



**HAL**  
open science

# Synthèse de complexes originaux de ruthénium(II) à base de ligands étendus dérivés de phénanthroline, caractérisation photophysique et propriétés d'interaction avec les G-quadruplexes

Dounia Saadallah

► **To cite this version:**

Dounia Saadallah. Synthèse de complexes originaux de ruthénium(II) à base de ligands étendus dérivés de phénanthroline, caractérisation photophysique et propriétés d'interaction avec les G-quadruplexes. Biologie moléculaire. Université Grenoble Alpes; Université libre de Bruxelles (1970-..), 2016. Français. NNT : 2016GREAV036 . tel-01806476

**HAL Id: tel-01806476**

**<https://theses.hal.science/tel-01806476>**

Submitted on 3 Jun 2018

**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 LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES ET DE L'UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES**

**Préparée dans le cadre d'une cotutelle entre la *Communauté  
Université Grenoble Alpes et L'Université Libre de Bruxelles***

Spécialité : **Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Dounia Saadallah**

Thèse dirigée par **Dr. Martine Demeunynck**

Codirigée par **Prof. Cécile Moucheron**

préparée au sein du **Département de Pharmacochimie  
Moléculaire et du Laboratoire de Chimie Organique et  
Photochimie.**

dans **les Écoles Doctorales Chimie et Sciences du Vivant et  
Chimie moléculaire, supramoléculaire et fonctionnelle**

## **Synthèse de complexes originaux de Ruthénium(II) à base de ligands étendus dérivés de phénanthroline, caractérisation photophysique et propriétés d'interaction avec les G-quadruplexes**

Thèse soutenue le **2 décembre 2016 à Grenoble et le 22 décembre à  
Bruxelles**, devant le jury composé de :

**Dr. Vincent RAUSSENS** (Université Libre de Bruxelles, Président)

**Dr. Laurent BOUFFIER** (Université de Bordeaux, Rapporteur)

**Pr. Lionel DELAUDE** (Université de Liège, Rapporteur)

**Dr. Thierry DOUKI** (CEA-Grenoble, Examineur)

**Dr. David MONCHAUD** (Université de Bourgogne, Examineur)





# Remerciements

---

Une thèse c'est surtout une aventure humaine pleine de rencontres et d'anecdotes. Une cotutelle c'est encore mieux !

C'est pour cela que j'aimerais adresser mes premiers remerciements à mes deux directrices de thèse, le Dr. Martine Demeunynck et le Pr. Cécile Moucheron qui semblaient s'entendre sur tout sauf sur des questions d'orthographe. Martine, merci pour ta bienveillance et ton soutien (même à distance) qui m'ont permis d'avancer tout au long de ces trois années. Cécile, ton enthousiasme a été un moteur important et motivant pour l'avancée de ce travail. Merci à toutes deux de m'avoir accordé votre confiance pour réaliser ce beau projet.

Je tiens également à remercier Isabelle Baussanne pour son engagement dans ce projet. Pour moi, tu as dû sacrifier toute une série de ballons et de frittés qui sont maintenant roses à jamais. Merci également d'avoir participé à la dernière étape de cette thèse, la moins aisée, la rédaction.

Merci au Pr. Andrée Kirsch-De Mesmaeker qui m'a aidée à la préparation de mon concours lorsque j'étais encore en mémoire et avec qui j'ai pu discuter lors de ces passages au P2.

Cette thèse n'aurait pas été la même sans toutes les collaborations qui ont permis de mener à bien ce beau projet.

C'est donc tout naturellement que mes remerciements vont au Dr. David Monchaud et à son équipe pour m'avoir accueillie si chaleureusement dans leur laboratoire. Ces deux semaines ont été riches du point de vue scientifique mais également en rire et en bonne humeur. David, tu as réalisé un travail exceptionnel sur mes complexes et tu m'as transmis énormément même sur un séjour aussi court. Souheila, merci d'avoir passé ton été à prendre des clichés d'imagerie confocale ; et aussi, je me dois de le mentionner, de m'avoir prêté une de tes casseroles pendant mon séjour, je n'aurais pas pu manger sans toi ! Et je n'oublierai pas Marc qui est probablement une des personnes les plus gentilles que j'ai pu rencontrer au cours de cette thèse et qui, disons le, fait de meilleurs échantillons de FRET que moi. (P.S. Je vous ai même piqué votre motto, tellement je m'y suis reconnue).

Merci également au Dr. Murielle Chavarot pour ses conseils avisés et constructifs et pour m'avoir permis de passer dans son laboratoire au CEA. Et merci au Dr. Jean-François Lefebvre avec qui j'ai partagé le labo à Grenoble et les problèmes de synthèse, mais aussi de bons moments. Notre entraide a été bénéfique à tous points de vue.

J'adresse également mes remerciements aux différents groupes de Mons avec qui j'ai eu la chance de collaborer : aux Dr. Pascal Gerbaux et Dr. Julien De Winter qui ont eu la gentillesse de relever des spectres de masse haute résolution sur mes complexes et Dr. Vincent Lemauro pour les calculs qu'il est encore en train de réaliser.

Mes remerciements vont également aux membres de mes deux comités d'accompagnement (oui, deux ! Les joies de la cotutelle) : les Dr. Guillerme Evano et Dr. Vincent Raussens à Bruxelles et les Dr. Jean-François Constant et Dr. Olivier Hamelin à Grenoble. Nos discussions et vos conseils m'ont été d'une grande aide pour l'avancée de mes travaux et m'ont permis de faire le point à chacune des étapes de cette thèse.

Je souhaite également remercier les membres de mon jury et particulièrement les deux rapporteurs, qui ont bien voulu évaluer ce travail et se déplacer pour la soutenance.

Je n'oublierai pas mon unique mémorante, Ambre De Neyer, toujours de bonne humeur, qui a également bien contribué à ce travail. Ce fut un plaisir de travailler avec toi, j'ai beaucoup appris sur moi même en t'encadrant (j'espère ne pas avoir été trop tyrannique).

Je souhaite également adresser mes remerciements à toutes les équipes qui ont eu la gentillesse de relever les divers spectres nécessaires à mes caractérisations de produits :

L'équipe du CIREM et le Pr. Michel Luhmer qui gère d'une main de maître son service et qui a tout de même accordé un peu de son temps pour certaines mesures RMN sur mes complexes. Rita et Lidija, merci pour tous les relevés de spectres que vous avez faits pour moi, que ce soit sur le 300, le 400 ou même le 600 MHz. Partager avec vous le dernier étage du P2 a été un plaisir.

Les membres du plateau RMN à Grenoble et particulièrement Marie-Carmen Molina qui a eu la gentillesse de relever des spectres pour moi, même quand j'étais à 800 km de là.

Marc Pamart qui s'occupe du spectromètre de masse de routine et qui est toujours disponible pour régler les problèmes de cette satanée machine.

Je remercie également les deux personnes sans qui le P2 ne tournerait pas : Mohamed Mahjoubi pour nous avoir aidé à régler tous les petits et gros problèmes du laboratoire, ton acharnement et tes talents de négociateur nous ont sauvés plus d'une fois ! Et Jessica Knaepenbergh pour m'avoir aidé dans mes diverses démarches administratives et également pour nos petites discussions hebdomadaires.

De même, je remercie Pascale Battistoni pour m'avoir aidé avec toute cette paperasse française qui dépasse la pauvre belge que je suis et Antoine Fortuné pour les questions informatiques qui me dépassent tout autant.

Et maintenant je tiens à remercier toutes les personnes qui n'ont pas participé directement à ce projet mais sans qui cette aventure n'aurait pas été la même. Cette cotutelle m'a permis de rencontrer des personnes exceptionnelles :

Les filles à Grenoble ! Emma (et Bernard), merci de m'avoir accueillie à de nombreuses reprises sur ton (votre) canapé ; en acceptant comme loyer un unique (mais non des moindres) paquet d'orangettes ! Flavia, parce que même quand ça ne va pas, ça va ! Ta bonne humeur est inébranlable et ça, c'est juste fabuleux. Florine, ta gentillesse est incomparable mais pas que ... c'est pas compliqué, je ne t'ai pas encore trouvé de défauts ! Vous m'avez accueillie dans un laboratoire que je ne connaissais pas, dans une ville que je ne connaissais pas, et ce, depuis le premier jour ! Grâce à vous, j'ai découvert les bons produits du terroir, particulièrement le vin (à

vrai dire, surtout grâce à Flavia, ce qui est étonnant quand on sait qu'elle est Brésilienne). On a vécu ensemble l'aventure « Dance Your PhD », on a fait des randonnées, on a rigolé, vous avez été coincées dans mon ascenseur, et on a même skié ! Merci pour tout et à bientôt, où que ce soit dans le monde !

Vinicius, nous nous sommes trouvés ! Il aura fallu moins de deux mois pour qu'on pense se connaître depuis des années ! Je suis tellement contente de t'avoir rencontré et ne t'inquiète pas, on ira fêter le carnaval au Brésil ensemble !

Les autres doctorants, Post-Doctorants et anciens du DPM et du DCM : Momo, Laurent, Sam et Kim (mes colocos d'un temps), David, Cédric, Roseline, Mat, Nono, Jean-Robert et Simon. Vous êtes tous au top et j'ai adoré passer ces quelques temps avec vous !

Les permanents du DPM, et surtout Serge et Yung pour être restés si souvent tard au labo pour nous permettre de travailler ; Benjamin pour être le moteur de ce laboratoire et pour avoir organisé les midis Ultimate bien sympatiques, et qui était également toujours là pour relever tous mes petits belgicisms. Ahcène, Basil, Romain, Marie-Ange, ... Merci également à tous d'avoir bien voulu participé à « Dance Your PhD » et à toutes les répétitions !

Mes collocos, Julia et Clémentine. Je n'aurais jamais imaginé que vivre en co-location pourrait être aussi sympa ! Vivement qu'on se refasse une soirée « Danse avec les Stars » (même par Skype).

Évidemment, je tiens aussi à remercier toutes les personnes du côté belge :

Les collègues du P2, Kevin et Gaétan, les inséparables qui ne manquent pas une occasion de se moquer de ma petite tendance à négliger les démarches administratives, de mon salaire ou encore de mon rire. Bref, un peu de tout... mais toujours avec bonne humeur. Sofia, avec qui j'ai partagé un bureau et toutes les galères associées à la thèse, mais également des bons moments, des sorties et même des voyages (que ce soit en Pologne ou à Mons). Jérôme qui m'a accompagnée depuis le mémoire, qui m'a supportée dans mes mauvais jours et qui m'a même nourrie quand ça n'allait pas (et oui, il paraît que je suis un hérisson) !

Les anciens, Ludo et Lio, toujours prêts à nous aider même quand ils sont à 9000 km de Bruxelles et toujours prêts à aller boire un verre après le labo quand ils y passent.

Les ingénieurs de l'étage d'en dessous avec qui j'ai partagé le labo, quelques midis et surtout les drinks et les repas de Noël !

Les membres du bâtiment U, auxquels je rendais visite à chaque passage à la masse.

Les amis qui ne m'ont pas quittée depuis la première année à l'université et d'autres depuis bien plus longtemps : depuis les secondaire ou même la cinquième primaire. Mes amies de longue date, Lénaïs (qui a mis à contribution ses talents de linguiste pour rendre ces remerciements plus agréables à lire) et Gohar (la future star), avec qui j'ai grandi et qui ne m'ont jamais lâchée depuis !

Je tiens à adresser mes derniers remerciements à ma famille et à mes parents ! C'est difficile de trouver les mots tellement ma gratitude est immense. C'est surtout grâce à vous, grâce à votre soutien inconditionnel et à vos encouragements que je suis arrivée là où j'en suis

aujourd'hui. Vous avez fait le travail le plus important parce c'est vous qui m'avez donné la force, tous les jours, d'avancer un peu plus ! Merci pour tout !

Et bien sûr, merci à Jean-Paul. Merci pour tout, tout simplement ! Vivre à tes côtés tous les jours est devenu une évidence pour moi. Tu as rendu ces dernières années tellement plus faciles et tellement plus intéressantes. Tu m'as soutenue, réconfortée, aimée, comprise, encouragée et même parfois poussée à dépasser mes limites. Merci d'avoir été là.

J'espère n'avoir oublié personne. Ces trois années ont été riches en découvertes, scientifiques et humaines. Et cela, grâce à vous tous. Encore une fois, merci pour tout.

Dounia

# Table des matières

---

## CHAPITRE I – Introduction générale

<b>1</b>	<b>Utilisation thérapeutique de complexes de métaux lourds</b> .....	<b>2</b>
1.1	Médicaments à base de métaux lourds .....	2
1.2	La photothérapie .....	6
1.3	Interaction et réactions des complexes polyazaaromatiques de ruthénium <sup>II</sup> avec l'ADN sous l'effet de la lumière .....	9
<b>2</b>	<b>Objectifs du travail</b> .....	<b>13</b>
2.1	Synthèse des complexes .....	13
2.2	Propriétés photophysiques .....	15
2.3	Interaction avec les quadruplexes G4 .....	16

## CHAPITRE II – Synthèse des complexes $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$

<b>1</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>22</b>
1.1	Synthèse des complexes polyazaaromatiques de ruthénium <sup>II</sup> .....	22
1.2	Synthèse de composés de type dipyrido[3,2- <i>a</i> :2',3'- <i>c</i> ]quinolino[2,3- <i>h</i> ]phénazine (dpqp) et dipyrido[3,2- <i>a</i> :2',3'- <i>c</i> ]pyrido[2,3,4- <i>de</i> ]quinolino[3,2- <i>h</i> ]phénazine (dppqp) .....	24
<b>2</b>	<b>Résultats et discussions</b> .....	<b>26</b>
2.1	Stratégie de synthèse .....	26
2.2	Synthèse par « chimie sur complexe » .....	31
2.2.1	Synthèse des précurseurs .....	31
2.2.2	$[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$ .....	34
2.2.3	$[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$ .....	41

## CHAPITRE III – Étude photophysique des complexes $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-R}]^{2+}$ et $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$

<b>1</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>61</b>
1.1	Principes fondamentaux de la photophysique des complexes polyazaaromatiques de ruthénium <sup>II</sup> .....	61
1.2	Applications des propriétés photophysiques des complexes polyazaaromatiques de ruthénium <sup>II</sup> .....	64
1.2.1	Les complexes de ruthénium <sup>II</sup> « light-switch » à ligands plan étendus .....	65

1.2.2	Propriétés photochimiques des complexes de ruthénium .....	66
<b>2</b>	<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>67</b>
<b>2.1</b>	<b>[Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-OH]<sup>2+</sup> - un complexe non luminescent.....</b>	<b>67</b>
2.1.1	Spectroscopie d'absorption UV-visible .....	67
2.1.2	Voltampérométrie cyclique .....	72
2.1.3	Maxima d'émission, rendements quantiques et temps de vie de l'état excité..	73
2.1.4	Emission en fonction de la longueur d'onde d'excitation.....	75
<b>2.2</b>	<b>Autres complexes - [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-Cl]<sup>2+</sup>, l'exception de la série .....</b>	<b>78</b>
2.2.1	Etudes photophysiques de [Ru(L) <sub>2</sub> dpqp-DMEA] <sup>2+</sup> et [Ru(L) <sub>2</sub> dppqp] <sup>2+</sup> .....	78
2.2.2	Etudes photophysiques de [Ru(L) <sub>2</sub> dpqp-Cl] <sup>2+</sup> .....	81
2.2.3	[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-Br] <sup>2+</sup> – Un second complexe « light-switch ».....	86
<b>2.3</b>	<b>Illumination stationnaire .....</b>	<b>87</b>
2.3.1	Illumination stationnaire menée sur les complexes [Ru(L) <sub>2</sub> dpqp-OH] <sup>2+</sup> et [Ru(L) <sub>2</sub> dpqp-Cl] <sup>2+</sup> .....	88
2.3.2	Illumination stationnaire menée sur le [Ru(L) <sub>2</sub> dpqp-DMEA] <sup>2+</sup> .....	89
2.3.3	Illumination stationnaire menée sur le [Ru(L) <sub>2</sub> dppqp] <sup>2+</sup> .....	90

## CHAPITRE IV – Complexes de Ru<sup>II</sup> en interaction avec les G-quadruplexes

<b>1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>106</b>
1.1	Les G4 - Structures particulières de l'ADN .....	106
1.2	Les G4 - Cibles thérapeutiques ? Quel rôle dans le génome ? .....	108
1.2.1	Les quadruplexes G4 dans les télomères.....	109
1.2.2	Les G4 impliqués dans l'expression des gènes.....	110
1.2.3	Instabilité génétique causée par les G4.....	111
1.3	Ligands de quadruplexes G4 et modes d'interaction .....	112
<b>2</b>	<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>114</b>
<b>2.1</b>	<b>Etude de stabilisation des quadruplexes G4 par méthode de FRET-Melting</b>	<b>114</b>
2.1.1	« FRET-melting » - Méthode.....	114
2.1.2	Résultats .....	117
<b>2.2</b>	<b>Etude de l'interaction complexe-G4 par luminescence .....</b>	<b>126</b>

## CHAPITRE V – Synthèse d'un complexe fonctionnalisé par une triple liaison : applications à la chimie « click »

<b>1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>138</b>
1.1	Le concept de chimie « click » - Applications en biologie.....	138
1.2	Cycloaddition 1,3-dipolaire avec les ylures de pyridinium .....	142
<b>2</b>	<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>143</b>
2.1	Synthèse de $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Am}]^{2+}$ par chimie sur complexe .....	143
2.2	Synthèse d'un pérylène fonctionnalisé .....	148

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 158

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

<b>1</b>	<b>Produits et solvants.....</b>	<b>166</b>
<b>2</b>	<b>Synthèses et caractérisations .....</b>	<b>166</b>
2.1	Synthèse des ligands.....	166
2.1.1	Synthèse du 1,4,5,8-tétraazaphénanthrène (TAP).....	166
2.1.2	Synthèse de la 10H-3,4-diamino-7-éthoxy-9-acridone et de la 12-hydroxy-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a :2',3'-c]quinolino[2,3-h]phenazine.....	168
2.2	Synthèse des complexes .....	171
2.3	Synthèse du pérylène fonctionnalisé par un pyridinium .....	181
<b>3</b>	<b>Techniques expérimentales.....</b>	<b>184</b>
3.1	Spectroscopie d'absorption UV-Visible.....	184
3.2	Spectroscopie d'émission stationnaire .....	184
3.2.1	Détermination des rendements quantiques .....	185
3.2.2	Titration par CT-DNA.....	185
3.2.3	Expérience de Stern-Volmer .....	185
3.3	Illumination stationnaire .....	186
3.4	Spectroscopie résolue dans le temps.....	186
3.5	Spectrométrie de masse .....	186
3.6	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire .....	187
3.7	Réacteur micro-onde.....	187
3.8	Chromatographie Liquide Haute Performance .....	187
3.9	FRET Melting Assays.....	187
<b>4</b>	<b>Annexes.....</b>	<b>189</b>

# Liste des abréviations

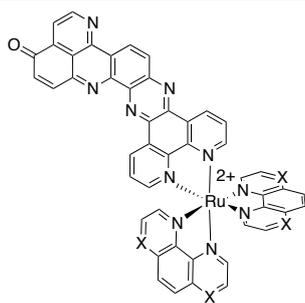
---

A	Absorbance
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
BET	Back Electron Transfer
bpy	2,2'-bipyridine
bpz	2,2'-bipyrazine
CAN	Cerium Ammonium Nitrate
COSY	Correlation Spectroscopy
CT DNA	Calf Thymus DNA
CuAAC	Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
dd	Doublet dédoublé
DFT	Density Functional Theory
DIC	Differential Interference Contrast
DMA	N,N-Diméthylacétamide
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dppz	Dipyrido[3,2-a :2',3'-c]phénazine
dpqp-OH	12-hydroxy-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a :2',3'-c]quinolo[2,3-h]phénazine
dpqp-Cl	12-chloro-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a :2',3'-c]quinolo[2,3-h]phénazine
dpqp-DMEA	12-(2,2-diméthoxyéthyl)amino-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a :2',3'-c]
dpqpp	15-éthoxy-dipyrido[3,2-a :2',3'-c]quinolo[2,3-h]pyrido[2,3,4-jk]phénazine
ESI-MS	Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
ESIPT	Excited State Intramolecular Proton Transfer
FAM	Fluorescein phosphoramidite
FDA	Food and Drug Administration
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	Guanine
G4	Quadruplexe de guanines
GMP	Guanosine Monophosphate
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
ILCT	Intra Ligand Charge Transfer
ISC	Inter System Crossing

IR	Infra-Rouge
LC	Ligand Centered
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
m	Multiplet
MALDI-ToF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight
MC	Metal Centered
MLCT	Metal to Ligand Charge Transfer
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NMP	1-Méthyl-2-pyrrolidinone
ODN	Oligodéoxynucléotide
PCT	Photo-Chimiotherapy
PDT	Photo-Dynamic Therapy
PHEHAT	1,10-phénanthrolino[5,6-b]1,4,5,8,9,12-hexaazatriphénylène
phen	1,10-phénanthroline
phendione	1,10-phénanthroline-5,6-dione
PQS	Putative Quadruplex Sequences
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
s	Singulet
SPC	Single Photon Counting
TAMRA	5-Carboxytétraméthylrhodamine
TAP	1,4,5,8-Tétraazaphénanthrène
TFA	Acide trifluoroacétique
TLC	Thin Layer Chromatography
tpac	Tétrapyrido[3,2-a:2',3'-c:3'',2''-h:2''',3'''-j]acridine
tpphz	Tétrapyrido[3,2-a:2',3'-c:3'',2''-h:2''',3'''-j]phénazine
Tris HCl	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane hydrochloride
UV	Ultraviolet
vis	Visible
$\epsilon$	Coefficient d'absorption molaire
$\tau$	Temps de vie
$\Phi$	Rendement quantique

## Structure des complexes et nomenclature associée

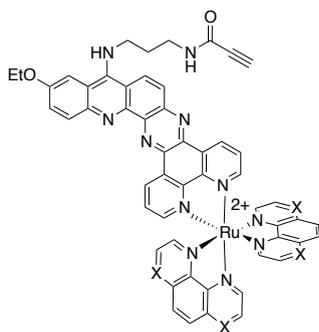
Structure	Nomenclature
	<p>Composé <b>29</b> : <math>[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}</math></p> <p><math>X = \text{CH}</math> : <b>29<sub>phen</sub></b>  <math>[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}</math>  <math>\text{RP}_2\text{OH}</math></p> <p><math>X = \text{N}</math> : <b>29<sub>TAP</sub></b>  <math>[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}</math>  <math>\text{RT}_2\text{OH}</math></p>
	<p>Composé <b>30</b> : <math>[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}]^{2+}</math></p> <p><math>X = \text{CH}</math> : <b>30<sub>phen</sub></b>  <math>[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}]^{2+}</math>  <math>\text{RP}_2\text{DPP}</math></p> <p><math>X = \text{N}</math> : <b>30<sub>TAP</sub></b>  <math>[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}]^{2+}</math></p>
	<p>Composé <b>39</b> : <math>[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}</math></p> <p><math>X = \text{CH}</math> : <b>39<sub>phen</sub></b>  <math>[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}</math>  <math>\text{RP}_2\text{Cl}</math></p> <p><math>X = \text{N}</math> : <b>39<sub>TAP</sub></b>  <math>[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}</math></p>
	<p>Composé <b>40</b> : <math>[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-DMEA}]^{2+}</math></p> <p><math>X = \text{CH}</math> : <b>40<sub>phen</sub></b>  <math>[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-DMEA}]^{2+}</math>  <math>\text{RP}_2\text{DMEA}</math></p> <p><math>X = \text{N}</math> : <b>40<sub>TAP</sub></b>  <math>[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-DMEA}]^{2+}</math></p>
	<p>Composé <b>55</b> : <math>[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-Br}]^{2+}</math></p> <p><math>X = \text{CH}</math> : <b>55<sub>phen</sub></b>  <math>[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Br}]^{2+}</math>  <math>\text{RP}_2\text{Br}</math></p> <p><math>X = \text{N}</math> : <b>55<sub>TAP</sub></b>  <math>[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-Br}]^{2+}</math></p>



Composé **56** :  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$

$X = \text{CH}$  : **56<sub>phen</sub>**  
 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$

$X = \text{N}$  : **56<sub>TAP</sub>**  
 $[\text{Ru}(\text{TAP})\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$



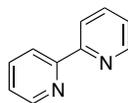
Composé **57** :  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-Am}]^{2+}$

$X = \text{CH}$  : **57<sub>phen</sub>**  
 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Am}]^{2+}$   
 RP<sub>2</sub>Am

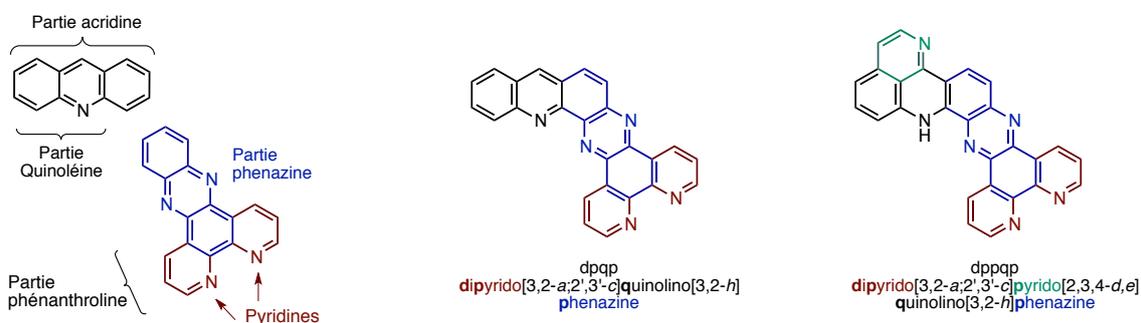
$X = \text{N}$  : **57<sub>TAP</sub>**  
 $[\text{Ru}(\text{TAP})\text{dpqp-Am}]^{2+}$

Dans ce travail, les complexes possèdent des contre-ions chlorure ou hexafluorophosphate. L'écriture sans contre-ion signifie que les deux formes sont présentées : en chlorure si la mesure est réalisée dans l'eau et en hexafluorophosphate si la mesure est réalisée dans l'acétonitrile.

Les composés en série bpy sont notés  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Ligand}]^{2+}$  et possèdent des ligands ancillaires dont la structure correspond à :



Le ligand correspond à la condensation entre une acridine et une phénanthroline avec création d'un nouveau cycle aromatique. Ce ligand est donc considéré en plusieurs parties auxquelles nous ferons appel à plusieurs endroits de cette thèse. Les différentes parties considérées sont représentées ci-dessous :



*« The most exciting phrase to hear in  
science, the one that heralds new  
discoveries, is not « Eureka » but  
« ~~That's funny~~ ... »  
« What's that mess !?! » »*

Isaac Asimov

# *Chapitre I : Introduction générale*

# Introduction générale

## 1 Utilisation thérapeutique de complexes de métaux lourds

### 1.1 Médicaments à base de métaux lourds

La majorité des médicaments utilisés actuellement sont issus de la synthèse organique ou sont d'origine naturelle (alcaloïdes par exemple) et on n'en trouve que peu à base de métaux.[1] Certains composés organométalliques sont pourtant largement utilisés en milieu clinique et ont prouvé leur efficacité au cours des années. Comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre, divers métaux, prometteurs, offrent des possibilités nouvelles aux thérapies actuelles.[1]

Les métaux, comme l'or ou le mercure, ont également été utilisés à des fins médicales depuis plusieurs centaines d'années. Ces utilisations étaient néanmoins généralement plus néfastes pour le patient que curatives.[2]

Parmi les premiers médicaments efficaces à base de métaux, le Salvarsan (Figure 1.1) a été découvert par Paul Ehrlich (prix Nobel 1908) pour le traitement de la syphilis.[3],[4] Ce composé, à base d'arsenic, est le premier médicament de synthèse capable de traiter une maladie infectieuse. A l'époque de son utilisation en tant qu'agent thérapeutique, sa structure n'était pas totalement connue et ce n'est que récemment que certaines propositions de structures furent publiées.[5] Suite à sa commercialisation en 1910, le succès du Salvarsan fut phénoménal jusqu'à l'apparition de la pénicilline vers 1940.[6],[7]

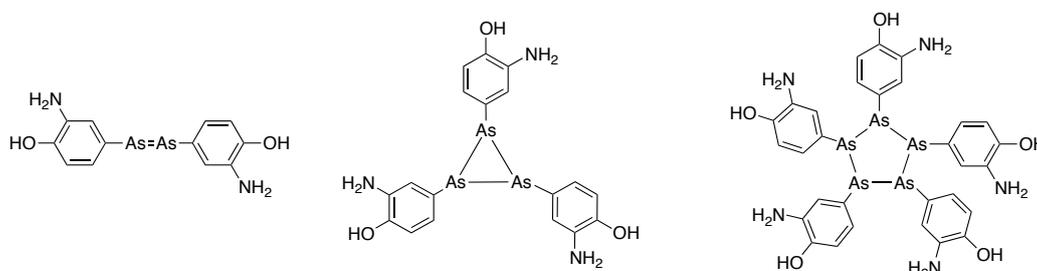
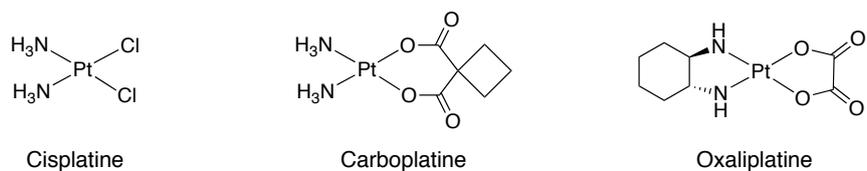


Fig. 1.1. Structures possibles du Salvarsan.[5]

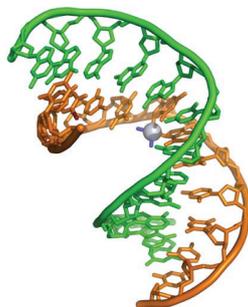
Le Salvarsan est inactif sous sa forme administrée, et ce n'est qu'une fois oxydé dans le corps sous la forme  $Ar-As=O$  qu'il est cytotoxique. Le salvarsan est donc également l'une des premières prodrogues[5]–[7]

Le second « grand » principe actif à base de métal est le cis-platine pour le traitement de nombreux types de cancer. Ce composé, approuvé par la FDA en 1978, et ses dérivés sont encore utilisés aujourd'hui en chimiothérapie et font partie des traitements standards administrés aux patients après chirurgie (Figure 1.2).



*Fig. 1.2. Structures du cisplatine, du carboplatine et de l'oxaliplatine*

L'effet du cis-platine a été découvert par un heureux hasard en 1965 par B. Rosenberg et L. VanCamp lors de leurs études sur l'effet de champs électriques sur *E. Coli*. [8],[9] A l'instar du Salvarsan, le mécanisme d'action du cisplatine implique sa transformation en  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$  et en  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$  une fois internalisé. Il est alors capable de former des liens covalents avec des purines (A ou G) adjacentes sur un même brin d'ADN (positions 1,2 ou 1,3), causant ainsi des déformations structurales du double brin (Figure 1.3). L'ADN est alors incapable de se répliquer et, par conséquent, la cellule de se diviser. [10]



*Fig. 1.3. Structure cristalline de  $d(\text{CCU}^{\text{Br}}\text{CTG}^*\text{G}^*\text{TCTCC})-d(\text{GGAGACCAGAGG})$  dont deux guanines adjacentes  $\text{G}^*$  sont liées au cisplatine ( $\text{U}^{\text{Br}}$  correspond à un uracile bromé). Structure déterminée par cristallographie aux rayons X (code PDB : 1AIO). [11], [12]*

Cependant, le cisplatine est également très toxique pour les cellules saines, même si, comme pour la majorité des agents anti-cancéreux, les cellules cancéreuses seront principalement touchées à cause de leur rythme de réplication plus important. Les effets secondaires pour les patients sont donc importants et très désagréables. De plus, certains cancers peuvent développer des mécanismes de résistance vis-à-vis du cisplatine. Afin de trouver des traitements alternatifs tout aussi efficaces, les recherches se sont tournées vers l'élaboration de nombreux dérivés, également à base de platine, mais moins cytotoxiques que le cisplatine. Le Carboplatine et l'Oxaliplatine sont ainsi déjà utilisés mondialement dans les traitements pour les cancers du colon, de l'ovaire, des poumons,... D'autres molécules, dérivées du cis-platine, sont encore en cours d'essais cliniques. [1], [10]

Une nouvelle génération de dérivés de cisplatine a montré des effets cytotoxiques par formation d'adduits de « coordination-intercalation ». En effet, ces dérivés ne se lient qu'une fois à l'ADN (mono-adduit covalent) mais comportent une acridine, hétérocycle plan connu pour s'intercaler entre les paires de bases de l'ADN (Figure 1.4).

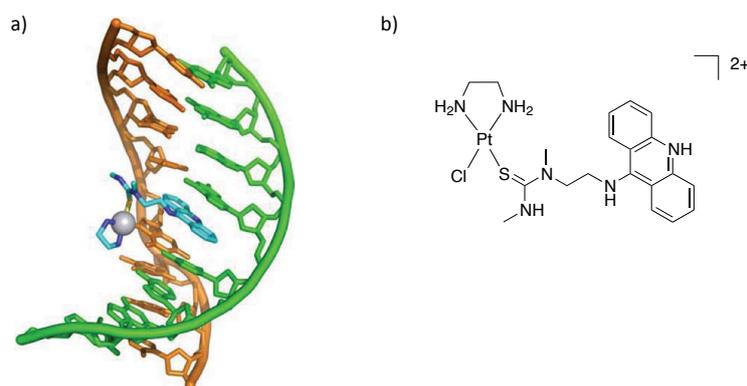


Fig. 1.4. a) Structure du complexe formé par le  $d(\text{CCTCG}^*\text{TCC})\text{-}d(\text{GGAGCAGG})$  et un dérivé de cisplatine comportant une acridine, b) Structure de ce même dérivé de cisplatine. [11]

Leur cytotoxicité étant comparable voire parfois supérieure à celle du cisplatine, ces nouveaux composés sont donc également prometteurs comme agents anticancéreux.[13],[14]

Deux alternatives prometteuses au platine sont l'or et le ruthénium. En effet, plusieurs complexes de ces métaux sont actuellement étudiés pour pouvoir remplacer les dérivés de cisplatine et réduire les effets secondaires liés à la prise de ces derniers puisque ces composés sont moins cytotoxiques envers les cellules saines.[11] Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement aux différents complexes de ruthénium en cours d'essais cliniques.

Le premier complexe de ruthénium à être entré en essais cliniques, actuellement en phase II, est le NAMI-A (*trans*-[tétrachloro(DMSO)(imidazole)ruthénate(III)] (Figure 1.5). Ce composé est un agent anti-métastatique, c'est à dire qu'il a peu d'effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses mais est capable d'inhiber la progression des métastases d'un cancer.[15],[16] Le NAMI-A est d'ailleurs particulièrement sélectif envers les métastases par rapport à la tumeur primaire et est donc utilisé en combinaison avec d'autres médicaments comportant des agents cytotoxiques comme le 5-fluorouracile.[17] Son mécanisme d'action n'est pas encore clairement élucidé mais il semble capable d'inhiber l'angiogenèse, phénomène indispensable pour la croissance des cellules cancéreuses.[18]

Un second complexe à base de ruthénium<sup>III</sup> à être entré en phase d'essais cliniques est le KP1019 (Figure 1.5). Il est assez similaire structurellement au NAMI-A mais n'opère étonnamment pas de la même manière puisqu'il s'agit d'un agent cytotoxique efficace sur les tumeurs primaires, particulièrement sur les tumeurs colorectales. Ce composé pourrait constituer une alternative au cisplatine puisqu'il a démontré son efficacité sur des tumeurs résistantes à ce dernier. Son mode d'action n'est pas encore totalement décrit mais est toutefois différent du cisplatine puisqu'il ne semble pas s'attaquer directement à l'ADN. [19]–[22]

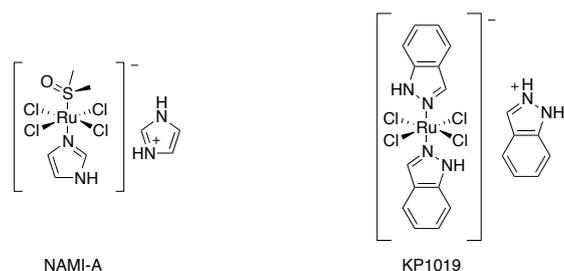


Fig. 1.5. Structures de deux complexes de ruthénium en essais cliniques, le NAMI-A et le KP1019

Il a été proposé que la forme réduite de ces composés ( $\text{Ru}^{\text{II}}$ ) est en réalité la forme active du complexe. A nouveau, ces composés sont administrés en tant que prodrogues et c'est probablement ce point qui rend les traitements moins lourds que ceux à base de cisplatine. En effet, le milieu dans lequel se trouvent les tumeurs est hypoxique à cause d'un défaut en approvisionnement sanguin ;[23] il est dès lors plus réducteur que dans les tissus sains et la réduction du ruthénium<sup>III</sup> en ruthénium<sup>II</sup> y est ainsi favorisée.[24]–[26]

Une nouvelle génération, dérivée de complexes de ruthénium<sup>II</sup>-arènes (Figure 1.6), est très prometteuse mais n'est pas encore entrée en essais cliniques. Les composés de tête de cette série sont le RAPTA-C et le RAPTA-T. Bien que très différents du NAMI-A, à l'exception de la présence de ruthénium, ces composés possèdent le même effet anti-métastatique et ne manifestent qu'une faible cytotoxicité *in vitro*. [27] Ils possèdent également des propriétés anti-angiogéniques.[28] Leur mécanisme d'action semble reposer sur l'interaction entre le complexe et certaines protéines cruciales pour la prolifération des cellules.[29], [30]

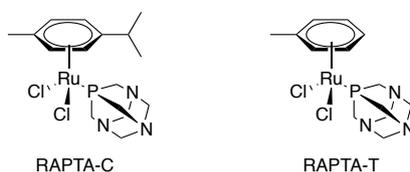


Fig. 1.6. Structures de complexes de ruthénium<sup>II</sup>-arènes, le RAPTA-C et le RAPTA-T

De nombreux autres dérivés  $\text{Ru}^{\text{II}}$ -arène ont été synthétisés et certains d'entre eux montrent un caractère cytotoxique comparable à celui des dérivés du cisplatine et sont donc également étudiés comme agents anti-cancéreux potentiels.[31]–[34]

Enfin, nous ne pouvons pas être exhaustif en ce qui concerne les différents métaux utilisés à des fins thérapeutiques car ce n'est pas le but de ce travail, néanmoins nous pouvons citer quelques utilisations remarquables : l'or pour le traitement de l'arthrite, l'étain contre le diabète et l'argent comme antiseptique.[1], [35]–[38] Bien qu'encore négligés par les industries pharmaceutiques, les complexes à base de métaux ont prouvé leur utilité dans des domaines variés et ce domaine de recherche mérite d'être encore approfondi.

## 1.2 La photothérapie

Comme cela a été montré dans le point précédent, les complexes à base de métaux lourds ont prouvé leur efficacité en thérapie quand ils sont utilisés seuls. Une seconde application possible des complexes est leur utilisation en combinaison avec la lumière.

L'usage de la lumière a également une longue histoire dans le domaine thérapeutique mais ce n'est qu'avec les travaux de Finsen pour lesquels il reçut le prix Nobel en 1903 que la photothérapie prit de l'importance. Il faudra néanmoins attendre les années 1970-80 pour voir émerger les premiers traitements photodynamiques sur des patients atteints de cancer. Le premier photosensibilisateur à avoir été mis sur le marché est le Photophrin® (Figure 1.7) pour le traitement du cancer de l'œsophage ou de certains types de cancers du poumon.[39] Il ne s'agit pas d'un complexe mais d'un polymère de porphyrines ; ce composé est le plus utilisé en PDT (Photo-Dynamic Therapy) et la majorité des autres agents photosensibilisateurs développés actuellement sont des dérivés de ce dernier.[40] Il a également été essayé d'incorporer des métaux aux photosensibilisateurs dérivés de porphyrine. En effet, l'ajout d'un métal permet de moduler les propriétés photophysiques d'une porphyrine.[41] Dans certains cas, cela a permis d'améliorer l'efficacité du photosensibilisateur, principalement grâce à une augmentation du rendement quantique d'« Inter-system Crossing » (ISC - décrit plus loin).[41]

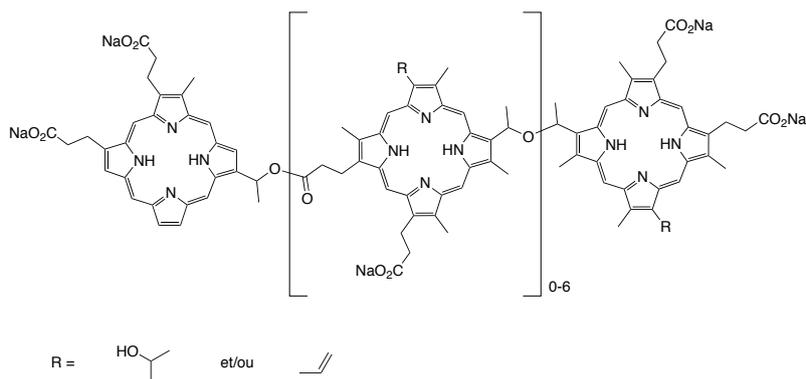


Fig. 1.7. Structure du Photophrin®

Trois éléments sont essentiels en PDT : la présence d'un photosensibilisateur dans la tumeur, l'oxygène dissous dans les tissus et la lumière sur la zone à traiter. Le photosensibilisateur, inerte dans le corps (dans le noir), s'active quand il est illuminé.

En effet, le photosensibilisateur, sous l'effet de la lumière, passe à un état triplet excité grâce à un processus « d'inter-system crossing » (ISC) à partir d'un état singulet excité (Figure 1.8). Cet état triplet possède généralement une durée de vie assez longue (centaine de nanosecondes) puisqu'il doit transgresser les règles de conservation du spin pour retourner à son état fondamental (phosphorescence).

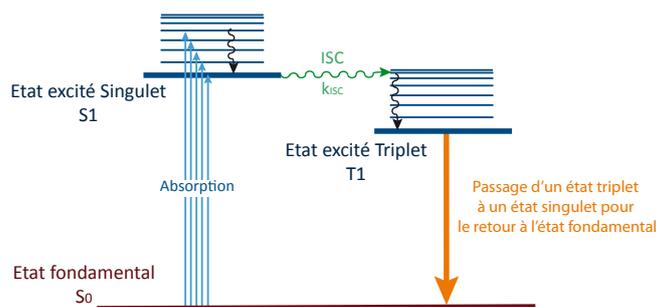


Fig. 1.8. Processus d'ISC responsable du passage de l'état excité singulet à l'état excité triplet

Du fait de cette présence prolongée d'un état triplet excité, le photosensibilisateur est capable de modifier l'oxygène présent dans les cellules. Plus précisément, le dioxygène à son état fondamental triplet ( $^3\text{O}_2$ ) passe à l'état excité sous la forme d'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) par transfert d'énergie avec le photosensibilisateur excité qui, lui, retombe à son état fondamental. Un second mécanisme est également présent et produit des espèces radicalaires d'oxygène (ROS) par transfert d'électron à partir du photosensibilisateur excité. L'oxygène singulet, ainsi que les ROS, sont des espèces extrêmement réactives capables d'endommager les cellules et par conséquent de détruire les tissus cancéreux illuminés.[42]

D'autres alternatives sont étudiées pour remplacer les molécules à base de porphyrine.[40],[43] Parmi elles, les complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> possèdent les caractéristiques requises pour une utilisation en tant que photosensibilisateur. En effet, plusieurs études sur la photophysique du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  (Figure 1.9) et de ses dérivés, ont montré que ces complexes sont capables de photosensibiliser l'oxygène.[44]–[46]

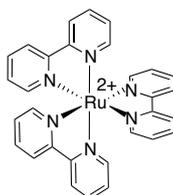


Fig. 1.9. Structure du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$

Ces complexes présentent l'avantage d'être généralement solubles et stables en milieux aqueux, même sous illumination. Leurs structures, ainsi que leurs propriétés photophysiques sont facilement modifiables par la variation des ligands entourant le centre métallique.[44],[47]

Bien que les traitements utilisés actuellement en PDT soient assez efficaces, l'utilisation d'oxygène dans un environnement pauvre en oxygène (phénomène d'hypoxie dans les cellules cancéreuses) semble assez paradoxale. C'est pourquoi certaines recherches en photothérapie se tournent également vers d'autres méthodes n'impliquant pas la présence d'oxygène dans le mécanisme thérapeutique. On ne parle alors plus de PDT mais de PCT (photo-chimiothérapie). De nombreux principes actifs à base de métaux sont ainsi étudiés et semblent très prometteurs pour le développement de nouveaux traitements. [48]–[50]

Par exemple, plusieurs complexes de ruthénium ont montré qu'ils pouvaient, sous l'effet de la lumière, perdre l'un de leurs ligands.[43],[48] Il est donc possible d'obtenir des molécules réactives et cytotoxiques après illumination à partir d'une espèce inerte en milieu biologique. Le  $[\text{Ru}(\text{tpy})(5\text{CNU})_3]^{2+}$  développé par le groupe de Turro est une illustration parlante de ce domaine de recherche puisque le complexe, inerte en présence d'ADN, peut libérer le 5-cyanouracile, structurellement parent avec le 5-fluorouracile (agent thérapeutique utilisé dans le traitement de certains cancers) (Figure 1.10).[51]

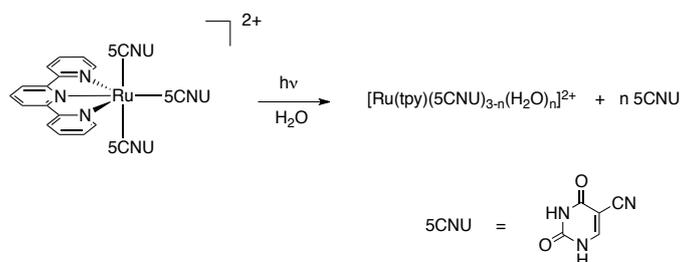


Fig. 1.10. Photo-libération d'un 5-cyanouracile à partir du  $[\text{Ru}(\text{tpy})(5\text{CNU})_3]^{2+}$  sous illumination

La photo-chimiothérapie (PCT) et la thérapie photodynamique (PDT) sont des méthodes grâce auxquelles il est possible de détruire des tissus cancéreux de manière ciblée et contrôlée, limitant ainsi les effets secondaires liés au traitement. Le plus gros effet secondaire lié à la photothérapie est la sensibilité des patients à la lumière solaire après traitement, aussi bien sur la peau que dans les yeux. A l'instar des anti-cancéreux traditionnels, il est donc important pour un photosensibilisateur de s'accumuler préférentiellement dans les tissus malades ou, à défaut, d'être transporté vers les tissus tumoraux visés (tumeurs de surface pouvant être illuminées).[52]

Une approche intéressante est explorée pour contourner ce problème. Celle-ci implique de réunir trois, et non deux, conditions à l'activation du médicament. Zhou *et al.* ont récemment publié des résultats décrivant l'activation d'un complexe azopyridinique (Figure 1.11) par réduction par le glutathion (GSH) et illumination simultanée.

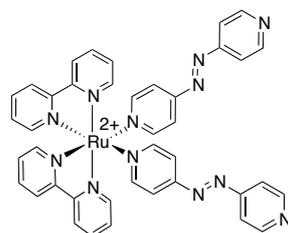


Fig. 1.11. Structure du complexe azopyridinique développé par Zhou *et al.*

Si les deux conditions, présence de lumière et de GSH, sont réunies, la formation d'un lien covalent avec l'ADN est observée. A l'inverse, en présence d'un seul des activateurs, on ne constate aucune modification de l'ADN. Comme nous l'avons déjà mentionné, les tumeurs sont des milieux généralement plus réducteurs que le reste du corps, avec une concentration particulièrement élevée de GSH. Ce type d'approche pourrait donc permettre d'accroître la sélectivité du traitement et par conséquent de réduire les effets secondaires qui en résultent.[53]

En conclusion, la photothérapie est une méthode efficace avec un large champ d'action qui peut encore être améliorée et nombre de recherches sont actuellement en cours afin de trouver de nouveaux composés utilisables dans ce genre d'approche. Les complexes de ruthénium, en raison de leurs propriétés physiques variées et modulables, occupent une grande part dans ces recherches. La plus grande limitation de ce genre d'approche réside dans le fait que seules les tumeurs superficielles (qui puissent être illuminées) peuvent être traitées de cette manière.

### 1.3 Interaction et réactions des complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> avec l'ADN sous l'effet de la lumière

Comme nous l'avons vu plus haut, l'intérêt de l'utilisation des complexes polypyridiniques de ruthénium<sup>II</sup> en biologie est apparu avec le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  et sa capacité à sensibiliser l'oxygène et par conséquent à dégrader l'ADN. L'analogue  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  a également été étudié et présente les mêmes caractéristiques que  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ . Ces complexes n'interagissent que de manière électrostatique avec les phosphates de l'ADN et montrent de faibles propriétés d'intercalation entre les paires de bases.[47],[54]

Un autre complexe, le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ , synthétisé en 1985,[55] a également fait l'objet de nombreuses études. Premièrement, lui et son analogue, le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ , possèdent un ligand avec un large plan aromatique, ce qui confère aux complexes une affinité accrue envers l'ADN par rapport au  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ . En effet, le ligand dppz (dipyrido[3,2-a :2',3'-c]phénazine) permet au complexe d'interagir avec l'ADN par intercalation entre les paires de bases de la double hélice (Figure 1.12).[56]–[58]

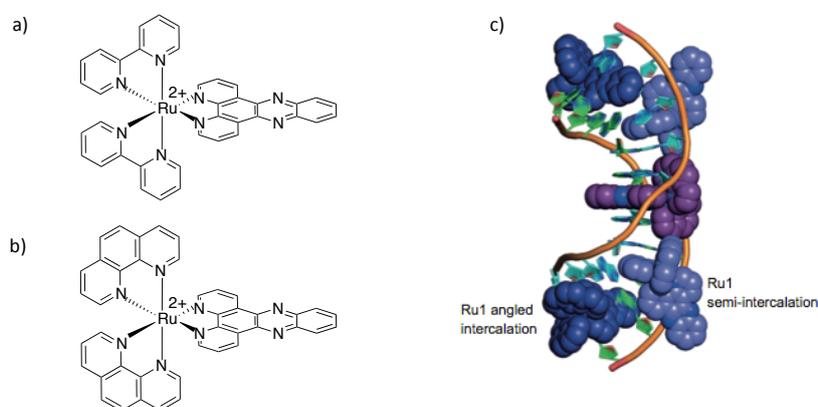


Fig. 1.12. a) Structure du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ , b) Structure du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ , c) Illustration de l'intercalation d'un complexe dans les sillons de l'ADN (Structure cristalline de complexes de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$  intercalés dans une double hélice d'ADN de séquence  $d(\text{CCGGTACCGG})_2$ . Les complexes en bleu pâle sont semi-intercalés.[58]

Deuxièmement, le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  et le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$  présentent un effet « light-switch ON » en présence d'ADN. En effet, ces complexes sont non luminescents dans l'eau mais voient leur rendement quantique de luminescence augmenter en présence d'ADN (ce phénomène sera détaillé dans le chapitre III).[57],[59] Ce phénomène a lancé le développement de nouvelles sondes photoluminescentes de l'ADN et il s'est avéré que de nombreux complexes polyazaromatiques de

ruthénium<sup>II</sup>, portant un ligand plan étendu, possèdent cette même propriété « light switch ON ». On peut citer à titre d'exemple le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{PHEHAT}]^{2+}$  synthétisé dans le laboratoire de Chimie Organique et Photochimie de l'ULB (Figure 1.13).[60] De plus, afin d'améliorer l'affinité de ces complexes, plusieurs équipes se sont penchées sur l'élaboration de complexes dimériques bis-intercalants (Figure 1.13) .[61]

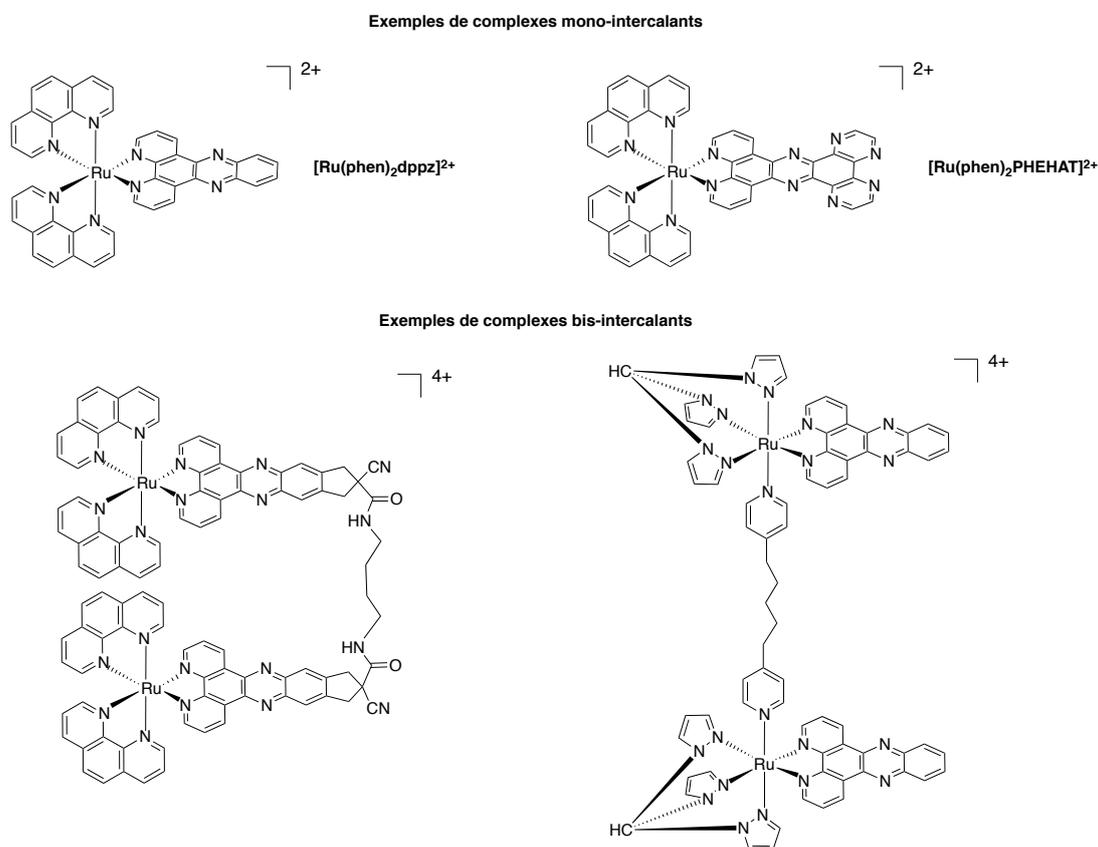


Fig. 1.13. Structures de complexes mono-intercalants (haut) et de complexes bis-intercalants (bas).

En 1987, le Laboratoire de Chimie Organique et Photochimie (ULB) publia le comportement photophysique inhabituel de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$ , complexe fortement photo-oxydant, en présence d'ADN. [62] En effet, à l'inverse du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ , ce complexe émet dans l'eau et voit son intensité de luminescence décroître avec l'ajout de poly[d(G-C)] ou d'ADN de thymus de veau. Cette diminution est due à un quenching par transfert d'électron à partir de résidus guanine de l'ADN vers le complexe excité (mécanisme détaillé dans le chapitre III). Ce phénomène a deux conséquences : premièrement, le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$  est capable d'endommager l'ADN par la création de radicaux en ne passant pas par un intermédiaire dérivé de l'oxygène ( $^1\text{O}_2$  ou ROS), deuxièmement, il peut former des photo-adduits avec l'ADN par recombinaison des radicaux (Figure 1.14).[63]

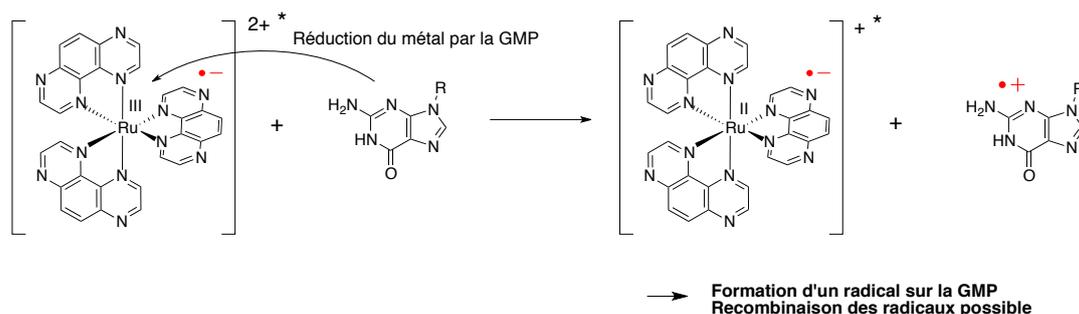


Fig. 1.14. Formation de radicaux sur la GMP en présence du  $[Ru(TAP)_3]^{2+}$  excité.

Ce dernier processus présente un intérêt nouveau dans l'utilisation des complexes de ruthénium du point de vue thérapeutique puisqu'il permet d'ancrer des complexes de ruthénium sur des biomolécules telles que des oligonucléotides ou des protéines. On retrouve donc le même mécanisme de dégradation de l'ADN qu'avec le cisplatine (agent de type alkylant) mais cette fois-ci sous illumination uniquement.

Il est apparu que la majorité des complexes de ruthénium<sup>II</sup> possédant au moins deux ligands TAP ont la capacité de former des photo-adduits et certaines structures ont déjà pu être élucidées, notamment celles impliquant le  $[Ru(TAP)_3]^{2+}$  et une guanine ou le  $[Ru(TAP)_3]^{2+}$  et un tryptophane (Figure 1.15).[64],[65]

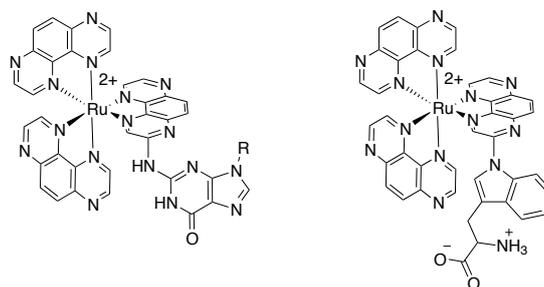


Fig. 1.15. Structures de photo-adduits entre le  $[Ru(TAP)_3]^{2+}$  et la GMP (gauche) et le tryptophane (droite).

En vue d'améliorer les propriétés d'interaction avec l'ADN, des complexes possédant deux ligands TAP et un ligand plan étendu (dppz, PHEHAT) ont été synthétisés. Le  $[Ru(TAP)_2dppz]^{2+}$  et le  $[Ru(TAP)_2PHEHAT]^{2+}$  possèdent une bonne affinité envers l'ADN combinée à la possibilité de former des photo-adduits.[66],[67] Un autre complexe binucléaire, le  $[(TAP)_2Ru(tpac)Ru(TAP)_2]^{2+}$  (tpac = tétrapyrido[3,2-a:2',3'-c:3'',2''-h:2''',3'''-j]acridine), a également montré sa capacité à former des photo-adduits mais cette fois sur une structure particulière de l'ADN : un quadruplexe G4 (Figure 1.16). Contrairement à la double hélice, les quadruplexes G4 sont formés de 4 brins, pour lesquels 4 guanines interagissent entre elles. La densité de guanine y est donc importante, ce qui en fait une cible idéale, et jusqu'à 6 photo-adduits sur une même séquence G4 ont été observés sur gel d'électrophorèse.[68]

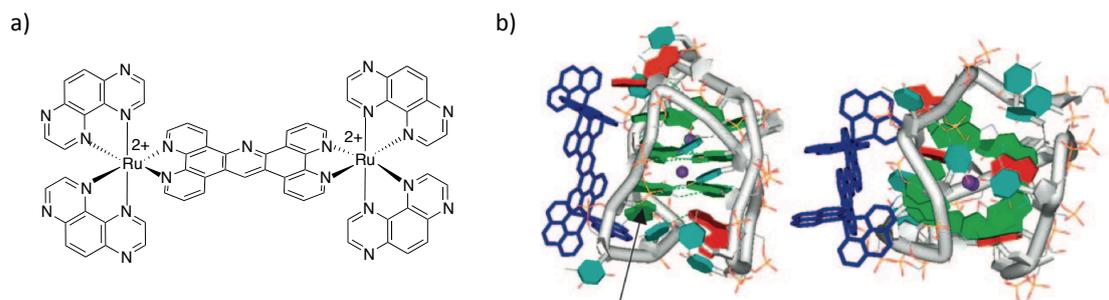


Fig. 1.16. a) Structure du  $[(TAP)_2Ru(tpac)Ru(TAP)_2]^{4+}$ , b) Structure du  $[(TAP)_2Ru(tpac)Ru(TAP)_2]^{4+}$  lié de manière covalente à une structure G4 télomérique de séquence  $d(T_2AG_3)_4$  déterminée par simulation en dynamique moléculaire. [69]

Une application particulièrement intéressante de cette propriété à former des photo-adduits est le photo-pontage de deux brins d'ADN par l'intermédiaire d'un complexe. Il s'agit donc d'un mécanisme similaire à celui du cisplatine mais déclenché uniquement sous illumination. De plus, une approche par une stratégie antigène-antisens permet de cibler une séquence d'ADN ou d'ARN choisie. Le complexe de ruthénium impliqué doit posséder deux ligands TAP, indispensables pour la formation de photo-adduit, et un ligand fonctionnalisé de telle sorte qu'il puisse s'ancrer sur un oligodésoxynucléotide (ODN) synthétique. L'ODN sonde, lié chimiquement au complexe, est capable de reconnaître et de s'hybrider à sa séquence complémentaire cible. Si le système est illuminé, le complexe peut former un photo-adduit avec le brin complémentaire, liant ainsi les deux brins de manière irréversible (Figure 1.17).

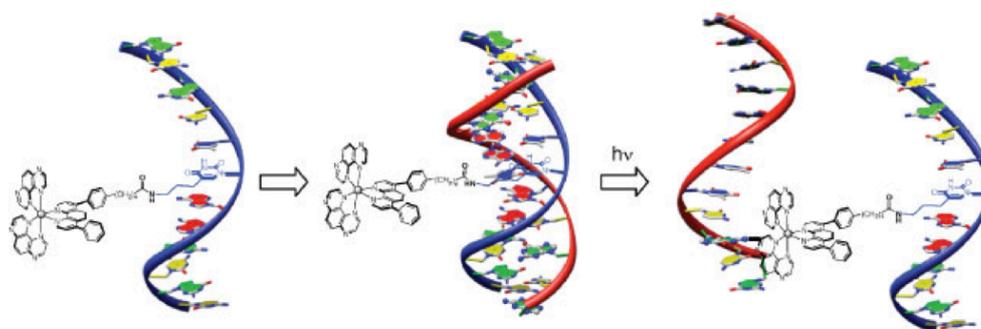


Fig. 1.17. Représentation schématique du pontage photo-induit de  $[Ru(TAP)_2dip]^{2+}$  ancré sur un oligodésoxynucléotide sonde à un oligodésoxynucléotide cible. [70]

Ce mécanisme a pu être amélioré par l'ajout d'une guanine sur la séquence ODN sonde. En effet, non seulement le rendement de photo-pontage n'est en rien diminué par la présence de cette guanine mais celle-ci permet la formation d'un photo-adduit intramoléculaire dans le cas où l'ODN sonde ne pourrait trouver sa cible. Ce photo-adduit est alors totalement inactif. Ce processus a été nommé « Seppuku » puisque l'ODN qui ne trouve pas sa cible ne peut remplir sa mission et finit donc par se suicider.[69] Cette nouvelle approche est intéressante du point de vue des applications thérapeutiques puisqu'elle permettrait de limiter grandement les effets secondaires dus au traitement.

La toxicité de nombreux médicaments anticancéreux, notamment les dérivés du cisplatine, reste considérable et un vaste domaine de recherche est actuellement dédié à l'élaboration de thérapies plus ciblées. Il s'agit généralement de l'utilisation de vecteurs (anticorps, virus, nanomatériaux...) spécifiques aux cellules cancéreuses ou à leur environnement pour distribuer localement le principe actif d'un médicament.[71]–[76] Néanmoins, comme nous l'avons vu tout au long de ce chapitre, certaines molécules (NAMI-A, agents en photothérapie, complexes dans la stratégie antisens-antigène), possèdent le potentiel pour être utilisés en thérapie ciblée sans l'intervention d'un quelconque vecteur.

## 2 Objectifs du travail

Ce projet, réalisé en cotutelle entre l'Université Grenoble-Alpes et l'Université Libre de Bruxelles, s'inscrit dans le cadre du développement de nouveaux complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> possédant des propriétés d'interaction avec l'ADN et l'ARN et plus particulièrement avec les structures quadruplexes G4.

Les deux équipes dans lesquelles ce projet a été réalisé sont complémentaires et possèdent des domaines d'expertise différents. La première (dirigée par le Dr. M. Demeunynck) est spécialisée dans la synthèse d'hétérocycles ayant des propriétés d'interaction avec l'ADN. La seconde (dirigée par le Pr C. Moucheron) est, quant à elle, spécialisée dans la synthèse de complexes de ruthénium, de leur étude photophysique et d'interaction avec l'ADN. Plusieurs collaborations fructueuses ont d'ailleurs déjà été entreprises entre ces laboratoires pour la synthèse et l'étude de complexes en présence de matériel génétique, notamment en présence de conformations particulières de l'ADN, les quadruplexes G4.

Le développement de nouveaux outils moléculaires pour la visualisation et l'étude *in vivo* des G4 constitue actuellement un domaine d'un intérêt tout particulier. Ce dernier point sera explicité dans l'introduction du chapitre IV de ce travail. Ce projet a donc pour objectif de synthétiser des composés originaux à base de ruthénium et d'évaluer leur potentiel en tant que sonde moléculaire pour la visualisation et le marquage des G4 *in vitro* et à plus long terme *in vivo*. Pour cela, deux points sont importants à étudier : les propriétés d'interaction (affinité et sélectivité) que possèdent ces composés avec les G4 et leurs propriétés photophysiques et photochimiques qui pourront être exploitées pour leur utilisation en tant qu'outil moléculaire.

Ce travail a donc été conçu en trois grandes parties : la synthèse des composés (chapitres II et V), l'étude photophysique de ces composés (chapitre III) et finalement l'étude de leur interaction avec les G4 (chapitre IV).

### 2.1 Synthèse des complexes

La première partie de ce travail a été consacrée à la synthèse des nouveaux complexes (chapitres II et V). Ceux-ci possèdent tous, en plus de ligands ancillaires 1,10-phénanthroline (phen) ou 1,4,5,8-tétraazaphénanthrène (TAP), un ligand avec un plan aromatique étendu (Figure 1.18).

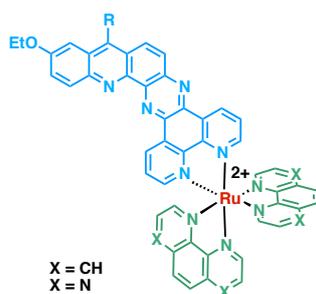


Fig. 1.18. Structure générale des complexes synthétisés durant ce travail.

Cette structure a été imaginée afin de pouvoir combiner les propriétés d'interaction du ligand à large plan étendu envers l'ADN avec les propriétés photophysiques et photochimiques généralement observées pour les complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup>.

Un point important pour la reconnaissance des différentes conformations de l'ADN est la taille du site d'interaction. Le site d'interaction des G4 étant plus étendu que celui de la double hélice, nos composés ont été imaginés avec un ligand aromatique très large qui devrait par conséquent conférer une affinité élevée envers les G4.

Les deux composés finaux de ces synthèses possèdent chacun leur particularité.

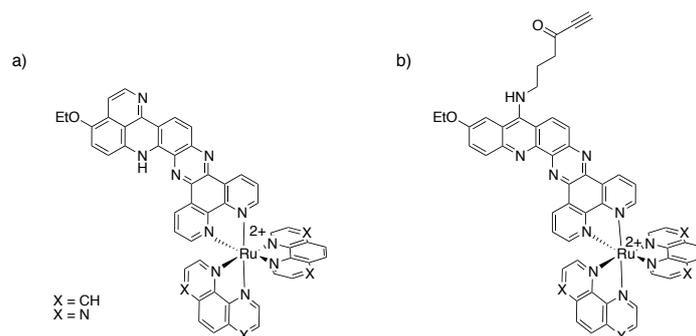


Fig. 1.19. Structure des complexes finaux  $[Ru(L)_2dppq]^2+$  et  $[Ru(L)_2dppq-Am]^2+$ .

Le premier (Figure 1.19.a) possède un ligand avec un cycle supplémentaire par rapport aux autres structures synthétisées. Il sera donc possible d'évaluer l'impact sur l'interaction (affinité et sélectivité envers les G4 par rapport à la double hélice) de ce complexe suite à l'augmentation de la taille du plan aromatique. La synthèse de ce complexe sera décrite dans le chapitre II.

Le second (Figure 1.19.b) est fonctionnalisé par une triple liaison et sera présenté dans le chapitre V. L'ajout de cette triple liaison nous permet d'envisager la formation d'une variété d'hétérodimères, formés par chimie « click », dont l'affinité et la sélectivité envers les G4 pourrait être accrues par rapport à celles du complexe seul (Figure 1.20).

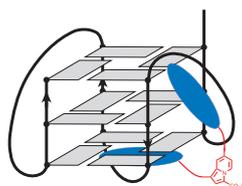


Fig. 1.20. Représentation schématique de l'interaction entre hétérodimère potentiel et un G4.

Une partie de ce chapitre V sera donc également consacrée à la synthèse d'un pérylène (composé connu pour interagir avec les G4) fonctionnalisé par un pyridinium (Figure 1.21). Ce composé pourrait donc constituer un partenaire pour la formation de l'hétérodimère avec le complexe fonctionnalisé.

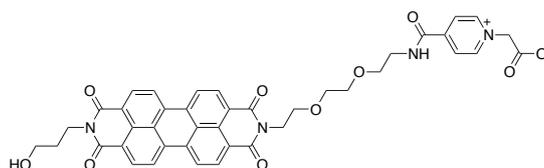


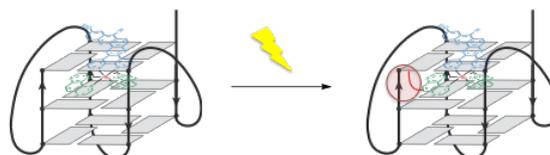
Fig. 1.21. Structure du dérivé de pérylène porteur d'un pyridinium.

## 2.2 Propriétés photophysiques

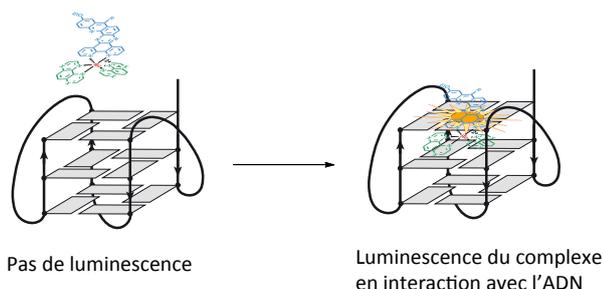
La deuxième partie de ce travail a été consacrée à l'étude photophysique des complexes synthétisés. En effet, les complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> possèdent des propriétés photophysiques et photochimiques particulières qui peuvent être précieuses pour leur utilisation en tant qu'outil moléculaire. Ces propriétés peuvent être modulées en fonction de la nature des ligands chélatés au centre métallique. C'est pourquoi la majorité des complexes de ce travail ont été synthétisés en série phen et en série TAP.

Deux utilisations peuvent être envisagées :

- La formation d'un photo-adduit avec une guanine du G4 pour le marquage de l'ADN.



- L'utilisation de la propriété « light-switch ON » de certains complexes à base de ligands plan étendus.



Cette dernière propriété sera exploitée dans le chapitre IV avec l'un des complexes synthétisés.

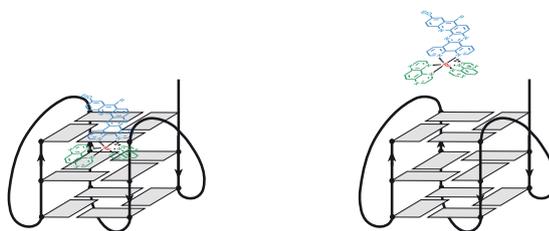
Afin de pouvoir évaluer leur potentiel pour l'une ou l'autre application, les différentes caractéristiques photophysiques (spectres d'absorption, rendements quantiques, maxima d'émission et durées de vie de l'état excité) ont été déterminées par spectroscopie d'absorption et d'émission et par « Single Photon Counting ».

### 2.3 Interaction avec les quadruplexes G4

La troisième et dernière partie de ce travail a été dédiée à l'étude de l'interaction des complexes synthétisés avec les structures de quadruplexes G4.

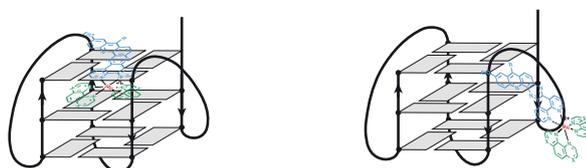
Dans le cadre de cette étude, plusieurs points sont à déterminer :

- La capacité des complexes à stabiliser les G4 et donc à interagir avec ces derniers.



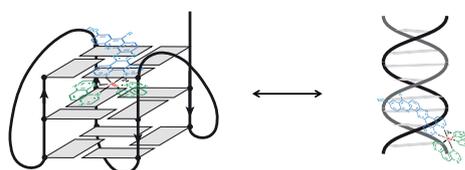
Ceci sera évalué par « FRET-Melting ».

- Le mode d'interaction avec les G4, par  $\pi$ -stacking avec la tétrade, par interaction électrostatique avec les boucles ou encore un mélange des deux.



Une étude de sélectivité compétitive entre des G4 normaux et le TG5T (G4 sans boucle) par « FRET-melting » nous permettra d'avoir quelques indications quant à la nature de l'interaction entre nos complexes et les G4.

- La sélectivité des complexes envers les G4 par rapport à l'ADN en double hélice.



Cette fois-ci, une étude de sélectivité compétitive avec le ds26 (ADN double brin) par « FRET-melting » nous permettra d'évaluer la sélectivité de nos complexes.

La réponse à ces trois points permettra de déterminer si les complexes synthétisés sont de bons candidats comme outils moléculaires pour la détection de G4 *in vivo*.

## Bibliographie

- [1] K. D. Mjos and C. Orvig, "Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry," *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 8, pp. 4540–4563, 2014.
- [2] C. Orvig and M. J. Abrams, "Medicinal Inorganic Chemistry : Introduction," *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 9, pp. 2201–2204, 1999.
- [3] W. G. Christiansen, "The relation between the mode of synthesis and toxicity of arsphenamine and related compounds.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 43, no. 10, pp. 2202–2210, 1921.
- [4] P. Ehrlich and A. Bertheim, "Ueber das Salzsäure 3,3'-diamino-4,4'-dioxy-arsenobenzol und seine nächsten Verwandten. (On the hydrochloride of 3,3'-diamino-4,4'-dioxy-arsenobenzene and its close derivatives)," *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, vol. 45, pp. 756–766, 1912.
- [5] N. C. Lloyd, H. W. Morgan, B. K. Nicholson, and R. S. Ronimus, "The composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a century-old debate," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 44, no. 6, pp. 941–944, 2005.
- [6] F. Bosch and L. Rosich, "The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: A tribute on the occasion of the centenary of his nobel prize," *Pharmacology*, vol. 82, no. 3, pp. 171–179, 2008.
- [7] S. Riethmiller, "From atoxyl to salvarsan: Searching for the magic bullet," *Chemotherapy*, vol. 51, no. 5, pp. 234–242, 2005.
- [8] B. Rosenberg, L. VanCamp, and T. Krigas, "Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode," *Nature*, vol. 205, pp. 698–699, 1965.
- [9] B. Rosenberg, L. VanCamp, J. E. Trosko, and V. H. Mansour, "Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents," *Nature*, vol. 222, pp. 385–386, 1969.
- [10] D. Wang and S. J. Lippard, "Cellular processing of platinum anticancer drugs," *Nat. Rev. Drug Deliv.*, vol. 4, no. 4, pp. 307–320, 2005.
- [11] S. Komeda and A. Casini, "Next-generation anticancer metallo drugs.," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 12, no. 3, pp. 219–35, 2012.
- [12] P. M. Takahara, A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, and S. J. Lippard, "Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin," *Nature*, vol. 377, pp. 649–652, 1995.
- [13] K. Cheung-Ong, K. T. Song, Z. Ma, D. Shabtal, A. Y. Lee, D. Gallo, L. E. Heisler, G. W. Brown, U. Bierbach, G. Giaever, and C. Nislow, "Comparative chemogenomics to examine the mechanism of action of DNA-targeted platinum-acridine anticancer agents," *ACS Chem. Biol.*, vol. 7, no. 11, pp. 1892–1901, 2012.
- [14] Z. Ma, J. R. Choudhury, M. W. Wright, S. Day, G. Saluta, G. L. Kucera, and U. Bierbach, "A Non-Cross-Linking Platinum-Acridine Agent with Potent Activity in Non-Small-Cell Lung," *J. Med. Chem.*, vol. 51, pp. 7574–7580, 2008.
- [15] G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchietto, A. Bergamo, S. Digiovine, G. Pezzoni, and L. Sartor, "Dual Action of NAMI-A in Inhibition of Solid Tumor Metastasis : Selective Targeting of Metastatic Cells and Binding to Collagen," *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, pp. 1898–1905, 2003.
- [16] A. Bergamo, R. Gagliardi, V. Scarcia, A. Furlani, E. Alessio, G. Mestroni, and G. Sava, "In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 289, no. 1, pp. 559–64, Apr. 1999.
- [17] A. Bergamo, T. Riedel, P. J. Dyson, and G. Sava, "Preclinical combination therapy of the investigational drug NAMI-A<sup>+</sup> with doxorubicin for mammary cancer," *Invest. New Drugs*, vol. 33, no. 1, pp. 53–63, 2015.
- [18] A. Vacca, M. Bruno, A. Boccarelli, M. Coluccia, D. Ribatti, A. Bergamo, S. Garbisa, L. Sartor, and G. Sava, "Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A.," *Br. J. Cancer*, vol. 86, no. 6, pp. 993–8, 2002.
- [19] E. S. Antonarakis and A. Emadi, "Ruthenium-based chemotherapeutics: Are they ready for prime time?," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 66, no. 1, pp. 1–9, 2010.
- [20] C. G. Hartinger, M. A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessler, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson, and B. K. Keppler, "KP1019, a new redox-active anticancer agent - Preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients," *Chem. Biodivers.*, vol. 5, no. 10, pp. 2140–2155, 2008.

- [21] S. K. Stevens, A. P. Strehle, R. L. Miller, S. H. Gammons, K. J. Hoffman, J. T. McCarty, M. E. Miller, L. K. Stultz, and P. K. Hanson, "The anticancer ruthenium complex KP1019 induces DNA damage, leading to cell cycle delay and cell death in *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol. Pharmacol.*, vol. 83, no. 1, pp. 225–34, 2013.
- [22] M. Pongratz, P. Schluga, M. A. Jakupec, V. B. Arion, C. G. Hartinger, G. Allmaier, and B. K. Keppler, "Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 19, no. 1, p. 46, 2004.
- [23] W. R. Wilson and M. P. Hay, "Targeting hypoxia in cancer therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 6, pp. 393–410, 2011.
- [24] M. J. Clarke, "Ruthenium metallopharmaceuticals," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 232, no. 1–2, pp. 69–93, 2002.
- [25] P. Schluga, C. G. Hartinger, A. Egger, E. Reisner, M. Galanski, M. a Jakupec, and B. K. Keppler, "Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP.," *Dalton Trans.*, no. 14, pp. 1796–802, 2006.
- [26] G. K. Gransbury, P. Kappen, C. J. Glover, J. N. Hughes, A. Levina, P. A. Lay, I. F. Musgrave, and H. H. Harris, "Comparison of KP1019 and NAMI-A in tumour-mimetic environments," *Metallomics*, vol. 8, pp. 762–773, 2016.
- [27] C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurenczy, T. J. Geldbach, G. Sava, and P. J. Dyson, "In Vitro and in Vivo Evaluation of Ruthenium(II)–Arene PTA Complexes," *J. Med. Chem.*, vol. 48, no. 12, pp. 4161–4171, 2005.
- [28] P. Nowak-sliwinska, J. R. Van Beijnum, A. Casini, A. A. Nazarov, H. Van Den Bergh, P. J. Dyson, and A. W. Griffioen, "Organometallic Ruthenium (II) Arene Compounds with Antiangiogenic Activity," *J. Med. Chem.*, vol. 54, pp. 3895–3902, 2011.
- [29] W. H. Ang, A. Casini, G. Sava, and P. J. Dyson, "Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action," *J. Organomet. Chem.*, vol. 696, no. 5, pp. 989–998, 2011.
- [30] Z. Adhireksan, G. E. Davey, P. Campomanes, M. Groessl, C. M. Clavel, H. Yu, A. a Nazarov, C. H. F. Yeo, W. H. Ang, P. Dröge, U. Rothlisberger, P. J. Dyson, and C. a Davey, "Ligand substitutions between ruthenium-cymene compounds can control protein versus DNA targeting and anticancer activity.," *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 3462, 2014.
- [31] A. Grozav, V. Miclus, O. Vostinaru, S. Ghibu, C. Berce, I. Rotar, C. Mogosan, B. Therrien, F. Loghin, and D.-S. Popa, "Acute toxicity evaluation of a thiazolo arene ruthenium (II) complex in rats," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 80, pp. 233–240, 2016.
- [32] A. Bergamo, A. Masi, A. F. A. Peacock, A. Habtemariam, P. J. Sadler, and G. Sava, "In vivo tumour and metastasis reduction and in vitro effects on invasion assays of the ruthenium RM175 and osmium AFAP51 organometallics in the mammary cancer model," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 104, no. 1, pp. 79–86, 2010.
- [33] F. Wang, H. Chen, J. A. Parkinson, P. del Socorro Murdoch, and P. J. Sadler, "Reactions of a Ruthenium (II) Arene Antitumor Complex with Cysteine and Methionine," *Inorg. Chem.*, vol. 41, pp. 4509–4523, 2002.
- [34] H. Bregman, D. S. Williams, G. E. Atilla, P. J. Carroll, and E. Meggers, "An organometallic inhibitor for glycogen synthase kinase 3," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 42, pp. 13594–13595, 2004.
- [35] A. Bergamo and G. Sava, "Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, pp. 8818–8835, 2015.
- [36] B. J. Pages, D. L. Ang, E. P. Wright, and J. R. Aldrich-Wright, "Metal complex interactions with DNA," *Dalton Trans.*, vol. 44, no. 8, pp. 3505–3526, 2015.
- [37] S. Medici, M. Peana, V. Marina, J. I. Lachowicz, G. Crisponi, and M. Antonietta, "Noble metals in medicine : Latest advances," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 284, pp. 329–350, 2015.
- [38] F. Li, J. G. Collins, and F. R. Keene, "Ruthenium complexes as antimicrobial agents," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, pp. 2529–2542, 2015.
- [39] R. R. Allison, H. C. Mota, and C. H. Sibata, "Clinical PD/PDT in North America: An historical review," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 1, no. 4, pp. 263–277, 2004.
- [40] A. E. O. O'Connor, W. M. Gallagher, and A. T. Byrne, "Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology : Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy," *Photochem. Photobiol.*, vol. 85, no. 17, pp. 1053–1074, 2009.

- [41] L. B. Josefsen and R. W. Boyle, "Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitizers," *Met. Based. Drugs*, vol. 2008, p. <http://dx.doi.org/10.1155/2008/276109>, 2008.
- [42] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, and Q. Peng, "Photodynamic Therapy," *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 90, no. 12, pp. 889–905, 1998.
- [43] C. Mari, V. Pierroz, S. Ferrari, and G. Gasser, "Combination of Ru(II) complexes and light: new frontiers in cancer therapy," *Chem. Sci.*, vol. 6, no. 5, pp. 2660–2686, 2015.
- [44] H. Huang, B. Yu, P. Zhang, J. Huang, Y. Chen, G. Gasser, and L. Ji, "Highly Charged Ruthenium (II) Polypyridyl Complexes as Lysosome-Localized Photosensitizers for Two-Photon Photodynamic Therapy," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 54, pp. 14049–14052, 2015.
- [45] R. Padilla, L. E. Donohoe, B. S. J. Winkel, and K. J. Brewer, "A new class of Ru (II) polyazine agents with potential for photodynamic therapy," *Chem. Comm.*, vol. 52, pp. 2705–2708, 2016.
- [46] J. Liu, Y. Chen, G. Li, P. Zhang, C. Jin, L. Zeng, and L. Ji, "Biomaterials Ruthenium (II) polypyridyl complexes as mitochondria-targeted two-photon photodynamic anticancer agents," *Biomaterials*, vol. 56, pp. 140–153, 2015.
- [47] M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, "Photosensitized singlet oxygen and its applications," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 234, pp. 351–371, 2002.
- [48] J. K. White, R. H. Schmehl, and C. Turro, "An overview of photosubstitution reactions of Ru(II) imine complexes and their application in photobiology and photodynamic therapy," *Inorganica Chim. Acta*, 2016.
- [49] S. He, Y. Qi, G. Kuang, D. Zhou, J. Li, Z. Xie, X. Chen, X. Jing, and Y. Huang, "Single-Stimulus Dual-Drug Sensitive Nanoplatfor for Enhanced Photoactivated Therapy," *Biomacromolecules*, vol. 17, no. 6, pp. 2120–2127, 2016.
- [50] R. N. Akhimie, J. K. White, and C. Turro, "Dual photoreactivity of a new Rh<sub>2</sub>(II,II) complex for biological applications," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 2, pp. 2–7, 2016.
- [51] M. A. Sgambellone, A. David, R. N. Garner, K. R. Dunbar, and C. Turro, "Cellular Toxicity Induced by the Photorelease of a Caged Bioactive Molecule: Design of a Potential Dual-Action Ru(II) Complex," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 30, pp. 11274–11282, 2013.
- [52] A. A. Rosenkranz, D. A. Jans, and A. S. Sobolev, "Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 78, no. 4, pp. 452–464, 2000.
- [53] Q.-X. Zhou, Y. Zheng, T.-J. Wang, Y.-J. Chen, K. Li, Y. Zhang, C. Li, Y.-J. Hou, and X. Wang, "A Novel Azopyridine-based Ru(II) Complex with GSH-responsive DNA Photobinding Ability," *Chem. Commun.*, vol. 51, pp. 10684–10686, 2015.
- [54] A. B. Tossi and J. M. Kelly, "A Study of some Polypyridylruthenium(II) Complexes as DNA Binders and Photocleavage Reagents," *Photochem. Photobiol.*, vol. 49, no. 5, pp. 545–556, 1989.
- [55] J. C. Chambron, J. P. Sauvage, E. Amouyal, and P. Koffi, "Ru(bipy)<sub>2</sub>(dipyridophénazine)<sup>2+</sup>: A Complex with a Long Range Directed Charge Transfer Excited State," *Nouv. J. Chim.*, vol. 9, p. 527, 1985.
- [56] C. Hiort, P. Lincoln, and B. Norden, "DNA Binding of Δ- and Λ-[Ru(phen)<sub>2</sub>DPPZ]<sup>2+</sup>," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 115, pp. 3448–3454, 1993.
- [57] A. E. Friedman, J.-C. Chambron, J. Sauvage, N. J. Turro, and J. K. Barton, "Molecular 'Light Switch' for DNA: Ru(bpy)<sub>2</sub>(dppz)<sup>2+</sup>," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 112, no. 11, pp. 4960–4962, 1990.
- [58] H. Niyazi, J. P. Hall, K. O'Sullivan, G. Winter, T. Sorensen, J. M. Kelly, and C. J. Cardin, "Crystal structures of Λ-[Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup> with oligonucleotides containing TA/TA and AT/AT steps show two intercalation modes," *Nat. Chem.*, vol. 4, no. 8, pp. 621–628, 2012.
- [59] Y. Jenkins, A. E. Friedman, N. J. Turro, and J. K. Barton, "Characterization of dipyridophenazine complexes of ruthenium(II): The light switch effect as a function of nucleic acid sequence and conformation," *Biochemistry*, vol. 31, no. 44, pp. 10809–10816, 1992.
- [60] C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, and S. Choua, "Photophysics of Ru(phen)<sub>2</sub>(PHEHAT)<sup>2+</sup>: A Novel 'Light Switch' for DNA and Photo-oxidant for Mononucleotides," *Inorg. Chem.*, vol. 36, no. 4, pp. 584–592, 1997.
- [61] F. Pierard and A. Kirsch-De Mesmaeker, "Bifunctional transition metal complexes as nucleic acid photoprobes and photoreagents," *Inorg. Chem. Commun.*, vol. 9, no. 1, pp. 111–126, 2006.
- [62] J. M. Kelly, D. J. McConell, C. OhUigin, A. B. Tossi, A. Kirsch-De Mesmaeker, A. Masschelein, and J. Nasielski, "Ruthenium polypyridyl complexes; Their interaction with DNA and their role as sensitizers for its photocleavage," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, pp. 1821–1823, 1987.
- [63] J.-P. Lecomte, A. Kirsch-De Mesmaeker, J. M. Kelly, A. B. Tossi, and H. Görner, "Photo-Induced

- Electron Transfer From Tetraazaphenanthrene: Model for Photosensitized DNA Oxidation,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 55, no. 5, pp. 681–689, 1992.
- [64] L. Jacquet, J. M. Kelly, and A. Kirsch-De Mesmaeker, “Photoadduct between tris(1,4,5,8-tetraazaphenanthrene)ruthenium(II) and guanosine monophosphate—a model for a new mode of covalent binding of metal complexes to DNA,” *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, no. 9, pp. 913–914, 1995.
- [65] E. Gicquel, A. Boisdenghien, E. Defrancq, C. Moucheron, and A. Kirsch-De Mesmaeker, “Adduct formation by photo-induced electron transfer between photo-oxidising Ru(II) complexes and tryptophan,” *Chem. Commun.*, vol. 1, no. 23, pp. 2764–2765, 2004.
- [66] C. Moucheron and A. Kirsch-De Mesmaeker, “New DNA-binding ruthenium (II) complexes as photo-reagents for mononucleotides and DNA,” *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 11, pp. 577–583, 1998.
- [67] I. Ortmans, B. Elias, J. M. Kelly, C. Moucheron, and A. Kirsch-DeMesmaeker, “[Ru(TAP)<sub>2</sub>(dppz)]<sup>2+</sup>: a DNA intercalating complex, which luminesces strongly in water and undergoes photo-induced proton-coupled electron transfer with guanosine-5'-monophosphate,” *Dalton Trans.*, vol. 2, no. 4, pp. 668–676, 2004.
- [68] S. Rickling, L. Ghisdavu, F. Pierard, P. Gerbaux, M. Surin, P. Murat, E. Defrancq, C. Moucheron, and A. K. De Mesmaeker, “A rigid dinuclear ruthenium (II) complex as an efficient photoactive agent for bridging two guanine bases of a duplex or quadruplex oligonucleotide,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 16, no. 13, pp. 3951–3961, 2010.
- [69] S. Le Gac, S. Rickling, P. Gerbaux, E. Defrancq, C. Moucheron, and A. Kirsch-De Mesmaeker, “A photoreactive ruthenium(II) complex tethered to a guanine-containing oligonucleotide: A biomolecular tool that behaves as a seppuku molecule,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 48, no. 6, pp. 1122–1125, 2009.
- [70] L. Herman, S. Ghosh, E. Defrancq, and A. Kirsch De Mesmaeker, “Ru(II) complexes and light: Molecular tools for biomolecules,” *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 21, no. 7–8, pp. 670–681, 2008.
- [71] T. D. Pencavel, M. J. Wilkinson, D. C. Mansfield, A. A. Khan, R. Seth, E. M. Karapanagiotou, V. Roulstone, R. J. Aguilar, N. G. Chen, A. A. Szalay, A. J. Hayes, and K. J. Harrington, “Isolated limb perfusion with melphalan, tumour necrosis factor-Alpha and oncolytic vaccinia virus improves tumour targeting and prolongs survival in a rat model of advanced extremity sarcoma,” *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 4, pp. 965–976, 2015.
- [72] S. M. Sagnella, J. A. McCarroll, and M. Kavallaris, “Drug delivery: Beyond active tumour targeting,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 10, no. 6, pp. 1131–1137, 2014.
- [73] M. Müllner, D. Mehta, C. J. Nowell, and C. J. H. Porter, “Passive tumour targeting and extravasation of cylindrical polymer brushes in mouse xenografts,” *Chem. Commun.*, vol. 52, pp. 9121–9124, 2016.
- [74] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, “Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 12, pp. 751–760, 2007.
- [75] M. H. Han, Z. T. Li, D. D. Bi, Y. F. Guo, H. X. Kuang, and X. T. Wang, “Novel folate-targeted docetaxel-loaded nanoparticles for tumour targeting: in vitro and in vivo evaluation,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 69, pp. 64306–64314, 2016.
- [76] M. Ferrari, “Cancer nanotechnology: opportunities and challenges,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 161–171, 2005.

*Chapitre II : Synthèse des complexes*



# Synthèse des complexes $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$

## 1 Introduction

### 1.1 Synthèse des complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup>

L'intérêt des complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> provient de leurs propriétés photophysiques et photochimiques particulières comme présenté au chapitre I.

La synthèse de complexes relève du domaine de la chimie coordinative puisqu'il s'agit d'un centre métallique sur lequel sont chélatés des ligands.

Les complexes peuvent être homoleptiques (complexes possédant tous leurs ligands identiques) ou hétéroleptiques (complexes possédant plus d'un type de ligand). Le complexe polyazaaromatique de ruthénium<sup>II</sup> le plus étudié de nos jours est le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  **3**, complexe homoleptique dont la synthèse a été décrite pour la première fois par F. H. Burstall en 1936.[1] Pour cette synthèse, le  $\text{RuCl}_3$  est chauffé à 250 °C en présence d'un excès de 2,2'-bipyridine. La procédure a été modifiée par J.A. Broomhead *et al.*[2] en 1990 pour obtenir le composé avec de meilleurs rendements et en conditions plus douces, dans un mélange eau/dihydrogénophosphate de sodium à reflux (Schéma 2.1).

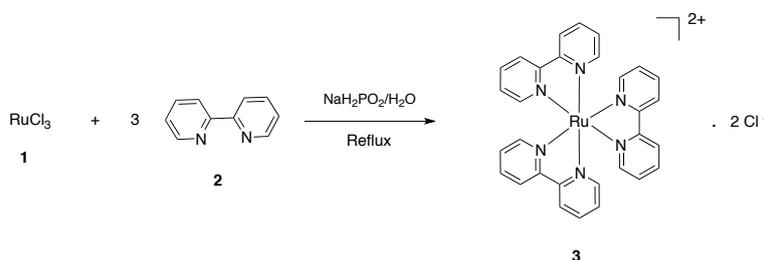


Schéma 2.1. Synthèse de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  **3** décrite par Broomhead *et al.*

Ce protocole a depuis été adapté à d'autres ligands : ainsi le complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  **4** a été synthétisé de la même manière que  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  **3**. D'autres méthodes, utilisant différents moyens de chauffage, ou encore d'autres produits de départ, ont également été publiées.[3],[4]

Grâce à l'intérêt porté à  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , d'autres complexes homoleptiques ont également été synthétisés, comme le  $[\text{Ru}(\text{bpz})_3]^{2+}$  **6** [5] ou encore le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$  **5** (Figure 2.1).[6]

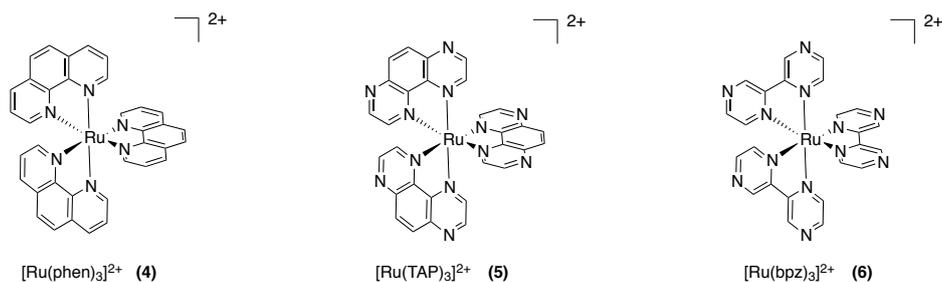


Fig. 2.1. Structures de  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  **4**,  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$  **5**,  $[\text{Ru}(\text{bpz})_3]^{2+}$  **6**.

De plus, afin d'accéder à une plus grande variété de complexes, de nouvelles voies de synthèse ont été développées permettant l'obtention des complexes hétéroleptiques de type  $[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{L}') ]^{2+}$ . Les complexes décrits dans cette thèse sont de ce dernier type.

La voie la plus classique, décrite par Sullivan *et al.*[7] est largement utilisée au Laboratoire de Chimie Organique et Photochimie, et permet d'obtenir le complexe tris-chélate  $[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{L}') ]^{2+}$  en passant par un complexe précurseur  $\text{Ru}(\text{L})_2\text{Cl}_2$  (Schéma 2.2).

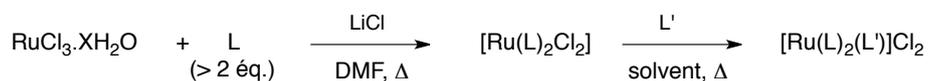


Schéma 2.2. Synthèse de complexes hétéroleptiques de ruthénium<sup>II</sup> de type  $[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{L}') ]\text{Cl}_2$ .

Il a ainsi été possible de synthétiser une très grande variété de complexes polyazaaromatiques possédant des ligands bpy, phen, bpz, TAP ou encore des ligands plus étendus comme le dppz 7,[8], [9] le tpphz 8,[10] le tpac 9,[11] ... (Figure 2.2)

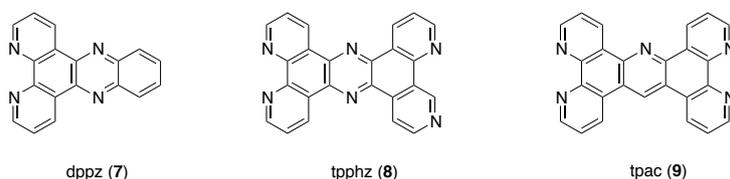


Figure 2.2. Structures de ligands dits « plans étendus ».

L'intérêt pour les complexes possédant des ligands de type plan étendu s'est fortement accru en raison de leurs propriétés photophysiques particulières et de leurs possibles applications en milieux biologiques,[12]–[14] en catalyse [15]–[18] ou pour la synthèse de dendrimères.[19]–[21]

Les complexes possédant un ligand plan étendu peuvent également être obtenus par une deuxième voie de synthèse qui consiste en la construction du ligand plan étendu directement sur le complexe (Schéma 2.3) par une double condensation.

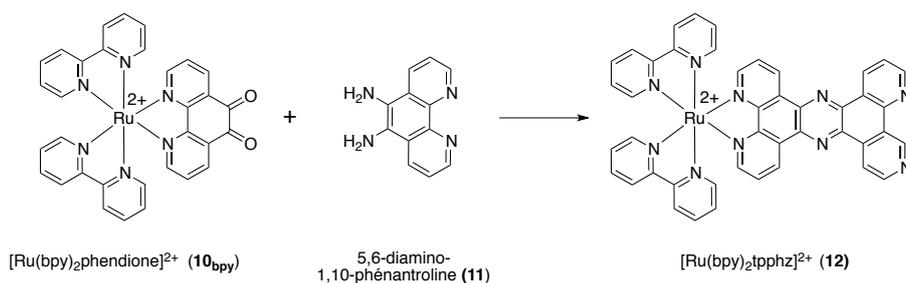


Schéma 2.3. Synthèse de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{tpphz}]^{2+}$  par double condensation. [10]

Cette nouvelle voie s'est révélée extrêmement intéressante lorsqu'il a fallu accroître le nombre de cycles accolés. En effet, les ligands eux-mêmes sont dans ce cas très peu solubles, de telle sorte qu'il est très difficile, d'une part, de les caractériser et, d'autre part, de les chélater au centre métallique. Cette méthode a été décrite par Bolger *et al.*[10] en 1995 pour les complexes mono- et bi-nucléaires  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tpphz})].2\text{PF}_6$  **12** et  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tpphz})\text{Ru}(\text{bpy})_2].4\text{PF}_6$  et est largement utilisée à présent.

## 1.2 Synthèse de composés de type dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]quinolino[2,3-*h*]phénazine (dpqp) et dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]pyrido[2,3,4-*de*]quinolino[3,2-*h*]phénazine (dppqp)

Les dérivés d'acridine, ainsi que la majorité des structures planaires poly-*N*-hétérocycliques, sont connus pour être de très bons intercalants de l'ADN et ont donc été largement étudiés pour leur activité anti-tumorale.[22],[23] L'équipe dirigée par le Dr. M. Demeunynck (Département de Pharmacochimie Moléculaire) est impliquée depuis plusieurs années dans le développement de nouvelles structures polyazaaromatiques dérivées d'acridine.[24]–[27] Parmi celles-ci, on note la dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]quinolino[2,3-*h*]phénazine, dpqp en abrégé (Schéma 2.4).[25] Cette structure, obtenue par la condensation de la phendione avec une *ortho*-diaminoacridine, correspond à un composé angulaire possédant un très large plan aromatique, caractéristique intéressante pour l'interaction avec ADN, particulièrement pour les conformations en triplexe ou en quadruplexe qui possèdent un plus grand site d'interaction (ces conformations des acides nucléiques seront décrites dans le chapitre IV).

La voie de synthèse mise au point permet également d'obtenir ce nouvel hétérocycle avec plusieurs points de fonctionnalisation (Schéma 2.4) :

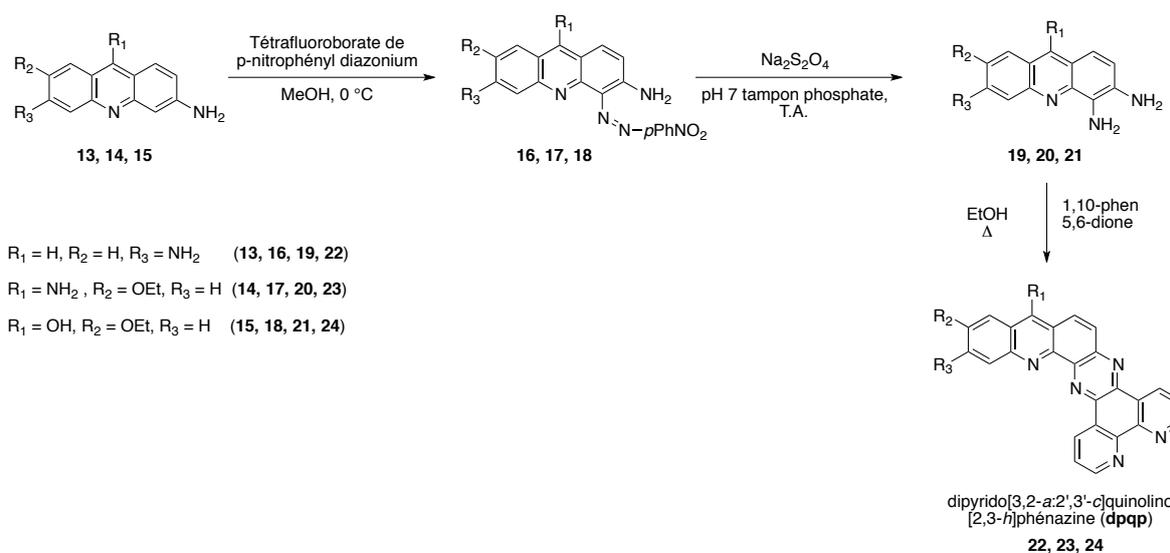


Schéma 2.4. Synthèse de composés heptacycliques dérivés d'acridine (série dpqp). [25]

Ces points de fonctionnalisation ont initialement été prévus pour y introduire des groupements permettant d'améliorer la solubilité des composés. En effet, les composés de ce type sont très peu solubles, aussi bien dans l'eau que dans les solvants organiques, et il était intéressant de pouvoir augmenter leur solubilité en milieu aqueux pour envisager des études biologiques.

Une deuxième série de composés, basée cette fois sur des dérivés de pyrido[2,3,4-*kl*]acridine, a été synthétisée par l'équipe du Dr. M. Demeunynck, Bouffier *et al.*[26], toujours dans une recherche de nouvelles molécules biologiquement actives (Figure 2.3).

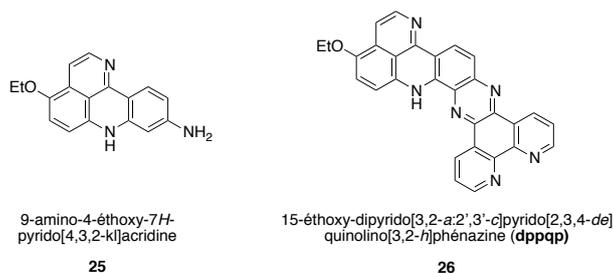


Fig. 2.3. Structures de composés tétra- et octacycliques dérivés de pyridoacridine. [26]

Parmi les composés obtenus, la structure octacyclique dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]pyrido[2,3,4-*de*]quinolino[3,2-*h*]phénazine **26** (dppqp), analogue au dpqp mais possédant un cycle aromatique supplémentaire, a été décrite.[26] Ce composé a pu être synthétisé de deux manières différentes : par condensation de la 8,9-diamino-4-éthoxy-pyrido[2,3,4-*kl*]acridine **32** avec la 1,10-phen-5,6-dione ou par transformations successives de l'heptacycle hydroxylé **24**, suivies d'une cyclisation en milieu acide. Cette dernière voie nous intéresse tout particulièrement puisqu'elle servira de base pour la synthèse de nos composés (Schéma 2.5).

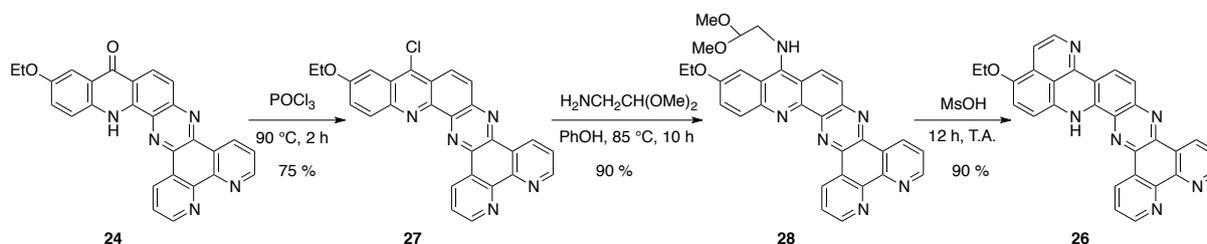


Schéma 2.5. Synthèse du composé **26** octacyclique dérivé d'acridine. [26]

Les propriétés biologiques du composé **26** n'ont malheureusement pas pu être mises en évidence à cause de problèmes de solubilité. En effet, l'ajout d'un cycle supplémentaire à une structure déjà très peu soluble la rend totalement insoluble. A l'inverse, le produit tétracyclique, 9-amino-4-éthoxy-pyrido[2,3,4-*kl*]acridine **25**, a pu être testé pour ses propriétés biologiques et a montré une activité cytotoxique intéressante sur cellules cancéreuses ( $IC_{50} = 1,35$  et  $2,1 \mu M$  sur les lignées HT29 et A431).[26]

Le manque de solubilité de ces structures étendues est un inconvénient majeur si l'on envisage des applications en milieu biologique, mais également d'un point de vue purement synthétique. Une particularité commune aux molécules heptacycliques (**24**, **27**, **28**) et octacyclique (**26**) peut nous permettre de contourner ce problème. En effet, toutes ces structures possèdent un site de chélation et peuvent donc être utilisées comme ligands dans un complexe métallique.

Ce dernier point fut exploité par Bouffier *et al.*[28] dans le cadre d'une collaboration entre les deux laboratoires dans lesquels ce présent travail est effectué. La synthèse d'un nouveau complexe de ruthénium<sup>II</sup>, le  $[Ru(phen)_2dppqp-OH]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub>, a été réalisée par la condensation entre le  $[Ru(phen)_2phendione]^{2+}$  **10**<sub>phen</sub> et la 3,4-diamino-7-éthoxyacridone **21** (Schéma 2.6) :

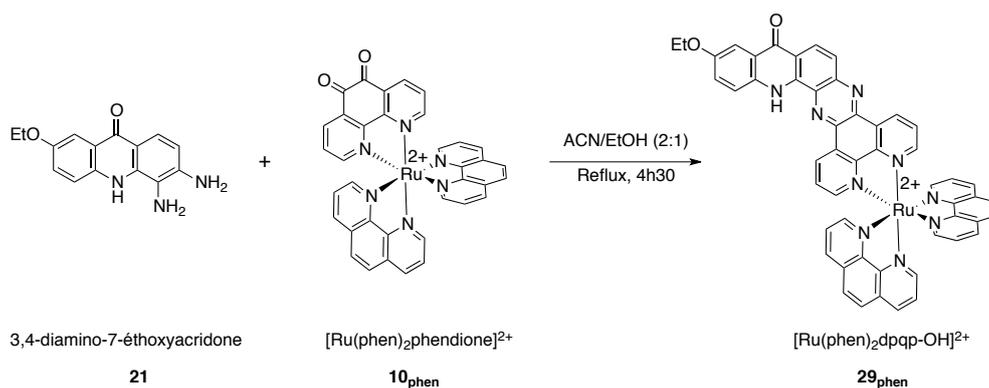


Schéma 2.6. Synthèse du complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  ( $\mathbf{29}_{\text{phen}}$ ).

La solubilité de ce composé dans différents solvants peut être contrôlée par la nature du contre-ion du complexe. Ainsi, le complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]\cdot 2\text{Cl}$   $\mathbf{29}_{\text{phen}}$  est suffisamment soluble dans l'eau pour pouvoir effectuer des études d'interaction avec l'ADN. Les résultats publiés ont montré le potentiel de ce complexe puisque les constantes d'affinité envers l'ADN calculées se révélèrent comparables à celles du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ . De plus, l'étude photophysique menée sur ce complexe a mis en évidence ses propriétés photophysiques particulières (décrites au chapitre III). Ces deux points nous ont encouragés à synthétiser de nouveaux composés dérivés du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$   $\mathbf{29}_{\text{phen}}$  et, plus particulièrement, des complexes porteurs du ligand octacyclique dppqp. En effet, l'augmentation de la surface planaire aromatique du ligand par l'ajout d'un cycle pourrait être intéressante du point de vue des applications biologiques, principalement en ce qui concerne la sélectivité G4 vs. ADN double brin.

L'abréviation rapportée pour le complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$   $\mathbf{29}_{\text{phen}}$ , réfère au complexe portant une forme tautomère possible du ligand. Il a été montré plus tard que la forme tautomère oxo (représentée sur le schéma 2.6) est nettement favorisée.[29] Nous garderons néanmoins cette nomenclature puisqu'elle peut être utilisée pour la suite des complexes synthétisés dans ce travail.

## 2 Résultats et discussions

### 2.1 Stratégie de synthèse

Les complexes ont été synthétisés avec des ligands ancillaires 1,4,5,8-tétraazaphénanthrène (TAP) ou 1,10-phénanthroline (phen). Ces ligands diffèrent par le nombre d'atomes d'azote portés par les cycles, ce qui a une forte influence sur les propriétés photophysiques et photochimiques des complexes correspondants.

Trois différentes stratégies furent envisagées pour la synthèse des complexes  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$   $\mathbf{30}$  (Figure 2.4).

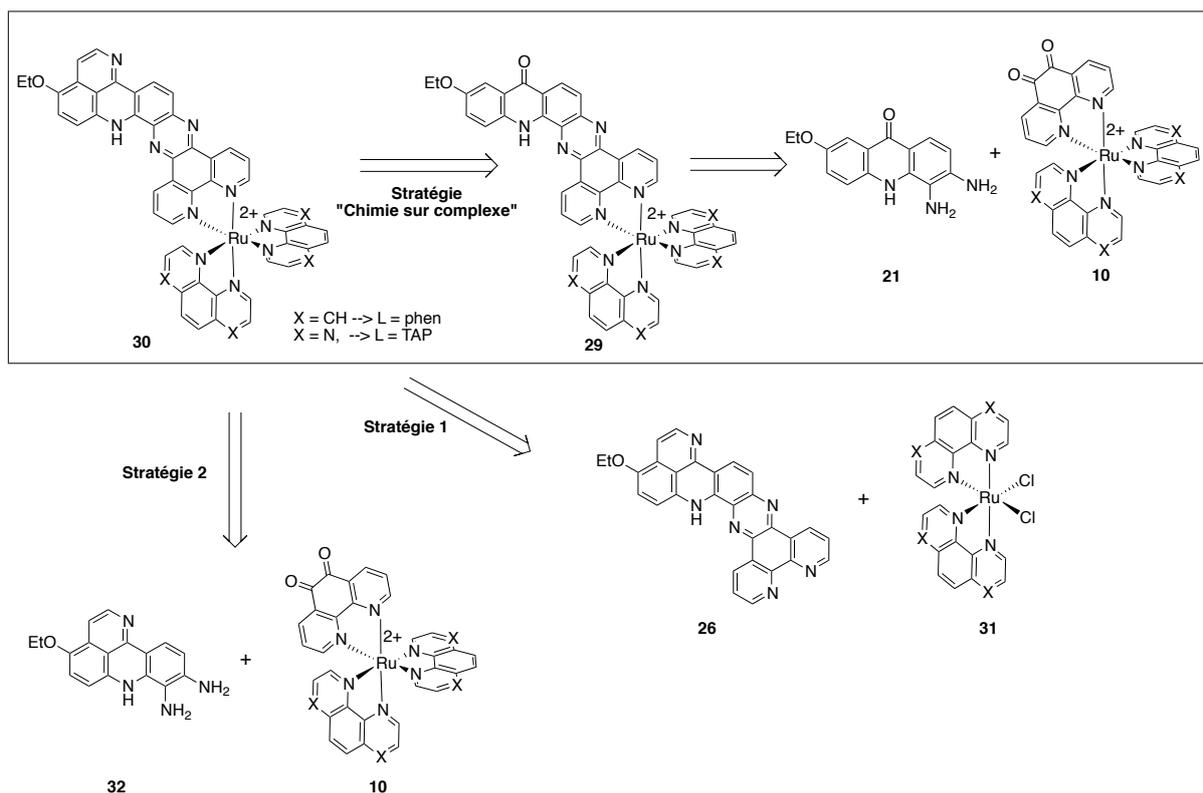


Fig. 2.4. Stratégies de synthèse envisagées pour obtenir le complexe  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30**.

La première voie, classique pour la préparation de complexes de ruthénium, consiste en la synthèse complète du ligand dppqp **26** suivie de la chélation directe de ce ligand sur  $\text{RuL}_2\text{Cl}_2$ . Cette méthode a rapidement été écartée à cause de la faible solubilité connue du ligand dppqp **26**, rendant la chélation au centre métallique très difficile.

La seconde stratégie repose sur la synthèse de la 3,4-diamino-7-éthoxypyrido[2,3,4-*kl*]acridine (ortho-diamino-pyridoacridine) **32** suivie d'une condensation avec la phendione déjà complexée sur le centre de ruthénium. Cette méthode est classiquement utilisée pour synthétiser des complexes possédant des ligands à larges plans étendus (Schéma 2.3) et a déjà été utilisée pour la synthèse du complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp-OH}]^{2+}$  **29** (Schéma 2.6).[28]

Les étapes de la synthèse mise au point au laboratoire pour obtenir l'ortho-diamino-pyridoacridine **32** sont les suivantes (Schéma 2.7) :

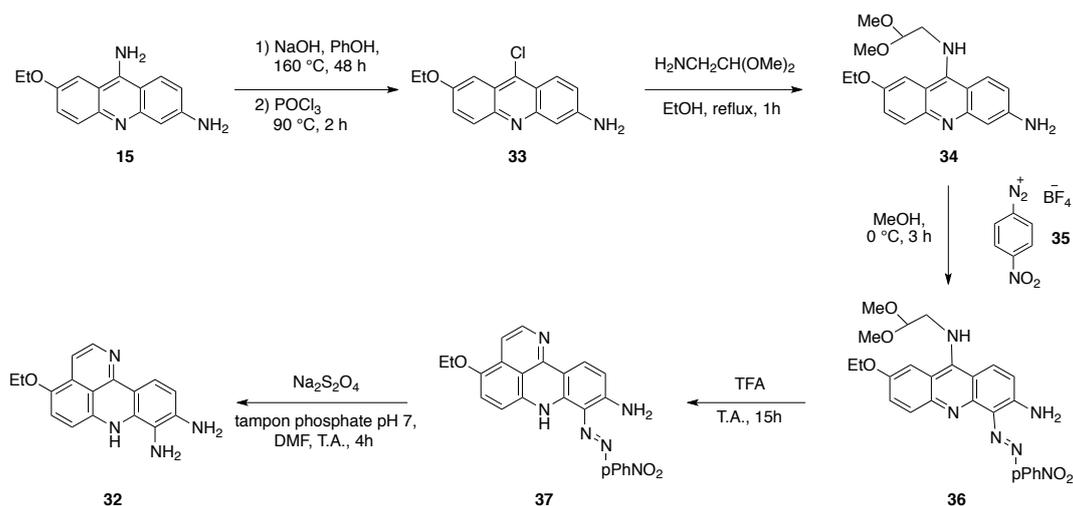


Schéma 2.7. Synthèse de la 3,4-diamino-7-éthoxy-2-(2-(méthoxy)éthylamino)pyrido[2,3,4-kl]acridine **32**. [26]

Les premières étapes de synthèse ont été réalisées avec succès jusqu'au composé **37**. Néanmoins, la dernière étape, correspondant à la réduction de la 9-amino-2-éthoxy-8-(*para*-nitrophényl-azo)-pyridoacridine **37** en 3,4-diamino-7-éthoxy-2-(2-(méthoxy)éthylamino)pyrido[2,3,4-kl]acridine **32**, ne nous a pas permis d'obtenir le composé avec des rendements reproductibles. La réaction a été suivie par spectrométrie de masse (ESI-MS). Nous avons dû augmenter le temps (12 h au lieu de 4 h) et la température de réaction (milieu chauffé à 50 °C) afin d'obtenir le produit désiré. Dans les conditions initiales de réaction, seul le produit de réduction du groupe nitro-phényle a été détecté (Schéma 2.8) à  $m/z = 396,39$ .

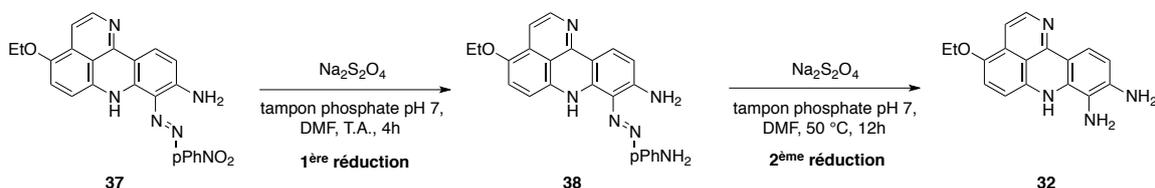


Schéma 2.8. Double réduction de la 9-amino-8-(*para*-nitrophényl-azo)-2-(2-(méthoxy)éthylamino)-9-éthoxy-10H-pyrido[2,3,4-kl]acridine **37**.

De plus, l'insolubilité de ce composé dans la majorité des solvants a rendu très difficile la purification du produit et nous n'avons pas réussi à caractériser le composé par  $^1\text{H}$  RMN. La spectrométrie de masse nous a néanmoins permis de détecter la 3,4-diamino-7-éthoxy-2-(2-(méthoxy)éthylamino)pyrido[2,3,4-kl]acridine **32** dans le brut de réaction et quelques essais de condensation ont été réalisés sur le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{pdpq}]^{2+}$  **10**<sub>phen</sub>. Ces essais, menés par A. De Neyer dans le cadre de son mémoire au laboratoire de Chimie Organique et Photochimie, ne furent pas concluants. Cette seconde stratégie semblait donc mener à une impasse et nous avons décidé de nous concentrer sur la dernière voie proposée.

Ayant écarté ces deux premières stratégies, une approche par « chimie sur complexe » a été imaginée pour laquelle le dernier cycle du ligand est construit par une suite de réactions menées directement sur complexe, en utilisant comme produits de départ les complexes  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29** (obtenus par la méthode décrite dans la littérature) [28] (Schéma 2.9).

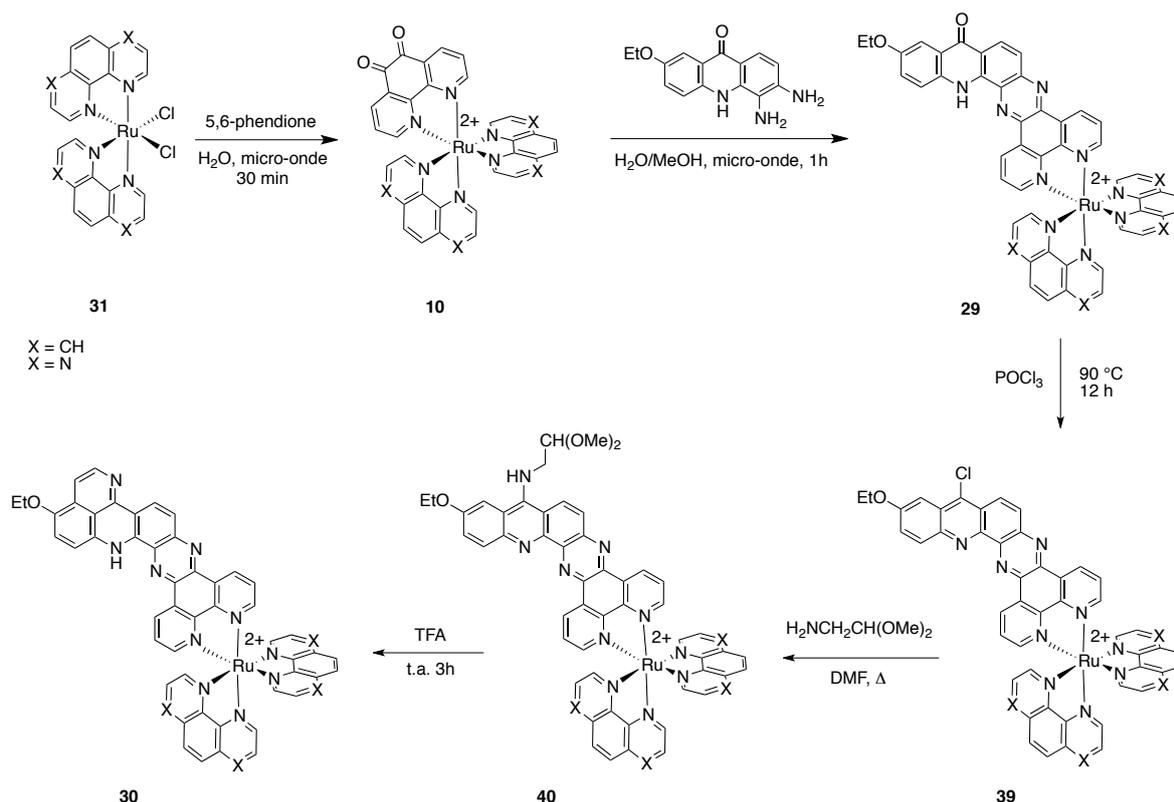


Schéma. 2.9. Synthèse de  $[Ru(L)_2dppqp]^{2+}$  **30** par « chimie sur complexe ».

Cette méthode présente l'avantage de pouvoir travailler avec des composés solubles qu'il est possible de purifier par chromatographie. De surcroît, leur solubilité dans différents solvants peut être modulée par échange de contre-ions, propriété également utile pour les purifications. En effet, les complexes sont solubles en milieux organiques quand ils ont comme contre-ions des hexafluorophosphates et le sont en milieu aqueux avec des contre-ions chlorures. L'échange de contre-ions (hexafluorophosphates vers chlorures) est facilement réalisé sur une colonne échangeuse d'ion (Schéma 2.10).

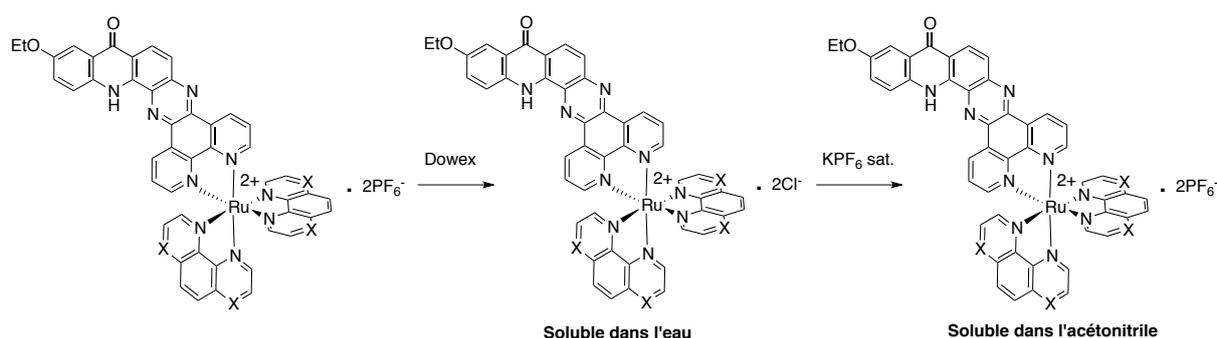


Schéma 2.10. Echange de contre ions des complexes de ruthénium.

L'échange inverse (chlorures vers hexafluorophosphates) est réalisé par simple addition d'une solution aqueuse saturée de KPF<sub>6</sub> dans une solution aqueuse du complexe. Ceci est illustré dans le schéma ci-dessus pour  $[Ru(L)_2dppqp-OH]^{2+}$  **29** mais peut être appliqué pour tous les complexes décrits dans ce travail.

Même si quelques exemples sont répertoriés dans la littérature, peu de réactions sur complexe de ruthénium ont été décrites.[17],[30]–[39] Il s’agit généralement d’une unique étape réactionnelle telle que des condensations (comme vu précédemment),[10],[30],[32] des réductions,[32],[33] des oxydations,[17] des photo-oxydations,[34] des hydrolyses,[37],[38],[40] ou encore des couplages catalysés par le palladium.[41],[42]

Le travail réalisé par Guillo *et al.*[39] a particulièrement attiré notre attention puisque les auteurs passent également par une approche de chimie sur complexe en deux étapes dont la première est une bromation et la seconde une substitution (Schéma 2.11).

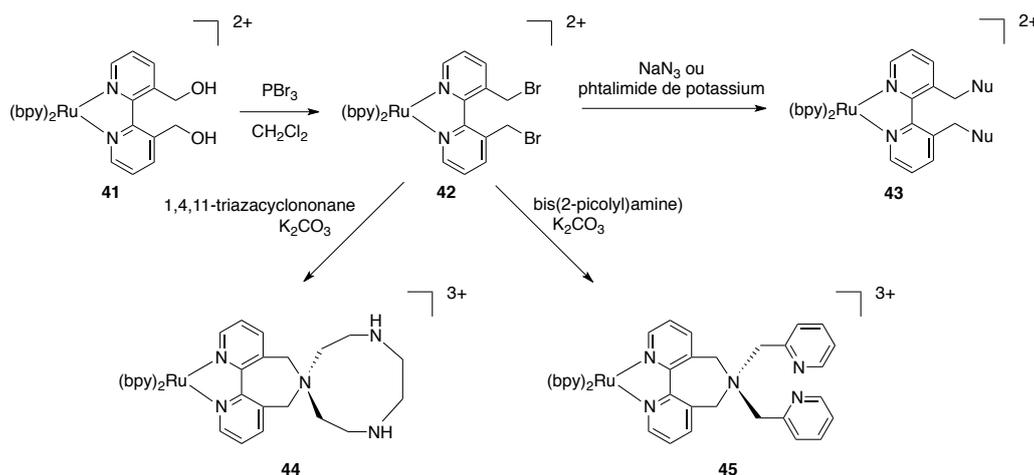


Schéma 2.11. Synthèses de complexes polyazaaromatiques fonctionnalisés par une approche de chimie sur complexe. [39]

Dans ce cas, les ligands ancillaires du complexe sont des bpy, or le présent travail porte sur la synthèse de complexes dont les ligands ancillaires sont des phen et des TAP (la série bpy a été synthétisée à Grenoble par le Dr. Lefebvre). La réactivité des complexes pourrait être influencée par les ligands ancillaires, particulièrement dans le cas du TAP qui est nettement plus électro-attracteur que le bpy. Nous verrons d’ailleurs par la suite que cette hypothèse est confirmée puisque les complexes possédant des TAP comme ligands ancillaires sont moins stables dans les conditions de réaction testées.

On trouve également des réactions de cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre [43],[44] réalisées sur des complexes de ruthénium. Ce point est particulièrement intéressant puisque, comme nous le verrons dans le chapitre V, un complexe fonctionnalisé par une triple liaison a été synthétisé dans le cadre de notre thèse et sera utilisé pour des réactions de « chimie-click ».

Ce type de chimie reste néanmoins peu développé et nous n’avons pas trouvé de publication concernant la construction d’un nouveau cycle aromatique sur un complexe. Cette méthode permet pourtant d’obtenir des composés difficilement synthétisables par les méthodes classiques.

La voie proposée dans ce travail consiste en une suite de réactions (3 étapes) qui auront pour finalité la construction d’un nouveau cycle aromatique sur le ligand dpqp chélaté au centre métallique de ruthénium<sup>II</sup>.

## 2.2 Synthèse par « chimie sur complexe »

Les différentes étapes nécessaires à la synthèse des complexes sont décrites ci-dessous. En premier lieu, nous avons synthétisé les précurseurs (1,4,5,8-tétraazaphénanthrène **50** et 1,10-phen-5,6-dione **52**) avec lesquels sont construits les complexes de départ  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{phendione}]^{2+}$  **10**. Ensuite, la condensation avec la 10*H*-3,4-diamino-7-éthoxy-acridin-9-one **21**, également synthétisée, permet d'obtenir le premier complexe de la série  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**. Une série de réactions réalisées à partir de ce complexe vont permettre d'obtenir le complexe final de la série  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30** (Schéma 2.9).

### 2.2.1 Synthèse des précurseurs

Les synthons de départ ont été préparés selon des méthodes déjà décrites dans la littérature.

#### $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{phendione}].2\text{PF}_6$ **10**

Deux séries de complexes ont été synthétisées, la première avec des 1,10-phénanthrolines (phen) comme ligands ancillaires, et la seconde avec des 1,4,5,8-tétraazaphénanthrènes (TAP). La phen est disponible commercialement tandis que le TAP a été synthétisé selon la procédure décrite par Nasielski-Hinkens *et al.*[45] Il est obtenu en quatre étapes à partir du 1,2-diamino-4-nitrobenzène avec un rendement global de 17% (Schéma 2.12).

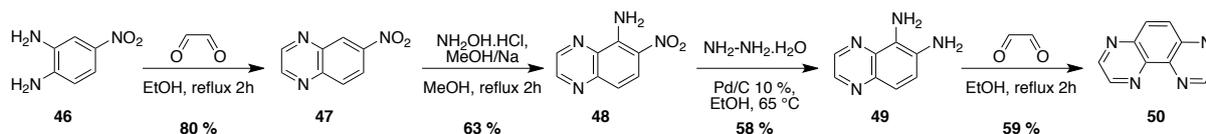


Schéma 2.12. Synthèse du 1,4,5,8-tétraazaphénanthrène **50** (TAP).

Les première et dernière étapes sont des condensations entre une diamine et le glyoxal, un dialdéhyde. Ces réactions sont très favorables et de bons rendements sont généralement obtenus. Dans notre cas, le rendement de la dernière étape est réduit à cause de la purification par cristallisation au cours de laquelle le produit ne précipite que partiellement à froid. Néanmoins, de meilleurs rendements peuvent être obtenus par purification sur colonne chromatographique. Les étapes intermédiaires consistent en une amination du composé et une réduction du groupe nitro- qui permettent d'obtenir l'*ortho*-diamine nécessaire à la seconde condensation.

La 1,10-phen-5,6-dione **52**, quant à elle, a été obtenue par oxydation, dans un mélange  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$  à chaud en présence de KBr, de la 1,10-phénanthroline **51** avec un rendement de 63% (Schéma 2.13).

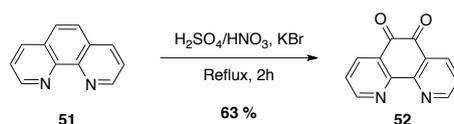


Schéma 2.13. Synthèse de la 1,10-phen-5,6-dione **52**.

Une fois ces intermédiaires obtenus, nous avons pu commencer la synthèse des complexes.

La première étape consiste en la synthèse des complexes précurseurs  $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2$  **31**<sub>phen</sub> et  $\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Cl}_2$  **31**<sub>TAP</sub> (Schéma 2.14). Cet intermédiaire de synthèse est très souvent utilisé pour obtenir des complexes tris-chélates hétéroleptiques de ruthénium. La synthèse consiste en la chélation de deux ligands, phen ou TAP, sur le centre de ruthénium. Cette réaction est suivie par absorption UV-vis, où l'on observe l'augmentation d'une bande à 530 nm, correspondant à l'espèce bis-chélate. Il est important de ne pas laisser la réaction trop longtemps au risque de voir se former l'espèce homoleptique tris-chélate  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  ou  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$ . Ceci est particulièrement important pour  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  et se traduit par l'apparition d'une bande vers 450 nm et la disparition de la bande à 530 nm dans le spectre d'absorption.

La deuxième étape consiste en la chélation du troisième et dernier ligand, dans notre cas, la 1,10-phen-5,6-dione **52** (Schéma 2.14).

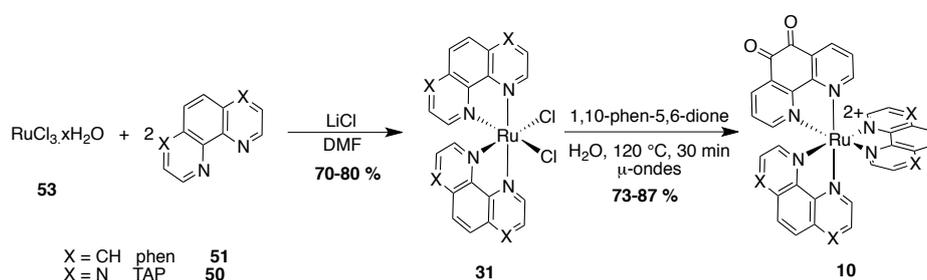


Schéma 2.14. Synthèse de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{phendione}]^{2+}$  **10**.

Nous avons amélioré le mode opératoire pour la chélation de la phendione au centre métallique en effectuant la réaction sous irradiation micro-onde, diminuant ainsi le temps de réaction, et en utilisant l'eau comme solvant, facilitant la purification de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{phendione}].2\text{Cl}$  (soluble dans l'eau contrairement aux produits de départ). Il est ensuite possible de précipiter les complexes **10** dans l'eau par échange de contre-ions. Grâce à cette méthode, il est possible d'obtenir les complexes  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{phendione}].2\text{PF}_6$  purs sans passer par une purification sur colonne chromatographique.

#### 10H-3,4-diamino-7-éthoxy-acridin-9-one **21**

La synthèse de ce second synthon a été réalisée selon la méthode mise au point au laboratoire (Schéma 2.15).<sup>[25]</sup> Elle commence par une substitution nucléophile aromatique du produit commercial, la 6,9-diamino-2-éthoxy-acridine **14**, permettant d'obtenir la 10H-6-amino-2-éthoxy-acridin-9-one **15**. Les deux étapes suivantes ont pour but d'introduire une seconde fonction amine en ortho de la première. Cette ortho-diamine est nécessaire pour la condensation avec la phendione (Schéma 2.15).

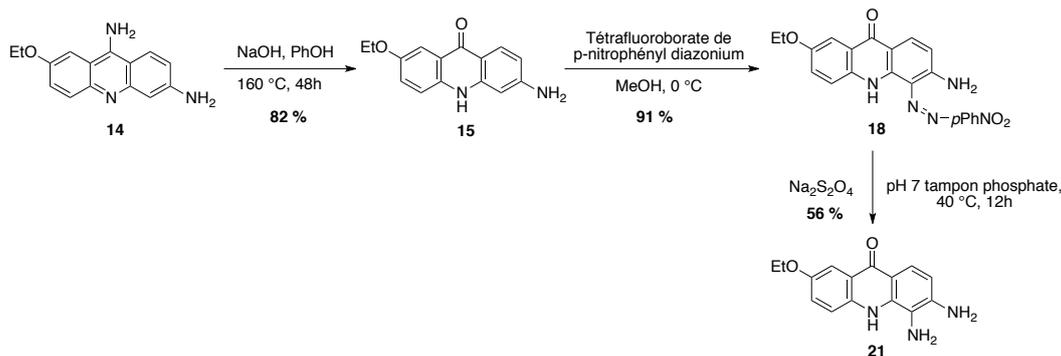


Schéma 2.15. Synthèse de la 10H-3,4-diamino-7-éthoxy-9-acridone **21**.

La réaction de substitution électrophile aromatique avec le sel de diazonium a l'avantage d'être totalement régiosélective sur la position 4 de l'acridine. Cette régiosélectivité s'explique par la présence de la première amine en position 3. En effet, le doublet non-liant de l'azote active la position 4 envers les électrophiles (Schéma 2.16).

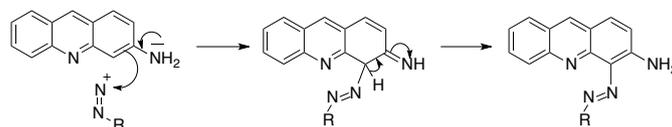


Schéma 2.16. Mécanisme de substitution électrophile influencée par la présence d'une amine en position 3.

Cette réactivité particulière a été mise en évidence par Martin en 1979,[46] et confirmée plus tard par Lhomme.[47] La réaction sur l'acridone **15** a été décrite par Dinica et al. en 2002.[25]

Le sel de diazonium est synthétisé directement à partir de la *para*-nitroaniline, disponible commercialement, mise en présence de nitrite de sodium en milieu acide (Schéma 2.17).[48]

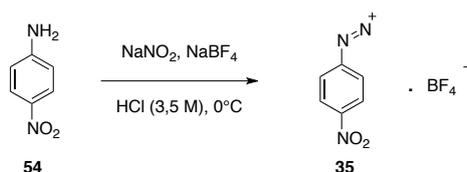


Schéma 2.17. Synthèse du tétrafluoroborate de *p*-nitrophényl diazonium **35**.

Le produit a été isolé sous forme d'un sel de tétrafluoroborate, puis engagé dans la réaction de substitution de l'acridone décrite précédemment.

Enfin, la réduction, qui permet la coupure du lien azido, se fait en conditions douces en présence de dithionite de sodium. Cette procédure a été légèrement modifiée par rapport à ce qui est décrit dans la littérature.[25] En effet, l'allongement du temps de réaction ainsi que l'augmentation de la température ont permis d'augmenter les rendements de la réaction. Dans les conditions de réaction initiales (4 heures à température ambiante), un produit secondaire résultant de la réduction du groupe *para*-nitrophényle en *para*-aminophényle sans coupure de la liaison N=N a été détecté dans le brut de réaction par spectrométrie de masse.

## 2.2.2 $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$

Le complexe  $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29** est le premier intermédiaire de synthèse de la série possédant un ligand avec un très large plan étendu et est obtenu par la condensation entre le  $[Ru(L)_2phen]^{2+}$ .2PF<sub>6</sub> **10**<sub>phen</sub> et la 10H-3,4-diamino-7-éthoxy-acridin-9-one **21** (Schéma 2.18). Ce complexe, déjà synthétisé et caractérisé dans la série phen,[28] a aussi été obtenu en série TAP dans ce travail mais également en série bpy (2,2'-bipyridine) par le Dr Lefebvre dans un projet mené en parallèle.[29]

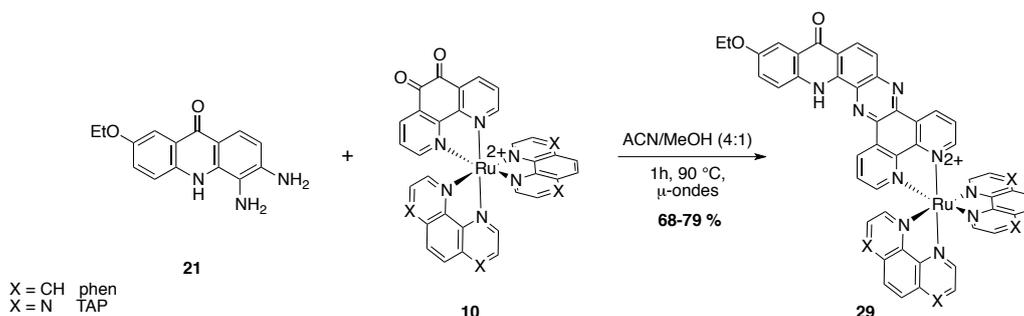


Schéma. 2.18. Synthèse des complexes  $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29** sous irradiation micro-onde.

Le protocole de synthèse décrit dans la littérature implique un chauffage à reflux dans un mélange acétonitrile/éthanol (v/v 1/2) pendant 4h30. Cette procédure a été améliorée grâce à l'utilisation d'un réacteur micro-onde. Ceci nous a permis de diminuer le temps de réaction à 60 minutes puisqu'il est possible, en tube scellé, d'augmenter la température à 90°C. Les rendements sont également légèrement supérieurs sous micro-ondes (79% contre 69% publiés pour  $[Ru(phen)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub>). Les complexes ont été purifiés par chromatographie sur alumine et caractérisés par RMN et spectrométrie de masse.

L'attribution complète des signaux de RMN avait déjà été faite par Bouffier *et al.*[28] pour le  $[Ru(phen)_2dpqp-OH].2PF_6$  **29**<sub>phen</sub> dans l'acétonitrile deutéré grâce à des expériences COSY et NOESY. Ces résultats nous ont permis d'attribuer également les signaux correspondant au  $[Ru(TAP)_2dpqp-OH].2PF_6$  **29**<sub>TAP</sub>. Le tableau 2.1 ci-dessous reprend l'attribution pour  $[Ru(TAP)_2dpqp-OH].2PF_6$  **29**<sub>TAP</sub> dans le CD<sub>3</sub>CN à 2 mM. Tous les protons sont différenciés à cause de la non-symétrie de la molécule :

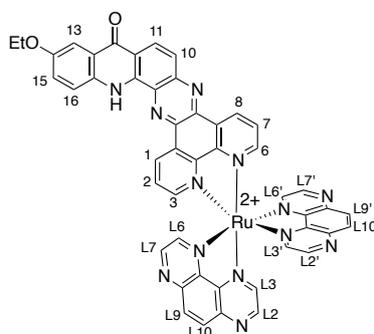


Fig. 2.5. Numérotation des protons du complexe  $[Ru(TAP)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub>.

$\delta$ (ppm)	Multiplicité	Intégration	Attribution	J (Hz)
10,76	s	1	NH	-
9,99	d	1	H <sub>1</sub>	8,1
9,27	d	1	H <sub>8</sub>	8,0
9,20	d	1	L <sub>2</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>7</sub> ( <sup>c</sup> )	2,8
9,05	d	1	L <sub>2</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>7</sub> ( <sup>c</sup> )	2,8
9,02	m	2	L <sub>2</sub> ( <sup>c</sup> ) et L <sub>7</sub> ( <sup>c</sup> )	-
8,88	s	1	L <sub>3</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>6</sub> ( <sup>c</sup> )	-
8,71	Syst. AB	2	L <sub>9</sub> ( <sup>c</sup> ) et L <sub>10</sub> ( <sup>c</sup> )	-
8,69	Syst. AB	2	L <sub>9</sub> ( <sup>c</sup> ) et L <sub>10</sub> ( <sup>c</sup> )	-
8,36	d	2	L <sub>3</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>6</sub> ( <sup>c</sup> )	2,9
8,31	d	1	H <sub>3</sub>	5,4
8,29	d	1	L <sub>3</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>6</sub> ( <sup>c</sup> )	2,8
8,22	dd	1	H <sub>6</sub>	5,4 ; 1,3
8,13	d	1	H <sub>11</sub>	9,0
7,98	d	1	H <sub>16</sub>	9,1
7,90	dd	1	H <sub>2</sub>	5,4 ; 8,1
7,80	d	1	H <sub>10</sub>	9,1
7,73	dd	1	H <sub>7</sub>	5,5 ; 8,2
7,23	d	1	H <sub>15</sub>	9,0
6,48	br s	1	H <sub>13</sub>	-
3,42	mult	1	O-CH <sub>2</sub>	-
3,26	mult	1	O-CH <sub>2</sub>	-
0,61	mult	3	CH <sub>3</sub>	-

Tableau 2.1. Attribution des signaux obtenus en RMN <sup>1</sup>H de [Ru(TAP)<sub>2</sub>dpqp-OH].2PF<sub>6</sub> **29**<sub>TAP</sub> dans CD<sub>3</sub>CN à 2 mM (25 °C).

Les résultats de RMN du proton pour le [Ru(phen)<sub>2</sub>dpqp-OH]<sup>2+</sup> **29**<sub>phen</sub> (Figure 2.6 et Tableau 2.2) concordent avec ce qui a déjà été décrit dans la littérature[28] à quelques variations près concernant les déplacements chimiques de certains protons du ligand dpqp-OH (spectres RMN <sup>1</sup>H analysés par A. de Neyer lors de son mémoire de fin d'étude).

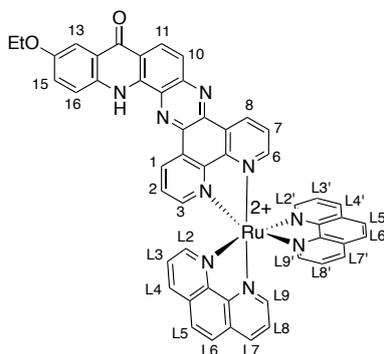


Fig. 2.6. Numérotation des protons du complexe [Ru(phen)<sub>2</sub>dpqp-OH]<sup>2+</sup> **29**<sub>phen</sub>.

Attribution	$\delta$ (ppm) Littérature[28]	$\delta$ (ppm) Expérimental
<b>NH</b>	<b>10.15</b>	<b>10.27</b>
<b>H<sub>1</sub></b>	<b>9.71</b>	<b>9.76</b>
H <sub>8</sub>	8.66	8.65
H <sub>3</sub>	8.26	8.25
H <sub>6</sub>	8.10	8.10
H <sub>11</sub>	7.94	7.90
H <sub>2</sub>	7.83	7.82
<b>H<sub>16</sub></b>	<b>7.78</b>	<b>7.68 (m)</b>
<b>H<sub>7</sub></b>	<b>7.71</b>	<b>7.68 (m)</b>
H <sub>10</sub>	7.70	7.68 (m)
<b>H<sub>15</sub></b>	<b>7.03</b>	<b>6.89</b>
<b>H<sub>13</sub></b>	<b>5.83</b>	<b>5.79</b>
<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>2.83</b>	<b>2.75</b>
<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>0.70</b>	<b>0.61</b>

Tableau 2.2. Comparaison des déplacements chimiques des protons du ligand dpqp-OH observés expérimentalement (400 MHz) et dans la littérature (300 MHz) dans le CD<sub>3</sub>CN. Les valeurs mises en gras représentent les signaux subissant les changements de déplacement chimique les plus importants.

[28]

Ces variations sont probablement dues à la formation d'agrégats, phénomène fréquent pour les molécules possédant un large plan aromatique et qui est fortement dépendant de la concentration. Ceci avait également été observé par ESMS par Bouffier *et al.*[28] pour le [Ru(phen)<sub>2</sub>dpqp-OH]<sup>2+</sup> **29<sub>phen</sub>**. On remarque également un dédoublement des protons O-CH<sub>2</sub> sur le spectre de RMN <sup>1</sup>H de [Ru(TAP)<sub>2</sub>dpqp-OH]<sup>2+</sup> **29<sub>TAP</sub>** (aussi observé par le Dr. Lefebvre pour [Ru(bpy)<sub>2</sub>dpqp-OH]<sup>2+</sup> **29<sub>bpy</sub>**)[29] (Figure 2.7).

La présence d'autres complexes empilés modifie l'environnement des deux protons qui ne sont alors plus équivalents et par conséquent différenciés sur le spectre. Ce dédoublement n'est pas observable pour le [Ru(phen)<sub>2</sub>dpqp-OH]<sup>2+</sup> **29<sub>phen</sub>** car ces signaux se trouvent sous celui du solvant.

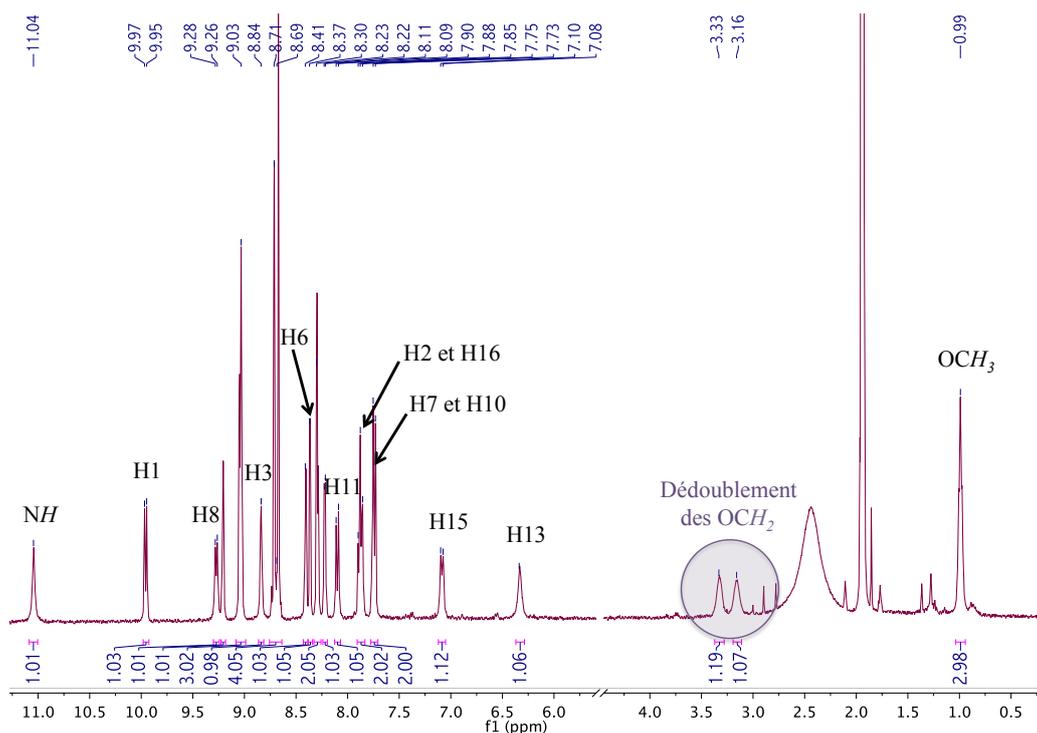


Fig. 2.7. Spectre de RMN  $^1\text{H}$  de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppq-OH}].2\text{PF}_6$   $\mathbf{29}_{\text{TAP}}$  dans  $\text{CD}_3\text{CN}$  (400 MHz), 5 mM, 35 °C.

Des spectres de RMN  $^1\text{H}$  ont donc été enregistrés à différentes concentrations en complexes dans l'acétonitrile afin de confirmer cet effet d'empilement pour les deux séries, phen (Figure 2.8) et TAP (Figure 2.9).

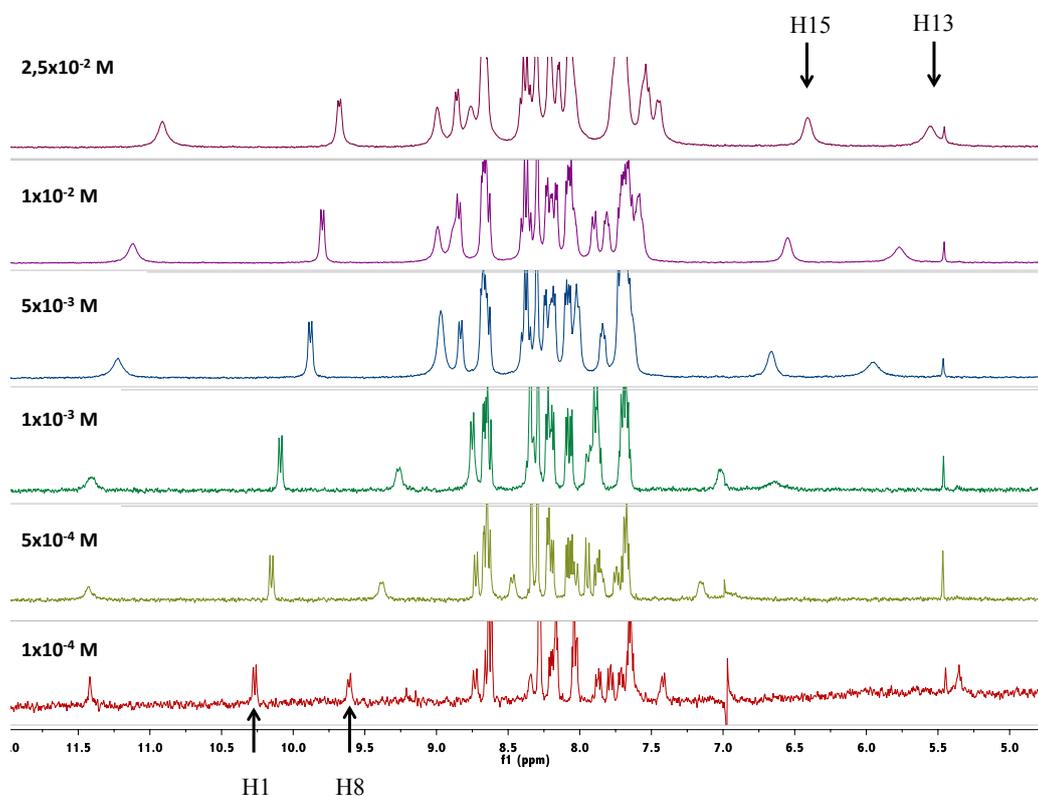


Fig. 2.8. Spectres de RMN  $^1\text{H}$  de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppq-OH}].2\text{PF}_6$   $\mathbf{29}_{\text{phen}}$  dans  $\text{CD}_3\text{CN}$  (400 MHz) à 25 °C à différentes concentrations.

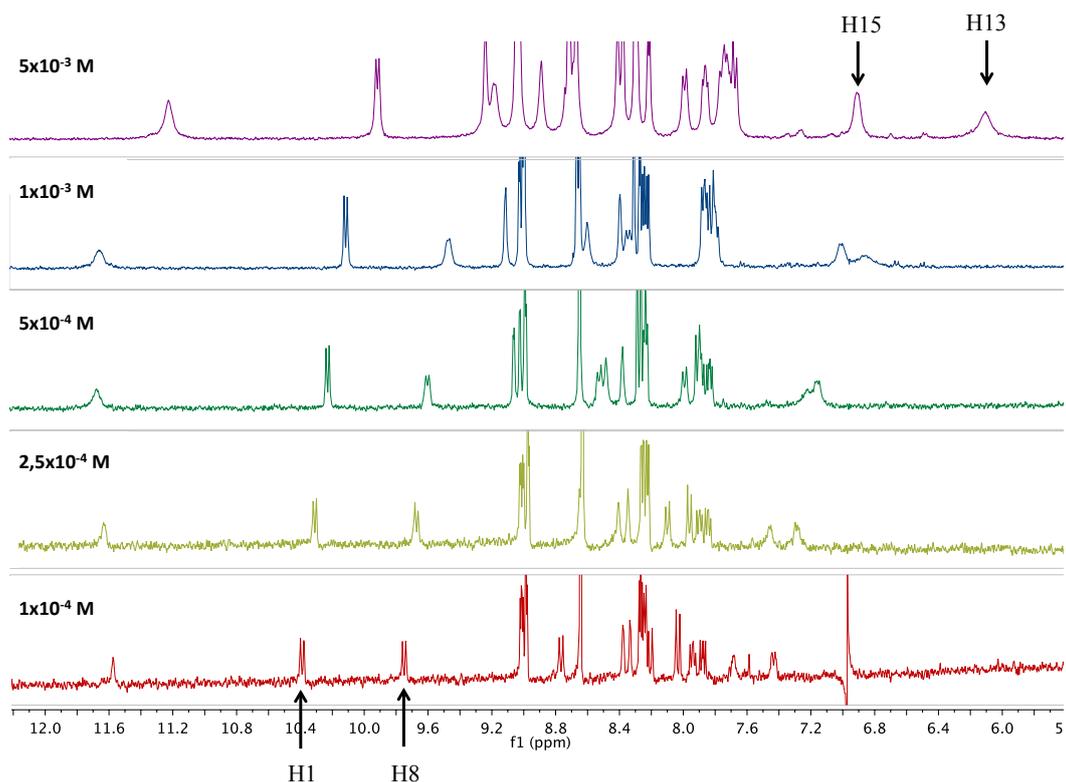


Fig. 2.9. Spectres de RMN  $^1\text{H}$  de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}].2\text{PF}_6$   $\mathbf{29}_{\text{TAP}}$  dans  $\text{CD}_3\text{CN}$  (400 MHz) à 25 °C à différentes concentrations.

On constate que les signaux sont en effet déplacés en fonction de la concentration et qu'ils sont mieux définis à basse concentration, mais également que certains signaux sont plus affectés que d'autres.

Nous avons essayé de déterminer la limite de concentration à laquelle il n'existe que le monomère en solution (Figure 2.10). Cette méthode a déjà été utilisée par les groupes de McDonnell[49] et de Rau,[50] et permet d'obtenir des constantes de dimérisation à partir de variations de déplacement chimique.

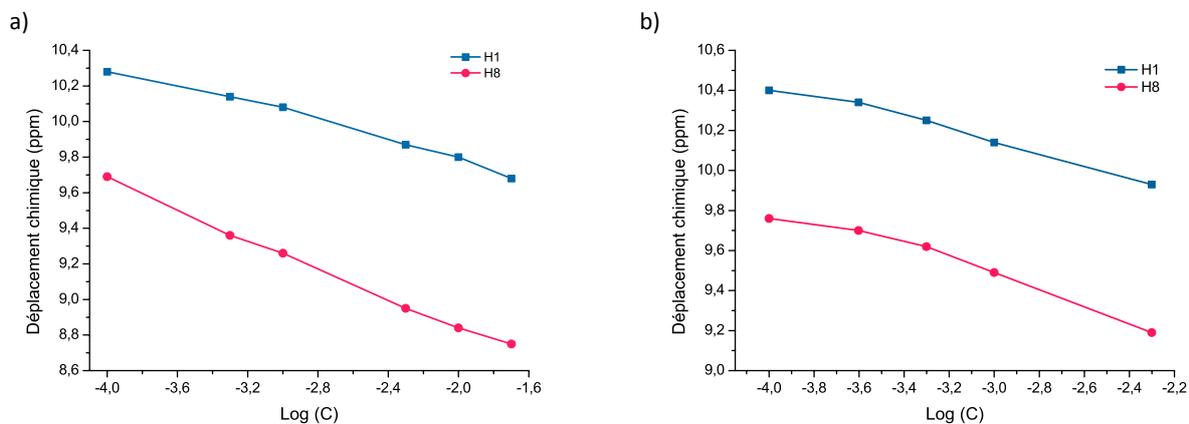


Fig. 2.10. Variations de déplacements chimiques en fonction du logarithme de la concentration pour a)  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}].2\text{PF}_6$   $\mathbf{29}_{\text{phen}}$  et b)  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}].2\text{PF}_6$   $\mathbf{29}_{\text{TAP}}$ .

Il n'a malheureusement pas été possible de calculer de constante de dimérisation à partir de ces données. En effet, la courbe sigmoïdale attendue n'a pas pu être tracée dans son entièreté à cause de la limite de solubilité ( $5 \times 10^{-2}$  -  $5 \times 10^{-3}$  M) de ces complexes (plus faible encore pour le complexe en série TAP) et de la limite de détection de l'appareil.

Les deux complexes ont également été mis en évidence sous forme de dimères en HRMS (MALDI-TOF) (Tableau 2.3).

Complexe	m/z théorique	m/z expérimental
$(2[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}])^+$	1810,36	1810,37
$(2[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}])^+$	1818,32	1818,30

Tableau 2.3. Masses des dimères de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29** détectées par HRMS (MALDI-TOF).

Ce phénomène avait déjà été observé pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29<sub>phen</sub>** et des signaux correspondant jusqu'à 7 complexes agrégés avaient été détectés.[28]

On peut signaler que les signaux correspondant aux dimères ont uniquement été détectés pour les complexes portant le ligand dpqp-OH **29**. Il semblerait donc que ces complexes ont davantage tendance à s'empiler que les autres, plus même que les complexes qui portent un cycle supplémentaire ( $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30**). Ceci a été confirmé par des calculs théoriques réalisés sur différents complexes de la série bpy (par « the HP computers of the Theoretical Chemistry group », Jena).[29] Il est possible que ce comportement soit dû à des interactions de type liaison H plus présentes avec le ligand dpqp-OH.

Une seconde expérience RMN  $^1\text{H}$  a été réalisée pour le complexe en série TAP, au cours de laquelle nous avons suivi la variation des déplacements chimiques en fonction de la température à 5 mM (Figure 2.11). A haute température, la formation de dimères devrait en effet être moins favorisée.

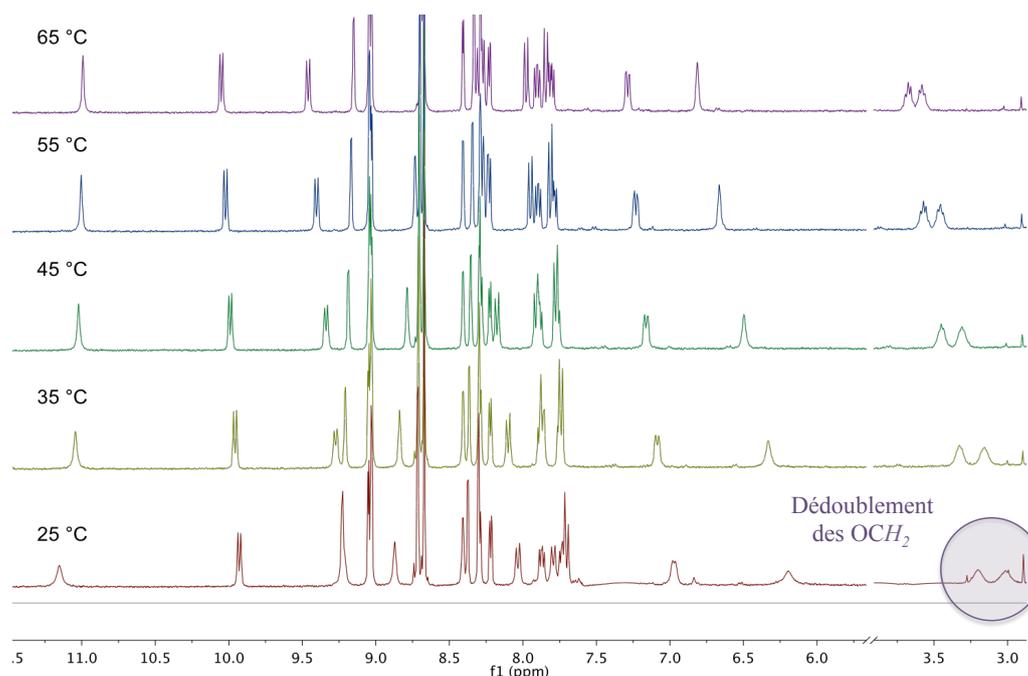


Fig. 2.11. Spectres RMN  $^1\text{H}$  de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}].2\text{PF}_6$  **29<sub>TAP</sub>** dans  $\text{CD}_3\text{CN}$  (400 MHz) à 5 mM à différentes températures.

A cette concentration, on observe bien le dédoublement des signaux du  $OCH_2$ ; ces signaux, ainsi que tous les autres, s'affinent avec l'augmentation en température. On observe également les mêmes tendances en ce qui concerne les variations de déplacement chimique.

L'expérience a également été réalisée pour une plus faible concentration à 0,5 mM en complexe (Figure 2.12).

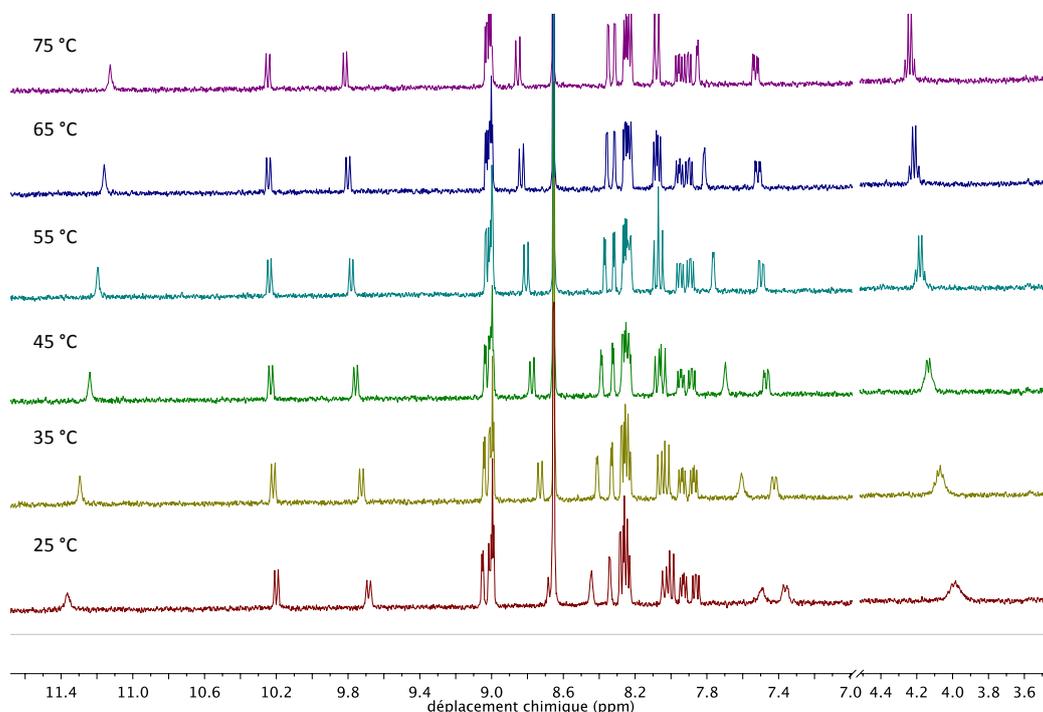


Fig. 2.12. Spectres RMN  $^1H$  de  $[Ru(TAP)_2dpqp-OH].2PF_6$  **29**<sub>TAP</sub> dans  $CD_3CN$  (400 MHz) à 0,5 mM à différentes températures.

A cette concentration, les signaux sont encore plus résolus à haute température. Ceci est particulièrement vrai pour le  $OCH_2$ . Ce signal n'est pas dédoublé à cette concentration mais il est très peu résolu à 25 °C et devient un beau quadruplet à partir de 55 °C. L'évolution des déplacements chimiques est moins marquée qu'à 5 mM mais reste présente (particulièrement pour le proton H13), ce qui indique qu'il existe encore de l'agrégation à  $5 \times 10^{-4}$  M. A cette concentration, nous nous trouvons dans les limites de détection de l'appareil et nous n'avons par conséquent pas pu déterminer la concentration limite d'agrégation.

Cette expérience confirme bien qu'un effet d'empilement influence les déplacements chimiques des complexes  $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29**. Toutes les analyses de RMN  $^1H$  seront donc effectuées à des concentrations connues et précises.

Comme mentionné ci-dessus, l'hypothèse selon laquelle les complexes ont tendance à s'empiler par  $\pi$ -stacking des ligands dpqp a été confirmée pour la série bpy synthétisée par le Dr. Lefebvre, pour laquelle des calculs d'interaction ont été réalisés par DFT par « the HP computers of the Theoretical Chemistry group » à Jena (Figure 2.13).[29] Ces calculs montrent bien qu'un tel empilement est possible et montrent la géométrie probable de celui-ci.

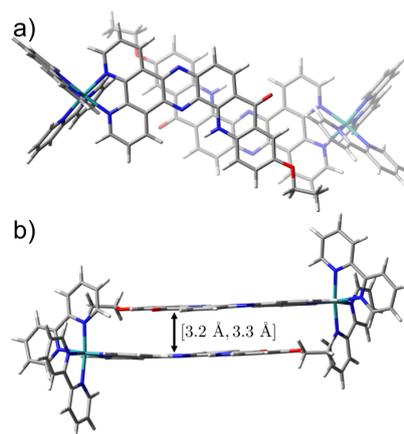


Fig. 2.13. Structure optimisée du dimère  $[Ru(bpy)_2(oxo-dppq)]_2^{4+}$  **29**<sub>bpy</sub> a) Représentation vue du dessus – Position déplacée d'un demi-cycle des ligands dpqp-OH superposés., b) Représentation vue de côté – Distance entre les deux ligands dpqp-OH superposés. [29]

### 2.2.3 $[Ru(L)_2dppqp]^{2+}$

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce chapitre, la voie de synthèse utilisée pour synthétiser les complexes  $[Ru(L)_2dppqp]^{2+}$  **30** à partir de  $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29** est très similaire à celle décrite pour le ligand homologue non complexé (cf Schéma 2.5).

La première étape consiste en la chloration du dpqp-OH chélaté dans l'oxychlorure de phosphore (Schéma 2.19).

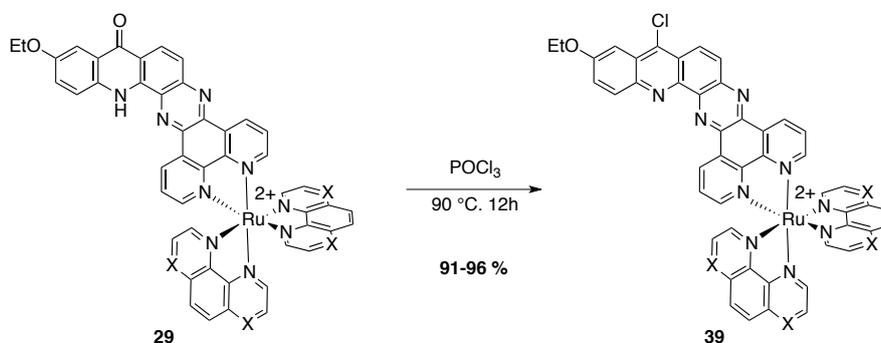


Schéma. 2.19. Synthèse de  $[Ru(L)_2dpqp-Cl]^{2+}$  **39**.

Le protocole qui consiste à chauffer le milieu réactionnel à 90 °C pendant une nuit est le même que celui décrit pour le ligand seul. La réaction est très propre, de telle sorte qu'il suffit de quelques lavages à l'eau pour obtenir le produit pur. Cette réaction permet d'obtenir le complexe avec d'excellents rendements variant de 91 à 96%.

Le  $[Ru(L)_2dpqp-Cl]^{2+}$  **39** a été caractérisé par RMN  $^1H$  et  $^{13}C$ , par spectrométrie de masse haute résolution et par spectroscopie d'absorption UV-vis. L'attribution RMN  $^1H$  a été réalisée partiellement sur base des données déjà obtenues pour les complexes précédents  $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29** et des spectres de corrélation  $^1H$ - $^1H$  (Figure 2.14 et 2.15).

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  des composés chlorés, à l'inverse du  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**, ne présentent pas de signal vers 11 ppm correspondant au proton porté par l'azote acridinique.

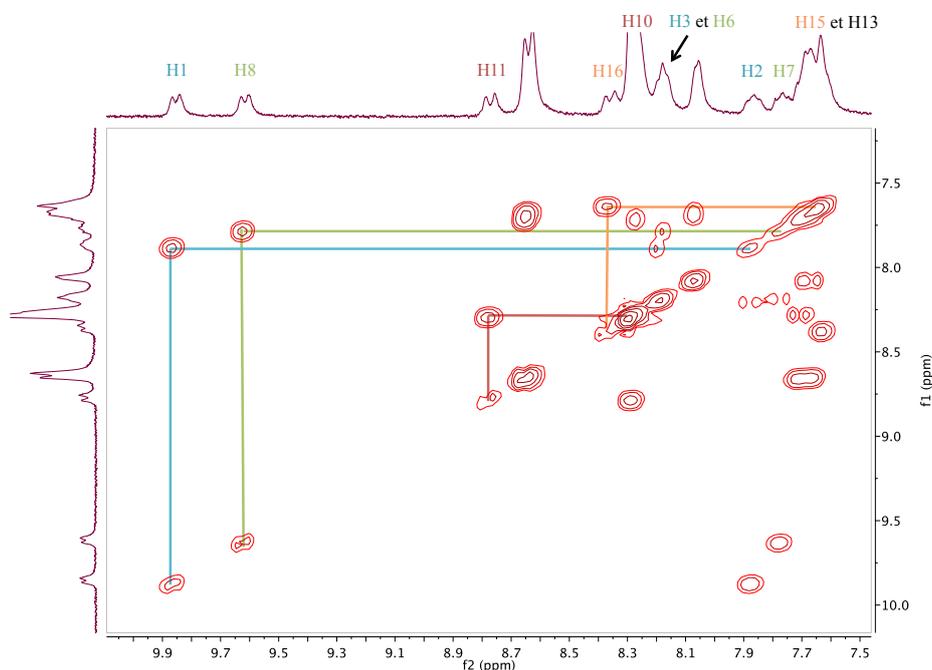


Fig. 2.14. Spectre de RMN 2D COSY de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{PF}_6$  **39<sub>phen</sub>** dans  $\text{CD}_3\text{CN}$  (300 MHz), 5 mM, 25 °C.

H1 et H8 sont très identifiables, par conséquent il a été facile d'attribuer les protons H2, H3, H6 et H7 par corrélation. Le massif situé à 7,65 ppm est le dernier de la région aromatique et intègre pour 6 protons. Parmi ces protons, 4 correspondent aux protons L3 et L8 des phen ancillaires, les deux autres correspondent donc probablement, par comparaison avec les spectres de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29<sub>phen</sub>**, aux protons H13 et H15. H16 est alors identifié par corrélation. Les deux signaux restants, corrélant entre eux, correspondent donc aux protons H10 et H11 (L'attribution provisoire complète est reprise dans la partie expérimentale).

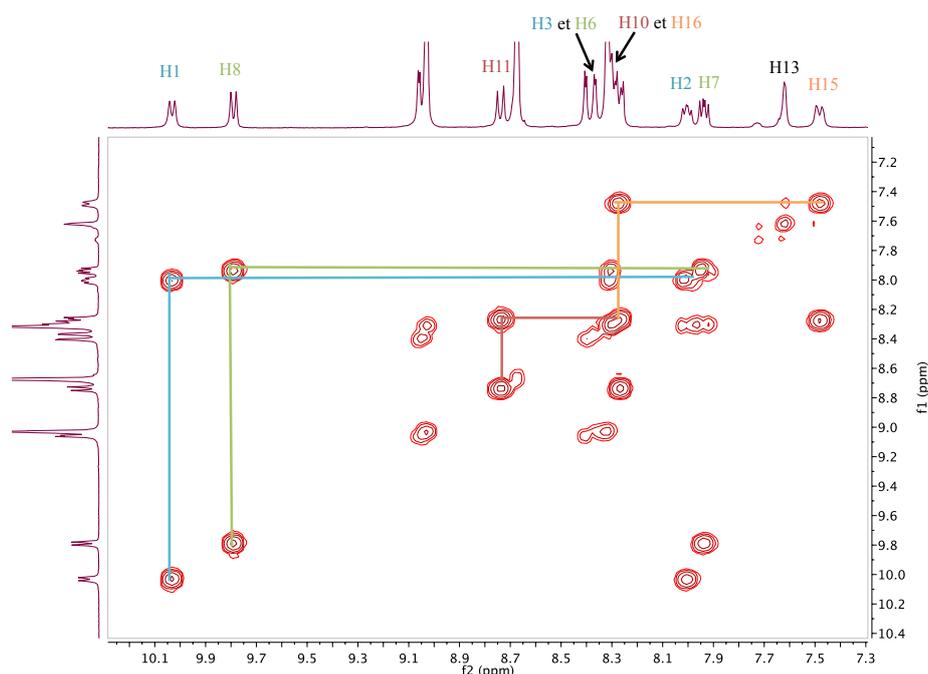


Fig. 2.15. Spectre de RMN 2D COSY de  $[Ru(TAP)_2dpqp-Cl].2PF_6 \mathbf{39}_{TAP}$  dans  $CD_3CN$  (400 MHz), 5 mM, 25 °C.

Les déplacements chimiques observés pour le  $[Ru(TAP)_2dpqp-Cl]^{2+} \mathbf{39}_{TAP}$  sont assez similaires aux signaux observés pour le  $[Ru(phen)_2dpqp-Cl]^{2+} \mathbf{39}_{phen}$  et confirment l'attribution donnée pour ce dernier. On constate que dans les deux cas, les déplacements chimiques des protons H10, H11 et H13 sont particulièrement impactés par la présence du chlore en position 12 puisqu'on observe un déplacement vers les bas champs par rapport aux signaux du  $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+} \mathbf{29}$ .

La chloration est une étape indispensable permettant d'augmenter la réactivité de cette position pour une substitution ultérieure. Néanmoins, cette réactivité pose également problème en ce qui concerne la stabilité de ce complexe. En effet, il a une forte tendance à s'hydrolyser pour retourner au produit de départ. En prenant soin de ne pas le chauffer quand il est en milieu aqueux et en ne le stockant que pour de courtes périodes sous forme solide, il est possible d'éviter la formation de produit hydroxylé. Néanmoins, cette instabilité en milieu aqueux peut poser problème pour les études en milieux biologiques. Nous avons montré par HPLC que le produit d'hydrolyse n'apparaît qu'au bout d'une semaine en milieu aqueux à température ambiante. Cette période de temps est suffisamment longue pour pouvoir envisager une évaluation en milieux biologiques mais constitue néanmoins une limite du point de vue expérimental (période de stockage en phase aqueuse limitée dans le temps).

Un analogue de ce complexe chloré, plus stable, a donc été synthétisé (Schéma 2.20). Il s'agit du  $[Ru(phen)_2dpqp-Br]^{2+} \mathbf{55}_{phen}$ , synthétisé par ajout de  $PBr_3$  à une solution de  $[Ru(phen)_2dpqp-OH]^{2+} \mathbf{29}_{phen}$  dans le DMF.

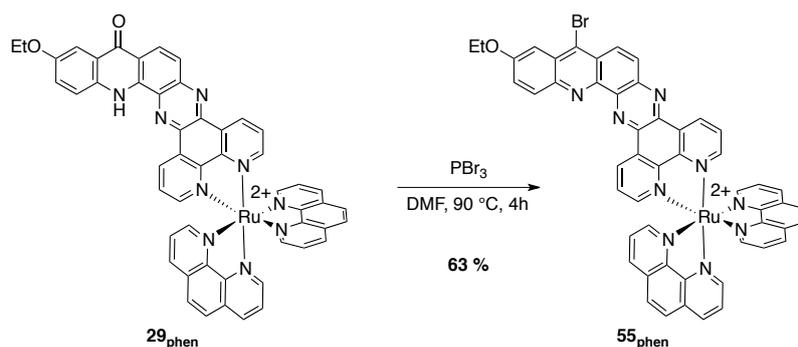


Schéma 2.20. Synthèse de  $[Ru(phen)_2dpqp-Br]^{2+}$  **55<sub>phen</sub>**.

Cette synthèse, initialement décrite par Acheson *et al.*[51],[52] pour l'obtention de 9-bromoacridines, a été adaptée pour que le complexe reste en conditions plus douces. Nous avons donc effectué la réaction dans le DMF et légèrement diminué la température à 90 °C (au lieu de 100 °C) pour ainsi obtenir le complexe bromé **55<sub>phen</sub>** avec 63% de rendement.

Ce complexe a également été caractérisé par RMN  $^1H$  et par spectroscopie UV-Visible. Les propriétés spectroscopiques d'absorption des deux complexes halogénés  $[Ru(phen)_2dpqp-Cl]^{2+}$  **39<sub>phen</sub>** et  $[Ru(phen)_2dpqp-Br]^{2+}$  **55<sub>phen</sub>** sont identiques (Chapitre III).

Le  $[Ru(phen)_2dpqp-Br]^{2+}$  **55<sub>phen</sub>**, plus stable vis à vis de l'hydrolyse, sera évalué dans l'avenir pour son affinité envers les G4. Jusqu'à présent en effet, seuls les analogues  $[Ru(phen)_2dpqp-Cl]^{2+}$  **39<sub>phen</sub>** et  $[Ru(bpy)_2dpqp-Br]^{2+}$  **55<sub>bpy</sub>** (synthétisé par le Dr. Jean-François Lefebvre) ont été étudiés dans le cadre de cette thèse pour leurs propriétés d'interaction avec les G4 (présenté dans le chapitre IV).

La deuxième étape de cette synthèse consiste en une substitution nucléophile du chlore par la 2,2'-diméthoxyéthylamine (Schéma 2.21).

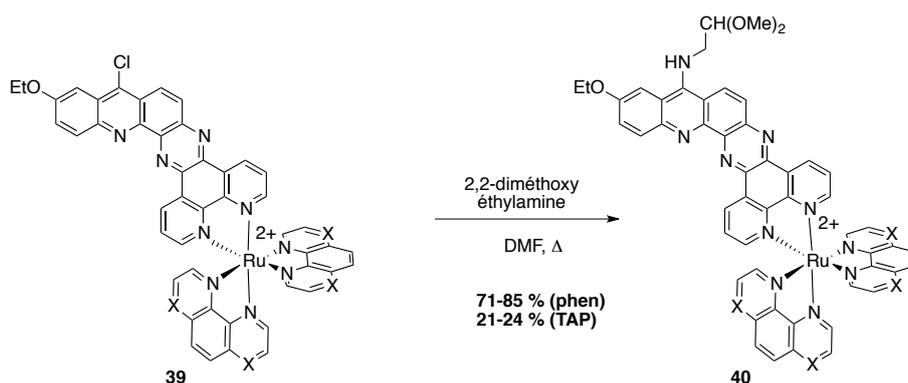


Schéma. 2.21. Synthèse de  $[Ru(L)_2dpqp-DMEA]^{2+}$  **40**.

L'introduction de cette chaîne possédant un aldéhyde protégé est un élément clé pour la construction du dernier cycle. La réaction décrite pour le ligand seul, dpqp-Cl, a également été appliquée à une grande diversité d'amines primaires avec de bons rendements de réaction, variant de 60 à 99%.[26],[53] Néanmoins, le protocole utilisé requiert l'utilisation de phénol à chaud, conditions totalement

incompatibles avec les complexes de ruthénium qui supportent très mal d'être en milieu basique (remplacement des ligands par les anions OH<sup>-</sup> et déstabilisation du complexe).

Un second protocole a été décrit pour la substitution de la 6-amino-9-chloro-2-éthoxy-acridine avec la 2,2'-diméthoxyéthylamine.[26] Cette fois, l'acridine est mise en solution avec environ 7 équivalents de l'amine dans l'éthanol à reflux pendant 24 h. Ces conditions plus douces sont transposables à la chimie sur complexe et les premiers essais de substitution ont donc été réalisés sur cette base. Il n'a cependant pas été possible d'obtenir le complexe désiré dans ces conditions. Afin de pouvoir obtenir le [Ru(phen)<sub>2</sub>dpqp-DMEA]<sup>2+</sup> **40**<sub>phen</sub>, le temps de réaction a été rallongé à 72 h et le nombre d'équivalents d'amine augmenté à 60. Le produit désiré dans la série phen a ainsi pu être obtenu avec 85 % de rendement. Malgré cela, le complexe en série TAP n'a pas pu être obtenu par cette méthode à cause d'une forte dégradation du complexe au cours de la réaction. La différence de réactivité entre les complexes en série phen et TAP est très peu documentée dans la littérature et il a été impossible de trouver un précédent permettant d'expliquer la plus grande sensibilité des complexes en série TAP. Cependant, il a déjà été constaté au laboratoire que l'effet électro-attracteur plus important des ligands TAP pouvait jouer un rôle déterminant sur la réactivité du complexe. Par exemple, il est généralement plus difficile de chélater un troisième ligand sur le Ru(TAP)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> **31**<sub>TAP</sub> que sur le Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> **31**<sub>phen</sub>.

Afin de limiter cet effet de dégradation observé pour le TAP, nous avons d'abord essayé de diminuer le temps de réaction. Premièrement, l'éthanol a été remplacé par le DMF ; ceci permet d'augmenter la température de réaction et d'améliorer la solubilité du complexe dans le milieu réactionnel. Ensuite, nous avons décidé de travailler en tube scellé dans un réacteur micro-onde afin de réduire encore le temps de réaction et d'éviter l'évaporation du réactif. Le nombre d'équivalents de réactif a été ajusté de façon à diminuer au maximum la vitesse de dégradation et le temps de réaction. Si nous utilisons un trop large excès de l'amine, le complexe se dégrade rapidement ; dans le cas contraire, le temps de réaction est rallongé et la dégradation apparaît au cours du temps. Nous avons également joué sur la température et la concentration pour diminuer le temps de réaction.

Le récapitulatif des conditions de réaction testées sur le [Ru(TAP)<sub>2</sub>dpqp-Cl]<sup>2+</sup> **39**<sub>TAP</sub> est présenté dans le tableau 2.4 ci-dessous, les essais de réaction ont été réalisés sur 5 mg de produit de départ. Les réactions sont suivies par HPLC toutes les 15 minutes et menées jusqu'à disparition du produit de départ :

Entrées	Température	Temps	Equivalent en réactif	Volume	Résultat
1	110 °C	60 min	80 éq.	1 mL	Dégradation au cours du temps
2	120 °C	45 min	80 éq.	1 mL	Dégradation au cours du temps, moins importante que pour l'entrée 1
3	130 °C	30 min	80 éq.	1 mL	Même résultat que entrée 2
4	140 °C	15 min	80 éq.	1 mL	Même résultat que entrée 2
5	140 °C	20 min	50 éq.	1 mL	Moins de dégradation que pour entrée 4
6	140 °C	15 min	50 éq.	0,5 mL	Dégradation au cours du temps
7	150 °C	20 min	50 éq.	1 mL	Dégradation au cours du temps
8	150 °C	20 min	20 éq.	0,5 mL	Dégradation au cours du temps
9	140 °C	60 min	10 éq.	1 mL	Dégradation au cours du temps
10	140 °C	15 min	50 éq.	1 mL	Moins de dégradation que pour entrée 5

Tableau 2.4. Optimisation des conditions réactionnelles pour la synthèse de  $[Ru(TAP)_2dpqp-DMEA]^{2+}$   $40_{TAP}$  dans le DMF sous irradiation micro-onde (200W).

Les rendements de chaque réaction n'ont pas été calculés à cause, d'une part, de la dégradation trop importante du complexe, rendant l'isolement du produit très difficile et, d'autre part, de la faible quantité de produit mise en jeu puisque nous n'avons engagé que 5 mg à chaque essai (une grande quantité de complexe de départ étant difficile à obtenir). Les résultats ont donc tous été évalués sur la base des chromatogrammes enregistrés en HPLC. Voici (Figure 2.16) à titre d'exemple les chromatogrammes correspondant aux essais 2 et 10 :

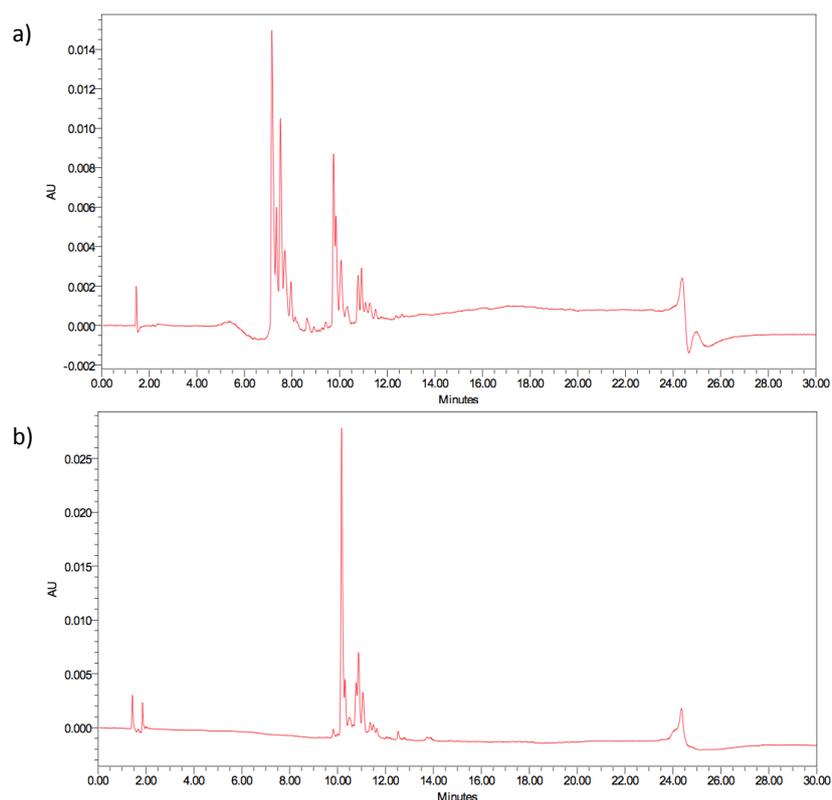


Fig. 2.16. Chromatogrammes de suivis de réaction de substitution pour obtenir le  $[Ru(TAP)_2dpqp-DMEA]^{2+}$   $40_{TAP}$  a) entrée 2 (éluant méthanol/eau), b) entrée 10 (éluant acétonitrile/eau).

Comme on peut le constater dans les entrées 6 et 8, augmenter la concentration en réactif pour augmenter la vitesse de réaction n'est pas la meilleure solution, tous les autres essais ont donc été menés à moindre concentration. Augmenter la température permet de diminuer le temps de réaction et par conséquent la dégradation du produit ; néanmoins, le produit ne semble pas supporter les conditions de réaction à 150 °C ; 140 °C semble donc être la meilleure alternative. Une trop faible quantité d'amine implique une conversion plus lente du produit de départ et une forte dégradation est observée au cours du temps. Le meilleur compromis trouvé est d'utiliser 50 équivalents de l'amine.

L'entrée 10 est l'essai pour lequel nous avons obtenu les meilleurs résultats. La réaction n'est pas complète et on observe encore beaucoup de dégradation. Néanmoins, cet essai est le seul pour lequel la dégradation est limitée et qui nous a permis d'isoler le produit désiré par chromatographie sur colonne C18.

Les conditions (140 °C, 15 minutes, en présence de 50 équivalents d'amine) ont été transposées à une plus grande quantité (20 mg de complexe). Par manque de temps, il n'a malheureusement pas été possible de trouver des conditions permettant d'obtenir le complexe avec un meilleur rendement que 24%. Il est encore envisageable de jouer sur les différents paramètres de la réaction en vue d'améliorer ce rendement pour de futurs travaux.

Au vu du gain de temps considérable de la réaction, ce protocole a également été appliqué au complexe de la série phen pour obtenir le  $[Ru(phen)_2dpqp-DMEA]^{2+}$   $40_{phen}$ . Les conditions réactionnelles donnant le meilleur résultat sont un chauffage sous micro-ondes pendant 90 minutes à

140 °C avec 20 équivalents d'amine. Le complexe ne se dégrade que légèrement dans ces conditions et il a été possible de l'isoler avec 85% de rendement.

Les deux complexes ont été identifiés par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , par spectrométrie de masse haute résolution et par spectroscopie d'absorption UV-vis. L'attribution RMN  $^1\text{H}$  (Figure 2.17 et 2.18) a été réalisée partiellement sur base des données déjà obtenues avec les complexes précédents mais s'en distingue par la présence de signaux correspondant à la chaîne DMEA.

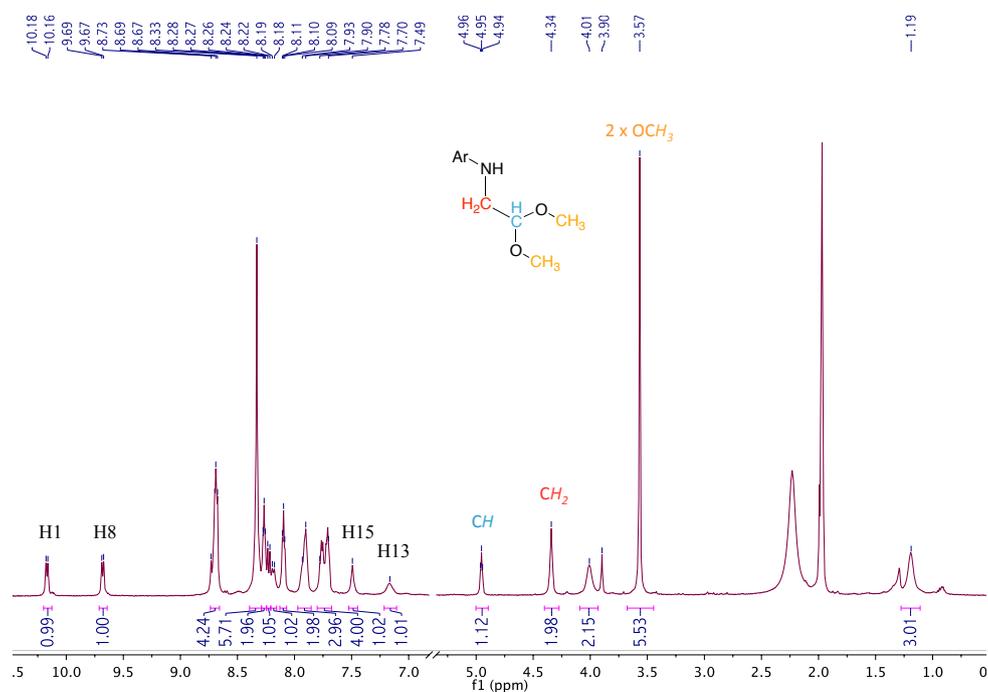


Fig. 2.17. Spectre de RMN  $^1\text{H}$  de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-DMEA}].2\text{PF}_6$   $40_{\text{phen}}$  dans  $\text{CD}_3\text{CN}$  (400 MHz), 5 mM, 25 °C.

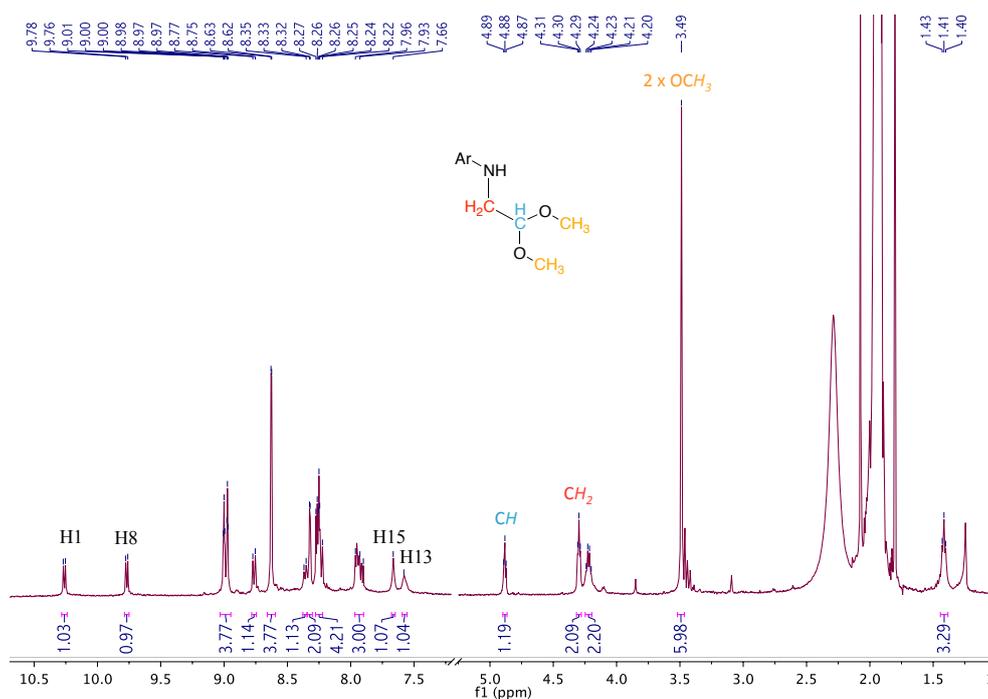


Fig. 2.18. Spectre de RMN  $^1\text{H}$  de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-DMEA}].2\text{PF}_6$   $40_{\text{TAP}}$  dans  $\text{CD}_3\text{CN}$  (400 MHz), 5 mM, 25 °C.

La région des protons aromatiques est très similaire à celle des spectres déjà obtenus pour les complexes précédents et on distingue à nouveau particulièrement les protons H<sub>1</sub> et H<sub>8</sub>. Les signaux caractéristiques de la chaîne portée par ce complexe sont visibles à 4,88, 4,29 et 3,49 ppm et intègrent respectivement pour 1, 2 et 6 protons.

La dernière réaction qui correspond à l'étape de fermeture du cycle se fait à température ambiante dans le TFA (Schéma 2.22). L'acide, également utilisé comme solvant, a pour fonction de déprotéger la fonction aldéhydique et de catalyser la réaction de type Friedel-Craft.

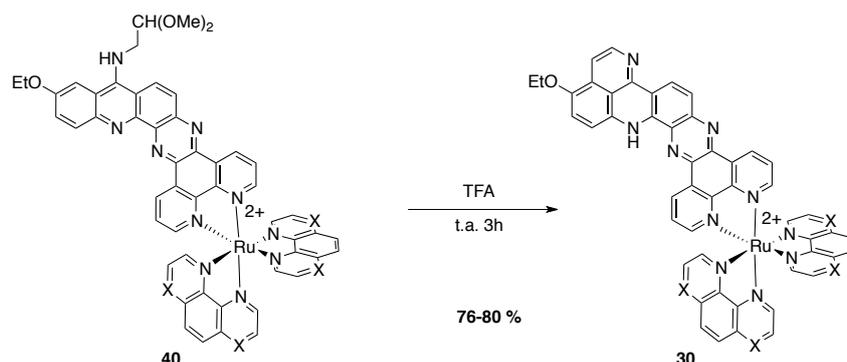


Schéma 2.22. Synthèse de  $[Ru(L)_2dppqp]^{2+}$  **30**.

Cette réaction a l'avantage d'être régiosélective. En effet, la présence du groupement éthoxy dirige la réaction grâce à son effet mésomère donneur. La position 13, dont la densité électronique est augmentée, est ainsi plus disponible pour une substitution électrophile aromatique.

Deux protocoles ont été décrits dans la littérature pour cette réaction en milieu acide. La cyclisation sur le ligand heptacyclique **28** pour donner le ligand octacyclique **26** se fait en présence d'acide méthane sulfonique. La réaction sur l'acridine **34** qui mène à la pyridioacridine **25** implique l'utilisation de TFA. Les deux réactions sont réalisées à température ambiante.[26] Nous avons arbitrairement choisi d'essayer en premier lieu la réaction avec l'acide trifluoroacétique (TFA). L'avancement de la réaction a été suivi par HPLC. A nouveau, le complexe en série phen a pu être obtenu sans problème majeur alors qu'une totale dégradation du produit a été observée pour le complexe en série TAP. La procédure a donc été adaptée pour ce dernier en diluant l'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane (DCM). Pour une dégradation minimale du complexe et une complétion maximale de la réaction, un rapport 5 :1 (DCM/TFA) et un temps de réaction de 18 h sont nécessaires.

Les complexes ont été caractérisés par RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, par spectrométrie de masse haute résolution et par spectroscopie d'absorption UV-visible. L'attribution des signaux obtenus en RMN <sup>1</sup>H est plus compliquée pour ces composés que pour les complexes précédents puisque la nature du ligand a changé et qu'il y a désormais trois groupes de paire de protons (H10-H11, H13-H14 et H16-H17) (Figure 2.19) qui ne peuvent pas être attribués avec certitude avec les corrélations COSY uniquement. Par manque de temps, aucune autre expérience RMN n'a été menée qui pourrait permettre d'attribuer ces protons.

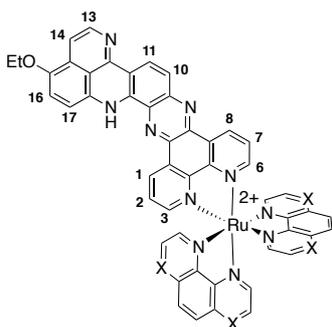


Fig. 2.19. Numérotation des protons du ligand dppqp.

Le spectre du complexe en série TAP (Figure 2.20) est plus facile à interpréter car moins de protons sont présents et qu'il est mieux résolu que celui obtenu pour le complexe en série phen. Nous allons donc commencer par l'attribution des signaux de  $[Ru(TAP)_2dppqp].2PF_6$  **30**<sub>TAP</sub> puis nous en servirons pour l'attribution des signaux de  $[Ru(phen)_2dppqp].2PF_6$  **30**<sub>phen</sub>.

RMN  $^1H$   $[Ru(TAP)_2dppqp].2PF_6$  **30**<sub>TAP</sub>

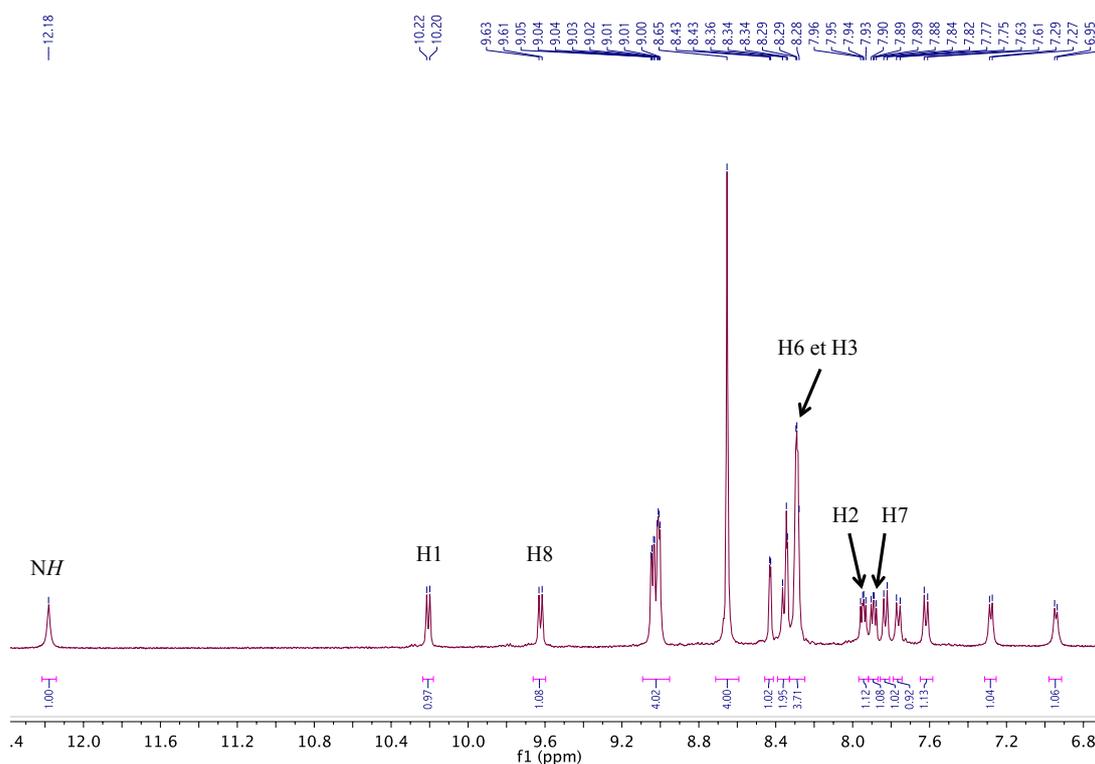


Fig 2.20. Spectre RMN  $^1H$  de  $[Ru(TAP)_2dppqp].2PF_6$  **30**<sub>TAP</sub> dans  $CD_3CN$  à 25 °C,  $2 \times 10^{-3}$  M (région des protons aromatiques).

Les protons  $H_1$  et  $H_8$  (partie phénanthroline des ligands dpqp et dppqp) sont très peu influencés par la nature du ligand et sont donc très facilement reconnaissables sur les spectres RMN  $^1H$  de tous les complexes étudiés. A partir des corrélations COSY, il a été facile d'attribuer les protons  $H_2$ ,  $H_3$ ,  $H_6$  et  $H_7$  à partir de  $H_1$  et  $H_8$ .

En ce qui concerne les autres protons du ligand, seules les paires peuvent être données par corrélation  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure 2.21).

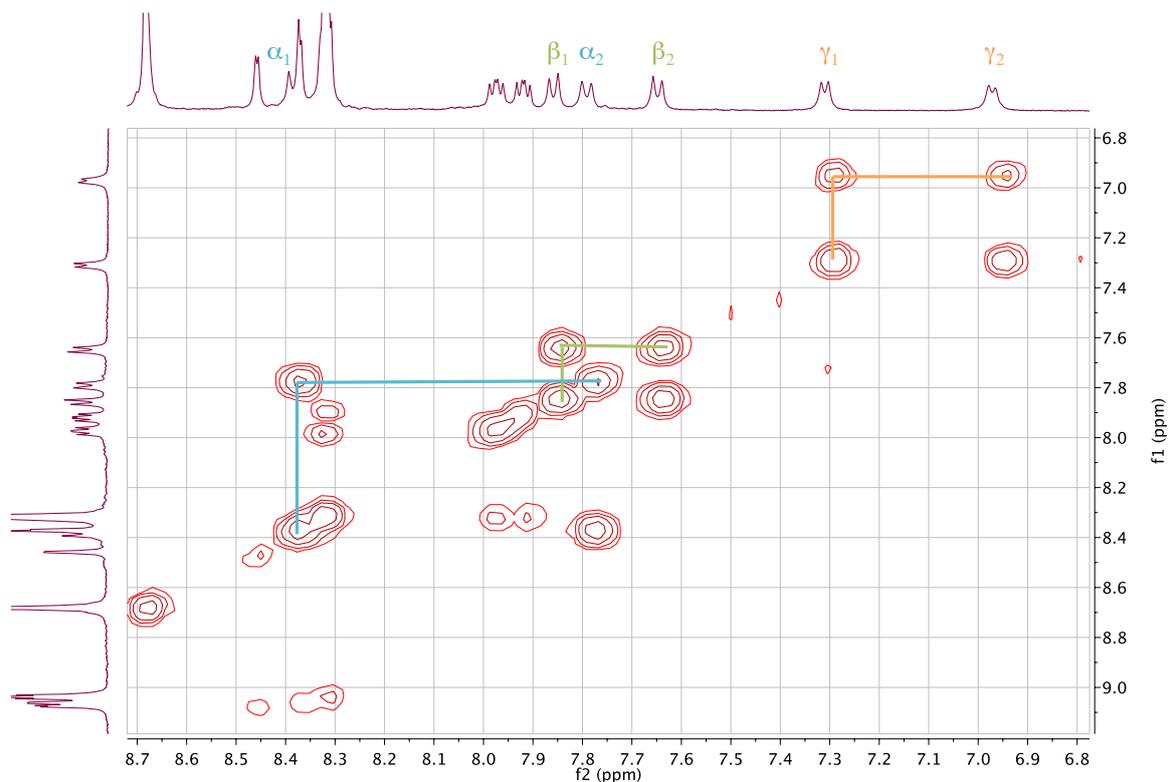


Fig 2.21. Spectre COSY de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}].2\text{PF}_6$   $\mathbf{30}_{\text{TAP}}$  dans  $\text{CD}_3\text{CN}$  à  $25\text{ }^\circ\text{C}$  (8,7 à 6,8 ppm).

En comparant ces signaux avec les déplacements des protons  $\text{H}_{10}$  et  $\text{H}_{11}$  des autres complexes de la série, il semble raisonnable d'attribuer la paire  $\beta$  à  $\text{H}_{10}$  et  $\text{H}_{11}$ . Nous avons donc une attribution partielle provisoire des protons du complexe  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}].2\text{PF}_6$   $\mathbf{30}_{\text{TAP}}$  dans  $\text{CD}_3\text{CN}$  à  $25\text{ }^\circ\text{C}$  (Tableau 2.5) :

$\delta$ (ppm)	Multiplicité	Intégration	Attribution	J (Hz)
12,18	s	1	NH	-
10,21	d	1	H <sub>1</sub>	8,2
9,62	d	1	H <sub>8</sub>	8,2
9,05	d	1	L <sub>2</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>7</sub> ( <sup>c</sup> )	2,7
9,03	d	1	L <sub>2</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>7</sub> ( <sup>c</sup> )	2,8
9,01	m	2	L <sub>2</sub> ( <sup>c</sup> ) et L <sub>7</sub> ( <sup>c</sup> )	-
8,65	s	4	L <sub>9</sub> ( <sup>c</sup> ) et L <sub>10</sub> ( <sup>c</sup> )	-
8,43	d	1	L <sub>3</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>6</sub> ( <sup>c</sup> )	2,7
8,34	m	2	H <sub>13</sub> , H <sub>14</sub> , H <sub>16</sub> ou H <sub>17</sub> et L <sub>3</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>6</sub> ( <sup>c</sup> )	-
8,29	m	4	H <sub>6</sub> , H <sub>3</sub> et L <sub>3</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>6</sub> ( <sup>c</sup> )	-
7,94	dd	1	H <sub>2</sub>	8,1 ; 5,6
7,89	dd	1	H <sub>7</sub>	8,0 ; 5,5
7,83	d	1	H <sub>11</sub>	9,0
7,76	d	1	H <sub>13</sub> , H <sub>14</sub> , H <sub>16</sub> , ou H <sub>17</sub>	9,6
7,62	d	1	H <sub>10</sub>	9,0
7,28	d	1	H <sub>13</sub> , H <sub>14</sub> , H <sub>16</sub> , ou H <sub>17</sub>	7,0
6,94	d	1	H <sub>13</sub> , H <sub>14</sub> , H <sub>16</sub> , ou H <sub>17</sub>	7,0
4,12	q	2	O-CH <sub>2</sub>	6,8
1,33	t	3	CH <sub>3</sub>	6,8

Tableau 2.5. Attribution des signaux de RMN <sup>1</sup>H de [Ru(TAP)<sub>2</sub>dppqp].2PF<sub>6</sub> **30**<sub>TAP</sub> dans CD<sub>3</sub>CN à 25 °C.

RMN <sup>1</sup>H [Ru(phen)<sub>2</sub>dppqp].2PF<sub>6</sub> **30**<sub>phen</sub>

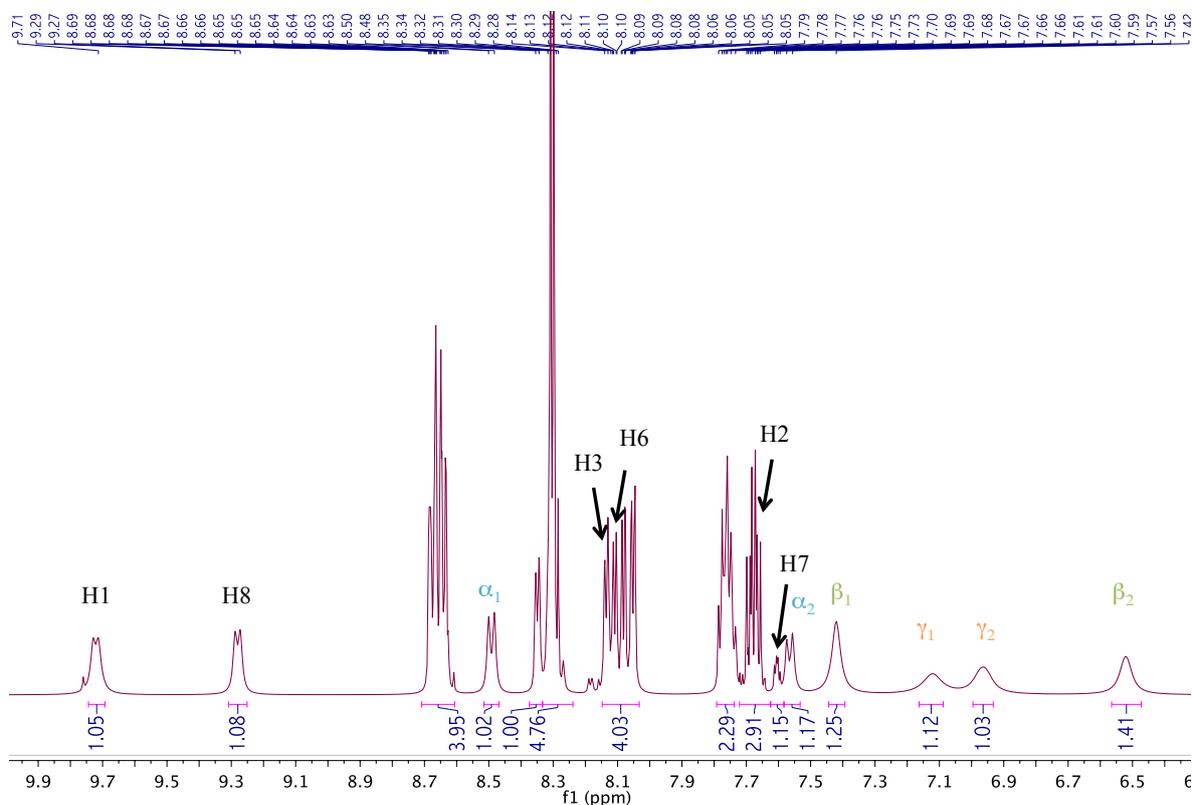


Fig. 2.22. Spectre RMN <sup>1</sup>H de [Ru(phen)<sub>2</sub>dppqp].2PF<sub>6</sub> **30**<sub>phen</sub> dans CD<sub>3</sub>CN à 25 °C, 8x10<sup>-3</sup> M (région des protons aromatiques)

Dans le cas de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}].2\text{PF}_6$ , **30**<sub>phen</sub> le spectre RMN comporte plus de protons (28 dans la région des protons aromatiques) que pour le complexe analogue à base de TAP, la superposition des signaux rend donc l'attribution plus difficile (Figure 2.22). On observe également un effet d'empilement plus important, se traduisant par la mauvaise résolution des protons  $\beta$  et  $\gamma$ , probablement due à la plus grande concentration ( $10^{-2}\text{M}$ ) en produit (nécessaire pour observer des signaux suffisamment résolus en un temps raisonnable). Il a néanmoins été possible de réaliser une attribution partielle des signaux (tableau 2.6), supportée par des expériences de corrélation COSY.

$\delta$ (ppm)	Multiplicité	Intégration	Attribution	J (Hz)
9,72	d	1	H <sub>1</sub>	8,4
9,28	d	1	H <sub>8</sub>	8,1
8,66	m	4	L <sub>4</sub> ( <sup>c</sup> ) et L <sub>7</sub> ( <sup>c</sup> )	-
8,49	d	1	H <sub>13</sub> , H <sub>14</sub> , H <sub>16</sub> ou H <sub>17</sub>	9,1
8,34	d	1	L <sub>2</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>9</sub> ( <sup>c</sup> )	5,2
8,30	m	5	L <sub>5</sub> ( <sup>c</sup> ), L <sub>6</sub> ( <sup>c</sup> ) et L <sub>2</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>9</sub> ( <sup>c</sup> )	-
8,14	d	1	H <sub>3</sub>	5,1
8,11	dd	1	H <sub>6</sub>	5,3 ; 1,3
8,08	dd	1	L <sub>2</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>9</sub> ( <sup>c</sup> )	5,1 ; 1,3
8,05	dd	1	L <sub>2</sub> ( <sup>c</sup> ) ou L <sub>9</sub> ( <sup>c</sup> )	5,3 ; 1,3
7,76	m	2	L <sub>3</sub> ( <sup>c</sup> ) et L <sub>8</sub> ( <sup>c</sup> )	-
7,68	m	3	L <sub>3</sub> ( <sup>c</sup> ), L <sub>8</sub> ( <sup>c</sup> ) et H <sub>2</sub>	-
7,60	m	1	H <sub>7</sub>	-
7,56	d	1	H <sub>13</sub> , H <sub>14</sub> , H <sub>16</sub> ou H <sub>17</sub>	9,1
7,42	br s	1	H <sub>10</sub> , H <sub>11</sub> , H <sub>13</sub> , H <sub>14</sub> , H <sub>16</sub> ou H <sub>17</sub>	-
7,12	br s	1	H <sub>10</sub> , H <sub>11</sub> , H <sub>13</sub> , H <sub>14</sub> , H <sub>16</sub> ou H <sub>17</sub>	-
6,96	br s	1	H <sub>10</sub> , H <sub>11</sub> , H <sub>13</sub> , H <sub>14</sub> , H <sub>16</sub> ou H <sub>17</sub>	-
6,52	br s	1	H <sub>10</sub> , H <sub>11</sub> , H <sub>13</sub> , H <sub>14</sub> , H <sub>16</sub> ou H <sub>17</sub>	-
3,81	m	2	O-CH <sub>2</sub>	-
1,04	m	3	CH <sub>3</sub>	-

Tableau 2.6. Attribution des signaux RMN <sup>1</sup>H de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}].2\text{PF}_6$  **30**<sub>phen</sub> dans CD<sub>3</sub>CN à 25 °C.

Ces attributions RMN sont partielles et doivent encore être confirmées par des études de corrélation plus poussées que nous n'avons pas eu le temps de réaliser durant cette thèse.

Ces deux complexes ont pu être obtenus avec de bons rendements variant de 76 à 80% sur cette dernière étape de synthèse. Le rendement global de la réaction à partir de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp-OH}]^{2+}$  **29** est d'environ 59% pour la série phen, rendement tout à fait respectable, et de 20% pour la série TAP, rendement assez bas en raison de la forte dégradation observée lors de l'étape de substitution du chlore par la 2,2'-diméthoxyéthylamine.

Du point de vue des propriétés photophysiques, il nous a paru intéressant de poursuivre un peu plus loin les synthèses afin de pouvoir établir une relation entre les propriétés photophysiques particulières des complexes (chapitre III) et la structure du ligand. La réaction envisagée est une dé-éthylation oxydative déjà décrite pour certaines pyridoacridines tétracycliques (Schéma 2.23).[54],[55] Cette réaction n'a néanmoins jamais été réalisée sur le ligand octacyclique non chélaté, probablement à

cause de la trop grande insolubilité de ce produit. L'obtention de cette structure nous permet de comparer les formes « oxydée » et « réduite » du ligand dppqp sur complexe.

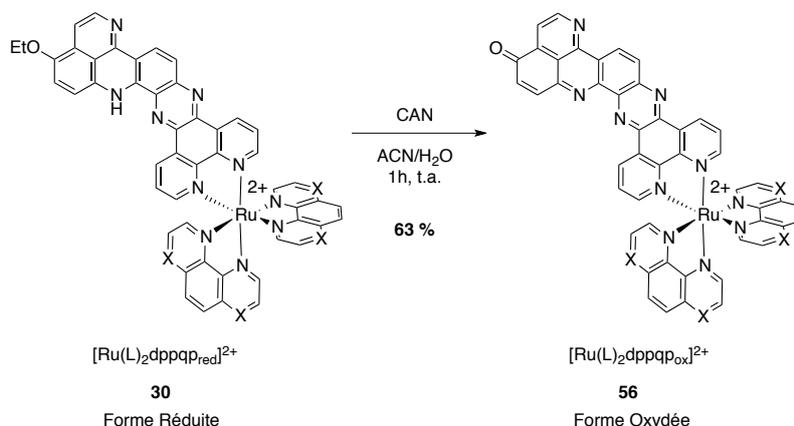


Schéma 2.23. Synthèse de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$  **56**.

Le nitrate de cérium et d'ammonium (CAN) a été utilisé à maintes reprises pour ce type de réaction.[54]–[56] La réaction est effectuée à température ambiante dans l'eau sur le complexe possédant des contre-ions chlorures. A nouveau, le complexe est capable de résister à ces conditions de réaction et est obtenu au bout d'une heure avec 63% de rendement (série TAP). La réaction, trop rapide pour être suivie par HPLC, est suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible puisque les spectres de ces deux espèces se distinguent particulièrement. Le complexe a été caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  (Figure 2.23) et par spectrométrie de masse.

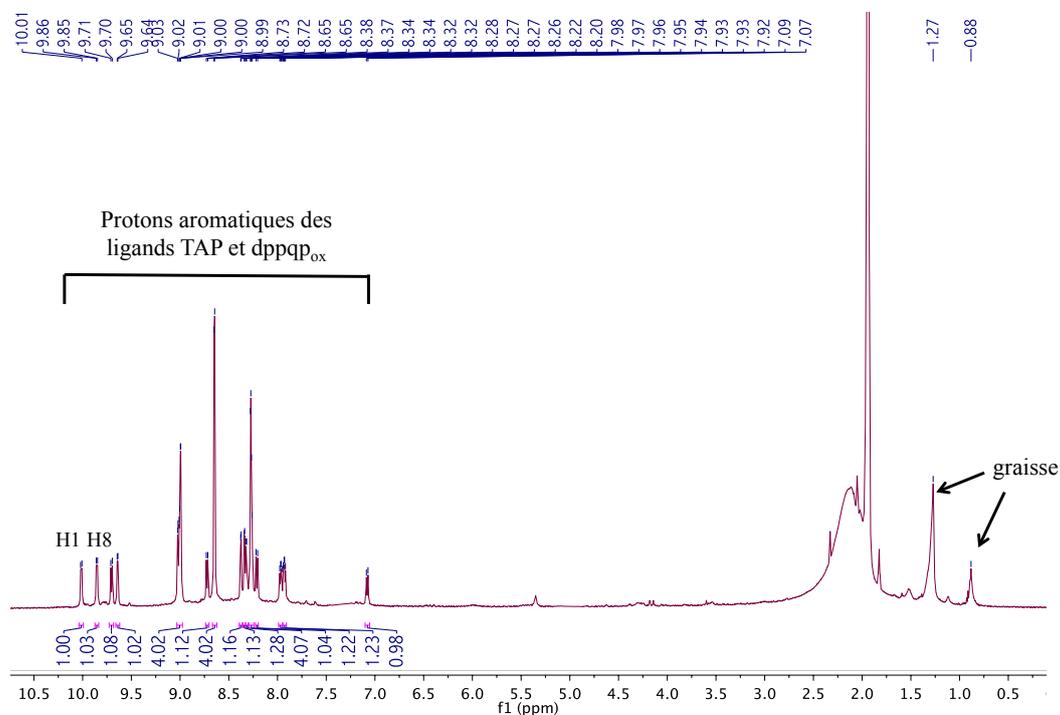


Fig. 2.23. Spectre RMN  $^1\text{H}$  de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}].2\text{PF}_6$  **56**<sub>TAP</sub> dans  $\text{CD}_3\text{CN}$  à  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5 \times 10^{-3}\text{ M}$ .

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  est caractérisé par l'absence des signaux correspondant à l'éthoxy qui n'est maintenant plus présent sur la molécule. Les seuls signaux correspondant aux protons du complexe se situent dans la région des protons aromatiques.

Le complexe en série phen a également été synthétisé et détecté par spectrométrie de masse du brut réactionnel (annexe) mais, par manque de temps, il n'a pas pu être isolé et caractérisé par RMN  $^1\text{H}$ . Un complexe analogue en série bpy a également été synthétisé par le Dr. Lefebvre.

En conclusion, un cycle supplémentaire a pu être construit à partir de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**, nous permettant d'obtenir le ligand  $\text{dppqp}_{\text{red}}$  complexé à un centre métallique de ruthénium par une méthode de chimie sur complexe. Il a même été possible de synthétiser le complexe  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$  **56** possédant un ligand jamais encore synthétisé quand non-chélaté. Cette approche est peu commune et peu d'exemples ont été rapportés dans la littérature ; elle est néanmoins de plus en plus envisagée en raison des opportunités inédites de synthèse qu'elle offre. En effet, la chélation d'un ligand possédant un très large plan étendu est généralement difficile. De plus, la solubilité que confère le complexe permet une fonctionnalisation qui peut être parfois difficile sur le ligand seul puisque les intermédiaires de synthèse sont généralement difficiles à synthétiser et à caractériser. Les complexes synthétisés lors de ce travail sont résistants à la majorité des conditions utilisées mais, comme nous l'avons vu, sont plus sensibles aux réactions de substitution ou encore de cyclisation (particulièrement pour la série TAP).

Les complexes synthétisés dans ce travail ont été évalués du point de vue photophysique (chapitre III) mais également en présence de G4 (chapitre IV).

## Bibliographie

- [1] F. H. Burstall, "Optical activity dependent on coordinated bivalent ruthenium," *J. Chem. Soc.*, p. 173, 1936.
- [2] J. A. Broomhead and G. Charles, "Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) dichloride Hexahydrate," *Inorg. Synth.*, vol. 28, pp. 338–340, 1990.
- [3] E. A. Seddon and K. R. Seddon, *The Chemistry of Ruthenium*, Elsevier. Elsevier, 1984.
- [4] L. Spiccia, G. B. Deacon, and C. M. Kepert, "Synthetic routes to homoleptic and heteroleptic ruthenium(II) complexes incorporating bidentate imine ligands," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 248, no. 13–14, pp. 1329–1341, 2004.
- [5] R. B. Silverman, S. J. Hoffman, and W. B. Catus III, "Ruthenium(II) Tris(bipyrazyl) Dication - A New Photocatalyst," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 102, no. 18, pp. 7128–7129, 1980.
- [6] A. Kirsch-De Mesmaeker, R. Nasielski-Hinkens, D. Maetens, D. Pauwels, and J. Nasielski, "Synthesis and Spectroscopic and Electrochemical Properties of a New Ruthenium Complex: The Tris(1,4,5,8-tetraazaphenanthrene)ruthenium(II) Dication," *Inorg. Chem.*, vol. 23, no. 3, pp. 377–379, 1984.
- [7] B. P. Sullivan, D. J. Salmon, and T. J. Meyer, "Mixed Phosphine 2,2'-Bipyridine Complexes of Ruthenium," *Inorg. Chem.*, vol. 17, no. 12, pp. 3334–3341, 1978.
- [8] E. Amouyal, A. Homsy, J.-C. Chambron, and J.-P. Sauvage, "Summary for Policymakers," in *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*, no. 6, Intergovernmental Panel on Climate Change, Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990, pp. 1–30.
- [9] J. C. Chambron, J. P. Sauvage, E. Amouyal, and P. Koffi, "Ru(bipy)<sub>2</sub>(dipyridophénazine)<sup>2+</sup>: A Complex with a Long Range Directed Charge Transfer Excited State," *Nouv. J. Chim.*, vol. 9, p. 527, 1985.
- [10] J. Bolger, A. Gourdon, and J. Launay, "Stepwise Syntheses of Mono- and Dinuclear Ruthenium tpphz Complexes [(bpy)<sub>2</sub>Ru(tpphz)]<sup>2+</sup> and [(bpy)<sub>2</sub>Ru(tpphz)Ru(bpy)<sub>2</sub>]<sup>4+</sup>," *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, vol. 20, pp. 1799–1800, 1995.
- [11] S. Rickling, L. Ghisdavu, F. Pierard, P. Gerbaux, M. Surin, P. Murat, E. Defrancq, C. Moucheron, and A. Kirsch-De Mesmaeker, "A rigid dinuclear ruthenium (II) complex as an efficient photoactive agent for bridging two guanine bases of a duplex or quadruplex oligonucleotide," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 16, no. 13, pp. 3951–3961, 2010.
- [12] A. E. Friedman, J.-C. Chambron, J. Sauvage, N. J. Turro, and J. K. Barton, "Molecular 'Light Switch' for DNA: Ru(bpy)<sub>2</sub>(dppz)<sup>2+</sup>," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 112, no. 11, pp. 4960–4962, 1990.
- [13] F. Pierard and A. Kirsch-De Mesmaeker, "Bifunctional transition metal complexes as nucleic acid photoprobes and photoreagents," *Inorg. Chem. Commun.*, vol. 9, no. 1, pp. 111–126, 2006.
- [14] C. Metcalfe and J. A. Thomas, "Kinetically inert transition metal complexes that reversibly bind to DNA.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 32, no. 4, pp. 215–224, 2003.
- [15] R. Konduri, H. Ye, F. M. MacDonnell, S. Serroni, S. Campagna, and K. Rajeshwar, "Ruthenium Photocatalysis Capable of Reversibility Storing up to Four Electrons in a Single acceptor Ligand: A step Closer to Artificial Photosynthesis," *Angew. Chemie, -Int. Ed.*, vol. 41, no. 17, pp. 3185–3187, 2002.
- [16] S. M. Molnar, G. Nallas, J. S. Bridgewater, and K. J. Brewer, "Photoinitiated Electron Collection in a Mixed-Metal Trimetallic Complex of the Form {[bpy)<sub>2</sub>Ru(dpb)]<sub>2</sub>IrCl<sub>2</sub>}(PF<sub>6</sub>)<sub>5</sub> (bpy = 2,2'-Bipyridine and dpb = 2,3-Bis(2-pyridyl)benzoquinoxaline)," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 116, no. 12, pp. 5206–5210, 1994.
- [17] M.-J. Kim, R. Konduri, H. Ye, F. M. MacDonnell, F. Puntoriero, S. Serroni, S. Campagna, T. Holder, G. Kinsel, and K. Rajeshwar, "Dinuclear Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes Containing Large, Redox - Active, Aromatic Bridging Ligands: Synthesis, Characterization, and Intramolecular Quenching of MLCT Excited States," *Inorg. Chem.*, vol. 41, no. 9, pp. 2471–2476, 2002.

- [18] S. Rau, B. Schäfer, D. Gleich, E. Anders, M. Rudolph, M. Friedrich, H. Görls, W. Henry, and J. G. Vos, "A supramolecular photocatalyst for the production of hydrogen and the selective hydrogenation of toluene," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 45, no. 37, pp. 6215–6218, 2006.
- [19] S. Campagna, G. Denti, S. Serroni, A. Juris, M. Venturi, V. Ricevuto, and V. Balzani, "Dendrimers of Nanometer Size Based on Metal Complexes: Luminescent and Redox-Active Polynuclear Metal Complexes Containing up to Twenty-Two Metal Centers," *Chem. Eur. J.*, vol. 1, no. 4, pp. 211–221, 1995.
- [20] C. Moucheron, A. Kirsch-de Mesmaeker, A. Dupont-Gervais, E. Leize, and A. Van Dorsselaer, "Synthesis and Characterization by Electrospray Mass Spectrometry of a Novel Dendritic Heptanuclear Complex of Ruthenium (II)," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 17, pp. 12834–12835, 1996.
- [21] J. Leveque, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, F. Loiseau, S. Serroni, F. Puntoriero, S. Campagna, H. Nierengarten, and A. Van Dorsselaer, "A mixed-bridging ligand nonanuclear Ru(II) dendrimer containing a tris-chelating core. Synthesis and redox properties," *Chem. Commun.*, no. 7, pp. 878–879, 2004.
- [22] M. Demeunynck, F. Charmantray, and A. Martelli, "Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 7, no. 17, pp. 1703–1724, 2001.
- [23] A. Adrien, *The acridines. Their Preparation, Physical, Chemical, and Biological Properties and Uses. (2nd Ed.)*. London, Edward Arnold, 1996
- [24] J. Debray, W. Zeghida, M. Jourdan, D. Monchard, M.-L. Dheu-Andries, P. Dumy, M.-P. Teulade-Fichou, and M. Demeunynck, "Synthesis and evaluation of fused bispyrimidinoacridines as novel pentacyclic analogues of quadruplex-binder BRACO-19," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 7, no. 24, pp. 5219–28, Dec. 2009.
- [25] R. Dinica, F. Charmantray, M. Demeunynck, and P. Dumy, "Regioselective synthesis of angular nitrogen polyheterocycles : dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phenazines," *Tetrahedron Lett.*, vol. 43, pp. 7883–7885, 2002.
- [26] L. Bouffier, R. Dinica, J. Debray, P. Dumy, and M. Demeunynck, "Functionalization of the A ring of pyridoacridine as a route toward greater structural diversity. Synthesis of an octacyclic analogue of eilatine," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 16, pp. 4836–4838, 2009.
- [27] F. Charmantray, M. Demeunynck, J. Lhomme, and A. Duflos, "New Route to Extended Angular Polyaza-heterocycles," *J. Org. Chem.*, vol. 66, pp. 8222–8226, 2001.
- [28] L. Bouffier, M. Demeunynck, P. Dumy, C. Moucheron, and A. Kirsch-De Mesmaeker, "Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[3,2-j]phenazine (dpqp-OH) - Synthesis, characterization and DNA interaction of the corresponding Ru(II) complex," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 360, no. 10, pp. 3162–3168, 2007.
- [29] J.-F. Lefebvre, D. Saadallah, P. Traber, S. Kupfer, S. Gräfe, B. Dietzek, I. Baussanne, J. De Winter, P. Gerbaux, C. Moucheron, M. Chavarot-Kerlidou, and M. Demeunynck, "Synthesis of three series of ruthenium tris-diimine complexes containing acridine-based  $\pi$ -extended ligands using an efficient 'chemistry on the complex' approach," *Dalton Trans.*, 2016, in press, DOI 10.1039/C6DT02944B
- [30] K. Wärnmark, J. A. Thomas, O. Heyke, and J.-M. Lehn, "Stereoisomerically controlled inorganic architectures: synthesis of enantio- and diastereo-merically pure ruthenium–palladium molecular rods from enantiopure building blocks," *Chem. Commun.*, no. 6, pp. 701–702, 1996.
- [31] B. Chesneau, M. Hardouin-Ierouge, and P. Hudhomme, "A Fused Donor - Acceptor System Based on an Extended Tetrathiafulvalene and a Ruthenium Complex of Dipyridoquinoxaline," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 12, no. 21, pp. 4868–4871, 2010.
- [32] E. Ishow, A. Gourdon, J.-P. Launay, C. Chiorboli, and F. Scandola, "Synthesis, Mass Spectrometry, and Spectroscopic Properties of a Dinuclear Ruthenium Complex Comprising a 20 Å Long Fully Aromatic Bridging Ligand," *Inorg. Chem.*, vol. 38, no. 7, pp. 1504–1510, 1999.
- [33] A. Ambroise and B. G. Maiya, "Ruthenium (II) Complexes of Redox-Related , Modified

- Dipyridophenazine Ligands : Synthesis , Characterization , and DNA Interaction,” vol. 2, pp. 4256–4263, 2000.
- [34] S. Rau, M. Schwalbe, S. Losse, H. Görls, C. McAlister, F. M. MacDonnell, and J. G. Vos, “Photoinduced ligand transformation in a ruthenium polypyridophenazine complex,” *Eur. J. Inorg. Chem.*, no. 7, pp. 1031–1034, 2008.
- [35] M. N. Ackermann and L. V. Interrante, “Ruthenium(II) Complexes of Modified 1,10-phenanthrolines. Synthesis and Properties of Complexes Containing Dipyridophenazines and a Dicyanomethylene-Substituted 1,10-Phenanthroline.,” *Inorg. Chem.*, vol. 23, pp. 3904–3911, 1994.
- [36] A. Grabulosa, M. Beley, and P. C. Gros, “Remarkable Effect of 4-Substituted 2,2'-Bipyridine Ligands on the Stereochemistry of Ruthenium(II) Complexes,” *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2008, no. 11, pp. 1747–1751, 2008.
- [37] M. K. Nazeeruddin, P. Péchy, T. Renouard, S. M. Zakeeruddin, R. Humphry-baker, P. Comte, P. Liska, L. Cevey, E. Costa, V. Shklover, L. Spiccia, G. B. Deacon, C. a. Bignozzi, and M. Grätzel, “Engineering of Efficient Panchromatic Sensitizers for Nanocrystalline TiO<sub>2</sub>-Based Solar Cells Engineering of Efficient Panchromatic Sensitizers for Nanocrystalline TiO<sub>2</sub>-Based Solar Cells,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, pp. 1613–1624, 2001.
- [38] M. Schwalbe, B. Schäfer, H. Görls, S. Rau, S. Tschierlei, M. Schmitt, J. Popp, G. Vaughan, W. Henry, and J. G. Vos, “Synthesis and characterisation of poly(bipyridine)ruthenium complexes as building blocks for heterosupramolecular arrays,” *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 3, no. 21, pp. 3310–3319, 2008.
- [39] P. Guillo, O. Hamelin, J. Pécaut, and S. Ménage, “Complexation to [Ru(bpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>: The trick to functionalize 3,3'-disubstituted-2,2'-bipyridine,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 54, no. 8, pp. 840–842, 2013.
- [40] A. Grabulosa, M. Beley, and P. C. Gros, “Remarkable effect of 4-substituted 2,2'-bipyridine ligands on the stereochemistry of ruthenium(II) complexes,” *Eur. J. Inorg. Chem.*, no. 11, pp. 1747–1751, 2008.
- [41] J. Wang, Y. Q. Fang, L. Bourget-Merle, M. I. J. Polson, G. S. Hanan, A. Juris, F. Loiseau, and S. Campagna, “The multichromophore approach: Prolonged room-temperature luminescence lifetimes in Ru<sup>II</sup> complexes based on tridentate polypyridine ligands,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 12, no. 33, pp. 8539–8548, 2006.
- [42] S. Welter, N. Salluce, A. Benetti, N. Rot, P. Belser, P. Sonar, A. C. Grimsdale, K. Mullen, M. Lutz, A. L. Spek, and L. De Cola, “Rodlike bimetallic ruthenium and osmium complexes bridged by phenylene spacers. Synthesis, electrochemistry, and photophysics,” *Inorg. Chem.*, vol. 44, no. 13, pp. 4706–4718, 2005.
- [43] A. Baron, C. Herrero, A. Quaranta, M. F. Charlot, W. Leibl, B. Vauzeilles, and A. Aukauloo, “Click chemistry on a ruthenium polypyridine complex. An efficient and versatile synthetic route for the synthesis of photoactive modular assemblies,” *Inorg. Chem.*, vol. 51, no. 11, pp. 5985–5987, 2012.
- [44] A. Kroll, K. Monczak, D. Sorsche, and S. Rau, “A luminescent ruthenium azide complex as a substrate for copper-catalyzed click reactions,” *Eur. J. Inorg. Chem.*, no. 22, pp. 3462–3466, 2014.
- [45] R. Nasielski-Hinkens and M. Benedek-Vamos, “Synthesis of Di- and Terta-substituted 1,4,5,8-Tetraazaphenanthrenes (Pyrazino[2,3-f]quinoxalines),” *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, vol. 13, p. 1975, 1975.
- [46] R. F. Martin and D. P. Kelly, “Synthesis and N.M.R. Spectra of Substituted Aminoiodoacridines,” *Aust. J. Chem.*, vol. 32, pp. 2637–2646, 1979.
- [47] H. Salez, A. Wardani, M. Demeunynck, A. Tatibouet, and J. Lhomme, “Synthesis of Tröger’s base analogs derived from 3-aminoacridine and 10-aminobenzo[b][1,7]phenanthroline,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 36, no. 8, pp. 1271–1274, 1995.
- [48] S. R. Sandler and W. Karo, “Organic Functional Group Preparations (2nd Ed.),” in *Organic Functional Group Preparations*, (London) LTD. Academic Press, Inc., Ed. Elsevier, 1989.
- [49] N. R. De Tacconi, R. Chitakunye, F. M. MacDonnell, and R. O. Lezna, “The role of monomers and

- dimers in the reduction of ruthenium(II) complexes of redox-active tetraazatetrapyridopentacene ligand,” *J. Phys. Chem. A*, vol. 112, no. 3, pp. 497–507, 2008.
- [50] K. Ritter, C. Pehlken, D. Sorsche, and S. Rau, “Optimized synthesis of a tert-butyl-phenyl-substituted tetrapyridophenazine ligand and its Ru(II) complexes and determination of dimerization behaviour of the complexes through supramolecular ‘Fingerhaken,’” *Dalton Trans.*, vol. 44, no. 19, pp. 8889–8905, 2015.
- [51] R. M. Acheson and M. J. T. Robinson, “The Bromination of Acridone,” *J. Chem. Soc.*, pp. 232–238, 1953.
- [52] R. M. Acheson, B. Adcock, G. M. Glover, and L. E. Sutton, “The Bromination and Nitration of Acridine 10-oxide,” *J. Chem. Soc.*, pp. 3367–3371, 1960.
- [53] L. Bouffier, “Thèse de doctorat : Synthèse d’hétérocycles azotés dérivés d’acridine et étude de leur interaction avec l’ADN,” Université Joseph Fourier, Grenoble, 2005.
- [54] N. Fixler, M. Demeunynck, M. C. Brochier, J. Garcia, and J. Lhomme, “Regioselective addition of aniline to 8H-pyrido[2,3,4-mn]acridinone: Structure determination of the reaction product,” *Magn. Reson. Chem.*, vol. 35, no. 10, pp. 697–700, 1997.
- [55] L. Bouffier, M. Demeunynck, A. Milet, and P. Dumy, “Reactivity of Pyrido[4,3,2-kl]acridines: Regioselective Formation of 6-Substituted Derivatives,” *J. Org. Chem.*, vol. 69, pp. 8144–8147, 2004.
- [56] I. Jacob, Peyton, P. S. Callery, A. T. Shulgin, and N. Castagnoli, “A convenient Synthesis of Quinones from Hydroquinone Dimethyl Esters. Oxidative Demethylation with Ceric Ammonium Nitrate,” *J. Org. Chem.*, vol. 41, no. 20, pp. 3326–3327, 1976.

*Chapitre III : Etude photophysique  
des complexes  $[Ru(L)_2dpqp-R]^{2+}$  et  
 $[Ru(L)_2dppqp]^{2+}$*

# Etude photophysique des complexes $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-R}]^{2+}$ et $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$

## 1 Introduction

### 1.1 Principes fondamentaux de la photophysique des complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup>

Le ruthénium<sup>II</sup>, dans sa configuration électronique, possède 6 électrons de valence et peut ainsi former des complexes de géométrie octaédrique hexacoordinée (Figure 3.1).

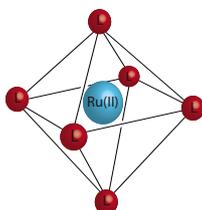


Fig 3.1. Structure octaédrique d'un complexe de ruthénium<sup>II</sup>.

La théorie du champ cristallin, combinée à la théorie des orbitales moléculaires, permet de construire le diagramme des orbitales moléculaires de complexes de ruthénium<sup>II</sup> (Figure 3.2). La nature des ligands est importante puisqu'elle influence le niveau énergétique relatif des orbitales du complexe. Parmi les complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup>, le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  est le plus largement étudié et sert de modèle pour la majorité des processus photophysiques des complexes de ruthénium.[1],[2] Il nous servira donc pour introduire les concepts fondamentaux sur la photophysique de tels complexes.[3]

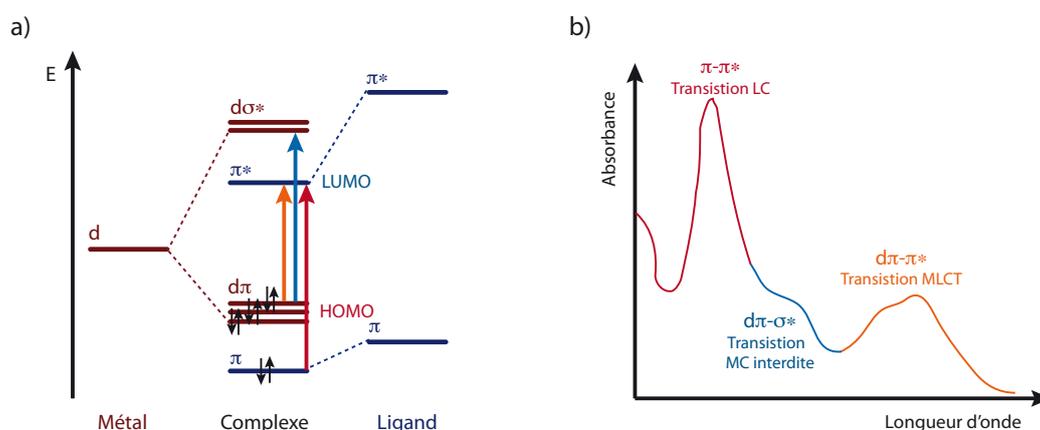


Fig. 3.2. a) Diagramme des orbitales moléculaires de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  et transitions électroniques sous illumination ; b) Spectre d'absorption schématisé dans l'UV-Vis et transitions correspondantes.

Trois transitions sont observées dans le domaine de l'UV-visible :[4]

- « Metal to Ligand Charge Transfer » (MLCT) : Celle-ci est la transition la plus basse en énergie pour les complexes classiques puisqu'elle correspond au passage d'un électron de la HOMO, centrée sur le métal, à la LUMO, centrée sur le ligand ( $d\pi-\pi^*$ ). Elle se situe à environ 450 nm sur le spectre d'absorption.
- « Metal Centered » (MC) : Celle-ci est centrée sur le métal et correspond à la transition électronique  $d\pi-d\sigma^*$ . Elle est dite interdite puisqu'elle ne respecte pas les règles de sélection de conservation de la symétrie des états impliqués ; elle est donc, expérimentalement, observée avec un coefficient d'absorption molaire très faible.
- « Ligand Centered » (LC) : Cette transition, la plus haute en énergie (environ à 280 nm sur le spectre d'absorption), est centrée sur les ligands et possède généralement le plus haut coefficient d'absorption molaire.

Les transitions MLCT sont les plus importantes du point de vue de la photophysique des complexes puisqu'elles permettent, entre autres, un processus de désactivation radiative pour le retour à l'état fondamental du complexe (Figure 3.3).

Après le peuplement de l'état  $^1\text{MLCT}$  suite à l'irradiation du complexe, un processus « intersystem crossing » (ISC) prend place presque instantanément et permet le peuplement, quasi unitaire, de l'état  $^3\text{MLCT}$ , plus stable en énergie. L'ISC, normalement interdit selon les règles de sélection sur la multiplicité de spin, n'est possible que grâce au couplage spin-orbite causé par la présence d'un atome lourd tel que le ruthénium.[5]

Aucun processus de fluorescence n'est donc observé à partir de l'état  $^1\text{MLCT}$  et c'est le  $^3\text{MLCT}$  qui sera l'état émissif. On parlera dans ce cas de luminescence pour qualifier le processus de désactivation radiative à partir de l'état  $^3\text{MLCT}$ .

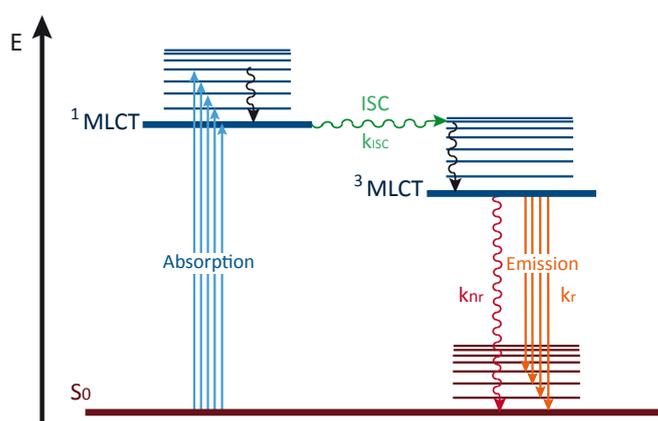


Fig 3.3. Diagramme de Jablonski de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ .

La particularité associée à ces composés est que le temps de vie de l'état excité est très long (de l'ordre de la centaine de nanosecondes). Ceci s'explique par le non respect des règles de sélection sur la multiplicité de spin puisque, pour le retour à l'état fondamental, il y a passage d'un état triplet MLCT vers un état singulet. A nouveau, ces transitions sont permises grâce à la présence du ruthénium.

Deux processus sont en compétition pour le retour à l'état fondamental : la désactivation radiative ( $k_r$ ), par émission d'un photon, et la désactivation non radiative ( $k_{nr}$ ), par dissipation de l'énergie vers l'environnement extérieur.[3]

La cinétique de ces deux processus détermine le temps de vie de l'état excité :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

A ces deux processus s'ajoute généralement le passage à l'état  $^3MC$  par activation thermique si cet état est assez bas en énergie (Figure 3.4). L'électron excité occupe alors l'orbitale antiliante  $\sigma^*$ , ce qui a pour effet d'affaiblir la liaison Ru-N et donc, de déstabiliser la structure du complexe. Deux cas de figure sont envisageables à partir de cet état : un retour à l'état fondamental par désactivation non radiative (principalement observé pour le  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ) ou la déchélation du ligand (principalement observé le pour  $[Ru(TAP)_3]^{2+}$ ).[6]

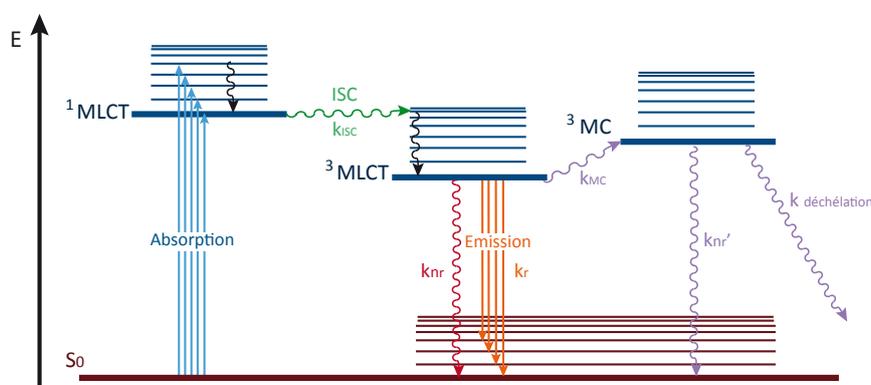


Fig. 3.4. Diagramme de Jablonski de  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$  incluant la désactivation de l'état excité par le passage à l'état  $^3MC$ .

Le temps de vie de l'état excité est alors dépendant des trois processus de désactivation et on peut écrire :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_{MC}e^{-\Delta E/RT}}$$

où  $k_{MC}$  est la constante cinétique du passage à l'état  $^3MC$  et  $\Delta E$  la différence d'énergie entre les états  $^3MC$  et  $^3MLCT$ .

Cette relation établit ainsi la dépendance de la durée de vie de l'état excité vis-à-vis de la température.

A ces processus, peuvent s'en ajouter d'autres, intra- ou intermoléculaires. On parlera alors de « quenching » de la luminescence. Par exemple, pour des « quenchings » intermoléculaires,  $\tau$  variera selon l'équation suivante :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_Q[Q]}$$

où  $k_Q$  est la constante cinétique de « quenching » et  $[Q]$  la concentration en « quencher ».

La valeur du temps de vie sera donc dépendante de la concentration en « quencher » et la constante cinétique pourra être déterminée par la relation de Stern-Volmer (point 2.2.2 de ce chapitre). Les principaux types de « quenching » intermoléculaire sont : les transferts d'électron, de proton et d'énergie, ou la formation d'excimères et d'exciplexes.

Plus généralement, on peut écrire la relation suivante pour l'expression du temps de vie de l'état excité :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr} + \sum_i k_i}$$

où  $k_i$  correspond à tous les processus de dépeuplement autres que les désactivations radiatives et non radiatives.

Le rendement quantique de luminescence, défini comme le rapport du nombre de photons émis par le nombre de photons absorbés, est une autre caractéristique photophysique importante. Il peut également être décrit en fonction des constantes cinétiques des processus de désexcitation :

$$\Phi_L = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + \sum_i k_i}$$

## 1.2 Applications des propriétés photophysiques des complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup>

Grâce à leurs propriétés photophysiques tout à fait particulières, les complexes de ruthénium<sup>II</sup> sont utilisés dans de nombreux domaines de recherche [7] comme la photo-catalyse [8] ou encore la conversion de l'énergie solaire.[9]–[12] Ce sont néanmoins leurs propriétés d'interaction avec l'ADN qui nous intéresseront dans ce travail.

Comme montré plus haut, la nature des ligands a une très grande influence sur les niveaux des orbitales moléculaires d'un complexe (série spectrochimique) et, par conséquent, sur ses propriétés photophysiques. Dans la famille des ligands polyazaaromatiques, on peut distinguer deux grandes classes (Figure 3.5) : Les ligands à caractère  $\sigma$ -donneur (phen, bpy) et ceux à caractère  $\pi$ -déficient (TAP, bpz) dont la densité électronique du cycle est appauvrie par la présence d'azotes supplémentaires. Cette simple différence mène à des écarts fondamentaux dans le comportement des complexes résultants.

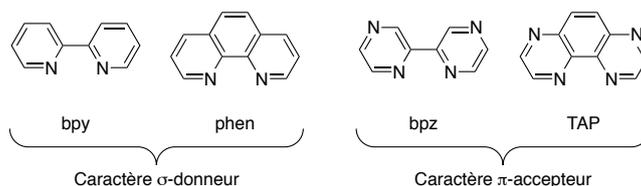


Fig. 3.5. Structure de ligands polyazaaromatiques usuels.

Les complexes ont donc été synthétisés en série phen ( $\sigma$ -donneurs) et en série TAP ( $\pi$ -déficients) afin de pouvoir exploiter les différentes propriétés offertes par la présence de ces ligand. Plus précisément,

nous envisageons d'utiliser les complexes de la série phen en tant que photo-sondes « light-switch » (point 1.2.1) et ceux de la série TAP pour des applications photochimiques (point 1.2.2).

### 1.2.1 Les complexes de ruthénium<sup>II</sup> « light-switch » à ligands plan étendus

A l'instar du complexe  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  a largement été étudié et est considéré comme modèle pour les complexes de ruthénium<sup>II</sup> possédant un ligand plan étendu (Figure 3.6).

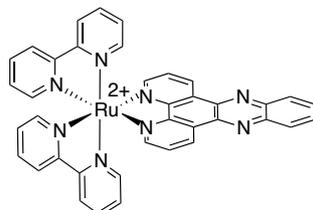


Fig. 3.6. Structure du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ .

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, ce complexe possède une particularité inédite du point de vue photophysique. En effet, il n'est pas luminescent dans l'eau et retrouve sa luminescence dans des solvants organiques ou en milieu aqueux en présence d'ADN, et peut donc jouer le rôle de sonde luminescente « light-switch ON ».

Cette caractéristique ne peut pas être expliquée par le schéma photophysique classique présenté pour le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  et de nombreuses thèses ont été avancées. Le schéma photophysique admis aujourd'hui postule l'existence de deux états <sup>3</sup>MLCT, proches en énergie, dont l'un serait « bright » (émissif) et l'autre « dark » (noir) (Figure 3.7).[13], [14]

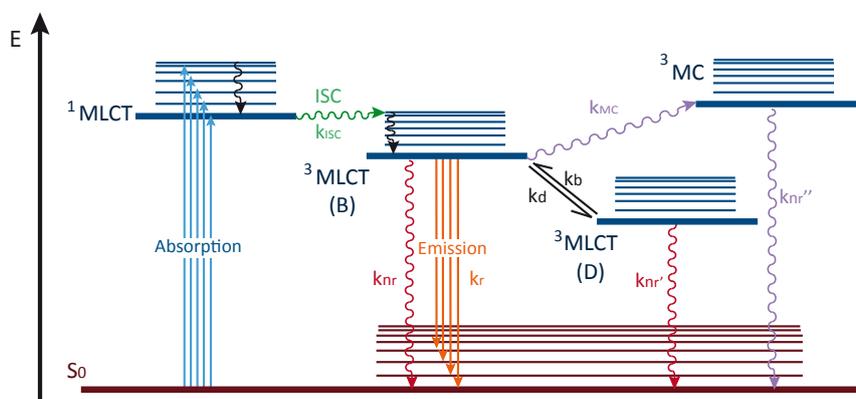


Fig. 3.7. Diagramme de Jablonski du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  et des complexes « light-switch ON ».

Dans l'eau, l'état « dark » est plus bas en énergie que l'état « bright » car il est stabilisé par le solvant. A l'inverse, dans les solvants organiques l'état « bright » est le plus stable et le complexe est alors luminescent. De même, quand le complexe est en interaction avec l'ADN, le ligand est protégé du solvant aqueux grâce aux brins d'ADN dans lesquels il est intercalé.[15]

L'analogue  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$  possède les mêmes caractéristiques photophysiques que  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  et ce comportement est généralement observé pour des complexes dérivés, possédant un ligand plan étendu et des ligands ancillaires du type bpy ou phen.

Cette propriété sera évaluée dans la suite de ce chapitre pour les complexes synthétisés et exploitée dans le chapitre IV.

Le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppz}]^{2+}$ , au contraire, est luminescent dans l'eau et possède un comportement photophysique plus proche de celui du  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{phen}]^{2+}$  que de celui du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ . Ceci s'explique par le fait que l'état MLCT le plus bas en énergie implique une transition électronique vers le ligand TAP et non vers le ligand dppz. Il n'existe donc pas d'état « dark » et le complexe possède un schéma photophysique proche de celui de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ . [16]

### 1.2.2 Propriétés photochimiques des complexes de ruthénium

Le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$  et d'autres complexes dérivés possédant au moins deux ligands TAP ont largement été étudiés dans le laboratoire de Chimie Organique et Photochimie (ULB) pour une propriété tout à fait particulière : la capacité à former des photo-adduits avec des molécules d'intérêt biologique par un processus de transfert d'électron photo-induit (PET).

Comme nous l'avons vu dans le point précédent, l'interaction de complexes avec des biomolécules, particulièrement l'ADN, influence leurs caractéristiques photophysiques. Ainsi des complexes comme le  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$  ou le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$  peuvent voir leur intensité d'émission augmenter légèrement en présence de  $[\text{poly}(\text{dA-dT})]_2$  grâce à la protection de l'état  $^3\text{MLCT}$  fournie par le microenvironnement de l'ADN. [17], [18] Néanmoins, lorsque le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$  est mis en présence de  $[\text{poly}(\text{dG-dC})]_2$ , un « quenching » de la luminescence est observé. [18]

Le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$  possède le même schéma photophysique que le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  avec néanmoins des différences non négligeables quant au niveau d'énergie des orbitales moléculaires. En effet, le caractère électro-déficient des ligands TAP aura tendance à mieux stabiliser les orbitales  $d\pi$  et  $\pi^*$  par rapport à un ligand bpy ou phen. Le complexe est ainsi plus oxydant que le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  de telle sorte qu'il est capable, à l'état excité, d'oxyder une espèce suffisamment réductrice comme la guanine (base la plus réductrice de l'ADN) ou le tryptophane. [19]–[21]

En effet, à l'état excité, les potentiels d'oxydo-réduction sont exaltés par le passage d'un électron de la HOMO vers la LUMO du complexe (Figure 3.8).

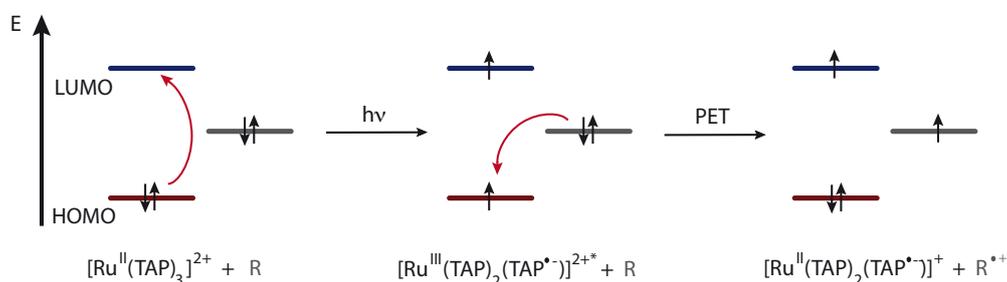


Fig. 3.8. Schéma d'oxydation par PET d'un réducteur en présence de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$ .

Le transfert d'électron photo-induit entre le complexe et un réducteur génère la formation de deux radicaux très réactifs. Trois processus sont alors possibles : a) le retour de l'électron (BET pour « Back Electron Transfer »). L'électron se trouvant sur l'orbitale excitée du complexe est transféré vers la HOMO du réducteur, le bilan réactionnel est donc globalement nul ; b) la dégradation de l'espèce

photo-oxydée radicalaire, comme par exemple la coupure de l'ADN dans le cas où l'espèce oxydée est une guanine ; c) la recombinaison des deux radicaux pour former un lien covalent entre les deux espèces donnant naissance à un photo-adduit.

Ce dernier processus est le plus intéressant pour le marquage de l'ADN ou d'autres biomolécules et a fait l'objet de nombreuses publications.

## 2 Résultats et discussion

### 2.1 $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$ - un complexe non luminescent

Comme indiqué dans le chapitre II, le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> avait déjà été synthétisé. Certaines études photophysiques ont été publiées pour tenter d'expliquer son comportement photophysique particulier.[22] En effet, il n'émet ni dans l'eau, ni dans l'acétonitrile et n'est donc pas « light-switch » comme l'est le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ . Les deux structures sont pourtant apparentées et ne diffèrent que par la partie quinoléine du ligand dpqp (Figure 3.9).

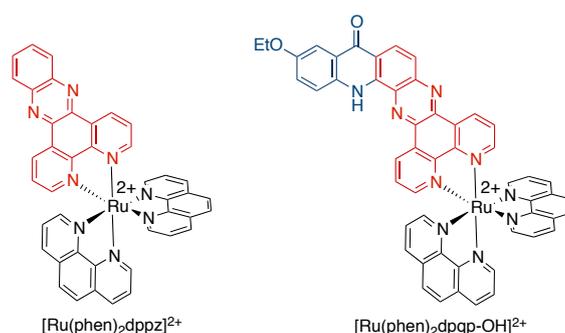


Fig. 3.9. Structures du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$  et du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub>.

La suite de ce chapitre sera consacrée à la discussion concernant ce comportement particulier du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> mais également du  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub> et d'autres complexes de la série qui, à l'instar du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub>, ne sont luminescents ni dans l'eau ni dans l'acétonitrile. Deux complexes, le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39**<sub>phen</sub> et le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39**<sub>TAP</sub>, font exception car ils possèdent des propriétés photophysiques attendues pour des complexes de ruthénium.

Nous commencerons avec les complexes  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> et  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub> car il existe déjà certaines données dans la littérature concernant le premier ; ce sont les premiers complexes de la série (les plus faciles à obtenir synthétiquement) et ce sont également les complexes présentant la plus faible intensité de luminescence. Par conséquent, ce sont ceux sur lesquels nous avons le plus concentré notre attention.

#### 2.1.1 Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption présentés ci-dessous ont été relevés dans l'eau et dans l'acétonitrile (Figure 3.10). Les coefficients d'absorption molaires ( $\epsilon$ ) ont été déterminés grâce à la loi de Beer-Lambert dans une gamme de concentration entre 5 et 40  $\mu\text{M}$  et sont mentionnés dans la partie expérimentale.

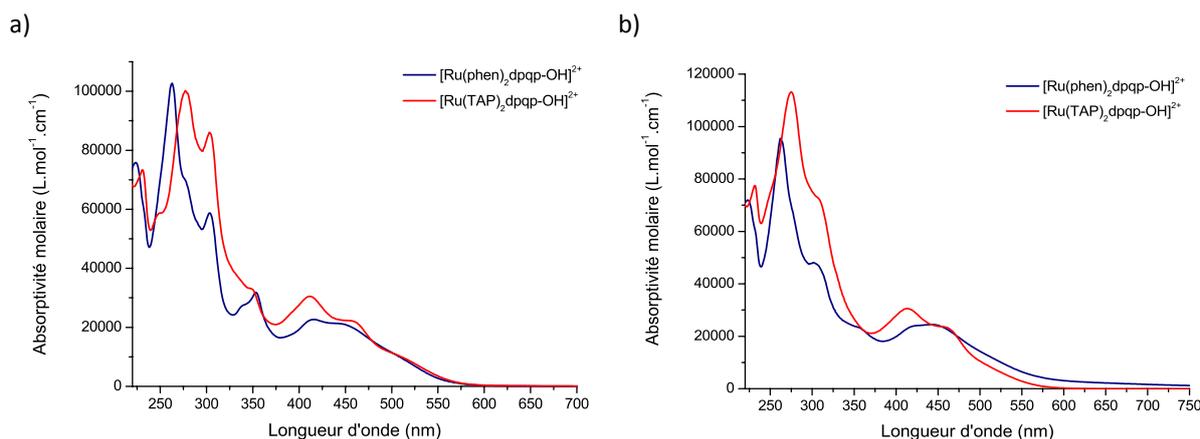


Fig. 3.10. Spectres d'absorption du  $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29** ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M) dans a) l'acétonitrile ; b) l'eau.

Les différents maxima d'absorption dans l'acétonitrile sont repris ci-dessous (Tableau 3.1) et comparés à ceux de complexes connus. Les valeurs obtenues pour le  $[Ru(phen)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> sont également comparées à celles déjà publiées et concordent parfaitement :

Complexes	$\lambda_{max}$ (nm)	$\lambda_{max}$ (nm)
	UV	Vis
$[Ru(phen)_2dpqp-OH]^{2+}$ <b>29</b> <sub>phen</sub>	226, 265, 280 (ep), 306, 341 (ep), 356	416, 445, 514 (ep)
$[Ru(phen)_2dpqp-OH]^{2+}$ Littérature [22]	221, 263, 274 (ep), 303, 338 (ep), 353	416, 442
$[Ru(TAP)_2dpqp-OH]^{2+}$ <b>29</b> <sub>TAP</sub>	232, 252 (ep), 282, 306, 348	411, 457, 512 (ep)
$[Ru(phen)_3]^{2+}$ [16], [23]	262	446
$[Ru(TAP)_3]^{2+}$ [6]	276	408, 437
$[Ru(TAP)_2phen]^{2+}$ [16]	272	412, 458
$[Ru(phen)_2dppz]^{2+}$ [16]	264, 276 (ep), 316, 352, 360, 368	440
$[Ru(phen)_2PHEHAT]^{2+}$ [24]	264, 276 (ep), 311 (ep), 355, 370	432
$[Ru(TAP)_2PHEHAT]^{2+}$ [24]	276, 362	414, 450

Tableau 3.1. Maxima d'absorption des complexes  $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29** dans l'acétonitrile comparés à ceux de complexes connus ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M). Les maxima en rouge représentent la transition LC centrée sur les ligands phen et TAP, ceux en bleu, la transition LC centrée sur le ligand plan étendu, ceux en jaune, l'épaule observé pour les complexes  $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29**.

Les différentes bandes caractéristiques des complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> sont présentes :

La première bande possède un coefficient d'absorption molaire élevé, respectivement aux environs de 260 et 280 nm pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> et le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub>. La comparaison avec les valeurs obtenues pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ , le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$  ou le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{phen}]^{2+}$  permet d'attribuer cette bande à une transition LC sur les ligands phen ou TAP.

Une seconde bande, plus visible dans l'acétonitrile car mieux définie et observable entre 320 et 370 nm, correspond, quant à elle, probablement à une transition LC centrée sur le ligand dpqp. Des bandes similaires sont observées pour les autres complexes possédant un ligand plan étendu comme le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$  ou le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{PHEHAT}]^{2+}$  (PHEHAT = 1,10-phénanthroline[5,6-b]1,4,5,8,9,12-hexaazatriphénylène).

La troisième bande, située dans le domaine du visible, est caractéristique de ce type de complexes puisqu'il s'agit de la transition MLCT ( $d\pi-\pi^*$ ).

Une dernière bande a attiré notre attention. Elle se trouve partiellement sous la MLCT et n'est visible que sous la forme d'un épaulement au delà de 500 nm. Cet épaulement est plus visible pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub> que pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub>. Ceci est probablement la raison pour laquelle il n'a pas été mentionné dans la publication précédente.[22] Cette bande est néanmoins intéressante puisqu'elle pourrait correspondre à une transition de type ILCT (« Intra Ligand Charge Transfer ») sur le ligand dpqp-OH, proche en énergie de la MLCT. Cette transition a d'ailleurs été observée par calculs théoriques sur l'analogue  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub>, étudié par le Dr. J.F Lefebvre dans le cadre d'un projet parallèle. Les transitions ILCT sont apparentées aux transitions LC, puisqu'il s'agit d'une transition sur les orbitales du ligand uniquement. Celles-ci se caractérisent néanmoins par un transfert de charge d'une partie du ligand vers une autre, s'accompagnant d'une création de dipôle sur le ligand. Dans notre cas, le ligand dpqp-OH pourrait subir une transition ILCT de la partie acridone en tant que donneur vers la partie phénazine en tant qu'accepteur.[25]

Quelques exemples sont rapportés dans la littérature concernant des transitions ILCT sur des complexes de ruthénium. Les ligands pouvant induire une transition ILCT sur le complexe sont variés mais possèdent toujours une partie jouant le rôle de donneur d'électron et une seconde le rôle d'accepteur. On peut citer les dérivés de bis(pyridine)triazine[26],[27] ou le TTF-dppz (tétra-thiafulvalène-dppz)[28] (Figure 3.11).

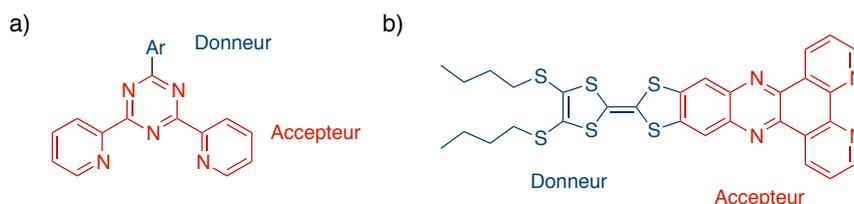


Fig. 3.11. Structures de a) dérivés de bis(pyridine)triazine[26],[27] et b) du TTF-dppz (tétra-thiafulvalène-dppz).[28]

La bande d'absorption correspondant à la transition ILCT subit un déplacement vers le rouge quand le ligand est chélaté au centre métallique. En effet, l'accepteur correspond généralement à la partie chélatante du ligand et la présence du métal accentue encore ce caractère accepteur d'électron.

Nous avons donc tenté de relever un spectre d'absorption du ligand libre (Figure 3.12) afin de déterminer s'il pouvait exister une transition ILCT proche en énergie de la MLCT. Celui-ci a été synthétisé selon la procédure décrite par Dinica *et al.*[29] Le ligand libre est très peu soluble dans l'acétonitrile, il a néanmoins été possible de réaliser la mesure en ajoutant quelques gouttes de DMSO. Un second spectre a été relevé dans le méthanol, solvant offrant une meilleure solubilité du dpqp-OH. Les deux spectres sont présentés ci dessous :

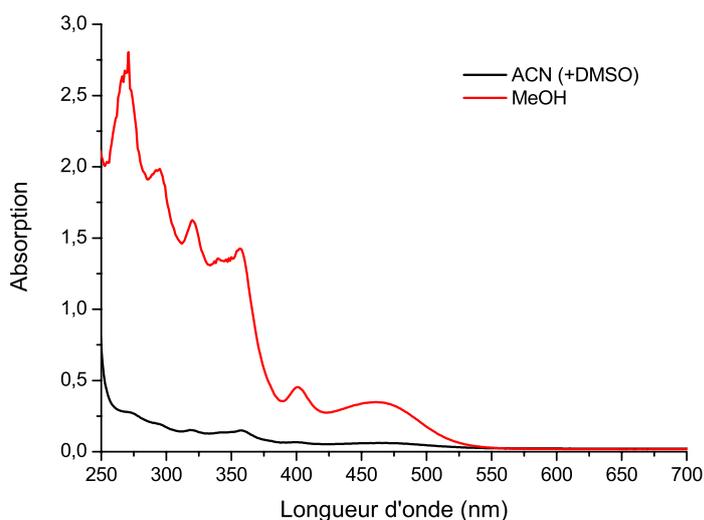


Fig. 3.12. Spectres d'absorption du ligand dpqp-OH libre (dans le méthanol et l'acétonitrile).

Le spectre relevé dans le méthanol est de meilleure qualité puisque le produit y est plus soluble. Les deux spectres sont néanmoins très similaires si l'on compare les maxima d'absorption. Comme on peut le voir, le ligand dpqp-OH possède une bande d'absorption aux alentours de 460 nm qui s'étend au delà de 500 nm. Il est donc tout à fait possible d'envisager ce même type de transition sur le ligand chélaté à un centre métallique sous forme d'une transition ILCT. De plus, grâce aux données de la littérature concernant les acridines et les acridones, il semble clair que cette bande ne correspond pas à une transition centrée sur cette partie du ligand. En effet, les acridines absorbent généralement vers 340-480 nm[30] et les acridones vers 370-400 nm, c'est-à-dire à une énergie beaucoup plus grande que celle observée pour le ligand dpqp-OH.[31]–[34]

De même, la dipyridophénazine (dppz) n'absorbe que dans le proche UV.[35] Cette bande s'étirant de 460 à 520 nm est donc tout à fait caractéristique de ce composé angulaire hybride « acridine-dipyridophénazine ».

Un cas presque similaire a été publié concernant certains dérivés de diarylamino-acridone qui possèdent, en plus d'une bande dans le proche UV, une bande aux alentours de 450 nm (plus faible en intensité) (Figure 3.13).

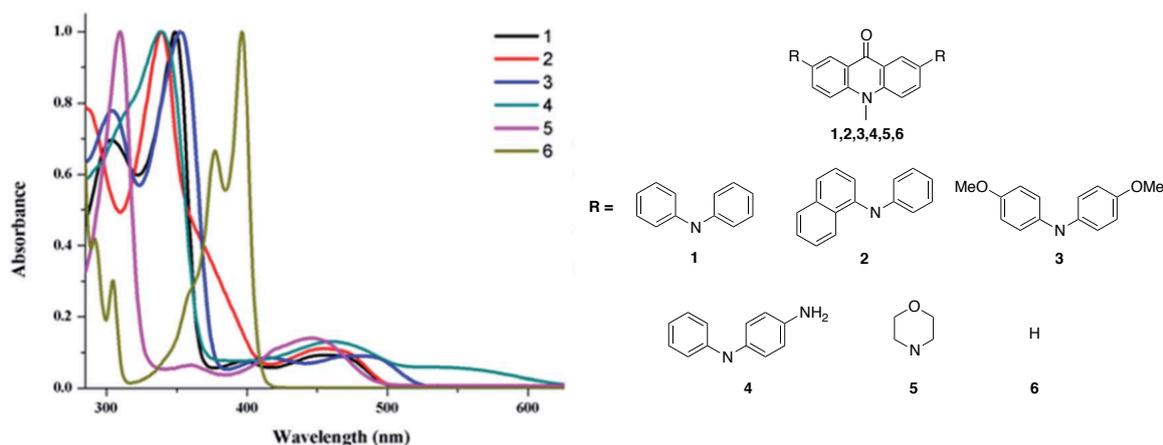


Fig. 3.13. Spectres d'absorption dans le toluène et structures des acridones correspondantes. [36]

Les auteurs expliquent la présence de cette large bande par l'existence d'une transition par transfert de charge mais cette fois à partir des arylamino (donneurs) vers l'acridone (accepteur).[36]

D'après ces différentes données, il est donc vraisemblable que la bande d'absorption du ligand dpqp-OH, centrée à 450 nm, n'existe que grâce à la présence des deux entités qui composent le ligand et corresponde à un transfert de charge entre ces deux entités. Cette transition devrait également exister sur le ligand chélaté et est probablement observée dans la même région que la transition MLCT.

Tout comme cela a été fait pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$   $\mathbf{29}_{\text{phen}}$ , nous nous sommes assurés que les propriétés d'absorption de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$   $\mathbf{29}_{\text{TAP}}$  ne sont pas influencées par la concentration dans la gamme utilisée pour les études photophysiques (Figure 3.14). En effet, comme décrit au chapitre II, ces complexes ont une forte tendance à s'empiler et la formation d'agrégats influencera probablement les caractéristiques spectroscopiques des complexes. Un empilement des complexes pourrait être responsable d'un « quenching » de la luminescence, il est donc important d'écartier cette possibilité.

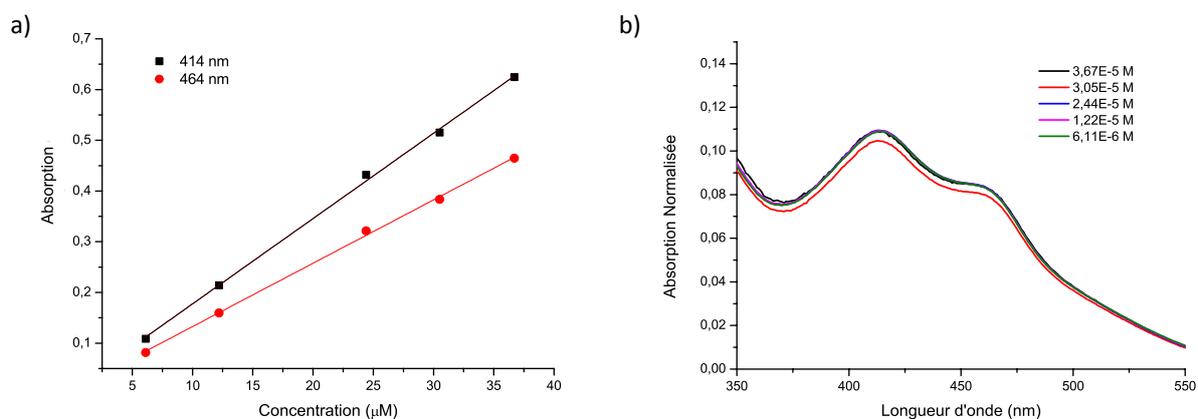


Fig. 3.14. Evolution linéaire du spectre d'absorption de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}].2\text{Cl}$   $\mathbf{29}_{\text{TAP}}$  dans l'eau à 25 °C en fonction de la concentration.

Dans l'eau, entre 6  $\mu\text{M}$  et 37  $\mu\text{M}$ , on observe une variation linéaire de l'absorbance en fonction de la concentration. Il n'existe donc probablement que le monomère en solution dans cette gamme de concentration. La même constatation a été rapportée pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> dans la littérature.

### 2.1.2 Voltampérométrie cyclique

Les valeurs de potentiels d'oxydation et de réduction pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> ont été publiées[22] et sont comparées aux valeurs d'autres complexes connus (tableau 3.2).

Complexe	$E_{\text{ox}}$ (V)	$E_{\text{red1}}$ (V)	$E_{\text{red2}}$ (V)	$E_{\text{red3}}$ (V)	$E_{\text{red4}}$ (V)
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$ <b>29</b> <sub>phen</sub> [22]	1,37	- 0,89	- 1,22	- 1,33	- 1,57
$[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ [37]	1,35	- 1,33	- 1,52	- 1,76	
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ [16]	1,30	- 1,00	- 1,44		
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{PHEHAT}]^{2+}$ [38]	1,35	- 0,84			
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{phen}]^{2+}$ [16]	1,73	- 0,83	- 1,01	- 1,55	- 1,74
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppz}]^{2+}$ [16]	1,77	- 0,80	- 0,98	- 1,07	- 1,62

Tableau 3.2. Potentiels d'oxydation et de réduction (V/SCE) de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}].2\text{PF}_6$  **29**<sub>phen</sub> dans l'ACN comparés aux valeurs de complexes connus.

Cette comparaison permet de tirer plusieurs conclusions. Premièrement, la valeur du potentiel d'oxydation de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> est comparable à celle des trois premiers complexes de référence et correspond à l'oxydation du ruthénium<sup>II</sup> en ruthénium<sup>III</sup>. Deuxièmement, les valeurs des différentes vagues de réduction, comparées à celle de  $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ , indiquent que les deux premières réductions ont vraisemblablement lieu sur le ligand dpqp-OH, et les deux secondes sur les ligands phen. A l'état excité, le transfert de charge à partir du ruthénium sera donc probablement dirigé vers le ligand dpqp-OH. Ce ligand, ainsi que les autres ligands plans étendus, possèdent des orbitales  $\pi^*$  plus basses en énergie qu'un ligand phen grâce à la conjugaison plus importante qui existe dans ce type de ligand.

Nous n'avons malheureusement pas réussi à reproduire cette expérience pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub>, ni pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub> et n'avons pas pu la mener sur les autres complexes synthétisés à cause de problèmes de solubilité dans un milieu concentré en sel. Ces mesures devront être réalisées par la suite pour venir compléter l'étude photophysique de ces complexes.

En ce qui concerne les complexes possédant des ligands TAP, on observe généralement un transfert d'électron vers les TAP puisque ces complexes possèdent un potentiel de réduction très élevé. Dans ce cas-ci, si nous comparons la valeur de la première réduction obtenue pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{phen}]^{2+}$  (-0,83 V) à celle obtenue pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> (-0,89 V), on constate qu'elles sont très

proches. Il est donc difficile d'avancer que l'électron ira bien vers le ligand TAP lorsque le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$   $\mathbf{29}_{\text{TAP}}$  sera excité .

Cette tendance peut être mise en parallèle avec les observations réalisées en absorption, lesquelles suggéraient, outre la présence d'une transition MLCT, l'existence d'une transition ILCT sur le ligand plan étendu. Les expériences de voltampérométrie cyclique sur les autres complexes donneront des indications expérimentales pour évaluer le niveau des orbitales HOMO et LUMO. Néanmoins, des études théoriques sont actuellement en cours à l'Université de Mons pour calculer le niveau d'énergie des orbitales impliquées dans les différents processus photophysiques.

### 2.1.3 Maxima d'émission, rendements quantiques et temps de vie de l'état excité

Les valeurs des maxima d'émission et des rendements quantiques de luminescence (excitation à 440 nm et fenêtre observée de 490 nm à 800 nm) du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$   $\mathbf{29}_{\text{phen}}$  et du  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$   $\mathbf{29}_{\text{TAP}}$  sont reprises dans le tableau 3.3 ci-dessous et comparées aux valeurs d'autres complexes. Ces données sont malheureusement entachées d'une grande imprécision à cause de la très faible intensité de luminescence des complexes :

Complexes	Maxima d'émission (nm)			
	Sous air et sous argon			
	ACN		H <sub>2</sub> O	
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$ $\mathbf{29}_{\text{phen}}$	665		639	
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$ $\mathbf{29}_{\text{TAP}}$	716		647	
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{phen}]^{2+}$ [16]	626		645	
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ [39]	630		-	
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppz}]^{2+}$ [16]	621		636	
Complexes	Rendements quantiques ( $\times 10^{-2}$ )			
	Sous air et sous argon			
	ACN		H <sub>2</sub> O	
	Sous air	Sous argon	Sous air	Sous argon
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$ $\mathbf{29}_{\text{phen}}$	0,08	0,16	0,03	0,07
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$ $\mathbf{29}_{\text{TAP}}$	0,06	0,14	0,01	0,03
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ [2]	1,80	6,20	2,80	4,20
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ [39]	0,73	3,30	-	-
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppz}]^{2+}$ [16]			3,50	

Tableau 3.3. Maxima d'émission et rendements quantiques de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$   $\mathbf{29}$  dans l'eau et l'acétonitrile, sous air et sous argon ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M), comparés aux valeurs de complexes connus.

Comme nous l'avons déjà introduit, les rendements quantiques sont extrêmement faibles par rapport à ceux de la référence  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  (jusqu'à 100 fois inférieur). L'erreur sur ces valeurs est donc très importante et elles ne sont présentées qu'à titre indicatif. A la vue de la différence tellement

importante entre la luminescence de la référence et celle des complexes étudiés dans cette thèse, nous pouvons les considérer comme non luminescents. Le fait que les mêmes propriétés photophysiques soient observées pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub> et le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> indique que la transition implique vraisemblablement le ligand dpqp-OH, et non un des ligands TAP pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub>. Dans le cas contraire, le complexe devrait présenter un comportement normal, c'est à dire une émission plus intense et un temps de vie de l'état excité de l'ordre de la centaine de nanosecondes. Le comportement observé pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub> est tout à fait atypique puisque la transition électronique se fait généralement vers les ligands TAP, extrêmement pauvres en électrons. Il est à mettre en lien avec la valeur du potentiel de première réduction observée pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub>.

Les maxima d'émission (pour une excitation réalisée à 440 nm), observables avec une ouverture maximale des fentes, se situent dans la région attendue pour une MLCT (Figure 3.15).

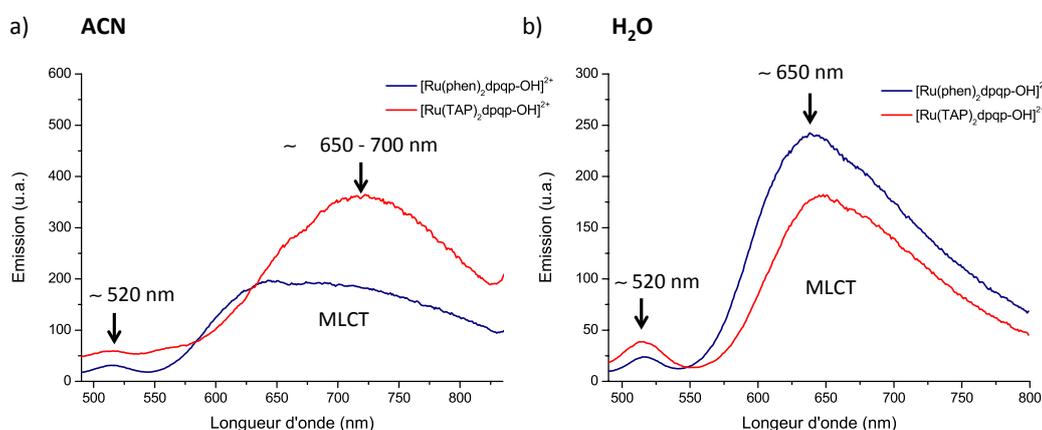


Fig. 3.15. Spectres d'émission à 25 °C de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29** a) dans l'acétonitrile et b) dans l'eau ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M). Fentes ouvertes à 15/15.

Une bande, beaucoup moins intense en émission, est observable aux alentours de 520 nm, particulièrement dans l'eau. Cette bande correspond à une harmonique de la lampe d'excitation car, comme on peut le voir dans la figure suivante, son maximum varie en fonction de la longueur d'onde d'excitation de l'échantillon. Ceci a été confirmé par le relevé de spectres d'émission des solvants seuls.

Il semble néanmoins, que les maxima d'émission de ces complexes soient plus hypsochromes dans l'eau que dans l'acétonitrile (Tableau 3.3 et Figure 3.15). Ce phénomène est à l'inverse de ce qui est observé pour les complexes de référence. En effet, la transition MLCT correspond à la création d'un dipôle et est donc favorisée dans des milieux aqueux. Étrangement, ceci est également le cas, mais dans une moindre amplitude, pour une transition ILCT qui correspond également à un transfert de charge.[40] Il est donc difficile d'expliquer cette différence dans le cas de nos complexes. Une hypothèse, qui devrait être testée à l'avenir, serait que l'état émissif, même s'il émet faiblement, ne serait pas le même dans les deux solvants (ILCT dans l'un et MLCT dans l'autre).

Comme nous l'avons vu ci-dessus, le ligand libre absorbe dans cette même région, il nous a donc semblé intéressant de varier la longueur d'onde d'excitation pour évaluer l'impact de celle-ci sur le spectre d'émission des complexes. Pour cela, des spectres d'émission d'un même échantillon de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub> ont été enregistrés dans l'acétonitrile à différentes longueurs d'onde d'excitation (Figure 3.16).

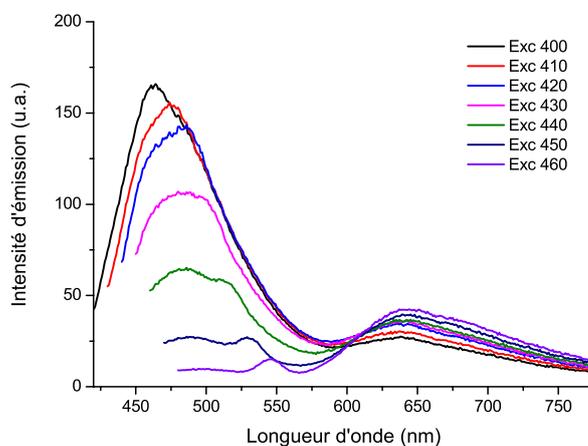


Fig. 3.16. Spectres d'émission en fonction de la longueur d'onde d'excitation de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}].2\text{PF}_6$  **29**<sub>TAP</sub> dans l'ACN à 25 °C ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M). Ouverture des fentes à 10/10.

En plus de la bande centrée à 650 nm, deux bandes sont observées : une bande de faible intensité, fortement déplacée en fonction de la longueur d'onde d'excitation, qui correspond à l'harmonique de la lampe, s'ajoute à une seconde bande d'émission particulièrement intense vers 470 nm et qui apparaît quand le complexe est excité à des courtes longueurs d'onde (400 à 440 nm). Cette bande correspond probablement à la fluorescence à partir du ligand, plus haute en énergie que la transition MLCT ou ILCT du complexe.

Comme les rendements quantiques de luminescence extrêmement bas, le temps de vie de l'état excité est court et se situe en dessous de la limite de détection de l'appareil utilisé dans notre laboratoire. En effet, le temps de vie des complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> est généralement de l'ordre de la centaine de nanosecondes (exemples : 855 ns et 630 ns pour le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2]^{2+}$  sous argon respectivement dans l'acétonitrile et dans l'eau),[1] alors qu'il est en dessous de 5 ns pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> et le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub>. Ces données concordent avec ce qui avait été observé précédemment pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> pour lequel des durées de vie de luminescence ont été mesurées à température ambiante (environ 8 ns dans l'acétonitrile) et à 77 K (environ 5  $\mu\text{s}$  dans l'acétonitrile). Il est intéressant de noter qu'à 77 K, le temps de vie est considérablement rallongé puisqu'il est d'environ 5  $\mu\text{s}$ . Ces expériences n'ont malheureusement pas pu être réalisées sur les autres complexes.

#### 2.1.4 Emission en fonction de la longueur d'onde d'excitation

Afin de pouvoir attribuer avec certitude les bandes d'émission dues au ligand, des spectres d'émission (Figure 3.17) ainsi qu'une durée de vie de l'état excité du dpqp-OH libre ont été enregistrés dans le méthanol (seul solvant dans lequel le ligand est assez soluble).

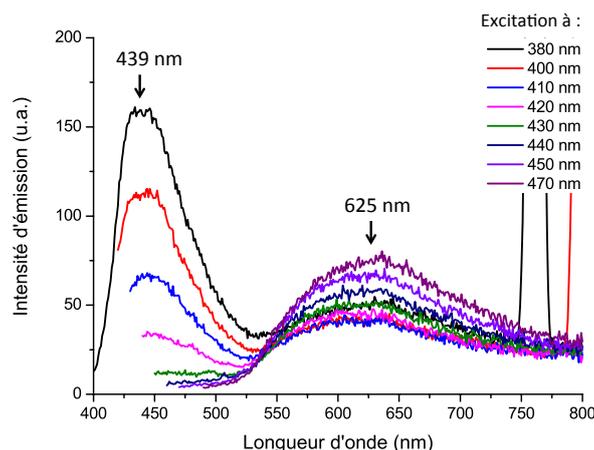


Fig. 3.17. Spectres d'émission en fonction de la longueur d'onde d'excitation du ligand dpqp-OH dans le méthanol à 25 °C. Ouverture des fentes à 3/5.

La première observation est que le ligand libre présente deux bandes de fluorescence à 25 °C, dont l'une est inhabituelle pour une molécule purement aromatique puisqu'elle se situe aux alentours de 625 nm. Nous avons à nouveau comparé ces données à celles de la littérature concernant les acridines et acridones. Ces dernières absorbent vers 380-400 nm et émettent aux alentours de 430-450 nm. [30]–[34] La première bande située à 439 nm pourrait donc tout à fait correspondre à la fluorescence de la partie acridine du ligand. Le maximum de la seconde bande semble, quant à lui, posséder un déplacement de Stokes étrangement grand pour une fluorescence. En effet, le composé émet vers 625 nm alors qu'il est excité à maximum 470 nm, ce qui correspond à environ 150 nm de différence.

Ceci pourrait être expliqué par un processus de Transfert de Proton Intramoléculaire à l'Etat Excité (ESIPT) largement décrit dans la littérature pour certaines molécules purement organiques.[41]–[44]

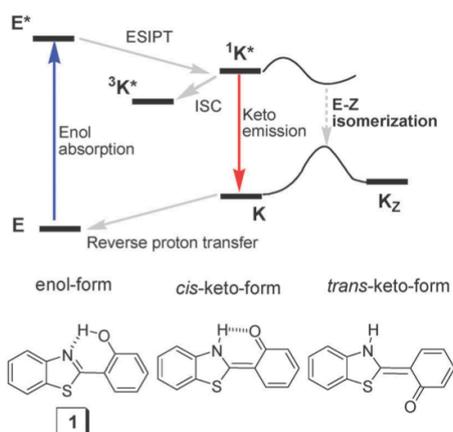


Fig. 3.18. Mécanisme de l'ESIPT de molécules organiques. [41]

Comme on le voit dans la figure 3.18, les molécules organiques ayant la possibilité de passer d'une forme énol à une forme cétone sont susceptibles de passer d'un état excité  $^1E^*$  à un autre état  $^1K^*$  plus bas en énergie qui devient l'état émissif. Le déplacement de Stokes est alors plus important que dans un cas d'une fluorescence normale. Bien que la majorité des molécules subissant l'ESIPT passent par un équilibre énol-cétone, le dpqp-OH possède également une structure permettant un ESIPT, au

contraire d'une simple acridine ou d'une simple phénazine (Figure 3.19). En effet, le ligand présente un cycle pyrazine électro-accepteur bien positionné pour faire une liaison hydrogène à l'état fondamental avec la partie hydroxyacridine sous sa forme tautomère d'acridone, stabilisant donc davantage encore cette forme tautomère.

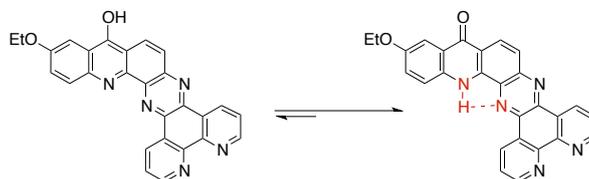


Fig. 3.19. Formes énol-cétone du ligand *dpqp-OH*. Stabilisation de la forme oxo par liaison hydrogène avec la phénazine.

A l'état excité, dans le cas d'un transfert de charge vers la partie phénazine, la densité électronique sur cette partie est accrue et la basicité de la pyrazine centrale également. Par conséquent, le transfert de proton devrait être facilité à l'état excité (Figure 3.20).

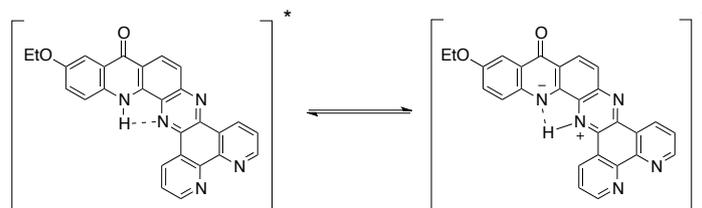


Fig 3.20. Schématisation du possible transfert de proton à l'état excité.

Cette bande de fluorescence à 625 nm pourrait donc correspondre à la fluorescence due à un ESIPT, ce qui expliquerait le déplacement de Stokes important pour cette deuxième bande d'émission et pourrait démontrer la tendance que possède ce ligand à subir un transfert de proton intramoléculaire.

Il est important de noter que ce composé possède des bandes de fluorescence extrêmement similaires à celles des complexes correspondants. Il est donc possible d'envisager que les différentes bandes d'émission du complexe soient uniquement dues aux fluorescences du ligand.

Puisque nous ne possédions des données que dans l'acétonitrile pour les complexes, d'autres spectres ont été relevés pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]\cdot 2\text{Cl}$  **29**<sub>TAP</sub> et le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]\cdot 2\text{Cl}$  **29**<sub>phen</sub> dans le méthanol pour pouvoir être mieux comparés à ce qui a été obtenu pour le ligand seul (Figure 3.21).

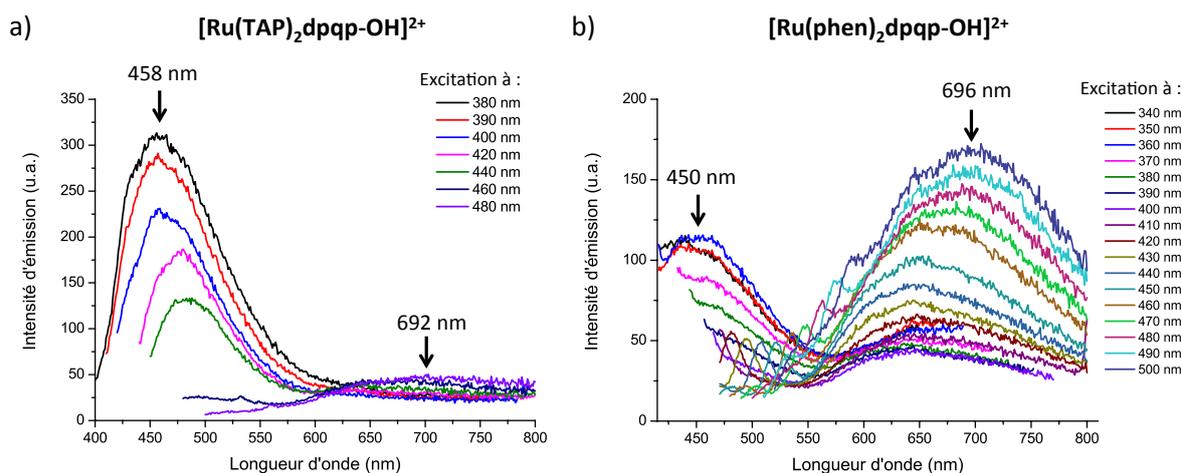


Fig. 3.21. Spectres d'émission en fonction de la longueur d'onde d'excitation dans le méthanol à 25 °C ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M) de a)  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  (Ouverture des fentes à 5/5)  $\mathbf{29}_{\text{TAP}}$  et b)  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  (Ouverture des fentes à 10/10).

Nous constatons que les ligands ancillaires (TAP ou phen) ont une grande influence sur l'intensité des deux bandes d'émission puisque la bande d'émission vers 450 nm est d'intensité faible pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$   $\mathbf{29}_{\text{phen}}$  et particulièrement intense pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$   $\mathbf{29}_{\text{TAP}}$ . Les maxima sont très similaires entre eux mais différent par rapport à ceux observés pour le ligand libre, particulièrement pour la seconde bande (vers 690 nm au lieu de 630 nm pour le ligand libre).

En effet, comme dans le cas du ligand libre, la structure du complexe favorise la formation d'un lien hydrogène entre l'azote de type acridine et l'azote de type phénazine, stabilisant la forme tautomère acridone. Au sein du complexe, la population de l'état excité doit augmenter la densité électronique sur la partie phénazine, que l'état excité de plus basse énergie participant à la photo-réaction soit localisé sur le ligand (ILCT) ou qu'il corresponde à une transition MLCT. Dès lors, quelle que soit la nature de cet état excité, le transfert de proton devrait être favorisé par la basicité accrue du cycle phénazine, et celui-ci est probablement responsable du « quenching » de la luminescence des complexes étudiés. Au vu du déplacement bathochrome observé entre la luminescence du ligand seul (625 nm) et celle du complexe (690 nm), il est probable que cette dernière luminescence résiduelle soit liée à l'état MLCT dans le méthanol. La très faible luminescence observée ne nous ayant pas permis de déterminer les durées de vie de cet état excité, les calculs théoriques devraient nous permettre de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

## 2.2 Autres complexes - $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$ , l'exception de la série

### 2.2.1 Etudes photophysiques de $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-DMEA}]^{2+}$ et $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$

Les complexes  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-DMEA}]^{2+}$   $\mathbf{40}$  et  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$   $\mathbf{30}$  (Figure 3.22), dont la synthèse a été décrite au chapitre II, ont également été étudiés pour leurs propriétés photophysiques. En effet, l'étude systématique de ce type de complexe peut nous fournir de nouvelles indications quant aux processus photophysiques impliqués.

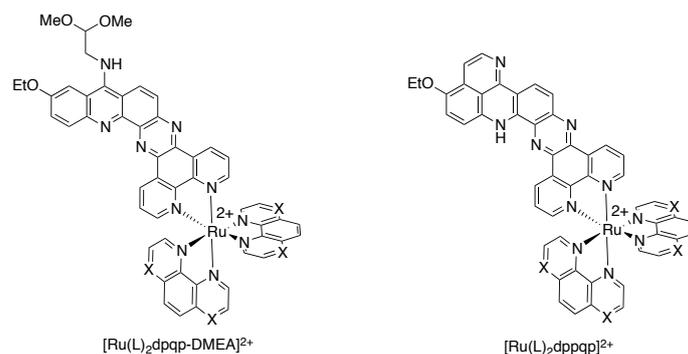


Fig. 3. 22. Structures des complexes  $[Ru(L)_2dpqp-DMEA]^{2+}$  **40** et  $[Ru(L)_2dppqp]^{2+}$  **30** (si  $X = CH$  : ligand ancillaire = phen ; si  $X = N$  : ligand ancillaire = TAP).

Les spectres d'absorption de ces complexes dans l'acétonitrile sont représentés ci-dessous (Figure 3.23) :

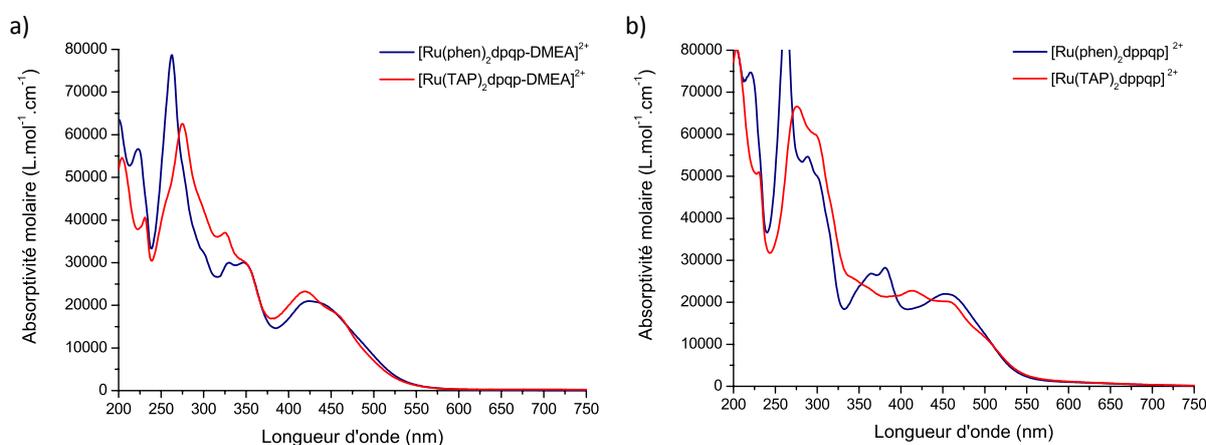


Fig. 3.23. Spectres d'absorption dans l'acétonitrile à 25 °C ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M) de a)  $[Ru(L)_2dpqp-DMEA].2PF_6$  **40** et b)  $[Ru(L)_2dppqp].2PF_6$  **30**.

On retrouve à nouveau les bandes caractéristiques des complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> et un allongement de la bande dans le visible au delà de 500 nm. Comme nous l'avons vu pour le  $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29**, cet allongement (qui est un épaulement pour le  $[Ru(TAP)_2dppqp]^{2+}$  **30<sub>TAP</sub>**) peut correspondre à une transition ILCT sur les ligand dpqp-DMEA et dppqp.

Les maxima d'émission dans l'eau et l'acétonitrile, comparables à ceux observés pour le  $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29**, sont repris ci-dessous (Tableau 3.4) :

Complexes	Maxima d'émission (nm)	
	ACN	H <sub>2</sub> O
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-DMEA] <sup>2+</sup> <b>40</b> <sub>phen</sub>	660	651
[Ru(TAP) <sub>2</sub> dpqp-DMEA] <sup>2+</sup> <b>40</b> <sub>TAP</sub>	641	643
[Ru(phen) <sub>2</sub> dppqp] <sup>2+</sup> <b>30</b> <sub>phen</sub>	650	632
[Ru(TAP) <sub>2</sub> dppqp] <sup>2+</sup> <b>30</b> <sub>TAP</sub>	631	644
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-OH] <sup>2+</sup> <b>29</b> <sub>phen</sub>	665	639
[Ru(TAP) <sub>2</sub> dpqp-OH] <sup>2+</sup> <b>29</b> <sub>TAP</sub>	716	647

Tableau 3.4. Maxima d'émission des complexes [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-DMEA]<sup>2+</sup> **40** et [Ru(L)<sub>2</sub>dppqp]<sup>2+</sup> **30** dans l'eau et l'acétonitrile (~ 2x10<sup>-5</sup> M) comparés aux valeurs obtenues pour [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-OH]<sup>2+</sup> **29**.

A l'instar des complexes [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-OH]<sup>2+</sup> **29**, les complexes [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-DMEA]<sup>2+</sup> **40** et [Ru(L)<sub>2</sub>dppqp]<sup>2+</sup> **30** (Figure 3.22) ne présentent qu'une très faible intensité de luminescence.

Les rendements quantiques de [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-DMEA]<sup>2+</sup> **40**, sont très légèrement supérieurs à ceux observés pour le [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-OH]<sup>2+</sup> **29**, mais restent très faibles et sont à nouveau, notés à titre indicatif (Tableau 3.5).

Complexes	Rendements quantiques (x10 <sup>-2</sup> )			
	ACN		H <sub>2</sub> O	
	Sous air	Sous argon	Sous air	Sous argon
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-DMEA] <sup>2+</sup> <b>40</b> <sub>phen</sub>	0,09	0,18	0,04	0,08
[Ru(TAP) <sub>2</sub> dpqp-DMEA] <sup>2+</sup> <b>40</b> <sub>TAP</sub>	0,10	0,21	0,02	0,04
[Ru(phen) <sub>2</sub> dppqp] <sup>2+</sup> <b>30</b> <sub>phen</sub>	0,04	0,07	0,03	0,06
[Ru(TAP) <sub>2</sub> dppqp] <sup>2+</sup> <b>30</b> <sub>TAP</sub>	0,02	0,08	0,04	0,07
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-OH] <sup>2+</sup> <b>29</b> <sub>phen</sub>	0,08	0,16	0,03	0,07
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-OH] <sup>2+</sup> <b>29</b> <sub>TAP</sub>	0,06	0,14	0,01	0,03
[Ru(bpy) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> [1]	1,80	6,20	2,80	4,20

Tableau 3.5. Rendements quantiques des complexes [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-DMEA]<sup>2+</sup> **40** et [Ru(L)<sub>2</sub>dppqp]<sup>2+</sup> **30** dans l'eau et l'acétonitrile (~ 2x10<sup>-5</sup> M), sous air et sous argon, comparés aux valeurs obtenues pour le [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-OH]<sup>2+</sup> **29** et aux valeurs de la littérature pour le [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>.

Cette fois encore, les durées de vie de l'état excité sont extrêmement faibles et sous la limite de détection de l'appareil (< 5ns).

Ces complexes possèdent donc les mêmes caractéristiques photophysiques que [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-OH]<sup>2+</sup> **29** et présentent probablement le même processus photochimique intramoléculaire.

En effet, bien que la forme amino soit favorisée dans le cas d'une amino-acridine libre, le ligand dpqp-DMEA peut subir une tautomérie de telle sorte que le ligand se trouve sous une forme imine et que le proton se trouve sur l'azote en position 9 de la partie acridine ; cette tautomérie serait à nouveau

favorisée par la possibilité d'un lien hydrogène avec l'azote de la partie phénazine. Dans ce cas, le « quenching » par transfert de proton (ESIPT) constitue donc également une hypothèse valable pour expliquer les propriétés photophysiques particulières de ces complexes.

### 2.2.2 Etudes photophysiques de $[Ru(L)_2dpqp-Cl]^{2+}$

A l'instar des complexes précédents, la photophysique des complexes  $[Ru(L)_2dpqp-Cl]^{2+}$  **39** (Figure 3.24), dont la synthèse est décrite dans le chapitre II, a été étudiée et se démarque particulièrement de celle observée pour les autres complexes de la série.

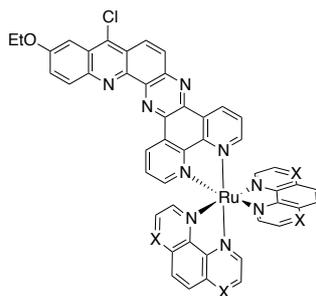


Fig. 3.24. Structure de  $[Ru(L)_2dpqp-Cl]^{2+}$  **39**.

Les spectres d'absorption de ces complexes sont représentés ci-dessous et comparés aux spectres de  $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29** (Figure 3.25):

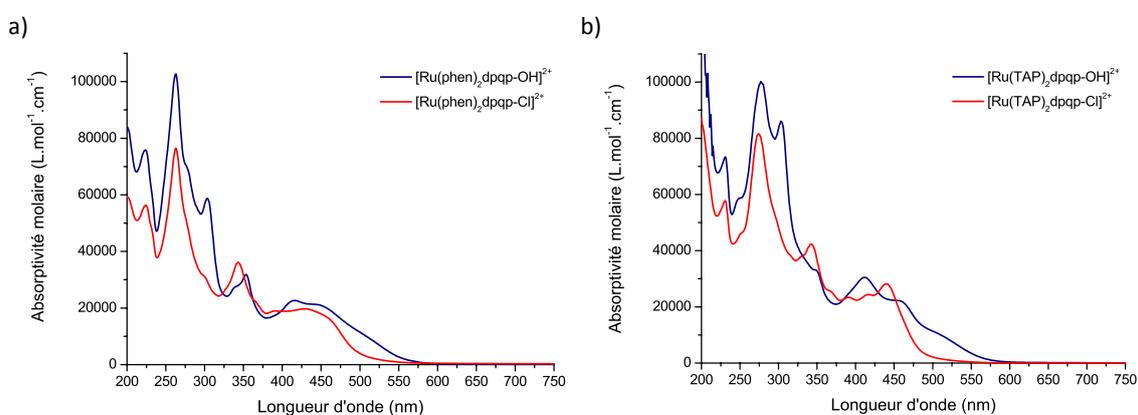


Fig. 3.25. Spectres d'absorption dans l'acétonitrile à 25 °C de a)  $[Ru(phen)_2dpqp-Cl]^{2+}$  **39<sub>phen</sub>** et b)  $[Ru(TAP)_2dpqp-Cl]^{2+}$  **39<sub>TAP</sub>** ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M) comparés respectivement à  $[Ru(phen)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29<sub>phen</sub>** et  $[Ru(TAP)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29<sub>TAP}</sub>**.

Les spectres présentent toutes les caractéristiques de complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> : une transition LC vers 260 et 280 nm, une seconde LC centrée sur le ligand plan étendu vers 340 nm et une large bande centrée vers 440 nm qui peut correspondre à une transition MLCT.

A l'inverse de tous les autres complexes étudiés jusqu'à présent, les spectres d'absorption de ces complexes ne présentent pas cet allongement si particulier de la bande observée dans le visible au-delà de 500 nm. Cet effet est particulièrement visible si l'on compare les spectres de  $[Ru(TAP)_2dpqp-Cl]^{2+}$  **39<sub>TAP</sub>** et  $[Ru(TAP)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29<sub>TAP}</sub>** (Figure 3.25).

Il est donc vraisemblable que la transition ILCT soit plus haute en énergie que la transition MLCT pour ces complexes. Il est également possible que cette transition n'existe pas dans le cas des composés halogénés à cause de leur effet électro-attracteur sur la partie acridinique du ligand dpqp-Cl.

Comme cela a été fait pour les autres complexes, nous avons mesuré les différentes caractéristiques photophysiques de ces complexes à l'état excité (Tableau 3.6) :

Complexes	Maxima d'émission		Durées de vie (ns)			
	ACN	H <sub>2</sub> O	ACN		H <sub>2</sub> O	
			air	argon	air	argon
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-Cl] <sup>2+</sup> <b>39<sub>phen</sub></b>	618	-	276	1210	-	-
[Ru(TAP) <sub>2</sub> dpqp-Cl] <sup>2+</sup> <b>39<sub>TAP</sub></b>	633	637	374	1140	1570	2840
[Ru(TAP) <sub>2</sub> phen] <sup>2+</sup> [16]	626	645			690	835
[Ru(phen) <sub>2</sub> dppz] <sup>2+</sup> [39]	607	-	177	663	-	-
[Ru(TAP) <sub>2</sub> dppz] <sup>2+</sup> [16]	621	636			820	1090
[Ru(bpy) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> [1]	620	626		855		630
[Ru(TAP) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> [6]	604	602	55	68	204	223
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-OH] <sup>2+</sup> <b>29<sub>phen</sub></b>	665	639			< 5 ns	
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-OH] <sup>2+</sup> <b>29<sub>TAP</sub></b>	716	647			< 5 ns	
<b>Rendements quantiques (x10<sup>-2</sup>)</b>						
	ACN		H <sub>2</sub> O			
	Sous air	Sous argon	Sous air	Sous argon		
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-Cl] <sup>2+</sup> <b>39<sub>phen</sub></b>	0,47	0,97	-	-		
[Ru(TAP) <sub>2</sub> dpqp-Cl] <sup>2+</sup> <b>39<sub>TAP</sub></b>	0,69	2,13	1,55	7,61		
[Ru(bpy) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> [1]	1,80	6,20	2,80	4,20		
[Ru(phen) <sub>2</sub> dppz] <sup>2+</sup> [39]	0,73	3,30	-	-		
[Ru(TAP) <sub>2</sub> dppz] <sup>2+</sup> [16]			3,50			

Tableau 3.6. Maxima d'émission, rendements quantiques et durées de vie de l'état excité de [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-Cl]<sup>2+</sup> **39** dans l'eau et l'acétonitrile (~ 2x10<sup>-5</sup> M), sous air et sous argon, comparés aux valeurs de complexes connus.

Les premières observations tirées de ces tableaux sont :

- Les valeurs de rendement quantique et de durée de vie obtenues sont du même ordre de grandeur que celles de complexes de référence, contrairement à tous les autres complexes de la série.
- Les rendements quantiques sont supérieurs sous argon, ceci suggère que les complexes subissent un « quenching » par l'oxygène de l'air. Ce type de « quenching » est très fréquemment observé et fait l'objet de nombreuses études pour la photosensibilisation de l'oxygène.[45]–[47]

- Les durées de vie de l'état excité sont longues par rapport aux valeurs obtenues pour les complexes usuels qui sont de l'ordre de quelques centaines de nanosecondes, particulièrement pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39**<sub>TAP</sub> dans l'eau.

Deux autres observations importantes peuvent être faites et seront détaillées ci-après :

- Le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39**<sub>phen</sub> n'est pas luminescent dans l'eau mais bien dans l'acétonitrile, ceci est très similaire au comportement « light-switch » de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$
- Le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39**<sub>TAP</sub> possède un rendement quantique plus élevé dans l'eau que dans l'acétonitrile. Il en est de même pour les durées de vie de luminescence. Cette tendance est également observée pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$ .

Etonnamment, les complexes  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39** sont les seuls complexes de la série à être luminescents. Le fait que ce soit les seuls complexes pour lesquels il n'y ait pas de proton sur l'azote acridinique du ligand dpqp, susceptible de désactiver l'état excité, est un argument particulièrement fort en faveur de l'hypothèse du « quenching » par transfert de proton pour les autres composés.

$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39**<sub>phen</sub> - complexe « light-switch ON »

Comme nous venons de le voir, le comportement observé pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39**<sub>phen</sub> est assez classique des complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> possédant un ligand plan étendu. En présence d'ADN, ces complexes agissent comme une sonde photo-luminescente puisqu'ils voient leur intensité de luminescence augmenter.

Dans le cas où ce complexe agit comme une sonde luminescente « ON », l'ajout d'ADN dans une solution aqueuse du complexe devrait permettre d'observer une augmentation de l'intensité de luminescence. Il est déjà connu que le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}].2\text{Cl}$  **29**<sub>phen</sub> possède une affinité pour l'ADN comparable à celle du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}].2\text{Cl}$ . Un titrage du complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl}$  **39**<sub>phen</sub> a donc été réalisé avec de l'ADN de thymus de veau (CT DNA) pour évaluer cette propriété (Figure 3.26).

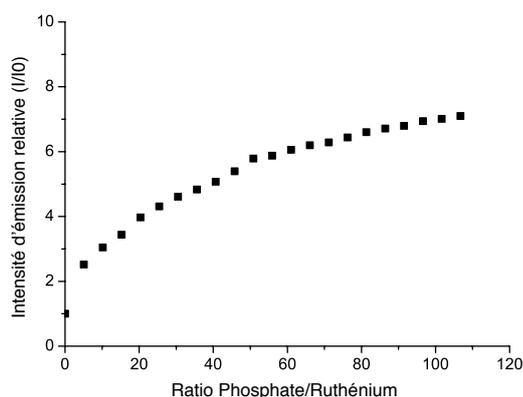


Fig. 3.26. Courbe de titrage de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl}$  **39**<sub>phen</sub> ( $\sim 1 \times 10^{-6}$  M) par l'ADN de thymus de veau dans un tampon Tris-HCl 10 mM et 50 mM NaCl.

L'hypothèse du comportement « light-switch » de ce complexe semble se confirmer puisqu'on observe une augmentation de l'intensité de luminescence d'un facteur 8 à des concentrations élevées en ADN.

Il est également possible de calculer une constante d'affinité  $K$ , du complexe envers le CT-DNA, à partir de cette courbe grâce à la relation de McGhee-Von-Hippel :

$$\frac{\nu}{C_f} = K(1 - n\nu) \left[ \frac{1 - n\nu}{1 - (n - 1)\nu} \right]^{n-1}$$

où  $C_f$  est la concentration en complexe libre,  $n$  le nombre de paires de bases (c'est à dire la taille du site d'interaction) et  $\nu$  correspond au taux de recouvrement et s'exprime selon :  $\nu = \frac{C_b}{[ADN]}$

C'est à dire le rapport des concentrations en complexe lié  $C_b$  et en paires de bases d'ADN. Pour un rapport de  $[P]/[Ru] = 100$ , on considère que toute l'espèce est liée à l'ADN. Cette situation correspond généralement à un plateau sur la courbe de titrage. Ce plateau n'est pas atteint ici, il est donc probable que tout le complexe ne soit pas lié à l'ADN à  $[P]/[Ru] = 100$ . Cette approximation est néanmoins faite pour pouvoir estimer  $C_b$ .

La valeur de  $K$ , obtenue après ajustement des points expérimentaux du graphique par l'équation de McGhee-Von Hippel représentant  $\nu/C_f$  en fonction de  $\nu$ , vaut  $22000 \pm 1000 \text{ M}^{-1}$ .

Cette valeur est nettement inférieure (facteur 100) à celle qui avait été rapportée pour le  $[Ru(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}].2\text{Cl } \mathbf{29}_{\text{phen}}$  ( $3,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), cette dernière étant du même ordre de grandeur que celle rapportée pour le  $[Ru(\text{bpy})_2\text{dppz}].2\text{Cl}$  ( $4,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Le  $[Ru(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } \mathbf{39}_{\text{phen}}$  semble donc interagir avec l'ADN mais avec une constante d'affinité moindre ; la présence du chlore semble donc avoir un impact important, probablement du point de vue stérique. Ce résultat est néanmoins assez intéressant pour les applications d'interaction avec les G4 puisqu'une faible affinité envers l'ADN en double brin (thymus de veau) pourrait permettre une meilleure sélectivité envers les G4. Ce point sera exploité dans le chapitre IV.

Il est important de considérer que l'ADN de thymus de veau est un ADN génomique pour lequel les brins peuvent se trouver sous plusieurs formes.[48] Les propriétés « light-switch » peuvent donc varier en fonction de l'ADN utilisé et il est probable qu'une meilleure affinité puisse être obtenue avec des oligonucléotides organisés de manière optimale.

Pour la suite des études photophysiques, il serait intéressant de relever les spectres d'émission en fonction de la température afin de confirmer que ce complexe présente le même comportement « light-switch » que celui de  $[Ru(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ . En effet, il est observé, pour les complexes possédant un état « bright » et un état « dark », un maxima de durée de vie de luminescence en fonction de la température (situé vers 260 K pour le  $[Ru(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ ).[13] Ceci est différents des autres complexes possédant un seul état pour lesquels la durée de vie ne fait qu'augmenter avec l'abaissement en température.

*Formation de photo-adduit avec  $[Ru(\text{TAP})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  ?*

Comme indiqué plus haut, le complexe  $[Ru(\text{TAP})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+} \mathbf{39}_{\text{TAP}}$  possède un rendement quantique plus élevé et une durée de vie de l'état excité plus longue dans l'eau que dans l'acétonitrile. Il est donc probable que, comme pour le  $[Ru(\text{TAP})_3]^{2+}$ , il existe une désactivation de l'état excité  $^3\text{MLCT}$  par

transition vers l'état triplet  $^3MC$ . En effet, dans des solvants moins polaires que l'eau, le niveau de l'état  $^3MLCT$  est déstabilisé et le passage à l'état  $^3MC$  est possible à température ambiante. A nouveau, cette hypothèse devra être confirmée par des études du comportement photophysique du complexe en fonction de la température.

Comme décrit dans l'introduction, la majorité des complexes possédant au moins deux ligands TAP sont capables de former des adduits avec la guanine sous illumination. Il est donc intéressant d'évaluer cette aptitude pour ce nouveau complexe par une expérience de « quenching » de la luminescence du complexe en présence de guanine. En effet, une diminution de l'intensité de luminescence suite à l'ajout de guanine impliquerait un « quenching » par transfert d'électron de la guanine vers le complexe excité, première étape pour la formation de photo-adduits.

La relation de Stern-Volmer met en relation l'intensité de luminescence en fonction de la concentration en « quencher » et permet de déterminer une constante de « quenching »  $k_q$  :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

où  $I_0$  et  $I$  correspondent aux intensités d'émission du complexe sans et avec « quencher » respectivement.

$\tau_0$  correspond à la durée de vie de l'état excité du complexe en absence de « quencher » et  $[Q]$  est la concentration en « quencher », dans ce cas-ci en guanine.

Cette même relation peut être écrite en fonction des durées de vie de luminescence :

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

où  $\tau_0$  et  $\tau$  correspondent aux durées de vie de l'état excité du complexe sans et avec « quencher » respectivement.

Les résultats de « quenching » sont représentés ci-dessous (Figure 3.27) :

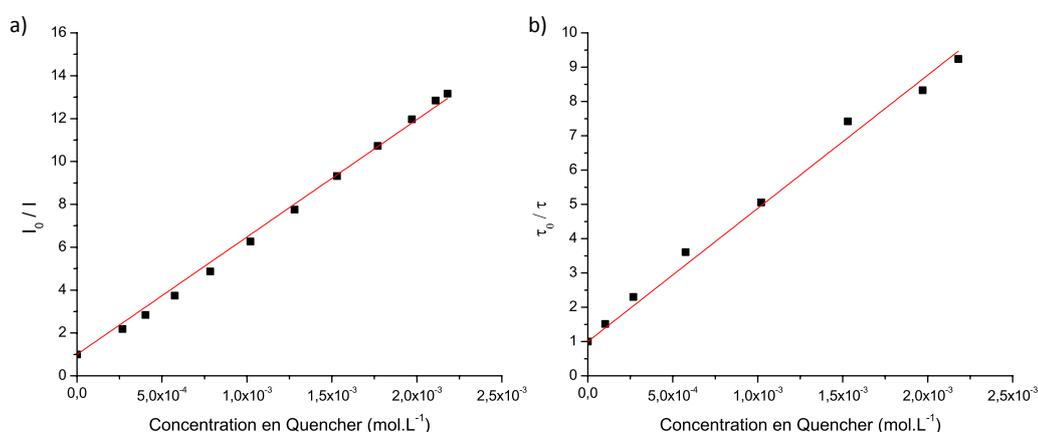


Fig. 3.27. Relation linéaire de Stern-Volmer pour  $[Ru(TAP)_2dppq-Cl].2Cl$  **39**<sub>TAP</sub> ( $1 \times 10^{-5}$  M) avec l'ajout de GMP dans un tampon Tris-HCl 0,1 M en a)  $I_0/I$  et b)  $\tau_0/\tau$ .

L'évolution de  $I/I_0$  et de  $\tau/\tau_0$  est linéaire dans les deux cas. Une constante de « quenching » a donc pu être calculée :

$$k_q = (2,63 \pm 0,05) \times 10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$$

Cette valeur est comparable à la valeur obtenue pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$  qui est de  $2,2 \times 10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ . Nous pouvons donc en conclure qu'il y a un transfert d'électron efficace entre les deux espèces sous illumination et que ce complexe est probablement capable de former un photo-adduit avec la guanine. Ceci devra être confirmé par une étude photochimique complète en présence de guanine.

### 2.2.3 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Br}]^{2+}$ – Un second complexe « light-switch »

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, le ligand dpqp-Br est moins sujet que le dpqp-Cl à reformer le dpqp-OH suite à une hydrolyse dans l'eau. Nous avons donc synthétisé le complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Br}]^{2+}$  **55<sub>phen</sub>** pour remplacer à terme l'homologue chloré puisque les études d'interaction avec l'ADN sont principalement réalisées en milieu aqueux.

Il était néanmoins impératif de s'assurer que ce nouveau complexe puisse assurer le même rôle que le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39<sub>phen</sub>**. Nous avons donc également examiné ses propriétés optiques (absorption et émission). La figure 3.28 présente le spectre d'absorption du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Br}]^{2+}$  **55<sub>phen</sub>** dans l'acétonitrile et permet de le comparer à celui du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39<sub>phen</sub>**.

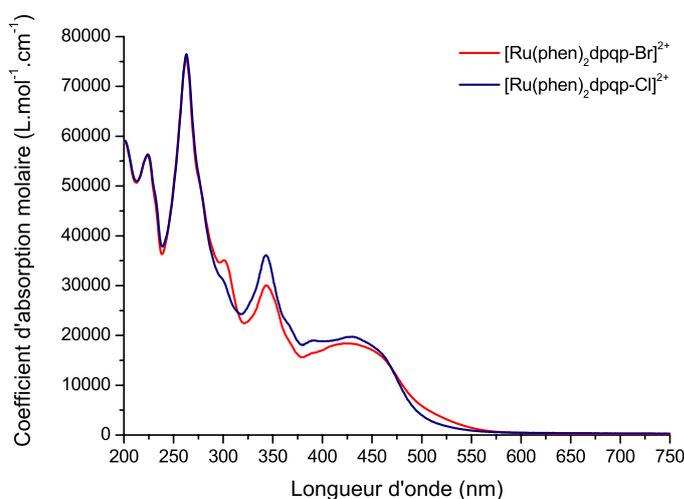


Fig. 3.28. Comparaison des spectres d'absorption des complexes  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{PF}_6$  **39<sub>phen</sub>** et  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Br}].2\text{PF}_6$  **55<sub>phen</sub>** dans l'acétonitrile à  $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

Les données d'émission sont quant à elles rassemblées dans le tableau 3.7.

Complexes	Maxima d'émission (nm)				
	ACN		H <sub>2</sub> O		
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-Cl] <sup>2+</sup> <b>39</b> <sub>phen</sub>	618		-		
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-Br] <sup>2+</sup> <b>55</b> <sub>phen</sub>	623		-		
Complexes	Rendements quantiques (x10 <sup>-2</sup> )				
	Sous air	ACN		H <sub>2</sub> O	
		Sous argon	Sous air	Sous argon	
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-Cl] <sup>2+</sup> <b>39</b> <sub>phen</sub>	0,47	0,97	-	-	
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-Br] <sup>2+</sup> <b>55</b> <sub>phen</sub>	1,21	2,93	-	-	
Complexes	Durée de vie (ns)				
	Sous air	ACN		H <sub>2</sub> O	
		Sous argon	Sous air	Sous argon	
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-Cl] <sup>2+</sup> <b>39</b> <sub>phen</sub>	276	1210	-	-	
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-Br] <sup>2+</sup> <b>55</b> <sub>phen</sub>	245	1106	-	-	

Tableau 3.7. Maxima d'émission et rendements quantiques de [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-Br]<sup>2+</sup> **55** dans l'eau et l'acétonitrile (~ 2x10<sup>-5</sup> M), sous air et sous argon, comparés aux valeurs de [Ru(L)<sub>2</sub>dpqp-Cl]<sup>2+</sup> **39**.

Ce complexe possède des propriétés presque identiques à celles du [Ru(phen)<sub>2</sub>dpqp-Cl]<sup>2+</sup> **39**<sub>phen</sub> : les spectres d'absorption sont similaires, les maxima d'émission dans l'ACN sont très proches et le [Ru(phen)<sub>2</sub>dpqp-Br]<sup>2+</sup> **55**<sub>phen</sub> possède également un comportement « light-switch », peut-être même plus marqué que l'homologue chloré puisque son rendement quantique est presque trois fois supérieur dans l'acétonitrile à celui du composé chloré. La durée de vie de l'état excité de ce complexe est également de l'ordre de la centaine de nanosecondes. Il sera donc probablement un bon candidat pour remplacer le complexe [Ru(phen)<sub>2</sub>dpqp-Cl]<sup>2+</sup> **39**<sub>phen</sub> dans de futurs tests.

### 2.3 Illumination stationnaire

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce chapitre, il existe généralement plusieurs voies de désactivation de l'état excité. L'une en particulier est le passage à l'état triplet MC centré sur le complexe. A partir de cet état, il est possible d'observer une déchélation d'un des ligands du complexe, qui peut être problématique dans le cadre d'applications sous illumination. Il est donc usuel dans le laboratoire de Chimie Organique et Photochimie (ULB) d'évaluer la stabilité des complexes synthétisés à l'exposition de lumière.

Les différents complexes de la série ont donc été placés sous illumination grâce à un dispositif permettant à une cellule spectroscopique en quartz d'être irradiée par un rayon focalisé généré par une lampe au Xénon (domaine du visible). L'évolution des spectres d'absorption et d'émission dans l'UV-vis est suivie au cours du temps d'illumination dans l'eau et dans l'acétonitrile.

### 2.3.1 Illumination stationnaire menée sur les complexes $[Ru(L)_2dpqp-OH]^{2+}$ et $[Ru(L)_2dpqp-Cl]^{2+}$

Les résultats du suivi de l'illumination continue sont représentés ci-dessous (Figure 3.29) pour le  $[Ru(TAP)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub>, les suivis du  $[Ru(phen)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub> et des complexes  $[Ru(L)_2dpqp-Cl]^{2+}$  **39**, assez similaires, sont présentés en annexe.

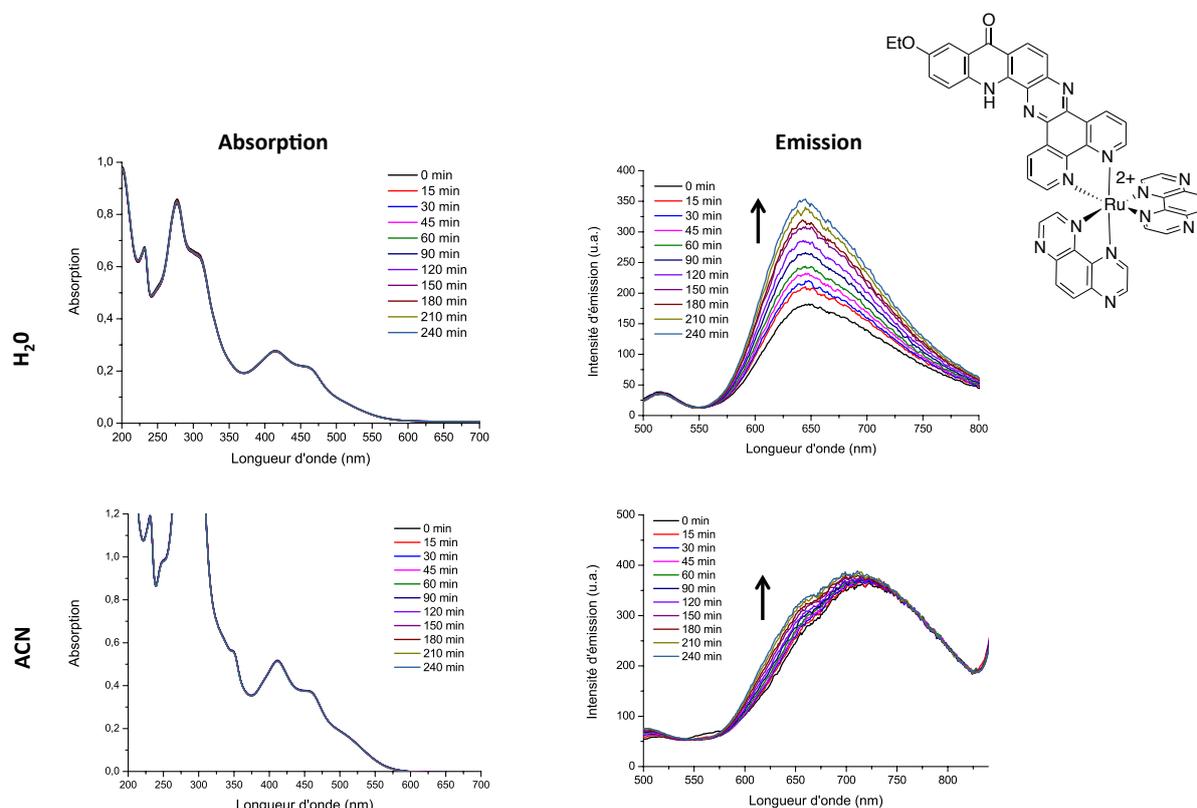


Fig. 3.29. Evolution en fonction du temps d'illumination des spectres d'absorption et d'émission du  $[Ru(TAP)_2dpqp-OH]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub> dans l'eau et dans l'acétonitrile ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M), sous air, à 25 °C.

Premièrement, les spectres d'absorption sont superposables, il n'y a aucune variation de ces spectres au cours du temps d'illumination. Le complexe en solution est donc stable sous illumination. On remarque néanmoins dans les spectres d'émission, une faible tendance qu'à l'intensité de luminescence à augmenter au cours du temps d'illumination (facteur de 1,8 fois dans l'eau et de 1,1 fois dans l'acétonitrile). Cette augmentation de l'intensité de luminescence, bien que faible, est surprenante. En effet, on observe plus généralement une diminution de l'intensité de luminescence, au cours du temps d'illumination, due à la perte d'espèces émissives en solution causée par le phénomène de déchélation décrit plus haut. Compte tenu de la faible émission de ces complexes, nous avons envisagé une erreur sur la mesure à cause de la variation de la chaleur de la lampe excitatrice. En effet, l'analyse de l'échantillon par HPLC et par spectrométrie de masse n'a révélé aucun changement dans la nature de l'espèce illuminée, ce qui suggère qu'aucun nouveau produit n'a été formé.

### 2.3.2 Illumination stationnaire menée sur le $[Ru(L)_2dpqp-DMEA]^{2+}$

Tout comme les composés précédents, le comportement des complexes  $[Ru(L)_2dpqp-DMEA]^{2+}$  **40** a été observé sous illumination et présente quelques différences par rapport aux complexes précédents (Figure 3.30).

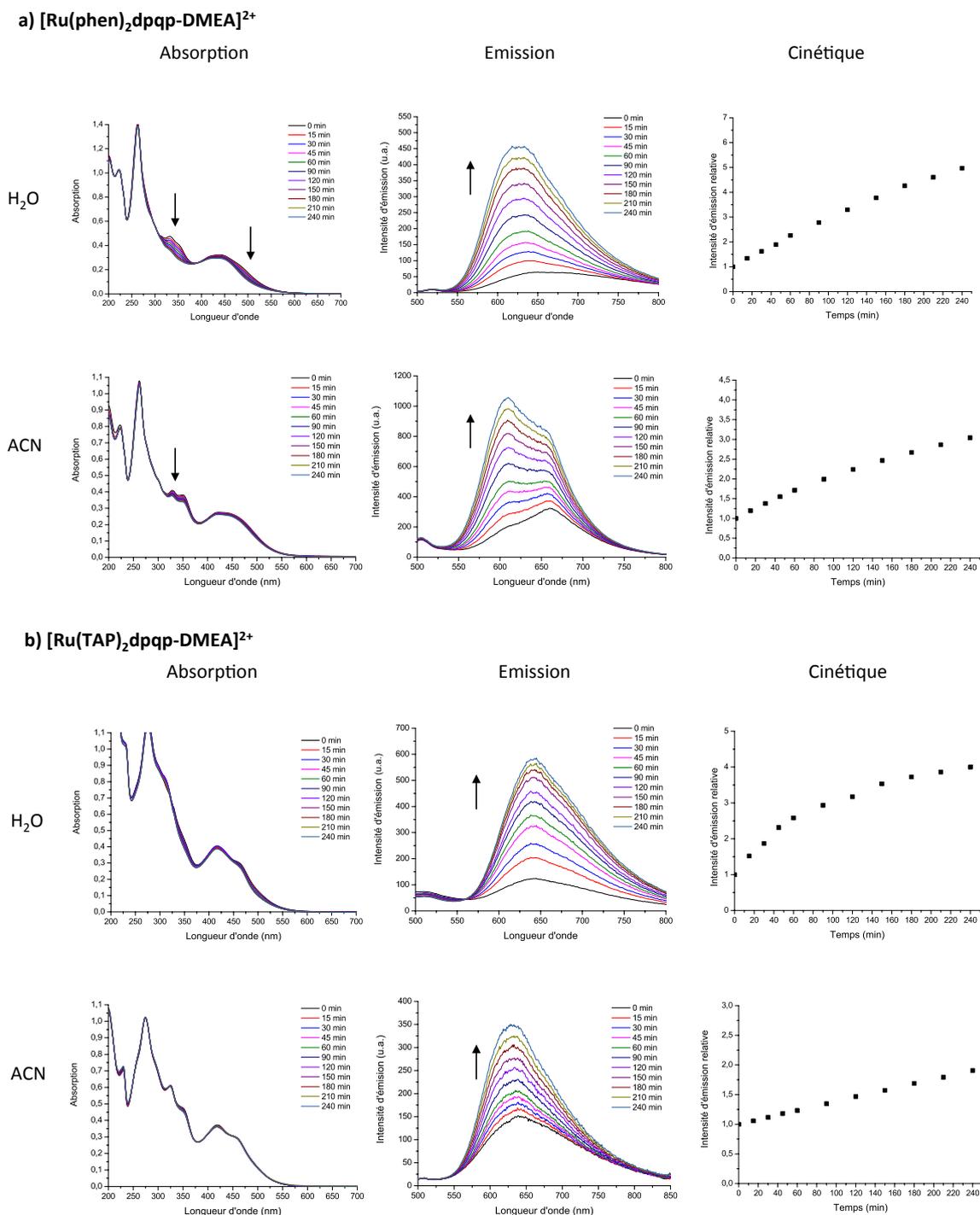


Fig. 3.30. Spectres d'absorption et d'émission suivis au cours du temps d'illumination et cinétique de l'émission relative ( $I_0$  étant l'intensité d'émission avant illumination) dans l'eau et l'acétonitrile, sous air à 25 °C de a)  $[Ru(phen)_2dpqp-DMEA]^{2+}$  **40<sub>phen</sub>** et b)  $[Ru(TAP)_2dpqp-DMEA]^{2+}$  **40<sub>TAP</sub>**.

La même tendance d'augmentation de l'intensité de luminescence a été observée dans le cas de l'illumination des complexes  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppq-DMEA}]^{2+}$  **40**. Cette fois cependant, la tendance est plus marquée, puisque une augmentation d'intensité d'émission jusqu'à 7 fois supérieure à  $I_0$  a été observée pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppq-DMEA}]\cdot 2\text{Cl}$  **40**<sub>phen</sub> dans l'eau. Les spectres d'absorption varient d'ailleurs de manière plus significative, principalement vers 350 nm. Cette augmentation ne peut donc plus être attribuée à une erreur sur la mesure.

Une analyse par spectrométrie de masse et par HPLC a donc été réalisée afin de déterminer si une nouvelle espèce était formée. Les espèces identifiées par ces méthodes après illumination semblent correspondre aux complexes de départ,  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppq-DMEA}]^{2+}$  **40**, et il est difficile à l'heure actuelle de déterminer la cause de ces variations. Une hypothèse serait que, sous illumination, un changement dans l'organisation supramoléculaire des complexes puisse exister et donner lieu à l'augmentation de luminescence observée.

### 2.3.3 Illumination stationnaire menée sur le $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppq}]^{2+}$

Lorsque l'expérience a été menée sur les derniers complexes de la série,  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppq}]^{2+}$  **30**, des changements encore plus importants ont été observés, aussi bien dans les spectres d'absorption (Figure 3.31), que dans les spectres d'émission (Figure 3.32).

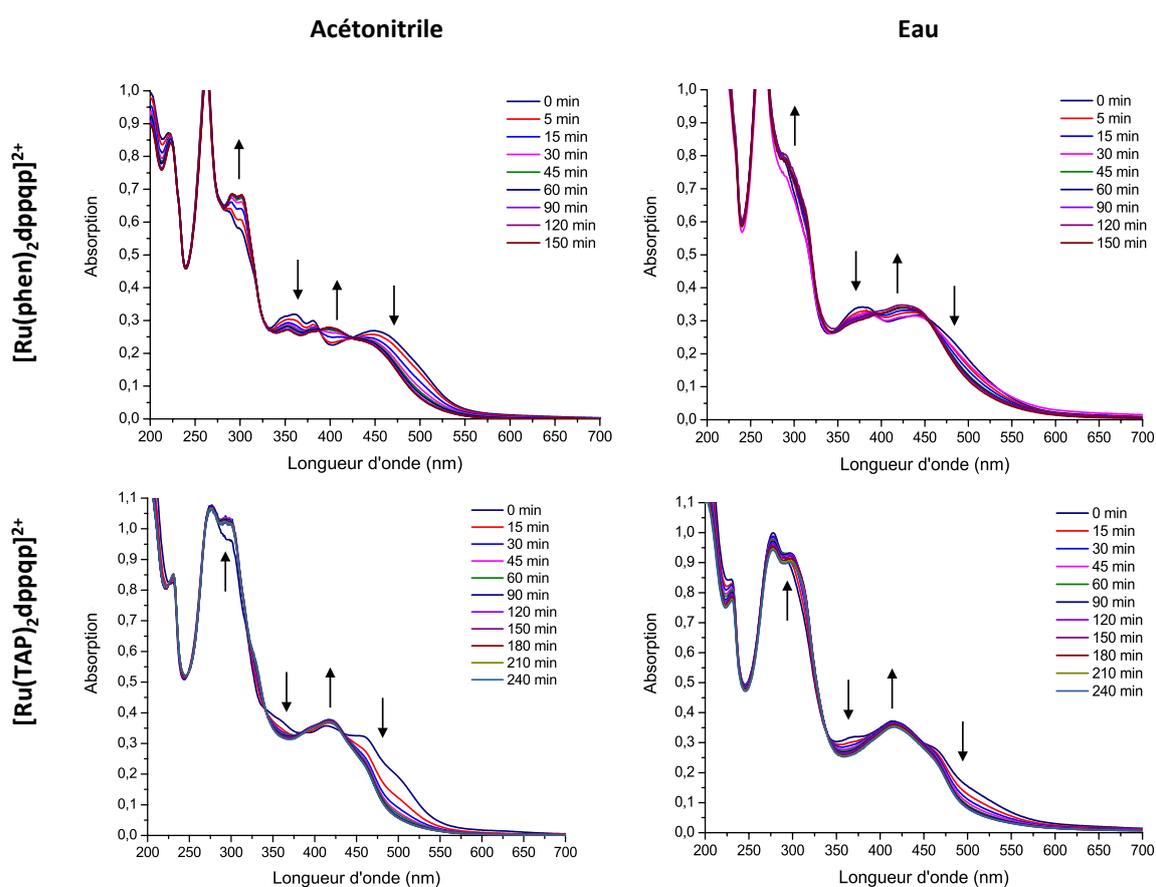


Fig. 3.31. Evolution en fonction du temps d'illumination des spectres d'absorption de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppq}]^{2+}$  **30** dans l'eau et dans l'acétonitrile ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M), sous air, à 25 °C.

Les changements au niveau des bandes d'absorption sont très similaires pour les deux complexes dans l'eau et dans l'acétonitrile. Globalement, on observe une petite augmentation au niveau de la bande LC vers 300 nm, une diminution vers 360-380 nm, une augmentation aux alentours de 420 nm et une diminution au delà de 500 nm.

Cette modification importante du spectre d'absorption laisse penser qu'il y a modification de l'espèce en solution. De plus, la ressemblance entre les différents spectres tend à indiquer que la même nouvelle espèce est formée dans tous les cas. Selon toute vraisemblance, il ne s'agit pas d'une photo-déchélation puisque, sur les spectres d'absorption, aucune bande à 550 nm n'apparaît. De plus, on observe une augmentation drastique de l'intensité d'émission au cours du temps d'illumination (Figure 3.32). Or, comme nous l'avons déjà mentionné, en cas de déchélation, on remarque plutôt une diminution de l'intensité de luminescence due à la perte d'espèces luminescentes. Ce comportement est tout à fait inhabituel et il est donc vraisemblable qu'une nouvelle espèce luminescente soit formée à partir du  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30** qui, lui, n'est pas luminescent.

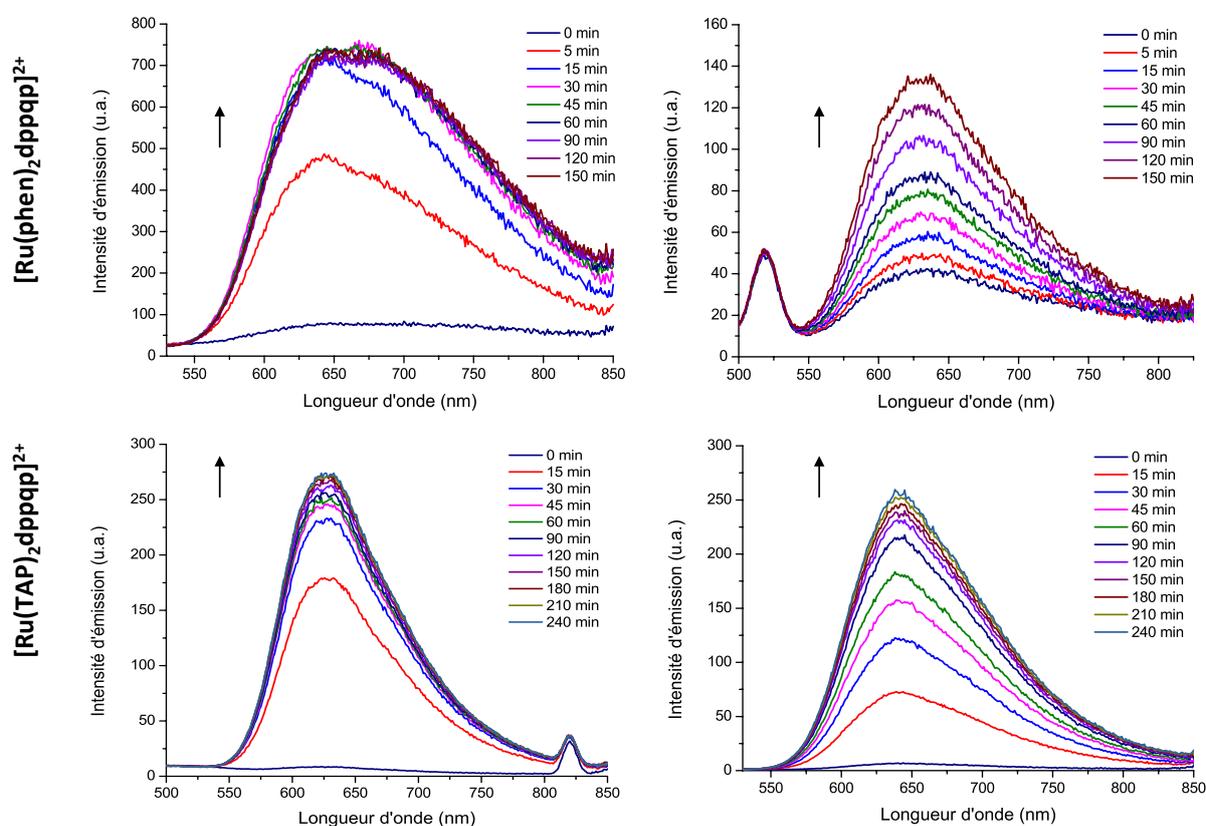


Fig. 3.32. Evolution en fonction du temps d'illumination des spectres d'émission de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30** dans l'eau et dans l'acétonitrile ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M), sous air, à 25 °C.

Les rendements quantiques sous air de cette nouvelle espèce ont été évalués à partir des différents spectres relevés en fin d'illumination. Ces données ne correspondent qu'à une estimation puisque il est difficile d'affirmer que l'espèce est seule en solution après illumination. Le rendement a été calculé par comparaison avec le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  selon la formule

$$\Phi_C^{emi} = \Phi_{ref}^{emi} \frac{A_{\lambda,ref} \int I_C^{emi} d\nu}{A_{\lambda,C} \int I_{ref}^{emi} d\nu}$$

où  $\Phi_C^{emi}$  correspond au rendement quantique du complexe,  $\Phi_{ref}^{emi}$  au rendement quantique du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ,  $\int I^{emi} d\nu$  à l'intégration des bandes d'émission du complexe et du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  et  $A_\lambda$  à l'absorption à la longueur d'onde correspondant à la longueur d'onde excitatrice.

Des durées de vie de l'échantillon ( $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Inc}]^{2+}$  avec Inc = ligand inconnu) ont également été relevées après illumination. Ces données sont présentées dans le tableau 3.8 ci-dessous.

Complexes	Rendements quantiques ( $\times 10^{-2}$ )	
	ACN	H <sub>2</sub> O
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Inc}]^{2+}$	0,58	~0,08
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Inc}]^{2+}$	2,14	2,35
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	1,80	2,80
	Durée de vie (ns)	
	ACN	H <sub>2</sub> O
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Inc}]^{2+}$	213	> 5 ns
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Inc}]^{2+}$	687	850

Tableau 3.8. Rendements quantiques et durées de vie de l'état excité de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30** après illumination dans l'eau et dans l'acétonitrile sous air à 25 °C (mesures réalisées sur l'échantillon illuminé).

Ces valeurs de rendement quantique sont comparées aux valeurs du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  à titre indicatif afin de montrer à quel point l'augmentation en intensité de luminescence est importante par rapport à l'espèce de départ (non luminescente), puisqu'ici, sous illumination, l'espèce inconnue possède un rendement quantique du même ordre de grandeur que  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  (à l'exception du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Inc}]^{2+}$  dans l'eau).

De même, les durées de vie de l'état excité sont de l'ordre de la centaine de nanosecondes, ce qui est usuel pour les complexes de référence.

Bien que les valeurs de rendement quantique soient faussées, l'augmentation par rapport aux complexes de départ est suffisamment significative pour pouvoir tirer les conclusions ci-dessous :

- Le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Inc}]^{2+}$  se comporte comme le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39<sub>phen</sub>**.
- $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Inc}]^{2+}$  se comporte comme le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39<sub>TAP</sub>**.

Les espèces formées présentent donc le même comportement que leurs analogues halogénés.

### Caractérisation des produits formés

Il nous a semblé pertinent à ce stade de relever les spectres de masse après illumination des échantillons afin d'identifier les nouvelles espèces formées (Figure 3.33).

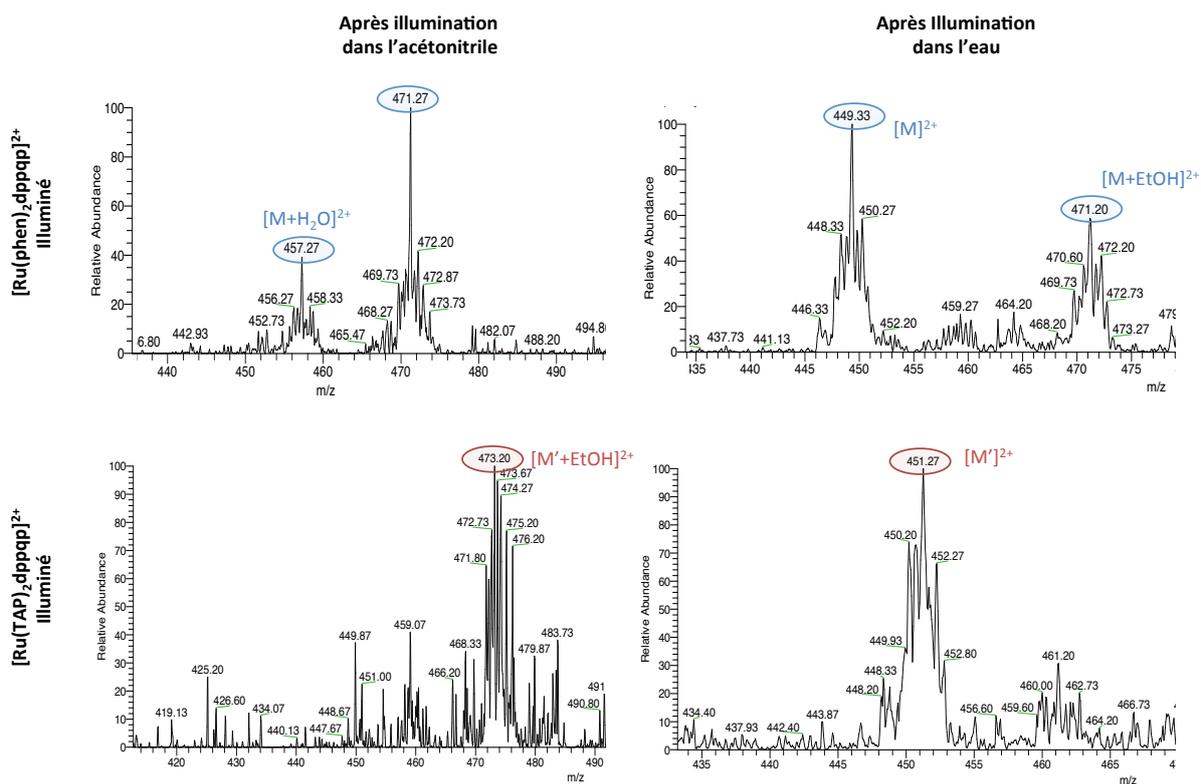


Fig 3.33. Spectres de masse ESI-MS des complexes  $[Ru(L)_2dppqp]^{2+}$  **30** après illumination dans l'eau et dans l'acétonitrile, sous air, à 25 °C.

Plusieurs pics sont observés sur les spectres de masse :

- Pour le  $[Ru(phen)_2dppqp]^{2+}$  **30<sub>phen</sub>** illuminé : deux pics principaux dans l'acétonitrile à 457,27 et 471,27 Th et deux dans l'eau à 449,33 et 471,20 Th. Le pic à 471,2 Th se retrouve donc dans les deux cas.
- Pour le  $[Ru(TAP)_2dppqp]^{2+}$  **30<sub>TAP</sub>** illuminé : un seul pic est détecté à chaque fois, à 473,20 Th dans l'acétonitrile et 451,27 Th dans l'eau.

Le fait qu'il y ait des différences de deux unités entre certains pics détectés pour les complexes à base de TAP et ceux à base de phen indique que la transformation s'opère sur le ligand dppqp et que les complexes formés sont des homologues en série TAP et phen.

Les pics à  $m/z = 449,33$  et  $451,27$  Th peuvent être attribués aux complexes porteurs du ligand dppqp oxydé suite à la perte de son éthyle en série phen et TAP (Schéma 3.1) dont les masses théoriques sont  $m/z = 449,08$  ( $[Ru(phen)_2dppqp_{ox}]^{2+}$  **56<sub>phen</sub>**) et  $451,06$  ( $[Ru(TAP)_2dppqp_{ox}]^{2+}$  **56<sub>TAP</sub>**) :

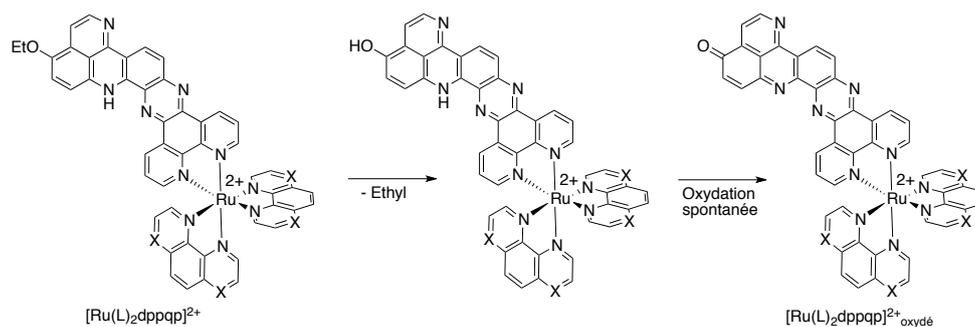


Schéma 3.1. Processus de dé-éthylation déclenchée sous illumination de  $[Ru(L)_2dppqp]^{2+}$  **30**.

Ces ions ne sont pas visibles tels quels dans les échantillons illuminés dans l'acétonitrile mais d'autres pics peuvent correspondre au complexe dé-éthylé et oxydé avec une molécule d'éthanol ou d'eau :

- $[Ru(phen)_2dppqp_{ox}]^{2+}$  **56<sub>phen</sub>** : 457,27 Th correspond à  $[M+H_2O]^{2+}$  et 471,27 Th à  $[M+EtOH]^{2+}$
- $[Ru(TAP)_2dppqp_{ox}]^{2+}$  **56<sub>TAP</sub>** : 473,20 Th correspond à  $[M+EtOH]^{2+}$

Il est intéressant de noter que ce nouveau composé, luminescent, ne possède pas de proton sur l'azote de l'acridine. Ce résultat apporte donc également un argument en faveur du « quenching » de la luminescence par transfert de proton au sein des complexes non luminescents décrits dans ce travail.

Afin d'ajouter une preuve supplémentaire quant à la nature du composé formé sous illumination, nous avons comparé ses propriétés photophysiques avec celles du complexe  $[Ru(TAP)_2dppqp_{ox}]^{2+}$  **56<sub>TAP</sub>** que nous avons synthétisé par voie chimique (chapitre II).

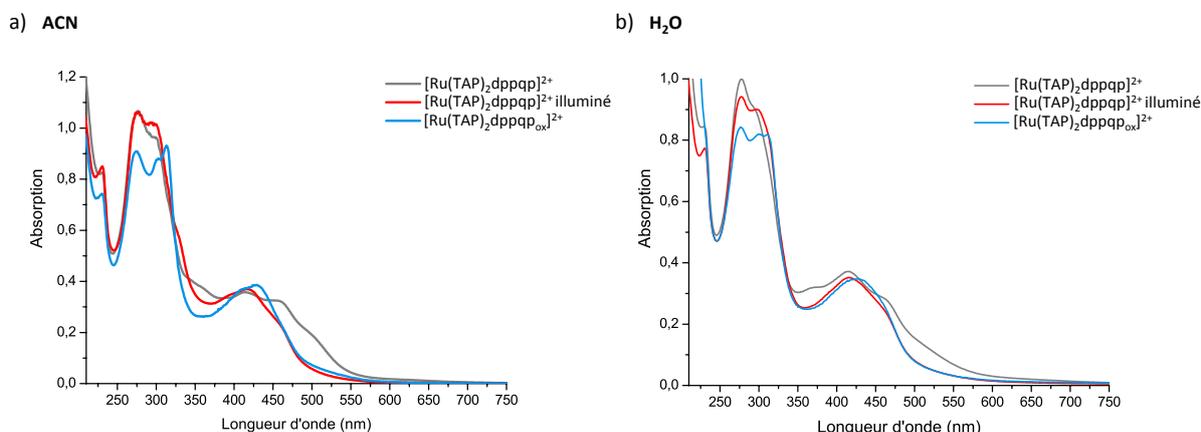


Fig. 3.34. Spectres d'absorption des complexes  $[Ru(TAP)_2dppqp]^{2+}$  **30<sub>TAP</sub>**,  $[Ru(TAP)_2dppqp]^{2+}$  **30<sub>TAP</sub>** après 240 minutes d'illumination et  $[Ru(TAP)_2dppqp_{ox}]^{2+}$  **56<sub>TAP</sub>** a) dans l'acétonitrile et b) dans l'eau, sous air à 25 °C.

Les spectres d'absorption (Figure 3.34) des complexes  $[Ru(TAP)_2dppqp_{ox}]^{2+}$  **56<sub>TAP</sub>** et  $[Ru(TAP)_2dppqp]^{2+}$  **30<sub>TAP</sub>** après illumination sont très similaires entre eux, particulièrement dans l'eau. Ils ne présentent pas d'allongement de la bande dans le visible au delà de 500 nm et possèdent des maxima très proches dans tout le spectre. Ces données donnent une indication supplémentaire quant à la nature du complexe formé sous illumination qui semble bien correspondre au  $[Ru(TAP)_2dppqp_{ox}]^{2+}$  **56<sub>TAP</sub>**.

Le tableau 3.9 ci-dessous reprend les différentes données photophysiques du  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$  **56**<sub>TAP</sub> (obtenu par voie chimique et non illuminé) qui sont comparées aux données du  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30**<sub>TAP</sub> après 240 minutes d'illumination :

Complexes	Rendements quantiques ( $\times 10^{-2}$ )	
	ACN	H <sub>2</sub> O
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$ <b>56</b> <sub>TAP</sub>	0,19	0,30
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Inc}]^{2+}$	2,14	2,35
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	1,80	2,80

Complexes	Durée de vie (ns)		Maxima d'émission (nm)	
	ACN	H <sub>2</sub> O	ACN	H <sub>2</sub> O
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$ <b>56</b> <sub>TAP</sub>	556	851	626	643
$[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Inc}]^{2+}$	687	850	627	641

Tableau 3.9. Rendements quantiques et durées de vie de l'état excité de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$  **56**<sub>TAP</sub> comparés aux valeurs obtenues pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Inc}]^{2+}$  (mesures réalisées sur l'échantillon illuminé) dans l'eau et dans l'acétonitrile sous air à 25 °C.

Les rendements quantiques du  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$  **56**<sub>TAP</sub> sont faibles par rapport aux rendements obtenus pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30**<sub>TAP</sub> après illumination. Il est important de considérer que les rendements renseignés pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{Inc}]^{2+}$  sont mesurés pour la solution illuminée et que le complexe n'a pas été isolé après illumination. Les conditions expérimentales sont donc différentes entre les deux complexes et ceci peut expliquer cette différence entre les rendements quantiques. De plus, à l'instar des complexes  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-DMEA}]^{2+}$  **40**, le temps d'illumination pourrait influencer sur l'organisation supramoléculaire des complexes  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$  **56**<sub>TAP</sub> et donc sur le rendement quantique observé. Il serait donc intéressant de réaliser l'expérience d'illumination stationnaire sur le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$  **56**<sub>TAP</sub> obtenu chimiquement.

Les rendements quantiques du  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$  **56**<sub>TAP</sub> restent néanmoins près de 10 fois supérieurs à ceux observés pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub> et ces complexes sont donc considérés comme luminescents.

Les durées de vie de luminescence du  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$  **56**<sub>TAP</sub>, obtenu chimiquement, sont identiques à celles de l'espèce formée sous illumination. Elles sont également de l'ordre de la centaine de nanosecondes comme la majorité des complexes de ruthénium. Les maxima d'émission sont quant à eux également très similaires entre les deux espèces.

D'après ces données, il est donc très probable que l'espèce formée après illumination corresponde bien au complexe  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$  **56**<sub>TAP</sub>.

La raison de cette photo-réaction intéressante, mise en évidence dans le cadre de ce travail, reste encore difficile à déterminer. Une première piste de réponse peut être amenée par le travail effectué par Nouri-Nigjeh *et al.* qui ont observé la dé-éthylation d'un composé par électrochimie (schéma 3.2).[49]

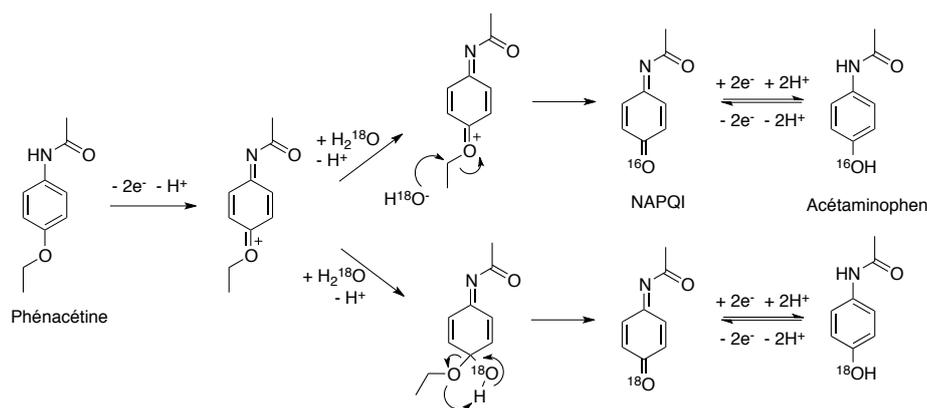


Schéma. 3.2. Formation électrochimique de l'acétaminophen à partir de la phénacétine à potentiel variable.

[49]

Dans ce travail, la phénacétine subit une déalkylation par oxydation, les espèces intermédiaires peuvent alors être transformées en acétaminophen avec l'intervention d'eau suivie d'une réduction. La réaction n'est pas observée à potentiel fixe mais à potentiel variable. Il est possible d'imaginer dans notre cas que la transition ILCT pourrait être responsable de cette dé-éthylation. En effet, le transfert d'un électron de l'acridine vers la phénazine pourrait correspondre à une oxydation de la partie acridinique du ligand.

### Paramètres influençant la réaction

Comme le montre la figure 3.35, les cinétiques (établies à partir des spectres d'émission intégrés) sont extrêmement rapides dans l'acétonitrile avec l'établissement d'un plateau après environ 40 minutes d'illumination. Elles sont moins rapides dans l'eau.

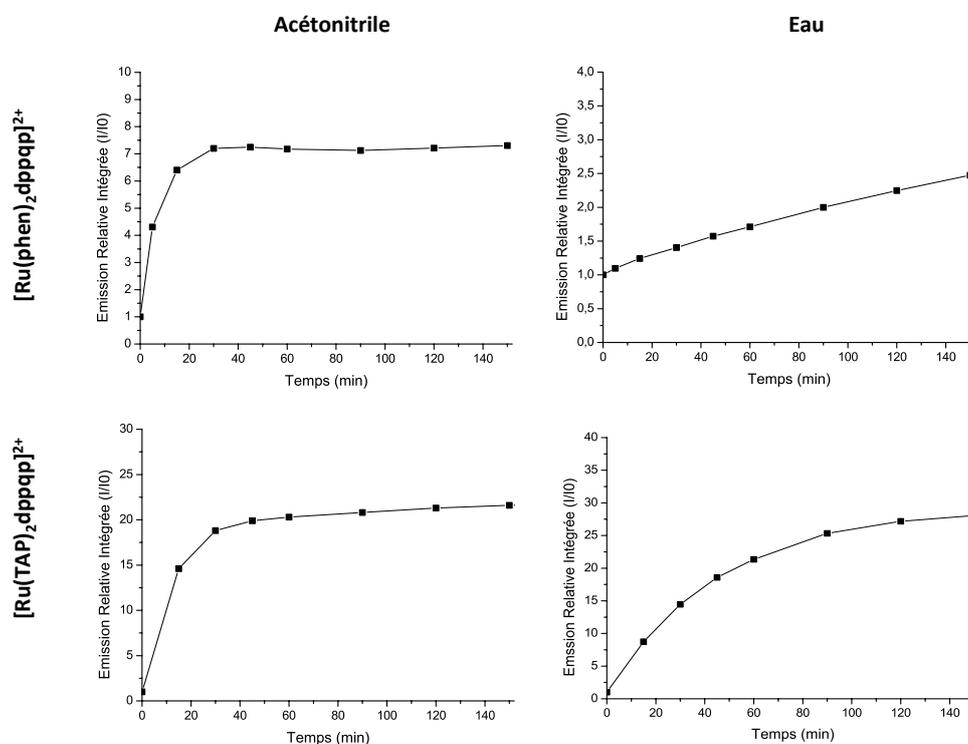


Fig. 3.35. Cinétiques de photo-réaction en fonction du temps d'illumination de  $[Ru(L)_2dppqp]^{2+}$  **30** dans l'eau et dans l'acétonitrile ( $\sim 2 \times 10^{-5} M$ ), sous air, à 25 °C.

Nous nous sommes également assurés qu'il s'agit bien d'une instabilité due à l'exposition à la lumière et non à la solubilisation des composés dans les différents solvants. Pour cela, la même expérience a été réalisée pour le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30**<sub>TAP</sub> dans l'acétonitrile, cette fois-ci dans le noir (Figure 3.36) :

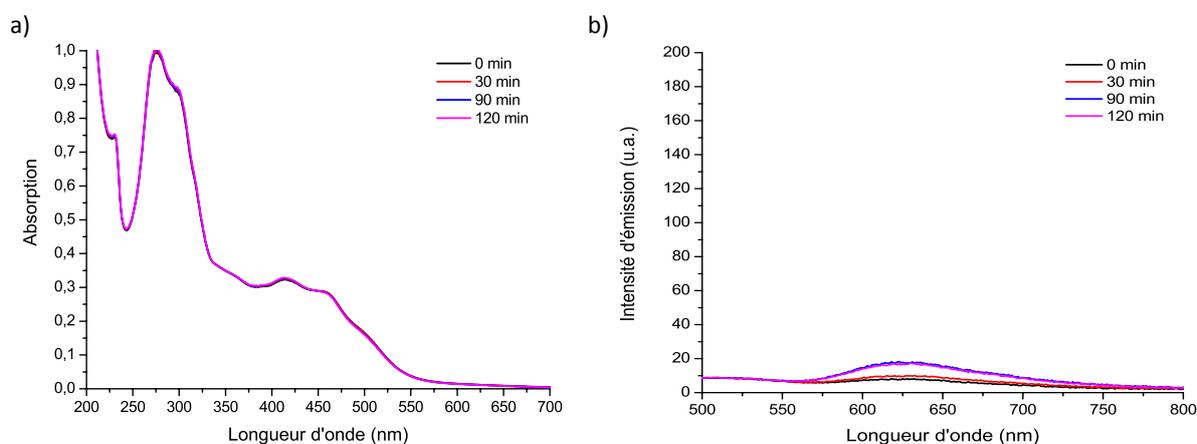


Fig. 3.36. Evolution au cours du temps sans illumination (dans le noir) des spectres d'absorption et d'émission de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}].2\text{PF}_6$  **30**<sub>TAP</sub> dans l'acétonitrile ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M), sous air, à 25 °C.

Comme on le voit dans la figure 3.36, aucun changement significatif dans les spectres d'absorption et d'émission n'est observé quand l'expérience est réalisée dans le noir. Il s'agit donc bien d'un effet dû à la lumière.

Comme nous l'avons vu plus haut, cette photo-réaction se fait probablement en deux étapes, où la seconde étape correspondrait à un processus d'oxydation ; nous avons dès lors voulu évaluer l'effet de la présence de l'oxygène en solution sur cette photoréaction. Les mêmes expériences d'illumination ont donc été réalisées sous bullage constant d'un flux d'argon. Les résultats sous air et sous argon sont comparés dans les figures 3.37 et 3.38.

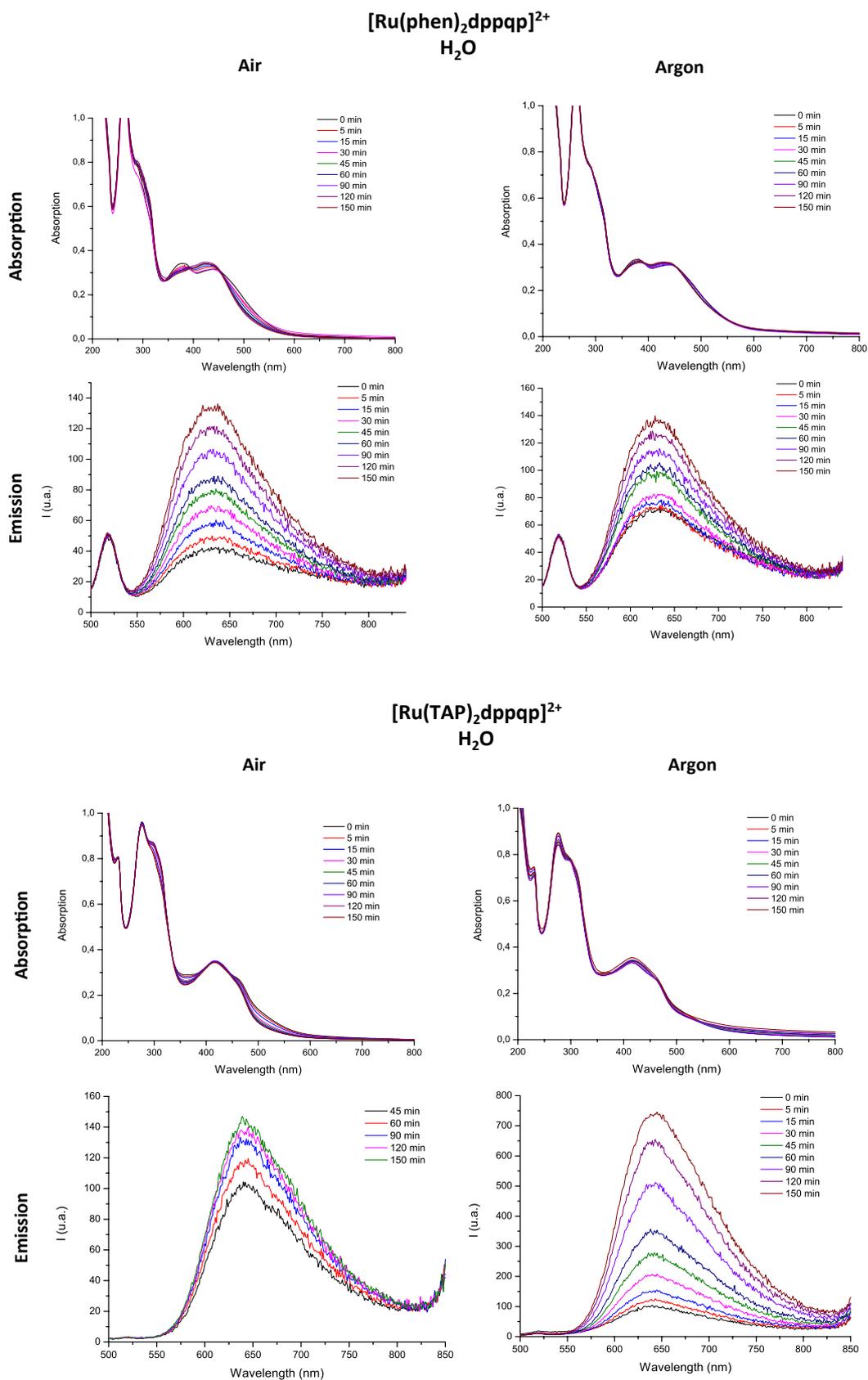


Fig. 3.37. Spectres d'absorption et d'émission dans l'eau de [Ru(L)<sub>2</sub>dppqp].2Cl 30 (~ 2x10<sup>-5</sup> M), sous air et sous argon, à 25 °C, en fonction du temps d'illumination de la solution.

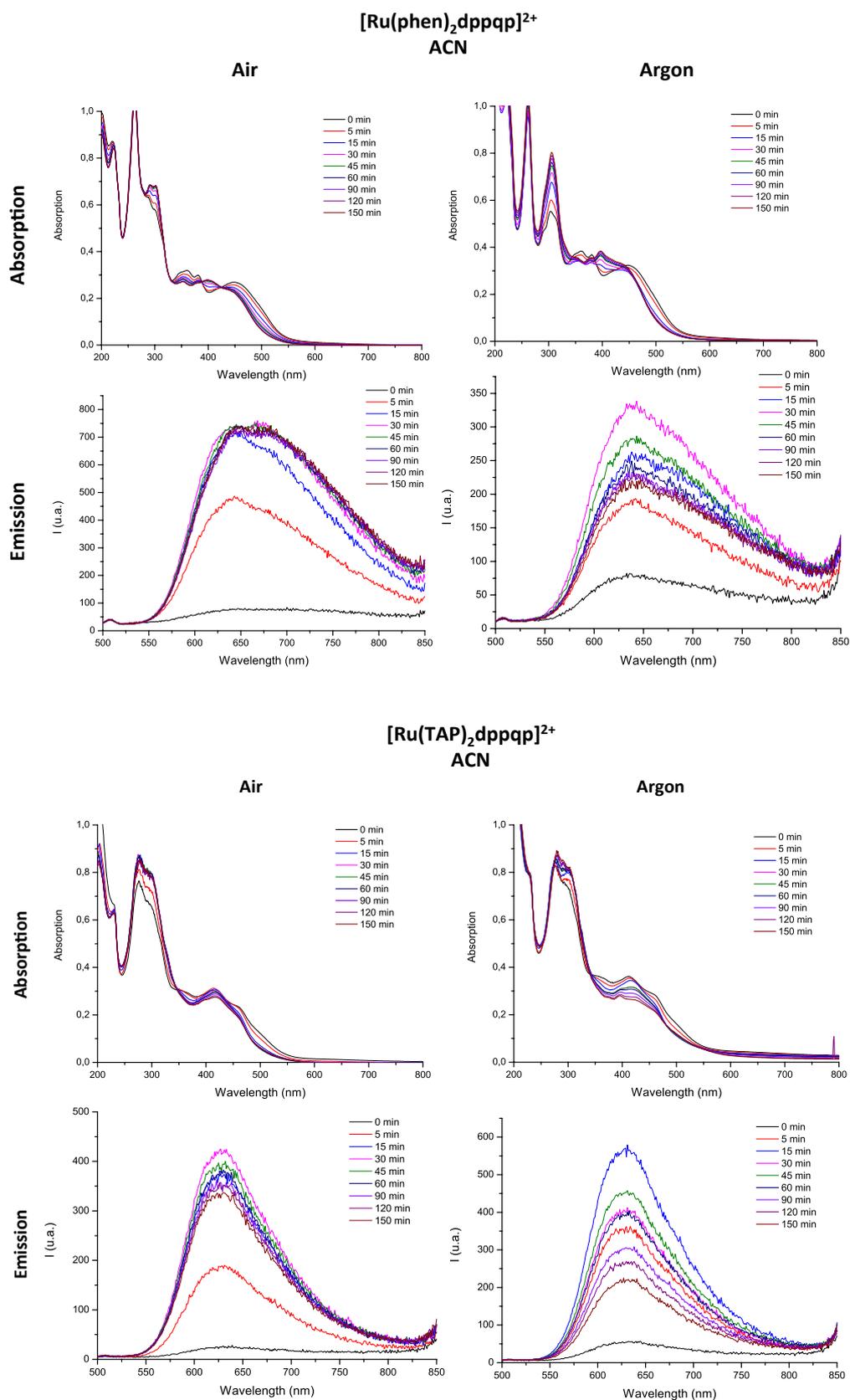


Fig. 3.38. Spectres d'absorption et d'émission dans l'acétonitrile de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]\cdot 2\text{PF}_6$  **30** ( $\sim 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), sous air et sous argon, à 25 °C, en fonction du temps d'illumination de la solution.

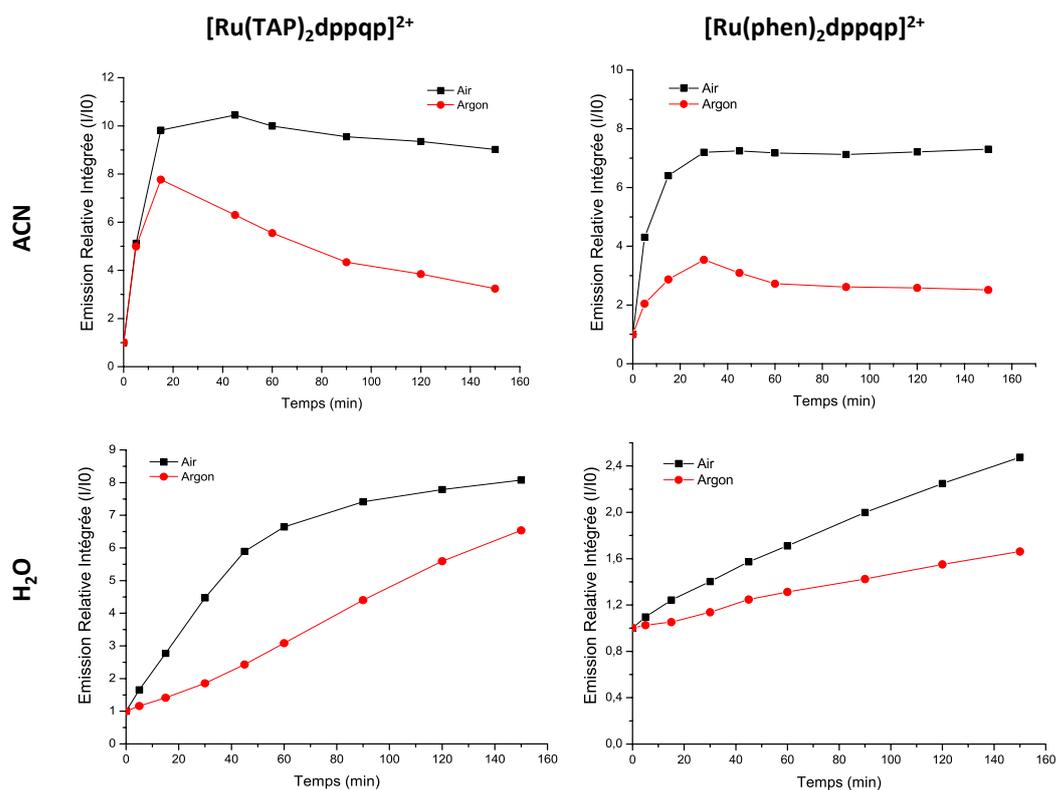


Fig. 3.39. Cinétiques de photo-réaction dans l'eau et l'acétonitrile en fonction du temps d'illumination de  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30** ( $\sim 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), sous air et sous argon, à 25 °C.

Dans l'eau, que ce soit pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30<sub>phen</sub>** ou le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30<sub>TAP</sub>**, l'atmosphère inerte sous argon semble ralentir la photo-réaction. En effet, les spectres d'absorption varient moins sous argon que sous air et les cinétiques de  $I/I_0$  présentent une pente moins forte (Figure 3.39). Le complexe  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30<sub>TAP</sub>** n'atteint d'ailleurs pas de plateau sous argon après 150 minutes d'illumination alors qu'on commence à l'atteindre sous air.

Les choses se compliquent néanmoins dans l'acétonitrile. De grands changements, plus importants sous argon que sous air, sont observés en absorption et en émission. Les spectres d'absorption sont d'ailleurs différents après le même temps d'illumination sous air et sous argon, avec l'apparition d'un maximum vers 400 nm dans le spectre du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30<sub>phen</sub>** sous argon et une forte diminution de la bande centrée à 440 nm dans celui du  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30<sub>TAP</sub>**. Si l'on regarde l'émission des solutions illuminées dans l'acétonitrile sous air et sous argon (Figure 3.38), on constate qu'un plateau est atteint dans les deux cas, mais avec une intensité d'émission atteinte plus élevée sous air, ce qui est en accord avec le fait qu'on génère plus de complexe oxydé (davantage émissif) sous air que sous argon.

Il serait intéressant d'effectuer la même expérience dans des solvants totalement dégazés puisqu'il est vraisemblable que le bullage seul ne permette pas d'éliminer tout l'oxygène dissout. De même, la réaction semble dépendre de la nature du solvant et il serait, pas conséquent intéressant de réaliser l'expérience dans différents solvants.

## Conclusion

En regroupant toutes ces données, nous avons pu déterminer qu'il existait un mécanisme de dé-éthylation, dépendant du solvant et de la concentration en oxygène, à l'état excité du complexe  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30**, qui permettrait de former le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$  **56**. Cette réaction est tout à fait inhabituelle et n'a, à notre connaissance, jamais été observée pour des complexes de ruthénium<sup>II</sup>. De plus, l'espèce formée est extrêmement luminescente par rapport au complexe de départ ; il est donc envisageable d'exploiter cette propriété pour des applications en milieu biologique.

Des calculs théoriques sont en cours afin de pouvoir rationaliser ce comportement tout à fait inattendu de la part de ces complexes. Deux questions sont posées : pourquoi ce complexe uniquement subit de tels changements dans la structure du ligand ? Quel est le mécanisme d'une telle réaction ? Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre cette réaction. Signalons néanmoins que des travaux précédents menés sur la réactivité du tétracycle pyrido[2,3,4-*kl*]acridine ont montré que lors de la réaction de dé-éthylation catalysée par le CAN, le composé hydroxylé correspondant n'est pas observé car celui-ci s'oxyde spontanément à l'air.[50] Ce tétracycle se comporte comme un système quinonique, avec une réactivité chimique très différente de celle des acridines diversement substituées. Un équilibre d'oxydo-réduction similaire est donc très probablement impliqué avec les complexes.

Comme cela a été montré dans ce chapitre, le comportement photophysique de plusieurs complexes de ruthénium<sup>II</sup> a été étudié. La majorité des complexes étudiés sont peu luminescents et les hypothèses avancées pour expliquer ce comportement sont la présence d'une transition ILCT ou MLCT dont la luminescence serait « quenchée » par transfert de proton intramoléculaire.

Deux de ces complexes, dont la structure ne permet pas d'avoir un tel transfert de proton photo-induit, sont, quant à eux, luminescents et ont été étudiés en vue de leur application en présence de biomolécules. Plus particulièrement, l'effet « light switch » observé pour le complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39**<sub>phen</sub> sera discuté dans le chapitre suivant.

## Bibliographie

- [1] J. V. Caspar and T. J. Meyer, "Photochemistry of  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . Solvent Effects," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 105, pp. 5583–5590, 1983.
- [2] B. Durham, J. V. Caspar, J. K. Nagel, and T. J. Meyer, "Photochemistry of  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 104, no. 2, pp. 4803–4810, 1982.
- [3] A. Juris, V. Balzani, F. Barigelletti, S. Campagna, P. Belser, and A. von Zelewsky, "Ru(II) polypyridine complexes: photophysics, photochemistry, electrochemistry, and chemiluminescence," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 84, pp. 85–277, 1988.
- [4] T. J. Meyer, "Photochemistry of metal coordination complexes : metal to ligand charge transfer excited states," *Pure Appl. Chem.*, vol. 58, no. 9, pp. 1193–1206, 1986.
- [5] L. Herman, S. Ghosh, E. Defrancq, and A. Kirsch De Mesmaeker, "Ru(II) complexes and light: Molecular tools for biomolecules," *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 21, no. 7–8, pp. 670–681, 2008.
- [6] A. Masschelein, L. Jacquet, A. Kirsch-De Mesmaeker, and J. Nasielski, "Ruthenium Complexes with 1,4,5,8-Tetraazaphenanthrene. Unusual Photophysical Behavior of the Tris-Homoleptic Compound," *Inorg. Chem.*, vol. 29, no. 4, pp. 855–860, 1990.
- [7] J. G. Vos and J. M. Kelly, "Ruthenium polypyridyl chemistry; from basic research to applications and back again.," *Dalton Trans.*, no. 41, pp. 4869–4883, 2006.
- [8] S. Rau, D. Walther, and J. G. Vos, "Inspired by nature: light driven organometallic catalysis by heterooligonuclear Ru(II) complexes.," *Dalton Trans.*, no. 9, pp. 915–919, 2007.
- [9] J. N. Clifford, E. Palomares, K. Nazeeruddin, M. Grtzel, J. R. Durrant, and M. Gra, "Dye Dependent Regeneration Dynamics in Dye Sensitized Nanocrystalline Solar Cells : Evidence for the Formation of a Ruthenium Bipyridyl Cation/Iodide Intermediate," *Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 17, pp. 6561–6567, 2007.
- [10] M. Grätzel, "Solar energy conversion by dye-sensitized photovoltaic cells.," *Inorg. Chem.*, vol. 44, no. 20, pp. 6841–51, 2005.
- [11] F. Puntoriero, F. Nastasi, M. Cavazzini, S. Quici, and S. Campagna, "Coupling synthetic antenna and electron donor species: A tetranuclear mixed-metal Os(II)-Ru(II) dendrimer containing six phenothiazine donor subunits at the periphery," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 251, no. 3–4, pp. 536–545, 2007.
- [12] M. Falkenström, O. Johansson, and L. Hammarström, "Light-induced charge separation in ruthenium based triads - New variations on an old theme," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 360, no. 3, pp. 741–750, 2007.
- [13] M. K. Brennaman, J. H. Alstrum-Acevedo, C. N. Fleming, P. Jang, T. J. Meyer, and J. M. Papanikolas, "Turning the  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  Light-Switch On and Off with Temperature," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 50, pp. 15094–15098, 2002.
- [14] M. K. Brennaman, T. J. Meyer, and J. M. Papanikolas, " $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$  Light-Switch Mechanism in Protic Solvents as Studied through Temperature-Dependent Lifetime Measurements," *J. Phys. Chem. A*, vol. 108, no. 45, pp. 9938–9944, 2004.
- [15] A. E. Friedman, J.-C. Chambron, J. Sauvage, N. J. Turro, and J. K. Barton, "Molecular 'Light Switch' for DNA:  $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})^{2+}$ ," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 112, no. 11, pp. 4960–4962, 1990.
- [16] I. Ortmans, B. Elias, J. M. Kelly, C. Moucheron, and A. Kirsch-DeMesmaeker, " $[\text{Ru}(\text{TAP})_2(\text{dppz})]^{2+}$ : a DNA intercalating complex, which luminesces strongly in water and undergoes photo-induced proton-coupled electron transfer with guanosine-5'-monophosphate.," *Dalton Trans.*, no. 4, pp. 668–676, 2004.
- [17] J. M. Kelly, A. B. Tossi, D. J. McConnell, and C. OhUigin, "A study of the interaction of some polypyridylruthenium(II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation," *Nucleic Acids Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 6017–6034, 1985.
- [18] J. M. Kelly, D. J. McConell, C. OhUigin, A. B. Tossi, A. Kirsch-De Mesmaeker, A. Masschelein, and J. Nasielski, "Ruthenium polypyridyl complexes; Their interaction with DNA and their role as sensitizers for its photocleavage," *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, pp. 1821–1823, 1987.
- [19] J.-P. Lecomte, A. Kirsch-De Mesmaeker, J. M. Kelly, A. B. Tossi, and H. Görner, "Photo-Induced

- Electron Transfer From Tetraazaphenanthrene: Model for Photosensitized DNA Oxidation,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 55, no. 5, pp. 681–689, 1992.
- [20] B. Elias, C. Creely, G. W. Doorley, M. M. Feeney, C. Moucheron, A. Kirsch-DeMesmaeker, J. Dyer, D. C. Grills, M. W. George, P. Matousek, A. W. Parker, M. Towrie, and J. M. Kelly, “Photooxidation of guanine by a ruthenium dipyrrophenazine complex intercalated in a double-stranded polynucleotide monitored directly by picosecond visible and infrared transient absorption spectroscopy,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 14, no. 1, pp. 369–375, 2008.
- [21] E. Gicquel, A. Boisdenghien, E. Defrancq, C. Moucheron, and A. Kirsch-De Mesmaeker, “Adduct formation by photo-induced electron transfer between photo-oxidising Ru(II) complexes and tryptophan,” *Chem. Commun.*, vol. 1, no. 23, pp. 2764–2765, 2004.
- [22] L. Bouffier, M. Demeunynck, P. Dumy, C. Moucheron, and A. Kirsch-De Mesmaeker, “Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[3,2-j]phenazine (dpqp-OH) - Synthesis, characterization and DNA interaction of the corresponding Ru(II) complex,” *Inorganica Chim. Acta*, vol. 360, no. 10, pp. 3162–3168, 2007.
- [23] C. Moucheron and A. Kirsch-De Mesmaeker, “New DNA-binding ruthenium (II) complexes as photo-reagents for mononucleotides and DNA,” *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 11, pp. 577–583, 1998.
- [24] L. Troian-Gautier, Thèse de doctorat: *Synthèse et étude de nouveaux complexes de ruthénium(II) à base de ligands polyazaaromatiques étendus en vue d'applications dans le domaine de l'opto-électronique*. Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, 2014.
- [25] S. Verma, P. Kar, and H. Nath, “Photophysical properties of ligand localized excited state in ruthenium (II) polypyridyl complexes : a combined effect of electron donor – acceptor ligand,” *Dalton Trans.*, vol. 40, pp. 9765–9773, 2011.
- [26] F. Nastasi, F. Loiseau, S. Campagna, E. A. Medlycott, M. Santoni, and G. S. Hanan, “Synthesis and photophysical properties of naphthyl-, phenanthryl- and pyrenyl-appended bis(pyridyl)triazine ligands and their Zn (II) and Ru(II) complexes,” *Can. J. Chem.*, vol. 87, pp. 254–263, 2009.
- [27] E. A. Medlycott and G. S. Hanan, “Ru (II) and Zn (II) complexes of multicomponent ligands incorporating triazine-based tridentate ligands,” *Inorg. Chem. Commun.*, vol. 10, pp. 229–233, 2007.
- [28] C. Goze, C. Leiggener, S. Liu, L. Sanguinet, E. Levillain, A. Hauser, and S. Decurtins, “Fused Donor–Acceptor Ligands in Ru(II) Chemistry: Synthesis, Electrochemistry and Spectroscopy of [Ru(bpy)<sub>3-n</sub>(TTF-dppz)<sub>n</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>,” *ChemPhysChem*, vol. 8, pp. 1504–1512, 2007.
- [29] R. Dinica, F. Charmantray, M. Demeunynck, and P. Dumy, “Regioselective synthesis of angular nitrogen polyheterocycles : dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phenazines,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 43, pp. 7883–7885, 2002.
- [30] T. Pedzinski, B. Marciniak, and G. L. Hug, “Quenching of the excited singlet state of acridine and 10-methylacridinium cation by thio-organic compounds in aqueous solution,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 150, pp. 21–30, 2002.
- [31] Y. Hagiwara, T. Hasegawa, A. Shoji, M. Kuwahara, H. Ozaki, and H. Sawai, “Acridone-tagged DNA as a new probe for DNA detection by fluorescence resonance energy transfer and for mismatch DNA recognition,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 16, pp. 7013–7020, 2008.
- [32] Y. Maegawa, N. Mizoshita, T. Tani, and S. Inagaki, “Transparent and visible-light harvesting acridone-bridged mesostructured organosilica film,” *J. Mater. Chem.*, vol. 20, pp. 4399–4403, 2010.
- [33] E. H. White, D. F. Roswell, A. C. Dupont, and A. A. Wilson, “Chemiluminescence Involving Acidic and Ambident Ion Light Emitters. The Chemiluminescence of the 9-acridinepercarboxylate Anion,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 109, no. 4, pp. 5189–5196, 1987.
- [34] O. S. Wolfbeis, C. Huber, and S. G. Schulman, “Phototautomeric Equilibrium in the Lowest Excited Singlet State of 3-Hydroxyacridone,” *J. Phys. Chem. A*, vol. 104, pp. 3900–3904, 2000.
- [35] G. T. Ruiz, M. P. Juliarena, R. O. Lezna, M. R. Feliz, and G. Ferraudi, “On the parallel formation of long-lived excited states of A contrast between the electrochemically and photochemically induced reduction of dpqp,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 179, pp. 289–297, 2006.
- [36] B. K. Sharma, A. M. Shaikh, N. Agarwal, and R. M. Kamble, “Synthesis, photophysical and electrochemical studies of acridone-amine based donor–acceptors for hole transport materials,” *RSC Adv.*, vol. 6, pp. 17129–17137, 2016.

- [37] N. E. Tokel-takvoryan, R. E. Hemingway, and A. J. Bard, "Electrochemical and Electrogenerated Chemiluminescence Studies of Ruthenium Chelates," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 95, pp. 6582–6589, 1973.
- [38] C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, and S. Choua, "Photophysics of Ru (phen)<sub>2</sub>(PHEHAT)<sup>2+</sup>: A Novel 'Light Switch' for DNA and Photo-oxidant for Mononucleotides," *Inorg. Chem.*, vol. 36, pp. 584–592, 1997.
- [39] R. B. Nair, B. M. Cullum, and C. J. Murphy, "Optical Properties of [Ru(phen)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup> as a Function of Nonaqueous Environment," *Inorg. Chem.*, vol. 36, no. 6, pp. 962–965, 1997.
- [40] D. C. Goldstein, Y. Y. Cheng, T. W. Schmidt, M. Bhadbhade, and P. Thordarson, "Photophysical properties of a new series of water soluble iridium bisterpyridine complexes functionalised at the 4' position," *Dalton Trans.*, vol. 40, no. 9, p. 2053, 2011.
- [41] J. Zhao, S. Ji, Y. Chen, H. Guo, and P. Yang, "Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT): from principal photophysics to the development of new chromophores and applications in fluorescent molecular probes and luminescent materials.," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, no. 25, pp. 8803–17, 2012.
- [42] Y. Li, Q. Zhu, B. An, H. Yuan, X. Guo, and J. Zhang, "Theoretical insights into excited-state intramolecular proton transfer in 1,8-dihydroxydibenzo[*a,h*]phenazine," *Mol. Phys.*, vol. 8976, pp. 1–10, 2016.
- [43] J. Piechowska, K. Virkki, B. Sadowski, H. Lemmetyinen, N. V Tkachenko, and D. T. Gryko, "Excited State Intramolecular Proton Transfer in  $\pi$ -Expanded Phenazine-Derived Phenols," *J. Phys. Chem. A*, vol. 118, no. 1, pp. 144–151, 2014.
- [44] V. Vetokhina, J. Nowacki, M. Pietrzak, M. F. Rode, A. L. Sobolewski, J. Waluk, and J. Herbich, "7-Hydroxyquinoline-8-carbaldehydes. Ground- and Excited-State Long-Range Prototropic Tautomerization," *J. Phys. Chem. A*, vol. 117, pp. 9127–9146, 2013.
- [45] M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, "Photosensitized singlet oxygen and its applications," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 234, pp. 351–371, 2002.
- [46] A. A. Rosenkranz, D. A. Jans, and A. S. Sobolev, "Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 78, no. 4, pp. 452–464, 2000.
- [47] L. B. Josefsen and R. W. Boyle, "Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers," *Met. Based. Drugs*, vol. 2008, pp. 1–23, 2008.
- [48] B. Wolf, S. Berman, and S. Hanlon, "Structural transitions of calf thymus DNA in concentrated LiCl solutions.," *Biochemistry*, vol. 16, no. 16, pp. 3655–62, 1977.
- [49] E. Nouri-Nigjeh, H. P. Permentier, R. Bischoff, and A. P. Bruins, "Electrochemical Oxidation by Square-Wave Potential Pulses in the Imitation of Oxidative Drug Metabolism," *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 14, pp. 5519–5525, Jul. 2011.
- [50] N. Fixler, M. Demeunynck, M. C. Brochier, J. Garcia, and J. Lhomme, "Regioselective addition of aniline to 8H-pyrido[2,3,4-*mn*]acridinone: Structure determination of the reaction product," *Magn. Reson. Chem.*, vol. 35, no. 10, pp. 697–700, 1997.

*Chapitre IV : Complexes de Ru<sup>II</sup> en  
interaction avec les G-quadruplexes*

# Complexes de Ru<sup>II</sup> en interaction avec les G-quadruplexes

## 1 Introduction

### 1.1 Les G4 - Structures particulières de l'ADN

La structure de l'ADN en double hélice, comme elle a été présentée par Watson et Crick en 1953,[1] est la vision la plus répandue aujourd'hui mais n'est pourtant pas l'unique existante. En effet, il est possible de rencontrer d'autres arrangements des bases de l'ADN dont les quadruplexes G4. La première indication de l'existence des G4 *in vitro* est apparue au début des années soixante.[2] Ces structures, d'abord considérées comme des curiosités scientifiques, font aujourd'hui l'objet d'une grande attention du point de vue de leur implication dans les mécanismes de régulation et d'expression des gènes *in vivo*, ce qui en ferait une cible de choix dans le cadre d'applications thérapeutiques. Il n'existe cependant que très peu de preuves de leur existence *in cellulo*, ce qui explique toute l'attention portée aux recherches sur les G4 actuellement. Les structures de G4 sont néanmoins étudiées depuis plusieurs années *in vitro* et ce premier point nous permettra de jeter les bases de ce qui est déjà connu sur ces structures si particulières de l'ADN.

Les quadruplexes G4 sont des structures organisées particulières d'ADN ou d'ARN qui peuvent apparaître dans des zones riches en guanines. Ils sont constitués d'un empilement d'au moins deux plateaux, appelés quartets, formés de quatre guanines interagissant entre elles par des liaisons H de type Hoogsteen (Figure 4.1).[3],[4]

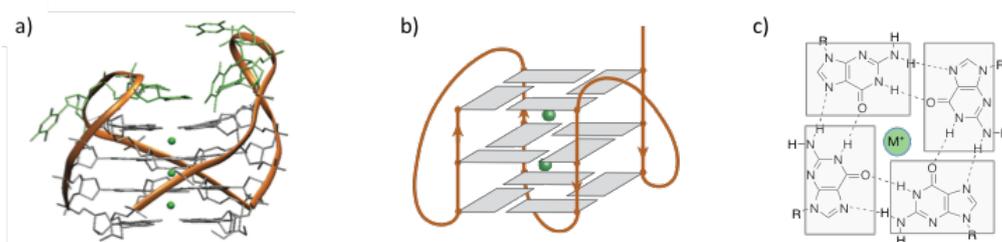


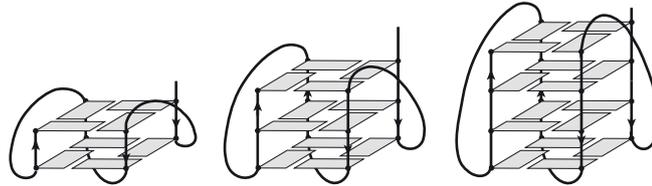
Fig. 4.1. a) Structure cristalline d'un G4 de séquence  $d(G_4T_3G_4)$  (code PDB : 2AVG),[3] b) structure schématisée d'un complexe G4, c) Structure d'un quartet de guanines.

Les quadruplexes G4 sont thermodynamiquement assez stables en conditions physiologiques, d'une part grâce à l'interaction par  $\pi$ -stacking entre les quartets (plus il y aura de plateaux, plus le quadruplexe sera stable) et, d'autre part, grâce à la présence d'ions métalliques (potassium ou sodium) au centre des quartets. En effet, il existe au sein des quartets une forte répulsion électrostatique causée par la forte densité de charge négative due à la présence des oxygènes en position 6 de chaque guanine. Cette densité de charge est alors contrebalancée par la présence d'une charge positive.[5]

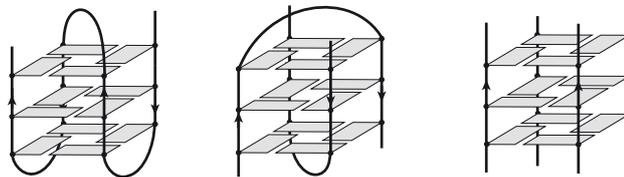
Ces structures sont donc thermodynamiquement stables. Bien que généralement plus résistantes à la dénaturation thermique que le duplex *in vitro*, il est vraisemblable que les deux formes (G4 et duplex) existent en équilibre dynamique dans les cellules, peut-être par l'intervention de protéines régulatrices de la formation de G4.[6]

Il existe une grande variété de quadruplexes G4 *in vitro* qui peuvent différer entre eux selon :[3], [7]

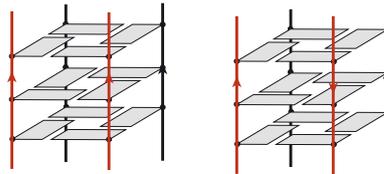
- Le nombre de quartet ;



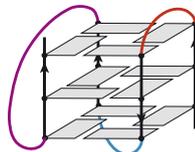
- Le nombre de brins qui les forment (variant de 1 à 4) ;



- L'orientation des brins (parallèles ou anti-parallèles) ;

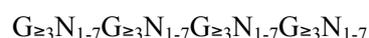


- La longueur (en nombre de bases) et le type de boucles (diagonale, latérale, « propeller »).



Le nombre de structures G4 possibles est donc extrêmement conséquent et il est même possible pour une même séquence d'adopter différentes conformations en fonction des conditions dans lesquelles elle se trouve. Il est donc vraisemblable que plusieurs de ces structures puissent être retrouvées dans le génome.

Une règle basée sur des études de stabilité du quadruplexe G4 a été proposée pour prédire de manière théorique la formation de structures G4 dans le génome (Putative Quadruplex Sequences – PQS). Cette règle stipule que les séquences de nucléotides pour lesquelles il est probable qu'une structure G4 unimoléculaire puisse se former doivent toutes posséder une signature commune : [8]



c'est à dire une courte séquence qui se répète successivement avec comme motif un minimum de trois guanines consécutives suivies de n'importe quelles autres bases (N) qui formeront les boucles du G4.

A partir d'études computationnelles qui suivent cette règle (ou des règles proches),[9] le nombre de sites du génome humain supposés pouvoir former des quadruplexes G4 est d'environ 375 000.[8],[9]

Une étude plus récente, n'utilisant pas d'approche bio-informatique mais une méthode de séquençage appelée G4-seq, développée par les auteurs, a révélé qu'il existerait plus de 700 000 PQS dans le génome humain.[10]

Plus qu'un nombre impressionnant de sites, la localisation de ces sites dans le génome est interpellante. En effet, en plus des télomères, certains oncogènes, et autres gènes liés au cancer et à l'expression génétique, possèdent une forte densité de sites de formation de G4.[10] Cette observation laisse à penser que les quadruplexes G4 jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes et pourraient donc être ciblés à des fins thérapeutiques.

## 1.2 Les G4 - Cibles thérapeutiques ? Quel rôle dans le génome ?

« *If G-quadruplexes form so readily in vitro, Nature will have found a way of using them in vivo* »

Aaron Klug

L'intérêt des quadruplexes G4 du point de vue thérapeutique ne peut être confirmé que si ces structures existent *in cellulo*. Les premières indications de leur existence dans les cellules ne sont apparues que récemment, rapportées par le groupe de Lipps pour l'ADN télomérique de ciliates par immunodétection[11] et études d'interaction avec des protéines chaperonnes,[12] le groupe de Maizels pour des bactéries par études de microscopie électronique[13] et le groupe de Balasubramanian pour des cellules humaines par immunodétection en 2013.[14] L'utilisation de petites molécules luminescentes, spécifiques aux G4, a également permis la visualisation de G4 en cellules fixées et ces molécules ont probablement le plus gros potentiel pour être utilisées comme sondes pour la visualisation des G4 dans les cellules vivantes.

Lipps *et al.* ont également montré la dépendance de la formation des quadruplexes G4 en fonction du cycle cellulaire, relevant ainsi leur probable implication dans des mécanismes de régulation génétique.[12], [15] De plus, il s'est avéré que de nombreuses protéines peuvent interagir avec les G4. Par conséquent, la formation et la déformation de ces structures dans les cellules pourraient être contrôlées par l'interaction avec ces protéines. En effet, au vu de leur stabilité *in vitro*, des mécanismes impliquant des protéines doivent exister *in vivo* pour déstructurer la forme G4 si nécessaire.[16]

Nous savons que le génome comprend probablement plus de 700 000 PQS, dont la densité est la plus grande au sein des télomères et des régions impliquées dans la régulation de l'expression des gènes. Les G4 sont des structures en équilibre dynamique avec la double hélice et la question principale est de comprendre quand, où et comment sont formés les G4 à partir d'une PQS.

La stabilisation et le contrôle de la formation des G4 sont d'abord apparus comme un avantage à exploiter du point de vue thérapeutique. En effet, la présence et la stabilisation de G4 ont montré avoir un effet inhibiteur sur l'activité de la télomérase, quand ils se trouvent dans les télomères, ainsi que sur l'expression de certains oncogènes, quand ils sont situés sur les régions promotrices de ces derniers.

Aujourd'hui, il semble certain que les G4 jouent un rôle dans les mécanismes de régulation de l'expression génétique des cellules. Malheureusement, il semble également qu'ils aient un impact négatif à cause de leur implication dans des mécanismes provoquant une instabilité génétique et certaines maladies associées. Il est donc difficile, à l'heure actuelle, de déterminer si l'existence des quadruplexes G4 a un effet global positif ou négatif dans le génome. L'étude *in cellulo* de ces structures devrait permettre de répondre à ces questions dans le futur.[17]

### 1.2.1 Les quadruplexes G4 dans les télomères

Les télomères correspondent à la région de l'ADN qui forme les extrémités des chromosomes et ont pour fonction de protéger le reste de l'ADN. Après chaque division cellulaire, la longueur des télomères est diminuée (Figure 4.2). Au bout d'un certain nombre de divisions, le télomère atteint une longueur limite et un mécanisme de mort cellulaire programmée (apoptose) est déclenché. Ce phénomène constitue une défense pour l'organisme qui permet d'éliminer des cellules ayant subi trop de cycles de divisions et, par conséquent, ayant accumulé un nombre trop important de mutations au sein du code génétique.[18]

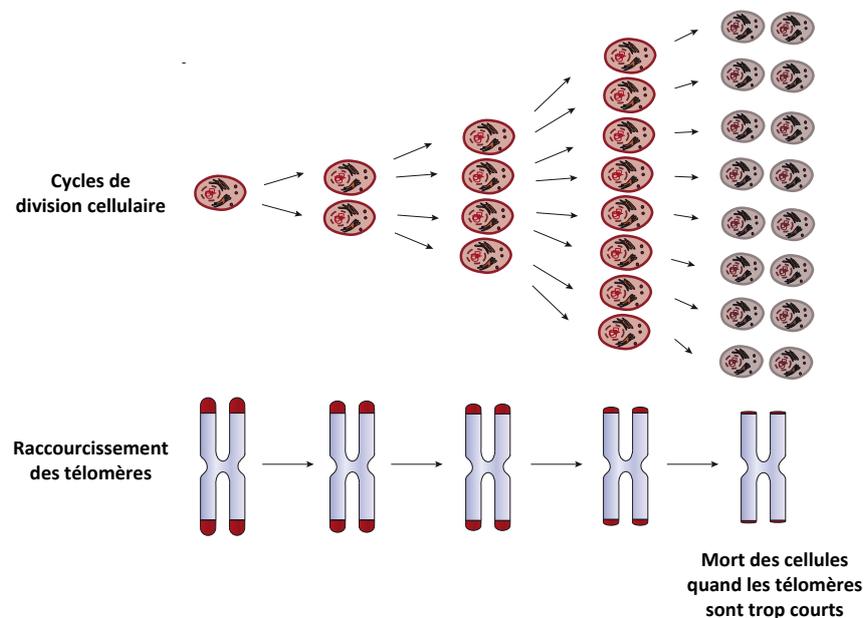


Fig. 4.2. Représentation schématique du raccourcissement des télomères au fil des divisions cellulaires.

Ce mécanisme est inhibé dans la majorité des cellules cancéreuses (Figure 4.3) puisqu'elles sont capables de sur-exprimer la télomérase, une protéine dont la fonction est de reconstruire les télomères après chaque division cellulaire.

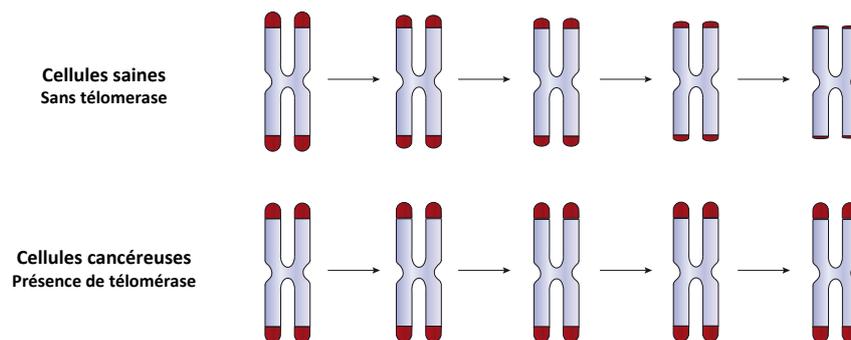


Fig. 4.3. Différences d'évolution des télomères au cours des cycles de réplication cellulaires entre des cellules saines et des cellules cancéreuses.

Ces cellules sont alors considérées comme « immortelles » puisqu'elles ont acquis la capacité de se diviser à l'infini.

L'ADN télomérique humain correspond à un unique brin dont la séquence est une répétition du motif AGGGTT. Il s'agit donc d'une région riche en guanines capables de former des structures G4 et qui, étonnamment, est conservée dans la majorité des cellules eukaryotes. La stabilisation des quadruplexes G4 dans les télomères par certaines molécules comme la télomestatine a permis d'y inhiber l'activité de la télomérase.[19] Il a donc été envisagé d'utiliser les quadruplexes G4 pour arrêter la progression des cancers dans le cadre d'une thérapie ciblée puisqu'il s'agirait d'inhiber un mécanisme tout à fait propre aux cellules cancéreuses.

Néanmoins, la stabilisation des quadruplexes G4 dans les télomères de cellules saines pourrait également avoir un impact négatif. En effet, une étude a permis de mettre en évidence l'activité de protéines capables de délier les quadruplexes G4 dans les télomères pour permettre la réplication correcte de ces derniers, c'est à dire, sans une perte trop importante de la séquence télomérique. L'ADN télomérique des cellules ne possédant pas ces protéines, n'est alors plus répliqué intégralement. Ce phénomène est aggravé avec l'ajout de TMPyP4, molécule stabilisatrice de quadruplexes G4. La perte accélérée des télomères résulte alors en un vieillissement prématuré des cellules.[20]

### 1.2.2 Les G4 impliqués dans l'expression des gènes

Les PQS sont présents dans 50% des régions promotrices de gènes. De manière intéressante, ils sont particulièrement représentés dans les régions promotrices d'oncogènes ou de gènes régulateurs. A l'inverse, ils sont très peu présents dans les promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur. Il est donc possible que la présence des G4 dans ces régions ait été défavorisée du point de vue évolutif.

L'effet régulateur des G4 dans le génome a été mis en évidence grâce à une étude sur la suppression de la transcription de l'oncogène c-MYC. Ainsi, une séquence particulière NHE III<sub>1</sub> située en amont de la région promotrice de c-MYC peut former une structure G4 sur le brin non codé. Il a été montré qu'une simple mutation sur ce brin, rendant la formation de quadruplexes G4 impossible, pouvait augmenter l'expression de c-MYC alors qu'à l'inverse, l'ajout de TMPyP4 (molécule connue pour stabiliser les G4) la diminuait. La preuve était faite que les G4 pouvaient être responsables de la

régulation de l'expression de certains gènes [21] et d'autres exemples sont ensuite venus le confirmer.[22], [23]

En plus de leur effet sur l'expression de l'ADN, la formation de G4 dans l'ARN peut également avoir un impact sur l'expression génétique puisque leur présence peut influencer, de manière assez variée, la traduction de certains ARN messagers. Par exemple, il a été montré que la protéine FMRP (« Fragile X Mental Retardation Protein »), qui n'est pas exprimée chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile, possède un site d'interaction spécifique à des structures G4 d'ARNm.[24] Il a été avancé que la reconnaissance des G4 sur une région non traduite d'ARNm par la protéine permettait d'inhiber leur traduction. Dans le cas où la protéine est déficiente, l'ARN est exprimé et cause le syndrome de l'X-fragile.[24]

Une étude plus récente sur l'effet de l'hélicase d'ARN eIF4A, surexprimée dans les cellules cancéreuses, a permis de mettre en évidence que les séquences ciblées par cette protéine sont des régions non traduites de l'ARN comportant un grand nombre de PQS.[25] La présence de eIF4A est indispensable pour que les ARNm dont les séquences non traduites correspondent à des PQS, puissent être exprimés. Ceci implique que eIF4A soit responsable de délier la structure G4 permettant ainsi à l'ARN d'être traduit. Sans l'intervention de eIF4A, les structures G4 empêchent la traduction de l'ARNm. Étonnamment, parmi les ARN dépendant de eIF4A, on retrouve de nombreux oncogènes et gènes régulateurs de transcription comme MYC, MYB, NOTCH, CDK6, BCL2,...[25]

De nombreux autres exemples ont permis de démontrer l'implication des G4 dans les mécanismes de régulation de l'expression génétique, aussi bien dans le génome que dans le transcriptome.[6], [26]–[29]

### 1.2.3 Instabilité génétique causée par les G4

Comme nous l'avons vu, de nombreuses protéines, principalement des hélicases, sont capables de reconnaître les quadruplexes G4 et ont probablement pour rôle dans la cellule de délier ces structures lors des processus de réplication et de transcription. En effet, les quadruplexes G4 sont susceptibles de se former à ces moments précis, c'est-à-dire quand l'ADN est en simple brin. Sans l'intervention de ces protéines, la progression des protéines spécialisées dans la transcription et la réplication est gênée et peut même être arrêtée. La non réplication complète des deux brins d'ADN mène à une instabilité génétique qui peut être dangereuse pour l'évolution de la cellule.

Il a été montré que des cellules déficientes en certaines de ces protéines peuvent subir une forte délétion de certains gènes dans les régions contenant des PQS. Le premier exemple a été donné par Cheung *et al.* qui ont montré que la perte de l'hélicase DOG-1 dans *Caenorhabditis elegans*, mène à la délétion de nombreux gènes particulièrement dans des sites riches en guanines.[30]

D'autres exemples ont été publiés dans la littérature avec des protéines comme FANCD1, RTEL1 et Pif1, XPB et XPD qui viennent confirmer ces hypothèses.[28],[31]–[35]

Rodriguez *et al.* ont également montré que l'incubation de la pyridostatine (molécule connue pour reconnaître et stabiliser les G4) dans des cellules cancéreuses induit la formation de sites de

dégradation de l'ADN. Il a de plus été démontré que ces sites correspondaient généralement à des régions riches en guanines. Bien que cela n'ait pas pu être clairement prouvé, il semble donc que la stabilisation des quadruplexes G4 par la pyridostatine puisse avoir un effet sur l'arrêt des processus de transcription et de réplication.[36]

### 1.3 Ligands de quadruplexes G4 et modes d'interaction

Un très gros domaine de recherche lié aux quadruplexes se focalise sur l'élaboration de nouvelles molécules capables d'interagir avec eux. Ces molécules, appelées ligands de G4, ont pour rôle de reconnaître et de stabiliser les G4. Dans un premier temps, elles pourront être utilisées comme outils moléculaires dans l'étude des G4 en milieu cellulaire et, ensuite, comme bases pour d'éventuelles applications thérapeutiques.

Plusieurs modes d'interaction de molécules avec un quadruplexe G4 ont été décrits (Figure 4.4) :[7]

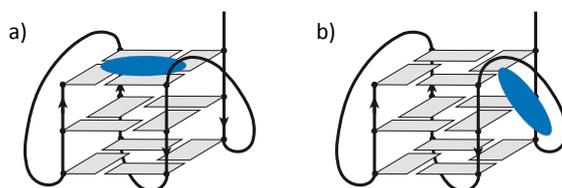


Fig. 4.4. Modes d'interaction a) par  $\pi$ -stacking, b) avec les sillons et les boucles.

La majorité des ligands de G4 interagissent par  $\pi$ -stacking avec les quartets extérieurs de la structure (Figure 4.4.a). Ces ligands possèdent généralement une très grande surface aromatique plane et peuvent être très sélectifs envers les quadruplexes par rapport aux duplexes. Ce type de sélectivité est extrêmement important et constitue donc un caractère indispensable d'un bon ligand de G4. Ces ligands ne peuvent cependant pas être sélectifs envers une structure de G4 en particulier puisque la tétrade est un caractère commun à tous les quadruplexes.

Parmi les ligands de ce type les plus connus, on peut citer la télomestatine, le TMPyP4, la phenDC3 ou encore la pyridostatine (Figure 4.5).

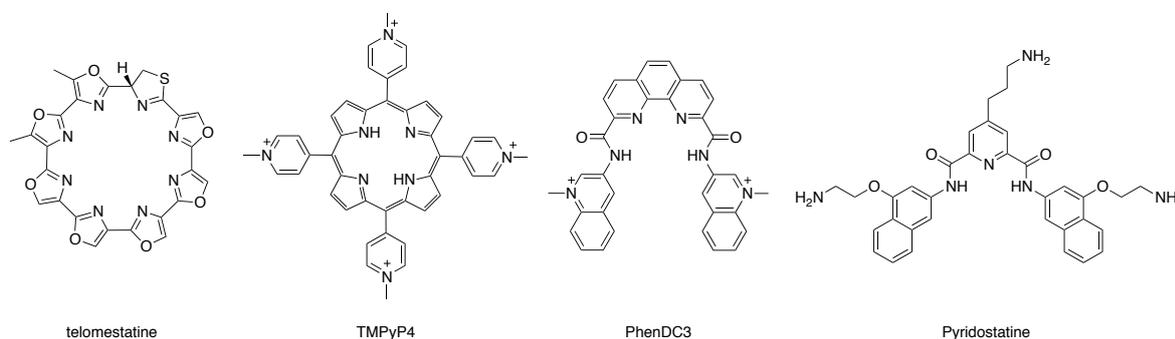


Fig. 4.5. Structures de ligands interagissant par  $\pi$ -stacking avec les G4.

Un deuxième mode d'interaction est possible via les boucles et les sillons des G4 (Figure 4.4.b). Il s'agit généralement d'interactions électrostatiques avec les phosphates de la chaîne. Les ligands

interagissant de cette manière sont d'ordinaire plus spécifiques envers un type particulier de G4 grâce à la diversité offerte par la longueur et la forme des boucles des G4. Il en existe peu mais la peimine et la peiminine en sont de bons exemples (Figure 4.6). [37]

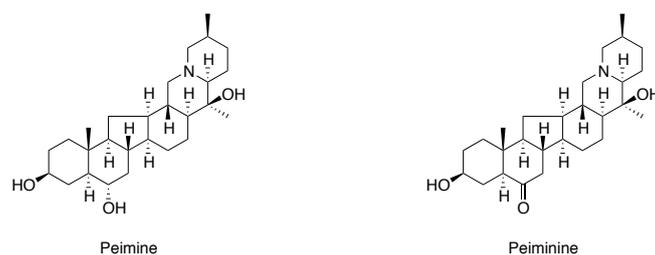


Fig. 4.6. Structure de ligands interagissant avec les boucles et les sillons de G4.

De manière générale, un mode d'interaction n'exclut pas l'autre et certains ligands, comme le TMPyP4, dont le mode d'interaction est principalement par  $\pi$ -stacking sur le quartet, interagissent également avec les sillons.

D'autres modes d'interaction peuvent exister mais sont néanmoins très peu observés. [7]

Comme nous l'avons vu, la visualisation des quadruplexes G4 à l'intérieur des cellules est un des défis actuels dans la compréhension des mécanismes de formation des G4 *in cellulo*. L'immunodétection par BG4 a fourni la première indication de leur existence dans les cellules humaines. Les anticorps sont néanmoins incapables de traverser la membrane cellulaire et l'étude n'a pu être réalisée que sur des cellules fixées dont la membrane a été perméabilisée. L'utilisation de plus petites molécules, capables de traverser la membrane cellulaire, est un choix approprié pour l'utilisation en tant qu'outil moléculaire pour la visualisation sur cellules vivantes. Ces molécules, en plus d'être sélectives envers les quadruplexes G4, doivent posséder des propriétés de luminescence utilisées pour la visualisation. En particulier, certains ligands voient leur intensité d'émission augmenter quand ils sont en interaction avec les quadruplexes G4.[38],[39] Le thiazole orange et ses analogues, [40] les carbazoles,[41] les porphyrines,[42] l'éthidium [43] et certains complexes métalliques, notamment certains complexes de ruthénium,[39],[44]–[48]... en constituent de bons exemples.

Récemment, une visualisation de quadruplexes G4 dans des cellules vivantes a pu être réalisée grâce à l'utilisation de la sonde « doublement intelligente » N-TASQ (Figure 4.7). Cette molécule est capable de reconnaître les quadruplexes G4 avec une très grande sélectivité grâce à une modification tridimensionnelle de sa structure induite par l'interaction avec la tétrade des G4. Cette modification entraîne également une augmentation de l'intensité de luminescence de la molécule.[49],[50]

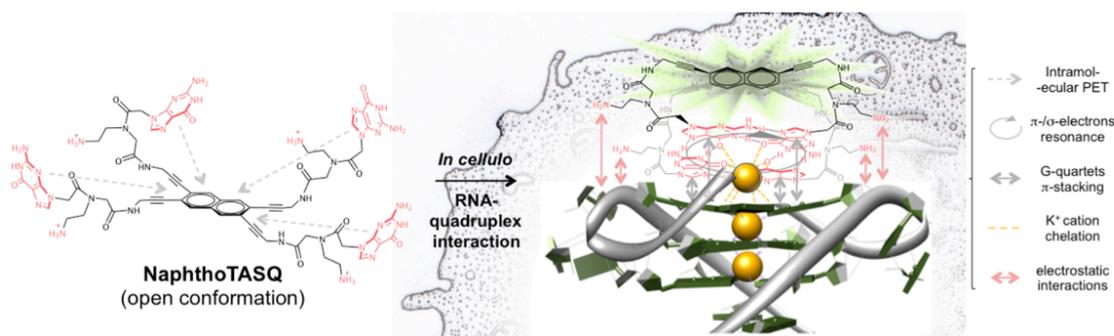


Fig. 4.7. Mode d'interaction de N-TASQ avec les G4 et augmentation de la luminescence en présence de ces derniers. [49]

## 2 Résultats et discussion

### 2.1 Etude de stabilisation des quadruplexes G4 par méthode de FRET-Melting

Après avoir synthétisé et examiné les propriétés photophysiques des complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> possédant les ligands dpqp et dppqp, nous avons évalué leurs propriétés d'interaction avec les quadruplexes G4. En effet, grâce à la présence d'un plan aromatique particulièrement étendu, nous supposons que ces complexes peuvent être de bons ligands de G4, trop grands pour interagir avec l'ADN mais suffisamment étendus pour interagir avec les quartets des G4. En plus d'une interaction par  $\pi$ -stacking, il est possible que les complexes, chargés positivement, puissent également interagir de manière électrostatique avec les boucles des G4. Des études de « FRET-melting » (« Fluorescence Resonance Energy Transfer ») ont donc été réalisées pour déterminer si les complexes possèdent une bonne affinité envers les quadruplexes G4, s'ils sont sélectifs envers les quadruplexes G4 et de quelle manière ils interagissent avec ceux-ci.

Toutes les études d'interaction par « FRET-melting » ont été menées dans le cadre d'un séjour à l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, sous la supervision du Dr. D. Monchaud.

#### 2.1.1 « FRET-melting » - Méthode

La méthode de « FRET-melting » est très largement utilisée dans les études d'interaction de ligands avec des quadruplexes G4 et repose sur la différence de stabilité thermique entre une structure G4 et cette même structure stabilisée par un ligand.

La température de dénaturation est mesurée grâce à l'intensité d'émission détectée au maximum d'émission de la FAM (Fluorescein phosphoramidite). Les oligonucléotides utilisés sont marqués par l'ajout, à chaque extrémité, de deux colorants organiques, la FAM et la TAMRA (5-Carboxytétraméthylrhodamine), représentées sur la figure 4.8.

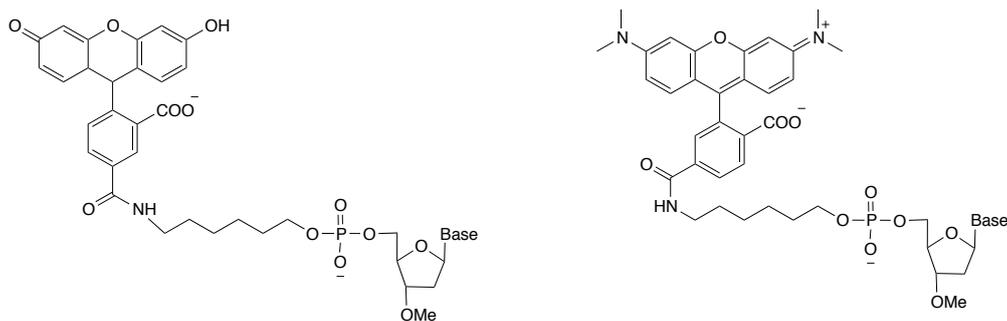


Fig. 4.8. Structures de la FAM (gauche) et de la TAMRA (droite).

Lorsque ces oligonucléotides ont une structure organisée (quadruplexe ou duplex), la FAM et la TAMRA sont proches dans l'espace. L'état excité de la FAM, après illumination, est alors désactivé par transfert d'énergie vers la TAMRA et on observe donc un « quenching » de la luminescence au maximum d'émission de la FAM. A l'inverse, lorsque l'oligonucléotide est dénaturé de manière thermique, les deux molécules sont éloignées et aucun transfert d'énergie n'est alors possible. On observe donc une augmentation de l'intensité de luminescence à 516 nm (Figure 4.9).

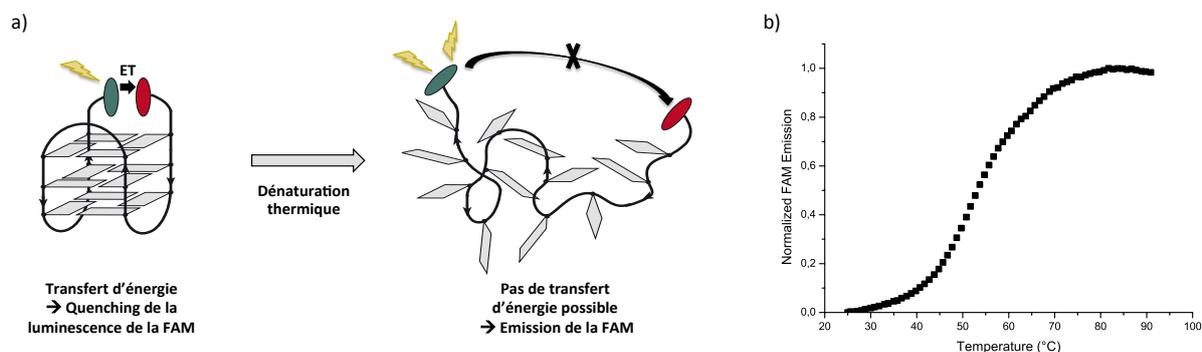


Fig. 4.9. Principe du test « FRET melting » a) dénaturation thermique causant une augmentation de l'intensité de luminescence de la FAM, b) Courbe sigmoïdale résultant de la détection de l'intensité de luminescence de la FAM au cours de la dénaturation thermique.

A l'ajout de ligand, le G4 peut être stabilisé et la température de dénaturation augmentée de telle sorte qu'il est possible de calculer la différence de température ( $\Delta T_{1/2}$ ) entre les structures stabilisée et non stabilisée (Figure 4.10).

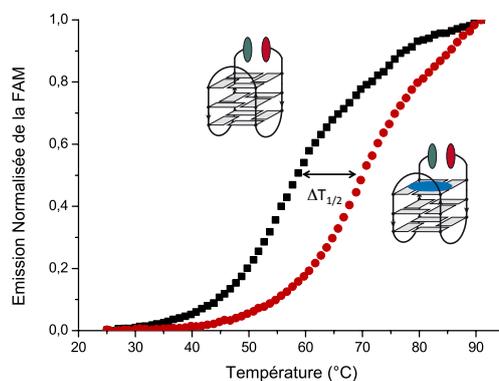


Fig. 4.10. Courbes de dénaturation thermique d'un quadruplexe G4 stabilisé et non stabilisé. Calcul de  $\Delta T_{1/2}$ .

Plus la différence de température de dénaturation est élevée, plus le ligand est capable de stabiliser la structure G4.

Une série de ligands connus et leurs valeurs de stabilisation thermique pour certains G4 sont représentées dans la figure 4.11 ci-dessous.

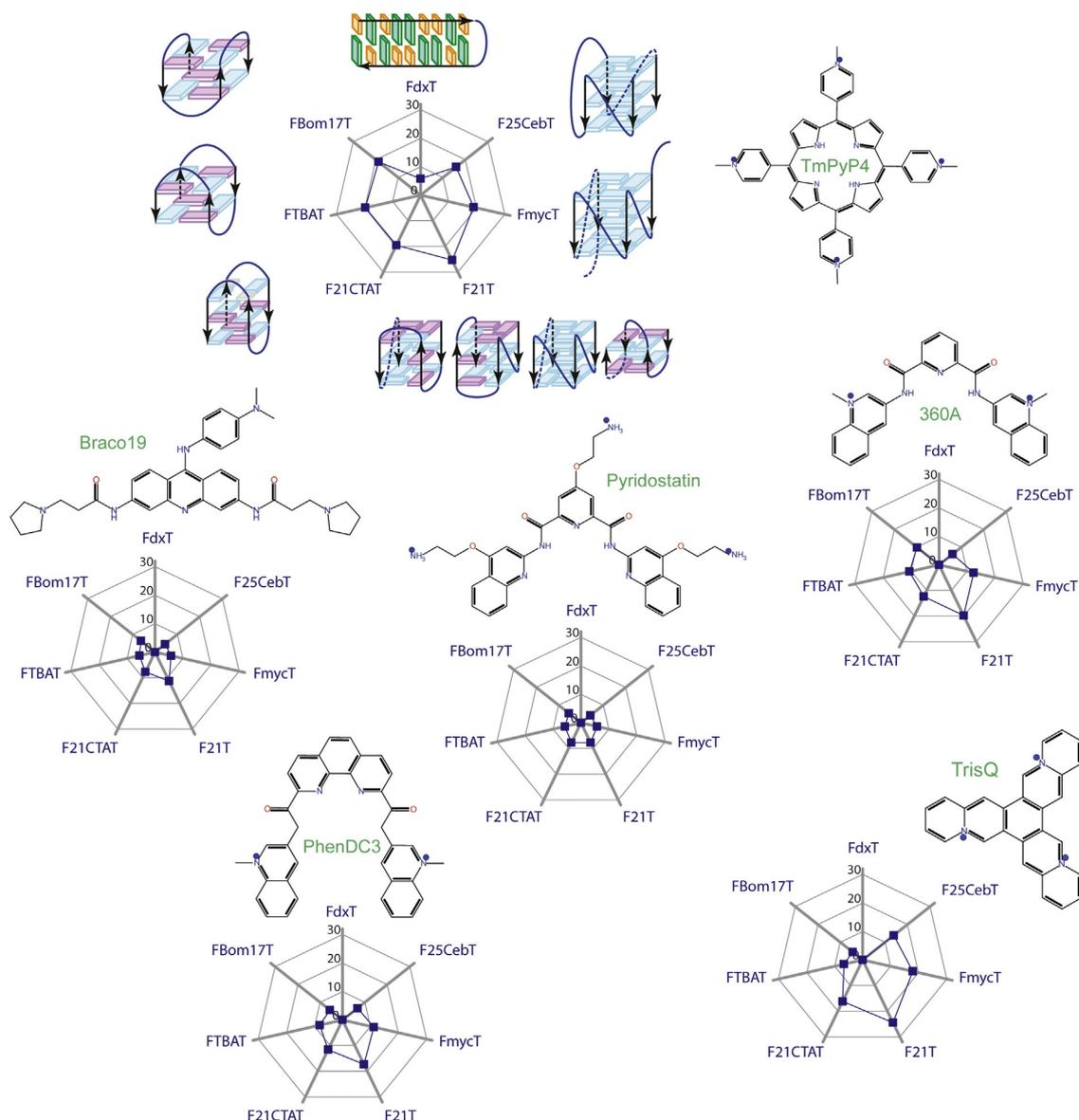


Fig. 4.11. Valeurs de stabilisation thermique  $\Delta T_{1/2}$  déterminées par « FRET melting » d'une série de ligands de G4 (TmPyP4, BRACO19, PhenDC3, Pyridostatin, 360A et TrisQ). [51]

Ces ligands peuvent stabiliser certaines structures avec un  $\Delta T_{1/2}$  d'un peu moins de 30 °C mais ne dépassent généralement pas les 20 °C.[51] Il est communément admis qu'un  $\Delta T_{1/2}$  de 10 °C ou plus correspond à une bonne affinité du ligand avec le G4.

## 2.1.2 Résultats

Les études d'interaction ont été réalisées sur les complexes en série phen et en série bpy (synthétisés par le Dr. Lefebvre à Grenoble). La bipyridine possède plus de flexibilité que la phénanthroline et certaines différences d'interaction avec les G4 peuvent être attendues.

Les complexes en série TAP n'ont pas été inclus à ce stade puisque nous ne nous attendions pas à de grands changements entre les complexes phen et TAP du point de vue de l'interaction avec les G4 et que des applications liées aux propriétés photochimiques des complexes seront réalisées ultérieurement. Le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29**<sub>TAP</sub> a tout de même été étudié pour être comparé avec ses équivalents phen et bpy.

Pour être solubles dans l'eau, les complexes ont été préparés avec des contre-ions chlorures. Pour faciliter la discussion, nous avons attribué des acronymes aux complexes (R pour ruthénium, P pour phen, T pour TAP, B pour bpy) précisant le type de ligand étendu comme indiqué dans la figure 4.12.

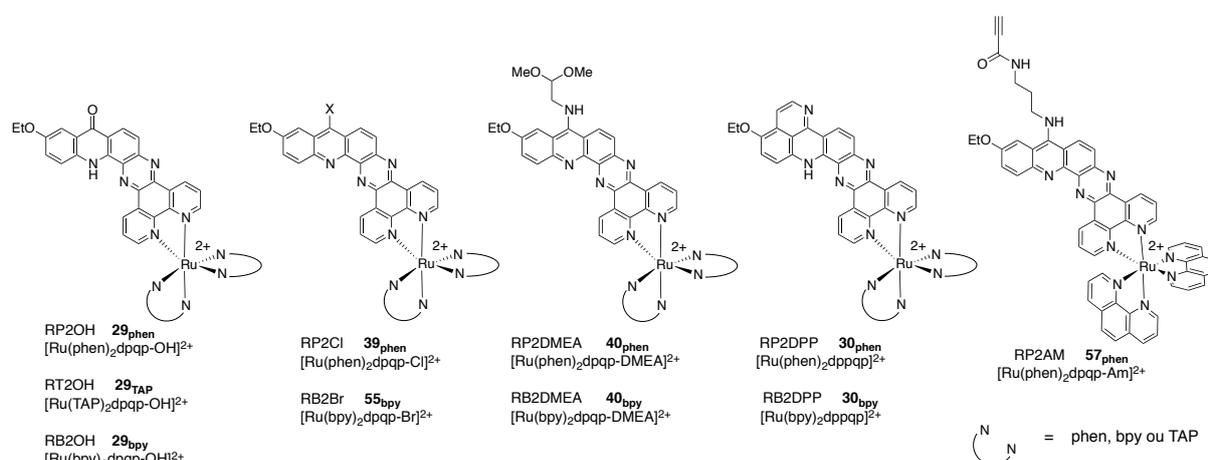


Fig. 4.12. Structure des complexes étudiés par « FRET Melting ».

Le dernier complexe, nommé  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Am}]^{2+}$  **57**<sub>phen</sub> (RP<sub>2</sub>Am), dont la synthèse sera décrite au chapitre suivant, a été fonctionnalisé par une triple liaison. Il sera possible d'envisager des réactions de « chimie click » avec ce complexe pour former des hétérodimères spécifiques aux quadruplexes G4. Ce dernier point sera également discuté dans le chapitre suivant.

Au cours de ce travail, cinq oligonucléotides de G4 marqués ont été utilisés, trois d'ADN: F21T (séquence présente dans les télomères humains), FmycT (région promotrice de l'oncogène myc), Fkit2T (région promotrice de l'oncogène kit) et deux d'ARN : FTERRAT (L'analogue ARN de F21T) et FTRF2T (région non traduite de l'ARNm du gène TRF2). Leurs séquences sont reprises dans le tableau 4.1 ci-dessous.

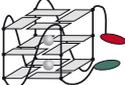
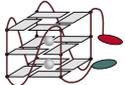
Nature	Nom	Séquence	Structure
ADN	F21T	FAM-d[ <sup>5'</sup> GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG <sup>3'</sup> ]-TAMRA	
	FmycT	FAM-d[ <sup>5'</sup> GAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAG <sup>3'</sup> ]-TAMRA	
	Fkit2T	FAM-d[ <sup>5'</sup> CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGG <sup>3'</sup> ]-TAMRA	
	FduplexT	FAM-d[ <sup>5'</sup> TATAGCTATATTTTTTATAGCTATA <sup>3'</sup> ]-TAMRA	
ARN	FTERRAT	FAM-r[ <sup>5'</sup> GGGUUAGGGUUAGGGUUAGGG <sup>3'</sup> ]-TAMRA	
	FTRF2T	FAM-r[ <sup>5'</sup> CGGGAGGGCGGGGAGGGC <sup>3'</sup> ]-TAMRA	

Tableau 4.1. Description des cinq quadruplexes G4 utilisés pour cette étude ainsi que de la séquence double hélice utilisée comme référence.

La première série d'expériences avait pour but de sélectionner les complexes pouvant stabiliser les quadruplexes G4, de déterminer s'il y a des différences significatives entre les différents complexes et si une préférence pour certains des G4 peut être observée.

Pour cela, les six oligonucléotides (cinq quadruplexes G4 et un duplex), à une concentration de 0,2  $\mu$ M dans un tampon cacodylate (pH 7,2), ont été mis en présence de 5 équivalents (1  $\mu$ M) de chacun des complexes cités ci-dessus. Les  $\Delta T_{1/2}$  ont été calculés à partir des courbes de dénaturation obtenues expérimentalement.

Deux représentations différentes seront utilisées pour illustrer et discuter ces résultats :

- Résultats par complexe (Figure 4.13).

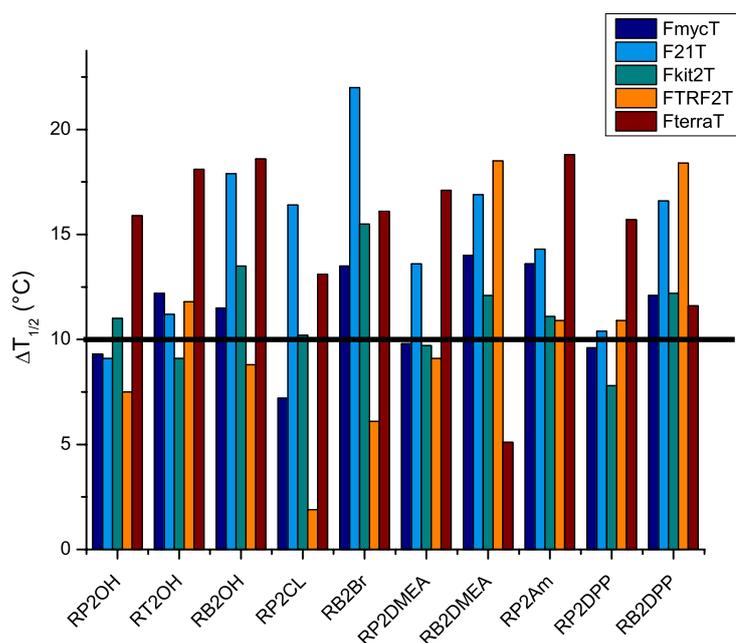


Fig. 4.13. Valeurs de stabilisation thermique mesurées par « FRET melting » (Groupement par complexe). Les mesures ont été réalisées à 0,2  $\mu\text{M}$  en quadruplexe G4 et 1  $\mu\text{M}$  en complexe dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de 10 mM KCl et 90 mM LiCl).

Tous les complexes stabilisent au moins un quadruplexe G4 avec un  $\Delta T_{1/2}$  supérieur à 10 °C. Ils sont donc tous considérés comme étant de bons ligands pour la stabilisation des quadruplexes G4. Aucun complexe ne se distingue particulièrement ; néanmoins, on constate que certains sont légèrement meilleurs que d'autres. Généralement, les complexes en série bpy stabilisent mieux les quadruplexes G4 que leurs homologues en série phen. Ceci pourrait s'expliquer par la meilleure flexibilité des ligands bpy, qui permet un plus grand degré de liberté à ces complexes pour interagir au mieux avec la surface du G4. Notons toutefois qu'à l'exception de F21T, le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}].2\text{Cl } \mathbf{29}_{\text{TAP}}$  (RT<sub>2</sub>OH), aussi rigide que le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}].2\text{Cl } \mathbf{29}_{\text{phen}}$  (RP<sub>2</sub>OH), stabilise autant les différents G4 que le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-OH}].2\text{Cl } \mathbf{29}_{\text{bpy}}$  (RB<sub>2</sub>OH). Des interactions supplémentaires par liaisons H avec les azotes non chélatés pourraient justifier ces comportements.

Le complexe  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } \mathbf{55}_{\text{bpy}}$  (RB<sub>2</sub>Br), bien que très mauvais pour la stabilisation de FTRF2T, possède le  $\Delta T_{1/2}$  le plus haut de tous quand il est en interaction avec F21T. Il stabilise également très bien FTERRAT, homologue de F21T, et les autres ADN G4.

Le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppqp}].2\text{Cl } \mathbf{30}_{\text{bpy}}$  (RB<sub>2</sub>DPP) et le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Am}].2\text{Cl } \mathbf{57}$  (RP<sub>2</sub>Am) semblent être les meilleurs candidats en termes d'affinité puisqu'ils stabilisent tous les G4 avec un  $\Delta T_{1/2}$  supérieur à 10 °C. Viennent ensuite les complexes  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}].2\text{Cl } \mathbf{30}_{\text{phen}}$  (RP<sub>2</sub>DPP),  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } \mathbf{55}_{\text{bpy}}$ ,  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-DMEA}].2\text{Cl } \mathbf{40}_{\text{phen}}$  (RP<sub>2</sub>DMEA) et  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-DMEA}].2\text{Cl } \mathbf{40}_{\text{bpy}}$  (RB<sub>2</sub>DMEA).

Les complexes **29** possédant le ligand dpqp-OH ne sont pas particulièrement bons pour l'interaction avec les G4. Ceci est étonnant puisque nous avons pu montrer que ces complexes ont la plus forte tendance à s'empiler entre eux par  $\pi$ -stacking.

- **Résultats par G4 (Figure 4.14).**

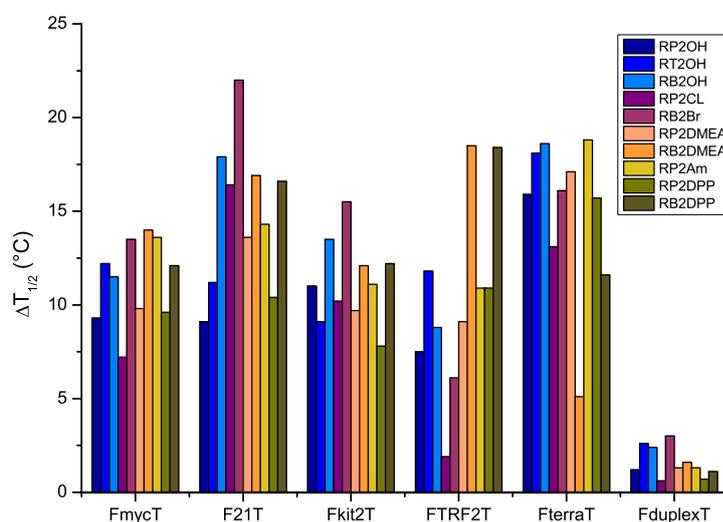


Fig. 4.14. Valeurs de stabilisation thermique mesurées par « FRET melting » (Groupement par G4). Les mesures ont été réalisées à 0,2  $\mu$ M en quadruplexe G4 et 1  $\mu$ M en complexe dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de 10 mM KCl et 90 mM LiCl).

Cette représentation permet de visualiser si un type de quadruplexe est mieux stabilisé que les autres. Aucune différence significative entre les structures n'est observée, ceci suggère que les complexes ne sont pas spécifiques à certains quadruplexes G4. Néanmoins, on constate que F21T et FTERRAT sont légèrement mieux stabilisés que les autres. Rappelons que ces deux oligonucléotides sont homologues (ADN-ARN) et que, par conséquent, les complexes peuvent avoir une légère préférence pour ces structures de G4.

Les résultats avec FduplexT, rajoutés sur cette représentation, permettent de comparer la sélectivité des complexes envers les G4 par rapport à l'ADN en double hélice. Les complexes stabilisent clairement mieux les quadruplexes G4 (FmycT, F21T, Fkit2T, FTERRAT et FTRF2T) que le FduplexT, suggérant qu'ils possèdent une meilleure affinité pour l'ADN sous sa forme G4 qu'en double hélice. Ces résultats doivent néanmoins être considérés avec précaution puisque le duplex utilisé ici est un oligonucléotide synthétique possédant peu de sites d'interaction par  $\pi$ -stacking et une large boucle (Tableau 4.1) avec laquelle les complexes sont capables d'interagir de manière électrostatique pouvant éventuellement déstabiliser la structure en double hélice.

Afin d'évaluer au mieux la sélectivité des complexes envers les G4, une étude de sélectivité compétitive a été réalisée avec un ADN double brin de 26 paires de bases ne comportant pas de boucle, nommé ds26 (Figure 4.15).



Séquence brins 1 et 2 :  
 $d[{}^5\text{CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG}^3]$

Fig. 4.15. Structure et séquence de l'oligonucléotide ds26.

Cette étude a été réalisée pour tous les complexes, en ajoutant 15 et 50 équivalents (en motif) de ds26 à un milieu comportant FmycT (choisi arbitrairement) et un des complexes (Figure 4.16). Il est à noter que le nombre de charges négatives portées par le ds26 est plus important que pour le G4 (environ deux fois plus). Les complexes étant chargés positivement, la sélectivité envers les quadruplexes G4 pourrait être impactée négativement par cette différence de charge.

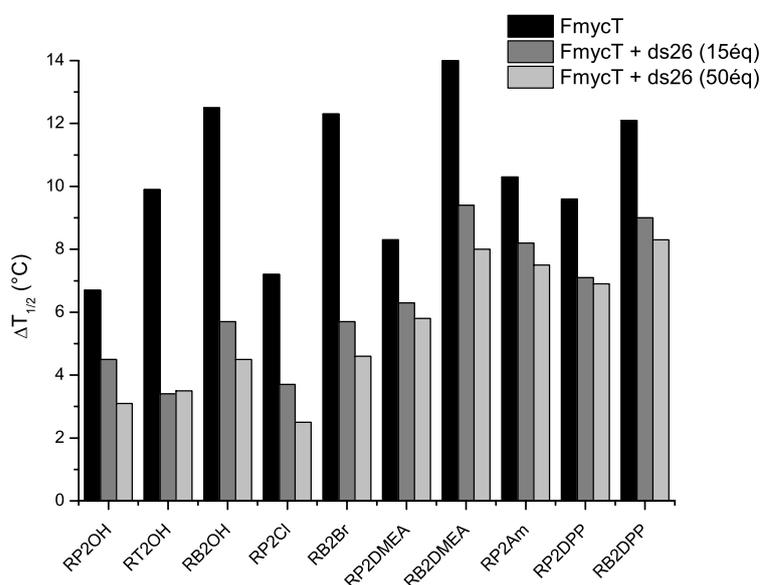


Fig. 4.16. Valeurs de stabilisation thermique pour une étude de sélectivité compétitive mesurée par « FRET melting ». Les mesures sont réalisées à 0,2  $\mu\text{M}$  en FmycT, 1  $\mu\text{M}$  en complexe et 3 et 10  $\mu\text{M}$  en ds26 dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de 10 mM KCl et 90 mM LiCl).

La chute de  $\Delta T_{1/2}$  correspond à une moins bonne stabilisation du G4 à l'ajout de ds26. En règle générale, à 50 équivalents de ds26, les valeurs de  $\Delta T_{1/2}$  valent 35% du  $\Delta T_{1/2}$  sans ds26 pour les moins sélectifs et de 70% pour les plus sélectifs.

Ces profils de sélectivité compétitive sont comparés à certains ligands de G4 connus, d'abord avec le TMPyP4 qui stabilise de manière très efficace les G4 mais est par contre peu sélectif envers ces derniers, puis avec des ligands très sélectifs comme le DOTASQ (Figure 4.17) et la phenDC3 (Figure 4.11).

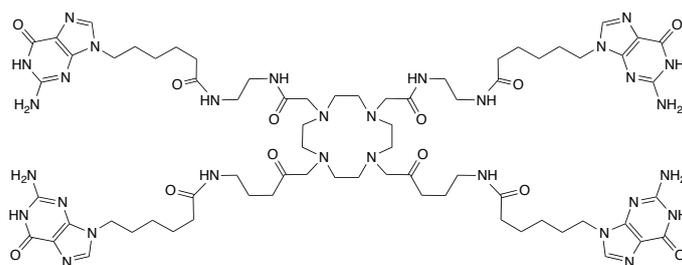


Fig. 4.17. Structure en conformation ouverte de DOTASQ.

Les complexes sont assez bons du point de vue de leur sélectivité si on compare ces résultats avec les données de la littérature concernant TMPyP4. Ils le sont également par rapport à d'autres analogues de TMPyP4 (TEGPy et Pd.TEGPy) qui sont, eux, plus sélectifs envers les G4 (Figure 4.18).

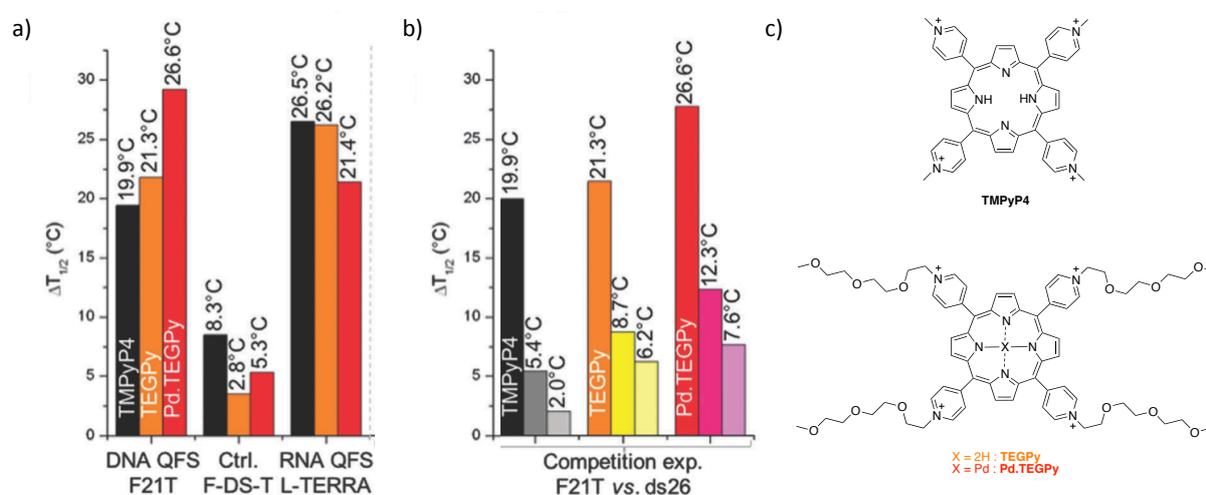


Fig. 4.18. a) Valeurs de stabilisation thermique de F21T, F-DS-T et L-TERRA à l'ajout de PMPyP4, TEGPy et Pd.TEGPy ; b) Etudes de sélectivité compétitive pour F21T à l'ajout de ds26. Les mesures sont réalisées à 0,2 mM en FmycT, 1 mM en complexe et 0,5 et 10 mM en ds26 dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (10 mM KCl/90 mM LiCl (F21T, F-DS-T) ou 1 mM KCl/99 mM LiCl (L-TERRA)) ; c) Structures de PMPyP4, TEGPy et Pd.TEGPy. [52]

En effet, les  $\Delta T_{1/2}$  de TMPyP4, TEGPy (analogue au TMPyP4) et Pd.TEGPy (TEGPy comportant un Pd au centre de la porphyrine) sont très élevés ( $> 20$  °C) mais décroissent rapidement à l'ajout de ds26. Ainsi, à 50 équivalents de ds26, les valeurs de  $\Delta T_{1/2}$  sont respectivement à 10, 29 et 28% de la valeur sans ds26.[52]

Les valeurs obtenues pour les plus sélectifs de nos complexes sont plus faibles mais comparables à celles obtenues pour le sélectif DOTASQ avec F21T pour lequel on observe des  $\Delta T_{1/2}$  valant 83% et 74% du  $\Delta T_{1/2}$  initial à 15 et 50 équivalents respectivement.[53] Elles paraissent cependant nettement moins intéressantes si on les compare au très sélectif phenDC3 pour lequel les valeurs de  $\Delta T_{1/2}$  sont de 94% et 88% du  $\Delta T_{1/2}$  initial dans les mêmes conditions.[54]

Les complexes possèdent donc une bonne sélectivité envers les quadruplexes G4 et certains complexes sont plus sélectifs que d'autres. Les complexes possédant les ligands dpqp-OH et les ligands halogénés sont les moins sélectifs.

Comme cela a été décrit par Bouffier *et al.*[55], le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}].2\text{Cl } \mathbf{29}_{\text{phen}}$  ( $\text{RP}_2\text{OH}$ ) possède une affinité particulièrement bonne avec l'ADN double brin (comparable à celle rapportée pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ , page 9, chapitre I). Il est donc attendu que la sélectivité envers les G4 ne soit pas excellente. Le résultat est un peu plus étonnant pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } \mathbf{39}_{\text{phen}}$  ( $\text{RP}_2\text{Cl}$ ) dont la constante d'interaction, calculée dans le chapitre précédent, est 100 fois inférieure à celle du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}].2\text{Cl } \mathbf{29}_{\text{phen}}$ . Il est peu probable que la mesure soit faussée par l'effet « light-switch ON » du complexe. En effet, l'émission est détectée à 516 nm (maximum d'émission de la fluorescéine) or la bande d'émission du complexe ne commence qu'à 550 nm. Il est donc difficile d'expliquer la moins bonne sélectivité du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } \mathbf{39}_{\text{phen}}$  ( $\text{RP}_2\text{Cl}$ ) et du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } \mathbf{55}_{\text{bpy}}$  ( $\text{RP}_2\text{Br}$ ) par rapport à celle des autres complexes.

Les propriétés « light-switch » de ces complexes halogénés ont néanmoins été évaluées et ces mesures sont décrites dans le point suivant. Le complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } \mathbf{55}_{\text{bpy}}$  n'a pas encore été étudié en présence de quadruplexe G4. Au vu de ses propriétés photophysiques similaires à celles du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } \mathbf{39}_{\text{phen}}$  (chapitre III), il semble néanmoins qu'il puisse, à terme, remplacer ce dernier.

Les derniers complexes de la série, le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-DMEA}].2\text{Cl } \mathbf{40}_{\text{phen}}$ , le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Am}].2\text{Cl } \mathbf{57}_{\text{phen}}$ , le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}].2\text{Cl } \mathbf{30}_{\text{phen}}$  et le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppqp}].2\text{Cl } \mathbf{30}_{\text{bpy}}$  semblent être les plus sélectifs envers les G4. Ces complexes portent un ligand heptacyclique avec une chaîne aminée ou un ligand octacyclique plus étendu. En effet, pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}].2\text{Cl } \mathbf{30}_{\text{phen}}$  et le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppqp}].2\text{Cl } \mathbf{30}_{\text{bpy}}$ , à l'ajout de 15 équivalents de ds26, la valeur du  $\Delta T_{1/2}$  vaut 74% de la valeur sans ds26. Le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Am}].2\text{Cl } \mathbf{57}_{\text{phen}}$  est également très sélectif puisqu'il est lui à 80% de la valeur initiale à 15 équivalents de ds26 et 73% à 50 équivalents.

On remarque également qu'à l'inverse des conclusions tirées lors des études d'affinité, il semble que les complexes en série phen soient plus sélectifs que les analogues en série bpy. L'évolution des valeurs de  $\Delta T_{1/2}$  en présence de duplex est reprise dans le tableau 4.2 ci-dessous pour exprimer cette tendance ( $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } \mathbf{39}_{\text{phen}}$  et  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } \mathbf{55}_{\text{bpy}}$  ne sont pas tout à fait comparables, néanmoins, la tendance est respectée) :

Complexe	$\Delta T_{1/2}$ (%)	$\Delta T_{1/2}$ (%)	$\Delta T_{1/2}$ (%)
	FmycT	FmycT + 15 éq. ds26	FmycT + 50 éq. ds26
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-DMEA].2Cl ( <b>40</b> <sub>phen</sub> )	100	76	70
[Ru(bpy) <sub>2</sub> dpqp-DMEA].2Cl ( <b>40</b> <sub>bpy</sub> )	100	67	57
[Ru(phen) <sub>2</sub> dppqp].2Cl ( <b>30</b> <sub>phen</sub> )	100	74	72
[Ru(bpy) <sub>2</sub> dppqp].2Cl ( <b>30</b> <sub>bpy</sub> )	100	74	68
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-Cl].2Cl ( <b>39</b> <sub>phen</sub> )	100	51	35
[Ru(bpy) <sub>2</sub> dpqp-Br].2Cl ( <b>55</b> <sub>bpy</sub> )	100	46	37
[Ru(phen) <sub>2</sub> dpqp-OH].2Cl ( <b>29</b> <sub>phen</sub> )	100	67	46
[Ru(bpy) <sub>2</sub> dpqp-OH].2Cl ( <b>29</b> <sub>bpy</sub> )	100	45	36

Tableau 4.2. Diminution des valeurs de  $\Delta T_{1/2}$  (en pourcent) à l'ajout de 15 et 50 équivalents de ds26.

En regroupant l'ensemble des résultats d'affinité et de sélectivité, deux complexes possèdent les meilleurs potentiels en tant que ligands de quadruplexes G4. Ces complexes sont le [Ru(phen)<sub>2</sub>dpqp-Am].2Cl **57**<sub>phen</sub> (déjà discuté plus haut) et le [Ru(bpy)<sub>2</sub>dppqp].2Cl **30**<sub>bpy</sub>. Pour ces deux composés, des expériences de sélectivité compétitive envers tous les autres G4 ont dès lors été réalisées (Figure 4.19).

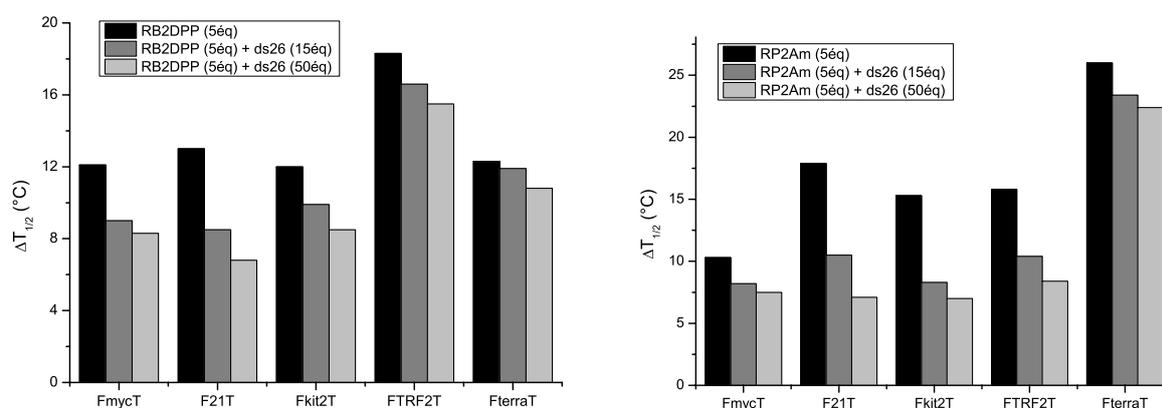


Fig. 4.19. Valeurs de stabilisation thermique pour une étude de sélectivité compétitive mesurée par « FRET melting ». Les mesures sont réalisées à 0,2  $\mu$ M en quadruplexe G4, 1  $\mu$ M en complexe ([Ru(bpy)<sub>2</sub>dppqp].2Cl **30**<sub>bpy</sub> ou [Ru(phen)<sub>2</sub>dpqp-Am].2Cl **57**<sub>phen</sub>) et 3 et 10  $\mu$ M en ds26 dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de 10 mM KCl et 90 mM LiCl).

Le [Ru(phen)<sub>2</sub>dpqp-Am].2Cl **57**<sub>phen</sub> est très sélectif pour FmycT et FtterraT mais moins pour les autres G4.

Le [Ru(bpy)<sub>2</sub>dppqp].2Cl **30**<sub>bpy</sub> semble quant à lui être très sélectif envers tous les quadruplexes G4 (un peu moins pour F21T). Cette expérience tend à confirmer que l'ajout d'un cycle supplémentaire sur le ligand permet d'améliorer la sélectivité envers les quadruplexes G4. En effet, la tétrade possède un site d'interaction nettement plus large que la double hélice, un ligand encombré devrait donc interagir nettement moins bien avec l'ADN double brin qu'avec un quadruplexe G4. Au vu de ces résultats, il

serait donc également intéressant d'évaluer la sélectivité de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}].2\text{Cl}$  **30**<sub>phen</sub>. Ce complexe possède une affinité raisonnable envers les quadruplexes G4 et une très bonne sélectivité pour FmycT. Si on considère que les séries phen sont plus sélectives que les homologues en série bpy, ce complexe pourrait s'avérer particulièrement bon du point de vue de la sélectivité pour les autres quadruplexes G4.

Une dernière expérience a été réalisée en vue de fournir une indication sur le type d'interaction que possèdent ces complexes avec les quadruplexes G4 (sur la tétrade ou avec les boucles). Pour cela, de la même manière qu'avec ds26, FmycT a été placé en compétition avec TG5T (Figure 4.20), un quadruplexe G4 formé de 4 brins et qui ne possède donc pas de boucle.

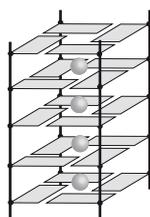


Fig.4.20. Structure schématisée de TG5T.

Généralement, les ligands qui interagissent avec les quadruplexes G4 par  $\pi$ -stacking avec la tétrade sont nettement plus enclins à interagir avec le TG5T puisque ce dernier ne possède pas de boucle pouvant gêner l'interaction. On observe alors une chute de  $\Delta T_{1/2}$  en « FRET melting » à l'ajout de TG5T.

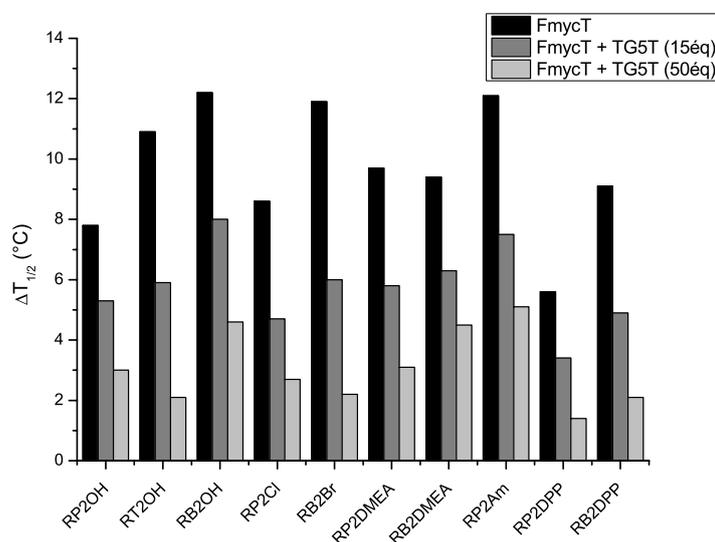


Fig. 4.21. Valeurs de stabilisation thermique pour une étude de sélectivité compétitive entre FmycT et TG5T mesurée par « FRET melting ». Les mesures sont réalisées à  $0,2 \mu\text{M}$  en FmycT,  $1 \mu\text{M}$  en complexe et 3 et  $10 \mu\text{M}$  en TG5T dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de  $10 \text{ mM KCl}$  et  $90 \text{ mM LiCl}$ ).

La stabilisation des G4 marqués est diminuée (Figure 4.21) mais est encore présente même à 50 équivalents de TG5T avec des valeurs de  $\Delta T_{1/2}$  allant de 15 à 45% de la valeur sans TG5T (35 à 79%

pour 15 équivalents). Le mode d'interaction est donc probablement double et ne repose pas uniquement sur le  $\pi$ -stacking avec la tétrade. Le second mode d'interaction est probablement électrostatique avec les boucles grâce à la présence de la double charge positive portée par le centre métallique. Les expériences de dichroïsme circulaire nous permettront d'avoir une meilleure compréhension des modes d'interaction de nos complexes avec les structures G4 (travaux en cours).

## 2.2 Etude de l'interaction complexe-G4 par luminescence

Comme nous l'avons vu dans le chapitre III, le complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl}$  **39**<sub>phen</sub> possède un caractère « light-switch ON » quand il est mis en présence d'ADN. L'homologue halogéné  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl}$  **55**<sub>bpy</sub> voit également son intensité de luminescence augmenter lorsqu'il est en interaction avec l'ADN. Comme cela a été discuté dans le chapitre précédent, les autres complexes ne possèdent pas ces propriétés photophysiques probablement à cause d'un « quenching » de la luminescence par transfert de proton intramoléculaire.

Nous avons donc voulu mettre ces propriétés à profit et avons étudié cet effet sur la luminescence des complexes en présence de structures G4. Toutes les mesures ont été réalisées par M. Bellakhal dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, sous la supervision du Dr. D. Monchaud.

Pour cela, plusieurs oligonucléotides, non marqués cette fois-ci, ont été utilisés : des quadruplexes d'ADN (22AG, c-kit, c-myc, SRC3 et TG5T), un quadruplexe d'ARN (TRF2) et des ADN en double brin différenciés par le nombre de bases (ds12, ds17 et ds26). Toutes les structures et séquences sont détaillées en annexe. Les mesures ont été réalisées dans un tampon cacodylate (pH 7,2) avec 2  $\mu\text{M}$  en complexe et 10  $\mu\text{M}$  en oligonucléotide.

Comme cela a été décrit dans le chapitre III, l'intensité d'émission du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl}$  **39**<sub>phen</sub> n'augmente que d'un facteur 7-8 quand il est en interaction avec l'ADN de thymus de veau. C'est donc avec surprise que nous avons vu cette intensité d'émission augmenter d'un facteur supérieur à 200 en présence de 22AG (G4). Des mesures sur toute une série d'ADN ont donc été réalisées afin d'évaluer le potentiel de cette molécule (Figure 4.22).

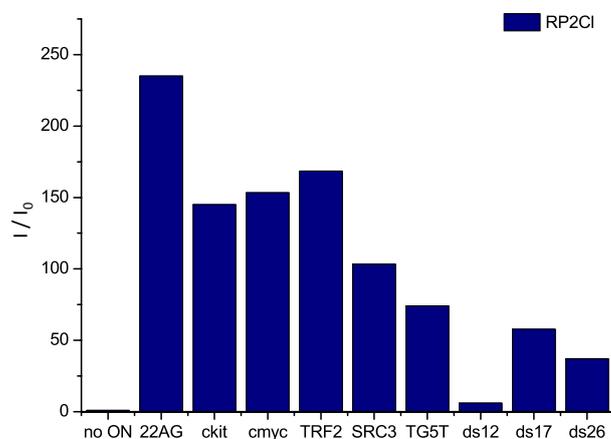


Fig. 4.22. Intensité de luminescence relative ( $I_0$  correspond à l'intensité d'émission sans ADN) de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl}$  **39**<sub>phen</sub> (2  $\mu\text{M}$ ) en présence de différents oligonucléotides (2  $\mu\text{M}$ ) dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de 10 mM KCl et 90 mM LiCl).

On constate que l'intensité de luminescence augmente le plus en présence de 22AG. L'intensité de luminescence est néanmoins aussi très augmentée en présence d'autres structures G4. L'effet « light-switch » est moins important pour les ADN en double hélice, ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans le chapitre III.

A notre connaissance, le complexe de ruthénium possédant la meilleure augmentation d'intensité de luminescence en présence de quadruplexes G4 est le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz-Br}]\cdot 2\text{Cl}$ , un analogue bromé du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]\cdot 2\text{Cl}$ , pour lequel un facteur 82 fois supérieur a été observé en présence d'un quadruplexe G4 similaire au TG5T par rapport au tampon.[48] L'ajout du brome permet de conférer à ce complexe la particularité de ne reconnaître qu'une forme particulière de G4 (sans boucles), ce qui n'est pas le cas de nos complexes. Néanmoins, à l'instar du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}]\cdot 2\text{Cl}$  **39**<sub>phen</sub>, ce complexe, ainsi qu'un second analogue, le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dmdppz-Br}]\cdot 2\text{Cl}$ , présentent une plus forte augmentation de luminescence en présence de quadruplexe G4 qu'en présence d'ADN double brin. Ce phénomène a également été observé pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{p-HPIP})]\cdot 2\text{Cl}$  [45] et semble être commun à ce type de composés (Figure 4.23).

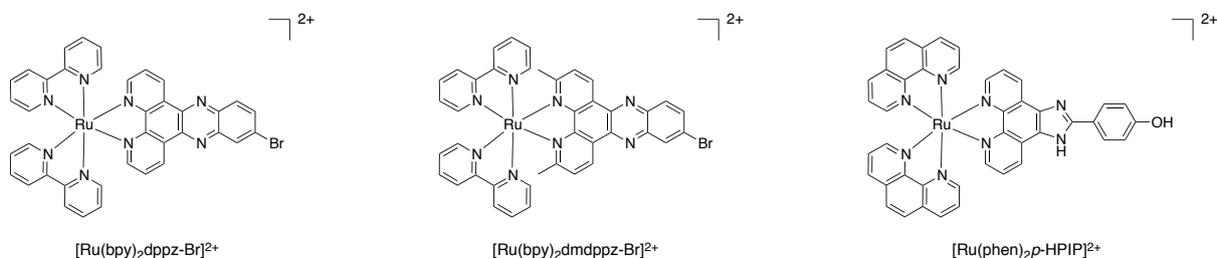


Fig. 4.23. Structures des complexes  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz-Br}]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dmdppz-Br}]^{2+}$  et  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{p-HPIP})]^{2+}$ .

L'intensité d'émission de tous les autres complexes a également été évaluée en présence d'ADN G4 (Figure 4.24). En effet, comme nous l'avons avancé dans le chapitre précédent, les autres complexes ne luminescent ni dans l'acétonitrile, ni dans l'eau, probablement à cause d'un « quenching » de la luminescence par transfert de proton. Néanmoins, il est possible qu'une fois en interaction avec les quadruplexes G4, le proton soit engagé dans des liaisons hydrogène avec la tétrade. Dans ce cas, nous devrions retrouver une augmentation de l'intensité de luminescence à l'ajout d'ADN G4. Une expérience a donc été réalisée pour laquelle tous les complexes étudiés en « FRET melting », à l'exception du  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-OH}]\cdot 2\text{Cl}$  **29**<sub>TAP</sub> et du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Am}]\cdot 2\text{Cl}$  **57**<sub>phen</sub>, ont été mis en présence de 5 équivalents de c-kit (G4) dans un tampon cacodylate (pH 7,2).

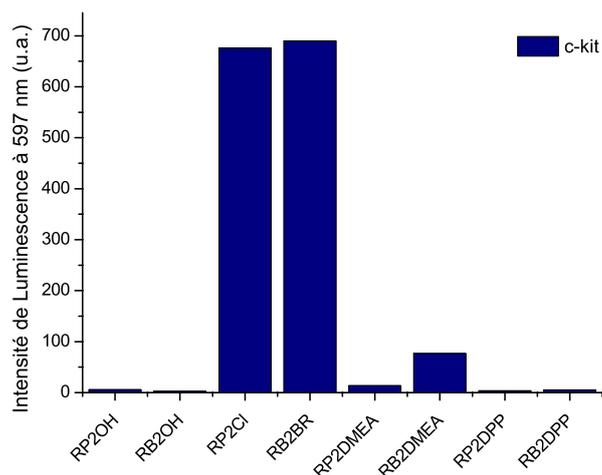


Fig. 4.24. Intensité de luminescence à 597 nm d'une série de complexes (2  $\mu\text{M}$ ) en présence c-kit (10  $\mu\text{M}$ ) dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de 10 mM KCl et 90 mM LiCl). (erreur inférieure à 10% sur la mesure pour les complexes  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-OH}].2\text{Cl } 29_{\text{phen}}$ ,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-OH}].2\text{Cl } 29_{\text{bpy}}$ ,  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-DMEA}].2\text{Cl } 40_{\text{phen}}$ ,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-DMEA}].2\text{Cl } 40_{\text{bpy}}$ ,  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}].2\text{Cl } 30_{\text{phen}}$  et  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppqp}].2\text{Cl } 30_{\text{bpy}}$  dont le  $I_{\text{max}}$  ne se situe pas à 597 nm).

Seuls les complexes  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } 39_{\text{phen}}$ , déjà connu pour avoir un comportement « light-switch ON » et  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } 55_{\text{bpy}}$  présentent une intensité de luminescence élevée en présence de c-kit. Le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-DMEA}].2\text{Cl } 40_{\text{phen}}$  et le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-DMEA}].2\text{Cl } 40_{\text{bpy}}$  luminescent faiblement et les autres absolument pas. L'interaction avec la tétrade ne suffit donc pas à modifier les propriétés photophysiques des complexes étudiés.

Le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } 55_{\text{bpy}}$  est très similaire au  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } 39_{\text{phen}}$ ; il est donc probable que ce complexe possède également un comportement « light-switch ». De la même manière que pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } 39_{\text{phen}}$ , son intensité de luminescence a donc été mesurée en milieu aqueux, seul et en présence d'une variété d'oligonucléotides (présentés ci-dessus). Les résultats sont présentés dans la figure 4.25.

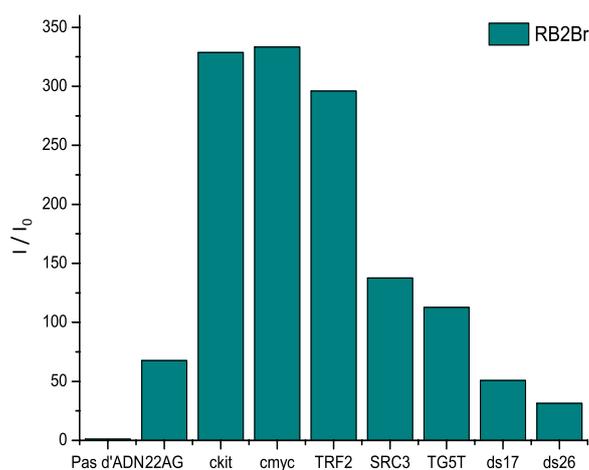


Fig. 4.25. Intensité de luminescence relative ( $I_0$  correspond à l'intensité d'émission sans ADN) de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } 55_{\text{bpy}}$  (2  $\mu\text{M}$ ) en présence de différents oligonucléotides (2  $\mu\text{M}$ ) dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de 10 mM KCl et 90 mM LiCl).

Tout comme le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } \mathbf{39}_{\text{phen}}$ , le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } \mathbf{55}_{\text{bpy}}$  n'émet pas dans l'eau, émet faiblement en présence d'ADN double brin et très fortement en présence de quadruplexes G4. Ce complexe possède donc également un comportement « light-switch » en présence d'ADN, et, à l'instar de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } \mathbf{39}_{\text{phen}}$ , son intensité d'émission est nettement plus intense en présence de G4 qu'en présence de duplex.

Les valeurs obtenues pour le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } \mathbf{55}_{\text{bpy}}$ , présentées dans la figure 4.25 sont comparées à celles obtenues pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } \mathbf{39}_{\text{phen}}$  (cf. Figure 4.23) dans la figure 4.26 ci-dessous.

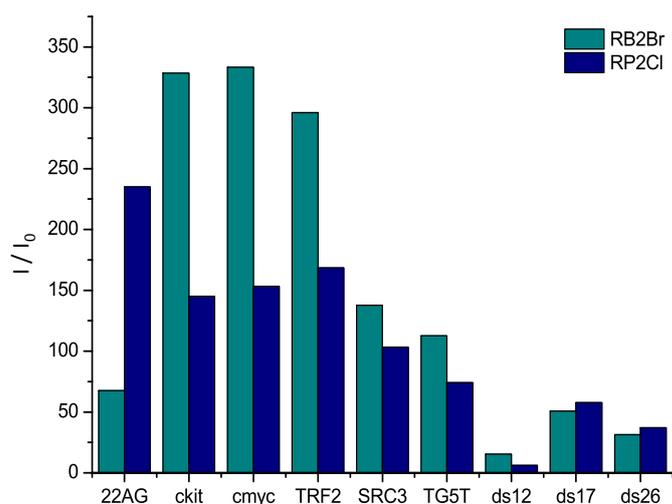


Fig. 4.26. Intensités de luminescence relatives ( $I_0$  correspond à l'intensité d'émission sans ADN) de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } \mathbf{55}_{\text{bpy}}$  ( $2 \mu\text{M}$ ) et de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } \mathbf{39}_{\text{phen}}$  ( $2 \mu\text{M}$ ) en présence de différents oligonucléotides ( $2 \mu\text{M}$ ) dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de  $10 \text{ mM KCl}$  et  $90 \text{ mM LiCl}$ ).

A l'exception du 22AG, l'effet « light-switch » est bien meilleur avec le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } \mathbf{55}_{\text{bpy}}$  qu'avec le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } \mathbf{39}_{\text{phen}}$ , particulièrement pour c-kit, c-myc et TRF2 pour lesquels l'intensité de luminescence est augmentée d'un facteur 300 ou plus. On remarque également que l'augmentation en intensité de luminescence est légèrement inférieure à celle observée avec le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl } \mathbf{39}_{\text{phen}}$  en présence d'ADN double brin. Le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } \mathbf{55}_{\text{bpy}}$  possède donc un meilleur potentiel en tant que sonde luminescente ; il est probable que la meilleure affinité du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl } \mathbf{55}_{\text{bpy}}$  envers les quadruplexes G4 (déterminée par « FRET melting ») soit responsable de ce phénomène.

Le fait que l'intensité d'émission de ces complexes soit plus intense avec les quadruplexes G4 qu'avec la double hélice, est particulièrement intéressant si nous envisageons d'utiliser ces molécules comme sondes moléculaires spécifiques aux quadruplexes G4. Néanmoins, le rapport entre l'intensité de luminescence avec un duplex et un quadruplexes G4 reste assez faible puisqu'au meilleur des cas, il est de 1/20. Ce dernier point pourrait poser problème pour une visualisation *in vivo* des quadruplexes car, en présence des deux structures, il risque d'être difficile d'identifier les quadruplexes G4 en particulier.

Le même rapport calculé pour le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz-Br}].2\text{Cl}$  est de 1/14 en présence d'un quadruplexe G4 et de CT-DNA.[48] A notre connaissance, le rapport obtenu ici reste donc meilleur que ce qui a été publié jusqu'à présent pour des complexes de ruthénium<sup>II</sup>.

Des expériences de luminescence compétitives ont donc été réalisées qui nous permettront d'évaluer au mieux les potentiels du  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl}$  **55<sub>bpy</sub>** et du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl}$  **39<sub>phen</sub>** comme sondes spécifiques aux G4 *in cellulo*, particulièrement pour le premier qui possède un potentiel légèrement meilleur que le second.

Une première expérience a été réalisée sur les deux complexes, expérience pour laquelle les complexes (2  $\mu\text{M}$ ) ont été mis en présence d'un large excès d'ADN de thymus de veau (50 équivalents). A ces solutions ont ensuite été ajoutés de 1 à 5 équivalents de c-kit pour le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl}$  **55<sub>bpy</sub>** et de 22AG pour le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl}$  **39<sub>phen</sub>** (Figure 4.27).

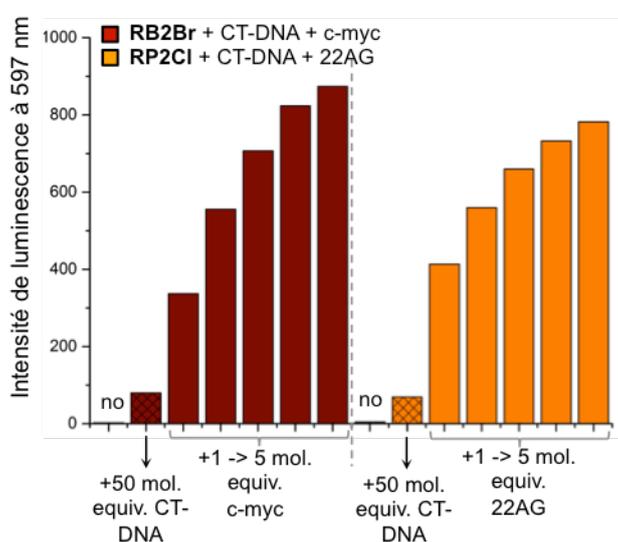


Fig. 4.27. Intensités de luminescence à 597 nm de  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl}$  **55<sub>bpy</sub>** et de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl}$  **39<sub>phen</sub>** (2  $\mu\text{M}$ ) en présence d'ADN de thymus de veau (CT DNA) (100  $\mu\text{M}$ ) et d'ajouts croissants de c-kit et 22AG respectivement (2 à 10  $\mu\text{M}$ ) dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de 10 mM KCl et 90 mM LiCl).

On voit que l'intensité de luminescence est très peu augmentée à l'ajout de 50 équivalents d'ADN de thymus de veau. Par contre, elle l'est nettement dès l'ajout d'un équivalent de G4, et continue ensuite d'augmenter avec le nombre d'équivalents. Les deux expériences présentent les mêmes types d'évolution et indiquent que la bonne affinité des complexes combinée à un effet « light-switch » plus important avec les quadruplexes G4 permet d'observer une forte spécificité envers les G4 du point de vue de la luminescence.

L'expérience suivante a été réalisée avec le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp-Br}].2\text{Cl}$  **55<sub>bpy</sub>** uniquement.

Le complexe a été mis en présence d'équivalents croissants (1 à 5) de c-myc puis d'équivalents croissants de ds17 (ADN double brin) (Figure 4.28) :

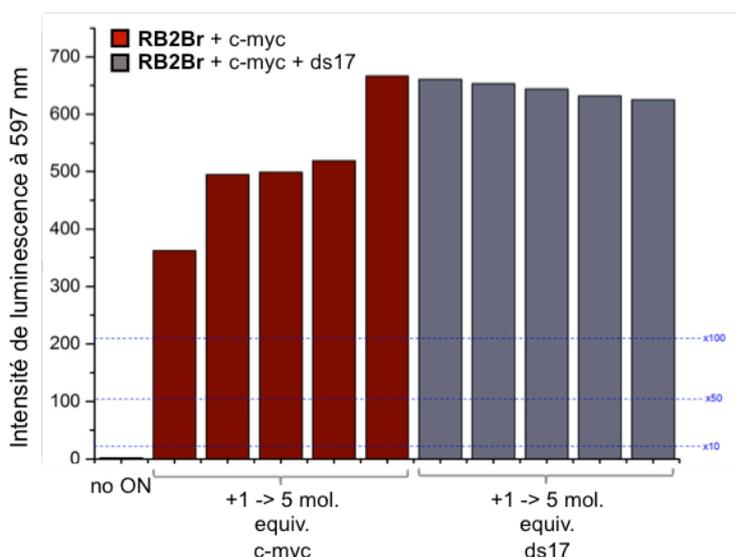


Fig. 4.28. Intensités de luminescence à 597 nm de  $[Ru(bpy)_2dpqp-Br].2Cl$   $55_{bpy}$  ( $2 \mu M$ ) en présence d'ajouts croissants de c-myc (2 à  $10 \mu M$ ) puis d'ajouts croissants de ds17 (2 à  $10 \mu M$ ) dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de 10 mM KCl et 90 mM LiCl).

L'intensité de luminescence du complexe est, comme on s'y attend, augmentée à l'ajout de c-myc et est maximale à 5 équivalents du G4. Ensuite, on constate que l'ajout d'ADN double brin dans l'échantillon ne modifie presque pas la luminescence totale détectée. Elle est même très légèrement diminuée à cause du passage de certains complexes du G4 vers le duplex. Sachant que l'interaction complexe-ADN double brin n'augmente que faiblement l'intensité de luminescence du complexe comparativement à l'augmentation de luminescence observée en présence de quadruplexe G4, le fait que l'intensité de luminescence observée en ajoutant du duplex ne diminue que très peu indique que le complexe reste majoritairement sur le quadruplexe G4.

La dernière expérience a été réalisée sur les deux complexes mais seuls les résultats avec le  $[Ru(bpy)_2dpqp-Br].2Cl$   $55_{bpy}$  sont présentés ci-dessous (les résultats pour le  $[Ru(phen)_2dpqp-Cl].2Cl$   $55_{bpy}$  sont présentés en annexe). Cette expérience permet de compléter les deux résultats montrés ci-dessus. Le complexe est mis en présence d'équivalents croissants de c-kit (1 à 5). A chaque équivalent de c-kit, un nombre croissant d'ADN de thymus de veau est ajouté à l'échantillon (1 à 100 éq.) (Figure 4.29).

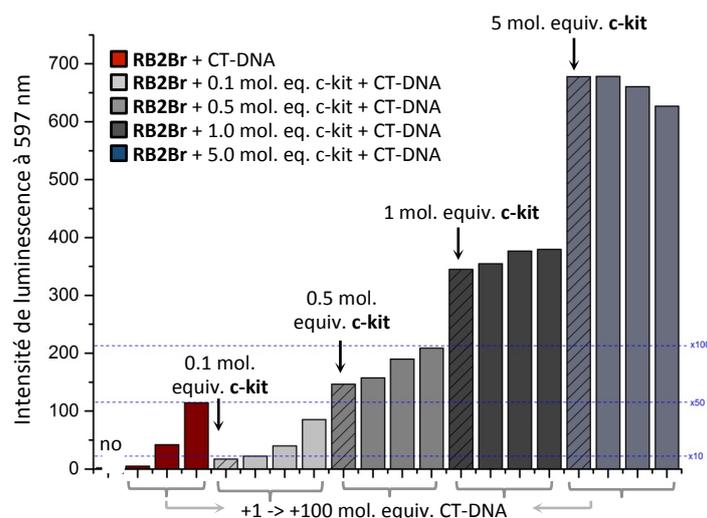


Fig. 4.29. Intensités de luminescence à 597 nm de  $[Ru(bpy)_2dpqp-Br].2Cl\ 55_{bpy}$  ( $2\ \mu M$ ) en présence d'ajouts croissants de *c-kit* (2 à  $10\ \mu M$ ) et d'ajouts croissants de thymus de veau (CT DNA) (0 à  $200\ \mu M$ ) dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de  $10\ mM\ KCl$  et  $90\ mM\ LiCl$ ).

A nouveau, on observe une augmentation de l'intensité de luminescence à l'ajout de quadruplexe G4 et à nouveau, l'ajout d'ADN double brin n'impacte pas dramatiquement cette augmentation d'émission du complexe, même à 100 équivalents de duplex. A 0,1 et 0,5 équivalents en *c-kit*, l'ajout de CT-DNA permet d'augmenter l'intensité de luminescence des complexes en solution de manière significative. Ceci s'explique probablement par la présence de nouveaux sites d'interaction disponibles pour les complexes seuls en solution à l'ajout d'ADN double brin. A 1 équivalent, cette augmentation est nettement moins marquée puisque la majorité des complexes en solution doivent déjà être en interaction avec un quadruplexe G4. A 5 équivalents, on retrouve le même effet que dans la figure 4.28, pour lequel une très faible diminution de l'intensité de luminescence est observée. Cette expérience semble donc également indiquer que les complexes sont préférentiellement en interaction avec les quadruplexes G4

Ces trois séries d'expériences permettent d'affirmer que les complexes sont d'excellentes sondes luminescentes *in cellulo*, et possèdent le potentiel de l'être également *in vivo* pour la visualisation des quadruplexes G4 dans les cellules. En effet, l'effet « light-switch ON » plus important quand les complexes sont en interaction avec les quadruplexes G4 qu'avec le duplex, allié à une sélectivité relativement bonne envers les quadruplexes G4, confère à ces complexes des propriétés photophysiques uniques leur permettant de luminescer spécifiquement en présence de quadruplexe G4 même en présence d'un large excès d'ADN double brin (ds17) ou d'un très large excès d'ADN génomique (CT).

Dès lors, des études préliminaires d'imagerie cellulaire ont été menées sur des cellules cancéreuses avec le  $[Ru(bpy)_2dpqp-Br].2Cl\ 55_{bpy}$  par le Dr. Amor (Université de Bourgogne, Dijon). Les clichés obtenus semblent indiquer d'une part que le complexe a trouvé des cibles biologiques avec lesquelles interagir puisqu'il luminesce et d'autre part qu'il reconnaît certaines cibles puisque la coloration est localisée. De plus, le complexe possède le même schéma de coloration que N-TASQ [49], [50]. Il est

donc probable qu'il puisse marquer les quadruplexes dans le noyau et dans le cytoplasme (Figure 4.30).

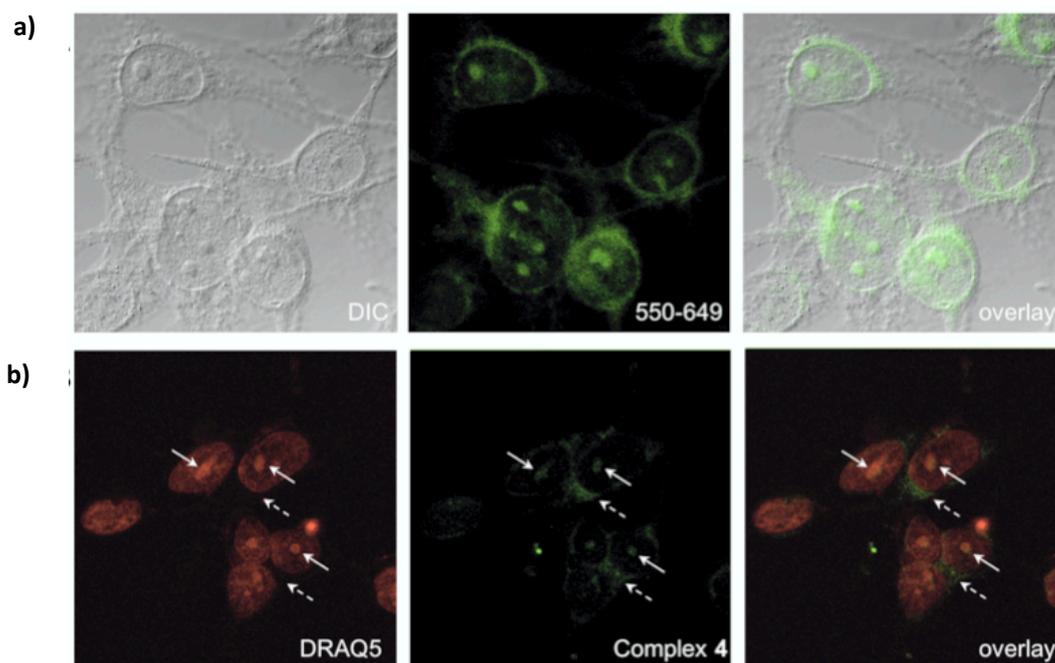


Fig. 4.30. Clichés d'imagerie confocale (Canal GFP) de cellules B16F10 après fixation au méthanol marquées par  $[Ru(bpy)_2dpqp-Br].2Cl$  **55**<sub>bpy</sub>. Colonne de gauche : a) sans DRAQ5, DIC correspond à « Differential Interference Contrast », b) émission enregistrée à  $\lambda_{ex} = 638\text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 661-785\text{ nm}$  correspondant à la luminescence du DRAQ5. Colonne du milieu : émission enregistrée à  $\lambda_{ex} = 488\text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 550-649\text{ nm}$  par le canal GFP correspondant à la luminescence du  $[Ru(bpy)_2dpqp-Br].2Cl$  **55**<sub>bpy</sub>. Colonne de droite : superposition des deux images.

Ces données sont trop préliminaires à ce stade pour pouvoir confirmer qu'il s'agit de marquage de G4 mais nous permettent de valider ce complexe comme sonde lumineuse dans les cellules.

Ces résultats sont donc très prometteurs et la poursuite d'études en imagerie cellulaire permettra de confirmer ou d'infirmer le potentiel de ces complexes en tant que sonde lumineuse « light switch » spécifique aux structures G4.

En conclusion, deux points importants ont pu être mis en évidence dans ce chapitre. Premièrement, la structure des ligands dpqp et dppqp semble bien adaptée pour l'interaction avec les quadruplexes G4. En effet, les complexes stabilisent généralement bien les différentes structures de quadruplexes G4. De plus, certains d'entre eux, particulièrement les complexes  $[Ru(L)_2dppqp].2Cl$  **30**, sont très sélectifs envers ces structures par rapport à la conformation en double hélice. Deuxièmement, les complexes  $[Ru(bpy)_2dpqp-Br].2Cl$  et  $[Ru(phen)_2dpqp-Cl].2Cl$  (déjà étudiés dans le chapitre III pour leur comportement « light-switch ») possèdent des propriétés photophysiques particulièrement intéressantes en présence de quadruplexes G4 puisqu'ils sont capables de reconnaître par luminescence ces structures, même en présence d'un grand excès d'ADN double brin.

## Bibliographie

- [1] J. C. Watson and F. H. Crick, "Molecular structure of nucleic acids," *Nature*, vol. 171, pp. 737–738, 1953.
- [2] M. Gellert, M. N. Lipsett, and D. R. Davies, "Helix Formation By Guanylic Acid," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 48, no. 12, pp. 2013–2018, 1962.
- [3] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, and S. Neidle, "Quadruplex DNA: Sequence, topology and structure," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 19, pp. 5402–5415, 2006.
- [4] G. Parkinson, "Fundamentals of quadruplex structures," *Quadruplex nucleic acids*, vol. Chapitre 1, pp. 29–39, 2006.
- [5] J.-L. Mergny, J. Gros, A. De Cian, F. Rosu, A. Bourdoncle, B. Sacca, L. Guittat, S. Amrane, M. Mills, P. Alberti, M. Takasugi, and L. Lacroix, "Energetics, Kinetics and Dynamics of Quadruplex Folding," in *Quadruplex Nucleic Acids*, S. Neidle and S. Balasubramanian, Eds. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2006, pp. 31–80.
- [6] D. Rhodes and H. J. Lipps, "G-quadruplexes and their regulatory roles in biology.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. 18, pp. 8627–37, 2015.
- [7] S. Zhang, Y. Wu, and W. Zhang, "G-quadruplex structures and their interaction diversity with ligands," *ChemMedChem*, vol. 9, no. 5, pp. 899–911, 2014.
- [8] J. L. Huppert and S. Balasubramanian, "Prevalence of quadruplexes in the human genome," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 9, pp. 2908–2916, 2005.
- [9] A. K. Todd, M. Johnston, and S. Neidle, "Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 9, pp. 2901–2907, 2005.
- [10] V. S. Chambers, G. Marsico, J. M. Boutell, M. Di Antonio, G. P. Smith, and S. Balasubramanian, "High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome," *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, no. July, pp. 1–7, 2015.
- [11] C. Schaffitzel, I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H. J. Lipps, and A. Plückthun, "In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 15, pp. 8572–8577, 2001.
- [12] K. Paeschke, T. Simonsson, J. Postberg, D. Rhodes, and H. J. Lipps, "Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 12, no. 10, pp. 847–854, 2005.
- [13] M. L. Duquette, P. Handa, J. A. Vincent, A. F. Taylor, and N. Maizels, "Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA," *Genes Dev.*, vol. 18, no. 13, pp. 1618–1629, 2004.
- [14] G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, and S. Balasubramanian, "Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells.," *Nat. Chem.*, vol. 5, no. 3, pp. 182–6, 2013.
- [15] K. Paeschke, S. Juranek, T. Simonsson, A. Hempel, D. Rhodes, and H. J. Lipps, "Telomerase recruitment by the telomere end binding protein-beta facilitates G-quadruplex DNA unfolding in ciliates.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 598–604, 2008.
- [16] N. Maizels, "Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 13, no. 12, pp. 1055–1059, 2006.
- [17] M. Tarsounas and M. Tijsterman, "Genomes and G-quadruplexes: For better or for worse," *J. Mol. Biol.*, vol. 425, no. 23, pp. 4782–4789, 2013.
- [18] E. H. Blackburn, "Structure and function of telomeres.," *Nature*, vol. 350, no. 6319, pp. 569–73, 1991.
- [19] A. M. Zahler, J. R. Williamson, T. R. Cech, and D. M. Prescott, "Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures," *Lett. to Nat.*, vol. 354, pp. 56–58, 1991.
- [20] L. Crabbe, R. E. Verdun, C. I. Haggblom, and J. Karlseder, "Defective Telomere Lagging Strand Synthesis in Cells Lacking WRN Helicase Activity," *Science*, vol. 306, no. 5703, pp. 1951–1953, 2004.

- [21] A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, and L. H. Hurley, "Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 18, pp. 11593–8, 2002.
- [22] S. Balasubramanian, L. H. Hurley, and S. Neidle, "Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy?," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 10, no. 4, pp. 261–75, 2011.
- [23] P. Murat and S. Balasubramanian, "Existence and consequences of G-quadruplex structures in DNA," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 25, no. 1, pp. 22–29, 2014.
- [24] J. C. Darnell, K. B. Jensen, P. Jin, V. Brown, S. T. Warren, and R. B. Darnell, "Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function.," *Cell*, vol. 107, pp. 489–499, 2001.
- [25] A. L. Wolfe, K. Singh, Y. Zhong, P. Drewe, V. K. Rajasekhar, V. R. Sanghvi, K. J. Mavrakis, M. Jiang, J. E. Roderick, J. Van der Meulen, J. H. Schatz, C. M. Rodrigo, C. Zhao, P. Rondou, E. de Stanchina, J. Teruya-Feldstein, M. A. Kelliher, F. Speleman, J. A. Porco, J. Pelletier, G. Rättsch, and H.-G. Wendel, "RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer.," *Nature*, vol. 513, no. 7516, pp. 65–70, 2014.
- [26] J. L. Huppert, A. Bugaut, S. Kumari, and S. Balasubramanian, "G-quadruplexes: The beginning and end of UTRs," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 19, pp. 6260–6268, 2008.
- [27] H. Fernando, S. Sewitz, J. Darot, S. Tavar, J. L. Huppert, and S. Balasubramanian, "Genome-wide analysis of a G-quadruplex-specific single-chain antibody that regulates gene expression," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 20, pp. 6716–6722, 2009.
- [28] L. T. Gray, A. C. Vallur, J. Eddy, and N. Maizels, "G quadruplexes are genome-wide targets of transcriptional helicases XPB and XPD.," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 10, no. 4, pp. 313–8, 2014.
- [29] H. Hegyi, "Enhancer-promoter interaction facilitated by transiently forming G-quadruplexes.," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 9165, 2015.
- [30] I. Cheung, M. Schertzer, A. Rose, and P. M. Lansdorp, "Disruption of dog-1 in *Caenorhabditis elegans* triggers deletions upstream of guanine-rich DNA.," *Nat. Genet.*, vol. 31, no. 4, pp. 405–409, 2002.
- [31] E. Kruisselbrink, V. Guryev, K. Brouwer, D. B. Pontier, E. Cuppen, and M. Tijsterman, "Mutagenic Capacity of Endogenous G4 DNA Underlies Genome Instability in FANCD1-Defective *C. elegans*," *Curr. Biol.*, vol. 18, no. 12, pp. 900–905, 2008.
- [32] T. B. C. London, L. J. Barber, G. Mosedale, G. P. Kelly, S. Balasubramanian, I. D. Hickson, S. J. Boulton, and K. Hiom, "FANCD1 is a structure-specific DNA helicase associated with the maintenance of genomic G/C tracts," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 52, pp. 36132–36139, 2008.
- [33] J.-B. Vannier, S. Sandhu, M. I. Petalcorin, X. Wu, Z. Nabi, H. Ding, and S. J. Boulton, "RTEL1 Is a Replisome-Associated Helicase That Promotes Telomere and Genome-Wide Replication," *Science*, vol. 342, no. 6155, pp. 239–242, 2013.
- [34] J. B. Vannier, V. Pavicic-Kaltenbrunner, M. I. R. Petalcorin, H. Ding, and S. J. Boulton, "RTEL1 dismantles T loops and counteracts telomeric G4-DNA to maintain telomere integrity," *Cell*, vol. 149, no. 4, pp. 795–806, 2012.
- [35] K. Paeschke, M. L. Bochman, P. D. Garcia, P. Cejka, K. L. Friedman, S. C. Kowalczykowski, and V. A. Zakian, "Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs.," *Nature*, vol. 497, no. 7450, pp. 458–462, 2013.
- [36] R. Rodriguez, K. M. Miller, J. V Forment, C. R. Bradshaw, M. Nikan, S. Britton, T. Oelschlaegel, B. Xhemalce, S. Balasubramanian, and S. P. Jackson, "Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 3, pp. 301–310, 2012.
- [37] Q. Li, J. Xiang, X. Li, L. Chen, X. Xu, Y. Tang, Q. Zhou, L. Li, H. Zhang, H. Sun, A. Guan, Q. Yang G. Xu, "Stabilizing parallel G-quadruplex DNA by a new class of ligands: Two non-planar alkaloids through interaction in lateral grooves," *Biochimie*, vol. 91, pp. 811–819, 2009.
- [38] E. Largy, A. Granzhan, F. Hamon, D. Verga, and M.-P. Teulade-Fichou, "Visualizing the Quadruplex: From Fluorescent Ligands to Light-Up Probes," *Top. Curr. Chem.*, vol. 330, pp. 111–178, 2013.
- [39] B. R. Vummidi, J. Alzeer, and N. W. Luedtke, "Fluorescent Probes for G-Quadruplex Structures,"

- ChemBioChem*, vol. 14, no. 5, pp. 540–558, 2013.
- [40] P. Yang, A. De Cian, M. P. Teulade-Fichou, J. L. Mergny, and D. Monchaud, “Engineering bisquinolinium/thiazole orange conjugates for fluorescent sensing of G-quadruplex DNA,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 48, no. 12, pp. 2188–2191, 2009.
- [41] C. C. Chang, I. C. Kuo, I. F. Ling, C. T. Chen, H. C. Chen, P. J. Lou, J. J. Lin, and T. C. Chang, “Detection of quadruplex DNA structures in human telomeres by a fluorescent carbazole derivative,” *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 15, pp. 4490–4494, 2004.
- [42] N. C. Sabharwal, V. Savikhin, J. R. Turek-Herman, J. M. Nicoludis, V. A. Szalai, and L. A. Yatsunyk, “N-methylmesoporphyrin IX fluorescence as a reporter of strand orientation in guanine quadruplexes,” *FEBS J.*, vol. 281, no. 7, pp. 1726–1737, 2014.
- [43] F. Koepfel, J. F. Riou, a Laoui, P. Mailliet, P. B. Arimondo, D. Labit, O. Petitgenet, C. Hélène, and J. L. Mergny, “Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 1087–1096, 2001.
- [44] C. Wang, Q. Yu, L. Yang, Y. Liu, D. Sun, Y. Huang, Y. Zhou, Q. Zhang, and J. Liu, “Ruthenium (II) polypyridyl complexes stabilize the bcl-2 promoter quadruplex and induce apoptosis of HeLa tumor cells,” *BioMetals*, vol. 26, no. 3, pp. 387–402, 2013.
- [45] Q. Yu, Y. Liu, C. Wang, D. Sun, X. Yang, Y. Liu, and J. Liu, “Chiral Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes: Stabilization of G-Quadruplex DNA, Inhibition of Telomerase Activity and Cellular Uptake,” *PLoS One*, vol. 7, no. 12, pp. 1–13, 2012.
- [46] D. Sun, Y. Liu, Q. Yu, D. Liu, Y. Zhou, and J. Liu, “Selective nuclei accumulation of ruthenium(II) complex enantiomers that target G-quadruplex DNA,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 150, pp. 90–99, Sep. 2015.
- [47] Q. Yu, Y. Liu, J. Zhang, F. Yang, D. Sun, D. Liu, Y. Zhou, and J. Liu, “Ruthenium(II) polypyridyl complexes as G-quadruplex inducing and stabilizing ligands in telomeric DNA,” *Metallomics*, vol. 5, no. 3, pp. 222–31, 2013.
- [48] E. Wachter, D. Moyá, S. Parkin, and E. C. Glazer, “Ruthenium Complex ‘Light Switches’ that are Selective for Different G-Quadruplex Structures,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 22, no. 2, pp. 550–559, 2016.
- [49] A. Laguerre, K. Hukezalie, P. Winckler, F. Katranji, G. Chanteloup, M. Pirrotta, J.-M. Perrier-Cornet, J. M. Y. Wong, and D. Monchaud, “Visualization of RNA-Quadruplexes in Live Cells,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 137, no. 26, pp. 8521–8525, 2015.
- [50] A. Laguerre, J. M. Y. Wong, and D. Monchaud, “Direct visualization of both DNA and RNA quadruplexes in human cells via an uncommon spectroscopic method,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 32141, 2016.
- [51] A. De Rache and J.-L. Mergny, “Assessment of selectivity of G-quadruplex ligands via an optimised FRET melting assay,” *Biochimie*, vol. 115, pp. 194–202, 2015.
- [52] P.-D. Diabate, A. Laguerre, M. Pirrotta, N. Desbois, J. Boudon, C. P. Gros, and D. Monchaud, “DNA structure-specific sensitization of a metalloporphyrin leads to an efficient in vitro quadruplex detection molecular tool,” *New J. Chem.*, vol. 40, no. 7, 2016.
- [53] R. Haudecoeur, L. Stefan, F. Denat, and D. Monchaud, “A Model of Smart G-Quadruplex Ligand,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, pp. 550–553, 2013.
- [54] A. De Cian, E. DeLemos, J. L. Mergny, M. P. Teulade-Fichou, and D. Monchaud, “Highly efficient G-quadruplex recognition by bisquinolinium compounds,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 7, pp. 1856–1857, 2007.
- [55] L. Bouffier, M. Demeunynck, P. Dumy, C. Moucheron, and A. Kirsch-De Mesmaeker, “Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[3,2-j]phenazine (dpqp-OH) - Synthesis, characterization and DNA interaction of the corresponding Ru(II) complex,” *Inorganica Chim. Acta*, vol. 360, no. 10, pp. 3162–3168, 2007.

*Chapitre V : Synthèse d'un complexe  
fonctionnalisé par une triple liaison :  
applications à la chimie « click »*

# Synthèse d'un complexe fonctionnalisé par une triple liaison: applications à la chimie « click »

## 1 Introduction

### 1.1 Le concept de chimie « click » - Applications en biologie

Les méthodes de chimie « click » ont trouvé de nombreuses applications dans des domaines variés au cours de ces dernières années.[1] En effet, le concept englobe des réactions régio- voire stéréospécifiques qui sont généralement faciles à mettre en œuvre et modulables, qui peuvent être utilisées sur une variété de produits, procèdent avec de hauts rendements et génèrent uniquement des produits secondaires « inoffensifs » pouvant être séparés sans passer par colonne chromatographique. Ces caractéristiques font partie des fondements requis pour introduire une réaction au concept de chimie « click ».[2]

Plusieurs réactions sont englobées dans ce concept. On peut notamment citer la cycloaddition de Diels-Alder, les cycloadditions 1,3-dipolaires, les réactions d'addition ou d'ouverture de cycle nucléophiles ou encore la chimie du carbonyle (Figure 5.1).[2]

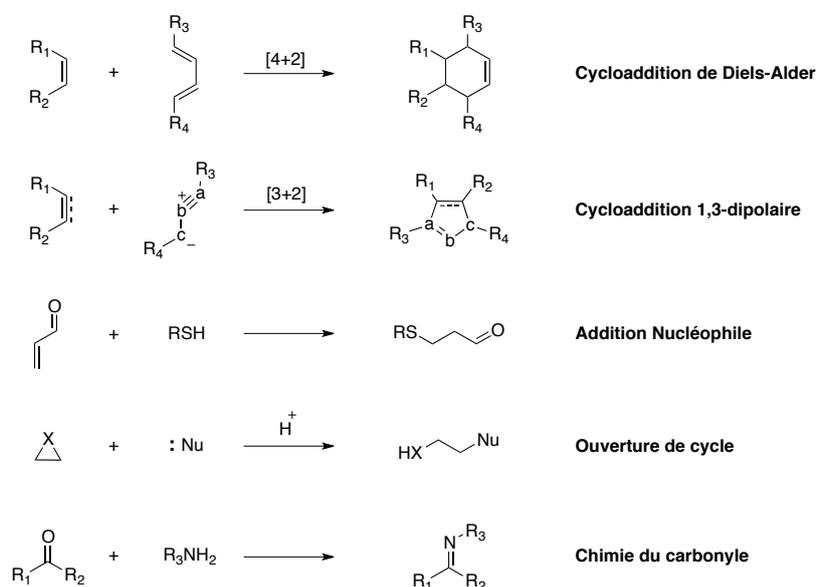


Fig. 5.1. Principales réactions englobées dans le concept de chimie « click ».

Parmi les réactions mises en jeu, la plus connue est la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un alcyne et un azoture pour former un 1,2,3-triazole.[3] Certains problèmes associés à cette réaction, comme une cinétique extrêmement lente, le besoin de chauffer à très haute température ou encore l'obtention d'un mélange d'isomères (substituants en positions 1,4 et 1,5), ont limité son application

jusqu'à la mise au point d'une variante décrite simultanément par les groupes de Sharpless[4] et Meldal[5] en 2002.

Cette variante connue sous l'acronyme CuAAC, met en jeu une catalyse au cuivre, ce qui permet la formation rapide et régiosélective de l'isomère 1,4 à température ambiante (Figure 5.2). L'utilisation de cette réaction s'est alors rapidement répandue à de nombreux domaines de la chimie.

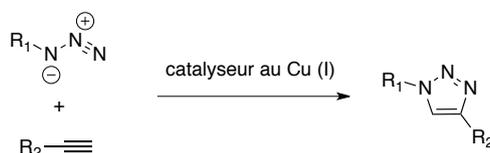


Fig. 5.2. Variante de la cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre.

L'utilisation d'autres catalyseurs, à base de ruthénium,[6] d'iridium[7] ou de zinc,[8] a permis par la suite d'obtenir l'isomère 1,5.

Cette réaction est particulièrement adaptée pour des applications en milieu biologique, principalement parce que les fonctions azotures et alcynes sont inertes en présence de biomolécules et compatibles avec les milieux cellulaires. La plus grosse limitation aux applications *in cellulo* et *in vivo* de cette réaction reste liée à la présence de cuivre, extrêmement cytotoxique.[9]

Cette compatibilité avec le milieu biologique, qui existe avec les alcynes et les azotures, rend les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire particulièrement attrayantes et ont donc amené les recherches vers des méthodes alternatives non catalysées au cuivre.

La variante la plus connue, décrite par le groupe de Bertozzi, implique l'utilisation de dérivés de cyclooctyne (Figure 5.3).[10]

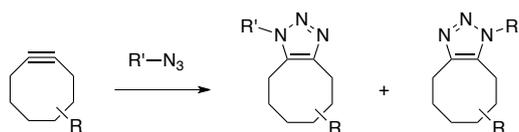


Figure 5.3. Cycloaddition non catalysée au cuivre de Bertozzi.

La cycloaddition est permise grâce à la présence du cycle tendu et à l'énergie de contrainte qui en résulte. De nombreux dérivés ont été synthétisés afin d'améliorer la réactivité de ces composés et cette méthode reste un modèle pour les réactions de chimie-click non catalysées au cuivre.[11], [12] Néanmoins, les applications sont restées limitées à cause de la difficulté à synthétiser le cyclooctyne précurseur.

Les applications trouvées à la chimie « click » en général sont nombreuses :[1]

- Sciences des matériaux : synthèse de dendrimères ou de polymères, fonctionnalisation de surfaces, « cross-linking » d'organogels, ...

- Sciences pharmaceutiques : outils dans la découverte de nouveaux médicaments et utilisation pour la bioconjugaison (décoration de biomolécules avec des fluorophores, immobilisation de biomolécules sur des surfaces, ...)

Il est très difficile d'être exhaustif tant l'utilisation de la chimie click est variée. Nous nous focaliserons donc sur les applications en biologie et plus particulièrement sur la chimie « click » *in situ* et les sondes *in vitro* et *in vivo*.

Une approche particulièrement intéressante a été développée par le groupe de Sharpless pour le développement de nouveaux médicaments. Cette technique de « fragment based drug design », appelée chimie « click » *in situ*, permet de former des molécules multimériques possédant une très bonne affinité pour une cible biologique donnée. La sélection du composé possédant la meilleure affinité est réalisée par la cible elle-même puisque la réaction « click » est assistée par cette dernière qui joue le rôle de poche catalytique (Figure 5.4.).[13], [14]

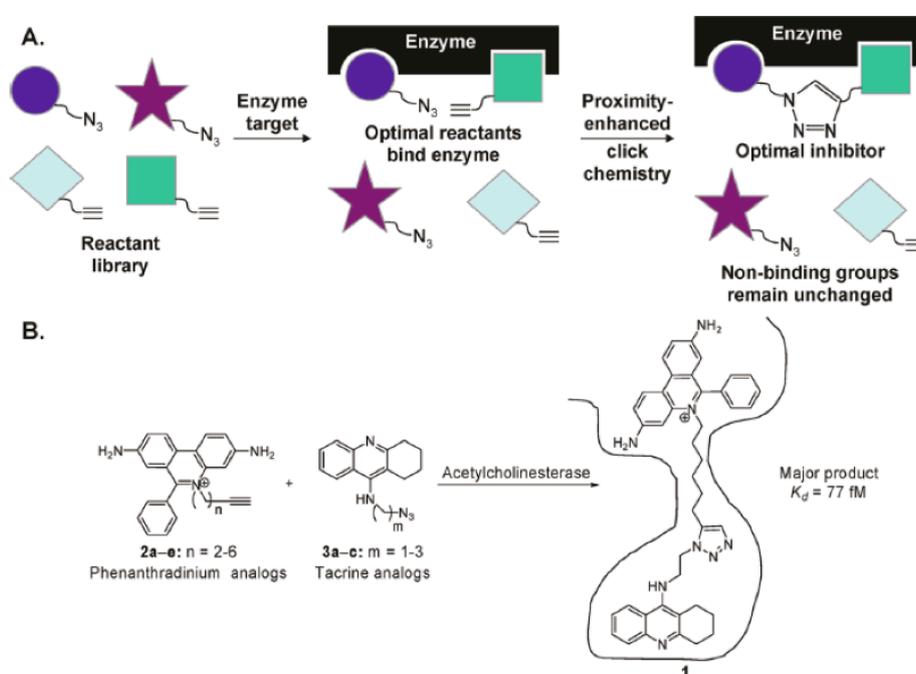


Fig. 5.4. Principe de réaction « click » *in situ*, illustré avec l'acétylcholinestérase comme poche catalytique. [13]

La réaction est facilitée grâce au maintien des deux composants dans des sites d'interaction proches de la protéine cible. Seules les molécules pouvant interagir avec la protéine dans les sites visés sont capables de réagir ensemble. L'hétéro-dimère formé présente alors une plus grande affinité envers le site d'interaction de la protéine.

Plus récemment, l'utilisation de G4 comme *template* pour la réaction « click » de Huisgen *in situ* a été publiée (Figure 5.5).[15], [16] Cette approche permet de former des composés spécifiques à une topologie particulière de G4. Actuellement peu de ligands des G4 sont capables de discriminer une topologie de G4 particulière et cette méthode est tout à fait adaptée pour en développer de nouveaux.

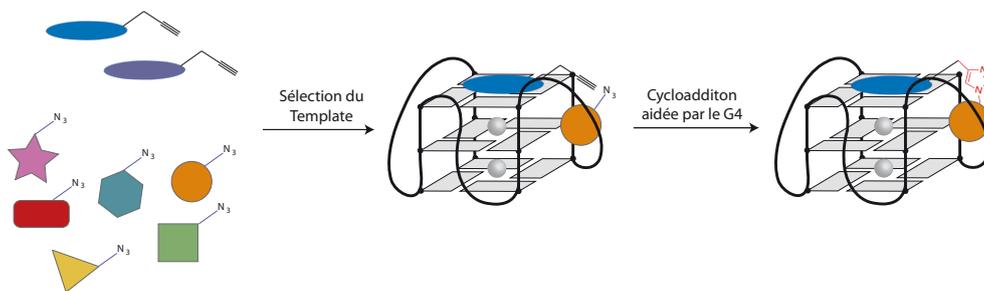


Fig. 5.5. Principe de réaction « click » in situ avec un G4 comme « template » de la réaction.

Le produit formé par cette réaction est particulièrement sélectif envers une forme de G4 (plus que les deux composés isolés). Néanmoins, les auteurs ont observé une cinétique de réaction avec les G4 comme *template* très lente en absence de cuivre. L'ajout de cuivre a permis d'accélérer cette réaction mais a également catalysé la formation de nombreux autres hétérodimères à partir des différentes espèces disponibles. La réaction entre les deux produits sélectionnés par le G4 reste néanmoins sélective en présence de cuivre. [15], [16] Ces études sont donc préliminaires puisqu'elles nécessitent l'utilisation du cuivre, mais prouvent l'utilité de cette méthode pour le développement de nouveaux ligands de G4 particulièrement sélectifs.

Une seconde application particulièrement intéressante est la formation de sondes moléculaires luminescentes. Pour cela, deux approches sont envisageables. La première nécessite la création d'une entité émettrice au cours de la réaction « click », il s'agit alors d'une réaction dite fluorogénique.[17], [18] Par exemple, la réaction de Huisgen catalysée au cuivre sur des dérivés de coumarine est une réaction de chimie « click » fluorogénique (Figure 5.6).[17]

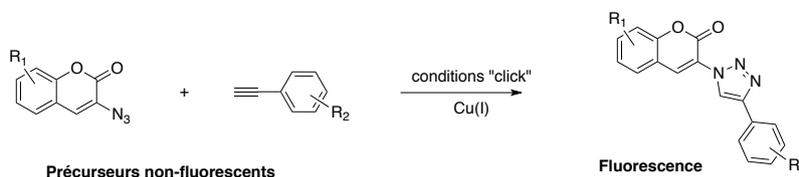


Fig. 5.6. Réaction de chimie « click » fluorogénique entre un dérivé de coumarine et un dérivé d'acétylène. [17]

La fluorescence de la coumarine est « quenchée » par la présence de l'azoture et la formation du triazole permet de rétablir cette fluorescence.

La seconde approche, largement utilisée, implique la fonctionnalisation d'un fluorophore puis l'ancrage de ce dernier sur une cible.

Cette seconde approche a permis la détection de G4 dans les cellules.[19] La pyridostatine- $\alpha$  est un analogue de la pyridostatine, ligand possédant une excellente affinité et une excellente sélectivité envers les G4, fonctionnalisé par une chaîne porteuse d'un alcyne terminal (Figure 5.7).

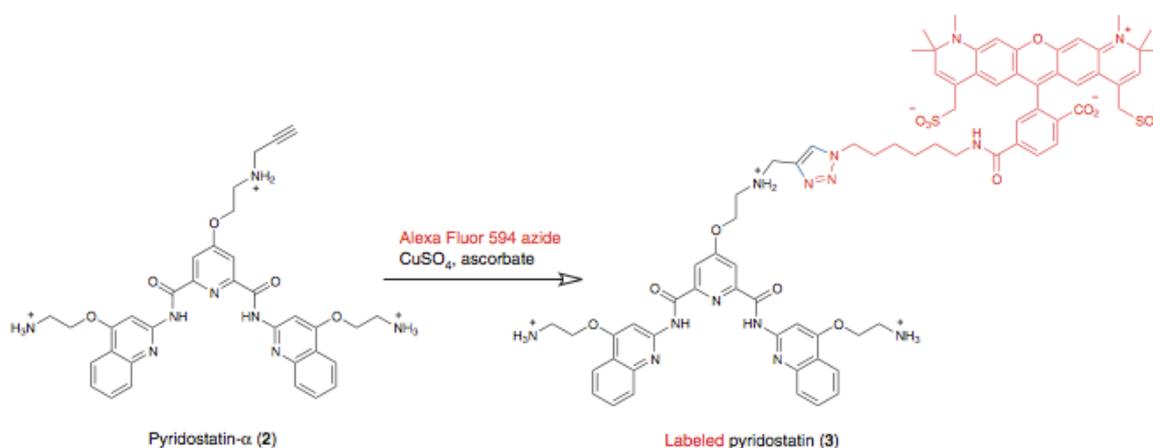


Fig. 5.7. Marquage de la pyridostatine- $\alpha$  par un fluorophore par chimie « click ». [19]

L'ajout de cette triple liaison permet l'introduction d'un fluorophore, indispensable pour la visualisation des G4 dans les cellules. Cette étude est importante puisqu'elle a permis de fournir des preuves supplémentaires quant à la présence de G4 dans les cellules humaines. Toutefois, pour ces études aussi, la présence de cuivre pose problème puisqu'il a été nécessaire de fixer les cellules afin de pouvoir faire la réaction de cyclo-addition.[19] Une méthode de chimie « click » non catalysée au cuivre constituerait donc une excellente alternative pour ce genre d'applications.

## 1.2 Cycloaddition 1,3-dipolaire avec les ylures de pyridinium

La formation d'une indolizine, fluorescente, par cycloaddition d'un ylure de pyridinium avec une triple liaison est une réaction largement décrite dans la littérature et étudiée par notre équipe à Grenoble (Dr. M. Demeunynck). Cette réaction ne fait pas partie des réactions dites "click" ; néanmoins, le travail effectué par S. Bonte durant sa thèse de doctorat a permis de définir des conditions réactionnelles compatibles avec celles de la chimie « click » non catalysée au cuivre : conditions douces (température entre 25 et 50 °C, milieux neutres ou faiblement basiques, pas de catalyseur métallique).

Pour effectuer la cycloaddition dans ces conditions, il faut introduire des groupes électroattracteurs sur le sel de pyridinium ( $R = \text{CN}, \text{CONHR}''', \text{CO}_2\text{R}''', \text{COCH}_3$ ) et sur l'alcyne (esters ou amides d'acide propiolique) (Figure 5.8).

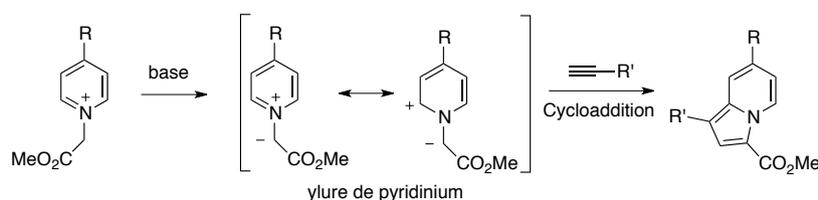


Fig. 5.8. Formation d'une indolizine par cycloaddition 1,3-dipolaire.

La présence d'une base est indispensable pour former l'ylure à partir du sel de pyridinium, en général  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NEt}_3$  ou  $\text{NH}_4\text{OH}$ , cependant la réaction a également pu être menée à pH 7.[20] Une réaction en "one-pot" a aussi été effectuée en utilisant une enzyme, une lipase, comme "poche" réactionnelle.[21] Aucun essai en présence d'ADN n'a encore été décrit pour cette réaction avec les ylures de pyridinium et l'utilisation de duplexes ou de G4 comme *templates* de la réaction serait une application particulièrement intéressante pour la suite de ce projet. Nous avons donc entrepris la synthèse d'analogues de nos complexes du ruthénium correctement fonctionnalisés afin de pouvoir mettre en jeu cette réaction avec un autre partenaire connu pour réagir avec les G4 ou un fluorophore. Il nous a semblé plus simple, dans un premier temps, de fonctionnaliser le complexe avec la triple liaison et introduire le sel de pyridinium sur l'autre partenaire de la réaction. En effet, la formation du propiolamide est réalisée par simple couplage peptidique à partir d'une amine alors que la formation du sel de pyridinium nécessite deux étapes de synthèse à partir d'une même amine. Introduire la triple liaison sur le complexe permet donc de limiter le nombre d'étapes sur ce dernier.

## 2 Résultats et discussion

### 2.1 Synthèse de $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Am}]^{2+}$ par chimie sur complexe

Une structure de complexe a donc été imaginée pour laquelle le ligand dpqp serait porteur d'une triple liaison activée par un groupe électro-attracteur de type propiolamide. Ce complexe a été nommé  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-Am}]^{2+}$  **57** (Figure 5.9).

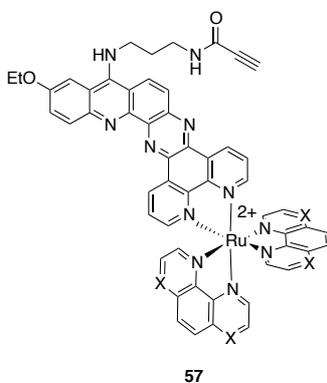


Fig. 5.9. Structure du complexe de ruthénium<sup>II</sup> fonctionnalisé par une triple liaison activée.

La voie de synthèse imaginée pour ce complexe est très similaire à celle développée pour le  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30** et repose sur le même raisonnement. La chélation directe du ligand n'est pas envisageable et la synthèse de l'*ortho*-diaminoacridine fonctionnalisée semblait compliquée. Encouragé par le succès rencontré dans le chapitre II, nous avons donc décidé de procéder à nouveau par chimie sur complexe.

La synthèse décrite dans le chapitre II et cette nouvelle synthèse divergent à partir de la substitution du chlore du complexe **39** par une amine. Une chaîne aminée linéaire possédant deux amines terminales a

été utilisée, la longueur de la chaîne ayant été choisie arbitrairement. La voie imaginée nous permettra d'obtenir le complexe désiré en deux étapes à partir du  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39** (Schéma 5.1).

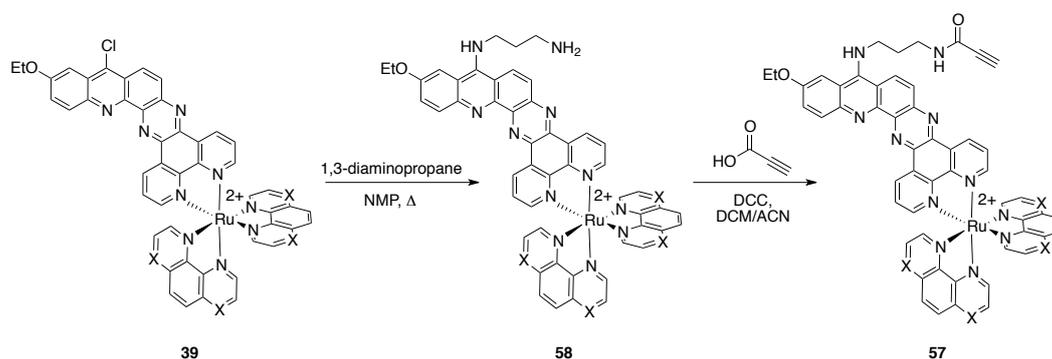


Schéma. 5.1. Fonctionnalisation du complexe par une triple liaison activée.

A nouveau, les conditions décrites dans la littérature pour la substitution des 9-chloroacridines, impliquant l'utilisation de phénol à chaud,[22][23] n'étaient pas envisageables dans notre cas.

Au vu de la faible stabilité constatée pour les complexes en série TAP, les premiers essais de substitution ont été réalisés en série phen et sont repris ci-dessous (Tableaux 4.1).

Entrées	Solvant	Température (°C)	Equivalent en réactif	Temps (h)	Résultat
1	1,3-diaminopropane	T.A. → 140 °C	Large excès	1 h	Dégradation
2	Ethanol	78 °C	1 éq. → 100 éq.	48 h	Produit de départ
3	Propanol	140 °C	1 éq. → 100 éq.	48 h	Produit désiré

Tableau 4.1. Essais de substitution sur  $39_{phen}$  par chauffage classique.

Le premier essai, pour lequel le réactif est utilisé comme solvant, ne fut pas concluant puisque la dégradation du complexe a été observée, démontrant bien la sensibilité des complexes de ruthénium en milieu basique. Le 1,3-diaminopropane a donc été dilué dans un solvant pour les essais suivants. Néanmoins, après deux jours de réaction à reflux de l'éthanol, seule une faible quantité de produit de départ avait réagi. Il a été possible d'augmenter la température en remplaçant l'éthanol par du propanol et d'obtenir ainsi le produit désiré au bout de deux jours de réaction avec un rendement de 41%. Le succès de l'utilisation du micro-onde dans les essais de substitution par la 2,2-diméthoxyéthylamine (chapitre II), menés parallèlement à ceux-ci, nous ont encouragé à procéder à de nouveaux essais.

Les premiers essais par chauffage sous irradiation micro-onde n'ont pas été très concluants pour obtenir le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]^{2+}$  **58<sub>phen</sub>**. Cette méthode permet néanmoins de réduire le nombre d'équivalents nécessaires ainsi que le temps de réaction (Tableaux 4.2).

Entrée	Solvant	Volume (mL)	T (°C)	Equivalents	Temps (min)	Résultat
1	DMF	1	140	50	30	Dégradation
2	DMF	1	140	10	30	Dégradation
3	DMF	1	140	10	40	Dégradation
4	DMF	0,5	150	15	40	Disparition complète du produit de départ, présence de produits secondaires

Tableau 4.2. Essais de substitution sous irradiation micro-onde pour former  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]^{2+}$  **58<sub>phen</sub>**.

Tout comme dans le chapitre II, les essais ont été menés sur 5 mg de complexe chloré et les rendements n'ont donc pas été calculés. Le suivi par HPLC nous a permis de suivre l'évolution de la réaction.

L'essai 4, seul essai pour lequel la réaction est complète sans trop de dégradation, nous a permis d'isoler le produit désiré avec 35% de rendement. Néanmoins, le relevé d'un spectre de masse du brut réactionnel nous a permis de détecter la présence de produits secondaires. Afin de limiter les réactions secondaires, nous avons tout d'abord remplacé le N,N-diméthylformamide par son homologue plus stable, le N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP). Nous avons aussi vérifié la pureté du 1,3-diaminopropane. Le relevé du spectre RMN  $^1\text{H}$  a montré la présence de carbonate d'ammonium, issu de la réaction d'une amine en présence de  $\text{CO}_2$ . L'ajout de quelques gouttes de triéthylamine nous a permis de retrouver le 1,3-diaminopropane pur.

Dans ces nouvelles conditions, il a été possible d'isoler le complexe désiré avec un rendement brut de 69%. Le complexe est très difficile à purifier sur colonne chromatographique et ne peut être partiellement purifié que par quelques lavages à l'eau et au diéthyl éther. Il peut cependant être engagé dans la réaction suivante sans plus de purification.

Cette fois encore, le complexe en série TAP supporte très mal ces conditions réactionnelles et malgré de nombreux essais, il a été impossible de l'isoler à cause d'une trop forte dégradation du produit.

Il a donc été décidé de ne continuer la synthèse que dans la série phen. En effet, ce complexe est principalement destiné à des études d'interaction avec l'ADN et en particulier avec les G4, et à la formation d'hétérodimères par cycloaddition. Une application photochimique n'est pas envisageable à ce stade.

La dernière étape correspond à la formation d'un propiolamide pour l'introduction de la triple liaison activée sur le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]^{2+}$  **58**<sub>phen</sub>. Cette réaction s'effectue en présence de l'acide propiolique et d'un agent de couplage, le DCC. Le complexe supporte très bien ces conditions de réaction et le produit désiré a été obtenu sans difficulté au bout de 12 heures de réaction avec 74% de rendement.

Le complexe final porteur d'une triple liaison activée, nommé  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Am}]^{2+}$  **57**<sub>phen</sub>, a été purifié par chromatographie sur colonne C<sub>18</sub> (le complexe possède des contre-ions chlorures quand il est purifié en phase inverse) avec comme éluant un mélange eau/acétonitrile (v/v 5 : 1 à 2 : 1). Il a ensuite été caractérisé par RMN <sup>1</sup>H, spectrométrie de masse et spectroscopie UV-vis.

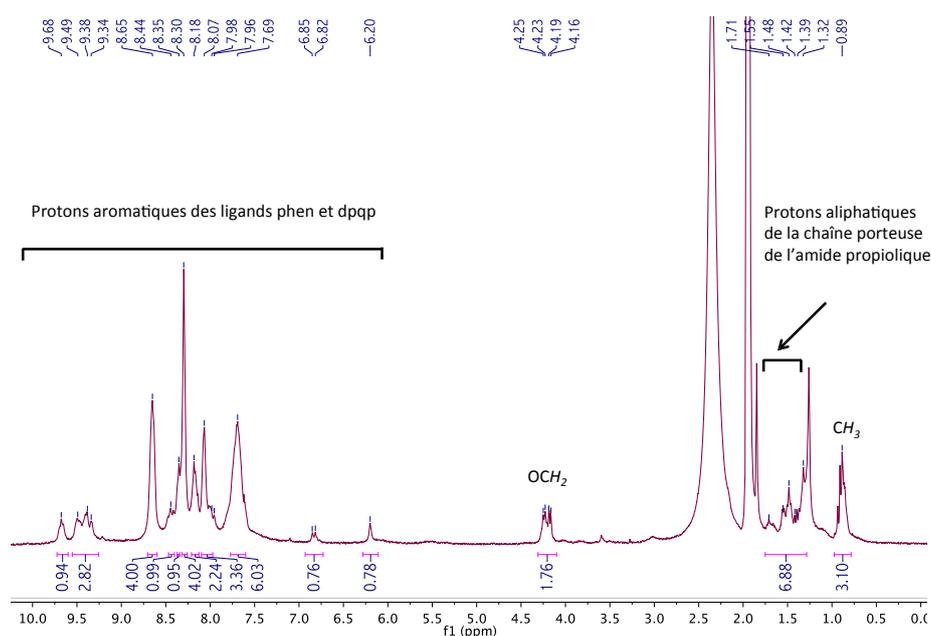


Fig. 5.10. Spectre de RMN <sup>1</sup>H du complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Am}].2\text{PF}_6$  **57**<sub>phen</sub> ( $1.10^{-2}$  M) dans  $\text{CD}_3\text{CN}$ , à 25 °C, 300 MHz.

Le spectre de RMN <sup>1</sup>H relevé dans l'acétonitrile deutéré à 300 MHz (Figure 5.10) n'est pas très résolu et nous n'avons malheureusement pas eu l'occasion d'obtenir un spectre de meilleure qualité. On distingue néanmoins la région des protons aromatiques, très semblable à toutes celles des spectres déjà obtenus pour les complexes du chapitre II. De même les protons du groupe éthoxy sont peu définis mais visibles et facilement reconnaissables. La partie caractéristique de ce spectre se situe dans la région des protons aliphatiques puisque ce complexe possède une chaîne propiolamide. A nouveau les signaux sont peu résolus mais on peut distinguer un massif entre 1,23 et 1,71 ppm intégrant pour 7 protons.

Le relevé d'un spectre de masse a cependant permis de confirmer la structure du complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Am}]^{2+}$  **57**<sub>phen</sub> (Figure 5.11).

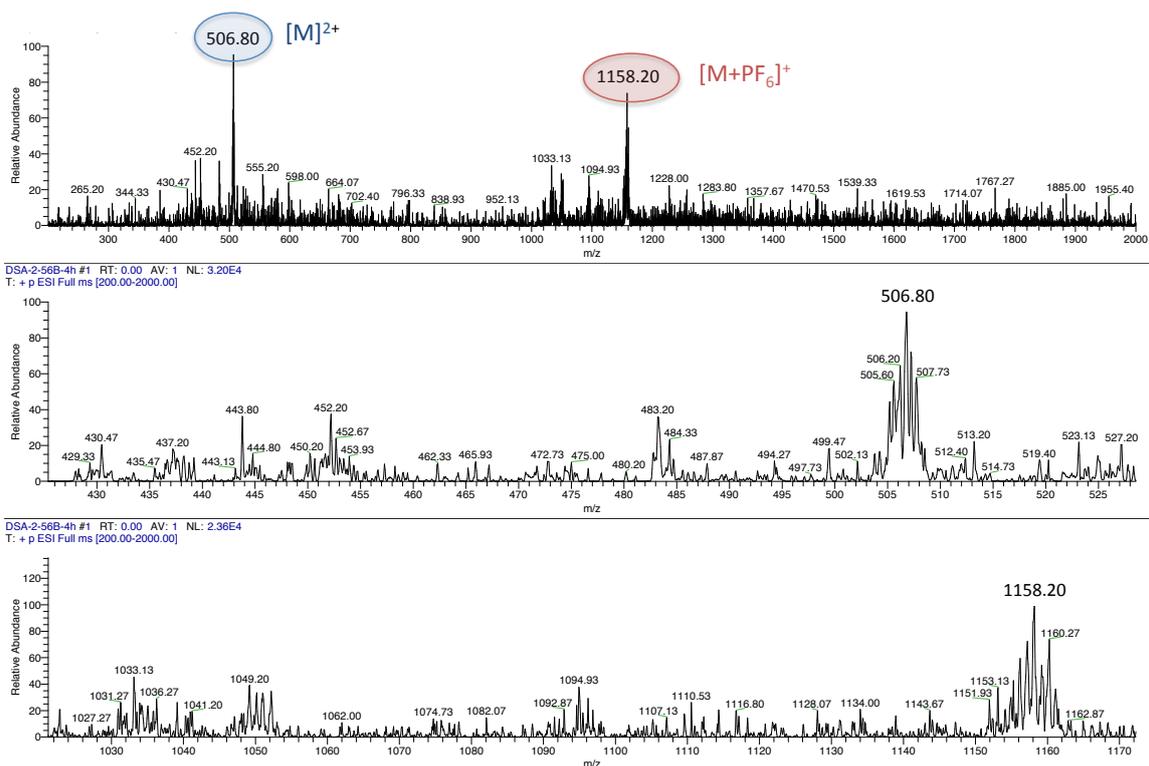


Fig. 5.11. Spectre de masse ESI-MS du complexe  $[Ru(phen)_2dpqp-Am]^{2+}$   $57_{phen}$ .

Le pic majoritaire à 506,80 Th correspond à l'espèce sans contre-ion chargée deux fois positivement. Le second pic, à 1158,20 Th, correspond à l'espèce possédant un contre-ion hexafluorophosphate, cette espèce est donc mono-chargée.

Du point de vue des propriétés photophysiques (spectre d'absorption UV-Vis, rendement quantique, temps de vie de luminescence), ce complexe est très similaire au  $[Ru(phen)_2dpqp-DMEA]^{2+}$   $40_{phen}$ .

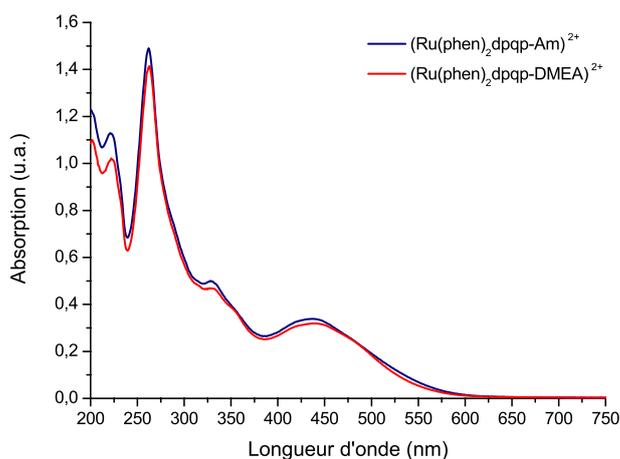


Fig. 5.12. Comparaison des spectres d'absorption des complexes  $[Ru(phen)_2dpqp-DMEA]_2Cl$   $40_{phen}$  et  $[Ru(phen)_2dpqp-Am]_2Cl$   $57_{phen}$  dans l'eau à 25 °C ( $\sim 2 \times 10^{-5}$  M).

Comme on peut le voir dans la figure 5.12, les spectres d'absorption des deux complexes sont presque superposés. De plus, tout comme le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-DMEA}]^{2+}$  **40<sub>phen</sub>**, le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Am}]^{2+}$  **57<sub>phen</sub>** n'est pas luminescent puisque les rendements quantiques sont extrêmement bas et les durées de vie de l'état excité inférieures à 5 ns. L'hypothèse du « quenching » de la luminescence par transfert de proton est tout à fait envisageable pour ce complexe puisqu'il possède également un proton acridinique disponible pour une tautomérie. On peut donc en déduire que la nature de la chaîne portée par le substituant aminé n'influence pas les propriétés photophysiques du complexe.

De nouveau, la méthode de "chimie sur complexe" nous a permis d'obtenir le produit désiré. Nous possédons maintenant un complexe fonctionnalisé par une triple liaison qui pourra être utilisé pour des essais de cycloaddition utilisant une structure G4 comme *template* ou pour la visualisation en milieu cellulaire par réaction avec un fluorophore. Nous avons, en effet, montré dans le chapitre IV que ce complexe possède une bonne affinité envers les G4 et qu'il est également sélectif par rapport aux duplexes.

Puisque nous possédons, à présent, un complexe substitué par une triple liaison activée, il s'agit de synthétiser la seconde partie de l'hétérodimère qui sera fonctionnalisé par un sel de pyridinium.

## 2.2 Synthèse d'un pérylène fonctionnalisé

Le pérylène est une structure connue pour interagir avec la tétrade des quadruplexes G4 et de nombreux analogues ont été développés.[24]–[27]

Un dérivé bisimide du pérylène (Figure 5.13), appelé pérylène dans la suite de ce travail, a donc été choisi comme partenaire pour la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire.

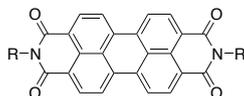


Fig. 5.13. Structure du pérylène bisimide.

La difficulté à travailler avec cette molécule réside dans la symétrie de ce composé. En effet pour former ensuite un hétérodimère, il est souhaitable de fonctionnaliser un seul côté du pérylène.

Deux voies sont envisageables, la première décrite par C. Xue *et al.*[28] permet, à partir du di-anhydride de pérylène-3,4,9,10-tétracarboxylique, d'introduire sélectivement une amine puis l'autre. Cette synthèse se fait en cinq étapes dont certaines procèdent avec un très faible rendement. La seconde voie, déjà utilisée par Wang *et al.*[29] se base sur une méthode statistique pour laquelle deux amines différentes sont mises en réaction avec le di-anhydride de pérylène-3,4,9,10-tétracarboxylique. Trois produits sont alors obtenus.

Cette seconde méthode a été préférée car elle ne nécessite qu'une seule étape de synthèse et que les produits obtenus sont séparables par chromatographie sur colonne.

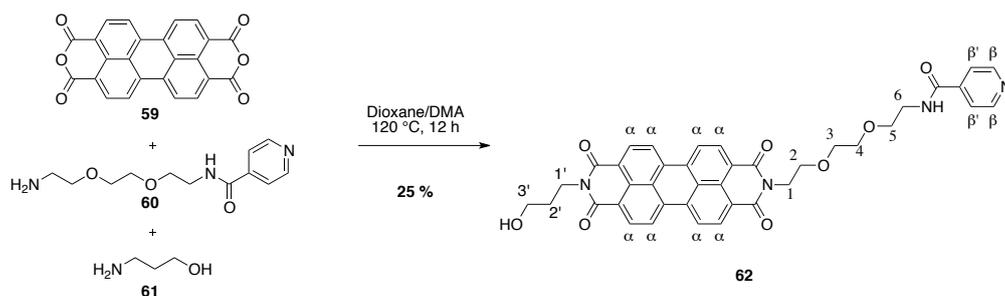


Schéma 5.2. Synthèse de pérylène di-substitué.

Nous avons tout d'abord préparé une pyridine possédant un groupe électroattracteur (nécessaire pour effectuer la cycloaddition en conditions douces). Nous avons choisi l'amide isonicotinique **60** représenté dans le schéma 5.2 qui a été préparé par couplage entre le 4-nitrophényl isonicotinate **64** et le 2,2'-(éthylènedioxy)bis(éthylamine) monoprotégé **63**. L'amine terminale est ensuite libérée quantitativement par traitement avec l'acide trifluoroacétique et le produit est obtenu avec un rendement global de 32% (Schéma 5.3).

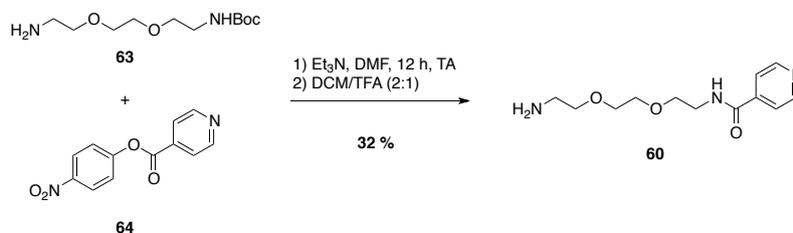


Schéma 5.3. Synthèse du composé **60**.

Le di-anhydride **59** a ensuite été mis en présence de l'amide isonicotinique **60**, et du 3-amino-propan-1-ol dans un mélange dioxane/*N,N*-diméthylacétamide (DMA). Les trois produits formés ont pu être séparés sur colonne d'alumine et le rendement de 25% en pérylène non symétrique est raisonnable compte tenu de la nature de la réaction.

Le produit a été caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  dans l'acide trifluoroacétique deutéré à 25 °C (Figure 5.14). Il n'a pas été possible d'enregistrer un spectre RMN  $^{13}\text{C}$  à cause de la très faible solubilité du produit.

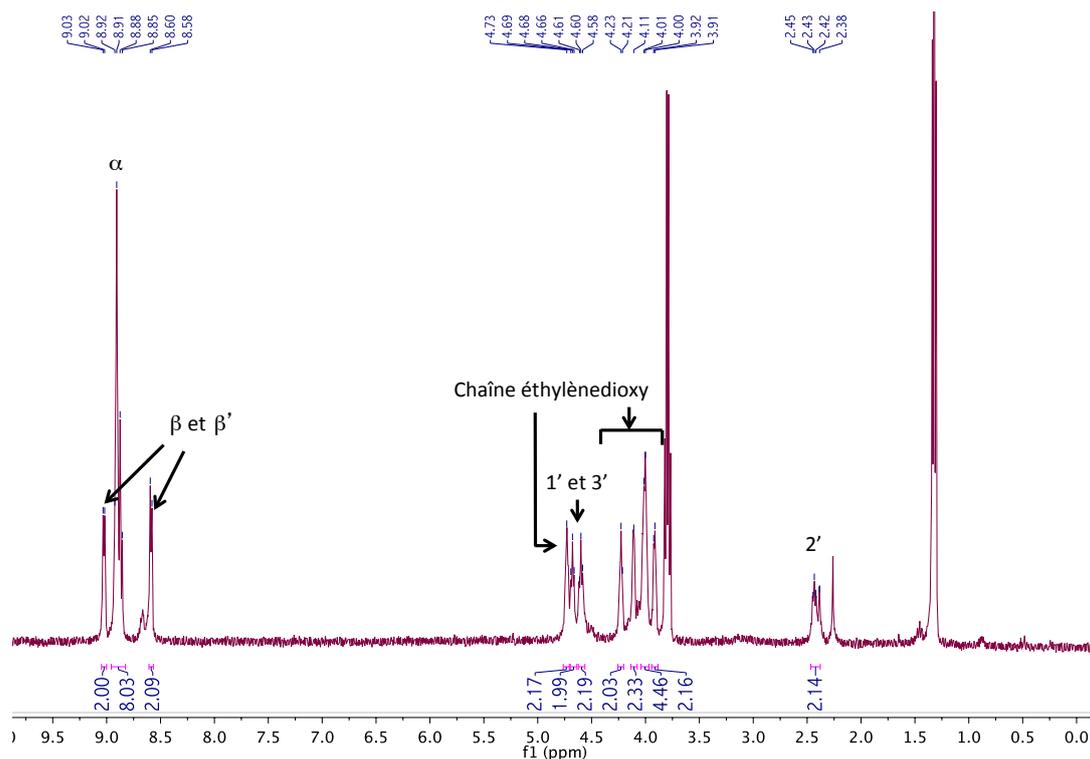


Fig. 5.14. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du pérylène disubstitué **62** dans le TFA deutéré à 25 °C.

Il est facile d'identifier les protons correspondant au pérylène et à la pyridine dans la région des protons aromatiques. Les premiers forment un massif à environ 8,9 ppm intégrant pour 8 protons et les seconds correspondent à deux doublets corrélant entre eux. Les protons de la chaîne aminopropanol sont identifiés par une expérience COSY et ont pour déplacements chimiques 4,68, 4,60 et 2,43 ppm. Les autres signaux correspondent à la chaîne éthylènedioxy.

Une fois cette étape réalisée, la pyridine a été alkylée pour obtenir un sel de pyridinium par réaction avec le bromoacétate de méthyle dans un mélange dichlorométhane/méthanol (v/v 1:1) (Schéma 5.4).

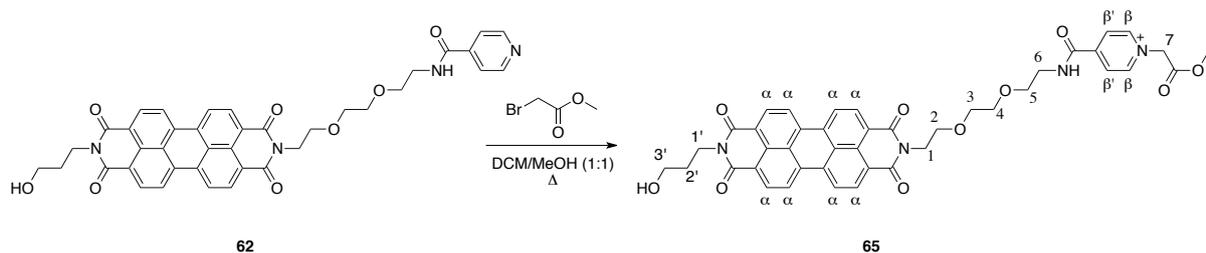


Schéma. 5.4. Formation du sel de pyridinium porté par le pérylène.

Le pérylène est extrêmement peu soluble et la réaction très lente. Nous avons cependant réussi à isoler et à caractériser par RMN  $^1\text{H}$  le produit désiré. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figures 5.15 et 5.16) a été enregistré dans le DMSO- $d_6$ , seul solvant dans lequel le produit soit suffisamment soluble. A l'instar du produit précédent, il n'a pas été possible d'obtenir un spectre en RMN  $^{13}\text{C}$  à cause de la trop faible quantité de produit dissoute en solution.

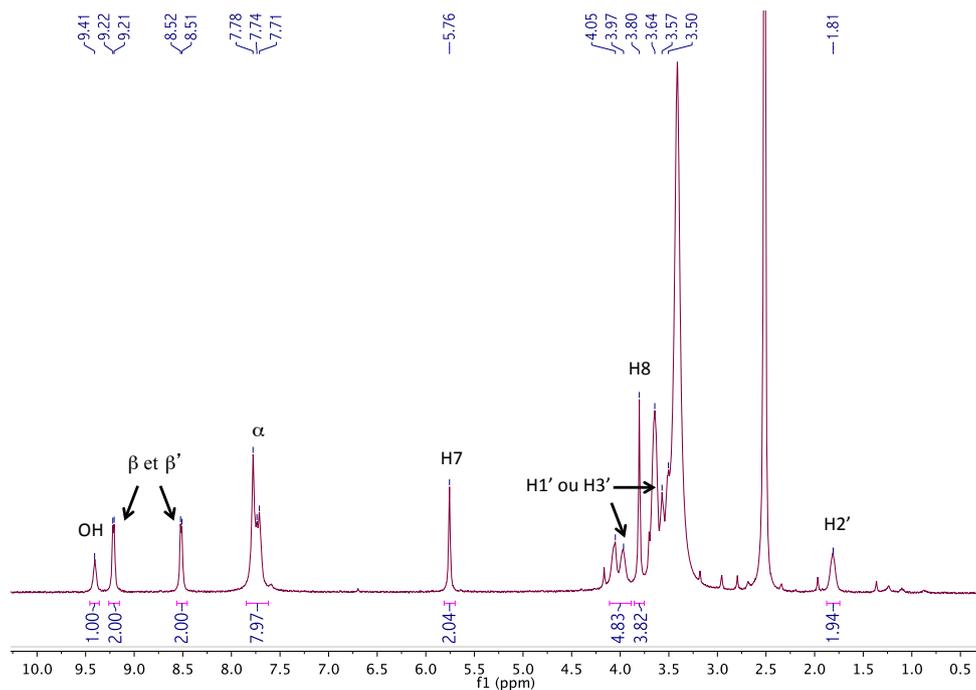


Fig. 5.15. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du pérylène fonctionnalisé par un sel de pyridinium **65** dans le DMSO- $d_6$  à 25 °C.

A nouveau, il est facile d'identifier les signaux correspondant aux protons du pérylène et de la pyridine. Malheureusement, la majorité des signaux correspondant aux protons des deux chaînes se trouvent sous le signal du solvant. On identifie néanmoins deux nouveaux signaux correspondant à deux singulets à 5,74 ppm et 3,79 ppm intégrant respectivement pour 2 ( $\text{CH}_2$ ) et 3 protons ( $\text{OCH}_3$ ).

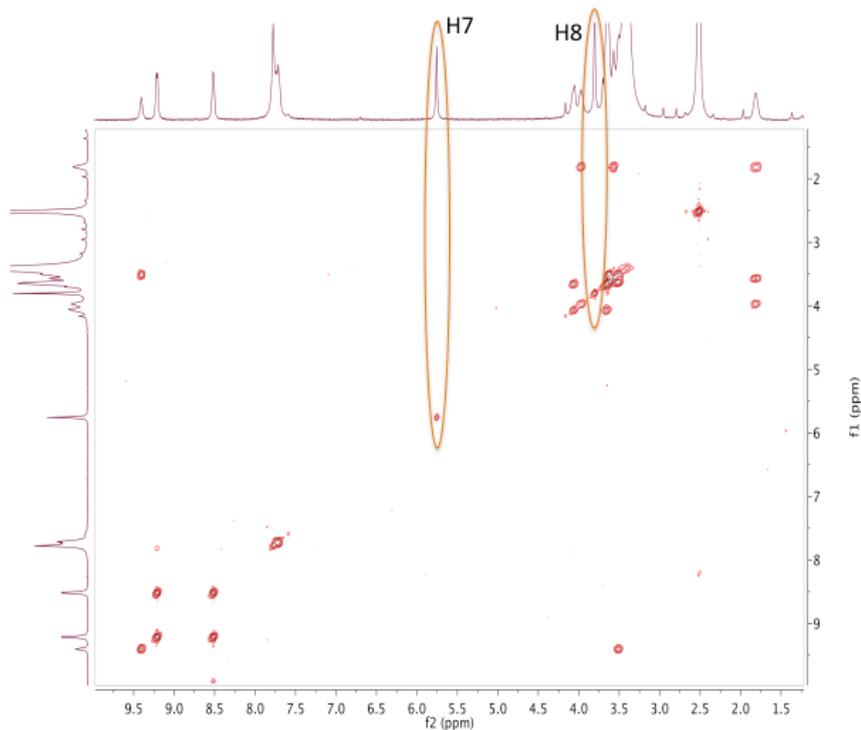


Fig. 5.16. Spectre de corrélation COSY du pérylène fonctionnalisé par un cycle pyridinium **65** dans le DMSO- $d_6$  à 25 °C et identification des protons correspondant au groupement introduit sur l'azote hétérocyclique.

Les déplacements chimiques de ces protons correspondent à ce qui a été décrit dans la littérature pour des sels de pyridinium analogues. La présence de ces deux signaux confirme ainsi que l'alkylation a bien eu lieu et que nous avons obtenu le produit désiré.

Les deux partenaires de l'hétérodimère ayant été synthétisés, nous avons tenté de réaliser la cycloaddition en milieu organique (sans intervention de G4) afin d'estimer la faisabilité de la réaction. Malheureusement, après quelques essais, suivis par HPLC, il a semblé difficile de pouvoir effectuer cette réaction. En effet, il est nécessaire d'être en milieu très concentré et l'insolubilité du pérylène est hélas un paramètre fortement limitant.

Il a donc été nécessaire de trouver un autre partenaire pour lequel il n'y aurait pas ce problème de solubilité. La synthèse d'un dérivé de naphthalimide a été réalisée par le Dr. I. Baussanne du DPM (Schéma 5.5). Les dérivés de naphthalimide sont également des molécules connues pour interagir avec les G4 [30]–[33] mais possèdent néanmoins un plan aromatique moins étendu que le pérylène, réduisant ainsi les problèmes de solubilité associés à ce genre de structures.

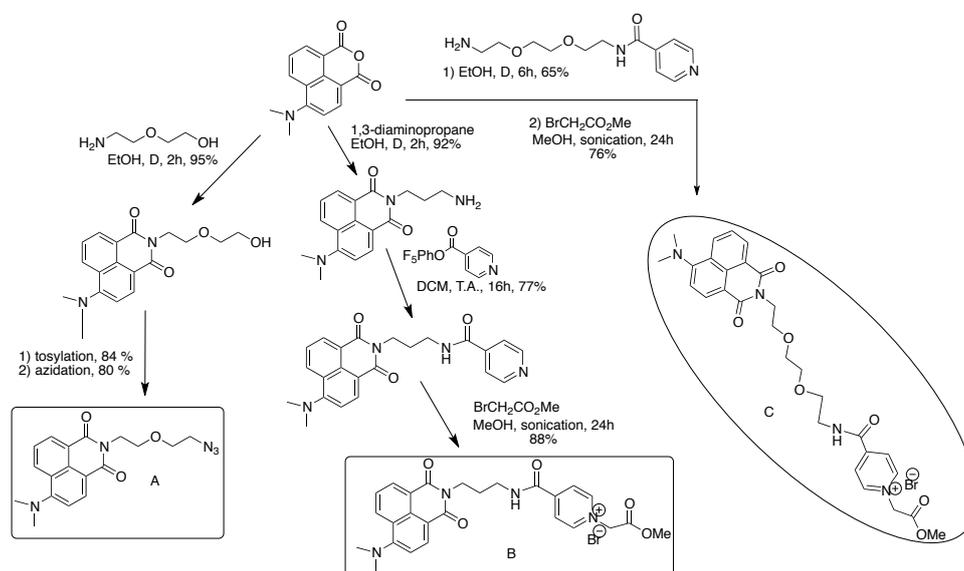


Schéma 5.5. Synthèse de trois nouveaux dérivés de naphthalimide fonctionnalisés par un azoture ou sel de pyridinium.

Trois composés ont été synthétisés, le premier fonctionnalisé par un azoture et les deux suivants par un sel de pyridinium. Ces composés sont plus solubles dans les différents solvants que le pérylène et des essais de cycloaddition avec ce nouveau partenaire sont prévus.

En conclusion, nous avons mis au point la synthèse d'un nouveau complexe de ruthénium fonctionnalisé par une triple liaison activée. La méthode de « chimie sur complexe » s'est encore une fois révélée efficace pour obtenir des composés difficilement synthétisables. De plus, comme cela a été montré dans le chapitre précédent, ce nouveau complexe possède de bonnes propriétés d'interaction avec les quadruplexes G4.

Il est donc maintenant tout à fait envisageable d'essayer la méthode de chimie « click » *in situ* avec le complexe et les dérivés de naphthalimide synthétisés par le Dr. I. Baussanne ou encore d'imaginer une réaction « click » avec un fluorophore pour la détection de G4 *in vivo*.

## Bibliographie

- [1] J. E. Moses and A. D. Moorhouse, "The growing applications of click chemistry.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 36, no. 8, pp. 1249–1262, 2007.
- [2] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 40, no. 11, pp. 2004–2021, 2001.
- [3] R. Huisgen, "Summary for Policymakers," in *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*, vol. 2, no. 11, Intergovernmental Panel on Climate Change, Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1963, pp. 1–30.
- [4] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, "A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective 'Ligation' of Azides and Terminal Alkynes," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 41, no. 14, pp. 2596–2599, 2002.
- [5] C. T. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal, "Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides," *J. Org. Chem.*, vol. 67, no. 9, pp. 3057–3064, 2002.
- [6] L. Zhang, X. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, and G. Jia, "Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 46, pp. 15998–15999, 2005.
- [7] E. Rasolofonjatovo, S. Theeramunkong, A. Bouriaud, S. Kolodych, M. Chaumontet, and F. Taran, "Iridium-Catalyzed Cycloaddition of Azides and 1-Bromoalkynes at Room Temperature," *Org. Lett.*, vol. 15, no. 18, pp. 4698–4701, 2013.
- [8] C. D. Smith and M. F. Greaney, "Zinc Mediated Azide–Alkyne Ligation to 1,5- and 1,4,5-Substituted 1,2,3-Triazoles," *Org. Lett.*, vol. 15, no. 18, pp. 4826–4829, 2013.
- [9] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, and C. R. Bertozzi, "A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides," *ACS Chem. Biol.*, vol. 1, no. 10, pp. 644–648, 2006.
- [10] N. J. Agard, J. A. Prescher, and C. R. Bertozzi, "A Strain-Promoted [3+2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 46, pp. 15046–15047, 2004.
- [11] E. M. Sletten and C. R. Bertozzi, "A hydrophilic azacyclooctyne for cu-free click chemistry," *Org. Lett.*, vol. 10, no. 14, pp. 3097–3099, 2008.
- [12] J. C. Jewett, E. M. Sletten, and C. R. Bertozzi, "Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 11, pp. 3688–3690, 2010.
- [13] W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radić, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, "Click Chemistry In Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 41, no. 6, pp. 1053–1057, 2002.
- [14] R. Manetsch, A. Krasiński, Z. Radić, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, and H. C. Kolb, "In Situ Click Chemistry: Enzyme Inhibitors Made to Their Own Specifications," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 40, pp. 12809–12818, 2004.
- [15] M. Hu, X. Chen, S. Chen, T. Ou, M. Yao, L. Gu, Z.-S. Huang, and J.-H. Tan, "A new application of click chemistry in situ: development of fluorescent probe for specific G-quadruplex topology," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 17202, 2015.
- [16] M. Di Antonio, G. Biffi, A. Mariani, E.-A. Raiber, R. Rodriguez, and S. Balasubramanian, "Selective RNA Versus DNA G-Quadruplex Targeting by In Situ Click Chemistry," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 51, no. 44, pp. 11073–11078, 2012.

- [17] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, and Q. Wang, "A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes," *Org. Lett.*, vol. 6, no. 24, pp. 4603–4606, 2004.
- [18] C. Le Droumaguet, C. Wang, and Q. Wang, "Fluorogenic click reaction," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 4, pp. 1233–1239, 2010.
- [19] R. Rodriguez, K. M. Miller, J. V Forment, C. R. Bradshaw, M. Nikan, S. Britton, T. Oelschlaegel, B. Xhemalce, S. Balasubramanian, and S. P. Jackson, "Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 3, pp. 301–310, 2012.
- [20] S. Bonte, I. O. Ghinea, I. Baussanne, J. P. Xuereb, R. Dinica, and M. Demeunynck, "Investigation of the lipase-catalysed reaction of aliphatic amines with ethyl propiolate as a route to N-substituted propiolamides," *Tetrahedron*, vol. 69, no. 26, pp. 5495–5500, 2013.
- [21] R. Dinica, B. Furdui, I. Ghinea, G. Bahrim, S. Bonte, and M. Demeunynck, "Novel One-Pot Green Synthesis of Indolizines Biocatalysed by *Candida antarctica* Lipases," *Mar. Drugs*, vol. 11, no. 2, pp. 431–439, 2013.
- [22] L. Bouffier, "Thèse de doctorat : Synthèse d'hétérocycles azotés dérivés d'acridine et étude de leur interaction avec l'ADN," Université Joseph Fourier, Grenoble, 2005.
- [23] L. Bouffier, R. Dinica, J. Debray, P. Dumy, and M. Demeunynck, "Functionalization of the A ring of pyridoacridine as a route toward greater structural diversity. Synthesis of an octacyclic analogue of eilatin," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 16, pp. 4836–4838, 2009.
- [24] L. Rossetti, M. Franceschin, S. Schirripa, A. Bianco, G. Ortaggi, and M. Savino, "Selective interactions of perylene derivatives having different side chains with inter- and intramolecular G-quadruplex DNA structures. A correlation with telomerase inhibition," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 15, no. 2, pp. 413–420, 2005.
- [25] L. Rossetti, M. Franceschin, A. Bianco, G. Ortaggi, and M. Savino, "Perylene diimides with different side chains are selective in inducing different G-Quadruplex DNA structures and in inhibiting telomerase," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 12, no. 18, pp. 2527–2533, 2002.
- [26] E. Micheli, C. M. Lombardo, D. D'Ambrosio, M. Franceschin, S. Neidle, and M. Savino, "Selective G-quadruplex ligands: The significant role of side chain charge density in a series of perylene derivatives," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 14, pp. 3903–3908, 2009.
- [27] L. Xue, N. Ranjan, and D. P. Arya, "Synthesis and Spectroscopic Studies of the Aminoglycoside (Neomycin)–Perylene Conjugate Binding to Human Telomeric DNA," *Biochemistry*, vol. 50, no. 14, pp. 2838–2849, 2011.
- [28] C. Xue, R. Sun, R. Annab, D. Abadi, and S. Jin, "Perylene monoanhydride diester: a versatile intermediate for the synthesis of unsymmetrically substituted perylene tetracarboxylic derivatives," *Tetrahedron Lett.*, vol. 50, no. 8, pp. 853–856, 2009.
- [29] K. R. Wang, Z. B. Yang, and X. L. Li, "High excimer-state emission of perylene bisimides and recognition of latent fingerprints," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 21, no. 15, pp. 5680–5684, 2015.
- [30] Z. Ou, Y. Qian, Y. Gao, Y. Wang, G. Yang, Y. Li, K. Jiang, and X. Wang, "Photophysical, G-quadruplex DNA binding and cytotoxic properties of terpyridine complexes with a naphthalimide ligand," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 43, pp. 36923–36931, 2016.
- [31] A. Peduto, B. Pagano, C. Petronzi, A. Massa, V. Esposito, A. Virgilio, F. Paduano, F. Trapasso, F. Fiorito, S. Florio, C. Giancola, A. Galeone, and R. Filosa, "Design, synthesis, biophysical and biological studies of trisubstituted naphthalimides as G-quadruplex ligands," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 19, no. 21, pp. 6419–6429, 2011.
- [32] M. Nadai, F. Doria, M. Di Antonio, G. Sattin, L. Germani, C. Percivalle, M. Palumbo, S. N. Richter, and

M. Freccero, "Naphthalene diimide scaffolds with dual reversible and covalent interaction properties towards G-quadruplex," *Biochimie*, vol. 93, no. 8, pp. 1328–1340, 2011.

- [33] W. Zhang, M. Chen, Y. Ling Wu, Y. Tanaka, Y. Juan Ji, S. Lin Zhang, C. He Wei, and Y. Xu, "Formation and stabilization of the telomeric antiparallel G-quadruplex and inhibition of telomerase by novel benzothioxanthene derivatives with anti-tumor activity," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 13693, 2015.

## *Conclusions et perspectives*

# Conclusions et perspectives

Le travail réalisé pendant cette thèse a porté sur trois axes principaux : la synthèse, l'étude photophysique et l'étude d'interaction de nouveaux complexes à ligand plan très étendu avec les quadruplexes G4.

## Synthèse

La synthèse de 10 nouveaux complexes (Figures 6.1 et 6.2) a pu être réalisée par une méthode de chimie sur complexe. Cette méthode est encore peu développée dans la littérature mais nous a cependant permis d'accéder à des molécules difficilement synthétisables par d'autres voies de synthèse. Les rendements globaux de ces réactions sont assez bons puisque nous avons obtenu des valeurs de 43% sur 4 étapes à partir du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{phendione}]^{2+}$  pour l'obtention du composé  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30**<sub>phen</sub>, de 16% pour le même composé en série TAP **30**<sub>TAP</sub> et de 42% pour le complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppq-Am}]^{2+}$  **57**<sub>phen</sub> également en 4 étapes à partir du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{phendione}]^{2+}$ . Nous avons, au cours de ces synthèses, mis en évidence la plus faible stabilité des complexes en série TAP vis-à-vis de la substitution par différentes amines. Ces complexes sont probablement plus sensibles aux conditions basiques à cause de l'effet électroattracteur plus important des ligands TAP par rapport aux ligands phen.

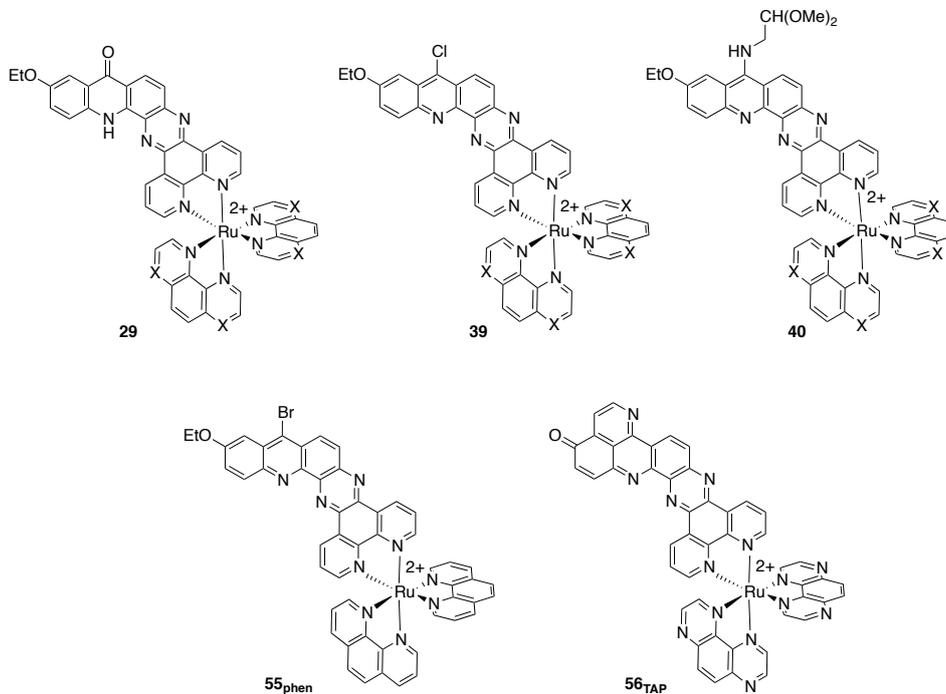


Fig. 6.1. Structure des complexes synthétisés lors de ce travail

Parmi les complexes synthétisés, les complexes finaux,  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30** et  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp-Am}]^{2+}$  **57<sub>phen</sub>** ( $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dppqp-Am}]^{2+}$  n'ayant pas pu être synthétisé) possèdent chacun leur particularité (Figure 6.2).

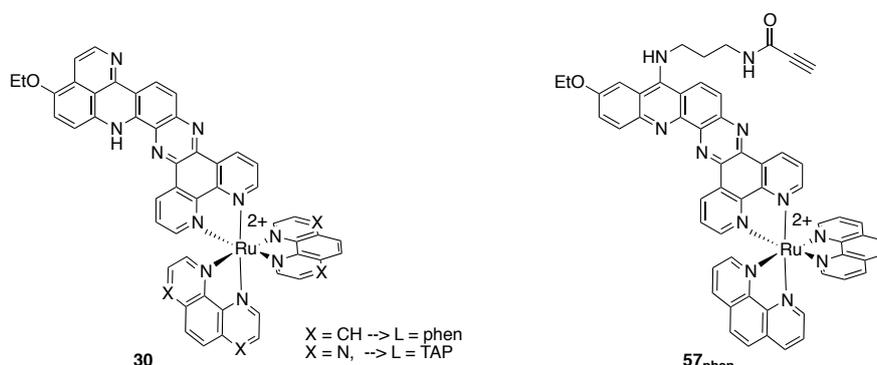


Fig. 6.2. Structure des complexes finaux  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30** et  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp-Am}]^{2+}$  **57<sub>phen</sub>**.

Les premiers,  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30**, possèdent un ligand avec un cycle supplémentaire par rapport aux autres ligands de ce travail. Le second est quant à lui fonctionnalisé par une triple liaison en vue d'applications en chimie « click » et en chimie « click » *in situ*.

#### Interaction avec les quadruplexes G4

La structure de ces complexes a été imaginée pour l'interaction avec les conformations quadruplexes G4 de l'ADN. En effet, ces complexes possèdent tous un ligand plan étendu particulièrement large capable d'interagir avec la tétrade du G4. Des études de « FRET-Melting » (réalisées sur les composés en série phen et bpy) ont permis de montrer que les complexes synthétisés étaient en effet capables de stabiliser les quadruplexes G4 puisque dans la majorité des cas, un  $\Delta T_{1/2}$  supérieur à 10 °C a été mesuré. Le mode d'interaction entre ces complexes et les différentes structures de quadruplexes G4 n'est pas encore défini. Des études d'interaction compétitives avec le TG5T semblent indiquer qu'il s'agit d'un mode d'interaction double impliquant la tétrade et les boucles de quadruplexe G4. Des études par dichroïsme circulaire permettront de confirmer ces résultats.

La taille du ligand imaginé est un paramètre important du point de vue de la sélectivité envers les quadruplexes G4 par rapport au duplex puisque nous avons pu montrer lors d'études compétitives d'interaction avec le ds26 par « FRET-melting », que les complexes sont sélectifs envers les différents G4 étudiés malgré la présence d'une charge positive sur le centre métallique. De plus, parmi les complexes étudiés, les plus sélectifs sont ceux possédant un plus fort encombrement stérique au niveau du ligand dpqp ou un ligand plus étendu, particulièrement les complexes  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp}].2\text{Cl}$  **30<sub>phen</sub>** et  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppqp}].2\text{Cl}$  **30<sub>bpy</sub>**. Notre hypothèse est que le ligand serait trop grand pour le site d'interaction qu'offre la double hélice et de la bonne taille pour interagir avec la tétrade du G4.

#### Applications à la chimie « click »

Le complexe  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppqp-Am}]^{2+}$  **57<sub>phen</sub>** possède lui aussi le potentiel pour être un bon ligand de G4. Ce complexe possède donc les propriétés requises pour imaginer par la suite de l'utiliser

pour des applications de chimie « click » *in situ* en présence de G4. En effet, ce complexe possède une triple liaison activée disponible pour une cycloaddition 1,3 dipolaire avec un ylure de pyridinium. Cette réaction, développée à Grenoble, ne nécessite pas la présence de cuivre et peut être réalisée en conditions douces (de 25 à 50 °C, milieux neutres ou faiblement basiques). Il serait ainsi possible de former des hétérodimères particulièrement sélectifs envers les quadruplexes G4 en utilisant les G4 eux-mêmes comme *template* de la réaction de cycloaddition. Il est également important de mentionner que l'indolizine formée lors de la cycloaddition est une molécule fluorescente et que cette cycloaddition peut donc être classée parmi les réactions fluorogéniques. Cette propriété est également intéressante pour la détection des G4 *in vitro* et *in vivo* par luminescence. Un dérivé de pérylène bis-imide, fonctionnalisé par un pyridinium, a d'ailleurs été synthétisé durant cette thèse afin de constituer un partenaire pour une réaction de cycloaddition non catalysée au cuivre avec ce nouveau complexe. Malheureusement, les quelques essais de cycloaddition menés n'ont pas été concluants à cause de la faible solubilité du pérylène et de nouveaux essais seront menés sur des dérivés de naphthalimide dont la synthèse a déjà été réalisée par le Dr. I. Baussanne.

Une seconde perspective serait la synthèse d'un nouveau complexe pouvant allier les deux caractéristiques des complexes finaux, c'est à dire possédant un cycle supplémentaire et porteur d'une triple liaison (Figure 6.3).

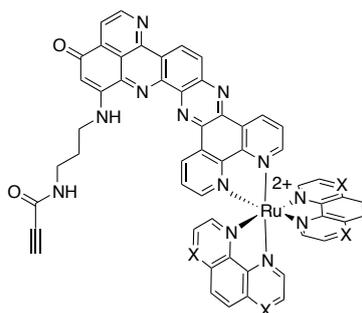


Fig. 6.3. Structure d'un complexe de  $Ru^{II}$  porteur d'un ligand octacyclique fonctionnalisé par une triple liaison.

Ce complexe posséderait peut-être alors une sélectivité accrue envers les G4 grâce à la présence du ligand octacyclique et la capacité de former un hétérodimère par cycloaddition avec un autre partenaire. L'introduction d'une chaîne aminée sur cette position a déjà été réalisée pour des pyridoacrinines tétracycliques[1] et la synthèse de ce nouveau composé peut être imaginé en deux étapes à partir du complexe  $[Ru(L)_2dppqp_{ox}]^{2+}$  (dont la synthèse est décrite dans le chapitre II).

### Etude photophysique

Du point de vue photophysique, la majorité des complexes synthétisés possèdent un comportement inhabituel par rapport aux autres complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> déjà décrits dans la littérature. En effet, tous les complexes, à l'exception du  $[Ru(L)_2dppq-Cl]^{2+}$  **39**<sub>phen</sub> et du  $[Ru(TAP)_2dppqp_{ox}]^{2+}$  **56**<sub>TAP</sub>, ne présentent qu'une faible intensité de luminescence et des temps de vie de luminescence inférieurs à 5 ns. L'hypothèse avancée implique la présence d'un « quenching » de l'état excité par transfert de proton intramoléculaire et ce, que la transition soit de type MLCT ou ILCT (Figure 6.4).

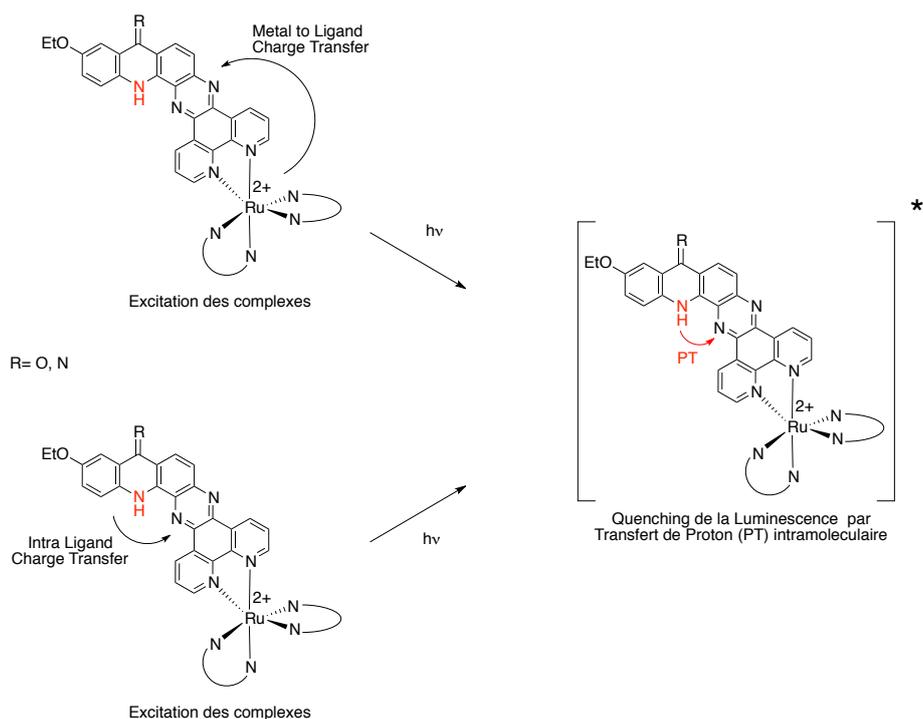


Fig. 6.4. Hypothèses avancées pour expliquer le « quenching » de la luminescence observé pour certains des complexes synthétisés (29, 30, 40 et 57).

Cette hypothèse du transfert de proton provient notamment du fait que les seuls complexes à être luminescents sont des complexes ne possédant pas de proton sur la partie acridine du ligand dpqp. Il est, de plus, vraisemblable que le ligand lui-même possède cette propriété de transfert de proton à l'état excité dénommé ES IPT. Le spectre d'absorption du ligand dpqp-OH révèle l'existence d'une bande vers 460 nm qui pourrait correspondre à une transition de transfert de charge au sein du ligand. Ceci avait également été observé pour le ligand dppqp [2] et renforce l'hypothèse de la présence d'une transition ILCT présente aux alentours de 500 nm dans les spectres d'absorption des différents complexes non luminescents. Cette transition entraînerait la création d'un dipôle au sein du ligand dpqp ou dppqp et favoriserait le transfert de proton à l'état excité.

### Photophysique des complexes en interaction avec l'ADN

Trois des complexes synthétisés ont néanmoins été étudiés pour leurs propriétés photophysiques intéressantes du point de vue de leur application en milieu biologique. Le  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39**<sub>TAP</sub> possède toutes les caractéristiques d'un complexe photo-oxydant similaire au  $[\text{Ru}(\text{TAP})_3]^{2+}$ . Ce complexe possède donc le potentiel pour former des liens covalents avec des biomolécules et particulièrement les G4. Des études photochimiques en présence de GMP permettront de confirmer ce dernier point.

Le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+}$  **39**<sub>phen</sub> possède quant à lui un comportement « light-switch ON » similaire au  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ . En effet, ce complexe, très peu luminescent dans l'eau, voit sa luminescence augmenter dans les solvants organiques ou en présence d'ADN. L'analogue, le  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Br}]^{2+}$  **55**<sub>phen</sub>, semble également posséder cette propriété particulière puisque des études préliminaires nous

ont permis d'établir que ce complexe n'est pas luminescent dans l'eau et l'est dans l'acétonitrile. Ce complexe a été synthétisé comme alternative au  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp}\text{-Cl}]^{2+}$  puisqu'il est plus stable en milieu aqueux que son analogue.

Cette propriété a d'ailleurs été exploitée en présence de quadruple G4 (mesures réalisées par M. Bellakhal). Pour cette étude, l'intensité de luminescence des complexes  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp}\text{-Cl}]^{2+}$  **39**<sub>phen</sub> et  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp}\text{-Br}]^{2+}$  **55**<sub>bpy</sub> (fourni par le Dr. J.F. Lefebvre) a été mesurée en présence de G4 mais également en présence d'un mélange de G4 et d'ADN double brin. Des augmentations d'intensité de luminescence spectaculaires ont été observées en présence de certains G4 et ces complexes, particulièrement le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp}\text{-Br}]^{2+}$  **55**<sub>bpy</sub>, se sont révélés très sélectifs envers les G4 du point de vue de leur luminescence. Ces composés possèdent donc un gros potentiel en tant que sonde luminescente pour la détection de G4 *in vivo* et *in vitro* et il serait également intéressant d'évaluer les propriétés du  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp}\text{-Br}]^{2+}$  **55**<sub>phen</sub> comme alternative au  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp}\text{-Cl}]^{2+}$  **39**<sub>phen</sub>. Des études préliminaires d'imagerie cellulaires ont été réalisées par le Dr. Amor à l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne avec le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dpqp}\text{-Br}]^{2+}$  **55**<sub>bpy</sub>. Les résultats obtenus sont prometteurs et sont poursuivis par le groupe du Dr. D. Monchaud.

### Dé-éthylation oxydative sous illumination

Un comportement particulier a été observé pour la majorité des complexes étudiés sous illumination et particulièrement pour le  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30** qui, sous illumination, semble subir une dé-éthylation oxydative résultant en la formation probable du  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}_{\text{ox}}]^{2+}$  **56**. Ce comportement est tout à fait inattendu et particulièrement intéressant puisque l'espèce formée est luminescente, contrairement à l'espèce de départ. Le mécanisme de cette photo-réaction reste encore incertain et il serait, par conséquent, intéressant de comprendre ce mécanisme par des études plus poussées sous illumination.

### Perspectives

Toutes les hypothèses concernant le « quenching » par transfert de proton intramoléculaire à l'état excité doivent encore être confirmées, d'une part par études théoriques concernant les niveaux des différentes orbitales moléculaires et, d'autre part par l'étude de nouveaux composés pour lesquels le proton ne serait pas présent. Deux structures sont actuellement envisagées (Figure 6.5).

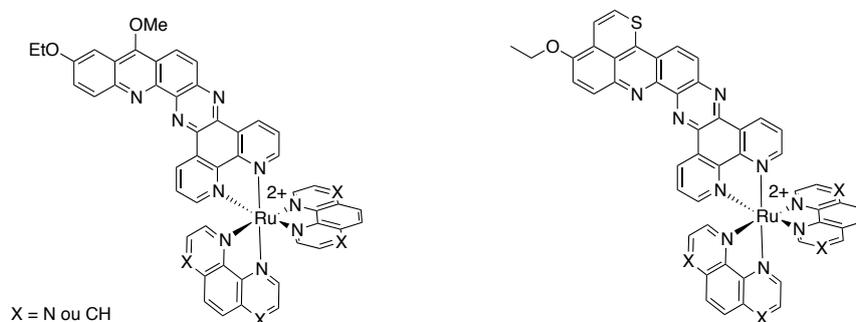


Fig. 6.5. Structures de complexes ne possédant pas de proton disponible pour un ESIPT.

Le premier complexe correspond au complexe  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dpqp-OH}]^{2+}$  **29** qui aurait été méthylé sur la partie acridine. Le second est un complexe porteur d'un ligand octacyclique analogue soufré à celui synthétisé durant ce travail. Ces deux complexes ne possèdent pas de proton sur l'acridine et le second pourrait être une bonne alternative au  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$  **30** pour l'interaction avec les G4 dans le cas où il serait luminescent. Il serait ainsi possible d'allier la sélectivité du ligand octacyclique envers les G4 avec les propriétés photophysiques généralement observées pour les complexes de ruthénium.

## Bibliographie

- [1] L. Bouffier, “Thèse de doctorat : Synthèse d’hétérocycles azotés dérivés d’acridine et étude de leur interaction avec l’ADN,” Université Joseph Fourier, Grenoble, 2005.
- [2] L. Bouffier, R. Dinica, J. Debray, P. Dumy, and M. Demeunynck, “Functionalization of the A ring of pyridoacridine as a route toward greater structural diversity. Synthesis of an octacyclic analogue of eilatin,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 16, pp. 4836–4838, 2009.

## *Partie expérimentale*

# Partie expérimentale

---

## 1 Produits et solvants

Tous les produits et solvants proviennent des fournisseurs suivants : Alfa Aesar, Sigma Aldrich, analaR NORMAPUR, Acros, Fisher Scientific et Chem-Lab. Tous les solvants deutérés utilisés pour les spectres RMN proviennent de Euriso-Top. La silice et l'alumine ont été achetées chez Sigma Aldrich et ROCC, et la C18 chez Fluka.

Les produits ont été utilisés sans plus de purification.

La 3,4-diamino-7-éthoxy-pyridoacridine a été synthétisée selon la procédure décrite par L. Bouffier [1]

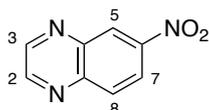
Tous les oligonucléotides d'ADN et d'ARN marqués et non marqués ont été achetés chez Eurogentec (Seraing, Belgique).

## 2 Synthèses et caractérisations

### 2.1 Synthèse des ligands

#### 2.1.1 Synthèse du 1,4,5,8-tétraazaphénanthrène (TAP)

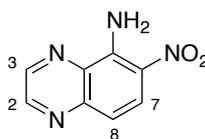
#### 6-nitroquinoxaline (47)[2]



The synthesis of the 6-nitroquinoxaline **47** was performed as described in the litterature. 1,2-Diamino-4-nitrobenzene (23.6 g, 145 mmol) was dissolved in 200 mL of warm ethanol. To this was added dropwise glyoxal 40% (33 mL, 361 mmol). The resulting mixture was refluxed for two hours. The reaction was followed by TLC (SiO<sub>2</sub>, hexane/acetone v/v 7 :3). Once the reaction over, the temperature was lowered to room temperature and the resulting suspension was filtered. The solid was washed with cold methanol then purified by recrystallisation in acetic acid/water (v/v 75 :25). The solid was obtained as pink needles with a yield of 80%.

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 300 MHz) :**  $\delta$  (ppm) 9.04 (2H, s, H<sub>2</sub> and H<sub>3</sub>), 8.95 (1H, d, H<sub>5</sub>, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz), 8.54 (1H, dd, H<sub>7</sub>, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz), 8.29 (1H, d, H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 75.5 MHz) :**  $\delta$  (ppm) 149.51, 148.81, 146.28, 142.69, 132.30, 126.65, 124.32. **ESI-MS :** m/z<sub>calc</sub> = 175.04 ; m/z<sub>obs</sub> : 176.00 (M+H<sup>+</sup>, 100 %).

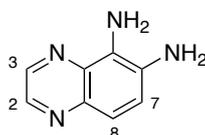
### 5-amino-6-nitroquinoxaline (48) [2]



The synthesis of the 5-amino-6-nitroquinoxaline **48** was performed as described in the literature. Metallic sodium (4.6 g, 200 mmol) was added in small portions to 250 mL of methanol. To the resulting solution of sodium methanolate was added 100 mL of a solution of hydroxylamine chlorhydrate (6.6 g, 90 mmol) in methanol. The resulting salt was filtered and the filtrate was poured on a refluxing suspension of 6-nitroquinoxaline **47** (10.5 g 60 mmol) in methanol (500 mL). The reaction was refluxed for two hours and followed by TLC (SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub> with 2 drops of ammonia). The mixture was then cooled in the fridge for 12 hours. The solid was filtered and purified by recrystallisation in acetic acid/water 75 :25. The product was obtained as brown needles and 63% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)** : δ (ppm) 9.10 (1H, d, H<sub>3</sub> or H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 1.8 Hz), 8.94 (1H, d, H<sub>2</sub> or H<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 1.8 Hz), 8.51 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 8.30 (1H, d, H<sub>7</sub>, <sup>3</sup>J = 9.7 Hz), 7.19 (1H, d, H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 9.7 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75.5 MHz)** : δ (ppm) 148.80, 145.79, 145.03, 143.17, 134.11, 126.05, 114.31. **ESI-MS** : m/z<sub>calc</sub> = 190.05 ; m/z<sub>obs</sub> : 191.07 (M+H<sup>+</sup>, 100%), 214.13 (M+Na<sup>+</sup>, 32%).

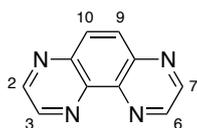
### 5,6-diaminoquinoxaline (49) [2]



The synthesis of 5,6-diaminoquinoxaline was performed as described in the literature. Hydrazine hydrate 98% (7.6 mL) was added dropwise to 300 mL of a suspension of 5-amino-6-nitroquinoxaline **48** (6.0 g, 31.5 mmol) (**2**) and Pd/C 10% (1.1 g) in ethanol. The mixture was heated to reflux and followed by TLC (SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>/acetone v/v 8 :2). The reaction was stopped after two hours and the suspension was filtered on celite. The filtrate was evaporated under reduced pressure, the solid was then purified by recrystallisation in toluene. The product was obtained as orange needles with a yield of 58%.

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 300 MHz)** : δ (ppm) 8.58 (1H, d, H<sub>2</sub> or H<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 1.8 Hz), 8.53 (1H, d, H<sub>2</sub> or H<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 1.8 Hz), 7.31 (2H, syst AB, H<sub>7</sub> and H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz), 4.58 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 4.26 (2H, s, NH<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 75.5 MHz)** : δ (ppm) 143.38, 142.14, 138.96, 134.50, 134.02, 127.78, 122.93, 119.01. **ESI-MS** : m/z<sub>calc</sub> = 160.07 ; m/z<sub>obs</sub> : 161.20 (M+H<sup>+</sup>, 100%).

### 1,4,5,8-tetraazaphenanthrene (50) [2]

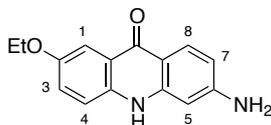


The synthesis of the 1,4,5,8-tetraazaphenanthrene **50** was performed as described in the literature. Glyoxal 40% (7.5 mL, 202 mmol) was added dropwise to a warm solution of 5,6-diaminoquinoxaline **49** (5.8 g, 36 mmol) dissolved in 60 mL of ethanol. The reaction was followed by TLC (SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>/acetone *v/v* 8 : 2). The reaction mixture was refluxed for 1h30, then cooled to room temperature. The solid was filtered off and purified on chromatographic column (SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>/acetone *v/v* 8 : 2). The product was obtained as a white powder with 80% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : δ (ppm) 9.15 (2H, d, H<sub>3</sub> and H<sub>6</sub>, <sup>3</sup>J = 1.9 Hz), 9.08 (2H, d, H<sub>2</sub> and H<sub>7</sub>, <sup>3</sup>J = 1.9 Hz), 8.34 (2H, s, H<sub>9</sub> and H<sub>10</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)** : δ (ppm) 147.62, 146.32, 145.12, 141.88, 132.57. **ESI-MS** : *m/z*<sub>calc</sub> = 182.06 ; *m/z*<sub>obs</sub> : 183.20 (M+H<sup>+</sup>, 35%).

### 2.1.2 Synthèse de la 10H-3,4-diamino-7-éthoxy-9-acridone et de la 12-hydroxy-14-éthoxy-dipyrido[3,2-a : 2',3'-c]quinolino[2,3-h]phenazine

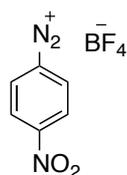
#### 6-amino-2-éthoxy-10H-9-acridone (**15**) [3]



The synthesis of the 6-amino-2-ethoxy-10H-9-acridone **15** was performed as described in the literature. 6,9-diamino-2-ethoxy-acridine (7 g, 27.6 mmol) was dissolved in 45 mL of phenol. To this mixture were added NaOH pellets (5.6 g, 140 mmol). The mixture was then heated to 160 °C for two days. When the reaction was over, the mixture was poured on an aqueous solution of NaOH (2 M) and left at room temperature for four more hours. The precipitate was filtered off and washed with a solution of NaOH (2M), water and ether successively. The product was obtained as a yellow powder with 82% yield and used in the next steps without further purifications.

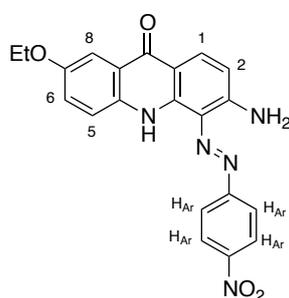
**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)** : δ (ppm) 11.07 (1H, s, NH), 7.88 (1H, d, H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz), 7.53 (1H, d, H<sub>1</sub>, <sup>4</sup>J = 2.9 Hz), 7.35 (1H, d, H<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz), 7.25 (1H, dd, H<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, <sup>4</sup>J = 2.9 Hz), 6.51 (1H, dd, H<sub>7</sub>, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, <sup>4</sup>J = 2.0 Hz), 6.38 (1H, d, H<sub>5</sub>, <sup>4</sup>J = 2.0 Hz), 6.04 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 4.06 (2H, q, CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz), 1.36 (3H, t, CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)** : δ (ppm) 174.51, 153.25, 152.53, 142.98, 135.55, 127.42, 122.80, 120.97, 118.13, 111.39, 111.32, 106.17, 95.24, 63.26, 14.69. **ESI-MS** : *m/z*<sub>calc</sub> = 254.11 ; *m/z*<sub>obs</sub> : 254.20 (M<sup>+</sup>, 100%).

#### p-Nitrobenzene diazonium tetrafluoroborate (**35**) [4]



p-nitroaniline (4 g, 29.3 mmol) was dissolved in 40 mL of an aqueous solution of HCl (3.5 M) and the temperature was lowered to 0 °C. Sodium nitrite (9g, 130 mmol) was added in small portions and the resulting mixture was stirred at 0 °C for 20 minutes. Sodium tetrafluoroborate was then added and the reaction was left for 1 hour. The precipitated was filtered and washed with water, ethanol and acetone successively. The product was obtained as a white powder with 65% yield.

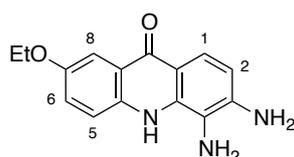
### 10H-3-amino-7-ethoxy-4-p-nitrophenylazo-9-acridone (18) [3]



To 20 mL of a solution of 6-amino-2-ethoxy-10H-9-acridone **15** (500 mg, 1.97 mmol) in MeOH at 0 °C, was added dropwise 25 mL of a solution of the diazonium salt **35** in MeOH. After 3 hours of stirring at 0 °C, NaOH 1M was added to the mixture and the resulting solid was filtered off and washed with hot water and Et<sub>2</sub>O. The pure product was isolated as a dark red solid with 91% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)** : δ (ppm) 11.97 (1H, s, NH), 9.51 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 8.41 (4H, m, H<sub>Ar</sub>), 8.11 (1H, d, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz), 7.96 (1H, d, H<sub>5</sub>, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz), 7.60 (1H, d, H<sub>8</sub>, <sup>4</sup>J = 2.7 Hz), 7.39 (1H, dd, H<sub>6</sub>, <sup>3</sup>J = 8.9 Hz, <sup>4</sup>J = 2.7 Hz), 6.78 (1H, d, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz), 4.15 (2H, q, CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz), 1.41 (3H, t, CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)** : δ (ppm) 174.49, 156.76, 154.72, 147.20, 134.63, 133.88, 125.20, 123.60, 123.56, 123.33, 122.78, 121.67, 121.29, 121.51, 111.08, 106.39, 63.94, 15.22. **ESI-MS** : m/z<sub>calc</sub> = 403.39 ; m/z<sub>obs</sub> : 403.27 (M<sup>+</sup>, 100%).

### 10H-3,4-diamino-7-ethoxy-9-acridone (21) [3]

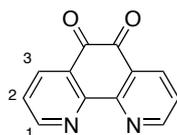


To 15 mL of a solution of the 10H-3-amino-7-éthoxy-4-p-nitrophénylazo-9-acridone **18** (500 mg, 1.78 mmol) in DMF was carefully added 40 mL of an aqueous solution (phosphate buffer pH 7) of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (12 mmol). The reacting mixture was stirred for one night at 40 °C and then basified by the addition of NaOH 0,1 M until it reaches pH 8. The product was extracted 3 times with EtOAc and the organic

phase was washed 3 times with water then dried with MgSO<sub>4</sub>. The product was isolated as a dark yellow solid with 56% yield

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)** : δ (ppm) 10.20 (1H, s, NH), 7.54 (3H, mult, H<sub>1</sub>, H<sub>5</sub> and H<sub>8</sub>), 7.27 (1H, dd, H<sub>6</sub>, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, <sup>4</sup>J = 3.0 Hz), 6.61 (1H, d, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 8.7 Hz), 5.40 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 4.45 (2H, br s, NH<sub>2</sub>), 4.08 (2H, q, CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz), 1.37 (3H, t, CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)** : δ (ppm) 175.29, 152.55, 139.36, 135.64, 131.75, 122.93, 120.26, 118.67, 116.92, 116.49, 112.82, 111.24, 105.94, 63.25, 14.69. **ESI-MS** : m/z<sub>calc</sub> = 269.12 ; m/z<sub>obs</sub> : 270.20 (M+H<sup>+</sup>, 100%).

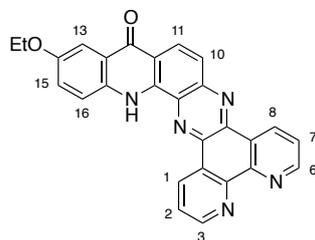
### 1,10-Phen-5,6-dione (52)[5]



The commercial 1,10-phenanthroline (4.00 g, 10.1 mmol) was solubilised in a mixture of 40 mL of concentrated sulfuric acid with 20 mL of concentrated nitric acid, cooled at 0 °C. To that, was added 4.00 g of potassium bromide (33.6 mmol). The resulting mixture was heated at reflux for 3 hours then cooled down to room temperature. The solution was poured onto ice and neutralized with NaOH (50%) then with NaOH (0.1 M). The pH should not exceed 8. The product was extracted 3 times with DCM and the grouped organic phases were washed with water then dried with MgSO<sub>4</sub>. The product was purified by recrystallisation in absolute MeOH and was obtained as yellow needles with 59% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)** : δ (ppm) 9.12 (2H, dd, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 4.7 Hz, J<sub>4</sub> = 1.8 Hz), 8.51 (2H, dd, H<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, <sup>4</sup>J = 1.8 Hz), 7.60 (2H, dd, H<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, <sup>3</sup>J = 4.7 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)** : δ (ppm) 177.71, 154.29, 152.22, 135.69, 129.09, 125.24. **ESI-MS** : m/z<sub>calc</sub> = 210.04 ; m/z<sub>obs</sub> : 211.20 (M+H<sup>+</sup>, 100%).

### 12-hydroxy-14-ethoxy-dipyrido[3,2-*a* :2',3'-*c*]quinolino[2,3-*h*]phenazine (24) [3]

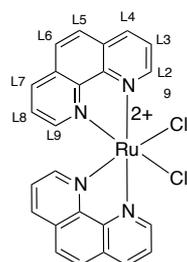


A stoichiometric amount of 10H-3,4-diamino-7-éthoxy-9-acridone (43 mg, 0.16 mmol) **21** and 1,10-Phen-5,6-dione **52** (34 mg, 0.16 mmol) were dissolved in 30 mL of MeOH. The resulting mixture was heated to reflux for 3 hours then cooled down to 0 °C. The precipitate was filtered off and washed with MeOH then dried under vacuum. The product was obtained as an orange solid with 85% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (TFA-*d*<sub>1</sub>, 400 MHz)** : δ (ppm) 10.49 (1H, d, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz), 10.35 (1H, d, H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz), 9.43 (2H, mult, H<sub>3</sub> and H<sub>6</sub>), 9.02 (1H, d, H<sub>11</sub>, <sup>3</sup>J = 9.7 Hz), 8.51 (4H, mult, H<sub>2</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>10</sub> and H<sub>16</sub>), 8.09 (2H, mult, H<sub>15</sub> and H<sub>13</sub>), 4.42 (2H, q, CH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz), 1.63 (3H, t, CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz). **<sup>13</sup>C NMR (TFA-*d*<sub>1</sub>, 400 MHz)** : δ (ppm) 166.15, 159.79, 148.83, 148.72, 146.34, 142.22, 140.79, 140.29, 139.83, 139.52, 138.21, 137.21, 136.01, 134.53, 132.56, 129.45, 129.19, 127.71, 127.56, 127.05, 126.00, 121.57, 119.95, 114.28, 100.89, 65.46, 12.56. **ESI-MS** : m/z<sub>calc</sub> = 443.46 ; m/z<sub>obs</sub> : 443.33

## 2.2 Synthèse des complexes

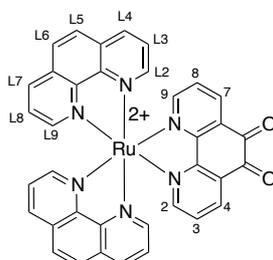
### Precursor complexe Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (**31<sub>phen</sub>**) [6]



Ruthenium<sup>III</sup> Chloride (293 mg, 1.4 mmol), lithium chloride (2.39 g, 56.4 mmol) and 1,10-phenanthroline (396 mg, 2.2 mmol) were dissolved in 40 mL of anhydrous DMF. The mixture was refluxed for 90 minutes then cooled to room temperature. The reaction was followed by UV-Vis spectroscopy with the appearance of a band at 540 nm in water corresponding to the formation of a bis-chelate Ru<sup>II</sup> complex. The product was precipitated by slow exchange (3 days) of solvent under acetone atmosphere. The solid was then washed with water, acetone and diethylether successively. The product was obtained as a deep purple powder with 43% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C, 300 MHz)** : δ (ppm) 10.28 (2H, d, L<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz), 8.71 (2H, d, L<sub>4</sub>, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz), 8.29 (2H, d, L<sub>5</sub> or L<sub>6</sub>, <sup>3</sup>J = 8.9 Hz), 8.23 (4H, m, L<sub>3</sub> and L<sub>7</sub>), 8.14 (2H, d, L<sub>5</sub> or L<sub>6</sub>, <sup>3</sup>J = 8.9 Hz), 7.76 (2H, d, L<sub>9</sub>, <sup>3</sup>J = 5.3 Hz), 7.32 (2H, dd, L<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz, <sup>3</sup>J = 5.3 Hz).

### [Ru(phen)<sub>2</sub>phendione](2PF<sub>6</sub>) (**10<sub>phen</sub>**) [7]

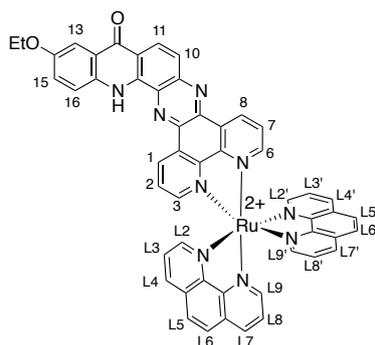


A suspension of Ru(phen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (290 mg, 0.57 mmol) and 1,10-phen-5,6-dione (149 mg, 0.71 mmol) in 6 mL of water was heated to 120 °C upon microwave irradiation (200 W) for 30 minutes. The resulting orange solution was centrifuged and the supernatant was collected. The product was then

precipitated by addition of  $\text{KPF}_6$  to the aqueous solution, washed with water and  $\text{Et}_2\text{O}$ . It was obtained as an orange solid with 82% yield.

**$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 25 °C, 300 MHz) :**  $\delta$  (ppm) 8.69 (2H, d,  $L_4$ ,  $^3J = 8.3$  Hz), 8.58 (2H, d,  $L_7$ ,  $^3J = 8.2$  Hz), 8.48 (2H, d,  $H_4$  and  $H_7$ ,  $^3J = 7.8$  Hz), 8.32 (2H, d,  $L_2$ ,  $^3J = 5.3$  Hz), 8.26 (4H, syst AB,  $L_5$  and  $L_6$ ,  $^3J = 8.8$  Hz), 7.90 (4H, m,  $L_9$ ,  $H_2$  and  $H_9$ ), 7.82 (2H, dd,  $L_3$ ,  $^3J = 8.2$  Hz,  $^3J = 5.3$  Hz), 7.60 (2H, dd,  $L_8$ ,  $^3J = 8.2$  Hz and  $^3J = 5.2$  Hz), 7.49 (2H, dd,  $H_3$  and  $H_8$ ,  $^3J = 8.0$  Hz and  $^3J = 5.8$  Hz).

**$[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dpqp-OH})].2\text{PF}_6$  (procedure modified compared to already reported method) ( $\mathbf{29}_{\text{phen}}$ ) [8]**



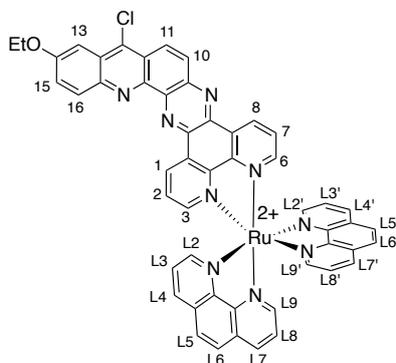
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{phendione}].2\text{PF}_6$   $\mathbf{10}_{\text{phen}}$  (192 mg,  $2 \times 10^{-4}$  mol) and 10*H*-3,4-diamino-7-ethoxy-9-acridone  $\mathbf{21}$  (107 mg,  $4 \times 10^{-4}$  mol) were dissolved in 6 mL of  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{EtOH}$  (*v/v* 3/1). The mixture was heated under argon upon microwave irradiation at 90 °C for 60 minutes (200 W). The solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting solid was purified by column chromatography on aluminium oxide using  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{EtOAc}$  (*v/v* 70:30 to 100:0) as eluent with some drops of TFA at 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$  to get all the product out of the column.  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dpqp-OH})].\text{PF}_6$   $\mathbf{29}_{\text{phen}}$  (177 mg) was obtained as an orange solid with 74% yield.

Characterizations are in accordance to what was previously published.[8]

**$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 25 °C, 400 MHz,  $10^{-2}$  mol x  $\text{L}^{-1}$ ) :**  $\delta$  (ppm) 11.11 (1H, s, *NH*), 9.80 (1H, d,  $H_1$ ,  $^3J = 7.9$  Hz), 8.98 (1H, br s,  $L_{2'}$  or  $L_{9'}$ ), 8.88-8.82 (2H, m,  $L_4$  or  $L_7$  and  $H_8$ ), 8.68-8.62 (3H, m,  $L_{4'}$ ,  $L_{7'}$  and  $L_4$  or  $L_7$ ), 8.36 (2H, syst AB,  $L_6$  and  $L_5$ ), 8.33–8.26 (2H, m,  $L_{6'}$  and  $L_{5'}$ ), 8.22 (1H, d,  $^3J = 5.0$  Hz,  $H_3$ ), 8.18 (1H, d,  $L_{2'}$  or  $L_{9'}$ ,  $^3J = 4.6$  Hz), 8.15 (1H, d,  $L_2$  or  $L_9$ ,  $^3J = 4.9$  Hz), 8.08-8.01 (3H, m,  $H_6$ ,  $L_{2'}$  or  $L_{9'}$  and  $L_3$  or  $L_8$ ), 7.89 (1H, d,  $H_{11}$ ,  $^3J = 8.8$  Hz), 7.80 (1H, dd,  $H_2$ ,  $^3J = 7.4$  Hz and  $^3J = 5.6$  Hz), 7.72–7.55 (6H, m,  $H_{16}$ ,  $H_7$ ,  $H_{10}$ ,  $L_{3'}$ ,  $L_{8'}$  and  $L_3$  or  $L_8$ ), 6.54 (1H, br s,  $L_{15}$ ), 5.76 (1H, br s,  $L_{13}$ ), 2.63 (2H, m,  $\text{OCH}_2$ ), 0.48 (3H, m,  $\text{CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 25°C, 500 MHz,  $10^{-2}$  mol x  $\text{L}^{-1}$ ):**  $\delta$  (ppm) 174.61, 155.83, 155.10, 155.00, 154.93, 154.19, 154.15, 153.94, 151.60, 151.04, 148.81, 148.74, 148.70, 148.60, 144.88, 141.07, 138.07, 137.99, 137.96, 137.77, 136.63, 135.41, 134.76, 134.14, 133.79, 132.05, 132.00, 131.97, 130.94, 130.44, 129.87, 129.26, 129.10, 129.07, 127.98, 127.56, 127.51, 127.05, 127.02, 124.22, 123.59, 121.76, 121.34, 117.00, 104.05, 62.98, 14.31. **UV-vis ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ): 265 nm (sh 85000  $\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ), 340 (sh 23000), 353 (26000), 416 (19000), 445 (18000), 514 (800). **HRMS (MALDI-TOF):** calcd for  $\text{C}_{51}\text{H}_{33}\text{N}_9\text{O}_2^{96}\text{Ru}$ : *m/z* 899.1833, found: *m/z* 899.1857 ( $[\text{M}]^+$ ).

At UMons, exact mass measurements were performed on the lightest Ru isotope (i.e.  $^{96}\text{Ru}$ ) to avoid isobaric contaminations due to isotope signal overlapping. It is also important to remind that, when measuring MALDI-ToF mass spectra of Ru complexes, singly charged ions are detected and mostly correspond to radical cations generated by one electron reduction upon MALDI

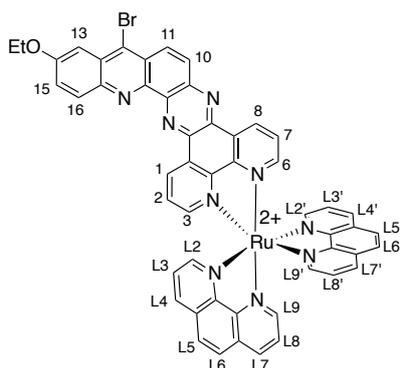
**[Ru(phen)<sub>2</sub>(dpqp-Cl)].2PF<sub>6</sub> (**39**<sub>phen</sub>)**



[Ru(phen)<sub>2</sub>(dpqp-OH)].2PF<sub>6</sub> **29**<sub>phen</sub> (120 mg, 10<sup>-4</sup> mol) was carefully added to 3 mL of POCl<sub>3</sub> and the mixture was heated to 90 °C overnight. The reaction mixture was then cooled to room temperature and the mixture was poured dropwise onto ice. The solution was neutralized with NaOH (1M) and the solid was filtered off and washed with H<sub>2</sub>O. It was redissolved in a minimum amount of CH<sub>3</sub>CN and precipitated with Et<sub>2</sub>O. [Ru(phen)<sub>2</sub>(dpqp-Cl)].2PF<sub>6</sub> **39**<sub>phen</sub> (114 mg) was obtained as an orange solid with 94% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25 °C, 400 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>):** δ (ppm) 9.86 (1H, d, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz), 9.61 (d, H<sub>8</sub> <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, 1H), 8.77 (1H, d, H<sub>11</sub>, <sup>3</sup>J = 9.6 Hz), 8.65 (4H, m, L<sub>4</sub>(<sup>⋅</sup>) and L<sub>7</sub>(<sup>⋅</sup>)), 8.35 (1H, d, H<sub>16</sub>, <sup>3</sup>J = 8.7 Hz), 8.29 (7H, m, H<sub>10</sub>, L<sub>5</sub>(<sup>⋅</sup>), L<sub>6</sub>(<sup>⋅</sup>), L<sub>2</sub> or L<sub>2</sub><sup>⋅</sup> and L<sub>9</sub> or L<sub>9</sub><sup>⋅</sup>), 8.18 (2H, m, H<sub>3</sub> and H<sub>6</sub>), 8.05 (2H, m, L<sub>2</sub> or L<sub>2</sub><sup>⋅</sup> and L<sub>9</sub> or L<sub>9</sub><sup>⋅</sup>), 7.87 (1H, m, H<sub>2</sub>), 7.77 (1H, m, H<sub>7</sub>), 7.65 (6H, m, H<sub>13</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>3</sub>(<sup>⋅</sup>) and H<sub>8</sub>(<sup>⋅</sup>)), 4.23 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.27 (3H, m, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25°C, 500 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>):** δ (ppm) 160.39, 155.40, 155.24, 154.30, 154.20, 154.02, 151.45, 151.28, 148.92, 148.84, 146.34, 145.73, 140.83, 139.84, 139.53, 138.02, 137.95, 134.65, 134.44, 133.44, 132.11, 132.09, 131.79, 131.08, 130.52, 129.51, 129.14, 128.18, 128.06, 127.05, 126.97, 125.72, 102.60, 65.47, 14.82. **UV-vis (CH<sub>3</sub>CN):** λ<sub>max</sub> (ε): 226 nm (52000 L x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>), 265 (73000), 303 (sh 29000), 347 (32000), 392 (17900), 434 (18500). **HRMS (MALDI-TOF):** calcd for C<sub>51</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>9</sub>O<sup>96</sup>Ru : m/z 917.1494, found: m/z 917.1497 ([M]<sup>+</sup>).

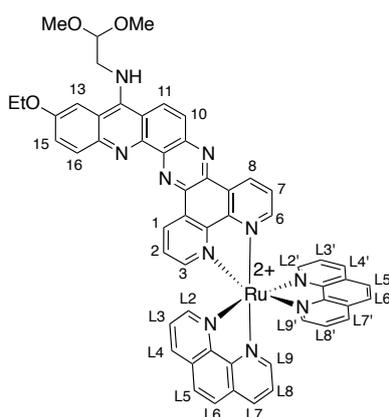
### [Ru(phen)<sub>2</sub>(dpqp-Br)].2PF<sub>6</sub> (**55**<sub>phen</sub>)



[Ru(phen)<sub>2</sub>(dpqp-OH)].2PF<sub>6</sub> **29**<sub>phen</sub> (30 mg, 3x10<sup>-5</sup> mol) was dissolved in 3 mL of dry DMF and the solution was cooled to 0 °C. Phosphorus tribromide PBr<sub>3</sub> (32 μL, 33x10<sup>-5</sup> mol) was added and the temperature was slowly raised to room temperature then to 90 °C. The mixture was left at 90 °C for 4 hours then poured onto ice and neutralized by NaOH (1M). The product was precipitated by the addition of KPF<sub>6</sub> and recovered by centrifugation. It was then washed with water and Et<sub>2</sub>O. The product was obtained with 63% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25 °C, 400 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>):** δ (ppm) 9.76 (1H, d, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz), 9.59 (d, H<sub>8</sub> <sup>3</sup>J = 8.1 Hz, 1H), 8.74 (1H, d, H<sub>11</sub>, <sup>3</sup>J = 9.6 Hz), 8.63 (4H, m, L<sub>4(c)</sub> and L<sub>7(c)</sub>), 8.31 (1H, d, H<sub>16</sub>, <sup>3</sup>J = 8.7 Hz), 8.26 (7H, m, H<sub>10</sub>, L<sub>5(c)</sub>, L<sub>6(c)</sub>, L<sub>2</sub> or L<sub>2'</sub> and L<sub>9</sub> or L<sub>9'</sub>), 8.16 (2H, m, H<sub>3</sub> and H<sub>6</sub>), 8.05 (2H, m, L<sub>2</sub> or L<sub>2'</sub> and L<sub>9</sub> or L<sub>9'</sub>), 7.85 (1H, m, H<sub>2</sub>), 7.74 (1H, m, H<sub>7</sub>), 7.65 (6H, m, H<sub>13</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>3(c)</sub> and H<sub>8(c)</sub>), 4.22 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.28 (3H, m, CH<sub>3</sub>). **UV-vis (CH<sub>3</sub>CN):** λ<sub>max</sub> (ε): 226 nm (52000 L x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>), 265 (73000), 303 (sh 29000), 347 (32000), 392 (17900), 434 (18500). **ESI-MS :** C<sub>51</sub>H<sub>32</sub>BrN<sub>9</sub>ORu: m/z 967.10; m/z<sub>obs</sub> : 483.30 ([M]<sup>2+</sup>).

### [Ru(phen)<sub>2</sub>(dpqp-DMEA)].2PF<sub>6</sub> (**40**<sub>phen</sub>)

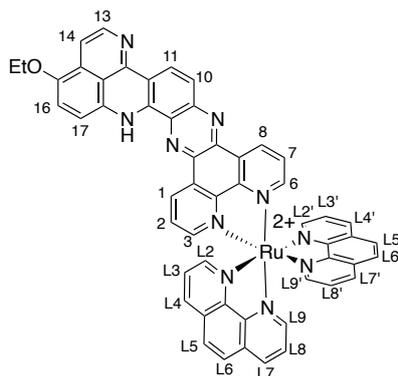


[Ru(phen)<sub>2</sub>(dpqp-Cl)].2PF<sub>6</sub> **39**<sub>phen</sub> (100 mg, 8x10<sup>-5</sup> mol) was dissolved in anhydrous DMF (4 mL) with DMEA (0.17 mL, 1.6x10<sup>-3</sup> mol, 20 eq.). The mixture was heated upon microwave irradiation at 130 °C for 90 minutes (200 W). The solid was then precipitated upon addition of a saturated aqueous solution of KPF<sub>6</sub> and water, filtered off and washed with H<sub>2</sub>O. The product was purified by column

chromatography on C18 with a CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O gradient (20% to 40%). [Ru(phen)<sub>2</sub>(dpqp-DMEA)].2PF<sub>6</sub> **40**<sub>phen</sub> (87 mg) was obtained as a red solid with 85% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25 °C, 400 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>):** δ (ppm) 13.98 (1H, br s, NH), 10.17 (1H, d, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 8.0), 9.68 (1H, d, H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz), 8.73-8.67 (4H, m, H<sub>11</sub>, L<sub>4(c)</sub> and L<sub>7(c)</sub>), 8.33 (6H, m, H<sub>16</sub>, L<sub>5(c)</sub>, L<sub>6(c)</sub> and L<sub>4(c)</sub> or L<sub>7(c)</sub>), 8.28-8.26 (2H, m, L<sub>2(c)</sub> and L<sub>9(c)</sub>), 8.23 (1H, d, H<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 9.7 Hz), 8.18 (1H, d, H<sub>6</sub>, <sup>3</sup>J = 9.7 Hz), 8.10 (2H, m, L<sub>2(c)</sub> and L<sub>9(c)</sub>), 7.93-7.90 (3H, m, H<sub>10</sub>, L<sub>3(c)</sub> and L<sub>8(c)</sub>), 7.78-7.70 (4H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>7</sub>, L<sub>3(c)</sub> and L<sub>8(c)</sub>), 7.49 (1H, m, H<sub>15</sub>), 7.16 (1H, br s, H<sub>13</sub>), 4.95 (1H, t, CH(OMe)<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz), 4.34 (2H, m, NHCH<sub>2</sub>), 4.01 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 3.57 (6H, s, (OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.19 (3H, m, CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25°C, 500 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>):** δ (ppm) 157.79, 157.03, 156.28, 155.97, 154.25, 154.16, 154.04, 153.94, 152.18, 151.54, 148.86, 148.82, 148.75, 148.74, 145.18, 143.47, 139.91, 138.14, 138.09, 138.03, 138.01, 135.39, 134.95, 134.73, 134.45, 132.12, 132.09, 132.08, 131.47, 131.02, 130.65, 129.14, 129.11, 129.07, 129.04, 128.47, 128.45, 128.19, 126.99, 124.48, 123.47, 117.70, 111.40, 103.95, 103.38, 65.59, 55.87, 51.73, 48.54, 14.56. **UV-vis (CH<sub>3</sub>CN):** λ<sub>max</sub> (ε): 223 nm (57000 L x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>), 265 (69000), 300 (sh 32000), 330 (30000), 347 (30000), 423 (21000). **HRMS (MALDI-TOF):** calcd for C<sub>55</sub>H<sub>42</sub>N<sub>10</sub>O<sub>3</sub> <sup>96</sup>Ru: m/z 986.2517, found: m/z 986.2520 ([M]<sup>+</sup>).

### [Ru(phen)<sub>2</sub>(dppqp)].2PF<sub>6</sub> (**30**<sub>phen</sub>)

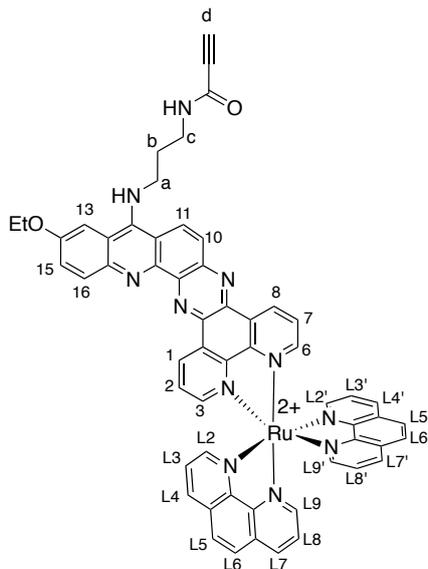


[Ru(phen)<sub>2</sub>(dpqp-DMEA)].2PF<sub>6</sub> **40**<sub>phen</sub> (50 mg, 4x10<sup>-5</sup> mol) was dissolved in pure TFA (2 mL) and the solution was stirred for 4 hours at room temperature in the dark. The mixture was then poured onto ice and neutralized with NaOH (1M). The solid was filtered off and washed with H<sub>2</sub>O before purification by column chromatography on C18 with a CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O gradient (15% to 30%). All the purification steps were as well performed in the dark. [Ru(phen)<sub>2</sub>(dppqp)].2PF<sub>6</sub> **30**<sub>phen</sub> (36 mg) was obtained as a dark red solid with 74% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25 °C, 400 MHz, 1x10<sup>-2</sup> mol x L<sup>-1</sup>):** δ (ppm) 9.28 (1H, d, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz), 8.85 (1H, d, H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz), 8.68-8.63 (4H, m, L<sub>4(c)</sub> and L<sub>7(c)</sub>), 8.49 (1H, d, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, H<sub>10, 11, 13, 14, 16 or 17</sub>), 8.35 (1H, d, L<sub>2(c)</sub> or L<sub>9(c)</sub>, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz), 8.32-8.29 (5H, m, L<sub>5(c)</sub>, L<sub>6(c)</sub> and L<sub>2(c)</sub> or L<sub>9(c)</sub>), 8.14 (1H, d, H<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz), 8.11 (1H, d, H<sub>6</sub>, <sup>3</sup>J = 5.3 Hz), 8.08 (1H, dd, L<sub>2(c)</sub> or L<sub>9(c)</sub>, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, <sup>4</sup>J = 1.3 Hz), 8.05 (1H, dd, L<sub>2(c)</sub> or L<sub>9(c)</sub>, <sup>3</sup>J = 5.3 Hz, <sup>4</sup>J = 1.4 Hz), 7.79-7.73 (2H, m, L<sub>3</sub> or L<sub>3'</sub> and L<sub>7</sub> or L<sub>7'</sub>), 7.70-7.60 (4H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>7</sub>, L<sub>3</sub> or L<sub>3'</sub> and L<sub>7</sub> or L<sub>7'</sub>), 7.57 (1H, d, H<sub>10, 11, 13, 14, 16 or 17</sub>, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz), 7.42 (1H, br s, H<sub>10, 11, 13, 14, 16 or 17</sub>), 7.12 (1H, br s, H<sub>10, 11, 13, 14, 16 or 17</sub>), 6.96 (1H, br s, H<sub>10, 11, 13, 14, 16 or 17</sub>), 6.52 (1H, br s, H<sub>10, 11, 13, 14, 16 or 17</sub>).

or 17), 3.79 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 1.03 (3H, m, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25°C, 500 MHz, 2x10<sup>-2</sup> mol x L<sup>-1</sup>): δ (ppm) 155.51, 155.14, 154.16, 154.08, 154.07, 154.04, 151.74, 151.27, 149.00, 148.98, 148.84, 148.82, 145.21, 138.15, 138.03, 138.02, 135.11, 134.29, 133.72, 133.13, 132.20, 132.16, 132.15, 131.22, 131.17, 129.23, 129.15, 129.11, 128.11, 128.02, 127.07, 127.05, 127.03, 127.00, 111.82, 108.84, 64.85, 14.94. UV-vis (CH<sub>3</sub>CN): λ<sub>max</sub> (ε): 221 nm (78000 L x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>), 261 (97000), 288 (60000), 303 (sh 52000), 368 (27000), 381 (29000), 456 (22000). HRMS (MALDI-TOF): calcd for C<sub>53</sub>H<sub>34</sub>N<sub>10</sub>O<sup>96</sup>Ru: m/z 922.1993, found: m/z 922.2021 ([M]<sup>+</sup>).

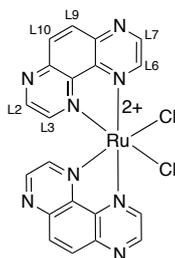
### [Ru(phen)<sub>2</sub>(dpqp-Am)].PF<sub>6</sub> (**57**<sub>phen</sub>)



[Ru(phen)<sub>2</sub>(dpqp-Cl)].2PF<sub>6</sub> **39**<sub>phen</sub> (50 mg, 4x10<sup>-5</sup> mol) was dissolved in anhydrous NMP (3 mL) with 1,3-diaminopropane (5.2 μL, 6.2x10<sup>-4</sup> mol, 15 eq.). The mixture was heated upon microwave irradiation at 150 °C for 40 minutes. The solid was then precipitated upon addition of a saturated aqueous solution of KPF<sub>6</sub>, filtered off and washed with H<sub>2</sub>O and dried. The product **58** (47 mg, 4x10<sup>-5</sup> mol) was then engaged in the coupling reaction without more purification. Propiolic acid (11 μL, 2x10<sup>-4</sup> mol) was added to a solution of DCC (8 mg, 4x10<sup>-5</sup>) in 1.5 mL ACN and the mixture was stirred for 30 min under argon atmosphere. A white precipitate is formed and removed by filtration. The complex is then added to the filtrate and mixture was left stirring for 12 hours. purified by column chromatography on C18 with a CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O gradient (20% to 40%). [Ru(phen)<sub>2</sub>(dpqp-Am)].2PF<sub>6</sub> **57**<sub>phen</sub> was obtained as a red solid with a global yield of 61% (32 mg).

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25 °C, 300 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>): 9.68 (1H, m, H<sub>1</sub>), 9.49-9.34 (3H, m, H<sub>8</sub>, L<sub>4</sub>(<sup>∘</sup>) and L<sub>7</sub>(<sup>∘</sup>)), 8.65 (4H, m, H<sub>6</sub>, H<sub>11</sub>, L<sub>4</sub>(<sup>∘</sup>) and L<sub>7</sub>(<sup>∘</sup>)), 8.44-8.30 (6H, m, H<sub>3</sub>, L<sub>5</sub>(<sup>∘</sup>), L<sub>6</sub>(<sup>∘</sup>) and L<sub>4</sub>(<sup>∘</sup>) or L<sub>7</sub>(<sup>∘</sup>)), 8.18 (2H, m, L<sub>2</sub>(<sup>∘</sup>) and L<sub>9</sub>(<sup>∘</sup>)), 8.07-7.96 (3H, m, H<sub>10</sub> L<sub>2</sub>(<sup>∘</sup>) and L<sub>9</sub>(<sup>∘</sup>)), 7.69 (6H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>7</sub>, L<sub>3</sub>(<sup>∘</sup>) and L<sub>8</sub>(<sup>∘</sup>)), 6.84 (1H, d, H<sub>15</sub>, <sup>3</sup>J = 10.5 Hz), 6.20 (1H, br s, H<sub>13</sub>), 4.21 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 1.73-1.32 (7H, m, H<sub>a,b,c,d</sub>), 0.89 (3H, m, CH<sub>3</sub>). UV-vis (CH<sub>3</sub>CN): λ<sub>max</sub> (ε): 223 nm (57000 L x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>), 265 (69000), 300 (sh 32000), 330 (30000), 347 (30000), 423 (21000). ESI-MS : C<sub>57</sub>H<sub>41</sub>N<sub>11</sub>O<sub>2</sub>Ru: m/z 1013.25; m/z<sub>obs</sub> : 506.80 ([M]<sup>2+</sup>, 100%), 1159 ([M+PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 75%).

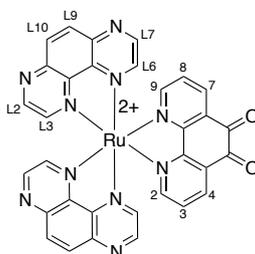
## Precursor complex Ru(TAP)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (**31**<sub>TAP</sub>) [6]



The synthesis of the Ru(TAP)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was performed as described in the literature. Ruthenium<sup>III</sup> Chloride (578 mg, 2.21 mmol), lithium chloride (270 mg, 6.34 mmol) and 1,4,5,8-tetraazaphenanthrene (1.0 g, 5.5 mmol) were dissolved in 40 mL of anhydrous DMF. The mixture was refluxed for 45 minutes then cooled to room temperature. The reaction was followed by UV-Vis spectroscopy with the appearance of a band at 540 nm in water corresponding to the formation of a bis-chelate Ru<sup>II</sup> complex. The product was precipitated by slow exchange (3 days) of solvent under acetone atmosphere. The solid was then washed with water, acetone and diethylether successively. The product **31**<sub>TAP</sub> was obtained as a deep purple powder with 56% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 25 °C, 300 MHz):** δ (ppm) 10.18 (2H, d, L<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz), 9.48 (2H, d, L<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz), 8.62 (2H, d, L<sub>7</sub>, <sup>3</sup>J = 3.0 Hz), 8.49 (4H, syst AB, L<sub>9</sub> and L<sub>10</sub>, <sup>3</sup>J = 9.3 Hz), 8.32 (2H, d, L<sub>6</sub>, <sup>3</sup>J = 3.0 Hz).

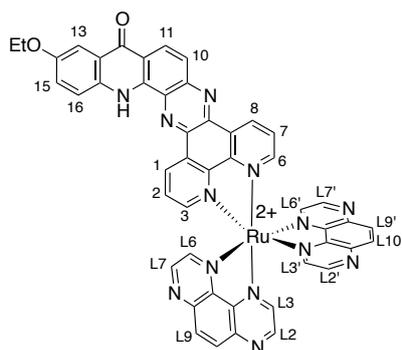
## [Ru(TAP)<sub>2</sub>phendione].2PF<sub>6</sub> (**10**<sub>TAP</sub>) [7]



A suspension of Ru(TAP)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> **31**<sub>TAP</sub> (291 mg, 0.57 mmol) and 1,10-phen-5,6-dione (140 mg, 0.71 mmol) in 6 mL of water was heated to 120 °C upon microwave irradiation (200 W) for 30 minutes. The resulting orange solution was centrifuged and the supernatant was collected. The product was then precipitated by addition of KPF<sub>6</sub> to the aqueous solution, washed with water and Et<sub>2</sub>O. It was obtained as an orange solid with 58 % yield.

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25 °C, 300 MHz):** δ (ppm) 9.15 (2H, d, L<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 2.5 Hz), 8.92 (2H, d, L<sub>7</sub>, <sup>3</sup>J = 2.6 Hz), 8.63 (6H, syst. AB, L<sub>9,10</sub> and H<sub>7,4</sub>), 8.42 (2H, d, L<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 2.5 Hz), 8.13 (2H, d, L<sub>6</sub>, <sup>3</sup>J = 2.6 Hz), 7.99 (2H, m, H<sub>2</sub> and H<sub>9</sub>), 7.57 (2H, m, H<sub>3</sub> and H<sub>8</sub>).

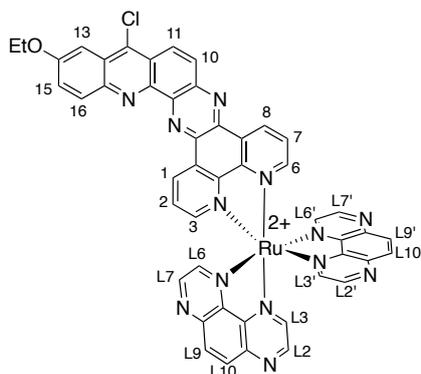
## [Ru(TAP)<sub>2</sub>(dpqp-OH)].2PF<sub>6</sub> (**29**<sub>TAP</sub>)



[Ru(TAP)<sub>2</sub>phendione].2PF<sub>6</sub> **10**<sub>TAP</sub> (192 mg, 2x10<sup>-4</sup> mol) and 10*H*-3,4-diamino-7-ethoxy-9-acridone were dissolved in 6 mL of CH<sub>3</sub>CN/EtOH (v/v 3/1). The mixture was heated under argon upon microwave irradiation at 90 °C for 60 minutes (200 W). The solvent was evaporated under reduced pressure and the resulting solid was purified by column chromatography on aluminium oxide using CH<sub>3</sub>CN/EtOAc (v/v 80:20 to 100:0) as eluent with some drops of TFA at 100% CH<sub>3</sub>CN to get all the product out of the column. [Ru(TAP)<sub>2</sub>(dpqp-OH)].2PF<sub>6</sub> **29**<sub>TAP</sub> (201 mg) was obtained as an orange solid with 84% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25 °C, 400 MHz, 2x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>):** δ (ppm) 10.76 (1H, br s, NH), 9.99 (1H, d, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz), 9.27 (1H, d, H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz), 9.20 (1H, d, L<sub>2(c)</sub> or L<sub>7(c)</sub>, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz), 9.05 (1H, d, L<sub>2(c)</sub> or L<sub>7(c)</sub>, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz), 9.03 (2H, m, L<sub>2(c)</sub> and L<sub>7(c)</sub>), 8.88 (1H, br s, L<sub>3(c)</sub> or L<sub>6(c)</sub>), 8.72-8.67 (4H, m, L<sub>9(c)</sub> and L<sub>10(c)</sub>), 8.36 (2H, d, L<sub>3(c)</sub> and L<sub>6(c)</sub>, <sup>3</sup>J = 2.9 Hz), 8.31 (1H, d, H<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz), 8.29 (1H, d, L<sub>3(c)</sub> or L<sub>6(c)</sub>, <sup>3</sup>J = 2.8 Hz), 8.22 (1H, dd, H<sub>6</sub>, <sup>3</sup>J = 5.4 Hz, <sup>4</sup>J = 1.3 Hz), 8.13 (1H, d, H<sub>11</sub>, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz), 7.98 (1H, d, H<sub>16</sub>, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz), 7.90 (1H, dd, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz and <sup>3</sup>J = 5.4 Hz), 7.80 (1H, d, H<sub>10</sub>, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz), 7.73 (1H, dd, H<sub>7</sub>, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz and <sup>3</sup>J = 5.5 Hz), 7.23 (1H, d, H<sub>15</sub>, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz), 6.48 (1H, br s, H<sub>13</sub>), 3.42 (1H, m), 3.26 (1H, m), 0.61 (3H, m). **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25°C, 500 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>):** δ (ppm) 156.11, 156.06, 150.78, 150.69, 150.62, 150.51, 150.40, 150.25, 149.90, 146.62, 146.56, 146.54, 146.46, 145.50, 143.30, 143.18, 143.15, 143.09, 141.30, 137.91, 137.61, 136.64, 135.81, 135.28, 135.17, 133.97, 133.92, 133.86, 131.39, 131.05, 130.51, 128.42, 128.31, 124.79, 124.48, 121.79, 121.38, 117.70, 64.13, 14.77. **UV-vis (CH<sub>3</sub>CN):** λ<sub>max</sub> (ε): 232 nm (73000 L x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>), 248 (59000), 277 (100000), 302 (86000), 348 (sh 25000), 411 (22000), 457 (16000), 512 (sh 7300). **HRMS (MALDI-TOF):** calcd for C<sub>47</sub>H<sub>29</sub>N<sub>13</sub>O<sub>2</sub><sup>96</sup>Ru: *m/z* 903.1643, found: *m/z* 903.1661 ([M]<sup>+</sup>).

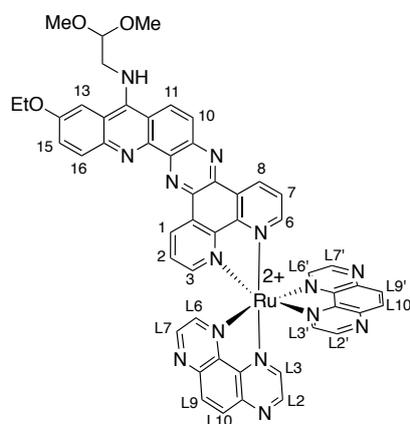
### [Ru(TAP)<sub>2</sub>(dpqp-Cl)].2PF<sub>6</sub> (**39**<sub>TAP</sub>)



[Ru(TAP)<sub>2</sub>(dpqp-OH)].2PF<sub>6</sub> **29**<sub>TAP</sub> (120 mg, 10<sup>-4</sup> mol) was carefully added to 3 mL of POCl<sub>3</sub> and the mixture was heated to 90 °C overnight. The reaction was then cooled to room temperature and the mixture was poured dropwise onto ice. The solution was neutralized with NaOH (1M) and the solid was filtered off and washed with H<sub>2</sub>O. It was redissolved in a minimum amount of CH<sub>3</sub>CN and precipitated with Et<sub>2</sub>O. [Ru(TAP)<sub>2</sub>(dpqp-Cl)].2PF<sub>6</sub> **39**<sub>TAP</sub> (118 mg) was obtained as an orange solid with 97% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25 °C, 400 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>):** δ (ppm) 10.00 (1H, d, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz), 9.76 (1H, d, H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz), 9.04 (1H, d, L<sub>2(′)</sub> or L<sub>7(′)</sub>, <sup>3</sup>J = 2.0 Hz), 9.00 (3H, m, L<sub>2(′)</sub> and L<sub>7(′)</sub>), 8.70 (1H, d, H<sub>11</sub>, <sup>3</sup>J = 9.7 Hz), 8.67 (4H, m, L<sub>9(′)</sub> and L<sub>10(′)</sub>), 8.40 (1H, d, L<sub>3(′)</sub> or L<sub>6(′)</sub>, <sup>3</sup>J = 2.7 Hz), 8.37 (2H, d, L<sub>3(′)</sub> or L<sub>6(′)</sub>, <sup>3</sup>J = 2.6 Hz), 8.32-8.26 (6H, m, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>16</sub>, L<sub>3(′)</sub> and L<sub>6(′)</sub>), 8.00 (1H, dd, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz and <sup>3</sup>J = 5.6 Hz), 7.94 (1H, dd, H<sub>7</sub>, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz and <sup>3</sup>J = 5.4 Hz), 7.62 (1H, s, H<sub>13</sub>), 7.44 (1H, d, H<sub>15</sub>, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz), 4.25 (2H, q, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz), 0.85 (3H, m). **<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25°C, 500 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>):** δ (ppm) 160.61, 156.42, 156.20, 150.68, 150.53, 150.39, 150.37, 150.18, 149.79, 146.61, 146.58, 146.55, 143.36, 143.34, 143.23, 140.95, 139.75, 136.68, 136.07, 133.88, 133.83, 132.49, 132.20, 132.00, 131.33, 130.54, 129.67, 128.52, 128.48, 127.84, 125.82, 102.82, 65.68, 14.79. **UV-vis (CH<sub>3</sub>CN):** λ<sub>max</sub> (ε): 227 nm (58000 L x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>), 253 (sh 46000), 277 (81000), 343 (43000), 368 (26000), 393 (23000), 417 (24000), 440 (28000). **HRMS (MALDI-TOF):** calcd for C<sub>47</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>13</sub>O<sup>96</sup>Ru: *m/z* 921.1304, found: *m/z* 921.1321 ([M]<sup>+</sup>).

#### [Ru(TAP)<sub>2</sub>(dpqp-DMEA)].2PF<sub>6</sub> (**40**<sub>TAP</sub>)

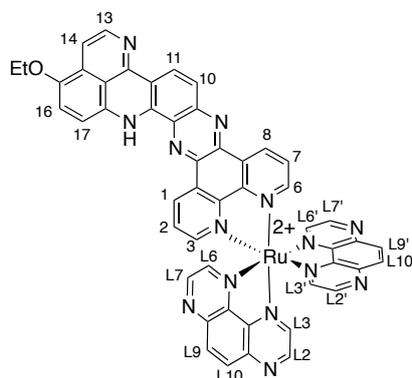


[Ru(TAP)<sub>2</sub>(dpqp-Cl)].2PF<sub>6</sub> **39**<sub>TAP</sub> (20 mg, 1.5x10<sup>-5</sup> mol) was dissolved in anhydrous DMF (3 mL) with DMEA (80 μL, 8x10<sup>-4</sup> mol, 50 eq.). The mixture was heated in a microwave oven at 140 °C for 15 minutes (200 W). The solid was then precipitated upon addition of a saturated solution of KPF<sub>6</sub> and water then washed with H<sub>2</sub>O. The product was purified by column chromatography on C18 with a CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O gradient (20% to 40%). [Ru(TAP)<sub>2</sub>(dpqp-DMEA)].2PF<sub>6</sub> **40**<sub>TAP</sub> (5 mg) was obtained as a red solid with 24% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25 °C, 400 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>):** δ (ppm) 10.26 (1H, d, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz), 9.77 (1H, d, H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz), 9.00 (4H, AB syst., L<sub>2(′)</sub> or L<sub>7(′)</sub>), 8.76 (1H, d, H<sub>11</sub>, <sup>3</sup>J = 9.7 Hz), 8.62 (4H, m, L<sub>9(′)</sub> and L<sub>10(′)</sub>), 8.36 (1H, d, H<sub>16</sub>, <sup>3</sup>J = 8.7 Hz), 8.32 (2H, d, L<sub>3(′)</sub> and L<sub>6(′)</sub>, <sup>3</sup>J = 2.6 Hz), 8.27-8.22 (4H,

m, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub>, L<sub>3(c)</sub> and L<sub>6(c)</sub>), 7.96-7.58 (3H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>7</sub> and H<sub>10</sub>), 7.66 (1H, s, H<sub>15</sub>), 7.58 (1H, br s, H<sub>13</sub>), 4.88 (1H, t, CH(OMe)<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz), 4.30 (2H, m, NHCH<sub>2</sub>), 4.21 (2H, q, OCH<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz), 3.49 (6H, s, (OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.41 (3H, t, CH<sub>3</sub>, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25°C, 400 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>): δ (ppm) 158.34, 157.75, 157.29, 151.39, 150.56, 150.38, 150.13, 149.97, 146.68, 146.61, 145.77, 143.46, 143.38, 143.23, 139.70, 138.58, 136.42, 135.51, 134.51, 133.93, 131.29, 131.17, 128.78, 124.65, 124.42, 123.41, 123.24, 11.65, 104.38, 103.36, 65.84, 55.83, 51.79, 14.87. UV-vis (CH<sub>3</sub>CN): λ<sub>max</sub> (ε): 232 nm (41000 L x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>), 279 (60000), 329 (35000), 356 (sh 27000), 419 (23000), 462 (sh 16000). HRMS (MALDI-TOF): calcd for C<sub>51</sub>H<sub>38</sub>N<sub>14</sub>O<sub>3</sub><sup>96</sup>Ru: m/z 990.2327, found: m/z 990.2346 ([M]<sup>+</sup>).

### [Ru(TAP)<sub>2</sub>(dppqp)].2PF<sub>6</sub> (30<sub>TAP</sub>)

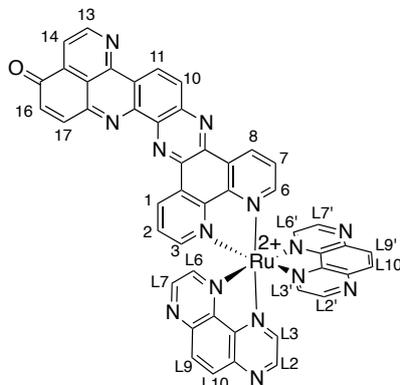


[Ru(TAP)<sub>2</sub>(dpqp-DMEA)].2PF<sub>6</sub> (40 mg, 3x10<sup>-5</sup> mol) was dissolved in 4 mL of DCM/TFA (v/v 5:1) and the mixture was stirred overnight at room temperature in the dark. The solvent was then evaporated and the resulting solid was redissolved in a minimum of CH<sub>3</sub>CN and precipitated upon addition of a saturated aqueous solution of KPF<sub>6</sub>. It was washed with H<sub>2</sub>O and purified by column chromatography on C18 with a CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O gradient (15% to 30%). All the purification steps were as well performed in the dark. [Ru(TAP)<sub>2</sub>(dppqp)].2PF<sub>6</sub> 30<sub>TAP</sub> (31 mg) was obtained as a dark red solid with 84% yield.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25 °C, 400 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>): δ (ppm) 12.18 (1H, br s, NH), 10.21 (1H, d, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz), 9.62 (1H, d, H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz), 9.05-9.00 (4H, m, L<sub>2(c)</sub> or L<sub>7(c)</sub>), 8.65 (4H, s, L<sub>9(c)</sub> and L<sub>10(c)</sub>), 8.43 (1H, d, L<sub>3(c)</sub> or L<sub>6(c)</sub>, <sup>3</sup>J = 2.6 Hz), 8.36-8.34 (2H, m, H<sub>10</sub>, 11, 13, 14, 16 or 17 and L<sub>3(c)</sub> or L<sub>6(c)</sub>), 8.29-8.28 (4H, m, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub>, L<sub>3(c)</sub> and L<sub>6(c)</sub>), 7.94 (1H, dd, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz and <sup>3</sup>J = 5.6 Hz), 7.89 (1H, dd, H<sub>7</sub>, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz and <sup>3</sup>J = 5.5 Hz), 7.83 (1H, d, H<sub>10</sub>, 11, 13, 14, 16 or 17, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz), 7.76 (1H, d, H<sub>10</sub>, 11, 13, 14, 16 or 17, <sup>3</sup>J = 9.6 Hz), 7.62 (1H, d, H<sub>10</sub>, 11, 13, 14, 16 or 17, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz), 7.28 (1H, d, H<sub>10</sub>, 11, 13, 14, 16 or 17, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz), 6.94 (1H, d, H<sub>10</sub>, 11, 13, 14, 16 or 17, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz), 4.12 (2H, q, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz), 1.33 (3H, t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25°C, 500 MHz, 5x10<sup>-3</sup> mol x L<sup>-1</sup>): δ (ppm) 157.20, 156.77, 151.43, 150.91, 150.65, 150.63, 150.49, 150.46, 150.25, 150.22, 149.83, 149.79, 149.19, 147.20, 146.66, 146.64, 146.62, 145.89, 143.38, 143.36, 143.29, 143.23, 140.20, 139.70, 137.01, 136.34, 134.51, 133.93, 133.66, 131.34, 131.10, 130.74, 128.78, 128.77, 126.73, 125.86, 123.66, 121.47, 120.52, 113.62, 112.63, 109.69, 66.07, 15.07. UV-vis (CH<sub>3</sub>CN): λ<sub>max</sub> (ε): 232 nm (50000 L x mol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>), 280

(66000), 303 (58000), 354 (sh 24000), 416 (22700), 464 (20000), 502 (sh 11000). **HRMS (MALDI-TOF)**: calcd for  $C_{49}H_{30}N_{14}O^{96}Ru$ :  $m/z$  926.1803, found:  $m/z$  926.1800 ( $[M]^+$ ).

### **[Ru(TAP)<sub>2</sub>(dppqp<sub>ox</sub>)]·2PF<sub>6</sub> (**56**<sub>TAP</sub>)**

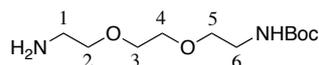


To a solution of  $[Ru(TAP)_2(dppqp)]_2Cl$  **30**<sub>TAP</sub> (12 mg,  $1 \times 10^{-5}$  mol) in 2 mL of H<sub>2</sub>O was added Cerium Ammonium Nitrate (16 mg,  $3 \times 10^{-6}$  mol). The mixture was stirred for 1 hour and the reaction was followed by UV-vis absorption spectroscopy by the disappearance of bands centered at 505 and 365 nm and the appearance of a band at 416 nm. After completion of the reaction, the product was precipitated by the addition of saturated aqueous solution of KPF<sub>6</sub>. The product was washed with water and Et<sub>2</sub>O and purified on C18 with a CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O gradient (15% to 30%).  $[Ru(TAP)_2(dppqp_{ox})]_2PF_6$  **56**<sub>TAP</sub> (10 mg) was obtained as an orange solid with 71% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 25 °C, 600 MHz,  $8 \times 10^{-3}$  mol x L<sup>-1</sup>)**:  $\delta$  (ppm) 10.01 (1H, d, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz), 9.85 (1H, d, H<sub>8</sub>, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz), 9.70 (1H, d, H<sub>16</sub> or H<sub>17</sub>, <sup>3</sup>J = 9.1 Hz), 9.64 (1H, d, H<sub>13</sub> or H<sub>14</sub>, <sup>3</sup>J = 4.2 Hz), 9.00 (4H, m, L<sub>2(c)</sub> or L<sub>7(c)</sub>), 8.72 (1H, d, H<sub>16</sub> or H<sub>17</sub>, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz), 8.65 (4H, m, L<sub>9(c)</sub> and L<sub>10(c)</sub>), 8.37 (1H, d, L<sub>3(c)</sub> or L<sub>6(c)</sub>, <sup>3</sup>J = 2.6 Hz), 8.34 (1H, d, L<sub>3(c)</sub> or L<sub>6(c)</sub>, <sup>3</sup>J = 2.6 Hz), 8.32 (1H, d, H<sub>13</sub> or H<sub>14</sub>, <sup>3</sup>J = 4.1 Hz), 8.27 (4H, m, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub>, L<sub>3(c)</sub> and L<sub>6(c)</sub>), 8.21 (1H, d, H<sub>10</sub> or H<sub>11</sub>, <sup>3</sup>J = 10.0 Hz), 7.95 (1H, dd, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz and <sup>3</sup>J = 5.3 Hz), 7.93 (1H, dd, H<sub>7</sub>, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz and <sup>3</sup>J = 5.5 Hz), 7.08 (1H, d, H<sub>10</sub> or H<sub>11</sub>, <sup>3</sup>J = 10.0 Hz). **ESI-MS**: C<sub>47</sub>H<sub>24</sub>N<sub>14</sub>ORu:  $m/z$  902.13 ;  $m/z_{obs}$ : 466.75 ( $[M+MeOH]^{2+}$ , 100%), 934.00 ( $[M+MeO]^+$ , 65%).

## **2.3 Synthèse du perylène fonctionnalisé par un pyridinium**

### **N-Boc-2,2'-(ethylenedioxy)diethylamine (63)**

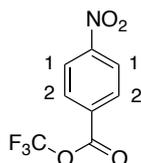


The 2,2'-(ethylenedioxy)bis(ethylamine) (12 mL, 118.3 mmol) was dissolved in 100 mL of DCM and the solution was cooled down to 0 °C. To that mixture was added dropwise a solution of Boc<sub>2</sub>O (3.6 g, 16.5 mmol). The temperature was raised to room temperature and the mixture was stirred overnight. It was then quenched with water and the product was extracted with DCM. The combined organic layers

were washed with water and dried with  $\text{MgSO}_4$ . The solvent was removed under reduced pressure and the product was isolated as an oil with 70% yield (2.85 g).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 3.60 (4H, s,  $\text{H}_3$  and  $\text{H}_4$ ), 3.52 (4H, m,  $\text{H}_2$  and  $\text{H}_5$ ), 3.39 (2H, m,  $\text{H}_1$ ), 2.87 (2H, m,  $\text{H}_6$ ), 1.42 (9H, s,  $(\text{CH}_3)_3$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 156.13, 79.28, 77.36, 73.32, 70.33, 70.32.

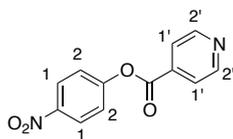
### Trifluoromethyl-4-nitrobenzoate (66)



Trifluoroacetic anhydride (7.35 mg, 35 mmol) and *p*-nitrophenol (4.17 g, 30 mmol) were dissolved in 20 mL of THF. The mixture was heated to 75 °C for 6 hours then cooled down to room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure and the product was obtained as a yellowish oil which solidify at 4 °C with 97% yield.

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 8.36 (2H, syst AB,  $\text{H}_1$ ), 7.45 (2H, syst AB,  $\text{H}_2$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 153.49, 146.61, 125.83, 121.86, 115.85, 113.01.

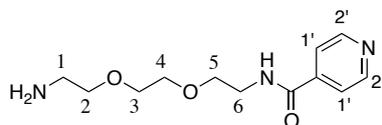
### 4-(4-nitro-phenoxy-carbonyl)-pyridine (64)



Isonicotinic acid (740 mg, 6.0 mmol) was solubilised in 20 mL of DCM. Triethylamine (1 mL, 7.2 mmol) was added to the solution, the mixture was cooled down to 0 °C and the trifluoromethyl-4-nitrobenzoate **66** (1.5 g, 6.6 mmol) was added slowly. The temperature was raised to room temperature and the mixture was stirred over night. The organic solution was washed with  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9), citric acid (1 M) and water. It was then dried with  $\text{MgSO}_4$  and the solvent was evaporated under reduced pressure. The pure product was isolated with 77% yield (1,14 g).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, 400 MHz):  $\delta$  (ppm) 8.90 (2H, syst AB,  $\text{H}_2$ ), 8.35 (2H, syst AB,  $\text{H}_1$ ), 8.01 (2H, syst AB,  $\text{H}_1'$ ), 7.44 (2H, syst AB,  $\text{H}_2$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 162.91, 155.10, 150.75, 145.95, 136.38, 125.60, 123.51, 122.57.

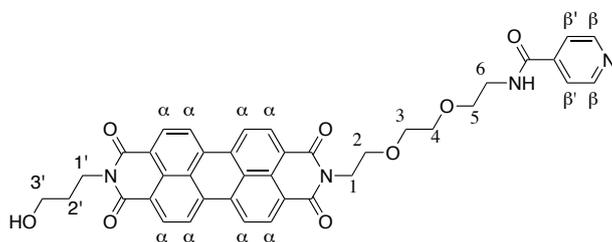
### *N*-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)isonicotinamide (**60**)



*N*-Boc-2,2-(ethylenedioxy)diethylamine **63** (273 mg, 2 mmol), triethylamine (2.2 mL, 16 mmol) and 4-(4-nitro-phenoxy-carbonyl)-pyridine **64** (537 mg, 2.2 mmol) were dissolved in 20 mL of DMF. The mixture was stirred over night at room temperature. When the reaction was complete, it was quenched by citric acid (0.05 M) and extracted with DCM. The organic layer was then washed with NaHCO<sub>3</sub> and water and dried with MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated under reduced pressure. The product was then solubilised in 6 mL of a solution of DCM/TFA (*v/v* 2 :1) for the deprotection of the remaining amine. The solution was stirred for 2 hours at room temperature. The solvent was then evaporated and the product was obtained with 32% yield.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, 400 MHz): δ (ppm) 8.82 (2H, d, H<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz), 7.98 (2H, d, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz), 3.72 (8H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> and H<sub>5</sub>), 3.66 (2H, m, H<sub>1</sub>), 3.14 (2H, m, H<sub>6</sub>).

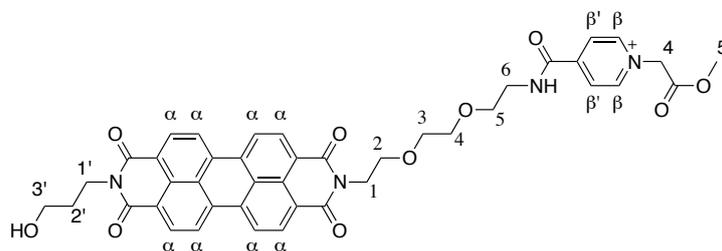
### *N*-(3-hydroxypropyl)-*N'*-(8-isonicotinamido-3,6-dioxyoctyl)-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic diimide (**62**)[9]



The perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic dianhydride (214 mg, 0.54 mmol), *N*-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)isonicotinamide **60** (196 mg, 0.84 mmol) and 3-amino-1-propanol (25 μL, 0.32 mmol) were dissolved in 22 mL of DMA/Dioxane (*v/v* 1 :1). The mixture was heated overnight at 120 °C. The product was precipitated upon addition of Et<sub>2</sub>O and filtered off. The product was separated from the other formed compounds by column chromatography on aluminium oxide (DCM/MeOH, 100% DCM to 93% DCM). The product **62** was obtained as a pink solid with 25% yield.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, TFA-*d*<sub>7</sub>) : δ (ppm) 9.01 (2H, d, H<sub>β</sub>, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz), 8.89 (8H, m, H<sub>α</sub>), 8.59 (2H, d, H<sub>β'</sub>, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz), 4.73 (2H, m, H<sub>1</sub>), 4.68 (2H, m, H<sub>1'</sub> or H<sub>3'</sub>), 4.60 (2H, m, H<sub>1'</sub> or H<sub>3'</sub>), 4.23 (2H, m, H<sub>2</sub>), 4.11 (2H, m, H<sub>6</sub>), 4.01 (4H, m, H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub>), 3.91 (2H, m, H<sub>5</sub>), 2.43 (2H, m, H<sub>2'</sub>).

## N-(3-hydroxypropyl)-N'-(8-(1-(2-methoxy-2-oxoethyl)isonicotinamido-3,6-dioxyoctyl)-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic diimide (65).



The perylenedicarboximide **62** (50 mg, 0.07 mmol) was dissolved in 50 mL of DCM/MeOH (1 :1). A large excess of methyl bromoacetate (500  $\mu$ L) was added to the solution. The mixture was then heated at 50 °C over night. The product was precipitated upon addition of Et<sub>2</sub>O. The product was obtained as a pink solid with 53% yield.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)** :  $\delta$  (ppm) 9.39 (1H, s, OH), 9.20 (2H, d, H $\beta$ , <sup>3</sup>J = 5.6 Hz), 8.50 (2H, d, H $\beta'$ , <sup>3</sup>J = 5.7 Hz), 7.72 (8H, m, H $\alpha$ ), 5.74 (2H, s, H<sub>4</sub>), 4.04 (2H, m, H<sub>1</sub>), 3.95 (2H, m, H<sub>1'</sub> or H<sub>3'</sub>), 3.63 (3H, s, H<sub>5</sub>), 3.55 (8H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> and H<sub>5</sub>), 3.55 (2H, m, H<sub>1'</sub> or H<sub>3'</sub>), 3.49 (2H, m, H<sub>6</sub>), 1.79 (2H, m, H<sub>2</sub>).

## 3 Techniques expérimentales

### 3.1 Spectroscopie d'absorption UV-Visible

Les spectres d'absorption (UV-Vis) des complexes et ligands, ainsi que les spectres relevés durant les suivis des réactions, ont été enregistrés à l'aide de spectrophotomètres UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 35 et 40. L'enregistrement des données est réalisé par un logiciel fourni par le fabricant sur un ordinateur connecté à l'appareillage.

Les titrages des différents oligonucléotides ont été effectués par absorption UV-vis sur un spectrophotomètre JASCO V630Bio.

### 3.2 Spectroscopie d'émission stationnaire

Les spectres d'émission des différents complexes et ligands ont été relevés (chapitre III) sur un spectrofluorimètre Shimadzu RF-5301PC, équipé d'une lampe au xénon de 150 W comme source d'excitation et d'un phototube Hamamatsu R928 comme détecteur. Une correction des données pour la réponse du phototube est nécessaire pour chaque spectre. La fonction de correction a été obtenue par l'enregistrement du spectre d'émission d'une lampe au tungstène calibrée d'Edinburgh Instrument.

Les spectres d'émission des complexes en présence de G4 ou d'oligonucléotides doubles brins (chapitre IV) ont été relevés sur un spectrofluorimètre JASCO FP8500.

### 3.2.1 Détermination des rendements quantiques

Le rendement quantique de luminescence est défini comme le rapport entre le nombre de photons émis par rapport au nombre de photons absorbés. Tous les rendements quantiques ont été calculés par rapport à la référence qu'est le  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  dont les rendements quantiques dans l'eau et l'acétonitrile, sous air et sous argon, sont connus et sont notés dans les tables du chapitre III. Ils ont été calculés de la manière suivante :

$$\Phi_C^{\text{émi}} = \Phi_{\text{ref}}^{\text{émi}} \frac{A_{\lambda,\text{ref}} \int I_C^{\text{émi}} d\nu}{A_{\lambda,C} \int I_{\text{ref}}^{\text{émi}} d\nu}$$

Le rendement quantique de la nouvelle espèce  $\Phi_C^{\text{émi}}$  est calculé à partir du rendement quantique de la référence  $\Phi_{\text{ref}}^{\text{émi}}$ , des absorptions des deux composés,  $A_{\lambda,C}$  et  $A_{\lambda,\text{ref}}$  à 440 nm et de l'aire sous la courbe d'émission de chaque composé  $\int I_C^{\text{émi}} d\nu$  et  $\int I_{\text{ref}}^{\text{émi}} d\nu$ .

### 3.2.2 Titration par CT-DNA

Une solution de complexe de ruthénium<sup>II</sup> est préparée dans un tampon TrisHCl (10 mM) (50 mM en NaCl). Le volume total de la solution est de 1,6 mL et est contenu dans une cellule en quartz pour spectroscopie. Une solution d'ADN (à environ  $5 \times 10^{-3}$  M) est ajoutée par pas de 2,5  $\mu\text{L}$  20 fois (50  $\mu\text{L}$  ajoutés au total).

La concentration en ADN est déterminée par spectroscopie d'absorption UV-vis et la concentration de départ en complexe est calculée de telle sorte que le rapport  $[\text{Phosphate}]/[\text{Complexe}] = 100$  soit satisfait au dernier ajout d'ADN.

Les spectres d'absorption et d'émission de l'échantillon sont relevés après chaque ajout.

### 3.2.3 Expérience de Stern-Volmer

Deux solutions sont préparées. Une première contenant la GMP à 2 mM et le complexe de ruthénium<sup>II</sup> à  $1 \times 10^{-2}$  mM dans un tampon TrisHCl 0,1 M. Une seconde contenant uniquement le complexe de ruthénium à  $1 \times 10^{-2}$  mM dans un tampon TrisHCl 0,1 M.

La première solution (3 mL) est contenue dans une cellule en quartz et constitue le premier point de l'expérience de Stern-Volmer. 100  $\mu\text{L}$  de cette solution sont alors retirés pour pouvoir ajouter 100  $\mu\text{L}$  de la seconde solution, permettant ainsi de maintenir la concentration en complexe constante et de diminuer la concentration en GMP. Cette manipulation est répétée plusieurs fois jusqu'à ce qu'un nombre suffisant de point soit atteint pour tracer la relation de Stern Volmer.

Les spectres d'absorption et d'émission de l'échantillon sont relevés après chaque diminution/ajout de la solution.

### **3.3 Illumination stationnaire**

La photostabilité des différents complexes a été évaluée par un dispositif d'illumination continue des composés dont la source de lumière est une lampe au xénon (Thermo-Oriel) d'une puissance de 500W. Le dispositif expérimental utilisé comprend plusieurs lentilles permettant de focaliser le faisceau sur la cellule et des filtres à l'eau et au KNO<sub>2</sub> permettant d'éliminer respectivement les rayons infrarouges et UV. Le suivi de l'illumination a été assuré par spectroscopie d'absorption et d'émission.

Les illuminations sous argon ont été réalisées par bullage d'argon de la solution 1 heure avant illumination puis durant tout le temps d'illumination. Le bullage n'a pas été assuré pendant les relevés des spectres d'absorption et d'émission.

### **3.4 Spectroscopie résolue dans le temps**

Les durées de vie de luminescence des différents complexes ont été déterminées à l'aide d'un appareillage Time Correlated Single Photon Counting (TC-SPC) LifeSpec II (Edinburgh Instrument). Cet appareillage mesure le temps écoulé entre un pulse d'excitation lumineuse et la détection du premier photon émis par le composé. Cette mesure est réalisée par le Time to Amplitude Converter (TAC). Le signal « start » est déclenché par la détection de la source lumineuse excitatrice, envoyée par une diode laser EPL-445 (Edinburgh Instrument). Le signal « stop » est, quant à lui, déclenché lors de la détection du premier photon émis par l'échantillon. La mesure est répétée un grand nombre de fois et les résultats sont transmis au Multi Channel Analyser qui reproduit un profil de type multi-exponentiel exprimant l'intensité lumineuse en fonction du temps.

### **3.5 Spectrométrie de masse**

Les spectres de masse, nécessaires à la caractérisation des ligands et des complexes, ont été relevés sur deux dispositifs expérimentaux différents.

Les masses de routine ont été relevées sur un spectromètre de masse ESI-MS ThermoQuest Finnigan LCQ Deca équipé d'un analyseur de type Ion-Trap et d'un détecteur de type MCP (Multi Channel Plate). L'ionisation par electrospray permet de ne fragmenter que faiblement les complexes. Il a ainsi été possible de détecter la masse exacte des composés synthétisés.

Les masses à haute résolution ont été relevées sur un spectre de masse Waters QToF Premier à l'Université de Mons (UMONS-Belgique). La méthode d'ionisation utilisée est également douce puisqu'il s'agit d'une source MALDI constituée d'un laser Nd-YAG, opérant à 355 nm avec un pulse d'énergie maximum à 104.1 µJ. Ce pulse est appliqué à l'échantillon avec une fréquence de 50 Hz. Tous les échantillons ont été préparés dans une solution saturée en acétonitrile sur une matrice d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique.

L'identification des pics correspondant aux complexes de ruthénium est aisée étant donné l'allure caractéristique de ces composés due à la présence des différents isotopes naturels du ruthénium.

### **3.6 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire**

L'ensemble des spectres de résonance magnétique nucléaire du proton, du carbone ainsi que les spectres de corrélation COSY nécessaires à l'élaboration de ce travail, ont été relevés sur quatre appareillages : des instruments Bruker Avance 300 (ULB), Varian VNMRS 400 (ULB), Varian VNMRS 600 (ULB), Bruker Avance 400 (UGA) et Avance 500 (UGA). Le déplacement chimique a systématiquement été mesuré par rapport au signal résiduel du solvant non deutéré utilisé comme référence interne. Les valeurs de ces déplacements ont été obtenues à partir de la littérature. Les abréviations standard utilisées pour la multiplicité des signaux sont : s pour singulet, d pour doublet, t pour triplet et m pour multiplet.

### **3.7 Réacteur micro-onde**

Les synthèses sous irradiation micro-onde ont été réalisées avec un appareil CEM-Discover. Ce type d'appareil permet de contrôler la température, le temps de réaction et la puissance maximum fournie pour chauffer la solution. Cette dernière a été réglée à 200 W pour toutes les synthèses et est modulé par l'appareil au cours de l'expérience. La solution est chauffée pendant une certaine période de temps afin d'arriver à la température désirée. Une fois cette température atteinte le temps de réaction correspond au temps défini manuellement par l'utilisateur. Les synthèses ont été effectuées en système fermé permettant ainsi de travailler à des pressions supérieures à la pression atmosphérique.

### **3.8 Chromatographie Liquide Haute Performance**

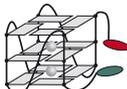
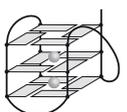
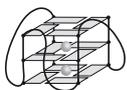
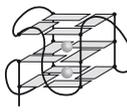
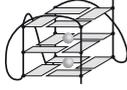
L'appareillage pour la Chromatographie Liquide Haute Performance est un équipement HPLC Waters utilisé en mode analytique. Il est constitué de plusieurs blocs dont une pompe 2535 à quatre voies pour les solvants, un autosampler 2707, un four à colonne, un détecteur PDA 2998 (absorption) et un détecteur de fluorescence 2475. La colonne utilisée est une colonne waters C18 Atlantis T3. Les différentes composantes de la machine sont contrôlées par un programme Empower 3 fourni par le constructeur. Ce logiciel permet également de collecter les différentes données de la mesure.

### **3.9 FRET Melting Assays**

Les mesures de FRET Melting assays ont été réalisées sur un appareil Agilent technologies Stratagen Mx3005P qPCR. Toutes les mesures ont été réalisées en duplicate sur un dispositif à 96 puits avec un volume global de 100  $\mu$ L dans chaque puits. Pour chaque mesure, une première étape d'équilibration est nécessaire pour commencer la mesure à 25 °C. La température est alors augmentée par pas de 1 °C toutes les 30 secondes jusqu'à atteindre 90 °C qui constitue la fin de la mesure.

Les solutions stock d'oligonucléotides ont été préparées à 1000  $\mu$ M pour TG5T et 500  $\mu$ M pour tous les autres par ajout d'eau dé-ionisée. La structuration des oligonucléotides est ensuite réalisée en préparant une solution de l'oligonucléotide dans un tampon cacodylate qui est chauffée à 90 °C pendant 5 minutes puis refroidie subitement à 0 °C ou lentement (10 minutes à 80 et 70 °C, 1 heure à 60, 50, 40 et 30 °C, 2-3 heures à température ambiante et une nuit à 4 °C).

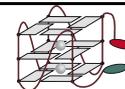
La structure et la séquence des différents oligonucléotides marqués et non marqués sont représentées dans le tableau ci-dessous.

Nature	Nom	Séquence	Structure
ADN G4 marqués	F21T	FAM-d[ <sup>5'</sup> GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG <sup>3'</sup> ]-TAMRA	
	FmycT	FAM-d[ <sup>5'</sup> GAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAG <sup>3'</sup> ]-TAMRA	
	Fkit2T	FAM-d[ <sup>5'</sup> CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGG <sup>3'</sup> ]-TAMRA	
ADN G4 non marqués	TG5T	Brins 1-4 : d[ <sup>5'</sup> TGGGGGT <sup>3'</sup> ]	
	22AG	d[ <sup>5'</sup> AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG <sup>3'</sup> ]	
	c-myc	d[ <sup>5'</sup> GAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAG <sup>3'</sup> ]	
	c-kit	d[ <sup>5'</sup> CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGG <sup>3'</sup> ]	
	SRC	d[ <sup>5'</sup> GGGAGGGAGGGCTGGGGG <sup>3'</sup> ]	
ADN double brin	FduplexT (marqué)	FAM-d[ <sup>5'</sup> TATAGCTATATTTTTTATAGCTATA <sup>3'</sup> ]-TAMRA	
	ds26	Brins 1 et 2 d[ <sup>5'</sup> CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG <sup>3'</sup> ]	
	ds17	Brin 1: d[ <sup>5'</sup> CCAGTTCGTAGTAACCC <sup>3'</sup> ] Brin 2 : d[ <sup>5'</sup> GGGTTACTACGAACTGG <sup>3'</sup> ]	

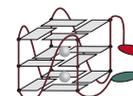
ds12 Brins 1 et 2 : d[<sup>5</sup>CGCGAATTCGCG<sup>3</sup>]



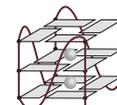
ARN G4 FTERRAT FAM-r[<sup>5</sup>GGGUUAGGGUUAGGGUUAGGG<sup>3</sup>]-TAMRA  
marqués



FTRF2T FAM-r[<sup>5</sup>CGGGAGGGCGGGGAGGGC<sup>3</sup>]-TAMRA

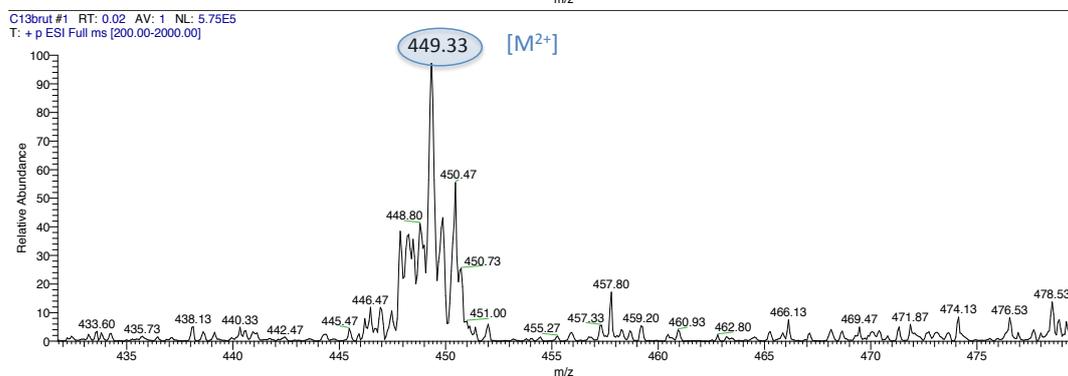
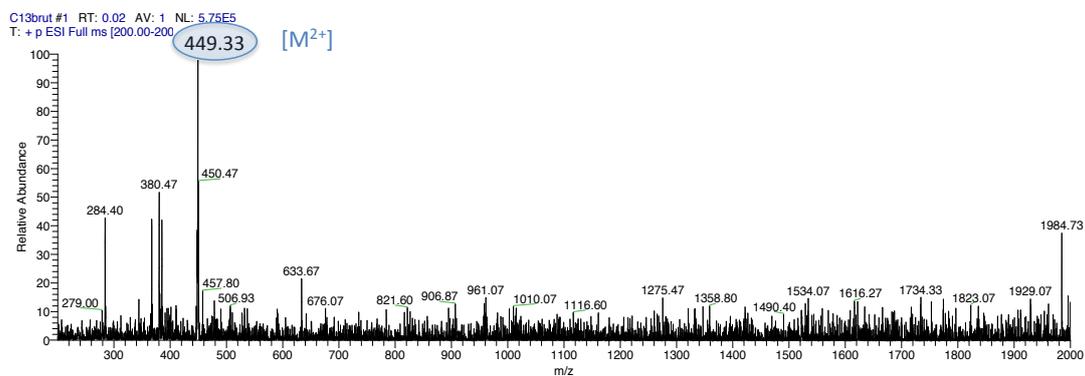


ARN G4 TRF2 r[<sup>5</sup>CGGGAGGGCGGGGAGGGC<sup>3</sup>]  
non  
marqué

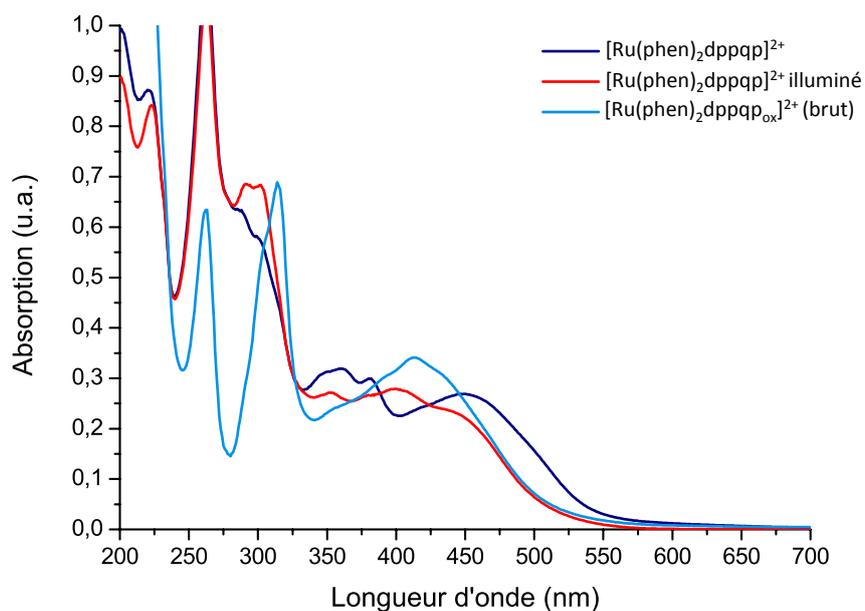


## 4 Annexes

### 4.1 Caractérisations sur le brut réactionnel du complexes [Ru(phen)<sub>2</sub>dppqp<sub>ox</sub>]<sup>2+</sup> 56<sub>phen</sub>

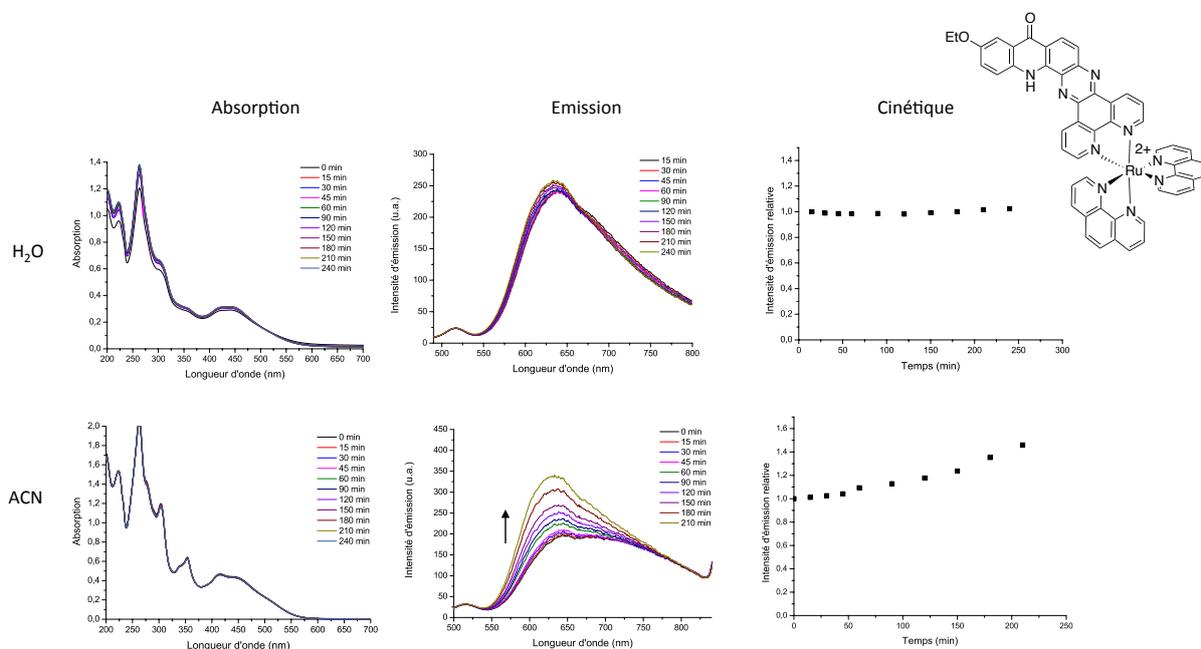


Spectre de masse ESI-MS du [Ru(phen)<sub>2</sub>dppqp<sub>ox</sub>]<sup>2+</sup> 56<sub>phen</sub>

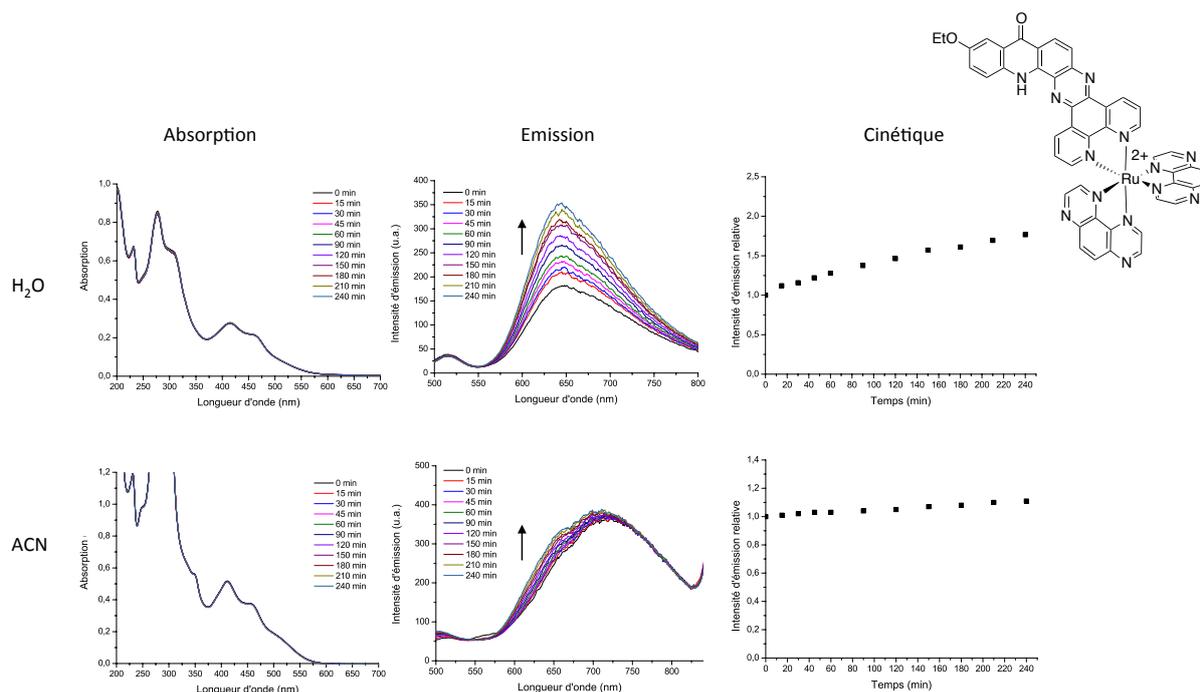


Spectre d'absorption dans l'ACN à 25 °C du brut réactionnel de **56**<sub>phen</sub> et comparaison avec  $[Ru(phen)_2dppqp]^{2+}$  **30**<sub>phen</sub> et  $[Ru(phen)_2dppqp]^{2+}$  **30**<sub>phen</sub> illuminé.

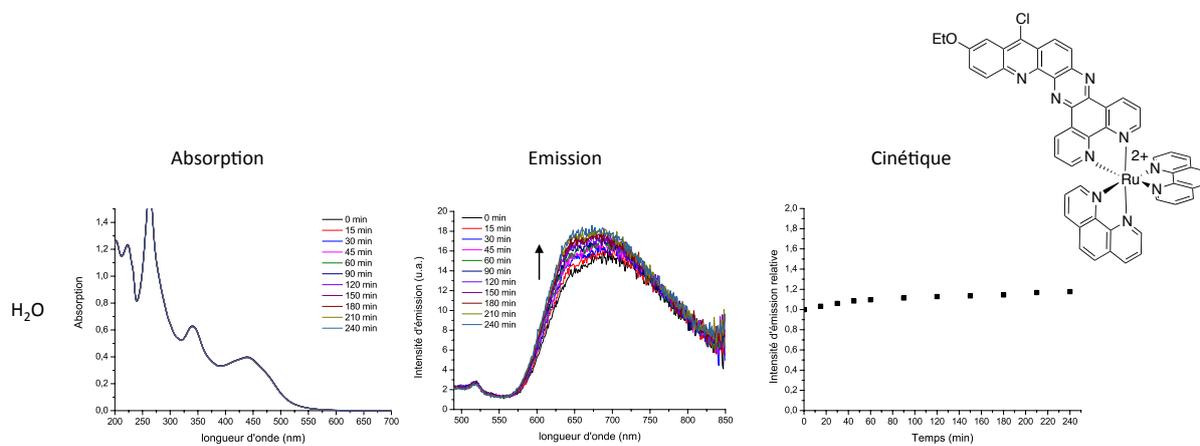
#### 4.2 Suivi d'illumination stationnaire



Spectres d'absorption et d'émission suivis au cours du temps d'illumination et cinétique de l'émission relative ( $I_0$  étant l'intensité d'émission avant illumination) dans l'eau et l'acétonitrile, sous air à 25 °C de  $[Ru(phen)_2dppqp-OH]^{2+}$  **29**<sub>phen</sub>.



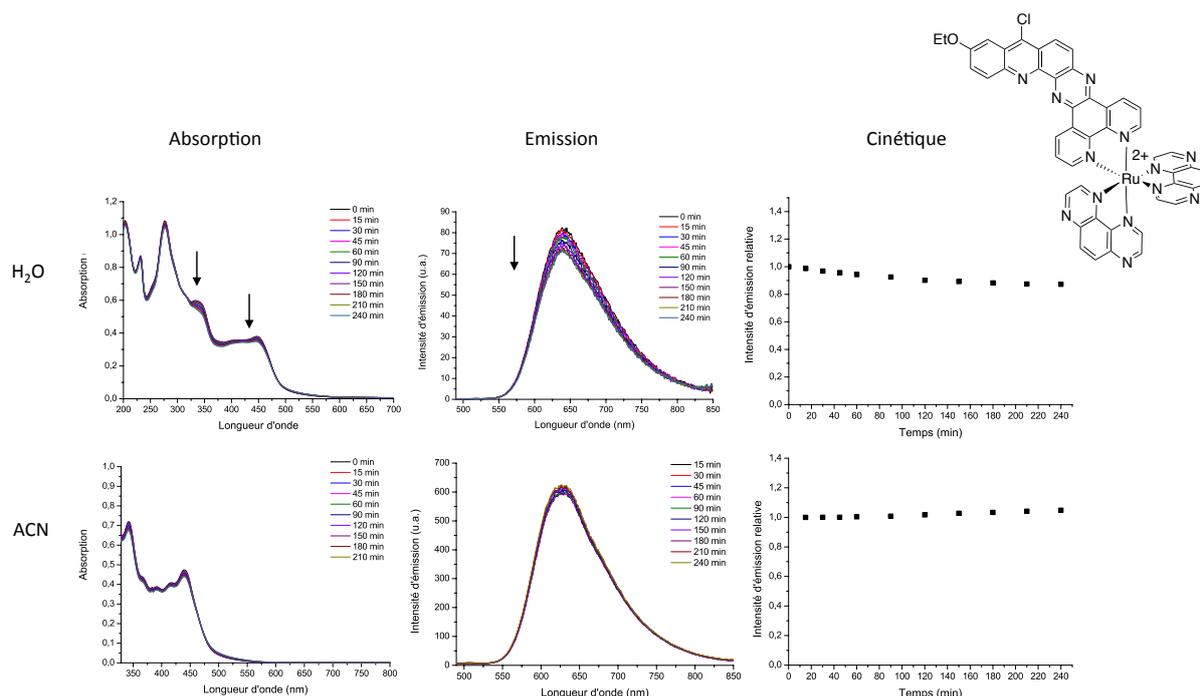
*Spectres d'absorption et d'émission suivis au cours du temps d'illumination et cinétique de l'émission relative ( $I_0$  étant l'intensité d'émission avant illumination) dans l'eau et l'acétonitrile, sous air à 25 °C de  $[Ru(TAP)_2dpqp-OH]^{2+} \mathbf{29}_{TAP}$ .*



ACN

Résultats dans le mémoire de A. De Neyer (ULB)

*Spectres d'absorption et d'émission suivis au cours du temps d'illumination et cinétique de l'émission relative ( $I_0$  étant l'intensité d'émission avant illumination) dans l'eau, sous air à 25 °C de  $[Ru(phen)_2dpqp-Cl]^{2+} \mathbf{39}_{phen}$ .*



Spectres d'absorption et d'émission suivis au cours du temps d'illumination et cinétique de l'émission relative ( $I_0$  étant l'intensité d'émission avant illumination) dans l'eau et l'acétonitrile, sous air à 25 °C de  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp-Cl}]^{2+} \mathbf{39}_{\text{TAP}}$ .

### 4.3 Expériences d'interaction de $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl} \mathbf{39}_{\text{phen}}$ avec les G4 par luminescence

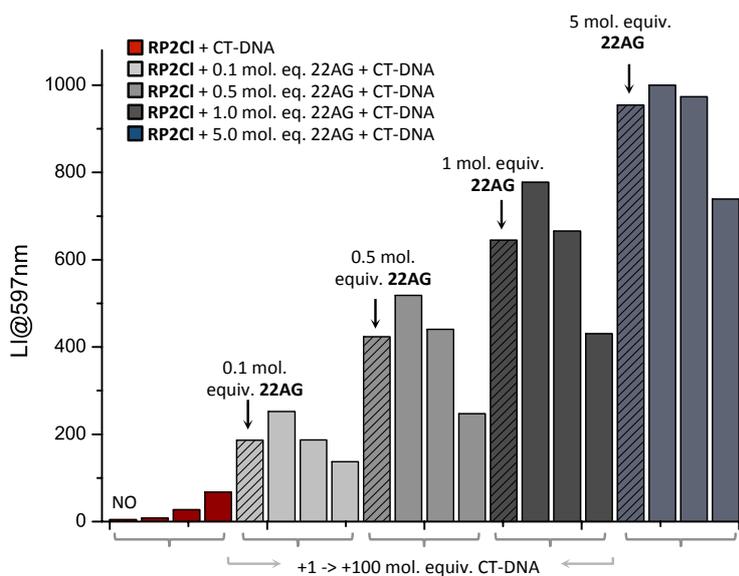


Fig. 4.27. Intensités de luminescence à 597 nm de  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp-Cl}].2\text{Cl} \mathbf{39}_{\text{phen}}$  (2  $\mu\text{M}$ ) en présence d'ajouts croissants de c-kit (2 à 10  $\mu\text{M}$ ) et d'ajouts croissants de thymus de veau (CT DNA) (0 à 200  $\mu\text{M}$ ) dans un tampon cacodylate (pH 7,2) modifié (ajout de 10 mM KCl et 90 mM LiCl).

## Bibliographie

- [1] L. Bouffier, R. Dinica, J. Debray, P. Dumy, and M. Demeunynck, "Functionalization of the A ring of pyridoacridine as a route toward greater structural diversity. Synthesis of an octacyclic analogue of eilatin," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 16, pp. 4836–4838, 2009.
- [2] R. Nasielski-Hinkens and M. Benedek-Vamos, "Synthesis of Di- and Terta-substituted 1,4,5,8-Tetraazaphenanthrenes (Pyrazino[2,3-f]quinoxalines)," *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, vol. 13, p. 1975, 1975.
- [3] R. Dinica, F. Charmantray, M. Demeunynck, and P. Dumy, "Regioselective synthesis of angular nitrogen polyheterocycles: dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[2,3-h]phenazines," *Tetrahedron Lett.*, vol. 43, no. 44, pp. 7883–7885, 2002.
- [4] S. R. Sandler and W. Karo, "Organic Functional Group Preparations (2nd Ed.)," in *Organic Functional Group Preparations*, (London) LTD. Academic Press, Inc., Ed. Elsevier, 1989.
- [5] M. Yamada, Y. Tanaka, Y. Yoshimoto, S. Kuroda, and I. Shimao, "Synthesis and Properties of Diamino-Substituted Dipyrido [3,2-a:2',3'-c]phenazine," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 65, no. 4, pp. 1006–1011, 1992.
- [6] B. P. Sullivan, D. J. Salmon, and T. J. Meyer, "Mixed Phosphine 2,2'-Bipyridine Complexes of Ruthenium," *Inorg. Chem.*, vol. 17, no. 12, pp. 3334–3341, 1978.
- [7] B. Elias, "Thèse de doctorat : Synthèse et photochimie de complexes de Ru(II). Photoréactivité avec des biomolécules et transfert d'énergie intramoléculaire," Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, 2005.
- [8] L. Bouffier, M. Demeunynck, P. Dumy, C. Moucheron, and A. Kirsch-De Mesmaeker, "Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]quinolino[3,2-j]phenazine (dpqp-OH) - Synthesis, characterization and DNA interaction of the corresponding Ru(II) complex," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 360, no. 10, pp. 3162–3168, 2007.
- [9] K. R. Wang, Z. B. Yang, and X. L. Li, "High excimer-state emission of perylene bisimides and recognition of latent fingerprints," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 21, no. 15, pp. 5680–5684, 2015.



## Résumé

Depuis plusieurs années, on observe un intérêt grandissant envers des structures particulières de l'ADN, les quadruplexes de guanine ou G4. Ces structures, largement étudiées *in vitro*, sont encore peu connues *in cellulo* mais semblent jouer un rôle important dans la régulation de l'expression génétique. Elles ont rapidement été considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles pour certaines maladies telles que le cancer. Le premier indice de leur existence dans les cellules n'a été obtenu qu'en 2013 par immunodétection sur des cellules fixées. Les recherches sont actuellement tournées vers le développement de nouveaux outils moléculaires qui permettraient la visualisation des G4 dans des cellules vivantes.

C'est dans ce cadre que nous avons imaginé une série de complexes polyazaaromatiques de ruthénium<sup>II</sup> à base de ligands plans étendus (heptacycle dpqp et octacycle dppqp). La combinaison des propriétés photophysiques des complexes de Ru<sup>II</sup> associées à la présence d'un large plan étendu supposé interagir avec les G4, fait de ces molécules des outils potentiels pour l'étude des G4 *in cellulo*.

La première partie de ce projet porte sur la synthèse de ces nouveaux complexes de ruthénium. Une méthode originale de "chimie sur complexe" a permis d'obtenir, entre autres, un complexe possédant le ligand dpqp, fonctionnalisé par une triple liaison. Il a également été possible, par « chimie sur complexe », de construire un cycle supplémentaire sur le ligand heptacyclique (dpqp) chélaté pour obtenir les complexes  $[\text{Ru}(\text{L})_2\text{dppqp}]^{2+}$ . Les propriétés photophysiques des différents complexes ont été étudiées. Seuls deux complexes,  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp}\text{-Cl}]^{2+}$  et  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp}\text{-Cl}]^{2+}$ , présentent un comportement s'approchant de celui des complexes de référence; c'est à dire des rendements quantiques comparables à  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  et des durées de vie de l'état excité de l'ordre de la centaine de nanosecondes. Les autres complexes sont non luminescents et l'hypothèse d'un quenching par transfert de proton à l'état excité a été avancée pour expliquer ce comportement.

Les complexes ont aussi été évalués vis à vis de différentes structures oligonucléotidiques G4 et duplexes. Tous les complexes possèdent une affinité correcte envers les G4. Comme nous l'espérons, le complexe porteur du ligand octacyclique semble être particulièrement sélectif envers les G4 par rapport à l'ADN double brin. Il a aussi été montré que deux des complexes testés ont le potentiel d'être utilisés comme sondes moléculaires "light-switch ON" pour les structures G4 en milieu cellulaire. Certains des complexes synthétisés possèdent donc le potentiel pour devenir de bons outils moléculaires pour l'étude des G4 *in cellulo*.

## Summary

A growing interest has risen these past few years for some unusual structures of DNA, the G4 quadruplexes. These structures were extensively studied *in vitro*, but a lot remains unknown about their existence *in cellulo*. Interestingly, G4 structures seem to play key regulatory roles in gene expression and therefore are potential therapeutic targets for diseases such as cancer. Consequently, visualisation of those structures in cells is the new challenge, and the use of small molecules with luminescent properties is a promising way of doing it.

In this context, we designed a series of new ruthenium<sup>II</sup> complexes chelated by a large planar aromatic ligand, (heptacycle dpqp or octacycle dppqp). Association of the photophysical properties of Ru<sup>II</sup> complexes with proposed favorable stacking properties of the ligand with G4, would make these complexes promising molecular tools for G4 visualization.

The first part of this project focusses on the synthesis of ruthenium complexes and their specific ligands. One particular ligand is formed by the condensation between acridine and phenanthroline nuclei. A chemistry on the complex approach enabled us 1) to functionalize the chelated ligand by a triple bond that will be used for the formation of an heterodimer by click chemistry, and 2) to build an additional cycle on the chelated ligand. Photophysical properties were evaluated and only two of them,  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpqp}\text{-Cl}]^{2+}$  and  $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{dpqp}\text{-Cl}]^{2+}$ , exhibit the same photophysical behaviour than reference complexes. Indeed, the quantum yields are in the same order of magnitude than for  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  and the excited state lifetime are of a few hundred nanoseconds. The other complexes are non-luminescent and a quenching by excited state proton transfer was hypothesised to explain this unusual behaviour. Interaction properties with G4 DNA were evaluated. All complexes display good affinity towards G4 and as expected, the complex bearing the octacyclic ligand shows a strong selectivity towards G4 compared to double stranded DNA. Two of the complexes were proven to be potential luminescent light-switch ON probes for G4 detection in cells. In conclusion, this work highlights the possibility to use some of the newly synthesized complexes as efficient molecular tools for G4 visualization in cells.