



HAL
open science

Reconnaissance de l'ADN par des complexes peptidiques des lanthanides

Laëtitia Ancel

► **To cite this version:**

Laëtitia Ancel. Reconnaissance de l'ADN par des complexes peptidiques des lanthanides. Chimie inorganique. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV088 . tel-01559099

HAL Id: tel-01559099

<https://theses.hal.science/tel-01559099>

Submitted on 10 Jul 2017

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie Inorganique et Bio Inorganique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Laetitia ANCEL

Thèse dirigée par **Pascale Delangle**

Co-encadrée par **Christelle Gateau**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologique**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant de Grenoble...**

Reconnaissance de l'ADN par des complexes peptidiques des lanthanides

Thèse soutenue publiquement le « **22 novembre 2013** »,
devant le jury composé de :

Pr. Clotilde Policar

Professeur à l'École Normale Supérieure, Paris (Rapporteur)

Dr. Loïc Charbonnière

Directeur de Recherche à l'Université de Strasbourg, Strasbourg
(Rapporteur,)

Pr. Claude Piguet

Professeur à l'Université de Genève, Genève, (Examineur)

Pr. Fabrice Thomas

Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble (Examineur)

Dr Pascale Delangle

Directeur de Recherche au CEA Grenoble, Grenoble Directrice de thèse

Dr Christelle Gateau

Ingénieur d'études au CEA Grenoble, Grenoble (Examineur)



*« Vis comme si tu devais mourir demain,
Apprends comme si tu devais vivre toujours »*

Mahatma Gandhi

Effectuer une thèse était pour moi un rêve de gosse, inatteignable, comme un mirage à l'horizon. C'était pour moi comme bâtir une cathédrale avec pour seul outil une petite cuillère... Et finalement voilà que je touche du doigt ce moment, après ce long parcours qui aura duré 8 ans, période à laquelle j'ai commencé à étudier dans le supérieur. J'y ai découvert le monde fascinant de la chimie, j'ai appris à apprendre, à être curieuse, et me suis prise de passion pour mes molécules et le monde du vivant ! Tenter de réaliser ce rêve n'aurait pas été possible seule. Voilà pourquoi je tiens sincèrement à remercier toutes les personnes qui ont croisé ma route durant ces années et qui m'ont aidé à bâtir ma cathédrale.

Je tiens à remercier tout d'abord les membres de mon jury de thèse, le Dr. Loïc Charbonnière, le professeur Clotilde Policar, le professeur Claude Piguet ainsi que le professeur Fabrice Thomas, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, les Dr. Thierry Douki et Martine Deumenynck, qui ont contribué à ce travail par leurs remarques, leurs idées et leurs encouragements. Je ne serai cependant pas ici si le Dr. Pascale Maldivi n'avait pas accepté de me voir arpenter (courir serait plus juste) dans les couloirs du bâtiment C₅. Merci de m'avoir laissé faire partie de l'équipe du RICC, qui durant ces trois années a été comme ma famille.

Un grand et profond merci, tout particulier au Dr Pascale DELANGLE, ma directrice de thèse. Tu (fini le vouvoiement, du moins par écrit !) as cru en moi alors que moi-même je n'y croyais pas encore. Tes encouragements et ton soutien m'ont permis de donner le meilleur de moi-même durant ces trois ans et m'ont permis de prendre confiance en moi. Toutes nos discussions m'ont beaucoup apporté et m'ont permis de progresser d'avantage. Merci pour le temps que tu as passé à lire mes écrits. Merci pour ta rigueur, tes conseils, ta disponibilité, ta patience (et je sais qu'avec moi il en faut). Merci également pour ta passion pour la recherche que tu sais si bien transmettre, mais surtout merci pour ton écoute, ta sensibilité et ta générosité. Je n'aurais pas pu rêver mieux comme directrice !

Merci au Dr Christelle Gateau ma co-directrice de thèse. Ton dynamisme, tes millions d'idées à la minute et ton écoute ont été de vrais cadeaux pendant ces trois années. Merci pour nos (trop) nombreuses discussions nicotine, pour nos débats passionnés sur la chimie et sur Strasbourg. Merci aussi d'avoir toujours répondu présente lorsque je te sollicitais pour résoudre une mésentente avec mes molécules, mes présentations ou mon manuscrit.

Un grand merci également à toi Colette. Tu as été comme une seconde maman pour moi. Tu es le cœur du RICC, sans toi rien ne serait possible. Tu manies ton spectro avec une main de maître !

Merci à Pierre-Alain Bayle, le grand manitou des spectro RMN, pour ta disponibilité quand je perdais patience sur les shim et les accords de sondes.

Merci à Zorah, la fée du secrétariat. Sans ton dévouement, je pense que je serais toujours en train d'essayer de comprendre comment fonctionne les missions CEA.

Merci à Yves, un technicien échappé du monde imaginaire de Peter Pan. Merci pour ton entrain (qu'il fallait souvent réfréner) lorsque nous avons travaillé ensemble. Et surtout merci d'avoir supporté mon caractère de mitraillette. Merci également à mon stagiaire et grand acteur Vincent Revil-Baudard, pour avoir fait preuve de beaucoup d'implication lors de ton stage. Et si jamais tu lis ma thèse, la sonde partit dans l'évier a fonctionné !!! Merci à Vicky, Anne-solène et Agniezscka pour avoir supporté ma schizophrénie passagère lorsque je parlais à mon ordinateur. Merci à Lydia, pour sa rapidité lorsque que j'avais besoin d'un produit, ou pour m'avoir aidé à chercher partout dans le labo les choses dont j'avais besoin. Tu as souvent été mes yeux !

Enfin comme je l'ai dit plus haut, le RICC a été ma famille pendant trois ans. Plus que des collègues, certains sont devenus des amis, embarqués dans la même galère ! Merci, un grand et "hudge" merci. Sans vous, votre bonne humeur, nos pauses caféines et nos apéros rien n'aurait été possible. Je radote je radote mais merci à vous tous : Dr G pour ton humour, Victor pour ta générosité, Nicolas pour avoir tenté de me sortir du monde des bisounours (ce fut un échec mais bien tenté), Jeremy B, Quentin D, Graham, Valentin grand amateur de T₂ et de bagarre de chips, à Bastien supernova, à qui une claque ne fait pas peur (hihi) et merci à Lucile, j'espère que la salle U ne te fera pas trop tourner en bourrique. Merci à Clément et son accent du Tarn (Tu le vis ça ?), ta passion pour ton travail et tes connaissances en chimie m'ont poussé vers le haut. Merci à Ronchonchon, mon mari de travail (alias M Starck), Stéphane.O un stagiaire Rebel mais dans le bon sens et Céline ma tata chimie de la pièce 337. Il me reste à remercier mes petits rayons de soleil, Julie ma rêveuse préférée, Marie mon petit cœur toujours débordant d'attention pour tout le monde et Maria mon petit ange fosséen toujours optimiste du laboratoire. Votre présence, votre soutien et vos sourires ont été des drogues plus efficaces que la caféine.

Merci également aux autres membres du service, notamment Camille. Tu es été ma première rencontre ici, et sans toi ces trois années aurait été difficiles.

Je remercie également tous mes amis grenoblois et ceux laissés en Alsace, qui ont toujours cru en moi.

Merci à ma famille, mes tatas et mes tontons, mes cousins et cousines sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Vous m'avez toujours poussée en avant, merci du fond du cœur. Merci à mon crapouillou, mon chenapan de filleul pour tes dessins, tes cartes et tes "je t'aime" qui m'ont réchauffés le cœur. Un merci tout particulier aux deux autres membres du trio infernal des trois cloches, mes cousines Elise et Fanny, qui sont pour moi comme mes sœurs. Vous avez été là à chaque étape de mon parcours, à prendre soin de moi. Grâce à vous, et votre amour j'ai tenu bon. Enfin, merci à maman qui a donné beaucoup de sa personne pour que je puisse être la aujourd'hui. Merci pour ta force, ton courage et ton amour qui ont fait de moi celle que je suis. Sans toi, ma petite maman, cette aventure aurait été impossible. Merci à mes anges gardiens de longue date, mon papa et mon frère Cédric. Vous avez été mes guides, ma force et mon sourire tout au long de ces années.

Pour terminer, je voudrais dédier ce manuscrit à un homme à qui je dois beaucoup. Son entêtement, sa force, son courage et sa volonté ont été des exemples pour moi, mais c'est surtout son humour et sa tendresse qui m'ont apporté de nombreux moments de bonheur et qui ont contribué à mener à bien l'aventure de ma thèse. Les mots me semblent bien faible pour expliciter ce que je te dois, alors je te dis juste Merci, ce travail est pour toi tonton Jojo.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	15
Introduction Générale	19
Chapitre I	
<hr/>	
I L'Acide Désoxyribonucléique	27
I.1 Historique	29
I.2 Structure et fonction de l'ADN	29
I.1.1 Structure primaire	30
I.1.2 Structures secondaires	32
I.1.2.1 La conformation B	32
I.1.2.2 La conformation A	33
I.1.2.3 La conformation Z	34
I.1.3 Structures tertiaires	35
I.1.3.1 La famille des triplex d'ADN	35
I.1.3.2 Quadruplex et i-motif	36
I.2 De la cellule à l'être vivant	38
I.3 L'ADN en (inter)action	40
I.3.1 Reconnaissance de l'ADN par des protéines	41
I.3.1.1 Les protéines, en bref	41
I.3.1.2 Interactions protéines-ADN	44
I.3.2 Reconnaissance par des oligonucléotides	47
I.4 ADN, cible thérapeutique	47
I.4.1 Les acides nucléiques peptidiques	47
I.4.2 Les complexes métalliques	48
I.4.2.1 Les complexes de Pt(II)	49
I.4.2.2 Les complexes de Pt(IV)	52
I.4.2.3 Autres complexes métalliques	53
I.5 ADN et sondes	54
I.5.1 Phénomène d'intercalation	56
I.5.2 Les complexes de reconnaissance intercalant de l'ADN	57
II LES LANTHANIDES	63
II.1 Historique	65
II.2 La chimie des lanthanides	66

II.2.1	Propriétés spectroscopiques des lanthanides	67
II.2.2	Propriétés magnétiques des lanthanides	68
II.2.3	Propriétés de luminescence	69
II.2.3.1	Définition	70
II.2.3.2	La luminescence des lanthanides	70
II.2.3.3	Sensibilisation et <i>effet d'antenne</i>	71
II.3	Exploitation des propriétés des lanthanides	76
II.3.1	Applications industrielles	76
II.3.2	Applications pour le vivant	77
II.3.2.1	Exploitation des propriétés magnétiques	77
II.3.2.2	Exploitation des propriétés de luminescence	78
II.4	Lanthanides et peptides	84
II.4.1	Interaction des lanthanides avec les sites à calcium des protéines	84
II.4.2	Insertion des lanthanides dans des peptides	85
II.4.2.1	Les complexes de lanthanides bioconjugués	85
II.4.2.2	Les peptides liant les lanthanides par les chaînes latérales des acides aminés	88
II.4.2.3	Hexapeptides incorporant des acides aminés chélatants non naturels	89
II.4.3	Élaboration de complexes peptides-lanthanides pour détecter l'ADN	91

Chapitre II Elaboration et Synthèse des sondes

96

I	Les noyaux intercalants	97
I.1	La proflavine	99
I.1.1	Comme sensibilisateur ?	99
I.1.2	Comme intercalant ?	101
I.2	Le naphthalimide	106
I.2.1	Comme sensibilisateur ?	106
I.2.2	Comme Intercalant ?	108
II	De P²² aux sondes Intercalant-P²²	111
II.1	Sondes de première génération	112
II.2	Sondes de deuxième génération : Introduction d'un espaceur	113
II.3	Sonde de troisième génération : peptide de haute denticité	115
II.4	Sonde de troisième génération : Noyau naphthalimide à cycle étendu	116
III	Synthèse et caractérisation des sondes	117
III.1	Stratégie	117
III.1.1	Synthèses des intercalants	118
III.1.1.1	Synthèse du dérivé proflavine 3	118
III.1.1.2	Synthèse du dérivé naphthalimide 5	119
III.1.1.3	Synthèse du dérivé thiazolonaphthalimide 10	119

III.1.1.4 Synthèses des acides aminés non naturels	121
III.1.2 Synthèse des peptides	123
III.2 Caractérisation	126

Chapitre III Complexation de l'Europium

134

I Sonde de première génération : complexation de l'euporium	133
I.1 Effet d'antenne dans les complexes de première génération	133
I.2 Spéciation et stabilité des complexes	135
I.2.1 Spectrométrie de masse	135
I.2.2 RMN	136
I.2.3 Dosage par luminescence	137
I.2.4 Constantes de stabilité conditionnelles à pH 7	139
I.3 Fluorescence des complexes EuP_1 et EuN_1	142
I.4 Emission de luminescence : et par rapport à P^{22} ?	145
I.5 Temps de vie	147
I.5.1 Nombre d'hydratation	147
I.5.2 Temps de vie à basse température et transfert en retour	151
II Sonde de deuxième génération : effet de l'espaceur glycine	152
II.1 Influence sur la spéciation et la stabilité	152
II.2 Influence sur les propriétés d'émission	156
II.2.1 Luminescence	156
II.2.2 Temps de vie	158
III Sonde de troisième génération	159
III.1 Peptide octadentate P_3	159
III.1.1 Complexation de l'euporium	159
III.1.2 Temps de vie et stabilité	162
III.1.3 Luminescence de l'euporium	163
III.1.4 Luminescence dans l'infra rouge	164
III.2 Peptide dérivé du naphthalimide à cycle étendu N_3	165
III.2.1 Sensibilisation	165
III.2.2 Temps de vie	167
III.2.3 Spéciation et stabilité	169

Chapitre IV Interaction avec l'ADN

178

I	Comment mesurer l'interaction avec l'ADN ?	177
I.1	Absorbance	177
I.2	Température de fusion ou température de dénaturation	178
I.3	Luminescence	180
I.4	Modèle d'interaction utilisé	181
I.5	Choix de l'ADN	182
II	Interaction des dérivés naphthalimides avec l'ADN	183
II.1	Naphthalimide	183
II.2	Sondes EuN ₁ et EuN ₂	184
II.2.1	Température de fusion	184
II.2.2	Luminescence	185
II.3	Sonde EuN ₃	190
II.3.1	Température de fusion	190
II.3.2	Luminescence	191
III	Interaction des dérivés proflavines avec l'ADN	193
III.1	La proflavine	194
III.2	Sondes EuP ₁ et EuP ₂ :	195
III.2.1	Absorbance et température de dénaturation de l'ADN	196
III.2.2	Luminescence	198
III.3	Sonde EuP ₃	201
III.3.1	Absorbance et température de fusion	201
III.3.2	Luminescence	202
IV	Sélectivité	204
IV.1	Choix de l'ADN	204
IV.2	Sélectivité et complexe EuP ₁	205
	Influence de l'espaceur glycine sur la sélectivité	207
V	Conclusion	211

Chapitre V Conclusions et perspectives

220

Experimental part

228

I	Synthesis	227
I.1	General	227
I.2	Proflavine derivatives	228
I.3	Naphthalimide derivatives	229

I.4	Peptide synthesis	234
I.4.1	Pfl derivated peptides	235
I.4.1.1	General	235
I.4.1.2	Purification	235
I.4.2	Naph derivated peptides	237
I.4.2.1	General	237
I.4.2.2	Purification	238
II	Physico-chemical and DNA binding studies	240
II.1	Solutions	240
II.1.1	Aqueous solution	240
II.1.2	DNA samples	241
II.2	Methods	241
II.2.1	Luminescence	241
II.2.2	UV-Vis	242
II.2.3	Titrations	243
II.2.4	ES-MS	243
Annexes		245
	Tables RMN	248
Bibliographie		255

ABREVIATIONS

Abréviations générales

A : Adénine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARN_m : ARN messenger

C: Cytosine

CIRC: Centre international de recherche sur le cancer

CIS: conversion intersystème

Ct-DNA: Calf Thymus DNA

E : Énergie

E.Coli : Escherichia Coli

Em: Émission

ES-MS : ElectroSpray Mass Spectrometry

Exc: excitation

G : Guanine

HD : haute densité

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HTH : Hélice-Tout-Hélice

IR : Infra-rouge

K_d : constante de dissociation

L-HSE : L-Homosérine

Ln : Lanthanide

P : peptide

P_b : paire de base

PDB : Protein Data Bank

PET : Photoinduced Electron transfer

Pfl : proflavine

pH : Potentiel hydrogen

Naph: Naphthalimide

Noesy : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

ROESY: Rotating-rame nuclear Overhauser Effect correlation Spectroscopy

SPPS: Synthèse peptidique sur Phase solide

T : Thymine

TOCSY : Total Correlation Spectroscopy

TPE: Transfert d'électron photoinduit

Trp : Tryptophane

U: Uracil

UV : Ultra-violet

Vs : versus

Zif : Zinc finger protein

Zip : Leucine Zipper

Composés chimiques

ACN : Acétonitrile

AcOEt: acétate d'éthyle

BET: Bomure d'éthidium

Boc: *ter*-butyloxycarbonyl

BMA: BisMethylAmide

Bpy: bipyridine

DCM : dichloromethane

DIP: di-phénylphénanthroline

DMF : diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOTA : 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid

DPAE : bis-disphénylarsinoethane

Dppz : Dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine

DTPA : diethylenetriaminepentacetate

EtOH: Ethanol

Fmoc : Fluorenylmethyloxycarbonyl

HEPES: Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid

HDPA : Dipyridyl-amine

MeDPA : Methyl-dipyridyl-amine

MeOH : Méthanol

Phen : Phénanthroline

tBu : tertio-butyl

TFA : Trifluoroacetic acid

THF : tétrahydrofurane

TIS: Triisopropylsilane

TRIS : trisaminomethane

Introduction Générale

Introduction générale

« Nous sommes faits d'un étrange mélange d'acides nucléiques et de souvenirs,
de rêves et de protéines, de cellules et de mots. »

Pr. François Jacob, Discours d'entrée à l'Académie Française du 20 novembre 1997

L'Homme est un être vivant d'une grande complexité. Ses souvenirs et ses rêves le façonnent, le rendant unique et multiple à la fois. Il est donc très étrange de se rendre compte, que chacun de ses rêves, de ses souvenirs, chacun de ses mots est la conséquence d'interactions moléculaires. L'homme est un assemblage de molécules organiques et inorganiques très complexes. Chacune de ses cellules, organites et protéines sont codées dès sa naissance par 4 lettres représentant la clé de voûte du monde du vivant : les bases azotées Adénine, Thymine, Guanine et Cytosine. Ces 4 bases sont les composants universels de la matrice du vivant, l'acide désoxyribonucléique ou **ADN**.

L'ADN, est l'un des polymères les plus importants dans le vivant. Sa structure en double hélice, découverte par Watson et Crick, fête cette année ces 60 ans.

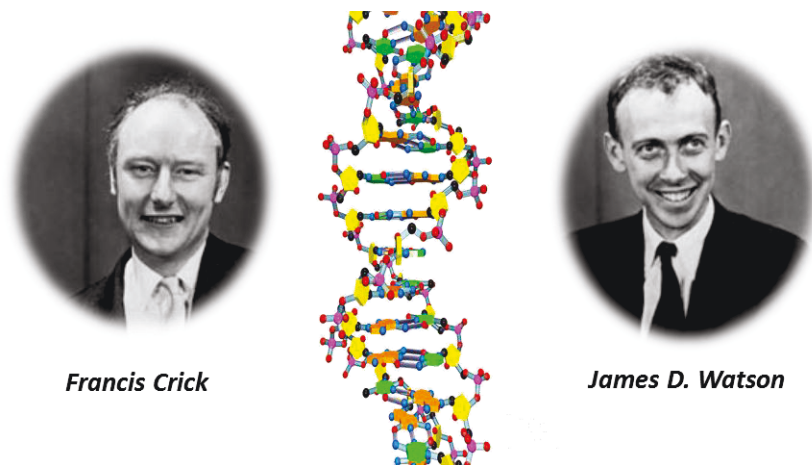


Figure 1 : Structure de la double hélice de l'ADN et photos des deux scientifiques nobélisés pour sa découverte

Depuis, de nombreuses études ont démontré l'importance de cette molécule bi-caténaire. En effet, lorsque l'ADN se retrouve lésé par des agents exogènes comme des polluants organiques, les rayonnements UV ou des métaux toxiques, des mutations sont engendrées. Ces mutations peuvent induire des pathologies comme par exemple des cancers. Comprendre comment se déroule les interactions ADN-protéines, ADN-drogues ou ADN-agents exogènes est donc fondamental pour permettre de développer de nouveaux candidats médicament.

Introduction générale

Des sondes luminescentes efficaces et spécifiques de l'ADN permettent une détection des interactions à travers l'observation d'un signal lumineux. Néanmoins, la fluorescence naturelle du matériel biologique impose le développement d'outils performants. Les **lanthanides**, de par leurs propriétés spectroscopiques particulières, notamment leurs raies fines d'émission et leurs longs temps de vie de luminescence, sont des candidats prometteurs pour le développement de sondes de l'ADN. Cependant, leur faible absorptivité molaire rend leur excitation directe difficile. Il est donc nécessaire de développer des ligands qui coordonnent efficacement les lanthanides et qui sont capables de les sensibiliser par un transfert d'énergie du ligand vers les états émissifs des cations lanthanides luminescents. C'est ce que l'on nomme *l'effet d'antenne*.

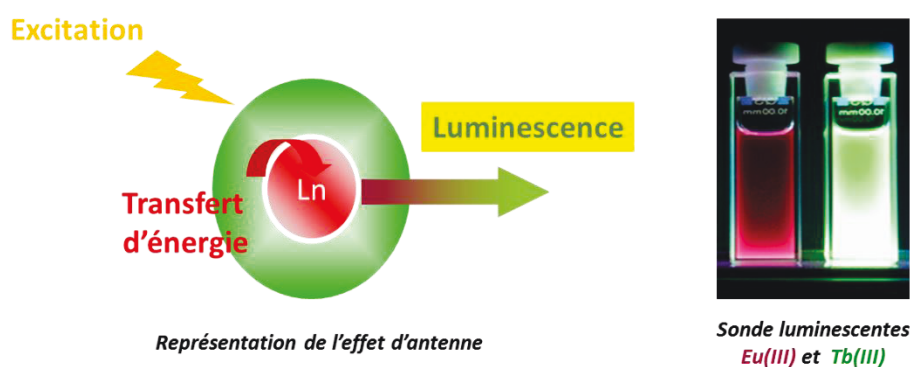


Figure 2 : Représentation de l'effet d'antenne et de la luminescence de l'euporium et du terbium

Des ligands, inspirés des sites calciques de protéines comme la calmoduline, ont permis de valider l'utilisation de **motifs peptidiques** pour la formation de complexes peptides-lanthanides. En effet, l'incorporation d'un acide aminé tryptophane dans la séquence peptidique permet la sensibilisation du cation lanthanide. La complexation est assurée par les chaînes latérales des acides aminés glutamates et aspartates présents dans la séquence du peptide. La stabilité à pH physiologique de ces complexes peptides-lanthanides n'est pas suffisante pour une utilisation comme sonde de l'ADN, qui présente lui-même une affinité vis-à-vis des ions métalliques. Pour l'utilisation des complexes peptide- Ln^{3+} comme sonde ADN, une plus haute stabilité est donc nécessaire. C'est pourquoi, au laboratoire de **Reconnaissance Ionique et Chimie de Coordination (RICC)**, des acides aminés non naturels **tridentate** ou **pentadentate** ont été insérés dans la séquence peptidique. L'affinité des complexes ainsi obtenus est multipliée par **1000** pour les complexes contenant deux acides aminés non naturels tridentates et par **1 000 000** pour les complexes contenant un acide aminé non naturel tridentate et un second pentadentate.

Introduction générale

Le deuxième facteur important pour l'utilisation de complexes peptidiques de lanthanides comme sonde de l'ADN est l'affinité pour la double hélice. L'insertion dans les complexes d'une unité de reconnaissance de l'ADN permet de visualiser l'interaction à travers des variations de la luminescence centrée sur le métal. L'**unité de reconnaissance** est donc également l'**unité sensibilisatrice** du cation lanthanide.

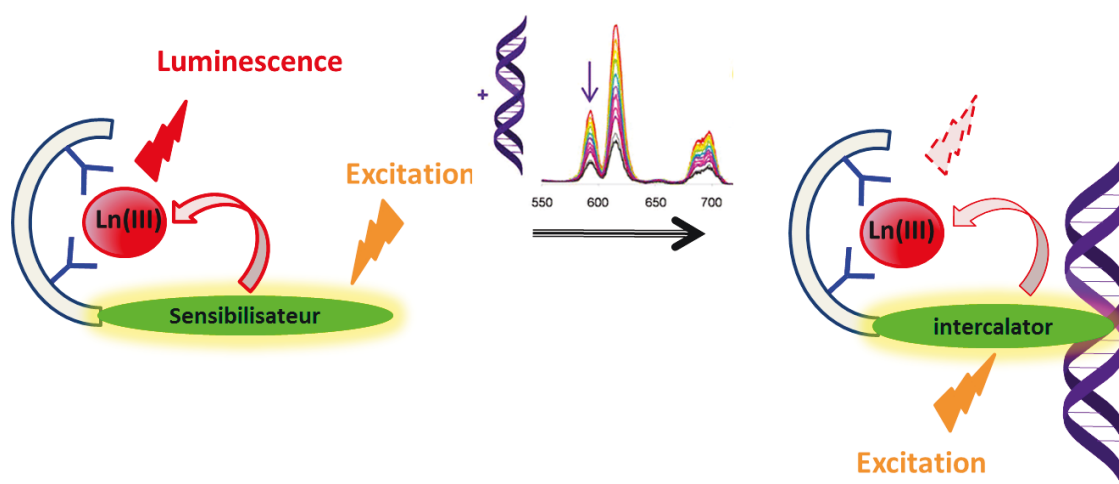


Figure 3 : Schéma de principe de la détection de l'ADN par variation du signal de luminescence d'un complexe peptidique de lanthanide.

La stratégie employée au cours de mes travaux de thèse repose sur l'insertion d'une unité de reconnaissance appartenant à la famille des intercalants de l'ADN, capable à la fois de sensibiliser l'ion lanthanide et également de reconnaître l'ADN. Ce couplage entre la sensibilisation et la reconnaissance induit une variation du signal de luminescence du cation lanthanide lors de l'interaction du complexe avec l'ADN. La conception et l'étude de ces nouveaux composés est décrite dans ce manuscrit.

La première étape est de choisir la nature de l'unité de reconnaissance intercalante de l'ADN. Celle-ci ne doit pas dénaturer la structure peptidique, et conserver, une fois insérée dans la séquence peptidique, ces capacités de reconnaissance de l'ADN. Son insertion doit perturber au minimum les propriétés de complexation des ions Ln^{3+} , de manière à conserver des propriétés similaires à celles obtenues pour les précédents complexes développés au laboratoire. Le choix d'une unité de reconnaissance par intercalation, explicitée au chapitre deux, a permis l'obtention de six nouvelles sondes peptidiques. Dans un second temps, la caractérisation des propriétés de complexation permet de mettre en évidence les propriétés de sensibilisation des unités intercalantes insérées. Enfin, les mesures de détection de l'ADN

Introduction générale

mettent en avant les propriétés de reconnaissance des complexes via la luminescence de l'ion lanthanide.

Afin de pouvoir concevoir des sondes lanthanides efficaces, il est nécessaire de s'intéresser à la structure de l'ADN et de connaître les différents types d'interactions potentiellement mises en œuvre lors de son interaction avec un composé.

État de l'Art

I L'Acide

Désoxyribonucléique

« La vie, ce concept mystérieux, est ramenée à la présence d'ADN. Il n'y a plus de frontière entre matière animée et inanimée. Tout n'est qu'une question de degré de complexité. »

Albert Jacquard, Extrait d'une Conférence du 10 Avril 2001

Du plus petit micro-organisme à l'homme, de la bactérie à la baleine, en passant par les plantes et les fruits, tous les êtres vivants sans exception, possèdent leurs informations génétiques codées dans un langage universel au sein de l'*Acide Désoxyribonucléique (ADN)*.

I.1 Historique

L'histoire de l'ADN commence avec Gregor Mendel en 1865. Moine botaniste tchèque devenu le père de la génétique actuelle, il démontra grâce à ses expériences sur les pois, que les traits de l'hérédité étaient fondés sur des lois spécifiques.

En 1869, un jeune scientifique suisse du nom de Friedrich Miescher, isolait pour la première fois une substance inconnue riche en phosphore. Issu du noyau (anglais nucleus, pluriel nuclei) de globules blancs, il baptisa ce composé 'nucléine' – un terme toujours conservé dans la dénomination actuelle de l'*Acide désoxyribonucléique (ADN)*.

Les constituants de la nucléine sont par la suite découverts : des bases azotées au nombre de quatre, un sucre pentose et des substituants phosphates.

En 1929, un biologiste anglais, Frederick Griffith, postula qu'un « facteur transformant » pouvait être libéré par des bactéries et intégré par d'autres, conférant alors à ces dernières de nouvelles propriétés héréditaires issues des bactéries donneuses. Cette découverte a donné lieu à une scission dans la communauté scientifique. Certains biologistes pensent en effet que l'hérédité induite par ce facteur transformant est supportée par du matériel protéique, alors que d'autres penchent eux pour un support d'origine nucléique, l'ADN.

C'est Oswald T. Avery qui trancha et clôtura ce débat. Il démontra en 1944, que ce facteur transformant était également le support de l'information génétique : l'ADN. Moins de 10 ans plus tard, la structure spatiale de l'ADN en « double hélice » était résolue par James D. Watson et Francis Crick, découverte dont on fête cette année les 60 ans.¹

I.2 Structure et fonction de l'ADN

L'ADN est une macromolécule biologique appartenant à la classe chimique des polymères dont les nucléotides sont les monomères de bases. Ils résultent de la combinaison en quantité équimolaire d'un groupement phosphate, d'un pentose (le 2-désoxy-D-ribose) et d'une base azotée à noyau purique (Adénine, Guanine) ou pyrimidique (Thymine ou Cytosine) désignée par les lettres **A**, **T**, **C**, **G**. (*Figure 1. 1*)

Chapitre I I-L'ADN

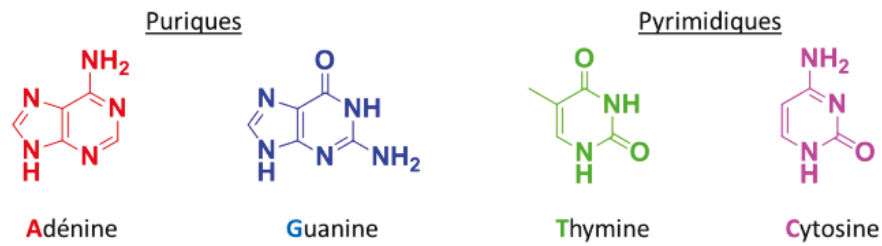


Figure 1. 1 : Structure des bases azotées

On appelle un **nucléoside** une base substituée par un sucre. La phosphorylation de l'hydroxyle en position 5' du sucre (Figure 1. 2) donne un **nucléotide**.

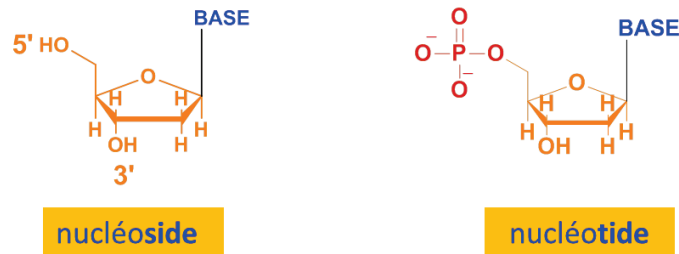


Figure 1. 2 : Structure d'un nucléotide et d'un nucléoside

I.1.1 Structure primaire

Chaque brin d'ADN est formé par des nucléotides liés entre eux par une liaison phosphodiester entre l'extrémité 5'OH et l'extrémité 3'OH des sucres portés par deux nucléosides adjacents (Figure 1. 3). Chaque brin d'ADN est donc chargé négativement.

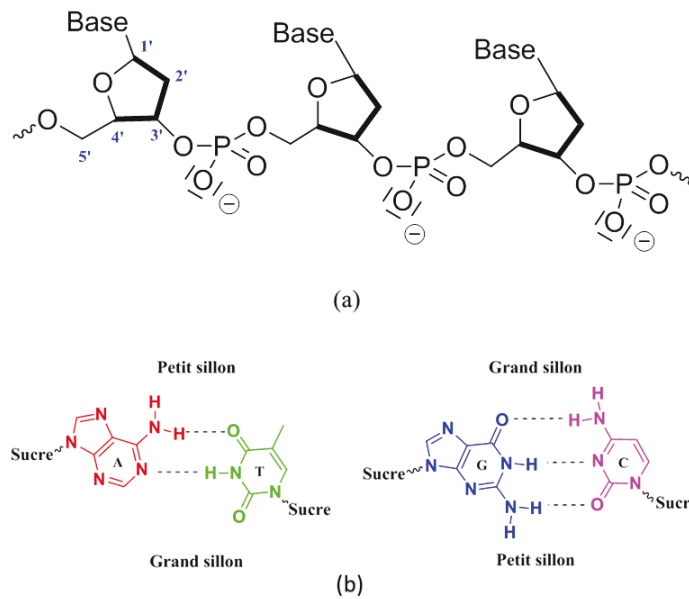


Figure 1. 3 : (a) Représentation du squelette sucre-phosphate d'un brin d'ADN et numérotation des carbones du sucre (b) Appariement de Watson et Crick complémentaire des bases azotées par des liaisons hydrogène. L'appariement des bases inter-brin forme une paire de base (pb).

Deux brins s'assemblent pour former un assemblage d'ADN bi-caténaire hélicoïdal par l'intermédiaire de liaisons hydrogène entre les bases puriques et pyrimidiques de chaque brin. L'appariement est dit complémentaire : l'adénine s'apparie avec la thymine en formant deux liaisons hydrogène, et la cytosine avec la guanine en en formant trois (Figure 1. 3). Cette exclusivité d'appariement est la conséquence des fonctions organiques portées par les bases ainsi que de leur géométrie. Cette complémentarité stérique permet la formation d'un polymère d'ADN en double hélice d'un diamètre constant de 2 nm. Cette contrainte stérique impose aux bases d'adopter une conformation *anti* (Figure 1. 4).

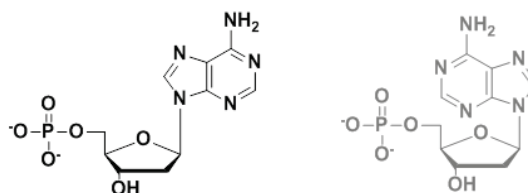


Figure 1. 4: Conformations *anti* (noire) et *syn* (gris) du nucléotide adénosine

L'orientation d'un brin est de 5'-phosphate vers 3'-OH, notée $5'_p-3'_{OH}$, pour l'un des brins et de $3'_{OH}-5'_p$ pour l'autre, on dit qu'ils sont antiparallèles. C'est la mise en évidence de cette

structure en double hélice, constituée de deux brins hélicoïdaux antiparallèles qui a permis à James D. Watson et Francis Crick d'obtenir le prix Nobel de Médecine en 1962.

I.1.2 Structures secondaires

La structure en double hélice de l'ADN découverte par Watson et Crick appelée conformation B, est une des structures polymorphes de l'ADN existant dans le vivant. On en dénombre 21, chacune désignée par une des 26 lettres de l'alphabet. Seules 5 lettres, F, Q, U, V et Y ne caractérisent aucune conformation.² Les différents polymorphes de l'ADN sont caractérisés par leurs structures (duplex, triplex, quadruplex), leur sens d'enroulement (gauche ou droite) et le pas d'enchaînement des bases. Trois des 21 conformères de l'ADN sont majoritaires dans le vivant : les polymorphes de type B, A et Z. Leurs propriétés sont détaillées ci-dessous.

I.1.2.1 La conformation B

La conformation B est la structure secondaire décrite par le modèle de Watson et Crick. C'est la forme prédominante de l'ADN dans les systèmes biologiques. C'est une hélice droite de pas égal à 3,4 nm (10 paires de bases par tour). Les bases sont inclinées de 1° par rapport au plan formé par une paire de bases et la distance entre deux plans successifs est de 0,34 Å. La chaîne hydrophile sucre-phosphate des brins d'ADN est orientée vers l'extérieur de la double hélice, alors que les bases plus hydrophobes, sont orientées vers le cœur perpendiculairement à l'axe de l'hélice. Elles s'empilent parallèlement les unes par rapport aux autres. L'attachement dissymétrique des bases au squelette sucre-phosphate de chaque brin et la position de l'axe de l'hélice au centre de chaque paire de base induisent la formation de deux sillons distincts dans la double hélice : le grand sillon et le petit sillon (*Figure 1. 5*).

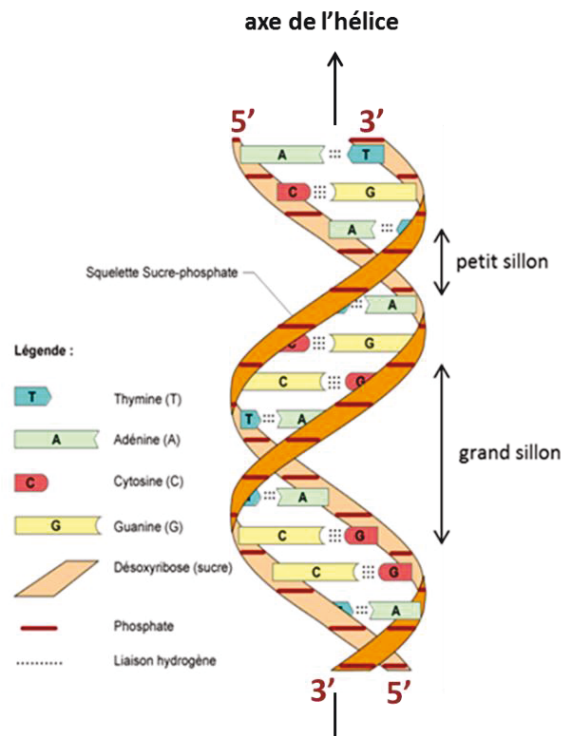


Figure 1. 5 : Représentation de l'ADN de conformation B en double hélice (ref <http://police-scientifique2012.webnode.fr/products/a2-le-sang-ladn/>)

I.1.2.2 La conformation A

Lorsque la teneur en eau d'une solution d'ADN diminue, comme par exemple lors de la cristallisation, la molécule d'ADN de type B change de conformation pour adopter une conformation de type A. Cette structure secondaire de type A est une hélice droite, avec un pas de 2,8 nm entre deux bases successives (11 paires de bases par tour). Les bases sont inclinées de 20° par rapport aux plans formés par les paires de bases et la distance entre deux plans adjacents est de 0,26 nm. La conformation A (Figure 1. 6) est donc **plus compacte** que la conformation B.

On retrouve cette conformation chez certaines spores bactériennes, en réponse à une dessiccation du milieu, mais également lors de l'amorce du processus de réplication de l'ADN par la formation éphémère d'hybrides ADN-ARN chez l'homme.

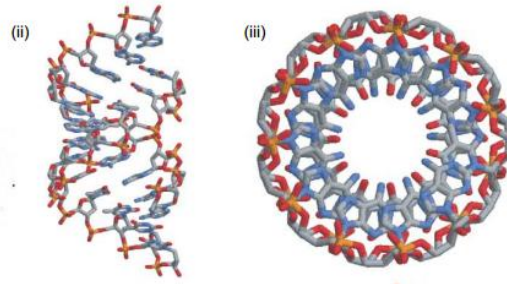


Figure 1. 6 : Vue d'un tour de double hélice du polymorphe A le long de l'axe d'enroulement (ii) et (iii) vue du dessus de la double hélice. ³

I.1.2.3 La conformation Z

Caractérisée pour la première fois⁴ dans les années 1970, la conformation Z est une conformation secondaire locale d'un duplex d'ADN possédant une région de composition alternée de bases purine-pyrimidine (ex G-C-G-C).

Dans cette conformation, les bases puriques adoptent une conformation *syn* (Figure 1. 4). L'enchaînement de nucléosides *syn puriques-anti pyrimidiques* entraîne la formation d'un enroulement gauche en zigzag des deux brins d'ADN. Le pas est de 4,5 nm par tour (12 paires de bases par tour). L'inclinaison des plans des bases est de 9° et la distance entre deux plans est de 0,37 nm. Un ADN de conformation Z est donc **plus étendu** que le B-(ADN). Il ne possède qu'un seul type de sillon, similaire au petit sillon de la conformation B (Figure 1. 7). Dans cet ADN *zigzag*, les groupements phosphates sont plus proches. Il est donc nécessaire d'augmenter la concentration saline afin de stabiliser la conformation du Z-(ADN). En effet, la présence de sels, en particulier des cations, masque la charge globale de ce polymorphe et réduit ainsi fortement les répulsions électrostatiques entre groupements phosphates.⁵

Cette conformation semble jouer un rôle dans l'expression et la régulation des gènes.^{5,6} En effet, 80% des sites d'initiation de la transcription du chromosome 22 de l'homme adoptent une conformation de type Z-(ADN). D'autres études ont montré que les séquences d'ADN de type Z ont le potentiel d'augmenter la fréquence de recombinaison, délétion et translocation de gènes dans les systèmes cellulaires.^{5,6}

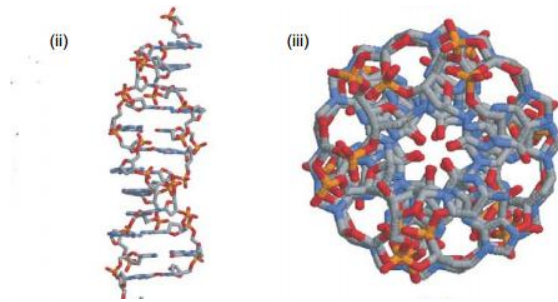


Figure 1. 7 : Vue d'un tour de double hélice du polymorphe Z le long de l'axe d'enroulement (ii) et (iii) vue du dessus de la double hélice. ³

Ces trois polymorphes d'ADN A, B et Z sont des structures appartenant à la famille des duplex. L'ADN peut cependant s'arranger en suprastructure et adopter des arrangements spatiaux tertiaires dépendant de l'environnement chimique et de la séquence des bases qui le composent.

I.1.3 Structures tertiaires

I.1.3.1 La famille des triplex d'ADN

C'est en 1957 que la première triple hélice a été caractérisée (*Figure 1. 8C*).⁷ Une triple hélice est composée d'une molécule d'ADN bi-caténaire et d'un troisième brin nucléotidique. Celui-ci s'apparie au duplex par le grand sillon de l'ADN via la formation de liaisons hydrogène aux sites accepteurs et donneurs des bases puriques du duplex. Cet appariement peut être soit parallèle soit antiparallèle à l'axe de la double hélice. On définit l'appariement parallèle et antiparallèle selon l'orientation 5'_p-3'_{OH} du mono brin d'ADN par rapport à la double hélice. On parle d'appariement antiparallèle lorsque qu'un brin à motif « **puriques** » (A ou G) ciblera les motifs puriques (A et G) du duplex par la formation de liaisons hydrogène de **Hoogsteen** (*Figure 1. 8A*). À l'inverse, on parlera d'appariement parallèle lorsqu'un troisième brin à motifs « **pyrimidiques** » (T ou C) ciblera les bases puriques (A ou G) du duplex via des liaisons hydrogène de **Hoogsteen inverse**. Ceci nécessite la protonation de l'azote de la cytosine contenue dans le brin monocaténaire (*Figure 1. 8B*).

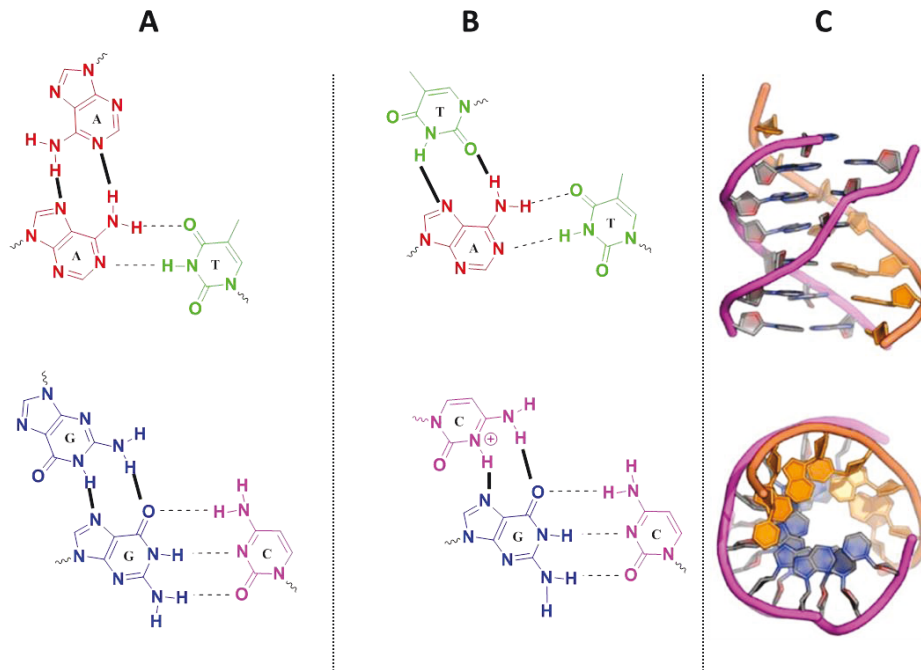


Figure 1. 8: (A) Appariement de type Hoogsteen (B) Appariement de type Hoogsteen inverse. Les liaisons de type Hoogsteen sont représentées en noires et les liaisons de type Watson et Crick en pointillées. (C) Structures cristallographiques⁸ d'un triplex d'ADN ; haut : vue le long de l'axe de la double hélice ; bas : vue de haut le long de l'axe d'enroulement de la double hélice.

I.1.3.2 Quadruplex et i-motif

Des répétitions inversées ou en miroir des bases qui composent l'ADN forment des palindromes. Ces séquences peuvent se lire dans les deux sens par rapport à un point central, soit sur le même brin soit sur les deux brins.

Exemple : 5' –A-T-C-G-G-C-T-A-3' palindrome intra-brin

5' – A-A-C-G-T-T- 3'

3' – T-T-G-C-A-A- 5'

La présence de palindrome dans l'ADN peut produire des structures cruciformes (Figure 1. 9a) ou en épingle à cheveux (Figure 1. 9b), par appariement intra-brin. Ces structures tertiaires forment des jonctions ou des boucles dans la double hélice, comme par exemple les *quadruplex* ou les *i-motifs*.⁹

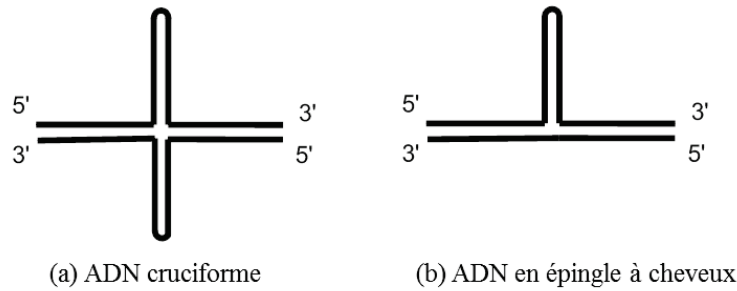


Figure 1. 9 : Schéma de structures tertiaires de l'ADN

L'exemple le plus connu est la structure des extrémités des chromosomes eucaryotes. Chacun commence et termine par des séquences riches en guanine et cytosine. Ces séquences, appelées télomères, sont nativement structurées en double hélice. Chaque brin de ce duplex peut cependant se structurer différemment : le brin riche en guanine peut former des **G-quadruplex** d'ADN appelés **G4** tandis que le brin riche en cytosine peut se structurer en **i-motifs**.

La succession de bases guanine permet la formation de liaisons hydrogène de Hoogsteen entre 4 bases : cet appariement forme un quartet plan de guanines. Ces quartets sont stabilisés par la présence d'un cation, souvent le sodium, encapsulé au centre du quartet de guanines. Ces quartets s'empilent ensuite parallèlement pour former un **G-quadruplex** d'ADN (Figure 1. 10).

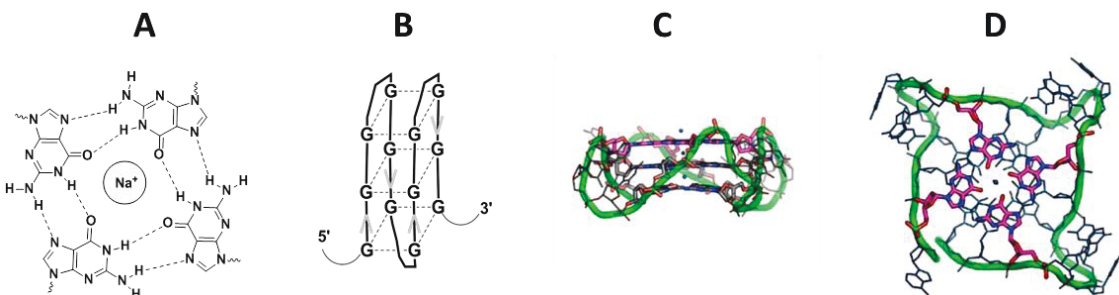


Figure 1. 10: (A) Liaisons hydrogène dans un G quartet, (B) Structure intramoléculaire des **G quadruplex**, (C) et (D) Structures cristallographiques¹⁰ d'un **G-quadruplex** vu de côté et le long de l'axe central.

L'enchaînement de bases cytosines permet la formation de **i-motifs** d'ADN grâce à un appariement de Hoogsteen inverse entre deux cytosines. Ces dimères peuvent ensuite s'empiler parallèlement en effectuant une rotation de 90° les uns par rapport aux autres. (Figure 1. 11)

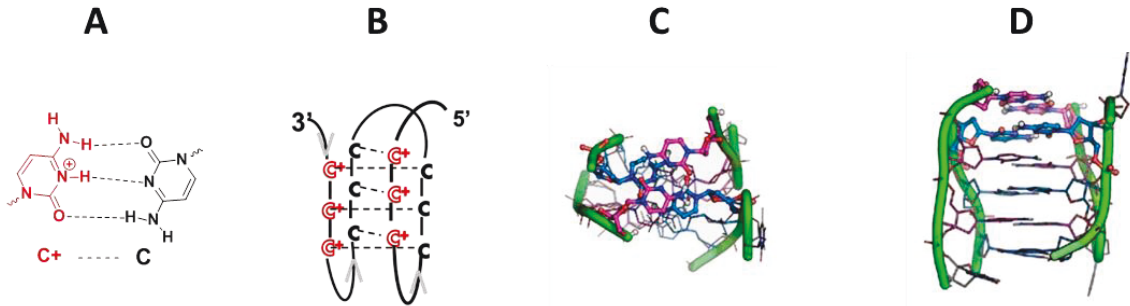


Figure 1. 11: (A) Appariement de Hoogsteen inverse dans un dimère de Cytosine⁺-Cytosine, (B) représentation intramoléculaire des **i-motifs**, (C) et (D) Structures cristallographiques¹¹ d'un **i-motif** vu par le haut et le long de l'axe de l'hélice.

L'ADN peut donc adopter différentes conformations spatiales qui jouent toutes un rôle essentiel dans le vivant.

I.2 De la cellule à l'être vivant

Dans le règne animal, l'ADN est situé dans le noyau de la cellule (Figure 1. 12). Chaque noyau cellulaire mesure environ 10 microns et contient approximativement 1 mètre d'ADN. Celui est donc fortement compacté. La double hélice d'ADN d'un diamètre de 2 nm s'enroule autour de protéines de compaction appelées histones pour former le nucléosome d'un diamètre de 11 nm : c'est la spiralisation de premier ordre. Le nucléosome est ensuite spiralisé pour former le *nucléofilament*, qui adopte lui-même des niveaux d'organisations plus compacts pour atteindre un diamètre de 300 nm. Des protéines non-histones dites « d'échafaudages », permettent alors une compression finale pour obtenir la chromatine d'un diamètre de 700 nm. Finalement une dernière étape de densification de la chromatine permet la structuration en **chromosome**, le support morphologique de l'information génétique. Malgré cet énorme degré de compaction, l'ADN doit être rapidement accessible afin de permettre son interaction avec la machinerie cellulaire et assurer le transfert de l'information génétique selon le dogme : *réplication, transcription et traduction* (Figure 1. 13).

La réplication de l'ADN s'effectue dans le noyau de la cellule. C'est un mécanisme complexe au cours duquel la quantité d'ADN est doublée, l'ADN parental est copié en ADN fils de même séquence nucléotidique et parfaitement superposable à l'ADN parent (Figure 1. 13 1).

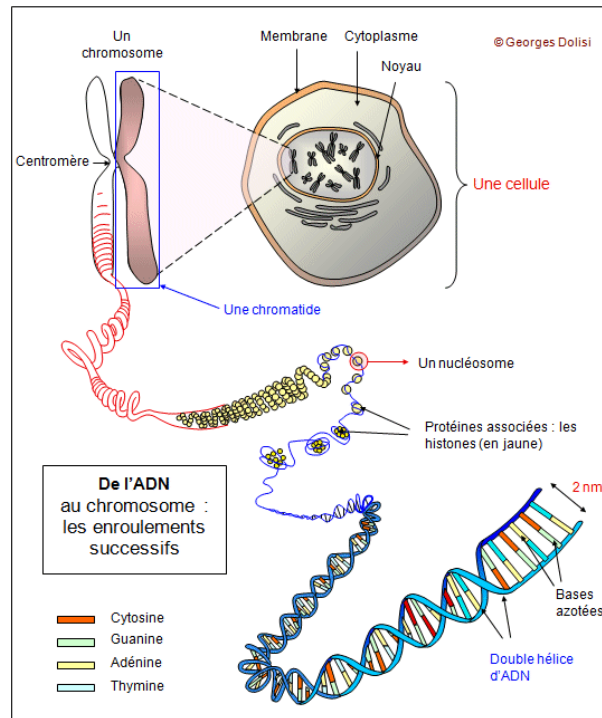


Figure 1. 12 De l'ADN à la cellule (ref http://georges.dolisi.free.fr/Transmission_vie/2_cycle_cellule.htm)

L'ADN fils est ensuite transcrit, toujours dans le noyau de la cellule, en acide ribonucléique monocaténaire appelé l'ARN messager (noté ARN_m) (Figure 1. 13 2). L' ARN_m est ensuite transporté dans le cytoplasme pour y être « traduit ». En effet, les ribosomes traduisent le code à 4 lettres des bases azotées de l' ARN_m (Figure 1. 13 encart) en un code à 22 lettres : celui des acides aminés (Annexe 1). La lecture de l' ARN_m s'effectue par « syllabe » : 3 bases par 3 bases appelées des codons. Les acides aminés sont ensuite assemblés lors de la traduction pour former les « phrases » du vivant : les protéines (Figure 1. 13 5 et 6). Un codon va, comme son nom l'indique, coder pour un acide aminé. La traduction comporte trois phases. Lors de la phase d'initiation, le ribosome constitué d'une grande et d'une petite sous unité reconnaît le codon d'initiation AUG porté par l' ARN_m et s'y fixe. La seconde phase est la phase d'élongation de la chaîne polypeptidique durant laquelle les acides aminés sont activés par l' ARN_t puis transportés au site de traduction du complexe ribosome- ARN_m . La dernière phase est la phase de terminaison durant laquelle la protéine est libérée lorsque le ribosome détecte un codon « stop ». Le complexe de traduction se désassemble pour libérer une protéine. Les protéines nouvellement synthétisées sont dirigées dans la cellule selon leurs fonctions, et peuvent s'assembler entre elles, former des tissus, des organes pour enfin ne faire partie que d'un seul ensemble : un être vivant.

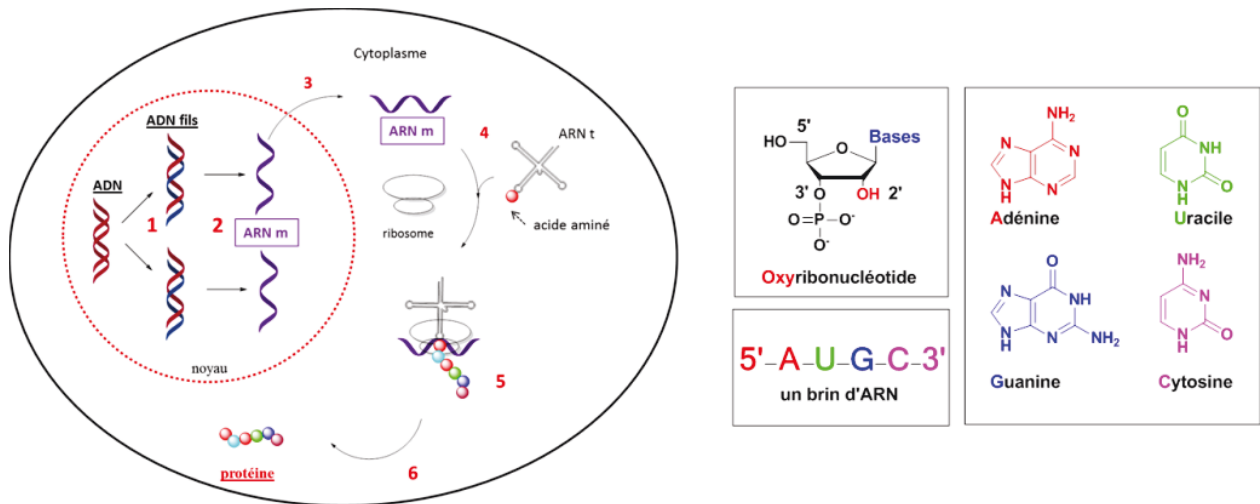


Figure 1. 13: 1) **Réplication** 2) **Transcription** 3) L'ARNm transcrit est transporté dans le cytoplasme. 4) **Traduction-initiation**. 5) **Traduction-Phase d'élongation** 6) **Traduction-terminaison**. Les encarts à gauche représentent les bases de l'ARN A U G C ainsi que la structure d'un nucléotide

C'est donc à partir d'un code à quatre lettres **A**, **T**, **C** et **G** qu'est déterminé tout ce qui était, est ou sera dans le vivant. Les différents enchaînements de ces 4 bases dans l'ADN, les différentes lectures effectuées par la machinerie cellulaire créent la diversité génétique et a permis, selon le dernier recensement mondial, de coder pour 7 milliards d'êtres humains différents.

Une seule perturbation lors de l'une des trois étapes du dogme peut entraîner de très graves conséquences : maladies génétiques, congénitales ou encore des cancers. Comprendre comment interagit l'ADN avec des protéines de la machinerie cellulaire, ou avec des agents exogènes (polluants, médicaments, etc.) au niveau moléculaire est donc essentiel pour permettre le développement de nouveaux outils diagnostiques performant ainsi que de nouveaux candidats médicaments.

I.3 L'ADN en (inter)action

Les interactions au niveau moléculaire d'un composé avec l'ADN dépendent de la nature et de la taille de ce composé. Différentes interactions sont mises en œuvre : liaisons hydrogène, électrostatiques, de coordination, ou de π -stacking. Elles déterminent la voie de reconnaissance de l'ADN, par le grand sillon, le petit sillon ou par un phénomène d'intercalation entre les paires de base de l'ADN. Dans le vivant, l'interaction de l'ADN avec les protéines de la machinerie cellulaire est le phénomène de reconnaissance prépondérant.

Afin de décrire ces interactions ADN-protéines, nous allons nous focaliser sur les interactions du polymorphe B de l'ADN.

I.3.1 Reconnaissance de l'ADN par des protéines

I.3.1.1 Les protéines, en bref

Les protéines, issues de la traduction de l'ARN_m par les ribosomes, sont de grosses molécules biologiques composées d' α -acides aminés chiraux liés entre eux par une liaison peptidique de type amide plane (Figure 1. 14). Les acides aminés dits « naturels » sont au nombre de 22 et sont généralement représentés par un code à 3 ou 1 lettres. (Annexe 1)

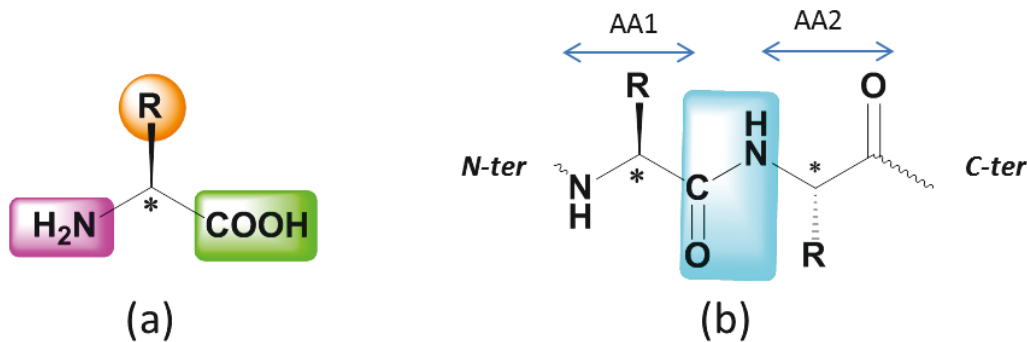


Figure 1. 14:(a) α -amino acide de configuration L composé une extrémité amine, d'une extrémité acide carboxylique et d'une chaîne latérale R variable. (b) Représentation d'un enchaînement de deux acides aminés AA1 et AA2, liés par une liaison peptidique.

On différencie **peptides** et **protéines** selon leur voie de métabolisation et leur taille. En effet, un peptide est un enchaînement de moins de 50 acides aminés. Les peptides sont issus de la traduction de l'ARN_m (polypeptides) ou de synthèses enzymatiques, alors que les protéines sont de longues chaînes polypeptidiques ayant subi des modifications **post-traductionnelles** et possédant une structure tertiaire voir quaternaire. Les peptides sont donc de petites chaînes polypeptidiques ne possédant pas de structuration spatiale complexe.

La séquence des acides aminés détermine les structures locales de la protéine. La nature des chaînes latérales des acides aminés portant des groupes chimiques donneurs ou accepteurs de liaison hydrogène, hydrophobes, aromatiques, chargés, neutres détermine la structuration en hélice α , feuillet β , coude β ou la non structuration en pelote statistique.

Hélice α

La forme hélicoïdale de l'**hélice α** résulte de la formation de ponts hydrogène entre le groupement C=O d'une liaison peptidique **i** et le groupement N-H de la liaison peptidique **i+4**. Chaque tour complet de la spirale est constitué d'environ 3,6 résidus acides aminés pour assurer l'alignement des groupements C=O (pointant vers le haut) et N-H (pointant vers le bas). Les groupements latéraux «R» sont orientés vers l'extérieur, perpendiculairement à l'axe de l'hélice, de manière à minimiser l'encombrement stérique (*Figure 1. 15*).

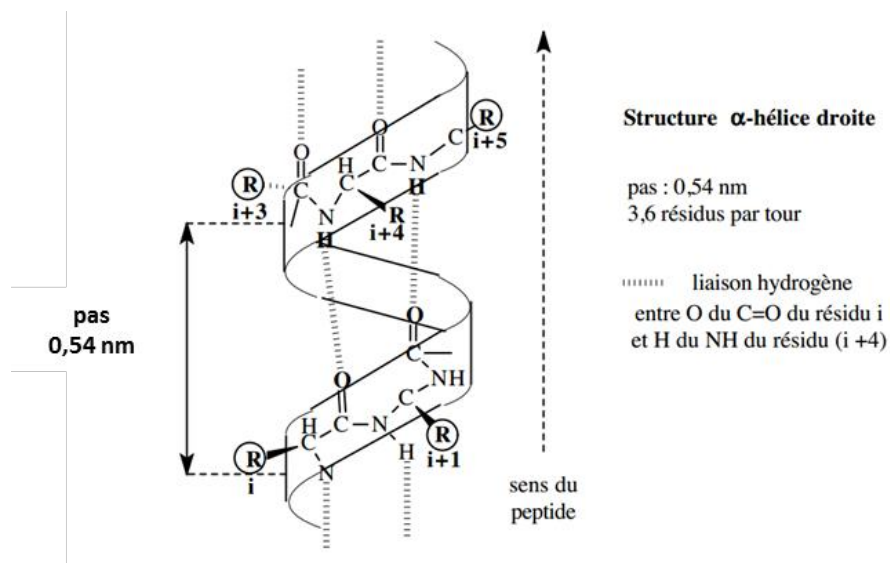


Figure 1. 15: Représentation d'une **hélice α** (réf cours de licence STE biochimie 1, Université d'Aix-Marseille)

Feuillet β

Dans un **feuillet β** , il se forme des liaisons hydrogène entre des chaînes peptidiques disposées parallèlement les unes par rapport aux autres. L'ensemble forme un plan : c'est un **feuillet β** plissé. L'orientation de la chaîne (N-ter \rightarrow C-ter) des deux brins adjacents est soit identique (feuillet parallèle β) soit opposée (feuillet anti-parallèle β). Les groupements latéraux **R** sont orientés alternativement de part et d'autre, vers l'extérieur de chaque feuillet (*Figure 1. 16*).

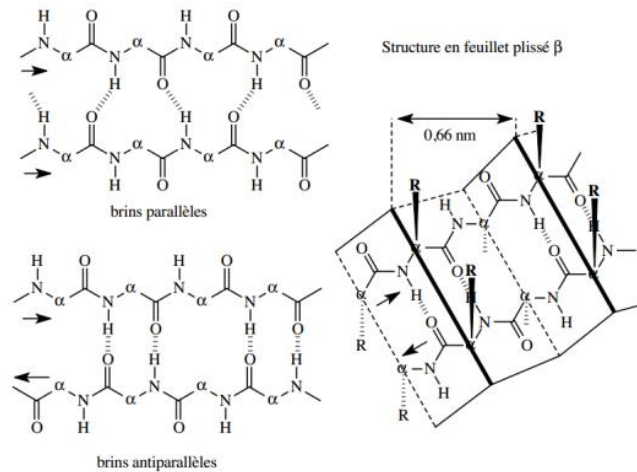


Figure 1. 16 : Représentation d'un **feuillet β** (réf cours de licence STE biochimie 1, Université d'Aix-Marseille)

Coude β

Certaines régions des protéines ne sont pas structurées en arrangement périodique comme les hélices α ou les feuillets β . Cependant, ces segments protéiques semblent structurés car ils contiennent un brusque changement de direction à 180° appelé **coude β** . C'est généralement un court segment de 2 à 4 résidus, contenant des liaisons hydrogène pontant le premier et le dernier acide aminé du coude (Figure 1. 17 gauche). On appelle également « **coude β** » la configuration particulière induite par le noyau pyrrolidine de la proline. La présence d'une proline dans la séquence peptidique permet un changement de direction sans nécessiter la présence de liaisons hydrogène entre d'autres résidus (Figure 1. 17 encadré droit).

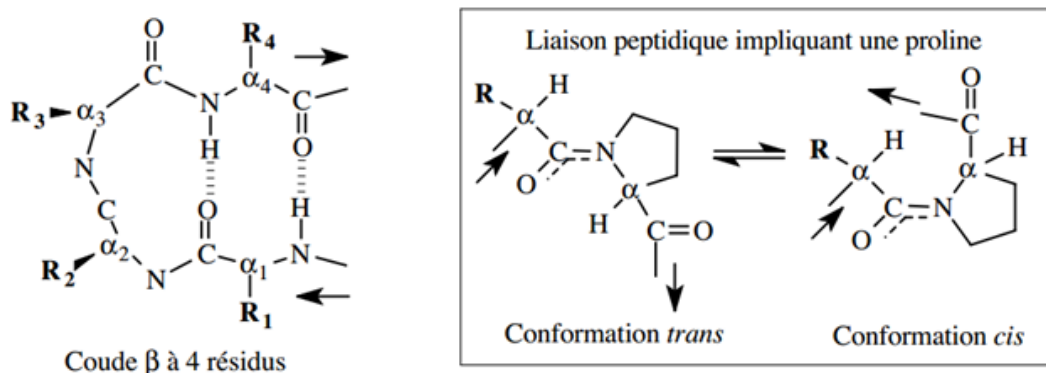


Figure 1. 17 : Représentation d'un **coude β** (gauche) et de la conformation induite par la présence d'un noyau proline (encart droit) (Extrait du cours de licence STE biochimie 1, Université d'Aix-Marseille)

Pelote statistique

C'est un arrangement non périodique et non structuré de la chaîne peptidique. Sa conformation dans l'espace obéit uniquement aux contraintes locales.

Une protéine sera donc composée d'**un assemblage** de segments peptidiques de conformation hélice α , feuillet β , coude β et de segments non structurés. C'est la composition chimique des segments qui fixe l'arrangement spatial protéique final et détermine son mode d'interaction avec l'ADN.

I.3.1.2 Interactions protéines-ADN

Les facteurs de transcription sont des protéines ayant pour rôle de réguler l'expression des gènes par interaction avec la double hélice de l'ADN. La reconnaissance de l'ADN par les facteurs de transcription est basée sur des motifs structuraux particuliers des protéines : les motifs **Hélice-Tour-Hélice** (HTH), les motifs **à doigts de zinc** (Zif issu de **zinc finger** en anglais), et les motifs **leucine zipper** (Zip).

La taille importante de ces protéines impose une reconnaissance de l'ADN via le grand sillon. Cette reconnaissance est essentiellement basée sur la formation de liaisons hydrogène spécifiques entre les bases de l'ADN et les chaînes latérales des acides aminés. Il existe une corrélation entre la séquence en bases de l'ADN reconnue et la séquence d'acides aminés de la protéine de reconnaissance, mais celle-ci est complexe et dépend de nombreux facteurs.

Les motifs HTH

Les **motifs HTH** représentent 1/3 des motifs de reconnaissance des protéines liant l'ADN. Ces structures sont composées de **deux hélices α** (notées H_1 et H_2), reliées par un espaceur peptidique non structuré (*Figure 1. 18*). Ces fragments **HTH** sont relativement courts, de 20 acides aminés environ. C'est l'hélice H_2 qui est responsable de la reconnaissance spécifique de l'ADN.¹² Les acides aminés impliqués dans le phénomène de reconnaissance sont majoritairement les arginines (groupement guanidinium), les histidines (noyau imidazole), la lysine (ammonium) ou encore les acides aspartique ou glutamique¹³, qui sont donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène.

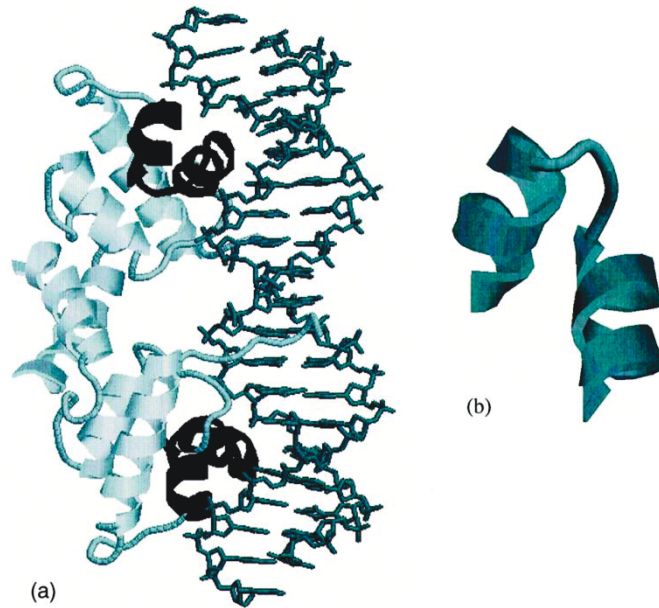


Figure 1. 18 : (a) Modélisation de l'interaction d'une protéine dimérique à motifs **HTH** via le grand sillon de l'ADN [PDB code 1lmb (3)]. Les sous unités **HTH** sont surlignées en noires (b) Représentation d'un motif **HTH**.¹²

Les motifs à doigts de zinc (Zif)

Les facteurs de transcriptions à **motif Zif** contiennent une séquence consensus d'acides aminés conservée dans toutes les protéines de cette famille. Ces séquences comportent moins de 30 acides aminés, et sont repliées en **feuillelet β -feuillelet β -hélice α** . Cet enchaînement $\beta\beta\alpha$ est stabilisé par la chélation d'un ion zinc par les chaînes latérales de 2 cystéines portées par un feuillelet β et par les noyaux imidazole de 2 histidines de l'hélice α (Figure 1. 19 B).

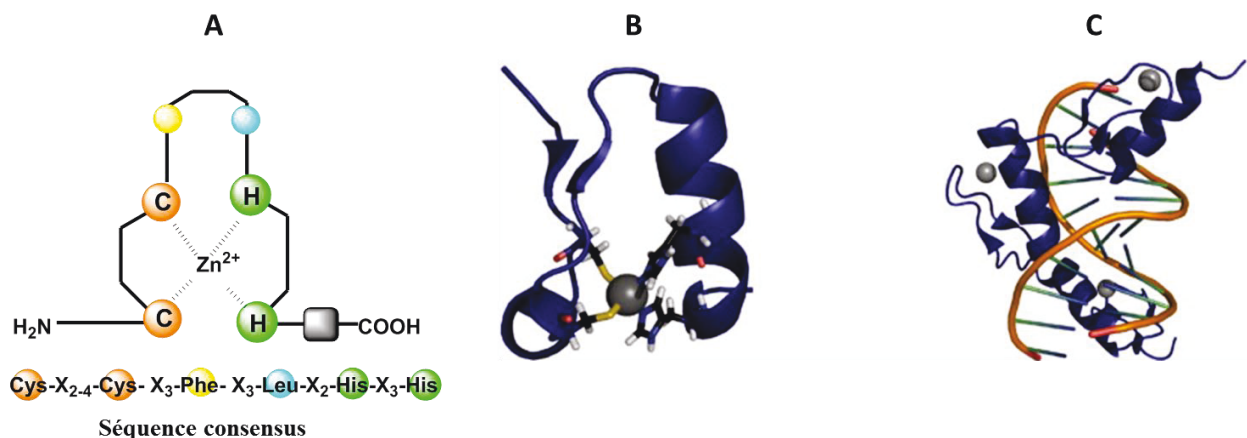


Figure 1. 19 : A) Représentation schématique d'une structure à doigts de zinc et sa séquence consensus. *X* représente les acides aminés non conservés dans la séquence et *n* leur nombre. B): Structure à doigt de zinc extraite de la PDB (fichier 1TF3). Les acides aminés impliqués dans la liaison au métal (sphère grise) sont représentés en bâtonnets (Cystéine sur le feuillelet β – Histidines sur l'hélice α). C) : Structure d'une protéine à

Chapitre I I-L'ADN

doigts de zinc Zif268 en interaction avec l'ADN, extraite de la PDB (1A1K). Les protéines sont en bleue, l'ADN en orange et les zinc en gris.¹⁴

Un acide aminé non conservé à l'extrémité **C-ter** des motifs à doigts de zinc est souvent responsable de la reconnaissance spécifique de l'ADN. Cet acide aminé est symbolisé par un carré gris sur la figure 19 A. La petite taille des segments protéiques à doigts de zinc limitent la reconnaissance du duplex d'ADN à quelques paires de bases adjacentes, c'est pourquoi plusieurs modules à doigts de zinc travaillent souvent de concert pour réguler l'expression des gènes via le grand sillon de l'ADN,^{15,16} comme sur la structure représentée sur la figure 19 C.

Les motifs Leucine zipper (Zip)

Les facteurs de transcriptions à motifs **leucine zipper** sont des protéines structurées en **hélice α** . Elles contiennent des segments riches en leucine d'une trentaine d'acides aminés, appelé **Zip** (**Zip** pour zipper en anglais). Les **Zip** sont des séquences répétées de septuplés où chaque leucine est séparée de la suivante par 6 acides aminés polaires (*Figure 1. 20*). Ce sont eux qui induisent la dimérisation spécifique de deux **Zip**, et permettent une **reconnaissance simultanée** des deux brins du duplex d'ADN.

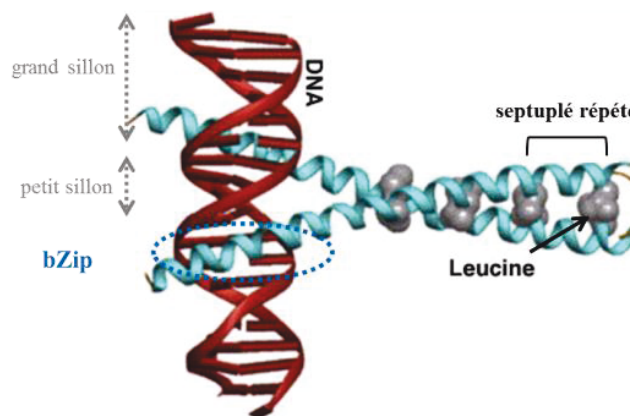


Figure 1. 20 :Interaction d'un dimère leucine zipper avec le grand sillon de l'ADN. Les leucines sont représentées en gris. C'est l'extrémité **bZip** qui reconnaît l'ADN.¹⁷

La liaison à l'ADN est assurée par des séquences protéiques riches en acides aminés basiques, situés vers l'extrémité **N-ter** de la protéine à motif leucine zipper. On nommera cette séquence **bZip** (b = basique). Cette région basique facilite la liaison à l'ADN via le grand sillon en interagissant avec les groupements phosphate de l'ADN.¹⁸

Les facteurs de transcription représentent donc une grande famille de protéines de forte diversité structurale, capable de reconnaître spécifiquement l'ADN, à travers la formation de liaisons hydrogènes, hydrophobes et électrostatiques. Les protéines ne sont cependant pas les seules biomolécules capables de reconnaître l'ADN. Les oligonucléotides, comme les ARN, sont interagissent également spécifiquement avec la double hélice.

I.3.2 Reconnaissance par des oligonucléotides

La transcription de l'ADN nécessite la formation d'hybrides ADN-ARN reposant sur une reconnaissance de l'ADN par une chaîne polynucléotidique. Dans le vivant, les oligonucléotides capables de reconnaître l'ADN peuvent s'apparier soit selon le modèle de Watson et Crick comme l'ARN issu de la transcription, soit selon le modèle de Hoogsteen/Hoogsteen inverse pour former des triplex avec la double hélice dans le grand sillon de l'ADN. Cependant, la répulsion électrostatique de charge due aux groupements phosphates des chaînes nucléiques est défavorable. C'est pourquoi dans le vivant, ces complexes ne sont que transitoires. Développer des composés nucléotidiques capables de reconnaître une séquence d'ADN particulière peut être une voie de recherche pour la thérapie génique. En effet, synthétiser une amorce nucléotidique peut permettre d'initier la reconnaissance d'un gène en activant la machinerie cellulaire. À l'inverse, celle-ci peut également masquer une séquence codante et inhiber sa transcription.





I.4 ADN, cible thérapeutique

L'ADN est la molécule de la vie, définissant chaque être vivant. La compréhension de la complexité de son mode de lecture par la machinerie cellulaire est indispensable pour concevoir de nouveaux outils diagnostiques ou des médicaments. En effet, les maladies génétiques, les cancers, les maladies congénitales trouvent leurs sources dans l'ADN.

I.4.1 Les acides nucléiques peptidiques

La formation d'une triple hélice d'ADN à visée thérapeutique, comme par exemple des antiviraux (Vitraven, antiviraux ARN) ou des antigènes, composée uniquement de nucléotides est difficile à cause de la répulsion de charge entre les groupements phosphates. *Nielsen*

développa dans les années 2000, des mimes d'ADN appelés **Acide Nucléique Peptidique (ANP)**,^{19,20} qui combinent les propriétés des protéines et de l'ADN. Les **ANP** sont des dérivés d'ADN constitués d'un squelette **polyamide neutre** dans le but de diminuer la répulsion électrostatique et ainsi faciliter les interactions avec l'ADN (*Figure 1. 21*). De taille variable, ils peuvent interagir par la formation de liaisons hydrogène via le grand sillon de l'ADN suivant 4 scénarios dépendant de la séquence visée (*Figure 1. 21 B*) :

-  invasion du duplex,
-  double invasion du duplex,
-  formation d'un triplex,
-  invasion d'un triplex induisant la formation d'une boucle d'ADN libre.

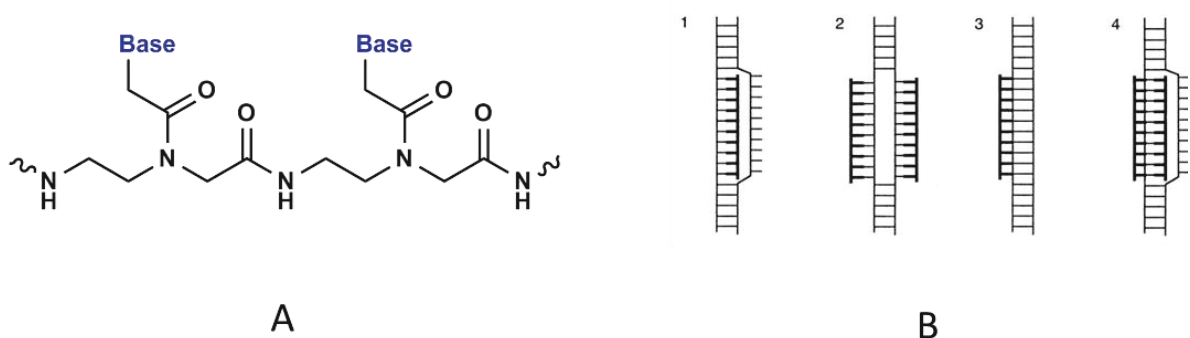


Figure 1. 21 : (A) Structure générale des **ANP** (B) Représentation des différentes interactions des **ANP** (en gras) avec l'ADN.²⁰

L'utilisation des **ANP** comme outils de régulation des gènes est cependant entravée par leurs faibles taux d'incorporation cellulaire. C'est pourquoi, il est nécessaire de les coupler à des peptides *polylysine* –*polyphénylalanine* connus pour augmenter le taux d'incorporation dans les cellules bactériennes de type *Escherichia Coli* (**E. Coli**) et plus récemment dans les cellules animales.^{21, 22}

I.4.2 Les complexes métalliques

En 1965, munis d'électrodes de platine et d'un milieu de culture cellulaire à haute teneur en chlore, Rosenberg et son équipe ont voulu tester la croissance de la bactérie *Escherichia Coli* (**E. Coli**) sous l'influence d'un champ électrique. Ils se sont rendus compte pendant leur expérience, que les bactéries devenaient filamenteuses et ne se répliquaient plus : le processus

Chapitre I I-L'ADN

de division cellulaire était bloqué.²³ Ce fut la découverte fortuite du *cis-Pt*, l'un des six complexes de platine utilisés comme agents anti-cancéreux dans le monde

I.4.2.1 Les complexes de Pt(II)

Le *cis-Pt* est le premier composé anticancéreux à base de platine au degré d'oxydation II. Il est composé de deux ligands ammoniac et deux ligands chlorures, sensibles aux substitutions nucléophiles. Dans le sang, la concentration élevée en chlorure permet de conserver le *cis-Pt* sous sa forme native (Figure 1. 22). Par contre, lorsque le *cis-Pt* entre dans les cellules, il est rapidement hydrolysé pour obtenir la forme active $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, qui peut alors interagir avec les biomolécules et notamment l'ADN.

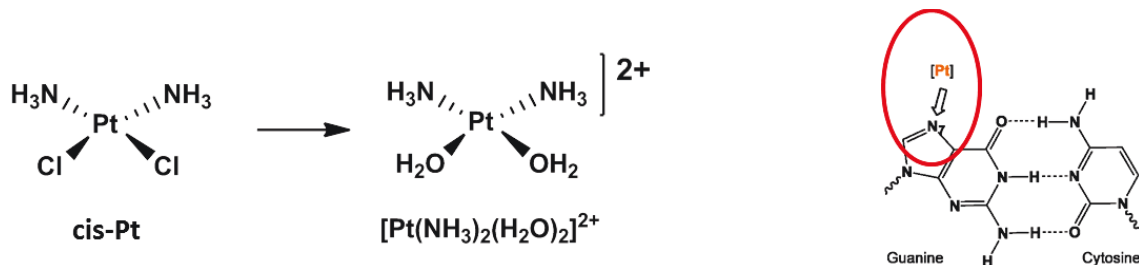


Figure 1. 22 : Structure du *cis-Pt* et de sa forme activée $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, représentation de la coordination du Pt à l'atome N₇ de la guanine

Les structures cristallographiques obtenues par l'équipe de Lippard^{24,25} ont montré que le *cis-Pt* interagissait avec l'ADN via le grand sillon par la formation d'une liaison de coordination entre le métal et l'atome d'azote N₇ des bases guanines de l'ADN. Cette interaction est irréversible et la formation de l'adduit du *cis-Pt* avec l'ADN induit une distorsion de la double hélice. L'ADN lésé ne peut alors plus être reconnu par la machinerie cellulaire. L'action du *cis-Pt* conduit ainsi la cellule à l'apoptose, une mort cellulaire précoce.

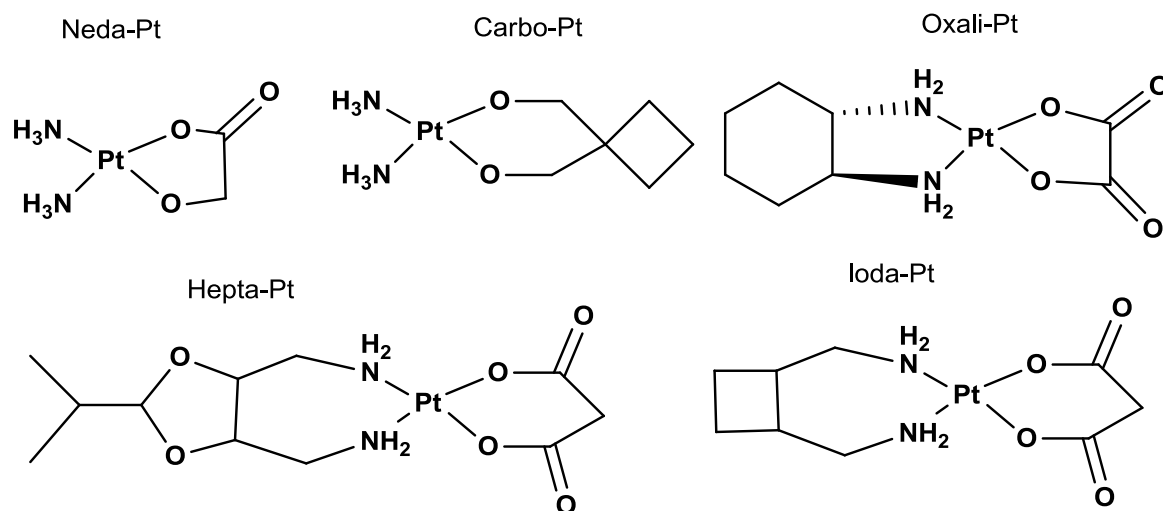


Figure 1. 23 : Les complexes de Pt(II) anti-cancéreux utilisés en clinique à travers le monde.

De par sa sensibilité aux substitutions nucléophiles, le *cis-Pt* interagit avec tous les substrats nucléophiles présents dans la cellule, entraînant des effets secondaires indésirables (nausée, vomissement, toxicité rénale). D'autres complexes de Pt(II), composés de ligands moins labiles ont donc été développés. À ce jour, on compte 6 complexes de Pt(II) utilisés en clinique dans le monde : *cis-Pt*, *carbo-Pt*, *oxali-Pt*, *neda-Pt* (Japon), *ioda-Pt* (Chine) et l'*hepta-Pt* (Corée du Sud) (Figure 1. 23). Ces complexes ont une activité anticancéreuse mais restent très toxiques.

Pour obtenir de nouveaux complexes de plus forte activité anticancéreuse mais moins toxiques, de nouveaux concepts ont été utilisés. Cela sous-entend le développement d'agents possédant un mode de reconnaissance de l'ADN différent des complexes de Pt(II) exposés précédemment.

L'exemple le plus connu est le complexe *trans-Pt* ou **BBR3464** (Figure 1. 24), développé par l'équipe de Farrell. Le **BBR3464** est un complexe **multi-nucléaire polycationique**, dans lequel les cœurs platine sont pontés entre eux par des espaceurs éthylènediamines flexibles. Ne contenant pas de groupe partant, son mode d'interaction avec l'ADN diffère des complexes de platine traditionnels. Des adduits bi-fonctionnels avec l'ADN sont formés, induisant un changement de conformation : l'ADN passe d'une hélice droite B-(ADN) à gauche Z-(ADN).²⁶ Ce changement de conformation irréversible et la formation de bis-adduit à l'ADN lui confèrent une très forte activité anticancéreuse.

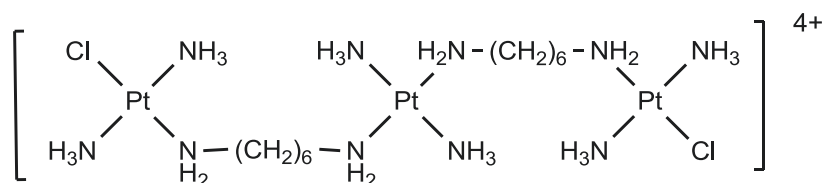


Figure 1. 24 : Structure du complexe de Pt(II) *BBR3464*

Un complexe de platine **octa-cationique** a été conçu sur le même modèle. Celui-ci a permis de mettre en évidence un nouveau mode de liaison à l'ADN par interaction avec le squelette sucre-phosphate. C'est à ce jour l'un des seuls complexes métalliques Pt(II) à induire un effet cytotoxique dans des cellules cancéreuses sans former d'adduits aux N₇ des bases puriques de l'ADN. (Figure 1. 25)

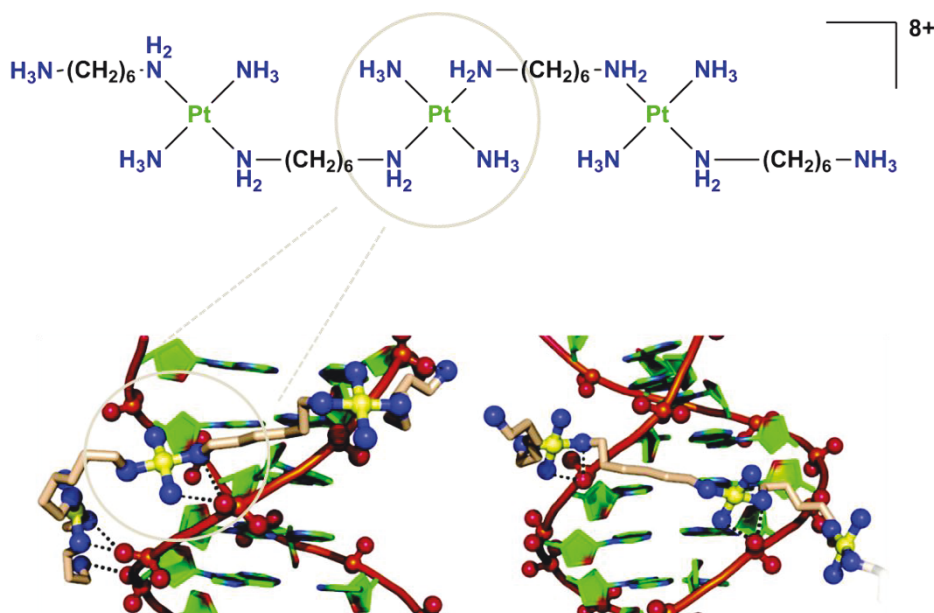


Figure 1. 25 : Structure du complexe octa-cationique de Farrell et structures cristallographiques (résolution 1.2 Å) du complexe en interaction avec le squelette phosphate d'un dodécamère de B-ADN *d(CGCGAATTCGCG)2*.^{27, 28}

Malgré les optimisations effectuées, ces complexes de Pt(II) possèdent toujours de nombreux effets secondaires, en réponse à une mauvaise spécificité d'interaction. Des complexes de platine au degré d'oxydation IV ont été synthétisés afin d'obtenir des pro-drogues dans le but de diminuer ces effets secondaires.

I.4.2.2 Les complexes de Pt(IV)

Le principe des pro-drogues est de masquer l'activité d'un composé jusqu'à ce que celui-ci atteigne sa cible (organe ou organite cellulaire). Le composé **Ipro-Pt**²⁹ est le premier complexe de Pt(IV) pro-drogue à activité anti tumorale. Ce composé de platine au degré d'oxydation IV est inactif. Après réduction *in cellulo* (perte de ligand hydroxo), la forme réduite au degré d'oxydation +II donne le complexe actif qui crée des adduits à l'ADN de type $[\text{Pt}((\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2)]$. Il est cependant moins actif que le **cis-Pt** et son mode d'action est nettement plus lent. Basé sur ce modèle, des optimisations ont été effectuées et de nouveaux complexes comme le **tétra-Pt** et le **satra-Pt** ont été conçus. Le **satra-Pt** est le complexe « tête de file » de cette famille et est actuellement en phase clinique III. Son mode d'administration par voie orale et son activité contre des lignées cancéreuses résistantes au **cis-Pt** en font le candidat médicament à base de platine le plus prometteur actuellement (Figure 1. 26).

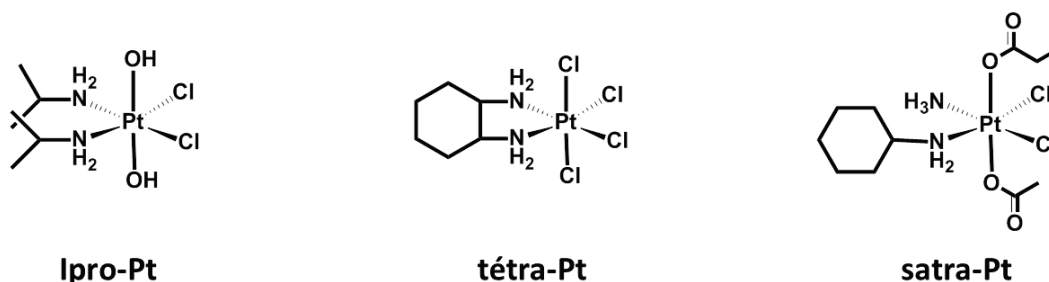


Figure 1. 26 : Structures des complexes de Pt(IV) à activité anticancéreuse.

Tous ces complexes de platine utilisés en clinique ou en développement ne possèdent pas de système de vectorisation. Leur vectorisation vers un tissu spécifique permettrait de diminuer fortement les doses administrées et certains effets secondaires.

Des complexes de Pt(IV) photoactivables ont été développés pour diminuer les effets cytotoxiques secondaires indésirables. L'activation du complexe de Pt(VI) en Pt(II) est induite par exposition à un rayonnement lumineux appliqué seulement sur les cellules malades. Seuls les complexes présents dans les cellules tumorales irradiées sont réduits par photoactivation et agissent comme anticancéreux par liaison au grand sillon des bases guanine de l'ADN.

Il existe deux types de ligands photoactivables: les **ligands iodure** ou des **ligands azoture** (Figure 1. 27). Les complexes diiodo, malgré leur grande photolabilité, sont facilement

réduits par les groupements thiols présents à l'intérieur et à l'extérieur des cellules, entraînant ainsi la formation d'un complexe de Pt(II) cytotoxique avant irradiation.^{30, 31 31} Les complexes diazotures sont plus stables *in cellulo* et conservent les propriétés cytotoxiques du **cis-Pt** après irradiation.

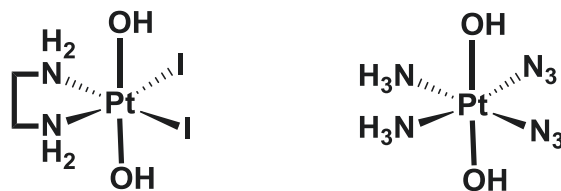


Figure 1. 27 : Complexes de Pt(IV) di-Iodo et di-azotures

I.4.2.3 Autres complexes métalliques

L'utilisation de métaux de transition différents, comme le ruthénium dans des complexes octaédriques est une autre piste pour la conception de métallo-médicaments innovants.

Le complexe **KP1019** développé par *Kepler*³² est un complexe de Ru au degré d'oxydation +III. Son mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé mais les études effectuées indiquent qu'il est probablement réduit *in vivo* en Ru(II) et que c'est sa forme réduite qui se coordonnerait aux atomes d'azote des bases puriques présentes dans le grand sillon de l'ADN. Des complexes de **Ru(III)-arène « en tabouret de piano »**,³⁰ développés par l'équipe de *Sadler*, ont également montré des propriétés cytotoxiques sur des lignées cancéreuses. Le mécanisme d'action fait intervenir la coordination du Ru(II) à l'azote N₇ des bases guanines et l'insertion partielle du groupement aryle entre les bases de l'ADN. Ce mode d'action différent du **cis-Pt** explique l'activité observée sur des lignées cancéreuses résistantes aux médicaments classiques dérivés du Pt. (Figure 1. 28)

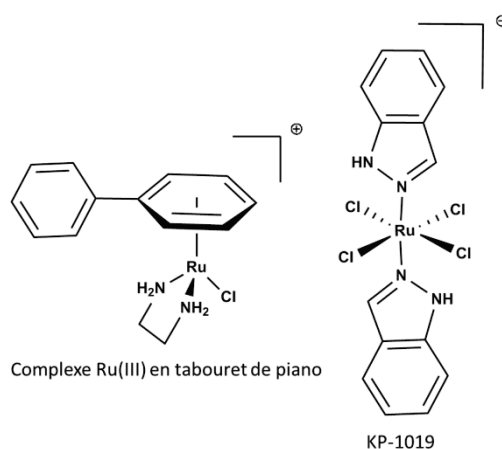


Figure 1. 28 : Exemples de complexes de Ru(III)

Cibler des séquences spécifiques et délivrer une molécule à un endroit précis de la double hélice permettrait le développement de médicaments plus efficaces et mieux tolérés. C'est pourquoi une meilleure compréhension des phénomènes de reconnaissance est nécessaire pour augmenter la spécificité et donc l'activité des médicaments. Le développement de composés interagissant avec l'ADN en donnant un signal identifiable, comme l'émission de photon, est donc important pour la compréhension des phénomènes de reconnaissance et également pour l'obtention d'outils diagnostiques.

I.5 ADN et sondes

Les outils de détection de l'ADN ont pour but de détecter la présence d'ADN, ses différentes structures et séquences et ainsi permettre un ciblage de l'ADN *in vitro* et *in vivo*.

Très utilisés en biologie, de nombreux fluorophores organiques permettent de révéler l'ADN : on les appelle des « *DNA stainer* ou *révélateur de l'ADN* ». Les interactions mises en jeu sont majoritairement des interactions de type électrostatique via le petit sillon de l'ADN. Les fluorophores les plus couramment utilisés sont des dérivés des benzamidines comme le **DAPI** ou des dérivés des bis-benzimidides, comme ceux de la famille **Hoechst**. (Figure 1. 29)

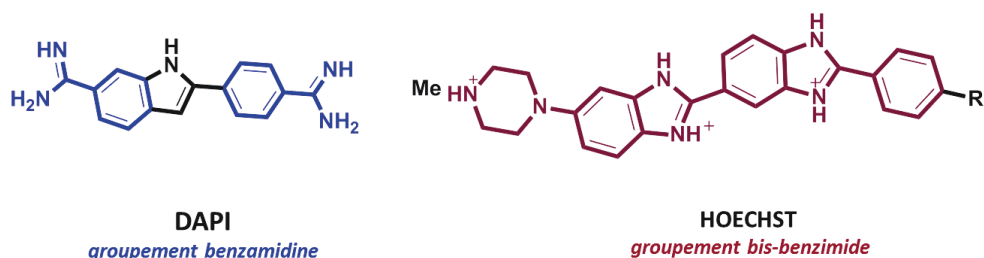


Figure 1. 29 : Fluorophores organiques interagissant via le petit sillon de l'ADN

Ces fluorophores interagissent avec tous les types d'ADN possédant un sillon de taille adapté.

Le ciblage de séquences spécifiques de l'ADN permettrait de détecter sélectivement des structures tertiaires comme **des structures tertiaires** les jonctions en épingle à cheveux formées lors de la transcription ou les quadruplex présents dans les télomères. Néanmoins, le développement d'outils de reconnaissance par liaisons hydrogène est délicat car la reconnaissance est basée sur de multiples liaisons hydrogène possédant des géométries précises. La présence d'un excédent de liaisons hydrogène ou d'un nombre de liaisons trop

faible entraînent une perte de spécificité de reconnaissance. L'élaboration de tels substrats est donc très délicate.

C'est pourquoi l'équipe du Pr. Hannon a développé des cylindres supramoléculaires de 1 nm de diamètre et 2 nm de long, composés de trois ligands pyridyl(imine) coordonnant deux ions Fer(II) (Figure 1. 30), pour mimer les hélices α des protéines possédant des motifs à doigts de zinc.¹³

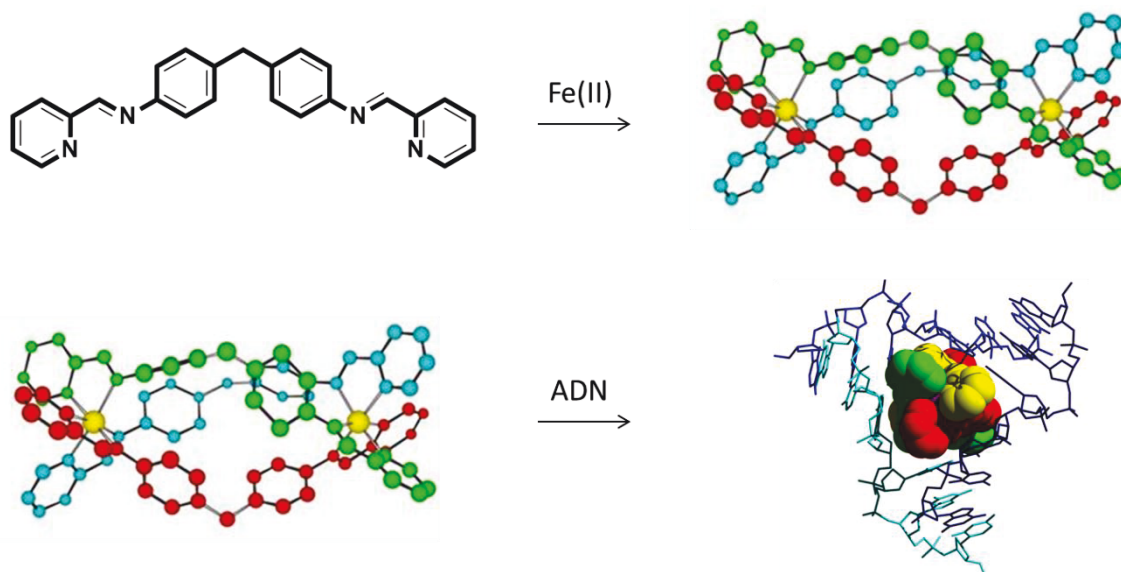


Figure 1. 30 : Haut : Conception d'une triple hélice cylindrique supramoléculaire capable d'interagir avec l'ADN.³³ Bas : Interaction du cylindre supramoléculaire (boules) avec un hexanucléotide d'ADN en épingle à cheveux (bâtonnets) au centre de la jonction (PBD 2ET0).³³

La taille du cylindre empêche toute interaction via le petit sillon de l'ADN. La cristallisation du cylindre en présence d'ADN a mis en évidence un nouveau mode de liaison à l'ADN par reconnaissance d'une jonction en épingle à cheveux spécifique dites en H. Le cylindre supramoléculaire de triple hélice est capable de détecter ces jonctions par interaction hydrophobe des phényles avec les bases de l'ADN au centre de la jonction. (Figure 1. 30) La substitution du Fe(II) par un métal inerte possédant des propriétés photophysique, le Ru(II), a permis le développement d'une triple hélice bis-ruthénium (II) présentant une augmentation du signal de fluorescence en présence d'une quantité croissante d'ADN.³⁴ Ce type de composé ouvre la voie vers des agents de ciblage métalliques pour la thérapie génique.

L'équipe de *Barton* aux États-Unis s'est aussi intéressée à la détection de l'ADN par des complexes métalliques. Elle a exploré une autre voie de reconnaissance et a été une pionnière dans le développement de complexes métalliques capable de reconnaître l'ADN via le phénomène d'intercalation.

I.5.1 Phénomène d'intercalation

Le phénomène d'**intercalation** dans l'ADN a été proposé par Léonard Lerman en 1961, pour caractériser l'interaction entre l'ADN et la proflavine, un tricycle aromatique de la famille des acridines (*Figure 1. 31*).³⁵ Les intercalants de l'ADN sont des molécules, généralement **planes, aromatiques et cationiques**, capables de reconnaître l'ADN par insertion entre deux paires de bases adjacentes. L'interaction repose donc sur le *π -stacking* entre les bases azotées de l'ADN et le composé intercalant. La présence de liaisons électrostatiques et de liaisons H supplémentaires stabilisent l'interaction de l'intercalant avec l'ADN. L'action d'un intercalant est donc double: induction de cancers dans des cellules saines par effet mutagène (perturbation d'une des trois étapes du dogme) ou effets cytotoxiques dans des cellules malades par inhibition des mécanismes de réparation.

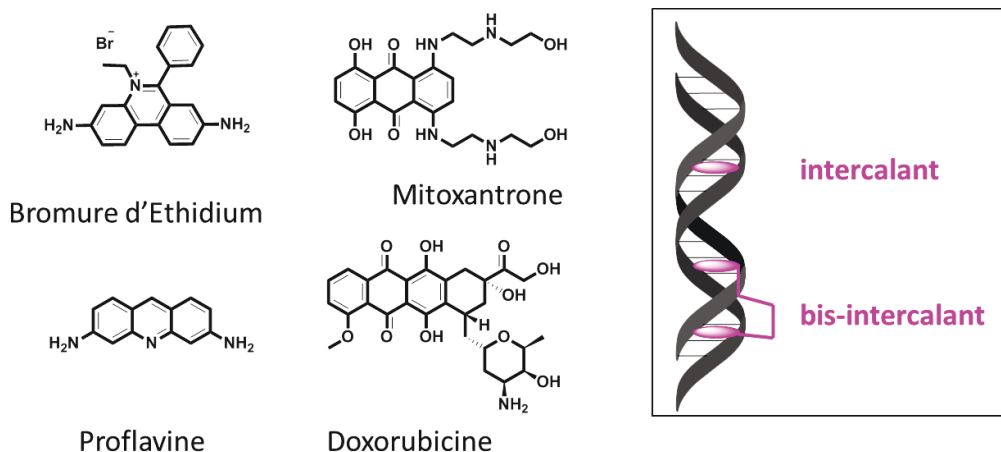


Figure 1. 31 : Structures d'intercalants connus de l'ADN. L'encart est une représentation schématique du phénomène d'intercalation d'un composé dans l'ADN.

Les intercalants de l'ADN sont très nombreux. On peut citer par exemple le **bromure d'éthidium (BET)** (*Figure 1. 31*) utilisé en biologie pour révéler l'ADN lors d'expérience de migration sur gel d'agarose. La toxicité du **BET** est reconnue par le classement CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) comme agent mutagène. C'est le noyau phénanthridinium qui s'intercale dans l'ADN. Les dérivés de l'acridine, comme la

proflavine, premier agent intercalant découvert, sont également utilisés en biologie pour marquer les cellules et permettre de visualiser les noyaux cellulaires. L'activité des proflavines est double: à la fois médicamenteuse par inhibition des enzymes télomérases dans les cellules malades mais également toxique, par intercalation dans les cellules saines. D'autres intercalants, comme le **mitoxantrone** ou la **doxorubicine** (famille des anthraquinones) sont des agents intercalant anticancéreux (*Figure 1. 31*).

Très peu d'intercalant reconnaissent spécifiquement une séquence d'ADN. L'utilisation de noyau intercalant pour étudier les mécanismes d'interaction avec l'ADN ne permet en général pas de cibler des sites spécifiques. Le couplage d'un noyau intercalant à un métal peut se révéler très efficace pour augmenter la spécificité de reconnaissance, absente pour l'intercalant seul.

I.5.2 Les complexes de reconnaissance intercalant de l'ADN

Comme dit précédemment, *Barton* fut une des pionnières dans le développement d'outils de reconnaissance de l'ADN par des complexes dit « métallo-intercalants ». La détection de l'interaction est alors possible grâce à la luminescence centrée sur le métal. La combinaison d'un composé intercalant et des propriétés luminescentes, dans l'infrarouge pour les métaux de transition ruthénium et rhodium, font de ces complexes d'excellentes sondes de l'ADN. L'équipe de *Barton* a montré que les complexes octaédriques de Rh(III), contenant au moins une unité intercalante permettaient une reconnaissance énantiosélective de l'ADN polymorphe B. La cristallisation du complexe $\Delta\text{-}\alpha\text{-}[\text{Rh}(\text{R,R})\text{Me}_2\text{trien}]\text{phi}^{3+}$ en présence d'un duplex octamérique d'ADN contenant la séquence cible 5'-TGCA-3', a permis l'obtention d'une des premières structures cristallographiques d'un complexe octaédrique intercalé dans une séquence spécifique d'ADN (*Figure 1. 32*).^{36, 37} Cette interaction spécifique par intercalation dans l'ADN est capable d'inhiber la reconnaissance de cette séquence par les protéines de liaisons à l'ADN.

D'un point de vue mécanistique, l'intercalation se déroule via le grand sillon de l'ADN (*Figure 1. 32*), avec le noyau aromatique *phi* en interaction de π -stacking avec les orbitales π des bases situées sur le flanc de l'ADN. La structure obtenue par diffraction des rayons X confirme également que lors de l'intercalation d'un composé entre les paires de bases de la double hélice, la structure de l'ADN s'étire. Les bases participantes s'affaissent, induisant un léger désenroulement du pas de l'hélice.

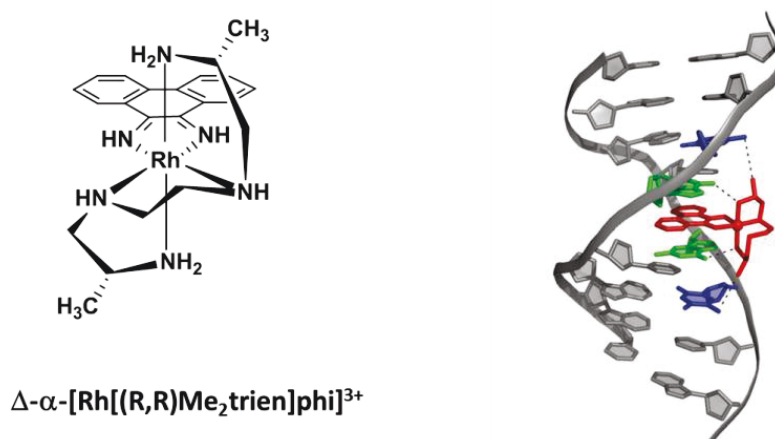


Figure 1. 32 : Structure du complexe $\Delta\text{-}\alpha\text{-}[\text{Rh}[(\text{R,R})\text{Me}_2\text{trien}]\text{phi}]^{3+}$ et la structure cristallographique ³⁸ (résolution 1.2 Å) de ce complexe en interaction avec un octamère d'ADN. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés.

La présence du Rh(III) coordonné au noyau ϕ permet d'induire une sélectivité de reconnaissance de l'ADN inexistante pour le composé ϕ libre. En effet le complexe métallique est chiral et induit spécificité de reconnaissance, détectable grâce à la luminescence du métal. Un autre exemple de ce phénomène est mis en évidence avec le complexe $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (Figure 1. 33). Ce complexe reconnaît l'ADN par intercalation d'un des trois noyaux phénanthrolines. La phénanthroline seule ne possède aucune sélectivité de reconnaissance de l'ADN et s'intercale toutes les deux paires de bases selon le « principe d'exclusion des plus proches voisins ». La coordination d'un ion Ru(II) permet une reconnaissance **énantiomérique** de l'ADN : les conformères droit et gauche ne reconnaissent pas les mêmes séquences d'ADN et ne s'intercalent pas de la même manière.

L'augmentation de la taille des noyaux intercalants permet d'augmenter l'affinité pour l'ADN, en augmentant la surface d'interaction entre les paires de bases et le composé. Le complexe $[\text{Ru}(\text{Phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ (Figure 1. 33) est un complexe intercalant de très haute affinité ($K_{\text{dissociation}} \approx 10^{-6} \text{ M}$),³⁹ conservant les propriétés chirales de reconnaissance du complexe $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$.

L'augmentation de la taille des cycles a également pour but d'augmenter la lipophilie des complexes, et ainsi de faciliter leur entrée dans les cellules.

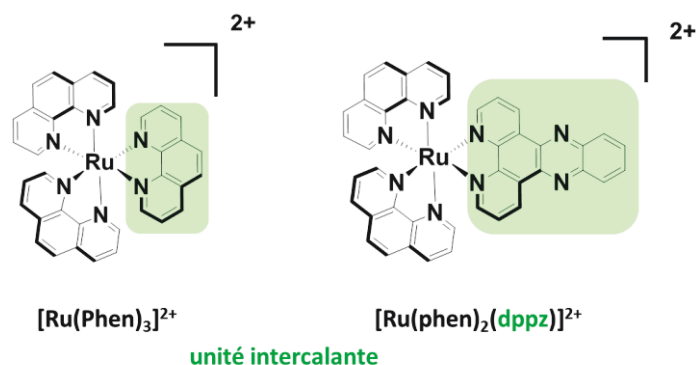


Figure 1. 33 : Complexes de ruthénium intercalant de l'ADN

Ces nouveaux complexes à cycle étendus interagissent également de manière différente selon leur conformation (droite ou gauche) et selon la séquence d'ADN. On distingue alors le phénomène de **métallo-intercalation** et de **métallo-insertion** (intercalation partielle). On ne peut cependant pas étendre la taille des aromatiques à l'infini, sous peine de perdre la capacité d'interaction avec l'ADN. En effet, avant de s'insérer entre les paires de bases, les complexes intercalant doivent être capables d'entrer via les sillons de l'ADN. Un composé trop gros et trop rigide ne s'orientera donc pas correctement.

Les complexes de la Figure 1. 34 sont une famille de complexes de rhodium(III) octaédriques possédant un noyau aromatique de la famille des chrysènes.^{40, 41}

La taille importante de leurs motifs de reconnaissance n'autorise pas une reconnaissance de l'ADN natif. Néanmoins le noyau *chrysi* une fois coordonné au métal, est capable de reconnaître un mésappariement entre les paires de bases. Il entre par le petit sillon du site tronqué et expulse la base non complémentaire. Ce sont les tous premiers complexes capables de reconnaître les sites thermodynamiquement instables de l'ADN avec une affinité micromolaire.

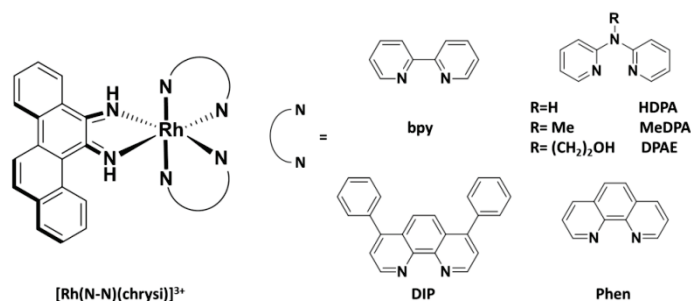


Figure 1. 34 : Complexes de la famille des chrysènes (*chrysi*) capable de reconnaître les bases non complémentaires dans une séquence d'ADN (bpy : bipyridine ; Phen : phénanthroline, HDBA : dipyridylamine ; MeDPA : méthyl-dipyridyl-amine ; DPAE : bis-disphénylarsinoethane ; DIP : di-phénylphénanthroline)

D'autres métaux possédant des propriétés spectroscopiques ont été étudiés et couplés à des unités de reconnaissance de l'ADN, comme les lanthanides. En effet, de par leurs propriétés spectroscopiques exceptionnelles, ils représentent des outils à fort potentiel pour étudier les interactions entre biomolécules.

Le complexe bis-intercalant hétérométallique « élément *f*-élément *d* » [*Nd*-*Pt*₂], développé par l'équipe de *Pikramenou* (Figure 1. 35B) est un exemple singulier de complexe intercalant. Il comporte deux complexes de métal de transition, le Pt(II), assurant l'interaction avec l'ADN et un métal *f* lanthanide : le néodyme (III) assurant la détection de l'interaction avec l'ADN grâce à ses propriétés de luminescence.

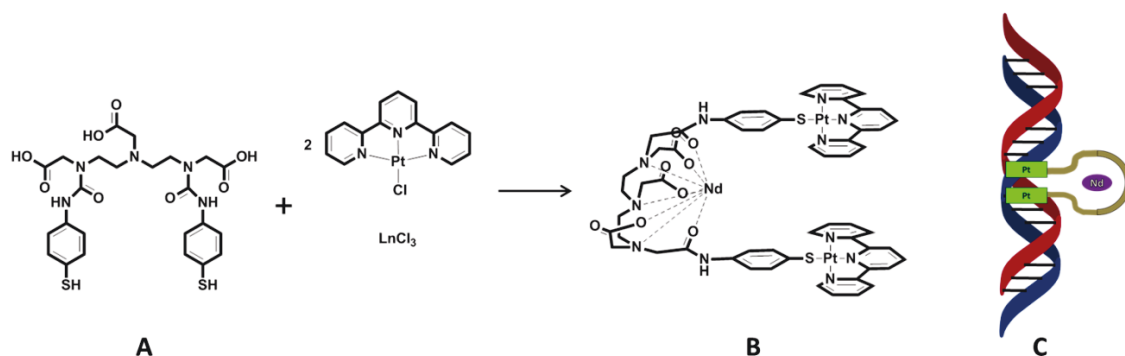


Figure 1. 35 : Schéma de synthèse « one pot » du complexe B intercalant hétérométallique [*NdPt*₂] et (C) schématisation de sa structure en épingle à cheveux en interaction avec l'ADN.⁴²

La simplicité de synthèse en « on-pot » du complexe (Figure 1. 35) et sa conformation spatiale en épingle à cheveux sont très originales. Des mesures de dichroïsme linéaire, permettant de visualiser l'orientation du complexe ($//$ ou \perp) par rapport à l'axe de la double hélice, ont montré que les noyaux terpyridines du complexe étaient perpendiculaires à l'axe de l'hélice de l'ADN, donc intercalés entre les paires de bases. L'espaceur polyiminodiacétate coordonnant l'ion néodyme se situe lui dans le sillon de l'ADN (Figure 1. 35C).⁴²

Des complexes de Ln³⁺ fonctionnalisés par d'autres noyaux intercalants ont été utilisés pour reconnaître l'ADN, comme le noyau anthraquinone dans le complexe [anthraquinone-(Gd(DOTA))₂],⁴³ le noyau phénanthridinium dans le complexe [Tb(phénanthridinium)] ou encore des dérivés chroméno-pyridinones dans le complexe [Tb(bis-chroméno-pyridinone)] (Figure 1. 36).⁴⁴

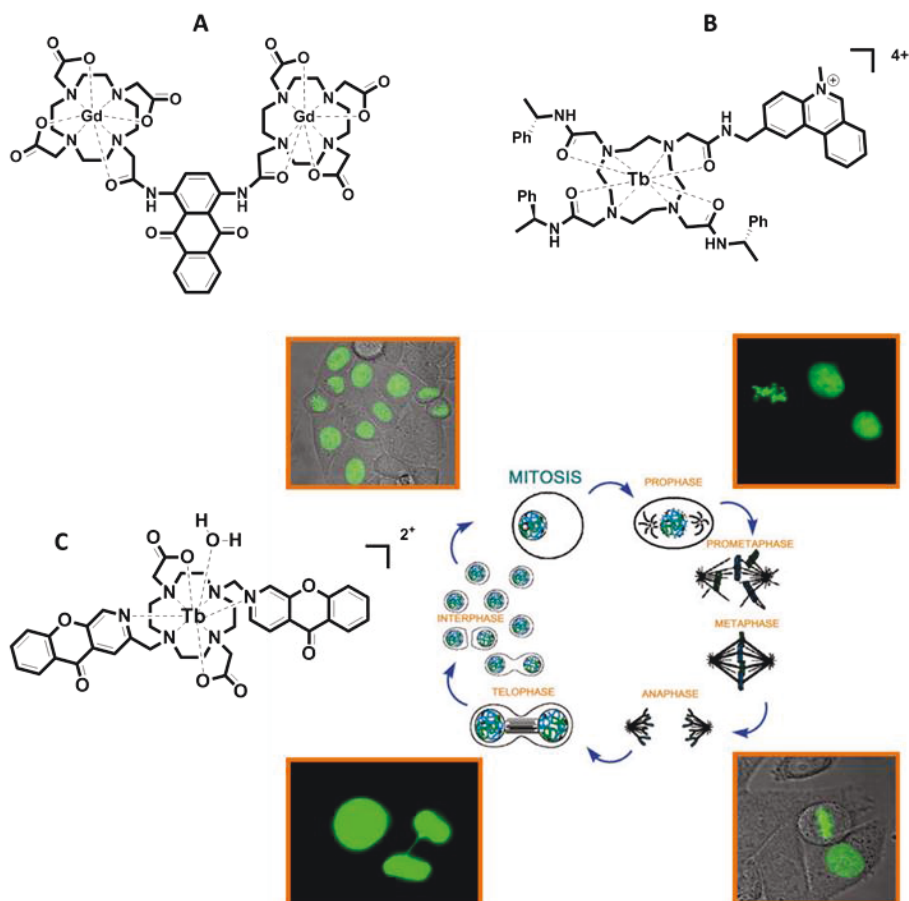


Figure 1. 36 : Complexes de lanthanides intercalant de l'ADN A) $[\text{anthraquinone}-(\text{Gd}(\text{DOTA}))_2]$ B) $[\text{Tb}(\text{phénanthridinium})]$; C) Complexe $[\text{Tb}(\text{bis-chromenopyridinone})]$ intercalant de l'ADN capable de détecter les différentes phases de la mitose. Image extraite de la référence ⁴⁴

Ces trois complexes possèdent un cation lanthanide qui permet de détecter la présence d'ADN grâce à la relaxivité pour le complexe de Gd^{3+} ou la luminescence de l'ion Tb^{3+} . Le complexe C de la Figure 1. 36 présente la capacité de détecter les différentes phases de la mitose cellulaire.

L'insertion d'un métal a donc permis de développer des sondes de l'ADN luminescentes et permet dans certains cas, d'augmenter la spécificité de reconnaissance. Cet axe de recherche est en conséquence, une aire de jeu pour le chimiste de coordination supramoléculaire. L'intérêt grandissant du développement de sondes capables de détecter des interactions supramoléculaires et les potentialités des ions lanthanides nous mène donc tout naturellement à nous intéresser à ces métaux.

Qu'est qu'un lanthanide ? Que sont les phénomènes de luminescence des ions Ln^{3+} et de relaxivité du Gd^{3+} ? Comment expliquer ces propriétés ? En répondant à ces questions, nous

Chapitre I I-L'ADN

pourrons exploiter librement et à notre avantage toutes les propriétés des lanthanides qui les rendent si singuliers.

II LES LANTHANIDES

«Les terre rares nous rendent perplexes dans nos recherches, nous déroutent dans nos spéculations et nous obsèdent dans nos rêves. Ils sont comme une mer inconnue s'étendant à nos pieds, railleuse et mystérieuse, nous murmurant d'étranges révélations et possibilités.»

Sir William Crookes

Chapitre I II-Lanthanides

L'utilisation des lanthanides comme sondes d'interactions supramoléculaires entre deux molécules nécessite de comprendre leur propriétés. La citation de Sir William Crookes reflète avec justesse la chimie si particulière de ces métaux.

Selon la nomenclature officielle de l'IUPAC (International Union of Pure Applied Chemistry), la série lanthanide (*Figure 1. 37*) regroupe les éléments de numéro atomique 58 (cerium) à 71 (lutécium). Si l'on ajoute le lanthane $Z=57$, on parle de la série des lanthanoïdes. Par un abus de langage ou coutume de laboratoire, on substitue très souvent le terme lanthanoïde par lanthanide. Si, dans cette série lanthanoïde, on inclut le scandium ($Z=21$) et l'yttrium ($Z=39$) on obtient la série des éléments appelés les terres rares.

Group →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Period ↓																		
1	1 H																	2 He
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba		72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra		104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Uut	114 Uuq	115 Uup	116 Uuh	117 Uus	118 Uuo
Lanthanides	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu			
Actinides	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr			

Figure 1. 37 : Tableau périodique

II.1 Historique

L'histoire des lanthanides débute en 1787 quand un lieutenant de l'Artillerie de l'armée suédoise, Carl Axel Arrhenius, découvre dans une carrière de Feldspath près d'Ytterby une étrange pierre noire. Le manque de personnel au département chimique de l'Université de Stockholm a repoussé les analyses de ce minerai à 1794 : un nouvel élément est alors découvert l'yttrium (Y). C'est le début de la chimie des lanthanides. Les propriétés inhabituelles de ces éléments et leur capacité à se « cacher » dans les minerais leur ont valu le nom de « terre rares ».

II.2 La chimie des lanthanides

Les métaux lanthanides sont les premiers éléments du tableau périodique à posséder des électrons dans leurs orbitales f. Leur configuration électronique générale est $[\text{Xe}] 4f^n 6s^2$ où $n = 1-14$ (sauf pour La $[\text{Xe}] 5d^1 6s^2$; Lu $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^1 6s^2$ et Gd $[\text{Xe}] 4f^7 5d^1 6s^2$).

Le degré d'oxydation prédominant des ions lanthanides en solution est +III (Ln^{3+}), bien que des espèces divalentes pour l'euprium et tétravalente pour le cérium aient été caractérisées.

Tableau 1. 1 : Propriétés des lanthanides : numéro atomique, configuration électronique et rayon ionique

Eléments	Lanthanides	Z	Configuration électronique		Rayon ionique (Å)
			Ln	Ln^{3+}	$\text{Ln}^{3+ \dagger}$
Lanthane	La	57	$[\text{Xe}]4f^0 5d^1 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^0$	1.160
Cerium	Ce	58	$[\text{Xe}]4f^1 5d^1 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^1$	1.143
Praséodyme	Pr	59	$[\text{Xe}]4f^3 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^2$	1.126
Néodyme	Nd	60	$[\text{Xe}]4f^4 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^3$	1.109
Prométhium‡	Pm	61	$[\text{Xe}]4f^5 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^4$	-
Samarium	Sm	62	$[\text{Xe}]4f^6 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^5$	1.079
Euprium	Eu	63	$[\text{Xe}]4f^7 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^6$	1.066
Gadolinium	Gd	64	$[\text{Xe}]4f^7 5d^1 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^7$	1.053
Terbium	Tb	65	$[\text{Xe}]4f^9 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^8$	1.040
Dysprosium	Dy	66	$[\text{Xe}]4f^{10} 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^9$	1.027
Holmium	Ho	67	$[\text{Xe}]4f^{11} 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^{10}$	1.015
Erbium	Er	68	$[\text{Xe}]4f^{12} 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^{11}$	1.004
Thulium	Tm	69	$[\text{Xe}]4f^{13} 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^{12}$	0.994
Ytterbium	Yb	70	$[\text{Xe}]4f^{14} 5d^0 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^{13}$	0.985
Lutécium	Lu	71	$[\text{Xe}]4f^{14} 5d^1 6s^2$	$[\text{Xe}]4f^{14}$	0.977

† Pour un nombre de coordination de 8

‡ Élément artificiel

L'enfouissement des électrons des orbitales f sous les couches 5s et 5p permet de les considérer comme des électrons de cœur et induit des propriétés chimiques particulières, partagées par presque tous les éléments de la série lanthanide.

Selon la classification de Pearson, les ions Ln^{3+} sont des acides durs et vont préférentiellement interagir avec des bases dures comme l'eau, les groupements hydroxo ou carboxylates. Du

fait de l'enfouissement des électrons f, l'influence du champ cristallin est très faible, de l'ordre de quelques centaines de cm^{-1} contre 3000 à 5000 cm^{-1} pour les métaux de transition. Le faible champ cristallin engendre une absence de directionnalité dans la liaison métal ligand et les liaisons seront majoritairement ioniques. La coordination des ligands autour du cation Ln^{3+} est donc régie par des effets stériques et électrostatiques. En conséquence, les complexes d'ions Ln^{3+} ont des géométries de coordination et des nombres de coordination variables (de 6 à 12). Enfin, le remplissage des couches f enfouies sous les couches 5s et 5p entraînent le phénomène de "contraction lanthanidique": le rayon ionique des lanthanides décroît régulièrement tout au long de la série. Toutes ces propriétés sont récapitulées dans le *Tableau 1. 1*.

II.2.1 Propriétés spectroscopiques des lanthanides

Chaque électron présent dans les orbitales f peut être caractérisé par les 4 nombres quantique n , l , ml et ms où :

- ✓ n est un nombre entier qui représente l'expansion radiale de l'orbitale
- ✓ l est le nombre quantique angulaire variant de $(n-1)$ à 0 représentant la forme des orbitales
- ✓ ml est le nombre quantique magnétique variant de $-l$ à $+l$
- ✓ ms est le moment magnétique de spin valant $\pm \frac{1}{2}$

La forme des 7 orbitales des électrons 4f ($n=4$ et $l=3$) est représentée sur la *Figure 1. 38*.

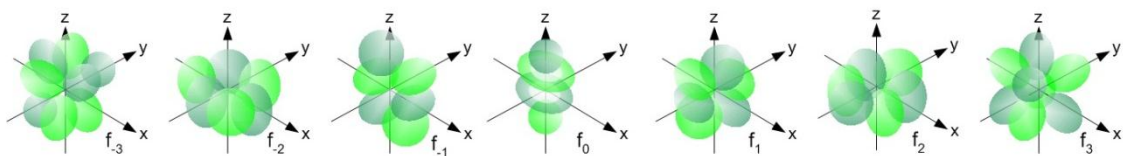


Figure 1. 38 : Orbitales atomiques 4f (http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Quantum_Mechanics/Atomic_Theory/Electrons_in_Atoms/Electronic_Orbitals)

La configuration électronique des cations lanthanides génère de nombreux états électroniques représentant le nombre de possibilités d'arrangement des électrons dans les orbitales. Ce nombre peut être calculé grâce à la formule $N = 14! / (n! (14 - n)!)$, où n représente le nombre d'électrons présents dans les orbitales de la couche 4f.⁴⁵ Cela représente 3003 états pour l' Eu^{3+} et le Tb^{3+} . Chacun de ces N états est décrit par le terme spectroscopique $(2S+1)L_J$, en fonction des perturbations (répulsion inter-électronique, couplage spin-orbite). Chaque niveau d'énergie est alors défini suivant sa multiplicité de spin totale S , son moment

Chapitre II-Lanthanides

orbitale total L et le moment cinétique total $\vec{J} = \vec{S} + \vec{L}$ dû au couplage spin-orbite, avec $|L - S| \leq J \leq |L + S|$, comme montré *Figure 1. 39* pour l' Eu^{3+} .

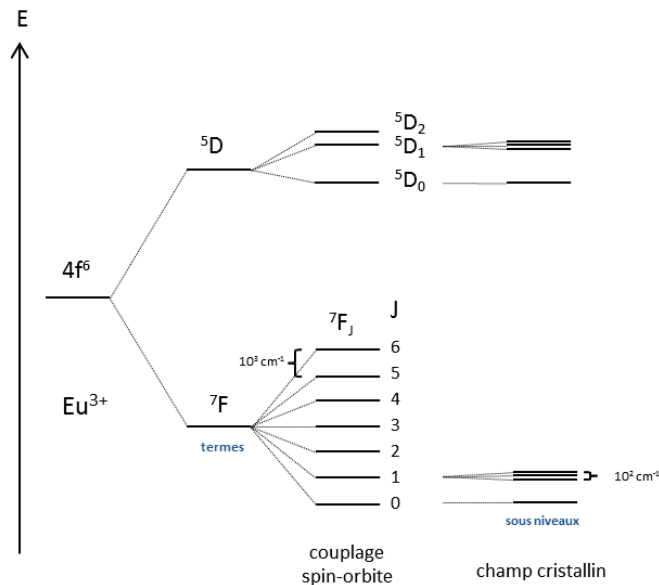


Figure 1. 39 : Représentations de niveaux électroniques $(2S+1)L_J$ de l'ion Eu^{3+}

L'état fondamental de chaque lanthanide est alors déterminé suivant les règles de Hund. Les nombres quantiques S et L doivent être les plus élevés et la somme de leur moment cinétique J sera égale à $L-S$ pour une sous couche f moins qu'à moitié pleine et à l'inverse sera égale à $L+S$ pour une sous couche à moitié ou plus qu'à moitié remplie. Les états électroniques des métaux lanthanides permettent d'étudier et de comprendre leurs propriétés de luminescence et leurs propriétés magnétiques.

II.2.2 Propriétés magnétiques des lanthanides

De configuration $[\text{Xe}]4f^7$, les propriétés magnétiques du Gd^{3+} résultent de son nombre de spin élevé $S=7/2$ et de son temps de relaxation électronique long de l'ordre de la nanoseconde. Ce cation paramagnétique influe fortement sur les temps de relaxation T_1 des spins nucléaires environnant. Cette propriété est exploitée pour mesurer la relaxivité des protons des molécules d'eau dans l'environnement de l'ion Gd^{3+} dans l'imagerie par résonance magnétique. En présence d'un champ magnétique constant, la relaxivité r ($\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$) est

Chapitre I II-Lanthanides

défini suivant l'équation 1, où \mathbf{i} représente la composante longitudinale ($\mathbf{i}=1$) ou axiale ($\mathbf{i}=2$) des spins nucléaires et $[\text{GdL}]$ représente la concentration de complexe de gadolinium.

$$r_i = \frac{1}{T_i^{\text{para}}} \times \frac{1}{[\text{GdL}]} \quad \text{Équation 1}$$

La relaxivité dépend de nombreux paramètres dont le champ magnétique B_0 appliqué. Elle dépend également des paramètres moléculaires du complexe comme le temps de corrélation rotationnelle du complexe τ_r , qui correspond à la vitesse à laquelle le complexe tourne sur lui-même en solution. Un autre paramètre influençant la relaxivité est la vitesse d'échange des molécules d'eau coordonnées au cation métallique avec les molécules d'eau du solvant, appelé τ_m . Plus celle-ci est grande, plus la relaxivité est élevée.

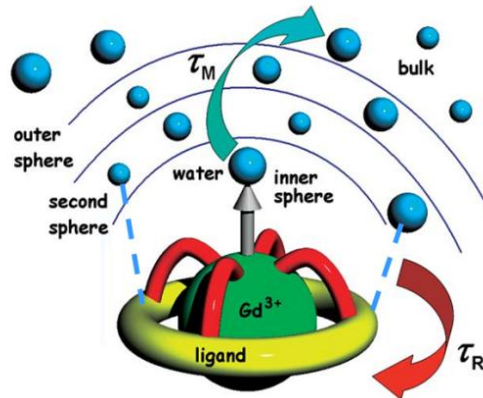


Figure 1.38 : Représentation du phénomène de relaxivité

Un autre paramètre important influençant la relaxivité est le nombre de molécules d'eau coordonnées au métal (appelé aussi nombre d'hydratation q). Plus le nombre d'hydratation est élevé, plus la relaxivité est grande. Cependant, la présence d'un nombre de molécule d'eau trop élevé dans la première sphère de coordination du Gd^{3+} déstabilise le complexe formé. C'est pourquoi ce nombre est généralement égal à 1 ou 2.

II.2.3 Propriétés de luminescence

Les propriétés optiques des lanthanides sont également exploitables pour détecter des interactions entre biomolécules.

Chapitre I II-Lanthanides

II.2.3.1 Définition

Le phénomène de luminescence est défini comme l'émission de photon associée à la désexcitation d'un spin électronique d'un état excité vers un état fondamental de plus basse énergie.

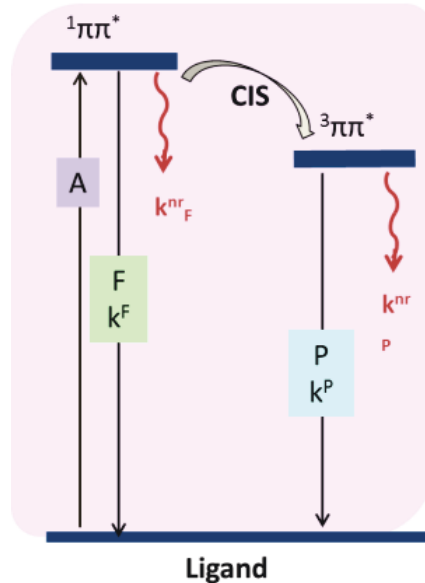


Figure 1. 40 : Diagramme de Jablonski simplifié représentant les transferts d'énergie possible d'un chromophore suite à une excitation lumineuse (état singulet $^1\pi\pi^*$, état triplet $^3\pi\pi^*$, A absorbance ; F fluorescence, P phosphorescence, CIS conversion intersystème ; k représente les constantes de vitesse, nr non radiative)

La luminescence regroupe le phénomène de fluorescence (pas de changement d'état de spin $\Delta S=0$ entre les états excités $^1\pi\pi^*$ et fondamental $^1\pi\pi$) et le phénomène de phosphorescence (variation du nombre de spin $\Delta S \neq 0$ de l'état excité $^3\pi\pi^*$ au fondamental $^1\pi\pi$). Le diagramme de Jablonski (Figure 1. 40) représente ces deux mécanismes. Le passage d'un état de spin singulet à triplet est appelé conversion intersystème (CIS).

Ces processus radiatifs se déroulent sur des échelles de temps différentes : les temps de vie des niveaux excités de fluorescence sont de 10^{-12} à 10^{-6} secondes (s), alors que les temps de vie des niveaux excités de phosphorescence sont de 10^{-6} à 10^0 secondes.

II.2.3.2 La luminescence des lanthanides

À l'exception de La^{3+} et Lu^{3+} , tous les ions Ln^{3+} sont luminescents, avec des émissions radiatives couvrant toute la gamme spectrale : de l'UV pour l'ion Gd^{3+} au proche infra-rouge (Nd^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} , Ho^{3+}) en passant par une émission dans le visible pour l' Eu^{3+} dans le rouge

Chapitre I II-Lanthanides

et le Tb^{3+} dans le vert. Ces propriétés de luminescences sont gouvernées par les niveaux énergétiques (excités et fondamentaux) des électrons 4f. La luminescence des lanthanides est très particulière, car les bandes d'émissions très fines sont caractéristiques du métal émetteur. De plus, un large déplacement de Stokes et des temps de vie des niveaux excités longs (de la μs pour une émission dans le proche IR à la ms dans le visible) en font d'excellents candidats pour le développement de sondes luminescentes.

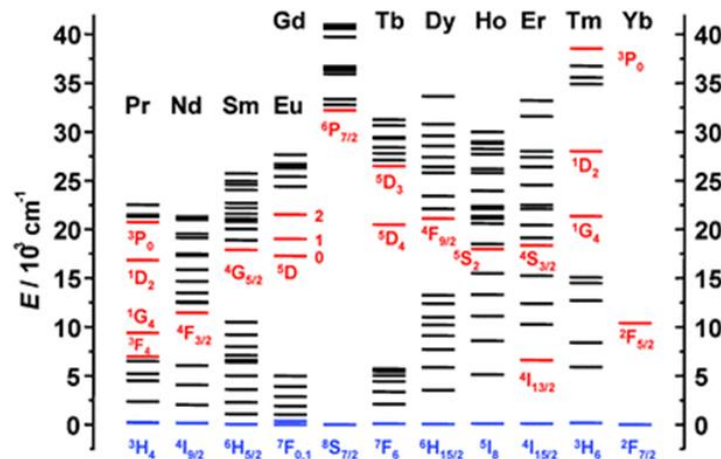


Figure 1. 41 : Diagramme partiel des niveaux d'énergies des ions lanthanides. Les états impliqués dans le phénomène de luminescence sont indiqués en rouge et les états fondamentaux en bleu.⁴⁶

II.2.3.3 Sensibilisation et effet d'antenne

Les propriétés de luminescence des lanthanides, dues à la présence des électrons dans les orbitales 4f sont particulièrement attractives mais ceux-ci sont également leur « *talons d'Achille* ».

Transition électronique et règle de sélection

En effet, selon la nature de la lumière absorbée, les transitions électroniques entre les niveaux énergétiques fondamentaux et excités sont régies par différents opérateurs : électrique dipolaire (ED), magnétique dipolaire (MD) et électrique quadripolaire (QD).

La règle de sélection dite de Laporte impose que la différence entre la somme des moments angulaires des électrons à l'état final et à l'état initial soit un nombre entier impair. Cela signifie que des états énergétiques de même parité ne peuvent être connectés par des transitions de type dipôle électrique. Les transitions f-f et p-p sont donc interdites par l'opérateur ED, d'où le coefficient d'absorptivité molaire faible des Ln^{3+} (\leq quelques $cm^{-1}M^{-1}$). Les autres règles s'appliquent au nombre quantique **J**, **L** et **S** définissant chaque

état électronique. Les transitions pour lesquelles $\Delta S=0$, $\Delta L=0$ et $\Delta J=0\pm 1$ sont autorisées alors que celles où $\Delta J 0\rightarrow 0$ sont interdites.

La luminescence des lanthanides est la conséquence de transitions de trois natures différentes :

- Des transitions à transferts de charges entre le ligand et le métal (LMCT) et inversement (MLCT)
- Des transitions 4f-5d
- Des transitions f-f

Les transitions à transfert de charge et de type **d-f** sont autorisées par les règles de sélections, mais se déroulent à haute énergie. Les transitions de type **f-f** sont interdites. Cependant, placées dans un environnement chimique adapté (champs cristallin par exemple), les interactions non centrosymétriques vont permettre de relaxer cette règle par un couplage entre les états électroniques /vibrationnels des fonctions d'ondes de différentes parités. C'est ce qu'on nomme des transitions induites ou forcées. L'intensité de ces transitions est dépendante de l'environnement et sont appelées transitions hypersensibles.

Seule une excitation par des sources très puissantes, comme des lasers, permet une luminescence intense. Il est donc nécessaire de doper la luminescence des ions lanthanides pour obtenir des sondes luminescentes adéquates : c'est ce que l'on appelle la sensibilisation par *effet d'antenne*.⁴⁷

La sensibilisation par effet d'antenne

Le phénomène de sensibilisation a été mis en évidence pour la première fois par Weissman en 1942,⁴⁸ en étudiant la complexation des lanthanides par des ligands aromatiques substitués par des β -dicétones, des acides carboxyliques ou des groupements alcools. Il a montré que l'intensité de luminescence du métal était dépendante de la température, du solvant mais surtout de la nature du ligand : c'est la première description d'une sensibilisation par un transfert d'énergie du ligand chélatant vers le cation lanthanide. *L'effet d'antenne* est donc une excitation indirecte de l'ion lanthanide *via* un transfert d'énergie d'un ligand vers le cation métallique. C'est un processus en trois étapes : absorption de la lumière par le chromophore organique, transfert de l'énergie au lanthanide puis émission de lumière à une longueur d'onde définie par le lanthanide. Le chromophore utilisé doit donc avoir un fort potentiel d'absorption (un coefficient d'absorption molaire élevé) pour sensibiliser efficacement le lanthanide.

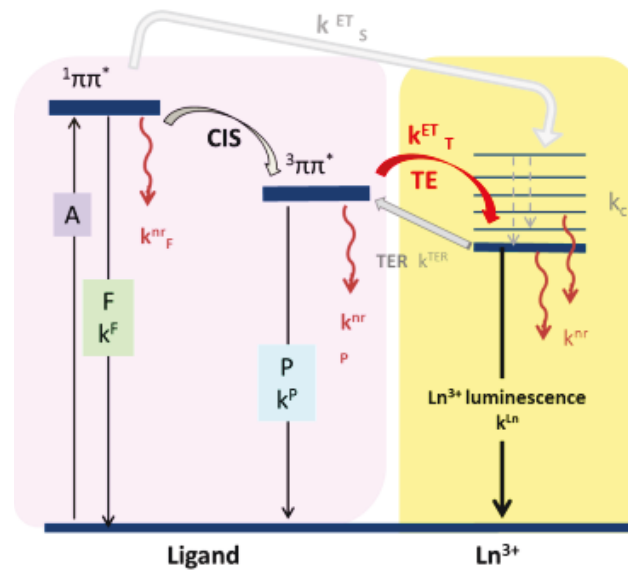


Figure 1. 42 : Diagramme simplifié des transferts d'énergie possibles dans un complexe de Ln^{3+} après irradiation (état singulet $^1\pi\pi^*$, état triplet $^3\pi\pi^*$, A absorbance ; F fluorescence, P Phosphorescence, CIS conversion intersystème, TE Transfert d'énergie, TER transfert d'énergie en retour, S singulet, T triplet, nr non radiatif, ci conversion interne)

La sensibilisation des ions lanthanides peut être représentée grâce à différents mécanismes schématisés sur le diagramme de la Figure 1. 42. Le chromophore organique absorbe la lumière et peuple son état singulet $^1\pi\pi^*$. L'électron peut alors se désactiver par des émissions radiatives de fluorescence. Ce dernier peut aussi passer sur un état triplet excité $^3\pi\pi^*$ de plus faible énergie par une conversion intersystème. La présence de métaux lourds comme les ions lanthanides, renforce le couplage spin-orbite et accélère le phénomène de conversion de spin intramoléculaire de l'état singulet vers l'état triplet du ligand. L'énergie est ensuite transférée vers un état émissif excité de l'ion lanthanide. Les transferts d'énergie de l'état singulet $^1\pi\pi^*$ du ligand vers les Ln^{3+} sont possibles, mais ne sont pas prédominants.^{49, 50}

L'état triplet $^3\pi\pi^*$ du ligand est déterminant dans le processus de sensibilisation afin de permettre un transfert d'énergie efficace vers les niveaux excités émissifs des ions lanthanides. L'efficacité du transfert d'énergie chromophore-lanthanide est déterminée selon le rendement quantique de luminescence de l'ion Ln^{3+} selon l'équation 2.

$$\phi_{\text{Ln}}^{\text{L}} = \eta_{\text{sens}} \times \phi_{\text{Ln}}^{\text{Ln}} \quad \text{Équation 2}$$

$\phi_{\text{Ln}}^{\text{L}}$ représente le rendement quantique total et $\phi_{\text{Ln}}^{\text{Ln}}$ le rendement intrinsèque du cation lanthanide dans le complexe. η_{sens} représente l'efficacité de transfert d'énergie de

sensibilisation du ligand L vers le lanthanide Ln. Les deux facteurs peuvent être optimisés afin d'assurer un fort signal de luminescence des ions lanthanides.

Le mécanisme de transfert d'énergie

L'état triplet du ligand doit être situé à un niveau énergétique estimé à 2500-3000 cm^{-1} par rapport au niveau excité émissif du lanthanide pour optimiser l'efficacité de transfert d'énergie et ainsi limiter les phénomènes de transferts d'énergie en retour (TER).⁵¹ Le transfert d'énergie de ligand vers un état émissif excité de plus basse énergie de l'ion lanthanide peut se dérouler selon deux processus différents : un mécanisme d'échange électronique dit de **Dexter** ou un mécanisme dit dipolaire de **Förster** (Figure 1. 43).

Comme représenté sur la Figure 1. 43, le mécanisme de **Dexter** est un double échange électronique. Un bon recouvrement des orbitales du ligand et du métal est donc essentiel, et de ce fait n'est efficace que sur de courtes distances (30-50 pm). De par la contraction spatiale des orbitales f des ions Ln^{3+} , ce phénomène est peu probable.

Le mécanisme de **Förster** repose lui sur des interactions dipôle-dipôle entre les états excités donneur du ligand ($^3\pi\pi^*$) et les états excités accepteur du métal, et est efficace sur des distances donneur-accepteur allant jusqu'à 1000 pm.

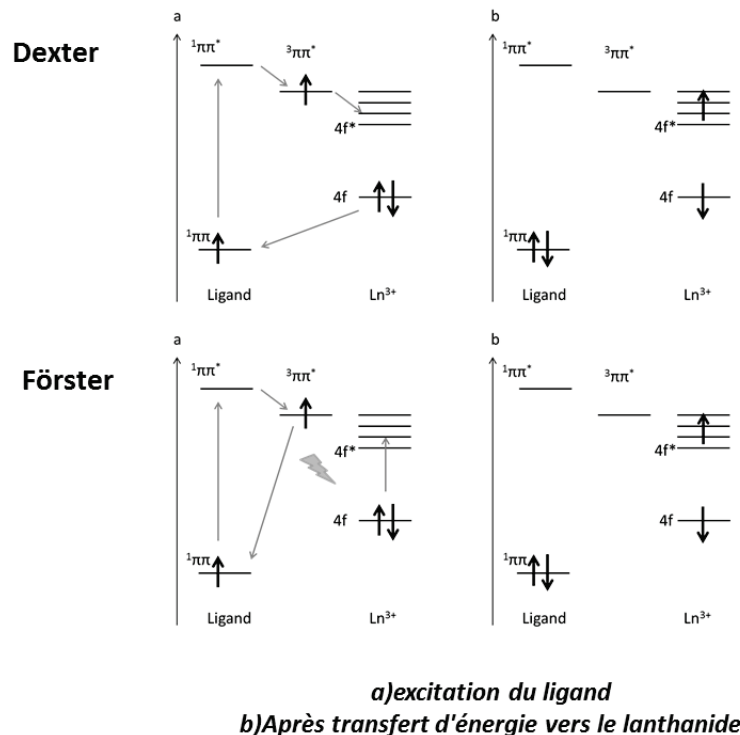


Figure 1. 43 : Mécanisme de transfert de Dexter et Förster avant et après désexcitation du ligand

Le rendement du transfert d'énergie est fonction du recouvrement des intégrales J entre le spectre d'émission du donneur (ligand) et le spectre absorption de l'accepteur (lanthanide). C'est le mécanisme majeur de transfert d'énergie par *effet d'antenne* des ions lanthanides.⁴⁵

Les désactivations non radiatives

Le diagramme *Figure 1.42* montre que la luminescence est un phénomène en compétition avec les désactivations non radiatives. Celles-ci sont majoritairement des vibrations des liaisons O-H, N-H proches du centre métallique, comme par exemple les liaisons O-H des molécules d'eau. Il est de ce fait important de contrôler la sphère de coordination de l'ion Ln^{3+} . Leurs nombres de coordination élevés impliquent que le ligand utilisé pour coordonner l'ion Ln^{3+} soit **multidentate**, dans le but de minimiser les extinctions de luminescence due aux désactivations non radiatives provenant des molécules d'eau coordonnées aux cations lanthanides.

Le rendement quantique intrinsèque $\Phi_{\text{Ln}}^{\text{Ln}}$ traduit la contribution des désactivations non radiatives, comme explicité dans l'équation 3.

$$\Phi_{\text{Ln}}^{\text{Ln}} = k_r^{(\text{Ln})} / ((k_{\text{nr}}^{(\text{Ln})} + k_r^{(\text{Ln})}) \quad \text{Équation 3}$$

Φ représente le rendement quantique. Il est défini comme le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés par la molécule. k_r et k_{nr} représentent les constantes de désactivations du niveau excité en considérant respectivement les contributions radiatives et non radiatives. Le temps de vie du niveau excité du métal noté τ (équation 4) traduit la vitesse de dépopulation de l'état excité (k^{obs}).

$$\tau = \frac{1}{k^{\text{obs}}} \quad \text{Équation 4}$$

La constante de dépopulation k^{obs} (équation 4) est la somme des divers processus de désactivation. k^{vib} est la constante de vibration induite et k^{TEP} le taux de transfert d'électrons photoinduits. k^{nr} représente toutes les désactivations restantes.

$$k^{\text{obs}} = k^r + \sum_i k_i^{\text{nr}} = k^r + \sum_i k_i^{\text{vib}} + \sum_j k_j^{\text{TEP}} + \sum_k k_k^{\text{nr}'} \quad \text{Équation 5}$$

Le phénomène de Transfert d'Électron Photoinduit (TEP) est une réduction de l'Eu(III) en Eu(II).

La conception de ligand de haute denticité permet d'obtenir des nombres de coordination élevés de l'ion Ln^{3+} , en saturant au maximum la première sphère de coordination. De cette

manière, les désactivations non radiatives (k^{nr}) dues aux vibrations des liaisons des molécules de solvant sont minimisées. La contribution des vibrations de molécules d'eau au signal de luminescence des ions Ln^{3+} peut être estimée par des équations phénoménologiques^{52, 53} (équation 6) permettant de calculer le nombre de molécule d'eau q (ou nombre d'hydratation) coordonnées au centre métallique

$$q = A \left(k_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{vib}} - k_{\text{D}_2\text{O}}^{\text{vib}} \right) = A \times \left(\frac{1}{\tau_{\text{H}_2\text{O}}} - \frac{1}{\tau_{\text{D}_2\text{O}}} \right) \quad \text{Équation 6}$$

A représente une constante expérimentale, k^{vib} les contributions vibrationnelles au signal de luminescence. k^{vib} est déterminé expérimentalement en mesurant la décroissance du signal de luminescence du complexe Ligand- Ln^{3+} dans l'eau légère et dans l'eau lourde.

En effet, les fréquences de vibrations des liaisons O-D sont 200 fois plus faibles que celles des liaisons O-H (fréquence de vibration de stretching $\sim 3300\text{cm}^{-1}$). Dans l'eau lourde, les oscillateurs possédant des protons échangeables type N-H (ν stretching $\sim 3300\text{cm}^{-1}$) ou O-H ne contribuent plus à l'extinction du signal de luminescence des ions Ln^{3+} . Ce calcul ne rend cependant pas compte des désactivations non radiatives provenant des fréquences de vibrations des liaisons C-H ($\nu \sim 3000\text{cm}^{-1}$). Donc plus le nombre de molécule d'eau est élevé, plus le signal de luminescence est faible.

II.3 Exploitation des propriétés des lanthanides

II.3.1 Applications industrielles

De par les coûts élevés de production et d'extraction de leurs minerais, il n'y avait que très peu d'applications industrielles des lanthanides au début du XIX^{ème} siècle, mis à part en métallurgie où ils étaient utilisés pour conférer une résistance élevée aux matériaux de construction : on nomme ces alliages des métaux *mish* (de l'allemand signifiant *métaux mixtes*). L'un de ces alliages, le métal *Auer* (du nom de son découvreur Carl Auer von Welsbach), est un mélange de cérium et de fer capable de produire une étincelle lorsqu'il est frappé : c'est le principe de la pierre à briquets.

Le développement industriel de techniques de production de lanthanides moins coûteuses, ont accéléré leur utilisation dans de nombreuses applications. Ils sont aujourd'hui utilisés comme

catalyseurs de réactions chimiques, comme lors de la réaction d'oxydation sélective des alcools secondaires par l'utilisation d'un catalyseur à base de Ce(IV).⁵⁴

Les propriétés de luminescence des ions lanthanides sont exploitées dans les téléviseurs couleurs et autres écrans tactiles de nouvelle génération, pour lesquels les oxydes d'euporium et d'yttrium rouges sont utilisés. Certains de ces écrans, notamment ceux des téléviseurs, contiennent du praséodyme et du néodyme afin de réduire l'éblouissement. D'autres composés de lanthanides sont utilisés dans les technologies optiques comme les lasers, les lampadaires, les projecteurs, et l'éclairage de haute intensité présent dans les stades.

Ils sont aussi utilisés dans l'industrie nucléaire pour leurs capacités à absorber les neutrons. Cela les rend très utiles dans les barres de contrôle régulant les réacteurs nucléaires, ainsi que dans le blindage des éléments de structure des réacteurs. Finalement certains composés de lanthanides sont utilisés dans l'industrie des aimants, comme par exemple le mélange cobalt-samarium qui produit un puissant aimant permanent.

II.3.2 Applications pour le vivant

Comme les lanthanides sont toxiques à l'état de cation libre dans le corps humain, ils doivent être sous forme de complexe avec un ligand afin de pouvoir être utilisé pour le vivant. Ce complexe doit avoir une stabilité suffisante pour éviter toute dissociation à pH physiologique. Plus les complexes sont stables, meilleures sont les chances de pouvoir les utiliser comme sondes *in vivo*. *In vitro*, une stabilité plus modérée, évitant les transferts de métaux indésirables, est suffisante.

II.3.2.1 Exploitation des propriétés magnétiques

L'influence du Gd^{3+} sur le phénomène de relaxivité des spins nucléaires des protons de l'eau permet son utilisation comme agent de contraste pour l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Les agents de contrastes à base de Gd^{3+} utilisés en clinique appartiennent à la famille dite T_1 , car le Gd^{3+} influence la composante longitudinale de relaxation des spins des molécules d'eau. Plus la composante T_1 est courte, plus la relaxivité est grande et donc plus efficace est l'agent de contraste.

Les complexes de Gd^{3+} approuvés en clinique sont conçus sur des plateformes chimiques dérivés du cyclène comme le DOTA ou de polyamines linéaires comme le DTPA.⁵⁵ Les

Chapitre I II-Lanthanides

agents de contraste commerciaux, ainsi que la structure des ligands sont représentés dans le *tableau 1.2* et sur la *figure 1.45*.

*Tableau 1. 2 : Complexes de Gd^{3+} utilisés en clinique comme agents de contrastes pour l'IRM. Les relaxivités données sont mesurées à 20 MHz, pH 7.3 et 25°C (*40°C).⁵⁵*

Formule chimique	Nom commercial	r_1 (mmol ⁻¹ .L.s ⁻¹)
$[Gd(DTPA)H_2O]^{2-}$	Magnevist	4.3
$[Gd(DOTA)H_2O]$	Dotarem	4.2
$[Gd(DTPA-BMA)H_2O]$	Omniscan	4.39
$[Gd(HP-DO_3A)H_2O]$	ProHance	3.7*
$[Gd(BOPTA)H_2O]^{2-}$	MultiHance	5.2

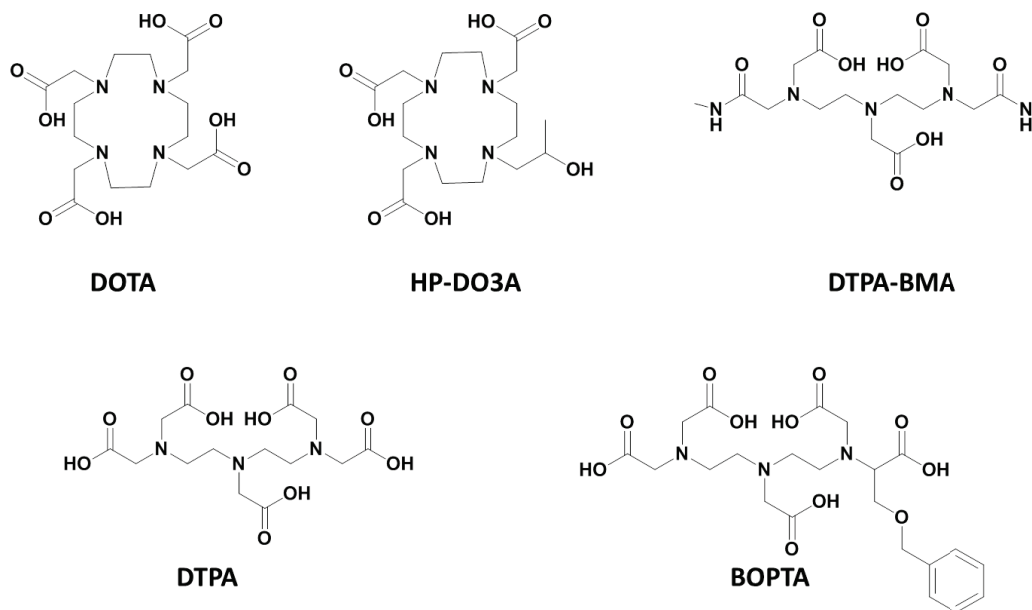


Figure 1. 44 : Ligands du Gd^{3+} dont les complexes sont utilisés en clinique comme agents de contraste IRM

II.3.2.2 Exploitation des propriétés de luminescence

Le besoin de méthodes de détection non invasive pour le diagnostic de pathologies comme le cancer met sur le devant de la scène tous les outils lumineux existants. En effet, grâce à l'émission de lumière, il est possible de visualiser la zone malade. Les fluorophores organiques ont des émissions très intenses mais sont sensibles au photoblanchiment. De plus,

Chapitre I II-Lanthanides

la fluorescence résiduelle du milieu cellulaire (tryptophane, tyrosine) diminue la sensibilité des mesures en interférant avec le signal de fluorescence du fluorochrome.

Les propriétés spectroscopiques très attractives des lanthanides permettent de s'affranchir de la fluorescence résiduelle du matériel biologique, grâce à aux temps de vie longs de leurs états excités. En effet, après l'excitation du chromophore, un délai est imposé avant la mesure et permet ainsi de supprimer la fluorescence à court temps de vie (ligand ou milieu biologique). Le signal lumineux enregistré provient alors uniquement de la luminescence de l'ion Ln^{3+} . C'est cette différence d'échelle de temps de vie entre les niveaux de vies excités entre des ions Ln^{3+} et des chromophores organiques qui permet d'effectuer des mesures de luminescence en temps résolu (*Figure 1. 45*) et d'augmenter significativement le rapport signal sur bruit.

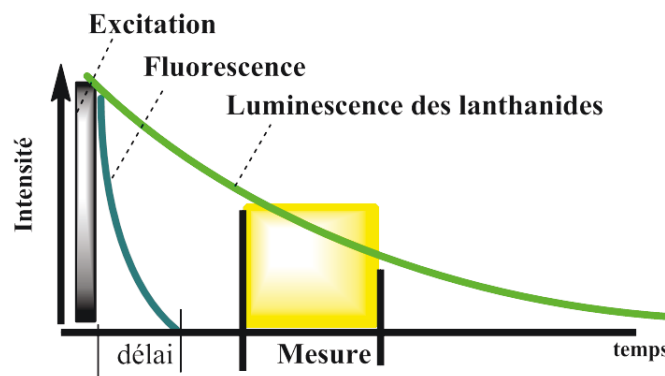


Figure 1. 45 : Représentation schématique des mesures de luminescence en temps résolu.

Les essais immunologiques:

Un bioconjugué est une espèce non biologique (complexe métallique, fluorophore organique, molécule organique) liée à une biomolécule. Le couplage de complexes de lanthanides à des anticorps spécifiques monoclonaux forme des complexes luminescents Ln^{3+} bioconjugué. Ces bioconjugués ont été développés comme d'outils diagnostiques luminescents (*Figure 1. 46*).

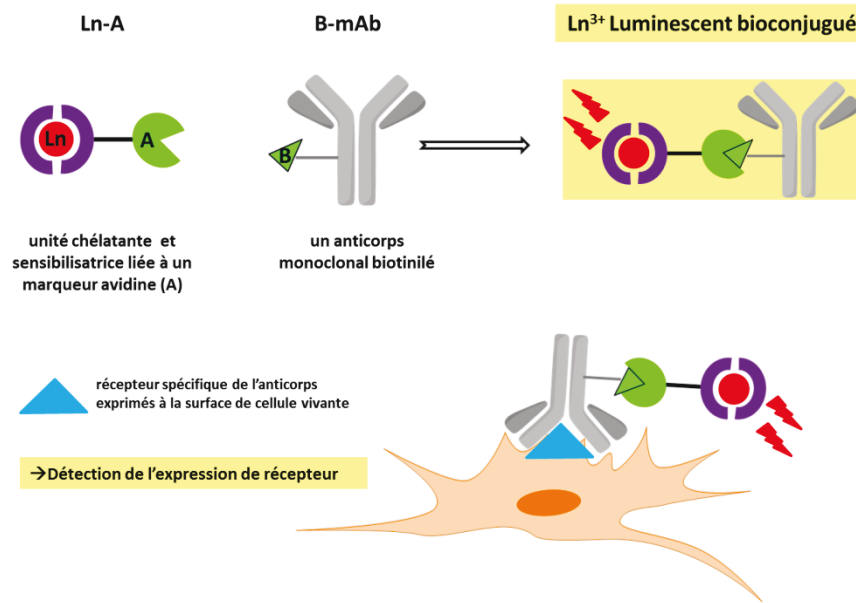


Figure 1. 46 : Représentation schématique de la formation d'un complexe de Ln^{3+} bioconjugué basé sur une interaction spécifique avidine-biotine. Ce complexe bioconjugué est capable de reconnaître l'expression spécifique de récepteurs à la surface des cellules grâce à la luminescence centrée sur le métal.

L'ion lanthanide est coordonné par une unité chélatante sensibilisatrice, couplé à un marqueur avidine. Ce complexe, noté **Ln-A**, reconnaît spécifiquement les anticorps marqués avec de la biotine, noté **B-mAb**, pour former un complexe de Ln^{3+} bioconjugué. La reconnaissance antigène-anticorps spécifique des Ln^{3+} bioconjugués, mesurée grâce à la luminescence du signal de l'ion lanthanide, permet la détection des substrats ciblés, comme par exemple l'expression de récepteur spécifique à la surface des cellules.⁵⁶ C'est donc la luminescence centrée sur le métal qui permet la détection.

Des essais immunologiques en phase hétérogène, commercialisés sous le nom de DELFIA, permettent la détection de substances sanguines/urinaires toxiques. Le composé toxique à détecter, lié à un agent de reconnaissance, est fixé sur un support solide. Il est ensuite mis en réaction avec le bioconjugué Ln-anticorps spécifique du métabolite cible. Ce complexe bioconjugué Ln-anticorps-analyte n'est initialement que très faiblement luminescent. Après passage dans une solution acide contenant des agents surfactants, les sites reconnus par les bioconjugués lanthanides sont coupés et convertis en complexes intensément luminescents. L'augmentation de luminescence découle de la formation de micelle protectrice autour du complexe de Ln^{3+} . La technique de luminescence des Ln^{3+} en temps résolu permet alors de détecter la présence de l'analyte (antigène, stéroïde, hormone) par augmentation du signal enregistré (Figure 1. 47).

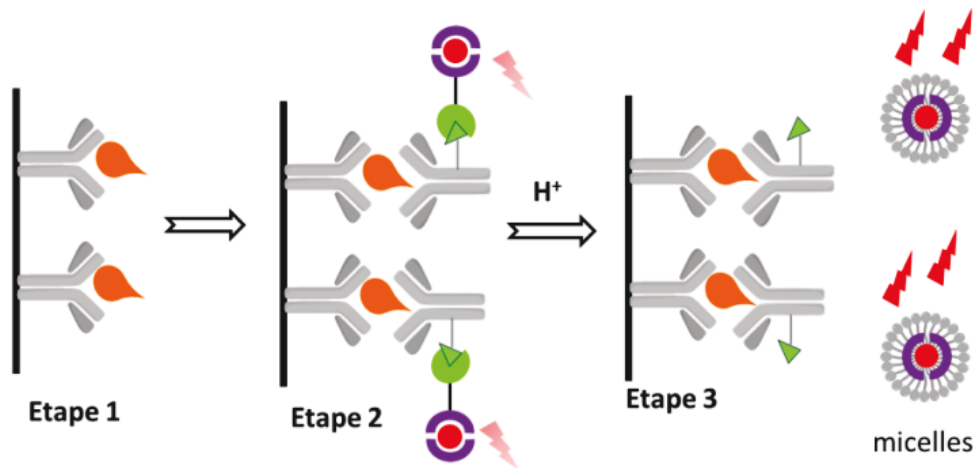


Figure 1. 47 : Représentation du principe des tests immunologiques en phase hétérogène. L'étape 1 est la reconnaissance de la toxine (orange) par les anticorps fixés sur un support. L'étape 2 est la reconnaissance du substrat « toxine-anticorps » par un Ln^{3+} bioconjugué. Le substrat sandwich formé est faiblement luminescent. L'étape 3 permet le relargage d'un complexe de Ln^{3+} très luminescent qui peut alors être dosé. (figure inspirée de la référence⁵⁶)

Des tests immunologiques en phase homogène sont également disponibles. Basés sur le principe de donneur-accepteur, la présence de la toxine est détectée par un transfert d'énergie de l'ion Ln^{3+} vers un chromophore accepteur.⁵⁶

Les sondes intelligentes

Les sondes dites intelligentes sont sensibles à des propriétés importantes du milieu biologique comme la concentration en oxygène, le pH ou la présence d'ions essentiels ou toxiques.

La présence d'oxygène singulet est très nocive car elle induit des oxydations en cascade du matériel biologique. Il est impliqué dans la signalisation cellulaire, induit l'expression de gènes et éventuellement conduit la cellule en apoptose. Cette dernière propriété de l' $^1\text{O}_2$ est utilisée dans les traitements de photothérapie contre le cancer, où il est généré photodynamiquement *in situ* en réponse à un transfert d'énergie. Il est donc important de contrôler son taux de présence *in cellulo*. Malheureusement, la faible émission de l'oxygène singulet rend toute mesure difficile à pH physiologique.

Les états émissifs des ions lanthanides ne sont pas *quenchés* par la présence d'oxygène. Néanmoins l'état triplet du ligand est sensible à l'oxygène. Donc, comme le taux de quenching de l'état triplet du ligand par l'oxygène est en compétition avec le transfert d'énergie ligand- Ln^{3+} , l'émission de luminescence de l'ion lanthanide est sensible à la présence d'oxygène.⁵⁷ C'est pour cela que des sondes spécifiques luminescentes dérivés des

Chapitre I II-Lanthanides

lanthanides ont été conçues par l'équipe de *Yuan*.^{58, 59} Le ligand **H₄L20**, forme en présence d'euprium un complexe de très haute stabilité ($\log K_{\text{affinité}} \sim 21$) qui en réagissant spécifiquement avec l' $^1\text{O}_2$ donne le complexe endoperoxydé **Eu(EpL20)⁻** (*Figure 1. 48*) fortement luminescent.

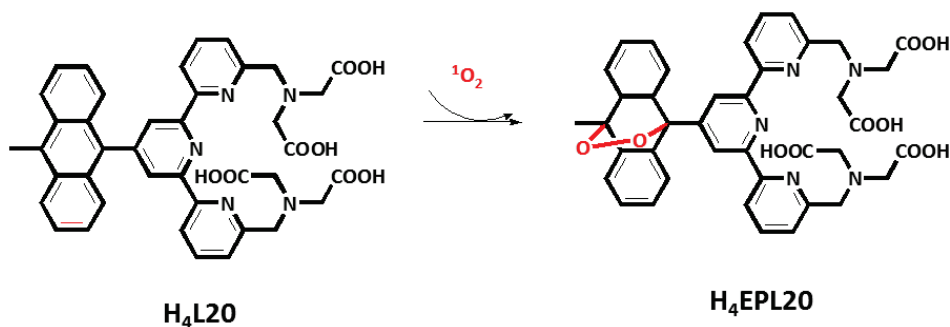


Figure 1. 48. : Sonde de détection d'oxygène singulet. La structure du ligand est représentée avant et après avoir réagi avec l'oxygène singulet.

La hausse du rendement quantique global de 1 à 13,8% ainsi que l'augmentation importante du temps de vie de l'état excité $^5\text{D}_0$ sont les preuves que la luminescence de l'euprium peut être utilisée pour quantifier la présence d'oxygène singulet. La limite de détection est 20 fois plus faible que celle obtenue pour des méthodes de détection de l' $^1\text{O}_2$ standard basées sur la chimiluminescence des dérivés tétrathiafulvène.^{56, 60}

D'autres sondes intelligentes ont été développées dans le but de détecter certaines activités enzymatiques : ce sont par exemple des complexes de lanthanide pH dépendant. En effet, dans certains systèmes contenant un chromophore et un centre métallique luminescent, la protonation des sites basiques peut annihiler les phénomènes de transfert d'électron photoinduit, augmentant ainsi la luminescence du complexe en fonction du pH. Ces systèmes sont donc des sondes à pH. *Parker* et son équipe ont développé des dérivés du cyclène contenant un noyau phénanthridine. Son état triplet $^3\pi\pi^* = 22000 \text{ cm}^{-1}$ permet la sensibilisation par effet d'antenne de l' Eu^{3+} . La protonation ou l'alkylation de l'azote du chromophore permet une excitation à des longueurs d'ondes supérieures à 370 nm. (*Figure 1. 49*) Les complexes d'euprium, après excitation répondent par une émission de luminescence centrée sur l' Eu^{3+} , qui augmente d'un facteur 6 lorsque le pH diminue (pH 6 \rightarrow pH 2). C'est donc la protonation du noyau phénanthridine en milieu acide qui permet d'inhiber des

Chapitre I II-Lanthanides

désactivations non radiatives photo induites et ainsi d'augmenter le signal de luminescence de l'ion Ln^{3+} .

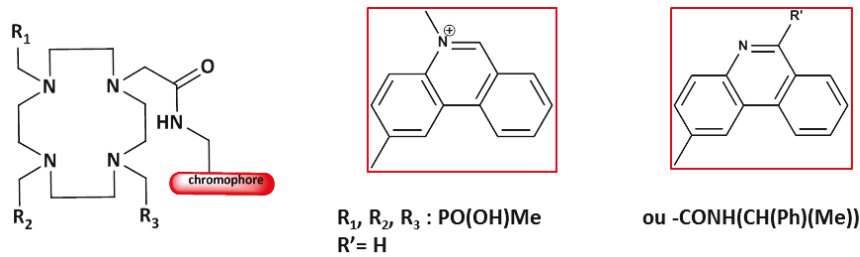


Figure 1. 49 : Structures chimiques des sondes de pH et d'oxygène singulet développé par l'équipe de Parker.⁵⁷

Exemple de sondes à ADN

Les complexes de lanthanides ont également été exploités pour mettre au point des sondes détectant l'ADN.

Des brins d'ADN en épingle à cheveux portant à l'extrémité 5' un complexe de Ln^{3+} luminescent et à l'extrémité 3' un *quencher* de luminescence ont été synthétisés. Dans ce brin d'ADN auto-complémentaire, il n'y a donc pas de signal de luminescence, celui-ci étant annulé par le *quencher* de luminescence. La présence d'un brin d'ADN de séquence complémentaire rompt l'appariement en épingle à cheveux, et éloigne le *quencher* du lanthanide (ex Black hole quencher **BHQ**). Cet appariement inter-brin restaure la luminescence du lanthanide. C'est le principe des *molecular beacons* Figure 1. 50.

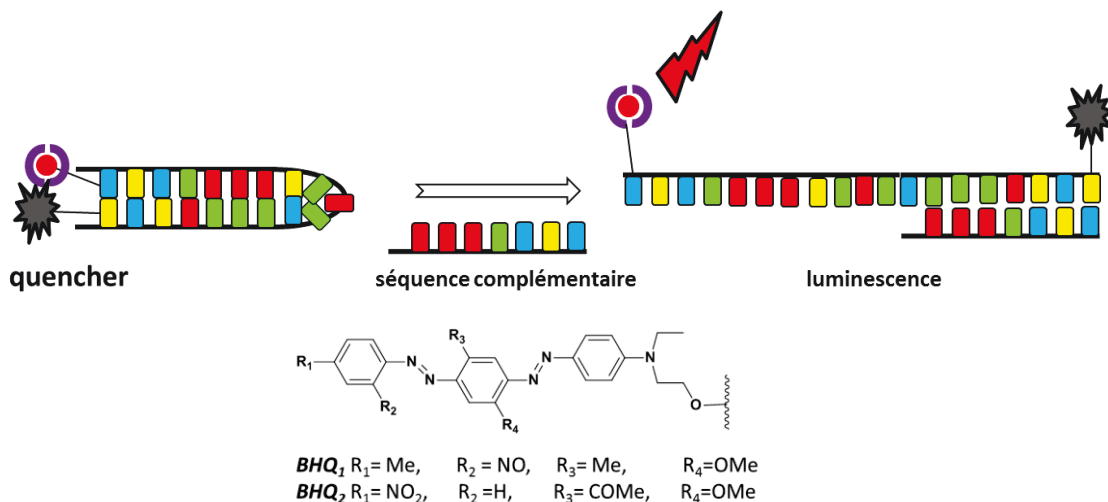


Figure 1. 50 : Principe des « molecular beacons ». En bas : structure des black hole quencher BHQ utilisés pour quencher la luminescence des ions Eu^{3+} .⁵¹

II.4 Lanthanides et peptides

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la complexation des ions lanthanides par des ligands peptidiques. Nous allons donc maintenant présenter les interactions entre les protéines ou peptides et ces ions métalliques.

II.4.1 Interaction des lanthanides avec les sites à calcium des protéines

Les protéines coordonnant des métaux représentent 40% du protéome humain. Il a été montré que les ions lanthanides étaient capables de se lier aux sites calciques de protéines comme ceux de la calmoduline, une protéine impliquée notamment dans la contraction des muscles striés. Les acides aminés responsables de la coordination des ions Ln^{3+} sont majoritairement des acides aspartiques et glutamiques présents dans les sites actifs de la protéine, qui portent des groupements carboxylates (bases dures) sur leurs chaînes latérales à pH physiologique. Les sites calciques des protéines sont des cibles privilégiées pour la coordination des ions Ln^{3+} du fait du nombre de coordination élevé du calcium (pouvant aller jusqu'à 7) et de sa similarité de rayon ionique avec les ions Ln^{3+} .⁶¹

La rapide vitesse d'échange des ligands de la première sphère de coordination des ions Ln^{3+} et leur charge positive élevée rendent ces derniers plus affins pour certains sites calciques riches en carboxylates que le calcium lui-même. Par exemple, les récepteurs calciques galactoses-glucoses d'*E.Coli* complexent les ions Yb^{3+} et Lu^{3+} avec des constantes de dissociation (K_d) de $0,8 \cdot 10^{-6}$ M et $1,1 \cdot 10^{-6}$ M contre un K_d de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M pour le Ca^{2+} .⁶¹ Les ions Ln^{3+} comme le Sm^{3+} et l' Eu^{3+} , se lient également aux sites protéiques de basse affinité pour le Ca^{2+} de l'enzyme *déshydroquinase* synthase,⁶² responsable de la déphosphorylation de certaines protéines.

Le calcium n'a aucun signal spectroscopique caractéristique et a donc été substitué par des ions Ln^{3+} , afin d'étudier les sites de fixation au sein de la protéine.⁶³ Le développement de séquences peptidiques spécifiques des lanthanides, puis leur insertion dans des protéines permet d'étudier le repliement des protéines et/ou leurs fonctions grâce à la luminescence du métal.

II.4.2 Insertion des lanthanides dans des peptides

On appelle « lanthanide binding tag » (**LBT**) une structure peptidique synthétique capable de coordonner spécifiquement les ions lanthanides et visant à être insérée dans une protéine ou un peptide. Deux approches peuvent être envisagées, soit la conception de bioconjugués Ln^{3+} /protéines soit la coordination directe du cation lanthanide par les chaînes latérales des acides aminés du peptide.

II.4.2.1 Les complexes de lanthanides bioconjugués

Les bioconjugués Ln^{3+} /protéines sont des complexes de lanthanides (souvent dérivés des cyclènes) incorporés sur les chaînes latérales réactives des acides aminés, comme par exemple les groupements sulfures des cystéines. La *Figure 1. 51* schématise la structure des complexes de lanthanides bioconjugués.

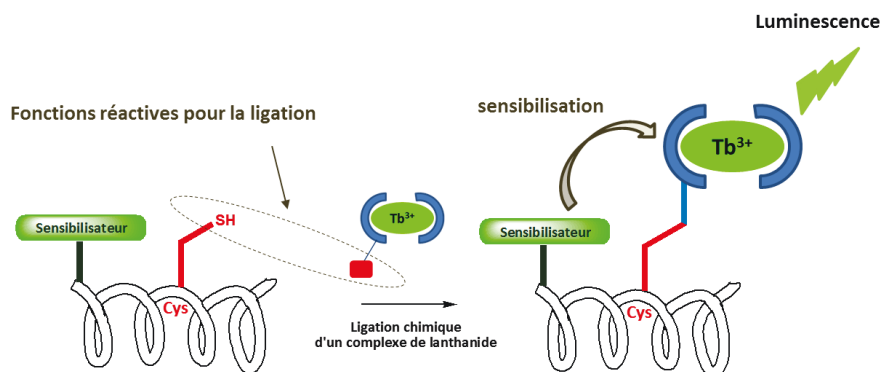


Figure 1. 51 : Représentation de la formation et de la structure d'un complexe de lanthanide bioconjugué.

Le bioconjugué lanthanide-peptide (ou protéine) contient également un chromophore sensibilisateur naturel comme un noyau tryptophane (Trp), ou synthétique comme le carboxytryl 124 (cs124) ou le naphthalimide (Naph). Ces chromophores sont choisis en fonction de l'ion lanthanide utilisé *Figure 1. 52*^{54, 64} afin d'assurer la sensibilisation par effet d'antenne.

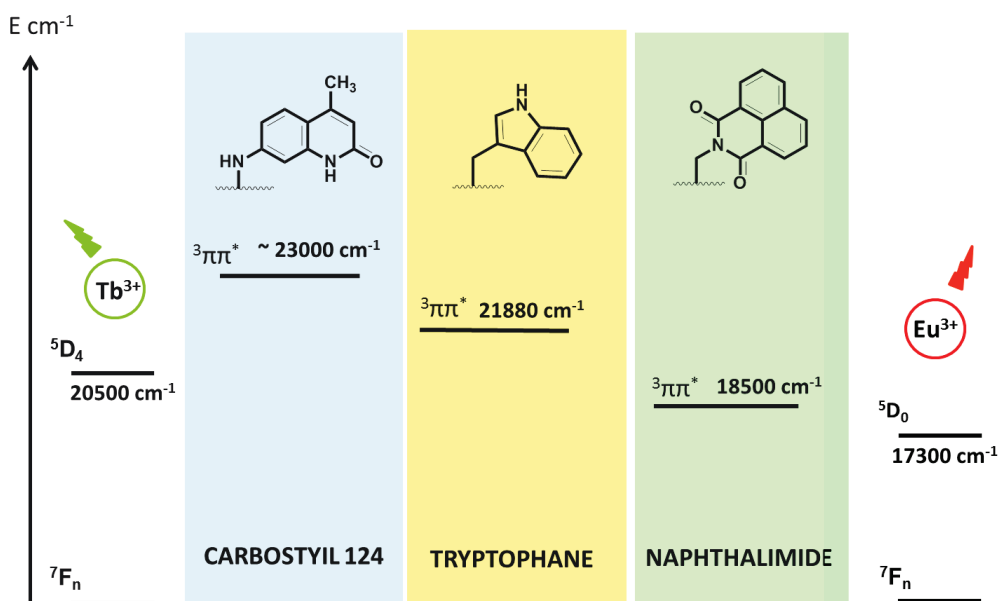


Figure 1. 52 : Représentation des noyaux sensibilisateurs ainsi que le niveau de leurs états triplet

Selvin et al⁶⁵ ont développé la synthèse d'un complexe de haute affinité pour les ions Ln³⁺, construit sur un squelette DTPA connu pour complexer efficacement les ions Ln³⁺.⁵⁵ La plateforme DTPA est substituée par un chromophore Cs124 et une fonction maléimide, permettant ainsi sa ligation à un acide aminé cystéine. (Figure 1. 53)

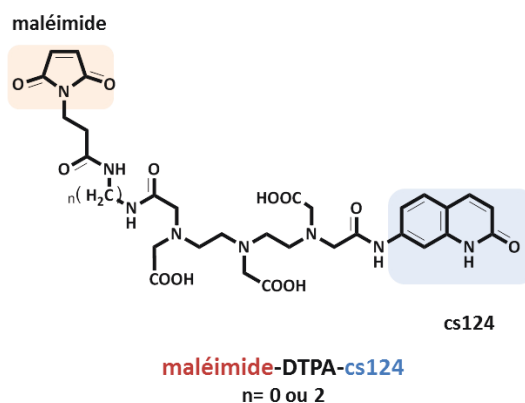


Figure 1. 53 : Structure du ligand DTPA-cs124 synthétisé par Selvin et al portant une fonction thiol réactive

D'autres plateformes, comme par exemple le DOTA, ont été utilisées pour permettre d'étudier le repliement des protéines. Par exemple, une biosonde de la Cycline A a été développée par l'équipe de Vazquez et Mascareñas (Figure 1. 59). La plateforme DOTA est incorporée sur une lysine présente dans les motifs peptidiques consensus de haute affinité pour les cyclines. Cette sonde de protéine met en jeu une détection par luminescence du métal, induite par un processus intermoléculaire. Ce motif **LBT-[DOTA]Tb** ne contient pas d'unité

Chapitre I II-Lanthanides

sensibilisatrice. C'est lors de la reconnaissance de la protéine Cycline A, contenant elle un résidu Tryptophane, qu'a lieu la sensibilisation du Tb^{3+} du LBT conjugué.⁶⁶

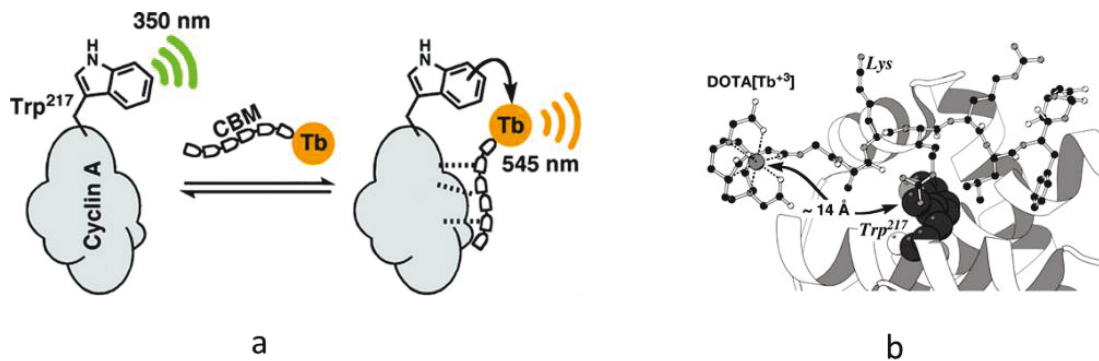


Figure 1. 54 : Représentation de la sensibilisation intermoléculaire du Terbium par une interaction entre un Peptidoconjugué *DOTA-Tb* et la cycline.⁶⁶

Sur le principe de changement de conformation, cette même équipe a développé un complexe capable de détecter le processus de dimérisation de deux protéines à motif leucine zipper. Comme expliciter dans la partie I paragraphe 4.2.1, la reconnaissance de l'ADN par des protéines à motifs **zip** s'effectue sous forme de dimère. Cette équipe a synthétisé le monomère bioconjugué **Zip-[Dota]Tb** qui en présence de la protéine complémentaire et d'ADN, se structure, rapprochant ainsi à travers l'espace le sensibilisateur tryptophane et le terbium. L'augmentation de la luminescence du Tb^{3+} enregistrée est d'un facteur 1.5.⁶⁷ (Figure 1. 55)

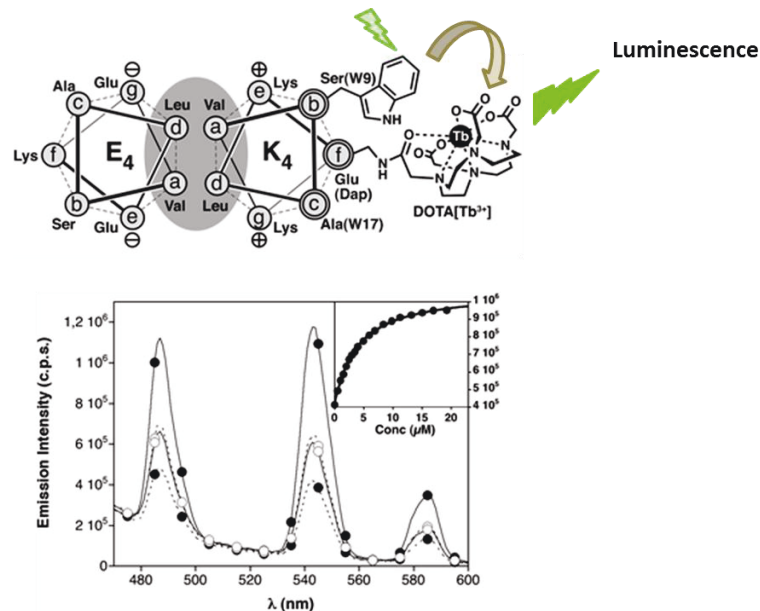


Figure 1. 55 : Haut : Schématisation de la dimérisation des motifs leucine zipper, extrait de la référence⁶⁷

Bas Graphique extrait de la ref⁶⁷ représentant l'augmentation de luminescence du terbium en présence d'Europium. La ligne en pointillée représente l'émission du terbium du monomère bioconjugué K_4 . Les lignes continues représentent l'émission du complexe en présence en présence du motif complémentaire E_4

Chapitre I II-Lanthanides

Récemment, *Vazquez et al.* ont également développé un complexe de lanthanide peptide-DOTA capable de détecter l'ARN grâce à la luminescence centrée sur le Tb^{3+} .⁶⁸ Dans ce cas, le réarrangement conformationnel du squelette peptidique lors de l'interaction avec la biomolécule d'ARN permet le rapprochement du tryptophane sensibilisateur du cation Tb^{3+} et donc la sensibilisation de ce dernier.

II.4.2.2 Les peptides liant les lanthanides par les chaînes latérales des acides aminés

Les chaînes latérales des acides aminés présents dans les peptides peuvent également être utilisées pour lier le cation lanthanide. Ces peptides peuvent être obtenus suivant les techniques de biologie moléculaire standards ou par synthèse de routine de laboratoire.

L'étude de la complexation du Tb^{3+} par des séquences consensus des 14 acides aminés conservés dans les sites à Ca^{2+} de la calmoduline a permis d'établir que lorsque le Trp sensibilisateur de l'ion Tb^{3+} est en position 7 de la séquence, ces peptides forment des complexes luminescents relativement stables.⁶⁹ Inspirés des motifs EF-Hand de la calmoduline liant le calcium, *Franklin et al* ont conçu des 33-mer synthétiques, à activité endonucléase, capables de coordonner les ions Ln^{3+} avec une affinité de l'ordre du micromolaire.⁷⁰ (*Figure 1. 56*). Ce premier complexe a permis de montrer que la présence du cation lanthanide ne perturbe pas les capacités de reconnaissance du facteur de transcription pour l'ADN.^{70, 71}

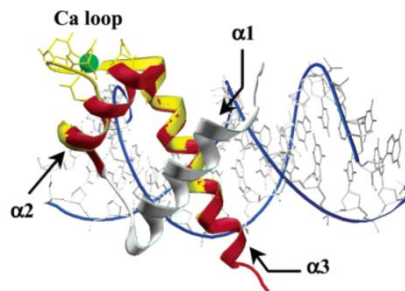


Figure 1. 56 : Interaction entre un peptide chimérique à activité endonucléase et l'ADN (bleu). Ce peptide chimère (jaune et rouge) est un dérivé de la calmoduline. Il est structuré en 3 hélices α et contient un site calcique de conformation boucle. Cette boucle protéique est le site de coordination des ions Ln^{3+} (boule verte).⁷⁰

Le groupe de *Barbara Imperiali*, a synthétisé des **LBTs** de 15 à 30 acides aminés, contenant une unité sensibilisatrice en N-ter/C-ter de la séquence.^{72, 73, 74} La coordination des ions Ln^{3+}

Chapitre I II-Lanthanides

est notamment assurée par les groupements carboxylates des aspartates et des glutamates (*Figure 1. 57*). De plus, le carbonyle de la liaison amide du tryptophane est impliqué dans la sphère de coordination du Tb^{3+} , ce qui permet un rapprochement du sensibilisateur et donc une meilleure sensibilisation.



Figure 1. 57 : Représentation des LBTs développés par Imperiali et al. Gauche : Le squelette du peptide est représenté en bleu, et les chaînes latérales des acides aminés chélatants en jaune.⁷³ Droite : Séquence peptidique des LBTs. En rouge sont indiqués les acides aminés responsable de la coordination de l'ion Tb^{3+} . Le noyau sensibilisateur Trp est indiqué en vert

Ces complexes peptidiques des lanthanides ont été obtenus par synthèse peptidique sur support solide. La séquence décrite sur la Figure 1.57 permet d'obtenir des complexes déshydratés, c'est-à-dire sans aucune molécule d'eau dans la première sphère de coordination de l'ion. La luminescence de ces complexes est donc optimale et a été exploitée pour déterminer la dynamique structurale des protéines, ainsi que pour élucider la localisation et le trafic cellulaire de certaines protéines.

En effet, grâce à des mesures de luminescence en temps résolu (*Figure 1. 45*), il est possible de s'affranchir de la fluorescence résiduelle cellulaire. Cette technique a permis pour la première fois de visualiser l'entrée d'une protéine chimère dans des cellules vivantes⁷⁵ grâce à luminescence du terbium, coordonné par un peptide encodé dans la séquence protéique. Cependant l'affinité maximale obtenue pour ces complexes peptidiques de lanthanides est de l'ordre du nanomolaire.

II.4.2.3 Hexapeptides incorporant des acides aminés chélatants non naturels

La stabilité du complexe de lanthanide est un paramètre clé pour envisager son utilisation comme sonde de molécules biologiques *in vitro*. En effet, il faut absolument éviter la

Chapitre I II-Lanthanides

décomplexation du cation lanthanide qui pourrait alors se coordonner à des sites de faible affinité de la biomolécule et ainsi perturber la mesure de l'interaction.

L'augmentation du nombre de sites de coordination avec des peptides naturels ne permettant pas d'augmenter l'affinité car la première sphère de coordination est déjà complète, le laboratoire de **R**econnaissance **I**onique et **C**himie de **C**oordination (**RICC**) a développé des hexapeptides synthétiques contenant des acides aminés non naturels avec des unités chélatantes aminodiacétates. Les hexapeptides développés dans notre laboratoire incorporent des acides aminés non naturels chélatant (*Figure 1. 58*), et un acide aminé Trp pour assurer la sensibilisation.

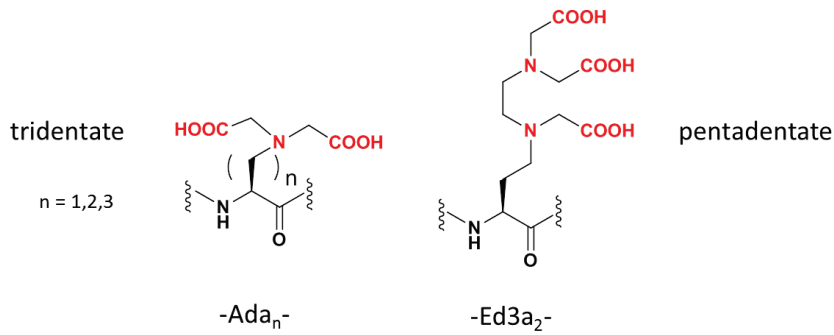


Figure 1. 58 : Structure chimique des acides aminés non naturels. Les sites de coordination sont représentés en rouge.

La présence d'une séquence Pro-Gly entre les deux acides aminés non naturels permet d'induire la formation d'un coude β et ainsi d'orienter les chaînes latérales chélatantes du même côté du plan du peptide pour promouvoir la coordination simultanée du métal par ces deux chaînes *Figure 1. 59*.

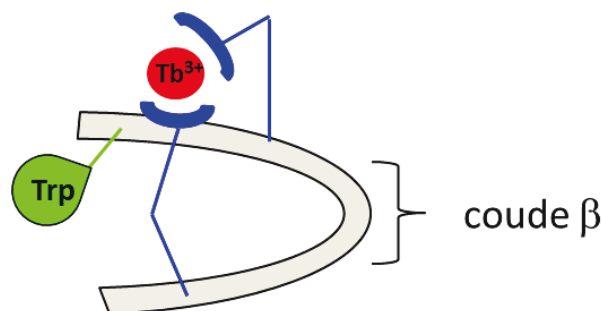


Figure 1. 59 : Représentation schématiques des hexapeptides développées au laboratoire

L'insertion d'acides aminés non naturels de type Ada_n , portant le motif aminodiacétate, a permis d'obtenir des complexes peptidiques des lanthanides de plus hautes affinités (de l'ordre du picomolaire) que ceux issus d'acides aminés naturels. Des études sur la longueur n des chaînes latérales des acides non naturels Ada_n ,^{76, 77, 78, 79} ainsi que sur la position du noyau sensibilisateur Trp ont été effectuées et ont mis en évidence la formation de complexe monométallique de stabilité de l'ordre du picomolaire pour $n = 2$. La position du Trp en N-ter assure également une bonne sensibilisation. Le peptide de référence développé P^{22} (où $n=2$), représenté *Figure 1. 60*, est hexadentate.^{77, 78, 79}

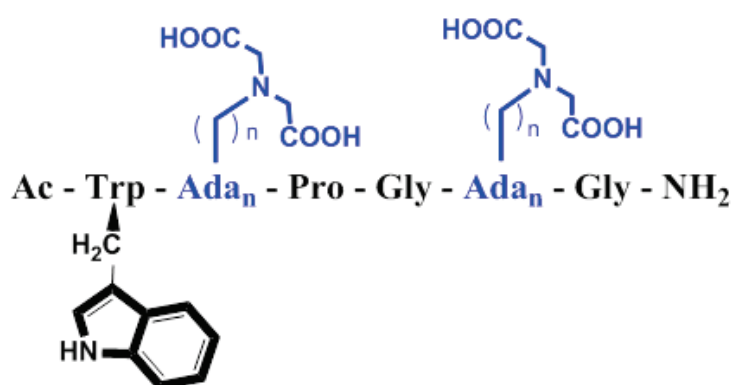


Figure 1. 60 : Structure générale des hexapeptides contenant des acides aminés non naturels

Les complexes $\text{Ln}^{3+} - \text{P}^{22}$ présentent 3 molécules d'eau dans la sphère de coordination de l' Eu^{3+} et du Tb^{3+} . Dans le but d'optimiser le signal de luminescence du métal, un acide aminé de plus haute denticité Ed3a_2 (*Figure 1. 58*) a été introduit dans la séquence et a ainsi permis l'obtention d'un complexe octadentate déshydraté. L'augmentation du nombre de sites de coordination permet ainsi la formation d'un complexe d'une stabilité de l'ordre du femtomolaire et de luminescence plus intense.^{76, 80}

II.4.3 Élaboration de complexes peptides-lanthanides pour détecter l'ADN

L'objectif de ce travail de thèse était de mettre au point des complexes peptidiques de lanthanides, dérivés des hexapeptides chélatants présentés ci-dessus, capables de reconnaître l'ADN. Deux stratégies ont été envisagées :

✿ Construire des motifs peptidiques de type facteur de transcription, qui interagissent avec l'ADN grâce des interactions ponts salins avec les groupements

phosphates, des interactions hydrophobes mais surtout de nombreuses liaisons hydrogène médiées par la présence de molécule d'eau. Cette stratégie a été explorée en parallèle de mes travaux au laboratoire par Agnieszka Niedźwiecka et s'est avérée très complexe.

❁ Développer des peptides dérivés du squelette **P²²** capable de reconnaître l'ADN par intercalation.

Le but de cette thèse a donc été de concevoir des sondes basées sur la séquence du peptide chélatant **P²²** et d'effectuer la preuve de concept de la détection de l'ADN à travers la luminescence des ions lanthanides. Pour cela nous avons incorporé une unité de reconnaissance de l'ADN intercalante dans la séquence peptidique. Cette unité a été choisie en fonction de ses propriétés sensibilisatrices des ions lanthanides et de son affinité pour la double hélice d'ADN. L'unité intercalante est introduite en lieu et place de l'acide aminé Tryptophane, assurant dans **P²²** la sensibilisation des ions Tb^{3+} . Cette unité de reconnaissance a donc pour rôle de sensibiliser l'ion Ln^{3+} mais également de reconnaître l'ADN. Nous avons ensuite vérifié que l'incorporation de cette unité de reconnaissance ne perturbait pas les propriétés de complexation de l'ion Ln^{3+} et était capable de sensibiliser ce dernier. Enfin nous avons vérifié si les sondes peptides lanthanides nouvellement développées étaient capables de détecter l'ADN via la luminescence de l'ion lanthanide. En effet, suite à l'interaction avec l'ADN de l'unité sensibilisatrice intercalante, une variation de luminescence du cation lanthanide est attendue.

CHAPITRE II

Élaboration et Synthèse des sondes

CHAPITRE II –Elaboration et Synthèse des sondes

Le but de ce travail de thèse est de concevoir des sondes dérivées du squelette de P^{22} capables de reconnaître l'ADN. (Figure 2. 1).

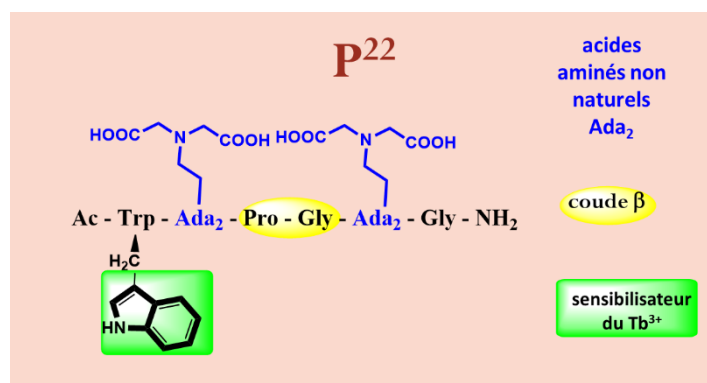


Figure 2. 1 : Structure du peptide P^{22}

La première étape est donc de choisir la nature de l'unité de reconnaissance de l'ADN. Celle-ci ne doit pas dénaturer la structure peptidique du dérivé P^{22} , et conserver, une fois insérée dans la séquence, ces capacités de reconnaissance de l'ADN. Son insertion doit perturber au minimum les propriétés de complexation des ions Ln^{3+} , de manière à conserver des propriétés similaires à celles de P^{22} . Celles-ci sont récapitulées dans le *tableau 2.1*. De plus l'unité choisie devra être capable de sensibiliser les ions Ln^{3+} (Eu^{3+} , Tb^{3+}) et de conduire à une modulation du signal de luminescence en absence et en présence de l'ADN.

Tableau 2. 1 : Propriété du complexe TbP^{22}

Nom	Séquence	q	K_d^{pH7} (M)	Kd (M)
P^{22}	Ac-W Ada ₂ PG Ada ₂ G-NH ₂	3	$10^{-9.1}$	$10^{-12.1}$

Avec q nombre d'hydratation du complexe, K_d^{pH7} la constante conditionnelle de stabilité à pH 7 et Kd la constante de stabilité globale

I Les noyaux intercalants

Un compromis entre sensibilisation et affinité pour l'ADN

Les motifs de reconnaissance de l'ADN choisis appartiennent à la famille des intercalants. Comme les intercalants sont moins sélectifs que les motifs de reconnaissance de l'ADN type **HTH**, pourquoi avoir fait ce choix ? Le premier avantage est leur aromaticité qui permet de reconnaître l'ADN à travers le phénomène d'intercalation. De plus, comme ils sont aromatiques, ils sont potentiellement capables de sensibiliser les ions lanthanides. La dualité reconnaissance-sensibilisation des intercalants permet donc de concevoir des sondes d'ADN à base de lanthanides. De plus, la synthèse relativement aisée de ces composés et leur compatibilité avec la peptide peptidique est un atout supplémentaire. Enfin, leur introduction dans la séquence peptidique ne devrait que faiblement affecter la complexation du cation lanthanide, en comparaison à l'encombrement engendré par l'incorporation d'un motif de reconnaissance **HTH**.

Les composés choisis doivent à la fois être capable de sensibiliser les ions Ln^{3+} (Eu^{3+} ou Tb^{3+} , émission dans le visible) mais également de reconnaître l'ADN. Cette reconnaissance doit s'accompagner d'une modulation du signal de luminescence. La *Figure 2. 2* illustre ces phénomènes.

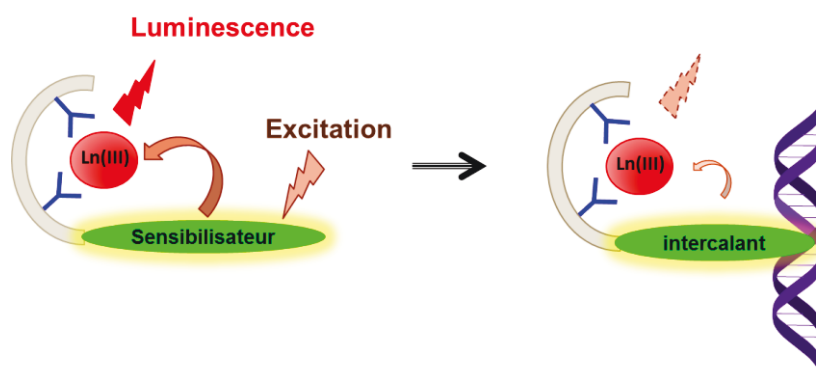
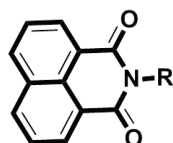


Figure 2. 2 : Schéma du mécanisme de reconnaissance de l'ADN par des sondes peptidiques des lanthanides dérivées de P²²

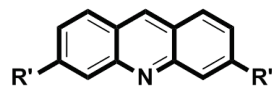
Nous avons choisi d'étudier la détection de l'ADN à travers la luminescence des ions Ln^{3+} en utilisant deux familles de noyaux : la famille des **naphthalimides** et la famille des **acridines**. Dans la famille des acridines, le noyau **proflavine** (ou 3,6-diaminoacridine) est celui qui a

retenu notre attention (Figure 2. 3). En effet, leurs propriétés de reconnaissance de l'ADN ainsi que leur potentiel pour la sensibilisation font de ces noyaux des candidats prometteurs.



Naphthalimide

R = H, alkyle



R', R'' = H **Acridine**

R', R'' = NH₂ **Proflavine**

Figure 2. 3 : Structure des noyaux intercalants étudiés

I.1 La proflavine

Les dérivés de la famille des acridines sont connus depuis longtemps pour leurs activités biologiques. En effet, depuis leur découverte en 1870, les acridines ou dibenzo[*b,e*]pyridines ont fait l'objet de nombreuses applications, notamment pour leurs propriétés thérapeutiques. Utilisés pour la première fois en tant qu'agents antiseptiques, puis comme agents antiparasites, ce n'est qu'en 1920 que leur activité anti-tumorale a été découverte.^{81, 82}

I.1.1 Comme sensibilisateur ?

Ne perdons pas de vue que le composé choisi doit sensibiliser les ions lanthanides. Aucune publication ne fait mention des propriétés de sensibilisation des acridines. Cependant, la proflavine est très largement utilisée en biologie pour ses propriétés de fluorescence permettant de marquer les cellules. Après une excitation à 445 nm, la proflavine répond par une intense émission de fluorescence centrée à 508 nm (à pH 7). Les temps de vie de ses niveaux excités singulet et triplet ne sont pas donnés à pH 7 dans la littérature mais à pH 4, et sont respectivement de 4,4 ns et 70 ms à 20 °C.⁸³ Son mode de fluorescence est qualifié de *retardé ou différé*. En effet, sa fluorescence est température dépendante. La repopulation thermique de son état singulet $^1\pi\pi^*$ par un état vibrationnel excité $^3\pi\pi^*$ entraîne un équilibre de population entre les états singulet et triplet.⁸⁴ La fluorescence paraît donc anormalement longue à température ambiante.

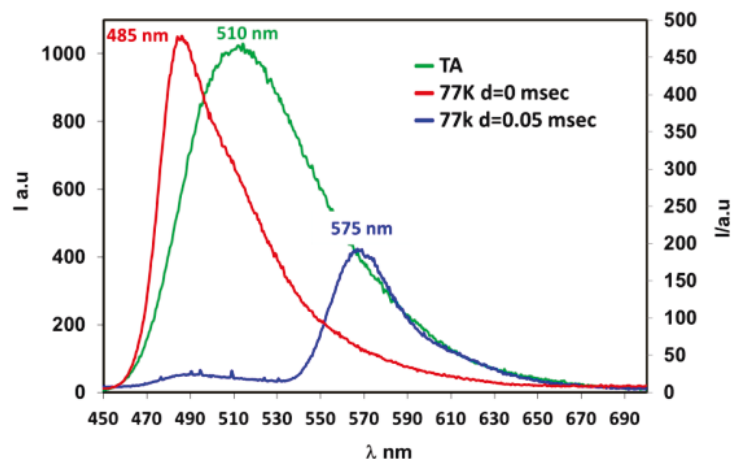


Figure 2. 4 : Emission du noyau proflavine à pH 7 à température ambiante (TA) et à 77 K avec (courbe bleue) et sans délai (d) de mesure (courbe rouge).

On peut s'affranchir de ce phénomène en travaillant à basse température et en imposant un temps de délai à la mesure. Le signal mesuré à température ambiante (Figure 2. 4 vert) est donc une émission moyenne entre la fluorescence (rouge Figure 2. 4) et la phosphorescence (bleue Figure 2. 4). C'est pour cela que l'on nomme ce type de fluorescence « **fluorescence retardée** ».⁸⁵

Il est également important de noter que la proflavine est basique. Ainsi à pH 7 et de par son pKa de 9,65, l'azote porté par le cycle pyrimidique central est protoné.⁸⁶

Qu'en est-il maintenant de ses potentielles propriétés de sensibilisation ? Il faut, pour répondre à cette question, regarder la différence d'énergie ΔE entre l'état triplet de la proflavine et les états émissifs excités des ions Ln^{3+} émettant dans le visible (Tb^{3+} et Eu^{3+}). Sur la Figure 2.5, on voit que le noyau proflavine n'est pas apte à sensibiliser les ions Tb^{3+} . En effet, le niveau d'énergie de l'état triplet de la proflavine se situe plus bas en énergie que les niveaux excités du Tb^{3+} . Concernant l' Eu^{3+} , la différence d'énergie entre les états donneur(s) et accepteur(s) est très faible (200-150 cm^{-1}). Cependant, la sensibilisation à basse énergie de l'euporium par des composés type base de Schiff possédant des états énergétiques proches (${}^3\pi\pi^*$ 17270 cm^{-1}) a été mise en évidence.⁸⁷ Il est donc concevable d'envisager une

sensibilisation de l'euporium par le composé proflavine. Si sensibilisation il y a, un fort transfert en retour est possible. La *Figure 2. 5* récapitule les derniers paramètres.

Le transfert par l'état singulet, bien que peu répandu, peut également être vérifié en effectuant des mesures de luminescence des ions Ln^{3+} en absence d'oxygène. En effet, l'état triplet est beaucoup plus sensible que l'état singulet à la présence d'oxygène.⁸³ Une augmentation brutale du signal de luminescence en absence d'oxygène indiquera un transfert d'énergie majoritaire par *effet d'antenne* « triplet- Eu^{3+} ».

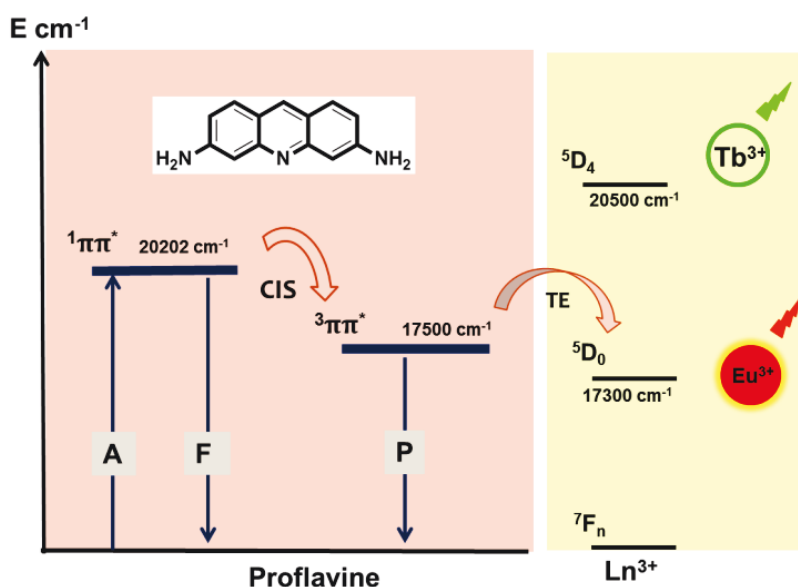


Figure 2. 5 : Diagramme d'énergie de l' Eu^{3+} et du noyau proflavine : sensibilisation potentielle

I.1.2 Comme intercalant ?

La proflavine a été l'un des premiers chromophores à être étudiés pour ses capacités d'interactions non covalentes avec l'ADN, en exploitant ses propriétés d'émission de fluorescence. Lors de sa liaison à l'ADN par un mécanisme d'intercalation, sa fluorescence diminue fortement.³⁵

Des études cinétiques par saut de température ont également mis en avant la rapidité de liaison de la proflavine à l'ADN, avec une vitesse de liaison de l'ordre de la milliseconde.⁸⁸

Le modèle de liaison établi à cette époque était le suivant :



où C_{Int} représente le complexe Proflavine –ADN et **Pfl** la proflavine. Il est important de noter que pour permettre une intercalation dans l'ADN, les plans des paires de bases doivent être séparés d'au moins 3,4 Å. La proflavine s'intercale donc dans les duplex polymorphes de types B et Z (distance inter-plan 3,4 et 3,7 Å respectivement). Des études menées à partir des années 1980 ont démontré que le modèle énoncé précédemment était erroné. En effet, le mode de liaison de la proflavine à l'ADN dépend à la fois de la concentration et de sa composition en paires de bases.⁸⁸

Si l'on définit un ratio égal à la concentration en ADN [**pb**], exprimée en paires de bases (pb), sur la concentration en chromophores [**Ch**], on obtient deux scénarios possibles :

- ✓ À faible ratio [**pb**]/ [**Ch**], le mode de liaison préférentiel est de type électrostatique, c'est-à-dire une liaison de la proflavine dans les sillons de l'ADN. On parle de liaison de basse affinité.
- ✓ À haut ratio [**pb**]/ [**Ch**], le mode de liaison préférentiel est de type π -stacking, c'est-à-dire une liaison par intercalation dans l'ADN. On parle dans ce cas de liaison de haute affinité.

Ces deux premiers scénarios ont été établis en présence de B-ADN de composition mixte, type *ct*-DNA (Calf Thymus DNA signifiant ADN de thymus de veau), contenant des bases A, T, G et C, dans un enchaînement *base –sucre-phosphate-base-sucre-phosphate* aléatoire.

L'influence de la composition en paires de bases de l'ADN sur le mode d'interaction de la proflavine, a été étudié en présence d'ADN duplex synthétique de type poly(dA-dT)₂, poly(dG-dC)₂, d'ADN bactérien *micrococcuss* (72% pb GC) et *bacillus* (30% pb GC) en suivant l'extinction de fluorescence du noyau proflavine.⁸⁹ Les calculs de rendement quantique de fluorescence mettent en avant une différence d'affinité et /ou une différence de mode de liaison selon la composition en bases de la double hélice. Plus l'ADN contient des paires de bases **GC**, plus le signal de fluorescence de la proflavine est éteint. En conséquence, le rendement quantique diminue. Ces premiers résultats indiquent que le noyau proflavine s'intercale préférentiellement entre des paires de bases **GC**. De plus, un ADN riche en paires

CHAPITRE II –Elaboration et Synthèse des sondes

de bases GC adopte une conformation locale de type Z-ADN, et peut potentiellement former des **G quadruplex**. *Javier* et son équipe ont d'ailleurs démontré que la proflavine était un bon détecteur de **G-quadruplex**.^{90, 91}

Des mesures de fluorescence complémentaires montrent en effet une légère préférence pour les paires de bases **GC**.⁹² L'affinité de la proflavine pour l'ADN a été calculée par la technique standard de déplacement d'un intercalant d'affinité connue.

L'affinité d'un composé pour l'ADN est décrite par la loi d'action de masse qui traduit l'équilibre dynamique entre les formes libres et associés du ligand. Strictement, l'affinité est définie comme la constante d'association K_a (M^{-1}). En pratique, la constante de dissociation K_D (M), qui est l'inverse de la constante association, est souvent donnée car son unité est plus évocatrice.

Pour effectuer le test de déplacement par la proflavine, un intercalant non sélectif de l'ADN, le bromure d'éthidium (**BET**) d'affinité $K_D = 10^{-5}M$ pour l'ADN, a été utilisé. Contrairement à la proflavine, sa fluorescence augmente fortement lors de sa liaison à l'ADN. L'affinité, en fonction de la concentration de composé ajouté au complexe **BET-ADN**, est déterminée de manière à obtenir une diminution de 50 % de la fluorescence du **BET**. On peut assimiler ces mesures à des CI_{50} (Concentration d'Inhibition à 50 %). Le *tableau 2.2* récapitule les données obtenues par l'équipe de *Terence C Jenkins*⁹² qui a mené ces expériences sur la proflavine.

*Tableau 2. 2 : Mesure de CI_{50} du **BET** par le noyau proflavine en présence d'ADN de compositions différentes ($[ADN]_{initiale}=10 \mu M$ bp; $[BET]_{initiale}=1 \mu M$)*

	AT	Ct-DNA	GC
[Pfl] μM	24 μM	20 μM	14 μM

Ces résultats mettent en évidence une faible sélectivité d'interaction pour les paires de bases GC (*Figure 2. 6*). La proflavine est donc *deux fois plus affine* des paires de bases GC.

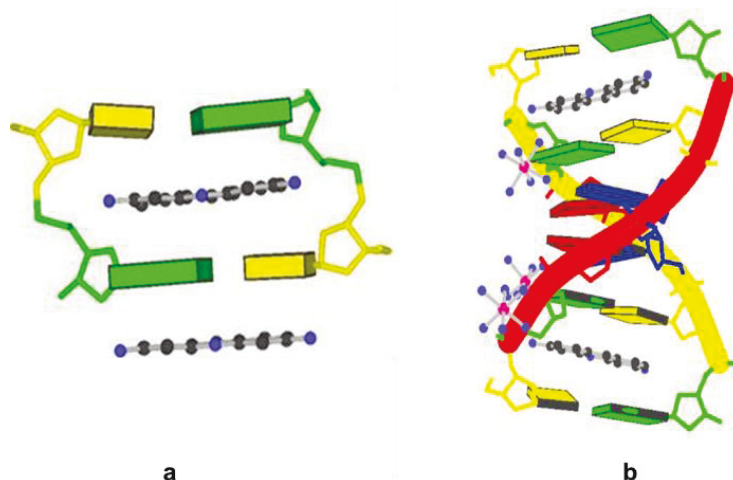


Figure 2. 6 : a) Structure cristallographique⁹³ extraite de la NDB (Id DDB009) de la proflavine intercalée dans un di-nucléotide 5'd(CpG) 3' (b) Structure cristallographique extraite de la PDB (ID 3FT6) représentant la proflavine intercalée dans un hexamère d'ADN de séquence 5'-d(CpGpApTpCpG)-3'. Les bases G sont en vertes, les C en jaunes, les A en rouge et le T en bleues. On remarque que la proflavine est intercalée uniquement entre les paires de bases GC.

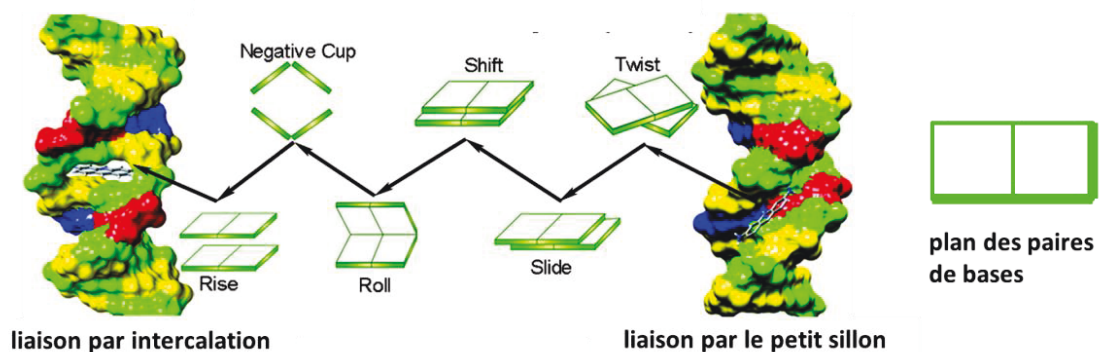
Ces mesures d'extinction de fluorescence, combinées aux mesures cinétiques ont permis à l'équipe de *Neidle*⁹⁴ de développer deux nouveaux modèles d'interaction de la proflavine avec l'ADN :



où C_{tr} représente un complexe transitoire de faible interaction électrostatique en présence d'une faible concentration d'ADN. Le complexe C_{tr} se forme rapidement. C_{Int} représente le complexe intercalé. C_{tr} est fortement dépendant de la nature des bases qui composent l'ADN. Le **modèle 1** est applicable pour un ADN type *ct*-DNA. L'espèce cinétique est transitoire, puis après stabilisation du système, l'espèce en intercalation est obtenue. Cependant en présence d'une très forte concentration locale de paires de bases AT, l'espèce intercalée est difficilement atteinte de par le faible espacement des plans des paires de bases dans ces régions (type A-ADN). Ceci est confirmé par des mesures d'allongement de la double hélice. Lors de l'intercalation d'un composé, la double hélice s'allonge.

Un allongement faible de la double hélice met en évidence un mode d'interaction préférentiel de type électrostatique dans les sillons de l'ADN. L'allongement quasi nul d'un ADN riche en paires de bases AT en présence de proflavine a montré que le complexe **Proflavine – ADN** obtenu était majoritairement un complexe lié dans le sillon.

Le *modèle 2* quant à lui est valable pour les duplex riches en paires de bases GC ou de composition alternée G-C-G-C. Très récemment *Mukherjee et al.* ont modélisé le mécanisme d'intercalation de la proflavine dans l'ADN. En se plaçant dans une configuration appropriée (paramètres mathématiques du modèle de *simulation métadynamique* tout atome, champs de force AMBER99, effet de solvatation), ils ont simulé l'interaction de la proflavine dans un dodécamère duplex d'ADN de séquence 5'-d(GpCpGpCpTpCpGpApGpCpGpC)-3'. Les résultats obtenus mettent en évidence une interaction minimisant les pénalités de stacking des bases, de manière à minimiser la perte d'énergie libre du système.^{95, 96} Le mode d'interaction de la proflavine simulé est représenté *Figure 2. 7*. L'intercalation de la proflavine se déroule via le grand sillon de l'ADN et est entropiquement favorable. Cependant, suivant le *modèle 1* établi, la proflavine forme très rapidement (nanoseconde) un complexe pré-intercalé via le petit sillon. Les calculs de *Mukherjee* montrent que l'intercalation directe est impossible de par la trop haute barrière énergétique de dé-solvatation du sillon.



*Figure 2. 7 : Modélisation des mouvements des plans des paires de bases de l'ADN de séquence 5'-d(GpCpGpCpTpCpGpApGpCpGpC)-3 lors de l'intercalation de la proflavine.*⁹⁶

Ces derniers résultats vont à l'encontre de ceux obtenus par l'équipe de *Neidle*.⁹⁴ En effet, l'ADN utilisé pour la modélisation est riche en paires de bases GC. Le mode de liaison devrait donc obéir au *modèle 2*.

En conclusion, le mode d'interaction de la proflavine par intercalation dans l'ADN est accepté par toute la communauté scientifique. Cependant, son mécanisme exact de liaison à l'ADN reste à valider. Néanmoins, la proflavine est un excellent intercalant de l'ADN, d'affinité de l'ordre de 10^{-5} M pour un ADN type *ct*-DNA.⁹⁷

SI la proflavine se révèle capable de sensibiliser les ions Eu^{3+} , les sondes nouvellement développées lors de ce travail devraient permettre d'explorer l'interaction avec l'ADN et d'effectuer des mesures de sélectivité de reconnaissance de séquences à travers la luminescence centrée sur l'euporium. L'impact de la structure peptidique sur la capacité de reconnaissance de l'ADN pourra alors être visualisé. Il sera intéressant de voir si l'on conserve les propriétés de reconnaissance de l'ADN et la sélectivité de reconnaissance de celui-ci (AT vs GC) par rapport au noyau proflavine libre.

I.2 Le naphthalimide

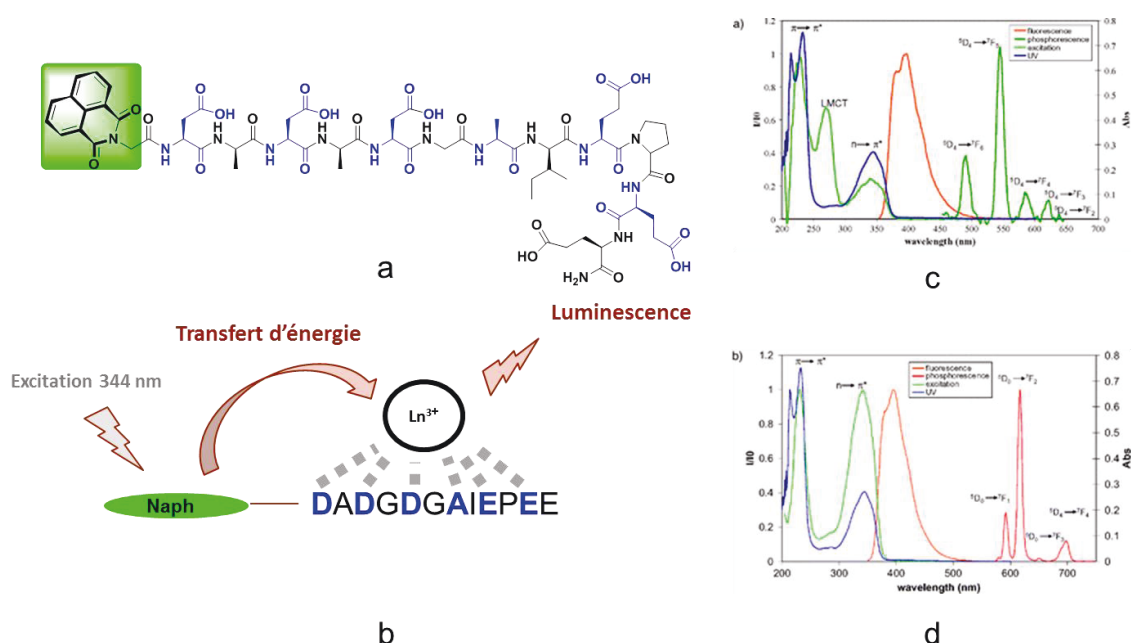
*Braña et al*⁹⁸ ont démontré depuis les années 1970 que la famille des naphthalimides possédait une forte activité anticancéreuse.⁹⁹

I.2.1 Comme sensibilisateur ?

Contrairement au noyau proflavine, le naphthalimide est répertorié comme sensibilisateur des ions Eu^{3+} , et plus récemment des ions Tb^{3+} . Les dérivés du 1,8-naphthalimide substitués sur l'azote sont généralement des chromophores émettant dans la gamme du bleu. Cependant, ils sont nettement moins fluorescents que les noyaux dérivés de la proflavine. Après excitation à 344 nm, le naphthalimide répond par une émission de fluorescence centrée à 380 nm (pH 7). Les temps de vie de son niveau excité singulet et triplet sont respectivement de 1,3 ns et 30 μsec dans l'eau, pour des solutions de concentration inférieure à 100 $\mu\text{molaires}$. En effet, à forte concentration, le naphthalimide forme des excimères. Les temps de vie des niveaux excités varient alors, pouvant atteindre 5 ns pour l'état singulet.¹⁰⁰ Son état singulet se situe aux environs de $27\,000\text{ cm}^{-1}$ et son état triplet $^3\pi\pi^*$ à $18\,500\text{ cm}^{-1}$.⁵⁰ La différence d'énergie avec l'état émissif excité $^5\text{D}_0$ de l'euporium est de 1000 cm^{-1} , ce qui n'est pas idéal si l'on veut éviter un transfert thermique d'énergie en retour. Cependant, le rendement quantique de conversion interne du naphthalimide en solution Φ_{CIS} de $^1\pi\pi^* \rightarrow ^3\pi\pi^*$ très élevé ($\Phi_{CIS} = 0,95$)¹⁰¹⁻¹⁰² en fait un sensibilisateur de choix, et permet d'effectuer des mesures de

CHAPITRE II –Elaboration et Synthèse des sondes

luminescence de l'euporium en temps résolu. Les rendements quantiques de l'euporium complexé par un dérivé N,N-diméthylamino-1,8-naphthalimide mesurés par *Sousa* sont de $\Phi_{Eu}^{H2O} = 0,125$.¹⁰³ Le niveau de son état triplet ne permet normalement pas une sensibilisation du Tb^{3+} . Cependant, l'équipe de *Gunnlaugsson et al.* a montré que des peptides capables de coordonner les ions Tb^{3+} contenant un noyau naphthalimide pouvait sensibiliser la luminescence du Tb^{3+} (*Figure 2. 8*).⁵⁰ Un transfert d'énergie via l'état singulet a été supposé. Les études menées sur des complexes Europium/Gadolinium-Naphthalimide de *Ward et al.*,⁶⁴ tendent à confirmer ce phénomène.



*Figure 2. 8 : a et b) Structure du peptide développé par Gunnlaugsson et al. Le noyau Naphthalimide (vert) joue le rôle de sensibilisateur des ions lanthanides. b) Schématisation de la coordination des ions Ln^{3+} (Tb^{3+} , Eu^{3+}) par les acides aminés aspartates **D** et glutamates **E** et de la sensibilisation par effet d'antenne. c et d) Superposition du spectre d'absorbance du peptide **a** et du spectre d'excitation du complexe peptide- Ln^{3+} (vert). Le spectre de fluorescence du noyau Naphthalimide est représenté par la courbe orange. Le spectre de luminescence en temps résolu du Tb^{3+} (c) et du Eu^{3+} (d) montre bien la capacité de sensibilisation du noyau naphthalimide. Extrait de la référence⁵⁰*

En effet, la vitesse de transfert d'énergie du $^3\pi\pi^*$ Naphthalimide $\rightarrow ^5D_0$ Eu^{3+} est faible (0,103 msec).¹⁰⁰ Des mesures de luminescence en temps résolu ont permis de mettre en avant un autre transfert d'énergie vers l'ion Eu^{3+} beaucoup plus rapide de l'ordre de la nanoseconde, provenant de l'état singulet $^1\pi\pi^*$ du Naphthalimide. Il semblerait donc que la sensibilisation

des ions $\text{Eu}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$ soit une combinaison de transfert d'énergie en compétition : $^1\pi\pi^* \rightarrow \text{Ln}^{3+}$, $^3\pi\pi^* \rightarrow \text{Ln}^{3+}$ ($\Phi_{TE}^{H2O} = 0,067$) et $\text{Ln}^{3+} \rightarrow ^3\pi\pi^*$ (Figure 2. 9).⁶⁴

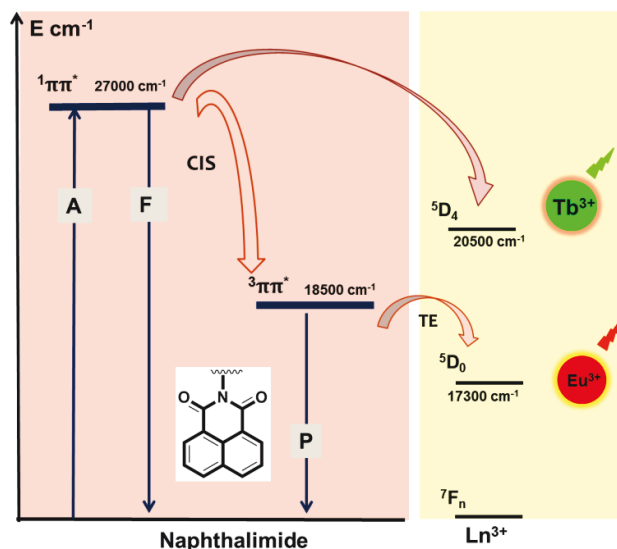


Figure 2. 9 : Diagramme de la sensibilisation de l' Eu^{3+} et du Tb^{3+} par le noyau naphthalimide

I.2.2 Comme Intercalant ?

Comme exposé dans le chapitre I, un bon intercalant est un composé qui possède les caractéristiques suivantes :

- ✓ Il doit être plan et hydrophobe, l'idéal étant un noyau aromatique.
- ✓ Il doit présenter une surface d'interaction suffisante pour assurer un fort π -stacking avec les paires de bases de l'ADN. La taille idéale minimum pour cela est de 3 cycles.
- ✓ Il doit posséder des groupements accepteurs/donneurs de liaisons hydrogène et porté une charge positive, de manière à faciliter l'interaction avec la double hélice, chargée négativement.

Le naphthalimide n'est donc pas le candidat parfait pour assurer une reconnaissance de l'ADN par intercalation (Figure 2. 10).

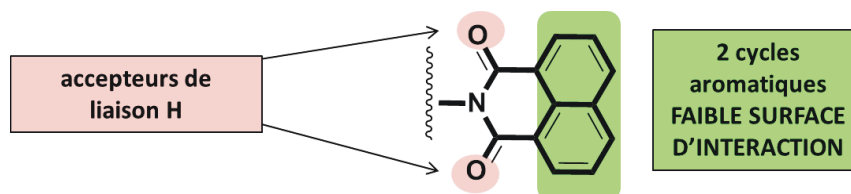


Figure 2. 10 : Naphthalimide et ses caractéristiques d'intercalant

Son affinité pour l'ADN est faible, dans la gamme du millimolaire. Cependant, de nombreux dérivés du naphthalimide ont été synthétisés pour leur capacité à reconnaître l'ADN et leur activité anticancéreuse. Les composés têtes de files sont l'*amonafide* et le *mitonafide*, tous deux actuellement en phase clinique II. (Figure 2. 11). Leur affinité pour l'ADN est de l'ordre d'une dizaine de μ molaire.¹⁰⁴ Cependant, la présence de substituants *amine* et *nitro* en position 3 modifie les propriétés spectroscopiques du noyau naphthalimide. Les groupements mésomères donneurs (NH_2) et mésomères attracteurs (NO_2) influencent les niveaux d'énergie singulet et triplet. La présence d'un groupement amine, par exemple, diminue le niveau d'énergie du niveau singulet ($\lambda_{\text{max abs}} = 410 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$ tampon TRIS, pH 7.4).¹⁰⁵ Ces modifications chimiques risquent donc de modifier la sensibilisation des ions Eu^{3+} et Tb^{3+} .

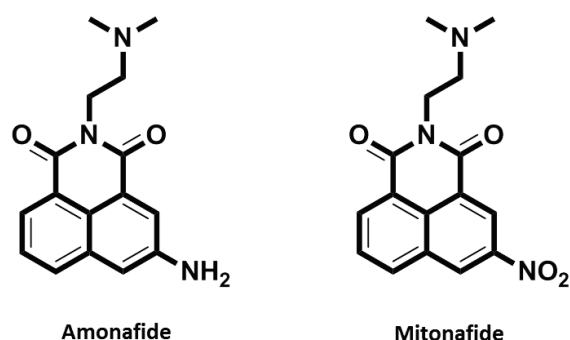


Figure 2. 11 : Structure des composés naphthalimides à activité anticancéreuse.

Pour augmenter l'affinité pour l'ADN, des composés dit bis-intercalant (Figure 2. 12) ont été synthétisés par l'équipe de Bailly *et al.*¹⁰⁶ L'espaceur polyamine s'insère dans le grand sillon et stabilise l'intercalation des deux extrémités naphthalimide dans l'ADN.¹⁰⁷ Le formation de liaisons hydrogène $\text{NH}(\text{polyamine})-\text{O}(\text{bases azotées})$ permet de renforcer l'interaction avec l'ADN. L'affinité est augmentée d'un facteur 100 (micromolaire) pour l'ADN par rapport au noyau naphthalimide nu, c'est-à-dire sans substituants.¹⁰⁸

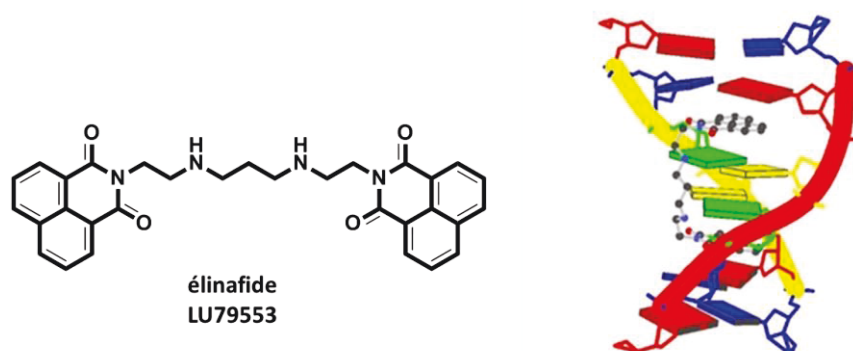


Figure 2. 12 : Structure d'un composé bis-intercalant de l'ADN et modélisation de son interaction dans un hexamère d'ADN de séquence 5'-d(ApTpGpCpApT)-3' (Structure extraite de la PDB Id 1CX3)

De manière similaire aux chaînes polyamines, un squelette peptidique pourrait stabiliser l'interaction avec l'ADN, à travers la formation de liaisons hydrogène supplémentaires.

Une autre piste permettant d'augmenter l'affinité des dérivés naphthalimide pour l'ADN est l'extension du cycle naphthalimide.

La formation de bases de Tröger,¹⁰⁹ l'extension du corps aromatique par un benzène¹¹⁰ (azonafide), par un cycle thiazole¹¹¹ ou encore l'addition de divers substituants comme des noyaux *diimide naphthalimides*¹⁰⁹, ou des triazoles^{107, 112} (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) permettent l'obtention de dérivés possédant de nouvelles activités anticancéreuses. Ces substituants ou extension de cycle induisent en effet un gain d'affinité pour la double hélice pouvant aller jusqu'à facteur 1000 par rapport au naphthalimide. Très souvent, la combinaison de l'insertion d'hétéroatomes dans une extension du cycle permet à la fois d'augmenter la surface d'interaction avec les paires de bases de l'ADN et la formation de nouvelles liaisons hydrogène.

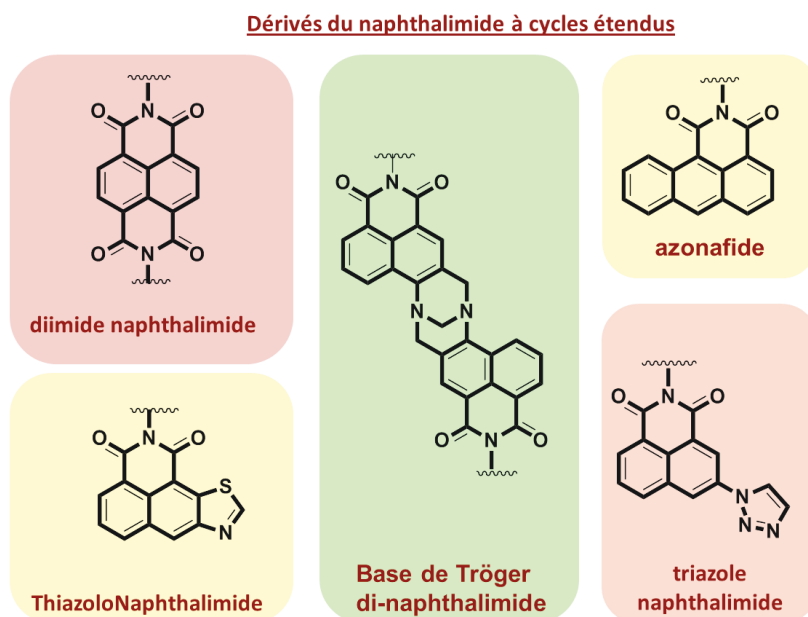


Figure 2. 13 : Structure des composés naphthalimides capables de reconnaître l'ADN (affinité moy $\sim 10^5$ - 10^6 M¹)

En conclusion, le naphthalimide est connu pour ses capacités de sensibilisation des ions Ln^{3+} . Ses capacités d'interactions avec l'ADN, sont, elles, beaucoup plus controversées. L'étude de la luminescence centrée sur le métal de nos nouveaux complexes Ln^{3+} peptide contenant un noyau naphthalimide, permettra de visualiser son affinité pour l'ADN.

II De P²² aux sondes Intercalant-P²²

Six peptides, contenant une unité proflavine, naphthalimide ou thiazonaphthalimide ont été obtenus et étudiés. Les sondes pour lesquelles l'unité intercalante est insérée directement sur la fonction amine *N-ter* de l'acide aminé modifié **Ada₂**, sont les sondes de première génération **P₁** et **N₁**. Un espaceur glycine a été inséré entre l'unité intercalante et l'extrémité *N-ter* des peptides **P₂** et **N₂**, de deuxième génération. Enfin **P₃** et **N₃** appartiennent à la troisième génération et incluent soit un acide aminé pentadentate soit un noyau naphthalimide étendu, TNaph. (Figure 2. 14).

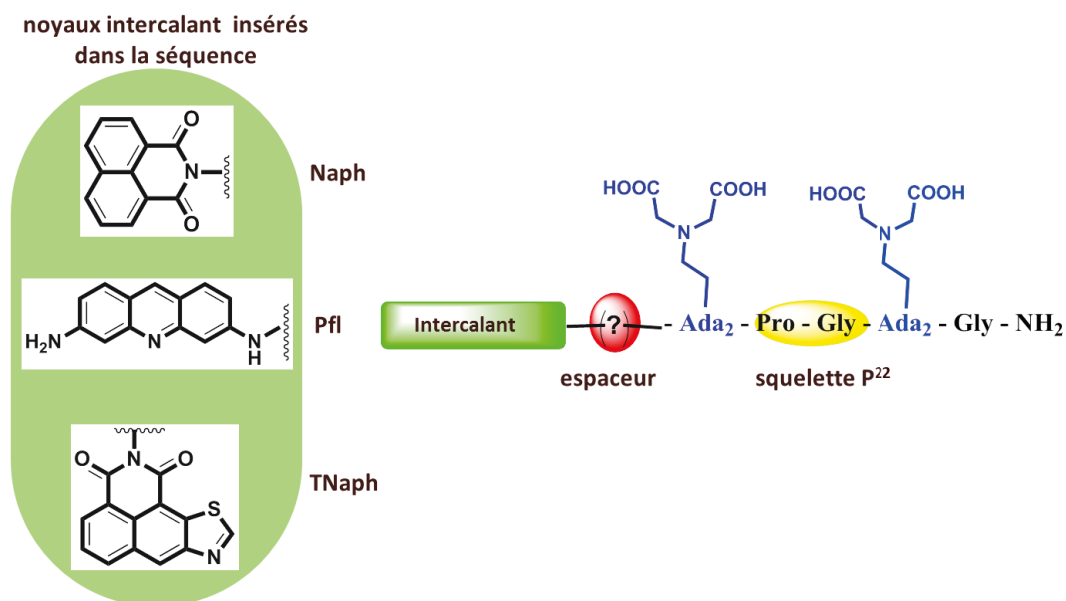


Figure 2. 14 : Structure des sondes visées

II.1 Sondes de première génération

Notre choix s'est porté sur l'insertion des composés **proflavine** et **naphthalimide** dans la séquence de **P²²**. La sensibilisation par *effet d'antenne* étant fortement dépendante de la distance, le choix de la position d'insertion des noyaux dans la séquence peptidique est primordial. Néanmoins, un trop fort encombrement stérique autour du noyau aromatique pourrait être préjudiciable, à la fois pour les propriétés de luminescence, et également pour les propriétés d'interaction dans l'ADN (rigidité trop élevée).

Une insertion en position *N-ter* de la séquence de l'hexapeptide, en lieu et place de l'acide aminé tryptophane de **P²²**, a donc été choisie. Les deux sondes visées ont donc les structures exposées *figure 2. 15*. De plus, une insertion de l'intercalant en position *N-ter* permet d'utiliser le protocole de synthèse peptidique sur phase solide (**SPPS**) usuel maîtrisé au laboratoire. Le choix de l'espaceur entre les intercalants et la chaîne peptidique **P²²** est également important pour une sensibilisation efficace des ions Eu^{3+} .

II.2 Sondes de deuxième génération : Introduction d'un espaceur

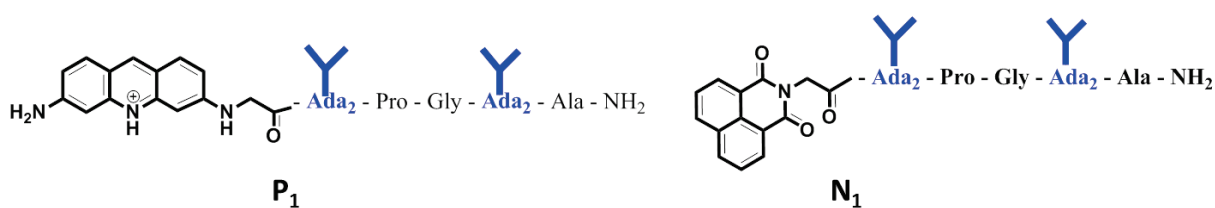
L'introduction d'un noyau aromatique de type proflavine ou naphthalimide dans la séquence peut potentiellement engendrer un fort encombrement stérique, qui peut affecter les propriétés de complexation des ions lanthanides ainsi que les capacités d'interaction avec l'ADN. Une forte gêne stérique peut en effet défavoriser la formation du complexe d'euporium, mais également diminuer la surface d'interaction exposée à l'ADN. L'insertion d'un espaceur dans la séquence a donc pour but d'aider à diminuer ces effets. Néanmoins, l'espaceur peut aussi éloigner trop fortement l'intercalant du cation Eu^{3+} , empêchant alors toute détection de l'ADN à travers la luminescence centrée sur l'euporium.

La comparaison des sondes de première et deuxième génération permet d'analyser l'impact de l'insertion d'un espaceur entre le noyau intercalant et la séquence peptidique sur l'efficacité de la sensibilisation de l'euporium et la reconnaissance de l'ADN.

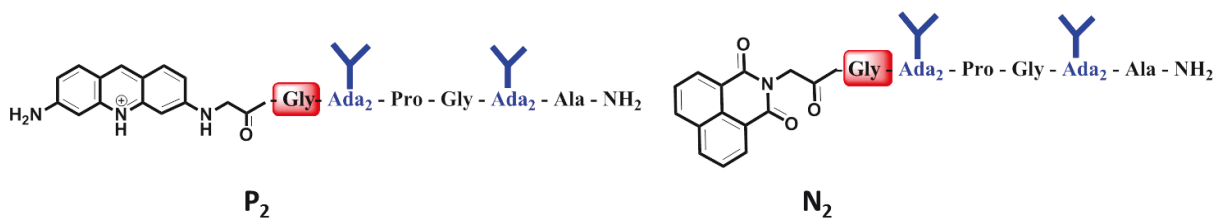
Par comparaison avec la littérature des sondes dérivées de la proflavine capable de reconnaître l'ADN,^{82, 113, 114, 115} ainsi qu'en analysant des structures synthétiques types polyamine capable de reconnaître l'ADN,^{116 117} l'insertion d'un espaceur glycine a été choisi. Sa faible taille permet de minimiser l'éloignement intercalant-euporium. De plus, sa disponibilité et sa compatibilité avec la stratégie de synthèse sur support solide (SPPS), ont permis d'obtenir aisément les peptides de deuxième génération **P₂** et **N₂**. (*figure 2. 15*)

Structures des sondes développées au laboratoire

Sondes de première génération



Sondes de deuxième génération



Sondes de troisième génération

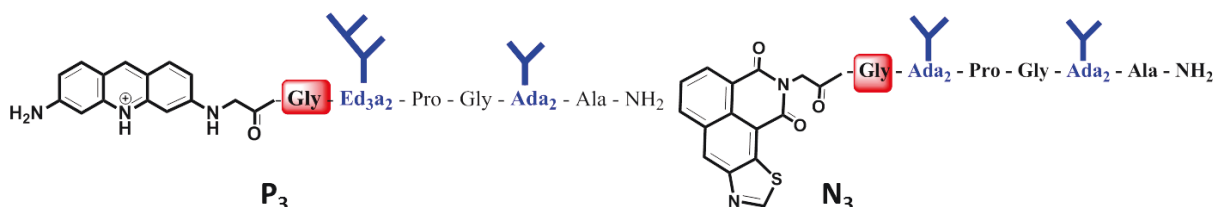


Figure 2. 15 : Structures des sondes développées au laboratoire

II.3 Sonde de troisième génération : peptide de haute denticité

La sonde de troisième génération **P₃** (Figure 2. 16) possède un acide aminé non naturel pentadentate **Eda3a₂**. En comparaison avec les sondes de première et deuxième générations, elle possède donc 8 sites potentiels de coordination des ions Ln³⁺.

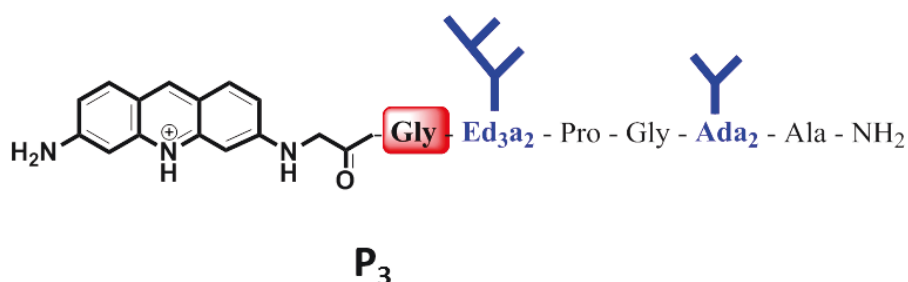


Figure 2. 16 : Structure de la sonde P₃

L'introduction de l'acide aminé **Eda3a₂** permet d'obtenir un peptide de **Haute Denticité (HD)** et ainsi de déshydrater la première sphère de coordination des ions Ln³⁺, par augmentation du nombre de sites de coordination disponible. L'insertion de cet acide aminé non naturel pentadentate dans la séquence a déjà permis d'obtenir des complexes de terbium déshydratés (q=0 TbP^{HD2}).⁷⁶ Les désactivations non radiatives étant réduites au minimum, le complexe obtenu possède des propriétés de luminescence améliorées.

La luminescence dans le proche infrarouge est plus sensible aux désactivations non radiatives que la luminescence des ions Ln³⁺ émettant dans le visible. Un contrôle total de la première sphère de coordination de ces ions est donc crucial pour permettre la détection d'un signal de luminescence. Le développement de ligands de haute denticité comme **P₃** devrait permettre de détecter la luminescence des ions Ln³⁺ émettant dans le proche infrarouge, comme l'ytterbium (Yb³⁺) ou le néodyme (Nd³⁺). Un autre avantage est la stabilité des complexes formés, pouvant aller jusqu'au femtomolaire à pH physiologique.⁷⁶

L'influence de la position d'insertion de l'acide aminé pentadentate **Eda3a₂** a été étudié dans les sondes **P^{HD2}** et **P^{HD5}** (Figure 2. 17) au laboratoire.^{40b, 44} Les études de complexation des ions Ln³⁺ (ES-MS, titration) ont montré que l'incorporation en position 2 (**P^{HD2}**) dans la séquence permet la formation d'un unique complexe monométallique. À l'inverse, l'incorporation en position 5 entraîne la formation de complexes polymétalliques en excès de métal.^{76, 118}

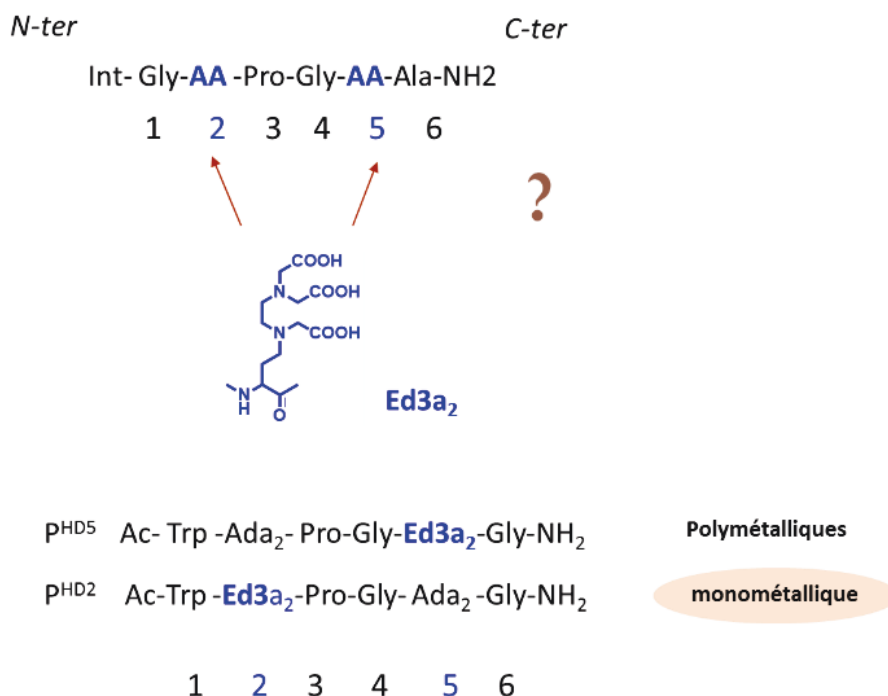


Figure 2. 17 : Choix de la position d'insertion de l'acide aminé pentadentate **Ed3a₂**

C'est pour toutes ces raisons que l'acide aminé **Ed3a₂**, synthétisé au laboratoire, a été introduit dans la séquence peptidique de **P₃** en position 2.

Notre choix s'est porté sur la synthèse d'une sonde de haute denticité de la famille de la proflavine. En effet, la longueur d'onde d'excitation à basse énergie (λ exc. 450 nm) est plus propice à la sensibilisation des ions Ln³⁺ émettant dans le proche IR.

II.4 Sonde de troisième génération : Noyau naphthalimide à cycle étendu

Parmi toute la famille des dérivés naphthalimides capable d'interagir avec l'ADN, c'est le noyau *thiazolonaphthalimide* qui a retenu notre attention. Ses propriétés d'interaction avec l'ADN sont démontrées, et son affinité est nettement supérieure à celle du noyau naphthalimide (10^3 vs 10^5 M⁻¹).¹¹¹ De plus, ses propriétés spectroscopiques étant très proches de celles du naphthalimide, la sensibilisation des ions Eu³⁺ devrait être similaire. C'est pour

ces raisons que notre choix s'est porté sur ce noyau. Celui-ci étant plus encombrant que le naphthalimide, nous avons décidé de conserver l'espaceur glycine dans la séquence.

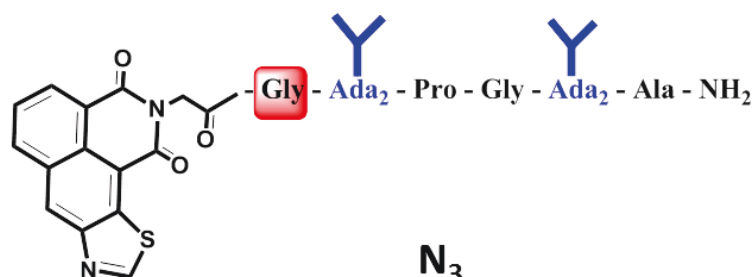


Figure 2. 18 : Structure de la sonde N_3

III Synthèse et caractérisation des sondes

III.1 Stratégie

Les six sondes sont synthétisées suivant le protocole de synthèse peptidique sur phase solide couramment utilisée au laboratoire. Celui-ci est basé sur le couplage de l'extrémité acide carboxylique libre d'un acide aminé sur l'extrémité amine du peptide en croissance. La synthèse s'effectue donc de l'extrémité *C-ter* du peptide vers l'extrémité *N-ter*. Les intercalants proflavine et naphthalimide ont donc été modifiés pour y introduire **une fonction acide carboxylique**, de manière à être intégrés dans la séquence peptidique dérivé de P^{22} suivant le protocole de synthèse peptidiques sur support solide utilisé au laboratoire. Les dérivés à synthétiser sont donc les suivants :

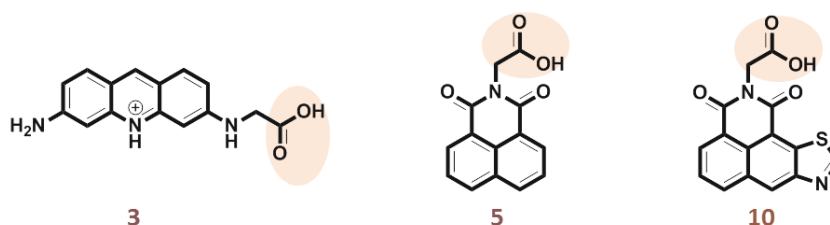


Figure 2. 19 : Structure chimique des dérivés intercalant proflavine **3** et Naphthalimide **5,10**

III.1.1 Synthèses des intercalants

III.1.1.1 Synthèse du dérivé proflavine 3

Le composé **3** a été synthétisé en 3 étapes à partir de la proflavine avec un rendement global de 23% (Figure 2. 20).^{117, 119} La première étape est la dissymétrisation de la proflavine par introduction d'un groupement *ter*-butyloxycarbonyle (Boc) sur une des deux fonctions amines primaires. Pour ce faire, la proflavine est mise en réaction avec 2 équivalents de Boc₂O. Cette réaction conduit à un mélange de produits duquel la proflavine mono-protégée **1** est isolée après purification sur colonne de silice avec un rendement de 53%. La présence de produits secondaires (7% de produit di-substitué) explique le rendement moyen obtenu.

Ensuite, le traitement du composé **1** par le de *tert*-butyl -2-chloroacétate en présence de carbonate de césium conduit majoritairement au produit **2** après purification sur colonne de silice (62 % de rendement). En effet, la présence du groupement -Boc, rend par un effet attracteur, le proton de l'amine substitué plus acide. Celui-ci est donc plus facilement déprotonable. C'est cette déprotonation qui permet l'obtention du produit désiré sous forme majoritaire à l'issue de la substitution nucléophile de type 2 du *tert*-butyl-2-chloroacétate. Cette réaction dure trois jours durant lesquels plusieurs additions successives de *tert*-butyl-2-chloroacétate (une toute les 24 heures) sont nécessaires du fait de la sensibilité de ce produit en présence de nucléophile et de sa rapide dégradation. Le rendement moyen de cette étape est expliqué par la formation de produits secondaires di et tri-substitués (27 % de tri-substitués).

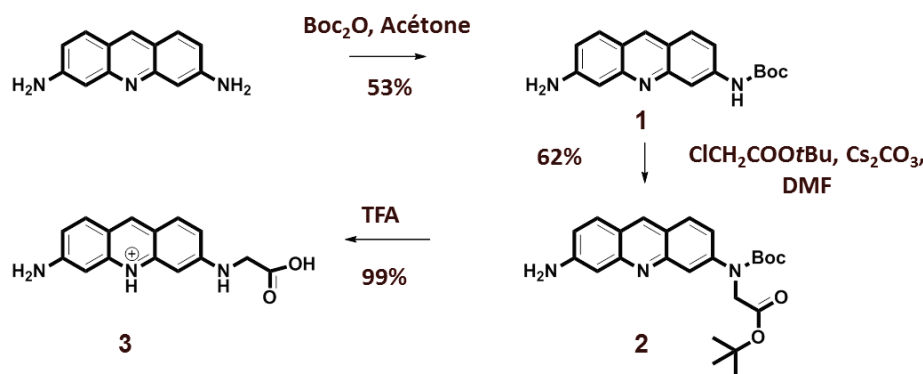


Figure 2. 20 : Schéma réactionnel de synthèse du composé proflavine intercalant **3**

Les groupements protecteurs (Boc, *t*Bu) du composé **2** sont ensuite clivés en milieu acide par traitement à l'acide trifluoroacétique avec un rendement de 70%. Le produit d'intérêt **3** est obtenu sous forme de trifluoroacétate d'ammonium après précipitation dans l'éther.¹²⁰

III.1.1.2 Synthèse du dérivé naphthalimide **5**

Le dérivé naphthalimide **5** a été synthétisé en 2 étapes avec un rendement global de 86% à partir de l'anhydride naphthalique selon une procédure analogue à celle décrite par *Qian*.¹²¹ La première étape consiste à condenser l'anhydride naphthalique avec la fonction amine primaire de la glycine sous forme d'ester méthylique pour former le composé **4**. Cette réaction est réalisée en présence de triéthylamine afin de libérer la fonction amine de la glycine vendue sous forme de sels de chlorure d'ammonium. Le produit désiré **4** est obtenu après purification sur colonne de silice avec un rendement de 91%. Ce dernier est ensuite mis en jeu dans une réaction de saponification en présence d'un excès de base, l'hydroxyde de lithium, dans un mélange THF/MeOH. Le méthanol est présent en faible quantité pour assurer la solubilisation des réactifs. Le dérivé du naphthalimide **5** est obtenu après précipitation en milieu acide avec un rendement de 95% (*Figure 2. 21*).¹²¹

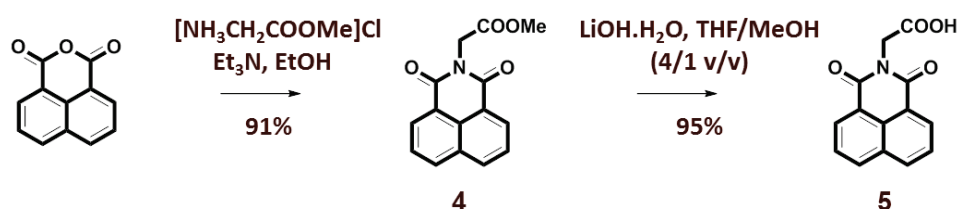


Figure 2. 21 : Schéma réactionnel de synthèse du composé intercalant naphthalimide **5**

III.1.1.3 Synthèse du dérivé thiazolonaphthalimide **10**

Le dérivé thiazolonaphthalimide **10** a été obtenu en 5 étapes avec un rendement global de 9% à partir de l'anhydride 3-nitro-1,8-naphthalique selon le protocole établi par *Qian* (*Figure 2. 22*).^{122, 123, 124} Toutes les étapes de synthèses ont été réalisées à l'abri de la lumière.

CHAPITRE II –Elaboration et Synthèse des sondes

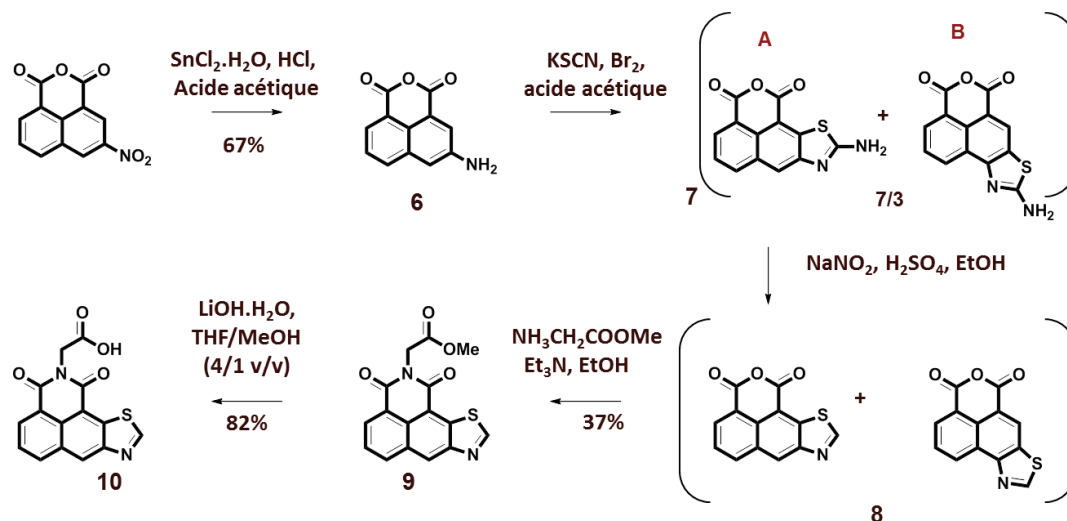


Figure 2. 22 : Schéma réactionnel de synthèse du composé intercalant naphthalimide **10**

La première étape est la réduction du groupement *nitro* en groupement *amine*. Différentes méthodes ont été testées. Leurs résultats sont récapitulés dans le *tableau 2.3*.

Tableau 2. 3 : *Conditions et résultats obtenus lors de l'étape de réduction pour l'obtention du composé 6*

CONDITIONS		RENDEMENTS
H ₂ , Pd/C	DMF, 3 bars, 3 jours	53 %
SnCl ₂ .H ₂ O, HCl	EtOH, sonication 9×9min	72% brut
SnCl ₂ .H ₂ O,HCl	acide acétique, Reflux 8 heures	90%

Des essais de réduction du groupement *nitro* par hydrogénation catalytique (3 bars H₂, Pd/C) dans la DMF ont été effectués. Cependant, la cinétique lente (3 jours), la difficulté d'élimination de la DMF, et le fait que la réaction ne soit pas totale n'en font pas une méthode de choix. La seconde méthode est une réduction par sonication en présence de sels d'étain. Cette méthode, bien que rapide et très originale, conduit à la formation de nombreuses espèces secondaires indésirables difficiles à séparer du produit d'intérêt.¹²⁵ La troisième méthode, celle que nous avons employée est la réduction de la fonction *nitro* en *amine* par les

sels d'étain à reflux de l'acide acétique. Elle permet d'obtenir l'amine **6** avec un rendement de 90% après purification sur colonne.^{126, 127}

L'insertion du cycle aminothiazole est réalisée par cyclisation à l'aide de thiocyanate et de dibrome. Dans un premier temps, le composé thiocyanate s'additionne sur l'amine primaire de cycle naphthalimide pour former un intermédiaire *naphthalimide-thiourée*. L'addition de dibrome induit la cyclisation et la formation du composé amino-thiazolonaphthalimide **7** attendu. Cette réaction conduit à deux isomères **A** et **B** (Figure 2. 22) en proportion 7/3 déterminée par RMN. L'isomère **A**, en quantité supérieure, est le produit désiré. L'instabilité de ces produits (oxydation, sensibilité à la lumière) a conduit à une dégradation lors des tentatives de purification (colonne de silice, recristallisation). Le mélange brut a donc été utilisé pour l'étape suivante.

L'étape suivante est la substitution de l'amine portée par le cycle thiazole par un hydrogène, par un traitement à l'aide de nitrite de sodium en milieu acide. L'addition du nitrite de sodium sur l'amine primaire conduit à la formation d'un intermédiaire nitrosamine, qui en présence d'acide forme *in situ* un diazonium. Finalement, l'addition d'éthanol à reflux conduit au départ de N₂.^{128, 129} Après précipitation dans l'eau glacée, le produit désiré est isolé sous forme d'un mélange de deux isomères. A ce stade, les deux isomères n'ont pu être séparés. Comme précédemment, ce mélange est mis en jeu dans une réaction de condensation en présence d'ester de glycine méthylique. A l'issue de cette étape de condensation, les deux isomères ont été séparés par chromatographie sur colonne de silice et le produit **9** est ainsi obtenu avec un rendement de 37%. Finalement, la saponification en présence d'hydroxyde de lithium permet d'obtenir le produit d'intérêt **10** avec un rendement de 87% après purification.

III.1.1.4 Synthèses des acides aminés non naturels

Deux types d'acides aminés modifiés ont été insérés dans la séquence peptidique, afin de former des complexes de Ln³⁺ stables à pH physiologique. Ils ont été synthétisés suivant les protocoles mis au point par Federico Cisnetti au laboratoire.^{76, 77}

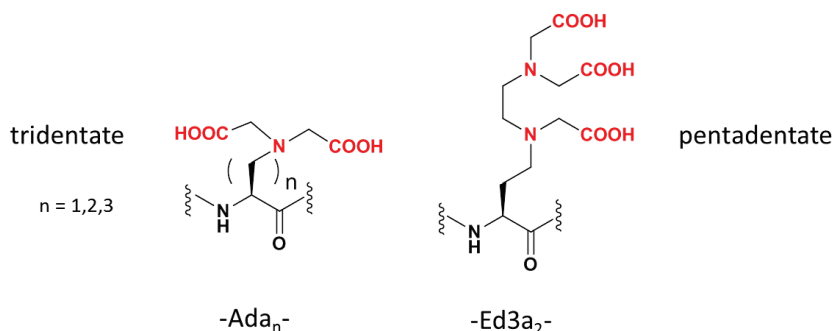


Figure 2. 23 : Structures des acides aminés chélatants

Le premier acide aminé, appelé **Ada₂**, possède 3 sites de coordination, le second se nomme **Ed3a₂** et dispose de 5 sites de coordination. Leur voie de synthèse est représentée sur la Figure 2. 24. Les acides aminés **Ada₂** et **Ed3a₂** possèdent une extrémité acide carboxylique libre et sont protégés sur la fonction amine ainsi que sur leur chaîne latérale pour permettre le couplage par SPPS et empêcher toutes réactions secondaires parasites.

Le produit de départ de ces deux composés est l'acide aminé L-Homosérine (**L-Hse**), qui porte une fonction alcool primaire. Après protection de l'extrémité amine par un groupement *Fmoc* ($\eta=94\%$), de l'extrémité acide par un groupement *benzyl* ($\eta=95\%$), l'acide aminé **L-Hse** est engagé dans une réaction d'oxydation de *Swern*. La fonction alcool est alors oxydée en présence de chlorure d'oxalyle et de DMSO pour conduire à l'aldéhyde **2** avec un rendement de 45%. Le rendement global de ces trois étapes est de 42%. L'aldéhyde **2** obtenu est le réactif de départ pour la formation des deux acides aminés protégés finaux. En présence de l'amine secondaire adéquate (Figure 2. 24), une réaction d'amination réductrice permet la formation de l'acide aminé désiré. Le composé **3**, nécessaire à la formation de l'acide aminé pentadentate, a été synthétisé suivant le protocole de *Scheider*.¹³⁰ Finalement, l'extrémité acide est ensuite déprotégée par hydrogénation catalytique, pour donner les acides aminés **Fmoc-Ed3a₂(*t*Bu)₃-OH** et **Fmoc-Ada₂(*t*Bu)₂-OH**, avec des rendements respectifs de 81% et 83% pour les deux dernières étapes.

CHAPITRE II –Elaboration et Synthèse des sondes

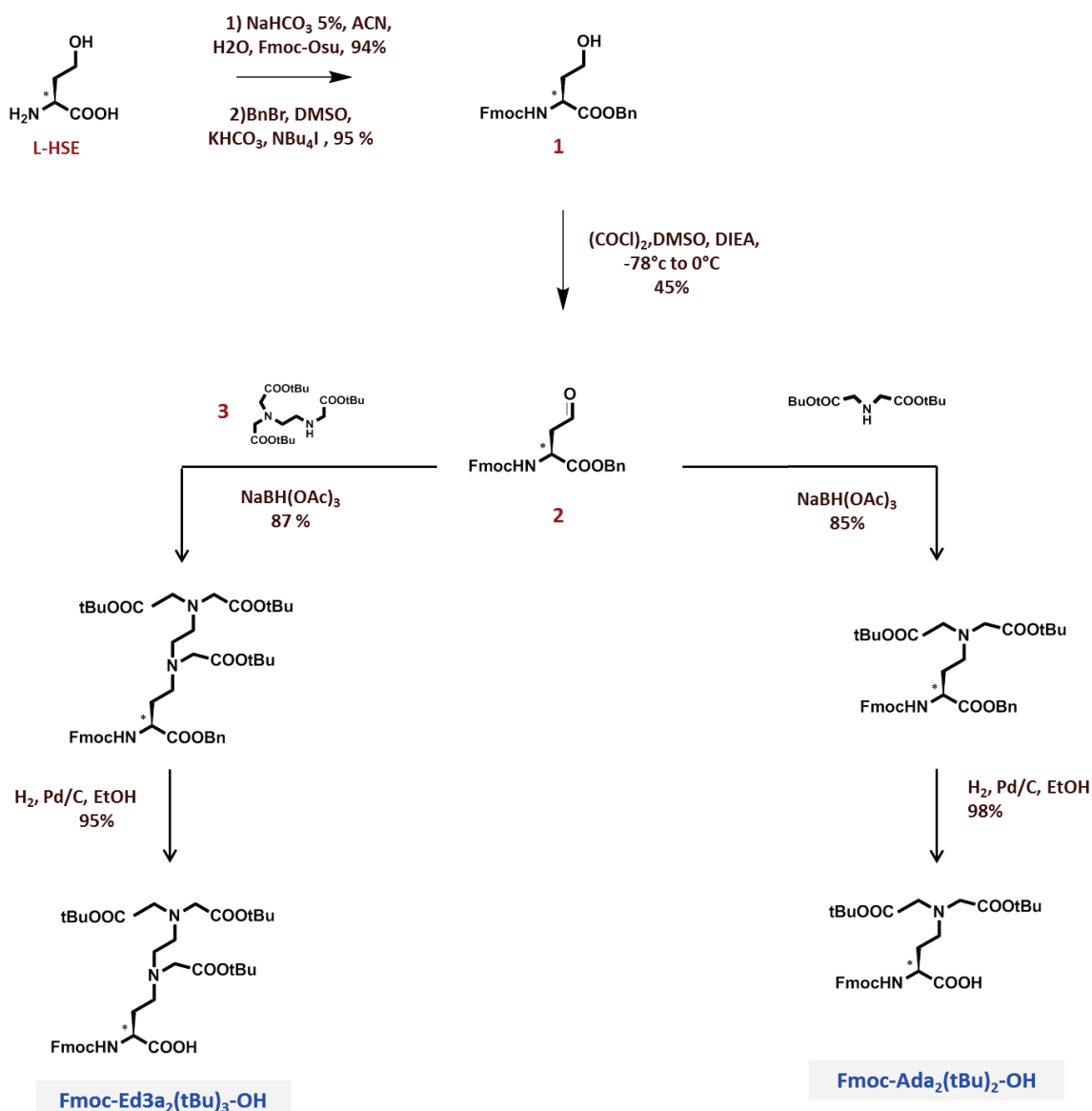


Figure 2. 24 : Schéma de synthèse des acides aminés non naturels

III.1.2 Synthèse des peptides

La Synthèse Peptidique sur Phase Solide ou **SPPS** est née en 1963 de l'esprit de **Robert Bruce Merrifield**, biochimiste Texan. Cette invention lui a d'ailleurs permis d'obtenir le prix Nobel de chimie en 1984. Dans le but de s'affranchir des problèmes de solubilité et de purification présents lors de la synthèse de peptide en phase homogène, il a développé une méthode de synthèse en phase hétérogène. L'utilisation d'un polymère polystyrène comme

CHAPITRE II –Elaboration et Synthèse des sondes

point d'ancrage des acides aminés lui a permis d'obtenir un térapeptide de haute pureté sans aucun problème de solubilité.¹³¹

La synthèse des peptides s'effectue suivant le protocole de synthèse sur support couramment utilisé au laboratoire. Le support utilisé est une bille de résine type *RINK amide*. Son suffixe amide fait référence à l'extrémité *C-ter* du peptide en croissance, qui après détachement du support devient un groupement amide. (Figure 2. 25)

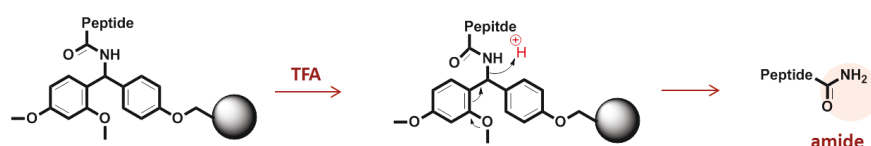


Figure 2. 25 : Mécanisme de détachement du peptide de la résine et formation de son extrémité amide

L'attachement de l'acide aminé sur le support, permet de neutraliser son extrémité acide carboxylique lors de la réaction de couplage et d'éliminer les réactifs excédentaires par un lavage. Chaque acide aminé introduit, naturel et non naturel, est protégé par un groupement Fmoc sur l'extrémité amine, et des groupements protecteurs stables aux conditions de couplage et de déprotection du Fmoc. La Figure 2. 26 illustre la stratégie de SPPS utilisée au laboratoire.

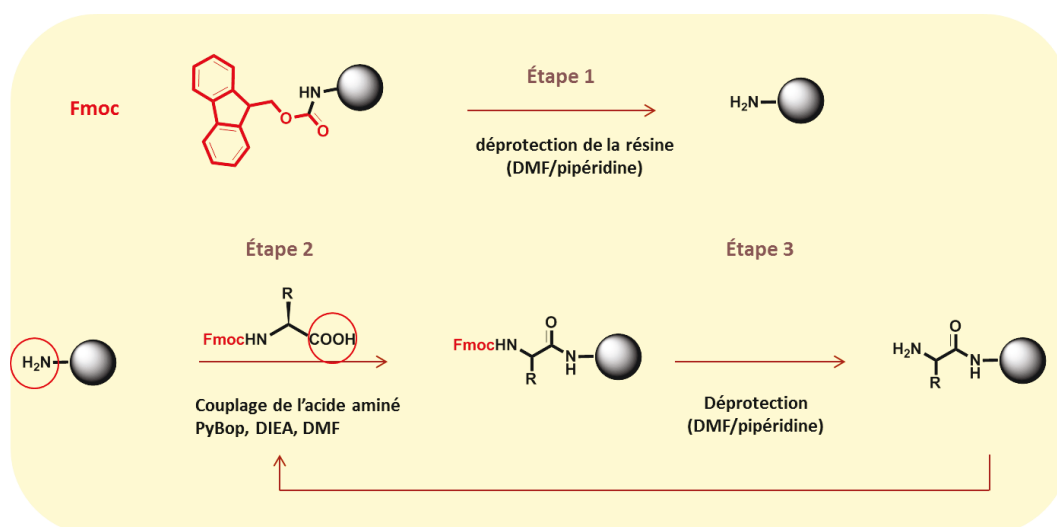


Figure 2. 26 : Principe de la SPPS : réaction de déprotection, puis de couplage d'un acide aminé

Lors de l'étape de couplage, la fonction acide carboxylique est activée par un agent dit activateur, le composé PyBob (Benzotriazole-1-yl-Oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium

CHAPITRE II –Elaboration et Synthèse des sondes

hexafluorophosphate) qui aide également à contrôler l'épimérisation. Une fois l'acide aminé couplé sur le support, une étape de « *capping* » (coiffage en français) des extrémités amines n'ayant pas réagi est effectuée. Cette étape permet de minimiser le nombre de peptides secondaires indésirables. L'extrémité *N-ter* Fmoc de l'acide aminé greffé sur le support est alors déprotégée à l'aide de la pipéridine dans la DMF. Le prochain acide aminé à coupler peut alors être introduit, et ainsi de suite jusqu'à obtenir le peptide désiré. Le peptide obtenu à la fin de la synthèse sur support porte donc une extrémité amine libre en *N-ter*, sur laquelle est introduit l'intercalant souhaité.

À la fin de la synthèse, le peptide est détaché de la résine par traitement à l'acide trifluoroacétique. Cette étape de détachement est à double emploi puisqu'elle permet également de déprotéger les chaînes latérales des acides aminés, (Figure 2. 27).¹¹⁹ Finalement, les peptides d'intérêts sont purifiés par HPLC en phase inverse.

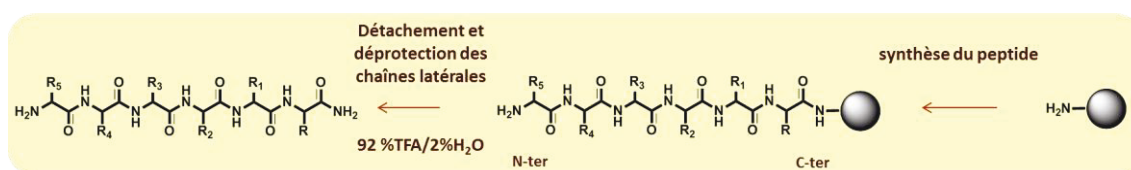


Figure 2. 27 : Synthèse peptidique : Croissance du peptide sur la résine, puis détachement en milieu acide.

Ainsi les six peptides d'intérêt: trois dérivés de la famille de la proflavine **P₁**, **P₂** et **P₃** et trois dérivés de la famille du naphthalimide **N₁**, **N₂** et **N₃** sont obtenus avec des rendements de 17 à 47% et des puretés supérieures à 97%. Le Tableau 2. 4 récapitule le nom donné à ces sondes, les six séquences obtenus ainsi que le rendement de la SPPS.

La pureté des sondes obtenues est estimée par HPLC analytique comme le montre la Figure 2. 28 pour le peptide **P₁**.

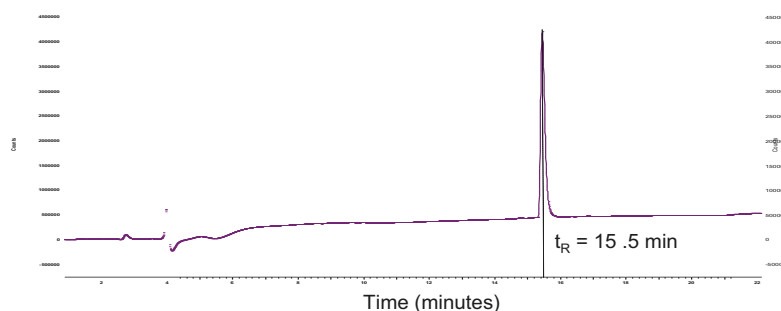


Figure 2. 28 : Chromatogramme HPLC analytique du peptide **P₁** enregistré à 214 nm après purification HPLC

CHAPITRE II –Elaboration et Synthèse des sondes

Tableau 2. 4 : Tableau récapitulatif des différents peptides obtenus

Noms	Séquence	Rendement après purification
P ₁	PfICH ₂ CO-Ada ₂ -Pro-Gly-Ada ₂ -Ala-NH ₂	32%
P ₂	PfICH ₂ CO-Gly-Ada ₂ -Pro-Gly-Ada ₂ -Ala-NH ₂	23%
P ₃	PfICH ₂ CO-Gly-Ed3a ₂ -Pro-Gly-Ada ₂ -Ala-NH ₂	25%
N ₁	NaphCH ₂ CO-Ada ₂ -Pro-Gly-Ada ₂ -Ala-NH ₂	44%
N ₂	NaphCH ₂ CO-Gly-Ada ₂ -Pro-Gly-Ada ₂ -Ala-NH ₂	47%
N ₃	TNaphCH ₂ CO-Gly-Ada ₂ -Pro-Gly-Ada ₂ -Ala-NH ₂	17%

III.2 Caractérisation

Ces six sondes ont été caractérisées par différentes techniques : la spectrométrie de masse ainsi que la RMN 1D et 2D dans l'eau légère.

La spectrométrie de masse en mode d'ionisation *électrospray* (ES-MS) permet de mettre en évidence le composé désiré, en détectant les espèces en fonction de leur quotient masse/charge (m/z). La comparaison des masses attendues et obtenues traduit la présence du produit désiré. On distingue deux modes de détection : le mode positif, où les espèces détectés sont globalement positives et le mode négatif où les espèces sont globalement chargées négativement. Le spectre ES-MS obtenu pour la sonde P₁ est représenté *Figure 2. 29*.

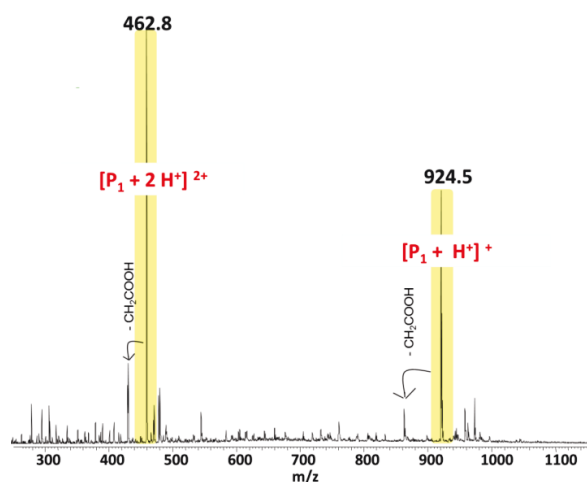


Figure 2. 29 Spectre (+)ES-MS de la sonde P₁

La séquence des peptides est déterminée par RMN dans un mélange H₂O/D₂O 90/10 v/v. En effet, la labilité des protons amides et leurs caractères échangeables imposent de travailler dans l'eau légère si l'on veut détecter ces signaux. Travailler dans l'eau légère signifie qu'il faut supprimer le signal de l'eau très intense afin d'obtenir un spectre correct du peptide.

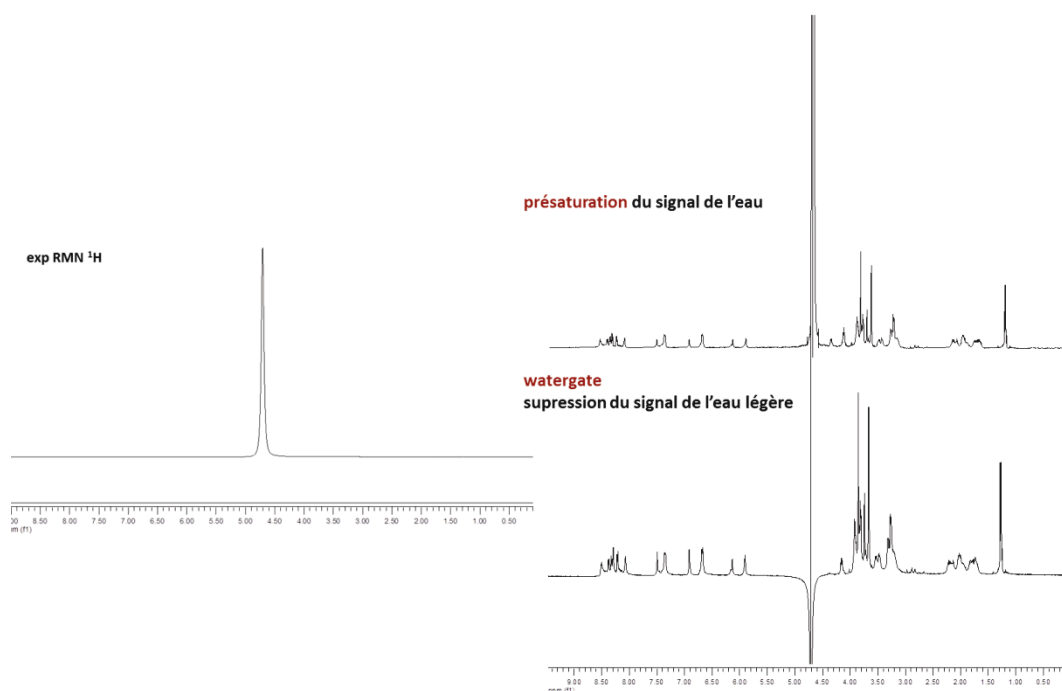


Figure 2. 30 : Expériences de RMN ¹H à 500 MHz du peptide P₃ menées dans l'eau légère. Le spectre du haut est un spectre de RMN classique. Celui du milieu est une expérience de RMN où l'on a présaturé le signal de l'eau. Le spectre du bas est l'expérience watergate, où le signal de l'eau a été supprimé.

Cette suppression s'effectue soit par une simple présaturation du signal de l'eau, soit par une séquence RMN « **WATERGATE** » (**WATER**-suppression by **GrAdient-Tailored Excitation**). La Figure 2.30 montre l'effet de la suppression de l'eau pour la sonde P₃.

Des séquences RMN **TOCSY WATERGATE**, qui mettent en évidence les couplages scalaire J entre protons, ont ensuite permis d'attribuer la fréquence de résonance de chaque proton de chaque acide aminé. Des expériences mettant en évidence des couplages dans l'espace (**NOESY** et **ROESY**) ont montré que les peptides étaient non structurés en solution. L'expérience **ROESY** nous a aussi permis de confirmer l'enchaînement des acides aminés, grâce aux couplages à travers l'espace entre deux protons amides de deux acides aminés adjacents.

CHAPITRE II –Elaboration et Synthèse des sondes

Afin d'aider le lecteur à comprendre les études qui vont suivre, une feuille détachable cartonnée avec les structures des sondes, leurs noms, et leurs classe générationnelle est à disposition au début du manuscrit.

Les six peptides ainsi caractérisées ont ensuite été mis en présence de sel d'euporium. Leurs propriétés de complexation ont été déterminées par des dosages de luminescence en temps résolu et des dosages par spectrométrie de masse ES-MS. Les résultats obtenus nous ont permis d'analyser l'impact de l'incorporation d'unité d'intercalation de l'ADN sur les propriétés de complexation du peptide **P²²**.

Chapitre III

Complexation de l'Europium

Six sondes peptidiques ont été obtenues: trois dérivés de la proflavine (**P**₁, **P**₂ et **P**₃) et trois dérivés du naphthalimide (**N**₁, **N**₂ et **N**₃). Ces sondes sont classées en trois catégories, première, deuxième et troisième génération, selon leurs compositions, à savoir la présence d'un espaceur, d'acides aminés chélatants tri- ou penta-dentate (**Ada**₂ ou **Ed3a**₂) et selon le noyau aromatique inséré. Ces sondes ont été conçues dans le but de pouvoir reconnaître l'ADN grâce à la luminescence centrée sur le métal. Rappelons que le noyau proflavine, à l'inverse du noyau naphthalimide, n'est pas connu pour sensibiliser les ions lanthanides. La première étape a donc été de s'assurer de la sensibilisation de l'ion europium par le noyau aromatique proflavine.

I Sonde de première génération : complexation de l'euporium

I.1 Effet d'antenne dans les complexes de première génération

Pour s'assurer de la sensibilisation et du mode de transfert d'énergie par effet d'antenne, la luminescence en temps résolu de l'euporium a été mesurée après excitation à la longueur d'onde d'absorption maximale des noyaux aromatiques proflavine et naphthalimide.

La sensibilisation de l'euporium par le noyau naphthalimide dans le complexe Eu**N**₁, est visualisée sur la Figure 3. 1, qui montre l'effet d'antenne observé précédemment par l'équipe de *T Gunnlaugsson*.⁵⁰ La longueur d'onde d'absorption maximale du noyau naphthalimide inséré dans les sondes peptidiques à pH 7 dans un milieu 10 mM HEPES 0,1 M KCl, est de 344 nm. (Figure 3. 1 courbe bleue). En présence d'un équivalent d'euporium et après excitation à 344 nm, le signal de fluorescence de la sonde **N**₁ est détecté (Figure 3. 1 courbe verte). En se plaçant dans un mode de détection résolu en temps, c'est-à-dire avec un délai de 0,05 msec avant la mesure, et après excitation à 344 nm du complexe Eu**N**₁ le signal caractéristique de l'émission de l'euporium est observée (Figure 3. 2 courbe rouge). On distingue les bandes d'émission fines correspondant aux transitions ⁵D₀ → ⁷F_J de l'euporium, où J=1, 2, 3, 4. La sensibilisation par effet d'antenne attendue est donc présente dans le complexe Eu**N**₁.

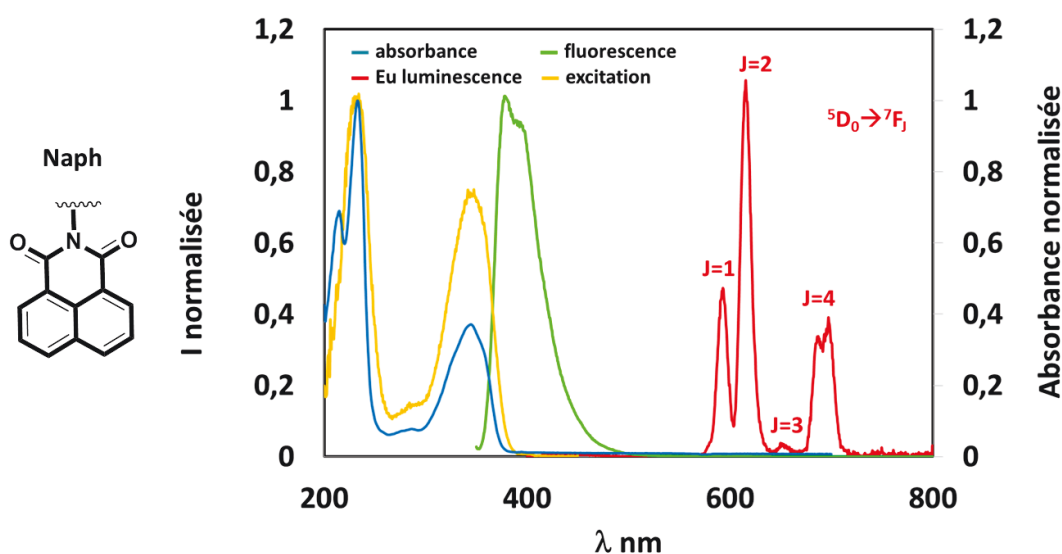


Figure 3. 1 Propriétés spectroscopiques du complexe EuN_1

L'unité proflavine n'est pas référencée comme sensibilisateur des ions lanthanides et ses propriétés de sensibilisation de l'euporium ont donc été étudiées. La longueur d'onde d'absorption maximale du noyau proflavine dans le complexe EuP_1 à pH 7 dans un milieu 10 mM HEPES 0,1M KCl, est de 450 nm. (Figure 3. 2 courbe bleue). Après excitation à 450 nm, le signal de fluorescence très intense de la proflavine de la sonde P_1 est mesuré. (Figure 3. 2 courbe verte) En se plaçant dans un mode de détection résolu temps, c'est-à-dire avec un délai de 0,05 msec avant la mesure et après excitation à 450 nm du complexe EuP_1 le signal caractéristique de l'émission de l'euporium est détecté (Figure 3. 2 courbe rouge). On distingue les bandes d'émission fines correspondant aux transitions ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$ de l'euporium, où $J=1, 2, 3, 4$. Malgré la faible différence d'énergie entre les niveaux donneur de la proflavine et accepteur de l'ion Eu^{3+} ($\Delta E {}^3\pi\pi^* \text{Pfl} \rightarrow {}^7\text{F}_0 \text{Eu}^{3+} = 150 \text{ cm}^{-1}$), la proflavine est capable de sensibiliser l'ion euporium. De plus, le spectre d'excitation effectué en détectant la transition $J=2$ ($\lambda_{em} = 616 \text{ nm}$) est superposable au spectre d'absorption de la proflavine. L'allure des courbes « spectre d'excitation-spectre d'absorption » est similaire (Figure 3. 2 courbe orange). Leur maximum d'intensité se situe à 450 nm. Cela nous indique que l'énergie nécessaire à la sensibilisation provient d'un composé absorbant à cette longueur d'onde. Dans notre cas, le seul composé présent en solution absorbant à 450 nm est l'extrémité *N-ter* proflavine du peptide P_1 . Il y a donc bien sensibilisation par *effet d'antenne*.

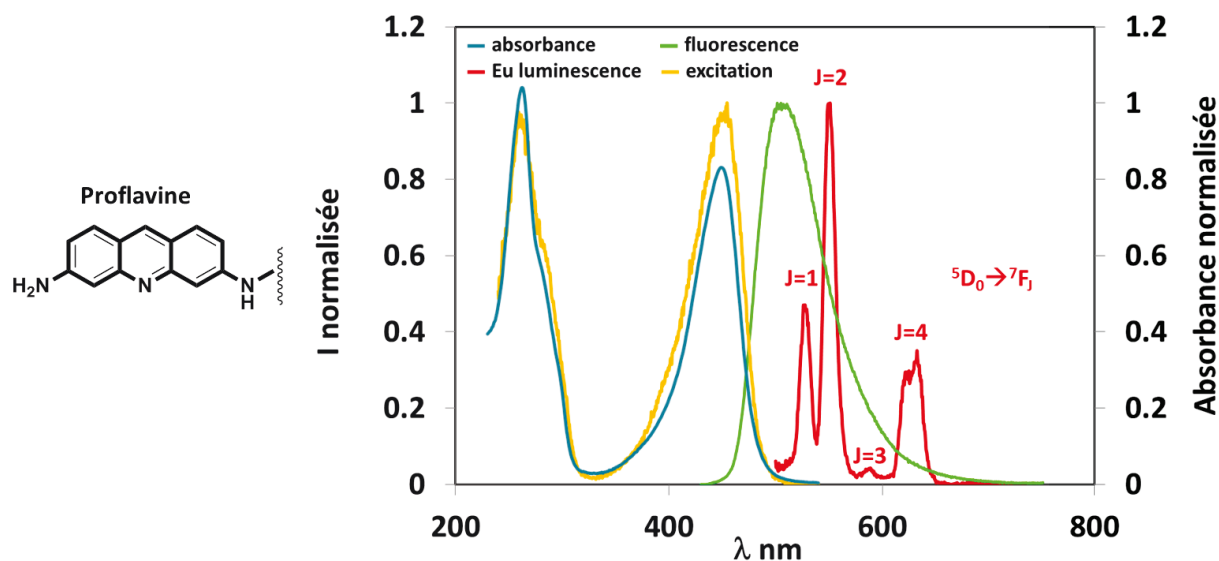


Figure 3. 2 : Propriétés spectroscopiques du complexe EuP_1 .

I.2 Spéciation et stabilité des complexes

Les complexes EuP_1 et EuN_1 montrent donc tous deux une sensibilisation de l'europlum et permettent la détection de la luminescence en temps résolu de ce dernier. Pour interpréter les résultats obtenus par luminescence lors de l'interaction avec l'ADN, il est tout d'abord nécessaire de caractériser les propriétés de complexation (spéciation, stabilité) des peptides P_1 et N_1 .

I.2.1 Spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse confirme la formation de complexes monométalliques, ce qui valide le contrôle de la nucléarité par la séquence Pro-Gly et les acides aminés non naturels Ada_2 , comme démontré dans des travaux antérieurs pour le complexes $\text{LnP}^{22,77}$. La Figure 3. 3 montre les résultats obtenus pour le complexe EuP_1 .

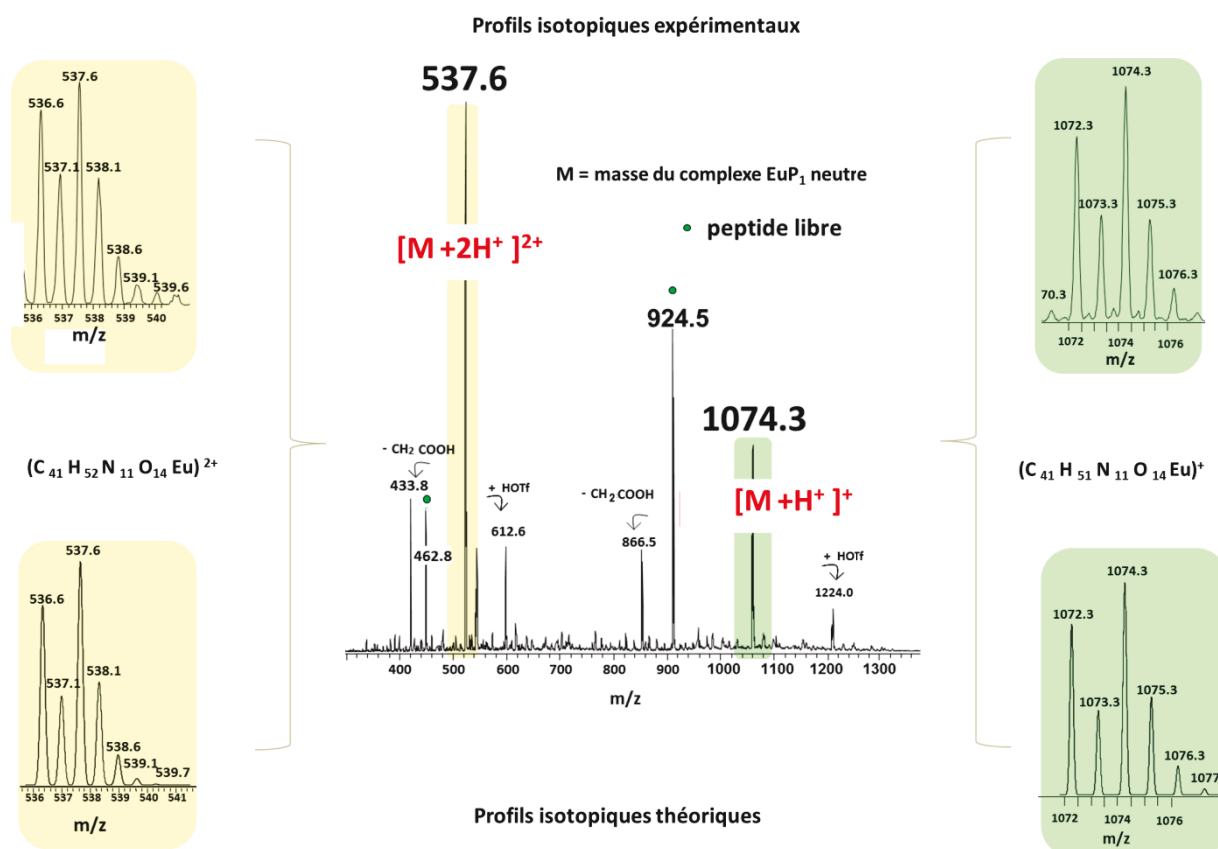


Figure 3. 3 Spectre ES-MS en mode positif d'une solution d'EuP₁ (0,165 mM) dans un tampon AcONH₄ (20 mM, pH 7). Sur les côtés: zoom et comparaison des massifs isotopiques expérimentaux et théoriques de EuP₁ m/z: 537,6 et 1074,3

I.2.2 RMN

Des mesures de complexation par RMN utilisant le La³⁺, diamagnétique, ont été effectuées pour caractériser le nombre d'espèces formés par le peptide N₁. Les spectres de RMN du ¹H dans l'eau légère ont permis de mettre en évidence la formation d'une espèce unique. Le spectre de RMN du peptide à l'état libre révèle la présence de trois espèces, attribuées à des conformations différentes du peptide N₁ en solution.

Après addition d'un équivalent de Lanthane et ajustement du pH à 7 à l'aide de solution aqueuse d'hydroxyde de potassium, la présence d'un seul jeu de signaux confirme la formation d'une espèce monométallique unique (Figure 3. 4).

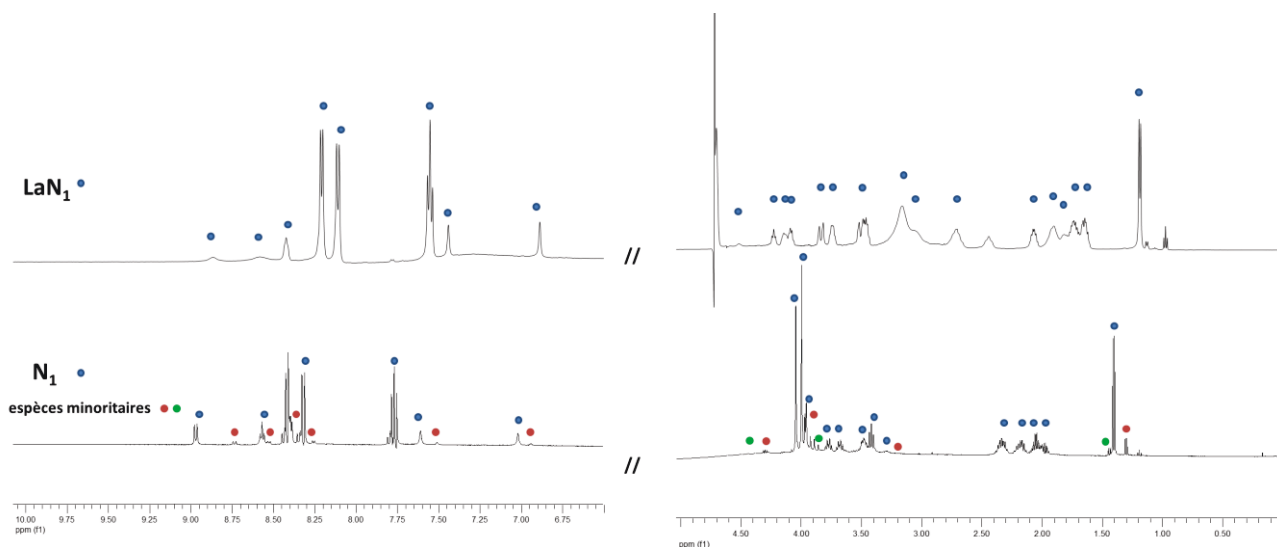


Figure 3. 4 : Spectre de RMN du ^1H dans $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10 v/v) du peptide libre N_1 à pH 3 (2,2 mM) et du complexe LaN_1 à pH 6,9 (3,0 mM) à 298 K

I.2.3 Dosage par luminescence

Les dosages par luminescence en temps résolu des deux peptides P_1 , et N_1 par addition d'une quantité croissante d' Eu^{3+} montrent une augmentation du signal de luminescence de l' Eu^{3+} de 0 à 1 équivalent, puis une stabilisation du signal (Figure 3. 5). Dans le cas de la sonde EuP_1 , un temps d'attente de 10 minutes entre l'ajout d'euporium et la mesure est suffisant pour atteindre l'équilibre thermodynamique. Après ce temps, le signal de luminescence en temps résolu du complexe EuP_1 n'évolue plus (Figure 3. 5).

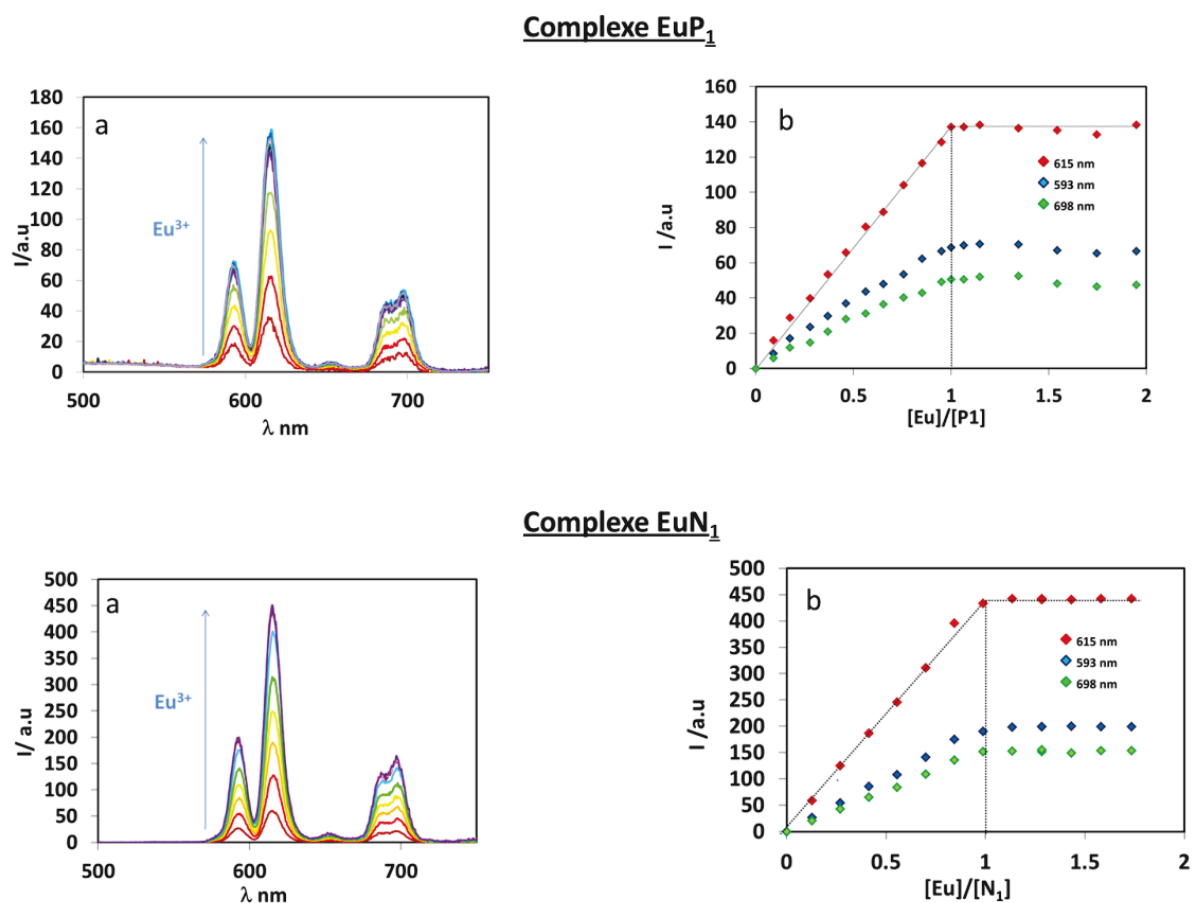


Figure 3. 5 : a) Luminescence de l'euporium durant le dosage des peptide **P₁** et **N₁** par addition d'une quantité croissante d' EuCl_3 . b) Variations d'intensité des maximums d'émission de la luminescence en temps résolu de l' Eu^{3+} ($d=0,05$ msec, exc slit em slit 10 10 nm) durant le dosage de **P₁** ($7,5\mu\text{M}$) et **N₁** ($10,2\mu\text{M}$) par EuCl_3 dans un milieu tamponné (10 mM HEPES, PH7, 0,1M KCl) après excitation à 450 nm et 344 nm, respectivement.

Pour le complexe **EuN₁**, un temps de stabilisation de 45 minutes est nécessaire entre chaque ajout pour atteindre l'équilibre thermodynamique. En effet, les mesures de l'augmentation du signal de luminescence effectuées avec un temps d'attente inférieur à 45 minutes, présentent une augmentation en deux temps (Figure 3. 6). Une augmentation linéaire du signal de l' Eu^{3+} à 616 nm jusqu'à l'ajout de 0,5 équivalent d' Eu^{3+} est d'abord détectée, puis un point de rupture suivi d'une deuxième augmentation jusqu'à un équivalent d'euporium. En présence d'un excès d'euporium, le signal se stabilise. L'augmentation du temps de stabilisation des complexes à 45 minutes permet de s'affranchir de ce phénomène et d'atteindre l'équilibre. Il y a donc formation d'espèces transitoires cinétiques lors de la complexation de l'euporium par le peptide **N₁**.

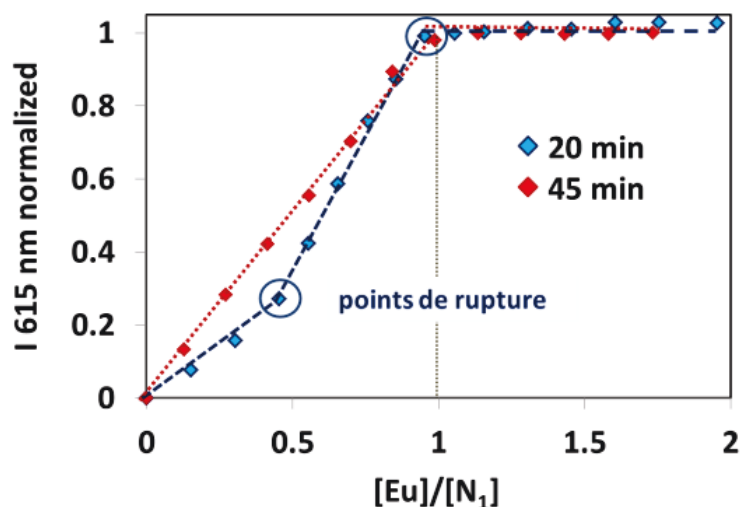


Figure 3. 6 : Variation de l'intensité d'émission de l'Eu³⁺ à 616 nm ($d=0,05$ msec, exc slit em slit 10 10 nm) durant le dosage de N_1 (10,2 μ M) par EuCl₃ dans un milieu tamponné (10 mM HEPES, PH7, 0,1M KCl) après excitation à 344 nm, en fonction du temps d'attente avant mesure (20 min en bleu ou 45 min en rouge)

I.2.4 Constantes de stabilité conditionnelles à pH 7

Des dosages en présence de compétiteurs d'affinité connue ont permis de déterminer la stabilité des complexes EuP₁ et EuN₁ formés à pH 7. Deux compétiteurs ont été employés : P²² pour le peptide N₁ et l'acide nitrilotriacétique (NTA) pour le peptide P₁.

☛ Pour le peptide N₁, le compétiteur utilisé est P²², comme décrit dans les précédents travaux au laboratoire.⁷⁹ La condition *sine qua non* pour obtenir une constante fiable est que l'un des deux complexes soit nettement plus émetteur que l'autre. C'est pourquoi l'ion Tb³⁺ a été utilisé car il est peu sensibilisé par le naphthalimide, en comparaison du tryptophane (Figure 3. 7)

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

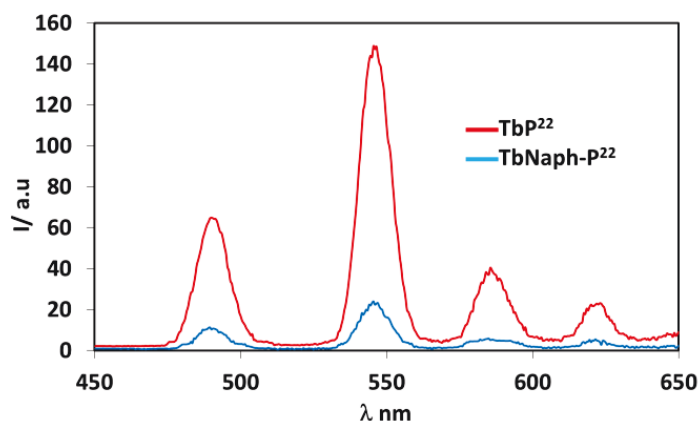


Figure 3. 7 : Comparaison de la sensibilisation du Tb^{3+} par les noyaux tryptophane (TbP^{22}) et naphthalimide (TbN_1) après excitation à 280 nm.

Une quantité croissante de Tb^{3+} est ajoutée à un mélange équimolaire des peptides P^{22} et N_1 en milieu tamponné pH 7 (10 mM HEPES, 0,1M KCl). Une augmentation régulière du signal de luminescence en temps résolu de l'ion Tb^{3+} est observée après excitation à 280 nm. Lorsque deux équivalents de terbium sont ajoutés le signal se stabilise (Figure 3. 8). Connaissant la constante de stabilité de l'espèce TbP^{22} à pH 7, la constante conditionnelle de formation du complexe TbN_1 a été calculée à l'aide du logiciel Specfit ($\log \beta_{11} = 9,1(5)$ à pH 7).

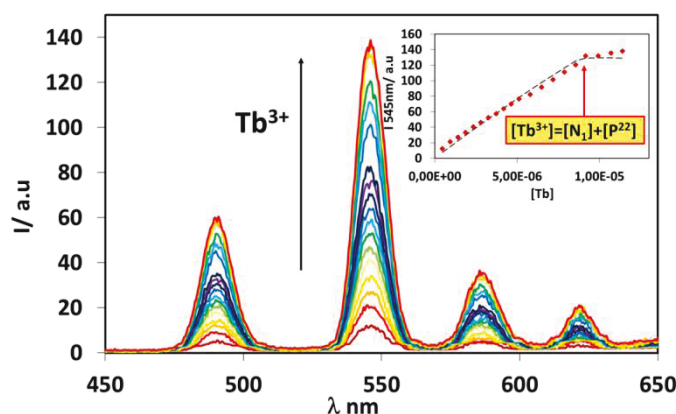


Figure 3. 8 : Augmentation de la luminescence en temps résolu du Tb^{3+} durant le dosage de P^{22} ($5 \mu M$) et N_1 ($5 \mu M$) par $TbCl_3$, après excitation à 280 nm. Encart : Variation de l'intensité maximale d'émission de luminescence du Tb^{3+} à 545 nm. Les points rouges représentent les données expérimentales, la courbe noire représente les données calculées par Specfit avec $\log \beta_{11} = 9.1(5)$ à pH 7.

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

Les compétitions effectuées en présence de P_1 et P^{22} n'ont pas donné de résultats satisfaisant. Elles indiquent néanmoins une stabilité nettement plus faible du complexe TbP_1 par rapport au complexe TbP^{22} .

✿ Pour le peptide P_1 , le compétiteur utilisé est l'acide nitrilotriacétique (NTA), dont l'affinité pour les ions lanthanides est connue. Des quantités croissantes de NTA sont ajoutées dans un échantillon tamponné à pH 7, (10 mM HEPES, 0,1M KCl) contenant le complexe EuP_1 déjà formé. Dans ce cas une diminution du signal de luminescence en temps résolu de l'ion Eu^{3+} après excitation à 450 nm est mesurée car les complexes $EuNTA$ et $Eu(NTA)_2$ ne sont pas émetteurs (Figure 3. 9).

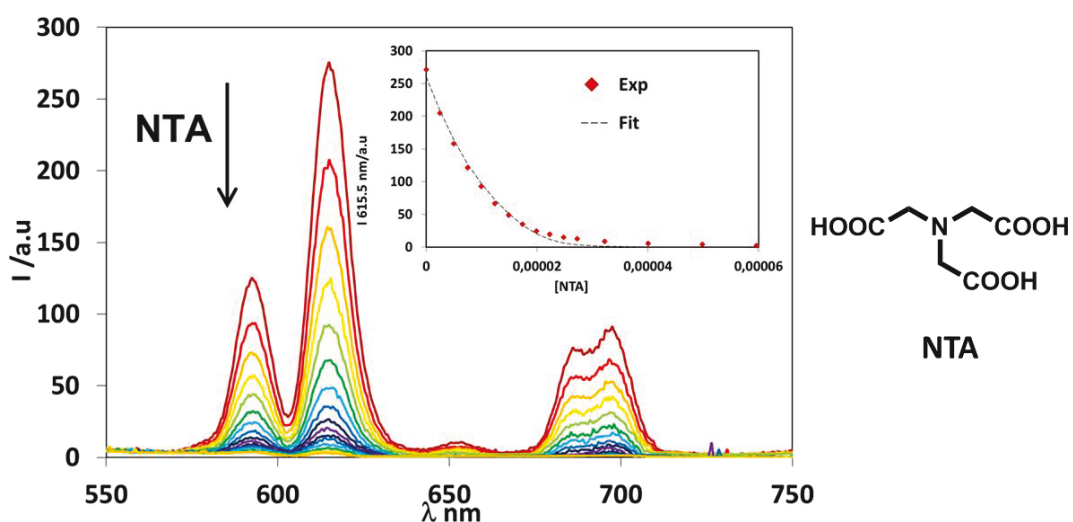


Figure 3. 9 : Luminescence en temps résolu de l'euporium (Exc slit 15 nm, Em slit 10 nm delay 0,05 msec) de EuP_1 (12,8 μM) pendant le dosage par le NTA après excitation à 450 nm. Encart : Variation de l'intensité maximale d'émission de luminescence de l' Eu^{3+} à 615 nm. Les points rouges représentent les données expérimentales, la courbe noire représente les données calculées par Specfit avec $\log \beta_{11} = 7,3(5)$ à pH 7. Les constantes d'affinité du NTA pour l'euporium ont été calculées à partir des valeurs de pK_A et des constantes de complexation données dans la NIST.¹³²

Les constantes obtenues sont récapitulées dans le Tableau 3. 1 . L'incorporation d'un noyau naphthalimide dans la séquence de P^{22} ne perturbe pas la complexation et autorise la formation d'un complexe de stabilité similaire à celle mesurée avec P^{22} à pH 7. Par contre il

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

apparaît que l'insertion du noyau proflavine diminue significativement la stabilité du complexe d'europium formé : deux ordres de grandeur par rapport à TbP²². La présence du noyau aromatique tricyclique perturbe donc la complexation. L'incorporation d'un espaceur glycine entre la séquence chélatant l'ion métallique et le sensibilisateur a donc été envisagée dans les peptides de seconde génération pour tenter de diminuer les contraintes stériques et ainsi de réhabiliter une affinité similaire au complexe TbP²².

Tableau 3. 1 : Constantes conditionnelles de stabilité à pH 7 et 298 K (10 mM HEPES, 0,1M KCl)

sondes	$\log \beta_{11}^{\text{pH}7}$
TbP ²²	9,1(5)
EuP ₁	7,3(5)
TbN ₁	9,1(5)

En conclusion, les sondes de première génération conservent globalement les propriétés de complexation de l'Eu³⁺ observées avec P²² : un seul complexe de stœchiométrie 1 pour 1 est formé, d'une stabilité de l'ordre du nanomolaire.

I.3 Fluorescence des complexes EuP₁ et EuN₁

Lors de la complexation de l'Eu³⁺ par les sondes de première génération P₁ et N₁, on observe une légère diminution du signal de fluorescence des unités aromatiques Pfl et Naph (Figure 3. 10), attribuée à la formation des complexes 1 :1. Cette diminution de fluorescence peut traduire deux phénomènes :

- ☼ soit un transfert d'énergie de l'aromatique vers le cation europium,
- ☼ soit un changement d'environnement de l'unité aromatique lors de la formation de ce complexe.

Pour expliquer cette diminution, des mesures de complexation du Lanthane (La) ont été effectuées. Le lanthane est le premier élément appartenant à la classe des terres rares. Il n'est pas luminescent et ne possède aucun électron f (configuration électronique La³⁺4f⁰).^{52, 133}

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

Celui-ci ne peut donc pas être sensibilisé par *effet d'antenne*. De plus, les niveaux de ces états *d* accepteurs sont situés trop haut en énergie pour pouvoir accepter un transfert d'énergie des noyaux aromatiques **Pfl** ou **Naph**. La fluorescence d'un composé organique est un phénomène extrêmement sensible à son environnement¹³⁴: température, pH, concentration saline, solvation ou exposition au solvant des composés fluorescents. Les trois premiers paramètres sont contrôlés en travaillant à pH constant (pH 7 milieu tamponné 10 mM HEPES), à concentration saline constante (0,1 M KCl) et à 25 °C. La solvation est le seul phénomène non contrôlable. Pour déterminer si la diminution de fluorescence mesurée dans les complexes Eu**P**₁ et Eu**N**₁ est consécutive à *l'effet d'antenne*, des mesures de complexation des ions La³⁺ par les sondes de première génération ont été effectuées.

Lors de la complexation des ions Eu³⁺ par les sondes **P**₁ et **N**₁, une diminution du signal de fluorescence des unités aromatiques est observée, de 7% pour **Pfl** et 18% pour **Naph** dans **P**₁ et **N**₁, respectivement (*Figure 3. 10 bas*). Lors de la complexation des ions La³⁺, une diminution du signal de fluorescence d'intensité similaire est observée, de 5% pour **P**₁ et de 12 % pour **N**₁. Les différences d'extinction de fluorescence entre les deux complexes La**X**₁ et Eu**X**₁ (X=**P**, **N**) sont donc très faibles et ne permettent pas de conclure que la légère différence d'extinction de fluorescence est une conséquence du phénomène de sensibilisation des ions Eu³⁺ par *effet d'antenne*.

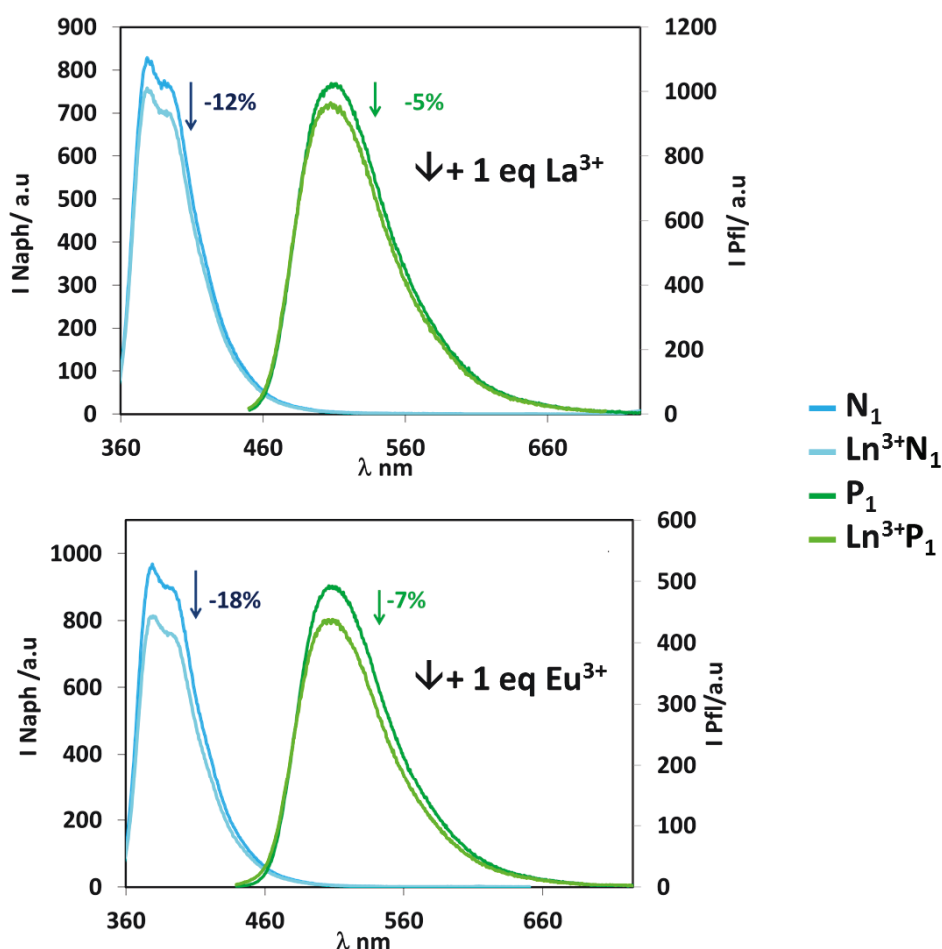


Figure 3. 10 : Diminution de fluorescence des unités aromatiques présentes dans les complexes de première génération ($10\mu\text{M}$, $10 \text{ mM HEPES pH } 7$, $0,1\text{M KCl}$), en présence d'une quantité équimolaire de La^{3+} (haut) et d' Eu^{3+} (bas).

La diminution de l'intensité de fluorescence des aromatiques semble donc majoritairement provenir d'un phénomène de structuration du peptide lors de la complexation des ions Ln^{3+} . En coordonnant le métal, le peptide se structure en coude β (séquence Pro-Gly) et devient plus rigide. Durant cette étape, l'unité aromatique voit son environnement chimique direct modifié, ce qui induit une légère extinction de fluorescence pour ces deux complexes. Comme les unités aromatiques **Pfl** et **Naph** ne sont pas coordonnées au métal et que le transfert d'énergie chromophore-lanthanide est distance dépendant (il décroît en r^{-6}), le transfert d'énergie de l'aromatique vers le métal est trop faible pour être détectable. Ceci a déjà été mis en évidence précédemment pour la fluorescence du tryptophane de **P²²** lors de la complexation du Tb^{3+} .^{77,79}

I.4 Emission de luminescence : et par rapport à P²² ?

Le tryptophane et la tyrosine sont les seuls acides aminés naturels capables de sensibiliser les ions Ln³⁺ émettant dans le visible. Le tryptophane sensibilise le Tb³⁺ de manière assez efficace pour permettre une détection à des concentrations faibles, allant jusqu'au nanomolaire.^{50, 66, 71, 72, 135} Les propriétés de sensibilisation de l'europium par le tryptophane restent, cependant très faibles. En effet, la différence d'énergie ΔE entre les niveaux triplet du Trp et les niveaux excités émissifs de l'europium est trop importante pour permettre un transfert d'énergie efficace ($\Delta E=4580 \text{ cm}^{-1}$). Un mécanisme de transfert électronique de type **PET** (photoinduced electron transfer) se met en place, conduisant à la réduction de l'Eu³⁺ en Eu²⁺.^{79, 136}

Des spectres de luminescence en temps résolue des complexes EuP²², EuP₁ et EuN₁ ont été exécutés dans les mêmes conditions expérimentales afin d'estimer le gain obtenu grâce à la substitution du sensibilisateur tryptophane par le noyau proflavine ou naphthalimide. Les résultats obtenus sont représentés sur la *Figure 3. 11*.

Les sondes de première génération sensibilisent beaucoup plus efficacement l'europium que le composé P²². L'insertion d'un noyau aromatique proflavine/naphthalimide dans la séquence peptidique de P²² permet donc d'augmenter la sensibilisation de l'ion Eu³⁺ et de détecter un signal de luminescence plus intense. En comparant l'intensité du signal de luminescence de l'Eu³⁺ émis par les complexes EuN₁ et EuP₁, on note une différence d'intensité de signal de l'ordre de 2. La différence d'énergie donneur-accepteur dans le cas de la proflavine ($\Delta E=150 \text{ cm}^{-1}$) est très faible ce qui favorise les phénomènes de transfert en retour. Par contre cette différence est nettement plus élevée pour le naphthalimide ($\Delta E=1000 \text{ cm}^{-1}$) qui est référencé comme sensibilisateur de l'europium. La proflavine, malgré la proximité des états donneurs et accepteurs d'énergie dans le complexe EuP₁, est donc également capable de sensibiliser l'europium.

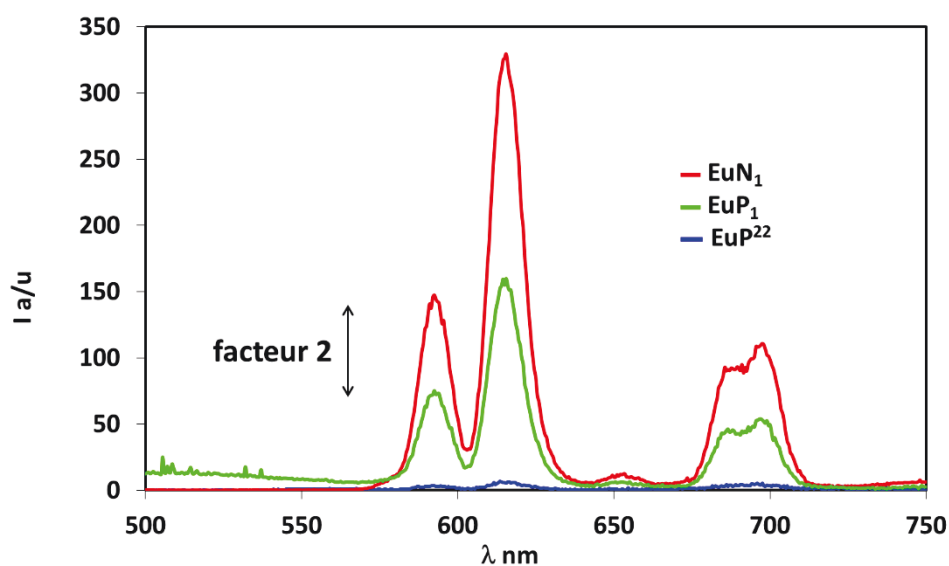


Figure 3. 11 : Comparaison de l'émission de l'europium dans les complexes incorporant un tryptophane (EuP^{22} λ exc 280 nm 5 μM), une proflavine (EuP_1 λ exc 450 nm 5 μM) ou un naphthalimide (EuN_1 λ exc 344 nm 5 μM)

L'intensité de luminescence de l'europium peut être optimisée en travaillant sous atmosphère inerte. Des mesures de luminescence du complexe EuP_1 en présence et absence d'oxygène ont été entreprises dans le but de visualiser l'impact de l'oxygène sur la luminescence de l' Eu^{3+} . Les échantillons sont conservés dans des cellules fermées par des septums, et les solutions sont dégazées avec de l'argon pendant deux heures, à l'abri de la lumière. Les résultats obtenus sont présentés *Figure 3. 12*.

Une différence d'intensité de signal de luminescence de l' Eu^{3+} du complexe de l'ordre d'un facteur 1,5 est mesurée. Les états émissifs des lanthanides, de par l'enfouissement des orbitales f, sont insensibles à la présence d'oxygène.^{51, 137} Par contre, l'état triplet $^3\pi\pi^*$ du ligand est sensible aux désactivations par l'oxygène et les transferts d'énergie se retrouvent alors diminués. Cette augmentation de signal de luminescence semble mettre en avant un transfert d'énergie lent et réversible entre les états donneurs $^3\pi\pi^*$ du noyau proflavine et les états émissifs excités 5D_n de l'europium. Le gain de luminescence (1.5) en absence d'oxygène reste modéré et il a été décidé d'effectuer la suite de nos études sans dégazer les échantillons.

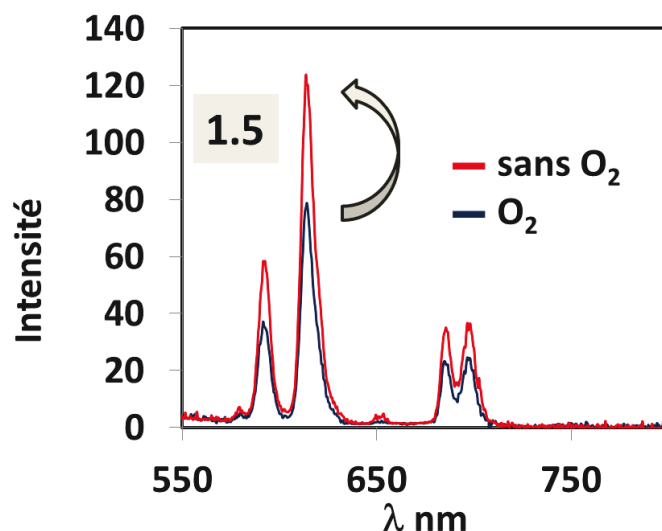


Figure 3. 12 : Spectre de luminescence de l'Eu³⁺ complexe (λ_{ex} 450 nm, Exc slit 10 nm, Em slit 5nm ; $d=0,05$ msec) du complexe EuP₁ (10 μ M, 10 mM HEPES, 0,1 M KCl, pH7) avant et après dégazage.

En conclusion, l'insertion des noyaux aromatiques **Naph** et **Pfl** synthétiques dans la séquence peptidique permet d'augmenter de manière significative la sensibilisation et l'intensité de signal de luminescence de l'Eu³⁺ par rapport à **P²²**. La faible différence entre les intensités des spectres d'émission des complexes EuN₁ et EuP₁, un facteur deux, met en avant les capacités de sensibilisation de l'Eu³⁺ à basse énergie par des composés incorporant une proflavine, malgré la faible différence d'énergie entre les niveaux donneurs de la proflavine et les niveaux accepteurs de l'euporium.

I.5 Temps de vie

I.5.1 Nombre d'hydratation

Il a été vu dans le chapitre 1 que le nombre d'hydratation q de l'euporium est relié aux temps de vie de ses états excités dans l'eau légère et dans l'eau lourde. En effet les désactivations non radiatives dues aux vibrations des liaisons O-H sont absentes dans l'eau lourde. Les équations phénoménologiques mises au point par *Parker et Horrocks*,^{53,138} permettent donc de calculer la contribution de désactivations non radiatives au signal de luminescence de

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

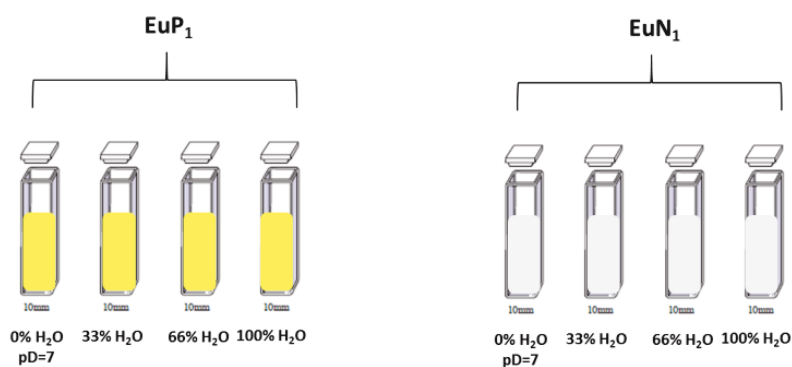
l'euporium, c'est-à-dire le nombre de molécule d'eau q coordonnée dans la première sphère de l'euporium.

$$q_{Eu^{0\text{ rroc s}}} = 1,05 (\tau_{H_2O}^{-1} - \tau_{D_2O}^{-1})$$

$$q_{Eu^{\text{a r er}}} = 1,2 (\tau_{H_2O}^{-1} - \tau_{D_2O}^{-1} - 0.25)$$

Dans le but de caractériser entièrement la première sphère de coordination des ions Eu^{3+} dans les complexes de premières générations EuP_1 et EuN_1 et de déterminer leur nombre d'hydratation q , les temps de vie des niveaux excités de l'euporium ont été mesurés dans l'eau légère et dans l'eau lourde.

Les mesures effectuées dans l'eau lourde sont contaminées par la présence d'eau résiduelle dans le peptide après lyophilisation. Le temps de vie dans l'eau lourde a donc été évalué en utilisant des échantillons préparés à différents rapports H_2O/D_2O . Les complexes EuP_1 et EuN_1 ont été formés dans des milieux tamponnés (10 mM HEPES, pH ou pD 7) à teneur en eau légère croissante : 0%, 33%, 66% et 100% H_2O .



La décroissance du signal de luminescence de l'euporium de chaque solution a été mesurée après excitation à 450 nm pour les complexes EuP_1 et 344 nm pour les complexes EuN_1 . Chaque mesure a été répétée trois fois, afin d'effectuer une moyenne des résultats obtenus.

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

La décroissance de l'intensité du signal de luminescence de l'euporium est indépendante de la concentration et est mathématiquement représentée par la fonction exponentielle suivante :

$$I(t) = A \times e^{-t/\tau}$$

où I représente la valeur de l'intensité mesurée au temps t et τ représente le temps de vie des états excités émissifs de l'ion euporium. La décroissance des niveaux excités de l'euporium, centrée sur la bande d'émission la plus intense de la transition ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ à 616 nm est représentée sur les *Figure 3. 13* et *Figure 3. 14* pour les complexes d'euporium EuP_1 et EuN_1 , respectivement. Les temps de vie mesurés dans l'eau lourde sont faussés par la présence d'eau résiduelle dans le peptide après lyophilisation ; ils ont donc été calculés par extrapolation graphique, de la vitesse de décroissance ($1/\tau$) des états excités en fonction de la fraction en eau légère de l'échantillon (*Figure 3. 13* et *Figure 3. 14* droite). Les temps de vie mesurés dans l'eau lourde sont effectivement plus courts que ceux calculés par extrapolation graphique. Il y a donc bien contamination par la présence d'eau résiduelle dans le peptide solide.

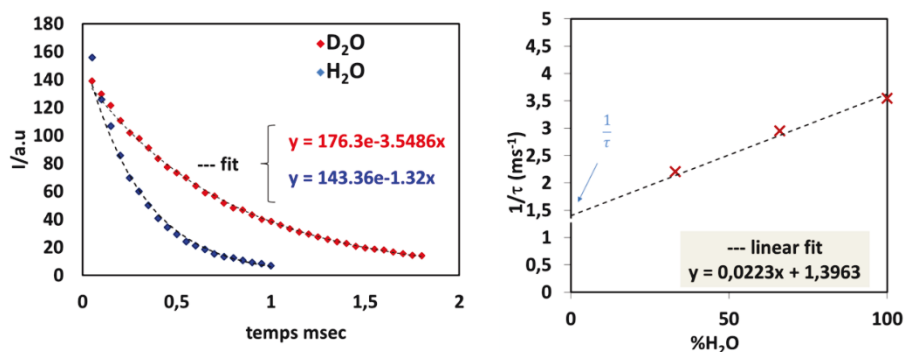


Figure 3. 13 : gauche : décroissance de l'intensité de luminescence de l'euporium dans le complexes EuP_1 après excitation à 450 nm dans l'eau légère (bleu) et dans l'eau lourde (rouge). Ces courbes sont traitées en utilisant une courbe exponentielle (courbes noires pointillées). Droite : obtention du temps de vie des états excités de l'euporium du complexe EuP_1 dans l'eau lourde, par extrapolation graphique.

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

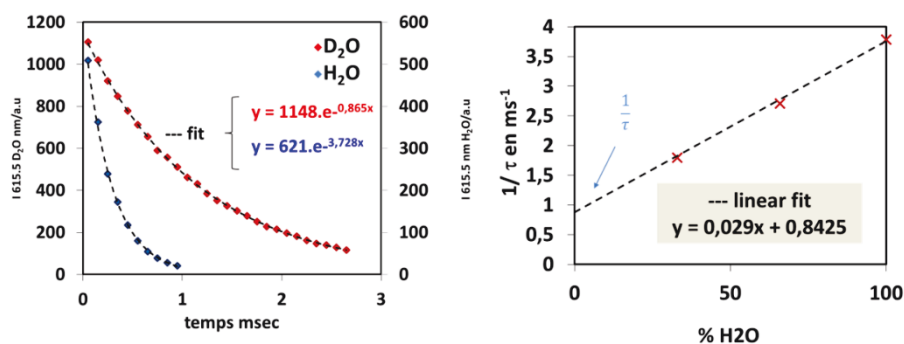


Figure 3. 14 : Gauche : décroissance de l'intensité de luminescence de l'europium dans le complexes EuN_1 après excitation à 344 nm dans l'eau légère (bleu) et dans l'eau lourde (rouge). Ces courbes sont traitées en utilisant une courbe exponentielle (courbes noires pointillées). Droite : obtention du temps de vie des états excités de l'europium du complexe EuN_1 dans l'eau lourde par extrapolation graphique.

Les résultats obtenus pour les complexes d'europium de première génération sont donnés dans le *tableau 3.2*.

Tableau 3. 2 : Temps de vie à 298 K et nombre d'hydratation calculés selon l'équation de Parker⁵³

sondes	τ H ₂ O (ms)	τ D ₂ O (ms)	q
P²²	0,30(1)	2,13(2)	3,1(1)
P₁	0,25(1)	0,72(1)	2,8(2)
N₁	0,26(1)	1,18(1)	3,3(2)

Les temps de vie dans l'eau légère des complexes EuP_1 et EuN_1 sont légèrement plus faibles que ceux obtenus pour EuP^{22} . Bien que faibles, ceux-ci restent dans la gamme des temps de vie courants des complexes d'europium dans l'eau.¹³⁹ Les temps de vie mesurés dans l'eau lourde sont plus longs, ce qui démontre la présence de désactivations non radiatives dues à des molécules d'eau de la première sphère de coordination de l'europium, dans notre cas $q=3$. Il y a donc 3 molécules d'eau présentes dans la sphère de coordination des complexes d'europium EuP_1 et EuN_1 .

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

On constate néanmoins que les temps de vie des états excités de l'euporium des deux complexes dans l'eau lourde sont beaucoup plus faibles que pour EuP^{22} . Nous verrons plus loin si cela est dû à la présence de transfert en retour.

Les propriétés de complexation des peptides N_1 et P_1 sont similaires à celles de P^{22} avec la formation d'un complexe monométallique tri-hydraté. Les complexes sont hexadentates, l'euporium étant coordonné par les chaînes latérales des deux groupes **aminodiacétates** des acides aminés Ada_2 , et la sphère de coordination de Eu^{3+} est complétée par trois molécules d'eau. La présence des trois molécules d'eau n'est pas optimum pour la luminescence puisqu'elles induisent des désactivations non radiatives mais nous avons vu que ces complexes montrent néanmoins des intensités de luminescence permettant leur détection pour des concentrations nanomolaires.

1.5.2 Temps de vie à basse température et transfert en retour

Un point important pour assurer une émission intense est la minimisation des mécanismes entrant en compétition avec la luminescence du métal. En plus des désactivations non radiatives, le phénomène de transfert d'énergie en retour peut être présent si la différence d'énergie entre le niveau triplet du ligand et le niveau émetteur de Eu^{3+} est faible. Les deux complexes EuP_1 et EuN_1 présentent des différences entre ces niveaux d'énergie nettement plus faibles que 2500 cm^{-1} , considérée comme une valeur optimale^{45, 47} : $\Delta E \text{ Pfl-Eu}^{3+} = 150 \text{ cm}^{-1}$ et $\Delta E \text{ Naph-Eu}^{3+} = 1000 \text{ cm}^{-1}$. Des mesures de temps de vie à basse température, 77K, dans l'eau lourde ont été effectuées pour visualiser la contribution des effets de transfert d'énergie en retour au signal de luminescence de l'euporium des complexes EuN_1 et EuP_1 . En effet, une augmentation de temps de vie quand la température diminue est indicative du phénomène de transfert d'énergie en retour.^{140, 141}

Tableau 3. 3 : Temps de vie de l'euporium des complexes EuN_1 et EuP_1 à 298 K et 77 K. dans un tampon HEPES (D_2O , 10 mM, $pD = 7$).

sondes	$\tau_{\text{D}_2\text{O}}^{298\text{K}}$ (ms)	$\tau_{\text{D}_2\text{O}}^{77\text{K}}$ (ms)
P_1	0,72(1) ^a	3,7(2) ^b
N_1	1,18(1) ^a	1,3(2) ^b

[a] Complexe (10 μM) dans un tampon HEPES (D_2O , 10 mM, $pD = 7$). [b] Complexe (60 μM) dans un mélange tampon HEPES (D_2O , 10 mM, $pD = 7$)/glycérol (70/30, v/v).

Les mesures effectuées mettent en évidence une augmentation d'un facteur 5 du temps de vie de l'euporium à 77 K du complexe EuP_1 contre un temps de vie de l'euporium quasi inchangé ($\times 1,1$) pour le complexe EuN_1 . La forte dépendance du temps de vie avec la température, couplée à la faible différence énergétique entre l'état triplet de la proflavine et le premier état émissif accepteur de l'euporium traduisent un important transfert d'énergie en retour dans le complexe EuP_1 . Par contre la faible variation du temps de vie de l'euporium du complexe EuN_1 indique l'absence de transfert d'énergie en retour.

Les sondes de première génération EuP_1 et EuN_1 possèdent donc des propriétés de luminescence intéressantes pour le développement de sondes de l'ADN, grâce à la présence d'un intercalant dans la séquence. Ces ligands hexadentates possèdent des propriétés de complexation similaires à celles de P^{22} . Malgré la présence d'un fort transfert d'énergie en retour dans le complexe EuP_1 , les propriétés de sensibilisation de l'euporium restent très intéressantes avec une intensité d'émission du même ordre de grandeur que pour EuN_1 . La stabilité plus faible du complexe EuP_1 , ainsi que la cinétique de formation des complexes EuN_1 peuvent cependant être améliorées par l'introduction d'un espaceur glycine. C'est la conception des sondes de deuxième génération.

II Sonde de deuxième génération : effet de l'espaceur glycine

L'insertion d'un espaceur glycine dans la séquence peptidique de P_1 et N_1 a donné naissance aux sondes de deuxième génération P_2 et N_2 .

II.1 Influence sur la spéciation et la stabilité

Les mesures de complexation de l'euporium par ES-MS de la sonde P_2 montre la formation d'un complexe unique, de stœchiométrie 1 : 1 (*Figure 3. 15*).

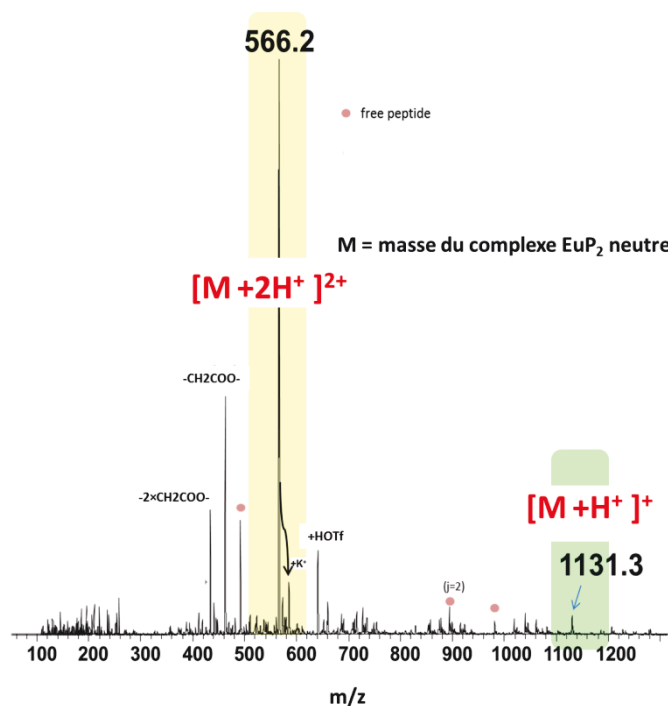


Figure 3. 15 : Spectre ES-MS en mode positif d'une solution d' EuP_2 (1 mM) dans un tampon $AcONH_4$ (20 mM, pH 7).

Ces résultats ont été confirmés lors d'un suivi par luminescence du dosage du peptide P_2 par l'euporium. L'espaceur glycine ne perturbe donc pas la spéciation des complexes formés. Concernant la complexation du cation métallique par la sonde N_2 , le suivi par luminescence a démontré que l'espaceur glycine permettait de s'affranchir de la formation des espèces cinétiques présente lors de la complexation de l'euporium par la sonde N_1 . En effet, un temps de stabilisation de 15 minutes est suffisant pour atteindre la formation de l'espèce thermodynamique 1 Eu : 1 N_2 . (Figure 3. 16)

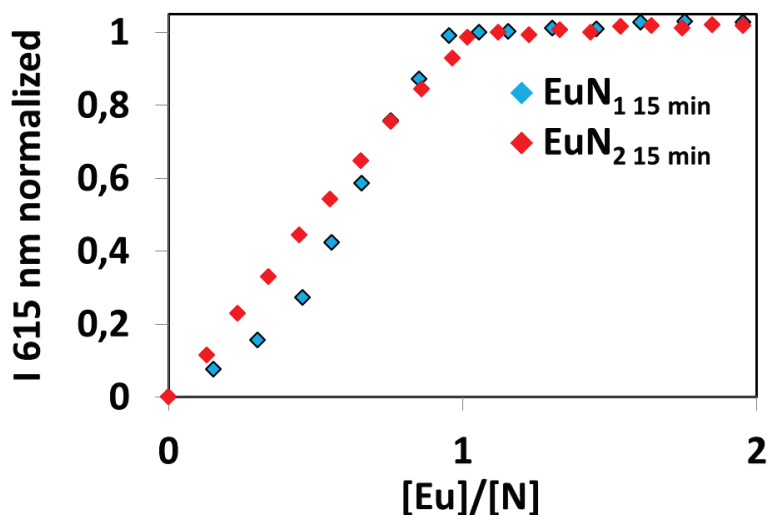


Figure 3. 16 : Variation de l'intensité maximale d'émission en temps résolu (délai 0,05 msec, Exc slit 10 Em slit 10 nm) de l'euporium des complexes EuN_1 (10,7 μM) et EuN_2 (6,1 μM) après excitation à 344 nm dans une solution de tampon HEPES (10 mM, 0,1 M KCl, pH 7)

L'espaceur glycine a été introduit initialement pour diminuer la gêne stérique présente dans les complexes EuN_1 et EuP_1 , pouvant perturber la complexation de l'euporium. La constante de stabilité diminuée du complexe EuP_1 obtenue renforce l'idée d'un encombrement stérique. Les mesures des constantes de stabilité conditionnelle à pH 7 ont été effectuées suivant les protocoles de compétition exposés précédemment. Pour la sonde N_2 , une compétition de complexation en présence du peptide P^{22} et d'une quantité croissante de terbium a permis de calculer une constante de stabilité égale à $\log \beta_{11}^{\text{pH } 7} = 9.0(5)$, équivalente à celle obtenu avec le composé N_1 . Pour la sonde P_2 , un dosage de complexation par compétition avec le NTA a été effectué. La mesure de la décroissance du signal de luminescence de l'euporium des complexes EuP_1 et EuP_2 en présence de NTA est représentée Figure 3. 17.

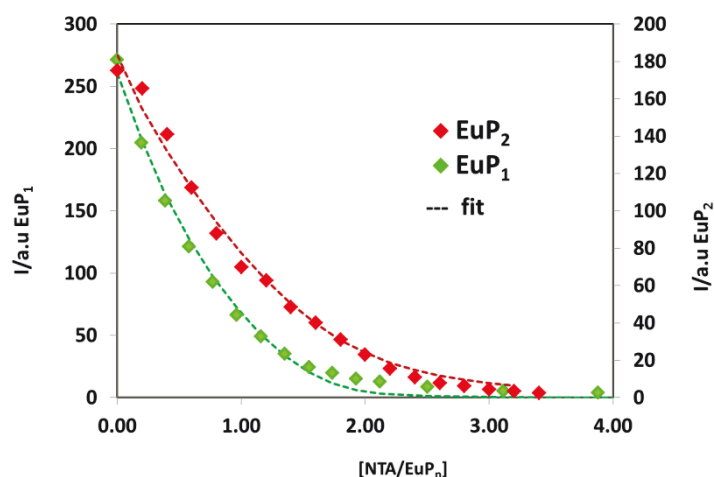


Figure 3. 17 : Comparaison de la décroissance du signal de l'europium des complexes EuP_1 et EuP_2 en présence d'une quantité croissante de NTA après excitation à 450 nm.

La comparaison des deux dosages montre qu'une quantité de compétiteur NTA supérieure est nécessaire pour obtenir une extinction du signal de luminescence de l'europium totale pour P_2 . Le calcul de la constante de stabilité conditionnelle à l'aide du logiciel SPECFIT donne $\log \beta_{11}^{\text{pH}7} = 9.2(3)$ et met en évidence l'augmentation de la stabilité du complexe EuP_2 formé grâce à l'insertion d'un espaceur glycine. La diminution de la rigidité et l'éloignement de l'unité aromatique permet d'obtenir un complexe d'europium de la famille de la proflavine de stabilité similaire au complexe TbP^{22} . Le tableau 3.4 récapitule les données obtenues.

Tableau 3. 4 : Constantes conditionnelles de stabilité à pH 7 et temps de stabilisation nécessaire pour atteindre l'équilibre thermodynamique lors du dosage du peptide avec l' Eu^{3+} .

sondes	$\log \beta_{110}^{\text{pH}7}$	cinétique
TbP^{22}	9,1(5)	5 min
EuP_1	7,3(5)	10 min
EuP_2	9,2(3)	10 min
TbN_1	9,1(5)	45 min
TbN_2	9,0(5)	15 min

L'espaceur permet donc d'obtenir un complexe monométallique de stabilité nanomolaire à pH 7 et permet de s'affranchir de la formation d'espèces cinétiques transitoires.

II.2 Influence sur les propriétés d'émission

II.2.1 Luminescence

Les spectres de luminescence de l' Eu^{3+} dans les complexes de deuxième génération ont été comparés à ceux obtenus précédemment (Figure 3. 18), afin d'étudier l'impact de l'espaceur sur la luminescence du métal.

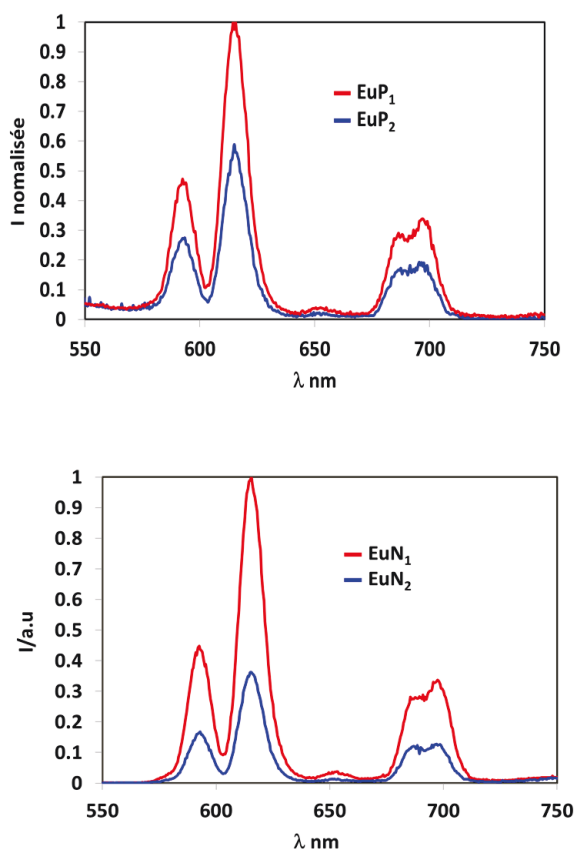


Figure 3. 18 : Comparaison des propriétés de sensibilisation des sondes de première et deuxième génération. Haut : Luminescence en temps résolu ($d=0,05\text{msec}$) de l' Eu^{3+} des complexes EuP_1 et EuP_2 ($5\ \mu\text{M}$, $10\ \text{mM}$ HEPES $0,1\ \text{M}$ KCl, pH 7) après excitation à $450\ \text{nm}$. Bas : Luminescence en temps résolu ($d=0,05\text{msec}$) de l' Eu^{3+} des complexes EuN_1 et EuN_2 ($5\ \mu\text{M}$, $10\ \text{mM}$ HEPES $0,1\ \text{M}$ KCl, pH 7) après excitation à $344\ \text{nm}$.

Le transfert d'énergie sur les lanthanides selon Förster (voir chapitre I, partie II) par *effet d'antenne* est dépendant de la distance. Le transfert décroît rapidement en $(r^6)^{-1}$, où r représente la distance entre le donneur (fluorophore) et l'accepteur (Ln^{3+}).¹⁴² L'augmentation de la distance r donneur-accepteur peut donc avoir des conséquences désastreuses sur la

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

sensibilisation du métal. Les résultats *Figure 3. 18* montrent que l'incorporation d'un espaceur glycine dans la séquence engendre une diminution d'intensité d'émission d'un facteur 2 pour le complexe EuP_2 et d'un facteur trois pour le complexe EuN_2 . Si l'on évalue la longueur d'un espaceur glycine dans la séquence peptidique, on obtient environ 2 Å. Les études structurales menées au laboratoire⁷⁷ par RMN liquide sur le complexe LaP^{22} ont permis de calculer la distance entre le sensibilisateur et le noyau La^{3+} qui est de l'ordre de 8,7 Å en considérant le centre du noyau indole du sensibilisateur tryptophane. L'aromatique proflavine dans P_1 ou naphthalimide dans N_1 ont été insérés dans une position équivalente à celle de l'acide aminé tryptophane dans P^{22} . La distance r devrait donc être proche de 8,7 Å dans les sondes de première génération EuP_1 et EuN_1 . Dans les sondes de deuxième génération, la distance r peut donc augmenter jusqu'à 10,7 Å.

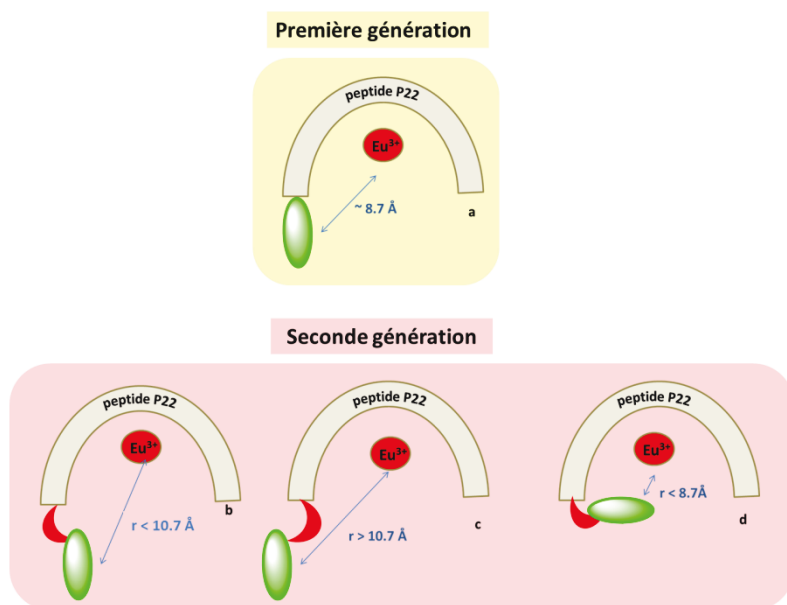


Figure 3. 19 : Représentation schématique des différents arrangements spatiaux des complexes en solution : a) Le noyau aromatique des sondes de première génération est situé à la même place que le Trp b) Le noyau aromatique des sondes de deuxième génération est situé parallèlement à la position du Trp de P^{22} 2 Å plus bas. c) et d) Le noyau aromatique des sondes de deuxième génération est situé plus loin (c) ou plus près (d) du centre métallique que ne l'était le Trp dans EuP^{22} , en raison de la flexibilité de l'espaceur glycine (lune rouge).

Comme la glycine est un acide aminé flexible, possédant un degré de liberté de rotation autour de la liaison N-C α -CO, plusieurs structures peuvent être envisagées pour les

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

complexes de deuxième et troisième génération. Elles sont représentées sur la *Figure 3. 19 bas*. L'espaceur peut soit rapprocher le sensibilisateur du cation métallique soit l'en éloigner. Si l'on suppose que dans les sondes de première et deuxième génération, l'absorbance, le taux de conversion interne et l'émission sont similaires, on peut attribuer la diminution d'intensité de luminescence à la variation de distance r entre le donneur et l'accepteur. Le transfert d'énergie décroissant en r^6 , une augmentation de la distance de 10% dans le complexe EuP_2 et de 20 % dans le complexe EuN_2 peut être évaluée, conséquente à l'insertion de l'espaceur glycine. L'espaceur éloigne donc modérément l'intercalant du cation métallique, comme représenté sur la *Figure 3. 19 b*.

II.2.2 Temps de vie

Les temps de vie et nombres d'hydratation mesurés pour EuP_2 et EuN_2 sont reportés dans le *Tableau 3. 5* et démontre que la sphère de coordination de l'euprium contient 3 molécules d'eau comme pour les composés de première génération. L'introduction de l'espaceur glycine ne modifie donc pas la coordination de l'euprium.

Tableau 3. 5 : Temps de vie et nombre de molécules d'eau coordonnées calculées selon l'équation de Parker.

Sondes	$\tau_{\text{H}_2\text{O}}$ (ms)	$\tau_{\text{D}_2\text{O}}$ (ms)	q
EuP^{22}	0,30(1)	2,13(1)	3,1(1)
EuP_1	0,25(1)	0,72(1)	2,8(2)
EuP_2	0,21(1)	0,59(1)	3,4(3)
EuN_1	0,26 (1)	1,18(1)	3,3(2)
EuN_2	0,29(1)	1,71(1)	3,1(2)

En conclusion, l'incorporation d'un espaceur glycine dans la séquence a permis d'améliorer la formation des complexes monométallique tri-hydratés d'euprium en diminuant l'encombrement stérique autour du métal. De plus, son insertion a permis d'augmenter significativement la stabilité du complexe EuP_2 par rapport à EuP_1 . La diminution d'un facteur 2 en intensité de luminescence des complexes, traduit un éloignement modéré du sensibilisateur du cation métallique par rapport aux composés sans espaceur.

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

Les deux peptides de troisième génération P_3 et N_3 ont été développés avec deux objectifs différents. Pour tenter d'améliorer les propriétés de luminescence, un acide aminé de plus haute denticité $Ed3a_2$ a été inséré dans la séquence peptidique, dans le but de déshydrater la sphère de coordination de l'euporium. L'augmentation de la denticité et donc du nombre de site de coordination a pour objectif de minimiser les désactivations non radiatives contribuant à éteindre la luminescence de l'euporium. L'insertion de l'acide aminé $Ed3a_2$ a été effectuée dans la séquence P_3 , contenant un dérivé proflavine de plus haute affinité pour l'ADN que la naphthalimide. Par ailleurs, la sensibilisation de l'euporium par le naphthalimide est efficace, mais son pouvoir de reconnaissance de l'ADN est limité. D'où le choix d'étendre le cycle aromatique du Naph dans le noyau **TNAph** qui a été inséré dans la séquence de la sonde EuN_3 .

III Sonde de troisième génération

III.1 Peptide octadentate P_3

La sonde EuP_3 a été synthétisée sur le modèle de conception du peptide P^{HD2} , précédemment étudié au laboratoire. Ses propriétés de complexation ont démontré une coordination octadentate, avec l'absence de molécule d'eau dans la première sphère de coordination pour le complexe TbP^{HD2} et une molécule d'eau pour le complexe EuP^{HD2} .⁷⁶ Il est donc important de vérifier que l'incorporation du noyau proflavine n'affecte pas les propriétés de complexation de l'euporium. L'espaceur glycine a été conservé dans la séquence puisque qu'il a été démontré qu'il permet d'augmenter la stabilité du complexe d'euporium dans EuP_2 . De plus, il convient de diminuer au maximum l'encombrement stérique entre l'acide aminé de haute denticité et le composé aromatique.

III.1.1 Complexation de l'euporium

Les premières études de complexation par spectrométrie de masse montrent la formation d'un complexe unique, $1Eu : 1P_3$ *Figure 3. 20*.

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

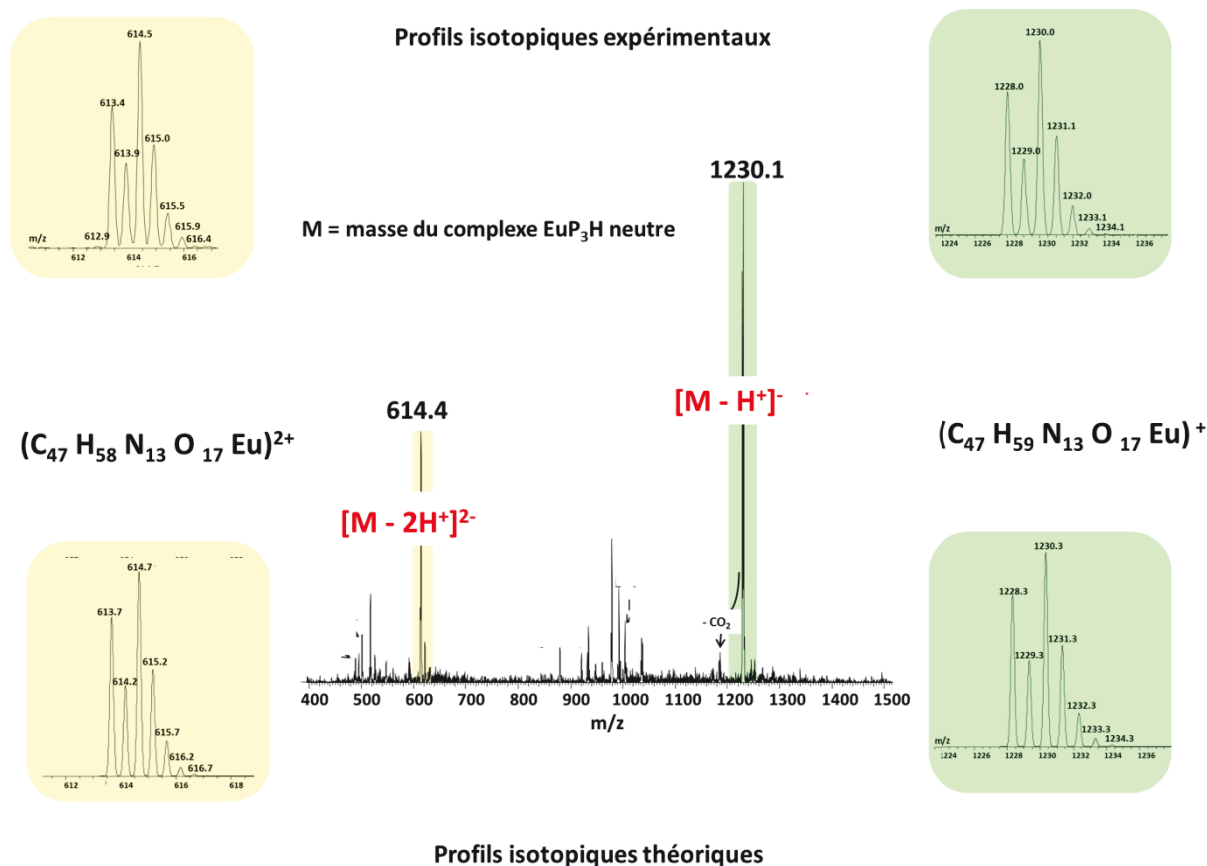


Figure 3. 20 : Spectre (-) ES-MS d'une solution d' EuP_3 (0,05 mM) dans un tampon acétate AcONH_4 (20 mM, pH 6,8) Sur les côtés: Zoom et comparaison des massifs isotopiques expérimentaux et théoriques de EuP_3 m/z: 614.4 et 1230.1

Cependant, les mesures de luminescence par l'addition d'une quantité croissante d'euporium révèlent la formation de complexes transitoires. L'augmentation du temps d'équilibration du système ne permet pas de passer outre la formation de ces espèces. L'augmentation du signal de luminescence de l'euporium tend donc à montrer la formation de deux espèces de stœchiométries différentes $\text{Eu}(\text{P}_3)_2$ et EuP_3 . (Figure 3. 21)

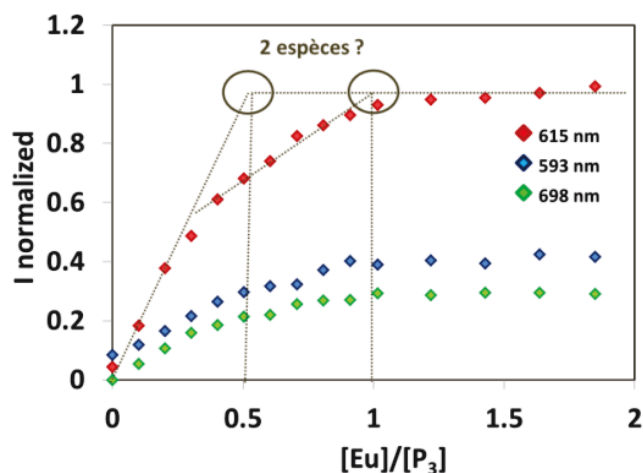


Figure 3. 21 : Variation d'intensité des maximums d'émission de la luminescence en temps résolu de l' Eu^{3+} ($d=0,05$ msec, exc slit em slit 10 10 nm) durant le dosage de P_3 ($7,95\mu\text{M}$) par EuCl_3 dans un milieu tamponné (10 mM HEPES, PH7, 0,1M KCl) après excitation à 450 nm

Afin d'obtenir une augmentation linéaire du signal de l'euporium à 615 nm, un suivi par *batch* a dû être effectué. Différentes quantités d'euporium (0 à 4 équivalents d' EuCl_3) ont été ajoutées à des échantillons de P_3 dans 10 mM HEPES, 0,1 M KCl pH 7, de concentration $6,5\mu\text{M}$. Après deux heures d'équilibration à 298 K, les premières mesures de luminescence en temps résolu de l'euporium ont été effectuées après excitation à 450 nm. Le maximum d'intensité de l'euporium à 615 nm est représenté sur la Figure 3. 22 en fonction du nombre d'équivalent d'euporium. Le suivi a été réalisé pendant 196 heures.

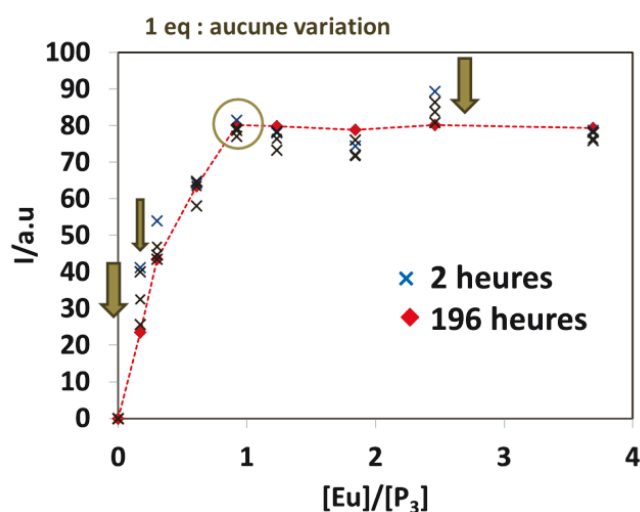


Figure 3. 22 : Emission du complexe EuP_3 à 615 nm en fonction du nombre d'équivalents d' Eu^{3+} ajouté à différents temps de stabilisation.

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

L'évolution des signaux de luminescence des échantillons EuP_3 à 0,25, 0,5 et 2,5 équivalents d'europlum traduit une équilibration lente vers l'espèce thermodynamique EuP_3 . À un équivalent d'europlum, aucune variation des signaux de luminescence n'est enregistrée. Il y a donc bien formation d'espèce monométallique EuP_3 . Pour la suite de mesures effectuées avec cette sonde, un temps de stabilisation du système de deux heures a été respecté. L'introduction de l'acide aminé Ed3a_2 dans la séquence influence donc fortement les vitesses de formation du complexe de l'europlum.

III.1.2 Temps de vie et stabilité

Les mesures de temps de vie du complexe EuP_3 dans l'eau légère et l'eau lourde conduisent à un nombre d'hydratation $q = 1$ (Tableau 3. 6). L'insertion de l'acide aminé pentadentate Ed3a_2 permet donc de déshydrater le cation Eu^{3+} .

Tableau 3. 7 : Données relatives à la formation des complexes d'europlum de la famille de la proflavine

sondes	$\tau \text{ H}_2\text{O}$ (ms)	$\tau \text{ D}_2\text{O}$ (ms)	q	$\log \beta_{110}^{\text{pH}7}$
EuP^{22}	0,30(1)	2,13(2)	3,1(1)	9,1(5)*
$\text{EuP}^{\text{HD}2}$	0,68(1)	2,03(2)	0,9(1)	12,7(5)*
EuP_1	0,25(1)	0,72(1)	2,8(2)	7,3(5)
EuP_2	0,21(1)	0,59(1)	3,4(3)	9,2(3)
EuP_3	0,23(1)	0,32(1)	1,2(3)	11,9(2)

* Constantes mesurées pour le cation Tb^{3+} .

La stabilité du complexe EuP_3 a été mesurée en présence d'un compétiteur de plus haute affinité que le NTA, l'HEDTA et donne une valeur similaire à celle obtenue précédemment au laboratoire pour le complexe $\text{TbP}^{\text{HD}2}$.

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

En conclusion, l'incorporation d'un composé proflavine et d'un acide aminé pentadentate dans la séquence du peptide P_3 a donc permis d'obtenir un complexe EuP_3 de stabilité plus élevée à pH 7 et ne possédant qu'une seule molécule d'eau dans sa première sphère de coordination.

III.1.3 Luminescence de l'europium

La comparaison des propriétés de luminescences des complexes EuP_1 , EuP_2 et EuP_3 valide l'insertion d'un acide aminé de haute denticité dans la séquence (Figure 3. 23). En effet, l'intensité de luminescence de l'europium est multipliée par quatre par rapport à celle du complexe EuP_2 . L'augmentation de la denticité des complexes permet donc de minimiser les contributions défavorables des désactivations non radiatives au signal de luminescence de l'europium. Ces résultats avaient déjà été démontrés pour les complexes TbP^{22} et TbP^{HD2} .⁷⁶

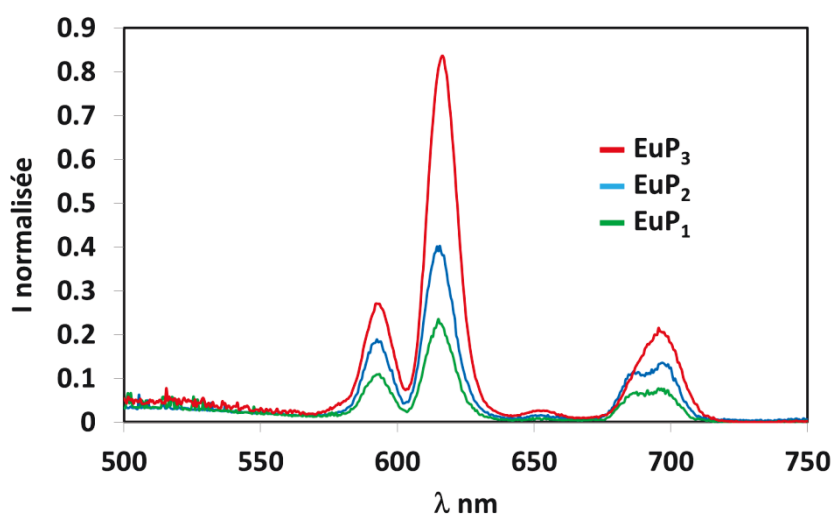


Figure 3. 23 : Comparaison des spectres d'émission de l'europium dans les complexes EuP_n où $n=1, 2, 3$ ($5 \mu M$, $10 mM$ HEPES, $0,1M$ KCl, pH 7, 298 K) après excitation à 450 nm (Exc slit 10 nm, Em slit 5 nm, $d= 0,05$ msec)

III.1.4 Luminescence dans l'infra rouge

Les temps de vie de luminescence des ions Yb^{3+} et Nd^{3+} , de l'ordre de la microseconde, sont plus courts que ceux des ions lanthanides émettant dans le visible. Un contrôle total de la sphère de coordination est par ailleurs nécessaire pour minimiser au maximum la contribution des désactivations non radiatives, qui sont nettement plus efficaces pour des énergies d'émission faibles. La sphère de coordination de l'euporium dans le complexe EuP_3 ($q=1$) ne contient qu'une seule molécule d'eau ce qui permet d'envisager la détection des spectres d'émission de l'ion Yb^{3+} et de l'ion Nd^{3+} . En effet, les niveaux de leurs états émissifs, respectivement ${}^2\text{F}^{5/2}$ ($10\,200\text{ cm}^{-1}$)¹⁴³ et ${}^4\text{F}_{3/2}$ ($11\,500\text{ cm}^{-1}$)¹⁴⁴, sont compatibles avec l'état ${}^3\pi\pi^*$ de la proflavine et donc avec une excitation à basse énergie ($\lambda_{\text{exc}} 450\text{ nm}$).

Des tentatives de détection des complexes de P_3 émettant dans l'infra-rouge n'ont montré aucun signal dans le cas de l'ytterbium. Par contre, le spectre du complexe NdP_3 , représenté sur la *Figure 3. 24* montre une sensibilisation à basse énergie (450 nm) effective du Nd^{3+} , avec l'obtention des raies d'émission caractéristiques ${}^4\text{F}_{n/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{n/2}$ où $n=9, 11$ et 13 . La mesure du spectre d'excitation du complexe NdP_3 , en détectant l'émission du Nd^{3+} à 1060 nm a mis en évidence une sensibilisation par effet d'antenne de l'unité proflavine. (*Figure 3. 25*).

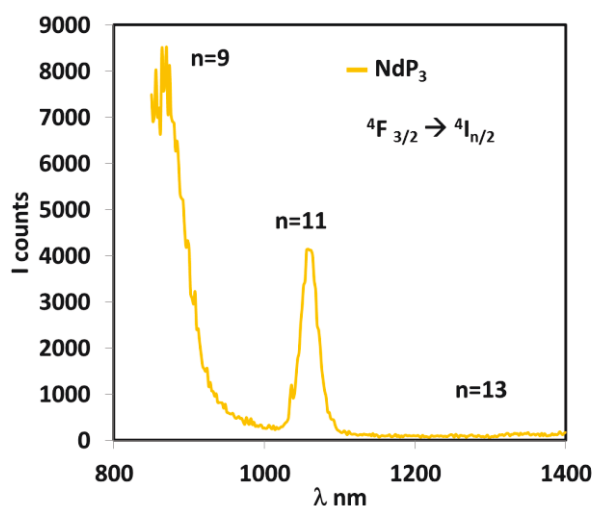


Figure 3. 24 : Luminescence du complexe NdP_3 (156 μM) dans une tampon HEPES (10 mM, 0,1M KCl, pH 7) mesurée avec un spectrofluorimètre Jobin Yvon ($\lambda_{\text{exc}} 450\text{ nm}$, Ex/Em 15,4/33 nm, IR filter, grafting 600-1000 nm)

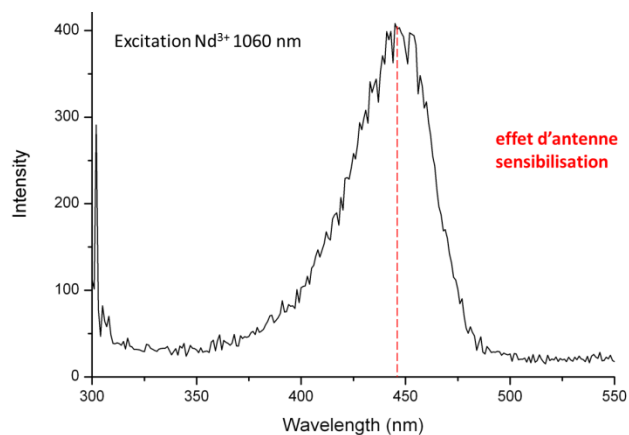


Figure 3. 25 : Spectre d'excitation du complexe NdP_3 , en détectant l'émission à 1060 nm.

Ces résultats préliminaires restent à approfondir. Ils ont néanmoins permis de montrer que la structure du peptide octadentate dérivé de la proflavine P_3 était capable de sensibiliser le Nd^{3+} par effet d'antenne et permettaient une détection du signal dans l'infrarouge.

III.2 Peptide dérivé du naphthalimide à cycle étendu N_3

III.2.1 Sensibilisation

La longueur d'onde d'absorption maximale du noyau **TNaph** inséré dans les sondes peptidiques à pH 7 dans un milieu 10 mM HEPES 0,1M KCl, est de 348 nm. Les bandes d'absorption à 450 nm et 506 nm, non présentes pour le noyau naphthalimide sont attribuées à l'extension du cycle. En présence d'un équivalent d'europium et après excitation à 348 nm, le signal de fluorescence est détecté à 400 nm. Les allures des spectres d'absorption et de fluorescence sont similaires à celles obtenues pour le naphthalimide dans les sondes EuN_1 et EuN_2 .

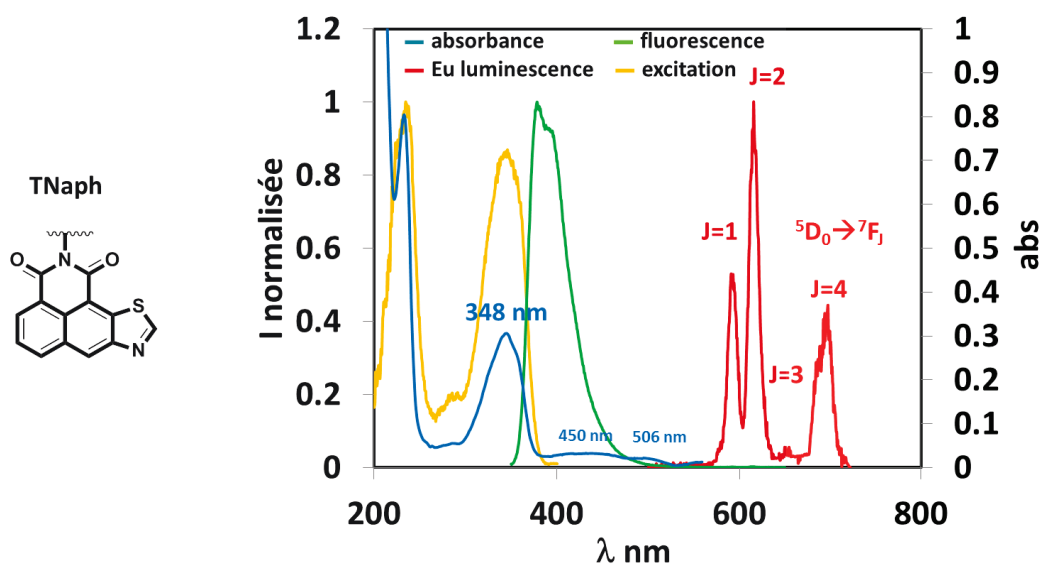


Figure 3. 26 : Propriétés spectroscopiques du complexe EuN_3 .

En se plaçant dans un mode de détection résolu temps, c'est-à-dire avec un délai de 0,05 msec avant la mesure, on enregistre après excitation à 348 nm du complexe EuN_3 le signal caractéristique de l'émission de l'euporium. On distingue les bandes d'émission fines correspondant aux transitions ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_J$ de l'euporium, où $J=1, 2, 3, 4$. L'extension du cycle, la sensibilisation de l'euporium est toujours assurée. Le spectre d'excitation effectué en détectant la transition $J=2$ ($\lambda_{em} = 616 \text{ nm}$) est similaire au spectre d'absorbance mesurée, ce qui indique une sensibilisation par effet d'antenne de l'euporium. Le noyau **TNaph** est donc capable de sensibiliser l'ion euporium à travers l'effet d'antenne.

La comparaison des propriétés de sensibilisation de l'euporium avec les sonde EuN_1 et EuN_2 a permis de caractériser l'influence de l'incorporation d'un noyau à cycle étendu dans la séquence peptidique. L'intensité d'émission du complexe EuN_3 est plus intense que celle de la sonde de structure proche EuN_2 .

L'incorporation du noyau **TNaph** permet donc d'augmenter le signal de luminescence de l'euporium et de combler en partie la perte de luminescence due à l'introduction de l'espaceur glycine. Ce noyau est donc un sensibilisateur efficace de l'euporium.

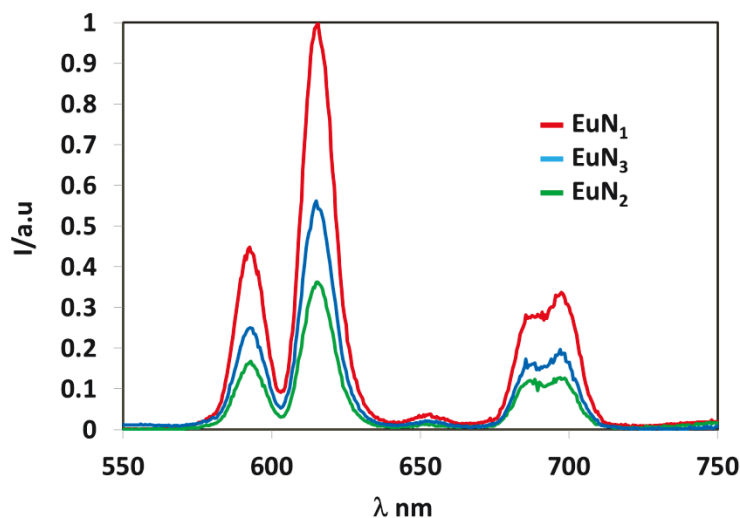


Figure 3. 27 : Comparaison des spectres d'émission des complexes EuN_n où $n=1, 2, 3$ ($5 \mu M$, $10 mM$ HEPES, $0,1M$ KCl, pH 7, $298 K$) après excitation à $344 nm$ (Exc slit $10 nm$, Em slit $10 nm$, $d= 0,05 msec$)

Ce noyau est cependant beaucoup plus gros que le naphthalimide, ce qui peut entraîner des perturbations de la complexation de l'europium. L'analyse de la spéciation, des temps de vie des niveaux excités de l'europium, et le calcul du nombre du nombre d'hydratation du complexe EuN_3 permettent de visualiser l'impact de l'insertion de cette unité aromatique dans le peptide sur la formation des complexes peptidiques d'europium.

III.2.2 Temps de vie

La mesure des temps de vie a permis de calculer le nombre de molécule d'eau coordonnée. Le nombre d'hydratation q égal à 3 est donc similaire à ceux mesurés précédemment pour les complexes de première et deuxième génération. L'incorporation d'un composé aromatique plus encombrant ne semble pas perturber la sphère de coordination du complexe.

Chapitre III COMPLEXATION DE L'EUROPIUM

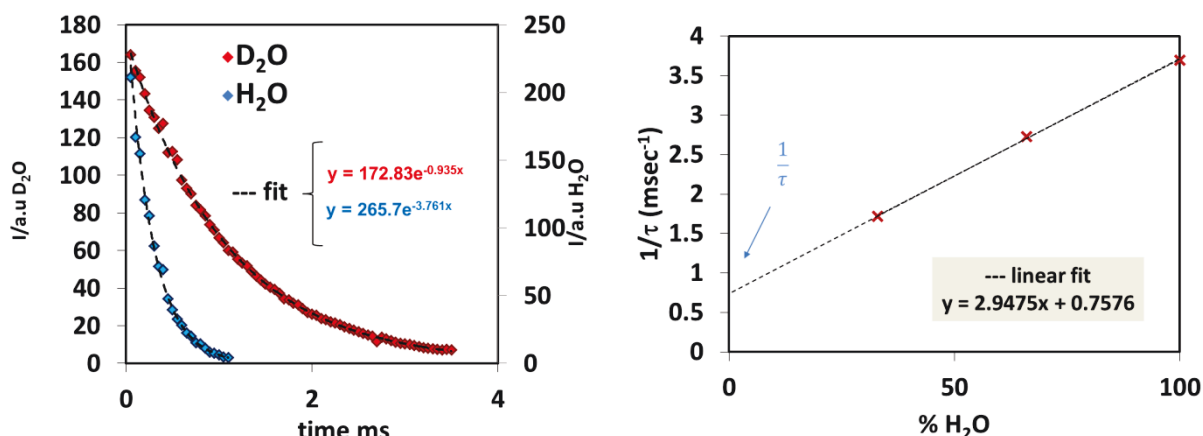


Figure 3. 28 : gauche : décroissance de l'intensité de luminescence de l'europium dans le complexes EuN_3 après excitation à 348 nm dans l'eau légère (bleu) et dans l'eau lourde (rouge). Ces courbes sont traitées en utilisant une exponentielle (courbes noires pointillées). Droite : Calcul de de l'inverse du temps de vie des états excités de l'europium du complexes EuN_3 après excitation à 348 nm, dans l'eau lourde par extrapolation graphique.

L'analyse des temps de vie à basse température montre une faible augmentation du temps de vie dans l'eau lourde à 77 K (+ 11%). Cette augmentation faible traduit l'absence de transfert d'énergie en retour.

Tableau 3. 8 : Données relatives aux complexes de la famille du naphthalimide

sondes	τ H_2O (ms)	τ D_2O (ms)	τ D_2O (ms) 77K	q^\ddagger	$\log \beta_{110}^{pH7}$
EuN_1	0,26(1)	1,18(1)	1,3(2)	3,3(2)	9,1(5)
EuN_2	0,29(1)	1,71(1)	2,6(2)	3,1(2)	9,0(5)
EuN_3	0,27(1)	1,32(1)	1,5(2)	3,2(2)	9,5(5)

‡ Selon la réf³, * déterminée pour Tb^{3+}

Les niveaux des états excités du composé **TNaph** identifiés sur le spectre d'émission à basse température (77 K), montre une énergie du niveau triplet $^3\pi\pi^*$ à $18\,000\text{ cm}^{-1}$ donc légèrement plus faible que celle du naphthalimide. (Figure 3. 29)

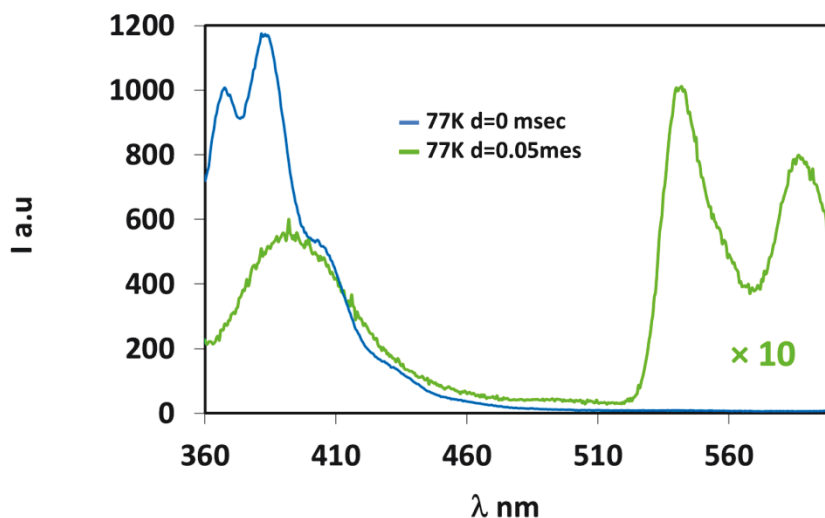


Figure 3. 29 : Spectre à basse température de la fluorescence du composé TNaph avec (courbe verte) et sans délai (courbe bleue) de mesure

Néanmoins, cette énergie reste compatible avec un transfert d'énergie efficace de l' Eu^{3+} (Figure 3. 30) comme le montrent les spectres d'émission des complexes EuN_3 .

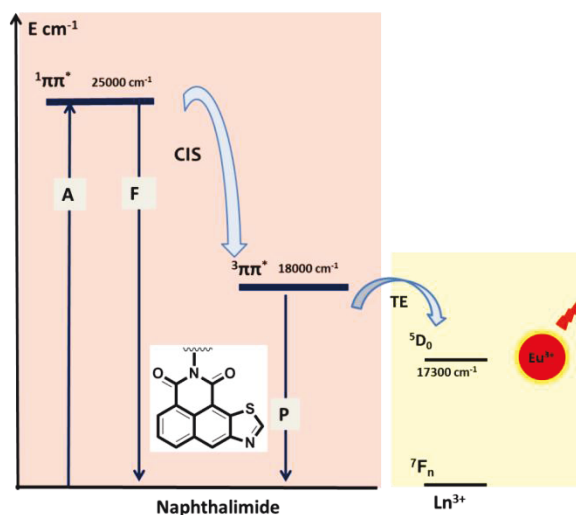


Figure 3. 30 : Diagramme énergétique du dérivé naphthalimide à cycle étendu

III.2.3 Spéciation et stabilité

L'incorporation d'un noyau *thiazolonaphthalimide* dans la séquence n'induit pas de perturbation de la complexation de l'europium : un complexe mononucléaire EuN_3 est formé.

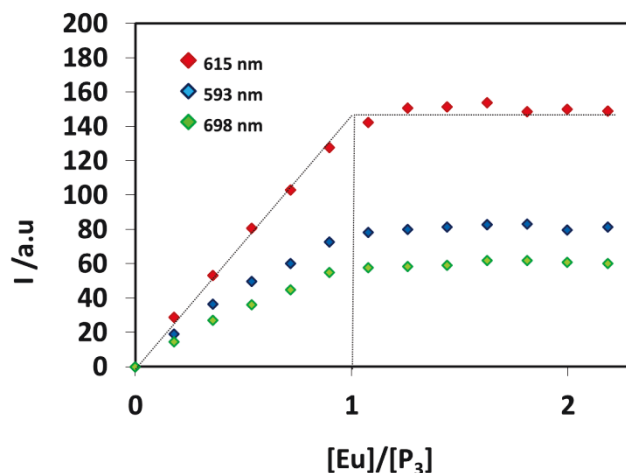


Figure 3. 31 Variations d'intensité d'émission de la luminescence en temps résolu de l' Eu^{3+} ($d=0,05$ msec, exc slit em slit 10 10 nm) durant le dosage de N_3 ($8,75 \mu\text{M}$) par EuCl_3 dans un milieu tamponné (10 mM HEPES, pH 7, 0,1 M KCl) après excitation à 348 nm.

La stabilité du complexe d'euporium formé a été mesurée par compétition en présence de NTA. L'addition de quantités croissantes de NTA au complexe EuN_3 dans un tampon pH 7 (10 mM HEPES, 0,1 M KCl) a permis de calculer une constante conditionnelle d'association de l'ordre du nanomolaire $-\log \beta_{11} = 9,5(5)$ avec le logiciel Specfit. (Figure 3.32)

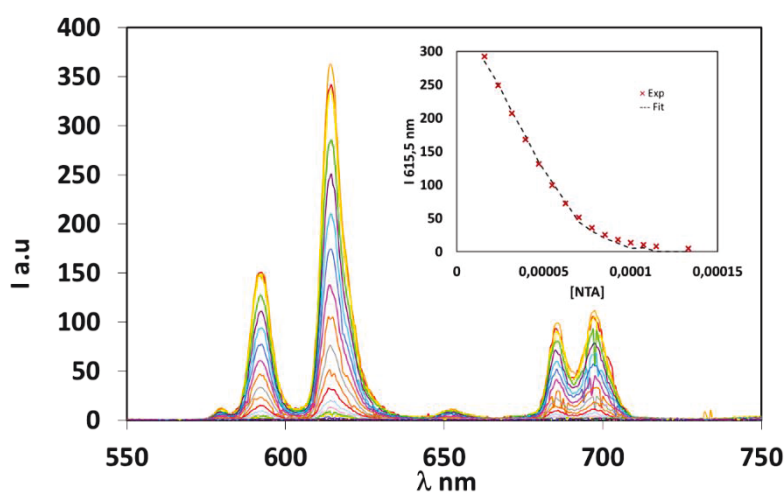


Figure 3. 32 : Mesure de la constante d'association du complexe EuN_3 en présence d'une quantité croissante de NTA

L'incorporation d'un aromatique plus encombré ne diminue donc pas la stabilité du complexe EuN_3 formé. Ce dernier possède des propriétés similaires aux complexes EuP^{22} et EuN_2 , avec de plus des propriétés d'émission améliorées. C'est donc un complexe très prometteur pour la détection de l'ADN, de par la présence d'un cycle aromatique étendu.

En conclusion, toutes les sondes, quels que soient les noyaux sensibilisateurs considérés, permettent la formation de complexe monométallique bien défini. L'incorporation d'un espaceur glycine dans la séquence de EuN_2 et EuP_2 a permis de s'affranchir à la fois des problèmes de cinétique présent lors de la formation de la sonde EuN_1 mais également d'obtenir une stabilité suffisante à pH physiologique pour le complexes EuP_2 , par une diminution des contraintes stériques. L'augmentation de la denticité du complexe EuP_3 octadentate a permis une forte augmentation de la stabilité à pH physiologique et une déshydratation suffisante de la première sphère de coordination du cation lanthanide pour permettre une détection de luminescence dans l'infra-rouge du complexe NdP_3 . Enfin, le noyau à cycle étendu **TNaph**, inséré dans le peptide N_3 permet d'obtenir une émission de l'euporium comparable à celles des sondes EuN_1 et EuN_2 .

Cette étude démontre l'obtention de six complexes d'euporium bien définis EuP ou EuN , leurs interactions avec la double hélice de l'ADN font l'objet du dernier chapitre de ce mémoire.

Chapitre IV

Interaction avec l'ADN

Les six peptides développés dans ce travail forment des complexes d'euporium monométalliques luminescents. Leurs propriétés d'interaction avec l'ADN font l'objet de ce chapitre et nous nous attacherons en particulier à démontrer que ces nouvelles sondes permettent la détection de l'ADN à travers la luminescence centrée sur le métal.

I Comment mesurer l'interaction avec l'ADN ?

Nous allons tout d'abord montrer comment les interactions de composés avec l'ADN peuvent être mises en évidence. Pour cela différentes techniques d'analyse peuvent être combinées afin de vérifier la cohérence et la pertinence des résultats obtenus.

La mesure du dichroïsme linéaire est LA technique phare pour prouver si un composé s'intercale dans l'ADN. En effet, celle-ci traduit l'orientation (parallèle ou perpendiculaire) d'un composé par rapport à l'axe de la double hélice. Cependant, celle-ci n'est pas disponible au laboratoire et pourra être éventuellement utilisée dans l'avenir pour s'assurer du mode d'interaction de certains complexes.

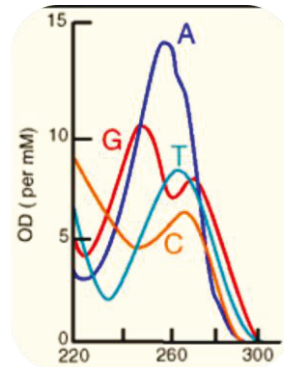
Les caractéristiques que nous avons utilisées pour caractériser l'interaction des complexes d'euporium avec l'ADN sont les suivantes : la luminescence de l'euporium, la fluorescence et l'absorbance des unités aromatiques contenues dans les complexes, et enfin la température de fusion de l'ADN.

I.1 Absorbance

Chaque base azotée de l'ADN possède sa propre signature énergétique (*Erreur ! Source du envoi introuvable.*). Pour chaque brin d'ADN, un spectre d'absorption moyen est mesuré qui dépend de l'enchaînement des paires de bases et de leur nombre. Tous les ADN double brins des mammifères ont une absorbance équivalente à la longueur d'onde de 260 nm, car ils possèdent tous la même proportion de bases **G**, **C**, **A** et **T** dans leurs gènes. L'appariement des bases deux à deux et leur empilement les unes sur les autres entraînent une diminution de l'absorbance des bases. L'interaction des orbitales π entre elles se traduit donc par une diminution de l'absorbance moyenne. Les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

maintiennent la structure de la double hélice et limitent la résonance des bases azotées de l'ADN, donc la délocalisation des électrons. C'est ce que l'on nomme *l'effet hypochrome*.



http://www.sciencisart.com/A_DNA/UVspectrum_2.html

Figure 4. 1 : Spectre d'absorbance des bases azotées de l'ADN

Tout composé pouvant interagir avec les orbitales π des bases de l'ADN entraîne une diminution supplémentaire de l'absorbance de la double hélice à 260 nm. **Donc un intercalant, qui par définition interagit à travers ses orbitales π et celles des bases de l'ADN, amplifiera l'effet hypochrome.**¹⁴⁵ La mesure d'un effet hypochrome de l'ADN en présence de complexes de lanthanides intercalants permet donc de caractériser partiellement le mode d'interaction de ces complexes. Par comparaison avec les résultats d'absorbance de l'ADN obtenu en présence des composés aromatiques seuls proflavine et naphthalimide, on peut évaluer l'impact de la séquence peptidique sur les capacités de reconnaissance des composés intercalant de l'ADN.

I.2 Température de fusion ou température de dénaturation

Une des conséquences de l'effet hypochrome est l'absorbance supérieure de 37% de l'ADN monobrin par rapport à l'ADN double brin. Cette différence d'absorbance permet de mesurer la température de fusion de l'ADN, notée T_f , qui correspond à la température de transition entre l'ADN double brin à basse température et l'ADN simple brin à haute température.¹⁴⁶ La température de fusion T_f est la température pour laquelle 50% des paires de bases de la double

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

hélice sont désappariées sous l'effet de la chaleur. Lorsque l'on chauffe la double hélice, les liaisons hydrogènes entre les bases se rompent pour donner deux brins d'ADN indépendants.

La température de fusion, peut être calculée selon la règle de *Bolton et Mac Carthy*:¹⁴⁷

$$T_f = 81,5 + 16,6 \times (\log_{10}([\text{Na}^+]) + 0,41 \times (\%GC) - \frac{600}{L}$$

où $[\text{Na}^+]$ est la concentration en sodium du milieu, (%GC) est la proportion en paire de base GC dans la séquence et L est la longueur de la séquence. La température de fusion de l'ADN dépend donc fortement de la composition en bases de l'ADN. L'utilisation de ce calcul nécessite de connaître la composition exacte et la longueur de l'ADN utilisé, ce qui est délicat lorsque l'on travaille sur de l'extrait d'ADN. Cette relation montre que plus la concentration en paires de base GC est élevée, plus la température de fusion de l'ADN est élevée. Lorsqu'un composé s'intercale dans la double hélice, cela entraîne une stabilisation accrue de cette dernière. La *Figure 4. 2* illustre le principe général des mesures de températures de fusion.

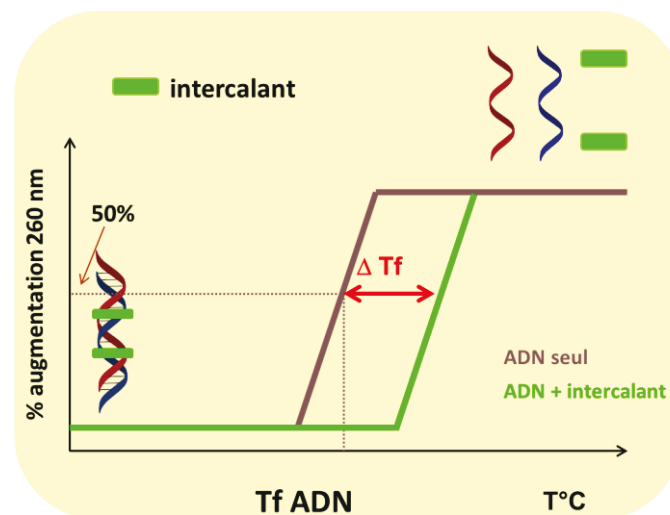


Figure 4. 2 : Principe des mesures de la dénaturation de l'ADN

La température de dénaturation de l'ADN augmente donc en présence d'un intercalant. On estime la stabilisation (ΔT_f) en mesurant la différence entre la température de dénaturation de l'ADN libre et celle de l'ADN en présence de l'intercalant.

$$\Delta T_f = T_f(\text{ADN-int}) - T_f(\text{ADN})$$

Bien qu'il n'y ait pas de règle absolue, un intercalant induit la plupart du temps une augmentation de la température de fusion d'au moins 4 °C.

I.3 Luminescence

Enfin, l'interaction des complexes avec l'ADN peut être identifiée grâce à la fluorescence des unités intercalantes aromatiques dérivées de la proflavine **Pfl**^{97, 120, 148} et du naphthalimide **Naph**^{104, 106, 112, 121} contenues dans les complexes. En effet, en présence d'ADN leur fluorescence varie. Cependant selon l'intercalant utilisé, une augmentation de fluorescence peut être observée, notamment avec le bromure d'éthidium,^{97, 146} ou une extinction comme avec la proflavine. C'est ce que l'on nomme un *quenching* ou extinction de fluorescence.

Cette extinction est dépendante de la concentration d'ADN présente, exprimée en paire de base.

Enfin, les variations de fluorescence permettent de vérifier les cohérences des résultats obtenus lors de la détection de l'interaction grâce à la luminescence centrée sur l'euporium, et de valider le modèle utilisé.

Les temps de vie de l'euporium dans les complexes interagissant avec l'ADN ont également été mesurés pour vérifier l'intégrité du complexe métallique lors de l'interaction. En effet une diminution traduirait une décomplexation du métal, rendant toute interprétation des résultats impossible.

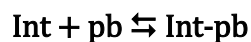
Pour quantifier l'effet de l'interaction avec l'ADN sur la luminescence, nous avons défini le pourcentage d'extinction **E** de luminescence comme étant :

$$E = \frac{I_0 - I}{I_0} \times 100$$

où **I** représente la luminescence mesurée en présence de 25 équivalents d'ADN exprimé en paires de base [pb], et **I₀** la luminescence initiale en absence d'ADN. Ce pourcentage d'extinction **E** est utilisé lors de la comparaison des résultats obtenus entre les différentes sondes.

I.4 Modèle d'interaction utilisé

La puissance de l'interaction spécifique entre l'intercalant et son site d'interaction dans l'ADN (la paire de base) correspond à l'affinité réciproque des deux partenaires. Cette affinité dépend de la structure chimique de chacun des partenaires permettant l'établissement de liaisons non covalentes multiples (hydrophobes, ioniques, hydrogènes, van der Waals). En dépit de cette complexité, l'analyse du mode de liaison obéit à la loi d'action de masse, représentant l'équilibre dynamique entre les formes associées et libres des composés. Le modèle suppose que la liaison intervient lors de la rencontre des deux partenaires par simple diffusion, avec une orientation spatiale favorable des deux acteurs et une énergie suffisante.^{149, 150} Ce modèle simple ci-dessous, développés par J.B. *Chaires*, est satisfaisant pour les études menées au cours de ces travaux de thèse.



où **Int** = composé intercalant

pb = ADN exprimé en paires de base

L'équilibre est atteint lorsque les vitesses d'association et de dissociation sont égales. **[Int] × [pb] × k₁** représente la vitesse d'association et **[Int-pb] × k₋₁** la vitesse de dissociation, avec **k₁** la constante cinétique d'association et **k₋₁** la constante cinétique de dissociation.

À l'équilibre thermodynamique on obtient :

$$[\text{Int}] \times [\text{pb}] \times k_1 = [\text{Int} - \text{pb}] \times k_{-1}$$

Soit

$$\frac{[\text{Int} - \text{pb}]}{[\text{Int}] \times [\text{pb}]} = \frac{k_1}{k_{-1}} = K_a = \frac{1}{K_D}$$

L'affinité est définie par la constante d'association à l'équilibre, K_a exprimée en M^{-1} . En pratique, on donne également l'inverse, soit la constante de dissociation K_D car son unité en Molarité est plus évocatrice.¹⁵¹ C'est donc avec ce modèle qu'ont été calculées, à l'aide du logiciel *Specfit*, les constantes d'association avec l'ADN des complexes peptidiques d'euporium développés.

I.5 Choix de l'ADN

L'ADN choisi pour effectuer les mesures d'interaction est un ADN extrait du thymus de veau, appelé *ct*-DNA (**Ct** pour **cal**f **th**ymus). Notre choix s'est porté sur cet ADN pour plusieurs raisons :

- ✿ Sa proportion en paire de base GC (42%) et AT (58%) est égale à l'ADN humain.
- ✿ Cet ADN a été fréquemment utilisé^{152, 153, 154} et nos résultats peuvent donc être comparés avec ceux décrits dans la littérature.^{97, 106, 109, 121, 122, 124}

Cette molécule d'ADN est extraite de cellule vivante et sa composition exacte et sa longueur ne sont donc pas connues. L'utilisation de la formule de *Bolton et Mac Carthy* n'est pas possible. Son poids moléculaire est estimé entre $10\text{-}15 \times 10^9$ Dalton (Da). Sachant qu'une paire de base correspond environ à 660 Da, sa taille moyenne est estimée entre 1 et 1,5 millions de paires de bases.

Les résidus protéiques issus de l'extraction de l'ADN de la cellule sont éliminés en précipitant le *ct*-DNA dans l'éthanol. L'excédent de sels présents, pouvant perturber les mesures d'interaction avec l'ADN, est éliminé par dialyse dans l'eau extra pure. En effet, une concentration saline trop élevée masque la charge globale de la double hélice et induit une augmentation de la température de fusion T_f de l'ADN. Une concentration saline trop faible, au contraire déstabilise la double hélice. La pureté du *ct*-DNA ainsi traité est caractérisée en calculant le ratio entre la valeur de l'absorbance à 260 et 280 nm. Ce ratio doit être compris entre 1,8 et 2 : supérieur, il traduit la présence d'ARN ; inférieur il traduit la présence de protéines.¹⁵⁵

II Interaction des dérivés naphthalimides avec l'ADN

Des mesures d'interaction du composé libre naphthalimide avec l'ADN ont tout d'abord été réalisées, afin de certifier les protocoles utilisés par comparaison avec les résultats trouvés dans la littérature.

II.1 Naphthalimide

L'absorbance du naphthalimide recouvre la zone d'absorbance de l'ADN. La mise en évidence de l'interaction par l'analyse des variations du spectre d'absorption de l'aromatique, effets bathochromes et hypochromes, est donc impossible.

L'extinction de fluorescence du naphthalimide en présence de 25 équivalents de paires de bases de *ct-DNA* est faible (8%) et ne peut être interprétée avec le modèle d'intercalation classique décrit ci-dessus (Figure 4. 3).

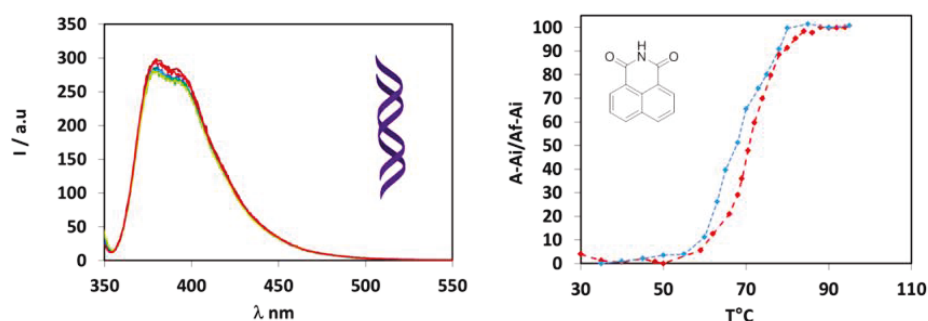


Figure 4. 3 Gauche Décroissance de la fluorescence du composé naphthalimide (12 μ M) après excitation à 344 nm dans un milieu HEPES (10 mM, 50 mM NaCl, pH 7) en présence d'une quantité croissante d'ADN. Droite : Mesure de la température de fusion de l'ADN en présence du composé naphthalimide en quantité 1 pour 5 pb.

De plus, la faible stabilisation de la double hélice ($\Delta T_f = 2^\circ\text{C}$) en présence de 5 équivalents de paires de bases d'ADN montrent que le naphthalimide n'interagit certainement pas avec l'ADN à travers un phénomène d'intercalation. (Figure 4. 3) En effet, dans la littérature, celui-ci n'est pas référencé comme un intercalant.¹⁰⁶ Son mode d'interaction semble être majoritairement via une insertion dans les sillons de la double hélice.

II.2 Sondes EuN₁ et EuN₂

II.2.1 Température de fusion

Les températures de fusion de l'ADN en présence des peptides **N₁** et **N₂** ou de leurs complexes Eu**N₁** et Eu**N₂** ont été mesurées en présence de 5 équivalents de paires de bases d'ADN pour un équivalent de composé étudié. Le *Erreur ! Source du renvoi introuvable.* récapitule l'ensemble des données obtenues.

Tableau 4. 1 : *Températures de dénaturation du ct-DNA en présence des peptides **N₁**, **N₂** et des sondes Eu**N₁** et Eu**N₂** dans le tampon HEPES 10 mM, pH 7, 50 mM NaCl*

Composé	N ₁	N ₂	EuN ₁	EuN ₂
$\Delta T_f (\pm 0,5)$	11 °C	2 °C	1,5 °C	2 °C

Les résultats obtenus en présence du peptide **N₁** montrent une plus forte différence de stabilisation de la double hélice (ΔT_f **N₁** = 11°C) qu'en présence d'une quantité égale du complexe Eu**N₁** (ΔT_f Eu**N₁** = 1,5°C). La complexation du métal perturbe donc dans ce cas l'interaction du peptide avec l'ADN. Bien que faible, la stabilisation de l'ADN par le complexe Eu**N₁** (ΔT_f = 1,5°C) est du même ordre de grandeur que celle obtenue pour le noyau naphthalimide (ΔT_f = 2°C), traduisant un mode d'action similaire. La forte stabilisation de la double hélice en présence du peptide libre **N₁** provient donc probablement de l'arrangement spatial de ce peptide en solution, propice à la formation de liaisons hydrogène avec l'ADN. Les bras **aminodiacétates** des acides aminés non naturels **Ada₂** étant libre, il est possible que ceux-ci participent à la formation de liaisons hydrogène, stabilisant ainsi plus fortement l'interaction avec l'ADN. Cependant, la mesure de la température de fusion ne traduit pas l'affinité des composés. Cette différence représente donc un mode d'interaction différent avec la double hélice. La *Figure 4. 4* représente les résultats obtenus pour les sondes **N₁** et Eu**N₁**.

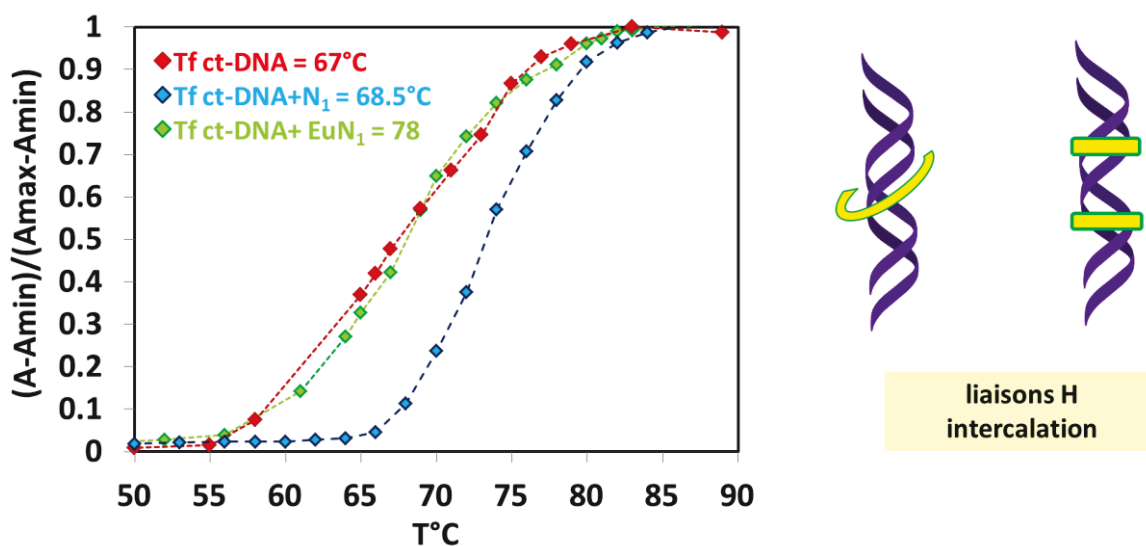


Figure 4. 4 : Mesure des températures de fusions de l'ADN en présence du peptide N_1 , et du complexe EuN_1 et représentation des différents modes d'interaction envisagés.

L'introduction de l'espaceur glycine dans la séquence du peptide N_2 induit une chute de la stabilisation de l'ADN en présence du peptide N_2 (Figure 4. 4) comparée à celle observée en présence du peptide N_1 . Cependant, aucune variation supplémentaire de la température de dénaturation de la double hélice n'est mesurée en présence du complexe EuN_2 . L'introduction de l'espaceur permet donc de diminuer l'effet de la complexation du métal sur l'interaction avec l'ADN. La chute de stabilisation mesurée en présence du peptide N_2 traduit potentiellement un arrangement spatial différent du peptide N_2 par rapport à N_1 en solution.

II.2.2 Luminescence

Les variations de fluorescence du naphthalimide en présence d'ADN montrent des comportements différents pour les composés N_1 et EuN_1 et pour leurs équivalents ayant un espaceur glycine dans la séquence N_2 et EuN_2 .

L'extinction de fluorescence en présence de 25 équivalents en paires de bases d'ADN obtenue pour le complexe EuN_1 de 18% est plus importante que celle obtenue pour le composé naphthalimide (-8%) libre, et est similaire à celle obtenue lors du dosage du peptide libre N_1 (-18%). Les essais d'interprétations et de calcul d'affinité suivant le modèle standard ont toutes échouées.

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

L'extinction quasi-totale de luminescence de l'euporium de 96 % du complexe EuN_1 en présence d'ADN (Figure 4. 5) n'est pas en corrélation avec les résultats obtenus par fluorescence.

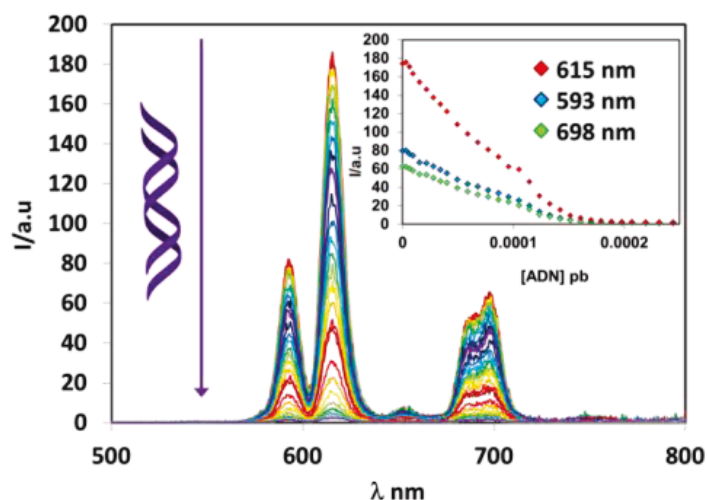


Figure 4. 5 : Luminescence en temps résolu de l'euporium durant la titration de EuN_1 (3,6 μM) par le *ct*-DNA (0-250 μM) dans le tampon HEPES (10mM, 50 mM NaCl, pH 7). Encart: Variation des intensités maximum de l'euporium.

Le temps de vie constant de l'euporium au cours du dosage permet d'affirmer que le cation n'est pas décomplexé au cours de l'expérience et que la décroissance observée est bien conséquente à la présence d'ADN. Cependant, dans ce cas comme pour la fluorescence, les résultats ne sont pas interprétables avec le modèle d'intercalation décrit ci-dessus.

Afin de déterminer l'affinité du complexe EuN_1 pour le *ct*-DNA, des mesures d'affinité par luminescence de l'euporium suivant la *méthode de Scatchard*^{151, 156} ont été effectuées. Une quantité d'ADN similaire est mis en présence d'une concentration croissante de complexe EuN_1 . Le signal de luminescence de l'euporium est mesuré avant et après l'addition d'ADN (courbe hachée et non hachée Figure 4. 6). On détermine alors la quantité de composé lié à l'ADN (C_{int}) suivant les formules suivantes 1 et 2.

$$C_{\text{int}} = \frac{I_l - I}{I_l - I_{\text{int}}} \quad 1$$

$$C_l = C - C_{int} \text{ et } I_{int} = I - I_l \quad 2$$

où C et I représentent la concentration et l'intensité de luminescence du complexe EuN_1 , I_{int} l'intensité de luminescence du complexe lié à l'ADN et C_l et I_l la concentration et l'intensité en complexe libre après addition d'ADN.

La constante d'affinité est ensuite déterminée par une extrapolation graphique affine suivant le modèle 3 :

$$\frac{r_b}{C_l} = K_a \times (n - r_l) \quad 3$$

Où r_l représente le rapport de la concentration de composé lié C_{int} sur la concentration d'ADN en paires de base, K_a est la constante d'affinité et n est la densité de site de fixation du composé dans l'ADN. La pente de la droite obtenue représente l'opposé de la constante d'affinité. La **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** représente les résultats obtenus après traitements des données pour la luminescence de l'euprium du complexe EuN_1 .

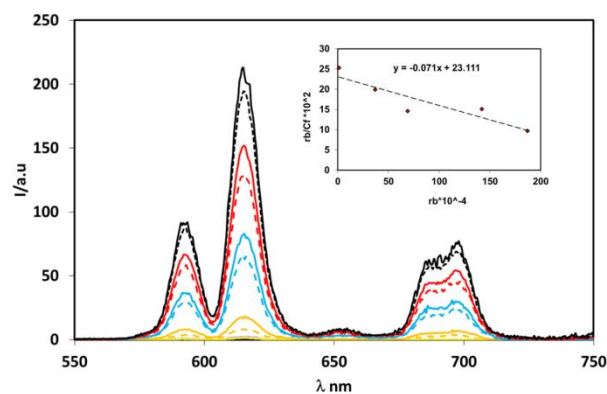


Figure 4. 6: Luminescence en temps résolu de EuN_1 (courbe orange 2 μM – bleue 5 μM - rouge 10 μM - noire 20 μM) en absence (courbe ininterrompue) ou en présence (courbe pointillée) d'une quantité égale d'ADN (40 μM pb) dans le tampon HEPES (10 mM, 50 mM NaCl, pH 7). Encart: Détermination de la constante d'affinité pour l'ADN suivant la méthode de Scatchard

La constante d'affinité obtenue $K_a = 1,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ de l'ordre du millimolaire est à modérer. En effet, le modèle utilisé est basé sur l'hypothèse que lors de l'interaction avec l'ADN, la luminescence du composé étudié est égale à 0, ce qui n'a pu être vérifié dans notre cas.

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

Malgré cela cette méthode donne une idée sur la force d'interaction de la sonde EuN_1 avec l'ADN.

Lors de l'étude de l'interaction avec l'ADN des sondes N_2 et EuN_2 , l'impact de l'incorporation d'un espaceur glycine sur la reconnaissance de l'ADN a pu être mesurée. En effet, une décroissance de 23% du signal de fluorescence du complexe EuN_2 a été enregistrée. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par décroissance de la luminescence en de l'euporium (-59%) en présence de 25 équivalents en paires de bases d'ADN. Les temps de vie de l'euporium sont constants ($\Delta\tau = 0$) au cours de la titration ce qui montre que la décroissance du signal n'est pas consécutive à une décomplexation du métal. Les résultats obtenus pour la luminescence centrée sur le métal ont permis de calculer l'affinité de ce nouveau complexe EuN_2 pour l'ADN avec $\log K_a = 3,8(2)$. (Figure 4. 7)

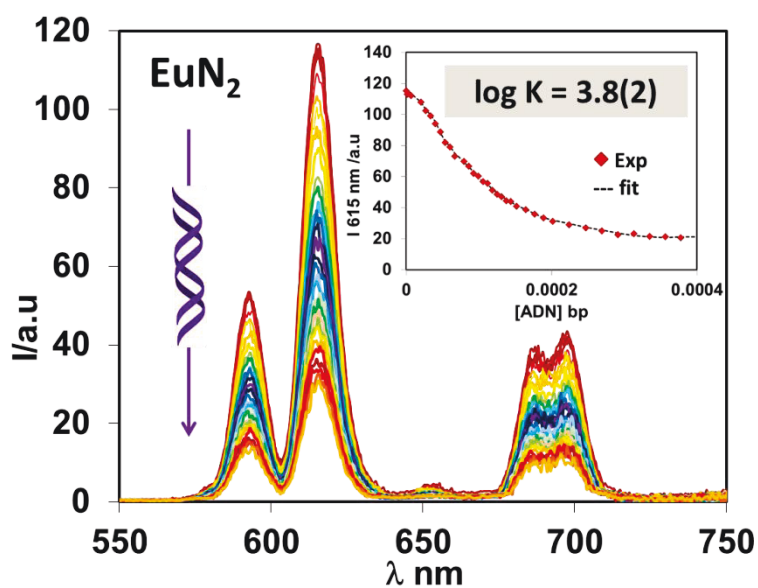


Figure 4. 7: Décroissance de la luminescence en temps résolu de l'euporium du complexe EuN_2 ($6,6\mu\text{M}$) après excitation à 344 nm, en présence de ct-DNA (0-400 μM) à 298 K. L'encart représente la variation d'intensité à 615 nm de l'euporium du complexe; les carrés rouges sont les données expérimentales et la ligne noire hachée représente les données calculées.

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

Tableau 4. 2 : *Données obtenues lors de la reconnaissance de l'ADN des espèces naphthalimides de première et deuxième génération*

	Luminescence de l'Eu			Fluorescence du Naph	
	E	$\Delta\tau$ (msec)	$\log K_a$	E	$\log K_a$
Naph	-	-	-	8%	-
N1	-	-	-	18%	-
EuN ₁	96%	0,01	3,1(5) ^a	18%	-
N ₂	-	-	-	27%	3,7(3) ^b
EuN ₂	59%	0,00	3,8(2) ^b	22%	3,9(1) ^b

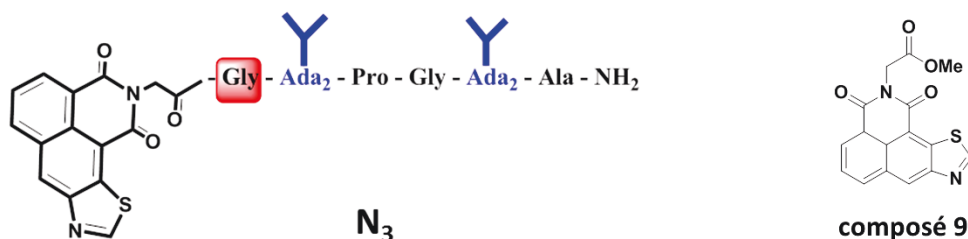
E représente l'extinction de luminescence de l'europlum ou de fluorescence en présence de 25 équivalents de paires de bases d'ADN. $\Delta\tau$ est la variation du temps de vie de l'europlum au cours du dosage. K_a est la constante d'interaction avec l'ADN mesurée dans un tampon HEPES (10 mM, 50 mM NaCl, pH 7 ^a selon la méthode de Scatchard ^b selon le modèle décrit dans la section I.4.

L'ensemble des données récapitulées dans le *tableau 4.2* met en évidence l'influence positive de l'insertion de l'espaceur dans la séquence. En effet, son incorporation dans la séquence peptidique a permis d'obtenir des résultats cohérents pour les différentes expériences menées (fluorescence, luminescence, température de fusion) et interprétables selon le modèle classique d'interaction. Bien que l'affinité des composés naphthalimides pour l'ADN reste faible et que son mode d'interaction par intercalation ne soit pas démontré, les complexes EuN₁ et EuN₂ sont capables de détecter la présence d'ADN à travers la luminescence centrée sur le métal.

Dans le but d'augmenter l'affinité des sondes naphthalimides pour l'ADN, le cycle thiazolonaphthalimide (**TNaph**) plus étendu a été inséré dans la séquence du peptide **N₃**. Cette extension de cycle a pour objectif d'augmenter l'affinité pour l'ADN ainsi que les propriétés de reconnaissance centrée sur le métal.

II.3 Sonde EuN_3

La sensibilisation de l'euprium par le dérivé N_3 a été démontrée précédemment. La taille plus importante du cycle aromatique, comparée aux sondes $\text{N}_{1/2}$ permet-il une augmentation de la force d'interaction avec l'ADN ?



II.3.1 Température de fusion

Les mesures de stabilisation de la double hélice, effectuées en présence d'un équivalent de composé pour 5 équivalents d'ADN en paire de bases, sont récapitulées dans le *Tableau 4. 3*

Tableau 4. 3 : Température de fusion de l'ADN en présence des composés dérivés du thiazolophthalimide

	Composé 9	N_3	EuN_3
$\Delta T_f (\pm 0,5^\circ\text{C})$	9,5 °C	9 °C	9 °C

On remarque que l'extension du cycle naphthalimide par un noyau thiazole induit une forte augmentation de la température de fusion de l'ADN comparée à celle obtenue pour le naphthalimide. La stabilisation est de 9,5 °C pour le composé aromatique **9** seul, qui correspond au **TNaph** substitué par une glycine méthyl ester, et de 9 °C pour le peptide N_3 et le complexe EuN_3 , ce qui met en évidence un phénomène d'interaction similaire pour les trois espèces. Ces premiers résultats montrent une augmentation de la surface d'interaction entre le complexe et l'ADN par rapport aux peptides précédents (*Figure 4. 8*).

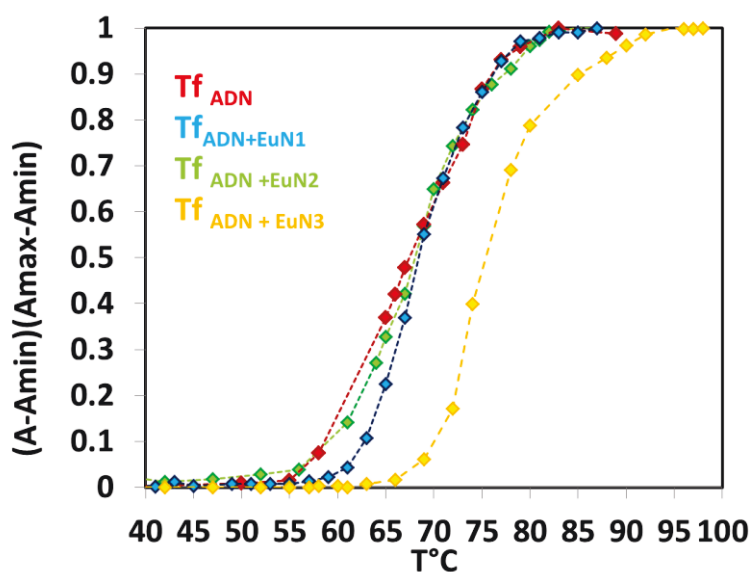


Figure 4. 8 : Comparaison des profils d'absorbance à 260 nm obtenus lors des mesures de dénaturation de l'ADN en présence des complexes europium naphthalimide $[Cx] = 0,2 \times [ADN]_{pb}$

La stabilisation du même ordre de grandeur de la double hélice de l'ADN en présence du complexe, du peptide et de l'aromatique seul traduit un mode d'interaction similaire à celui démontré dans la littérature par intercalation.¹²⁴ L'augmentation de la taille du cycle a donc permis d'obtenir un mode d'interaction défini par intercalation avec l'ADN et permet de valider la stratégie employée. L'introduction d'un noyau à cycle étendu permet donc une stabilisation plus importante de la double hélice en présence du complexe EuN_3 qu'en présence des sondes de première génération EuN_1 et EuN_2 .

Bien que cette méthode ne traduise pas l'affinité des composés pour l'ADN, on peut tout de même supposer que celle-ci est supérieure à celle de la sonde EuN_2 aux vues de la forte augmentation de la température de fusion.

II.3.2 Luminescence

Les résultats obtenus par mesure de la température de fusion de l'ADN semblent indiquer une interaction plus forte des dérivés du thiazolonaphtalimide avec la double hélice de l'ADN que les dérivés du naphthalimide. Les mesures de température de fusion n'étant pas pertinentes en terme d'affinité, un suivi des modifications de fluorescence de l'aromatique et de luminescence de l'euporium en présence d'ADN a été effectué.

Les variations de fluorescence et de luminescence du complexe EuN_3 en présence de ct-DNA donnent des résultats cohérents et démontre une interaction avec $\log K = 4,2(1)$. Le temps de vie de l'euporium est constant au cours de la titration, ce qui permet d'affirmer que l'extinction de luminescence mesurée est consécutive à l'interaction avec l'ADN et non à une décomplexation du cation métallique. Le complexe EuN_3 est donc une sonde luminescente de la double hélice de l'ADN. L'extinction de luminescence ainsi que l'affinité du complexe EuN_3 pour le ct-DNA, $\log K_a = 4,2(1)$ sont supérieures à celles obtenues précédemment pour la sonde EuN_2 . Cependant, la constante d'affinité est plus faible que celle déterminée dans la littérature¹¹¹ avec $\log K_a = 5,31$ pour le dérivé **TNaph**, déterminé selon la méthode de *Scatchard*.

Nous avons donc mesuré l'affinité pour l'ADN du composé **9** correspondant à l'aromatique **TNaph** substitué sur l'atome d'azote, par analyse des variations de fluorescence : $\log K_a = 4,4$ (2). L'interaction avec l'ADN du composé substitué est donc également plus faible que celle du **TNaph** décrite dans la littérature. La différence observée provient certainement de l'encombrement stérique apporté par la substitution de l'azote du thiazolonaphthalimide, qui peut empêcher la formation de liaisons hydrogène supplémentaires avec la double hélice. L'insertion d'un cycle étendu permet néanmoins d'obtenir une sonde plus affine avec un contrôle de l'interaction avec la double hélice, mesurable par luminescence centrée sur l'euporium.

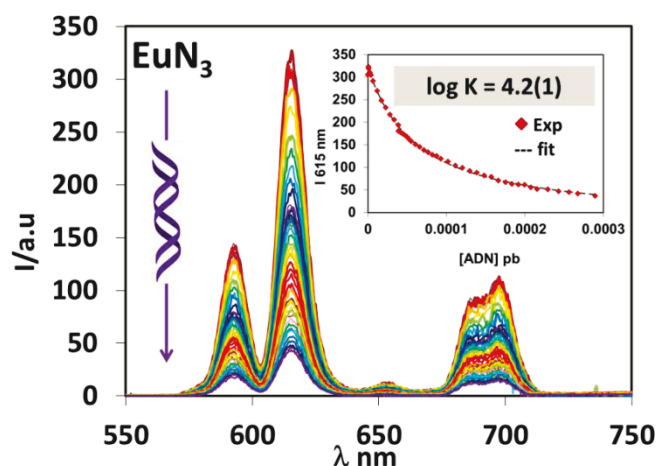


Figure 4. 9 : Décroissance de la luminescence en temps résolu de l'euporium EuN_3 ($6,7 \mu\text{M}$) après excitation à 344 nm , en présence de ct-DNA ($0\text{-}400 \mu\text{M}$) à 298 K . Les encarts représentent les variations des intensités d'émission maximales de l'euporium des complexes à 615 nm ; les carrés rouges sont les données expérimentales et la ligne noire hachées sont les données calculées.

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

Tableau 4. 4 : Résultats des expériences menées sur la détection de l'ADN par les sondes naphthalimides

	Luminescence de l'Eu			Luminescence de l'Eu	
	E	$\Delta\tau$ (msec)	$\log K_a$	E	$\log K_a$
EuN ₁	96%	0,01	3,1(5) ^a	28%	-
EuN ₂	59%	0,00	3,8(2) ^b	23%	3,9(2) ^b
EuN ₃	72%	0,04	4,2(1) ^b	27%	4,1(1) ^b

E représente l'extinction de luminescence de l'europlum ou de fluorescence en présence de 25 équivalents de paires de bases d'ADN. $\Delta\tau$ est la variation du temps de vie de l'europlum au cours du dosage. K_a est la constante d'interaction avec l'ADN mesurée dans un tampon HEPES (10 mM, 50 mM NaCl, pH 7^a selon la méthode de Scatchard^b selon le modèle décrit dans la section I.4.

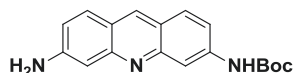
En conclusion sur les sondes de la famille du naphthalimide, l'insertion d'un espaceur glycine a permis d'obtenir des résultats interprétables selon le modèle couramment utilisé. L'extension du cycle, couplée à la présence d'un espaceur glycine dans la séquence peptidique a permis de démontrer le potentiel du complexe EuN₃ comme sonde de l'ADN, à travers la mesure du signal de luminescence de l'europlum. Les résultats obtenus par luminescence sont rassemblés dans le Tableau 4. 4.

La seconde famille de sondes développées contient un composé aromatique proflavine. La proflavine ayant une affinité plus forte que le naphthalimide pour l'ADN, l'affinité des sondes EuP_{1/2/3} devrait être plus forte pour l'ADN également.

III Interaction des dérivés proflavines avec l'ADN

Les sondes de la famille des naphthalimides ont permis de valider la stratégie employée pour développer des sondes capables de détecter l'ADN à travers la luminescence centrée sur le métal. L'étude de l'interaction avec l'ADN des sondes proflavines devraient permettre d'obtenir des sondes plus affines pour la double hélice.

III.1 La proflavine



Structure du composé proflavine 1

Pour permettre d'estimer l'influence de la structure peptidique sur la reconnaissance de l'ADN, les mesures d'interaction de l'ADN en présence du composé proflavine 1 ont d'abord été effectuées, en suivant les variations de fluorescence et d'absorbance mais également la température de fusion de l'ADN (Figure 4. 10).

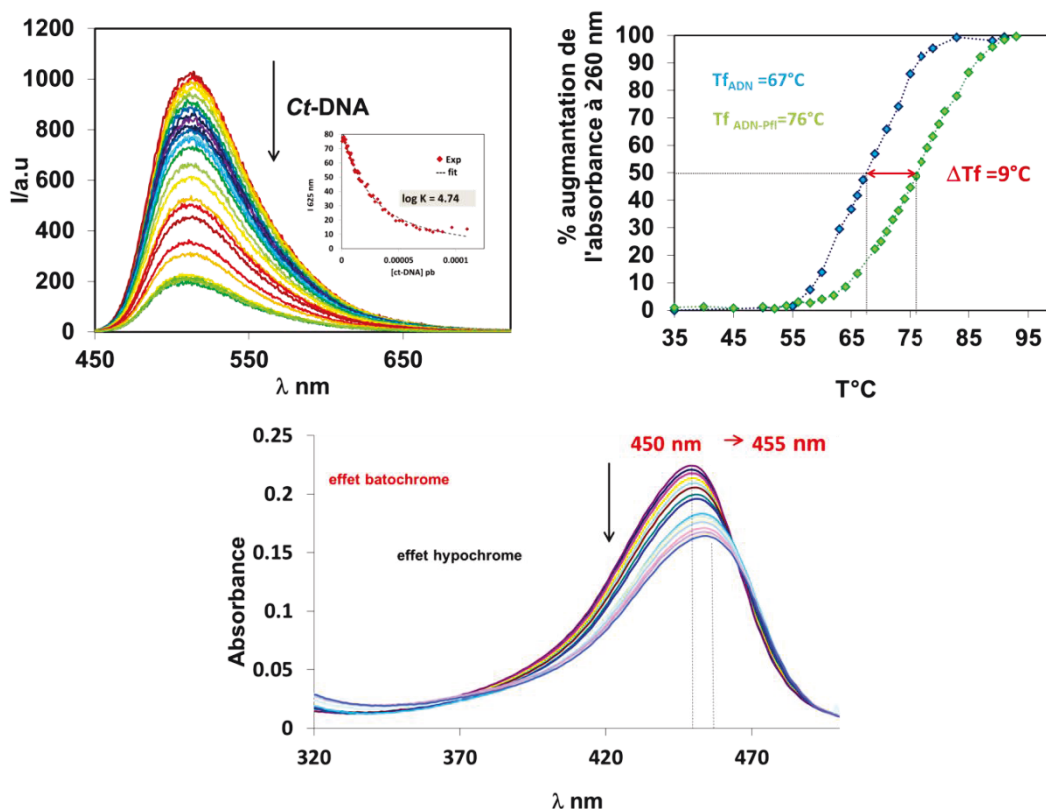


Figure 4. 10 : HAUT : Gauche Décroissance de la fluorescence du composé proflavine 1 (12,0 μ M) après excitation à 450 nm dans un milieu HEPES (10 mM, 50 mM NaCl, pH 7) en présence d'une quantité croissante d'ADN exprimée en paire de base. Encart : traitement avec le logiciel Specfit ; les carrés rouges représentent les données expérimentales, la ligne noire les données calculées pour $\log K_a = 4,7$. Droite : Mesure de la température de dénaturation de l'ADN en présence du composé proflavine 1 en quantité 1 pour 5 pb. BAS : Variation de l'absorbance du composé 1 (12,0 μ M) dans un milieu HEPES (10 mM, 50 mM NaCl, pH 7) en présence d'une quantité croissante d'ADN

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

Les résultats obtenus indiquent une plus forte interaction de la proflavine **1** avec l'ADN que le composé naphthalimide. En effet une stabilisation de 9 °C est observée, contre 2 °C seulement pour le composé naphthalimide. La proflavine interagit donc plus fortement avec la double hélice. Dans la littérature, la constante d'affinité de la proflavine pour l'ADN mesurée grâce à l'extinction de fluorescence est $K_a \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$.⁹⁷ L'obtention d'une constante proche pour le composé **1** dans nos expériences ($K_a = 5.10^4 \text{ M}^{-1}$) indique que la substitution d'une fonction amine de la proflavine nuit peu à l'intercalation du composé.

Tableau 4. 5 : *Récapitulation des données obtenues sur l'interaction du composé 1 avec le ct-DNA.*

	E	logK_a	hypochromisme	ΔTm
Proflavine 1	80%	4,7(1)	27%	9°C

E représente l'extinction de fluorescence en présence de 25 équivalents de paires de bases d'ADN. K_a est la constante d'interaction avec l'ADN mesurée dans un tampon HEPES (10 mM, 50 mM NaCl, pH 7 selon le modèle décrit dans la section I.4.

L'effet hypochrome mesuré (27%) ainsi que la température de fusion en augmentation de 9°C traduit le phénomène de stabilisation de la double hélice par intercalation de la proflavine.⁹²

L'augmentation de la température de fusion du ct-DNA en présence du composé **3** est légèrement inférieure à celle exposée dans la littérature par *T. Jenkins et al*, à savoir 12 °C pour la proflavine. Cette différence peut s'expliquer par la substitution d'une des fonctions amine de la proflavine dans le composé **1** qui engendre un encombrement stérique et peut ainsi diminuer la facilité d'insertion dans l'ADN. Néanmoins cet effet reste faible. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour les peptides **P** et les complexes Eu**P** devrait permettre de visualiser l'influence de la structure peptidique et du métal sur les capacités de reconnaissance de l'ADN des composés intercalants.

III.2 Sondes EuP₁ et EuP₂ :

Les études de la détection de l'ADN en présence des sondes de première génération Eu**P**₁ et Eu**P**₂ ont été réalisées. Un suivi de fluorescence, luminescence de l'euprotium, de variation d'absorbance en présence d'une quantité croissante d'ADN, ainsi que des mesures de

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

température de fusion de l'ADN en présence des complexes (1 complexe pour 5 paire de bases) ont permis de déterminer l'incidence de l'insertion des noyaux intercalant dans la séquence sur la reconnaissance de l'ADN.

III.2.1 Absorbance et température de dénaturation de l'ADN

Le complexe EuP_1 et le peptide P_1 induisent une stabilisation de la double hélice ($\Delta T_f = 7^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$) similaire. Il n'y a donc aucun effet sur l'interaction avec l'ADN provenant de la complexation du métal. Le peptide et le complexe interagissent de manière similaire avec l'ADN. (Figure 4. 11) La température de dénaturation obtenue est proche de celle obtenue pour le composé proflavine **1** ($\Delta T_f = 9^\circ\text{C}$). Leur mode d'interaction avec l'ADN est donc similaire à celui du noyau aromatique isolé. L'effet bathochrome (+5 nm) combiné à l'effet hypochrome de l'ADN (-26%) en présence du complexe EuP_1 , analogue à l'effet hypochrome en présence de proflavine **1** (-27%), renforce l'idée d'une reconnaissance de l'ADN par intercalation du complexe EuP_1 .

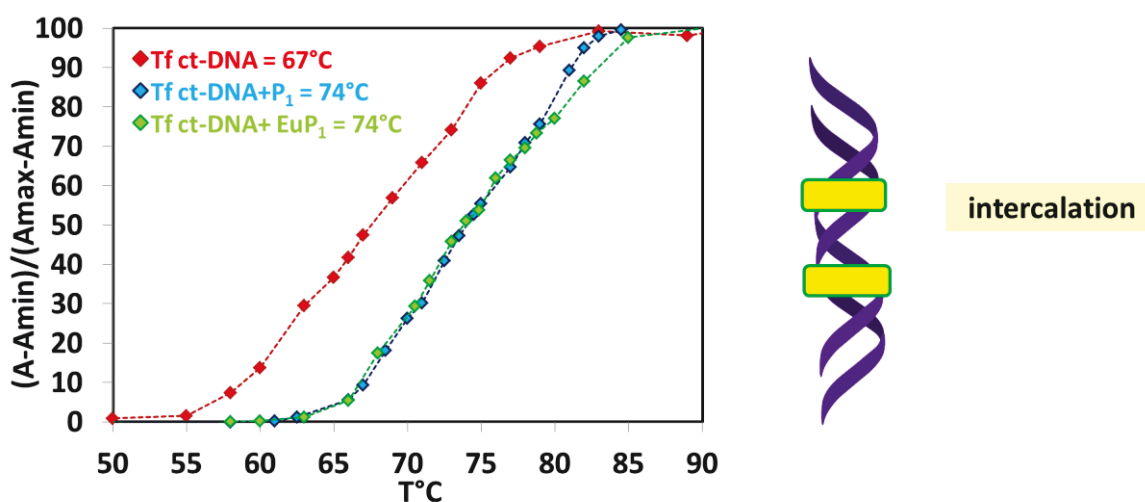


Figure 4. 11 : Températures de dénaturation de l'ADN en présence du peptide P_1 et du complexe EuP_1

L'espaceur glycine a été introduit initialement pour diminuer l'encombrement stérique présent dans le complexe EuP_1 . Cependant son insertion dans la séquence peptidique n'a pas d'effet déterminant sur la stabilisation de la double hélice ($\Delta T_f = 8^\circ\text{C}$). Les mesures de température de

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

dénaturation de l'ADN obtenues en présence des sondes EuP₁ et EuP₂ sont similaires à 1 degré près. L'incertitude de mesure provenant de l'appareil ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) ne permet pas de dire si cette augmentation traduit un réel gain de stabilisation dû à l'espaceur glycine. (Tableau 4. 6)

Tableau 4. 6 : Mesures effectuées par spectrométrie UV-Visible

	$\Delta T_f (\pm 0,5^\circ\text{C})$	hypochromisme	bathochromisme	$\log K_a$
P f l 1	9°C	27%	5 nm	4,7(1)
P₁	7°C	-	-	-
EuP₁	7°C	26%	5 nm	4,4(3)
P₂	8°C	-	-	-
EuP₂	8°C	45%	8 nm	4,7(2)

K_a est la constante d'interaction avec l'ADN mesurée dans un tampon HEPES (10 mM 50 mM NaCl, pH 7)

La mesure des effets hypochrome et bathochrome reflète l'interaction des orbitales π de l'intercalant avec les orbitales π des bases azotées. Plus ceux-ci sont importants, plus grande est l'interaction. Les effets hypochrome (-45%) et bathochrome (+8nm) du complexe EuP₂ en présence d'ADN sont plus élevés que ceux mesurés avec EuP₁, ce qui indique une interaction plus importante entre les orbitales π de la proflavine du complexe EuP₂ et celles des bases de l'ADN. L'espaceur permet donc une insertion plus en profondeur de la proflavine du complexe EuP₂ au cœur de la double hélice en diminuant les contraintes stérique autour de l'aromatique.

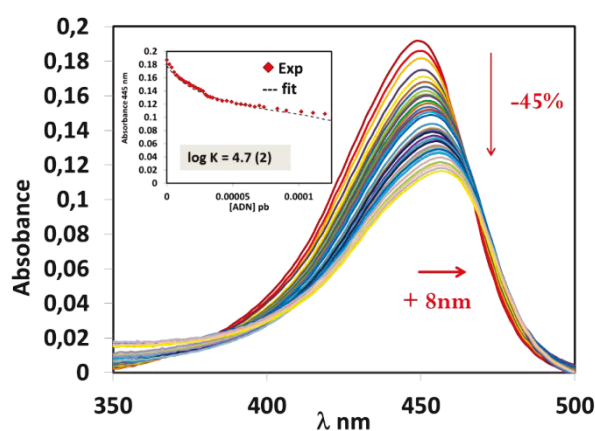


Figure 4. 12 : Mesures de l'effet hypochrome et bathochrome de la proflavine du complexe EuP₂ (5μM) en présence d'une quantité croissante d'ADN (0-150 μM) dans un tampon HEPES (10 mM, 50 mM NaCl, pH 7)

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

Les constantes d'association des sondes EuP_1 et EuP_2 avec le ct-DNA ont été évaluées à partir des variations d'absorbance à 450 nm. L'association avec EuP_2 avec est légèrement plus élevée avec $\log K_a = 4,7(2)$ contre $4,4(3)$ pour EuP_1 . Il semble donc que l'espaceur facilite l'interaction avec l'ADN.

III.2.2 Luminescence

Pour la sonde proflavine de première génération, une différence d'extinction de fluorescence en présence d'ADN entre le peptide libre P_1 et le complexe EuP_1 et la proflavine a été mesurée. En effet, une extinction de fluorescence $E = 66\%$ pour P_1 et une extinction $E = 45\%$ pour le complexe EuP_1 traduit l'impact de la complexation du métal sur les capacités de reconnaissance de l'ADN de l'extrémité proflavine (*Erreur ! Source du renvoi introuvable.*). près la complexation de l'euporium, la sonde EuP_1 est moins flexible, donc moins libre d'interagir avec l'ADN de manière similaire au composé Pfl libre.

Tableau 4. 7 : Résultats obtenus en présence de 25 équivalents en paires de bases d'ADN pour les complexes EuP_1 et EuP_2

	Luminescence de l'Eu			Fluorescence	
	E	$\Delta\tau$ (msec)	$\log K_a$	E	$\log K_a$
Pfl 1	-	-	-	75%	4,7(2)
P_1	-	-	-	66%	-
EuP_1	75%	0,04	4,4(3)	45%	4,7(1)
P_2	-	-	-	65%	-
EuP_2	88%	0,03	4,7(1)	66%	4,7(3)

E représente l'extinction de luminescence de l'euporium ou de fluorescence en présence de 25 équivalents de paires de bases d'ADN. $\Delta\tau$ est la variation en msec du temps de vie de l'euporium à 615 nm. K_a est la constante d'interaction avec l'ADN mesurée dans un tampon HEPES (10 mM 50 mM NaCl, pH 7)

Pour le complexe EuP_1 , la constante d'affinité pour le ct-DNA a pu être calculée par trois types d'expériences indépendantes : $\log K_a = 4,4(3)$ par UV (Figure 4. 13), $= 4,7(1)$ par fluorescence et $= 4,4(3)$ par luminescence de l'euporium (Figure 4. 14). Ces valeurs sont cohérentes et démontre une interaction d'affinité proche de celle de l'aromatique proflavine

seul. La légère augmentation du temps de vie des états excités de l'euporium assurent la conservation de l'intégrité du complexe au cours de la titration. Malgré une extinction de fluorescence plus faible pour le complexe EuP_1 que pour la proflavine, provenant certainement d'une interaction moins en profondeur dans l'ADN, le complexe EuP_1 est capable de détecter l'ADN à travers la luminescence centrée sur le métal de manière aussi efficace que le noyau proflavine libre.

La sonde EuP_1 combine donc les propriétés d'interaction de la proflavine avec l'ADN et les avantages de la luminescence en temps résolu du cation euporium.¹²⁰

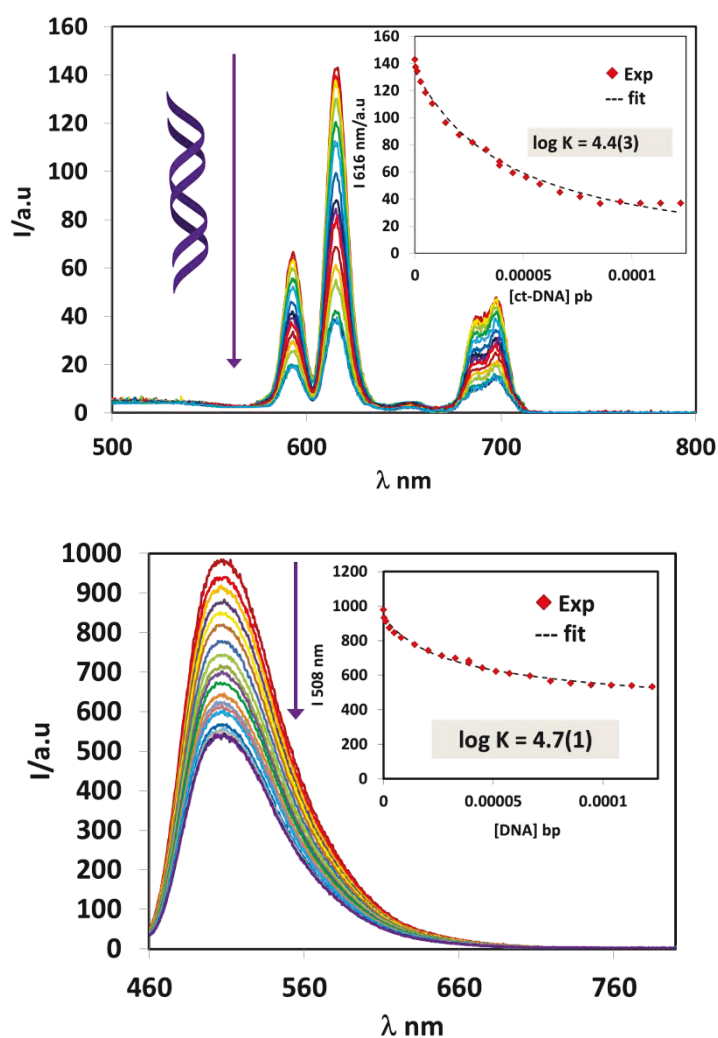


Figure 4. 14 : haut : Luminescence en temps résolu de l'euporium de EuP_1 ($3,6 \mu\text{M}$) durant la titration par le ct-DNA ($0-250 \mu\text{M}$). Encart: variation des intensités maximum de l'euporium. Bas : Fluorescence de la proflavine dans le complexe EuP_1 en présence d'une quantité croissante d'ADN ($0-250 \mu\text{M}$) Encart: Variation de l'intensité maximale de fluorescence de la proflavine.

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

L'analyse des résultats d'interaction du complexe EuP_2 avec le *ct*-DNA révèle une décroissance plus importante du signal de fluorescence ($E = 66\%$) par rapport au complexe de première génération EuP_1 . Cette diminution est du même ordre de grandeur que celle obtenue précédemment pour le composé proflavine seul. L'introduction de l'espaceur glycine permet donc d'observer un effet plus important sur la fluorescence de l'aromatique lors de la présence d'ADN. Cette extinction de fluorescence plus forte est en miroir de celle obtenue par luminescence de l'euprium des complexes. En effet, une décroissance de 88% du signal de l'euprium du complexe EuP_2 est enregistrée (Figure 4. 15). Le temps de vie de l'euprium constant au cours de la mesure prouve que cette diminution est conséquente à l'interaction de l'intercalant proflavine avec l'ADN et non d'une décomplexation du métal. La constante d'affinité calculée pour le complexe EuP_2 ($\log K = 4,7(3)$) est légèrement plus élevée que celle obtenue pour le complexe sans l'espaceur glycine ($\log K = 4,4(3)$).

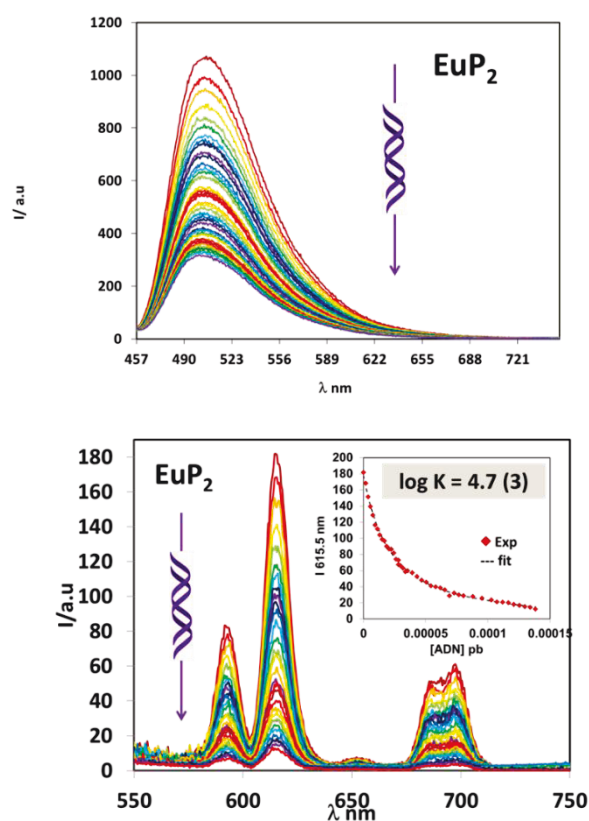


Figure 4. 15 : Haut : Fluorescence de la proflavine dans le complexe EuP_2 (4,5 μM) en présence d'une quantité croissante d'ADN (0-250 μM) Bas : Luminescence en temps résolu de l'euprium durant la titration de EuP_2 (4,9 μM) par le *ct*-DNA (0-150 μM) dans le tampon HEPES (10mM, 50 mM NaCl, pH 7). Encart: variation des intensités maximum de l'euprium. Les carrés rouges représentent les données expérimentales et la ligne noire haché les données calculées avec $\log K = 4.7(3)$

La concordance des résultats obtenus nous permet d'affirmer que les sondes EuP_1 et EuP_2 interagissent avec l'ADN au travers d'un phénomène d'intercalation.

L'espaceur glycine induit une augmentation de l'effet ressenti par la luminescence du métal et permet une meilleure interaction avec l'ADN, par une insertion entre les paires de bases plus en profondeur. La diminution de l'encombrement stérique autour du composé Pfl intercalant permet ainsi au complexe EuP_2 d'interagir aussi fortement avec l'ADN que le composé proflavine **1** seul.

III.3 Sonde EuP_3

III.3.1 Absorbance et température de fusion

L'introduction d'un acide aminé de plus haute denticité Ed3a_2 a été effectuée pour déshydrater la sphère de coordination de l'euprium, augmenter la luminescence de l'euprium en minimisant la contribution des désactivations non radiatives et ainsi augmenter son potentiel de détection de l'ADN. L'augmentation du signal de luminescence de l'euprium du complexe EuP_3 et son nombre d'hydratation $q=1$ devrait permettre une meilleure détection de l'ADN. Or, la chute de la stabilisation de la double hélice de l'ADN en présence de EuP_3 ($\Delta T_f = 1,5^\circ\text{C}$) par rapport à EuP_2 ($\Delta T_f = 8^\circ\text{C}$) indique une interaction plus faible avec les bases de l'ADN. De plus l'effet hypochrome moins élevé (-35%) confirme une interaction minimisée entre les orbitales π des bases de l'ADN et l'extrémité proflavine du complexe (Figure 4. 16).

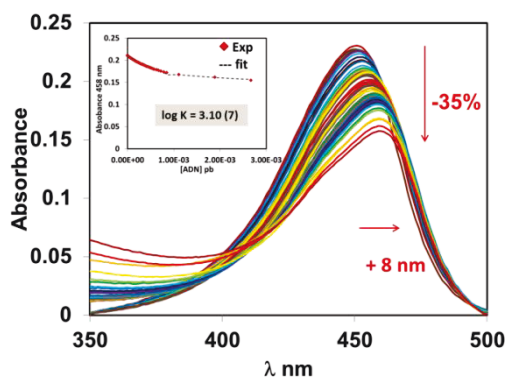


Figure 4. 16 : Mesures de l'effet hypochrome et bathochrome de la proflavine du complexe EuP_3 ($5 \mu\text{M}$) en présence d'une quantité croissante d'ADN ($0-300 \mu\text{M}$) dans un tampon HEPES (10 mM , 50 mM NaCl , $\text{pH } 7$)

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

Le calcul de la constante d'affinité par effet hypochrome à 450 nm sanctionne également l'introduction de l'acide aminé **Ed3a₂** : l'affinité chute d'un facteur 20 comparé au complexe **EuP₂**. Le *Erreur ! Source du renvoi introuvable.* récapitule les données obtenues.

Tableau 4. 8 : *Récapitulatifs de données obtenues pour les sondes Proflavine par spectroscopie UV-visible*

	$\Delta T_f (\pm 0,5^\circ\text{C})$	Effet hypochrome	Effet bathochrome	$\log K_a$
EuP₁	7°C	26%	5 nm	4,4(3)
EuP₂	8°C	43%	8 nm	4,7(2)
EuP₃	1,5°C	35%	9 nm	3,1(2)

III.3.2 Luminescence

La constante d'affinité du complexe **EuP₃** pour le ct-DNA, mesurée par la luminescence du cation europium démontre également une valeur nettement plus basse que les deux précédentes sondes **EuP₁** et **EuP₂** (Tableau 4. 9). L'augmentation du temps de vie des états excités de l'euporium (+ 0,11 msec) au cours de la titration du complexe **EuP₃** par l'ADN indique que l'euporium ne se décomplexe pas. Cette augmentation peut traduire une déshydratation totale de la sphère de coordination du complexe avec par exemple le remplacement de la molécule d'eau par un groupement phosphate de l'ADN. Aux vues de sa faible affinité pour l'ADN (Figure 4. 17), la sensibilité de la luminescence de l'euporium de la sonde **EuP₃** n'est donc pas optimale pour détecter l'ADN. La chute de l'affinité pour le ct-DNA de la sonde **EuP₃** peut être expliquée par la répulsion électrostatique entre le complexe **EuP₃**, chargé négativement, et les groupements phosphate de l'ADN. De plus, la proximité spatiale entre l'acide aminé pentadentate et le noyau intercalant peut induire une gêne stérique et entraver l'insertion de la proflavine dans la double hélice de l'ADN.

Néanmoins, malgré cette chute d'affinité, la détection de l'ADN par la sonde **EuP₃** est toujours assurée par une variation significative du signal de luminescence du cation europium. Des tentatives de détection de l'ADN par luminescence infra rouge en présence du complexe **NdP₃** ont été effectuées mais après la première addition d'ADN, une extinction totale du signal de luminescence du Nd^{3+} est observée.

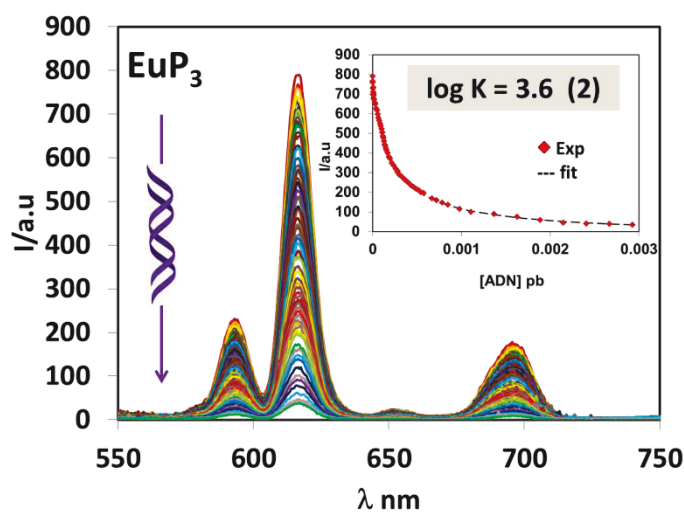


Figure 4. 17 : Décroissance de la luminescence en temps résolu de l'euporium dans le complexe EuP_3 ($5 \mu\text{M}$), après excitation à 450 nm , en présence de ct-DNA ($0\text{-}400 \mu\text{M}$) à 298 K . Les encarts représentent les variations à 615 nm de l'euporium; les carré rouges sont les données expérimentales et la ligne noire hachées sont les données calculées.

Les résultats obtenus par luminescence de l'euporium des sondes proflavines sont récapitulés dans le *tableau 4.9*

Tableau 4. 9 : Résultats des expériences menées sur la détection de l'ADN par luminescence des sondes proflavine

	E	$\Delta\tau$ (msec)	$\log K_a$
EuP ₁	75%	0.04	4,4(3)
EuP ₂	88%	0.03	4,7(1)
EuP ₃	45%	0.11	3,6(2)

En conclusion, la luminescence de l'euporium dans les sondes proflavines est très sensible aux différences d'interaction avec l'ADN observées par absorbance et mesure de température de fusion de l'ADN. L'insertion de l'espaceur glycine a permis d'augmenter la sensibilité des sondes à la présence d'ADN et ainsi d'optimiser la détection de l'ADN à travers la luminescence de l'euporium en amplifiant le phénomène d'extinction. La détection de l'ADN avec la sonde EuP_3 reste elle à optimiser.

Les sondes nouvellement développées au cours de cette étude répondent donc bien à la problématique de départ visant à coupler l'intercalation au phénomène de sensibilisation afin de détecter l'interaction sonde-ADN par la luminescence résolue en temps du cation lanthanide.

IV Sélectivité

Nous venons de démontrer que les complexes peptidiques de lanthanide comportant une unité de reconnaissance de l'ADN étaient capables de détecter la présence d'ADN grâce à la luminescence centrée sur le métal. Les sondes de la famille de la proflavine EuP₁ et EuP₂ donnent par ailleurs les résultats les plus encourageants. L'unité proflavine a été choisie pour ses capacités d'interaction par intercalation avec l'ADN. Un atout supplémentaire de la proflavine est sa sélectivité pour la composition en paires de bases de l'ADN, sélectivité déjà discutée dans le *chapitre II*. En effet, selon la composition en paires de bases de l'ADN, le mode d'interaction de la proflavine varie (intercalant-sillon) et la décroissance de la fluorescence de la proflavine est différente : elle est d'autant plus grande que la composition en enchaînement de paires de bases GC est grande. On parle alors de sélectivité de reconnaissance, qui représente en fait une sélectivité structurale de reconnaissance. L'ADN riche en paire de bases GC sera de type Z-DNA, alors qu'un ADN riche en paires de bases AT aura une conformation intermédiaire entre le B et le A-DNA.

La question est donc : est-ce que les sondes EuP₁ et EuP₂ sont sélectives d'une séquence d'ADN ? Et si oui, la luminescence de l'Eu³⁺ est-elle capable de mettre en évidence cette sélectivité ?

La taille des complexes est plus importante que celle de la proflavine seule, ce qui pourrait entraîner une perte de sélectivité. La sélectivité des complexes EuP₁ et EuP₂ a donc été étudiée par luminescence en utilisant des brins d'ADN de compositions différentes. La sonde EuP₃ n'a pas été testée, aux vues de son affinité nettement plus faible pour l'ADN.

IV.1 Choix de l'ADN

Les ADN choisis pour cette étude sont synthétiques et donc de compositions connues. En effet, on ne peut pas utiliser un ADN extrait de cellule vivante car il serait nécessaire

d'effectuer un séquençage au préalable. Afin de maximiser l'effet de variation de la luminescence, les complexes doivent s'intercaler entre des paires de bases identiques. L'enchaînement des bases sur un brin doit donc être contrôlé. De ce fait, notre choix s'est porté sur des brins d'ADN composés d'une alternance de bases purine-pyrimidine :

✿ soit G-C-G-C, ce qui correspond à un ADN de type poly(dG-dC)₂

✿ soit A-T-A-T ce qui correspond à un ADN de type poly(dA-dT)₂

✿

Ces doubles brins d'ADN commerciaux ont une taille estimée entre 500 et 1000 paires de bases.

IV.2 Sélectivité et complexe EuP₁

La reconnaissance de l'ADN poly(dA-dT)₂ et poly(dC-dG)₂ par le complexe EuP₁ a été analysée grâce aux variations de fluorescence de la sonde et de luminescence de l'euporium.

Les mesures de variations de fluorescence de la proflavine présente dans le complexe EuP₁ nous apprennent que son insertion dans une séquence peptidique ne perturbe pas ses capacités de sélectivité de reconnaissance. En effet, la différence d'extinction de fluorescence en présence d'ADN poly(dG-dC)₂ (E=51%) et en présence d'ADN poly(dA-dT)₂ (E = 29%) traduit une différence d'interaction selon la composition en paire de bases. L'analyse de ces données nous indiquent que la sonde EuP₁ est capable, au même titre que la proflavine de détecter par fluorescence (*Figure 4. 18*), les différences de composition en bases de l'ADN. Le complexe EuP₁ interagit donc préférentiellement avec un ADN de composition riche en paires de bases GC.

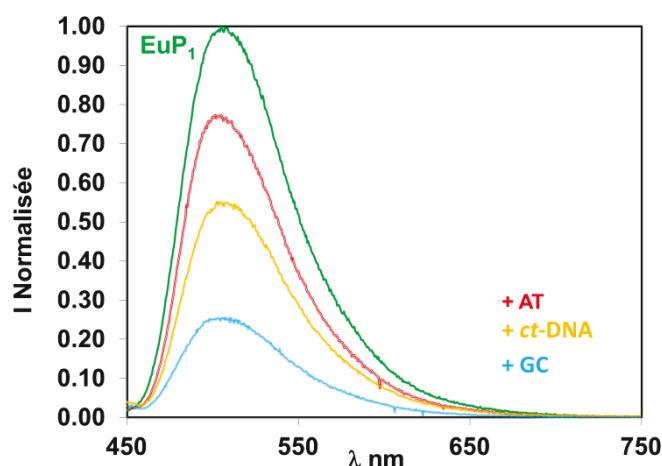


Figure 4. 18 : Fluorescence de la sonde EuP_1 ($5 \mu\text{M}$) après excitation à 450 nm en présence de $100 \mu\text{M}$ en paires de bases d'ADN *ct-DNA*, $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$ et $\text{poly}(\text{dC-dG})_2$.

Un effet similaire est détecté sur la luminescence de l'euprium. Une extinction plus forte de luminescence $E = 85\%$ du complexe EuP_1 est observée en présence d'ADN $\text{poly}(\text{dG-dC})_2$, contre un extinction de 65% en présence d'ADN $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$. Cette différence d'extinction du signal permet de discriminer les deux types d'ADN utilisés (Figure 4. 19). Les constantes d'affinité déduites de ces données sont très proches, dans la barre d'erreur de la mesure. Ceci est cohérent avec les affinités mesurées par *T.Jenkins*⁹² qui montrent un rapport de constantes d'affinité d'un facteur deux entre l'ADN $\text{poly}(\text{dG-dC})_2$ et l'ADN $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$.

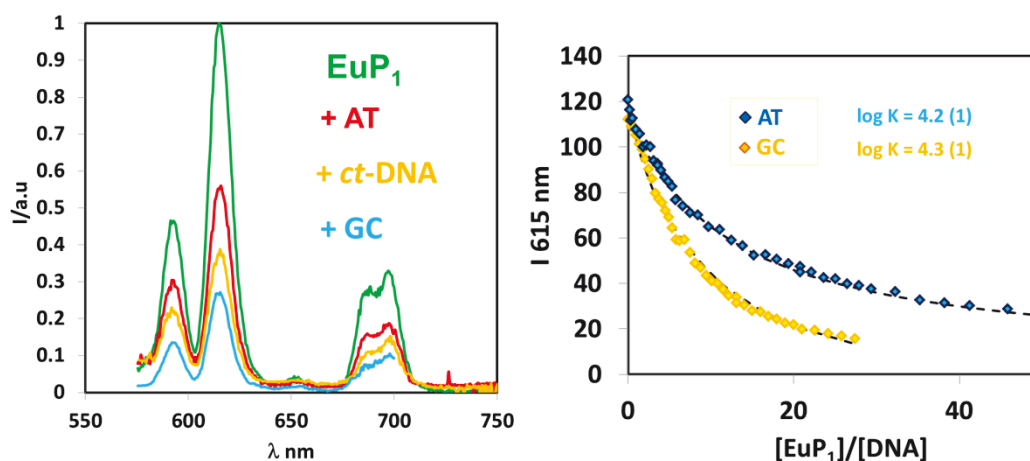


Figure 4. 19 : Luminescence en temps résolu de EuP_1 ($5 \mu\text{M}$) après excitation à 450 nm en présence de $100 \mu\text{M}$ en paires de bases d'ADN type *ct-DNA*, $\text{poly}(\text{dA-dT})_2$ et $\text{poly}(\text{dC-dG})_2$. Les deux encarts représentent les variations maximales d'intensités de l'euprium à 616.5 nm en présence d'une quantité de paires de bases croissantes *AT*, *GC* et de *ct-DNA*. La ligne hachée noire représente les données calculée avec $\log K_{AT} = 4,2(1)$ et $\log K_{GC} = 4,3(1)$.

En conclusion, la sonde EuP₁ est capable de différencier des séquences d'ADN riche en paires GC ou AT à travers la luminescence centrée sur le métal. En effet les intensités de fluorescence/luminescence du complexe EuP₁ sont très dépendantes de la séquence de l'ADN. La différence d'affinité observée reste néanmoins dans la barre d'erreur de notre détermination, à savoir $\Delta \log K_a \approx 0,3$.

Influence de l'espaceur glycine sur la sélectivité

Il a été vu précédemment que l'incorporation d'une glycine entre l'unité proflavine et le peptide dans la séquence de EuP₂ permettait une interaction plus en profondeur dans l'ADN. Des études de sélectivité de reconnaissance de l'ADN poly(dA-dT)₂ et poly(dG-dC)₂ ont donc été effectuées pour mettre en évidence l'influence d'une glycine supplémentaire dans la séquence peptidique sur les propriétés de reconnaissance de l'ADN.

Les différences d'extinction de fluorescence selon la composition de l'ADN ($E_{GC} = 59\%$ $E_{AT} = 29\%$) mesurées sont similaires avec les résultats obtenus précédemment pour la sonde EuP₁. L'introduction de l'espaceur dans la séquence n'induit donc pas de perte de sélectivité de reconnaissance. La mesure des variations de la luminescence centrée sur le métal du complexe EuP₂ permet également de discriminer la composition en bases de l'ADN. Une extinction de luminescence plus forte est mesurée en présence de l'ADN synthétique riche en paires de bases GC ($E_{GC} = 93\%$; $E_{AT} = 80\%$). (Figure 4. 20)

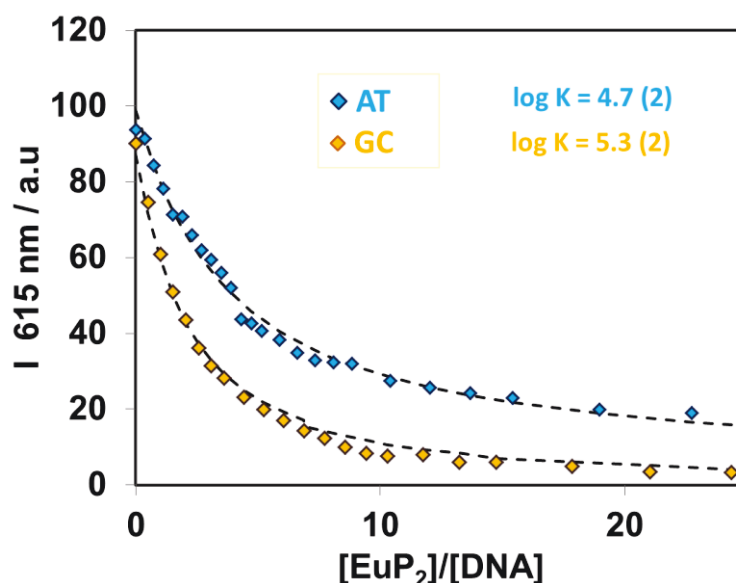


Figure 4. 20 : Variation de luminescence de l'euporium du complexe EuP_2 après excitation à 450 nm en présence d'une quantité croissante d'ADN poly(dA-dT)_2 et poly(dG-dC)_2 exprimée en paires de bases. Les lignes en pointillées représentent les données calculées avec $\log K_a^{\text{GC}} = 5,3(2)$ et $\log K_a^{\text{AT}} = 4,7(2)$

Tableau 4. 10 : Constantes d'affinité K_a calculées à l'aide du logiciel Specfit par variation de luminescence de l'euporium des complexes

log K_a	Poly(dA-dT) ₂	Ct-DNA	Poly(dG-dC) ₂
EuP ₁	4,2(3)	4,4(3)	4,3(1)
EuP ₂	4,7(2)	4,7(1)	5,3(2)

L'extinction du signal de luminescence de l'euporium plus importante pour la sonde EuP_2 que pour la sonde EuP_1 , ainsi que la valeur des constantes d'affinités mesurées (Tableau 4. 10). L'augmentation de l'affinité de la sonde EuP_2 pour tous les ADN utilisés met en avant l'effet positif de l'incorporation d'un espaceur glycine entre l'intercalant et la séquence peptidique. La diminution de la rigidité du complexe permet probablement une meilleure interaction avec la double hélice, en particulier avec l'ADN riche en paires de bases GC avec une augmentation d'affinité d'un facteur 10 entre la sonde EuP_1 et EuP_2 . La sonde EuP_2 permet donc, grâce à la luminescence centrée sur l' Eu^{3+} , de discriminer les séquences d'intérêt d'une manière plus efficace que la proflavine libre.

L'espaceur glycine permet donc d'améliorer la détection de l'ADN à travers une amplification de l'extinction de la luminescence centrée sur le métal et d'augmenter la sélectivité de reconnaissance du composé EuP₂ pour les paires de bases GC.

Pour visualiser l'effet de l'incorporation de l'espaceur glycine sur la sélectivité, les données obtenues par luminescence centrée sur l'euporium des complexes EuP₁ et EuP₂ ont été comparées (*Erreur ! Source du renvoi introuvable.*). Pour ce faire, nous avons défini le paramètre de sélectivité **Sel** selon l'équation suivante :

$$\mathbf{Sel} = \frac{I_{Ref} - I_X}{I_{Ref}}$$

où I_{Ref} représente l'intensité de luminescence du complexe en présence de 15 équivalents de *ct*-DNA et I_X représente cette même intensité en présence d'ADN de séquence X (X = GC ou AT).

Le paramètre de sélectivité **Sel** est donc calculé en prenant comme référence le *ct*-DNA et représente les variations d'intensité de luminescence par rapport à ce dernier. Une reconnaissance plus forte que pour le *ct*-DNA se traduit par une valeur positive du paramètre **Sel**. À l'inverse, une valeur négative de **Sel** traduit une interaction moins importante qu'avec le *ct*-DNA. **Ce paramètre traduit donc la détection spécifique de séquences d'ADN enrichie en paires de bases AT ou GC par rapport à une séquence d'ADN de composition aléatoire.**

La *Figure 4. 21* représente les résultats obtenus suivant le calcul de la sélectivité exposé pour les complexes EuP₁ et EuP₂.

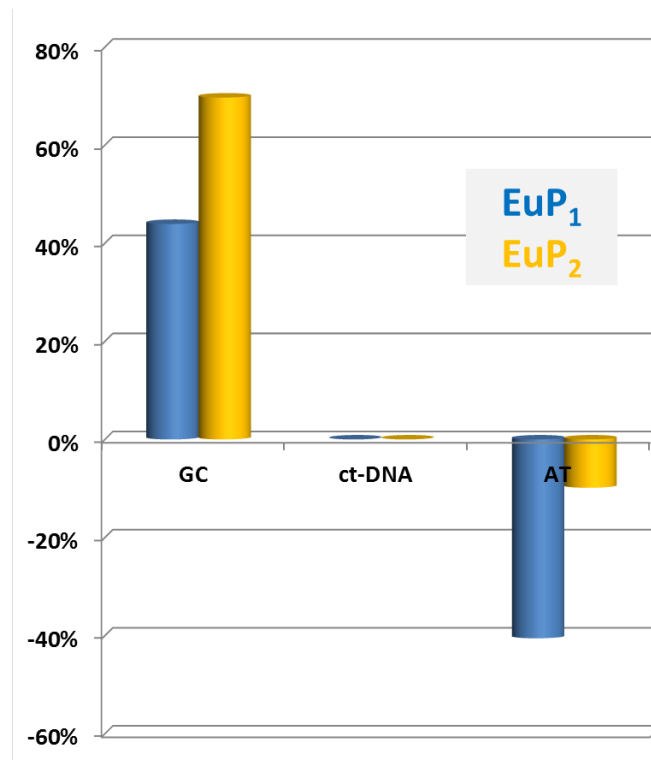


Figure 4. 21 : Sélectivité des sondes EuP₁ et EuP₂ pour l'ADN de composition différentes. AT pour poly(dA-dT)₂ et GC pour poly(dG-dC)₂.

On remarque en premier lieu que les deux sondes sont plus sensibles aux paires de bases GC, avec des paramètres de sélectivité positifs. Ceux-ci sont négatifs pour les deux sondes en présence de paires de base AT. Cette observation est en cohérence avec les extinctions de luminescence mesurées, plus forte en présence d'ADN GC que d'ADN AT.

Dans un second temps, on remarque que l'incorporation de l'espaceur glycine dans la sonde EuP₂ augmente la valeur du paramètre **Sel** de 30%. La sonde EuP₂ détecte donc plus fortement les séquences GC que la sonde EuP₁. Au contraire, l'introduction de la glycine dans la séquence EuP₂ diminue l'effet détecté pour les paires de bases AT par rapport au ct-DNA. En effet, le paramètre **Sel** se rapproche de 0. La structure de l'ADN riche en paires de bases AT est une structure double brin de polymorphisme hybride B-A. L'augmentation de la flexibilité du complexe, consécutive à l'insertion de l'espaceur glycine, augmente donc le potentiel d'interaction avec ce type de structure hybride, en facilitant l'insertion de l'intercalant entre les plans des paires de bases. La diminution de la gêne stérique permet donc d'interagir plus facilement avec l'ADN riche en paire de bases AT. L'analyse de ces données indique que la sonde EuP₂ est une sonde capable de détecter préférentiellement l'enchaînement de paires de bases GC, par rapport à un enchaînement aléatoire ou AT.

La sonde EuP₂ permet donc, grâce à la luminescence centrée sur l'Eu³⁺, de discriminer des séquences d'intérêt d'une manière plus efficace que la proflavine libre.

En conclusion, les sondes proflavines EuP₁ et EuP₂ sont capables de reconnaître l'ADN avec une affinité similaire à celle du noyau proflavine libre. La sensibilité de la luminescence du métal europium permet de détecter des différences d'interaction avec l'ADN en fonction de sa composition en paires de bases. L'espaceur glycine a permis de développer une sonde capable d'interagir 4 fois mieux avec un enchaînement de paires de base GC structurées en double hélice qu'avec un ADN de composition aléatoire et donc deux fois plus sélective que le composé proflavine lui-même. **Cette dernière sonde met en avant le potentiel des composés peptidiques complexant les lanthanides développés dans cette thèse comme outil de reconnaissance de l'ADN.**

V Conclusion

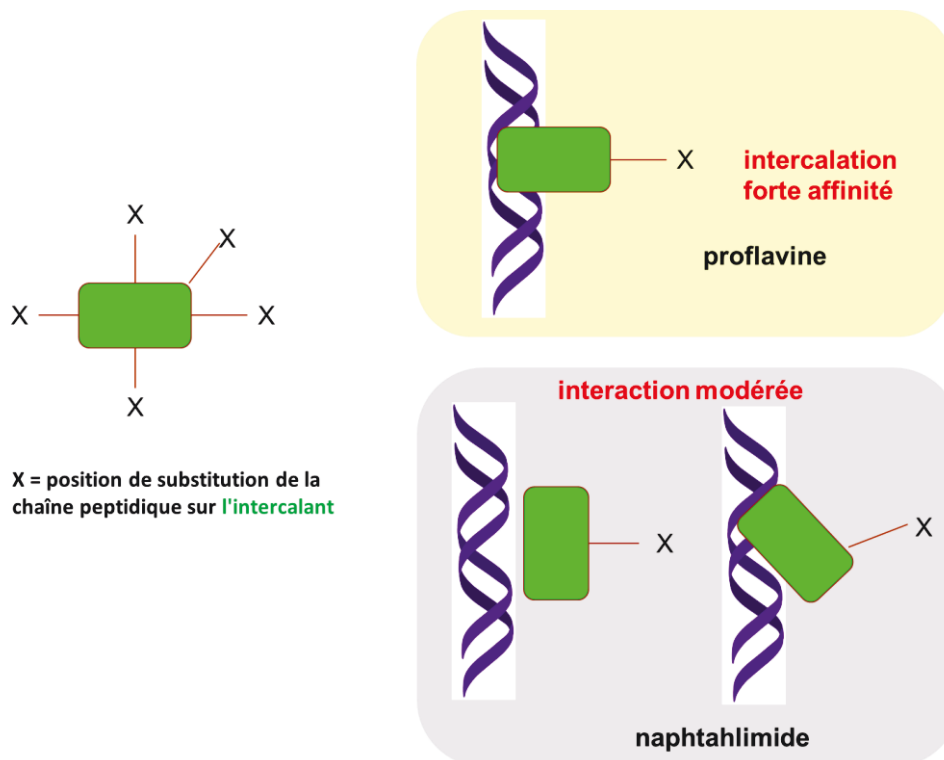
Lors de la détection de l'ADN, une extinction de fluorescence est systématiquement observée, entraînant pour chacune des sondes Eu³⁺ une extinction du signal de luminescence de l'euporium. Les complexes peptidiques coordonnant l'euporium développés dans ce travail, qui contiennent une unité intercalante, sont donc capables de transférer l'information de liaison à l'ADN centrée sur l'aromatique vers le cation métallique.

Concernant les sondes naphthalimides, les optimisations effectuées (introduction d'un espaceur, cycle étendu) ont permis une progression significative de leur potentiel de détection de l'ADN. En effet, l'affinité de la sonde EuN₂ pour le ct-DNA augmente d'un facteur 5 par rapport à la sonde EuN₁ et un facteur 10 est observé pour la sonde EuN₃. De plus, l'insertion d'un cycle naphthalimide plus étendu dans la sonde EuN₃ a permis de caractériser un mode d'interaction avec l'ADN par intercalation, grâce aux mesures de température de fusion de l'ADN. La différence d'affinité observée avec le composé TNaph référencé dans la littérature indique un effet de l'encombrement stérique généré par la substitution sur l'atome d'azote du noyau naphthalimide. L'encombrement stérique provenant de la structure peptidique perturbe donc l'interaction avec l'ADN.

Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

Les sondes de la famille de la proflavine EuP ont démontré leur potentiel de détection de la double hélice par intercalation. Les constantes d'affinité mesurées sont similaires à celle obtenue pour l'intercalant libre ($10^{4,7}$ M) sauf pour EuP₃ qui est plus encombré et chargé négativement. De plus, la sonde EuP₂ permet de détecter une sélectivité de reconnaissance de l'ADN, en fonction de la nature de bases qui le compose, grâce à la luminescence de l'euporium.

La comparaison avec les unités intercalantes seules montrent que la substitution de ces dernières a un effet sur l'interaction avec l'ADN. En particulier, une diminution importante d'affinité pour l'ADN est observée pour la sonde EuN₃ par rapport au composé thiazolonaphthalimide. L'effet est nettement moins marqué pour les dérivés de la proflavine. Une explication pourrait provenir de la position de substitution du composé intercalant. En effet, la proflavine est substituée sur une amine latérale. Le plan de l'aromatique est donc libre de s'insérer dans l'ADN. Les composés naphthalimides sont liés aux peptides par une extrémité interagissant avec l'ADN à travers la formation de liaisons hydrogène. De ce fait, l'orientation du cycle dans le complexe n'est pas optimale pour assurer une interaction aussi forte que celle des composés EuP. Le schéma ci-dessous traduit ce phénomène.



Chapitre IV INTERACTION AVEC L'ADN

La comparaison des deux familles de sondes met donc en avant l'importance de la position de la substitution de l'intercalant-sensibilisateur. Une position de substitution adéquate permet donc une détection optimale de l'ADN à travers la luminescence centrée sur le métal des complexes peptidiques de lanthanide.

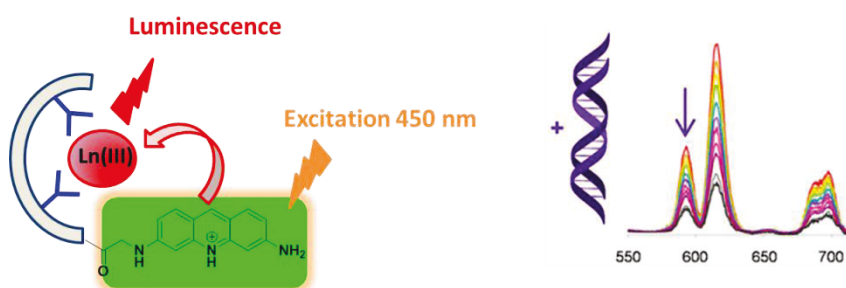
Chapitre V

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Le but de ce travail de thèse était de concevoir des sondes peptidiques dérivées du squelette du peptide synthétique P^{22} , d'affinité picomolaire pour les ions lanthanides, capables de reconnaître l'ADN. La stratégie employée repose sur la substitution de l'acide aminé naturel tryptophane par une unité aromatique en position N-terminale du peptide, qui doit à la fois sensibiliser l'euprium et jouer le rôle d'intercalant de l'ADN. Lors de l'interaction avec l'ADN, une variation du signal de luminescence est attendue. Deux noyaux aromatiques ont été choisis dans ce travail : la proflavine, connue pour s'intercaler dans la double hélice de l'ADN et le naphthalimide connu pour sensibiliser le cation euprium.

L'évaluation des propriétés de la première génération de sondes a permis de montrer la formation de complexes monométalliques tri-hydratés bien définis. De plus, un transfert d'énergie efficace permettant de détecter le signal de l'euprium à des concentrations de l'ordre du nanomolaire a été mis en évidence avec les deux unités aromatiques envisagées. L'interaction de ces deux premières sondes avec l'ADN a été étudiée grâce à différentes techniques : absorbance, température de dénaturation de l'ADN, fluorescence et luminescence centrée sur l'euprium. Lors de l'interaction avec l'ADN, une extinction de fluorescence du composé aromatique est systématiquement observée, entraînant pour chacune des sondes métallées une extinction du signal de luminescence de l'euprium. Les complexes d'euprium de première génération sont donc capables de transférer l'information de liaison à l'ADN centrée sur l'aromatique vers le cation métallique. En effet, leur interaction avec l'ADN induit une variation importante du signal de luminescence de l'euprium, validant ainsi la stratégie employée. Ces premiers composés ont donc un potentiel pour détecter l'ADN grâce à la luminescence centrée sur le métal.



L'introduction d'un espaceur glycine, l'augmentation de la denticité et l'extension du cycle de l'unité aromatique naphthalimide ont ensuite permis d'optimiser les propriétés de complexation du cation métallique et/ou d'interaction avec l'ADN.

Conclusions et perspectives

L'introduction d'un espaceur glycine entre le noyau sensibilisateur et le peptide permet de diminuer les contraintes stériques ce qui améliore à la fois les propriétés de complexation du cation métallique mais aussi l'interaction avec l'ADN. Les sondes de deuxième génération présentent des stabilités plus élevées du complexe d'euporium et des affinités plus fortes pour l'ADN. L'éloignement du sensibilisateur du site de coordination n'induit pas de perte majeure d'intensité de luminescence de l'euporium par rapport aux sondes de première génération. La diminution des contraintes stériques a donc permis d'obtenir une détection plus sensible de l'ADN.

Le cycle naphthalimide étendu, ou thiazolonaphthalimide, a permis d'obtenir une sonde capable de coordonner et de sensibiliser le cation euporium de manière équivalente au naphthalimide. De plus l'affinité pour l'ADN de cette dernière sonde est augmentée d'un facteur dix par rapport à la sonde naphthalimide de première génération.

Enfin, l'augmentation de la denticité par l'insertion d'un acide aminé pentadentate dans la séquence conduit à une augmentation de la stabilité des complexes formés qui est picomolaire à pH physiologique. La déshydratation de la première sphère de coordination du cation lanthanide est suffisante pour détecter la luminescence du néodyme dans le proche infra-rouge. Cependant, le fort encombrement stérique et la charge négative plus élevée de ce dernier peptide induit une perte importante d'affinité pour l'ADN.

L'efficacité de détection de l'ADN par les complexes peptidiques de lanthanides développés dans ce travail a été prouvée. De plus, des études de sélectivité de reconnaissance d'ADN de compositions en bases connues ont mis en évidence le potentiel de discrimination de séquences d'ADN spécifiques à travers la sensibilité de la luminescence de l'euporium pour les peptides dérivés de la proflavine.

En conclusion, les sondes développées au cours de ce travail ont démontré leur potentiel de détection de l'ADN, basé sur la luminescence en temps résolu de l'euporium. En effet, la substitution de l'acide aminé naturel tryptophane par des aromatiques dérivés de la proflavine ou du naphthalimide permet de coupler l'interaction avec l'ADN au phénomène de sensibilisation et donc à l'émission du lanthanide.

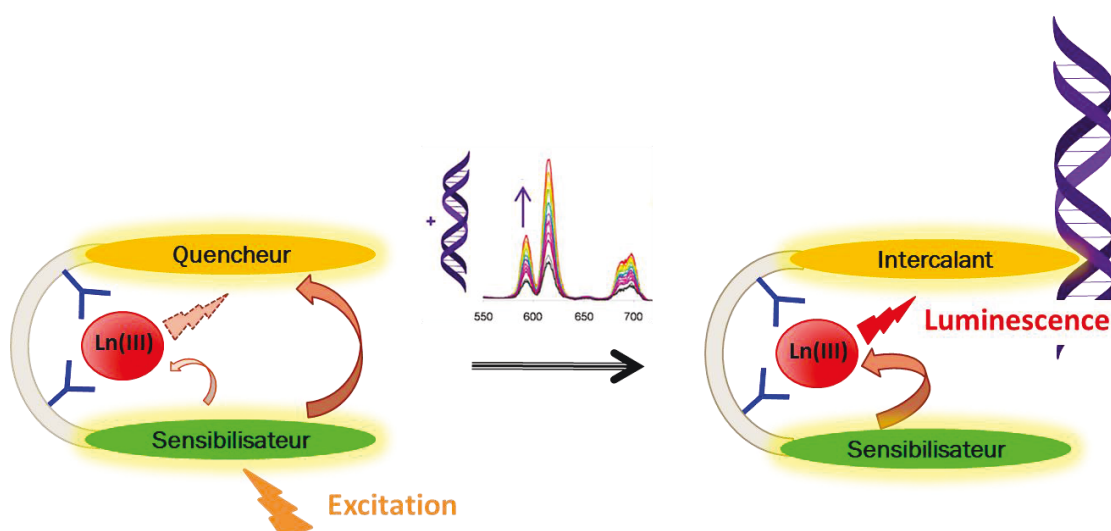
Néanmoins, des optimisations supplémentaires peuvent être apportées pour la détection de l'ADN par luminescence dans le proche infra-rouge. En effet, la faible affinité de la sonde de haute denticité pour l'ADN peut être attribuée à un trop fort encombrement stérique ainsi qu'à une forte répulsion électrostatique entre le complexe chargé négativement et les groupes phosphates de l'ADN. Pour s'affranchir de ces contraintes, le centre métallique pourrait être éloigné du noyau proflavine, soit par l'insertion d'un espaceur soit par l'insertion de l'acide aminé pentadentate dans une autre position de la séquence peptidique. Une autre stratégie pour augmenter le signal de luminescence du cation lanthanide serait d'utiliser un sensibilisateur-intercalant capable de coordonner le cation lanthanide. De cette manière, le transfert d'énergie serait plus efficace ainsi que la détection de l'ADN.

Les sondes peptidiques pourraient également être incorporées dans des séquences plus longues inspirées du vivant. Les sondes peptidiques intercalantes pourraient ainsi être couplées à des motifs de reconnaissance de l'ADN de longueurs plus importantes comme les structures HTH, capable de reconnaître sélectivement certaines séquences d'ADN grâce à des interactions spécifiques par liaisons hydrogène. La présence de l'intercalant dans la séquence pourrait augmenter la constante d'affinité et permettre la détection des séquences d'intérêts grâce à la luminescence centrée sur le métal.

Par ailleurs, l'interaction avec l'ADN des sondes actuelles induit l'observation d'une diminution du signal de luminescence, c'est ce que l'on nomme un effet « *switch-off* ». Une détection par augmentation de luminescence de l'euporium lors de l'interaction avec l'ADN serait plus facilement exploitable. C'est ce que l'on nomme une détection en « *switch-on* ». ^{67,}
68

La stratégie que nous envisageons d'utiliser pour mettre au point de telles sondes est exposée dans le schéma de principe ci-dessous. Le couplage de deux unités aromatiques différentes dans la séquence peptidique permettrait d'accéder à un tel effet :

- ✿ la première unité aromatique jouerait le rôle de sensibilisateur des ions Ln(III),
- ✿ la seconde de *quencheur* de fluorescence et d'intercalant de l'ADN.



En absence d'ADN, le *quencheur* inhibe le transfert d'énergie vers le cation lanthanide. Aucune émission de lumière n'est donc observable. Le sensibilisateur est alors appelé un donneur d'énergie et le *quencheur* un accepteur d'énergie. En présence d'ADN, le *quencheur-intercalant* interagit avec la double hélice, libérant ainsi la fluorescence du sensibilisateur, qui peut alors transférer son énergie vers le lanthanide et assurer l'effet d'antenne. L'interaction de la sonde avec la double hélice devrait alors être détectée via une augmentation de la luminescence.

Dans ce type de sonde, le sensibilisateur et l'unité de reconnaissance sont deux unités distinctes. Le choix du couple « *sensibilisateur-quencheur/intercalant* » adéquat est donc déterminant pour permettre une détection de l'ADN par un « *switch-on* ». Un recouvrement spectral de l'émission du sensibilisateur et de l'absorbance du *quencheur* est impératif pour obtenir une détection de ce type.

L'unité proflavine possède de nombreuses applications thérapeutiques potentielles. Les sondes peptidiques de la famille de la proflavine sont donc très prometteuses. En effet, cette unité aromatique est reconnue pour cibler spécifiquement les motifs structuraux en **G-quadruplex** de l'ADN.⁹⁰ La présence de ce motif dans les chromosomes et leurs implications dans l'apparition de cancers rend le développement d'outils capables de le détecter très attractifs. La luminescence en temps résolu des sondes proflavines peut donc être un atout pour le développement d'outils diagnostiques de ces motifs. Une autre piste d'utilisation de ces sondes serait la détection des plaques β -amyloïdes observées chez les personnes atteintes de maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer. En effet, il a été démontré

que le proflavine était capable d'interagir avec ces plaques.¹⁵⁷ La luminescence en temps résolu des sondes proflavines permettant de s'affranchir de la luminescence du milieu biologique, est donc un outil de fort potentiel pour la détection de ces résidus.

En substituant les ions Eu^{3+} par des ions Gd^{3+} , la détection pourrait être réalisée par mesure de la relaxivité des complexes de gadolinium. En effet, des peptides acides cycliques précédemment développés au laboratoire ont démontré leur capacité à complexer le Gd^{3+} et les complexes associés présentent des relaxivités élevées dues à des contributions de seconde sphère.¹⁵⁸ De plus, la relaxivité étant dépendante du temps de corrélation rotationnel (τ_R) du complexe de Gd^{3+} et donc de sa taille, une modification de la relaxivité est attendue lors de l'interaction avec l'ADN et de la formation de l'adduit ADN-peptide. Cette modification de la relaxivité pourrait également être exploitée pour étudier la reconnaissance des plaques β -amyloïdes, des G-quadruplex grâce aux propriétés de relaxivité du gadolinium.⁴³

Experimental part

I Synthesis

I.1 General

Starting materials and solvents were purchased from Sigma Aldrich and Fluka and were used without purification unless specified. Natural amino acids were purchased from Novabiochem Merck. **Compound 1** (*tert-butyl(6-aminoacridin-3-yl)carbamate*) was obtained according to the literature.¹¹⁷ Fmoc-Ada₂(*t*Bu)₂-OH and Fmoc-Ed₃a₂(*t*Bu)₃-OH were synthesized according to *Delangle et al.* protocols.^{76, 77} All water solutions were prepared from ultrapure laboratory grade water that has been filtered and purified by reverse osmosis using Millipore MilliQ cartridge system (resistivity 18 MΩcm). Thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254 (Merck). Flash chromatography was performed on silica gel 60 (40-63 μm, Merck). Analytical peptide HPLC were performed on a Lichrocart® RP18a column (250 × 4 mm, 5μm) and preparative peptide HPLC on an Merck Purospher® RP18a column (125 × 25 mm, 5μm) controlled with EZ-ChromElit software and equipped with a UV-visible detection. Mixtures of solvents used for HPLC experiments were ACN/water/TFA (90/10/0.1 v/v/v) called solvent A and water/TFA (99.925/0.075 v/v) called solvent B. Peptide's HPLC purifications were followed simultaneously at 214 nm and 344 nm for naphthalimide peptides and 450 nm for proflavine peptides. The purity was checked by analytical HPLC using the same elution gradient as for purification with a lower flow rate (1 mL.min⁻¹).

¹H NMR and ¹³C NMR spectra of organic compounds were recorded on a 200 MHz Avance Bruker spectrometer or a 400 MHz Varian Mercury spectrometer at 298 K. ¹H NMR chemical shift (δ) are reported in ppm with the solvent as internal reference. The signals were assigned to the corresponding protons using TOCSY, NOESY and ROESY. Abbreviations used for describing multiplicity of the NMR signals are: s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), t (triplet), dt (doublet of triplet), q (quadruplet) and m (multiplet) and br (broad)

Peptide's NMR spectra were recorded on a 500 MHz Avance Bruker spectrometer equipped with a BBI probe with a triple-axis gradient field. ¹H NMR spectra were recorded with 12 ppm windows and 32k points in the domain, at 298 K in H₂O/D₂O (v/v=9/1) using **WATERGATE** or presaturation solvent suppression experiment according to *Piotto's* protocol.¹⁵⁹ The shim parameters were defined by using a 3D gradient shimming.

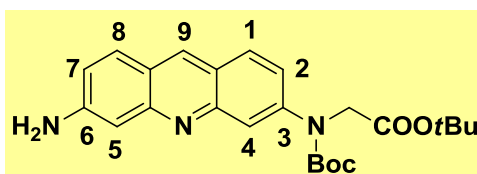
Mass spectra were acquired on a Finigan LXQ-linear ion trap (Thermo Scientific, San Jose, CA,USA), equipped with an electrospray source. The samples were analysed in positive and negative modes. The

Experimental Part

LXQ calibration (m/z 50-2000) was achieved according to the standard calibration procedure from the manufacturer (mixture of caffeine/MRFA and Ultramark 1621). The LXQ calibration (m/z 2000-4000) was performed with ES tuning mix (Agilent). The temperature of the heated capillary of the LXQ was set to the range of 180-220 °C, the ion spray voltage was in the range of 1-3 kV with an injection time of 5-100 ms.

I.2 Proflavine derivatives

Compound 2 - *tert*-butyl 2-((6-aminoacridin-3-yl)(*tert*-butoxycarbonyl)amino)acetate



Compound 2

Cs_2CO_3 (1.95 g, 6.00 mmol) and *tert*-butyl-2-chloroacetate (145 μL , 1.1 mmol) were carefully added under argon atmosphere to a solution of compound **1** (*tert*-butyl(6-aminoacridin-3-yl)carbamate) (310 mg, 1.00 mmol) in anhydrous DMF (10 mL). The reaction mixture was stirred for 72 hours and two portions of *tert*-butyl-2-chloroacetate (66 μL , 0.5 mmol ; 26 μL , 0.2 mmol) were added after 24 and 48 hours. The clear brown solution was quenched by addition of water (100 mL). The DMF/water layer was extracted with AcOEt (3 \times 200 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 \times 100 mL), dried (Na_2SO_4) and concentrated under vacuum. The resulting brown solid (700 mg) was purified by SiO_2 column chromatography (40 g ; successive elutions: AcOEt/Hexane 1/1 v/v, AcOEt, AcOEt/Acetone 1/1 v/v ; $R_f = 0.52$, AcOEt/Acetone 1/1 v/v). Compound **2** (270 mg, 62% yield) was obtained as a brown solid.

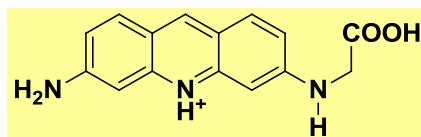
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3CN , 298 K): 8.59 (s, 1H, H_9), 7.87 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{1/8}$), 7.81 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{1/8}$), 7.69 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{4/5}$), 7.41 (dd, $J=9.0, 2.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{2/7}$), 7.07 (dd, $J=9.0, 2.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{2/7}$), 7.01 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{4/5}$), 4.89 (sl, 2H, $-\text{NH}_2$), 4.33 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COO}t\text{Bu}$), 1.48 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

Experimental Part

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): 152.62 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 152.52 (CO), 151.31 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 150.65 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 150.55 (CO), 149.59 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 140.51 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 134.62 (C_{Ar}), 134.28 (C_{Ar}), 129.33 (C_{Ar}), 129.13 (C_{Ar}), 128.81 (C_{Ar}), 128.68 (C_{Ar}), 120.29 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 119.83 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 79.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.71 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.51 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

ES-MS m/z : 424.3 [$\text{M}+\text{H}^{++}$]

Compound 3 - 2-((6-aminoacridin-3-yl)amino)acetic acid



Compound 3

Compound **2** (270 mg, 0.638 mmol) was diluted in a TFA/water/TIS solution (20 mL, 92/4/4 v/v/v). The reaction mixture was stirred for 15 hours. The red solution was extracted with Et₂O (2 × 30 mL). The aqueous layer was lyophilized to give the corresponding ammonium triflate salt of the compound **3** (169 mg, 70% yield) as a cloudy red solid.

^1H NMR (200 MHz, CD₃OD, 298 K): 8.62 (s, 1H, H₉), 7.76 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H_{1/8}), 7.02 (m, 2H, H₂ and H₇), 6.67 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H_{4/5}), 6.49 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H_{4/5}), 4.12 (s, 2H, -CH₂-COOH)

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , 298K): 170.15 (CO), 135.23 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 129.89 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 129.77 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 129.27 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 129.13 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 129.04 (C_{Ar}), 128.41 (C_{Ar}), 124.13 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 122.67 (C_{Ar}), 122.20 (C_{Ar}), 121.00 (C_{Ar}), 120.90 (C_{Ar}), 104.45 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 61.16 (CH₂)

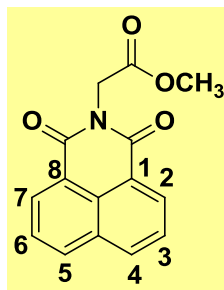
ES-MS m/z : 268.1 [$\text{M}+\text{H}^{++}$]

I.3 Naphthalimide derivatives

Compound 4 - 1,8-naphthalimide-N-methylacetate

Experimental Part

Adapted from the literature – Aibin WU, Yufang Xu, Xuhong Qian *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, (2009), 592-599



Compound 4

A solution of glycine methyl ester hydrochloride (552 mg, 4.4 mmol) and Et₃N (43.9 mmol, 6.13 mL) in EtOH (5 mL) was added to a solution of 1,8-naphthalic anhydride (787 mg, 3.97 mmol) in EtOH (16 mL). After stirring at reflux for 1 hour, the resulting yellow mixture was concentrated to dryness. The crude yellow solid (1.2 g) was purified by silica column chromatography (40g ; DCM/MeOH 99/1 ; R_f = 0.62). Compound **4** was obtained as a pale yellow powder (986 mg, 91%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K) : 8.64 (d, J=7.2 Hz, 2H, H₂ and H₇), 8.24 (d, J=8.4Hz, 2H, H₄ and H₅), 7.77 (t, J= 8.0 Hz, 2H, H₃ and H₆), 4.95 (s, 2H, -CH₂-), 3.78 (s, 3H, -COOCH₃)

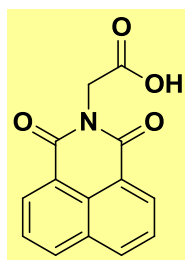
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 298 K) : 163.51 (COOCH₃), 163.74 (2 CO), 134.36 (C_{Ar}H₄, C_{Ar}H₅), 131.54 (C_{Ar}), 131.49 (C_{Ar}H₂, C_{Ar}H₇), 128.17 (C_{Ar}), 126.87 (C_{Ar}H₃, C_{Ar}H₆), 122.01 (2×C_{Ar}), 52.4 (-CH₂-), 41.15 (COOCH₃)

ES-MS *m/z*: 292.2 [M+Na⁺]⁺, 306.2 [M+2H⁺+Cl⁻]⁺, 308.1 [M+K⁺]⁺

Compound 5 – 1,8-naphthalimide-N-acetic acid

Adapted from the literature – Aibin WU, Yufang Xu, Xuhong Qian *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, (2009), 592-599

Experimental Part



Compound 5

LiOH.H₂O (305 mg, 7.27 mmol) was added to a solution of compound **4** (986 mg, 3.66 mmol) in 10 mL THF/MeOH (4/1 v/v). The solution was stirred at 50 °C overnight and concentrated to half of the volume. After neutralization with 1 M HCl aqueous solution, a white precipitate formed. It was collected by filtration and dried under vacuum to give the desired compound **5** (891 mg, 95%) as a white powder.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 298 K) : 8.26 (m, 4H, H₂, H₄, H₅ and H₇), 7.64 (t, J=7.6 Hz, H₃ and H₆), 4.49 (s, 2H, -CH₂)

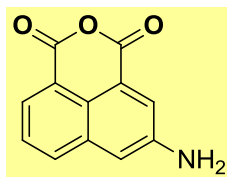
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 298 K) : 161.89 (COOH), 155.66 (2×CO), 127.42 (2×C_{Ar}H), 123.93 (2×C_{Ar}), 123.68 (2×C_{Ar}H), 119.93 (2×C_{Ar}H), 114.04 (2×C_{Ar}), 33.72 (-CH₂-)

ES-MS *m/z* : 254.2 [M-H]⁺

Compound 6 - 3-amino-1,8-naphthalic anhydride

Adapted from the literature – Zhigang Li, Qing Yang, Xuhong Qian, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 15, (2005), 1769-1772

Experimental Part



Compound 6

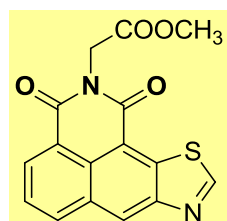
Concentrated hydrochloric acid (2.5 mL) and tin chloride (5.5 g, 24.44 mmol) were added to a degassed solution of 3-nitro-1,8-naphthalic anhydride (193 mg, 0.79 mmol) in AcOH (12.2 mL). The yellow mixture was stirred at reflux for 5 hours. After neutralization with 20% NaOH aqueous solution, a yellow precipitate formed. It was collected by filtration, washed with water and dried at 100 °C during 6 hours. After two successive recrystallizations in acetone, the desired compound **6** (115 mg, 67%) was obtained as a yellow powder.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆, 298 K): 8.16 (d, 2H, J=7.8 Hz, H₇ and H₅), 7.94 (s, 1H, H_{2/4} and H₃), 7.65 (t, 1H, J=7.9 Hz, H₆), 7.35 (s, 1H, H_{4/2}), 6.12 (sl, 2H, NH₂)

ES-MS *m/z* : 214.2[M+H]⁺

Compound 9 - 2,3-thiazolo-1,8-naphthalimide-N-methylacetate

Adapted from the literature – Zhigang Li, Qing Yang, Xuhong Qian, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 15, (2005), 1769-1772 et Xuhong Qian, Zhigang Li and Qing Yang, Zhigang Li, Qing Yang, Xuhong Qian, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 15, (2007), 6846-6851

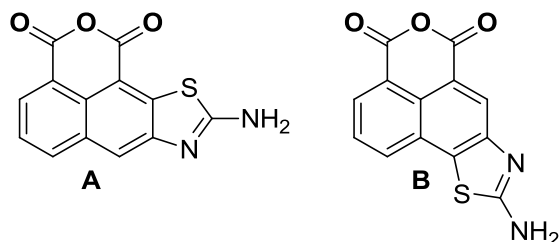


Compound 9

Potassium thiocyanate (210 mg, 2.16 mmol) was added to a solution of compound **6** (115 mg, 0.55 mmol) in acetic acid (3.9 mL). After stirring under argon for 2 hours, a solution of bromine (0.31 mL, 0.605 mmol) in acetic acid (1.5 mL) was added dropwise at 20 °C. The resulting orange solution was

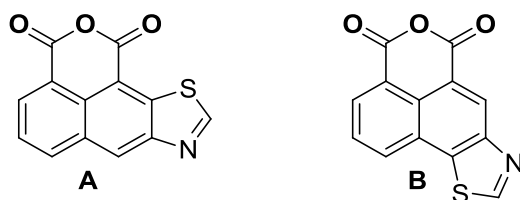
Experimental Part

stirred for 48 hours. The orange powder formed was collected by filtration, washed with water (5×150 ml) to yield the crude compound **7** as a mixture of two isomers (152 mg, ratio A/B). This mixture was used for the next step without purification.



Compound 7

A solution of the crude compound **7** (152 mg) in sulfuric acid (0.5 mL) was added to a cooled ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$) solution of sodium nitrite (53 mg, 0.768 mmol) in sulfuric acid (2 mL). After stirring for 2 hours, dry ethanol (20 mL) was added dropwise and the resulting solution was stirred at reflux overnight. After precipitation in cooled water and filtration, the compound **8** (286 mg) was obtained as a pale yellow powder as a mixture of two isomers.



Compound 8

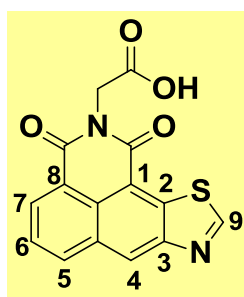
A solution of glycine methyl ester hydrochloride (45.6 mg, 0.363 mmol) and Et₃N (0.54 mL, 3.63 mmol) in EtOH (5 mL) was added to a solution of compound **8** (286 mg) in EtOH (15 mL). After stirring at reflux overnight, the yellow solution was concentrated under vacuum. The crude yellow product (124 mg) was purified on silica column chromatography (15 g ; DCM/MeOH 99/1 and 97/3 (v/v) ; R_f = 0.43 with DCM/MeOH 97/3 (v/v)) to give the desired compound **9** (92 mg, 37%) as a yellow powder.

Experimental Part

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): 9.36 (s, 1H, H₉), 8.34 (s, 1H, H₄), 8.44 (d, 1H, J=7.2 Hz, H_{7/5}), 8.32 (d, 1H, J=8.4Hz, H_{7/5}); 7.85 (dd, 1H, J= 7.9, 8.0 Hz, H₆), 5.62 (s, 2H,-CH₂), 4.23 (s, 3H, COOCH₃)

ES-MS m/z : 326.4 [M+H⁺]⁺

Compound 10 – (2,3-thiazolo-1,8-naphthalimide)-N-acetic acid



Compound 10

Compound **9** (92 mg, 0.283 mmol) was dissolved in 25 mL of THF/MeOH (4/1 v/v), then LiOH.H₂O (23.74 mg, 0.566 mmol) was added. The solution was heated at 50 °C, stirred overnight and concentrated to half of the volume. After neutralization with 1 M HCl aqueous solution, the yellow precipitate was collected by filtration and dried under vacuum to give the desired compound **10** (72.4 mg, 82%) as a yellow powder.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): 9.22 (s, 1H, H₉), 8.34 (s, 1H, H₄), 8.31 (d, 1H J=7.2 Hz, H_{7/5}), 8.20 (d, 1H, J=8.4Hz, H_{7/5}); 7.79 (dd, 1H, J₁= 7.8, 8.0Hz, H₆), 5.1 (s, 2H,-CH₂)

ES-MS m/z : 311.3 [M-H⁺]⁻

I.4 Peptide synthesis

Peptides were obtained using manual solid-phase peptide synthesis on a Rink Amide MBHA 100-200 mesh resin (loading 0.57 mmol/g) using Fmoc chemistry. The dry resin bullets were swelled in DCM during two hours. Initial deprotection of the Fmoc protected commercial resin was performed using a

Experimental Part

DMF/piperidine solution (4/1 v/v) ($3 \times 10 \text{ mL} \times 3 \text{ min}$). Amino acids coupling were performed with $N\alpha$ -Fmoc protected amino acids (2 equiv), PyBop (2 eq) and DIEA (6 eq) in 10 mL of DMF for 30-50 min. For the coupling of the synthetic amino acids Fmoc-Ada₂(tBu)₂-OH and Fmoc-Eda₃2(tBu)₃-OH only 1.5 equiv of the amino acid were used. The completion of each coupling was determined by a negative TNBS test. After each coupling, the resin was treated with DMF/Ac₂O/pyridine solution (7/2/1 v/v/v) ($2 \times 5 \text{ mL} \times 2 \text{ min}$) to acetylate the unreacted ending amino group. Fmoc deprotection was then achieved with DMF/piperidine solution (4/1 v/v) ($3 \times 10 \text{ mL} \times 3 \text{ min}$). The yield of each coupling was determined by UV/Vis spectrometry ($\epsilon_{300\text{nm}} = 7800 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for the piperidine adduct of dibenzofulvene). The resin was washed with DCM before each coupling, acetylation step and Fmoc deprotection.

I.4.1 Pfl derivated peptides

I.4.1.1 General

The coupling of Pfl compound **3** (1.5 eq) was performed on the resin with PyBop (2 eq) and DIEA (12 eq **P**₁, 12 eq **P**₂; 33 eq **P**₃) under stirring for 24 hours for **P**₁, 21 hours for **P**₂ and 22 hours for **P**₃ in DMF (50 mL). After washing the resin with DCM and DMF, the peptides were cleaved from the resin and the protective groups on the side chains of amino acids were removed with a mixture of TFA/water/TIS (20 mL, 92/4/4). After stirring for 3 hours, the yellow fluorescent solutions were concentrated under vacuum. The concentrated yellow solutions (5 mL) was treated several times with cooled Et₂O ($3 \times 50 \text{ mL}$) to obtain red powders (**P**₁ 84 mg, **P**₂ 112 mg, **P**₃ 96 mg).

I.4.1.2 Purification

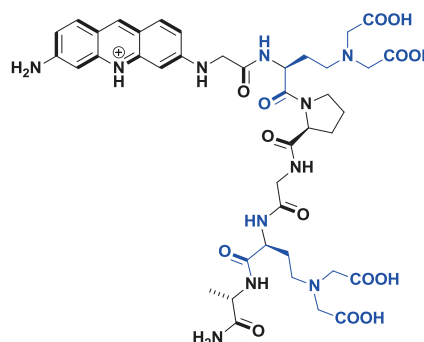
The solid residue of **P**₁ (84 mg) was dissolved in 9 mL of water/TFA solution (9/1 v/v) and purified by preparative RP-HPLC (gradient from A/B: 10/90 to 100/0 in 20 minutes, flow rate 10 mL.min⁻¹).

Sequence **PfICH₂CO-Ada₂-Pro-Gly-Ada₂-Ala-NH₂**

Yield on the resin before the coupling of **3**: 92 %

Isolated mass: 36 mg

Isolated yield assuming **P**₁-3TFA: 32%



Experimental Part

(+) ES-MS m/z : 924.5 $[M+H^+]^+$, 462.8 $[M + 2H^+]^{2+}$

(-) ES-MS m/z : 922.3 $[M-H^+]^-$, 394.8 $[M - 2H^+]^{2-}$

RP –HPLC: R_t = 15.5 minutes, purity 98%

The solid residue of **P₂** (112 mg) was dissolved in 15 mL of water/TFA solution (99.925/0.075 v/v) and purified by preparative RP-HPLC (gradient from A/B: 0/100 to 60/40 in 15 minutes, then to 0/100 in 12 minutes, flow rate 10 mL.min⁻¹).

Sequence: **PfICH₂CO-Gly-Ada₂-Pro-Gly-Ada₂-Ala-NH₂**

Yield on the resin before the coupling of **3**: 79 %

Isolated mass: 35 mg

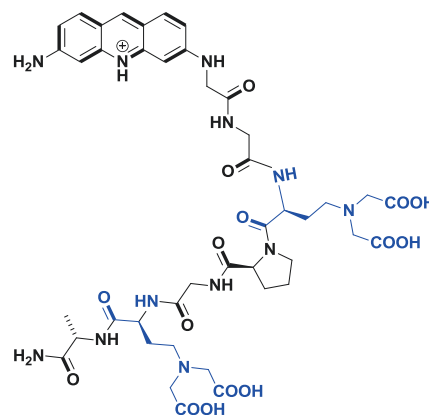
Isolated yield assuming **P₂**-3TFA: 23%

(+) ES-MS m/z : 981.5 $[M + H^+]^+$, 502.3 $[M + Na^+ + H^+]^{2+}$,

491.3 $[M + 2H^+]^{2+}$

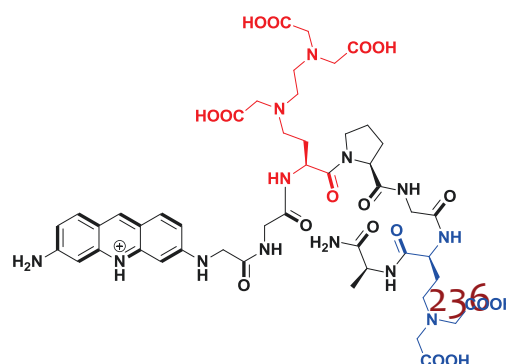
(-) ES-MS m/z : 979.3 $[M - H^+]^-$

RP –HPLC: R_t = 11.2 minutes, purity 98.3%



The solid residue of **P₃** (96 mg) was dissolved in 11 mL water/TFA solution (99.925/0.075 v/v) and purified by preparative RP-HPLC (A/B: 0/100 during 7 minutes, then gradient from 0/100 to 20/80 in 13 minutes, then to 50/50 in 5 minutes, flow rate 15 mL.min⁻¹).

Sequence: **PfICH₂CO-Gly-Ed3a₂-Pro-Gly-Ada₂-Ala-NH₂**



Experimental Part

Yield on the resin before the coupling of **3** : 75 %

Isolated mass : 40 mg

Isolated yield assuming **P**₃-4TFA : 24.8%

(+) ES-MS *m/z*: 1083.6 [M+H]⁺

541.8 [M + 2H]²⁺

361.6 [M + 3H]³⁺

RP –HPLC: Rt = 26.1 minutes, purity 99.9%

The peptide concentration was quantified by ¹H NMR 400 MHz using standards of known concentrations to calculate the molar extinction coefficient of proflavine in the peptides:

$$\epsilon_{449\text{nm}} = 39\,200 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

1.4.2 Naph derivated peptides

1.4.2.1 General

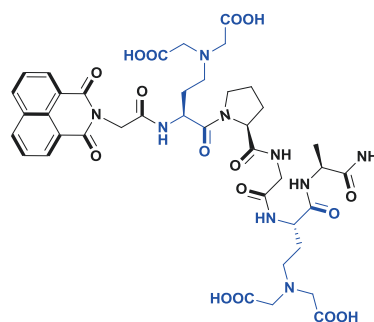
The coupling of **Naph** compound **5** (1.5 equiv.) was performed on the resin in 15 mL of DMF during 12 hours to obtain **N**₁ and **N**₂. The coupling of **TNaph** compound **10** (1.05 eq) was performed on the resin in 25 mL of DMF during 24 hours to obtain **N**₃. Each coupling was performed with PyBop (2 eq) and DIEA (**N**₁ and **N**₂ 8 eq, **N**₃ 12 eq). After washing the resin with DCM and DMF, the peptides were cleaved from the resin and the protective groups on the side chains of amino acids were removed with a mixture of TFA/water/TIS solution (20 mL, 92/4/4). After stirring during 3 hours, the pale yellow solutions were concentrated under vacuum. The concentrated solutions (5 mL) were treated several times with cooled Et₂O (3 × 50 mL) to obtain white powders. (**N**₁ m=98 mg, **N**₂ m=134 mg, **N**₃ m=42 mg)

Experimental Part

I.4.2.2 Purification

The solid residue of **N**₁ (98mg) was dissolved in 8 mL of a water/TFA solution (99.925/0.075 v/v) and purified by preparative RP-HPLC (gradient from A/B: 5/95 to 0/100 in 15 minutes, flow rate 15 mL.min⁻¹).

Sequence NaphCH₂CO-Ada₂-Pro-Gly-Ada₂-Ala-NH₂



Yield on the resin before the coupling of **5**: 85 %

Isolated mass: 48 mg

Isolated yield assuming **N**₁-2TFA: 44%

(+) ES-MS *m/z*: expected 921.3 [M+H⁺]⁺

obtained 950.6 [M + K⁺]⁺

921.4 [M+H⁺]⁺

475.8 [M + K⁺+H⁺]²⁺

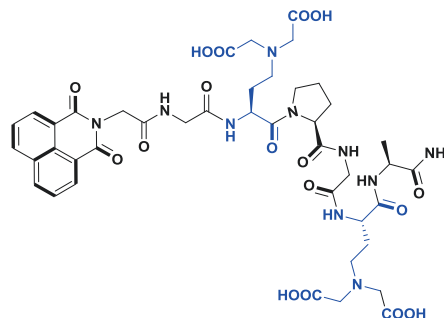
456.8 [M + 2H⁺]²⁺

RP -HPLC: Rt: 9.4 minutes, purity 99.9%

The solid residue of **N**₂ (134mg) was dissolved in 10 mL of a water/TFA solution (99.925/0.075 v/v) and purified by preparative RP-HPLC (gradient from A/B: 5/95 to 55/45 in 8 minutes, then to 100/0 in 17min, flow rate 15 mL.min⁻¹).

Experimental Part

Sequence **NaphCH₂CO-Gly-Ada₂-Pro-Gly-Ada₂-Ala-NH₂**



Yield on the resin before the coupling of **5**: 76%

Isolated mass: 45.1 mg

Isolated yield assuming **N**₂-2TFA: 47%

(+) ES-MS *m/z*: expected 969.38 [M+H]⁺

obtained 969.4 [M+H]⁺

456.8 [M + 2H]²⁺

RP –HPLC: Rt: 12.1 minutes, purity 98.5%

The solid residue of **N**₃ (42 mg) was dissolved in 11 mL of a water/TFA solution (99.925/0.075 v/v) and purified by preparative RP-HPLC (gradient from A/B: 15/85 to 65/35 in 7 minutes, then to 100/0 in 15 minutes, flow rate 15 mL·min⁻¹).

Sequence **TNaphCH₂CO-Gly-Ada₂-Pro-Gly-Ada₂-Ala-NH₂**

Yield on the resin before the coupling of **10**: 88%

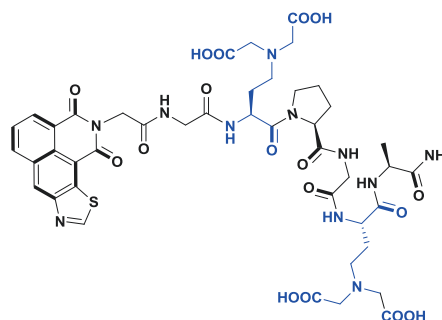
Isolated mass: 13.3 mg

Isolated yield assuming **N**₃-2TFA: 11%

(+) ES-MS *m/z* : expected 1012.3 [M+H]⁺

obtained 1012.4 [M+H]⁺

506.8 [M + 2H]²⁺



RP –HPLC: Rt: 9.2 minutes, purity 99.7%

Experimental Part

The molar extinction coefficients are those reported in the literature for Naph and TNaph. It was verified that the nitrogen substitution does not influence these values by ^1H NMR using standards of known concentrations.

$\epsilon^{\text{Naph}}_{344\text{nm}} = 10\,964 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ and $\epsilon^{\text{TNaph}}_{344\text{nm}} = 14\,015 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ were used to quantify peptide's concentration.^{50 111}

II Physico-chemical and DNA binding studies

II.1 Solutions

II.1.1 Aqueous solution

Buffers:

HEPES buffer (10 mM, pH 7, KCl 0.1 M) was used for the luminescence complexation studies. Acetate buffer (20 mM, pH 7) was used for the ES-MS titration studies.

HEPES buffer (10 mM, pH 7, NaCl 50 mM) was used for all the experiments with DNA.

Europium solutions were prepared from their corresponding salts $\text{EuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ or $\text{Eu}(\text{OTf})_3$ for ES-MS experiments in H_2O or D_2O . Their exact concentrations were checked by titration with 5 mM volumetric ethylenediaminetetraacetic acid in the presence of xylenol orange and 10 mM acetate buffer in water.

NTA and HEDTA solutions were prepared in H_2O and their exact concentrations were checked by potentiometric experiment.

DNA and Peptide solutions were freshly prepared before use and their exact concentration were determined by UV measurement.

Experimental Part

II.1.2 DNA samples

ct-DNA type I fibers (Aldrich lot **058K7014V**) were dialysed (1 night, 4 °C in ultra-pure water), isolated by EtOH precipitation in acidic media and stored at -18 °C. The purity of ct-DNA solutions (free of proteins) were checked by UV: a ratio $A_{(260\text{nm})}/A_{(280\text{nm})}$ in the range 1.8-2 ensures a high purity level. Their concentrations were expressed in base pair (bp) and checked by UV/Vis measurement ($\epsilon_{260\text{ nm}} = 13\ 200\ \text{L mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$).⁹²

DNA solutions in HEPES buffer (10 mM, pH 7, NaCl 50 mM) were prepared by dilution of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Fluka), sodium chloride, dialysed DNA and the pH was adjusted to 7 by addition of 0.1 M KOH aqueous solution. DNA was dissolved by stirring for 2 hours in HEPES buffer before use to ensure a good solubility.

Synthetic poly(dG-dC)₂ and poly(dA-dT)₂ DNA strands (Aldrich) were dialysed (1 night, 4 °C in ultra-pure water). The freshly dialysis DNA solutions were dissolved in HEPES buffer (10 mM, pH 7, NaCl 50 mM). Their concentrations were checked by UV-measurement ($\epsilon_{\text{GC } 260\text{ nm}} = 13\ 100\ \text{L mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ and $\epsilon_{\text{AT } 260\text{ nm}} = 16\ 800\ \text{L mol}^{-1}$)⁹². The GC DNA solutions were heated at 40°C to ensure the dissolution.

II.2 Methods

II.2.1 Luminescence

Luminescence studies have been performed on a LS50B Perkin Elmer spectrofluorimeter controlled by FLWinlab 2.0 software. Luminescence spectra were recorded at 298 K in quartz cells (optical path lengths: 1 cm) and in quartz capillary tube at 77K.

Pfl fluorescence titrations were performed with 450 nm excitation (Exc slit 15 nm, Em slit 2.5 nm).

Naph fluorescence titrations were performed with 344 nm excitation (Exc slit 15 nm, Em slit 10 nm)

Eu³⁺ luminescence spectra at 298 K were recorded upon **Pfl** and **Naph** excitation after 0.05 ms delay with 0.5 ms gate time (Exc Slit 10 nm, Em slit 10 nm). A 430 nm cut off filter was used.

Lifetime measurements (τ) were performed on peptide samples containing 1 equivalent of EuCl₃ in presence/absence of ct-DNA. The most intense Eu³⁺ emission intensity was recorded after excitation

Experimental Part

with an initial delay of 0.05 ms, a delay increment of 0.02 ms and the number of measurements was adjusted to have a final delay of 4τ . Each lifetime measurements were recorded 3 times and averaged.

For singlet oxygen quenching measurement, the samples were degased with argon for 2 hours.

The conditional stability constant of EuP_1 (12.91 μM) and EuP_2 (8.03 μM) were measured by recording the Eu centered luminescence of the complexes in HEPES buffer (10 mM, 0.1 M KCl, pH7) upon the addition of an increasing amount of NTA solution. Fifteen minutes waiting between two successive points ensured reaching the thermodynamic equilibrium. Conditional stability constants were extracted from specfit software,¹⁶⁰ using stability constant extracted from the NIST database for NTA and HEDTA¹³²:

$$\log\beta_{11}^{\text{pH}7}(\text{EuNTA}) = 8.7$$

$$\log\beta_{12}^{\text{pH}7}(\text{EuNTA}_2) = 15.3$$

$$\log\beta_{11}^{\text{pH}7}(\text{EuHEDTA}) = 12.5$$

II.2.2 UV-Vis

UV-Visible measurements were carried out at 298 K with a Varian Cary 50 Probe in quartz cells (optical path lengths: 1 cm).

Melting temperature measurements (Abs at 260 nm) were controlled with RNA-DNA Cary Win UV software and temperature was checked with a temperature Pelletier block. The step temperature gradient was 1 °C/minute. The baseline was corrected by measuring the background at 320 nm. The ratio between the complex and the DNA concentration, expressed in base pair, was 0.2.

P_1 (7.57 μM) pKa measurement were recorded in H_2O , starting from pH 4 to 12. After each addition of KOH aqueous solution UV measurement was recorded. The absorbance modifications were analyzed with Specfit software, using acid pKa fit protocol.

pH measurements were registered with a Metler Toledo Five Easy FE20/Fiv Go FG 20 pH meter, using a silver/silver chloride electrode. The electrode was filled with 3 M KCl aqueous solution.

The electrode was calibrated using a 2 points calibration protocol, depending on the desired pH range. The calibration buffer (pH 4 - pH 7 - pH 9 - pH 12) were purchased from Aldrich. A freshly buffer was used before each calibration.

Experimental Part

II.2.3 Titrations

Typical peptide concentration was 5–10 μM for lanthanide and DNA titrations. A waiting time of 15 min was used after DNA aliquots before spectrum acquisition to ensure equilibration

II.2.4 ES-MS

The complex solutions were prepared by adding $\text{Eu}(\text{OTf})_3$ (from 0, 0.33, 0.66, 1, 1.5, 2, 3 equiv) to peptide solutions (from 60 to 100 μM) in acetate buffer (20 mM, pH 7). Resulting mixture was injected into the spectrometer at a flow rate of 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. 2kV and 250 $^\circ\text{C}$ capillary temperature were applied. The experimental isotopic profiles of the complexes were compared in each case to the theoretical ones.

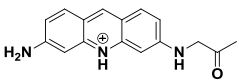
Annexes

A1: liste et structure des 21 acides aminés naturels

					<u>Acides aminés chargés</u>	<u>Codes 3 et 1 lettres</u>
Arg	His	Lys	Asp	Glu	Arginine	Arg / R
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{N} \\ / \quad \backslash \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \backslash \quad / \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Histidine	Hist / H
Ser	Thr	Asn	Gln		Lysine	Lys / L
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$		Aspartate	Asp / D
Ala	Ile	Leu	Met	Val	Glutamate	Glu / E
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CHCH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Acides aminés polaires	Ser / S
Phe	Trp	Tyr			Serine	Thr / T
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$			Thréonine	Asn / N
Cys	Gly	Pro			Asparagine	Gln / Q
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HN} \\ \\ \text{C}_4\text{H}_7 \end{array}$			Acides aminés hydrophobes	Ala / A
					Alanine	Ile / I
					Isoleucine	Leu / L
					Leucine	Met / M
					Méthionine	Val / V
					Valine	
					Acides aminés aromatiques	
					Phénylalanine	Phe / F
					Tryptophane	Trp / W
					Tyrosine	Tyr / Y
					« les inclassables »	
					Cystéine	Cys / C
					Glycine	Gly / G
					Proline	Pro / P

Tables RMN

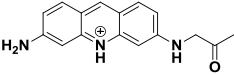
A 2 Déplacement chimique (δ ppm) de l'expérience RMN ^1H (500 MHz) du peptide P_1 dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10, v/v) à 1.61 mM, 298 K et pH 4.

Residue	NH	H α	H β	Others	
	Ada ₂	8.27	3.75	2.17, 1.87	
	Pro	-	4.13	2.20, 2.06	8.13 (sl, 1H, H δ), 7.38 (m, 2H, H Ar), 6.68 (m, 2H, H Ar), 6.21 (sl, 1H, H Ar), 5.91 (sl, 1H, H Ar), 3.69 (N-CH ₂ -CO) H γ 3.25 (2H), CH ₂ COO 3.85
	Gly	8.41	3.92 (2H)		H γ ; 2.04 (2H), H δ : 3.54, 3.61
	Ada ₂	8.64	3.70	2.05, 1.78	H γ 3.30 (2H), CH ₂ COO 3.85
	Ala	8.19	4.2	1.26	
	NH ₂	7.47, 6.90			

A 3 Déplacement chimique (δ ppm) de l'expérience RMN ^1H (500 MHz) du peptide **P₂** dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10, v/v) à 2.25 mM, 298 K et pH 4.

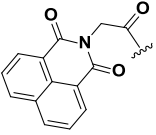
Residue	NH	H α	H β	Others
				7.93 (sl, 1H, H β)
				7.22 (m, 2H, H Ar)
				6.55 (m, 2H, H Ar)
				6.03 (sl, 1H, H Ar),
				5.79 (sl, 1H, H Ar),
				3.71 (N-CH $_2$ -CO)
	Gly	8.37	3.79	
Ada $_2$	8.24	4.27	2.12-1.96	H γ 3.19: H δ 3.73
Pro		3.98	3.38-3.48	H δ 1.68-1.84
Gly	8.42	3.79		
Ada $_2$	8.16	4.71	2.04-1.95	H γ 3.21 H δ 3.73
Ala	8.25	4.05	1.18	
NH $_2$	7.44-6.86			

A 4 Déplacement chimique (δ ppm) de l'expérience RMN ^1H (500 MHz) du peptide **P₃** dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10, v/v) 3.5 mM, 298 K et pH 4.

Residue	NH	H α	H β	Others
				8.06 (sl, 1H, H δ) 7.34 (m, 2H, H Ar) 6.66 (m, 2H, H Ar) 6.13 (sl, 1H, H Ar), 5.89 (sl, 1H, H Ar), 3.79 (N-CH $_2$ -CO)
				
Gly	8.32	3.83		
Ed3a $_2$	8.2	4.4	2.04-2.22	H η 3.83; H δ 3.72; H γ 3.29 H ϵ 1.71-1.83 H ζ 3.32
Pro		4.14	3.51-3.41	H δ 1.68-1.72 H γ 2.1
Gly	8.5	3.9		
Ada $_2$	8.37	4.64	2.16-1.98	H γ 3.64 H δ 3.22
Ala	8.28	4.17	1.25	
NH $_2$	7.48-6.9			

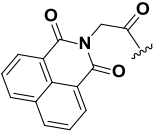
Superposition des signaux H α Gly et -CH $_2$ **Pf**

A 5 Déplacement chimique (δ ppm) de l'expérience RMN ^1H (500 MHz) du peptide N_1 dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90/10, v/v) 2.25 mM, 298 K et pH 2.

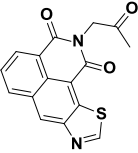
Residue	NH	H α	H β	Others
				8.31 (d,2H)
				8.21 (d,2H)
				7.65 (2H)
				3.93 (s, 2H, $-\text{CH}_2^\circ$)
	Ada ₂	8.29	4.42	2.23-2.09
Pro		4.36	3.56-3.65	H γ 2.26 H δ 1.89-1.87
Gly	8.5	3.9		
Ada ₂	8.37	4.64	2.16-1.98	H γ 3.64 ; H δ 3.22
Ala	8.31	4.18	1.13	
NH ₂	7.49-6.9			

Superposition des signaux NH Ada₂ and H_{aro} 8, 31 ; - Superposition des signaux H γ Ada₂ and H γ Pro

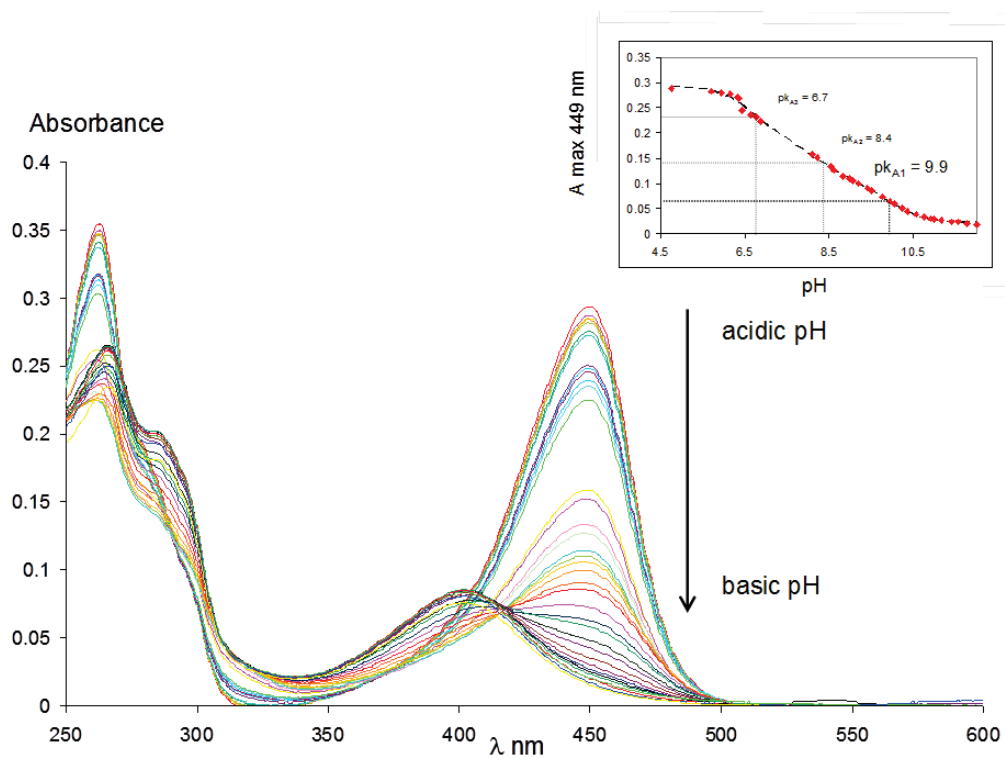
A 6 Déplacement chimique (δ ppm) de l'expérience RMN 1H (500 MHz) du peptide N_2 dans un mélange H_2O/D_2O (90/10, v/v) 2.99 mM, 288 K et pH 2.

Residue	NH	H α	H β	Others
				8.35 (d,2H)
				8.25 (d,2H)
				7.69 (2H)
				3.89 (s, 2H, -CH $_2$) $^\circ$
Gly	8.89	3.9		
Ada $_2$	8.39	4.51	2.2-2.02	H δ 3.83; H γ 3.26
Pro		4.38	3.56-3.65	H γ 2.45 H δ 1.89-1.79
Gly	8.53	3.84		
Ada $_2$	8.49	4.75	2.2-2.04	H γ 3.3 ; H δ 3.78
Ala	8.44	4.15	1.28	
NH $_2$	7.49-6.9			

A 7 Déplacement chimique (δ ppm) de l'expérience RMN 1H (500 MHz) du peptide N_3 dans un mélange H_2O/D_2O (90/10, v/v) 2.25 mM, 288 K et pH 5.

Residue	NH	H α	H β	Others
				9.36 (s,1H), 8.51 (s,1H), 8.47 (d) 8.32 (d, 1H) 7.97 (t) 4.15 (s, 2H,-CH ₂)
Gly	8.92	3.9		
Ada ₂	8.29	4.55	2.1-1.93	
Pro		3.72	3.36-3.23	H γ 2.92 H δ 1.89-1.82
Gly	8.61	3.93		
Ada ₂	8.85	4.33	2.04-1.94	H δ 3.69 H γ 3.48
Ala	8.31	4.28	1.18	
NH ₂	7.64-7.09			

A 8: Dosage par spectrophotométrie UV-visible de P_1 ($7,5 \mu\text{M}$ dans H_2O) en fonction du pH. Le pH de départ est 4,7. Encart: Variation de l'absorbance à 449 nm en fonction du pH. Les points rouges représentent les données expérimentales et la courbe noire les données calculées avec $pK_{a1} = 9,9$, $pK_{a2} = 8,4$; $6,7$.



Bibliographie

1. Watson, J. D.; Crick, F. H. C., Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737-738.
2. Jain, A. K.; Bhattacharya, S., Groove Binding Ligands for the Interaction with Parallel-Stranded ps-Duplex DNA and Triplex DNA. *Bioconjugate Chem* **2010**, *21* (8), 1389-1403.
3. Arnott, S., Historical article: DNA polymorphism and the early history of the double helix. *Trends Biochem Sci* **2006**, *31* (6), 349-354.
4. Wang, A. H. J.; Quigley, G. J.; Kolpak, F. J.; Crawford, J. L.; Vanboom, J. H.; Vandermarel, G.; Rich, A., Molecular-Structure of a Left-Handed Double Helical DNA Fragment at Atomic Resolution. *Nature* **1979**, *282* (5740), 680-686.
5. Schroth, G. P.; Chou, P. J.; Ho, P. S., Mapping Z-DNA in the Human Genome - Computer-Aided Mapping Reveals a Nonrandom Distribution of Potential Z-DNA-Forming Sequences in Human Genes. *J Biol Chem* **1992**, *267* (17), 11846-11855.
6. Rich, A., The biology of left-handed Z-DNA. *J Biol Chem* **1996**, *271* (20), 11595-11598.
7. Felsenfeld, G.; Davies, D. R.; Rich, A., Formation of a 3-Stranded Polynucleotide Molecule. *J Am Chem Soc* **1957**, *79* (8), 2023-2024.
8. Radhakrishnan, I.; Patel, D. J., Solution Structure and Hydration Patterns of a Pyrimidine-Center-Dot-Purine-Center-Dot-Pyrimidine DNA Tripler Containing a Novel T-Center-Dot-Cg Base-Triple. *J Mol Biol* **1994**, *241* (4), 600-619.
9. Phan, A. T.; Mergny, J. L., Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and watson-crick double helix. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30* (21), 4618-4625.
10. Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H.; Neidle, S., Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* **2002**, *417* (6891), 876-880.
11. Weil, J.; Min, T. P.; Yang, C.; Wang, S. R.; Sutherland, C.; Sinha, N.; Kang, C. H., Stabilization of the i-motif by intramolecular adenine-adenine-thymine base triple in the structure of d(ACCCT). *Acta Crystallogr D* **1999**, *55*, 422-429.
12. Jones, S.; Barker, J. A.; Nobeli, I.; Thornton, J. M., Using structural motif templates to identify proteins with DNA binding function. *Nucleic Acids Res* **2003**, *31* (11), 2811-2823.
13. Hannon, M. J., Supramolecular DNA recognition. *Chem Soc Rev* **2007**, *36* (2), 280-295.

14. Elrod-Erickson, M.; Benson, T. E.; Pabo, C. O., High-resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger DNA recognition. *Struct Fold Des* **1998**, *6* (4), 451-464.
15. Jamieson, A. C.; Miller, J. C.; Pabo, C. O., Drug discovery with engineered zinc-finger proteins. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2* (5), 361-368.
16. Choo, Y., End effects in DNA recognition by zinc finger arrays. *Nucleic Acids Res* **1998**, *26* (2), 554-557.
17. Manna, P. R.; Dyson, M. T.; Stocco, D. M., Role of basic leucine zipper proteins in transcriptional regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2009**, *302* (1), 1-11.
18. Fujii, Y.; Shimizu, T.; Toda, T.; Yanagida, M.; Hakoshima, T., Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nat Struct Biol* **2000**, *7* (10), 889-893.
19. Nielsen, P. E., Targeting double stranded DNA with peptide nucleic acid (PNA). *Curr Med Chem* **2001**, *8* (5), 545-550.
20. Paulasova, P.; Pellestor, F., The peptide nucleic acids (PNAs): a new generation of probes for genetic and cytogenetic analyses. *Ann Genet-Paris* **2004**, *47* (4), 349-358.
21. Good, L.; Awasthi, S. K.; Dryselius, R.; Larsson, O.; Nielsen, P. E., Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates. *Nat Biotech* **2001**, *19* (4), 360-364.
22. Schwarze, S. R.; Hruska, K. A.; Dowdy, S. F., Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends in Cell Biology* **2000**, *10* (7), 290-295.
23. Rosenber.B; Vancamp, L.; Krigas, T., Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **1965**, *205* (4972), 698-&.
24. Sherman, S. E.; Gibson, D.; Wang, A. H. J.; Lippard, S. J., X-Ray Structure of the Major Adduct of the Anticancer Drug Cisplatin with DNA - Cis-[Pt(Nh3)2(D(Pgpg))]. *Science* **1985**, *230* (4724), 412-417.
25. Takahara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J., Crystal-Structure of Double-Stranded DNA Containing the Major Adduct of the Anticancer Drug Cisplatin. *Nature* **1995**, *377* (6550), 649-652.
26. Harris, A. L.; Yang, X. H.; Hegmans, A.; Povirk, L.; Ryan, J. J.; Kelland, L.; Farrell, N. P., Synthesis, characterization, and cytotoxicity of a novel highly charged trinuclear platinum compound. Enhancement of cellular uptake with charge. *Inorg Chem* **2005**, *44* (26), 9598-9600.

27. Hannon, M. J., Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum post-genomic future and biology. *Pure Appl Chem* **2007**, *79* (12), 2243-2261.
28. Komeda, S.; Moulaei, T.; Woods, K. K.; Chikuma, M.; Farrell, N. P.; Williams, L. D., A Third Mode of DNA Binding: Phosphate Clamps by a Polynuclear Platinum Complex. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (50), 16092-16103.
29. Braddock, P. D.; Connors, T. A.; Jones, M.; Khokhar, A. R.; Melzack, D. H.; Tobe, M. L., Structure and Activity Relationships of Platinum Complexes with Anti-Tumour Activity. *Chem-Biol Interact* **1975**, *11* (3), 145-161.
30. Pizarro, A. M.; Sadler, P. J., Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* **2009**, *91* (10), 1198-1211.
31. Heringova, P.; Woods, J.; Mackay, F. S.; Kasparikova, J.; Sadler, P. J.; Brabec, V., Transplatin is cytotoxic when photoactivated: Enhanced formation of DNA cross-links. *J Med Chem* **2006**, *49* (26), 7792-7798.
32. Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessl, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K., KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent - Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients. *Chem Biodivers* **2008**, *5* (10), 2140-2155.
33. Muller, J.; Lippert, B., Imposing a three-way junction on DNA or recognizing one: A metal triple helicate meets double helix. *Angew Chem Int Edit* **2006**, *45* (16), 2503-2505.
34. Pascu, G. I.; Hotze, A. C. G.; Sanchez-Cano, C.; Kariuki, B. M.; Hannon, M. J., Dinuclear ruthenium(II) triple-stranded helicates: Luminescent supramolecular cylinders that bind and coil DNA and exhibit activity against cancer cell lines. *Angew Chem Int Edit* **2007**, *46* (23), 4374-4378.
35. Luzzati, V.; Lerman, L. S.; Masson, F., Interaction of DNA and Proflavine - a Small-Angle X-ray Scattering Study. *J Mol Biol* **1961**, *3* (5), 634-&.
36. Kielkopf, C. L.; Erkkila, K. E.; Hudson, B. P.; Barton, J. K.; Rees, D. C., Structure of a photoactive rhodium complex intercalated into DNA. *Nat Struct Biol* **2000**, *7* (2), 117-121.
37. Krotz, A. H.; Hudson, B. P.; Barton, J. K., Assembly of DNA Recognition Elements on an Octahedral Rhodium Intercalator - Predictive Recognition of 5'-Tgca-3' by Delta-[Rh[(R,R)-Me2trien]Phi]3+. *J Am Chem Soc* **1993**, *115* (26), 12577-12578.
38. Komor, A. C.; Barton, J. K., The path for metal complexes to a DNA target. *Chem Commun* **2013**, *49* (35), 3617-3630.
39. Tan, C. P.; Lai, S. S.; Wu, S. H.; Hu, S.; Zhou, L. J.; Chen, Y.; Wang, M. X.; Zhu, Y. P.; Lian, W.; Peng, W. L.; Ji, L. N.; Xu, A. L., Nuclear Permeable Ruthenium(II)beta-Carboline Complexes

Induce Autophagy To Antagonize Mitochondrial-Mediated Apoptosis. *J Med Chem* **2010**, *53* (21), 7613-7624.

40. Ernst, R. J.; Komor, A. C.; Barton, J. K., Selective Cytotoxicity of Rhodium Metalloinsertors in Mismatch Repair-Deficient Cells. *Biochemistry-US* **2011**, *50* (50), 10919-10928.

41. Sitlani, A.; Long, E. C.; Pyle, A. M.; Barton, J. K., DNA photocleavage by phenanthrenequinone diimine complexes of rhodium(III): shape-selective recognition and reaction. *J Am Chem Soc* **1992**, *114* (7), 2303-2312.

42. Glover, P. B.; Ashton, P. R.; Childs, L. J.; Rodger, A.; Kercher, M.; Williams, R. M.; De Cola, L.; Pikramenou, Z., Hairpin-shaped heterometallic luminescent lanthanide complexes for DNA intercalative recognition. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (33), 9918-9919.

43. Jones, J. E.; Amoroso, A. J.; Dorin, I. M.; Parigi, G.; Ward, B. D.; Buurma, N. J.; Pope, S. J. A., Bimodal, dimetallic lanthanide complexes that bind to DNA: the nature of binding and its influence on water relaxivity. *Chem Commun* **2011**, *47* (12), 3374-3376.

44. Law, G. L.; Man, C.; Parker, D.; Walton, J. W., Observation of the selective staining of chromosomal DNA in dividing cells using a luminescent terbium(III) complex. *Chem Commun* **2010**, *46* (14), 2391-2393.

45. Bunzli, J. C. G.; Comby, S.; Chauvin, A. S.; Vandevyver, C. D. B., New opportunities for lanthanide luminescence. *J Rare Earth* **2007**, *25* (3), 257-274.

46. Bunzli, J. C. G.; Piguet, C., Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chem Soc Rev* **2005**, *34* (12), 1048-1077.

47. Bünzli, J.-C. G.; Eliseva, S. V., Basics of Lanthanide Photophysics. **2010**.

48. Weissman, S. I., Intramolecular energy transfer the fluorescence of complexes of Europium. *The Journal of Chemical Physics* **1942**, *10* (4), 3.

49. Kleinerm.M, Energy Migration in Lanthanide Chelates. *J Chem Phys* **1969**, *51* (6), 2370-&.

50. Bonnet, C. S.; Devocelle, M.; Gunnlaugsson, T., Luminescent lanthanide-binding peptides: sensitising the excited states of Eu(III) and Tb(III) with a 1,8-naphthalimide-based antenna. *Org Biomol Chem* **2012**, *10* (1), 126-133.

51. Steemers, F. J.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N.; Vandertol, E. B.; Verhoeven, J. W., New Sensitizer-Modified Calix[4]Arenes Enabling near-Uv Excitation of Complexed Luminescent Lanthanide Ions. *J Am Chem Soc* **1995**, *117* (37), 9408-9414.

52. Horrocks, W. D.; Sudnick, D. R., Lanthanide Ion Luminescence Probes of the Structure of Biological Macromolecules. *Accounts Chem Res* **1981**, *14* (12), 384-392.

53. Beeby, A.; Clarkson, I. M.; Dickins, R. S.; Faulkner, S.; Parker, D.; Royle, L.; de Sousa, A. S.; Williams, J. A. G.; Woods, M., Non-radiative deactivation of the excited states of europium, terbium and ytterbium complexes by proximate energy-matched OH, NH and CH oscillators: an improved luminescence method for establishing solution hydration states. *J Chem Soc Perk T 2* **1999**, (3), 493-503.
54. Kanemoto, S.; Tomioka, H.; Oshima, K.; Nozaki, H., Cerium or Ruthenium Catalyzed Oxidation of Alcohols to Carbonyl-Compounds by Means of Sodium-Bromate. *B Chem Soc Jpn* **1986**, *59* (1), 105-108.
55. Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B., Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chem Rev* **1999**, *99* (9), 2293-2352.
56. Bunzli, J. C. G., Lanthanide Luminescence for Biomedical Analyses and Imaging. *Chem Rev* **2010**, *110* (5), 2729-2755.
57. Parker, D.; Senanayake, P. K.; Williams, J. A. G., Luminescent sensors for pH, pO₂, halide and hydroxide ions using phenanthridine as a photosensitiser in macrocyclic europium and terbium complexes. *J Chem Soc Perk T 2* **1998**, (10), 2129-2139.
58. Song, B.; Wang, G.; Tan, M.; Yuan, J., Synthesis and time-resolved fluorimetric application of a europium chelate-based phosphorescence probe specific for singlet oxygen. *New J Chem* **2005**, *29* (11), 1431-1438.
59. Song, B.; Wang, G.; Yuan, J., A new europium chelate-based phosphorescence probe specific for singlet oxygen. *Chem Commun* **2005**, (28), 3553-3555.
60. Li, X. H.; Zhang, G. X.; Ma, H. M.; Zhang, D. Q.; Li, J.; Zhu, D. B., 4,5-Dimethylthio-4'-[2-(9-anthryloxy)ethylthio]tetrathiafulvalene, a highly selective and sensitive chemiluminescence probe for singlet oxygen. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (37), 11543-11548.
61. Pidcock, E.; Moore, G. R., Structural characteristics of protein binding sites for calcium and lanthanide ions. *J Biol Inorg Chem* **2001**, *6* (5-6), 479-489.
62. Moore, J. D.; Skinner, M. A.; Swatman, D. R.; Hawkins, A. R.; Brown, K. A., Reactivation of 3-dehydroquinase synthase by lanthanide cations. *J Am Chem Soc* **1998**, *120* (28), 7105-7106.
63. Horrocks, W. D.; Sun, X., Chiral Recognition of a Ca²⁺-Binding Domain in Parvalbumin by Delta-(Co(En))₃⁺ and Lambda-[Co(En)]₃⁺ - Enantiomeric Selectivity of Energy-Transfer in the Eu³⁺-Substituted Protein by Laser-Excited Luminescence. *Faseb J* **1992**, *6* (1), A177-A177.
64. Plyusnin, V. F. K., A. S. ; Grivin, V. P. ; Shelton, A. H.; Sazanovich, I. V. ; Meijer, A. J. H. M.; Weinstein, J. A. and Ward, M. D. , Photophysics of 1,8-naphthalimide/Ln(III) dyads (Ln = Eu, Gd): naphthalimide → Eu(III) energy-transfer from both singlet and triplet states. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**.

65. Chen, J. Y.; Selvin, P. R., Thiol-reactive luminescent chelates of terbium and europium. *Bioconjugate Chem* **1999**, *10* (2), 311-315.
66. Pazos, E.; Torrecilla, D.; Lopez, M. V.; Castedo, L.; Mascarenas, J. L.; Vidal, A.; Vazquez, M. E., Cyclin A probes by means of intermolecular sensitization of terbium-chelating peptides. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (30), 9652.
67. Pazos, E.; Jimenez-Balsa, A.; Mascarenas, J. L.; Vazquez, M. E., Sensing coiled-coil proteins through conformational modulation of energy transfer processes - selective detection of the oncogenic transcription factor c-Jun. *Chem Sci* **2011**, *2* (10), 1984-1987.
68. Penas, C.; Pazos, E.; Mascarenas, J. L.; Vazquez, M. E., A Folding-Based Approach for the Luminescent Detection of a Short RNA Hairpin. *J Am Chem Soc* **2013**, *135* (10), 3812-3814.
69. Clark, I. D.; Hill, I.; Sikorskawalker, M.; Macmanus, J. P.; Szabo, A. G., A Novel Peptide Designed for Sensitization of Terbium (Iii) Luminescence. *Febs Lett* **1993**, *333* (1-2), 96-98.
70. Kovacic, R. T.; Welch, J. T.; Franklin, S. J., Sequence-selective DNA cleavage by a chimeric metallopeptide. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (22), 6656-6662.
71. Lim, S.; Franklin, S. J., Lanthanide-binding peptides and the enzymes that Might Have Been. *Cell Mol Life Sci* **2004**, *61* (17), 2184-2188.
72. Reynolds, A. M.; Sculimbrene, B. R.; Imperiali, B., Lanthanide-binding tags with unnatural amino acids: Sensitizing Tb³⁺ and Eu³⁺ luminescence at longer wavelengths. *Bioconjugate Chem* **2008**, *19* (3), 588-591.
73. Nitz, M.; Sherawat, M.; Franz, K. J.; Peisach, E.; Allen, K. N.; Imperiali, B., Structural origin of the high affinity of a chemically evolved lanthanide-binding peptide. *Angew Chem Int Edit* **2004**, *43* (28), 3682-3685.
74. Sculimbrene, B. R.; Imperiali, B., Lanthanide-binding tags as luminescent probes for studying protein interactions. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (22), 7346-7352.
75. Goda, N.; Tenno, T.; Inomata, K.; Iwaya, N.; Sasaki, Y.; Shirakawa, M.; Hiroaki, H., LBT/PTD dual tagged vector for purification, cellular protein delivery and visualization in living cells. *Bba-Mol Cell Res* **2007**, *1773* (2), 141-146.
76. Niedzwiecka, A.; Cisnetti, F.; Lebrun, C.; Delangle, P., Femtomolar Ln(III) Affinity in Peptide-Based Ligands Containing Unnatural Chelating Amino Acids. *Inorg Chem* **2012**, *51* (9), 5458-5464.

77. Cisnetti, F.; Gateau, C.; Lebrun, C.; Delangle, P., Lanthanide(III) Complexes with Two Hexapeptides Incorporating Unnatural Chelating Amino Acids: Secondary Structure and Stability. *Chem-Eur J* **2009**, *15* (30), 7456-7469.
78. Cisnetti, F.; Lebrun, C.; Delangle, P., A lanthanide binding peptide with short chelating side-chains: structural impact of the backbone coordination. *Dalton T* **2010**, *39* (15), 3560-3562.
79. Niedzwiecka, A.; Cisnetti, F.; Lebrun, C.; Gateau, C.; Delangle, P., Lanthanide-binding peptides with two pendant aminodiacetate arms: Impact of the sequence on chelation. *Dalton T* **2012**, *41* (11), 3239-3247.
80. Ancel, L.; Niedzwiecka, A.; Lebrun, C.; Gateau, C.; Delangle, P., Rational design of lanthanide binding peptides. *Comptes Rendus Chimie CR Chimie* **2013**, *16*, 8.
81. Belmont, P.; Bosson, J.; Godet, T.; Tiano, M., Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: Where are we now? *Anti-Cancer Agent Me* **2007**, *7* (2), 139-169.
82. Denny, W. A., Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. *Curr Med Chem* **2002**, *9* (18), 1655-1665.
83. Parker, C. A.; Hatchard, C. G., Triplet-Singlet Emission in Fluid Solution. *J Phys Chem-US* **1962**, *66* (12), 2506-&.
84. Geacintov, N. E.; Waldmeyer, J.; Kuzmin, V. A.; Kolubayev, T., Dynamics of the Binding of Acridine-Dyes to DNA Investigated by Triplet Excited-State Probe Techniques. *J Phys Chem-US* **1981**, *85* (24), 3608-3613.
85. Parker, C. A.; Joyce, T. A., Prompt and Delayed Fluorescence of Some DNA Adsorbates. *Photochemistry and photobiology* **1973**, *18* (6), 467-474.
86. Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution Iupac. *Chim Anal-Paris* **1965**, *47* (11), 614-&.
87. Archer, R. D.; Chen, H. Y.; Thompson, L. C., Synthesis, characterization, and luminescence of europium(III) Schiff base complexes. *Inorg Chem* **1998**, *37* (8), 2089-+.
88. Corin, A. F.; Jovin, T. M., Proflavin Binding to Poly[D(a-T)] and Poly[D(a-Br5u)] - Triplet-State and Temperature-Jump Kinetics. *Biochemistry-US* **1986**, *25* (14), 3995-4007.
89. Ramstein, J.; Ehrenberg, M.; Rigler, R., Fluorescence Relaxation of Proflavin-Deoxyribonucleic Acid Interaction - Kinetic-Properties of a Base-Specific Reaction. *Biochemistry-US* **1980**, *19* (17), 3938-3948.
90. Javier, C.; Martin, A. R.; Stephen, N., The Design of G-quadruplex Ligands as Telomerase Inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2003**, *3* (1), 11-21.

91. Lv, L.; Guo, Z. J.; Wang, J. H.; Wang, E. K., G-Quadruplex as Signal Transducer for Biorecognition Events. *Curr Pharm Design* **2012**, *18* (14), 2076-2095.
92. McConaughie, A. W.; Jenkins, T. C., Novel Acridine-Triazenes as Prototype Combilexins - Synthesis, DNA-Binding, and Biological-Activity. *J Med Chem* **1995**, *38* (18), 3488-3501.
93. Shieh, H. S.; Berman, H. M.; Dabrow, M.; Neidle, S., Structure of Drug-Deoxydinucleoside Phosphate Complex - Generalized Conformational Behavior of Intercalation Complexes with Rna and DNA Fragments. *Nucleic Acids Res* **1980**, *8* (1), 85-97.
94. Neidle, S.; Pearl, L. H.; Herzyk, P.; Berman, H. M., A Molecular-Model for Proflavine E-DNA Intercalation. *Nucleic Acids Res* **1988**, *16* (18), 8999-9016.
95. Mukherjee, A., Molecular Mechanism of Proflavine Intercalation: Evidence for Drug-Induced Minimum Base-Stacking Penalty Pathway. *Biophys J* **2013**, *104* (2), 15a-15a.
96. Sasikala, W. D.; Mukherjee, A., Intercalation and de-intercalation pathway of proflavine through the minor and major grooves of DNA: roles of water and entropy. *Phys Chem Chem Phys* **2013**, *15* (17), 6446-6455.
97. Horowitz, E. D.; Hud, N. V., Ethidium and proflavine binding to a 2',5'-linked RNA duplex. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (48), 15380-15381.
98. Brana, M. F.; Cacho, M.; Gradillas, A.; de Pascual-Teresa, B.; Ramos, A., Intercalators as anticancer drugs. *Curr Pharm Design* **2001**, *7* (17), 1745-1780.
99. Brana, DE Patent 2,316,136,1973, CA86; 106,236,1977. **1973**.
100. Plyusnin, V. F.; Kupryakov, A. S.; Grivin, V. P.; Shelton, A. H.; Sazanovich, I. V.; Meijer, A. J. H. M.; Weinstein, J. A.; Ward, M. D., Photophysics of 1,8-naphthalimide/Ln(iii) dyads (Ln = Eu, Gd): naphthalimide [rightward arrow] Eu(iii) energy-transfer from both singlet and triplet states. *Photoch Photobio Sci* **2013**.
101. Gunnlaugsson, T.; Mac Donnell, D. A.; Parker, D., Lanthanide macrocyclic quinolyl conjugates as luminescent molecular-level devices. *J Am Chem Soc* **2001**, *123* (51), 12866-12876.
102. Wintgens, V.; Valat, P.; Kossanyi, J.; Biczok, L.; Demeter, A.; Berces, T., Spectroscopic properties of aromatic dicarboximides. Part1.-N-H and N-methyl-substituted naphthalimides. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **1994**, *90* (3), 411-421.
103. de Sousa, M.; Kluciar, M.; Abad, S.; Miranda, M. A.; de Castro, B.; Pischel, U., An inhibit (INH) molecular logic gate based on 1,8-naphthalimide-sensitised europium luminescence. *Photoch Photobio Sci* **2004**, *3* (7), 639-642.

104. Chen, Z.; Liang, X.; Zhang, H. Y.; Xie, H.; Liu, J. W.; Xu, Y. F.; Zhu, W. P.; Wang, Y.; Wang, X.; Tan, S. Y.; Kuang, D.; Qian, X. H., A New Class of Naphthalimide-Based Antitumor Agents That Inhibit Topoisomerase II and Induce Lysosomal Membrane Permeabilization and Apoptosis. *J Med Chem* **2010**, *53* (6), 2589-2600.
105. Cui, L.; Zhong, Y.; Zhu, W. P.; Xu, Y. F.; Qian, X. H., Selective and sensitive detection and quantification of arylamine N-acetyltransferase 2 by a ratiometric fluorescence probe. *Chem Commun* **2010**, *46* (38), 7121-7123.
106. Bailly, C.; Brana, M.; Waring, M. J., Sequence-selective intercalation of antitumour bis-naphthalimides into DNA - Evidence for an approach via the major groove. *Eur J Biochem* **1996**, *240* (1), 195-208.
107. Li, X. L.; Lin, Y. J.; Wang, Q. Q.; Yuan, Y. K.; Zhang, H.; Qian, X. H., The novel anti-tumor agents of 4-triazol-1,8-naphthalimides: Synthesis, cytotoxicity, DNA intercalation and photocleavage. *Eur J Med Chem* **2011**, *46* (4), 1274-1279.
108. Gallego, J.; Reid, B. R., Solution structure and dynamics of a complex between DNA and the antitumor bisnaphthalimide LU-79553: Intercalated ring flipping on the millisecond time scale. *Biochemistry-Us* **1999**, *38* (46), 15104-15115.
109. Banerjee, S.; Veale, E. B.; Phelan, C. M.; Murphy, S. A.; Tocci, G. M.; Gillespie, L. J.; Frimannsson, D. O.; Kelly, J. M.; Gunnlaugsson, T., Recent advances in the development of 1,8-naphthalimide based DNA targeting binders, anticancer and fluorescent cellular imaging agents. *Chem Soc Rev* **2013**, *42* (4), 1601-1618.
110. Sami, S. M.; Dorr, R. T.; Alberts, D. S.; Solyom, A. M.; Remers, W. A., 2-[2'-(dimethylamino)ethyl]-1,2-dihydro-3H-dibenz[de,h]isoquinoline-1,3-diones with substituents at positions 4, 8, 9, 10, and 11. Synthesis, antitumor activity, and quantitative structure-activity relationships. *J Med Chem* **1996**, *39* (25), 4978-4987.
111. Qian, X. H.; Li, Z. G.; Yang, Q., Highly efficient antitumor agents of heterocycles containing sulfur atom: Linear and angular thiazonaphthalimides against human lung cancer cell in vitro. *Bioorgan Med Chem* **2007**, *15* (21), 6846-6851.
112. Li, X. L.; Lin, Y. J.; Yuan, Y. K.; Liu, K.; Qian, X. H., Novel efficient anticancer agents and DNA-intercalators of 1,2,3-triazol-1,8-naphthalimides: design, synthesis, and biological activity. *Tetrahedron* **2011**, *67* (12), 2299-2304.
113. Baguley, B. C.; Finlay, G. J.; Ching, L. M.; Denny, W. A., In vivo and In vitro Selectivity of a New Acridine Carboxamide Derivative against Lewis Lung-Carcinoma. *Invest New Drug* **1987**, *5* (1), 83-83.
114. Atwell, G. J.; Rewcastle, G. W.; Baguley, B. C.; Denny, W. A., Potential Antitumor Agents .50. In vivo Solid-Tumor Activity of Derivatives of N-[2-(Dimethylamino)Ethyl]Acridine-4-Carboxamide. *J Med Chem* **1987**, *30* (4), 664-669.

115. Gourdie, T. A.; Prakash, A. S.; Wakelin, L. P. G.; Woodgate, P. D.; Denny, W. A., Synthesis and Evaluation of DNA-Targeted Spatially Separated Bis(Aniline Mustards) as Potential Alkylating-Agents with Enhanced DNA Cross-Linking Capability. *J Med Chem* **1991**, *34* (1), 240-248.
116. Singleton, S. F.; Dervan, P. B., Equilibrium Association Constants for Oligonucleotide-Directed Triple-Helix Formation at Single DNA Sites - Linkage to Cation Valence and Concentration. *Biochemistry-Us* **1993**, *32* (48), 13171-13179.
117. Lorente, A.; Vazquez, Y. G.; Fernandez, M. J.; Ferrandez, A., Bisacridines with aromatic linking chains. Synthesis, DNA interaction, and antitumor activity. *Bioorgan Med Chem* **2004**, *12* (16), 4307-4312.
118. Ancel, L.; Niedźwiecka, A.; Lebrun, C.; Gateau, C.; Delangle, P., Rational design of lanthanide binding peptides. *Comptes Rendus Chimie* **2013**, *16* (6), 515-523.
119. Wilson, B.; Gude, L.; Fernandez, M. J.; Lorente, A.; Grant, K. B., Tunable DNA photocleavage by an acridine-imidazole conjugate. *Inorg Chem* **2005**, *44* (18), 6159-6173.
120. Ancel, L.; Gateau, C.; Lebrun, C.; Delangle, P., DNA Sensing by a Eu-Binding Peptide Containing a Proflavine Unit. *Inorg Chem* **2013**, *52* (2), 552-554.
121. Wu, A. B.; Xu, Y. F.; Qian, X. H., Novel naphthalimide-amino acid conjugates with flexible leucine moiety as side chain: Design, synthesis and potential antitumor activity. *Bioorgan Med Chem* **2009**, *17* (2), 592-599.
122. Li, Z. G.; Yang, Q.; Qian, X. H., Novel thiazonaphthalimides as efficient antitumor and DNA photocleaving agents: Effects of intercalation, side chains, and substituent groups. *Bioorgan Med Chem* **2005**, *13* (16), 4864-4870.
123. Yang, Q.; Qian, X. H.; Xu, J. Q.; Sun, Y. S.; Li, Y. G., Thio-heterocyclic naphthalimides with aminoalkyl side chains: novel alternative tools for photodegradation of genomic DNA without impairment on bioactivities of proteins. *Bioorgan Med Chem* **2005**, *13* (5), 1615-1622.
124. Li, Z. G.; Yang, Q.; Qian, X. H., Novel 2-aminothiazonaphthalimides as visible light activatable photonucleases: effects of intercalation, heterocyclic-fused area and side chains. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15* (7), 1769-1772.
125. Gamble, A. B.; Garner, J.; Gordon, C. P.; O'Conner, S. M. J.; Keller, P. A., Aryl nitro reduction with iron powder or stannous chloride under ultrasonic irradiation. *Synthetic Commun* **2007**, *37* (16), 2777-2786.
126. Wang, Y.; Wu, Y. Z.; Tian, H., Synthesis of "donor-bridge-acceptor" triad compounds containing the aromatic sulfur bridges. *Dyes Pigments* **2000**, *44* (2), 93-100.

127. Bellamy, F. D.; Ou, K., Selective Reduction of Aromatic Nitro-Compounds with Stannous Chloride in Non-Acidic and Non-Aqueous Medium. *Tetrahedron Lett* **1984**, 25 (8), 839-842.
128. Lewis, E. S.; Chalmers, D. J., Reaction of diazonium salts with nucleophiles. XVII. Reaction of p-phenylenebisdiazonium ion with alcohols. *J Am Chem Soc* **1971**, 93 (13), 3267-3272.
129. Smith, M. B., March, J., *March's advanced organic chemistry*.
130. Micklitsch, C. M.; Yu, Q.; Schneider, J. P., Unnatural multidentate metal ligating alpha-amino acids. *Tetrahedron Lett* **2006**, 47 (35), 6277-6280.
131. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **1963**, 85 (14), 2149-&.
132. Smith, R. M.; Martell, A. E.; Standards, N. I. o.; Technology, *NIST critically selected stability constants of metal complexes database*. National Institute of Standards & Technology: 1998.
133. Adams, R. D.; Captain, B.; Zhu, L., Platinum participation in the hydrogenation of phenylacetylene by Ru-5(CO)(15)(C)[Pt(PBu3t)]. *J Am Chem Soc* **2004**, 126 (10), 3042-3043.
134. Adams, P. D.; Chen, Y.; Ma, K.; Zagorski, M. G.; Sönnichsen, F. D.; McLaughlin, M. L.; Barkley, M. D., Intramolecular Quenching of Tryptophan Fluorescence by the Peptide Bond in Cyclic Hexapeptides. *J Am Chem Soc* **2002**, 124 (31), 9278-9286.
135. Allen, K. N.; Imperiali, B., Lanthanide-tagged proteins - an illuminating partnership. *Curr Opin Chem Biol* **2010**, 14 (2), 247-254.
136. Kazakov, V. P.; Ostakhov, S. S.; Farrakhova, G. G., Photoinduced electron transfer from higher excited singlet states of tryprophan: 1. Effects of the excitation wavelength, pH, and temperature on quenching of Tryptophan fluorescence by europium(III) ions. *High Energy Chem* **2008**, 42 (4), 283-286.
137. Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Manet, I.; Bolletta, F.; Ziessel, R., Synthesis and Luminescence of Lanthanide Complexes of a Branched Macrocyclic Ligand Containing 2,2'-Bipyridine and 9-Methyl-1,10-phenanthroline Subunits. *Inorg Chem* **1994**, 33 (5), 955-959.
138. Horrocks, W. D.; Sudnick, D. R., Lanthanide Ion Probes of Structure in Biology - Laser-Induced Luminescence Decay Constants Provide a Direct Measure of the Number of Metal-Coordinated Water-Molecules. *J Am Chem Soc* **1979**, 101 (2), 334-340.
139. Winston, H.; Marsh, O. J.; Telk, C. L.; Suzuki, C. K., Fluorescence of Europium Thenoyltrifluoroacetate .1. Evaluation of Laser Threshold Parameters. *J Chem Phys* **1963**, 39 (2), 267-&.
140. Chauvin, A. S.; Comby, S.; Song, B.; Vandevyver, C. D. B.; Thomas, F.; Bunzli, J. C. G., A polyoxyethylene-substituted bimetallic europium helicate for luminescent staining of living cells. *Chem-Eur J* **2007**, 13 (34), 9515-9526.

141. Couchet, J. M.; Galaup, C.; Tisnes, P.; Picard, C., Improvement of stability and luminescence properties in water of Eu(III) and Tb(III) complexes photosensitized by a bipyridine antenna. *Tetrahedron Lett* **2003**, *44* (26), 4869-4872.
142. Breen, P. J.; Hild, E. K.; Horrocks, W. D., Spectroscopic Studies of Metal-Ion Binding to a Tryptophan-Containing Parvalbumin. *Biochemistry-Us* **1985**, *24* (19), 4991-4997.
143. Huang, W.; Wu, D. Y.; Guo, D.; Zhu, X.; He, C.; Meng, Q. J.; Duan, C. Y., Efficient near-infrared emission of a Ytterbium(III) compound with a green light rhodamine donor. *Dalton T* **2009**, (12), 2081-2084.
144. Faulkner, S.; Pope, S. J. A.; Burton-Pye, B. P., Lanthanide complexes for luminescence imaging applications. *Appl Spectrosc Rev* **2005**, *40* (1), 1-31.
145. Erkkila, K. E.; Odom, D. T.; Barton, J. K., Recognition and reaction of metalointercalators with DNA. *Chem Rev* **1999**, *99* (9), 2777-2795.
146. Waring, M. J., Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol* **1965**, *13* (1), 269-282.
147. Bolton, E. T.; Mccarthy, B. J., A General Method for Isolation of Rna Complementary to DNA. *P Natl Acad Sci USA* **1962**, *48* (8), 1390-&.
148. Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Biver, T.; Boggioni, A.; Bonacchi, S.; Danesi, A.; Giorgi, C.; Gratterer, P.; Ingrain, A. M.; Secco, F.; Sissi, C.; Valtancoli, B.; Venturini, M., DNA binding by a new metalointercalator that contains a proflavine group bearing a hanging chelating unit. *Chem-Eur J* **2008**, *14* (1), 184-196.
149. Qu, X. G.; Chaires, J. B., Analysis of drug-DNA binding data. *Method Enzymol* **2000**, *321*, 353-369.
150. Qu, X.; Chaires, J. B., Analysis of drug-DNA binding data. In *Methods in Enzymology*, Michael L. Johnson, L. B., Ed. Academic Press: 2000; Vol. Volume 321, pp 353-369.
151. Landry, Y. G., J.P, Pharmacologie Approche par liaison spécifique de l'affinité et de l'activité. In *Pharmacologie Des cibles vers l'indication thérapeutique*, Dunod, Ed. 2009; pp 473-491.
152. Selvakumar, B.; Rajendiran, V.; Maheswari, P. U.; Stoeckli-Evans, H.; Palaniandavar, M., Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper(II) complexes of iminodiacetic acid: The novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage. *J Inorg Biochem* **2006**, *100* (3), 316-330.
153. Bobba, G.; Bretonniere, Y.; Frias, J. C.; Parker, D., Enantiopure lanthanide complexes incorporating a tetraazatriphenylene sensitizer and three naphthyl groups: exciton coupling, intramolecular energy transfer, efficient singlet oxygen formation and perturbation by DNA binding. *Org Biomol Chem* **2003**, *1* (11), 1870-1872.

154. Bobba, G.; Frias, J. C.; Parker, D., Highly emissive, nine-coordinate enantiopure lanthanide complexes incorporating tetraazatriphenylenes as probes for DNA. *Chem Commun* **2002**, (8), 890-891.
155. Bogner, P.; Killeen, A., Extraction of Nucleic Acids. In *Molecular Diagnostics*, Coleman, W.; Tsongalis, G., Eds. Humana Press: 2005; pp 25-30.
156. Gupta, M.; Ali, R., Fluorescence Studies on the Interaction of Furocoumarins with DNA in the Dark. *J Biochem-Tokyo* **1984**, 95 (5), 1253-1257.
157. Garin, D.; Oukhatar, F.; Mahon, A. B.; Try, A. C.; Dubois-Dauphin, M.; Laferla, F. M.; Demeunynck, M.; Sallanon, M. M.; Chierici, S., Proflavine derivatives as fluorescent imaging agents of amyloid deposits. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, 21 (8), 2203-2206.
158. Bonnet, C. S.; Fries, P. H.; Crouzy, S.; Seneque, O.; Cisnetti, F.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Delangle, P., A Gadolinium-Binding Cyclodecapeptide with a Large High-Field Relaxivity Involving Second-Sphere Water. *Chem-Eur J* **2009**, 15 (29), 7083-7093.
159. Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenář, V., Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol Nmr* **1992**, 2 (6), 661-665.
160. Hancock, W. S.; Battersby, J. E., New Micro-Test for Detection of Incomplete Coupling Reactions in Solid-Phase Peptide-Synthesis Using 2,4,6-Trinitrobenzene-Sulphonic Acid. *Anal Biochem* **1976**, 71 (1), 260-264.