated binding of agents that target the DNA minor groove**. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**:10171–83.
91. Nguyen B, Lee MPH, Hamelberg D, Joubert A, Bailly C, Brun R, Neidle S, Wilson WD: **Strong binding in the DNA minor groove by an aromatic diamidine with a shape that does not match the curvature of the groove**. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, **124**:13680–1.
92. Munde M, Ismail M a, Arafa R, Peixoto P, Collar CJ, Liu Y, Hu L, David-Cordonnier M-H, Lansiaux A, Bailly C, et al.: **Design of DNA minor groove binding diamidines that recognize GC base pair sequences: a dimeric-hinge interaction motif**. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, **129**:13732–43.
93. Cai X, Gray PJ, Von Hoff DD: **DNA minor groove binders: back in the groove**. *Cancer Treat. Rev.* 2009, **35**:437–50.
94. Boykin DW, Tidwell RR: **Dicationic DNA minor groove binders as antimicrobial agents**. In *DNA and RNA binders*. Edited by Demeunynck M, Bailly C, Wilson WD. Wiley VCH. 2003:414–460.
95. Holzhauser C, Berndl S, Menacher F, Breunig M, Göpferich A, Wagenknecht H-A: **Synthesis and Optical Properties of Cyanine Dyes as Fluorescent DNA Base Substitutions for Live Cell Imaging**. *Eur. J. Org. Chem.* 2010, **2010**:1239–1248.
96. Ehrenschwender T, Varga BR, Kele P, Wagenknecht H-A: **New far-red and near-infrared fluorescent probes with large Stokes shifts for dual covalent labeling of DNA**. *Chem. As. J.* 2010, **5**:1761–4.
97. Stadler AL, Delos Santos JO, Stensrud ES, Dembska A, Silva GL, Liu S, Shank NI, Kunttas-Tatli E, Sobers CJ, Gramlich PME, et al.: **Fluorescent DNA Nanotags Featuring Covalently Attached Intercalating Dyes: Synthesis, Antibody Conjugation, and Intracellular Imaging**. *Bioconj. Chem.* 2011, **22**:1491–502.
98. Zhang J, Fu Y, Lakowicz JR: **Fluorescence Images of DNA-Bound YOYO between Coupled Silver Particles**. *Langmuir* 2007, **23**:11734–11739.
99. Pljevaljčić G, Schmidt F, Weinhold E: **Sequence-specific methyltransferase-induced labeling of DNA (SMILING DNA)**. *ChemBioChem* 2004, **5**:265–9.

100. Braun G, Diechtierow M, Wilkinson S, Schmidt F, Hüben M, Weinhold E, Reich NO: **Enzyme-directed positioning of nanoparticles on large DNA templates.** *Bioconj. Chem.* 2008, **19**:476–9.
101. Latt S, Stetten G: **Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis.** *J. Histochem. Cytochem.* 1976, **24**:24.
102. Armitage BA: **Cyanine dye–DNA interactions: intercalation, groove binding, and aggregation.** *Top. Curr. Chem.* 2005, **253**:55–76.
103. Cosa G, Focsaneanu KS, McLean JR, McNamee JP, Scaiano JC: **Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution.** *Photochemistry and photobiology* 2001, **73**:585–99.
104. Nygren J, Svanvik N, Kubista M: **The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA.** *Biopolymers* 1998, **46**:39–51.
105. Granzhan A, Ihmels H: **N-aryl-9-amino-substituted acridizinium derivatives as fluorescent “light-up” probes for DNA and protein detection.** *Org. Lett.* 2005, **7**:5119–22.
106. Peng X, Wu T, Fan J, Wang J, Zhang S, Song F, Sun S: **An effective minor groove binder as a red fluorescent marker for live-cell DNA imaging and quantification.** *Angew. Chem.* 2011, **50**:4180–3.
107. Vázquez O, Sánchez MI, Martínez-Costas J, Vázquez ME, Mascareñas JL: **Bis-4-aminobenzamidines: versatile, fluorogenic A/T-selective dsDNA binders.** *Org. Lett.* 2010, **12**:216–9.
108. Erve A, Saoudi Y, Thiriot S, Guetta-Landras C, Florent J-C, Nguyen C-H, Grierson DS, Popov AV: **BENA435, a new cell-permeant photoactivated green fluorescent DNA probe.** *Nucleic Acids Res.* 2006, **34**:e43.
109. Feng S, Kim YK, Yang S, Chang Y-T: **Discovery of a green DNA probe for live-cell imaging.** *Chem. Commun.* 2010, **46**:436–8.
110. Njoh KL, Patterson LH, Zloh M, Wiltshire M, Fisher J, Chappell S, Ameer-beg S, Bai Y, Matthews D, Errington RJ, et al.: **Spectral Analysis of the DNA Targeting Bisalkylaminoanthraquinone DRAQ5 in Intact Living Cells.** *Cytometry. part A* 2006, **814**:805–814.
111. Gill MR, Derrat H, Smythe CGW, Battaglia G, Thomas JA: **Ruthenium(II) metallo-intercalators: DNA imaging and cytotoxicity.** *ChemBioChem* 2011, **12**:877–80.
112. Barragán F, López-Senín P, Salassa L, Betanzos-Lara S, Habtemariam A, Moreno V, Sadler PJ, Marchán V: **Photocontrolled DNA Binding of a Receptor-Targeted Organometallic Ruthenium(II) Complex.** *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**:14098–14108.
113. Ohulchanskyy TY, Pudavar HE, Yarmoluk SM, Yashchuk VM, Bergey EJ, Prasad PN: **A monomethine cyanine dye Cyan 40 for two-photon-excited fluorescence detection of nucleic acids and their visualization in live cells.** *Photochem. Photobiol.* 2003, **77**:138–45.
114. Tokar VP, Losytskyy MY, Ohulchanskyy TY, Kryvorotenko DV, Kovalska VB, Balanda AO, Dmytruk IM, Prokopets VM, Yarmoluk SM, Yashchuk VM: **Styryl dyes as two-photon excited fluorescent probes for DNA detection and two-photon laser scanning fluorescence microscopy of living cells.** *J. Fluoresc.* 2010, **20**:865–72.
115. Chang C-C, Chu J-F, Kao F-J, Chiu Y-C, Lou P-J, Chen H-C, Chang T-C: **Verification of antiparallel G-quadruplex structure in human telomeres by using two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy of the 3,6-Bis(1-methyl-4-vinylpyridinium)carbazole diiodide molecule.** *Anal. Chem.* 2006, **78**:2810–5.
116. Feng XJ, Wu PL, Bolze F, Leung HWC, Li KF, Mak NK, Kwong DWJ, Nicoud J-F, Cheah KW, Wong MS: **Cyanines as new fluorescent probes for DNA detection and two-photon excited bioimaging.** *Org. Lett.* 2010, **12**:2194–7.
117. Abbotto A, Baldini G, Beverina L, Chirico G, Collini M, D’Alfonso L, Diaspro A, Magrassi R, Nardo L, Pagani G a: **Dimethyl-pep: a DNA probe in two-photon excitation cellular imaging.** *Biophys. Chem.* 2005, **114**:35–41.

118. Kauffman J, Litak PT, Adams JK: **Syntheses and photophysical properties of some 5(2)-aryl-2(5)-(4-pyridyl) oxazoles and related oxadiazoles and furans.** *J. Heterocycl. Chem.* 1992, **29**:1245.
119. Stockert JC, Pinna-Senn E, Bella JL, Lisanti J a: **DNA-binding fluorochromes: correlation between C-banding of mouse metaphase chromosomes and hydrogen bonding to adenine-thymine base pairs.** *Acta Histochem.* 2005, **106**:413–20.
120. Charier S, Ruel O, Baudin J-B, Alcor D, Allemand J-F, Meglio A, Jullien L, Valeur B: **Photophysics of a series of efficient fluorescent pH probes for dual-emission-wavelength measurements in aqueous solutions.** *Chem. Eur. J.* 2006, **12**:1097–113.
121. Besselièvre F, Lebrequier S, Mahuteau-Betzer F, Piguel S: **C-H Bond Activation: A Versatile Protocol for the Direct Arylation and Alkenylation of Oxazoles.** *Synthesis* 2009, **20**:3511–3518.
122. Chang CC, Wu JY, Chang TC: **A carbazole derivative synthesis for stabilizing the quadruplex structure.** *J. Chin. Chem. Soc* 2003, **50**:185–188.
123. Williams ATR, Winfield SA, Miller JN: **Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer.** *Analyst* 1983, **108**:1067.
124. Healy EF: **Quantitative Determination of DNA – Ligand Binding.** *J. Chem. Educ.* 2007, **84**:1–4.
125. Benesi HA, Hildebrand J: **A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons.** *J. Am. Chem. Soc.* 1949, **71**:2703–2707.
126. Kong Y: **A note on the quantitative properties of McGhee–von Hippel model.** *Biophys. Chem.* 2002, **95**:1–6.
127. Thordarson P: **Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry.** *Chem. Soc. Rev.* 2010, **6**:1305–1323.
128. Loontjens FG, Regenfuss P, Zechel a, Dumortier L, Clegg RM: **Binding characteristics of Hoechst 33258 with calf thymus DNA, poly[d(A-T)], and d(CCGGAATTCCGG): multiple stoichiometries and determination of tight binding with a wide spectrum of site affinities.** *Biochemistry* 1990, **29**:9029–39.
129. Rentzeperis D, Alessi K, Marky L a: **Thermodynamics of DNA hairpins: contribution of loop size to hairpin stability and ethidium binding.** *Nucleic Acids Res.* 1993, **21**:2683–9.
130. Telfer SG, McLean TM, Waterland MR: **Exciton coupling in coordination compounds. [Internet].** *Dalton Trans.* 2011, **40**:3097–108.
131. Berova N, Di Bari L, Pescitelli G: **Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds.** *Chem. Soc. Rev.* 2007, **36**:914–31.
132. Kenworthy a K: **Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy.** *Methods* 2001, **24**:289–96.
133. Capoulade J, Wachsmuth M, Hufnagel L, Knop M: **Quantitative fluorescence imaging of protein diffusion and interaction in living cells.** *Nature Biotechnol.* 2011, **29**:835–9.
134. Sun Y, Day RN, Periasamy A: **Investigating protein-protein interactions in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy.** *Nat. Protoc.* 2011, **6**:1324–40.
135. Jing C, Cornish VW: **Chemical Tags for Labeling Proteins Inside Living Cells.** *Acc. Chem. Res.* 2011, **44**:784–92.
136. Lin MZ, Wang L: **Selective labeling of proteins with chemical probes in living cells.** *Physiology* 2008, **23**:131–41.
137. Giepmans BNG, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY: **The fluorescent toolbox for assessing protein location and function.** *Science* 2006, **312**:217–24.
138. Patton WF: **A thousand points of light : The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics.** *Electrophoresis* 2000, **21**:1123–1144.

139. Maeda K, Finnie C, Svensson B: **Cy5 maleimide labelling for sensitive detection of free thiols in native protein extracts: identification of seed proteins targeted by barley thioredoxin h isoforms.** *Biochem. J.* 2004, **378**:497–507.
140. Rabilloud T, Strub J, Luche S, Dorsselaer AV, Lunardi J: **A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels.** *Proteomics* 2001, **1**:699-704.
141. Wu P, Wong ELM, Ma DL, Tong GSM, Ng KM, Che CM: **Cyclometalated Platinum (II) Complexes as Highly Sensitive Luminescent Switch-On Probes for Practical Application in Protein Staining and Cell Imaging-Supportin information.** *Chem. Eur. J.* 2009, **15**:3652–3656.
142. Lee J-S, Vendrell M, Chang Y-T: **Diversity-oriented optical imaging probe development.** *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2011, **15**:760–767.
143. Baldini L, Wilson AJ, Hong J, Hamilton AD: **Pattern-based detection of different proteins using an array of fluorescent protein surface receptors.** *J. Am. Chem. Soc.* 2004, **126**:5656–7.
144. Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov K a: **Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging.** *Trends Biotechnol.* 2005, **23**:605–13.
145. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY: **A guide to choosing fluorescent proteins.** *Nat. Methods* 2005, **2**:905–9.
146. Drobizhev M, Makarov NS, Tillo SE, Hughes TE, Rebane A: **Two-photon absorption properties of fluorescent proteins.** *Nat. Methods* 2011, **8**:393–9.
147. Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, Pick H, Vogel H, Johnsson K: **A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo.** *Nature Biotechnol.* 2003, **21**:86–9.
148. Schultz C, Köhn M: **Simultaneous protein tagging in two colors.** *Chem. Biol.* 2008, **15**:91–2.
149. Maurel D, Banala S, Laroche T, Johnsson K: **Photoactivable and photoconvertible fluorescent probes for protein labeling.** *ACS Chemical Biology* 2010, **5**:507–516.
150. Lukinavičius G, Johnsson K: **Switchable fluorophores for protein labeling in living cells.** *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2011, **15**:768–74.
151. Kim HM, Yang PR, Seo MS, Yi J-S, Hong JH, Jeon S-J, Ko Y-G, Lee KJ, Cho BR: **Magnesium ion selective two-photon fluorescent probe based on a benzo[h]chromene derivative for in vivo imaging.** *J. Org. Chem.* 2007, **72**:2088–96.
152. Gallagher SS, Jing C, Peterka DS, Konate M, Wombacher R, Kaufman LJ, Yuste R, Cornish VW: **A trimethoprim-based chemical tag for live cell two-photon imaging.** *ChemBioChem* 2010, **11**:782–4.
153. Kim HM, Fang XZ, Yang PR, Yi J-S, Ko Y-G, Piao MJ, Chung YD, Park YW, Jeon S-J, Cho BR: **Design of molecular two-photon probes for in vivo imaging. 2H-Benzo[h]chromene-2-one derivatives.** *Tet. Lett.* 2007, **48**:2791–2795.
154. Griffin BA, Adams SR, Tsien RY: **Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells.** *Science* 1998, **281**:269–272.
155. Adams SR, Campbell RE, Gross L a, Martin BR, Walkup GK, Yao Y, Llopis J, Tsien RY: **New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications.** *J. Am. Chem. Soc.* 2002, **124**:6063–76.
156. Soh N: **Selective Chemical Labeling of Proteins with Small Fluorescent Molecules Based on Metal-Chelation Methodology.** *Sensors* 2008, **8**:1004–1024.
157. Lee J-J, Lee S-C, Zhai D, Ahn Y-H, Yeo HY, Tan YL, Chang Y-T: **Bodipy-diacrylate imaging probes for targeted proteins inside live cells.** *Chem. Commun.* 2011, **47**:4508–10.
158. Yang C-H, Chen H-L, Chuang Y-Y, Wu C-G, Chen C-P, Liao S-H, Wang T-L: **Characteristics of triphenylamine-based dyes with multiple acceptors in application of dye-sensitized solar cells.** *J. Power Sources* 2009, **188**:627–634.

159. Brodersen R: **Bilirubin. Solubility and interaction with albumin and phospholipid.** *J. Biol. Chem.* 1979, **254**:2364–2369.
160. Enyedy EA, Horváth L, Hetényi A, Tuccinardi T, Hartinger CG, Keppler BK, Kiss T: **Interactions of the carrier ligands of antidiabetic metal complexes with human serum albumin: a combined spectroscopic and separation approach with molecular modeling studies.** *Bioorg. Med. Chem.* 2011, **19**:4202–10.
161. Carter DC, Ho JX: **Structure of Serum Albumin.** In *Advances in Protein Chemistry*. Edited by Schumaker VN. Academic Press; 1994:153–196.
162. Peters T: *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*. Elsevier; 1996.
163. Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M: **Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin.** *Biol. Pharm. Bull.* 2002, **25**:695–704.
164. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN: **The Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin.** *Mol. Pharmacol.* 1975, **11**:824–832.
165. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN: **Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin.** *Mol. Pharmacol.* 1976, **12**:1052–1061.
166. Dockal M, Carter DC, Rüker F: **The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties.** *J. Biol. Chem.* 1999, **274**:29303–10.
167. Jisha VS, Arun KT, Hariharan M, Ramaiah D: **Site-selective interactions: squaraine dye-serum albumin complexes with enhanced fluorescence and triplet yields.** *J. Phys. Chem. B* 2010, **114**:5912–9.
168. Baldrige A, Feng S, Chang Y-T, Tolbert LM: **Recapture of GFP chromophore fluorescence in a protein host.** *ACS Comb. Sci.* 2011, **13**:214–7.
169. Paul BK, Samanta A, Guchhait N: **Exploring hydrophobic subdomain IIA of the protein bovine serum albumin in the native, intermediate, unfolded, and refolded states by a small fluorescence molecular reporter.** *J. Phys. Chem. B* 2010, **114**:6183–96.
170. Baptista MS, Indig GL: **Effect of BSA Binding on Photophysical and Photochemical Properties of Triarylmethane Dyes.** *J. Phys. Chem. B* 1998, **102**:4678–4688.
171. Tomasic T, Masic LP: **Rhodanine as a Privileged Scaffold in Drug Discovery.** *Curr. Med. Chem.* 2009, **16**:1596–1629.
172. Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, Mulley B, Wagner G, Mitchison T, Yuan J: **Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL.** *Nat. Cell Biol.* 2001, **3**:173–82.
173. Talele TT, Arora P, Kulkarni SS, Patel MR, Singh S, Chudayeu M, Kaushik-Basu N: **Structure-based virtual screening, synthesis and SAR of novel inhibitors of hepatitis C virus NS5B polymerase.** *Bioorg. Med. Chem.* 2010, **18**:4630–8.
174. Strat D, Missailidis S, Drake AF: **A novel methodological approach for the analysis of host-ligand interactions.** *ChemPhysChem* 2007, **8**:270–8.
175. Epps D, Raub T: **A general, wide-range spectrofluorometric method for measuring the site-specific affinities of drugs toward human serum albumin.** *Anal. Biochem.* 1995, **227**:342–350.
176. Cicchi R, Saverio Pavone F: **Non-linear fluorescence lifetime imaging of biological tissues.** *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, **400**:2687–97.
177. Petit PX, Susin S a, Zamzami N, Mignotte B, Kroemer G: **Mitochondria and programmed cell death: back to the future.** *FEBS Let.* 1996, **396**:7–13.
178. Hamblin MR, Mroz P (Eds): *Advances in Photodynamic Therapy*. Artech House; 2008.
179. Berg K, Selbo PK, Weyergang a, Dietze a, Prasmickaite L, Bonsted a, Engesaeter BØ, Angell-Petersen E, Warloe T, Frandsen N, et al.: **Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications.** *J. Microsc.* 2005, **218**:133–47.

180. Starkey JR, Rebane AK, Drobizhev M a, Meng F, Gong A, Elliott A, McInerney K, Spangler CW: **New two-photon activated photodynamic therapy sensitizers induce xenograft tumor regressions after near-IR laser treatment through the body of the host mouse.** *Clin. Cancer Res.* 2008, **14**:6564–73.
181. Kang C-C, Chen C-T, Cho C-C, Lin Y-C, Chang C-C, Chang T-C: **A dual selective antitumor agent and fluorescence probe: the binary BMVC-porphyrin photosensitizer.** *ChemMedChem* 2008, **3**:725–8.
182. Koo H, Huh MS, Sun I-C, Yuk SH, Choi K, Kim K, Kwon IC: **In Vivo Targeted Delivery of Nanoparticles for Theranosis.** *Acc. Chem. Res.* 2011, **44**:1018–28.
183. Cabral H, Nishiyama N, Kataoka K: **Supramolecular Nanodevices: From Design Validation to Theranostic Nanomedicine.** *Acc. Chem. Res.* 2011, **44**:999–1008.
184. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB: **Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions.** *Angew. Chem.* 2001, **40**:2004–2021.
185. Prescher J a, Bertozzi CR: **Chemistry in living systems.** *Nat. Chem. Biol.* 2005, **1**:13–21.
186. Baskin JM, Prescher JA, Laughlin ST, Agard NJ, Chang PV, Miller IA, Lo A, Codelli JA, Bertozzi CR: **Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007, **104**:16793–16797.
187. Lartia R, Allain C, Bordeau G, Schmidt F, Fiorini-Debuisschert C, Charra F, Teulade-Fichou M-P: **Synthetic Strategies to Derivatizable Triphenylamines Displaying High Two-Photon Absorption.** *J. Org. Chem.* 2008, **73**:1732–1744.
188. Dess DB, Martin JC: **A Useful 12-1-5 Triacetoxyperiodinane (the Dess-Martin Periodinane) for the Selective Oxidation of Primary or Secondary Alcohols and a Variety of Related 12-1-5 Species.** *J. Am. Chem. Soc.* 1991, **113**:7277–7287.
189. Dalcanale E, Montanari F: **Selective oxidation of aldehydes to carboxylic acids with sodium chlorite-hydrogen peroxide.** *J. Org. Chem.* 1986, **51**:567–569.
190. Levsky JM, Singer RH: **Fluorescence in situ hybridization: past, present and future.** *J. Cell. Sci.* 2003, **116**:2833–8.
191. Carter NP: **Fluorescence in situ hybridization—state of the art.** *Bioimaging* 1996, **4**:41–51.
192. Kolpashchikov DM: **Binary probes for nucleic acid analysis.** *Chem. Rev.* 2010, **110**:4709–23.
193. Martí A a, Jockusch S, Stevens N, Ju J, Turro NJ: **Fluorescent hybridization probes for sensitive and selective DNA and RNA detection.** *Acc. Chem. Res.* 2007, **40**:402–9.
194. Marras S a E: **Interactive fluorophore and quencher pairs for labeling fluorescent nucleic acid hybridization probes.** *Mol. Biotechnol.* 2008, **38**:247–55.
195. Lewis FD, Zhang Y, Letsinger RL: **Bispyrenyl Excimer Fluorescence : A Sensitive Oligonucleotide Probe.** *J. Am. Chem. Soc.* 1997, **119**:5451–5452.
196. Kostenko E, Dobrikov M, Pyshnyi D, Petyuk V, Komarova N, Vlassov V, Zenkova M: **5'-bis-pyrenylated oligonucleotides displaying excimer fluorescence provide sensitive probes of RNA sequence and structure.** *Nucleic Acids Res.* 2001, **29**:3611–20.
197. Lartia R, Asseline U: **New cyanine-oligonucleotide conjugates: relationships between chemical structures and properties.** *Chem. Eur. J.* 2006, **12**:2270–81.
198. Nielsen P: **Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology.** *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001, **12**:16–20.
199. Svanvik N, Westman G, Wang D, Kubista M: **Light-up probes: thiazole orange-conjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogeneous solution.** *Anal. Biochem.* 2000, **281**:26–35.
200. König K, Göhlert A, Liehr T, Loncarevic IF, Riemann I: **Two-Photon Multicolor FISH: A Versatile Technique to Detect Specific Sequences with in Single DNA Molecules in Cells and Tissues.** *Single Mol.* 2000, **1**:41–51.

201. Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC: **Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1982, **79**:4381–5.
202. Speel EJM: **Detection and amplification systems for sensitive, multiple-target DNA and RNA in situ hybridization: looking inside cells with a spectrum of colors.** *Histochem. Cell Biol.* 1999, **112**:89–113.
203. Schröck E, Manoir SD, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, et al.: **Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes.** *Science* 1996, **273**:494–497.
204. König K, Riemann I, Fischer P, Halbhuber K: **Multiplex FISH and three-dimensional DNA imaging with near infrared femtosecond laser pulses.** *Histochem. Cell Biol.* 2000, **114**:337–345.
205. Volpi EV, Bridger JM: **FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique.** *BioTechniques* 2008, **45**:385–409.
206. Cerqueira L, Fernandes RM, Ferreira RM, Carneiro F, Dinis-Ribeiro M, Figueiredo C, Keevil CW, Azevedo NF, Vieira MJ: **PNA-FISH as a new diagnostic method for the determination of clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori*.** *BMC microbiol.* 2011, **11**:101.
207. Selvaraju SB, Kapoor R, Yadav JS: **Peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) assay for specific detection of *Mycobacterium immunogenum* and DNA-FISH assay for analysis of pseudomonads in metalworking fluids and sputum.** *Mol. Cell. Probes* 2008, **22**:273–80.
208. Donnell MJO, Hebert N, McLaughlin LW: **The Stereospecific Introduction of Reporter Groups to Oligodeoxynucleotides by the Labeling of Individual Phosphorus Diastereomers.** *Bioorg. Med. Chem.* 1994, **4**:1001–1004.
209. Svanvik N, Nygren J, Westman G, Kubista M: **Free-probe fluorescence of light-up probes.** *J. Am. Chem. Soc.* 2001, **123**:803–9.
210. Asseline U, Chassignol M, Aubert Y, Roig V: **Detection of terminal mismatches on DNA duplexes with fluorescent oligonucleotides.** *Org. Biomol. Chem.* 2006, **4**:1949–57.
211. Privat E, Melvin T, Asseline U, Vigny P: **Oligonucleotide-conjugated thiazole orange probes as “light-up” probes for messenger ribonucleic acid molecules in living cells.** *Photochem. Photobiol.* 2001, **74**:532–41.
212. Igarashi K, Kashiwagi K: **Modulation of cellular function by polyamines.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010, **42**:39–51.
213. De Bandt J-P, Moinard C, Cynober L: **Métabolisme et fonctions des polyamines.** *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2006, **21**:333–341.
214. Guminski Y, Grousseau M, Cugnasse S, Brel V, Annereau J-P, Vispé S, Guilbaud N, Barret J-M, Bailly C, Imbert T: **Synthesis of conjugated spermine derivatives with 7-nitrobenzoxadiazole (NBD), rhodamine and bodipy as new fluorescent probes for the polyamine transport system.** *Bioorg. Med. Chem. Letters* 2009, **19**:2474–7.
215. Wang Y, Zhang X, Zhao J, Xie S, Wang C: **Nonhematotoxic naphthalene diimide modified by polyamine: synthesis and biological evaluation.** *J. Med. Chem.* 2012, **55**:3502–12.
216. Sol V, Lamarche F, Enache M, Garcia G, Granet R, Guilloton M, Blais JC, Krausz P: **Polyamine conjugates of meso-tritylporphyrin and protoporphyrin IX: potential agents for photodynamic therapy of cancers.** *Bioorg. Med. Chem.* 2006, **14**:1364–77.
217. Larsen AF, Nielsen MC, Ulven T: **Tetrasubstituted Phenanthrolines as Highly Potent, Water-Soluble, and Selective G-Quadruplex Ligands.** [Internet]. *Chem. Eur. J.* 2012, **3**:10892–10902.
218. Segal EI, Low PS: **Tumor detection using folate receptor-targeted imaging agents.** *Cancer Metastasis Rev.* 2008, **27**:655–64.
219. Low PS, Kularatne SA: **Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer.** *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009, **13**:256–62.
220. Xia W, Low PS: **Folate-targeted therapies for cancer.** *J. Med. Chem.* 2010, **53**:6811–24.

- 221. Kennedy M, Jallad K, Lu J, Low P, Ben-Amotz D: **Evaluation of folate conjugate uptake and transport by the choroid plexus of mice.** *Pharm. Res.* 2003, **20**:714–719.
- 222. Moon WK, Lin Y, Loughlin TO, Tang Y, Kim D, Weissleder R, Tung C: **Enhanced Tumor Detection Using a Folate Receptor-Targeted Near-Infrared Fluorochrome Conjugate.** *Bioconj. Chem.* 2003, **14**:539-545.
- 223. Thomas M, Clarhaut J, Strale P-O, Tranoy-Opalinski I, Roche J, Papot S: **A galactosidase-responsive “trojan horse” for the selective targeting of folate receptor-positive tumor cells.** *ChemMedChem* 2011, **6**:1006–10.
- 224. Santra S, Kaittanis C, Santiesteban OJ, Perez JM: **Cell-specific, activatable, and theranostic prodrug for dual-targeted cancer imaging and therapy.** *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**:16680–8.
- 225. Bettio A, Honer M, Müller C, Brühlmeier M, Müller U, Schibli R, Groehn V, Schubiger AP, Ametamey SM: **Synthesis and preclinical evaluation of a folic acid derivative labeled with ¹⁸F for PET imaging of folate receptor-positive tumors.** *J. Nucl. Med.* 2006, **47**:1153–60.
- 226. Ke C-Y, Mathias CJ, Green M a: **Folate-receptor-targeted radionuclide imaging agents.** *Adv. Drug Delivery Rev.* 2004, **56**:1143–60.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

A. SYNTHESIS

I. Materials and methods

1. Chemicals

Chemicals were bought from Sigma-Aldrich (USA) or Acros Organics (Belgium) and used as received. Metal catalysts were bought from Strem Chemicals (USA) and used as received. 2-iodoxybenzoic acid (IBX) was prepared in the laboratory according to the reported procedure.¹

2. Analyses and purifications

Preparative flash chromatography was carried out with Merck silica gel (Si 60, 35-70 μm) or on a CombiFlash Companion from Teledyne Isco equipped with packed silica (50 μm) cartridges from Interchim.

¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 300 MHz and 75 MHz respectively on a Bruker Advance 300 spectrometer.

High-performance liquid chromatography was carried out on a Waters Alliance equipped with a photodiode array detector using an XterraMS column eluted with a linear gradient of water (0.1% formic acid) and acetonitrile. Methods are detailed thereafter for each analysis.

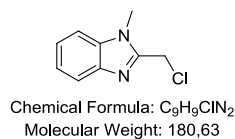
Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was performed at the Institut Curie.

Electrospray ionization high resolution mass spectrometry (HR-MS) was performed at the *Small Molecule Mass Spectrometry platform* of IMAGIF (Centre de Recherche de Gif - www.imagif.cnrs.fr).

¹ Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537–4538.

II. Procedures

2-(chloromethyl)-1-methyl-1H-benzo[d]imidazole **3**:



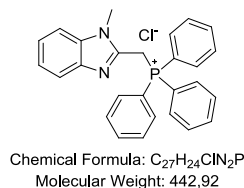
N1-methylbenzene-1,2-diamine (5.38 g, 5 mL, 44.0 mmol) and 2-chloroacetic acid (6.24 g, 66.0 mmol, 1.5 eq) were added in 20 mL of 2N HCl. The resulting dark purple solution is stirred at reflux overnight. After cooling at rt, the solution is brought to pH=8 with NaOH 1M and extracted twice with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with brine dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure.

Crude product was purified by flash chromatography using CombiFlash (ethyl acetate/cyclohexane 50/50 to 80/20) to afford 6.1 g of the title compound as a white powder (77%).

CAS number [4760-35-4]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.77 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.46 – 7.03 (m, 3H), 4.86 (s, 2H), 3.89 (s, 3H)

((1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)methyl)triphenylphosphonium chloride **4**:

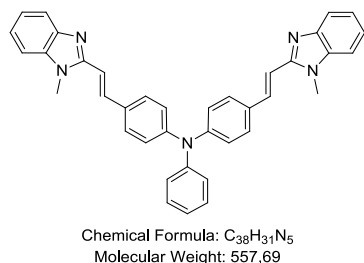


A solution of **3** (6.1 g, 33.8 mmol) and triphenylphosphine (13.29 g, 50.7 mmol, 1.5 eq) in 40 mL of toluene was heated at reflux. A white precipitate forms. After one night stirring the precipitates is filtered under reduced pressure, washed with pentane and dried under reduced pressure to afford 13.85 g (31.3 mmol, 93%) of the expected product as a white solid.

CAS number [68426-76-6]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.96 (dd, J = 13.0, 7.8 Hz, 6H), 7.75 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 7.69 – 7.53 (m, 6H), 7.47 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.32 – 7.08 (m, 3H), 6.03 (d, J = 14.8 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H).

bis(4-((E)-2-(1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)vinyl)phenyl)-N-phenylaniline **2a**:



To a solution of 4,4'-bisformyltriphenylamine (200 mg, 0.664 mmol) and **4** (647 mg, 1.460 mmol, 2.2 eq) in 5 mL methanol is added 5 mL of a freshly prepared solution of sodium methanolate in methanol (76 mg Na, 3.32 mmol, 5 eq). After one night stirring, the solution is left to cool at rt and concentrated under reduced pressure. The residue is dissolved in DCM. Pentane is added until precipitation of a yellow solid. The precipitate is

filtered under reduced pressure, washed with pentane and dried under vacuum to afford 315 mg (0.564 mmol, 85%) of the title compound.

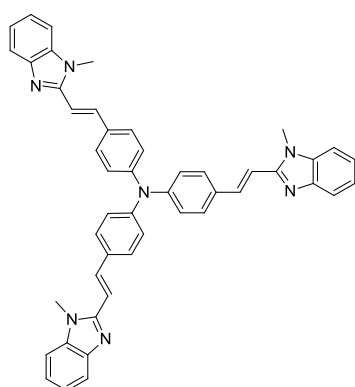
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.93 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.83 – 7.69 (m, 2H), 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 7.43 – 7.23 (m, 8H), 7.21 – 7.15 (m, 2H), 7.12 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 7.00 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 151.4, 148.1, 146.7, 143.1, 136.7, 136.0, 130.5, 129.6, 128.4, 125.6, 124.3, 123.6, 122.6, 122.4, 119.2, 111.1, 109.1, 37.0, 29.8.

MS (ES⁺): m/z 558.2 [M+H]⁺.

HRMS (ESI⁺): m/z calcd for [C₃₈H₃₁N₅]⁺: 558.2658; found: 558.2657

tris(4-((E)-2-(1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)vinyl)phenyl)amine **2b:**



Chemical Formula: C₄₈H₃₉N₇
Molecular Weight: 713.87

According to the same procedure, 200mg of 4,4',4''-triformyltriphenylamine (0.607 mmol) led to 282 mg of the title compound as a yellow solid (65%).

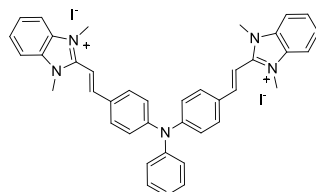
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.95 (d, J = 15.6 Hz, 3H), 7.85 – 7.66 (m, 3H), 7.55 (d, J = 7.7 Hz, 6H), 7.40 – 7.22 (m, 9H), 7.17 (d, J = 7.6 Hz, 6H), 7.03 (d, J = 15.8 Hz, 3H), 3.87 (s, 9H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 151.3, 147.4, 143.1, 136.5, 136.0, 131.3, 128.5, 124.4, 122.6, 122.5, 119.1, 111.6, 109.1, 29.8.

MS (ES⁺): m/z 714.4 [M+H]⁺.

HRMS (ESI⁺): m/z calcd for [C₄₈H₃₉N₇]⁺: 714.3345; found: 714.3373

bis(4-((E)-2-(N,N'-dimethylbenzimidazolium-2-yl)vinyl)phenyl)phenylamine diiodide, **TP-2Bzim :**



Chemical Formula: C₄₀H₃₇I₂N₅
Molecular Weight: 841.56

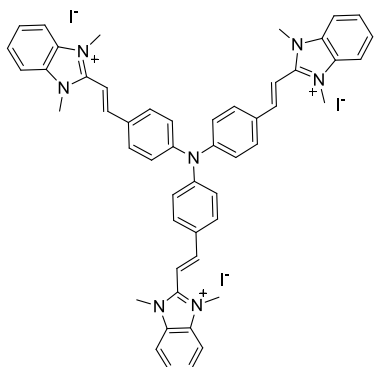
To a solution of **2a** (48 mg, 0.086 mmol) in 2mL dichloromethane and 2mL methanol is added a large excess of methyl iodide (1 mL). The solution turns red. After stirring overnight at 40°C, pentane is added until a red precipitates forms. The solid is filtered under reduced pressure, washed with pentane and dried under vacuum to afford 40mg of the pure product (55%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.05 (dd, J = 6.0, 2.9 Hz, 4H), 7.90 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 7.79 (d, J = 16.8 Hz, 2H), 7.70 (dd, J = 6.2, 2.9 Hz, 4H), 7.53 – 7.36 (m, 4H), 7.34 – 7.23 (m, 1H), 7.23 – 7.13 (m, 6H), 4.14 (s, 12H).

¹³C NMR (75MHz, DMSO-*d*₆) δ 149.0, 148.6, 145.8, 145.7, 132.0, 130.3, 129.0, 126.4, 126.1, 125.5, 123.0, 112.9, 105.9, 33.0.

MS (ES⁺): m/z 293.7 [M-2I]²⁺.

HRMS (ESI⁺): m/z calcd for [C₄₀H₃₇N₅]²⁺: 293.6525; found: 293.6520

tris(4-((E)-2-(N,N'-dimethylbenzimidazolium-2-yl)vinyl)phenyl)amine triiodide, TP-3Bzim :

Chemical Formula: C₅₁H₄₈I₃N₇
Molecular Weight: 1139,69

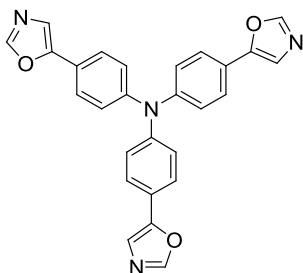
According to the same procedure, 40 mg of **2b** (0.056 mmol) led to 55 mg of the pure compound as a red solid (86%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.07 (dd, *J* = 6.2, 3.1 Hz, 6H), 7.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 6H), 7.84 (d, *J* = 16.7 Hz, 3H), 7.71 (dd, *J* = 6.2, 3.0 Hz, 6H), 7.51 (d, *J* = 16.7 Hz, 3H), 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 6H), 4.16 (s, 18H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 148.4, 148.3, 145.6, 131.9, 130.4, 130.1, 126.4, 124.3, 112.9, 106.7, 33.0.

MS (ES⁺): *m/z* 252.8 [M-3I]³⁺.

HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for [C₅₁H₄₈N₇]³⁺: 252.7990; found: 253.1304

tris(4-(oxazol-5-yl)phenyl)amine **5b:**

Chemical Formula: C₂₇H₁₈N₄O₃
Molecular Weight: 446,46

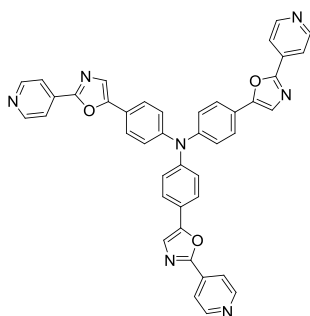
A mixture of tris-formyltriphenylamine **1b** (296 mg, 0.9 mmol, 1 equiv.), TosMIC (586 mg, 3 mmol, 3.3 equiv.), potassium carbonate (744 mg, 5.3 mmol, 6 equiv.) in methanol (16 mL) was stirred for 4 h at 80°C. The reaction mixture was concentrated to dryness. The resulting residue was diluted with dichloromethane and water. After decantation, the organic layer was washed with water (two times), brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated to dryness. The crude residue was dissolved in a minimal amount of dichloromethane and a large quantity of pentane was added. No precipitate was

observed but after concentration to dryness the pure title compound **2a** was obtained as a yellow foam in a quantitative yield (422 mg, 0.9 mmol).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (s, 3H), 7.58 (d, *J* = 8.7, 6H), 7.30 (s, 3H), 7.17 (d, *J* = 8.7, 6H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 151.3, 150.3, 147.1, 125.7, 124.5, 123.0, 121.0.

MS (ES⁺) *m/z* 447.1

tris(4-(2-(pyridin-4-yl)oxazol-5-yl)phenyl)amine TPn-3Ox2Py:

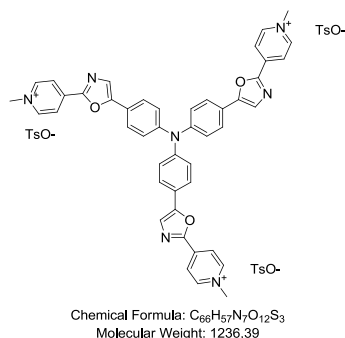
Chemical Formula: C₄₂H₂₇N₇O₃
Molecular Weight: 677,71

A mixture of compound **5b** (100 mg, 0.22 mmol, 1 equiv.), 4-bromopyridine hydrochloride (140 mg, 0.71 mmol, 3.2 equiv.), lithium tert-butyrate (143 mg, 1.8 mmol, 8 equiv.), palladium tetrakis (39 mg, 0.03 mmol, 0.15 equiv.) in dry dioxane (4 mL) was stirred overnight at 120°C in a sealed tube. Dichloromethane and water were added. After decantation, the resulting organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated to dryness. The

crude residue was purified by column chromatography (dichloromethane/methanol = 100/0 to 95/5) to afford the desired compound **TPn-3Ox2Py** in 21 % yield (32 mg, 0.05 mmol) as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.77 (d, J = 5.9, 6H), 7.94 (d, J = 6.0, 6H), 7.69 (d, J = 8.6, 6H), 7.49 (s, 3H), 7.26 (d, J = 8.7, 6H)

tris(4-(N-methylpyridinium-4-yl-oxazol-5-yl)phenyl)amine tris(p-toluenesulfonate), TP-3(Ox2Py):



A suspension of **TPn-3Ox2Py** (30 mg, 0.04 mmol, 1 equiv.) and methyl tosylate (37 mg, 0.2 mmol, 4.5 equiv.) in toluene (3 mL) was stirred for 22 h at reflux. After cooling down to room temperature, the red precipitate was filtered, washed with hot toluene and diethyl ether to afford the desired salt as a red solid (45 mg, 0.03 mmol) in 82 % yield.

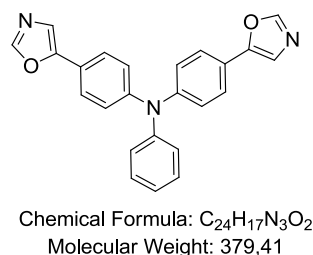
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9.08 (d, J = 6.6, 6H), 8.62 (d, J = 6.9, 6H), 8.18 (s, 3H), 8.00 (d, J = 8.6, 6H), 7.46 (d, J = 7.8, 6H), 7.29 (d, J = 8.4, 6H), 7.10 (d, J = 7.7, 6H), 4.37 (s, 9H), 2.28 (s, 9H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 156.4, 155.0, 148.3, 147.4, 146.7, 140.0, 138.5, 129.0, 127.7, 127.0, 126.4, 125.5, 123.7, 122.6, 48.7, 21.7

MS (ES+) m/z 241.1

HRMS (ESI) calcd for C₄₅H₃₆N₇O₃ [M+] 722.2880, found 722.2905.

bis(4-(oxazol-5-yl)phenyl)N-phenylaniline **5a:**



A mixture of bis-formyltriphenylamine **1a** (452 mg, 1.5 mmol, 1 equiv.), TosMIC (637 mg, 3.3 mmol, 3.3 equiv.), potassium carbonate (830 mg, 6 mmol, 4 equiv.) in methanol (20 mL) was stirred for 4 h at 80°C. The reaction mixture was concentrated to dryness. The resulting residue was diluted with dichloromethane and water. After decantation, the organic layer was washed with water, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated to dryness. The

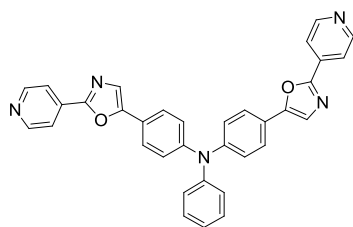
crude residue was dissolved in a minimal amount of dichloromethane and a large quantity of pentane was added. No precipitate was observed but after concentration to dryness the pure title compound **15a** was obtained as a yellow foam in a quantitative yield (568 mg, 1.5 mmol).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (s, 2H), 7.54 (d, J = 8.7, 4H), 7.36 – 7.29 (m, 2H), 7.26 (s, 2H), 7.18 – 7.08 (m, 9H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 151.5, 150.2, 147.7, 146.8, 129.7, 125.6, 125.4, 124.3, 123.9, 122.3, 120.7. **MS** (ES+) m/z 447.

Anal. (C₂₄H₁₇N₃O₂ · H₂O) Calcd: C, 72.53; H, 4.82; N, 10.57 Found : C, 72.98; H, 4.52; N, 10.29

N-phenyl-4-(2-(pyridin-4-yl)oxazol-5-yl)-N-(4-(2-(pyridin-4-yl)oxazol-5-yl)phenyl)aniline TPn-2Ox2Py:



Chemical Formula: C₃₄H₂₃N₅O₂
Molecular Weight: 533,58

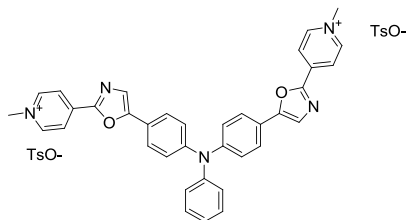
A mixture of compound **5a** (190 mg, 0.5 mmol, 1 equiv.), 4-bromopyridine hydrochloride (233 mg, 1.2 mmol, 2.4 equiv.), lithium tert-butyrate (160 mg, 2 mmol, 4 equiv.), palladium tetrakis (58 mg, 0.05 mmol, 0.10 equiv.) in dry dioxane (2 mL) was stirred overnight at 120°C in a sealed tube. Dichloromethane and water were added. After decantation, the resulting organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated to dryness. The crude residue was purified by column chromatography (dichloromethane/methanol = 100/0 to 95/5) to afford the desired compound in 50 % yield (133 mg, 0.25 mmol) as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.76 (d, J = 5.5, 4H), 7.93 (d, J = 5.5, 4H), 7.63 (d, J = 9.0, 4H), 7.44 (s, 2H), 7.35 (t, J = 7.8, 2H), 7.20-7.15 (m, 3H); 7.18 (t, J = 9.0, 4H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.5, 152.6, 150.7, 148.1, 146.7, 134.4, 129.9, 125.9, 125.8, 124.8, 124.0, 123.4, 122.0, 120.0

MS (ES+) m/z 534.0

bis(4-(N-methylpyridinium-4-yl-oxazol-5-yl)phenyl)N-phenylaniline bis(p-toluenesulfonate), TP-2Ox2Py:



Chemical Formula: C₅₀H₄₃N₅O₈S₂
Molecular Weight: 906,04

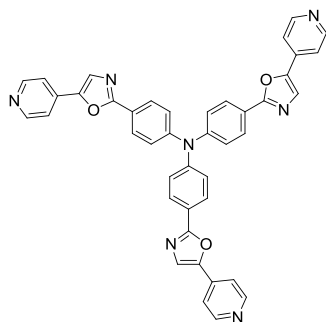
A suspension of **TPn-2Ox2Py** (40 mg, 0.075 mmol, 1 equiv.) and methyl tosylate (42 mg, 0.22 mmol, 3 equiv.) in toluene (3 mL) was stirred for 22 h at reflux. After cooling down to room temperature, the red precipitate was filtered, washed with hot toluene and diethyl ether to afford the desired salt as a red solid (66 mg, 0.072 mmol) in 97% yield.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.08 (d, J = 6.5, 4H), 8.61 (d, J = 6.5, 4H), 8.13 (s, 2H), 7.94 (d, J = 8.5, 4H), 7.50-7.45 (m, 2H), 7.47 (d, J = 8.0, 4H), 7.30-7.20 (m, 3H), 7.20 (d, J = 8.5, 4H), 7.11 (d, J = 8.0, 4H), 4.37 (s, 6H), 2.29 (s, 6H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 156.0, 155.0, 147.3, 139.9, 138.3, 137.9, 132.2, 128.8, 127.4, 126.6, 126.2, 124.2, 124.1, 123.6, 123.5, 121.7, 121.4, 121.2, 48.3, 21.4.

MS (ES+) m/z 281.8

HRMS (ESI) calcd for C₃₆H₂₉N₅O₂ [M⁺] 563.2321, found 563.2308

tris(4-(5-(pyridin-4-yl)oxazol-2-yl)phenyl)amine TPn-3Ox5Py:

Chemical Formula: $C_{42}H_{27}N_7O_3$
Molecular Weight: 677.71

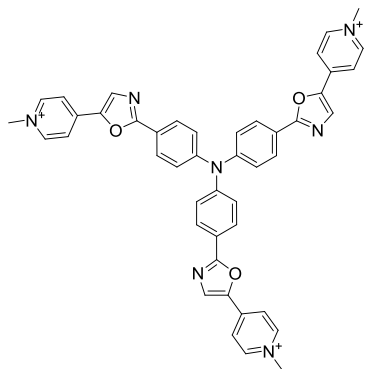
A mixture of tris-bromotriphenylamine **6b** (123 mg, 0.25 mmol, 1 equiv.), 5-pyridyloxazole (112 mg, 0.77 mmol, 3 equiv.), lithium tert-butyrate (92 mg, 1.1 mmol, 4.5 equiv.), palladium tetrakis (44 mg, 0.04 mmol, 0.15 equiv.) in dry dioxane (2 mL) was stirred for 2 h at 120°C in a sealed tube. Dichloromethane and water were added. After decantation, the resulting organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated to dryness. The crude residue was purified by column chromatography (dichloromethane/methanol = 100/0 to 90/10), dissolved in a minimal amount of dichloromethane and precipitated with diethyl ether to afford the desired compound in 35 % yield (60 mg, 0.09 mmol) as a yellow solid.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.69 (d, J = 5.0, 2H), 8.09 (d, J = 8.6, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.58 (d, J = 5.7, 2H), 7.30 (d, J = 8.6, 2H)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 162.2, 150.5, 148.8, 148.6, 134.8, 128.2, 127.1, 124.6, 122.3, 117.9.

MS (ES+) m/z 678.3.

Anal. ($C_{42}H_{27}N_7O_3 \cdot 0.5H_2O$) Calcd: C, 73.46; H, 4.11; N, 14.28 Found : C, 73.62; H, 3.89; N, 13.96

tris(4-(5-(N-methylpyridinium-4-yl-oxazol-2-yl)phenyl)amine tris(p-toluenesulfonate), TP-3Ox5Py:

Chemical Formula: $C_{45}H_{36}N_7O_3^{3+}$
Molecular Weight: 722.81

A suspension of **TPn-3Ox5Py** (40 mg, 0.06 mmol, 1 equiv.) and methyl tosylate (50 mg, 0.26 mmol, 4.5 equiv.) in toluene (4 mL) was stirred for 12 h at reflux. After cooling down to room temperature, the reaction mixture was sonicated and put at 4 °C for 2 days. The resultant fine solid was washed with hot toluene and diethyl ether to afford the desired salt as an orange solid (52 mg, 0.04 mmol) in 71 % yield.

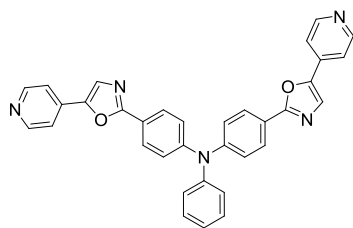
1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.01 (d, J = 6.1, 6H), 8.61 (s, 3H), 8.46 (d, J = 6.3, 6H), 8.25 (d, J = 8.6, 6H), 7.47 (d, J = 7.9, 6H), 7.37 (d, J = 8.2, 6H), 7.10

(d, J = 7.8, 6H), 4.30 (s, 9H), 2.28 (s, 9H)

^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ 163.9, 148.9, 146.1, 146.0, 145.7, 140.4, 137.7, 134.6, 128.9, 128.1, 125.51, 124.7, 121.2, 120.5, 47.2, 20.8.

MS (ES+) m/z 241.0

HRMS (ESI) calcd for $C_{52}H_{43}N_7O_6S [M+OTs]^{2+}$ 446.6498, found 446.6481

N-phenyl-4-(5-(pyridin-4-yl)oxazol-2-yl)-N-(4-(5-(pyridin-4-yl)oxazol-2-yl)phenyl)aniline TPn-2Ox5Py:

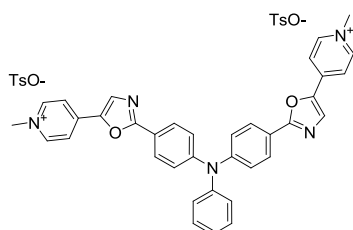
Chemical Formula: $C_{34}H_{23}N_5O_2$
Molecular Weight: 533,58

A mixture of bis-bromotriphenylamine **6a** (426 mg, 1 mmol, 1 equiv.), 5-pyridyloxazole (386 mg, 2.6 mmol, 2.5 equiv.), lithium tert-butyrate (338 mg, 4.2 mmol, 4 equiv.), palladium tetrakis (122 mg, 0.1 mmol, 0.10 equiv.) in dry dioxane (10 mL) was stirred for 21 h at 120°C in a sealed tube. Ethyl acetate and water were added. After decantation, the resulting organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated to dryness. The crude residue was purified by column chromatography (dichloromethane/methanol = 100/0 to 90/10), dissolved in a minimal amount of dichloromethane and precipitated with a small quantity of diethyl ether and a large quantity of pentane to afford the desired compound in 26 % yield (147 mg, 0.27 mmol) as a bright yellow solid.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.66 (d, J = 5.4, 4H), 8.00 (d, J = 8.7, 4H), 7.63 (s, 2H), 7.54 (d, J = 5.4, 4H), 7.41 – 7.30 (m, 2H), 7.25 – 7.13 (m, 7H)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 162.6, 150.5, 149.6, 148.4, 146.3, 135.1, 130.0, 128.0, 127.2, 126.3, 125.3, 123.5, 121.2, 118.0.

MS (ES+) m/z 534.2

bis(4-(5-(N-methylpyridinium-4-yl)-oxazol-2-yl)phenyl)N-phenylaniline bis(p-toluenesulfonate), TP-2Ox5Py:

Chemical Formula: $C_{50}H_{43}N_5O_8S_2$
Molecular Weight: 906,04

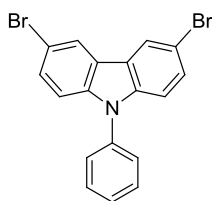
A suspension of **TPn-2Ox5Py** (40 mg, 0.07 mmol, 1 equiv.) and methyl tosylate (42 mg, 0.22 mmol, 3 equiv.) in toluene (4 mL) was stirred for 18 h at reflux. After cooling down to room temperature, the orange precipitate was filtered, washed with hot toluene and diethyl ether to afford the desired salt as an orange solid (60 mg, 0.06 mmol) in 89 % yield.

1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.99 (d, J = 6.2, 4H), 8.58 (s, 2H), 8.43 (d, J = 6.2, 4H), 8.17 (d, J = 8.1, 4H), 7.47 (d, J = 7.5, 4H), 7.35 – 7.15 (m, 9H), 7.10 (d, J = 7.3, 4H), 4.29 (s, 6H), 2.28 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ 164.1, 149.6, 145.9, 145.8, 145.4, 140.4, 137.5, 134.7, 130.3, 128.9, 128.7, 128.2, 128.0, 126.5, 125.5, 123.0, 120.4, 119.8, 47.2, 20.8.

MS (ES+) m/z 282.3

HRMS (ESI) calcd for $C_{36}H_{29}N_5O_2$ $[M+]$ 563.2321, found 563.2304

3,6-dibromo-(N-phenyl)carbazole:

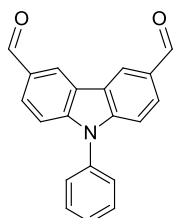
Chemical Formula: $C_{18}H_{11}Br_2N$
Molecular Weight: 401,09

N-phenylcarbazole (2.5 g, 10.3 mmol) and N-bromosuccinimide (3.75 g, 21.1 mmol) were dissolved in 30 mL $CHCl_3$. The resulting orange solution was stirred at reflux overnight. The organic phase was washed with brine twice, dried over $MgSO_4$ and evaporated to give 3.82 g of raw product.

Purification by flash chromatography afforded 3.5 g of the title compound (8.7 mmol, 84%) as a white powder.

CAS number [57103-20-5]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.20 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 7.67 – 7.56 (m, 2H), 7.56 – 7.42 (m, 5H), 7.24 (s, 2H).

9-phenyl-9H-carbazole-3,6-dicarbaldehyde 7:

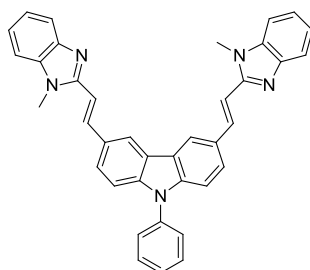
Chemical Formula: $C_{20}H_{13}NO_2$
Molecular Weight: 299,32

n-BuLi (1.6M, 1.25 mL, 20 mmol, 4 eq) was added dropwise to a solution of 3,6-dibromo-(N-phenyl)carbazole (2 g, 5 mmol) in 15 mL anhydrous THF cooled to $-78^\circ C$. After 2hrs stirring, DMF (1.8 mL, 23 mmol, 4.6 eq) in solution in 5 mL THF is added dropwise to the reaction.

The reaction was left to warm slowly to $0^\circ C$ and then 40 mL of HCl 3M were added dropwise. The solution was stirred for 15 min and the phases were separated. THF was evaporated to give a yellow solid. Purification by flash chromatography (pure DCM) yielded 1.15 g (3.84 mmol, 77%) of the expected product.

CAS number [145771-93-3]

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10.16 (s, 2H), 8.73 (s, 2H), 8.02 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.78 – 7.51 (m, 5H), 7.47 (d, J = 8.6 Hz, 2H).

9-phenyl-3,6-bis((E)-2-(1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)vinyl)-9H-carbazole 8:

Chemical Formula: $C_{38}H_{29}N_5$
Molecular Weight: 555,67

To a solution of **7** (116 mg, 0.388 mmol) and **4** (400 mg, 0.903 mmol, 2.3 eq) in methanol was added a freshly prepared solution of MeONa (90 mg of Na in 10 mL MeOH). The solution was stirred overnight at reflux and a yellow solid precipitated. The precipitate was filtered and dried under vacuum to afford 157 mg of the title compound (0.283 mmol, 73%).

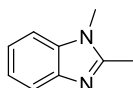
1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.76 (s, 2H), 8.06 (d, J = 15.5 Hz, 2H), 7.95 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.82 – 7.67 (m, 4H), 7.67 – 7.51 (m, 7H), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.29 – 7.10 (m, 4H), 4.00 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 151.4, 141.0, 136.6, 136.3, 136.1, 130.3, 128.8, 126.6, 126.5, 123.2, 121.9, 121.7, 120.0, 118.3, 112.2, 110.3, 110.0, 28.2.

MS (ESI⁺): m/z 556.1 [M+H]⁺.

HPLC: R_t = 17.10 min (98%). 90/10 (0 min) – 0/100 (30 min)

1,2-dimethyl-1H-benzo[d]imidazole **9**:



Chemical Formula: $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2$
Molecular Weight: 146,19

A mixture of 0.92 mL of N-methylbenzene-1,2-diamine (8 mmol, 1 eq) and 0.70 mL of acetic acid (1.2 mmol, 1.5 eq.) was refluxed in hydrochloric acid (20 mL) for 17 h. The reaction was then quenched with NaOH 3N until pH 6 and a brown solid appeared. The mixture was extracted with diethyl ether and dried over magnesium sulphate.

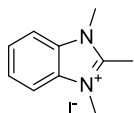
The resulting solution was filtered and concentrated under reduced pressure to obtain 1.244 g of a brownish solid with a quantitative yield.

CAS number [2876-88-6]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.72 – 7.64 (m, 1H), 7.29 – 7.18 (m, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.58 (s, 3H).

MS (ES⁺): m/z 147.1 [M+H]⁺, 169.2 [M+Na]⁺.

1,2,3-trimethyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium iodide **10**:



Chemical Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{IN}_2$
Molecular Weight: 288,13

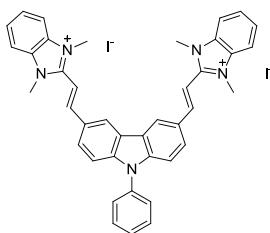
To 0.504 g of 1,2-dimethyl-1H-benzimidazole **9** (3.4 mmol, 1 eq.) were added 3 mL of methyl iodide (48.2 mmol, 14 eq.) and the mixture was stirred at 35°C for 16 h. The crude product was then filtered and washed over n-pentane, to afford 0.762 g of a pale brown solid (Yield = 78 %).

CAS number [3805-38-7]

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.98 (dd, J = 3.0, 6.0, 2H), 7.64 (dd, J = 3.0, 6.0, 2H), 3.99 (s, 6H), 2.85 (s, 3H).

MS (ES⁺): m/z 161.2 [M-I]⁺.

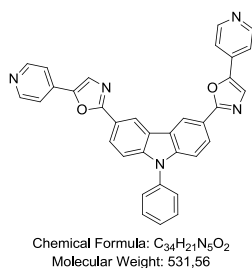
9-phenyl-3,6-bis((E)-2-(N,N'-dimethylbenzimidazolium-2-yl)vinyl)-9H-carbazole diiodide, **Cbz-2Bzim**:



Chemical Formula: $\text{C}_{40}\text{H}_{35}\text{I}_2\text{N}_5$
Molecular Weight: 839,55

A solution of **7** (17 mg, 0.057 mmol) and **10** (36 mg, 0.125 mmol, 2.2 eq) in ethanol was refluxed for 5 hrs and a yellow solid precipitates. After cooling to rt, the solid is filtered, washed with pentane and dried under vacuum to afford 34mg (0.040 mmol, 71%) of the title compound as a yellow solid. The product is unstable and could not be completely characterized.

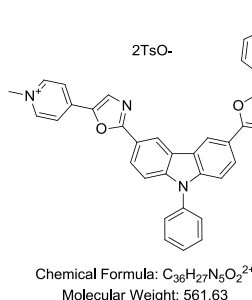
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.97 (s, 2H), 8.26 – 7.91 (m, 9H), 7.87 – 7.41 (m, 15H), 4.22 (s, 12H).

9-phenyl-3,6-bis(5-pyridin-4-yl-oxazol-2-yl)-9H-carbazole, Cbzⁿ-2Ox5Py:

In a sealed flask flushed with Argon, 3,6-dibromo-(N-phenyl)carbazole (500 mg, 0.247 mmol), 5-(pyridin-4-yl)oxazole (455 mg, 3.12 mmol), lithium *tert*-butoxide (399 mg, 4.99 mmol) and Palladium *tetrakis*(triphenylphosphine) (144mg, 10 mol%) were added in anhydrous dioxane to give a brown suspension and stirred at 120°C for 44hrs. After cooling to rt, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate and washed with water. The aqueous phase was extracted twice with ethyl acetate and the combined organic phases were washed with brine dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to give a red solid. The raw product was purified by flash chromatography (eluent: 5% MeOH in DCM) to afford the expected product as a yellow solid (168 mg, 0.316 mmol, 25%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.03 (s, 2H), 8.73 (d, J = 5.7 Hz, 4H), 8.24 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.86 – 7.38 (m, 16H).

MS (ES⁺): m/z 532.1 [M+H]⁺

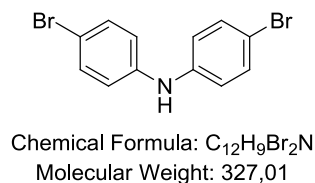
9-phenyl-3,6-bis(5-(N-methylpyridinium-4-yl)-oxazol-2-yl)-9H-carbazole bis(p-toluenesulfonate), Cbz-2Ox5Py:

Methyl tosylate (47 mg, 0.252 mmol) was added to a suspension of Cbzⁿ-2Ox5Py (35 mg, 0.066 mmol) in toluene (20 mL). The suspension dissolves when heated. After 24 hours at reflux, an orange precipitates forms. It is filtered under vacuum and washed with warm toluene to afford 50 mg of the expected product (0.055 mmol, 84%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.38 (s, 2H), 9.03 (s, 4H), 8.52 (m, 8H), 7.95 – 7.34 (m, 16H), 7.11 (s, 4H), 4.32 (s, 6H), 2.27 (s, 6H).

HPLC: R_t = 7.26 min. (79%) 98/2 (0 min) – 90/10 (2 min) – 80/20 (5 min) – 60/40 (7 min) – 0/100 (12 min).

MS (ES⁺): m/z 280.8 [M-2TsO]²⁺

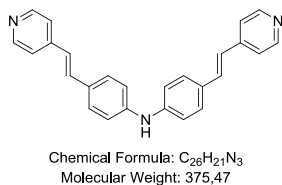
bis(4-bromophenyl)amine:

N-bromosuccinimide (3.56 g, 20 mmol, 2 eq) in solution in 10 mL of DMF was added dropwise to a solution of diphenylamine (1.69 g, 10 mmol) in 10 mL of DMF at 0°C. The solution was stirred at 0°C for 6 hours and then overnight at rt. Water was added to the reaction mixture and a white solid precipitated. The solid was filtered under vacuum to afford 1.77 g (7.6 mmol, 76%) of the expected product.

CAS number [16292-17-4]

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.35 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 6.91 (d, J = 8.8 Hz, 4H)

bis(4-((E)-2-(pyridin-4-yl)vinyl)phenyl)amine **11:**

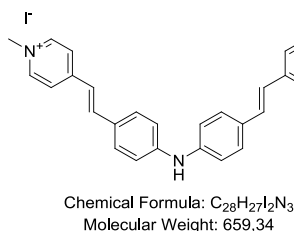


bis(4-bromophenyl)amine (200 mg, 0.611 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (9.6 mg, 0.043 mmol, 7 mol%) and $\text{P}(t\text{-butyl})_3\text{BF}_4$ (26 mg, 0.092 mmol, 15 mol%) were placed in a dry schlenck and flushed with Argon. 2 mL of DMF and 2 mL of triethylamine were then added and the mixture was stirred at 110°C under argon for 22h. CH_2Cl_2 was added to the reaction and the solution was washed with water twice and with NaHCO_3 , dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. Purification by flash chromatography using combiflash (DCM:EtOH, 100:0 to 40-60) afforded 121 mg (0.32 mmol, 53%) of the expected product as a yellow powder.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.56 (d, J = 6.0 Hz, 4H), 7.49 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.35 (d, J = 6.1 Hz, 4H), 7.32 – 7.17 (m, 2H), 7.12 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 6.90 (d, J = 16.3 Hz, 2H), 3.7 (s, 1H).

MS (ES^+): m/z 376.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

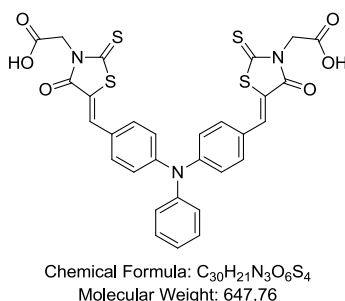
bis(4-((E)-2-(N-methylpyridinium-4-yl)vinyl)phenyl)amine diiodide, **DP-2Py:**



A large excess of MeI (1 mL) was added to a solution of **11** (500 mg, 1.33 mmol) in a methanol/DCM mixture. The reaction was stirred at 30°C overnight. A red solid precipitated and was filtered under vacuum, washed with pentane and dried undervacuum to afford 615 mg (0.93 mmol, 70%) of the expected product as a dark red powder.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMF}-d_7$) δ 9.20 (d, J = 6.8 Hz, 4H), 9.7 (s, 1H), 8.56 (d, J = 6.8 Hz, 4H), 8.38 (d, J = 16.1 Hz, 2H), 8.12 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.76 (s, 2H), 7.68 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 4.64 (s, 6H).

Synthesis of TP-2Rho:



4,4'-bisformyltriphenylamine (166 mg, 0.55 mmol), rhodanine-3-acetic acid (220 mg, 1.14 mmol, 2.1 eq) and ammonium acetate (100 mg, 1.3 mmol, 2.4 eq) were dissolved in 15 mL of acetic acid. The solution was stirred at 110°C overnight. A red solid precipitated and was filtered to afford 310 mg (87%) of the expected product.

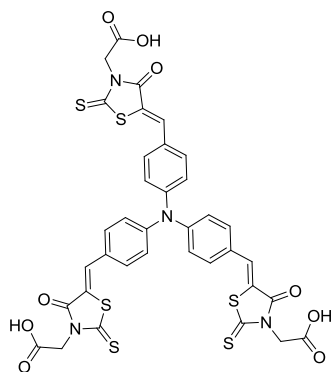
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.82 (s, 2H), 7.64 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.47 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.31 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.16 (d, J = 8.6 Hz, 3H), 4.74 (s, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 192.92, 167.36, 166.46, 148.56, 144.93, 133.47, 132.79, 130.37, 127.17, 127.00, 126.34, 122.99, 119.15, 45.18, 30.73.

MS (ESI⁻) *m/z* 646.0 [M-H]⁻.

HRMS (ESI⁻) calcd for C₃₀H₂₀N₃O₆S₄ 646.0235, found 646.0267.

TP-3Rho:



Chemical Formula: C₃₆H₂₄N₄O₉S₆
Molecular Weight: 848.99

According to the same procedure as for TP-2Rho, 4,4',4''-trisformyltriphenylamine (40 mg, 0.12 mmol), rhodanine-3-acetic acid (69 mg, 3.1 eq) and ammonium acetate (72 mg) afforded 70 mg (69%) of the expected product.

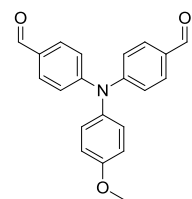
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.79 (s, 3H), 7.66 (d, *J* = 8.1, 6H), 7.25 (d, *J* = 8.1, 6H), 4.60 (s, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 192.93, 167.34, 166.45, 147.73, 132.90, 128.64, 124.86, 120.17, 45.16, 30.73.

MS (ESI⁻) *m/z* 847.3 [M-H]⁻

HRMS (ESI⁻) calcd for C₃₆H₂₂N₄O₉S₆ 845.9711, found 845.9730

4-((4-methoxyphenyl)(4-benzaldehyde)amino)benzaldehyde 12:



Chemical Formula: C₂₁H₁₇NO₃
Molecular Weight: 331.36

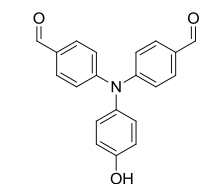
POCl₃ (10 mL, 16.7 g, 109 mmol, 15 eq) was added dropwise over 15 min to 9 mL DMF (7.9 g, 109 mmol, 15 eq) at 0°C under Ar. The solution is stirred at 0°C for 1hr. 4-methoxytriphenylamine (2 g, 7.26 mmol) is added and the solution is stirred at 95°C for 4h30. The dark mixture is poured into an ice bath and stirred for 30min. The solution is basified with NaOH 1M. The aqueous phase is extracted with DCM and the organic phase is washed twice with water dried over MgSO₄ and evaporated to give a black oil.

Purification by flash chromatography using combiflash (AcOEt:Cyclohexane 10:80 to 70:30) affords 1.72 g (5.19 mmol, 72%).

CAS number [149676-16-4]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.87 (s, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 7.16 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H), 7.11 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.94 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H).

4-((4-hydroxyphenyl)(4-benzaldehyde)amino)benzaldehyde 13:



Chemical Formula: C₂₀H₁₅NO₃
Molecular Weight: 317.34

BBr₃ (1.5 mL, 3.98 g, 15.87 mmol, 3.5 eq) was added dropwise to a solution of **12** in 20 mL of DCM at 0°C. The reaction is then left to warm slowly to r.t. and stirred for 3 hrs. The solution turns from yellow to dark. The mixture is then slowly poured into an ice bath. The aqueous phase is extracted with DCM twice. The combined organic phases are washed with water twice, dried over MgSO₄ and evaporated to give 1.5 g of a green

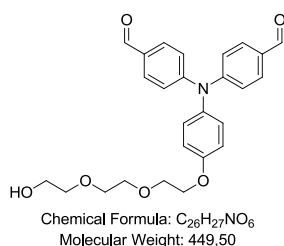
foamy solid.

Purification by flash chromatography using Combiflash (AcOEt:cyclohexane 10:90 to 60:40) afforded 1.4 g (4.412 mmol, 97%) of the title compound as a yellow solid.

CAS number [336619-78-4]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.88 (s, 2H), 7.76 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.17 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.07 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 8.7 Hz, 2H).

4-((4-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)(4-benzaldehyde)amino)benzaldehyde 14:

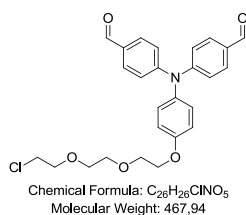


Chloro-triethylene glycol (0.025mL, 29.2 mg, 0.173 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of **13** (50 mg, 0.158 mmol) and K₂CO₃ (23.95 mg, 0.173 mmol, 1.1 eq) in anhydrous DMF under argon. The reaction was stirred at 150°C for 24hrs. DCM is added to the solution and the organic layer is washed five times with brine. Organic phase is dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford 57 mg (0.123 mmol, 78%) of the title compound as a yellow oily solid pure with only traces of the starting triethyleneglycol.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.88 (s, 2H), 7.76 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.16 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.10 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.20 – 4.12 (m, 2H), 3.94 – 3.86 (m, 2H), 3.80 – 3.57 (m, 8H).

MS (ES⁺): m/z 472.2 [M+Na]⁺.

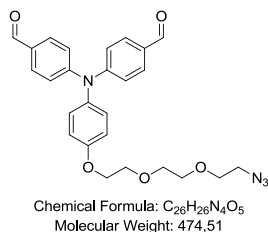
4-((4-(2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)(4-benzaldehyde)amino)benzaldehyde 15:



13 (110 g, 0.347 mmol) and dichloro-triethyleneglycol (0.060 mL, 71.3 mg, 0.381 mmol, 1.1 eq) were dissolved in anhydrous DMF under argon and the solution was stirred at 60°C overnight. DCM is added to the solution and the organic layer is washed once with water and thrice with brine. Organic phase is dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford 89 mg (0.190 mmol, 55 %) of the expected compound.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.88 (s, 2H), 7.76 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.16 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 7.11 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.22 – 4.10 (m, 2H), 3.94 – 3.86 (m, 2H), 3.83 – 3.57 (m, 8H).

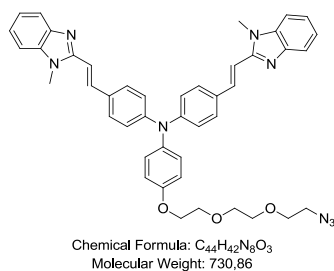
MS (ES⁺): m/z 467 [M+H]⁺, 490 [M+Na]⁺.

4-((4-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)(4-benzaldehyde)amino)benzaldehyde **16:**

Sodium azide (40.8 mg, 0.628 mmol) and a pinch of sodium iodide were added to a solution of **15** (98 mg, 0.209 mmol) in anhydrous DMF under argon. The solution was stirred overnight at 70°C. Ethyl acetate was added to the reaction and the organic layer was washed with brine five times. Solvent was evaporated to afford 86 mg (0.181 mmol, 87%) of the title compound.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.87 (s, 2H), 7.86 – 7.55 (m, 4H), 7.16 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 7.10 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.19 – 4.13 (m, 2H), 3.94 – 3.84 (m, 2H), 3.79 – 3.74 (m, 2H), 3.73 – 3.66 (m, 4H), 3.43 – 3.36 (m, 2H).

MS (ES^+): m/z 497.2 $[M+Na]^+$.

TPn-2Bzim-TriEG-N₃:

Compound **16** (50 mg, 0.105 mmol) was dissolved in a 1:1 mixture of EtOH and THF (5 mL total volume). Phosphonium salt **4** (103 mg, 0.232 mmol, 2.2 eq) and DBU (0.08 mL, 80 mg, 0.527 mmol, 5 eq) were added to form a homogenous yellow solution. The reaction was stirred overnight at r.t.

Reaction mixture was concentrated under vacuum and the residue was dissolved in ethyl acetate and washed with brine. Solvent was evaporated to

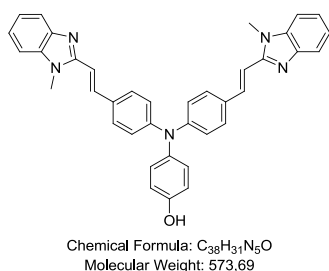
yield a yellow oil.

Purification by flash chromatography (50:50 Ac:Cy + 1% Et_3N) affords 46 mg (0.063 mmol, 60%) of the expected product as a yellow solid.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.92 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.79 – 7.62 (m, 4H), 7.49 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.38 – 7.20 (m, 4H), 7.12 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 6.98 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 6.91 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.18 – 4.13 (m, 2H), 3.92 – 3.87 (m, 2H), 3.86 (s, 6H), 3.79 – 3.74 (m, 2H), 3.73 – 3.67 (m, 4H), 3.40 (t, J = 5.1 Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 151.5, 148.2, 143.1, 139.6, 136.8, 136.0, 129.9, 128.3, 128.0, 122.7, 122.4, 119.1, 115.8, 110.8, 109.1, 70.8, 70.1, 69.9, 67.7, 50.7, 29.8.

MS (ES^+): m/z 731 $[M+H]^+$, 753 $[M+Na]^+$, 703 $[M-N_2]^+$.

4-(bis(4-((E)-2-(1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)vinyl)phenyl)amino)phenol, TPn-2Bzim-OH:

The phosphonium salt **4** (10.11 g, 22.81 mmol, 2 eq) was added to a mixture of THF and EtOH (1:1 50 mL) to form a yellow suspension. DBU (8.60 mL, 8.68 g, 57 mmol, 5 eq) was then added and the suspension dissolved to form an orange solution. The dialdehyde **13** (3.62 g, 11.41 mmol) in solution in

THF:EtOH (1:1 20 mL) was then added and the reaction turned to dark red. The solution was stirred at rt overnight and a yellow solid precipitated. The precipitate was filtered to yield 2.802 g of the expected product. The filtrate was concentrated under vacuum to approx. 10 mL and, after addition of pentane and ether, an additional 1.76 g of solid was retrieved by filtration, to afford a total 4.56 g of title compound (7.94 mmol, 70%).

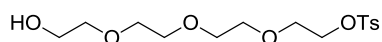
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.76 (d, *J* = 15.7 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.58 – 7.47 (m, 4H), 7.31 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H), 7.22 – 7.14 (m, 4H), 7.00 (dd, *J* = 8.7, 3.2 Hz, 4H), 6.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.89 (s, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156.0, 151.8, 148.1, 143.3, 137.5, 136.5, 136.0, 130.1, 129.3, 129.1, 128.8, 122.4, 122.3, 118.7, 117.1, 112.6, 110.4, 56.5, 30.0, 19.0.

MS (ES⁺): *m/z* = 574 [M+H]⁺.

HPLC: *R*_t = 6.10 min. 98/2 (0 min) – 80/20 (2 min) – 0/100 (12 min).

2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate **18**:



Chemical Formula: C₁₅H₂₄O₇S
Molecular Weight: 348,41

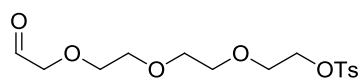
Tetraethylene glycol (89 mL, 100.1 g, 515 mmol) was added to solution of 300 mL of DMF and 21 mL of triethylamine (0.3 eq). The solution was cooled to 0°C and *p*-toluenesulfonyl chloride (20 g, 0.105 mmol, 0.2 eq) in solution in DCM (50 mL) was added dropwise. After 2h stirring at rt, the mixture was diluted with 400 mL HCl 1N and extracted with DCM. The organic layer was washed thrice with saturated NaHCO₃, dried over MgSO₄ and evaporated to give 26 g of crude product.

Purification by flash chromatography (Cyclohexane:AcOEt 80:20) afforded 17.9 g (0.51 mmol, 10%) of the title compound as a colorless oil.

CAS number [77544-60-6]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.19 – 4.14 (m, 2H), 3.77 – 3.56 (m, 14H), 2.45 (s, 3H).

2-(2-(2-(2-oxoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate:



Chemical Formula: C₁₅H₂₂O₇S
Molecular Weight: 346,40

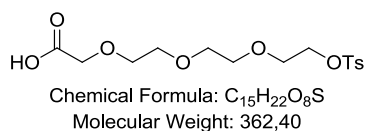
Compound **18** (3 g, 8.6 mmol) was added to a solution IBX (4.82 g, 17.2 mmol, 2 eq) in 50 mL of DMSO. The resulting colorless solution was stirred overnight at rt.

Iced water was added and to form a precipitate which was filtered. The solution was then extracted with twice DCM and the organic layer washed with water five times to afford 1.825 g of the expected compound. Product was used in the next step without further purification.

CAS number [302352-43-8]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.72 (s, 1H), 7.80 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.25 – 4.07 (m, 4H), 3.78 – 3.50 (m, 12H), 2.45 (s, 3H).

2-(2-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)acetic acid 19:



The aldehyde (1.825 g, 5.27 mmol) in solution in 5 mL acetonitrile was added to a solution of NaH₂PO₄ (193 mg, 1.40 mmol, 0.267 eq) and H₂O₂ (35% water) (535 μL, 5.42 mmol, 1.03 eq) in 3 mL H₂O at 10°C. NaClO₂ (841 mg, 7.43 mmol, 1.41 eq) in solution in 6 mL H₂O was added dropwise and the reaction mixture turned yellow. After 1h stirring at 10°C, 200 mL of HCl and 400 mL of diethyl ether were added. The aqueous phase was extracted twice with ether and the combined organic layers were dried over MgSO₄ and evaporated to afford 1.697 g (4.68 mmol, 89%) of the title compound pure.

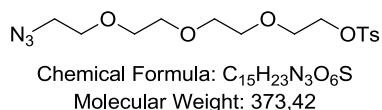
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.31 – 4.07 (m, 4H), 3.82 – 3.52 (m, 10H), 2.45 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 173.2, 144.9, 132.7, 129.8, 127.9, 71.0, 70.4, 70.3, 70.2, 69.3, 68.6, 68.4, 21.6.

MS (ES⁺): 363.3 [M+H]⁺, 385.3 [M+Na]⁺.

MS (ES⁻): 361.3 [M-H]⁻.

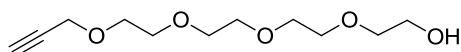
2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate 20:



Compound **18** (2 g, 5.74 mmol), NaN₃ (700 mg, 10.8 mmol, 1.88 eq) and NaHCO₃ (800 mg, 9.5 mmol, 1.66 eq) were mixed in 20 mL of DCM. After 2h of stirring at 80°C, the reaction was concentrated under vacuum and the residue taken up in 100 mL of water. The aqueous solution was extracted thrice with DCM and the combined organic layer were dried over MgSO₄ and evaporated to yield 1.254 g (5.74 mmol theoretically) of a colorless oil. The raw product and triethylamine (1.2 mL, 8.61 mmol, 1.5 eq) were dissolved in DCM at 0°C. p-toluenesulfonyl chloride (1.31 g, 6.88 mmol, 1.2 eq) in solution in DCM was added and the reaction was stirred at rt overnight. Water was added to the mixture and the solution was extracted thrice with DCM to afford 1.394 g (3.73 mmol, 65%) of the expected product.

CAS number [168640-82-2]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 4.21 – 4.09 (m, 2H), 3.77 – 3.52 (m, 14H), 3.43 – 3.32 (m, 2H), 2.45 (s, 3H).

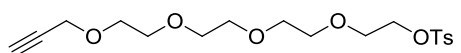
3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn-1-ol **21:**

Chemical Formula: C₁₁H₂₀O₅
Molecular Weight: 232,27

NaH (60% in mineral oil) (412 mg, 10.30 mmol, 1 eq) was added to a solution of tetraethylene glycol (1.78 mL, 10.3 mmol) in 20 mL of THF at 0°C. After 15 min of stirring, propargyl bromide (1.22 mL, 1.68 g, 11.33 mmol, 1.1 eq) was added slowly and the mixture was stirred at 0°C for 2h. The solvent was evaporated under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography (elution with pure ethyl acetate) to give 1.32 g (5.65 mmol, 55%) of the expected product as a colorless oil.

CAS number [87450-10-0]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.16 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.65 – 3.61 (m, 14H), 3.56 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 2.75 (br. s, 1H), 2.40 (t, J = 2.4 Hz, 1H).

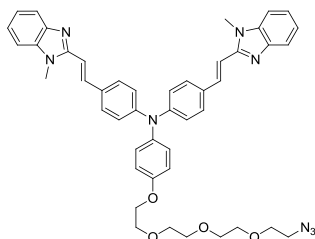
3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate **22:**

Chemical Formula: C₁₈H₂₆O₇S
Molecular Weight: 386,46

p-Toluenesulfonyl chloride (1.724 g, 9.04 mmol, 1.6 eq) and DMAP (0.041 g, 0.339 mmol, 6 mol%) were added to a solution of **21** (1.31 g, 5.65 mmol) in a 1:1 pyridine:dichloromethane mixture (6 + 6 mL). After 5h of stirring at rt, the solution was poured into iced water (25 mL) and the aqueous phase was extracted thrice with DCM. The combined organic layers were washed with saturated NH₄Cl and brine, dried over MgSO₄ and evaporated to afford a yellow oil. The crude product was purified by flash chromatography (AcOEt:hexane 3:1) to yield 1.31 g (3.39 mmol, 60%) of the expected compound as a colorless oil.

CAS number [875770-32-4]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.26 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.19 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.16 (t, J = 7.8 Hz, 2 H), 3.70 – 3.55 (m, 14H), 2.54 (s, 3H), 2.4 (t, J = 2.4 Hz, 1H).

TPn-2Bzim-TEG-N₃:

Chemical Formula: C₄₆H₄₈N₈O₄
Molecular Weight: 774,91

TPn-2Bzim-OH (150 mg, 0.261 mmol) and K₂CO₃ (72.3 mg, 0.523 mmol, 2 eq) were placed in a flask flushed with argon. 10 mL of anhydrous DMF were then added to form a yellow solution. After 15 min stirring compound **20** (219 mg, 0.586 mmol, 2.2 eq) in solution in anhydrous DMF was added and the reaction was stirred at 60°C overnight. After cooling to rt, AcOEt was added to the reaction which was then washed with brine. Organic phase was dried and evaporated to give a yellow oil. Raw product was purified by flash chromatography using companion (DCM/EtOH 99/1---97/3) to afford 127 mg (0.164 mmol, 63%) of the expected product as a yellow oil.

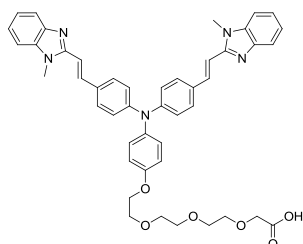
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.91 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.78 – 7.72 (m, 2H), 7.48 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.34 – 7.22 (m, 6H), 7.11 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 6.97 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 6.91 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.16 – 4.12 (m, 2H), 3.92 – 3.85 (m, 2H), 3.84 (s, 6H), 3.77 – 3.65 (m, 10H), 3.43 – 3.35 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 156.2, 151.5, 148.2, 143.2, 139.6, 136.7, 136.0, 129.9, 128.3, 128.0, 122.7, 122.6, 122.4, 119.1, 115.8, 110.8, 109.1, 70.9, 70.7, 70.7, 70.1, 69.7, 67.7, 50.7, 29.7.

MS (ES⁺): m/z = 775 [M+H]⁺, 797 [M+Na]⁺.

HPLC: Rt = 9.59 (97%). 98/2 (0 min) – 0/100 (20 min).

TPn-2Bzim-TEG-COOH:



Chemical Formula: C₄₆H₄₅N₅O₆
Molecular Weight: 763.88

TPn-2Bzim-OH (200 mg, 0.349 mmol) and 30 mg of sodium hydride (60% in mineral oil) were added to 8 mL of anhydrous DMF in a sealed tube under argon. Compound **19** (152 mg, 0.418 mmol, 1.2 eq) and 20 mg of NaH were added to 3 mL of DMF in a cone flask under argon. After 30 min stirring at rt, both solution were combined in the sealed tube to form a dark red solution and stirred overnight at 60°C. After cooling to rt, DCM was added to the mixture and the reaction was quenched by washing with a saturated NH₄Cl solution. Organic phase was concentrated under vacuum to give a red oil in the remaining DMF and ether was added to precipitate the product. Filtration under vacuum afforded 209 mg (0.274 mmol, 78%) of the expected product as an orange powder.

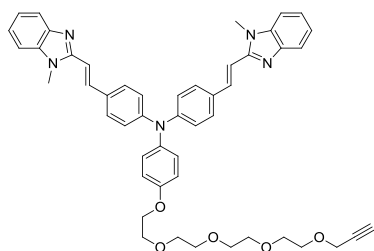
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.76 (d, J = 15.0 Hz, 2H), 7.72 – 7.64 (m, 4H), 7.60 – 7.47 (m, 4H), 7.33 (d, J = 15.9 Hz, 2H), 7.23 – 7.13 (m, 5H), 7.10 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 8.2 Hz, 5H), 4.14 – 4.06 (m, 2H), 3.99 – 3.93 (m, 2H), 3.89 (s, 6H), 3.78 – 3.71 (m, 2H), 3.64 – 3.47 (m, 8H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.8, 151.75, 148.0, 147.9, 143.3, 139.4, 136.5, 135.9, 130.4, 129.2, 128.3, 122.6, 122.4, 122.2, 118.7, 116.3, 112.8, 110.5, 70.4, 70.2, 70.0, 69.4, 67.8, 36.3, 31.2, 30.0.

MS (ES⁺): m/z 382.7 [M+2H]²⁺, 353.7 [M-CH₂COOH + 2H]₂⁺, 580.4 [M-O(CH₂CH₂O)₃CH₂COOH + H]⁺.

HPLC: Rt = 5.46 min (90%). 95/5 (0 min) – 0/100 (10 min).

TPn-2Bzim-TEG-Alcyne:



Chemical Formula: C₄₉H₄₉N₅O₅
Molecular Weight: 787.94

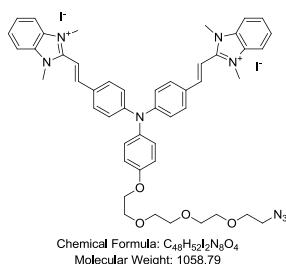
A solution of Compound **22** (404 mg, 1.046 mmol, 1.5 eq) and NaH (30 mg) in 3.5 mL of DMF was added to a solution of **TPn-2Bzim-OH** (400 mg, 0.697 mmol) and NaH (40 mg) under argon. The reaction was stirred at 60°C overnight. The product was extracted with AcOEt and washed with brine to remove the DMF. Purification by flash chromatography (AcOEt:Cyclohexane 2:8 to 7:3) afforded 275 mg (0.349 mmol, 50%) of the expected product.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.77 – 7.72 (m, 2H), 7.48 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 7.32 – 7.21 (m, 6H), 7.10 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 6.96 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.19 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.16 – 4.11 (m, 2H), 3.90 – 3.84 (m, 2H), 3.82 (s, 6H), 3.77 – 3.62 (m, 13H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 156.2, 151.5, 148.2, 143.1, 139.6, 136.7, 136.0, 129.9, 128.3, 128.0, 122.6, 122.5, 122.3, 119.1, 115.8, 110.8, 109.1, 79.7, 74.6, 70.8, 70.6, 70.4, 69.7, 69.1, 67.7, 58.4, 29.7.

MS (ES+): m/z = 788.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 810.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

TP-2Bzim-TEG- N_3 :



1 mL of MeI was added to a solution of **TPn-2Bzim-TEG- N_3** (100 mg, 0.129 mmol) in 5 mL of DMF in a sealed tube. The solution was stirred at 60°C for 6 hours. After cooling to rt, ether was added to the solution and a red precipitate formed. The solid was filtered under vacuum to afford 103 mg (0.097 mmol, 75%) of the expected product as a red solid.

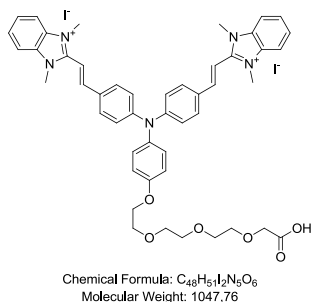
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.94 – 7.79 (m, 4H), 7.78 – 7.69 (m, 4H), 7.63 – 7.52 (m, 4H), 7.44 (d, J = 16.5 Hz, 2H), 7.03 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 6.99 – 6.87 (m, 4H), 4.30 – 4.09 (m, 14H), 3.87 (s, 2H), 3.79 – 3.61 (m, 10H), 3.42 – 3.35 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 157.0, 149.9, 149.0, 147.7, 138.4, 132.1, 130.8, 128.5, 127.9, 127.1, 122.4, 116.2, 112.7, 104.5, 70.6, 70.0, 69.7, 67.9, 50.7, 34.7, 34.6.

MS (ES+): m/z 402.3 $[\text{M}-2\text{I}]^{2+}$, 388.2 $[\text{M}-\text{N}_2-2\text{I}]^{2+}$.

HPLC: R_t = 5.69 min. 95/5 (0 min) – 0/100 (10 min).

TP-2Bzim-TEG-COOH:



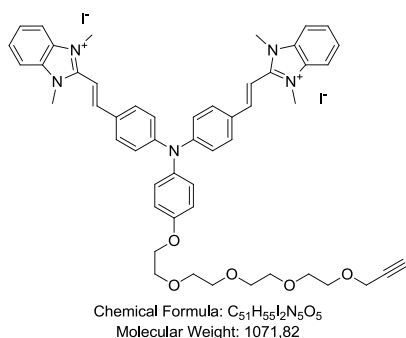
According to the same procedure, 100 mg of **TPn-2Bzim-TEG-COOH** (0.131 mmol) afforded 130 mg (0.124 mmol, 95%) of the title compound as a red solid.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.08 – 7.98 (m, 4H), 7.86 (d, J = 7.6 Hz, 4H), 7.76 (d, J = 16.8 Hz, 2H), 7.71 – 7.61 (m, 4H), 7.39 (d, J = 16.9 Hz, 2H), 7.26 – 7.19 (m, 2H), 7.17 – 6.99 (m, 8H), 4.12 (s, 14H), 4.01 (s, 2H), 3.83 – 3.69 (m, 2H), 3.65 – 3.45 (m, 8H).

MS (ES+): m/z 396 $[\text{M}-2\text{I}]^{2+}$, 407.7 $[\text{M}-2\text{I}+\text{Na}]^{2+}$.

HPLC: R_t = 5.35 min. 95/5 (0 min) – 0/100 (10 min).

TP-2Bzim-TEG-alcyne:



According to the same procedure, 123 mg of **TPn-2Bzim-TEG-alcyne** (0.156 mmol) afforded 129 mg (0.121 mmol, 77%) of the title compound as a red solid.

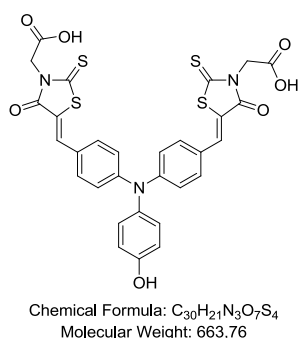
¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 8.06 – 7.84 (m, 5H), 7.84 – 7.56 (m, 9H), 7.43 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 7.26 – 7.03 (m, 6H), 7.02 – 6.89 (m, 2H), 4.22 (s, 16H), 3.97 – 3.77 (m, 2H), 3.77 – 3.49 (m, 12H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 156.9, 149.8, 149.1, 147.7, 138.4, 132.1, 130.9, 128.5, 128.0, 127.0, 122.4, 116.1, 112.6, 104.6, 79.6, 74.8, 70.5, 70.4, 69.7, 69.1, 67.9, 58.4, 34.7, 34.7.

MS (ES+): m/z 408.8 $[M-2I]^{-2+}$.

HPLC: R_t = 11.69 min (95%). 95/5 (0 min) – 78/22 (5 min) – 61/39 (10 min) – 45/55 (15 min) – 0/100(20 min).

TP-2Rho-OH:



Compound **13** (1.4g, 4.41 mmol) in solution in acetic acid (10 ml) was added to a solution of rhodanine-3-acetic acid (1.86 g, 9.71 mmol, 2.2 eq) and NH_4OAc (1.36 g, 17.7, 4 eq) in acetic acid (30 ml). The solution rapidly turned to red and was heated at reflux (117°C) for 15h. After cooling to rt, the precipitate formed was filtered under vacuum to afford 2.495 g (3.71 mmol, 84%) of the expected product.

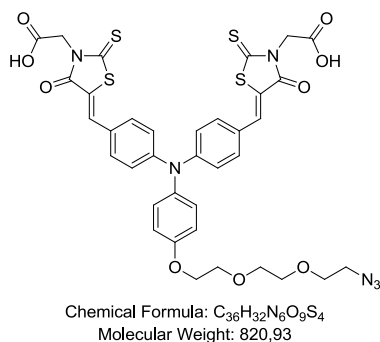
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.72 (s, 2H), 7.56 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.10 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 7.03 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.48 (s, 4H).

MS (ES⁺): m/z 664.4 [M+H]⁺, 686.3 [M+Na]⁺.

MS (ES⁻): m/z 662.4 [M-H]⁻.

HPLC: $R_t = 16.39$ min. 98/2 (0 min) – 0/100 (20 min).

TP-2Rho-TriEG-N₃:



Compound **16** (83 mg, 0.175 mmol) was added to a solution of rhodanine acetic acid (74 mg, 0.385 mmol, 2 eq) and NH_4OAc (54 mg, 0.700 mmol, 4 eq) in 30 mL of acetic acid. The resulting yellow solution was heated at 117°C and rapidly turned red. After 4 hrs of stirring, the reaction mixture was cooled to rt and concentrated under vacuum until approx. 10 ml of acetic acid remained. Ether was added to the solution and a dark red sticky precipitate formed. The solid was filtered, washed with ether and

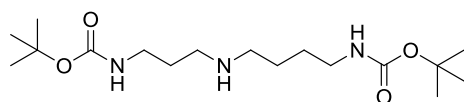
dried to afford 100 mg (0.122 mmol, 70%) of the expected product as a dark red powder.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.68 (s, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 4H), 7.23 – 6.97 (m, 8H), 4.30 (s, 4H), 4.17 – 4.03 (m, 2H), 3.79 – 3.70 (m, 2H), 3.70 – 3.47 (m, 6H), 3.38 (s, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 192.8, 172.2, 167.0, 166.9, 156.9, 148.4, 137.5, 132.4, 131.9, 128.9, 126.9, 122.2, 119.9, 116.1, 69.9, 69.7, 69.2, 68.9, 67.4, 50.0, 47.9, 21.3.

MS (ES⁺): *m/z* 843.6 [M+Na]⁺.

***N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylspermidine 23:**



Chemical Formula: C₁₇H₃₅N₃O₄
Molecular Weight: 345,48

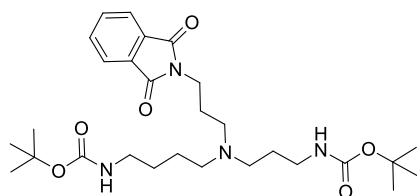
Triethylamine (2.66 mL, 1.933 g, 19.11 mmol, 3 eq) was added to a solution of spermidine (1 mL, 0.925 g, 6.37 mmol) in THF (15 mL) cooled in an ice bath. Boc-ON (3.14 g, 12.74 mmol, 2 eq) in solution in THF (10 mL) was then added dropwise and the reaction

was run at room temperature overnight. THF was then evaporated and the residue was dissolved in 40 mL DCM washed with an aqueous solution of 1% NaOH. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and evaporated.

Crude product was purified by flash chromatography: eluent DCM + 0.5% NH₄OH to remove byproducts and then EtOH + 0.5% NH₄OH to retrieve the expected product as a colorless oil (1.2 g, 54%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.16 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 3.25 – 3.03 (m, 4H), 2.64 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.58 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.63 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.55 – 1.47 (m, 4H), 1.42 (s, 18H).

***N*⁴-(4-phthalimidobutyl)-*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylspermidine 24:**



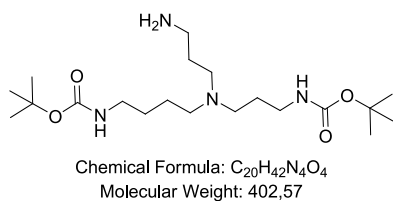
Chemical Formula: C₂₈H₄₄N₄O₆
Molecular Weight: 532,67

Compound **23** (1.1 g, 3.18 mmol), N-(3-bromopropyl)phthalimide (1.067 g, 3.98 mmol, 1.25 eq) and K₂CO₃ (2.2 g, 15.92 mmol, 5 eq) were dissolved in acetonitrile (25 mL) and the solution was stirred at reflux overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum and the residue dissolved in DCM. The solution was then washed with a saturated NaHCO₃ solution (2*100 mL), dried, filtered

and evaporated. Crude product was purified by flash chromatography (pure DCM, then DCM/EtOH 93/7) to afford the expected product (1.3 g, 77%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.85 (dd, *J* = 5.4, 3.1 Hz, 2H), 7.73 (dd, *J* = 5.4, 3.1 Hz, 2H), 5.54 (s, 1H), 5.09 (s, 1H), 3.80 – 3.58 (m, 4H), 3.28 – 3.02 (m, 4H), 2.57 – 2.29 (m, 6H), 1.82 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.62 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.44 (s, 18H).

***N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylspermidine 25:**

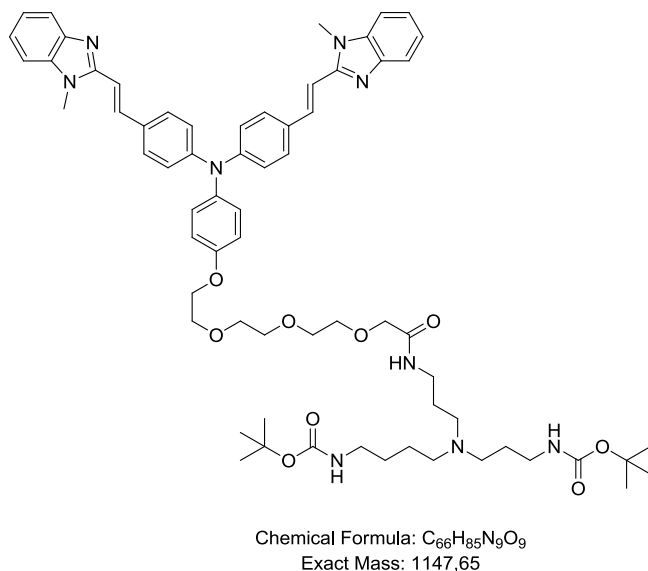


Hydrazine monohydrate (0.119 ml, 0.122 g, 2.441 mmol, 1 eq) was added to a solution of **24** (1.3 g, 2.441 mmol) in a THF/EtOH mixture (11 ml/2.75 ml) and the reaction was stirred at 90°C for 5 h. The solvent was evaporated, and the residue dissolved in DCM. The resulting solution was washed with a solution of 1M NaOH and with water and was then

dried, filtered and evaporated.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.53 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 3.08 – 2.83 (m, 4H), 2.65 – 2.42 (m, 4H), 2.40 – 2.12 (m, 6H), 1.45 (dd, *J* = 13.4, 6.7 Hz, 4H), 1.39 – 1.13 (m, 20H).

TP*n*-2Bzim-Spmd:



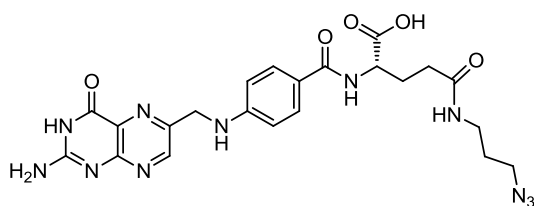
TPn-2Bzim-TEG-COOH (85 mg, 0.111 mmol), DCC (25.3 mg, 0.122 mmol, 1.1 eq) and HOBT (18.74 mg, 0.122 mmol, 1.1 eq) were placed in a flask and flushed with argon. 10 mL of anhydrous DMF were then added and the reaction was stirred for 10 min at room temperature. Compound **25** in solution in 5 mL DMF was then added and the reaction was stirred for 18h at rt. Crude product was then purified by preparative TLC (DCM/EtOH 85/15) to afford the expected product with a 41% yield.

¹H NMR (300 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.76 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H), 7.65 – 7.46 (m, 6H), 7.35 – 7.28 (m, 2H), 7.19 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H), 7.07 (dd, *J* = 6.0, 3.1 Hz, 4H), 7.00 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 6.88 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.11 – 3.96 (m, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.76 – 3.69 (m, 2H), 3.66 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.63 – 3.50 (m, 10H), 3.09 – 2.89 (m, 4H), 2.65 (s, 6H), 2.35 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.70 (d, *J* = 5.3 Hz, 4H), 1.48 (d, *J* = 13.8 Hz, 2H), 1.44 – 1.34 (m, 2H), 1.25 (s, 18H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 169.4, 156.3, 156.0, 151.8, 148.0, 143.3, 139.4, 136.5, 135.9, 132.5, 130.4, 129.1, 128.3, 122.6, 122.4, 122.2, 118.7, 116.2, 112.8, 110.4, 77.8, 70.7, 70.5, 70.3, 70.1, 69.4, 67.8, 55.4, 53.4, 51.6, 51.4, 40.8, 40.5, 40.3, 40.0, 39.7, 39.4, 39.1, 37.2, 30.0, 28.7, 27.8, 23.9.

MS (ES^+): m/z 1149.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1171.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HPLC: R_t = 9.02 min (80%). Gradient: 98/2 (0 min) - 0/100 (20 min)

γ -azidopropyl folic amide 26:

Chemical Formula: $C_{22}H_{25}N_{11}O_5$
Molecular Weight: 523,50

Voie 1:

Azidopropylamine (0.230 g, 2.3 mmol, 1 eq), DCC (1.186 g, 5.75 mmol, 2.5 eq) and pyridine (4.5 mL, 4.40 g, 55.6 mmol, 25 eq) were added to a solution of folic acid (1.0 g, 2.3 mmol) in DMSO (9 mL). The mixture was stirred at RT for 24 hours. The DCC urea precipitated and was filtered off. Addition of ether to the filtrate caused the precipitation of the crude product which was retrieved by filtration.

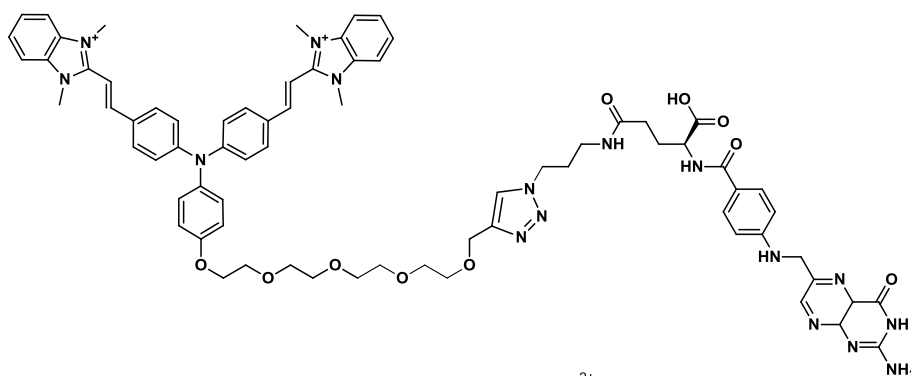
Voie 2:

Folic acid (500 mg, 1.128 mmol, 1 eq) was dissolved in 6 mL of DMF and 236 μ L of triethylamine. The solution was cooled to 0°C and 361 mg of HBTU were added (1.128 mmol, 1eq), the reaction mixture was stirred for 1 h at 0°C. 113 mg of azidopropylamine (1.128 mmol, 1 eq) were added at 0°C, the reaction was stirred at 0°C for 1 h and allowed to warm to rt for an additional hour. Reaction was concentrated under vacuum and the crude product was precipitated with ether to afford a mixture of the starting material, the mono and the disubstituted products.

CAS number [1185275-89-1]

MS (ES^+): m/z 524.1 $[M+H]^+$.

HPLC: R_t = 7.28 min. 95/5 (0 min) – 78/22 (5 min) – 61/39 (10 min) – 45/55 (15 min) – 0/100(20 min).

TP-2Bzim-FA:

Chemical Formula: $C_{73}H_{82}N_{16}O_{10}^{2+}$
Exact Mass: 1342,64

18.84 mg of **TP-2Bzim-TEG-alcyne** (0.018 mmol, 1.15 eq) and 8 mg of **24** (0.015 mmol, 1 eq) were dissolved in 1 ml of DMSO containing 10% of water. 5.35 mg of L-sodium ascorbate salt (0.031 mmol, 2 eq) and 1.463 mg of CuSO_4 (9.17 μmol , 0.6 eq) were added. The solution was stirred at RT for 6h. Other portions of CuSO_4 were added regularly till the disappearance of the azido folate. The reaction was diluted with 1 ml of MeOH and poured into cold Et_2O . The precipitate was filtered and washed with MeOH and Et_2O several times. The crude compound was dissolved in 0.5 ml of DMSO and a solution of EDTA disodium salt dihydrate in 0.2 M pH 7 phosphate buffer was added at 0 °C (it means 32 mg (6 eq) of EDTA_2Na in 0.5 ml pH7 phosphate buffer). The solution was stirred 5 h (overnight). The crude solution was filtered and washed with water, CH_2Cl_2 and Et_2O to give the desired compound as a red-orange powder.

Product not isolated.

MS (ES^+): m/z 670.3 $[\text{M}-\text{H}]^{2+}$.

HPLC: R_t = 10.52 min. 95/5 (0 min) – 78/22 (5 min) – 61/39 (10 min) – 45/55 (15 min) – 0/100 (20 min).

B. BIOPHYSICAL EXPERIMENTS

I. Samples preparation

Sodium cacodylate buffer was prepared by dissolving sodium cacodylate trihydrate (Sigma-Aldrich, USA) in milliQ water. pH was adjusted to 7.2 by with HCl or NaOH solutions.

Herring testes DNA was obtained from Sigma-Aldrich (USA). It was dissolved in milliQ water filtrated and titrated by UV-Vis absorption ($\epsilon_{260} = 12920 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Lyophilized oligonucleotides were purchased from Eurogentec (Belgium) and dissolved in milliQ water. For duplexes and quadruplexes, hybridization or folding were performed at a concentration of ca. 250 μM by heating the samples in milliQ water at 90°C for 5 min. Duplex were then slowly cooled to room temperature over a period of 12 hours while the quadruplexes were rapidly cooled in an ice bath. Concentrations were controlled after thermal denaturation of a 1/100 diluted solution by UV-Vis absorption using the supplier's calculated molar absorption coefficients.

Theoretical DNA thermodynamic properties and molar absorption coefficients were calculated using the online calculator at <http://biophysics.idtdna.com/>.

Human Serum Albumin (A3782, 99%, globulin free) was bought from Sigma-Aldrich (USA) and used without further purification. It was dissolved in 10 mM sodium cacodylate buffer pH 7.2 at a concentration of ca. 5 mg/mL^{-1} and stored at -20°C. The molar concentration of the solution was controlled by UV using the value $\text{DO} = 0.631 \text{ (HSA) for } 1 \text{ g.L}^{-1}$ and $M = 66500 \text{ Da}$.¹

After preparation, samples were stored at -4°C.

Stock solutions of fluorophores were prepared in DMSO, at concentrations varying from 1 to 5 mM, and stored at -20°C. When necessary, a preliminary dilution was performed before the experiments, so that the volume to be added in the working solution would not be below 1 μL . The total amount of DMSO in the working solutions did not exceed 1% in volume.

¹ Dufour, C.; Dangles, O. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2005**, 1721, 164–73.

II. Optical spectroscopies

Measurements were performed in 1 or 3 mL Hellma® quartz cuvettes (material code QS blue, 200-2000 nm). UV-vis experiments were monitored on a Uvikon XL (Secomam, France) UV spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded on a FluoroMax-3 (Jobin Yvon), at room temperature. Data were corrected with a blank and from the variations of the detector with the emitted wavelength. The CD spectra were recorded on a Jasco J-710 spectrometer thermostated at 22°C. All experiments were performed in 10 mM sodium cacodylate buffer pH 7.2 with a varying concentration of NaCl or KCl.

1. Quantum yield measurements

Fluorescence quantum yields were measured according to Williams comparative method¹ using rhodamine 101 in ethanol ($\Phi_F = 1$)² or quinine sulfate in 0.1M H₂SO₄ ($\Phi_F = 0.54$)³ as references. Absorption and fluorescence spectra were recorded for five solutions of increasing concentrations with an absorbance comprised between 0.01 and 0.1 to avoid reabsorption phenomenon. The reference is chosen so that both it and the sample can be excited at the same wavelength even if it is not the maximum of absorption. The fluorescence of the sample and the reference are then plotted versus their absorbance. The data should correlate linearly and after calculating the gradient of the curve, the fluorescence quantum yield is given by equation (1),

$$\Phi_x = \Phi_{\text{ref}} \frac{\text{grad}_x}{\text{grad}_{\text{ref}}} \frac{\eta_x^2}{\eta_{\text{ref}}^2} \quad (1)$$

where x stands for the sample, ref the reference, Φ the quantum yield and η the refractive index of the solvent.

2. Fluorimetric titrations

The variation of the fluorescence signal of a fluorophore solution of fixed concentration (1 μM or 0.25 μM) was monitored upon addition of increasing quantities of an oligonucleotide. A quick UV titration of the fluorophore by the oligonucleotide was first performed to determine the isobestic point when there is one. The excitation wavelength was then chosen so as to minimize the variation of the absorbance upon addition of DNA.

The titration curves were obtained by plotting F/F_0 versus the concentration of oligonucleotide, where F is the integrated fluorescence intensity of the oligonucleotide-dye complex and F_0 the initial integrated fluorescence intensity of the free dye. Data were analyzed using Graphpad Prism 5.0 software according to the mathematical model discussed in the first chapter of this manuscript.

¹ *Analyst* **1983**, 108, 1067

² *J. Phys. Chem.* **1980**, 84, 1871

³ *J. Phys. Chem.* **1961**, 65, 229

3. CD experiments

The spectrometer was first flushed with liquid nitrogen for 15 minutes. After verifying the absence of a CD signal for the free dyes, the CD spectra were recorded for a solution of DNA at a fixed concentration upon addition of the dyes. Each spectrum is the accumulation of four scans performed with a 1 nm step and a 200 nm/min scanning speed.

4. UV-melting

The temperature in the UV spectrometer was controlled by a peltier thermostat device.

Solutions of DNA and dyes were prepared in a 10 mM sodium cacodylate buffer with 20 mM of NaCl. The ionic force is chosen to have a theoretical melting temperature around 40°C. Each solution was degassed for 5 minutes in an ultrasound bath and centrifuged at 13 000 tr/min for 5 s.

The temperature was varied from 10°C to 90°C (0.2°C/min) and from 90°C to 10°C (0.5°C/min) and the absorption at 260 nm of each solution was measured every two minutes.

5. Two-photon absorption cross-section measurements (CEA, Saclay)¹

Two photon induced fluorescence measurements were performed at the CEA (Saclay) using an inverted microscope set-up coupled to a mode locked Ti-sapphire laser (Tsunami, Spectra Physics) delivering 100 fs pulses with a 76 MHz repetition rate over the spectral range covering 740 to 950 nm. The Ti-Saph excitation beam was focused in a cell filled with low concentration solutions using a 40x microscopic objective, the same objective being also used for the two-photon fluorescence signal collection. The signal is then sent either to a channel plate multiplier (Perkin Elmer MP-993-CL) or to a spectrometer coupled to a CCD camera (Andor DU401-BR-DD) for detailed study of the emission spectra. The laser beam was linearly polarized and a set of half-wave plate and polarizer was used to vary the fundamental beam intensity (700μW at the level of the sample). Excitation spectra were determined from measurements of the whole emitted light using a photomultiplier proceeded with filters cutting the fundamental beam (SemRock razor edge 785, stopline 785 and 808, FF735 and FF-01-750). The TPIF intensities of the samples were measured relative to a solution of fluorescein in water (pH= 13), the ratio of the fluorescent signals enabling further determination of the 2PA cross section (δ) assuming equal one- and two-photon fluorescence quantum yields.²

¹ Measurements carried out by Dr. Yara El Harfouch.

² M. A. Albota, C. Xu, and W. W. Webb, *Appl. Opt.*, 1998, **37**, 7352-6.

III. Molecular modeling¹

Ligand drawing, standardization (protonation state at physiological pH, aromatization, hydrogen treatment) and 3D generation were done with Chemaxon Marvin Beans.² Docking was performed with the Surflex-Dock engine of the Tripos SYBYL-X 2.0 suite.³ The modified GeomX mode was used throughout the calculations with the option *Allow DNA movement*: 6 additional starting conformations were generated, pre- and post-dock minimizations were performed, a maximum of 3 final poses were saved, with a minimum of 0.5 RMSD between poses. The spin alignment method was used, with an exhaustive accuracy (density of search 9.0) and 12 number of spins per alignment. A drewAT-like structure was build using SYBYL-X 2.0 (biopolymer builder module) and the binding site centered on the central AATT sequence was determined by protomol probes (CH₄ as a steric hydrophobic probe, NH as a hydrogen bond donor probe, C=O as a hydrogen bond acceptor probe). The docking results are ranked based on an empirical scoring function including hydrophobic, polar, repulsive, entropic, solvation and crash terms, and expressed in $-\log_{10}(K_d)$ units to represent binding affinities.⁴

¹ Experiments carried out by Dr. Nicolas Saettel.

² ChemAxon: Budapest, Hungary, **2010**.

³ 2.0 ed.; Tripos International: 1699 South Hanley Rd., St Louis, Missouri, 63144 USA, **2012**.

⁴ A. N. Jain *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 499.

C. CELL CULTURE AND CELLULAR IMAGING

I. Cell culture

HT29 cells were grown on coverslips at 37°C in monolayer cultures in complete DMEM (Gibco, Cergy Pontoise, France) with 10% FCS and antibiotics (100 mg/ml streptomycin and 100 mg/ml penicillin) under conditions of 100% humidity, 95% air and 5% CO₂ for 24 hours. Fixation and incubation with the dyes were then performed according to one of the two protocols thereafter.

Staining protocol 1 (incubation in live cells):

The cells were incubated for two hours with the desired compound. After washing twice with PBS, the cells were fixed by addition of 4% paraformaldehyde (Stabilized with methanol, Sigma-Aldrich, USA). After 10 minutes of reaction, the cells were washed twice with PBS and the paraformaldehyde was then neutralized by addition of 2 mL of a solution of NH₄Cl (1 mg/mL PBS) (wait 5 min, repeat twice). The cells were finally washed again twice with PBS.

Staining protocol 2 (incubation in fixed cells):

The cell were first fixed by addition of 4% paraformaldehyde (10 minutes of reaction) and washed twice with PBS. The paraformaldehyde was neutralized by addition of 2 mL of a solution of NH₄Cl (1 mg/mL PBS) (wait 5 min, repeat twice) and the cells were washed once with PBS. They were then incubated for 15 minutes with the desired compound and washed again twice with PBS.

Finally, the coverslips were mounted on microscope slides using Prolong Gold® antifade reagent (Invitrogen).

II. Cellular imaging (Institut Curie)

The fluorescence imaging (confocal and biphotonic) was performed using a confocal laser scanning microscope DMI 6000 with a SP5-AOBS unit (both Leica) equipped with a 63x (NA = 1.4) objective (oil immersion), an argon gas laser for one-photon excitation and a Chameleon Ti:Saph laser delivering pulses in the 100 to 200 fs range at an 80 MHz repetition rate with a tunability ranging from 705 to 980 nm for two-photon excitation.

Fluorescence Lifetime Imaging was performed on the same experimental setup by TCSPC (*time-correlated single-photon counting*) using two-photon excitation and a SPAD (*single photoavalanche diode*) detector with an acquisition time of 150 s.

III. Cellular imaging (ENS Cachan)¹

1. Cytotoxicity and phototoxicity assays

The cytotoxicity and phototoxicity were measured by MTT assay in two cell lines (HeLa and MCF-7 cells). For phototoxicity, cells were first illuminated with a mercury lamp (452 nm $\pm$ 45 nm filter, fluence 60 mW.cm⁻²). Irradiation times are detailed in figure legends.

2. Fluorescence imaging

One-photon epifluorescence and confocal images were obtained using a SP2 confocal microscope (Leica MicroSystem) equipped with an incubation chamber (37°C, CO₂ 5%). Excitation and emission filters for epifluorescence were 450-490 nm and 515-700 nm, respectively. A continuous laser line (458 nm) was used for excitation in the confocal mode (emission slit settings are specified in figure legends). A similar set up was used for two-photon images except that the excitation source was a 80-MHz mode-locked Mai Tai® Ti:Sapphire tunable laser (720-920 nm, 100 fs laser pulse; Spectra Physics, Mountain View, California) tuned to 860 nm. For each experiment, the total intensity (in mW/cm²) was measured using a power meter (Nova II / PD300-3W photodiode sensor or VEGA / 3A thermal head).

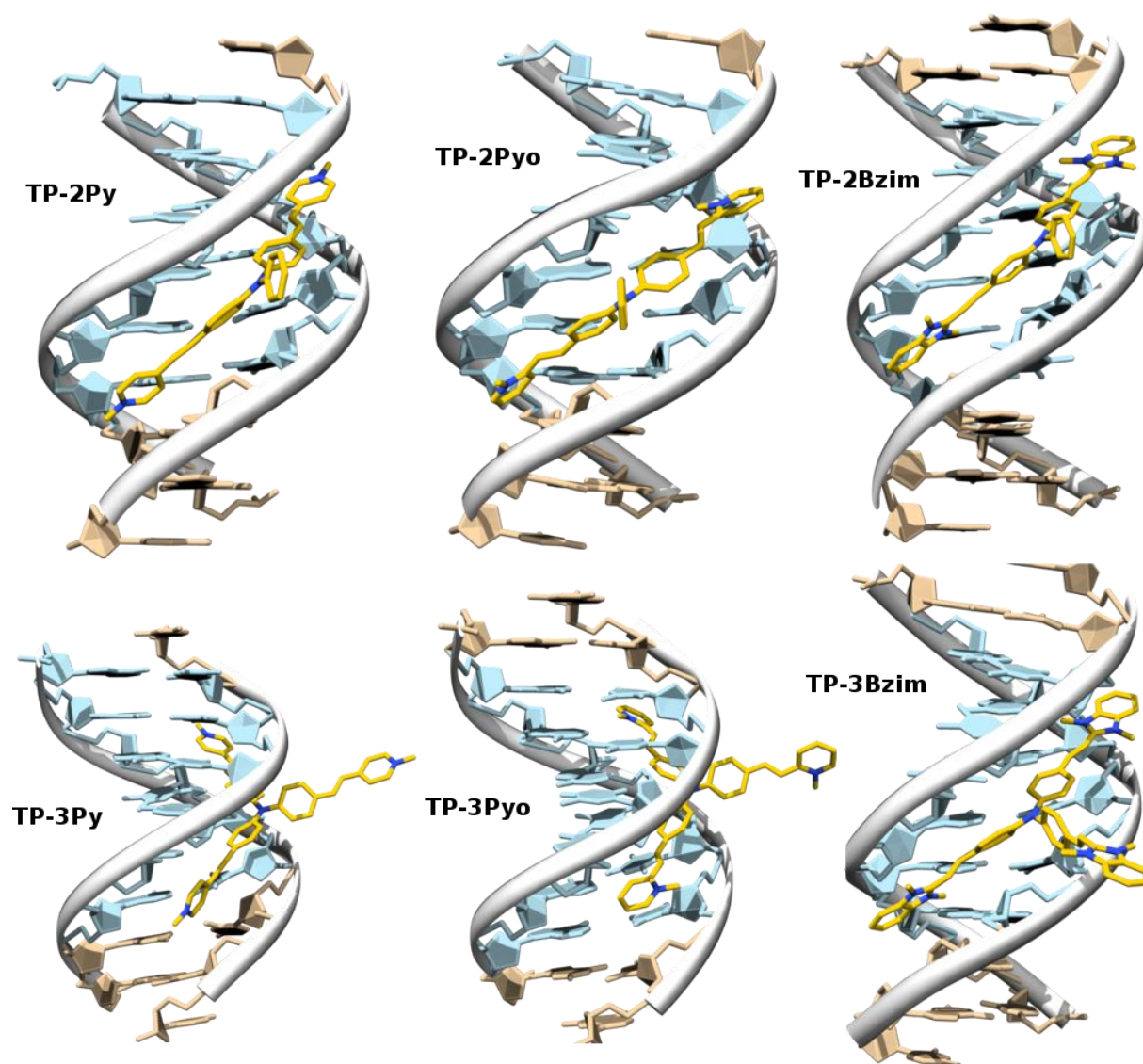
¹ Experiments carried out by Dr. Nathalie Gagey and Dr. Houcine Bougherara.

ANNEXES

A. MODELISATION DES COURBES DE TITRATIONS: RESULTATS DES CALCULS

	Substrat	Concentration (μM)	[NaCl] (μM)	K_d (μM)	R^2	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95%
TP-2Py	drewAT	0.25	400	0.8262	0.9983	0.02309	0.7775-0.8749
	ds26	0.25	400	2.874	0.9987	0.1060	2.645-3.103
	HSA	1	0	11.85	0.9989	0.5408	10.63-13.08
TP-3Py	drewAT	0.25	400	0.2350	0.9996	0.004516	0.2252-0.2447
	ds26	0.25	400	0.8428	0.9967	0.04021	0.7559-0.9296
TP-2Pyo	drewAT	0.25	400	1.208	0.9998	0.01164	1.003-1.052
	ds26	0.25	400	5.542	0.9995	0.1555	5.206-5.878
TP-3Pyo	drewAT	0.25	400	0.4255	0.9996	0.006156	0.4125- 0.4386
	ds26	0.25	400	1.536	0.9981	0.06112	1.404-1.668
TP-2Bzim	drewAT	0.25	400	0.08841	0.9994	0.002573	0.08293-0.09389
	ds26	0.25	400	1.029	0.9960	0.05434	0.9120-1.147
TP-3Bzim	drewAT	0.25	400	0.01353	0.9086	0.009187	0-0.03310
	ds26	0.25	400	0.3342	0.9727	0.04692	0.2429-0.4456
Cbz-2Py	drewAT	0.25	400	0.009747	0.9986	0.001444	0.006533-0.01296
	ds26	1	100	0.09435	0.9850	0.02890	0.03073-0.1580
	c-myc	1	100	0.1304	0.9553	0.05996	0-0.2623
	c-kit2	1	100	0.1829	0.9691	0.06170	0.04710-0.3187
	22AG	1	100	0.03810	0.9737	0.02753	0-0.1016
Cbz-3Py	drewAT	0.25	400	0.05796	0.9781	0.01145	0.03356-0.08235
	ds26	1	100	0.02281	0.9364	0.03103	0-0.09299
	c-myc	1	100	0.1976	0.9567	0.08017	0.01898-0.3762
	c-kit2	1	100	0.8973	0.9991	0.04340	0.8006-0.9940
	22AG	1	100	0.1789	0.9758	0.05778	0.05017-0.3076
TP-2Ox5Py	drewAT	1	400	1.991	0.9958	0.1385	1.687-2.296
TP-3Ox5Py	drewAT	1	400	2.684	0.9975	0.1610	2.326-3.043

B. CALCULS DE DOCKING DANS LE DREWAT



Molécule	Score
TP2-Bzim	10.0875
TP3-Bzim	9.5871
TP2-Py	9.2602
TP2-Pyo	8.4281
TP3-Py	8.1734
TP3-Pyo	7.7782