



HAL
open science

Synthèse de sondes fluorescentes hybrides epicocconone-triphénylamine pour le piégeage de protéines liées aux zones à risques de l'ADN.

Romain Mougeot

► **To cite this version:**

Romain Mougeot. Synthèse de sondes fluorescentes hybrides epicocconone-triphénylamine pour le piégeage de protéines liées aux zones à risques de l'ADN.. Autre. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR126 . tel-03059706

HAL Id: tel-03059706

<https://theses.hal.science/tel-03059706>

Submitted on 13 Dec 2020

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Chimie

Préparée au sein de L'université de Rouen Normandie

Synthèse de sondes fluorescentes hybrides epicoconone-triphénylamine pour le piégeage de protéines liées aux zones à risques de l'ADN

Présentée et soutenue par
Romain MOUGEOT

Thèse soutenue publiquement le 12 décembre 2018
devant le jury composé de

M. Philippe BELMONT	Professeur, Faculté de Pharmacie Paris, Université Paris Descartes.	Rapporteur
M. Samir MESSAOUDI	Directeur de Recherches, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11.	Rapporteur
Mme Isabelle GILLAIZEAU	Professeure, Université d'Orléans.	Examineur
M. Xavier FRANCK	Directeur de Recherches, Université Rouen Normandie.	Directeur de thèse
Mme Florence MAHUTEAU-BETZER	Directrice de Recherches, Institut Curie, Université Paris Sud.	Co-encadrant de thèse
M. Stéphane LELEU	Maître de Conférences, Université Rouen Normandie.	Co-encadrant de thèse
M. Jean-François BRIERE	Directeur de Recherches, Université Rouen Normandie.	Membre invité
M. Thibault GALLAVARDIN	Chargé de Recherches, Université Rouen Normandie.	Membre invité

Thèse dirigée par le Dr. Xavier FRANCK, Laboratoire COBRA (UMR 6014).



Normandie Université



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Chimie

Préparée au sein de L'université de Rouen Normandie

Synthèse de sondes fluorescentes hybrides epicoconone-triphénylamine pour le piégeage de protéines liées aux zones à risques de l'ADN

Présentée et soutenue par
Romain MOUGEOT

Thèse soutenue publiquement le 12 décembre 2018
devant le jury composé de

M. Philippe BELMONT	Professeur, Faculté de Pharmacie Paris, Université Paris Descartes.	Rapporteur
M. Samir MESSAOUDI	Directeur de Recherches, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11.	Rapporteur
Mme Isabelle GILLAIZEAU	Professeure, Université d'Orléans.	Examineur
M. Xavier FRANCK	Directeur de Recherches, Université Rouen Normandie.	Directeur de thèse
Mme Florence MAHUTEAU-BETZER	Directrice de Recherches, Institut Curie, Université Paris Sud.	Co-encadrant de thèse
M. Stéphane LELEU	Maître de Conférences, Université Rouen Normandie.	Co-encadrant de thèse
M. Jean-François BRIERE	Directeur de Recherches, Université Rouen Normandie.	Membre invité
M. Thibault GALLAVARDIN	Chargé de Recherches, Université Rouen Normandie.	Membre invité

Thèse dirigée par le Dr. Xavier FRANCK, Laboratoire COBRA (UMR 6014).

Ce sujet de thèse a été financé par une bourse Labex SynOrg et co-financé par la région, et a été effectué au sein du laboratoire COBRA (UMR CNRS 6014) à Rouen sous la direction du Dr. Xavier Franck et le co-encadrement du Dr. Stéphane Leleu et à l'institut curie (UMR 176) à Orsay sous l'encadrement du Dr. Florence Mahuteau-Betzer.

Je remercie vivement la Pr. Isabelle Gillaizeau (Professeure à l'université d'Orléans), le Pr. Philippe Belmont (Professeur à la faculté de Pharmacie de Paris, université Paris Descartes) et le Dr. Samir Messaoudi (Directeur de recherches à la faculté de pharmacie, université de Paris-Sud 11) pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.

« DE TOUTES LES EXPÉRIENCES QUE TU VIS, RETIENS SEULEMENT LA SAGESSE QU'ELLES RENFERMENT. »

MARK TWAIN.

REMERCIEMENTS

Pour commencer, je souhaiterais vivement remercier mes encadrants de thèse, les docteurs Stéphane Leleu et Xavier Franck qui m'ont supportés pendant ces trois années de thèse. Je vous remercie pour votre écoute de tous les instants malgré vos nombreuses responsabilités. Je vous remercie également pour tous les conseils que vous m'avez donnés, pour votre passion de la chimie et de la recherche communicative, pour vos remarques toujours pertinentes mais aussi pour la liberté que vous m'avez accordée à la paillasse. Je voulais également vous remercier pour votre constante bonne humeur et positivité devant les échecs qui m'ont toujours poussé vers l'avant. Je tenais également à vivement remercier le docteur Florence Mahuteau-Betzer pour son accueil lors de ma venue à Orsay. Les échanges que nous avons eus et la positivité devant les résultats « pas terribles » des sondes que j'ai obtenues m'ont été bénéfiques. Merci à vous trois, pour votre encadrement.

Je souhaite également remercier le docteur Thibault Gallavardin, toujours présent en cas de problème, pour répondre aux questions diverses et variées ou lancer des petits pics sur des sujets que l'on pourrait qualifier de « sensibles », comme les fluorophores qui ne fluorescent pas Merci aussi aux docteurs Cyrille Sabot, Ludovic Jean et au professeur Pierre-Yves Renard, également présent en cas de soucis.

Je souhaite bien évidemment remercier tous les anciens comme les docteurs Sovy, Monica, Julien (aka B), Killian, Arnaud mais surtout le docteur Thibault Alle qui m'a encadré pendant mon stage de M2 et qui m'a appris beaucoup de choses et donné l'envie de faire une thèse (et qui m'a accessoirement donné goût au foot en salle).

Vient ensuite des anciens que j'ai eu la chance de côtoyer pendant un temps plus long. Poupousse avec sa chance légendaire et ses tentatives de blagues (Tiger Wood et le lion de bois). David alias Pépito avec son rire ne passant pas inaperçu et parlant mieux français que la plupart des français ... Benoit alias Roubax, grand amateur de champignons et de musique. Mehdi alias MacCrap le stabilo à qui j'apprenais à jouer à pokémon (et au foot aussi) et qui me disait « Franchement ça va ». Kathleen, qui est toujours à dire que je suis « vraiment trop bête », à force je vais finir par le croire !!! Olivier, qui même au pays des Caribous, balance encore et toujours des vacheries !

Un petit paragraphe destiné aux nombreuses personnes qui sont passées chez nous, Jordan (Ou Jason), Alexandre (aussi appelé le petit Mougeot), Sarra, Hasan mais surtout Alex, qui a été mon stagiaire pendant ma première année de thèse. Merci à toi pour m'avoir aidé pendant cette année à la paillasse, je te souhaite bon courage pour ta thèse, et je suis heureux de t'avoir donné l'envie de faire une thèse.

Il me reste à remercier les personnes actuellement en thèse, en commençant par les personnes de la cellule 229. Margot, alias Cyanine, le Schtroumpf, le minimoy bleu, bref tout ce qui est petit et bleu ! Mais aussi Alexis appelé le moche (parce qu'il est vraiment très moche !) pour les bons fous rires que l'on a partagés, cette danse mythique du RECOB et sa collaboration avec Pierrick pour avoir mis mon lit sur le balcon ... Je remercie également Kévin avec qui j'ai fait mon master et ses trois années de thèse, on est dans la même galère !! Mais aussi Madeleine, qui vient juste d'arriver et qui prend ma relève sur les blagues pourraves, et ça c'est bien !!

Bien sûr, il ne faut pas oublier les étudiants des autres laboratoires. Je remercie Pierrick pour ses longues discussions sur de nombreux sujets en rentrant du foot (pendant plus d'1h par moment !) mais également pour avoir eu l'excellente idée de mettre mon lit sur le balcon au RECOB... Je remercie Dorra pour sa bonne humeur et ses connaissances en CCM grâce à son chef. Je remercie Batoul pour sa bonne humeur et je la félicite pour ses progrès fait en français. Je remercie également Mégane et son camion de déménagement, Baptiste et ses capillaires de flux bouchés, Pauline, qui comme moi pétait une durite en fin de rédaction. Matthieu pour ses discussions sur One Piece. Masahiro et son sourire constant. Amaury et sa bonne humeur. Maxime le roukmouth avec qui j'ai fait du covoiturage et avec qui j'ai partagé de bons moments.

Je tiens maintenant à remercier une personne avec qui j'ai « grandi » pendant ses années de thèse, Samuel Oger, aussi connu sous le nom de Samuel Ovier ou Tonton Tugdu. Il a travaillé à mi-temps à l'IRCOF mais également à mi-temps chez Paint dont les montages photos sont tous aussi moches les uns que les autres. Nos nocturnes jusqu'à minuit en faisant des blinds tests ou des jeux de sociétés, mais également tes punchlines assassines m'ont manqués durant cette dernière année. Plus sérieusement, merci pour tes conseils et pour m'avoir aidé pendant la rédaction avec mes questions idiotes et mes relectures « pour voir si j'ai pas dit de bêtises ». Merci pour ta présence en cas de pépin. Dans une moindre mesure, je te remercie d'essayer d'assurer mes arrières quand nous jouons ensemble à Overwatch, IDIOOOOOT.

Je tiens également à remercier toutes les autres personnes de l'étage comme Emilie et Denis avec qui j'ai toujours eu plaisir à discuter, sans oublier le personnel « du plateau technique » comme Patricia, chez qui j'ai fait des travaux de moquette, Laetitia et Emilie pour leurs conseils et leur bonne humeur.

Il me reste à remercier mes parents, ma sœur et ma grand-mère, ainsi que mes proches notamment ma belle-famille et mes amis, Pierre, Yannis, Loïc pour m'avoir toujours encouragés et soutenus dans cette aventure qu'est la thèse.

Je vais finir par remercier la personne la plus importante, ma moitié, Létitia, qui partage ma vie depuis un long moment maintenant. Merci d'être toujours là pour moi et me supporter au quotidien. Merci pour ton soutien de chaque instant, de ta bonne humeur, de ta douceur, de ta patience et de ton aide. Je suis très heureux et fier de t'avoir à mes côtés. Merci à toi.

TABLE DES MATIÈRES

Abréviations et acronymes.....	20
Préambule	24
1. Introduction générale	28
1.1. La découverte de l'ADN, 50 ans de travaux.....	30
1.1.1. Les prémices de la découverte.....	30
1.1.2. L'élucidation de la structure de l'ADN	31
1.2. L'ADN, sa structure	35
1.2.1. La structure de base de l'ADN.....	35
1.2.2. La structure tridimensionnelle de l'ADN.....	36
1.2.3. Les sillons de l'ADN.....	37
1.2.4. Les structures non canoniques de l'ADN	38
1.2.5. Le niveau de condensation maximal de l'ADN : Le chromosome.....	39
1.3. L'ADN centre de commande de la cellule, son rôle et ses protéines.....	41
1.3.1. La régulation de l'ADN.....	41
1.3.2. La réplication de l'ADN.....	41
1.3.3. La transcription de l'ADN	43
1.3.4. La préservation de l'ADN.....	45
1.4. Les structures complexes de l'ADN	48
1.4.1. Les G-quadruplex.....	48
1.4.1.1. Leurs structures	48
1.4.1.2. Leurs fonctions.....	49
1.4.1.2.1. Les télomères.....	50
1.4.1.2.2. La réplication	51
1.4.1.2.3. La transcription	52
1.4.2. Les zones riches en adénine et thymine de l'ADN	53
1.4.2.1. Une structure favorisant les interactions	54
1.4.2.2. Une séquence cosmopolite et multitâche	55
1.4.2.2.1. L'initiation de la transcription, la boîte TATA et ses protéines	55
1.4.2.2.1.1. DNA unwinding elements	57
1.4.2.2.2. Les séquences longues en adénine et thymine	58
1.4.2.2.2.1. Les sites fragiles	58
1.4.2.2.3. La grande diversité de protéines régulant les zones riches en AT	59

1.4.2.2.3.1. Les HMGs.....	59
1.4.2.2.3.2. Les protéines STABs	60
1.5. Les ligands de l'ADN.....	61
1.5.1. Les différents modes de liaison.....	62
1.5.1.1. Interactions électrostatiques	62
1.5.1.2. Intercalations entre les paires de bases	63
1.5.1.3. Interactions avec les sillons de l'ADN	64
1.5.1.4. Intercalants à liaison métallique.....	65
1.5.2. Les ligands	67
1.5.2.1. Le Grand sillon de l'ADN	67
1.5.2.1.1. Aflatoxine.....	67
1.5.2.1.2. Azinomycines	69
1.5.2.1.3. Neocarzinostatine.....	70
1.5.2.2. Les Intercalants	72
1.5.2.2.1. Doxorubicine.....	72
1.5.2.2.2. Camptothécine	73
1.5.2.2.3. Bromure d'éthidium	75
1.5.2.3. Le Petit sillon de l'ADN.....	76
1.5.2.3.1. Duocarmycine et ses dérivés	77
1.5.2.3.2. Diarylamidines	79
1.5.2.3.3. La famille Hoechst, bis-benzimidazole	82
1.5.2.3.4. Les triphénylamines.....	86
1.6. Conclusion	90
1.7. Vers une nouvelle sonde polyfonctionnelle.....	91
1.8. Conception de la sonde	92
2. Synthèse de la sonde polyfonctionnelle.....	100
2.1. Le piège à protéine	100
2.1.1. L'épicocconone, une azaphilone profluorescente piégeant les protéines.....	100
2.1.2. Synthèse du piège à protéines, l'analogue naphthyle de l'épicocconone.....	108
2.1.2.1. Synthèse de l'alcool désaromatisé	110
2.1.2.2. Synthèse de la β -céto-dioxinone, précurseur d'acyl-cétène.....	112
2.1.2.3. Réaction d'acylfuranonisation	114
2.2. Le ligand de l'ADN.....	117

2.2.1.	Les TP-Ox-PY, une famille de ligands des zones riches en AT particulière.	117
2.2.2.	Synthèse du ligand de l'ADN, un analogue du TP-Ox2Py.....	121
2.2.2.1.	Première voie de synthèse.....	121
2.2.2.1.1.	Synthèses linéaires.	121
2.2.2.1.1.1.	Première approche de synthèse linéaire.	124
2.2.2.1.1.2.	Seconde approche de synthèse linéaire.	127
2.2.2.1.1.3.	Troisième approche de synthèse linéaire.	129
2.2.2.1.2.	Synthèse convergente.	130
2.2.2.1.2.1.	Synthèse des premiers fragments triphénylamine 66a et 66b	131
2.2.2.1.2.2.	Synthèse des précurseurs oxazole-pyridine 65a et 65b	132
2.2.2.2.	Seconde voie de synthèse, la C-H activation « on water ».....	134
2.2.2.2.1.	La C-H activation, un accès rapide à des structures complexes.	134
2.2.2.2.1.1.	Les débuts de la C-H activation.....	135
2.2.2.2.1.2.	Amélioration des conditions de C-H activation, utilisation de l'eau et l'effet « on water ».	136
2.2.2.2.2.	Arylation directe de différents hétérocycles azotés par C-H activation « on water ».....	138
2.2.2.2.2.1.	Les thiazoles.	138
2.2.2.2.2.2.	Les oxazoles.....	139
2.2.2.2.3.	L'importance de l'argent dans les couplages Pd/Ag.....	141
2.2.2.2.3.1.	Le rôle de l'argent dans les couplages Pd/Ag.	142
2.2.2.2.3.2.	L'argent, médiateur de C-H activation.....	143
2.2.2.2.4.	Obtention de la partie ligand de l'ADN par C-H activation « on water ».	146
2.2.2.3.	Synthèse de nouveaux ligands de l'ADN.....	149
2.2.2.3.1.	Synthèse des hétérocycles.....	149
2.2.2.3.1.1.	Série Ox-5Py.	150
2.2.2.3.1.2.	Série Ox-2Py.	150
2.2.2.3.1.3.	Série Thia-2Py.....	151
2.2.2.3.2.	Étape de C-H activation.	153
2.2.2.3.3.	Quaternarisation des noyaux pyridines.....	154
2.2.2.3.3.1.	Série TP-2Ox-5Py.....	154
2.2.2.3.3.2.	Série TP-2Thia-2Py.	154
2.3.	Synthèse de la sonde.	157

2.3.1.	Réaction de CuAAC : Travaux antérieurs au sein du laboratoire.....	158
2.3.2.	Stratégie CuAAC, premier couplage.....	159
2.3.3.	Nouvelle stratégie innovante : utilisation de la SPAAC.....	162
2.3.3.1.	Travaux préliminaires de la SPAAC.....	163
2.3.3.2.	Synthèse du linker de la sonde : La chimie du cyclo-octyne.....	164
2.3.3.2.1.	Introduction de la fonction amine par couplage de Sonogashira.....	166
2.3.3.2.1.1.	Couplage de Sonogashira sur le dérivé di-cationique.....	167
2.3.3.2.1.2.	Couplage de Sonogashira sur le composé 67	168
2.3.3.2.2.	Formation du di-cation pyridinium, et libération de l'amine nécessaire au couplage peptidique.....	169
2.3.3.2.3.	Introduction du linker cyclo-octyne sur le ligand de l'ADN par couplage peptidique.....	170
2.3.3.2.3.1.	Preuve de concept.....	171
2.3.3.2.3.2.	Synthèse de la sonde.....	175
2.4.	Conclusion.....	178
3.	Évaluation des ligands synthétisés.....	184
3.1.	Introduction.....	184
3.1.1.	La titration fluorimétrique.....	185
3.1.2.	Le FRET-Melting.....	186
3.1.3.	Le FID : Fluorescent Intercalator Displacement.....	188
3.1.4.	Le dichroïsme circulaire.....	190
3.1.5.	Les séquences ADN d'intérêt pour cette étude.....	191
3.1.6.	Imagerie cellulaire.....	192
3.2.	Évaluation biologique des ligands synthétisés.....	194
3.2.1.	Évaluation de la sonde 146	194
3.2.1.1.	Expérience de FID.....	194
3.2.1.1.1.	Séquence riche en G quadruplex.....	195
3.2.1.1.2.	Séquence DS-26.....	199
3.2.1.2.	Expérience de FRET-Melting.....	200
3.2.2.	Évaluation des nouveaux ligands synthétisés.....	205
3.2.2.1.	Propriété spectroscopique des ligands synthétisés.....	205
3.2.2.2.	Titration fluorimétrique.....	207
3.2.2.3.	Imagerie cellulaire.....	209
3.2.2.3.1.1.	Les sondes TP-2Ox-5Py.....	209

3.2.2.3.1.1.1.	La sonde 121	209
3.2.2.3.1.1.2.	La sonde 120	210
3.2.2.3.1.2.	Les sondes TP-2Thi-2Py.....	211
3.2.2.3.1.2.1.	La sonde 122	211
3.2.2.3.1.2.2.	La sonde 123	212
3.3.	Conclusion	214
4.	Conclusions et perspectives.....	220
5.	Partie expérimentale.	230
5.1.	General information.	230
5.1.1.	NMR.....	230
5.1.2.	Infrared.....	230
5.1.3.	HPLC.....	230
5.1.4.	MS.....	230
5.1.5.	UV-Fluorescence.	230
5.1.6.	Quantum Yield.....	231
5.1.7.	Buffer constitution	231
5.1.8.	DNA sequences.....	231
5.1.9.	DNA sequences preparation	231
5.1.10.	Fluorimetric titration	231
5.1.11.	G4-FID assay	231
5.1.12.	FRET-melting.....	232
5.1.13.	Cell culture	232
5.2.	Synthesis.....	234
5.2.1.	Proteins trap	235
5.2.1.1.	Dearomatised alcohol synthesis	235
5.2.1.2.	Dioxinone synthesis	238
5.2.1.3.	Acyl-furanonisation step.....	244
5.2.2.	DNA ligand	245
5.2.2.1.	Linear synthesis.....	245
5.2.2.2.	Convergent synthesis.....	257
5.2.3.	Linker synthesis.	263
5.2.3.1.	Linker preparation and Sonogashira step.....	263
5.2.3.2.	SPAAC step.....	268

5.2.4.	New ligand synthesis	270
5.2.4.1.	Synthesis of oxazole in position 5.....	271
5.2.4.2.	Synthesis of oxazole in position 2.....	272
5.2.4.3.	Synthesis of thioamide	275
5.2.4.4.	Synthesis of thiazole	277
5.2.4.5.	“On water” C-H activation step	279
5.2.4.6.	Methylation step of isomere in position 5	285
5.2.4.7.	Methylation step of isomere in position 2	287
6.	Références	289
7.	Table des légendes.....	315

ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

A	Adénine
Å	Angstrom
A ou abs	Absorbance
Ac	Groupe acétyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APTS ou PTSA	Acide Para-ToluèneSulfonique
Aq.	Aqueux
Ar	Aromatique
ARN	Acide Ribonucléique
Atm.	Atmosphère
<i>B</i>	Brillance
BER	Réparation par Excision de Base
Bn	Benzyl
BSA	Bovine Serum Albumine
BuLi	ButylLithium
<i>c</i>	Concentration
C	Cytosine
CD	Circular Dichroïsme
CFSE	6-CarboxyFluoresceine Succinimidyl Ester
cm	Centimètre
CMD	Déprotonation-Métallation Concertée
COBRA	Chimie Organique et Bioorganique – Réactivité et Analyse
CuAAC	Cycloaddition Azoture-Alcyne Catalysée au Cuivre
Da	Dalton
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
DBCO	DiBenzoCycloOctyne
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DC ₅₀	Quantité nécessaire pour déplacer 50 % du fluorophore
DCM	DiChloroMéthane
DiBAI-H	Hydru de DiisoButylAluminium
DIPEA	N,N-Diisopropyléthylamine
DMAP	4-N,N-DiméthylaminoPyridine
DMF	DiMéthylFormamide
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
Dr.	Docteur
DS	Dual Strand
dtbpy	4,4'-Di-Tert-Butyl-2,2'-diPYridyl
DUE	DNA Unwinding Element
EDCI	1-Ethyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide
Em.	Emission
Et	Ethyle
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
Exc.	Excitation
FID	Fluorescent Intercalator Displacement

FRET	Förster Resonance Energy Transfer ou Transfert d'énergie par résonance de type Förster
g	Gramme
G	Guanine
G4	G-quadruplex
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Heure
HMGA	High Mobility Protein Group
HOMO	Orbital Haute Occupée
HPLC	Chromatographie Phase Liquide Haute Performance
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry ou Spectrométrie de Masse Haute Résolution
IBA	Acide Iodosobenzoïque
IBX	Acide 2-Iodoxobenzoïque
ICD	Induced Circular Dichroism
j	Jour
k	Kilo
K _d	Constance de dissociation
L	Litre
LDA	Diisopropyle Amidure de Lithium
LiHMDS	HexaMéthylDiSilazane de Lithium
LRMS	Low Resolution Mass Spectrometry ou Spectrométrie de Masse Basse Révolution
LUMO	Orbital Basse Vacante
M	Mole par litre
M.S.	Molecular Sieves
Max	Maximum
Me	Méthyle
MeCN	Acétonitrile
MeI	Iodure de Méthyle
MeOH	Méthanol
MeOTs	Tosylate de Méthyle
mg	Milligramme
min	Minute
mol	Mole
MOM	Méthoxyméthyle
MS	Spectrométrie de Masse
<i>n</i>	Indice de réfraction
Naph	Naphtyle
NBS	N-BromoSuccinimide
NER	Réparation par Excision de Nucléotide
NHS	N-HydroxySuccinimide
NIS	N-iodosuccinimide
nm	Nanomètre
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Ph	Phényle
PI	Iodure de propidium

Prof.	Professeur
RMN	Résonance Magnétique Fluorescence
RuAAC	Cycloaddition Azoture-Alcyne Catalysée au Ruthénium
s	Seconde
S/MAR	Scaffold/Matrix Attachement Region
Sat.	Saturé
SPAAC	Cycloaddition Azoture-Alcyne Spontanée
SSB	Single Strain Binding protein
T	Thymine
Ta ou rt	Température ambiante ou room temperature
TAMRA	TétraMéthylRhodAmine
TBAF	Fluorure de TétraButylAmmonium
TBP	TATA Binding Protein
TBTA	Tris(BenzylTriaolylmethyl)Amine
<i>t</i> -BuOLi	Oxyde de tert-butyle lithium
TFA	Acide TriFluoroacétique
TFIID	Transcription Factor
TIPS	TriIsoPropylSilyle
Tm	Température de demi-fusion
TMG	TetraMethylGuanidine
TMS	TriMéthylSilyl
TO	Thiazole Orange
Tos ⁻	Tosylate
TosMIC	p-Toluenesulfonylmethyl isocyanide
u.a.	Unité arbitraire
UV	Ultraviolet
Δ	Chauffage
ε	Coefficient d'extinction molaire
λ	Longueur d'onde
Φ _F	Rendement quantique de fluorescence
μM	Micromolaire
Å	Angström
°C	Degré Celsius

PRÉAMBULE

La survie et la prolifération des organismes vivants dépendent de l'habilité des cellules à stocker, récupérer et traduire l'information génétique qu'elles contiennent. Dès l'émergence de la génétique au début du XX^{ème} siècle, les scientifiques ont été intrigués par sa structure, sa localisation et la façon dont elle était transmise de cellule en cellule. Avec les avancées technologiques, les chercheurs ont été en mesure de répondre à ces questions, tout en en soulevant d'autres. En effet, ils ont réussi à observer que de petites entités (nommées protéines) interagissaient avec ce matériel génétique, et étaient responsables des phénomènes biologiques. Ça n'est que plus tard, avec l'essor de la fluorescence et l'étroite collaboration entre biologistes et chimistes, que des découvertes majeures ont pu être réalisées.

En effet, les chimistes ont mis au point différents outils, principalement fluorescents, pour la visualisation des entités biologiques *in vivo*. C'est grâce à ces outils que des interactions protéines/ADN ont été mises en avant et se sont révélées être à l'origine de tous les phénomènes métaboliques. La compréhension de ces interactions est donc un enjeu de taille pour les scientifiques, dont les découvertes pourraient, par exemple, permettre de corriger les troubles métaboliques néfastes causés par la modification de ces interactions protéines/ADN. Cependant, malgré tous ces efforts et les nombreuses avancées, il subsiste encore des questions, et seule la conception de nouveaux outils innovants pourra permettre d'approfondir les connaissances dans ce domaine.

C'est dans cette optique qu'ont été réalisés ces travaux de thèse, en développant une sonde pro-fluorescente polyfonctionnelle sélective des zones à risques de l'ADN capable de piéger les protéines à leurs voisinages. Ce manuscrit sera divisé en trois parties :

- La première partie sera consacrée à un bref rappel de la structure et des rôles de l'ADN, ainsi qu'une présentation de ses différents modes de liaisons, accompagnés d'exemples de ligands.
- La seconde partie regroupera les efforts synthétiques mis en place pour le développement de cette sonde polyfonctionnelle. Dans un premier temps, la synthèse du piège à protéines sera abordée. Puis dans un second temps, la synthèse du ligand de l'ADN sera développée, en finissant par la stratégie utilisée pour relier ces deux entités. De plus, de nouveaux ligands de l'ADN ont été obtenus, et leurs synthèses seront détaillées dans cette partie.
- La troisième et dernière partie sera, quant à elle, consacrée à l'évaluation biologique de ces différents composés, grâce à des méthodes de fluorescences couramment utilisées en biologie.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

C'est grâce à une petite unité fondamentale et indispensable, la cellule, que la vie existe sur terre. La découverte de cette unité remonte à l'Antiquité où les hommes se posaient déjà de nombreuses questions telles que celle de la constitution des êtres vivants. Ce sont les philosophes grecs comme Aristote qui ont été les premiers à émettre des hypothèses à ce sujet. Ce dernier a suggéré l'idée qu'une suite de petits éléments semblables se répétant devait constituer les êtres vivants. Ce n'est que bien plus tard, vers 1665, que cette petite suite d'éléments fut observée. L'anglais Robert Hooke analysa du liège grâce à la conception d'un microscope « primitif », et vit dans l'échantillon des « cases » semblables à celles des prisonniers qu'il nomma « cellules ». Une dizaine d'années plus tard, le Néerlandais Antoni Van Leeuwenhoek observa les premiers micro-organismes présents dans l'eau de pluie, et les dessina. Ces dessins ont pu être effectués grâce à l'élaboration d'un système de lentilles ingénieux (plus évolué que celui conçu par Robert Hooke) qui donnerait naissance ensuite aux premiers microscopes « perfectionnés » (Figure 1).

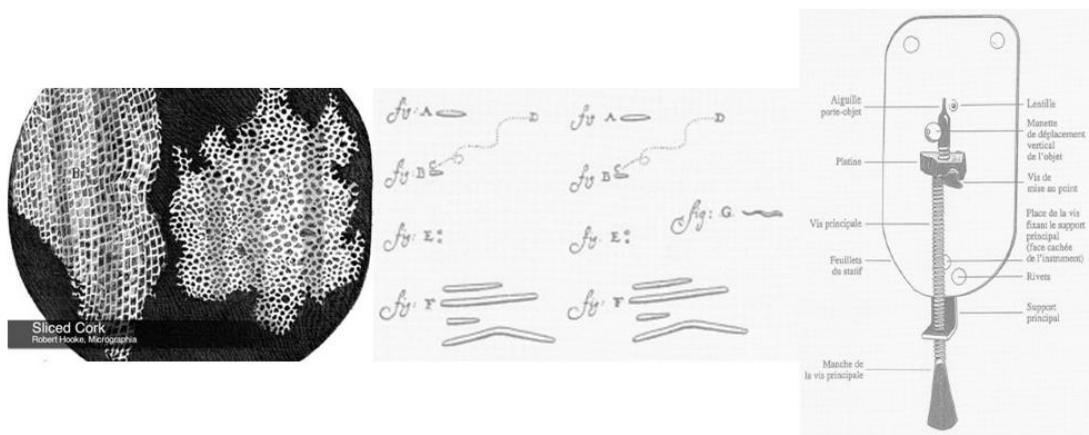


FIGURE 1 DESSIN DES "CELLULES" DE LIÈGE DE ROBERT HOOKE À GAUCHE, DESSIN D'OBSERVATION DE VAN LEEUWENHOEK ET SCHÉMA DE SON MICROSCOPE À DROITE.

Mais c'est seulement quelques siècles plus tard que la cellule et ses composants les plus petits ont pu être observés en détail, notamment grâce à la technologie des microscopes électroniques. C'est ainsi que les scientifiques ont découvert que la cellule était constituée de plusieurs petits organites interagissant de façon complexe et permettant le bon fonctionnement du métabolisme des êtres vivants (Figure 2).

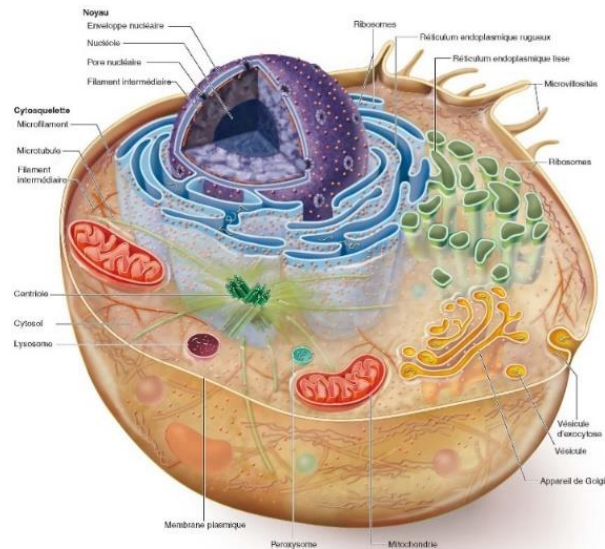


FIGURE 2 REPRÉSENTATION D'UNE CELLULE EUCARYOTE.

Cette petite entité qu'est la cellule, mesurant seulement quelques micromètres, dispose de tout le nécessaire vital au bon fonctionnement des êtres vivants. Parmi les éléments les plus importants d'une cellule se trouve le noyau. Il est séparé du reste des organites de la cellule par une membrane disposant de petits pores extrêmement sélectifs. C'est dans ce noyau qu'est situé le patrimoine génétique, indispensable à la vie et au bon fonctionnement, porté par l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), qui est le niveau de condensation le plus bas d'un chromosome (Figure 3).

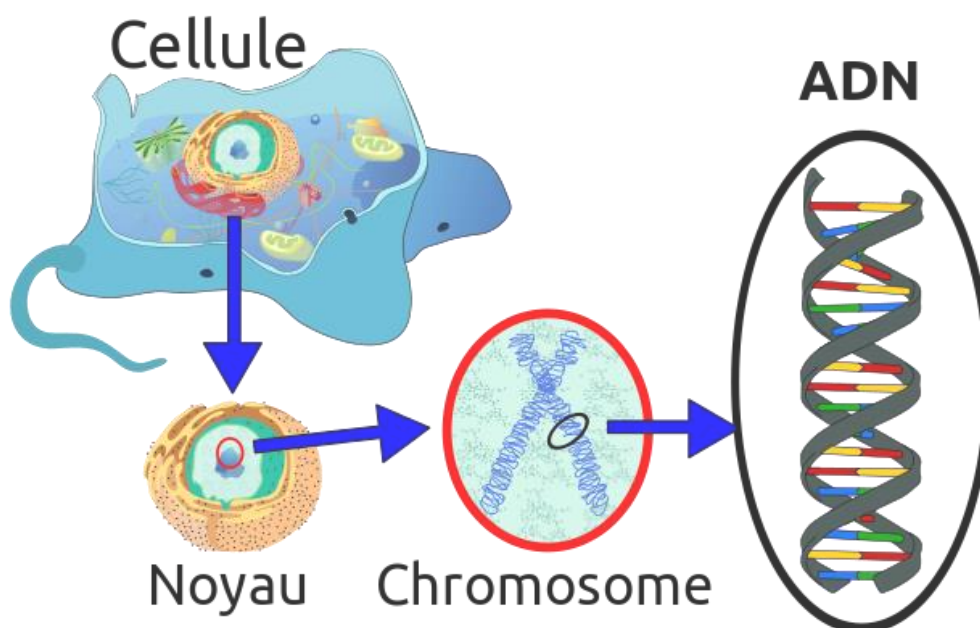


FIGURE 3 LOCALISATION DE L'ADN DANS LA CELLULE.

1.1. LA DÉCOUVERTE DE L'ADN, 50 ANS DE TRAVAUX

1.1.1. LES PRÉMICES DE LA DÉCOUVERTE

La découverte de ce polymère naturel qu'est l'ADN remonte au milieu du XIX^{ème} siècle et est due aux travaux de divers scientifiques dans le monde. Tout a commencé par les travaux du suisse Friedrich Miescher qui réussit à isoler une substance riche en phosphore dans le noyau des cellules qu'il nomma « nucléine ». ¹ Par la suite, l'allemand Richard Altmann isola en 1889 une substance acide (l'acide nucléique) de la nucléine, découverte préalablement par Miescher. Albrecht Kossel découvrit, en 1896, les quatre bases azotées, l'adénine et la guanine (qui sont des bases puriques) ainsi que la thymine et la cytosine (bases pyrimidiques). ¹ C'est en 1919 que la nucléine fut identifiée par l'américain Phoebus Levene comme l'association de trois entités : la base (A, T, C, G), un sucre, et un phosphate (Figure 4). ²⁻⁴

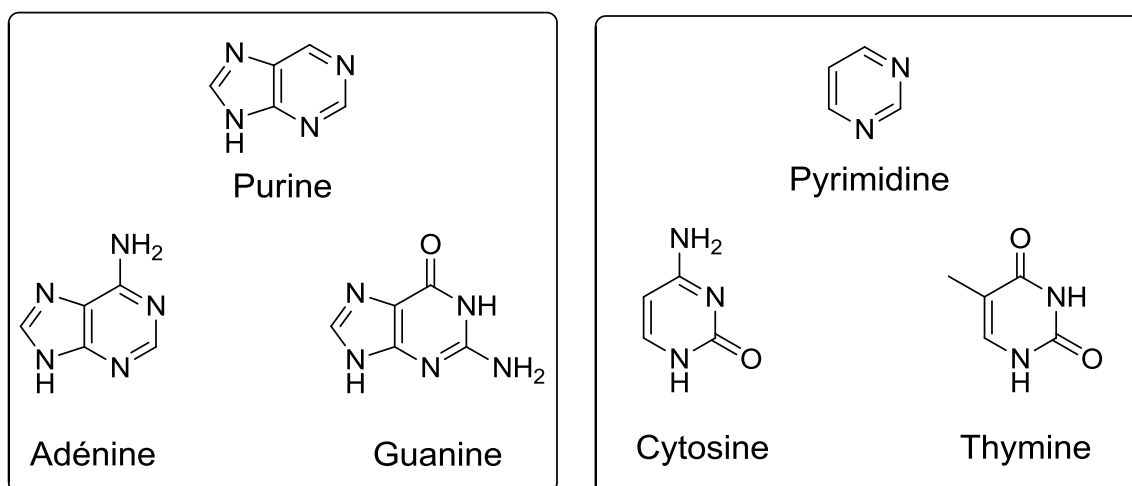


FIGURE 4 LES QUATRE BASES AZOTÉES DE L'ADN.

Au début du XX^{ème}, les scientifiques pensaient que les protéines détenaient l'information génétique. Le russe Nikolai Koltsov a postulé en 1927 que l'hérédité venait « d'une protéine géante » constituée de « deux brins miroirs l'un de l'autre qui se reproduiraient de manière semi-conservative en utilisant chaque brin comme modèle ». ⁵ Il fallut attendre 1952, avec les biologistes américains Martha Chase et Alfred Hershey, pour confirmer que c'était l'ADN qui contenait l'information génétique et non les protéines. ⁶

La structure de l'ADN fut élucidée un an plus tard, en 1953, par le biologiste américain James Watson et le physicien anglais Francis Crick, ce qui leur valut les prix Nobel de physique et de médecine le 31 octobre 1962. ⁷

1.1.2. L'ÉLUCIDATION DE LA STRUCTURE DE L'ADN

Cependant, la détermination de cette structure n'a pu se faire qu'avec les travaux de Rosalind Franklin, qui a effectué une diffraction des rayons X d'un fragment d'ADN cristallisé en 1951, donnant ainsi le célèbre « cliché 51 » (Figure 5). C'est grâce à ce cliché que Watson et Crick ont pu aboutir à la structure de l'ADN telle que nous la connaissons actuellement.

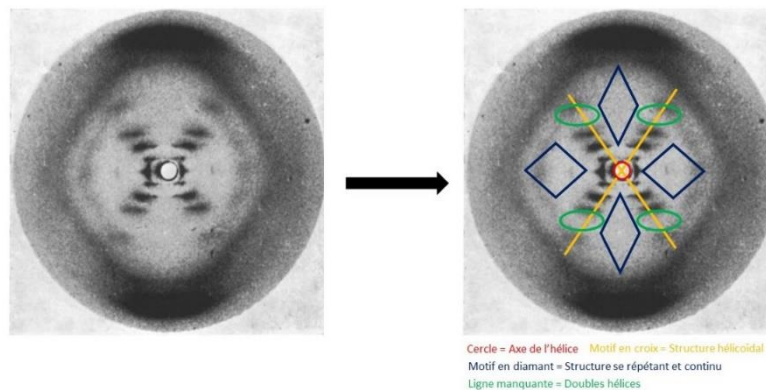


FIGURE 5 CLICHÉ 51 À GAUCHE ET SA RÉOLUTION À DROITE.

Dans un premier temps, Watson et Crick ont observé la parfaite symétrie Nord/Sud et Est/Ouest du cliché, indiquant que l'ADN devait être une structure symétrique. Le « X » formé au centre de la photo par les taches noires, ainsi que l'espacement régulier qui est caractéristique d'une structure en hélice observée aux rayons X, ont permis de déduire que l'ADN est une structure hélicoïdale. La mesure de l'angle entre chaque résidu (tache) étant de 36° sur le cliché, a permis de déterminer que le pas de l'hélice d'ADN était de 34 \AA , soit 10 résidus par tour, donc un résidu tous les $3,4 \text{ \AA}$. La disparition du résidu sur la ligne « 4 » (cercle vert sur Figure 5) ne leur a pas échappé, indiquant un possible croisement de deux hélices en ce point. L'esprit de déduction de Watson et Crick les a conduit tout naturellement au fait que la structure de l'ADN devait être une double hélice disposant de deux sillons, un grand et un petit.⁷

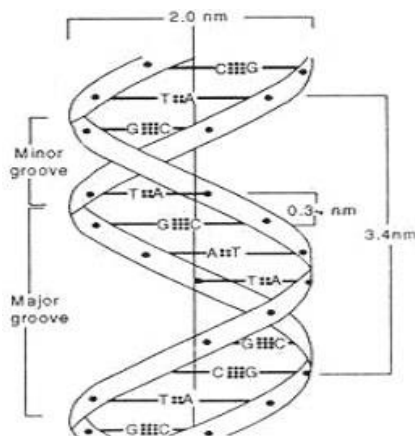


FIGURE 6 REPRÉSENTATION DE L'ADN SELON WATSON ET CRICK.

L'analyse du cliché 51 n'est pour autant pas finie (Figure 5). En effet, la présence de diamants de part et d'autre du « X » indique qu'il s'agit d'une structure continue à motifs répétés. Ces diamants disposés à l'Ouest et à l'Est du « X » sont légèrement plus sombres sur les extrémités extérieures, indiquant la présence « d'objets » à ces endroits. Les deux scientifiques en ont déduit qu'il s'agissait des groupements phosphodiester, reliés aux oses. Ces derniers sont placés à l'extérieur de l'hélice permettant ainsi aux bases de se trouver à l'intérieur. Les bases se trouvent ainsi perpendiculaires aux groupements phosphates, contrairement à ce que pensait Pauling et Corey (Figure 7).⁸

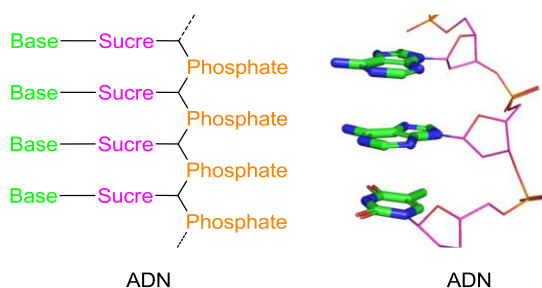


FIGURE 7 ORGANISATION D'UN BRIN D'ADN SELON WATSON ET CRICK.

Leurs connaissances en chimie leur ont permis d'émettre l'hypothèse que les oses étaient des β -D-désoxyriboses et non des riboses, puisque la présence de l'oxygène sur le carbone C₂ de ce dernier empêcherait les liaisons de Van der Waals de se faire.

Autrement dit, ils ont déterminé qu'à l'extérieur de l'hélice se trouvait une succession de groupements phosphates et de β -D-désoxyriboses, sur lesquels une base (A, T, C, G) était liée, pointant vers le cœur de l'hélice. Il ne restait alors qu'à élucider le mystère de la seconde hélice et de l'appariement des bases.⁷

Ce problème fut résolu grâce aux travaux effectués par Erwin Chargaff entre 1940 et 1950. Il émit en effet deux principes primordiaux concernant les paires de bases de l'ADN, donnant ainsi les règles de Chargaff. Selon le premier principe, le pourcentage d'adénine et de thymine est le même, tout comme le pourcentage de cytosine et de guanine. Le second principe établit que la somme des proportions d'adénine et de guanine est égale à la somme des proportions de cytosine et de thymine. Ces deux principes indiquent que ces bases sont étroitement liées.^{9, 10, 11, 12, 13}

$$\frac{A + G}{T + C} = 1 ; \%A = \%T ; \%C = \%G$$

ÉQUATION 1 POSTULATS D'ERWIN CHARGAFF.

Grâce à ces travaux, Watson et Crick en ont déduit une complémentarité entre les différentes bases de l'ADN. Ils ont également émis l'hypothèse que l'équilibre céto-énolique/amino-imino des bases puriques et pyrimidiques devait favoriser la forme cétone/amine plutôt que la forme énol/imine. Ceci impliquait donc qu'une base purique était jointe à une base pyrimidique par liaison hydrogène et qu'il n'y avait qu'une seule option possible : l'adénine avec la thymine, et la guanine avec la cytosine (Figure 8).

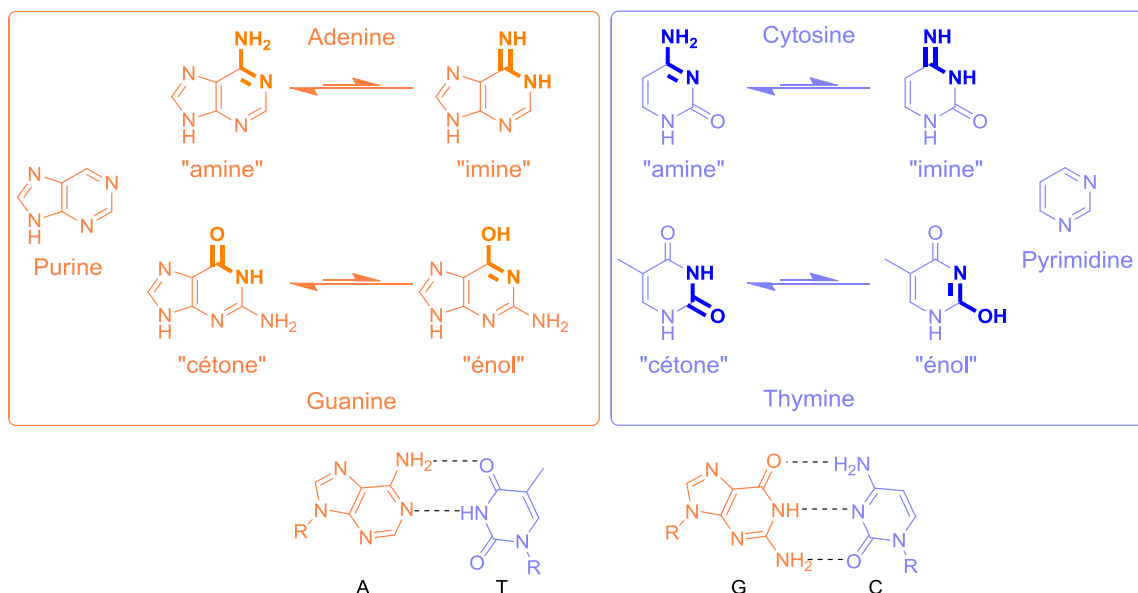


FIGURE 8 EQUILIBRE CÉTO-ÉNOLIQUE ET AMINO-IMINO ET LIAISON HYDROGÈNE ENTRE LES DEUX PAIRES DE BASES.

Ils en ont ainsi déduit que l'ADN était complémentaire, c'est-à-dire que si l'un des deux brins d'ADN était connu, il était facile d'en déduire l'autre brin de par la complémentarité des

bases. Leur conclusion fut donc que les deux hélices de l'ADN étaient antiparallèles l'une de l'autre (Figure 9).⁷

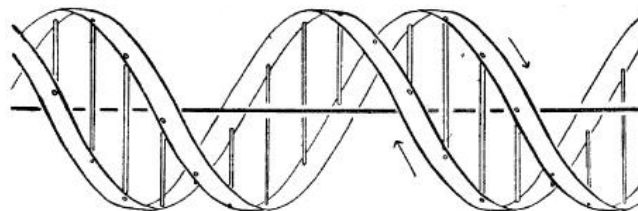


FIGURE 9 REPRÉSENTATION DE L'ADN ET DES DEUX BRINS ANTIPARALLÈLES.

Pour résumer, grâce aux travaux préalables de Rosalind Franklin et Erwin Chargaff, Watson et Crick ont pu déterminer que l'ADN était une macromolécule en double hélice dont les brins sont complémentaires, antiparallèles et reliés entre eux par leurs bases *via* des liaisons hydrogène (l'adénine liée à la thymine par deux liaisons hydrogène et la guanine liée à la cytosine par trois liaisons hydrogène). Les brins d'ADN sont constitués d'une succession de groupements phosphates et β -D-désoxyriboses portant les bases puriques ou pyrimidiques.⁷ Les deux biologistes ont ainsi pu créer le premier modèle d'ADN en utilisant des tiges métalliques (Figure 10).

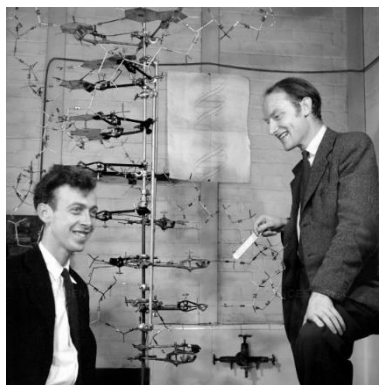


FIGURE 10 PHOTO DES DEUX SCIENTIFIQUES ET LEUR MODÈLE D'ADN.

Depuis l'avancée scientifique de ces deux chercheurs, les biologistes, chimistes et physiciens ont largement étudié l'ADN, et ont pu valider les hypothèses de Watson et Crick. De plus, de nouvelles découvertes ont été effectuées grâce à l'utilisation d'outils de plus en plus élaborés et puissants (comme les spectrophotomètres ou les microscopes électroniques), qui ont permis d'apporter des informations supplémentaires sur la structure de l'ADN.

1.2. L'ADN, SA STRUCTURE

1.2.1. LA STRUCTURE DE BASE DE L'ADN

Comme l'ont montré Watson et Crick, l'ADN est composé de deux brins complémentaires et antiparallèles l'un de l'autre, orientés en 5'-3' (selon le sens de synthèse de l'ADN) en formant une double hélice. Les brins d'ADN sont constitués d'une suite de groupements phosphates situés à l'extérieur de l'hélice reliés au 2'-β-D-désoxyribose. Les bases azotées situées à l'intérieur de l'hélice sont reliées à cet ose. Ces bases s'apparient entre elles deux à deux par liaisons hydrogène entre une base purique et une base pyrimidique : l'adénine avec la thymine *via* deux liaisons hydrogène et la cytosine avec la guanine *via* trois liaisons hydrogène. Cet appariement a été qualifié de « canonique » par Watson et Crick (Figure 11).

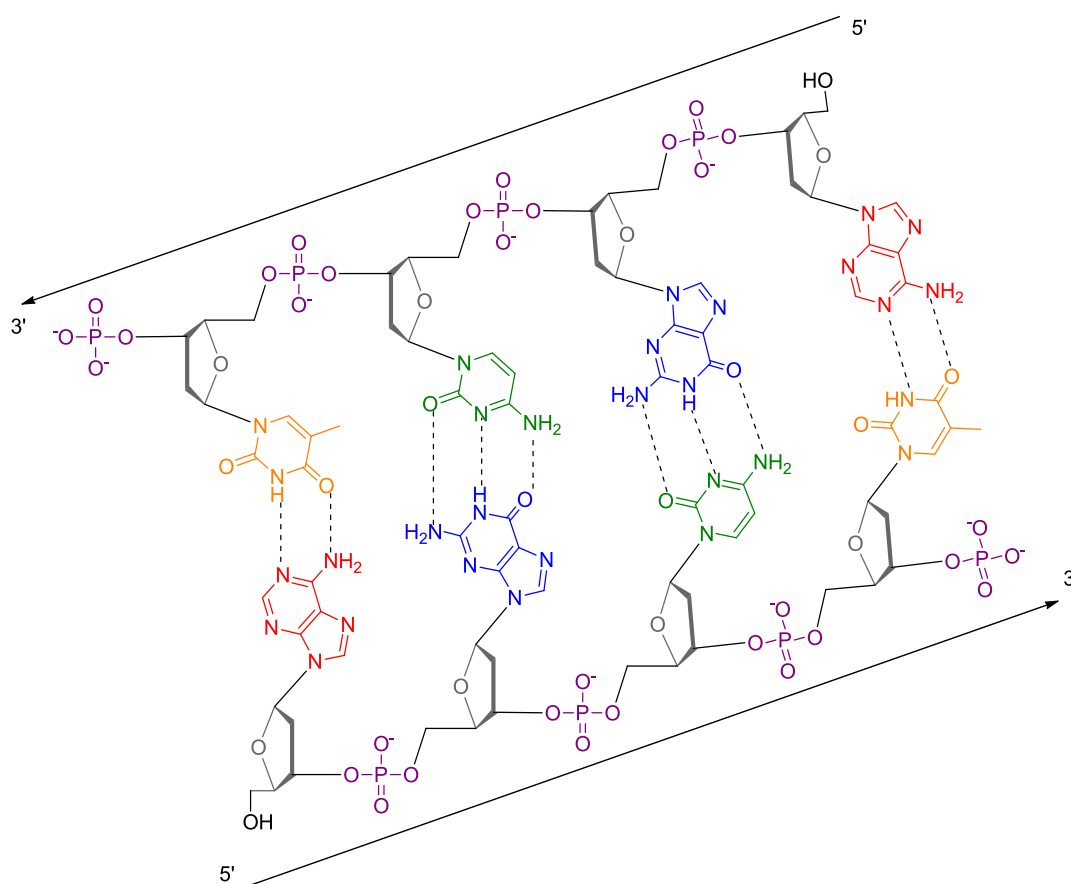


FIGURE 11 REPRÉSENTATION DE L'ADN ET DE SES COMPOSANTS. (EN GRIS LES β-D- DÉSOXYRIBOSES RELIÉ ENTRE EUX PAR DES GROUPEMENTS PHOSPHATE EN VIOLET, EN ROUGE L'ADÉNINE, EN VERT LA CYTOSINE, EN JAUNE LA THYMINE ET EN BLEU LA GUANINE).

Il a de plus été démontré que l'appariement entre les bases de l'ADN n'était pas seulement gouverné par les liaisons hydrogène mais également par des interactions de type Van der Waals (« stacking » ou empilement) entre bases adjacentes.¹⁴

Afin de décrire précisément l'architecture de l'ADN, plusieurs niveaux structurels ont été définis. La structure primaire de l'ADN correspond à sa suite de paires de bases, aussi nommée séquence et sa structure secondaire correspond à l'appariement entre les deux brins de l'ADN formant la double hélice. Cependant ces deux niveaux ne rendent pas compte des différentes conformations spatiales que peut adopter l'ADN.

1.2.2. LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE L'ADN

La structure tertiaire a donc été introduite afin de rendre compte de l'orientation tridimensionnelle de l'ADN dont la double hélice est la plus commune. Elle est très rigide et dispose d'un petit diamètre (2 nm). La longueur d'un pas est de 3,4 nm et contient 10 paires de bases, comme l'avaient démontré Watson et Crick. Le petit sillon de l'ADN dispose d'une profondeur de 0,82 nm pour une hauteur de 1,2 nm et une largeur de 0,6 nm, tandis que la profondeur du grand sillon est de 0,85 nm pour une largeur de 1,16 nm et une hauteur de 2,2 nm. L'espace ainsi présent au niveau de ses sillons permet à des molécules de pouvoir interagir avec l'ADN (Figure 12).

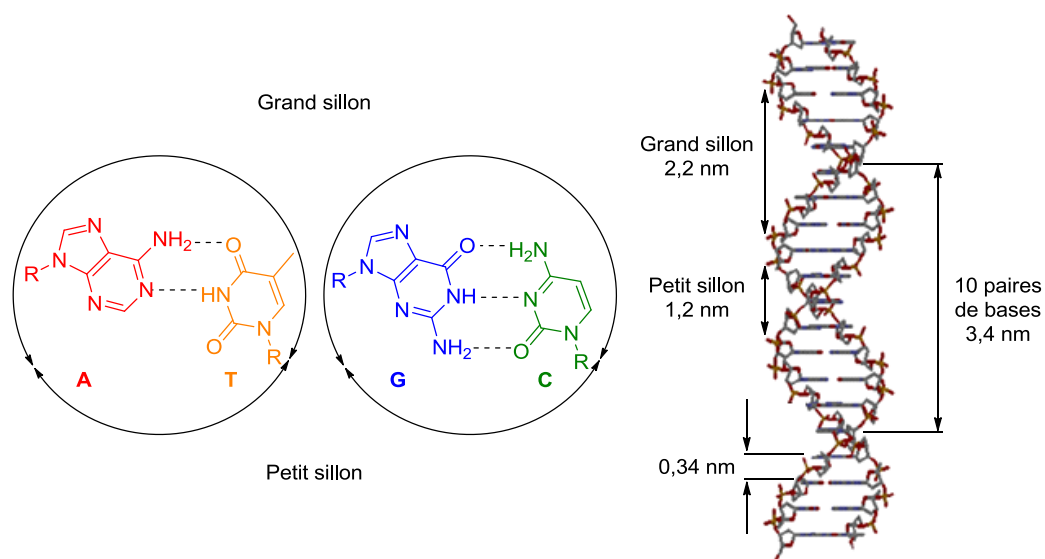


FIGURE 12 REPRÉSENTATION DES DIMENSIONS DE L'ADN ET DE SES SILLONS. À GAUCHE

1.2.3. LES SILLONS DE L'ADN

Les sillons de l'ADN sont des cibles de choix pour les molécules qui interagissent avec l'ADN. Elles peuvent s'y lier selon différentes interactions :

- Liaison hydrogène.
- Force électrostatique.
- Affinité hydrophile.
- Liaison de Van der Waals.

Les groupements chimiques présents sur les bases azotées induisent différentes topologies selon les sillons. Ainsi, il sera plus aisé pour les petites molécules d'aller interagir avec le petit sillon plutôt qu'avec le grand. Comme décrit sur la Figure 13, quatre motifs d'encombrements sont possibles dans les grands sillons de l'ADN, contre deux possibles dans le petit sillon. En effet, si nous comparons l'encombrement stérique des séquences AT par rapport aux séquences TA du petit sillon, ces deux dernières seront identiques contrairement au grand sillon où la topologie sera différente. Cette remarque est également valable pour les séquences CG et GC.¹⁴

De plus, la surface du petit sillon étant moindre que celle du grand sillon, les interactions y seront plus nombreuses, stabilisant ainsi les molécules s'y insérant.

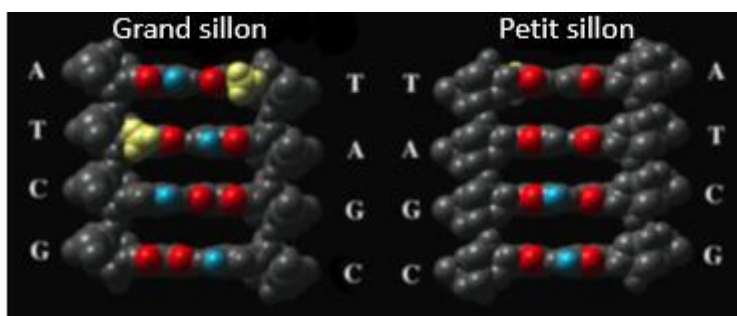


FIGURE 13 TOPOLOGIE DES SILLONS DE L'ADN (JAUNE : MÉTHYL, ROUGE : OXYGÈNE ET AZOTE, BLEUE : GROUPEMENT BASIQUE).

De nombreuses molécules vont se lier au niveau de ces sillons, mais également des portions de brin d'ADN, formant ainsi des complexes particuliers. Ceci est rendu possible grâce à un appariement dit « non canonique » découvert par Karst Hoogsteen en 1963 (Figure 14).¹⁵ Il a démontré que des liaisons hydrogène étaient également possibles avec une autre face que celle envisagée par Watson et Crick. Cet appariement de base est plus fréquent avec le couple

AT qu'avec le couple CG. Ceci est dû au fait que pour effectuer cet appariement non canonique, la cytosine doit être protonée, ce qui n'arrive pas à pH physiologique.

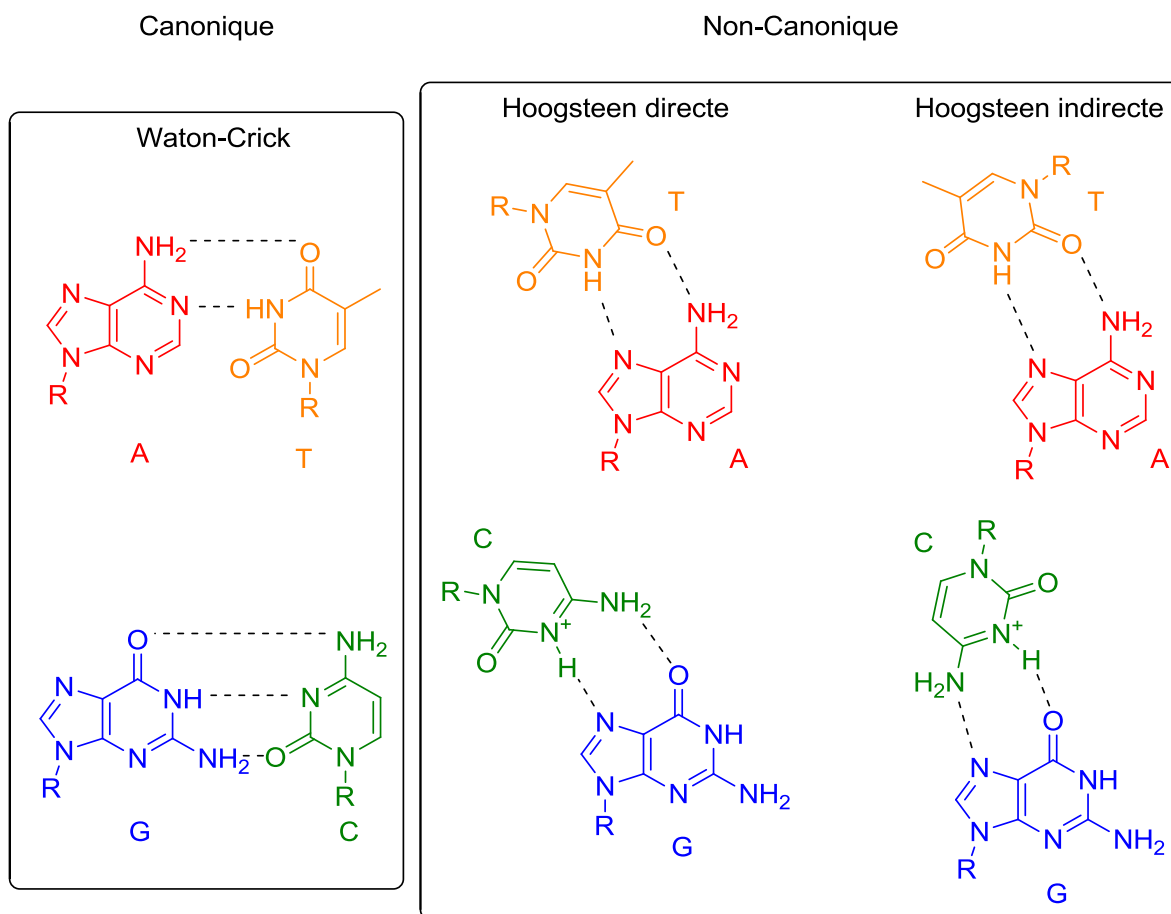


FIGURE 14 COMPARAISON ENTRE LES APPARIEMENTS DE WATSON ET CRICK ET LES APPARIEMENTS NON CANONIQUES DE HOOGSTEEN.

De par la richesse d'informations disponibles dans le grand sillon de l'ADN et la taille de ce dernier, les protéines iront préférentiellement s'y lier. Au contraire, les petites molécules iront plutôt dans le petit sillon, vulnérable aux attaques et déserté par les protéines. Ces petits sillons sont des cibles de choix pour les agents thérapeutiques.¹⁶

1.2.4. LES STRUCTURES NON CANONIQUES DE L'ADN

Cet appariement non canonique va permettre la formation de structures tertiaires particulières comme les triplex d'ADN et les G-quadruplex (Figure 15). Le triplex d'ADN est un complexe entre l'hélice double brin et un troisième brin, formant ainsi une triple hélice. Ce troisième brin peut provenir de la même chaîne ADN (intramoléculaire) ou d'une autre chaîne (intermoléculaire). Ces complexes sont possibles grâce à l'appariement de base de type Hoogsteen, la troisième hélice allant se loger dans le grand sillon. Les triplex d'ADN sont

connus pour avoir un rôle dans la régulation de la transcription de l'ADN, sa réplication et sa réparation.¹⁷ Les G-quadruplex seront détaillés plus loin dans la partie : Les structures complexes de l'ADN (p48).

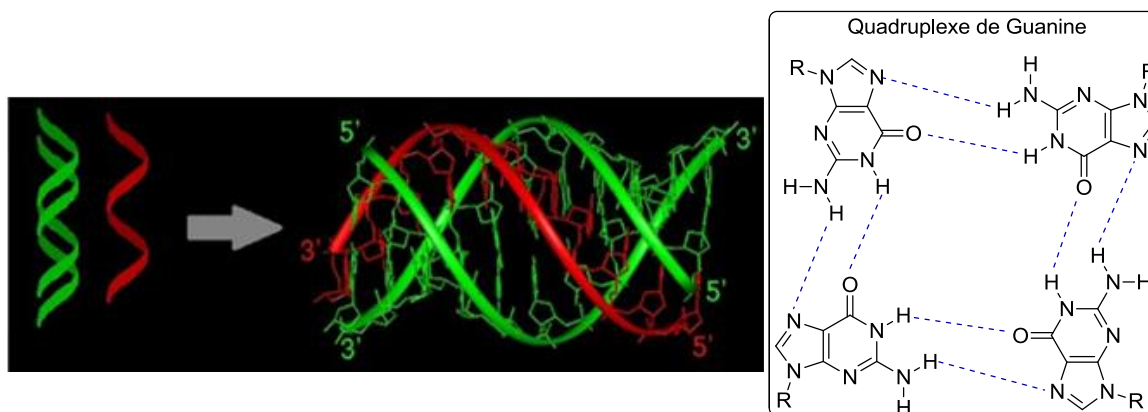


FIGURE 15 REPRÉSENTATION D'UN TRIPLEX D'ADN À GAUCHE ET D'UN G-QUADRUPLEX À DROITE.

1.2.5. LE NIVEAU DE CONDENSATION MAXIMAL DE L'ADN : LE CHROMOSOME

Le dernier niveau de structuration de l'ADN, dit « structure quaternaire », est la surcondensation de l'ADN. Il s'agit d'un assemblage de brins d'ADN autour de protéines (nommées histones) formant ainsi le chromosome, qui est le stade de condensation de l'ADN le plus élevé. Les histones sont des holoprotéines constituées à 25 % de lysine et d'arginine, s'organisant en octamère (H2a, H2b, H3 et H4 dites histones « nucléosomiques ») en enroulant le brin d'ADN, à la façon d'un collier de perles, formant ainsi le nucléosome. L'histone H1 (dite histone « internucléosomique ») va ensuite lier ces perles entre elles pour faire un collier de plus en plus condensé, s'entortillant grâce aux conformères de l'ADN (ADN-Z principalement) et formant ainsi le chromosome. L'interaction histone-ADN est effectuée par liaisons électrostatiques entre le squelette ose-phosphate chargé négativement et les charges positives des acides aminés présents sur les histones (Figure 16).

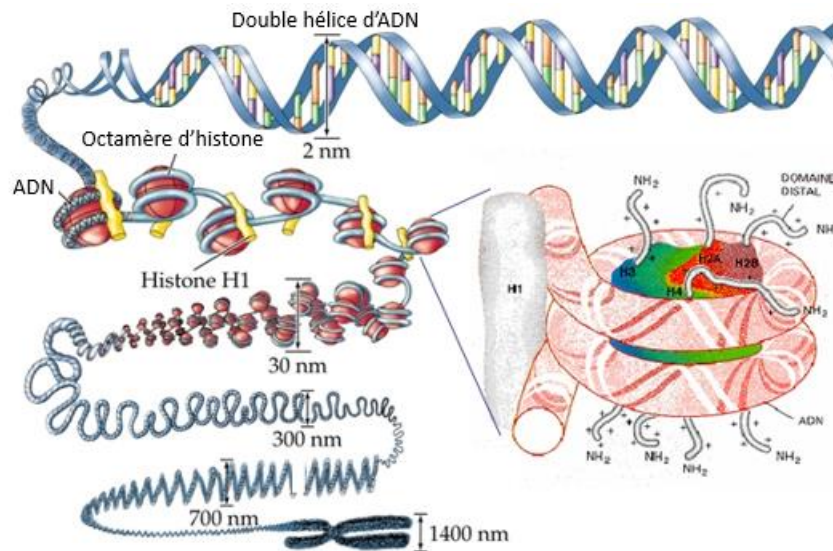


FIGURE 16 REPRÉSENTATION DE L'ADN ET DE SES NIVEAUX DE CONDENSATION.

La structure générale de l'ADN est aujourd'hui bien connue, et les scientifiques cherchent maintenant à éclaircir les zones d'ombres présentes autour de sa structure tertiaire, avec un intérêt certain pour les rôles que jouent les G-quadruplex ainsi que les zones riches en adénine et thymine dans les mécanismes génétiques.

1.3. L'ADN CENTRE DE COMMANDE DE LA CELLULE, SON RÔLE ET SES PROTÉINES

Les différents rôles joués par l'ADN au sein d'un organisme sont de nos jours plutôt bien définis, et compris dans les grandes lignes, malgré cela, nous savons que toutes les fonctions de l'ADN participent au bon fonctionnement métabolique. Cependant, il reste à comprendre quelles parties ou structures particulières sont impliquées dans les étapes élémentaires des mécanismes métaboliques qu'il gouverne.

1.3.1. LA RÉGULATION DE L'ADN

Au sein d'un organisme, la régulation des gènes est importante. Cette régulation se fait par l'intermédiaire de protéines allant interagir avec l'ADN pour induire différents changements métaboliques en fonction des besoins de la cellule ou de l'organisme à un instant donné. Ces changements sont principalement des ajustements par amplifications ou inhibitions de phénomènes tels que la synthèse protéique, la réplication ou encore la transcription. Par exemple, si l'organisme est sujet à une infection, il y aura une régulation de la synthèse d'anticorps visant les antigènes portés par l'agent pathogène. Cette régulation peut également intervenir en cas d'apparition d'erreurs dans l'ADN ou « d'attaques » extérieures dues à des radiations ou des produits chimiques.

1.3.2. LA RÉPLICATION DE L'ADN

Le but de tout organisme est de vivre et de se multiplier pour pouvoir croître et perdurer dans le temps. L'information génétique que contient l'ADN doit donc être transmise de façon exacte aux cellules de la génération suivante. Ce relai de l'information génétique entre cellule mère et cellule fille est le phénomène de réplication. La réplication est un phénomène semi-conservatif, c'est-à-dire que chaque cellule fille va hériter d'un brin d'ADN de la double hélice parentale et un nouveau brin complémentaire au brin parent sera synthétisé, permettant ainsi une réplication à l'identique de l'information génétique (Figure 17).¹⁸

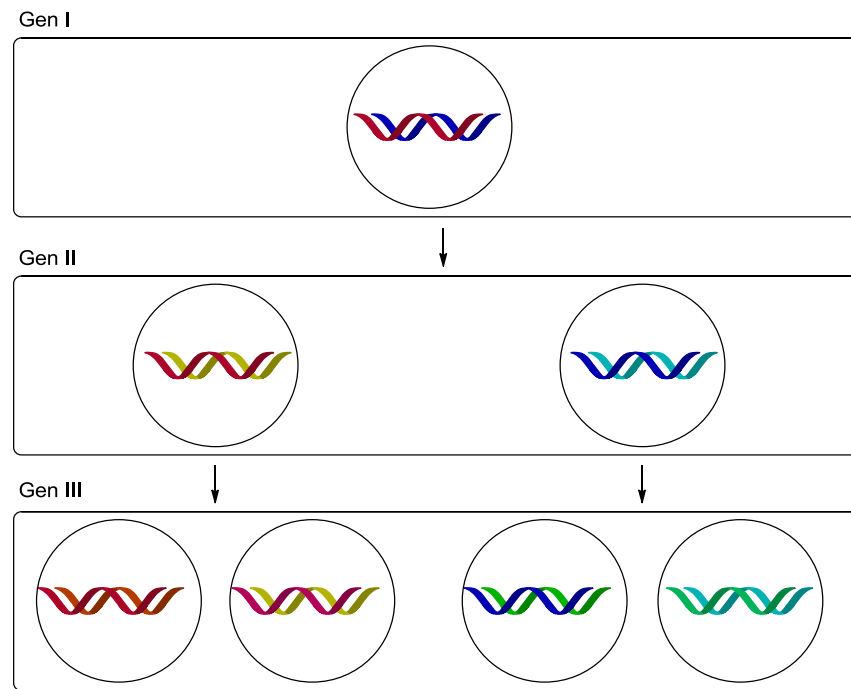


FIGURE 17 PRINCIPE DE SEMI-CONSERVATION DE L'ADN. LES BRINS ROUGES ET BLEUS DE LA PREMIÈRE GÉNÉRATION SE RETROUVENT EN TROISIÈME GÉNÉRATION.

Ce phénomène de réplication survient durant la division cellulaire ou mitose. Elle est fondamentale à la croissance et à la régénération cellulaire. Durant ce phénomène de duplication à l'identique de l'ADN, de nombreuses protéines vont venir interagir intimement avec l'ADN, avec chacune un rôle bien spécifique. Ces complexes protéiques sont appelés « réplisome » et se trouvent au niveau des facteurs d'initiation (zones spécifiques présentes sur l'ADN, souvent riches en adénine et thymine), créant ainsi des fourches, où la duplication va se produire.

Les hélicases vont reconnaître des séquences riches en AT de l'ADN et s'y insérer afin de permettre le déroulement de l'ADN avec l'action conjointe de topoisomérases. Cette cascade enzymatique permet ainsi de séparer les deux brins d'ADN en deux simples brins *via* une dénaturation locale de la double hélice dans le sens 5' vers 3' par rupture des liaisons hydrogène présentes entre les paires de bases. D'autres protéines, les SSB (Single Strand Binding protein) vont maintenir le brin d'ADN monocaténaire droit au niveau de la fourche de réplication. Une fois l'ADN mis à nu, un autre complexe protéique constitué d'une primase et d'une ADN polymérase va venir interagir avec le simple brin de l'ADN afin de le répliquer à l'identique en un brin fille.

Cependant, les ADN polymérases sont capables de synthétiser dans le sens 5' vers 3', et non dans le sens 3' vers 5', posant donc un problème lors de la réplication du brin complémentaire à ce dernier. L'astuce que la nature a trouvée est la synthèse d'amorces d'ARN (Acide RiboNucléique), dites « brins tardifs » ou fragments d'Okazaki (d'après leur découvreur Reiji Okazaki¹⁹) qui serviront de point d'ancrage aux ADN polymérases. Celles-ci peuvent alors synthétiser le brin complémentaire. D'autres protéines, les ligases, viendront ensuite lier les différents brins tardifs entre eux afin de former un brin d'ADN fille continu et identique au brin mère (Figure 18).²⁰

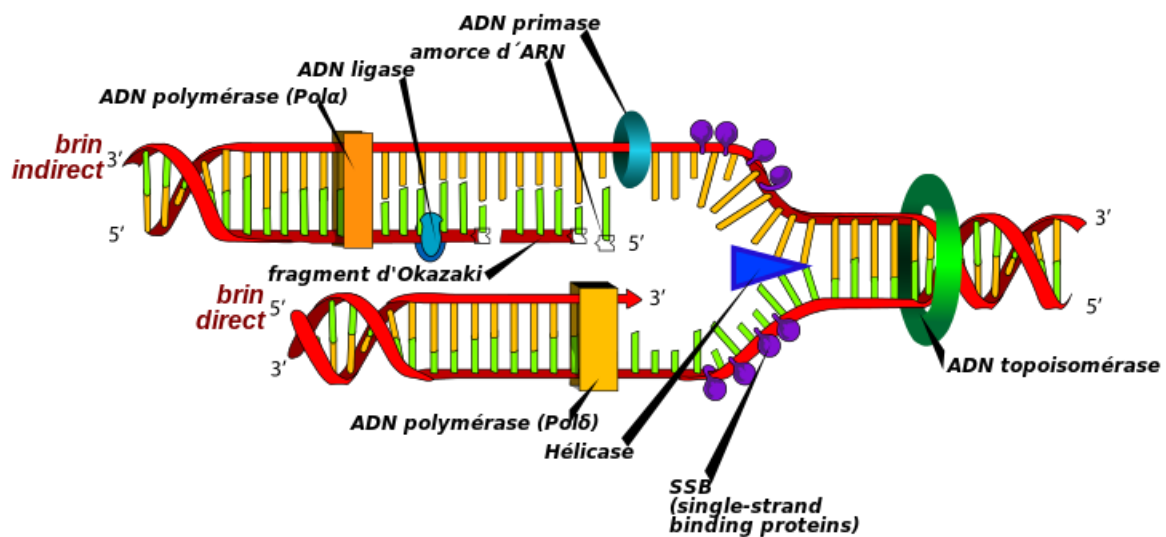


FIGURE 18 REPRÉSENTATION DU PHÉNOMÈNE DE RÉPLICATION DE L'ADN ET DE SES DIFFÉRENTS COMPLEXES PROTÉIQUES.

Ce mécanisme complexe permet à la cellule de transmettre et de maintenir son information génétique.

1.3.3. LA TRANSCRIPTION DE L'ADN

Les protéines sont des éléments clés et indispensables à la cellule. Ces éléments sont synthétisés de façon indirecte grâce à l'ADN. En effet, la synthèse protéique (étape de traduction) se fait grâce à l'utilisation d'ARN, qui provient de la transcription de l'ADN. Cette étape est importante pour la cellule puisque l'intégralité de l'information génétique sera copiée en ARN. D'un certain point de vue, ce mécanisme peut être considéré comme une protection des données contenues dans l'ADN, lui évitant ainsi d'aller dans le cytoplasme et d'être copié par des éléments exogènes. Pour rappel, le sucre présent sur l'ARN est un acide ribonucléique et non désoxyribonucléique. De plus, la thymine initialement présente dans

l'ADN est substituée par un uracile dans l'ARN, qui est un analogue méthylé de la thymine cependant plus instable (Figure 19). Toutes ces différences entre l'ARN et l'ADN permettent de protéger les données de ce dernier car il n'est pas possible de synthétiser de l'ADN en partant de l'ARN (sauf dans quelques rares cas de transcriptases inverses utilisées par les rétrovirus telle que le VIH²¹⁻²³).

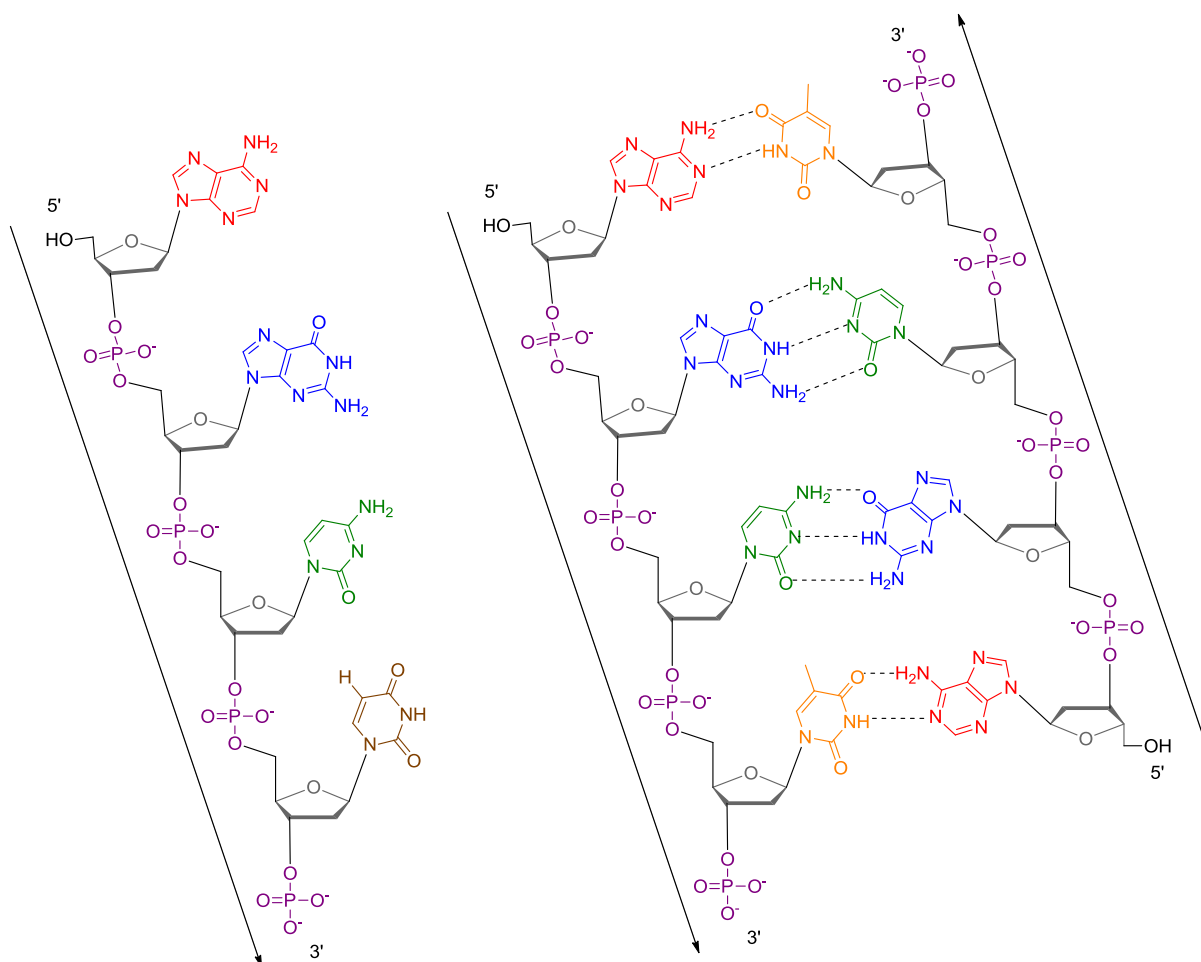


FIGURE 19 DIFFÉRENCES ENTRE L'ARN À GAUCHE ET L'ADN À DROITE.

Ce phénomène de transcription commence par la reconnaissance d'une séquence particulière présente au niveau de l'ADN par une protéine. Cette séquence courte est constituée de quelques paires de bases (4 à 6) composées de thymine et d'adénine et couramment appelée « TATA-Box » (ou boîte de Pribnow chez les bactéries). Cette séquence promotrice va permettre à un complexe protéique appelé TBP (pour « TATA-Binding Protein »), contenant un mélange de protéines (facteurs de transcriptions, hélicase et ARN polymérase), de se fixer et ainsi d'initier la transcription en commençant par dérouler l'ADN puis en transcrivant la séquence ADN en ARN. Une fois le brin d'ARN synthétisé, un autre

complexe protéique créé une queue d'adénines terminales permettant la formation d'une boucle stoppant le travail de l'ARN polymérase (Figure 20).

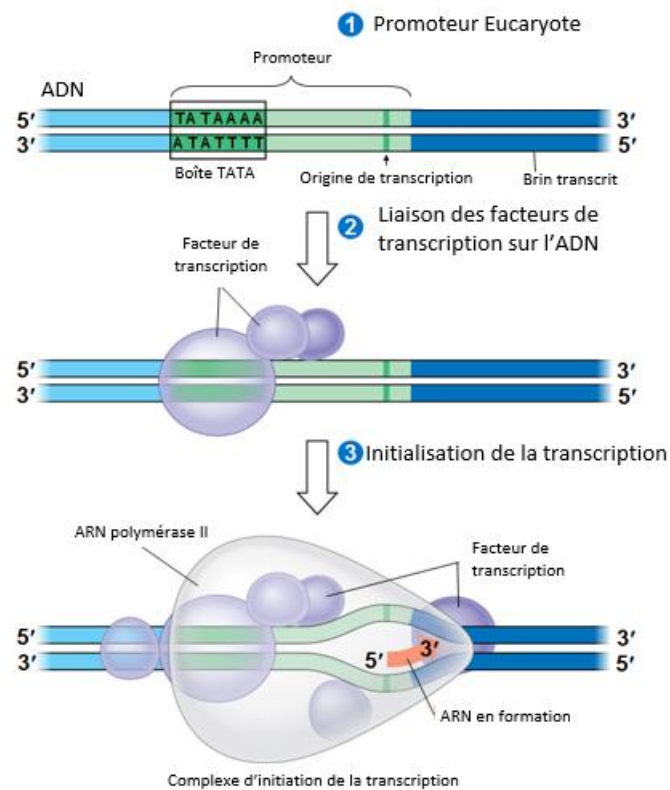


FIGURE 20 REPRÉSENTATION DU PHÉNOMÈNE DE TRANSCRIPTION.

L'ARN ainsi produit subira une maturation (étape d'épissage) le transformant en ARN messenger qui pourra sortir du noyau et aller dans le cytoplasme, où chaque triplet (ou codon) de bases sera traduit en un acide aminé par des complexes protéiques nommés ribosomes.²⁴

1.3.4. LA PRÉSERVATION DE L'ADN

L'ADN est donc un outil indispensable aux cellules qu'il est nécessaire de préserver. C'est pour cela que la cellule s'est dotée d'un système de réparation de l'ADN. Les dommages infligés à la séquence nucléique peuvent provenir de sources endogènes, comme lors de l'étape de réplication, par (Figure 21) :

- Mésappariement de bases.
- Perte de bases (apparition de sites abasiques).
- Oxydation des bases par des radicaux libres.
- Désamination des bases.

Mais également provenir de sources exogènes plus nocives pour l'ADN ^{25,26} telles que (Figure 21) :

- Des radiations UV formant des dimères de pyrimidine stables conduisant à une torsion de l'ADN empêchant l'appariement de base.
- Des rayonnements X ou gamma conduisant à une cassure de l'ADN.
- Des substances mutagènes distordant l'ADN par méthylation des bases (suppression des liaisons hydrogènes), formant des ponts entre les brins d'ADN ou encore s'intercalant entre les paires de bases ou les sillons de l'ADN (Figure 22).

Tous ces facteurs, et plus particulièrement les substances mutagènes, sont propices à la formation de cancers.²⁷

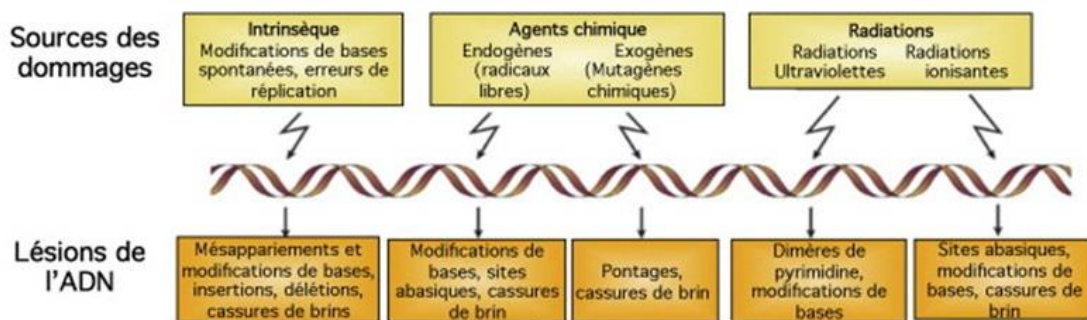


FIGURE 21 RÉCAPITULATIF DES DOMMAGES FAITS À L'ADN

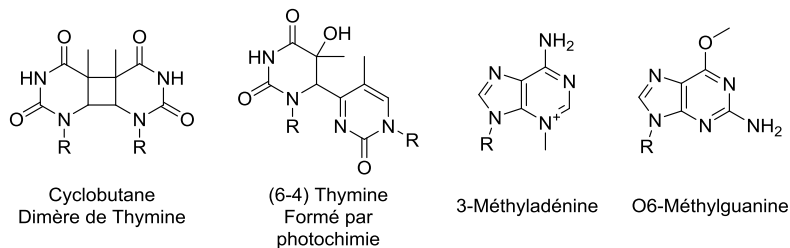


FIGURE 22 MODIFICATIONS CHIMIQUES RÉSULTANT DES DOMMAGES À L'ADN.

La cellule a donc développé de nombreux moyens de réparer l'ADN. Il existe plusieurs types de réparations faisant intervenir des protéines, comme le phénomène de réparation par excision de base (BER) ou de nucléotide (NER) qui sont externes à la réplication. Mais il en existe d'autres survenant durant la réplication comme la réparation des mésappariements. Si la réparation ne peut pas être effectuée correctement, la cellule va alors initier un processus d'apoptose.²⁷

Malheureusement, dans certains cas la mutation engendrée par l'ADN est telle que la cellule ne peut être ni réparée, ni entrer en apoptose. Ceci se traduit lors de la réplication par une duplication du matériel génétique contenant de l'erreur, qui sera de nouveau transmis aux cellules filles (Figure 23).

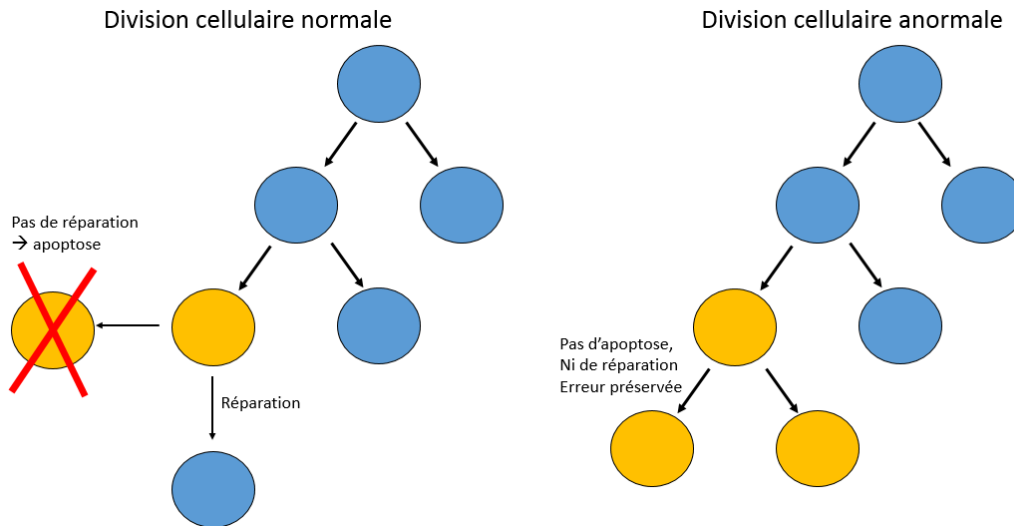


FIGURE 23 DIVISION CELLULAIRE DE CELLULES SAINES À GAUCHE ET DE CELLULES ENDOMMAGÉES À DROITE.

Les recherches effectuées sur les différents rôles que joue l'ADN au sein d'une cellule ont permis de découvrir que ce polymère est le centre névralgique de la survie cellulaire. Les investigations menées par Watson et Crick grâce aux observations de leurs collaborateurs, les ont amenées en 1953 à émettre une hypothèse, confirmée par la suite, sur la structure de l'ADN. Depuis, d'autres structures tridimensionnelles de l'ADN ont été identifiées et leurs rôles ont, pour la plupart, été déterminés. Les interactions constantes entre l'ADN et d'autres objets biologiques plus ou moins massifs comme les protéines, permettent de réguler les phénomènes métaboliques. C'est l'interaction entre l'ADN et ces objets qui focalisent maintenant l'attention des chercheurs, et c'est dans ce cadre que s'inscrit cette thèse.

1.4. LES STRUCTURES COMPLEXES DE L'ADN

Comme mentionné précédemment, la structure secondaire de l'ADN et ses rôles sont bien connus. Cependant, des structures tertiaires souvent impliquées dans les dysfonctionnements métaboliques existent et sont moins familières aux yeux des chercheurs. C'est par exemple le cas des G-quadruplex et des séquences riches en adénine et thymine faisant l'objet de nombreux sujets de recherche.

1.4.1. LES G-QUADRUPLEX

1.4.1.1. LEURS STRUCTURES

Les G-quadruplex (G4) sont des structures complexes formées de guanines. Ces dernières sont organisées en tétrades planes reliées entre elles par liaisons hydrogène de façon « non-canonique ». En leur centre se trouve un cation monovalent, majoritairement un ion potassium et dans de rares cas un ion sodium ou ammonium. Ces tétrades forment une large surface permettant de faire aisément du π -stacking qui leur confère la possibilité de s'empiler les unes sur les autres (généralement un empilement de trois tétrades). Cet effet s'ajoute à celui de l'interaction électrostatique entre le cation et l'atome d'oxygène sur la guanine permettant de former ces G4 hélicoïdaux (Figure 24).^{28–31} Ces complexes sont d'une grande stabilité, parfois supérieure à celle de la double hélice d'ADN^{31,32} et sont favorisés par la présence successive de guanines dans des séquences de type TGGGGT (Figure 24).³³

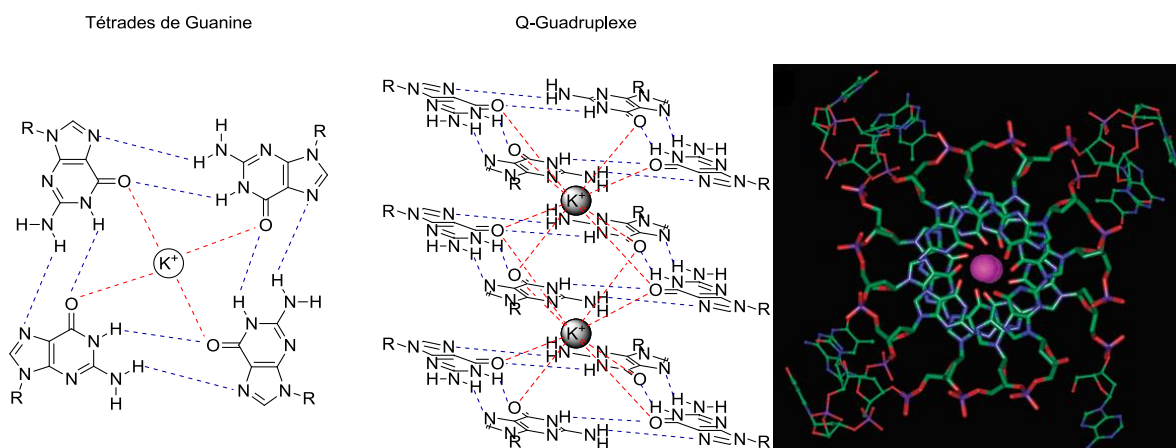


FIGURE 24 REPRÉSENTATION DES TÉTRADES DE GUANINES À GAUCHE, DES G4 AU CENTRE (FORCES ÉLECTROSTATIQUES EN ROUGE ET LIAISONS HYDROGÈNE EN BLEU) ET À DROITE UNE VUE DE HAUT DES G4 AVEC LE CATION AU CENTRE.

De nombreuses topologies différentes sont envisageables pour les G4. Les guanines formant le complexe peuvent provenir soit de différents brins d'ADN (intermoléculaires), soit du même brin d'ADN (intramoléculaire). Lorsqu'un seul brin est impliqué dans les G4, des boucles sont présentes pour relier les guanines, donnant une grande variété de structures. La stabilité de ces complexes est régie par la longueur de la séquence et la nature des boucles ainsi que la nature du cation central (Figure 25).^{29,34–37} Il est à noter que le remplacement d'une guanine par une autre base déstabilise complètement le G4.

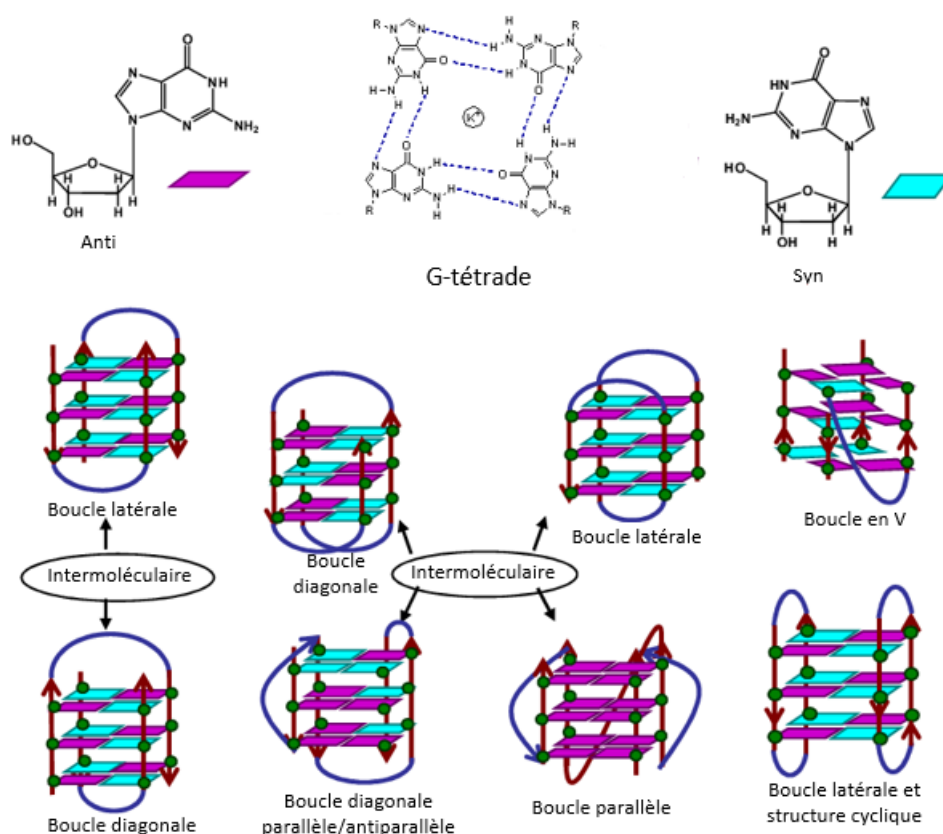


FIGURE 25 DIFFÉRENTS TYPES DE G4 ET LES CONFORMÈRES POSSIBLES.

Les G4 sont formés lorsque l'ADN est sous forme monocaténaire, c'est-à-dire lors de la réplication, de la transcription ou de sa réparation. C'est à ce moment que les liaisons canoniques sont rompues et que la formation de structures non-canoniques est possible.^{31,38}

1.4.1.2. LEURS FONCTIONS

Le génome humain comporte environ 300 000 séquences pouvant faire des G4.³⁹ Ils sont répartis de façon non homogène et localisés dans les régions dites « expressives » des gènes (Figure 26). Leur importance est telle que ces séquences sont conservées d'un génome à l'autre.⁴⁰

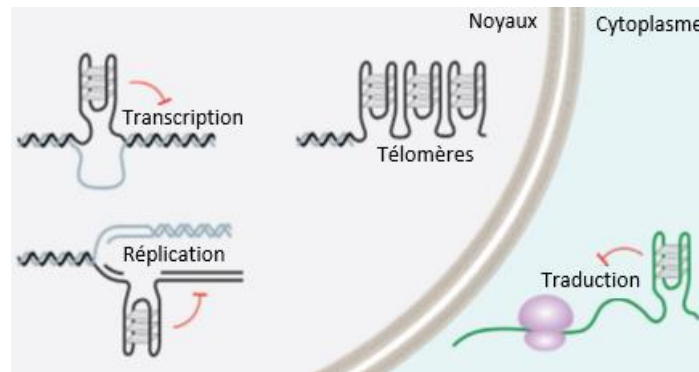


FIGURE 26 LOCALISATIONS POSSIBLES DES G4.

1.4.1.2.1. LES TÉLOMÈRES

Les télomères sont des séquences répétées en TTAGGG localisées à l'extrémité des chromosomes. Ils forment de façon spontanée des G4 disposant d'une boucle TTA stable en conditions physiologiques. Ces télomères sont répétés plus de 1000 fois dans l'ADN humain (Figure 27).²⁹

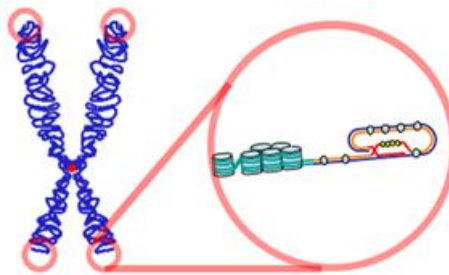


FIGURE 27 LOCALISATION DES TÉLOMÈRES.

Les G4 présents au niveau des télomères rendent illisible la lecture de l'ADN par les enzymes de la réplication et de la transcription. Ceci a pour conséquence de diminuer la taille des télomères à chaque duplication conduisant à la fusion de chromosomes, l'apoptose ou la sénescence. C'est pour cela que les cellules mères se sont dotées d'enzymes (les télomérases) leur permettant d'accroître ces télomères.^{29,31}

La gêne stérique provoquée par la structure des G-quadruplex va empêcher de nombreuses protéines de se lier à l'ADN, impliquant de lourdes conséquences métaboliques pouvant être aussi bien négatives, comme le blocage de l'expression des télomérases (présence de G4 intramoléculaires et antiparallèles) que positives, en activant ces télomérases (présence de G4 intermoléculaires parallèles) (Figure 28).^{31,41-43}

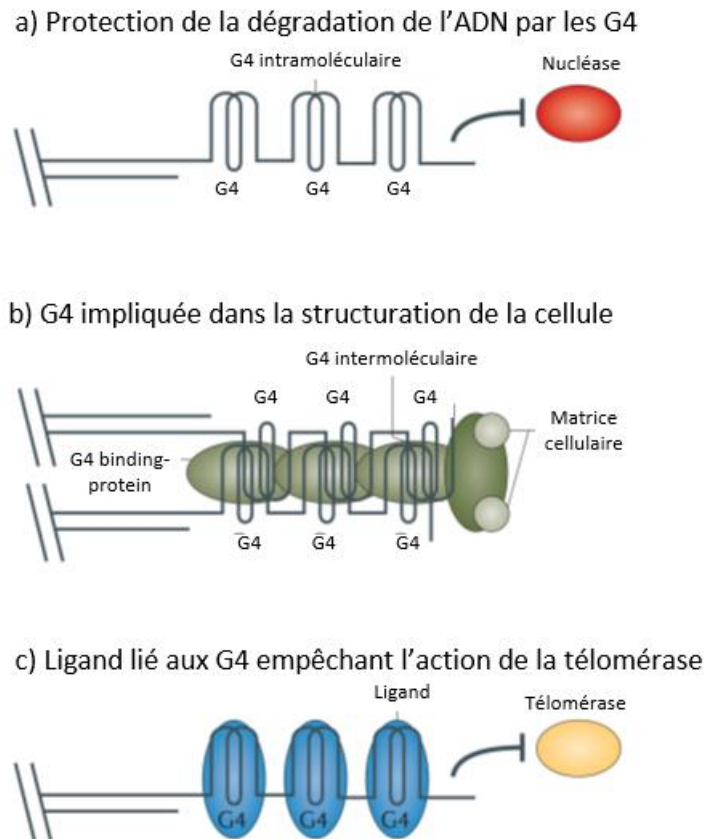


FIGURE 28 DIFFÉRENTES UTILITÉS DES G-QUADRUPLEX AU NIVEAU DES TÉLOMÈRES. (A : PROTECTION FOURNIE PAR LES G-QUADRUPLEX DE LA DÉGRADATION PAR LES NUCLÉASES OU AUTRES ENZYMES. B G4 IMPLIQUÉS DANS LA STRUCTURATION DE LA CELLULE. C: PROTÉINES SE LIANT AUX G4 EMPÊCHANT LES TÉLOMÉRASES D'AGIR.

Les télomérases sont surexprimées dans 85 % des cancers rendant la cellule cancéreuse théoriquement « immortelle ». L'intérêt thérapeutique serait donc de développer des composés ciblant les télomérases afin d'inhiber leur caractère « immortelle » en empêchant cette surexpression. ^{29,31,44}

1.4.1.2.2. LA RÉPLICATION

L'étape de réplication (Cf. p41) nécessite la lecture de l'ADN par des complexes protéiques. La présence de G4 peut entraîner une gêne stérique empêchant les réplisomes de dérouler et de répliquer l'ADN de façon convenable. ^{31,35,45} Afin de pallier ce problème, la cellule s'est dotée d'enzymes pouvant dérouler les G4. Cependant, la non-expression ou la mutation de ces enzymes entraîne des troubles métaboliques par réarrangement des zones riches en guanine ^{46,47}, délétions de bases ⁴⁸ ou inactivation de la réplication (Figure 29). ^{49–52}

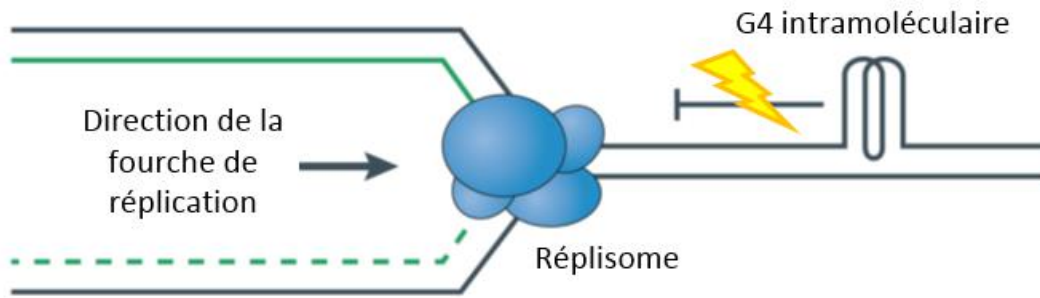


FIGURE 29 CONTRAINTE PROVOQUÉE PAR LA PRÉSENCE D'UN G4 PENDANT LA RÉPLICATION.

Il s'est également avéré que les G4 étaient présents dans 80 % des origines de réplication, ce qui suggère leur implication importante mais dispensable⁵³ dans une grande partie du cycle cellulaire (Figure 30).^{54–56}

Origine de réplication

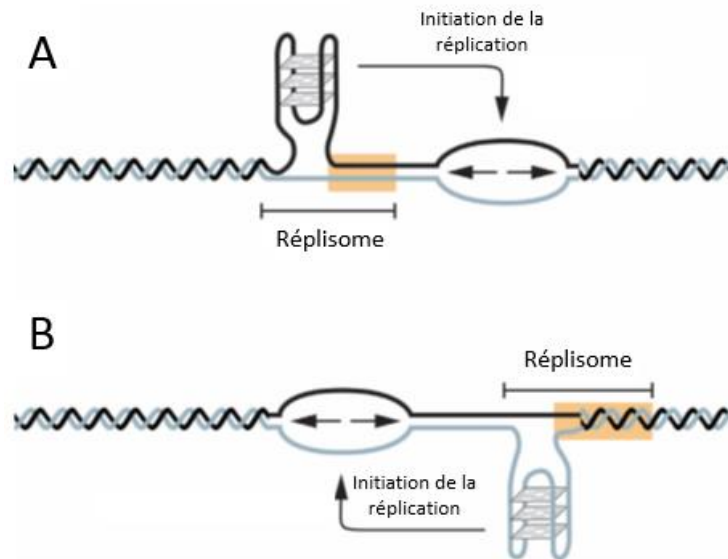


FIGURE 30 PRÉSENCE DES G4 AU NIVEAU DES ORIGINES DE RÉPLICATION.

Ces G4 disposent donc de deux rôles contradictoires dans la réplication. D'un côté un effet « positif » en aidant à initier la réplication, mais d'un autre côté, ils disposent d'un effet « négatif » en bloquant stériquement l'accroche des protéines impliquées dans la réplication et provoquent donc de nombreuses maladies.⁴⁵

1.4.1.2.3. LA TRANSCRIPTION

Tout comme la réplication (Cf. p41), la transcription (Cf. p43) utilise les brins d'ADN comme matrice, donc par analogie les problèmes rencontrés lors de la réplication seront également présents pendant l'étape de transcription. Les G4 vont là aussi entraîner une gêne stérique en bloquant la transcription de la même manière que pendant la réplication, mais

uniquement lorsque le G4 est présent sur le brin transcrit. Si au contraire il est sur le brin non transcrit, l'ARN résultant disposera également d'un G4, entraînant sa traduction en protéine non mature ou mutée.^{29,31,57}

Par ailleurs, 50 % des zones d'initialisation de la transcription contiennent des G-quadruplex en amont de la zone à transcrire (les séquences reconnues par les protéines entre les sites d'initiations de la réplication et de la transcription ne sont pas les mêmes) indiquant également une importance de ces complexes dans le métabolisme de transcription (Figure 31).^{29,31,57}

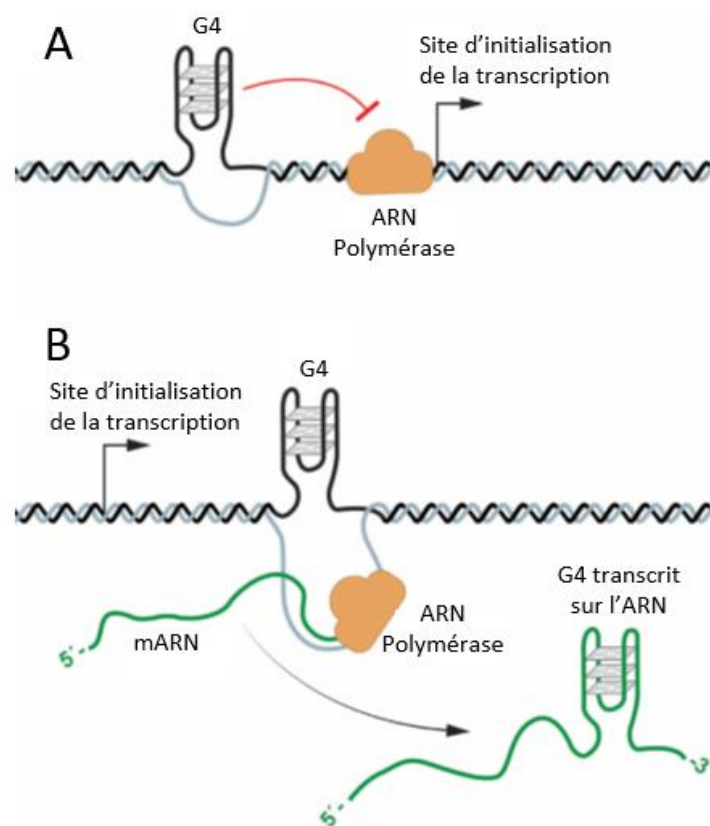


FIGURE 31 RÔLES DES G4 PENDANT L'ÉTAPE DE TRANSCRIPTION.

Les G-quadruplex participent donc à la régulation des gènes au sein d'une cellule. Malheureusement ils sont plus souvent connus pour leurs rôles dans de nombreux cancers.⁴⁵ Toutefois, il ne s'agit pas là des seules séquences et motifs pouvant perturber le métabolisme cellulaire, les séquences riches en adénine et thymine en font également partie.

1.4.2. LES ZONES RICHES EN ADÉNINE ET THYMINE DE L'ADN

Les zones riches en adénine et thymine (AT) sont des séquences consensus constituées de 80 % à 100 % en adénine et thymine dont la taille de séquence varie.⁵⁸ Elle peut aller de quelques

paires de bases (minimum 4, « short AT island »), à plusieurs milliers (« long AT island »). Ces séquences ont des rôles importants dans le métabolisme cellulaire puisqu'elles participent à la structuration de la région du centromère et à l'initialisation de la transcription, même si globalement leurs rôles restent peu compris.

1.4.2.1. UNE STRUCTURE FAVORISANT LES INTERACTIONS

Il peut exister une multitude de séquences ADN et certaines possèdent des motifs largement prédominants. Parmi ces motifs se trouvent des séquences riches en AT qui, comparées aux autres séquences riches en GC ou aux séquences génériques de l'ADN, possèdent un petit sillon plus étroit (Tableau 1).

		ADN générique ⁵⁹	AT riches ⁶⁰	GC riches ⁶¹
Largeur	Sillon mineur	6 Å	3,2 Å	7 Å
	Sillon majeur	11,6 Å	12,7 Å	11 Å

TABLEAU 1 RÉCAPITULATIF DES TAILLES MOYENNES DE SILLONS POUR LES TROIS MOTIFS PRINCIPAUX DE L'ADN.

Cette étroitesse va favoriser les interactions de type Van der Waals, électrostatiques ou de liaisons hydrogène permettant une interaction entre l'ADN et son environnement moléculaire. Les petites molécules iront donc préférentiellement dans les petits sillons riches en AT plutôt que dans les autres sillons (Figure 32).^{60,62}

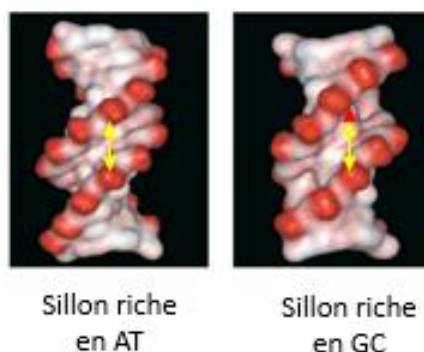


FIGURE 32 DIFFÉRENCES DE TAILLE DE SILLON ENTRE LES SÉQUENCES RICHES EN AT (À GAUCHE) ET EN CG (À DROITE).

Grâce à leur petite taille maximisant ces interactions, les petits sillons riches en AT de l'ADN seront donc des cibles spécifiques pour les petites molécules qui pourront induire des modifications structurelles et donc métaboliques.

1.4.2.2. UNE SÉQUENCE COSMOPOLITE ET MULTITÂCHE

Les séquences riches en AT de l'ADN disposent d'une multitude de tâches en fonction de leur localisation et de leur taille, cela sera décrit ci-après.

1.4.2.2.1. L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION, LA BOÎTE TATA ET SES PROTÉINES

La boîte TATA est une courte séquence d'ADN consensus constituée de thymine et d'adénine permettant d'initier la transcription de 20 % des gènes.⁶³ Cette boîte est constituée de 6 à 8 paires de bases et fait partie des « short AT island ». Elle est située à 30 paires de bases en amont du site à transcrire.^{63–65}

Cette boîte TATA sera reconnue par de nombreux complexes protéiques qui vont interagir avec elle. L'association de l'ensemble de ces complexes, qualifiée de phénomène de recrutement, constitue le marqueur biologique reconnu par l'ARN polymérase permettant l'initiation de la transcription (Figure 33).^{64–66}

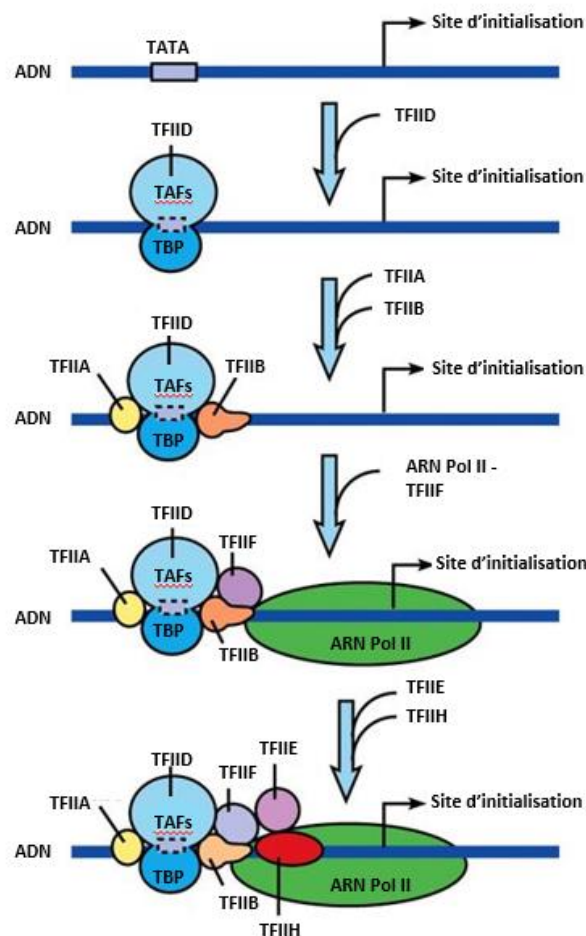


FIGURE 33 SCHÉMA DE RECRUTEMENT DES COMPLEXES PROTÉIQUES POUR LA TRANSCRIPTION.

Parmi tous les complexes se liant à la boîte TATA, le premier est le complexe TFIID, qui est constitué de 15 protéines différentes dont la plus importante est la sous-unité TBP (pour TATA-Binding Protein). Cette sous-unité dispose d'une très forte affinité pour la boîte TATA^{64,65} et est indispensable à la transcription. Une fois liée à la boîte TATA, celle-ci va pouvoir recruter les autres facteurs composant le complexe TFIID et initier la transcription (Figure 34).^{64,65,67}

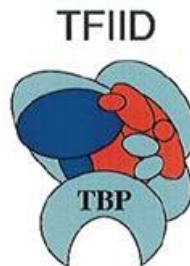


FIGURE 34 TBP DANS LE COMPLEXE PROTÉIQUE TFIID.

L'interaction de la TBP avec le petit sillon de la boîte TATA est régie par des liaisons électrostatiques entre les résidus aminés (des lysines et arginines) et les groupements phosphates présents sur les brins d'ADN.⁶⁷ Cette complexation entre ces deux entités va entraîner une courbure de la boîte TATA qui permettra de réguler la transcription en inhibant l'activité des promoteurs par une gêne stérique (Figure 35).^{64,65}

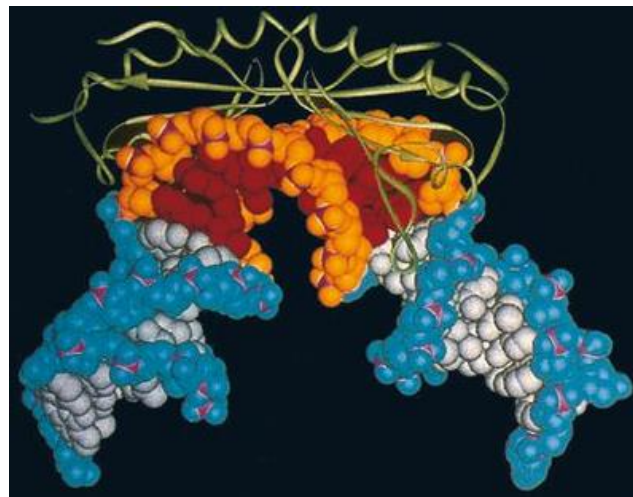


FIGURE 35 REPRÉSENTATION TRIDIMENSIONNELLE DE LA TBP LIÉ À L'ADN, AVEC EN ORANGE ET ROUGE LA SÉQUENCE TATA COURBÉE PAR LA TBP, ET EN BLEU ET BLANC LA SÉQUENCE ADN.

La sous-unité TBP est donc primordiale pour l'étape de transcription. Lorsque ce complexe mute, il peut s'accumuler au niveau des cellules nerveuses et interrompre leur métabolisme, entraînant alors des problèmes de coordination des mouvements, comme dans

les maladies de type Huntington.⁶⁸⁻⁷⁰ Ces problèmes seraient dus à une modification de la structure tertiaire de la TBP, empêchant alors sa liaison avec l'ADN.⁷⁰

Le rôle et l'importance de cette sous-unité reliée aux boîtes TATA sont connus dans les grandes lignes mais de plus amples recherches sont nécessaires afin d'en connaître tous les mécanismes, notamment dans le cadre d'applications à visée thérapeutique.

Contrairement aux boîtes TATA qui sont des éléments dits « *trans*-régulateurs », c'est-à-dire faisant partie des gènes codant de l'ADN, de nombreuses régions de l'ADN sont dites « *cis*-régulatrices » et non-codantes. Parmi ces dernières régions se trouvent les éléments permettant le contrôle de l'ADN tels que les promoteurs, les activateurs ou les inhibiteurs mais également les éléments permettant la structuration de l'ADN comme les Scaffold/Matrix Attachment Regions (S/MAR).⁷¹ Parmi les S/MAR se trouvent des éléments comme les éléments déroulant l'ADN (DUE pour « DNA Unwinding Element ») et les sites fragiles, dont la mutation peut engendrer de graves troubles métaboliques comme les cancers.

1.4.2.2.1.1. DNA UNWINDING ELEMENTS

Les DUE (DNA Unwinding Elements) sont des séquences courtes en adénine et thymine de 8 à 50 paires de bases permettant d'initier l'ouverture de la double hélice d'ADN au niveau des origines de réplication. Ces éléments sont présents aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes.⁷²⁻⁷⁴ Les hélicases, mentionnées dans la partie I, ainsi que de nombreuses autres protéines vont ainsi reconnaître ces DUE et séparer les brins d'ADN en déroulant la double hélice, les rendant accessible pour la machinerie de réplication et transcription.⁷⁵

Cependant, ces DUE peuvent subir des phénomènes entraînant des dysfonctionnements métaboliques. Il pourrait s'agir :

- D'un réarrangement structural comme la formation de G-quadruplex (Les G-quadruplex p48) entravant la liaison des protéines avec la séquence.⁷⁴
- D'une mutation de la séquence, rendant cette dernière illisible par la protéine et supprimant ainsi l'initiation de la réplication.^{73,74}
- De la mutation de la protéine interagissant avec la séquence, entraînant un défaut de liaison ou de fonctionnement qui conduira à l'apoptose cellulaire.⁷¹⁻⁷⁴

1.4.2.2.2. LES SÉQUENCES LONGUES EN ADÉNINE ET THYMINE

Ces S/MAR sont estimés à plus de 100 000 dans le génome et sont des régions de l'ADN dont les séquences peuvent contenir des suites de 100 à 1000 paires de bases généralement très riches en adénine et thymine (>70 %),^{71,76} faisant ainsi partie des « AT long island » (comme l'allèle du minisatellite CEB 310 dont la séquence « TATACACACATATACATATATAT » est répétée 25 fois). Il existe plus de 500 protéines se liant à ces régions et étant impliquées dans différents phénomènes métaboliques allant de la structuration de l'ADN en passant par la régulation de la transcription ou de la réplication.^{71,76,77} De par cette composition exclusive en adénine et thymine de plus d'une centaine de bases, les S/MARs sont des régions où l'ouverture de l'ADN en brins monocaténaire est favorisée.⁷³ Cette ouverture va rendre disponible les brins d'ADN pour remodeler la chromatine et la rendre disponible pour la machinerie cellulaire.^{71,76–78}

1.4.2.2.2.1. LES SITES FRAGILES

Les sites fragiles sont des régions de l'ADN qui n'ont pu être compactées durant la mitose, entraînant une cassure dans la continuité des brins d'ADN ou la formation de structures secondaires.⁷⁹ Ces sites, principalement composés d'adénine et de thymine (pour plus de 90 %), n'apparaissent que chez 5 % de la population et sont très souvent impliqués dans les cancers.^{58,79–82}

L'un des exemples les plus connus est le site fragile FRA16B retrouvé sur le chromosome 16^{79,80}, contenant plus de 2000 copies d'une suite de 33 paires de bases en adénine et thymine (Figure 36).^{79,83,84}

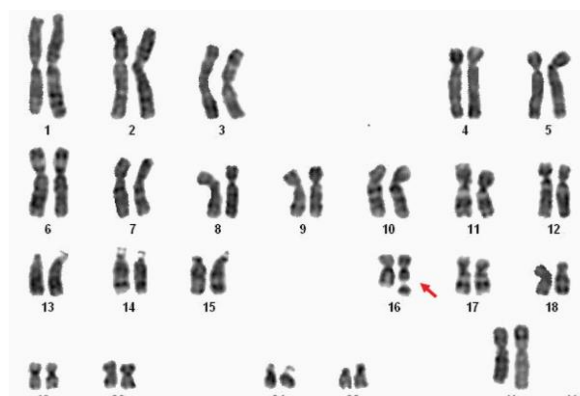


FIGURE 36 CARYOTYPE MONTRANT UN SITE FRAGILE SUR LE CHROMOSOME 16.

Il existe par ailleurs de nombreux autres sites fragiles entraînant des dysfonctionnements graves, comme le site fragile FRAXA conduisant au syndrome du X fragile (responsable d'un retard cognitif), ou encore FRAXE et FRA11B provoquant également des retards mentaux.^{85,86}

S'il reste de nombreuses parts d'ombre concernant ces sites fragiles, les conséquences néfastes qu'ils engendrent sont, elles, clairement identifiées. C'est dans le cadre de l'étude de ces sites que la conception et la synthèse de composés affins à ces zones s'est développée.

De nombreuses protéines peuvent se lier aux zones riches en adénine et thymine, comme la TBP vue précédemment mais également des protéines intervenant dans la réplication, transcription et la structuration de l'ADN. Parmi elles se trouvent des topoisomérases, des histones, des protéines HMGA (High Mobility Protein Group) ou encore les protéines STAB.

1.4.2.2.3. LA GRANDE DIVERSITÉ DE PROTÉINES RÉGULANT LES ZONES RICHES EN AT

1.4.2.2.3.1. LES HMGS

Les HMG sont des protéines intervenant dans différents processus métaboliques comme la transcription, la réplication et la réparation. Elles possèdent au moins un motif dit « AT Hook » qui leur confère une affinité pour les zones riches en adénine et thymine de l'ADN.⁸⁷ Ces motifs sont également présents chez d'autres familles de protéines et constitués de séquences identiques en acides aminés : « -Proline-Arginine-Glycine-Arginine-Proline- ».⁸⁸ Cette séquence d'acide aminé va épouser le petit sillon des zones riches en AT de l'ADN grâce aux différentes liaisons hydrogène non-canoniques et occuper 5 à 6 paires de bases⁸⁸. De plus sa forme particulière en « crochet » va permettre de stabiliser le complexe « AT-Hook-ADN » grâce aux différentes interactions électrostatiques entre les résidus lysines ou arginines et les groupements phosphate du brin d'ADN (Figure 37).⁸⁸

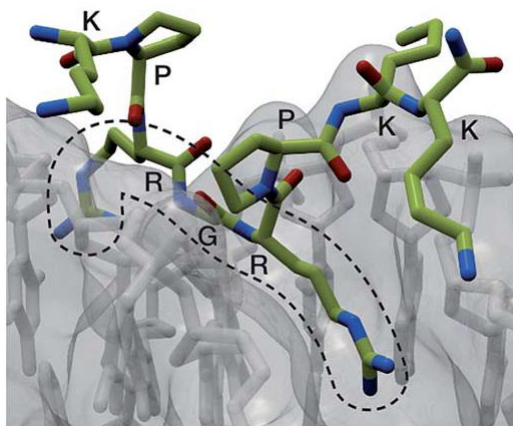


FIGURE 37 REPRÉSENTATION DES ACIDES AMINÉS (P : PROLINE, R : ARGININE, G : GLYCINE, K : LYSINE) AFFINS DE LA SÉQUENCE AT.

Les HMGA sont des protéines non-histones modelant la chromatine qui ont la particularité de posséder trois AT-Hooks. Ceci permet la liaison de ces protéines à une suite de 15 à 18 paires de bases en adénine et thymine.^{76,78,89} Les HMGA pourraient être impliquées dans le remodelage de la chromatine des gènes contrôlant la production de lymphocytes T,⁷⁸ ce qui indique qu'elles sont indispensables pour la cellule. Leur expression est maximale durant le développement des jeunes enfants^{76,78} et l'altération des HMGA est d'ailleurs responsable de cancers infantiles comme les neuroblastomes ou lymphomes de Burkitt, mais également dans des cancers plus courants comme ceux du colon ou de la prostate. Enfin, d'autres cancers comme la leucémie peuvent survenir lors de la mutation des « AT Hook ».⁷⁸

1.4.2.2.3.2. LES PROTÉINES STABS

Les protéines STAB1 et STAB2 sont des protéines allant également se lier aux zones riches en adénine et thymine des S/MAR.^{76,78} Elles possèdent un motif PDZ⁹⁰ étant également présent sur de nombreuses autres protéines, qui permet un ancrage au niveau des membranes cellulaires des composants du cytosquelette.^{90,91} Les protéines STAB sont retrouvées dans les lymphocytes T et B, leur non expression handicape leur développement cellulaire ce qui conduit à leur apoptose.⁷⁸ Ces STAB servent également de point d'ancrage pour les complexes de remodelage du nucléosome comme les histones.⁷⁸

Les zones riches en AT et les G4 de l'ADN sont des sites sensibles impliqués dans différents métabolismes allant de la réplication à la cohésion des chromosomes. Les nombreuses protéines qui leur sont associées jouent un rôle vital dans le bon fonctionnement métabolique. Les chercheurs ont observé que de nombreux

dysfonctionnements étaient liés à ces zones. Cependant de nombreuses questions restent en suspens concernant leurs mécanismes d'actions.

En effet, les mécanismes de réplication, de transcription et de traduction sont étroitement liés les uns aux autres, autrement dit une erreur survenant dans l'un de ces trois mécanismes aura un impact sur les autres. Trouver l'origine d'un dérèglement métabolique est alors difficile et de nombreuses questions peuvent être soulevées. L'erreur provient-elle d'une erreur lors de la transcription qui a engendré un ARN défectueux ? Ou provient-elle d'une mutation survenue dans la séquence d'ADN qui est à l'origine d'une réplication erronée ? De plus, à quoi est due cette mutation ? Provient-elle d'une mutation spontanée ou est-elle due à un agent perturbateur exogène ? Autant de questions que se posent les chercheurs.

Par conséquent ces derniers se sont focalisés sur l'élaboration d'outils permettant de se lier à ces zones supposées régulatrices ou impliquées dans un mécanisme clé, mais également aux protéines susceptibles d'interagir avec ces séquences afin d'aboutir à une compréhension globale de la cascade d'évènements à l'origine du dérèglement métabolique.⁹² Les chercheurs ont donc mis au point de nombreux ligands ayant une forte affinité pour l'ADN.

1.5. LES LIGANDS DE L'ADN

Ces différents ligands vont pouvoir s'associer à l'ADN selon différents modes d'interactions, dont certains sont utilisés par les protéines elles-mêmes (Figure 38) :^{93–95}

- Par interaction électrostatique entre le ligand et le groupement phosphate de l'ADN.
- Par intercalation entre les paires de base des sillons de l'ADN (grand sillon ou petit sillon) (A).
- Par interaction avec les sillons de l'ADN (grand sillon ou petit sillon) (B).
- Par un mélange d'une interaction et d'une intercalation au niveau des sillons de l'ADN (C).
- Par l'intermédiaire d'un ligand vecteur d'un complexe métallique (D).

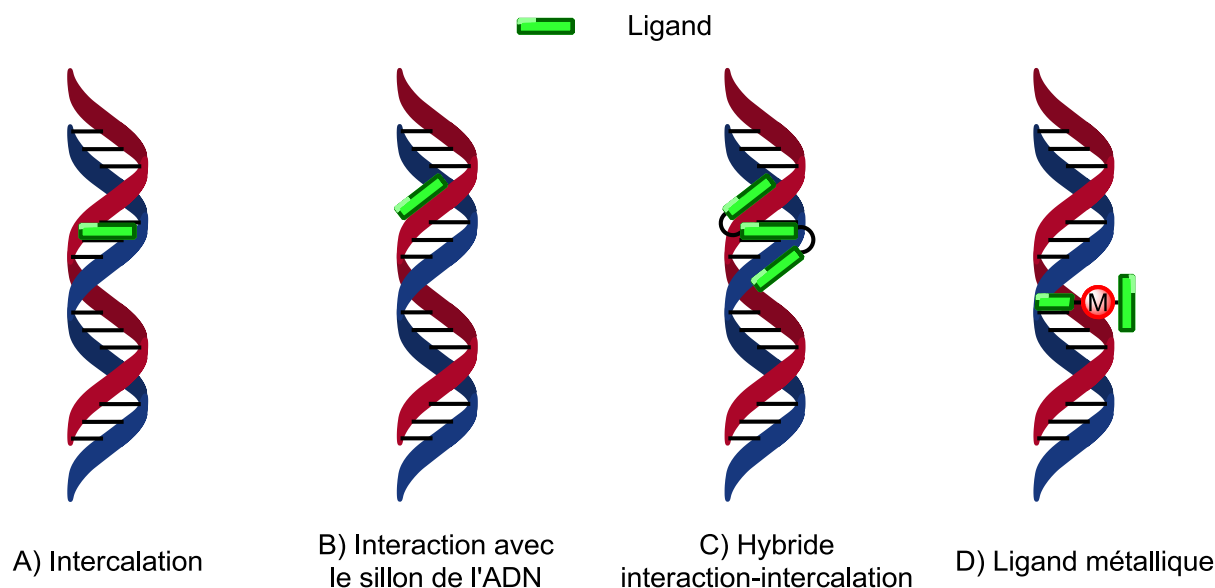


FIGURE 38 LES DIFFÉRENTS MODES D'INTERACTIONS ENTRE L'ADN ET UN LIGAND.

Toutes ces interactions sont pour la plupart réversibles (sauf pour de rares cas lors de la formation de structures tertiaires de l'ADN telles que les triplex ou d'autres complexes protéine-ADN). Les plus fréquentes sont les interactions avec les sillons et les intercalations dans l'ADN ; les hybrides étant une combinaison des deux interactions précédentes et ne seront pas détaillés ici.⁹³⁻⁹⁵

1.5.1. LES DIFFÉRENTS MODES DE LIAISON

1.5.1.1. INTERACTIONS ÉLECTROSTATIQUES

Certaines conformations ou structures de l'ADN nécessitent la présence d'un cation stabilisateur, comme c'est le cas dans les G-quaduplex (p48).^{93,95} Ce type d'interaction pure est rare, mais permet aux molécules hautement chargées de pouvoir se lier à l'ADN comme c'est souvent le cas chez les protéines.^{93,95,96}

D'une manière générale, toutes les molécules interagissant à l'ADN le font au minimum par interaction de type électrostatique.^{93,95,96} La charge partielle de l'ADN étant globalement négative, les ligands devront être chargés positivement pour avoir une affinité avec l'ADN (Figure 39).

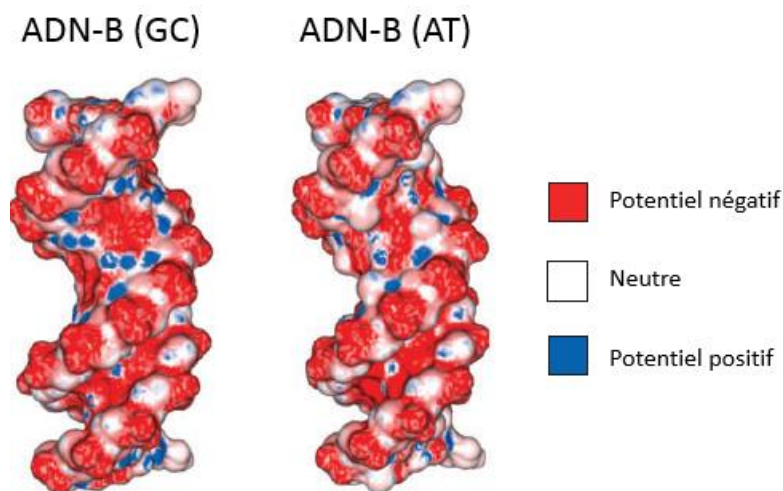


FIGURE 39 POTENTIEL ÉLECTROSTATIQUE DES ZONES RICHES EN GC À GAUCHE ET EN AT À DROITE.⁹⁷

1.5.1.2. INTERCALATIONS ENTRE LES PAIRES DE BASES

L'intercalation de molécules entre les paires de bases de l'ADN est certainement le mode d'interaction le plus connu et le plus utilisé. Bien que ce dernier soit facile à déterminer en observant la structure de l'ADN (par dichroïsme circulaire), les forces intervenant dans ce mécanisme sont assez mal comprises.^{93,95,98} En plus des interactions électrostatiques et de la gêne stérique présente entre les paires de bases induites par le ligand, de nombreuses autres interactions interviennent, comme celles de type hydrophobe. Les ligands auront en effet tendance à s'intercaler dans les poches hydrophobes présentes entre les bases, de manière plus favorable lorsque le ligand dispose d'un cycle aromatique chargé positivement.^{93,95,96,98} De plus, cette intercalation sera renforcée par les interactions de type π -stacking qui stabilisent le complexe ligand-ADN.⁹³

À tous ces phénomènes viennent s'ajouter des interactions orbitales entre le ligand et l'ADN. Un effet de recouvrement entre la LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) du ligand et la HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) des bases adjacentes^{95,99} sera possible, permettant d'améliorer la stabilité du complexe.

Cependant, ce type de liaison va également induire une dénaturation locale de la double hélice d'ADN^{93,95,96,98} évitant ainsi la fixation d'un second ligand à proximité du premier, il s'agit de la règle d'exclusion de proximité (Figure 40).^{93,96,98}

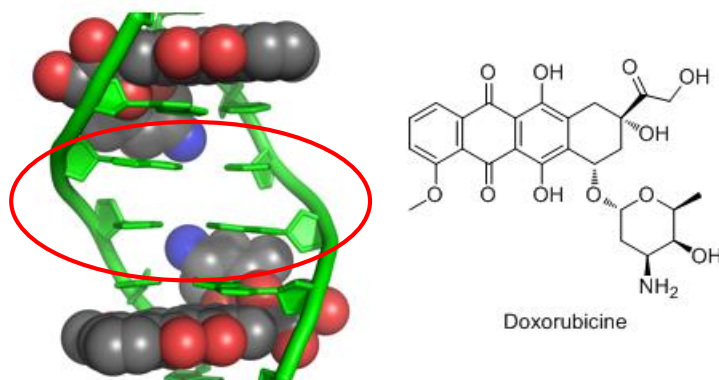


FIGURE 40 CRISTAL D'ADN INTERCALÉ PAR DEUX MOLÉCULES DE DOXORUBICINE. (PDB :151D)

Sur l'exemple de la Figure 40, le polycycle de la Doxorubicine (anti-tumorale) plan va s'insérer entre les paires de bases de l'ADN (le phénomène de π stacking est ici bien visible) et engendrer une légère déformation de ce dernier (cercle rouge). Cette déformation empêche l'intercalation entre nucléotides successifs d'une seconde molécule de Doxorubicine, ce qui serait normalement possible sans cette déformation. Le cycle pyranose va quant à lui venir s'insérer et interagir avec le sillon de l'ADN, augmentant la stabilité du complexe ligand-ADN.

1.5.1.3. INTERACTIONS AVEC LES SILLONS DE L'ADN

Les interactions ligand-sillon de l'ADN semblent être des interactions faibles, néanmoins il a été démontré que ces affinités se rapprochaient de celles connues pour les protéines chargées de la régulation de l'ADN (protéines intervenant dans la réplication, la transcription, la réparation et la traduction de l'ADN). La force d'association d'un ligand interagissant au niveau du sillon de l'ADN serait donc plus forte que celle résultant d'une simple intercalation entre les paires de bases.^{96,100} De plus, contrairement aux intercalants, aucune distorsion de la double hélice n'est observée. D'une manière générale, l'affinité d'une molécule pour l'ADN dépendra de la largeur du sillon, de sa profondeur et des potentiels électrostatiques mesurés.^{93,95,96}

Les grosses molécules et protéines disposeront d'une affinité accrue pour les grands sillons de l'ADN alors que les petites molécules interagiront avec le petit sillon de l'ADN. En effet, le grand sillon étant plus large et moins profond que le petit sillon, c'est avec ce dernier que les petites molécules pourront plus aisément établir des liaisons hydrogène et des liaisons de type Van der Waals.^{93,95,96}

C'est pour cela que l'ADN monocaténaire formant les triplex d'ADN va s'insérer dans le grand sillon de la double hélice d'ADN par liaison de type Hoogsteen. De plus, les séquences consensus en AT possèdent des sillons plus profonds que les séquences riches en CG, rendant ces premières plus aptes à recevoir des ligands.^{93,96,98,100}

Sur l'exemple de la Figure 41, le Berenil (antiparasitaire¹⁰¹) vient se loger dans la cavité du petit sillon de l'ADN, grâce à la charge positive de ses amidiniums, et épouser la forme du sillon maximisant ainsi les interactions possibles.

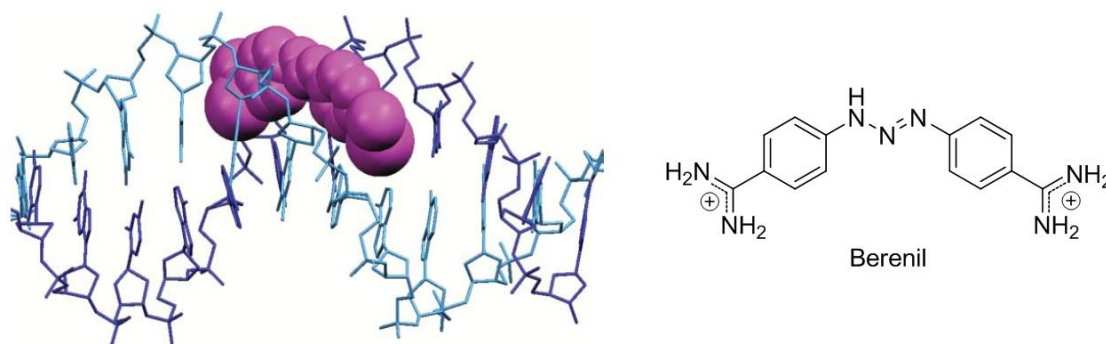


FIGURE 41 STRUCTURE DU BERENIL (PDB : 2GRV) ET INTERCALATION DE CELUI-CI DANS LES SÉQUENCES RICHES EN AT DU PETIT SILLON DE L'ADN.

1.5.1.4. INTERCALANTS À LIAISON MÉTALLIQUE

Les forces électrostatiques étant les interactions principales avec l'ADN, les ligands doivent disposer d'une charge positive. Un des moyens les plus faciles d'obtenir cette charge est de coordiner un métal de transition au ligand^{93,102}, ce qui va également permettre de diminuer la densité électronique des molécules organiques qui lui sont coordonnées, permettant ainsi une interaction d'empilement π plus forte.

La modulation du métal de coordination permet également de faire varier la géométrie du complexe. Le platine, le ruthénium et le rhodium sont les métaux de transition les plus utilisés pour la formation de ces complexes métalliques de par leur faculté à facilement former des complexes octaédriques stables ou plans carrés stables comme avec le platine.^{93,102} Ces ligands sont généralement plans et bidentates.

Les ligands choisis vont s'insérer dans l'ADN et ainsi véhiculer le métal et son co-ligand au niveau des sillons de l'ADN (petit ou grand, dépendant du complexe).^{93,102} Ces ligands métalliques sont utilisés pour leurs propriétés photochimiques leur conférant une utilité en imagerie¹⁰², notamment en résonance paramagnétique électronique où il est possible de

caractériser les interactions protéine-ADN avec les agents de chimiothérapie métalliques et de visualiser leur comportement au sein d'une cellule.^{103–107}

Sur l'exemple de la Figure 42, le diaminophénanthrène est intercalé entre les paires de bases de l'ADN par liaisons π et va légèrement distordre la double hélice d'ADN. Le motif bis-éthylènediamine va quant à lui former des interactions de type Van der Waals avec le petit sillon de l'ADN.¹⁰²

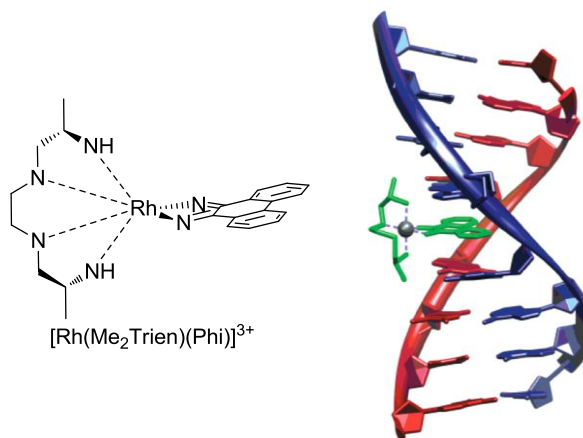


FIGURE 42 COMPLEXE $[Rh(phi)(Me_2Trien)]^{3+}$ RECONNAISSANT LES SÉQUENCES TCGA COMPLEXÉ PAR INTERCALATION À L'ADN.

Dans cette famille entre également des agents de réticulation étant utilisés en médecine comme le cisplatine et ses dérivées (Carboplatine, Oxaliplatine et le Nedaplatine). Ces composés vont réticuler les bases puriques et induire une déformation locale du double brin d'ADN. Seules des variations de leurs niveaux de toxicité et de leurs biodispositions les différencient.¹⁰⁸

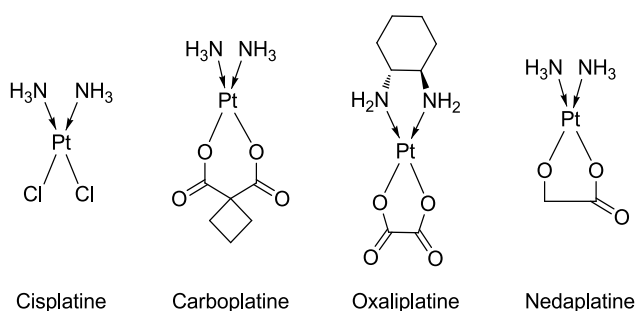


FIGURE 43 STRUCTURES D'AGENTS RÉTICULANTS DES BASES PURIQUES DE L'ADN À BASE DE PLATINE.

Il existe ainsi un grand nombre d'interaction possible ADN-ligand et un grand nombre de ligands, possédant des caractéristiques bien spécifiques permettant ainsi de les classer :

- Par famille de composés.
- Par mode de liaison avec l'ADN.
- Par séquence d'ADN ciblée.
- Par origine (produit naturel ou synthétique)
- Par type d'application, comme l'imagerie ou la thérapie.

Dans la suite de cette partie, quelques ligands représentatifs seront présentés et ces derniers seront classés par séquence ADN ciblée.

1.5.2. LES LIGANDS

De nombreux composés peuvent se lier à l'ADN et sont souvent utilisés en tant qu'anti-tumorale, en bouleversant le fonctionnement métabolique de la cellule, ou comme agent de visualisation de l'ADN. Par exemple, la nétropsine (Figure 44) s'associe au petit sillon des zones riches en AT et intervient dans l'inhibition de l'étape de transcription.

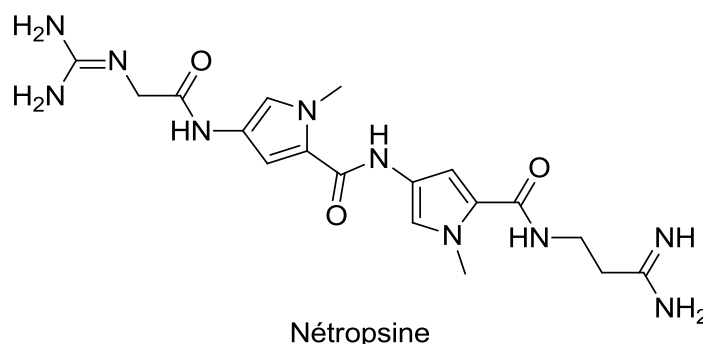


FIGURE 44 STRUCTURE DE LA NÉTROPSINE

1.5.2.1. LE GRAND SILLON DE L'ADN

Les composés s'associant au grand sillon de l'ADN sont relativement rares et la majorité d'entre eux sont des protéines ou des composés qui doivent être suffisamment imposants pour pouvoir interagir avec ce sillon.

1.5.2.1.1. AFLATOXINE

Les aflatoxines sont des mycotoxines produites par les champignons du genre *Aspergillus*, apparaissant généralement dans les lieux de stockages céréaliers (Figure 45). La contamination de ces stocks de céréales peut entraîner des problèmes de santé publique s'ils

ont été consommés. Ces toxines ont la particularité de se lier aux grands sillons de l'ADN riches en guanine et causent des cancers du foie.¹⁰⁹

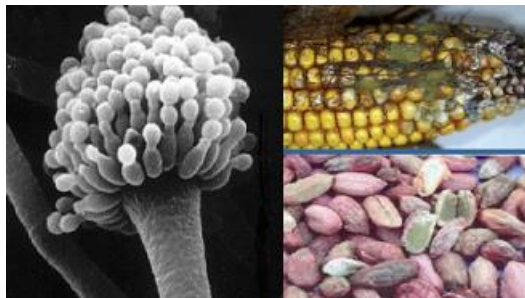


FIGURE 45 ASPERGILUS FLAVIUS ET SA CONTAMINATION DE GRAINES

Ces aflatoxines auront la possibilité de s'oxyder au niveau de la double liaison entre les carbones C8 et C9, formant un époxyde sur lequel va réagir l'azote en position 7 de la guanine (Figure 46).^{110,111} Cette addition nucléophile va entraîner une élimination spontanée de la guanine ou une ouverture du cycle imidazole.^{111,112} Ces modifications induiront des mutations au niveau du gène *p53* qui intervient dans le cycle cellulaire et dans la signalisation de l'apoptose.¹⁰⁹

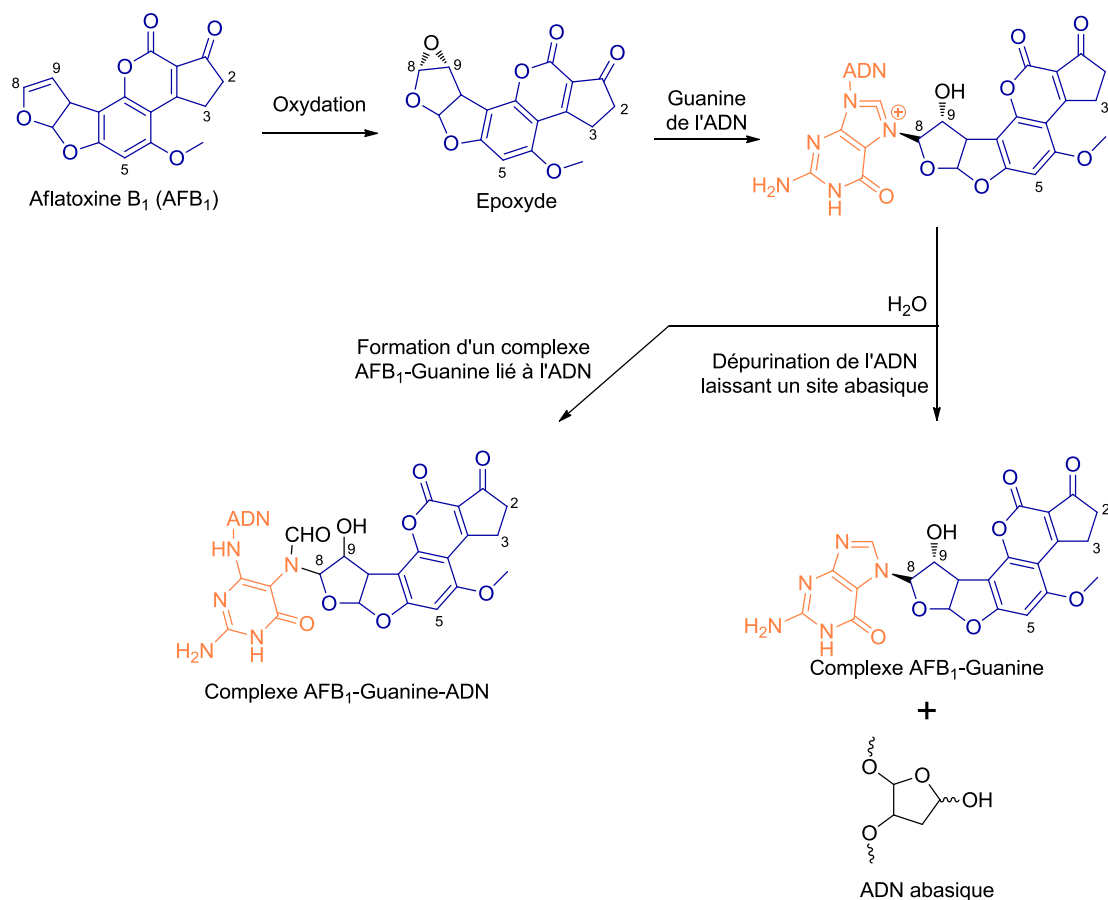


FIGURE 46 MÉCANISME D'ACTION DE L'AFLATOXINE AVEC LA GUANINE.

Sur la Figure 47, l'aflatoxine B₁ est localisée dans le grand sillon et liée à une guanine, occupant ainsi l'espace entre les paires de bases.

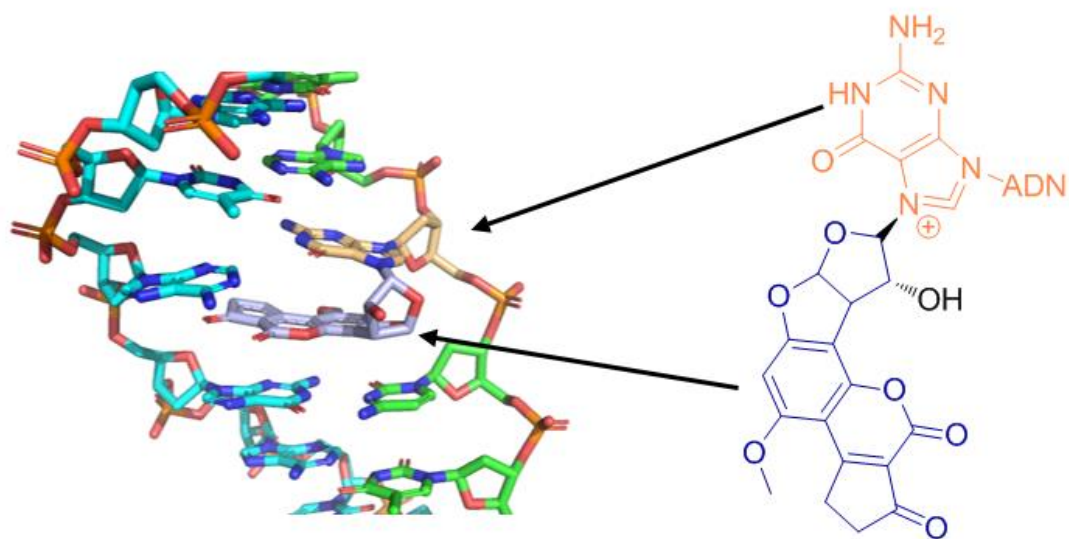


FIGURE 47 COMPLEXE AFB1-GUANINE EN JAUNE ET BLEU CLAIR. (PDB : 1MK6)

Les aflatoxines posent un problème socio-économique mais surtout un véritable souci de santé publique. Leur détection et leur élimination font parties des défis importants de l'OMS. C'est pour cela que certains laboratoires s'attèlent à développer des outils de détection^{113,114} et d'élimination^{115,116} de ces toxines.

1.5.2.1.2. AZINOMYCINES

Les azinomycines sont biosynthétisées par des bactéries de la famille des *Streptomyces*.¹¹⁷⁻¹²¹ Ces composés contiennent une fonction époxyde et une fonction aziridino-pyrrolidine pouvant réagir avec les bases de l'ADN. L'azinomycine dispose d'une affinité pour les grands sillons de l'ADN et va pouvoir se lier de façon covalente en formant un pont entre les deux brins d'ADN (Figure 48).

Ce pontage entre brins sera effectué par addition nucléophile de l'azote N7 des résidus guanine sur le carbone C10 de l'aziridine. Une seconde addition nucléophile est réalisée sur le carbone C21 de l'époxyde¹¹⁷⁻¹²¹, conduisant à la liaison des deux brins d'ADN. Cette addition nucléophile peut également avoir lieu avec l'azote N3 de l'adénine (Figure 48).¹¹⁷

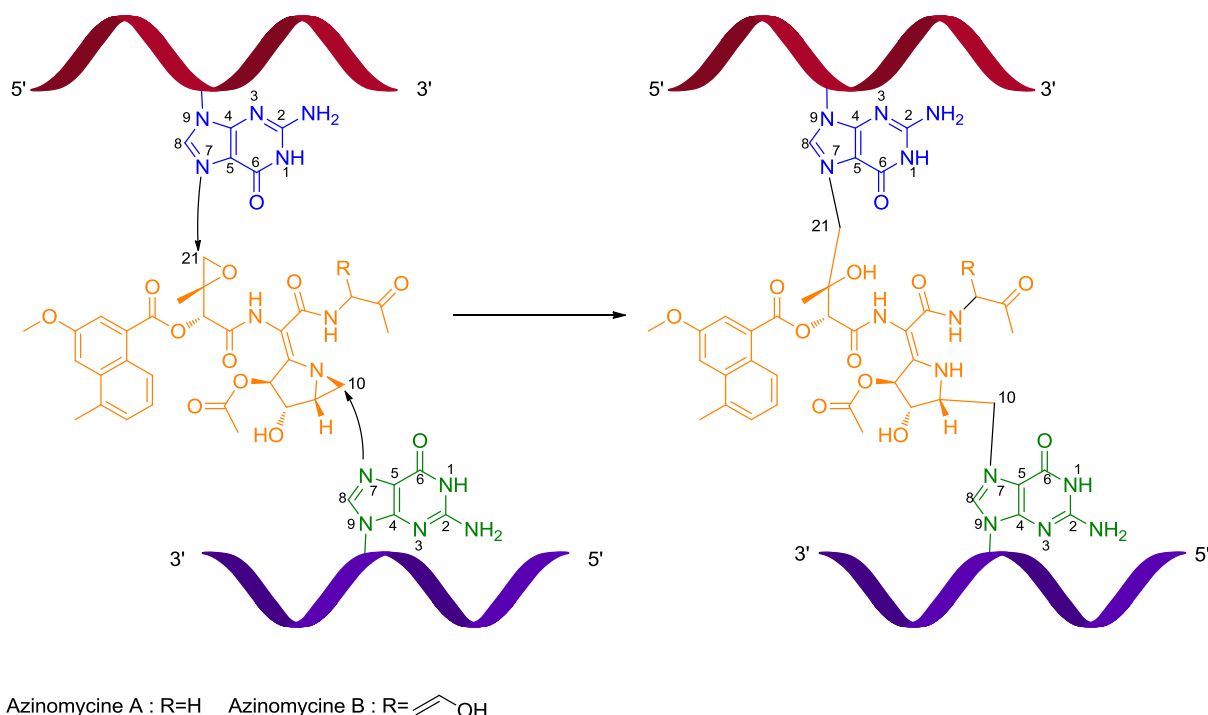


FIGURE 48 STRUCTURE DES AZINOMYCINES A ET B. MÉCANISME DE LIAISON COVALENTE AVEC L'ADN, ICI SUR UN RÉSIDU GUANINE EN BLEU ET ADÉNINE EN VERT.

Le pontage de l'ADN va rigidifier sa structure et empêcher le déroulement de la double hélice d'ADN (normalement associée par liaisons hydrogène) perturbant ainsi les phénomènes de réplication ainsi que de transcription.¹¹⁷⁻¹²¹

Ce composé a montré une activité contre les leucémies et le carcinome d'Ehrlich, mais son instabilité dans la cellule conduit les chercheurs vers la synthèse d'analogues.^{122,123}

1.5.2.1.3. NEOCARZINOSTATINE

La neocarzinostatine est une macromolécule isolée de *Streptomyces carzinostaticus* en 1965 (Figure 49).¹²⁴ Elle est composée d'une partie protéique la neocarzinostatine et d'un chromophore du même nom faisant partie de la famille des enediynes liés de façon non covalente à sa protéine ($K_d = 10^{-10}$ M).¹¹⁷ Par la suite, l'utilisation du mot neocarzinostatine concernera le chromophore représenté ci-dessous (Figure 49).

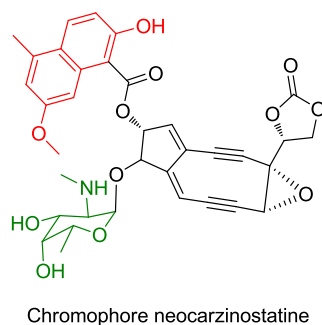


FIGURE 49 STRUCTURE DE LA NEOCARZINOSTATINE.

La neocarzinostatine est très sensible à la lumière¹²⁴, à la chaleur¹²⁵, aux bases¹²⁶ et aux nucléophiles¹²⁷ à cause du noyau epoxybicyclo[7,3,0]dodecadienediène^{117,127,128} qui génère facilement des espèces radicalaires. La présence de l'amino-sucre (en vert sur la Figure 49) va permettre à la neocarzinostatine d'approcher au niveau des grands sillons riches en AT¹²⁹ de l'ADN par affinité pour les groupements phosphates. Le noyau naphthoate (en rouge sur la Figure 49), quant à lui, va s'intercaler entre les paires de bases d'ADN (Figure 50).^{117,127-129}

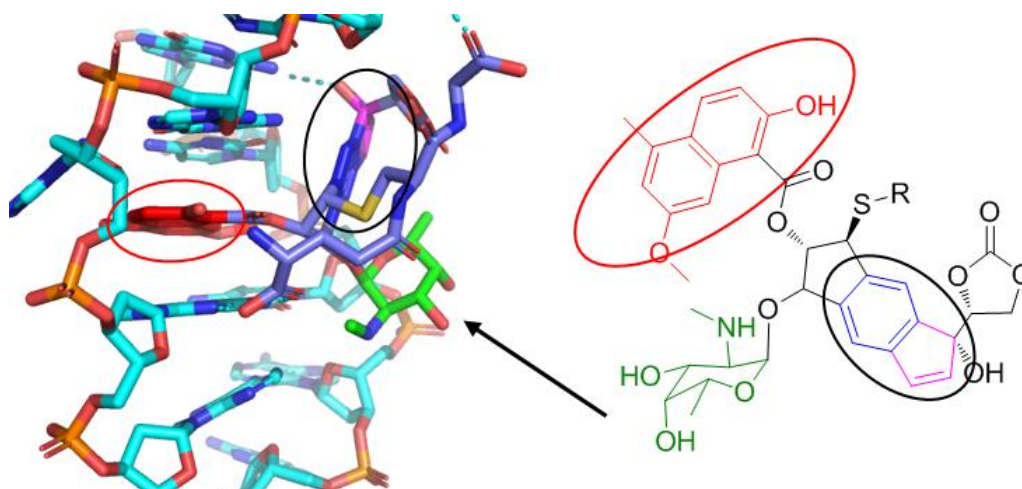


FIGURE 50 NÉOCARZINOSTATINE INSÉRÉE DANS L'ADN. LE GROUPEMENT NAPHTOATE EN ROUGE EST INTERCALÉ ENTRE LES PAIRES DE BASES ET LE RESTE DE LA MOLÉCULE EST PRÉSENT DANS LE GRAND SILLON DE L'ADN. (PDB : 1MP7)

La formation de l'espèce radicalaire peut être initiée par l'addition nucléophile d'un groupement thiol (Figure 51). Celle-ci aura lieu sur le carbone C12 et va permettre l'ouverture de la fonction époxyde en formant un cumulène. Par la suite, une cyclisation de type Bergmann entre les carbones C3 et C7 a lieu, laissant deux radicaux libres sur les carbones C2 et C6.^{117,127,129}

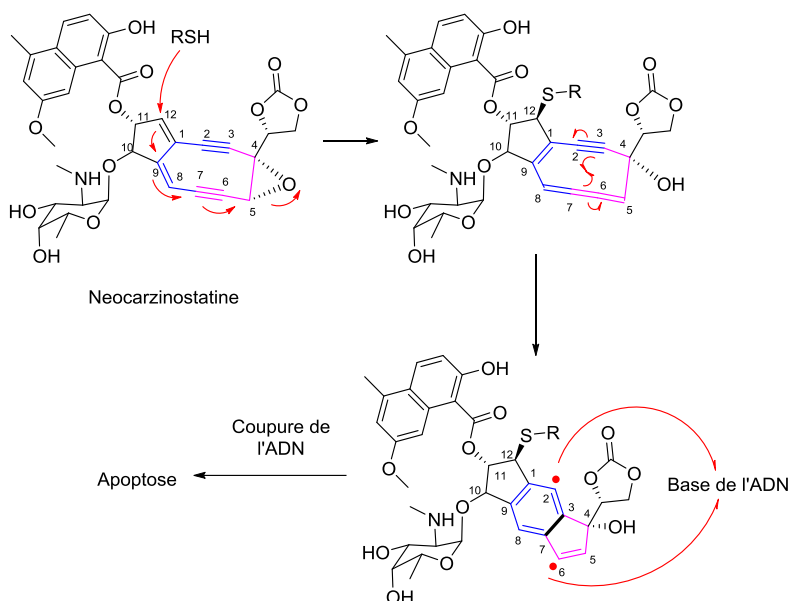


FIGURE 51 MÉCANISME DE FORMATION DE L'ESPÈCE RADICALAIRE DE LA NEOCARZINOSTATINE.

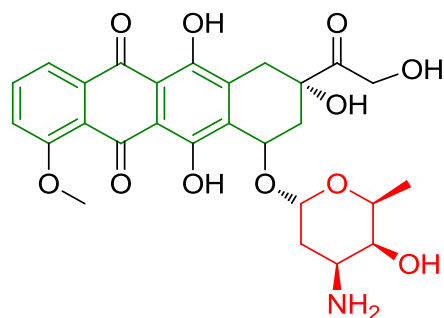
Ces radicaux pourront ensuite piéger les hydrogènes présents sur le squelette de l'ADN et induire une cascade radicalaire. Cette cascade va conduire finalement à la cassure du brin par décomposition de la base.^{117,129}

1.5.2.2. LES INTERCALANTS

Les intercalants sont une famille de molécules modifiant légèrement la structure de l'ADN en s'insérant entre ses paires de bases.

1.5.2.2.1. DOXORUBICINE

La doxorubicine fait partie de la famille des anthracyclines et a été isolée de *Streptomyces peucetius* (Figure 52). Ce composé a montré une efficacité dans le traitement des leucémies et lymphomes mais également des sarcomes osseux. Cependant, malgré sa présence dans la liste des médicaments essentiels de l'OMS, son utilisation est limitée à cause de la nécessité d'une multi-thérapie afin d'améliorer son efficacité mais également par la présence d'effets secondaires indésirables et peu compris.¹³⁰



Doxorubicine

FIGURE 52 STRUCTURE DE LA DOXORUBICINE.

La doxorubicine (en vert foncé et rouge dans la Figure 53) va s'intercaler au niveau des paires de bases *via* des interactions de types π stacking grâce à son noyau polycyclique (en vert sur la Figure 52).^{117,130} Le cycle pyrane (en rouge sur la Figure 52) va, quant à lui, s'insérer et interagir avec le sillon de l'ADN, augmentant la stabilité du complexe.

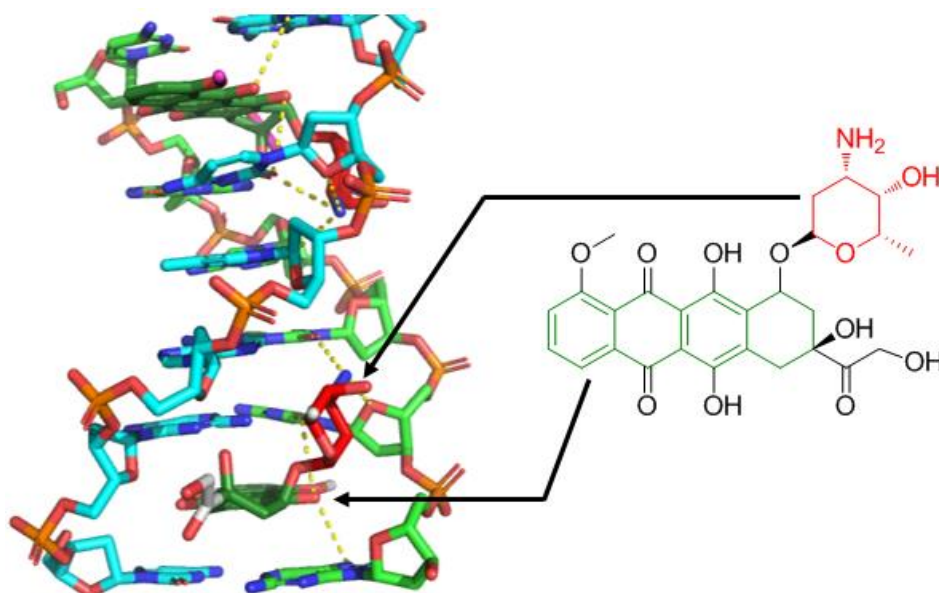


FIGURE 53 DEUX MOLÉCULES DE DOXORUBICINES INTERAGISSANT AVEC L'ADN. LE POLYCYCLE EN VERT EST BIEN INTERCALÉ ENTRE LES PAIRES DE BASES ET LE CYCLE PYRANIQUE DANS LE SILLON DE L'ADN. (PDB : 215D)

En se liant de cette façon à l'ADN, la doxorubicine va empêcher la progression de la topoisomérase II et stopper le phénomène de réplication.¹³⁰

1.5.2.2.2. CAMPTOTHÉCINE

La camptothécine est un alcaloïde pentacyclique plan incluant un motif pyrroloquinoline conjugué à une pyridone et une hydroxy-lactone. Ce composé est une molécule naturelle provenant de l'écorce d'un arbre du sud de la Chine, le *Camptotheca*

acuminata^{131–134}, et était utilisé en médecine chinoise traditionnelle comme remède contre le cancer (Figure 54).¹³⁴

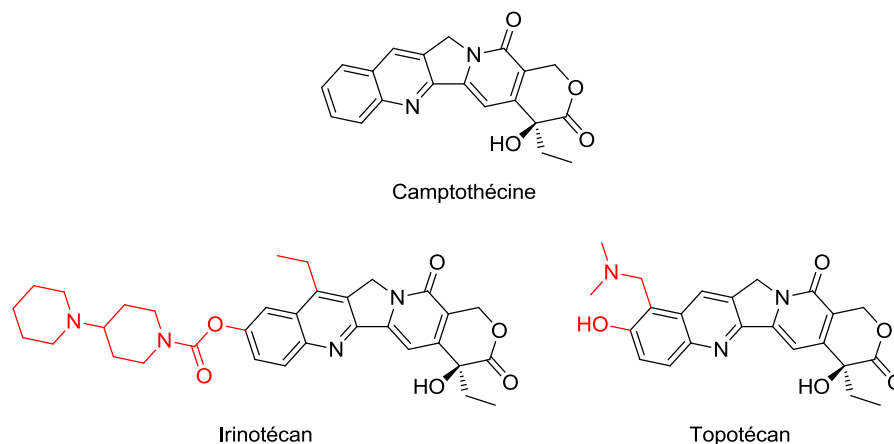


FIGURE 54 LA CAMPTOTHÉCINE ET SES ANALOGUES ANTI-TUMORALES.

La camptothécine va s'intercaler au niveau des paires de bases pendant la réplication de l'ADN, où la topoisomérase intervient, et former une liaison phosphodiester irréversible avec l'ADN.^{131–133} Ceci aura pour conséquence de bloquer la fourche de réplication, par formation d'un complexe ternaire camptothécine-ADN-Topoisomérase très stable. Une cassure non réparable par les complexes protéiques est alors générée et va induire l'apoptose de la cellule (Figure 55).^{131–133}

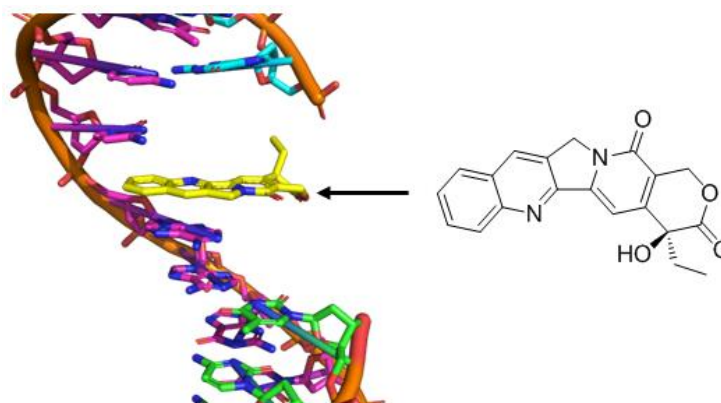


FIGURE 55 CAMPTOTHÉCINE (EN JAUNE) INTERCALÉE DANS L'ADN AVEC UNE CASSURE DU BRIN CRÉANT TROIS BRINS D'ADN (ROSE, BLEU ET VERT). (PDB : 1T8I)

La topoisomérase est surexprimée dans les cellules cancéreuses et est donc une cible thérapeutique pertinente. Cependant la camptothécine est trop toxique pour être utilisée en tant que médicament. Les chimistes se sont donc inspirés de cette molécule naturelle pour synthétiser des analogues moins toxiques et possibles à utiliser dans la lutte contre le cancer : l'irinotecan et le topotecan (Figure 54).

1.5.2.2.3. BROMURE D'ÉTHIDIUM

Le bromure d'éthidium est un composé synthétique développé dans les années 1950 pour lutter contre les trypanosomoses bovines (maladie parasitaire).¹³⁵ Cependant il s'est avéré que ce composé pouvait marquer l'ADN par fluorescence sur gel d'électrophorèse, ce pourquoi il est principalement utilisé en génomique (Figure 56).

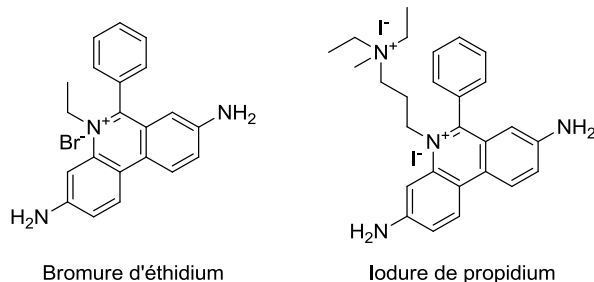


FIGURE 56 BROMURE D'ÉTHIDIUM ET SON SUBSTITUT L'IODURE DE PROPIDIUM.

Le bromure d'éthidium est composé d'un noyau phénanthridinium substitué par deux fonctions amines (Figure 57).¹³⁶ Ce composé a la faculté de s'intercaler aux niveaux des paires de bases de l'ADN grâce aux interactions de type électrostatiques, de π stacking et de liaisons hydrogène entre les fonctions amines et les groupements phosphates du brin d'ADN.¹³⁶

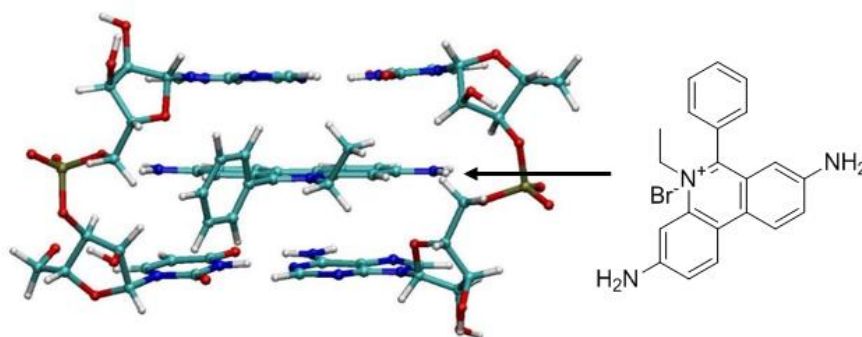


FIGURE 57 INTERCALATION DU BROMURE D'ÉTHIDIUM DANS L'ADN.

Le bromure d'éthidium va bloquer la réplication et la transcription en gênant stériquement la liaison des complexes protéiques (Figure 58).^{135,136}

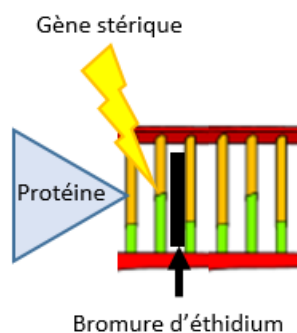


FIGURE 58 EXEMPLE DE GÈNE STÉRIQUE PROVOQUÉ PAR LE BROMURE D'ÉTHIDIUM. (ICI UNE HÉLICASE NE POUVANT PAS DÉROULER LE DOUBLE BRIN D'ADN).

Ce fluorophore sous excitation à 520 nm émet dans le proche-infrarouge à 600 nm (rouge-orangé), faisant de ce composé un excellent fluorophore pour des applications en imagerie. En effet, son émission de fluorescence est présente dans la fenêtre idéale pour l'observation *in vivo*, en s'affranchissant de l'auto-fluorescence des tissus. Le bromure d'éthidium lié à l'ADN présente une fluorescence exacerbée par la rigidité apportée par les paires de bases (π stackings du noyau phénatridinium). De plus une inhibition de fluorescence a lieu en présence de molécules d'eau. Inhibition disparaissant une fois le composé situé dans l'environnement hydrophobe apporté par l'ADN.¹³⁷

Ces propriétés d'intercalation font de lui un composé cancérigène. Il est substitué par un composé ayant des propriétés similaires, l'iodure de propidium ($\lambda_{ex}=535$ nm, $\lambda_{em}=617$ nm) (Figure 56). Ce dernier est moins cancérigène de par sa plus grande difficulté à passer la membrane cellulaire.

1.5.2.3. LE PETIT SILLON DE L'ADN

Les molécules affines pour les petits sillons de l'ADN vont généralement posséder plusieurs types d'interactions à la fois : interactions électrostatiques, interactions de Van der Waals (avec le squelette phosphate de l'ADN) et formations de liaisons hydrogène avec l'azote N3 des adénines et l'oxygène O2 de la thymine.

1.5.2.3.1. DUOCARMYCINE ET SES DÉRIVÉS

La duocarmycine est une molécule naturelle issue de la famille des *Streptomyces* (Figure 59).¹³⁸ Cette molécule et ses dérivés sont neutres et ont une affinité pour les petits sillons de l'ADN.¹³⁹

La famille des duocarmycines dispose de deux motifs clés : le premier est un noyau cyclopropano-pyrrolo-indole pouvant subir une addition nucléophile de l'azote N3 de l'adénine, le second est un noyau indole-2-carbonyle s'insérant dans le petit sillon des zones riches en AT de l'ADN (Figure 59).^{138–140}

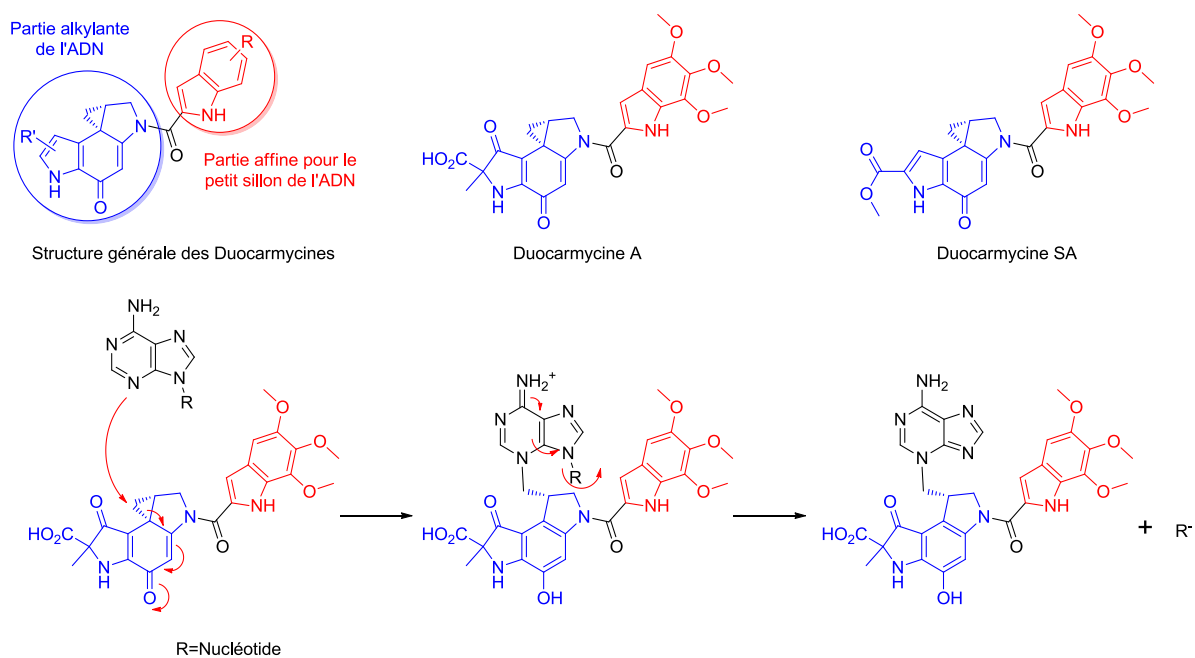


FIGURE 59 STRUCTURE GÉNÉRALE DE LA FAMILLE DES DUOCARMYCINES, LA DUOCARMYCINE A ET SON MÉCANISME D'INTERCALATION.

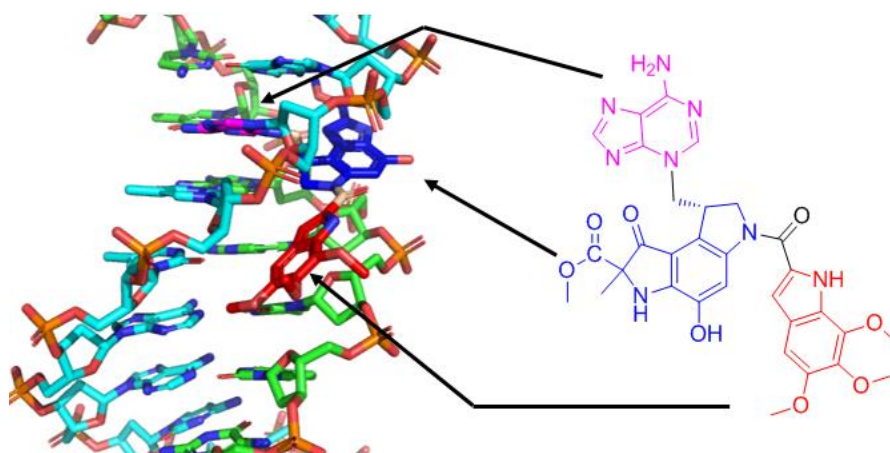


FIGURE 60 DUOCARMYCINE SA LIÉE À UN RÉSIDU ADÉNINE EN ROSE INSÉRÉE DANS LE PETIT SILLON DE L'ADN. LA PARTIE INDOLE EN ROUGE EST LOGÉE DANS LE SILLON DE L'ADN TANDIS QUE LE NOYAU TRICYCLIQUE EN BLEU S'INTERCALE DANS L'ADN. (PDB : 1DSA)

La dépurination résultant de l'addition de la duocarmycine sur l'ADN va entraîner une altération de sa structure, conduisant à l'apoptose de la cellule.^{139,140}

La duocarmycine, contrairement à d'autres anti-tumoraux, va pouvoir agir à n'importe quel moment du cycle cellulaire.¹³⁹ Forts de ces observations, les chercheurs ont mis au point des analogues de la duocarmycine dans le but d'obtenir des composés ayant de meilleures propriétés thérapeutiques (Figure 61).^{141,142}

Le composé CC-1065 isolé de *Streptomyces zelensis*¹⁶ présente une structure comparable à la duocarmycine (présence d'un groupement cyclopropanoindolone).

Sa réactivité au niveau de l'azote N3 de l'adénine sera identique à la duocarmycine (Figure 59), mais contrairement à cette dernière, les dépurinations de l'ADN seront rares du fait de la stabilité de l'adduit adénine-CC-1065.¹⁶ Il faut ajouter à cela que ce composé présente de plus faibles risques mutagéniques que la duocarmycine.¹⁶ Cependant, malgré son bon potentiel anti-tumorale, il s'est avéré que ce composé retardait la mort cellulaire et qu'il était fortement hépatotoxique, limitant ainsi son utilisation.¹⁶

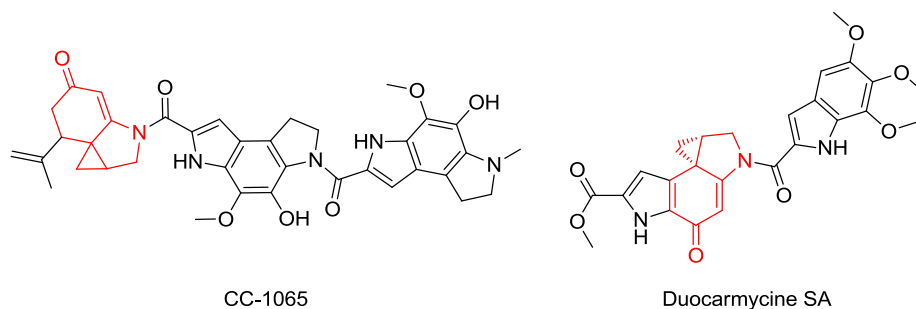


FIGURE 61 STRUCTURES DU CC-1065 ET DE LA DUOCARMYCINE SA.

Des analogues du composé CC-1065 ont été élaborés et sont prometteurs. D'une manière générale, il a été observé que la présence de groupements électro-donneurs (sur la fonction benzoyle) et d'un site électrophile (ou d'un halogène sur la carzelesin) vont favoriser l'addition nucléophile de l'adénine sur le ligand. C'est la vitesse de cette alkylation qui va déterminer l'activité anti-cancéreuse du composé.¹⁶

Parmi ces analogues prometteurs se trouvent l'adozelesine et la carzelesin (Figure 62). Le premier présente un meilleur recouvrement du sillon de l'ADN, tandis que le second a une meilleure affinité pour les zones riches en AT.¹⁴¹

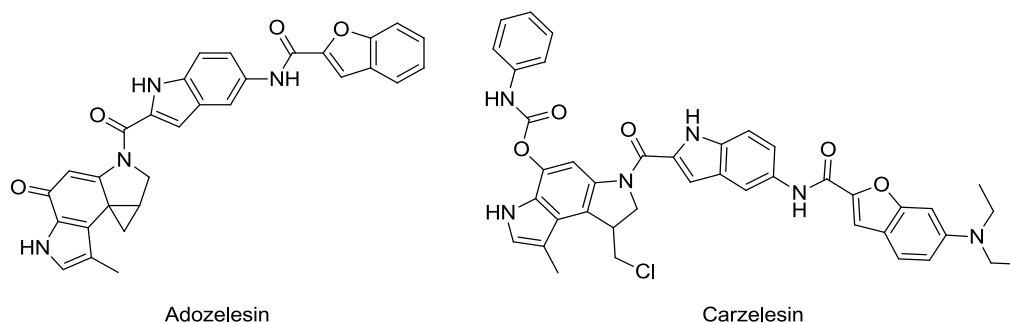


FIGURE 62 ANALOGUES DE LA DUOCARMYCINE

Ces composés sont entrés en phase clinique mais se sont révélés d'une étonnante toxicité pour la moelle osseuse, contraignant les patients à arrêter le traitement.¹³⁹

1.5.2.3.2. DIARYLAMIDINES

Les composés de la famille des diarylamidines possèdent une affinité pour les séquences riches en adénine et thymine et ont été utilisés dans le traitement de protozoose (infection de protozoaire) comme la leishmaniose et la trypanosomose. Ces composés sont facilement protonables et sont donc des ligands cationiques. Dans cette famille se trouvent par exemple le DAPI (4',6'-Diamidino-2-phénylindole), la pentamidine ou encore le berenil (Figure 63).

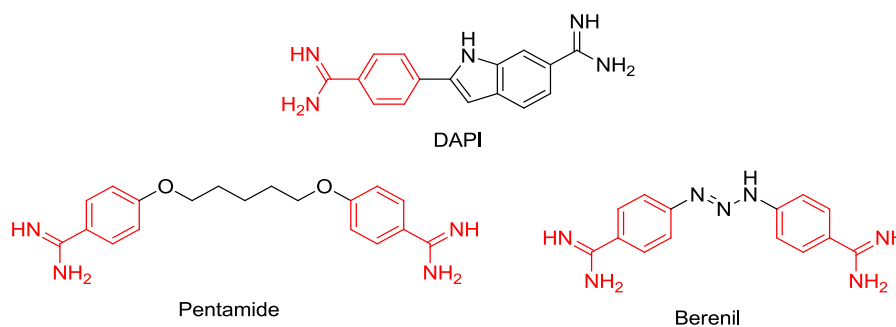


FIGURE 63 EXEMPLES DE STRUCTURES DE COMPOSÉS DE LA FAMILLE DES DIARYLAMIDINES (STRUCTURES NON SALIFIÉES).

Le DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindole) va s'insérer dans les séquences d'un minimum de trois paires de bases consécutives en AT au niveau de ses petits sillons.^{143,144} Toutefois, si ces paires de bases ne se suivent pas, le DAPI pourra se lier à l'ADN en s'intercalant entre les paires de bases.^{143,145} Cette insertion dans le petit sillon de l'ADN peut s'effectuer grâce à l'étroite interaction entre le DAPI et la fonction amine présente sur l'adénine (Figure 64).¹⁴³ Il s'agit donc ici d'un effet de concentration.

Cette affinité est de plus améliorée grâce :¹⁴³

- À la planéité du composé.
- Au potentiel électronégatif plus fort des petits sillons riches en AT.
- À la gêne stérique moindre dans ces sillons riches en AT, due à l'absence du groupement amine de la guanine, permettant une insertion plus profonde dans le sillon.
- À la faculté d'ajustement de sa conformation à la topologie du sillon par rotation de la liaison aryl-aryl.

Ces interactions avec l'ADN ont fait du DAPI une molécule utilisée contre les protozooses par sa propriété à bloquer la topoisomérase I (enzyme intervenant dans la réplication et la transcription).¹⁴⁶ Cependant, son activité biologique étant relativement faible comparée à certains de ses analogues (comme le berenil et la pentamidine), le DAPI est plus communément utilisé pour marquer l'ADN sur gel d'électrophorèse ou dans la cellule (puisque'il traverse facilement les membranes). En effet, une fois en interaction avec l'ADN, la fluorescence émise par le DAPI est décalée à 526 nm, alors que nativement, son émission de fluorescence est de 455 nm (pour une longueur d'onde d'excitation de 345 nm).¹⁴³

Ce fluorophore peut être utilisé en cytométrie en flux (technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de cellules marquées suspendues dans un liquide) pour quantifier l'ADN.^{142,147} Il peut également servir d'agent de visualisation des zones riches en AT de l'ADN (par sa faculté à marquer spécifiquement ces zones) ou de l'ADN en général s'il est utilisé à forte concentration (par sa faculté à s'intercaler entre les bases d'ADN) (Figure 64).¹⁴³

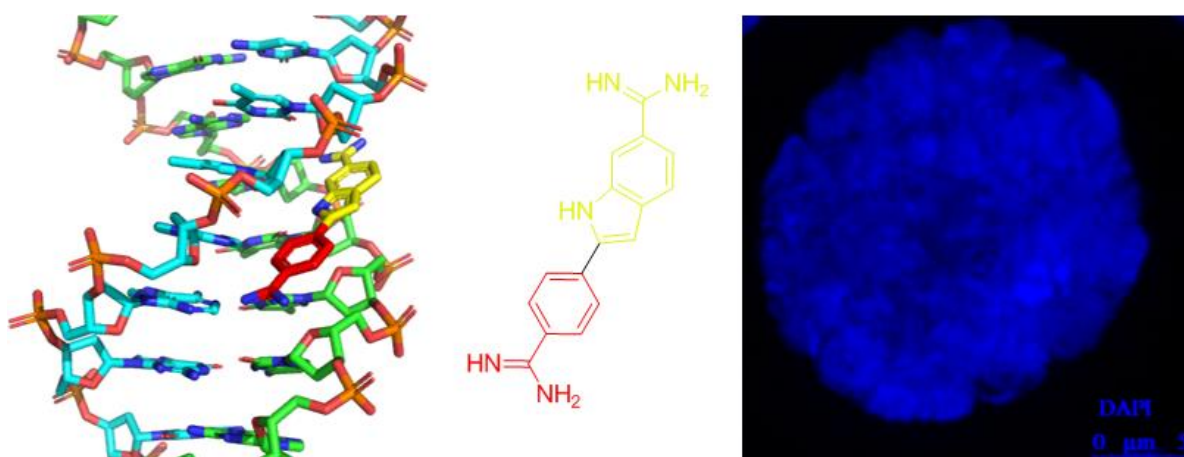


FIGURE 64 DAPI INSÉRÉ DANS UNE SÉQUENCE RICHE EN AT À GAUCHE (PDB : 1D30) ET CELLULE DE GLANDE SALIVAIRE MARQUÉE AU DAPI À DROITE.

Le berenil (Figure 63, p80), possédant une structure proche du DAPI, est utilisé en tant qu'anti-trypanosomose. Il a la faculté d'inhiber les topoisomérases (enzymes intervenant notamment dans la réplication et la transcription) des cellules eucaryotes, mais aussi d'inhiber sélectivement les topoisomérases II des mitochondries présentes dans les agents infectieux de la trypanosomose.^{148,149} Le berenil peut également bloquer l'initiation de la transcription en perturbant la liaison de la protéine MBP-1 à la TBP.¹⁵⁰

Le berenil se lie aux petits sillons de l'ADN riches en adénine et thymine par interaction électrostatique.¹⁴³ Il a de plus la faculté, une fois les sites AT occupés, de s'intercaler dans les séquences riches en GC par interactions de Van der Waals¹⁴³ grâce à sa forme concave épousant parfaitement les sillons de l'ADN (Figure 65).¹⁵¹

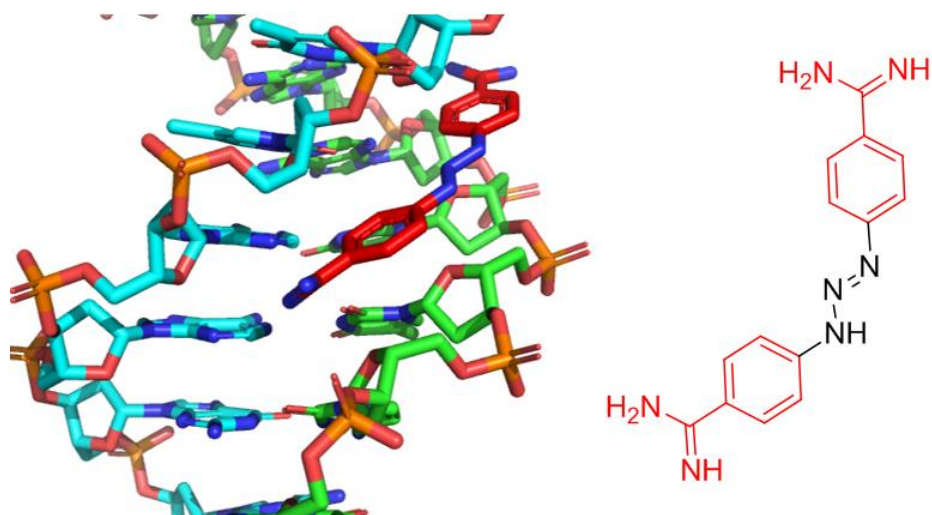


FIGURE 65 INSERTION DU BERENIL DANS UNE SÉQUENCE RICHE EN AT DE L'ADN. (PDB : 2GVR)

La pentamidine (Figure 63, p80) va s'insérer dans une suite de quatre à cinq paires de bases en formant des liaisons hydrogène entre ses groupements amidiniums et l'azote en position 3 de l'adénine ou l'oxygène en position 2 de la thymine (Figure 66).¹⁴³

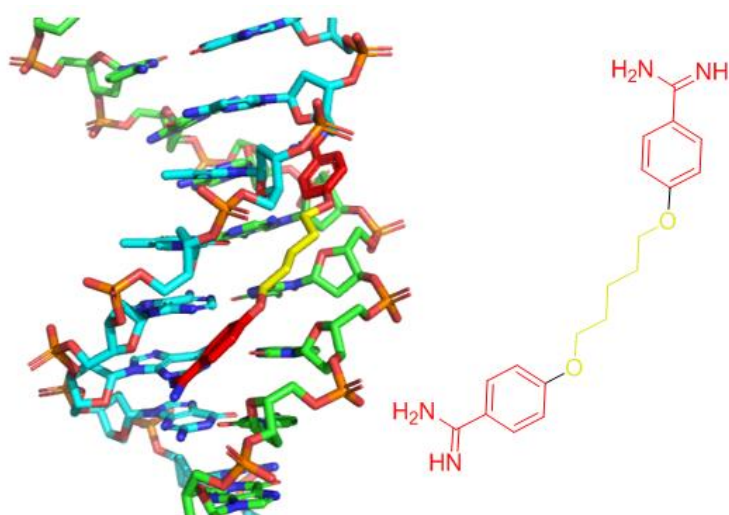


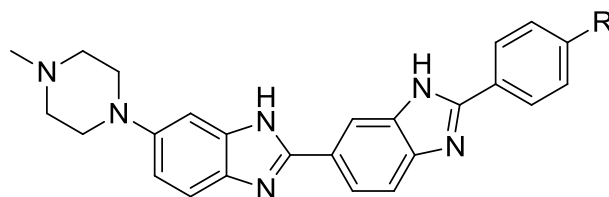
FIGURE 66 INSERTION DE LA PENTAMIDINE DANS UNE SÉQUENCE RICHE EN AT DE L'ADN. (PDB : 1PRP)

Bien que le mécanisme d'action de la pentamidine ne soit pas connu, elle semble avoir une action négative sur la réplication, la transcription et la traduction.¹⁵²

1.5.2.3.3. LA FAMILLE HOECHST, BIS-BENZIMIDAZOLE

La famille des Hoechst (dont le leader est le Hoechst 33258) (Figure 67) est une famille synthétique de sondes fluorescentes possédant une partie bis-benzimidazole. Ces composés ont une affinité pour les petits sillons contenant 4 à 5 paires de bases consensus en AT de l'ADN.^{142,143,153,154} Cependant, comme le DAPI, le Hoechst a la possibilité de s'intercaler entre

les paires de bases de l'ADN quand l'insertion dans le petit sillon est impossible, c'est notamment le cas dans les zones riches en GC (Figure 68).^{143,155}



Hoechst 33258 : R= —OH

Hoechst 33342 : R= —CH₂CH₃

Hoechst 34580 : R= —N(CH₃)₂

FIGURE 67 HOECHST 33258 ET SES ANALOGUES COMMUNÉMENT UTILISÉS.

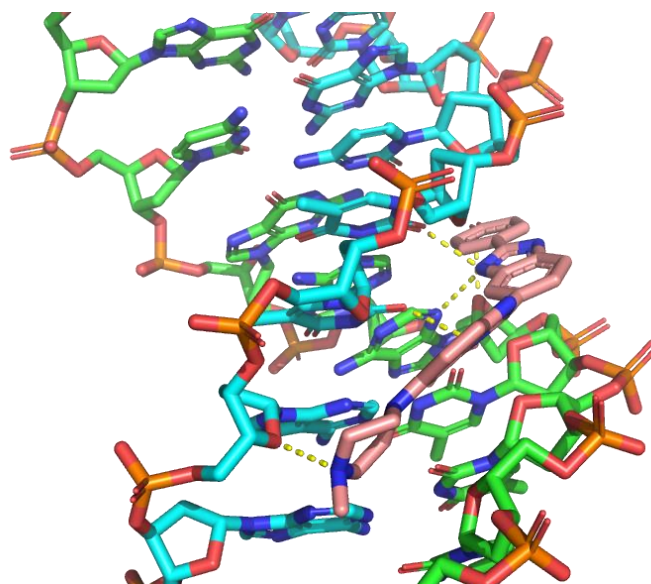


FIGURE 68 LE HOECHST 33258 EN ROSE INSÉRÉ DANS UN SILLON RICHE EN AT, LE CYCLE PIPÉRAZINIQUE POINTANT VERS NOUS. (PDB : 1DNH)

La famille des Hoechst inhibe certaines topoisomérases et hélicases. Cependant le mécanisme d'action n'est à ce jour pas connu. De plus, l'initiation de la transcription est perturbée par cette famille de composés. Ils sont capables de bloquer l'action de l'ARN polymérase de type II par altération du site de liaison de la boîte TATA ou par dégradation de la TBP, en libérant les facteurs de transcription liés à TFIID.^{16,142,143,154,156,157}

Mais, tout comme le DAPI, la famille des Hoechst est plus connue pour sa capacité à fluorescer en présence d'ADN. La longueur d'onde d'excitation de cette famille se situe à 352 nm pour Hoechst 33258 et à 392 nm pour Hoechst 34580, avec des longueurs d'ondes

d'émissions sensiblement similaires (461 nm pour le dérivé 33258 et 440 nm pour le dérivé 34580) (Figure 69).

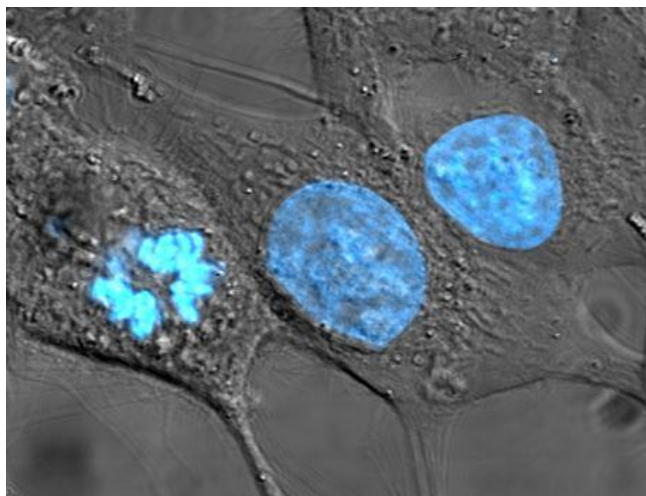


FIGURE 69 FLUORESCENCE DE L'ADN DE CELLULE HELa (LIGNÉE DE CELLULES CANCÉREUSES) GRÂCE À HOECHST 33258.

Ces bis-benzimidazoles marqueront à faible concentration les zones riches en AT de l'ADN et le marqueront de façon globale à plus haute concentration, exactement comme le DAPI.

Les sondes Hoechst peuvent aussi être utilisées comme co-marqueur de cellule. En effet leurs longueurs d'ondes d'excitation et d'émission ne recouvrent pas celles des autres fluorophores couramment utilisés dans le vert-rouge, comme l'iodure de propidium ($\lambda_{\text{ex}}=530$ nm, $\lambda_{\text{em}}=620$ nm) ou la 6-carboxyfluoresceine succinimidyl ester (CFSE) utilisés pour révéler les éléments du cytosol ($\lambda_{\text{ex}}=496$ nm, $\lambda_{\text{em}}=516$ nm) (Figure 70).¹⁵⁸

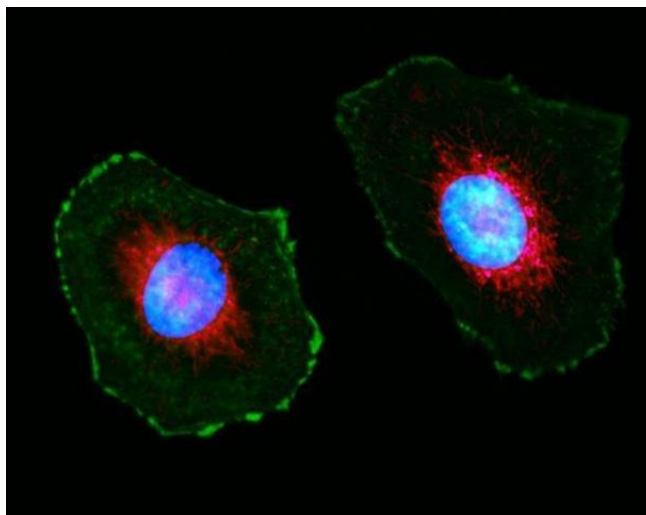


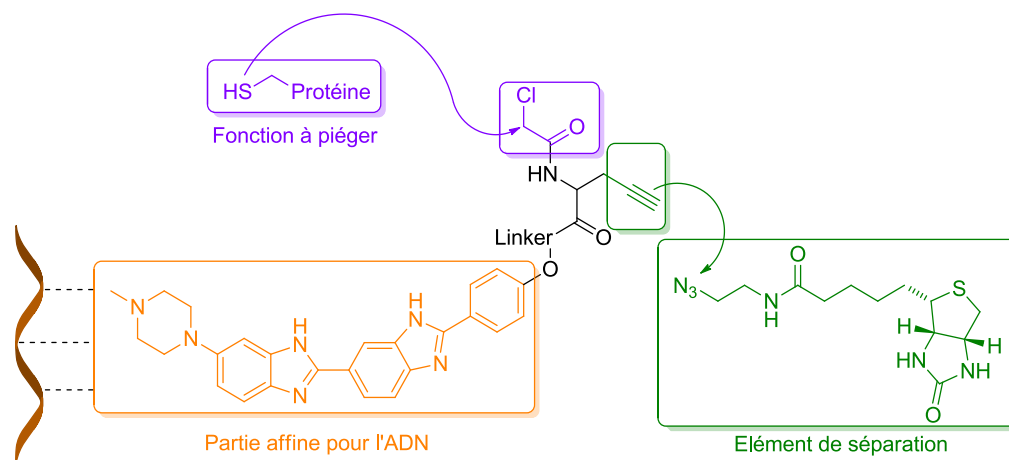
FIGURE 70 EXEMPLE DE CO-MARQUAGE D'UNE CELLULE AVEC EN BLEU LE HOECHST 33258 MARQUANT LE NOYAU, EN VERT LE TALIN-GFP MARQUANT LE CYTOSQUELETTE ET EN ROUGE UN MARQUEUR DE MITOCHONDRIE (THERMOFISCHER).

Elles sont également utilisées pour visualiser la distribution des composés destinés à interagir avec l'ADN afin de vérifier si la cible a bien été atteinte.¹⁵⁸

Mais ce fluorophore peut être également fonctionnalisé et servir de sonde plus complexe, comme celle récemment élaborée en parallèle de nos travaux, en 2016 par l'équipe du docteur Hamachi.¹⁵⁹

Cette sonde représentée en Figure 71 est modifiée sur la base du composé Hoechst 33258 (en orange sur la Figure 71)¹⁵⁹ en incorporant une fonction chloroacétyle (en mauve sur la Figure 71). Cette sonde a pour but de piéger les protéines disposant d'une fonction thiol (résidus cystéines) grâce à la fonction chloroacétyle, et ce dans le noyau, grâce aux propriétés du Hoescht 33258 (Figure 71). La fonction alcyne (en vert) va servir d'agent de séparation par réaction de CuAAC avec une biotine modifiée par un groupement azoture. Les tests effectués avec cette sonde ont montré qu'une fluorescence négligeable émanait du cytosol, et que 87

% des protéines piégées analysées provenaient du noyau, avec une grande majorité d'histone.¹⁵⁹



Hoechst 33258 modifié

FIGURE 71 SCHÉMA DE CONSTRUCTION DE LA SONDE DE L'ÉQUIPE DU DOCTEUR HAMACHI.

1.5.2.3.4. LES TRIPHÉNYLAMINES

De nombreux ligands synthétiques ont ainsi vu le jour, comme ceux développés par l'équipe du docteur Teulade-Fichou qui a mis au point une série de ligands basés sur le noyau triphénylamine présentant une affinité pour l'ADN et fluorescent une fois lié à l'ADN.^{160–163}

Ces ligands sont basés sur un motif permettant d'engendrer un effet push-pull entre un groupement donneur D et un groupement accepteur A passant au travers d'un système π conjugué. Cet accepteur A est en général un groupement cationique. Une fois liées à l'ADN, ces sondes voient leur fluorescence exacerbée (Figure 72).

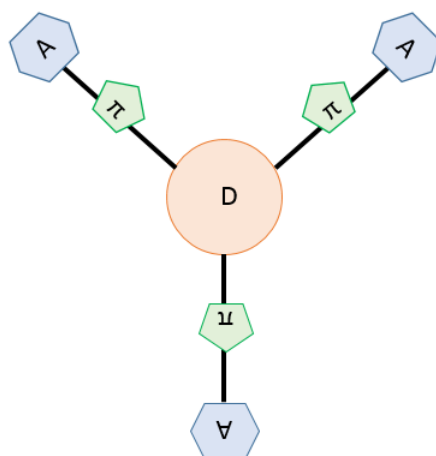


FIGURE 72 MOTIF GÉNÉRAL DES SONDAS DE L'ÉQUIPE DU DOCTEUR TEULADE-FICHOU (A : ACCÉPTEUR, π : SYSTÈME π , D : DONNEUR).

La première série de ligands mise au point par l'équipe du docteur Teulade-Fichou est composée d'un noyau triphénylamine comme groupement donneur qui est connu pour émettre dans le proche infra-rouge,^{164–167} d'un groupement vinyle comme système π conjugué, et de noyaux pyridiniums ou benzimidazoliums comme accepteur (Figure 72).^{161,163}

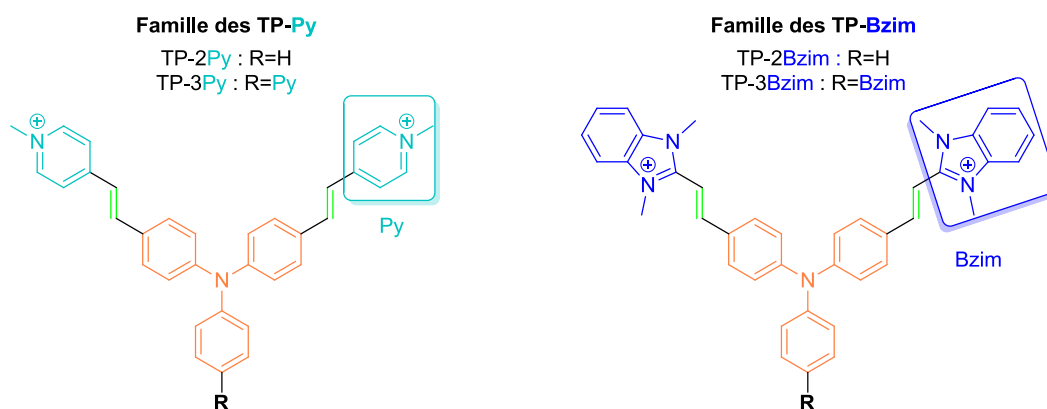


FIGURE 73 PREMIÈRE SÉRIE DE LIGANDS BASÉS SUR LE NOYAU TRIPHÉNYLAMINE.

Des études de docking sur ces familles de composés ont montré que la présence d'un troisième bras était non nécessaire, tout simplement car ce dernier pointe vers l'extérieur de la double hélice d'ADN (Figure 74).^{161,163}

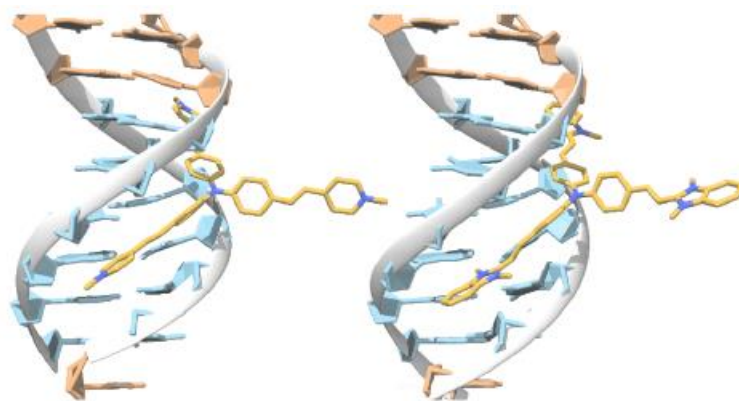


FIGURE 74 TP-3PY À GAUCHE ET TP-3BZIM À DROITE INSÉRÉ DANS UN SILLON DE L'ADN. LE TROISIÈME BRAS POINTE VERS L'EXTÉRIEUR.

D'un point de vue physico-chimique, il s'est avéré que ces deux familles de composés émettaient une fluorescence une fois insérées dans le sillon de l'ADN, et avec une affinité accrue pour les séquences riches en AT. Mais malgré ces caractéristiques communes, la famille des TP-BZim se révèle être un ligand plus intéressant.

En effet, cette famille possède une plus forte affinité pour ces séquences de l'ADN (faible K_D), mais également un effet de fluorescence dit « off/on ». Comme les données le montrent sur le Tableau 2, ces composés auront une exaltation de fluorescence beaucoup plus faible en solution (voir quasiment nulle), alors qu'elle sera fortement exacerbée une fois liés à l'ADN, offrant ainsi un excellent rapport signal sur bruit (Tableau 2).^{161,163}

		$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	Φ_f	K_D (μM)
TP-2Py	Solution	474/650	<0,005	0,80
	ADN AT riche	509/656	0,07	
TP-3Py	Solution	474/684	<0,005	0,23
	ADN AT riche	499/684	0,01	
TP-2BZim	Solution	432/620	<0,005	0,09
	ADN AT riche	476/585	0,54	
TP-3BZim	Solution	430/640	<0,05	0,01
	ADN AT riche	468/591	0,34	

TABEAU 2 RÉCAPITULATIF DES DONNÉES SPECTRALES (RÉFÉRENCE RHODAMINE 101 DANS L'ÉTHANOL) ET CONSTANTES D'AFFINITÉ (K_D) POUR LES ZONES RICHES EN AT DE LA PREMIÈRE SÉRIE DE LIGANDS.

Le meilleur de ces ligands (le TP-2Bzim) a ainsi été testé en marquage cellulaire et comparé à deux standards, le TO-PRO3 et l'iodure de propidium (PI). Comme constaté sur la Figure 75, aucune fluorescence du TP-2Bzim n'est émise dans le cytosol contrairement à ce qui est observé avec l'iodure de propidium (PI). De plus, sa photo-stabilité est relativement bonne dans le temps comparée au TO-PRO-3 (Figure 75).^{161,163}

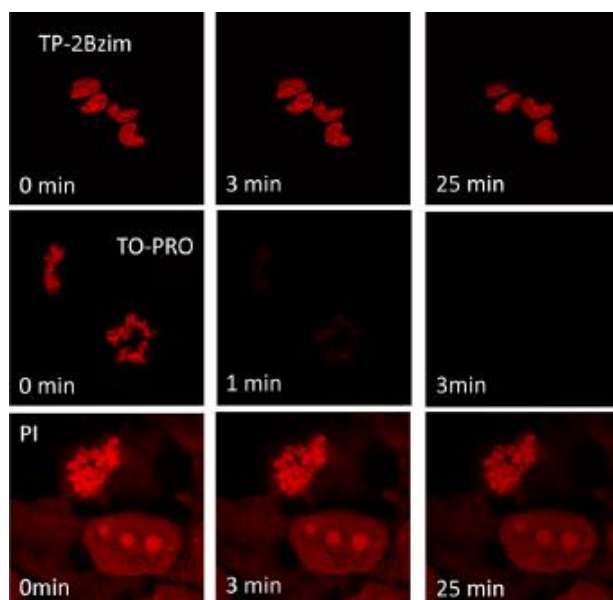


FIGURE 75 MARQUAGE DE CELLULES MRC-5 AVEC 2 μ M DE TP-2BZIM, 2 μ M DE TO-PRO ET 2 μ M DE PI (IODURE DE PROPIDIUM).

L'équipe du docteur Teulade-Fichou a ainsi élaboré un ligand à forte affinité pour les séquences riche en AT et dont la fluorescence n'est présente qu'une fois lié à l'ADN.

Les ligands de l'ADN, qu'ils se lient aux zones riches en AT ou non, qu'ils aient une affinité pour le petit sillon, le grand sillon, ou s'intercalent entre les paires de bases, chacun d'entre eux aura une influence sur le métabolisme cellulaire. Certains seront utilisés comme agents thérapeutiques comme le berenil, les dérivés du CC-1065 ou la doxorubicine. D'autres comme les aflatoxines sont susceptibles de causer des drames sanitaires contre lesquels les scientifiques cherchent des solutions. Enfin, d'autres sont utilisés comme outils d'imagerie de l'ADN comme le DAPI, le Hoechst et les sondes basées sur le squelette de la triphénylamine. Ce sont ces derniers ligands, voués à l'analyse, qui sont à la base de ce travail de thèse.

Parmi ces ligands, ceux ne disposant d'aucune sélectivité pour des séquences particulières de l'ADN comme l'iodure de propidium ne sont pas pertinents puisqu'une spécificité pour les séquences riches en AT sera recherchée par la suite. Le DAPI et le Hoechst possédant une spécificité pour ces zones à faible concentration, ont malheureusement la possibilité de s'intercaler entre les paires de bases de l'ADN, et marquer n'importe quelles séquences à plus forte concentration.

Au contraire, les différentes sondes développées par l'équipe du docteur Teulade-Fichou sont intéressantes. En effet, leur caractère fluorescent uniquement présent une fois lié à l'ADN et leur spécificité pour les zones riches en AT de l'ADN, font de ces composés des excellents candidats à l'élaboration de sondes polyfonctionnelles visant ces zones de l'ADN.

1.6. CONCLUSION

L'ADN est le centre névralgique de la cellule, il commande tous les phénomènes métaboliques de façon directe (réplication et synthèse d'ARN), mais aussi de façon indirecte (synthèse protéique). Ce sont d'ailleurs ces mêmes protéines (connues comme inconnues) qui vont venir réguler et contrôler ces phénomènes métaboliques mentionnés précédemment.

Néanmoins, il subsiste au niveau de cette macromolécule des zones dites « à risques » permettant la bonne réalisation de ces fonctions, comme les G-quadruplex et les zones riches en AT présents dans les zones clefs du métabolisme. De nombreuses protéines y sont associées, dont le rôle et la structure sont pour la plupart encore inconnus, et vont interagir avec l'ADN en contrôlant les processus de réplication, transcription et traduction.

Cependant, des mutations ainsi que d'autres problèmes peuvent survenir et empêcher le bon déroulement de ces phénomènes. Ceci induit des erreurs conduisant à une altération des fonctions cellulaires et pouvant entraîner la mort cellulaire et de nombreuses pathologies.

L'élaboration de sonde visant à étudier ces zones à risques et leurs environnements protéiques est donc une priorité et deux options s'offrent aux scientifiques, en fonction des connaissances dont ils disposent sur le couple séquence/protéine :

- Soit l'élaboration de sondes permettant d'étudier la structure de l'ADN.

- Soit l'élaboration de sondes permettant d'étudier les protéines liées à ces zones de l'ADN.

C'est autour de cette seconde thématique que s'articulent ces travaux de recherche, à savoir le développement d'une sonde se liant aux zones riches en adénine et thymine de l'ADN afin de piéger les molécules étant aux voisinages de ces mêmes zones.

1.7. VERS UNE NOUVELLE SONDE POLYFONCTIONNELLE.

Dans le cadre de ce projet, nous nous intéressons à la synthèse de sondes destinées à l'analyse de protéines liées aux zones à risques de l'ADN.

L'intérêt porté aux G-quadruplex, aux séquences riches en AT et à l'environnement protéique est grandissant et de nombreuses méthodes voient le jour afin de mieux comprendre le fonctionnement de certains phénomènes métaboliques qui leurs sont liés. La plupart de ces méthodes nécessitent la formation de liaisons covalentes spécifiques impliquant de piéger le substrat à l'ADN par des stratégies de cross-linking chimique ou photochimique.^{168–170}

Une autre approche peut être envisagée en utilisant des sondes polyfonctionnelles dont la conception repose sur une association judicieuse de partenaires. La plupart de ces sondes disposent de deux éléments fonctionnels (Figure 76) :

- Une partie affine pour l'ADN, s'inspirant d'un ligand développé par notre collaborateur de l'équipe du docteur Teulade-Fichou à l'Institut Curie, basé sur une triphénylamine.
- Une partie permettant de piéger les protéines, qui ne possédera non pas une fonction chloroacétyl comme la sonde de l'équipe d'Hamachi (pour piéger **irréversiblement** les fonctions thiols des cystéines, p86, Figure 71), mais qui possédera un analogue de l'epicoconone. Ce composé a la faculté de piéger les amines libres des résidus lysine de façon **réversible** et appartient à la famille des azaphilones, famille étant devenue une spécialité de l'équipe du docteur Franck à l'université de Rouen.

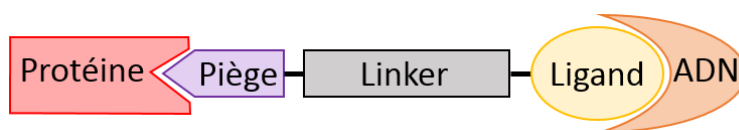


FIGURE 76 SCHÉMA GÉNÉRAL DE SONDE DESTINÉE À PIÉGER DES ÉLÉMENTS PRÉSENTS DANS DES ZONES D'INTÉRÊTS.

C'est dans cette optique que ces travaux de thèse s'inscrivent, c'est-à-dire concevoir, synthétiser et évaluer, une sonde permettant de piéger de façon non spécifique toutes les protéines liées aux séquences riches en AT de l'ADN.

L'élaboration de cette sonde contenant deux parties fonctionnelles repose sur le savoir-faire de deux laboratoires différents. Le premier laboratoire est spécialisé dans la synthèse de piège à protéine inspiré de l'epicoconone et se situe à Rouen au COBRA dans l'équipe du docteur Franck. Le second laboratoire est spécialisé dans la synthèse de ligands de séquences riches en AT et de G-quadruplex de l'ADN, situé à Orsay à l'Institut Curie dans l'équipe du docteur Teulade-Fichou.

1.8. CONCEPTION DE LA SONDE

Comme évoqué précédemment, l'objectif de cette thèse est d'élaborer une sonde pouvant à la fois se lier aux séquences riches en AT de l'ADN et piéger les protéines interagissant avec ces zones pour ensuite les analyser.

En se basant sur les critères précédents, la sonde envisagée disposera (Figure 77) :

- D'un piège à protéines : un analogue profluorescent de l'epicoconone développé par l'équipe du docteur Franck.
- D'une partie affine pour les séquences consensus en AT : un analogue du TP-Ox2Py (non-fluorescent) développé par l'équipe du docteur Teulade-Fichou, servant également de vecteur vers l'ADN.

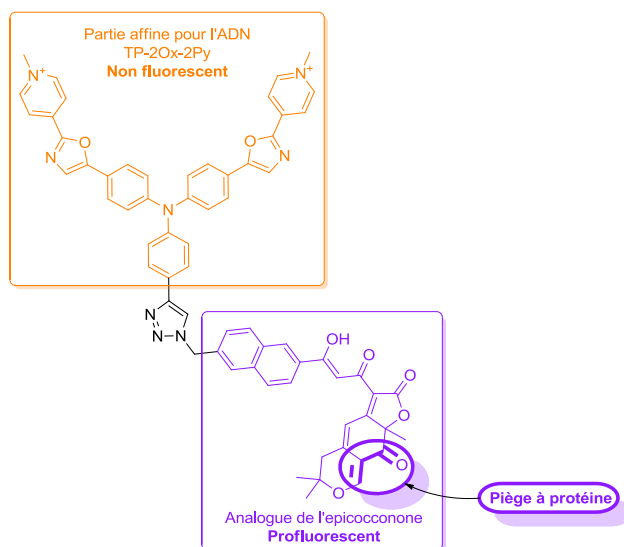


FIGURE 77 STRUCTURE DE LA SONDE ENVISAGÉE.

Ces deux partenaires seront reliés par réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire catalysé au cuivre (CuAAC) déjà étudiée au sein du laboratoire.^{171,172}

La conception d'une telle sonde va permettre l'analyse de protéines selon le principe suivant (Figure 78) :

- Dans un premier temps, il y aura une reconnaissance entre la partie TP-2Ox-2Py de la sonde et les zones riches en AT de l'ADN. (1)
- Puis dans un deuxième temps, les protéines à proximité de la sonde seront piégées par la partie analogue de l'epicoconone, et une émission de fluorescence sera observée. (2)
- Troisièmement, les brins d'ADN seront purifiés et isolés. (3)
- Ensuite les protéines seront libérées en faisant varier le pH de la solution, grâce à la propriété de réversibilité de l'epicoconone. (4)
- Enfin, les protéines libérées seront analysées. (5)

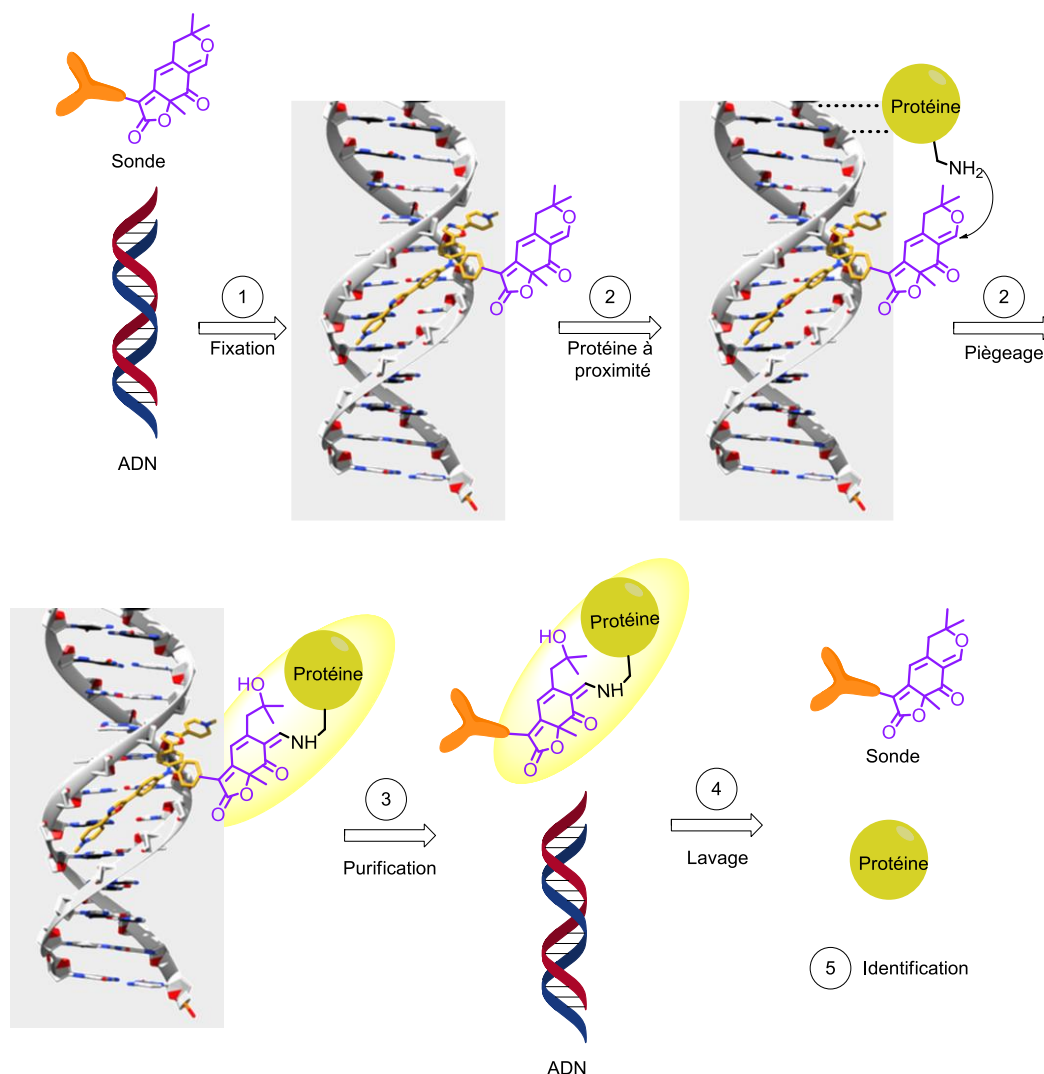


FIGURE 78 PRINCIPE DE LA SONDÉ.

Fort de l'expérience du laboratoire sur les analogues de l'epicoconone (notamment sur sa fragilité abordée plus tard dans ce manuscrit), il a été décidé que la fonction azoture serait portée par ce dernier et donc la fonction alcyne portée par le dérivé non fluorescent TP-2Ox-2Py (Figure 79).

La partie affine pour l'ADN est élaborée en se basant d'une part sur la fonctionnalisation de la triarylamine qui est le savoir-faire de l'équipe du docteur Teulade-Fichou à l'Institut Curie à Orsay. Et d'autre part sur la partie analogue de l'epicoconone qui est une synthèse bien connue au sein de l'équipe du docteur Franck au laboratoire COBRA et est utilisée en routine. Cette dernière fait intervenir une β -céto-dioxinone et un alcool dit « désaromatisé » afin de former le squelette dihydropyranoquinone de l'analogue de l'epicoconone par réaction d'acylfuranonisation (Figure 79).

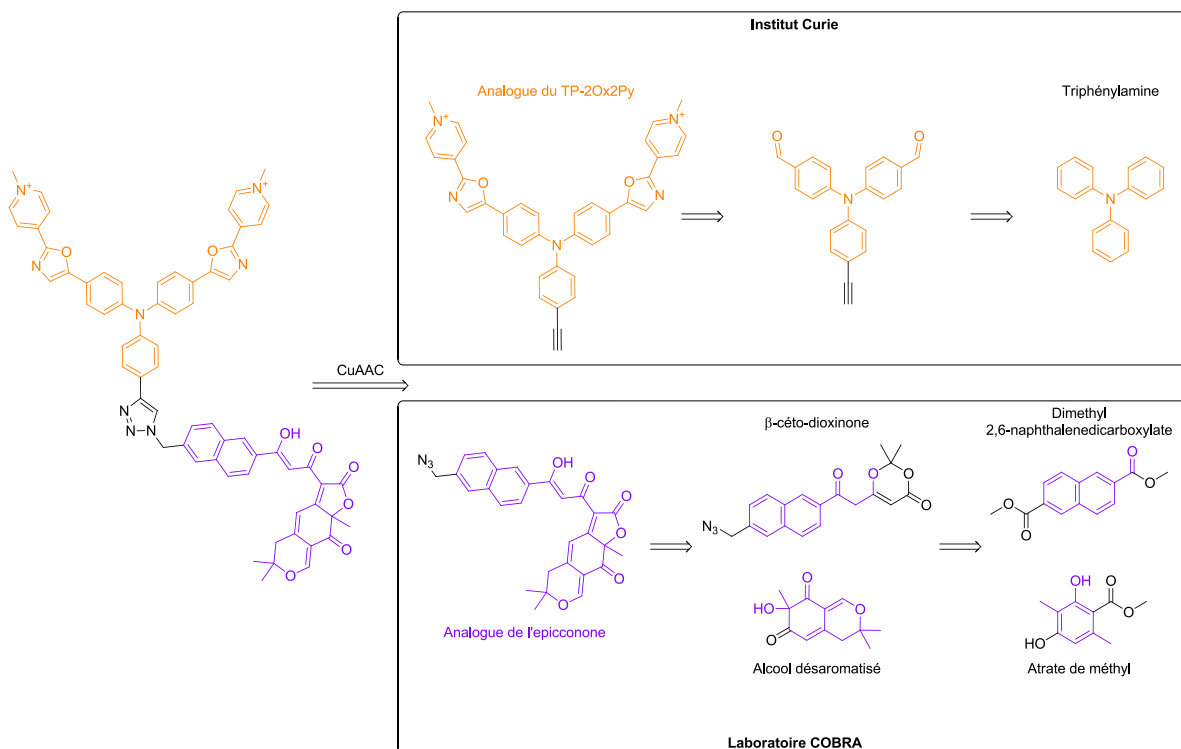


FIGURE 79 ANALYSE RÉTROSYTHÉTIQUE DE LA SONDE ENVISAGÉE.

La synthèse du piège à protéines (l'analogue de l'epicoconone) sera dans un premier temps abordée puis viendra celle du ligand de l'ADN (l'analogue du TP-2Ox-2Py). Une fois ces deux produits synthétisés, la réaction de couplage par la cycloaddition de Huisgen peut être envisagée.

SYNTHÈSE DE LA SONDE POLYFONCTIONNELLE.

2. SYNTHÈSE DE LA SONDE POLYFUNCTIONNELLE.

2.1. LE PIÈGE À PROTÉINE

2.1.1. L'EPICOCCONONE, UNE AZAPHILONE PROFLUORESCENTE PIÉGEANT LES PROTÉINES.

L'équipe du docteur Franck a fait de la chimie des composés azaphiles une spécialité et s'est intéressée à la synthèse de deux produits naturels azaphiles à savoir, la chaetoviridine A et l'epicocconone.

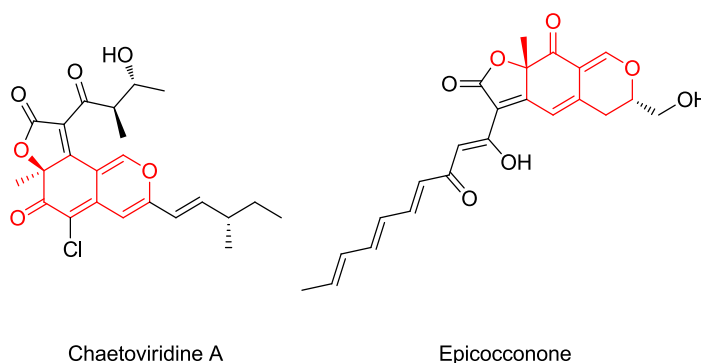


FIGURE 80 STRUCTURE DES COMPOSÉS AZAPHILES ÉTUDIÉS AU LABORATOIRE.

La famille des azaphilones est composée d'environ 400 molécules, dont l'epicocconone et la chaetoviridine A.^{173–175} Ces azaphilones proviennent principalement de champignons terrestres ou aquatiques et sont caractérisées par un noyau bicyclique pyranoquinone ou dihydropyranoquinone.¹⁷⁵ L'alcool présent sur le carbone 7 au niveau de ce cycle est engagé dans différentes fonctions chimiques telles que (Figure 81) :

- Des fonctions esters comme l'acide (-) lunatique A.
- Des fonctions lactones angulaires comme la chaetoviridine A.¹⁷⁶
- Des fonctions lactones linéaires comme l'epicocconone.¹⁷⁵

Ces azaphilones possèdent des activités biologiques variées (antioxydantes, antifongiques, antibactériennes, ...) qui sont dues à leur faculté de réagir avec les amines primaires des protéines. Ainsi, les cycles pyranoniques vont former des dérivés pyridoquinones de façon irréversible comme chez la chaetoviridine A, alors que les cycles dihydropyranoquinones vont former des énamines acycliques de façon réversible, comme chez l'epicocconone (Figure 81).¹⁷⁵

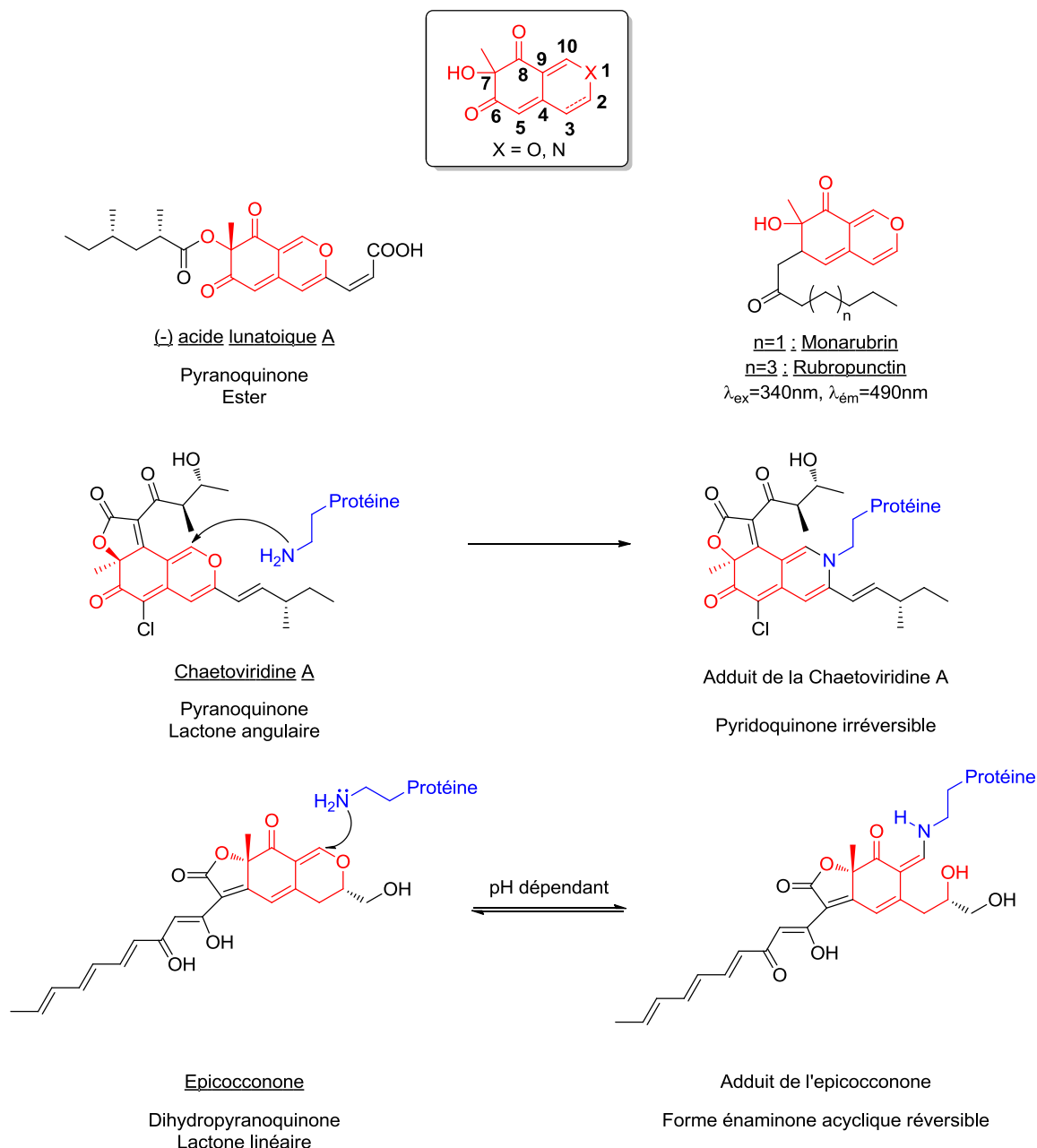


FIGURE 81 NOYAU BICYCLIQUE PYRANOQUINONE (POINTILLÉ) ET DIHYDROPYRANOQUINONE, EPICOCCONONE ET QUELQUES COMPOSÉS NATURELS AZAPHILES.

Parmi les cycles pyraquinones, certains sont fluorescents comme c'est le cas pour la monarubrine et la rupropunctine, qui, sous une excitation de 340 nm émettent à 490 nm pour le cycle pyraquinone de la forme native(Figure 81).¹⁷⁷

Parmi les composés dihydropyraquinones, l'epicocconone a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. Elle a été isolée du champignon *Epicoccum nigrum* par le Professeur Karuso en 2003¹⁷⁸ et est une azaphilone à cœur dihydropyraquinone pro-fluorescente.

Les noyaux dihydropyranoquinones, contrairement aux noyaux pyranoquinones, ont la particularité de former une énaminone acyclique lorsqu'une amine réagit avec la fonction aldéhyde masquée,^{174,179} et ce de façon réversible en fonction du pH. De plus, cette énaminone (aussi appelée forme bioconjuguée) se révèle être fortement fluorescente par rapport à sa forme aldéhyde masquée (aussi appelée forme native), comme le montrent les valeurs de rendement quantique Φ_F (Figure 82).^{173–175} De ce fait, l'epicocconone est un révélateur d'amine pro-fluorescent possédant un effet d'émission de fluorescence « off/on », c'est-à-dire que l'émission de fluorescence n'est présente que lorsqu'une amine réagit avec (Figure 82).

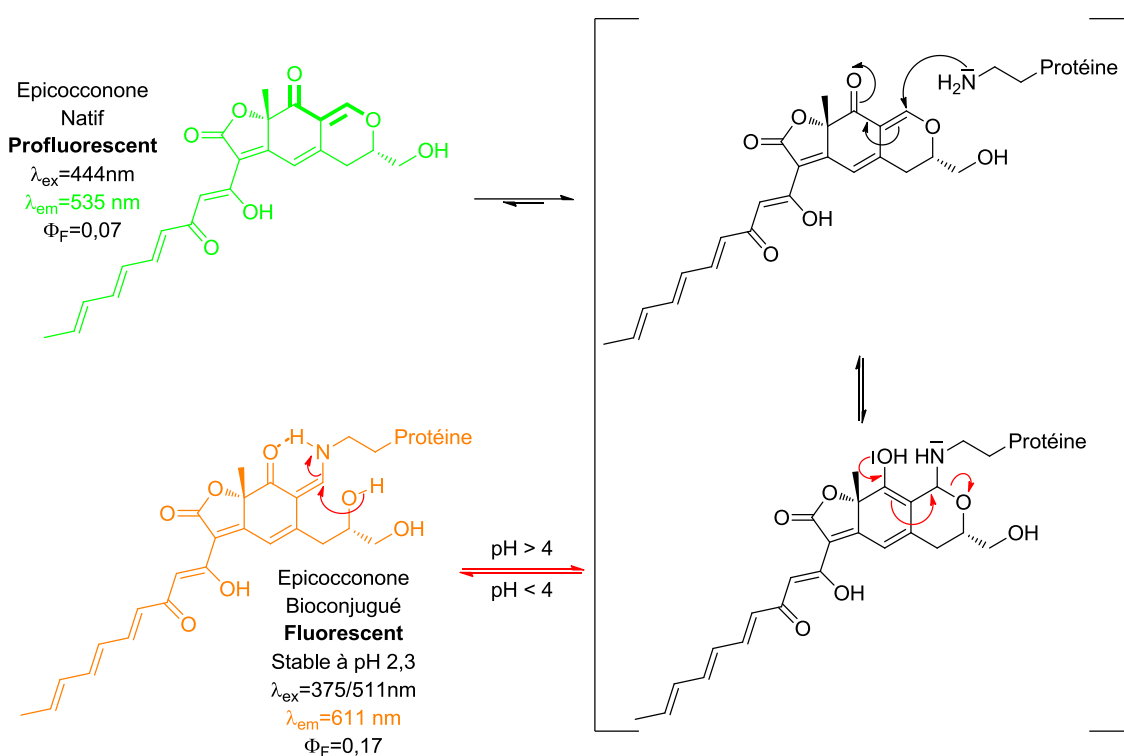


FIGURE 82 L'EPICOCCONONE, SA RÉACTION AVEC LES AMINES PRIMAIRES ET SES FORMES FLUORESCENTES.

De plus, cette énaminone (tout comme sa forme native) possède un déplacement de Stokes d'environ 100 nm vers le proche infra-rouge. Ce large déplacement de Stokes permet d'obtenir une meilleure détection des espèces fluorescentes en empêchant tout risque de neutralisation de l'émission de fluorescence par auto-absorption de l'énergie (Figure 83).

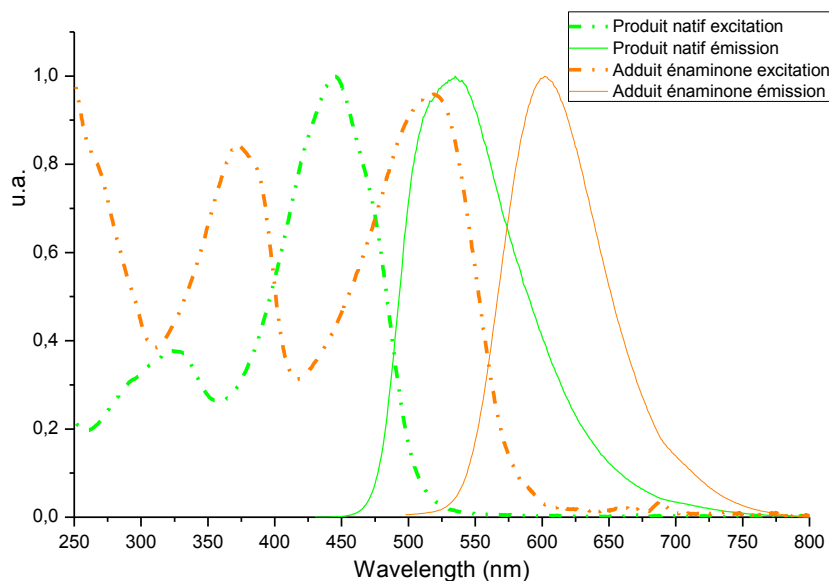


FIGURE 83 COMPORTEMENT SPECTRAL DE L'EPICOCCONONE NATIVE EN VERT ET BIOCONJUGUÉE EN ORANGE (TRAIT POINTILLÉ : LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION. TRAIT PLEIN : LONGUEUR D'ONDE D'ÉMISSION).

La réversibilité de réaction en fonction du pH de l'epicocconone lui confère ainsi une intéressante caractéristique, lui octroyant une place particulière parmi les composés utilisés pour révéler les gels d'électrophorèses. En effet, cette réversibilité va permettre de relarguer la protéine détectée par fluorescence de façon intacte afin de pouvoir l'analyser par spectrométrie de masse après digestion trypsique.

De plus, sa limite de détection sur gel d'électrophorèse, inférieure au nanogramme, rend l'epicocconone plus efficace que certains révélateurs usuellement utilisés comme :

- le SYPRO Ruby® qui est un marqueur non covalent, dont les inconvénients résident dans la succession de lavages nécessaires pour obtenir un bon rapport signal sur bruit et dans l'utilisation de ruthénium.¹⁷⁹
- le nitrate d'argent qui est un marqueur colorimétrique très sensible mais dont le protocole très délicat réduit sa reproductibilité (Figure 84).¹⁷⁹

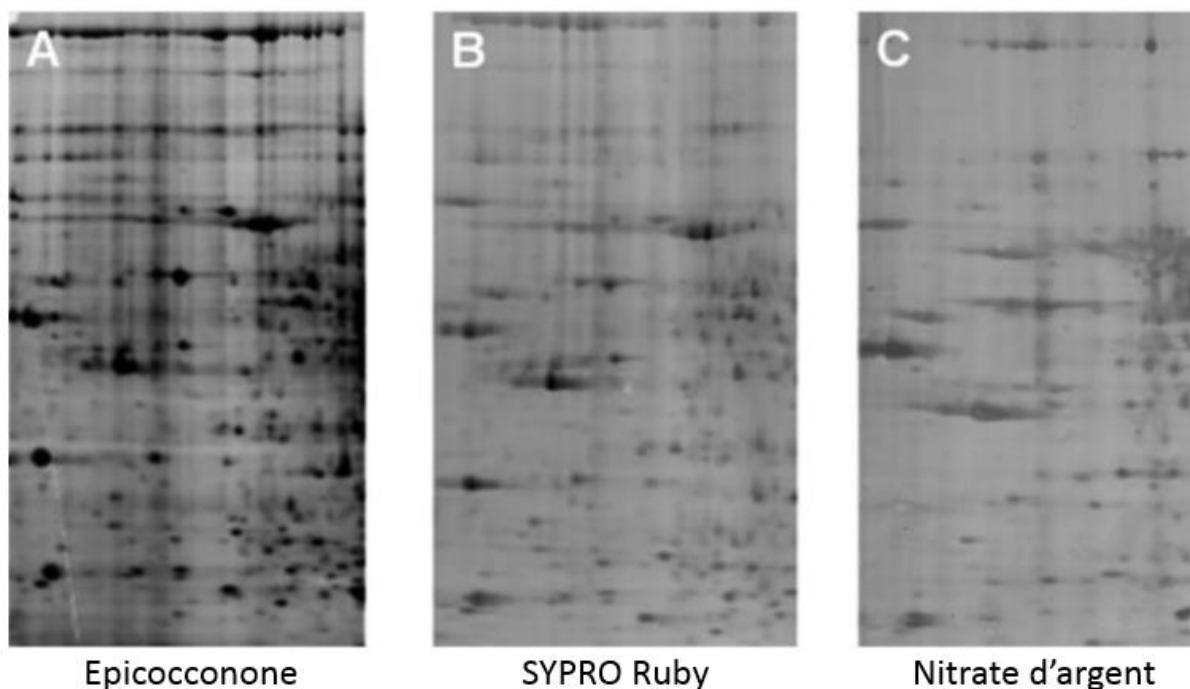


FIGURE 84 COMPARAISONS DE MARQUAGE SUR GEL D'ÉLECTROPHORÈSE DE PROTÉINES SOLUBLES DE SOURIS ENTRE L'EPICOCCONONE, LE SYPRO RUBY ET LE NITRATE D'ARGENT.

Cependant de nombreux inconvénients limitent l'utilisation de l'epicocconone. Le temps de demi-vie faible de la forme énamine (11 minutes) est le principal frein à son utilisation. En effet, un photo-blanchiment rapide est observé sous irradiation UV continue, pouvant entraîner une isomérisation de sa chaîne tri-énique^{180,181} ou la photo-oxydation des fonctions alcools.¹⁸² Cette dégradation de la molécule pourrait également provenir de sa réaction avec l'oxygène singulet généré par l'irradiation UV du composé. Finalement, cette sensibilité ainsi que l'absence de synthèse totale de l'epicocconone sont autant de freins supplémentaires à son utilisation en tant que marqueur sur gel d'électrophorèse.

C'est pour cela que l'équipe du docteur Franck s'est intéressée à la synthèse d'analogues de l'epicocconone en vue d'améliorer ses propriétés physico-chimiques (photo-stabilité et fluorescence).¹⁷³ Des études de relations structure/fluorescence ont montré que ce sont le motif céto-énolique et le noyau dihydropyranoquinone qui procurent la réactivité particulière de l'epicocconone et son émission de fluorescence dans le proche infra-rouge (Figure 85). Il est donc primordial de garder ces motifs. Cependant, la chaîne triénique et l'hydroxyméthylène sont des sources d'instabilité.

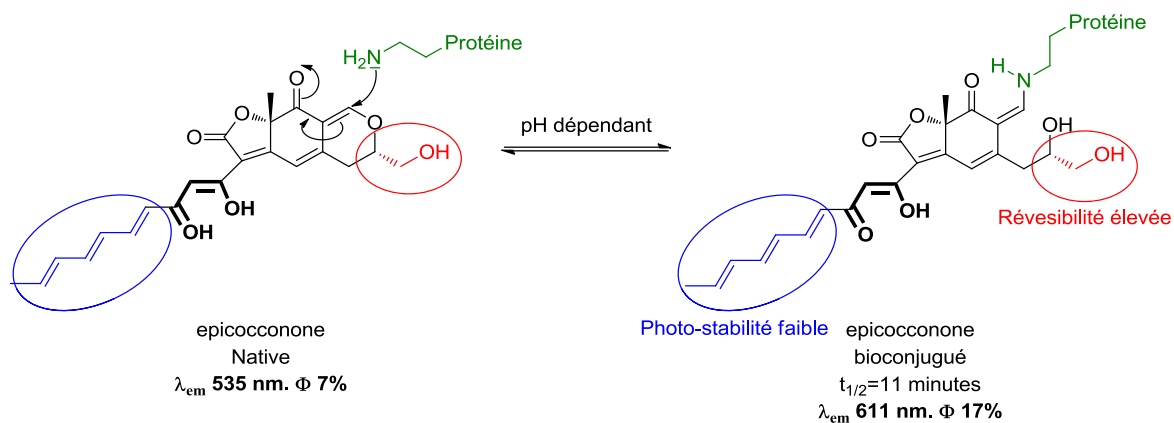


FIGURE 85 RÉVERSIBILITÉ DE L'ÉPICOCCONONE AVEC LES PROTÉINES ET PROPRIÉTÉS SPECTRALES.

Un composé leader est ainsi ressorti de cette étude, l'analogue naphthyle. Ce dernier diffère de la molécule naturelle par le remplacement des sources d'instabilité : (Figure 86)

- La chaîne triénique a été remplacée par un groupement naphthyle afin d'augmenter la photo-stabilité de la molécule mais également afin de diminuer les désexcitations non radiatives.
- La fonction hydroxyméthylène en position 2 a été substituée par un groupement gem-diméthyle limitant la réversibilité entre la forme native et la forme bioconjuguée.

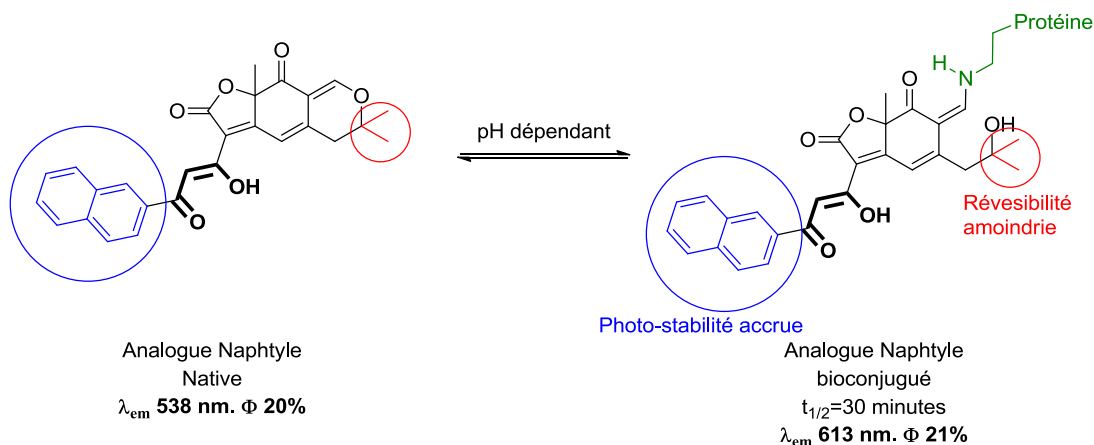


FIGURE 86 RÉVERSIBILITÉ DE L'ANALOGUE NAPHTYLE AVEC LES PROTÉINES ET PROPRIÉTÉS SPECTRALES.

Ces changements structuraux se sont révélés fructueux puisque le temps de demi-vie de la forme bioconjuguée a été triplé passant de 11 minutes à 30 minutes.¹⁷³ De plus, la substitution de la chaîne triénique par le groupement naphthyle, plus rigide, a sans doute permis de supprimer des effets de désexcitations non radiatives qui affectent négativement l'émission de fluorescence de l'epicocconone, ayant pour conséquence d'augmenter le rendement quantique de la forme énamine de l'analogue naphthyle ($\Phi = 21\%$), comparé à

celui de la molécule naturelle ($\Phi = 17\%$).¹⁷³ Il est à noter que ces deux molécules conservent cependant la même gamme spectrale (Tableau 3) :

		λ_{em} (nm)	Φ (%)
Natif	Epicconone	535 nm	7 %
	Analogue Naphtyle	538 nm	20 %
Bioconjuguée	Epicconone	611 nm	17 %
	Analogue Naphtyle	613 nm	21 %

TABLEAU 3 TABLEAU COMPARATIF DE L'ANALOGUE NAPHTYLE ET L'EPICOCCONONE.

L'émission de fluorescence de l'analogue naphthyle dans le proche infra-rouge permet d'envisager son utilisation en imagerie de fluorescence *in vivo*. En effet, les fluorophores, pour être utilisables et efficaces en imagerie de fluorescence *in vivo*, doivent remplir certains critères physico-chimiques mais également biologiques :

- L'hydrosolubilité : le fluorophore doit être soluble dans le milieu cellulaire.
- La toxicité : le fluorophore doit être peu ou pas toxique pour ne pas altérer le fonctionnement cellulaire.
- Perméabilité membranaire : il doit passer la membrane cellulaire sans pour autant l'altérer.
- La photostabilité : le fluorophore doit être photostable afin d'obtenir une fenêtre d'observation suffisante dans le temps.
- Émission dans le proche infra-rouge : l'émission dans le proche infra-rouge permet de s'affranchir de l'auto-fluorescence des tissus et autres composés biologiques cellulaires.

Cet analogue naphthyle a donc été testé en imagerie *in vivo* pour le marquage cellulaire. Les travaux de Damien Schapman sur ce sujet ont montré un marquage spécifique des protéines présentes dans un environnement lipophile comme c'est le cas dans les membranes et les organites lipophiles du cytoplasme (l'appareil de golgi ou le réticulum endoplasmique^{183,184}). De plus, cet analogue de l'epicocconone ne marque pas le noyau de la cellule comme montré dans la Figure 87. Cet analogue naphthyle peut, de ce fait, être utilisé en microscopie de fluorescence grâce à de nombreux avantages (Figure 87) :^{183,184}

- Une pénétration facile dans les cellules.
- Une faible toxicité grâce à sa réversibilité de marquage avec les protéines.

- Un faible bruit de fond dû à l'exaltation de fluorescence en présence de protéines et du large déplacement de Stokes.

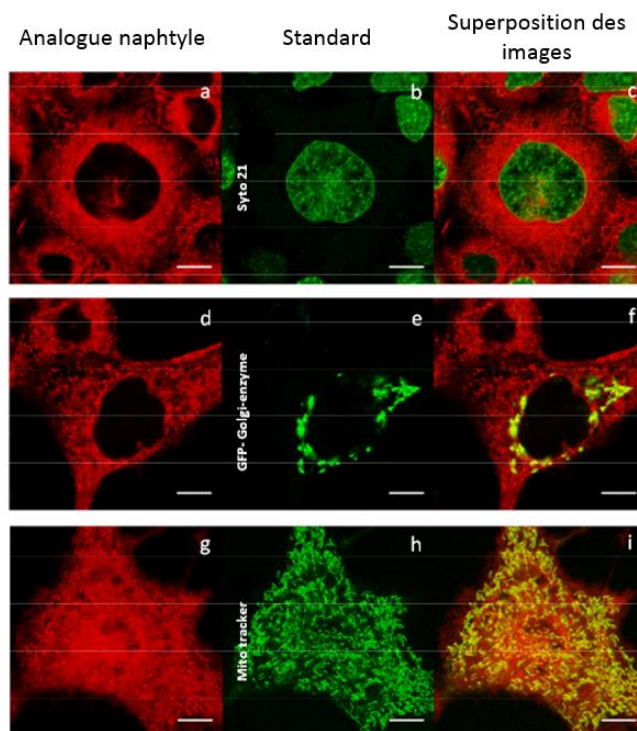


FIGURE 87 MARQUAGE PAR FLUORESCENCE DE CELLULES. A, D, G MARQUAGE DE CELLULES PAR L'ANALOGUE NAPHTYLE. B MARQUAGE DU NOYAU PAR SYTO 21, E MARQUAGE DE L'APPAREIL DE GOLGI PAR LA GFP, H MARQUAGE DES MITOCHONDRIES. C, SUPERPOSITION DES IMAGE A ET B, F SUPERPOSITION DES IMAGES D ET E, I SUPERPOSITION DES IMAGE G ET H.¹⁸⁴

Ainsi, en se basant sur les propriétés et le squelette de l'epicocconone, l'équipe du docteur Franck a élaboré un analogue, l'analogue naphthyle, disposant d'une photo-stabilité et d'une fluorescence accrues comparées à la molécule naturelle. Cet analogue est utilisé en marquage sur gel d'électrophorèse et possède un intérêt en imagerie de microscopie.

L'analogue naphthyle a donc été adapté à la sonde prévue pour ces travaux de thèse, en introduisant une fonction azoture. La synthèse de ce composé est décrite dans la suite de cette partie.

2.1.2. SYNTHÈSE DU PIÈGE À PROTÉINES, L'ANALOGUE NAPHTYLE DE L'ÉPICOCCONONE.

Le squelette des analogues de l'epicoconone est composé d'un noyau tricyclique **1** formé par réaction d'acylfuranonisation entre deux composés clefs, la dioxinone **4** et l'alcool désaromatisé **2**.

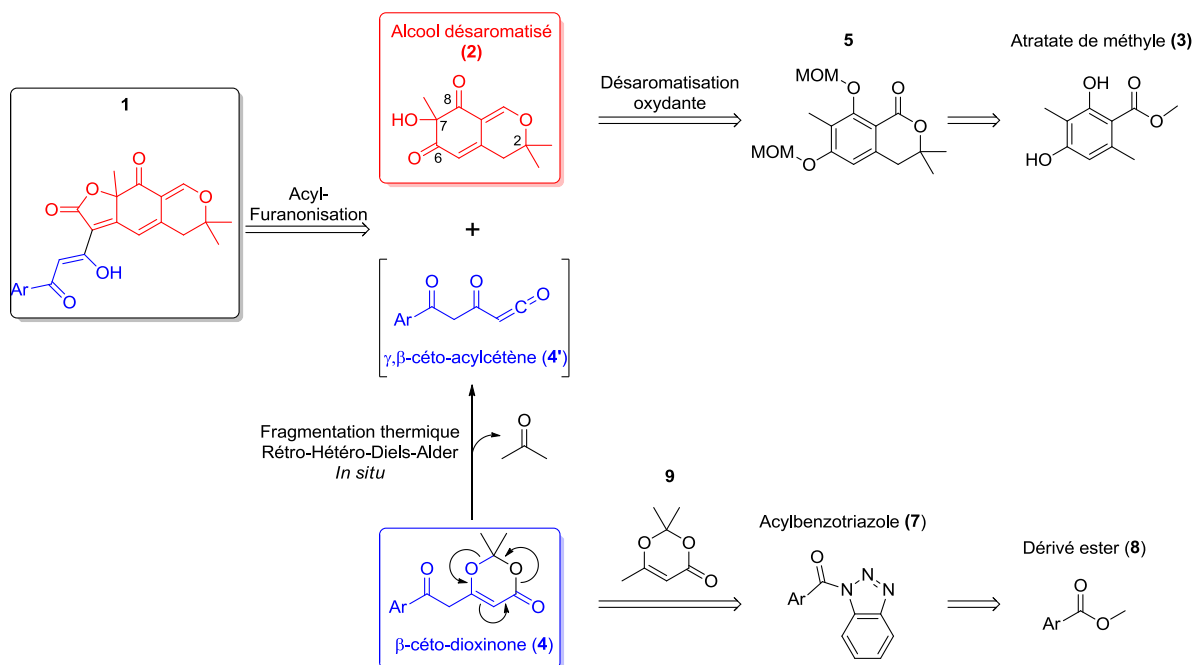


FIGURE 88 ANALYSE RÉTROSYNTHÉTIQUE DE LA PRÉPARATION DES ANALOGUES DE L'ÉPICOCCONONE **1**.

Le premier composé clef, l'alcool dit désaromatisé **2**, est obtenu en quatre étapes à partir de l'atrataste de méthyle **3**. Le second composé clef est une β -céto-dioxinone **4** provenant du dérivé ester **8** correspondant (Figure 88).

La réaction d'acylfuranonisation (Figure 89), permettant la formation de ce noyau tricyclique, est initiée par un apport thermique fragmentant la β -céto-dioxinone **4** en β,γ -céto-acylcétène **4'** par réaction de rétro-hétéro-Diels-Alder.^{173,185,186} Une fois ce dernier généré, il est piégé par le groupement hydroxyle présent sur l'alcool désaromatisé **2** générant un intermédiaire β,γ -céto-diester **10**. L'ajout de base conduit alors à une condensation de Knoevenagel intramoléculaire et sélective en position 6, formant l'intermédiaire tricyclique **12**. Un traitement acide permet ensuite de déshydrater cet intermédiaire et de former le produit désiré **1** (Figure 89).

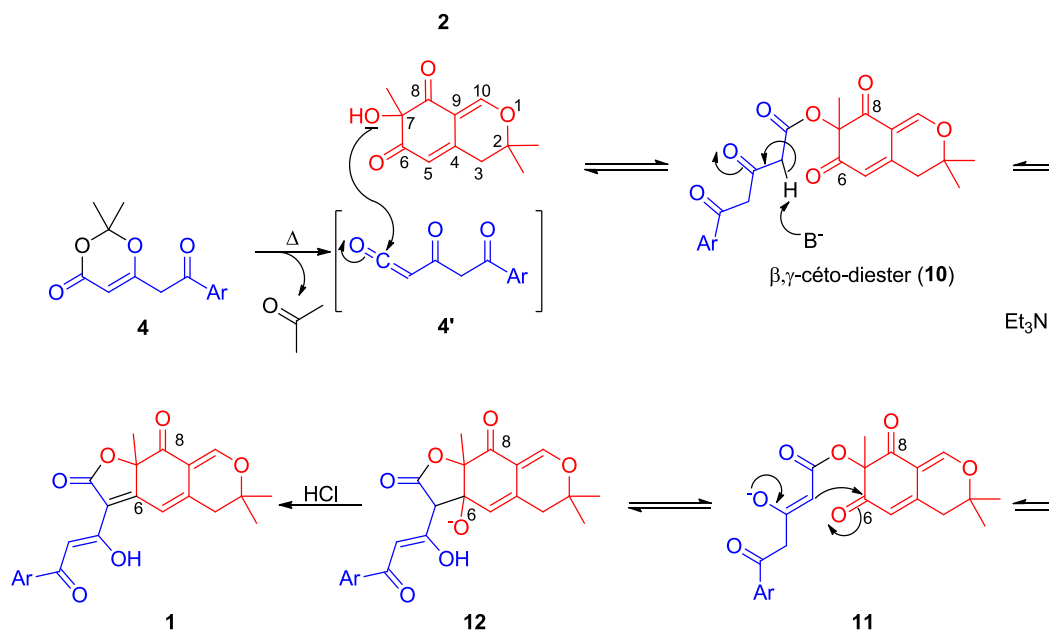


FIGURE 89 MÉCANISME RÉACTIONNEL DE L'ACYLFURANONISATION.

Cependant, cette cyclisation est également envisageable sur la cétone en position 8 de l'alcool désaromatisé. Les travaux antérieurs menés au sein du laboratoire par le docteur Alle ont montré que cette cyclisation est spécifique de la position 6 (qui est le produit thermodynamique) lorsque la β -céto-dioxinone est fonctionnalisée par un groupement aromatique (Figure 90).¹⁸⁵

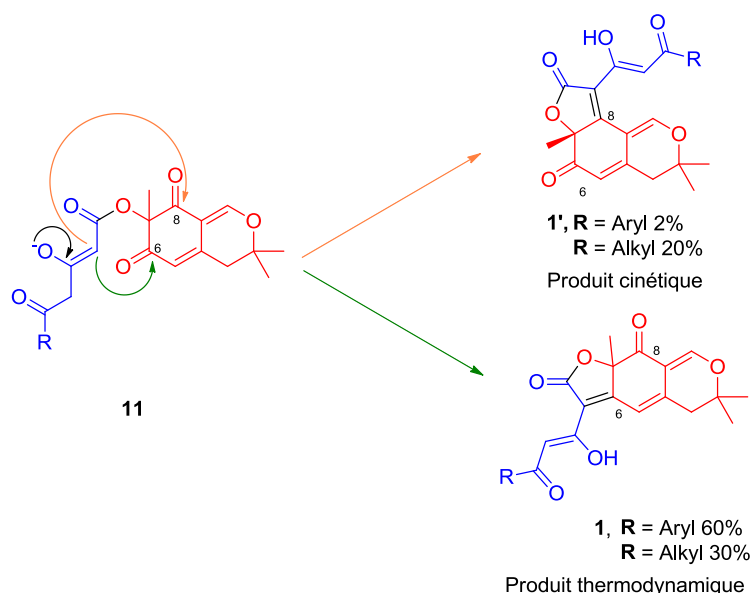


FIGURE 90 RÉGIOSÉLECTIVITÉ DE LA RÉACTION D'ACYLFURANONISATION. EN ORANGE LA CYCLISATION EN POSITION 8 (PRODUIT CINÉTIQUE), ET EN VERT LA CYCLISATION EN POSITION 6 (PRODUIT THERMODYNAMIQUE).

La synthèse des β -céto-dioxinones et de l'alcool désaromatisé ainsi que la réaction d'acylfuranonisation sont des réactions développées et maîtrisées au sein du laboratoire.^{173,185,186}

Dans la suite de cette partie, la synthèse de l'alcool désaromatisé sera dans un premier temps abordée, suivi de celle de la β -céto-dioxinone. Une fois ces deux partenaires en possession, la réaction d'acylfuranonisation peut être effectuée afin de former le noyau tricyclique de l'epicoconone.

2.1.2.1. SYNTHÈSE DE L'ALCOOL DÉSAROMATISÉ

La synthèse de l'alcool désaromatisé **2** se base sur une étape clef de désaromatisation oxydante d'un lactol issu de la réduction de la lactone **5** correspondante.¹⁸⁶ Cette dernière provenant de la condensation d'une molécule d'acétone sur un dérivé protégé de l'atrataste de méthyle commercial **3** (Figure 91).

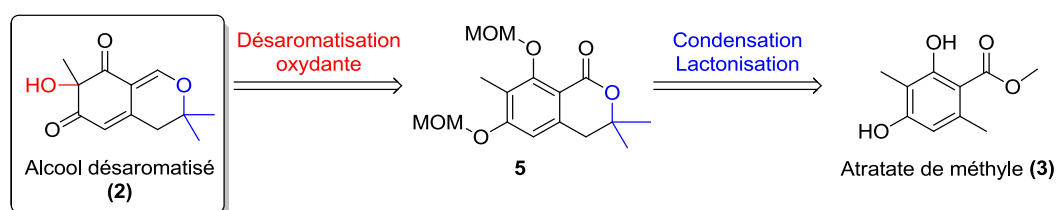


FIGURE 91 ANALYSE RÉTROSYNTHÉTIQUE DE L'ALCOOL DÉSAROMATISÉ.

La synthèse de l'alcool désaromatisé **2** (Figure 92) débute par la protection des groupements phénolique de l'atrataste de méthyle **3** sous forme d'acétal méthoxyméthyle (MOM). La déprotonation du composé protégé **13** à l'aide de diisopropylamide de lithium (LDA) génère un anion benzylique piégé par une molécule d'acétone. L'alcoolate résultant peut ainsi cycliser intramoléculairement sur l'ester méthylique en position *ortho* et conduire à la lactone **5**. La réduction de cette lactone en lactol **14** grâce à l'action du DIBAL-H (hydrure de diisobutylaluminium), suivie d'une réaction de désaromatisation oxydante par l'action de l'acide 2-iodoxobenzoïque (IBX) développée au sein du laboratoire,¹⁸⁶ conduit à la formation de l'alcool désaromatisé **2** avec un rendement de 22 % sur 4 étapes (Figure 92).

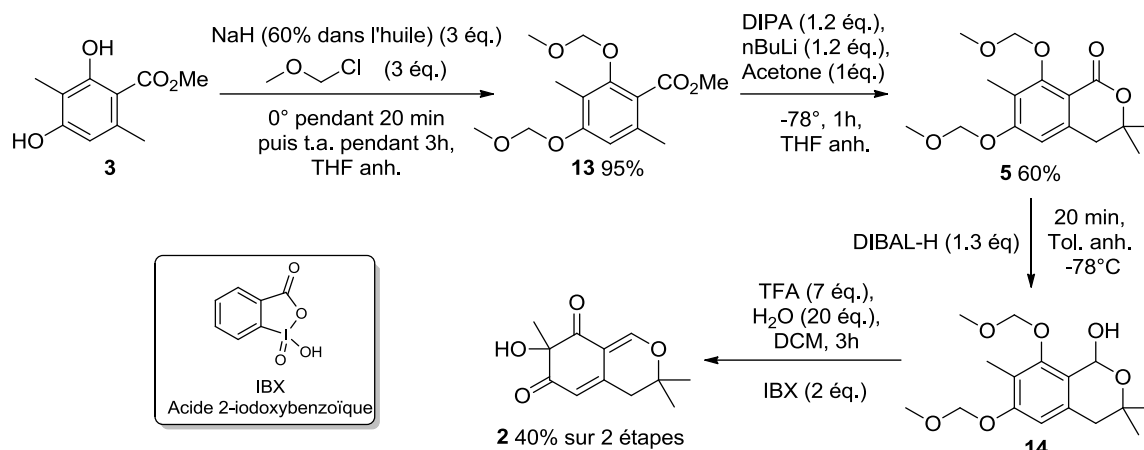


FIGURE 92 SCHÉMA SYNTHÉTIQUE DE L'ALCOOL DÉSAROMATISÉ 2.

Le mécanisme de cette étape de désaromatisation oxydante (Figure 93) est réalisé en présence d'eau et d'acide trifluoroacétique (TFA) dont l'action combinée permet la déprotection des groupements MOM et la déshydratation de l'hémiacétal en ion oxonium **14a**. Cela a pour conséquence d'initier une réaction intramoléculaire de désaromatisation oxydante conduisant à l'intermédiaire **14b** par échange de ligand entre l'IBX et le diphenol **14a**. Il s'ensuit une cascade intramolécule formant l'intermédiaire **14c** qui, par hydrolyse, conduit à la formation de l'alcool désaromatisé souhaité **2** et de l'IBA (Acide iodobenzoïque) (Figure 93).¹⁸⁶

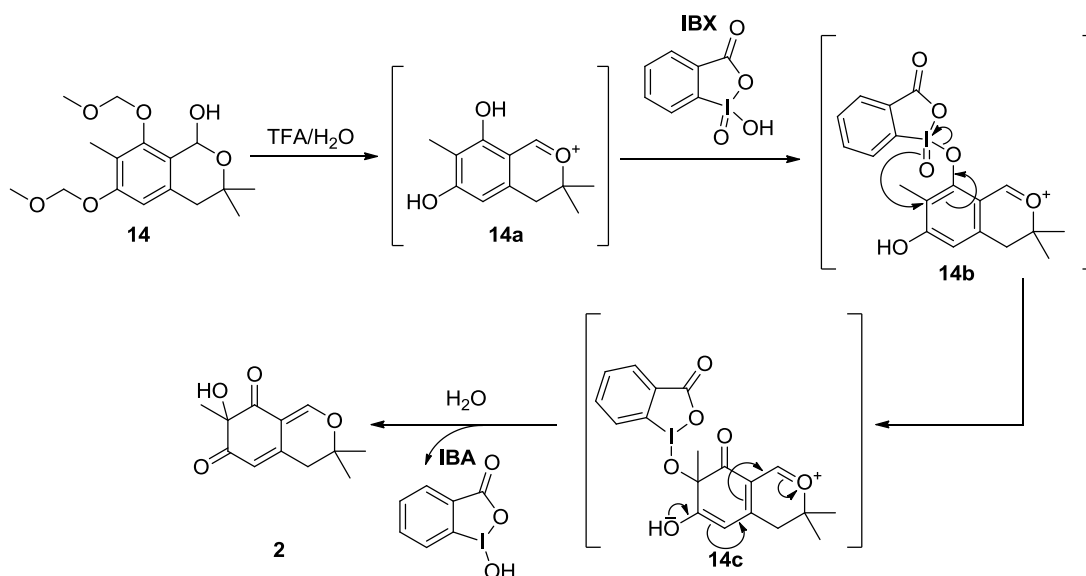


FIGURE 93 MÉCANISME DE L'ÉTAPE CLEF DE DÉSAROMATISATION OXYDANTE.

Une fois le premier composé clé synthétisé, la synthèse de la β -céto-dioxinone peut être envisagée.

2.1.2.2. SYNTHÈSE DE LA β -CÉTO-DIOXINONE, PRÉCURSEUR D'ACYL-CÉTÈNE.

Les cétènes et acyl-cétènes sont des composés très réactifs pouvant être utilisés pour former divers hétéro-cycle par cycloaddition [2+2], [2+3] ou encore [2+4].^{187–189} Mais ils peuvent également être piégés par des nucléophiles qui vont engendrer une cascade réactionnelle conduisant à des structures complexes comme c'est le cas pour l'epicoconone.

Il existe de nombreuses voies d'obtention de ces cétènes (et donc des acylcétènes) (Figure 94) notamment en passant par des dérivés d'acides activés,¹⁹⁰ d' α -diazocétones (par réarrangement de Wolff),¹⁹¹ d'énolates d'ester,¹⁹² ainsi que par l'utilisation de dioxinones.¹⁹³ Ce sont ces dernières qui sont utilisées dans la synthèse des analogues de l'epicoconone, de par leur stabilité et facilité de synthèse.

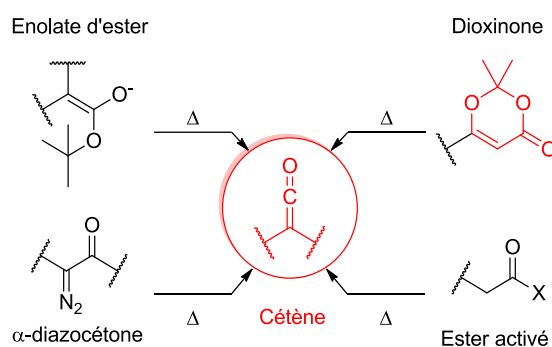


FIGURE 94 EXEMPLE DE PRÉCURSEURS D'ACYLCÉTÈNE.

Les β -céto-dioxinones synthétisées au sein du laboratoire sont obtenues par activation préalable d'un acide carboxylique **15** sous forme d'un acylbenzotriazole **7**.^{194,195} L'addition nucléophile de l'anion **9b** provenant de la dioxinone méthyle **9a** sur ces acides activés conduit aux composés désirés **4** (Figure 95).¹⁹⁶

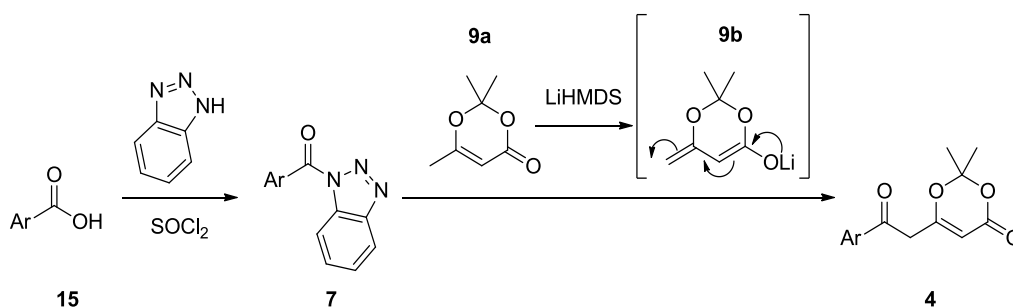


FIGURE 95 SYNTHÈSE DES β -CÉTO-DIOXINONES

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons choisi de relier notre agent de reconnaissance de l'ADN au piège à protéine (Figure 79, p95) par un groupement triazole issu d'une cycloaddition catalysée au cuivre (I) entre un azoture et un alcyne. L'analogue de l'epicoconone sera fonctionnalisé par le groupement azoture.

Pour cela, le diméthyl-2,6-naphtalènedicarboxylate **18** sera travaillé afin d'aboutir à la β -céto-dioxinone portant une fonction azoture **16** désirée. Ainsi, cette fonction azoture sera dans un premier temps incorporée au noyau naphthyle donnant le composé azoture **17**, puis ce même noyau sera fonctionnalisé par le motif β -céto-dioxinone nécessaire à la réaction d'acylfuranonisation (Figure 96).

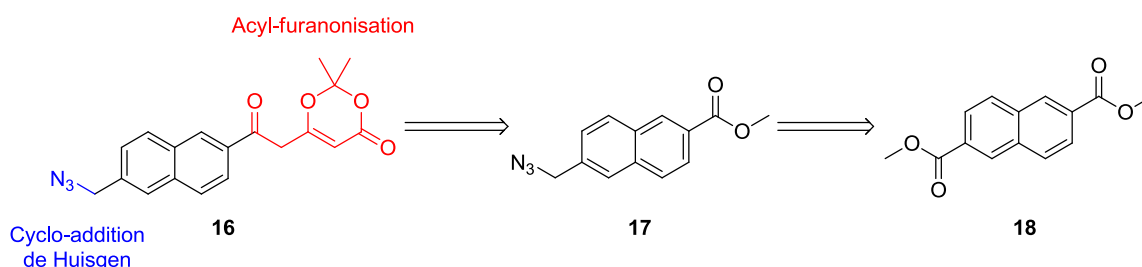


FIGURE 96 RÉTROSYNTHÈSE DE LA DIOXINONE SOUHAITÉE.

Tout d'abord, le diméthyl-2,6-naphtalènedicarboxylate **18** est mono-saponifié¹⁹⁷ en acide carboxylique **19** de façon quantitative. Celui-ci est ensuite réduit chimiosélectivement en alcool **20** grâce à l'action du $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$.¹⁹⁸ L'introduction de la fonction azoture se fait par substitution de l'alcool **20**, préalablement activé sous forme de mésylate **21**, avec un rendement de 80 % sur deux étapes donnant l'ester **17** fonctionnalisé par le groupement azoture souhaité (Figure 97).

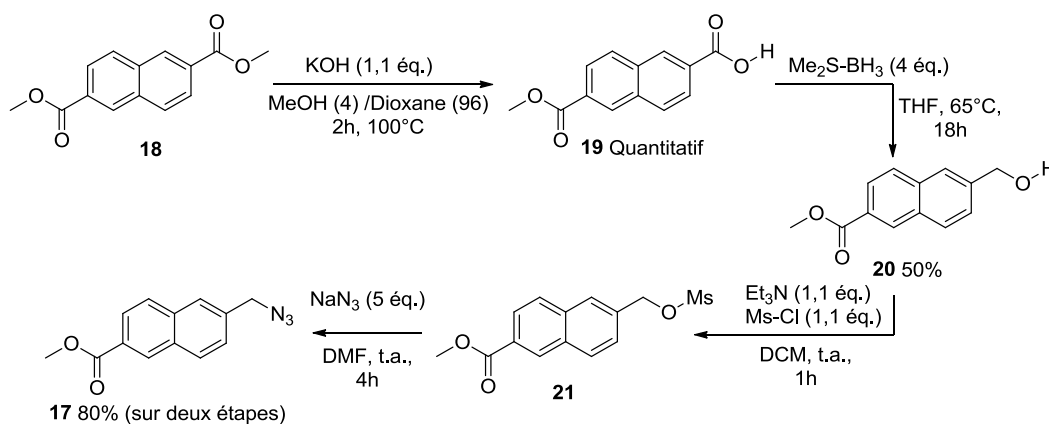


FIGURE 97 SYNTHÈSE DE L'ESTER **17**, PRÉCURSEUR DE LA DIOXINONE **16**.

Une fois cette fonction azoture incorporée, le motif β -céto-dioxinone peut être introduit. Pour cela (Figure 98), l'ester restant est saponifié pour conduire au composé **22**. La transformation de ce dernier en acylbenzotriazole **23**^{194,195} permet de travailler avec un composé plus stable et plus facile à manipuler qu'un chlorure d'acide (Figure 98).

La dioxinone souhaitée **16** a pu être obtenue par addition nucléophile de l'anion de la dioxinone méthyle **9b** sur l'acylbenzotriazole **23** en présence de LiHMDS.¹⁹⁶ Ainsi, la β -céto-dioxinone désirée **16** a pu être obtenue en 7 étapes avec un rendement global de 23 % (Figure 98).

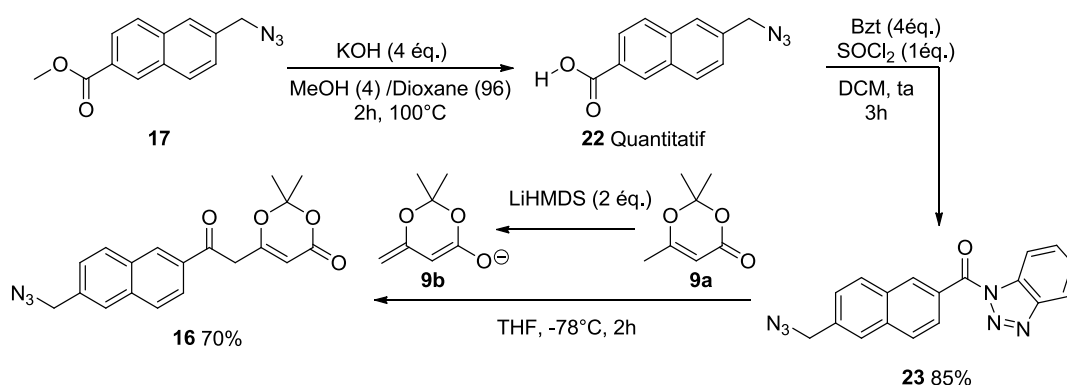


FIGURE 98 FIN DE LA SYNTHÈSE DE LA β -CÉTO-DIOXINONE SOUHAITÉE **16**.

Une fois les deux composés clefs synthétisés, il ne reste qu'à réaliser la réaction d'acylfuranonisation.

2.1.2.3. RÉACTION D'ACYLFURANONISATION

Comme expliqué précédemment (Figure 89, p109), la formation du squelette tricyclique de l'epicocconone est basée sur une réaction d'acylfuranonisation entre les deux partenaires précédemment synthétisés, l'alcool désaromatisé **2** et la β -céto-dioxinone **16** (Figure 99).

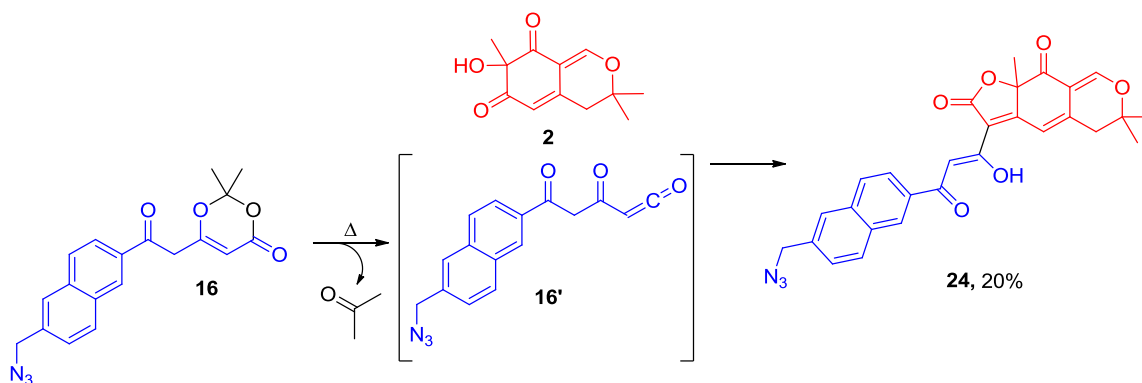


FIGURE 99 ÉTAPE D'ACYLFURANONISATION ENTRE LES DEUX COMPOSÉS CLEFS **16** ET **2**.

Le piège à protéines a ainsi pu être obtenu avec un rendement global de 5 % sur 8 étapes et 20 % sur cette dernière. Ce faible rendement s'explique par des réactions secondaires pouvant survenir lors de cette étape d'acylfuranonisation :

- La base doit être ajoutée au moment opportun, c'est-à-dire lorsque tout l'alcool désaromatisé a été transformé en β -céto-ester, limitant ainsi l'auto-condensation de l'acyl-cétène sur lui-même en dérivé pyrone **25** (En rouge sur la Figure 100).¹⁹⁶
- Aucune trace d'eau ne doit être présente. En effet l'eau piégée par l'acyl-cétène va conduire à la formation de l'acide carboxylique **26**. Ce dernier va se décarboxyler rapidement lors de l'ajout de base en formant finalement l'acétoacétone **27** correspondante (en bleu sur la Figure 100).¹⁹⁶
- De même, il est possible qu'une β -élimination survienne au niveau du β,γ -céto-diester, redonnant l'alcool désaromatisé et l'acyl-cétène (en vert sur la Figure 100).

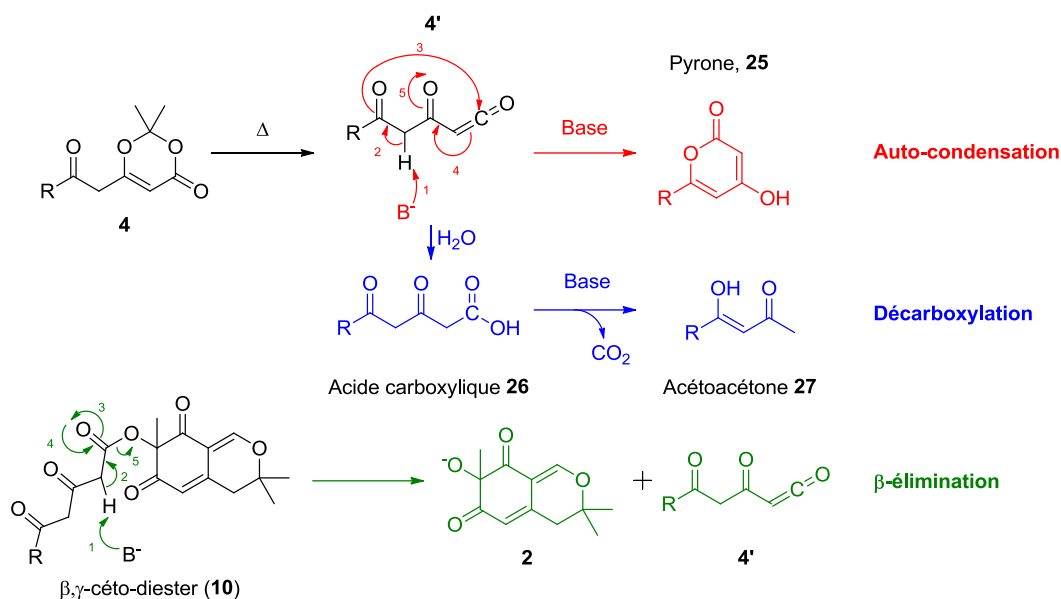


FIGURE 100 RÉACTIONS PARASITES SE PRODUISANT LORS DE L'ÉTAPE D'ACYLFURANONISATION.

Le but de ce projet est de concevoir et de synthétiser une sonde piégeant les protéines liées aux zones riches en AT de l'ADN. L'application de la méthodologie de synthèse des analogues de l'epicocconone a donc permis la préparation du composé **24**, constituant la partie piège à protéines de la sonde (Figure 101).

Le caractère pro-fluorescent du piège à protéines nous oblige à choisir un ligand de l'ADN non fluorescent. L'équipe du docteur Teulade-Fichou a élaboré une série de ligands basée sur le squelette de la triphénylamine, spécifiques des zones riches en AT de l'ADN et n'étant pas fluorescents une fois liés à ces zones (Figure 101). Dans la partie suivante, la synthèse du ligand de l'ADN sera développée.

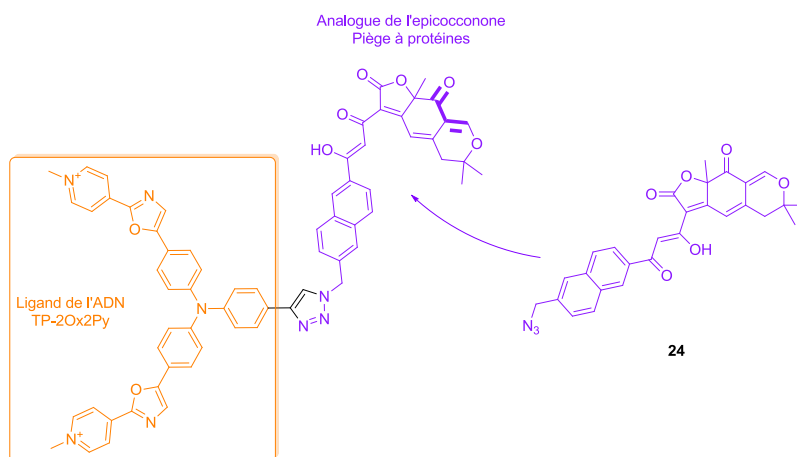


FIGURE 101 SCHÉMA DE LA SONDÉ DÉSIRÉE.

2.2. LE LIGAND DE L'ADN.

2.2.1. LES TP-OX-PY, UNE FAMILLE DE LIGANDS DES ZONES RICHES EN AT PARTICULIÈRE.

Comme évoqué page 86, l'équipe du docteur Teulade-Fichou a conçu une première série de sondes spécifiques des zones riches en AT de l'ADN dont la fluorescence est exacerbée une fois liée à l'ADN. Cette série est basée sur un groupement donneur, le squelette de la triarylamine, et des groupements accepteurs cationiques, noyaux pyridinium ou benzimidazolium. Ces groupements donneurs et accepteurs sont séparés par un système vinylique servant d'agent de conjugaison (Figure 73, p87).

Cependant, la liaison vinylique peut s'isomériser sur ces dérivés et être source de désexcitations non-radiatives. C'est pour cela que l'équipe du docteur Teulade-Fichou s'est orientée vers la synthèse d'une seconde série de ligands disposant d'un motif oxazole plus rigide à la place de ce système vinylique (Figure 102).¹⁶⁰ Trois sondes ont ainsi été synthétisées :

- Une sonde possédant le motif oxazole di-substitué ; en position 5 par un noyau benzimidazole ; en position 2 par le noyau triphénylamine (TP-Ox5Bzim).
- Une sonde possédant le motif oxazole di-substitué ; en position 5 par un noyau pyridine ; en position 2 par le noyau triphénylamine (TP-Ox5Py).
- Une sonde possédant le motif oxazole di-substitué ; en position 2 par un noyau pyridine ; en position 5 par le noyau triphénylamine (TP-Ox2Py).

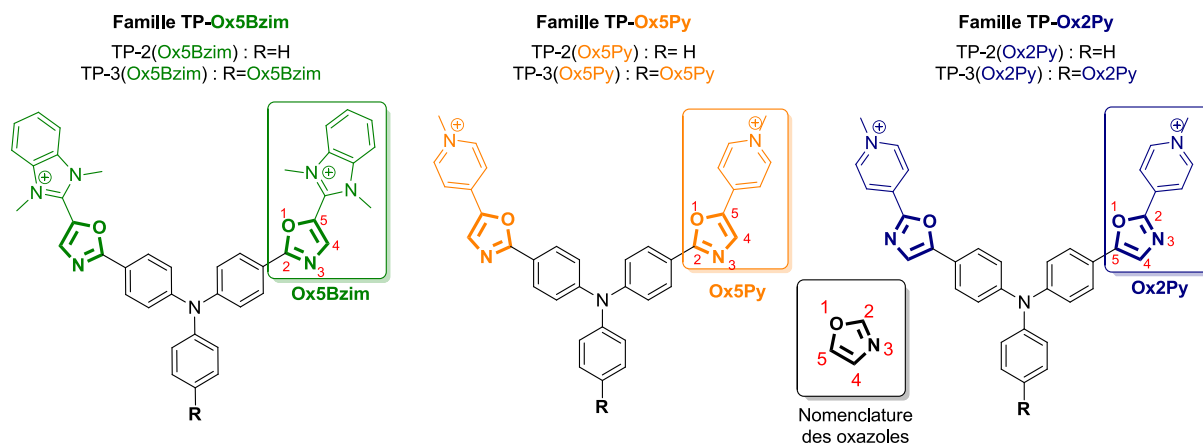


FIGURE 102 SECONDE SÉRIE DE LIGANDS SYNTHÉTISÉS.

Comparée à leurs parents TP-Py et TP-BZim (Figure 73, p87) de la première génération, cette seconde série possède les mêmes caractéristiques photo-physiques, à l'exception de la famille des TP-Ox-2Py qui ne présente aucune exaltation de fluorescence en solution comme dans l'ADN (Tableau 4).¹⁶⁰

	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	Φ_f
TP-2(Ox5Py)	466/631	0,038
TP-3(Ox5Py)	444/606	0,031
TP-2(Ox2Py)	505/ND	ND
TP-3(Ox2Py)	480/ND	ND
TP-2(Ox5Bzim)	440/533	0,17
TP-3(Ox5Bzim)	426/536	0,28

TABEAU 4 DONNÉES SPECTRALES DE LA SECONDE GÉNÉRATION DE LIGANDS EN SOLUTION. (ND : NON DÉFINI)

Parmi ces ligands, tous ont révélé une affinité spécifique pour les zones riches en AT de l'ADN, sauf la famille des TP-Ox-5Bzim n'ayant aucune spécificité de séquences.¹⁶⁰ Cette « anomalie » est due à une mauvaise insertion du ligand dans le petit sillon riche en AT comme le montre la Figure 103 où un bras du TP-Ox5Bzim (en bleu) sort du sillon de l'ADN.¹⁶⁰

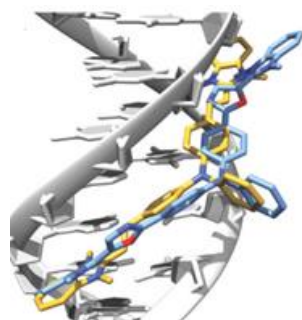


FIGURE 103 INSERTION DU DÉRIVÉ TP-2BZIM (1^{ÈRE} GÉNÉRATION) EN JAUNE ET TP-2(Ox5BZIM) (2ND GÉNÉRATION) EN BLEU DANS UN SILLON RICHE EN AT DE L'ADN.

Une différence de fluorescence entre les isomères TP-Ox-5Py et TP-Ox-2Py est à noter et est due au manque de conformation plane du TP-Ox-2Py, exposant un noyau pyridinium en dehors du sillon et entraînant une perte de fluorescence par désexcitation non radiative (Figure 104).¹⁶⁰



FIGURE 104 INSERTION DU DÉRIVÉ TP-2PY (1^{ÈRE} GÉNÉRATION) EN JAUNE, TP-2OX5PY (2^{ÈME} GÉNÉRATION) EN VIOLET ET TP-2OX2PY (2^{ÈME} GÉNÉRATION) EN BLEU, DANS UN SILLON RICHE EN AT DE L'ADN.

Mais malgré l'absence de fluorescence des dérivées TP-Ox-2Py en présence d'ADN, ils possèdent, tout comme les TP-Ox-5Py, une affinité pour les zones riches en AT de l'ADN qui a été mesurée par dichroïsme circulaire (CD) (détaillé p190, Figure 105).¹⁶⁰ Le CD représente l'une des voies les plus simples pour mettre en évidence la présence d'un complexe ADN-ligand. En effet, le CD se base sur un changement de chiralité du milieu. Ainsi, aucun signal ne sera décelé sauf lors d'interaction avec l'ADN, ce qui va briser l'achiralité du ligand en induisant un signal (ICD).

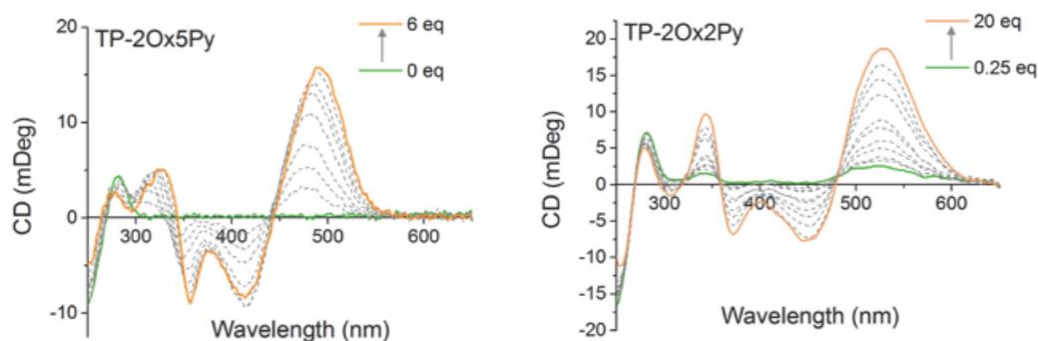


FIGURE 105 RÉSULTAT DE DICHROÏSME CIRCULAIRE DU COMPOSÉ TP-2OX5PY À GAUCHE ET DU COMPOSÉ TP-2OX2PY À DROITE.

Les dérivés fluorescents TP-2Ox-5Py et TP-3Ox-5BZim ont été évalués en marquage d'ADN cellulaire. Ce premier dérivé a révélé une émission de fluorescence uniquement présente au niveau du noyau, contrairement au second dérivé, dont l'émission de fluorescence est uniforme dans la cellule (Figure 106).

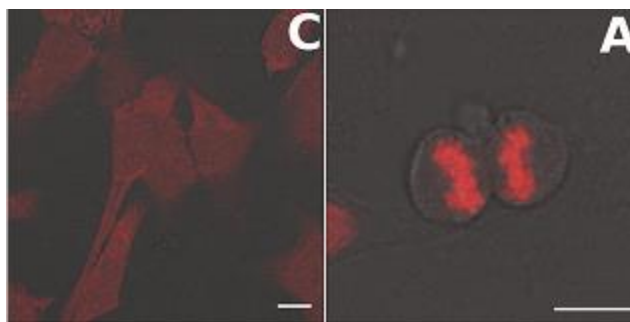


FIGURE 106 MARQUAGE DE CELLULES HELa AVEC 2 μ M DE : C) TP-3Ox5Bzim ET A) TP-2Ox5Py

L'équipe du docteur Teulade-Fichou a ainsi élaboré différentes sondes, ayant chacune leur spécificité, en partant d'un même squelette triphénylamine (Figure 107) :

- Une famille de sondes fluorescentes se liant à l'ADN sans aucune spécificité (TP-Ox5Bzim).
- Une famille de sondes fluorescentes se liant spécifiquement et avec une haute affinité aux zones riches en AT (TP-Ox5Py).
- Une dernière famille de sondes non-fluorescentes se liant spécifiquement aux zones riches en AT de l'ADN (TP-Ox2Py).¹⁶⁰

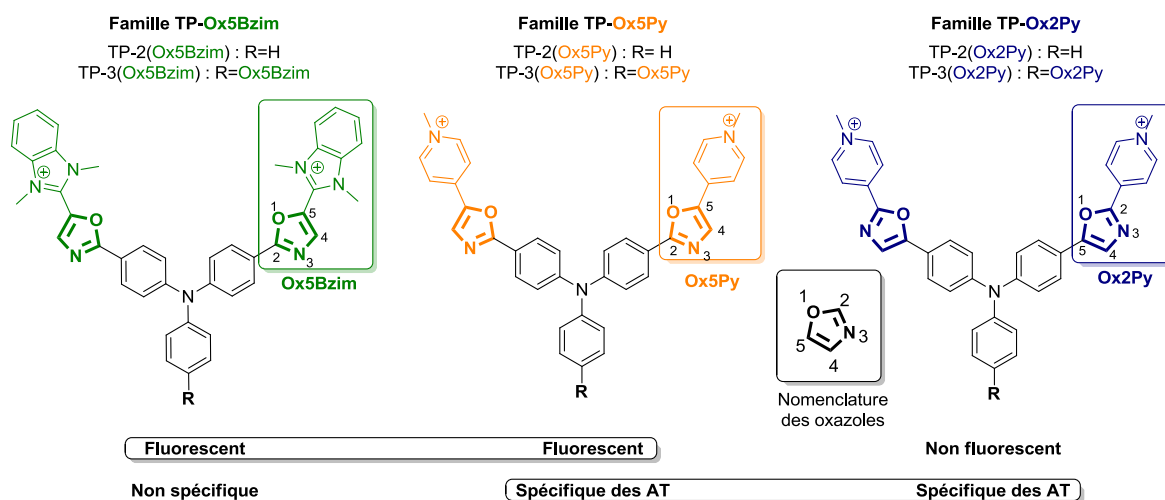


FIGURE 107 RÉCAPITULATIF DES DIFFÉRENTES FAMILLES DE LIGANDS DES ZONES RICHES EN AT DE DEUXIÈME GÉNÉRATION DÉVELOPPÉES PAR L'ÉQUIPE DU DOCTEUR TEULADE-FICHOU.

L'affinité spécifique du composé TP-Ox-2Py pour les séquences riches en AT et sa non-fluorescence, font de ce ligand un excellent candidat pour ce projet de thèse. En effet, le piège à protéines étant pro-fluorescent, en choisissant ce ligand, seule l'émission provenant de l'analogue naphthyle lié aux protéines sera détectée.

Ainsi, la partie affine pour l'ADN (analogue du TP-2Ox-2Py) sera fonctionnalisée par un groupement alcyne pour réaliser sa jonction avec le piège à protéines (analogue de l'epicocconone) de la sonde, par réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre (Figure 108).

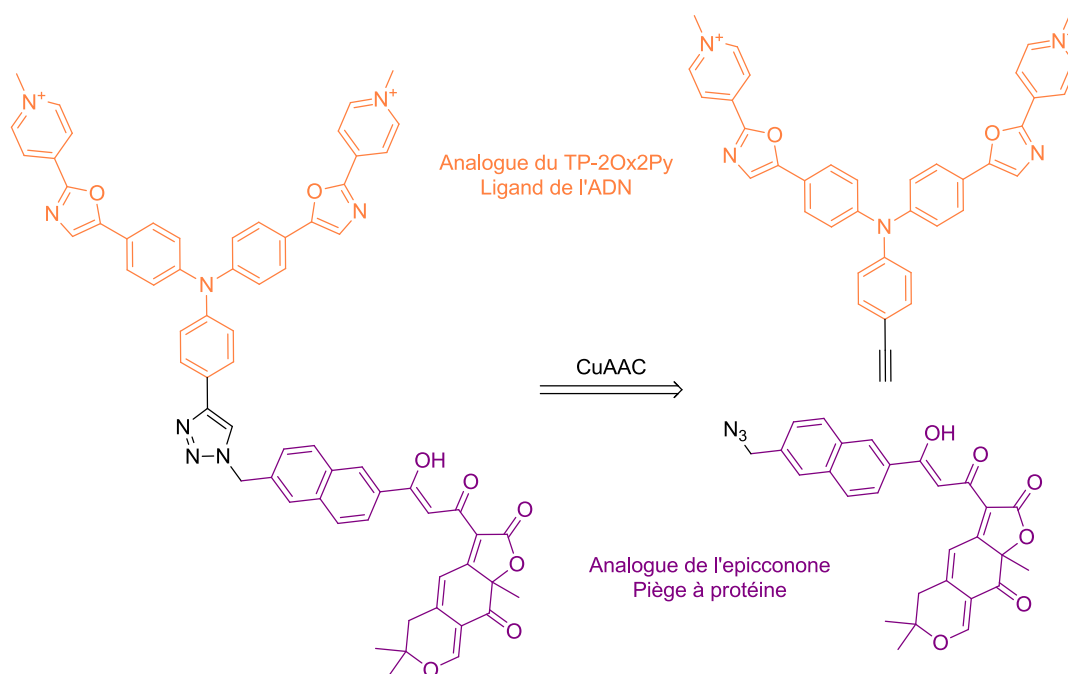


FIGURE 108 COUPURE RÉTROSYNTHÉTIQUE ENVISAGÉE POUR LA PRÉPARATION DE LA SONDE.

Plusieurs stratégies de synthèses ont été abordées pour obtenir l'analogue du TP-2Ox-2Py. Ces dernières seront détaillées dans la suite de ce chapitre.

2.2.2. SYNTHÈSE DU LIGAND DE L'ADN, UN ANALOGUE DU TP-Ox2Py.

2.2.2.1. PREMIÈRE VOIE DE SYNTHÈSE.

Deux stratégies de synthèse ont été envisagées afin d'obtenir le produit désiré : une synthèse linéaire et une synthèse convergente. Ces deux stratégies seront étudiées dans la suite de ce chapitre, en commençant par la synthèse linéaire, dont trois approches ont été envisagées.

2.2.2.1.1. SYNTHÈSES LINÉAIRES.

La synthèse des dérivés TP-2Ox-2Py développée par les docteurs Sandrine Piguel et Florence Mahuteau-Betzer au sein de l'UMR176 à l'institut Curie à Orsay,¹⁹⁹ repose sur une étape cruciale d'arylation par une réaction de C-H activation catalysée au palladium entre la position 2 d'un cycle oxazole et un halogénure d'aryle. En se basant sur leur savoir-faire,^{160-163,200} et la nécessité d'introduire une fonction alcyne permettant la cycloaddition de Huisgen,

deux approches de synthèse linéaires ont ainsi été élaborées en partant de la triphénylamine commerciale **28**. Ces approches utilisent toutes deux la réaction de C-H activation venant d'être citée, mais également une étape de couplage de Sonogashira permettant d'introduire la fonction alcyne. Cependant, l'ordre dans lequel ces réactions sont réalisées est différent et résumé ci-dessous :

- Première approche : introduction de la fonction alcyne par couplage de Sonogashira **puis** introduction des groupements pyridines par C-H activation (Figure 109).

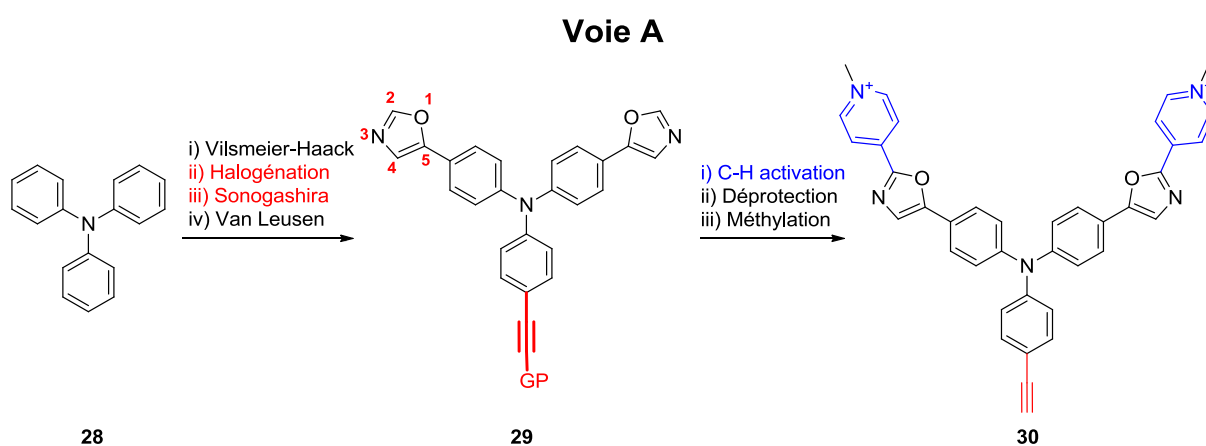


FIGURE 109 PREMIÈRE APPROCHE DE SYNTHÈSE ENVISAGÉE.

- Deuxième approche : introduction des groupements pyridines par C-H activation **puis** introduction de la fonction alcyne par couplage de Sonogashira (Figure 110).

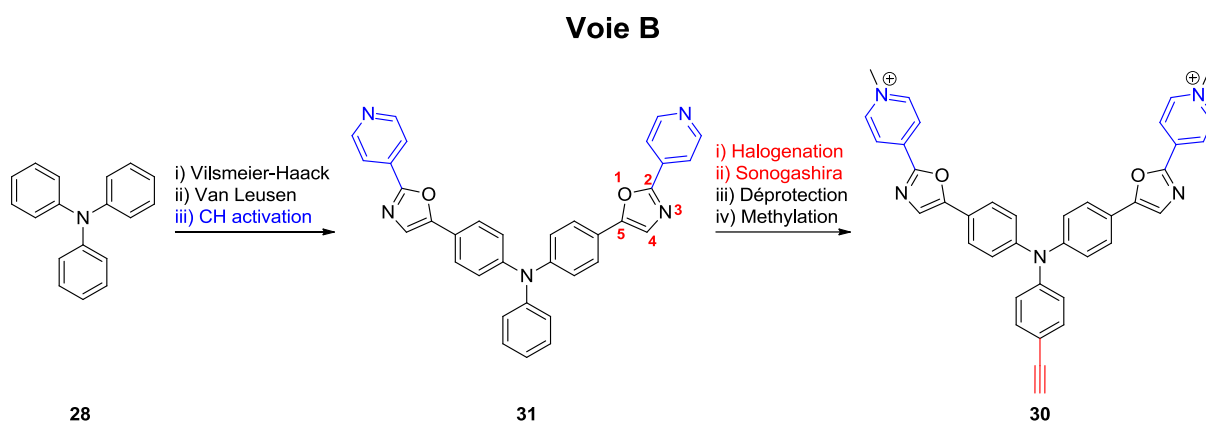


FIGURE 110 DEUXIÈME APPROCHE DE SYNTHÈSE ENVISAGÉE.

Une dernière approche a été envisagée en formant le noyau oxazole par une réaction de cyclisation oxydante catalysée à l'iode,²⁰¹ entre un intermédiaire 2-aminocétone et la 4-

pyridinecarboxaldehyde. L'introduction de cette fonction 2-aminocétone sur le noyau triphénylamine est réalisée grâce à une acylation de Friedel-Craft (Figure 111).^{202–208}

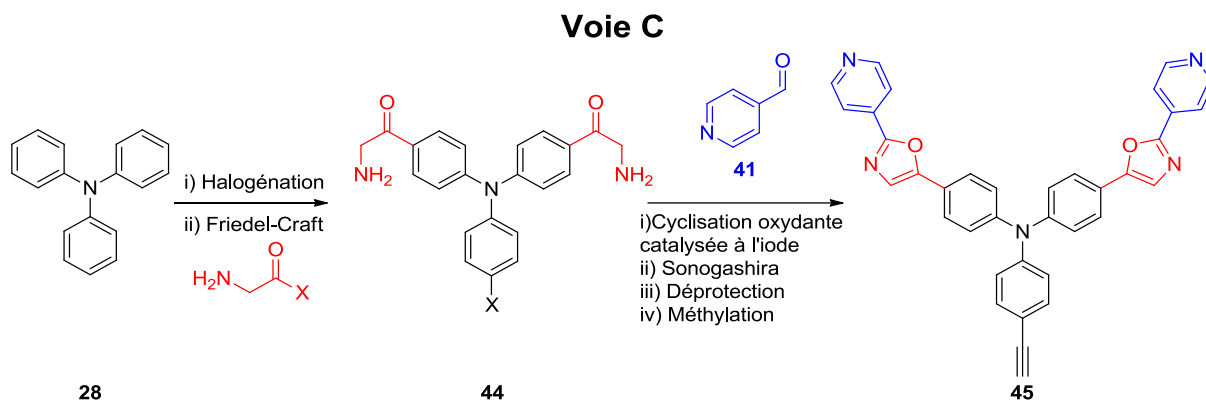


FIGURE 111 TROISIÈME APPROCHE DE SYNTHÈSE ENVISAGÉE.

Dans chacune de ces approches, l'alkylation des cycles pyridines en pyridiniums correspondants est effectuée en fin de synthèse dans le but d'éviter les difficultés de manipulation liées aux sels.

2.2.2.1.1.1. PREMIÈRE APPROCHE DE SYNTHÈSE LINÉAIRE.

La synthèse débute ainsi par une double formylation de Vilsmeier-Haack du composé triphénylamine **28** afin d'obtenir le produit **32** avec 65 % de rendement.¹⁹⁹ Il est à noter que le rendement est moyen, de par la difficulté de séparation du composé **32** et du composé tri-formylé. S'ensuit l'introduction de l'atome d'iode à l'aide de sulfate d'argent et de l'iode dans l'obscurité permettant ainsi l'obtention du composé **33** avec un rendement de 80 % (Figure 112).¹⁹⁹

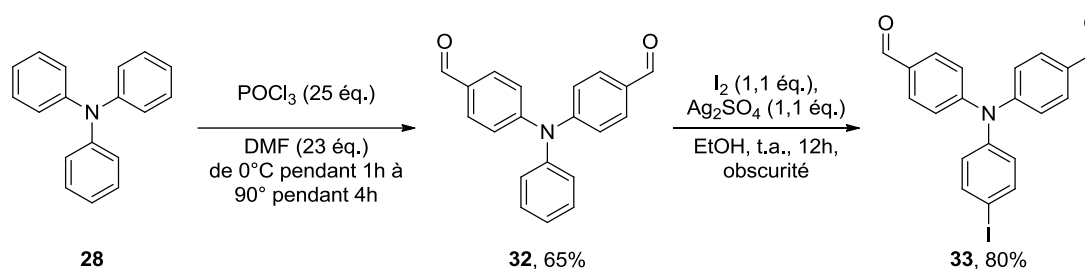


FIGURE 112 SYNTHÈSE DU COMPOSÉ **39**.

Une fois le composé **33** obtenu, la réaction de Sonogashira peut être envisagée avec de l'acétylène protégée. Afin de pouvoir facilement moduler les conditions de déprotection du groupement alcyne, deux alcynes possédant des groupements protecteurs différents ont été sélectionnés, le TMS-acétylène et le TIPS-acétylène. Le premier groupement protecteur TMS nécessite des conditions de déprotection douces en milieu basique, tandis que le second nécessite des conditions beaucoup plus dures comme l'utilisation de fluorure d'argent, mais aura l'avantage d'être plus stable au cours de la synthèse.²⁰⁹ L'introduction de ces deux alcynes a ainsi été effectuée et s'est révélée être deux fois plus performante avec le TIPS-acétylène donnant le produit **34b** avec 80 % de rendement, qu'avec le TMS-acétylène donnant le produit **34a** avec 40 % de rendements (Figure 113). Cette différence peut s'expliquer par un effet électronique donneur plus fort du groupement TIPS, stabilisant plus facilement le complexe alcyne-cuivre formé.

Une fois ces alcynes introduits, la formation des noyaux oxazoles peut être effectuée selon les conditions réactionnelles de Van Leusen.²¹⁰ Ces conditions mettent en jeu du TosMIC en milieu basique à 80°C et ont permis d'obtenir les produits **35a** et **35b** avec respectivement 65 % et 90 % de rendement (Figure 113).

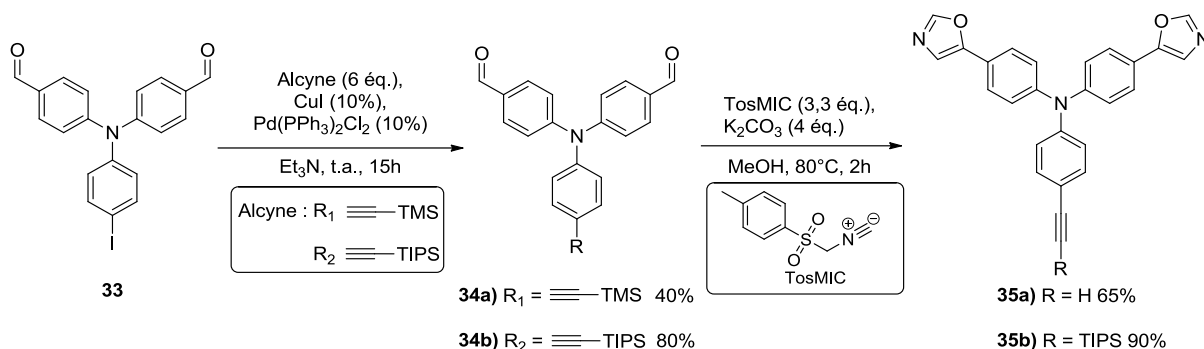


FIGURE 113 ÉTAPE DE SONOGASHIRA ET FORMATION DES NOYAUX OXAZOLES.

Cependant, les conditions classiques utilisées ont eu pour effet de cliver le groupement TMS présent sur le composé **34a** libérant ainsi l'alkyne vrai **35a**. Cet alkyne vrai est problématique pour l'incorporation des noyaux pyridines *via* l'étape de C-H activation développée par l'Institut Curie. En effet, cette étape met en jeu l'hydrogène présent en position 2 de l'oxazole possédant un pKa de 27,1 (mesuré dans le DMSO selon la table de Bordwell et Evans),^{211,212} contre un pKa de 28,8 pour celui de l'alkyne (Figure 114).^{211,212} Une compétition peut donc avoir lieu entre ces deux positions et conduire à un mélange de deux produits (réaction de C-H activation ou couplage de Sonogashira), ce qui n'est pas le cas avec le composé **35b**.

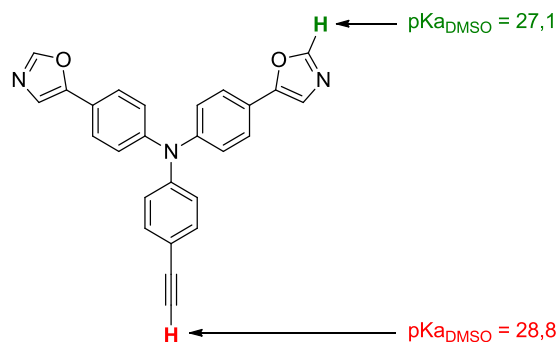


FIGURE 114 DIFFÉRENCE DE pKa ENTRE LE PROTON DE L'ALCYNE VRAI ET LE PROTON EN POSITION 2 DE L'OXAZOLE.

Malgré cette faible différence de pKa, cette réaction de C-H activation a été effectuée sur les produits **35a** et **35b**. Concernant l'alkyne vrai **35a**, le produit de Sonogashira non désiré a été obtenu avec un rendement de 85 %. Cependant, concernant le produit **35b** protégé par le groupement TIPS, la C-H activation a permis d'obtenir le produit **36b** souhaité avec un rendement de 50 % (Figure 115).

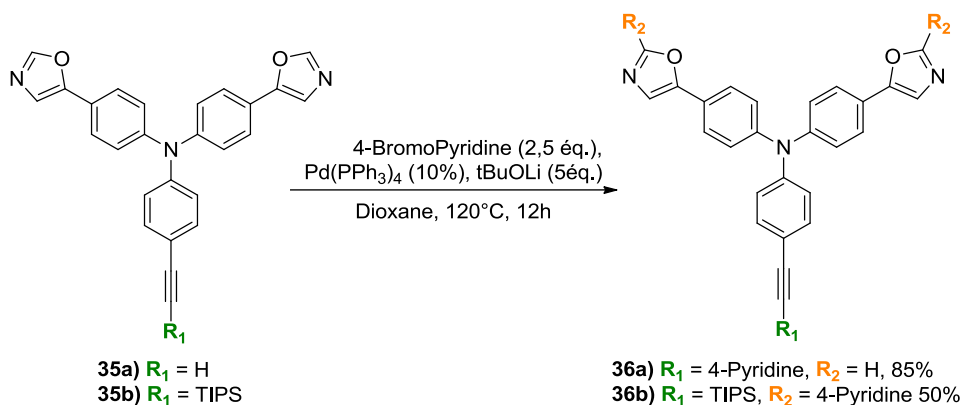


FIGURE 115 FONCTIONNALISATION DE LA POSITION 2 DE L'OXAZOLE PAR RÉACTION DE C-H ACTIVATION.

Le rendement moyen du produit **36b** s'explique par les conditions réactionnelles strictes et rigoureuses de C-H activation développées par l'Institut Curie :

- La base (*t*-BuOLi) doit impérativement être fraîchement resublimée.
- Un long dégazage des solvants est nécessaire.
- Le palladium tétrakis (Pd(PPh₃)₄) employé doit également être fraîchement préparé.

Avant d'effectuer l'étape de jonction par réaction de CuAAC entre le piège à protéines (analogue de l'epicocconone) et le ligand de l'ADN, le clivage du groupement TIPS est nécessaire. Pour cela, plusieurs conditions ont été essayées et sont résumées ci-dessous (Figure 116, Tableau 5).²⁰⁹

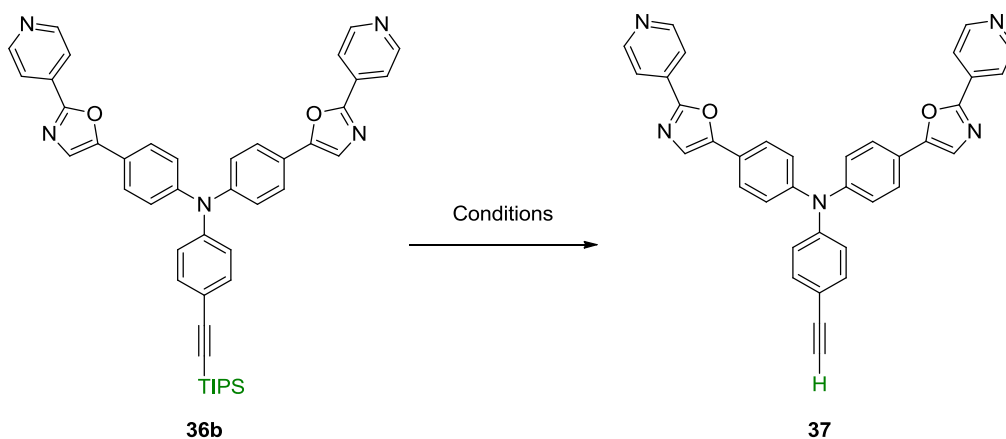


FIGURE 116 ÉTAPE DE DÉPROTECTION DU GROUPEMENT TIPS PRÉSENT SUR LA FONCTION ALCYNE.

Conditions	Résultats
TBAF (2 éq.), THF, ta, 1h	Déprotection réussie, mais élimination des sels résiduels accompagnant le composé 37 impossible.
TBAF (1 éq.), THF, ta, 1h	
KF (1,5 éq.), AgNO ₃ (1,5 éq.), MeOH, ta, 4h	Déprotection partiellement effectuée (50-80 % par RMN) et présence de complexes d'argent accompagnant le composé 37 .
AgF (1 éq.), MeOH, ta, 4h	Déprotection partiellement effectuée (50-80 % par RMN), mais élimination des sels résiduels accompagnant le composé 37 impossible.
NaOH 1M (1 éq.), THF/H ₂ O, 80°C, 8h	20 % de déprotection du composé 37 observée par RMN avec présence de nombreux sous-produits.
HF (2 éq.), THF, ta, 10h	Aucune réaction, obtention du produit de départ 36b .
HF (excès), THF, ta, 20h	

TABLEAU 5 RÉCAPITULATIF DES CONDITIONS DE DÉPROTECTION DU GROUPEMENT TIPS.

Les meilleurs résultats ont ainsi été obtenus en utilisant le fluorure de tetrabutylammonium (TBAF), cependant le produit n'a jamais pu être isolé de manière satisfaisante. En effet, ce dernier est toujours accompagné de sels dont l'élimination nécessite de nombreux lavages acido-basiques en contrepartie d'une très grosse perte du produit **37** en phase aqueuse.

La seconde approche élaborée envisage, dans un premier temps l'introduction des groupements pyridines par C-H activation, puis dans un second temps l'introduction de la fonction alcyne par couplage de Sonogashira. Cette approche permet de s'affranchir des conditions rudes nécessaires à la déprotection du groupement TIPS.

2.2.2.1.1.2. SECONDE APPROCHE DE SYNTHÈSE LINÉAIRE.

Cette seconde stratégie débute par la formation des noyaux oxazoles selon les conditions de Van Leusen en partant du composé **32** di-formylé précédemment synthétisé. Dans ces conditions, le composé **38** est obtenu avec 90 % de rendement. S'ensuit l'introduction des groupements pyridines dans les conditions de C-H activation développées à l'Institut Curie. Le composé **31** est obtenu avec 45 % de rendement sur cette étape (Figure 117).

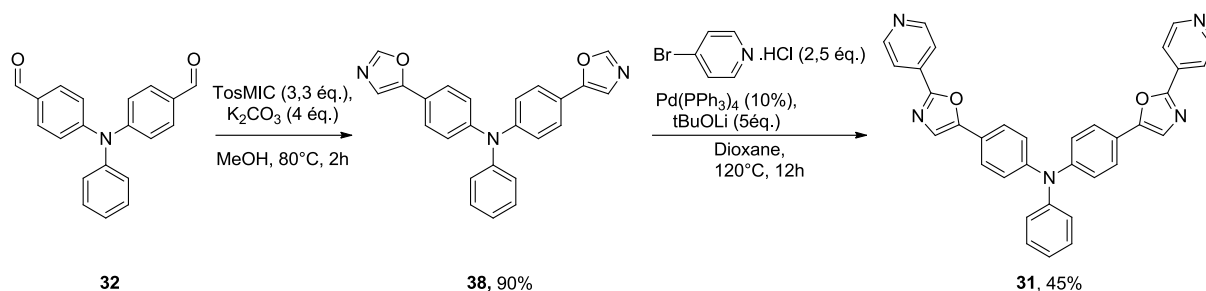


FIGURE 117 SYNTHÈSE DU COMPOSÉ 31.

Cependant, l'introduction de l'atome d'iode servant à l'insertion de la fonction alcyne a été un échec, et seul le produit de départ a été observé malgré l'utilisation des conditions opératoires ayant fonctionnées préalablement. Ceci étant peut-être dû à un manque de réactivité de la triphénylamine, appauvrie en électrons par les groupements oxazoles-pyridines (Figure 118).

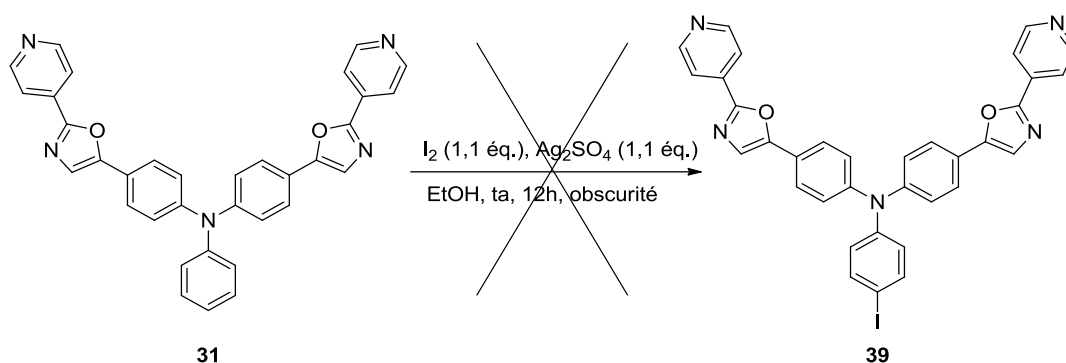


FIGURE 118 ÉCHEC DE SYNTHÈSE DU COMPOSÉ 39.

L'utilisation de la réaction de C-H activation étant difficilement reproductible, comme l'ont démontrés les échecs précédents, une nouvelle approche a été envisagée en s'affranchissant de cette étape. L'objectif est alors de conserver l'atome d'halogène le plus longtemps possible et ainsi d'introduire la fonction alcyne plus tardivement, autorisant alors l'utilisation du groupement protecteur TMS, très facile à cliver.

2.2.2.1.1.3. TROISIÈME APPROCHE DE SYNTHÈSE LINÉAIRE.

Cette troisième et dernière approche débute par l'introduction du motif 2-aminocétone par acylation de Friedel-Craft, dans le but de réaliser la réaction de cyclisation oxydante catalysée à l'iode permettant d'obtenir le noyau oxazole. De nombreuses tentatives d'acylation de Friedel-Craft ont été tentées en présence de trois composés : le composé **49** qui est facile à fonctionnaliser en amine primaire, le composé **60** dont la déprotection du phthalimide en amine primaire est aisée, et le composé **50** servant de témoin.^{213,214} Les résultats obtenus sont résumés ci-dessous (Figure 119, Tableau 6) :

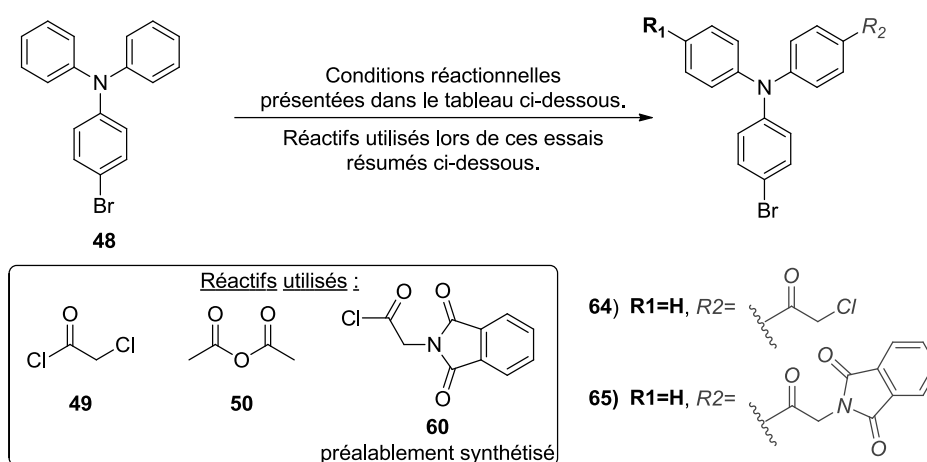


FIGURE 119 TENTATIVE D'ACYLATION DE FRIEDEL-CRAFT.

	SOLVANT	ACIDE DE LEWIS	RÉACTIF	TEMPÉRATURE	RÉSULTATS
1	DCM	AlCl ₃ (16 éq.) ^{202,203}	49 (16 éq.)	23°C	Trace de 64 (<2 %)
2	DCM	AlCl ₃ (16 éq.) ^{202,203}	49 (16 éq.)	50°C	Trace de 64 (<2 %)
3	DCM	AlCl ₃ (6 éq.) ^{202,203}	49 distillé (6 éq.)	23°C	Trace de 64 (<2 %)
4	DCM	AlCl ₃ (6 éq.) ^{202,203}	50 (6 éq.)	23°C	Produit de départ
5	DCM	AlCl ₃ (6 éq.) ^{202,203}	60 (6 éq.)	23°C	Produit de départ
6	DCM	Yb(OTf) ₃ (2 éq.) ²⁰⁴	49 (4 éq.)	50°C	Produit de départ
7	NO ₂ CH ₃	Yb(OTf) ₃ (2 éq.) ²⁰⁴	49 (4 éq.)	50°C	Produit de départ
8	Aucun	ZnO (1 éq.) ²⁰⁵	49 (2,2 éq.)	23°C	Produit de départ

TABEAU 6 TABLEAU RÉCAPITULATIF DES TENTATIVES D'ACYLATION DE FRIEDEL-CRAFT.

Les résultats obtenus sont décrits ci-dessous :

- La température n'influence en aucun cas la quantité de produit désirée obtenue, comme les entrées 1 et 2 le stipulent.
- Les quantités en acide de Lewis ajoutées n'ont aucune influence sur la quantité de produit obtenue, comme le montrent les entrées 1 et 3.
- La nature du substrat n'influence pas le résultat de la manipulation, comme les entrées 1, 4 et 5 peuvent le démontrer.^{213,214}
- L'acide de Lewis utilisé ainsi que le solvant utilisé n'ont aucune répercussion sur le résultat, comme l'attestent les entrées 1, 6, 7 et 8.^{204,205}

Pour les conditions ayant fonctionnées (entrées 1, 2, 3 et 5), seules des traces de produits mono-acétylés ont été observées. Malgré les quelques exemples de Friedel-Craft sur la triphénylamine décrits dans la littérature,^{202–208,214} aucun résultat n'a pu être exploité de cette approche. Ce manque de réactivité serait peut-être dû à une éventuelle complexation entre le noyau triphénylamine et l'acide de Lewis ainsi qu'à des réactions radicalaires possibles, le noyau triphénylamine étant un excellent donneur d'électrons.

Suite à l'échec de ces trois approches de synthèses linéaires, une nouvelle stratégie convergente a été envisagée et est détaillée ci-dessous.

2.2.2.1.2. SYNTHÈSE CONVERGENTE.

Cette nouvelle stratégie de synthèse convergente est basée sur un couplage pallado-catalysé de Suzuki entre deux fragments clefs : un fragment triphénylamine **66** et un fragment oxazole-pyridine **65** (Figure 120). Deux voies de fonctionnalisation de ces fragments sont alors envisagées (Figure 120) :

- La voie A : le fragment triphénylamine **66a** portant la fonction acide boronique et le fragment oxazole-pyridine **65a** portant la fonction iodée (Encadré noir Figure 120).
- La voie B : le fragment triphénylamine **66b** portant la fonction iodée et le fragment oxazole-pyridine **65b** portant la fonction acide boronique (Encadré rose Figure 120).

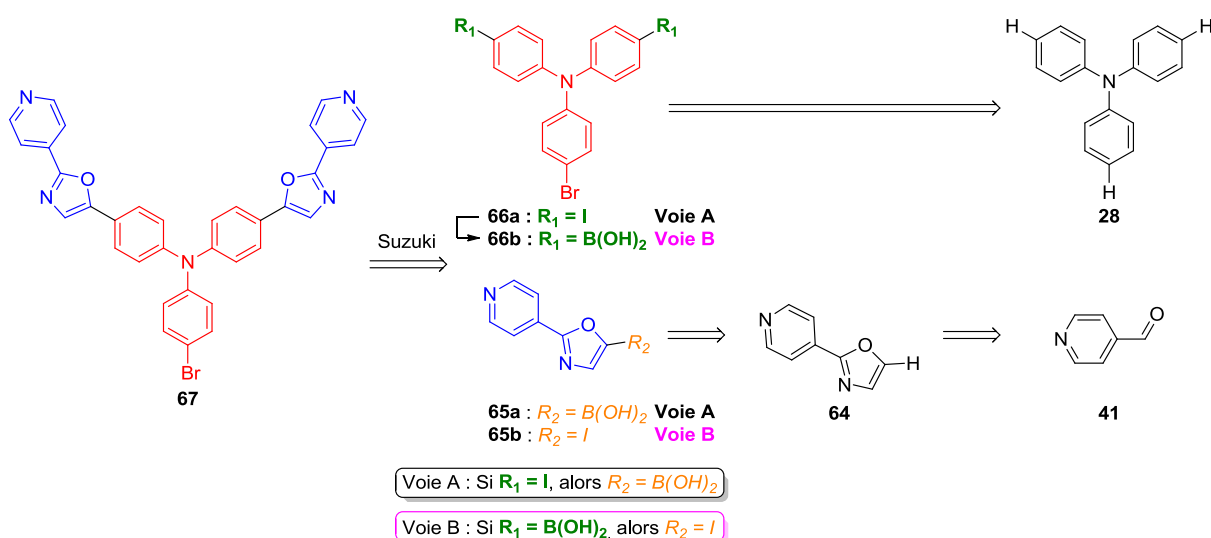


FIGURE 120 STRATÉGIES DE SYNTHÈSE CONVERGENTE UTILISANT UN COUPLAGE DE SUZUKI.

Le noyau triphénylamine **28** sera fonctionnalisé par deux atomes d'iode et un atome de brome. Une telle fonctionnalisation va permettre de discriminer une position par rapport à l'autre. Ainsi le couplage de Sonogashira entre le composé **66a** et le composé **65a**, sera plus aisé sur les atomes d'iode que sur l'atome de brome. L'utilisation de cette même discrimination va permettre la transformation du composé **66a** en **66b**, nécessaire à la voie B (Figure 120).

2.2.2.1.2.1. SYNTHÈSE DES PREMIERS FRAGMENTS TRIPHÉNYLAMINE **66A** ET **66B**.

Ce premier fragment **66a** a ainsi pu être synthétisé en deux étapes (Figure 121) en effectuant dans un premier temps une mono-bromation de la triphénylamine commerciale²¹⁵ donnant le produit **48** avec un rendement de 95 %. Puis dans un second temps, les deux derniers phényles sont iodés en présence de KIO_3 et de KI ,²¹⁶ conduisant au produit **66a** nécessaire à la voie A, avec un rendement de 95 % également (Figure 121).

Ce composé **66a** est utilisé comme précurseur du composé **66b** nécessaire à la voie B. Les groupements pinacolboranes ont ainsi pu être introduits avec un rendement de 70 % sur cette étape (Figure 121).²¹⁵

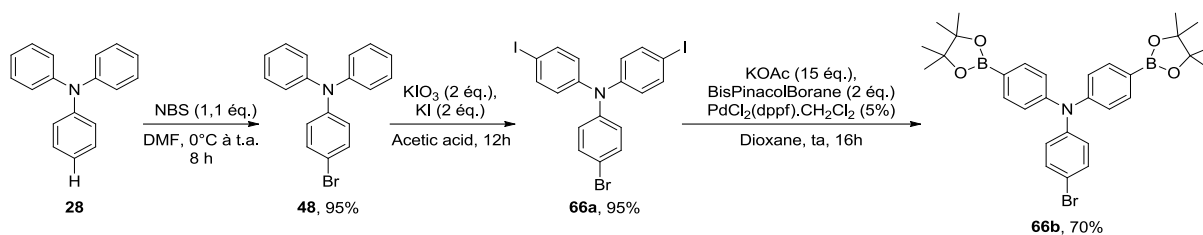


FIGURE 121 SYNTHÈSE DES FRAGMENTS 66A ET 66B.

Le fragment triphénylamine **66a** a ainsi été synthétisé pour la voie A avec un rendement de 90 % sur deux étapes, et le composé **66b** pour la voie B avec un rendement de 63 % sur trois étapes.

2.2.2.1.2.2. SYNTHÈSE DES PRÉCURSEURS OXAZOLE-PYRIDINE 65A ET 65B.

Le précurseur oxazole-pyridine **64** nécessaire à l'obtention des fragments **65a** et **65b**, provient d'une cyclo-déshydratation d'un dérivé aminoacétal *via* l'utilisation d'un dérivé du réactif d'Eaton, un mélange d'acide sulfurique concentré et de pentoxyde de phosphore (Figure 122).^{217,218}

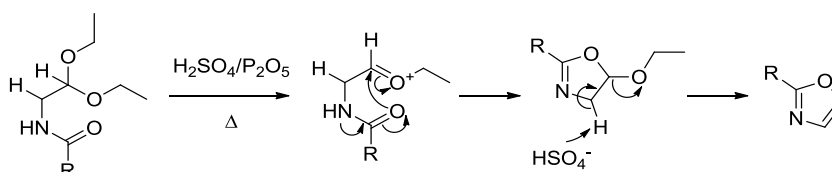


FIGURE 122 MÉCANISME DE CYCLO-DÉSHYDRATATION UTILISANT LE RÉACTIF D'EATON.

Ce fragment **64** a pu être synthétisé avec un rendement de 90 % sur deux étapes en partant de la 4-pyridine carboxaldehyde **41** (Figure 123). La seconde étape reste cependant délicate.^{217,218} En effet, il s'agit de conditions très rudes nécessitant une neutralisation et une extraction délicates.

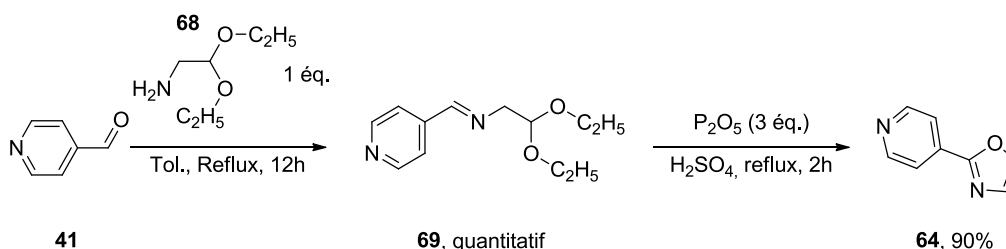


FIGURE 123 SYNTHÈSE DU COMPOSÉ 64.

Les voies A et B précédemment citées nécessitent respectivement la fonctionnalisation de la position 5 de l'oxazole **64** par un groupement acide boronique et un atome d'halogène.

Concernant la fonctionnalisation en acide boronique, plusieurs conditions réactionnelles ont été testées et sont résumées ci-dessous (Figure 124, Tableau 7) :

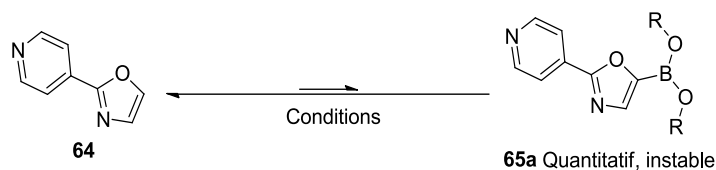


FIGURE 124 TENTATIVES DE BORYLATION DU NOYAU OXAZOLE-PYRIDINE 64.

Entrée	Conditions	Résultats
1	n-BuLi (2,5M, 1,2 éq.), B(OiPr) ₃ (1,2 éq.), THF, -78°C → ta, 3h	Formation de l'acide boronique et récupération du produit de départ.
2	n-BuLi (2,5M, 1,2 éq.), B(OiPr) ₃ (1,2 éq.), pinacol (1,2 éq.), THF, -78°C → ta, 3h	
3	Pinacol borane (1,5 éq.), [Ir(COD)(OMe)] ₂ (0,02 éq.), dbtpp (0,06 éq.), THF, ta, 3h	

TABLEAU 7 TABLEAU RÉCAPITULATIF DES CONDITIONS UTILISÉES POUR LA BORYLATION DU NOYAU 64.

Dans chacun des cas listés ci-dessus, l'acide boronique a été observé par RMN. Cependant après purification, l'analyse ne révèle aucune trace du produit désiré. Il s'avère que le dérivé boronique (acide comme ester) est très instable, ce qui entraîne une déborylation rapide. Ce phénomène a d'ailleurs déjà été observé par l'équipe du docteur Rault.²¹⁹ Cette instabilité a conduit à l'abandon de la voie A au profit de la voie B.

La voie B (Figure 125) repose sur la fonctionnalisation du noyau oxazole par un atome d'halogène. Différentes conditions réactionnelles ont ainsi été testées, et sont résumées ci-dessous (Figure 125, Tableau 8).

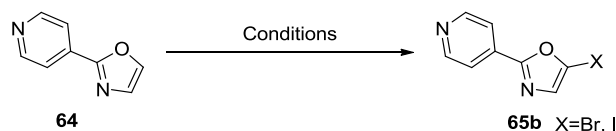


FIGURE 125 TENTATIVES D'HALLOGÉNERATION DU COMPOSÉ 64.

Entrée	Conditions	Résultats
1	NBS (1,2 éq.), CHCl ₃ , ta, 12h	Aucune bromation observée
2	NBS (1,2 éq.), CHCl ₃ , reflux, 12h	Aucune bromation observée
3	NBS (1,2 éq.), MeCN, ta, 12h	Aucune bromation observée
4	NBS (1,2 éq.), DMF, ta, 12h	Aucune bromation observée
5	<i>n</i> -BuLi (2 éq.), I ₂ (1 éq.), THF, -78°C, 4h	Fortes dégradations

TABLEAU 8 TABLEAU RÉCAPITULATIF DES CONDITIONS UTILISÉES POUR L'HALLOGÉNATION DU COMPOSÉ 64.

Quelles que soient les conditions utilisées, aucune halogénéation n'a été observée, ce qui a conduit à l'abandon de la voie B.

La synthèse des intermédiaires halogénés ainsi que des acides boroniques du fragment oxazole-pyridine n'ayant pas pu être achevée, le couplage de Suzuki n'a pas pu être réalisé. Une autre stratégie, qui sera développée ci-après, consiste à réaliser un couplage par C-H activation, entre les fragments 64 et 66a.

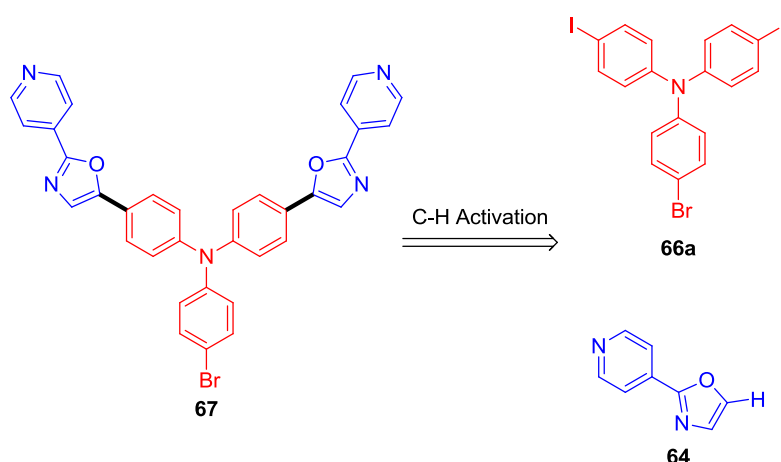


FIGURE 126 RÉACTION DE C-H ACTIVATION ENVISAGÉE ENTRE LES COMPOSÉS 66a ET 64.

2.2.2.2. SECONDE VOIE DE SYNTHÈSE, LA C-H ACTIVATION « ON WATER ».

2.2.2.2.1. LA C-H ACTIVATION, UN ACCÈS RAPIDE À DES STRUCTURES COMPLEXES.

Les réactions de C-H activation sont des méthodes innovantes et très utiles dans la construction de composés complexes. Leur emploi permet l'utilisation de synthons de départ simples facilitant grandement les stratégies de synthèses. Ce type de réaction se caractérise également par une forte économie d'atome en adéquation avec les principes de la chimie verte, dont l'essor actuel n'est plus à souligner. Néanmoins et de façon assez ironique, ces C-H activation nécessitent l'utilisation de métaux de transition allant de l'indium au palladium, qui sont des métaux rares possédant une certaine toxicité.

2.2.2.2.1.1. LES DÉBUTS DE LA C-H ACTIVATION.

Depuis les années 2000, un large panel de réactions de C-H activation a été mis au point par divers laboratoires et un cycle catalytique général a été admis pour ce type de réaction (Figure 127) :^{220–229}

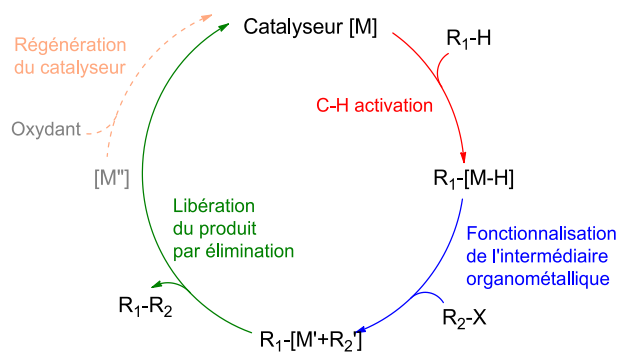


FIGURE 127 MÉCANISME GÉNÉRAL DE C-H ACTIVATION.²²⁷

Ce cycle catalytique peut être résumé en quatre grandes étapes :

- L'activation de la liaison R_1-H ; pendant laquelle le substrat va se complexer au catalyseur métallique ($R_1-[M-H]$).
- La réaction avec le partenaire R_2-X ; pendant laquelle un complexe [substrat-catalyseur-réactif] sera formé ($R_1-[M'+R_2']$).
- La libération du produit par élimination réductrice ; pendant laquelle une élimination a lieu, libérant le produit et le catalyseur réduit.
- Dans certains cas, la régénération du catalyseur par une réoxydation est nécessaire afin de le rendre disponible pour un nouveau cycle.

Les premiers exemples de C-H activation furent réalisés dans la fin des années 1990 par l'équipe du docteur Miura,²³⁰ dans des conditions devenues classiques. Celles-ci font intervenir une source de palladium 0 associée à un ligand phosphine dans le DMF à chaud (Figure 128) :^{231,232}

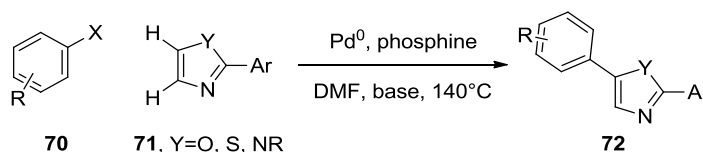


FIGURE 128 CONDITIONS CLASSIQUES UTILISÉES POUR LES RÉACTIONS DE C-H ACTIVATION DE MIURA.

Cependant, ces conditions réactionnelles sont très rudes puisque ces réactions se font à haute température (supérieure à 100°C) et nécessitent ainsi l'utilisation de solvants comme

le DMF. Trouver des conditions plus douces permettrait de rendre compatible un plus large nombre de groupements fonctionnels.

2.2.2.2.1.2. AMÉLIORATION DES CONDITIONS DE C-H ACTIVATION, UTILISATION DE L'EAU ET L'EFFET « ON WATER ».

Depuis les années 2010, de nombreux groupes se sont intéressés au développement de cette réaction de C-H activation en utilisant des conditions douces et des solvants verts.^{227,233–239} L'utilisation de l'eau, en particulier en tant que solvant, confère de nombreux avantages, tels que :

- Un coût quasiment nul.
- Le qualificatif de solvant vert.
- Une non toxicité.
- Une facilité de manipulation : purification facile.
- Une bonne conductivité thermique en cas de chauffage.

Cependant, la majorité des composés utilisés en chimie organique sont souvent caractérisés par une forte hydrophobie. Pour résoudre ce problème, il est souvent nécessaire d'introduire des groupements hydrosolubles. Malheureusement, ce gain de solubilité peut se traduire par une perte d'efficacité de la réaction de C-H activation. Néanmoins, il est possible d'effectuer des réactions avec un composé insoluble dans l'eau grâce à l'effet « on water » décrit par Sharpless en 2005.²⁴⁰ Ce phénomène reste peu compris et de nombreuses hypothèses sont émises sur son fonctionnement.

On peut comparer l'effet obtenu à celui de la cycloaddition de Diels-Alder. En effet, il est nécessaire qu'une proximité spatiale soit présente entre le diénophile **73** et le diène **74**. Cette proximité est généralement facilitée à haute concentration ou pression. Mais une autre approche est possible *via* la formation d'agrégats hydrophobes dans lesquels la réaction a lieu. Ces agrégats peuvent être générés en utilisant le caractère hydrophobe des composés, créant ainsi un effet « on water » (Figure 129). Pour ces réactions de Diels-Alder, il est également possible que la vitesse de réaction accrue dans l'eau soit liée aux liaisons hydrogènes.^{241–243}

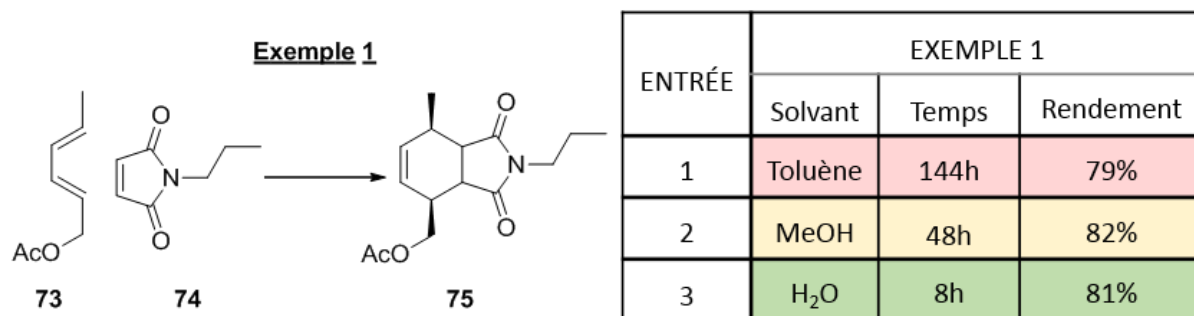


FIGURE 129 EXEMPLE D'AMÉLIORATION D'UNE RÉACTION DE DIELS-ALDER AVEC L'EFFET « ON WATER » DÉCRIT PAR SHARPLESS

Néanmoins, si on prend l'exemple mettant en jeu l'ouverture d'un époxyde par une pipérazine, l'effet « on water » est exprimé d'une façon différente (Figure 130). Malgré la nécessité d'un rapprochement spatial des réactifs pour que la réaction ait lieu, il semblerait que ce soit avant tout une hydrosolubilité partielle de chacun des réactifs qui gouverne la réaction et tende à déplacer l'équilibre vers la formation du produit **78**.^{238,240,244,245} De plus, il est possible que la présence d'eau accélère la vitesse de réaction, *via* la formation de liaisons hydrogènes avec l'époxyde, exacerbant ainsi son caractère électrophile.

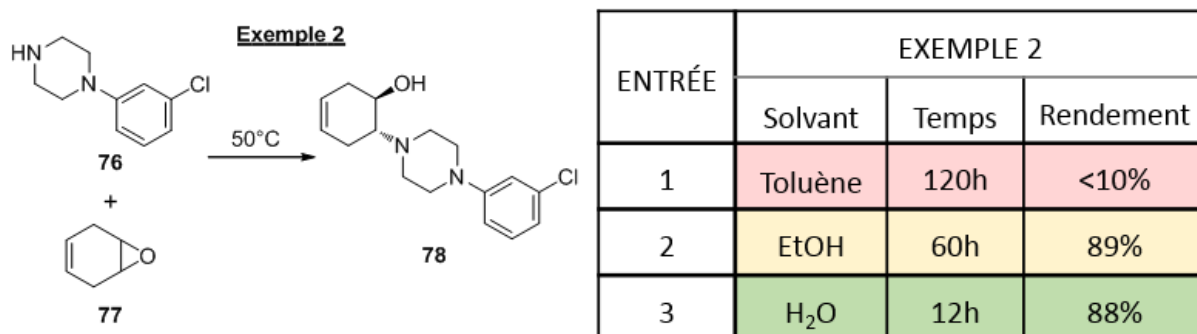


FIGURE 130 EXEMPLE DE L'AMÉLIORATION D'UN ADDITION NUCLÉOPHINE D'UNE PIPÉRAZINE SUR UN ÉPOXYDE AVEC EFFET « ON WATER » DÉCRIT PAR SHARPLESS.

Comme le montrent ces exemples ainsi que ceux de la bibliographie,^{222,227,233,234,238,240,244} cet effet « on water » permet donc d'accélérer la vitesse de réaction ou d'améliorer le rendement. De plus, l'utilisation de ces conditions vis-à-vis des solvants organiques seuls, permet d'envisager l'utilisation de produits peu solubles en jouant sur leur solubilité partielle ou la formation d'agrégats hydrophobes.

Dans ce deuxième cas, utilisant exclusivement de l'eau, la notion de « in water » pourrait être employée. Néanmoins, comme l'explique le professeur Hayashi,²⁴⁶ une différence existe entre l'effet appelé « in presence of water » par Hayashi (correspondant à l'effet « on water » de Sharpless, pionnier dans la matière) et l'effet « in water ». En effet, parmi les réactions pouvant correspondre à l'effet « in water » se trouvent les réactions dans lesquelles au moins un des réactifs participant au bilan réactionnel est totalement dissout. En revanche, dans l'effet « in presence of water » (ou « on water »), les réactions ont lieu dans le peu de phase organique qui se retrouve concentrée par la présence de l'eau. Cet effet est également appelé « concentrated organic phases » par le professeur Janda.²⁴⁵

En s'appuyant sur toutes ces observations, l'équipe du professeur Greaney a développé une méthode de fonctionnalisation d'hétérocycles par C-H activation en utilisant l'effet « on water » décrit par Sharpless²⁴⁷⁻²⁵⁰ ou « in presence of water » par Hayashi.²⁴⁶

2.2.2.2. ARYLATION DIRECTE DE DIFFÉRENTS HÉTÉROCYCLES AZOTÉS PAR C-H ACTIVATION « ON WATER ».

2.2.2.2.1. LES THIAZOLES.

Les premiers travaux de l'équipe du professeur Greaney en 2007, concernent l'arylation directe de thiazoles selon une méthodologie innovante mettant en jeu un halogénure d'aryle et la position 5 du 2-phénylthiazole.²⁵⁰ Cette méthodologie est basée sur l'emploi d'un catalyseur au palladium Pd(ddpf)Cl₂ associé à de la triphénylphosphine, en présence d'un excès de carbonate d'argent, dans l'acétonitrile à 60 °C ou dans l'eau.

Un large éventail de composés a ainsi été synthétisé en faisant varier les groupements présents en position *para* du 2-phénylthiazole, mais également sur l'halogénure d'aryle. Des

groupements aussi bien donneurs (-Me, -OMe) qu'attracteurs (-CF₃, -NO₂) sont ainsi tolérés (Figure 131) :²⁵⁰

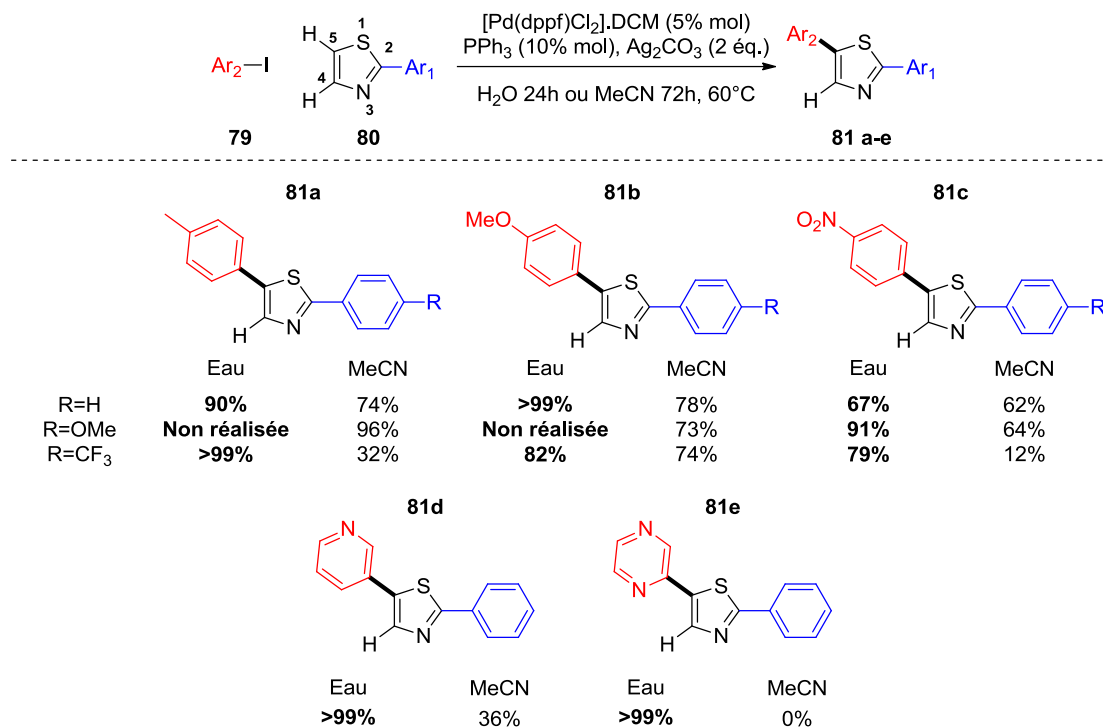


FIGURE 131 EXEMPLES DE COMPOS\u00c9S SYNTH\u00c9TIS\u00c9S PAR L'\u00c9QUIPE DE GREANEY EN UTILISANT SA M\u00c9THODOLOGIE.

L'exp\u00e9rience a montr\u00e9 que l'utilisation de l'eau permettait de r\u00e9duire le temps de r\u00e9action (passant de trois \u00e0 un jour) mais \u00e9galement d'augmenter de fa\u00e7on consid\u00e9rable le rendement.²⁵⁰ Suite \u00e0 ces observations, d'autres h\u00e9t\u00e9rocycles ont \u00e9t\u00e9 \u00e9valu\u00e9s comme les benzoxazoles (**82**), benzothiazoles (**83**), benzimidazoles (**84**) mais surtout les oxazoles (**85**), correspondant au projet de cette th\u00e8se (Figure 132) :²⁵⁰

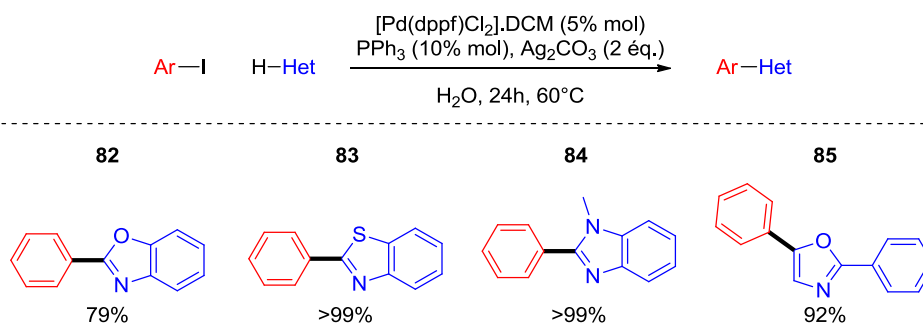


FIGURE 132 AUTRES EXEMPLES DE C-H ACTIVATION « ON WATER » EFFECTU\u00c9S PAR L'\u00c9QUIPE DE GREANEY.

2.2.2.2.2.2. LES OXAZOLES.

Les noyaux oxazoles ont été profondément étudiés par cette équipe. En effet, ces oxazoles sont souvent présents dans certains produits naturels comme la basolxine (issue d'une plante *Amyris balsamifera*), la télomestatine²⁵¹ (inhibiteur des télomérases) et la texaline²⁵² (produit actif contre la tuberculose) (Figure 133).

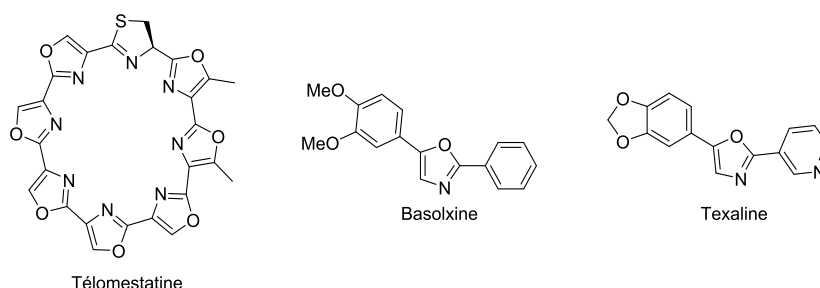


FIGURE 133 STRUCTURES DE TROIS PRODUITS NATURELS POSSÉDANT UN OU DES MOTIFS OXAZOLES.

La méthodologie précédemment développée a ainsi été appliquée à la fonctionnalisation de la position 5²⁴⁸ (Figure 134) des noyaux oxazoles et s'est révélée être très générale et à haut rendement.

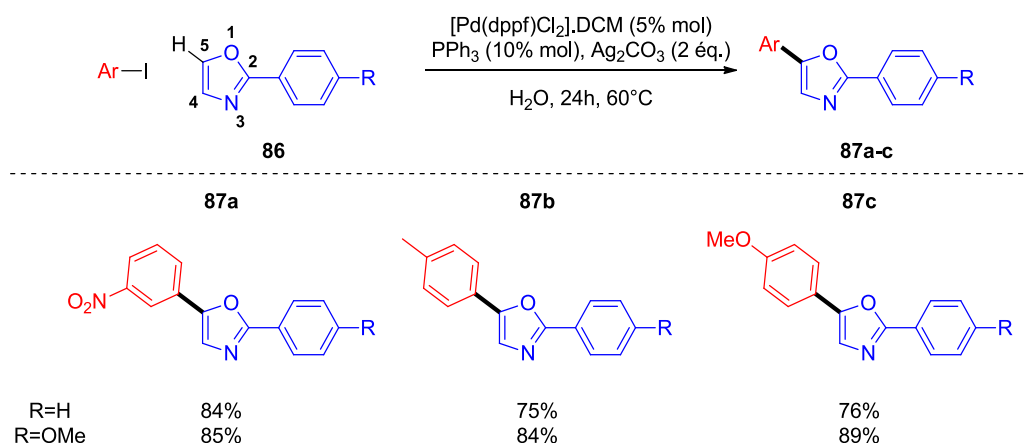


FIGURE 134 EXEMPLES DE C-H ACTIVATIONS DE LA POSITION 5 DE TROIS DÉRIVÉS OXAZOLES.

Cette même méthodologie a été étendue à la fonctionnalisation de la position 2²⁴⁹ de ces oxazoles, cas correspondant à ce projet de thèse. Des réactivités et des rendements similaires à ceux obtenus sur la position 5 sont observés (Figure 135).

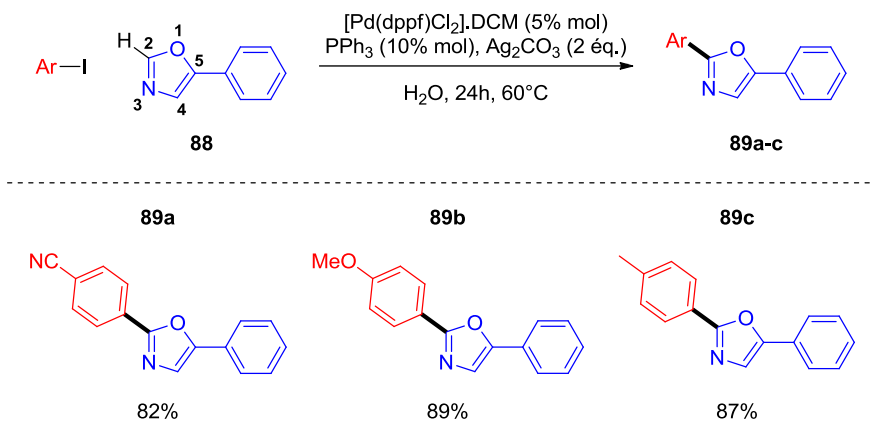


FIGURE 135 EXEMPLES DE C-H ACTIVATIONS DE LA POSITION 2 DU 5-PH\u00c9NYL-OXAZOLE.

Pour finir, cette m\u00e9thodologie a \u00e9t\u00e9 utilis\u00e9e pour synth\u00e9tiser deux produits naturels en fonctionnalisant la position 5 des noyaux oxazoles (Figure 136 et Figure 137). La basolxine a ainsi \u00e9t\u00e9 isol\u00e9e en deux \u00e9tapes avec 70 % de rendement global, contre 40 % obtenus pr\u00e9c\u00e9demment en 7 \u00e9tapes par les \u00e9quipes des docteurs Hodgetts et Kershaw (Figure 136).²⁵³

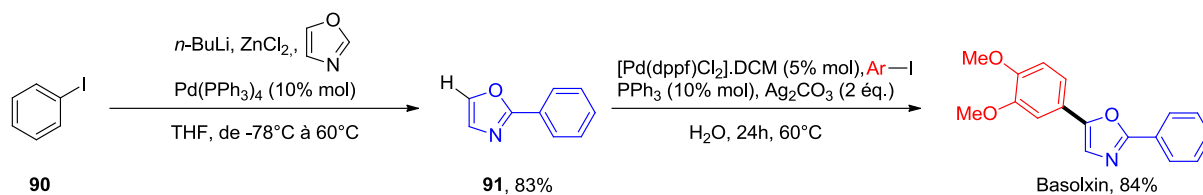


FIGURE 136 SYNTH\u00c8SE TOTALE DE LA BASOLXINE EN DEUX \u00c9TAPES PAR L'\u00c9QUIPE DE GREANEY.

De la m\u00eame mani\u00e8re, la texaline a \u00e9t\u00e9 synth\u00e9tis\u00e9e avec 58 % de rendement global alors que l'\u00e9quipe du docteur Copp²⁵⁴ l'avait pr\u00e9c\u00e9demment obtenue en 6 \u00e9tapes avec un rendement de 4 % (Figure 137).

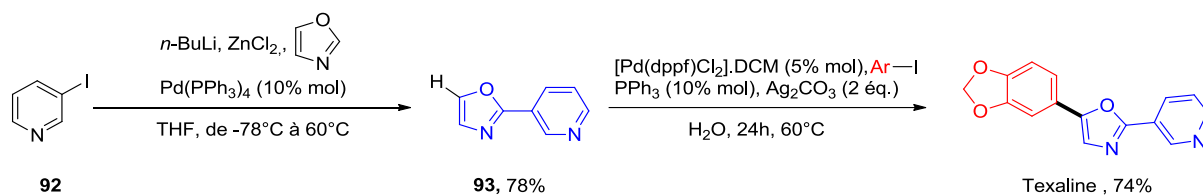


FIGURE 137 SYNTH\u00c8SE TOTALE DE LA TEXALINE EN DEUX \u00c9TAPES PAR L'\u00c9QUIPE DE GREANEY.

La m\u00e9thode de C-H activation « on water » d\u00e9velopp\u00e9e par l'\u00e9quipe du professeur Greaney est innovante, et permet un acc\u00e8s simple et rapide \u00e0 diff\u00e9rents h\u00e9t\u00e9rocycles comme les oxazoles. Cette m\u00e9thode peut ainsi \u00eatre utilis\u00e9e afin d'obtenir les oxazoles d\u00e9sir\u00e9s pour ces travaux de th\u00e8ses. Cependant, malgr\u00e9 le r\u00f4le encore incompris du carbonate d'argent, sa pr\u00e9sence est n\u00e9cessaire au bon fonctionnement de la r\u00e9action de C-H activation.

2.2.2.2.3. L'IMPORTANCE DE L'ARGENT DANS LES COUPLAGES Pd/Ag.

2.2.2.2.3.1. LE RÔLE DE L'ARGENT DANS LES COUPLAGES Pd/Ag.

Malgré une utilisation récurrente des sels d'argent en association avec des dérivés iodés (comme c'est le cas avec les conditions utilisées par le professeur Greaney), leurs rôles dans les réactions de C-H activation restent incompris.^{255,256} Ces sels d'argent sont souvent sous forme de carboxylate ou de carbonate et sont suspectés de participer à différents processus (Figure 138) :^{257,258}

- Piéger l'iode libéré *in situ* en générant des halogénures d'argent inertes.
- Ré-oxyder le palladium pendant le cycle catalytique.
- Servir de base.

Cependant leurs substitutions par d'autres composés aux propriétés identiques tel que le Cs_2CO_3 ²⁵⁷ n'aboutissent pas à des résultats concluants, indiquant ainsi un rôle beaucoup plus important joué par les sels d'argent.

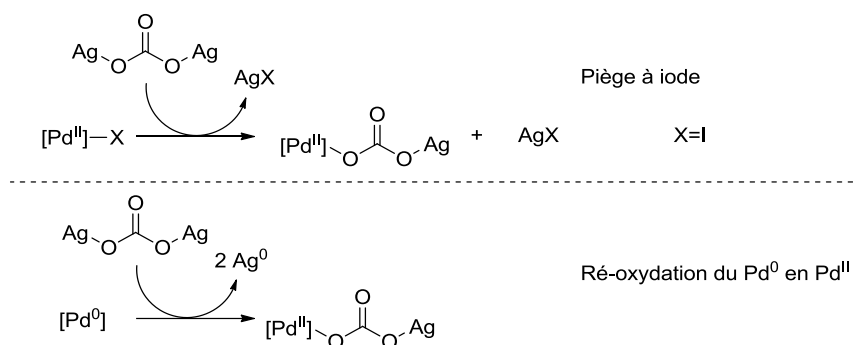


FIGURE 138 DEUX RÔLES SUPPOSÉS DES SELS D'ARGENT DANS LES RÉACTIONS DE C-H ACTIVATION.

Les groupes du professeur Larossa (2016)²⁵⁷, du professeur Hartwig (2016)²⁵⁹ et du professeur Sanford (2017)²⁵⁸, ont mis en évidence la présence d'une espèce « Ar-Ag » en solution. Cette espèce interviendrait dans le cycle catalytique, en effectuant une étape de transmétallation avec le complexe palladique (Figure 139). Ainsi deux mécanismes, proposés par le professeur Sanford, sont possibles :

- Soit par médiation de l'argent en clivant la liaison C-H, formant une espèce intermédiaire nécessaire à l'étape de transmétallation.
- Soit par clivage de la liaison C-H *via* un complexe bimétallique Pd/Ag.

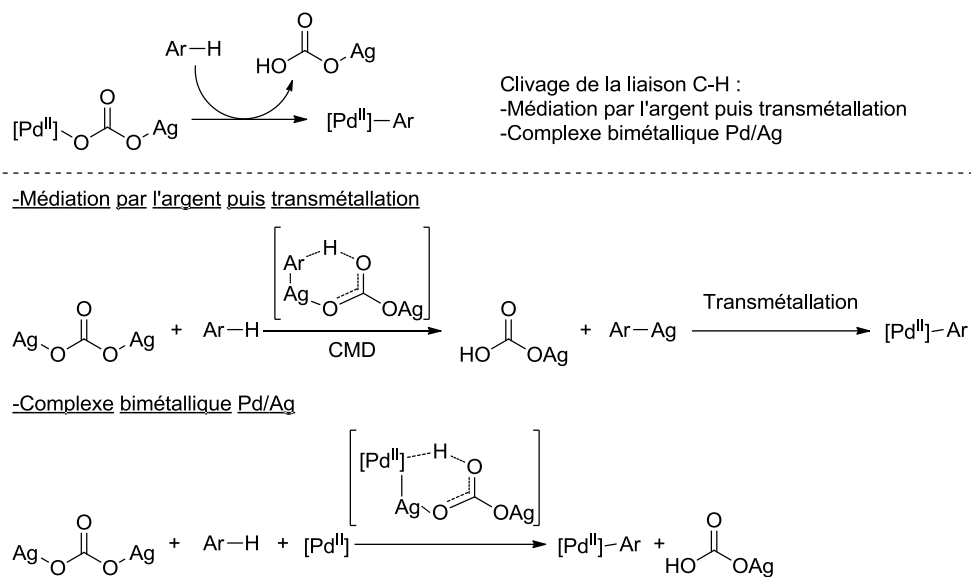


FIGURE 139 DIFFÉRENTS RÔLES TENUS PAR L'ARGENT DANS LES RÉACTIONS DE C-H ACTIVATION.

2.2.2.2.3.2. L'ARGENT, MÉDIATEUR DE C-H ACTIVATION.

Les investigations menées par le groupe du professeur Sanford sont en adéquation avec ceux du professeur Larossa et ont permis de proposer un double cycle catalytique faisant

intervenir à la fois le palladium, mais également l'argent selon une étape de médiation puis de transmétallation (Figure 140) :²⁵⁷

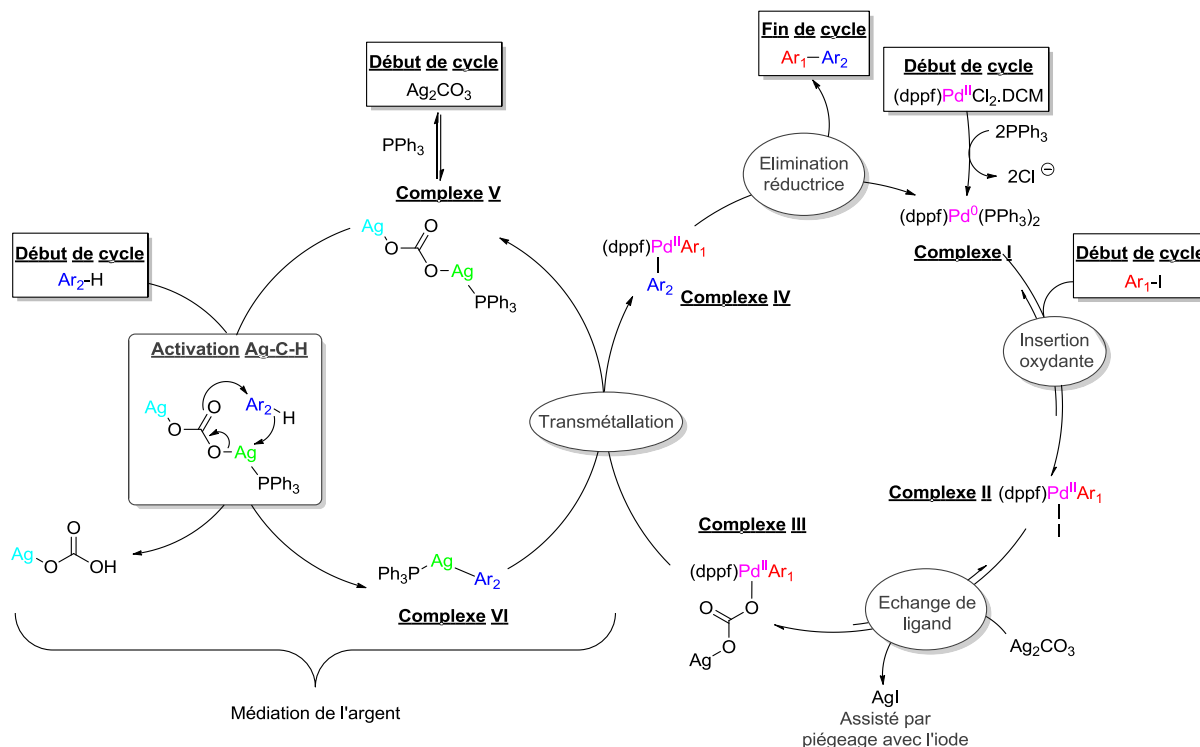


FIGURE 140 CYCLE CATALYTIQUE PROPOSÉ PAR L'ÉQUIPE DU PROFESSEUR LAROSSA.

Ce cycle catalytique commence par une **insertion oxydante** du complexe [palladique Pd^0] I dans la liaison carbone-iodure, donnant ainsi le complexe palladique-aryle [$\text{Pd}^{\text{II}}/\text{Ar}_1$] II. S'ensuit un **échange de ligand** entre le sel d'argent et le complexe palladique-aryle [$\text{Pd}^{\text{II}}/\text{Ar}_1$] II, afin d'obtenir le complexe mixte d'argent palladique-Aryle [$\text{Ag}/\text{Pd}/\text{Ar}_1$] III. Cette étape est assistée par le piégeage de l'argent avec l'iode formant AgI . Il est alors nécessaire d'avoir une quantité stœchiométrique de sel d'argent.

En parallèle de ce cycle d'activation de l'iodure d'aryle, un second cycle impliquant l'argent va concerner la réaction d'activation C-H. La complexation de la triphénylphosphine sur le carbonate d'argent va permettre de générer le complexe phosphinocarbonate d'argent V. C'est ce complexe qui, par un mécanisme assimilé à une déprotonation-métallation concertée (CMD), va effectuer l'étape de C-H activation de $\text{Ar}_2\text{-H}$ et former le complexe d'argent-aryle médiateur [Ag/Ar_2] VI.

Une fois les complexes d'argent palladique-Aryle [$\text{Ag}/\text{Pd}/\text{Ar}_1$] III (issus du cycle catalytique du palladium) et le médiateur [Ag/Ar_2] VI (issus du cycle catalytique de l'argent)

formés, une étape de **transmétallation** a lieu, conduisant à la régénération de l'espèce phosphinocarbonate d'argent **V** et à la génération du complexe palladique diarylé $[Ar_1Pd^{(II)}Ar_2]$ **IV**, classique des couplages pallado-catalysés. Enfin, une étape **d'élimination réductrice** a lieu, libérant le produit et régénérant le complexe palladique catalytique $[Pd^0]$ **I**.

La proposition de ce double cycle a été faite après avoir mené de nombreuses expériences en faisant varier divers paramètres comme :

- La quantité en palladium qui a permis de déterminer une cinétique d'ordre 0 de la réaction. Ceci a été interprété par l'existence d'un second cycle catalytique indépendant.
- La quantité de triphénylphosphine, dont les mesures cinétiques ont permis de mettre en évidence l'hypothèse d'un complexe phosphino carbonate d'argent $[AgPPh_3CO_3]$ **V** qui est impliqué dans l'étape cinétiquement déterminante du mécanisme.
- L'isolement du complexe mixte d'argent palladique-Aryl $[Ag/Pd/Ar_1]$ **III** qui, mise en réaction avec du carbonate d'argent et de la triphénylphosphine, conduit au produit de C-H activation.

Grâce aux investigations menées par le professeur Larossa puis par le professeur Sanford, le rôle de l'argent a pu être déterminé. Celui-ci joue un rôle bien plus important que celui d'une simple base, d'oxydant ou de piège à iode. Il participe à l'étape de C-H activation en effectuant l'étape de CMD et en servant de médiateur au cycle du palladium.

Cette méthodologie de C-H activation « on water » d'hétérocycles mise au point par l'équipe du professeur Greaney a pu être adaptée à la synthèse développée au cours de ces travaux de thèse afin de réaliser le couplage entre les fragments **66a** et **64** (Figure 126, p134).

2.2.2.2.4. OBTENTION DE LA PARTIE LIGAND DE L'ADN PAR C-H ACTIVATION « ON WATER ».

Afin d'obtenir la partie ligand de l'ADN de la sonde, de nombreuses tentatives de couplage vues précédemment ont été effectuées et se sont soldées par des échecs. Les travaux développés par l'équipe du professeur Greaney sur les oxazoles ont été utilisés et adaptés à la cible. Ces conditions ont conduit à l'obtention du produit souhaité **67** avec un rendement de 70 % (Figure 141). Cependant, pour effectuer cette réaction, l'eau a été utilisée en co-solvant avec le DCM en proportion équimolaire créant ainsi un milieu bi-phasique qui diffère des conditions totalement aqueuses décrites par l'équipe du professeur Greaney.

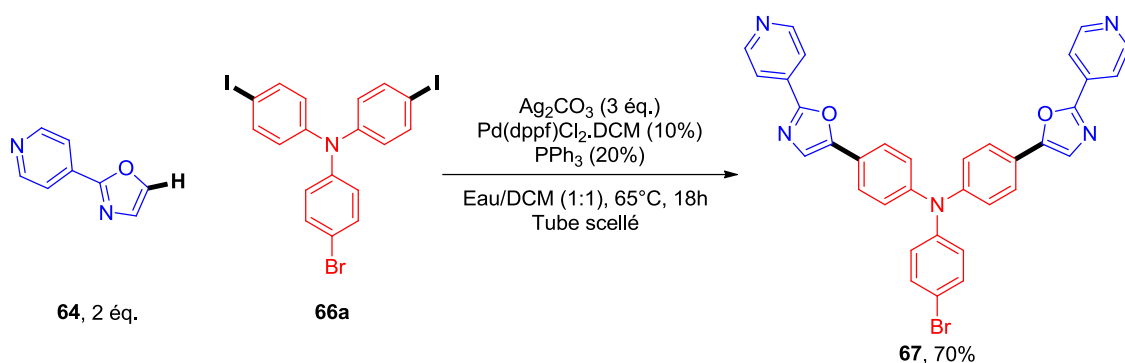


FIGURE 141 ÉTAPE DE C-H ACTIVATION « ON WATER » ADAPTÉE DE LA MÉTHODOLOGIE DE L'ÉQUIPE DE GREANEY.

L'utilisation d'un tel système de solvant à 65°C en tube scellé permet de vaporiser le DCM, créant ainsi des agrégats sur l'eau. On retrouve donc ici les notions, de « in presence of water » de par la solubilité partielle en phase aqueuse de la triphénylphosphine et du carbonate d'argent, mais également de « concentrated organic phases » dû à la vaporisation du DCM.

Après de nombreux échecs de synthèse en utilisant les méthodes précédemment détaillées, la partie ligand de l'ADN a pu être synthétisée en 3 étapes avec 63 % de rendement global et de façon orthogonale à l'atome de brome présent sur le dernier cycle aromatique du composé **67**. Cet halogène va permettre d'introduire par couplage de Sonogashira la fonction alcyne dans le but d'effectuer la jonction entre les deux partenaires de la sonde par réaction de cycloaddition catalysée au cuivre.

Ainsi, cette nouvelle stratégie de synthèse convergente bénéficie de nombreux avantages comparés à l'ancienne voie linéaire, dont le rendement global était de 26 % sur 3 étapes, en utilisant des conditions rudes et difficilement reproductibles. De plus, la convergence de cette nouvelle voie peut être adaptée à la synthèse rapide et en deux étapes de nombreux oxazoles (Figure 142, Tableau 9).

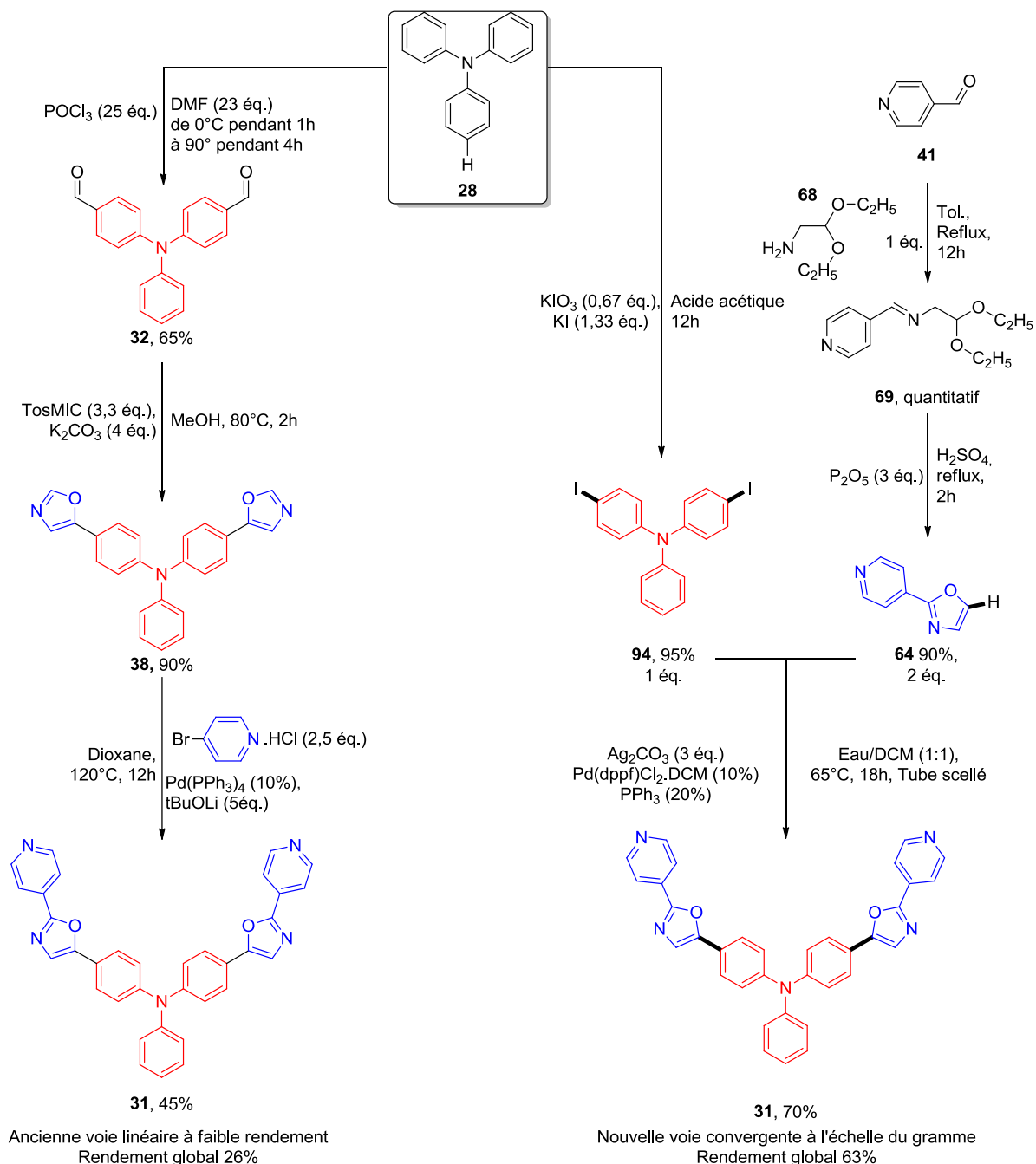


FIGURE 142 COMPARAISON DES DEUX VOIES DE SYNTHÈSE. À GAUCHE L'ANCIENNE VOIE ET À DROITE LA NOUVELLE VOIE CONVERGENTE.

	Ancienne voie	Nouvelle voie
Nombre d'étapes	3 étapes	3 étapes
Rendement global	26 %	63 %
Remarques	-Conditions rigoureuses (120°C) -Linéaire -Reproductibilité difficile -Petite échelle	-Conditions relativement douces (65°C) -Convergent -Facile et reproductible -Échelle du gramme -Synthons très simples

TABLEAU 9 TABLEAU RÉCAPITULATIF DES DEUX VOIES DE SYNTHÈSE D'OBTENTION DES LIGANDS TP-20x2PY.

Cette nouvelle voie d'accès aux ligands de l'ADN, simple, rapide et convergente permet de les synthétiser sur grosse échelle et d'en envisager de nouveaux en remplaçant, par exemple, le noyau oxazole par un thiazole. Cette famille, en plus d'être compatible avec les conditions de C-H activation « on water », est connue pour posséder des propriétés biologiques diverses et variées.^{260–271} Parmi ces composés se trouvent des marqueurs fluorescents de l'ADN comme le Thiazole Orange et ses dérivés qui sont très utilisés par les biologistes, notamment pour déterminer des constantes d'affinités (Figure 143).

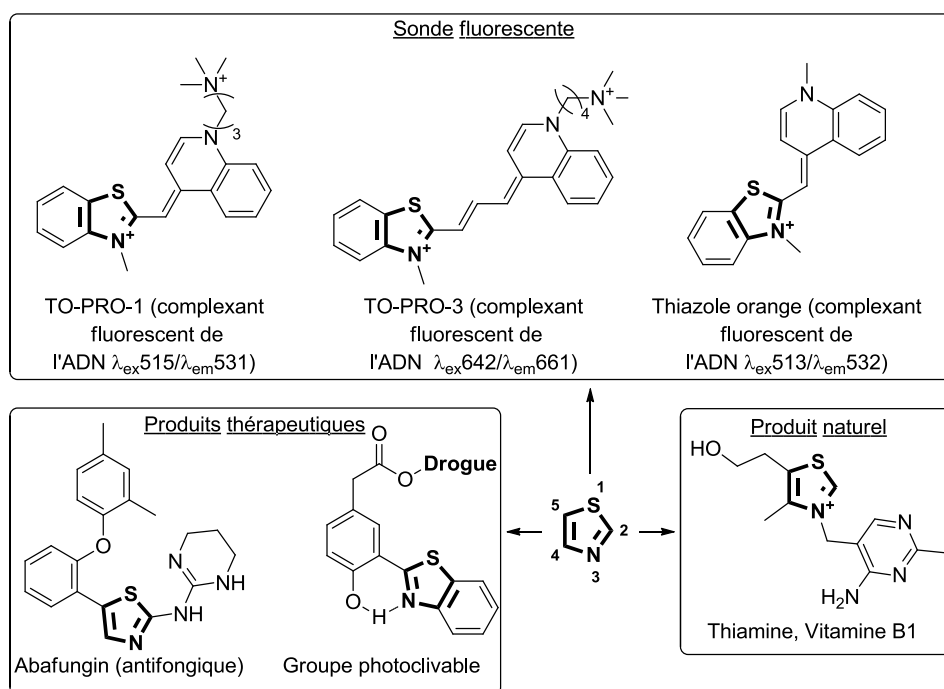


FIGURE 143 EXEMPLES DE PRODUITS NATURELS ET SYNTHÉTIQUES POSSÉDANT DES GROUPEMENTS THIAZOLES OU BENZOTHIAZOLES.

La présence de groupements benzothiazoliums sur ces marqueurs fluorescents indique une éventuelle contribution de leurs parts dans la complexation avec l'ADN. Il est ainsi intéressant de synthétiser une nouvelle série de ligands thiazoles dans le but de déterminer

leurs contributions biologiques. De plus, grâce à la méthodologie développée durant ces travaux de thèse, il est également possible de synthétiser de nouveaux ligands en utilisant les isomères de positions de la pyridine. Ainsi, de nouveaux ligands ont été envisagés et synthétisés, en se basant sur la méthodologie « on water » développée durant ces travaux de thèse.

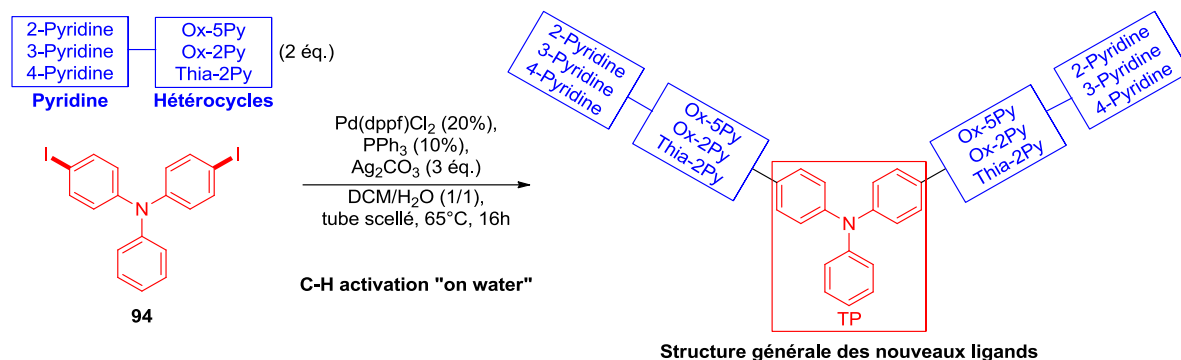


FIGURE 144 STRUCTURE GÉNÉRALE DES NOUVEAUX LIGANDS DÉSIRÉS ISSUS DE L'ÉTAPE DE C-H ACTIVATION « ON WATER ».

La synthèse de ces nouveaux ligands est l'objet de la prochaine partie de ce manuscrit.

2.2.2.3. SYNTHÈSE DE NOUVEAUX LIGANDS DE L'ADN.

L'obtention de ces nouveaux ligands nécessite donc l'obtention préalable de fragments **Pyridine-Hétérocycles** correspondant. La synthèse de ses fragments sera abordée dans un premier temps, suivie de l'étape de C-H activation « on water » avec le composé **94**. Pour finir, une étape de méthylation des groupements pyridines permet d'aboutir aux ligands souhaités.

2.2.2.3.1. SYNTHÈSE DES HÉTÉROCYCLES.

Sept fragments **Pyridine-Hétérocycles** sont ainsi envisagés et peuvent être classés en fonction de leurs hétérocycles et isoméries.

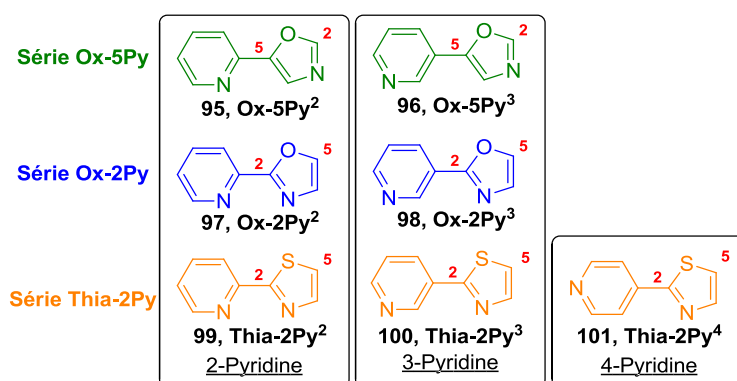


FIGURE 145 FRAGMENTS ENVISAGÉS POUR LA SYNTHÈSE DES LIGANDS DÉSIRÉS.

La synthèse de ces différents fragments sera abordée successivement en commençant par la synthèse des fragments de la série Ox-5Py.

2.2.2.3.1.1. SÉRIE OX-5PY.

Comme évoqué précédemment, la spécificité des composés de la série Ox-5Py, est la fonctionnalisation de la position 5 des noyaux oxazoles par un groupement pyridine. Cette régioisomérisation de position 5 est obtenue par la cyclisation de Van Leusen entre un aldéhyde et du TosMIC en présence de K_2CO_3 (Cf. Figure 113, p125) (Figure 146) :

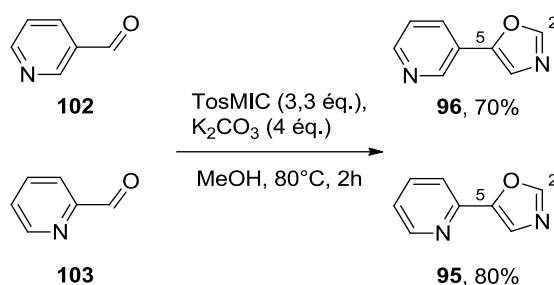


FIGURE 146 SYNTHÈSE DES INTERMÉDIAIRES **129** ET **130** NÉCESSAIRES À L'ÉTAPE DE CH ACTIVATION.

Les substituants **96** et **95** ont ainsi pu être synthétisés en une seule étape avec de bons rendements (respectivement 70 % et 80 %).

2.2.2.3.1.2. SÉRIE OX-2PY.

Par analogie, les composés de la série Ox-2Py sont fonctionnalisés non pas en position 5 des noyaux oxazoles, mais en position 2. L'obtention de ces régioisomères a été élaborée durant ces travaux de thèse et repose sur une cyclo-déshydratation de dérivés aminoacétal (produits **104** et **105**) issus d'aldéhyde (Cf. Figure 122 p132, Figure 147) :

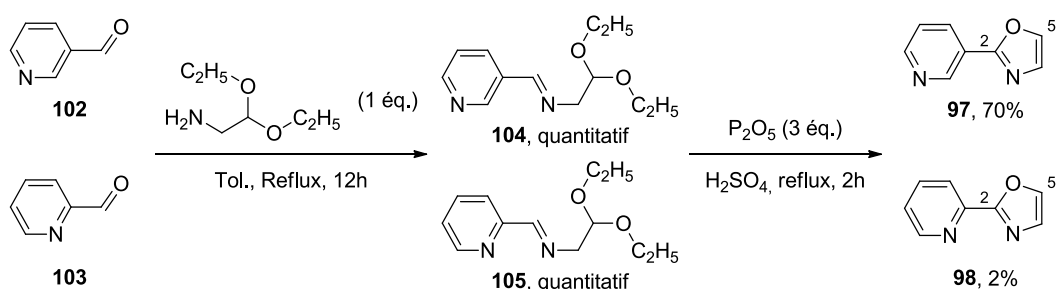


FIGURE 147 SYNTHÈSE DES COMPOSÉS **97** ET **98**.

Le produit **97** a ainsi été synthétisé en deux étapes avec un rendement de 70 %. Le composé **98** cependant, a été obtenu avec un rendement de 2 %. Ce faible rendement peut s'expliquer par la chélation des différents sels issus de la neutralisation du brut réactionnel de cyclo-déshydratation. Cette complexation serait d'autant plus favorable qu'un cycle à 5

chaînon extrêmement miscible dans l'eau est formé, rendant l'extraction du produit très difficile (Figure 148).

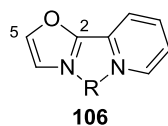


FIGURE 148 POSSIBLE CHÉLATION AVEC LE COMPOSÉ 106 AVEC R REPRÉSENTANT UN SEL PRÉSENT DANS LE MILIEU.

Ainsi, ces travaux ont permis d'élaborer deux voies d'accès à deux régioisomères d'oxazoles en partant d'un seul et même aldéhyde (Figure 149) :

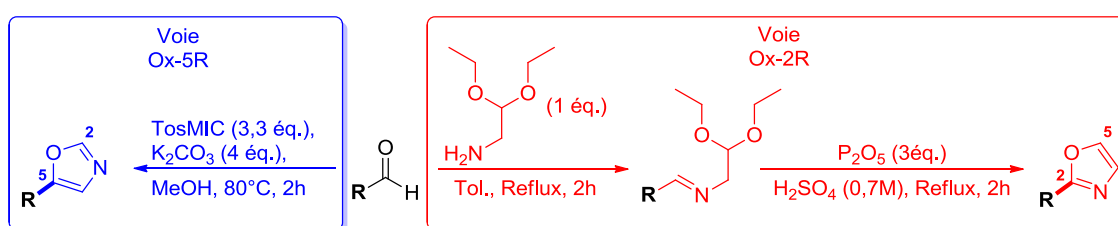


FIGURE 149 OBTENTION DES ISOMÈRES 5 ET 2 OXAZOLES EN PARTANT D'UN SEUL ET MÊME ALDÉHYDE.

Ainsi, le régioisomère oxazole de position 5 peut être obtenu en utilisant la cyclisation de Van Leusen, tandis que le régioisomère de position 2 est obtenu par une cyclo-déshydratation en milieu acide.

2.2.2.3.1.3. SÉRIE THIA-2PY.

La synthèse de la nouvelle série de ligands Thia-2Py, possédant des noyaux thiazoles substitués en position 2 par un groupement pyridine, a été calquée sur celle de la série des 2Ox-2Py, en envisageant une cyclisation sur un thioamide afin de former le noyau thiazole.

La bibliographie mentionne une telle réaction, entre un thioamide et un bromoacétaldéhyde mis en présence d'acide.^{272,273} L'acide va permettre la déprotection du bromoacétaldéhyde en formant un ion oxonium (**intermédiaire A**), permettant l'addition du thioamide. S'ensuit une cascade réactionnelle (**intermédiaire B** et **C**) aboutissant sur une déshydratation (**intermédiaire D**) permettant l'obtention du noyau thiazole (Figure 150) :^{272,273}

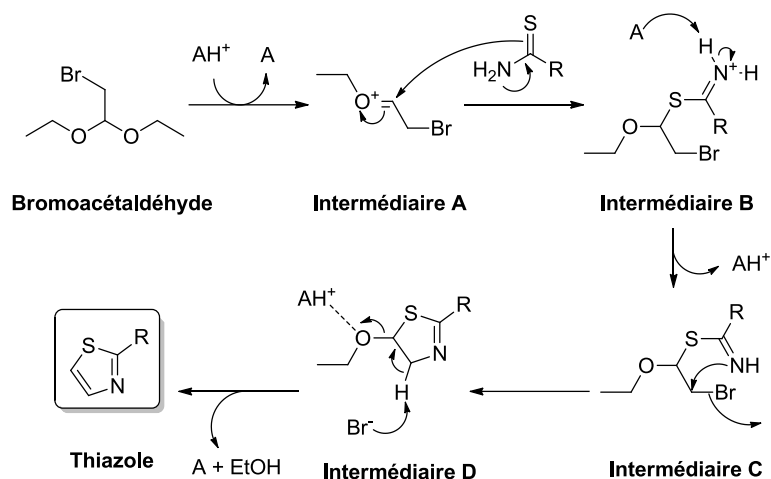


FIGURE 150 MÉCANISME HYPOTHÉTIQUE DE FORMATION DU NOYAU THIAZOLE PAR CYCLISATION DÉSHYDRATANTE.

La stratégie de synthèse oblige donc de travailler avec une fonction thioamide. Il est donc nécessaire pour les ligands envisagés de partir soit d'une pyridine commerciale disposant déjà d'une fonction thioamide, soit d'introduire ce groupe sur une pyridine simple. Pour cette seconde option, deux méthodes de thioamidation existent.^{274–276} La première consiste à utiliser un agent de thioamidation électrophile comme le réactif de Lawesson²⁷⁷ ou le pentasulfite de phosphore sur des dérivés amides, cétones ou encore esters.²⁷⁸ La deuxième méthode met en jeu un agent de thioamidation nucléophile sur des dérivés amides ou nitriles.^{279–281} C'est cette deuxième méthode qui a été choisie en utilisant un dérivé nitrile comme substrat en présence de disulfure d'ammoniaque $(\text{NH}_4)_2\text{S}$.

Les différents fragments thiazoles **99**, **100** et **101** ont ainsi été synthétisés avec des rendements corrects de l'ordre de 33 % en deux étapes: (Figure 151)

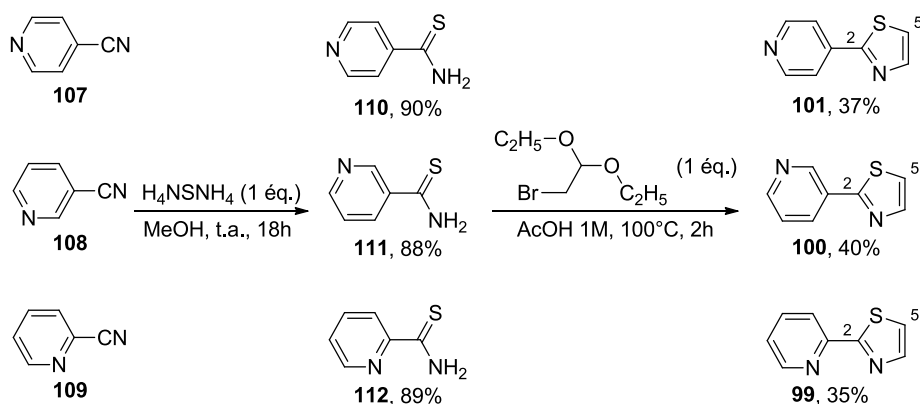


FIGURE 151 SYNTHÈSE DES INTERMÉDIAIRES THIAZOLES-PYRIDINES **99**, **100** ET **101**.

Les différents fragments désirés, nécessaires à l'étape de C-H activation « on water », ont ainsi été synthétisés de façon simple et efficace.

2.2.2.3.2. ÉTAPE DE C-H ACTIVATION

La méthodologie développée par l'équipe du professeur Greaney et optimisée au sein du laboratoire pour la synthèse du composé **67**, est de nouveau utilisée ici et les résultats obtenus sont résumés ci-dessous (Figure 152) :

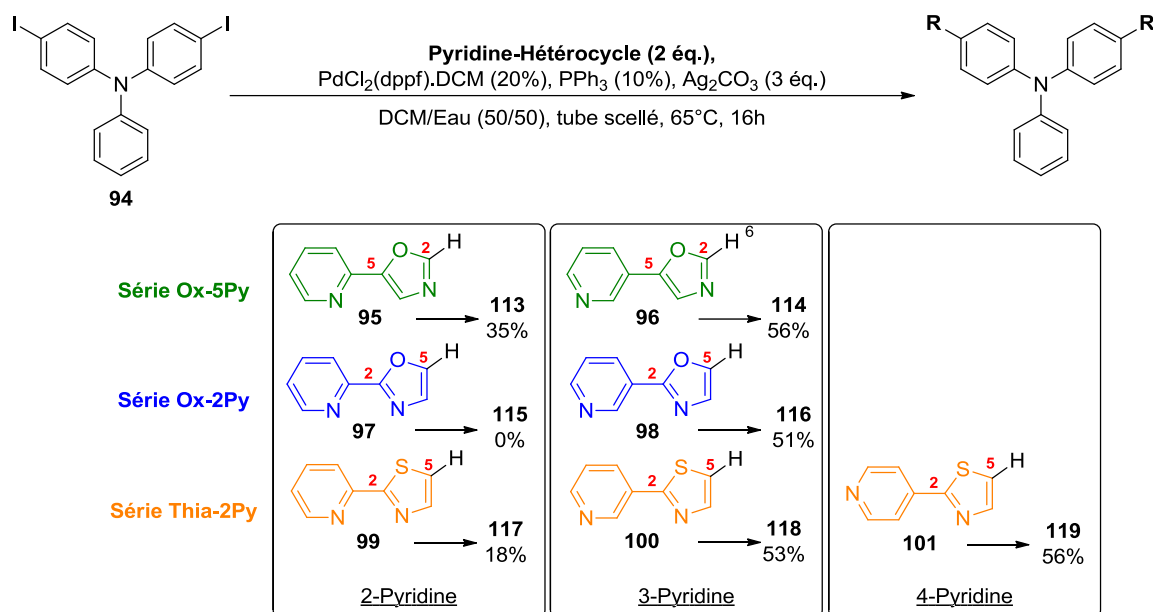


FIGURE 152 RÉSUMÉ DES DIFFÉRENTES MOLÉCULES SYNTHÉTISÉES PAR ÉTAPE DE C-H ACTIVATION.

Les dérivés 3-pyridines et 4-pyridines ont été obtenus avec des rendements corrects avoisinant les 50 % (composés **114**, **116**, **118** et **119**), tandis que les dérivés 2-pyridines ont été obtenus avec des rendements faibles de 18 % pour le composé **117** et 35 % pour le composé **113**. Ces faibles rendements et la non obtention du composé **115** pourraient s'expliquer par une possible complexation des sels d'argent entre les atomes de l'hétérocycle et la pyridine, créant ainsi une pince (Figure 153)^{282–284} :

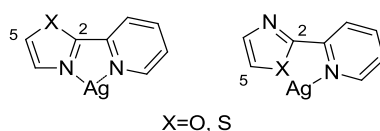


FIGURE 153 POSSIBILITÉ DE COMPLEXATION DES SELS D'ARGENT AVEC LES DÉRIVÉS OXAZOLES ET THIAZOLES.

Une fois ces produits obtenus, l'étape finale de méthylation des pyridines peut être effectuée dans des conditions différentes dépendant des séries étudiées.

2.2.2.3.3. QUATERNARISATION DES NOYAUX PYRIDINES.

2.2.2.3.3.1. SÉRIE TP-2OX-5PY.

En synthétisant le premier composé de la série TP-2Ox-5Py, le groupe de l'Institut Curie a élaboré une méthode de méthylation des pyridines pour cette série, et ce sont ces conditions qui ont été reprises pour obtenir les composés **120** et **121** : (Figure 154)

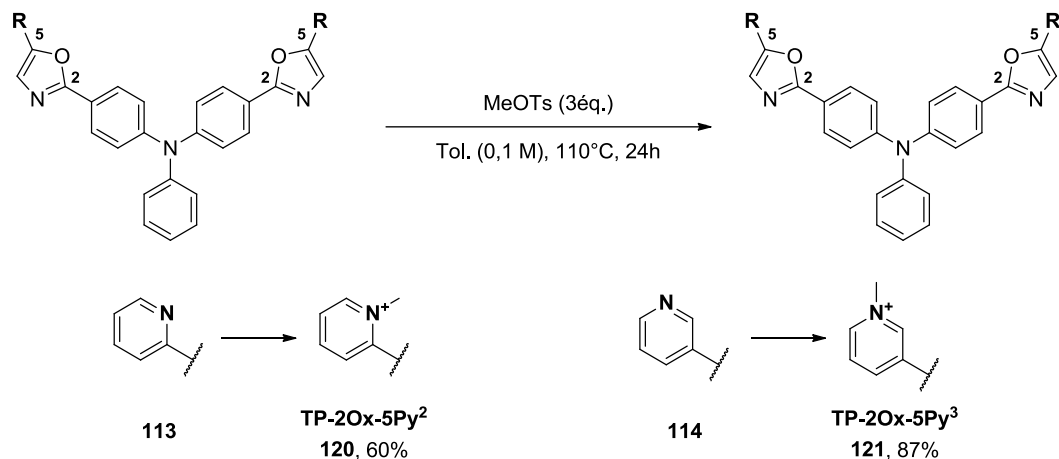


FIGURE 154 ÉTAPE DE MÉTHYLATION DE LA SÉRIE DES TP-2OX5PY.

Le ligand **121** a pu être synthétisé avec 87 % de rendements contre 60 % pour le ligand **120**. Cette différence peut s'expliquer par encombrement stérique plus important entre les cycles oxazole et pyridine pour ce ligand **120**.

Ainsi, deux nouveaux ligands appartenant à la série TP-2Ox-5Py ont été synthétisés en trois étapes avec des rendements globaux de 34 % pour le ligand **121** (TP-2Ox-5Py³) et 17 % pour le ligand **120** (TP-2Ox-5Py²).

2.2.2.3.3.2. SÉRIE TP-2THIA-2PY.

L'agent de méthylation utilisé pour les séries TP-2Thia-2Py et TP-2Ox-2Py est différent de celui utilisé précédemment : le MeOTf est remplacé par le MeI en quantité équimolaire au toluène. Ces conditions, établies durant ces travaux de thèse, se sont avérées être plus efficaces et ont donc été préférées ici pour la méthylation de ces ligands à structures inédites (Figure 155).

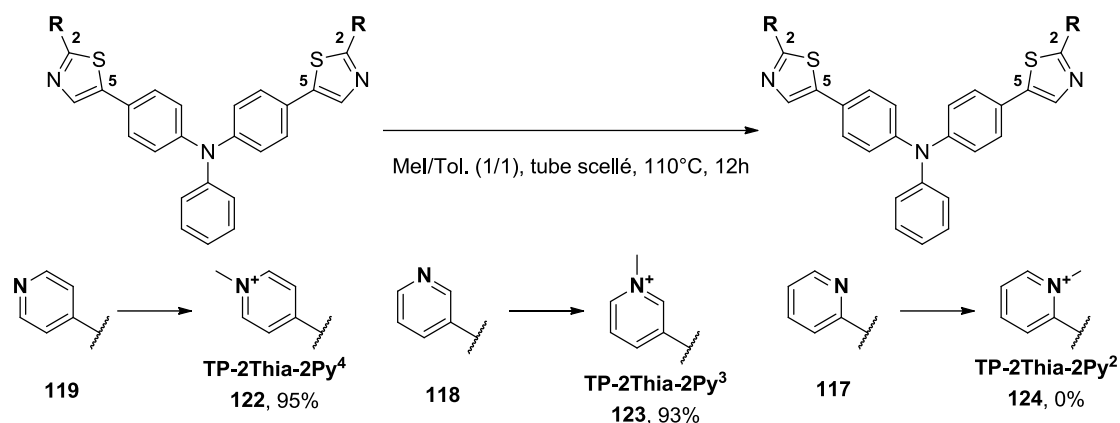


FIGURE 155 ÉTAPE DE MÉTHYLATION DES COMPOSÉS DE LA SÉRIE TP-2THIA-2PY.

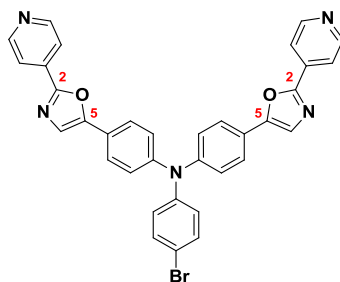
Les ligands **122** et **123** ont été synthétisés en 4 étapes avec des rendements globaux de 17 %, avec une dernière étape à haut rendement.

Seul le composé **124** possédant la 2-pyridine n'a pas été obtenu. Tout comme le TP-2Ox-5Py² **120**, l'encombrement stérique généré par la proximité spatiale des hétéroatomes des cycles thiazole et pyridine doit empêcher l'agent de méthylation de réagir convenablement.

Ainsi, une nouvelle stratégie de synthèse générale vers les ligands de l'ADN a été élaborée et possède de nombreux avantages (Figure 156) :

- Sa simplicité du fait de l'utilisation de composés de départ très simples et peu chers. (aldéhyde, nitrile, triphénylamine, bromoacétaldéhyde ...).
- Son efficacité : 3 à 4 étapes sont nécessaires pour atteindre le composé désiré avec un rendement global correct.
- Sa convergence : un cœur triphénylamine di-iodé est la base sur laquelle viennent se greffer différents hétérocycles.
- La facilité de purification sur la dernière étape.

Quatre nouveaux ligands ont pu être synthétisés et sont résumés ci-dessous. Leurs propriétés biologiques seront évoquées plus tard dans ce manuscrit. Par la suite, seul le composé **67** sera couplé aux pièges à protéines, couplage décrit dans la partie suivante.



67, composé utilisé comme ligand de l'ADN pour la sonde à protéine.

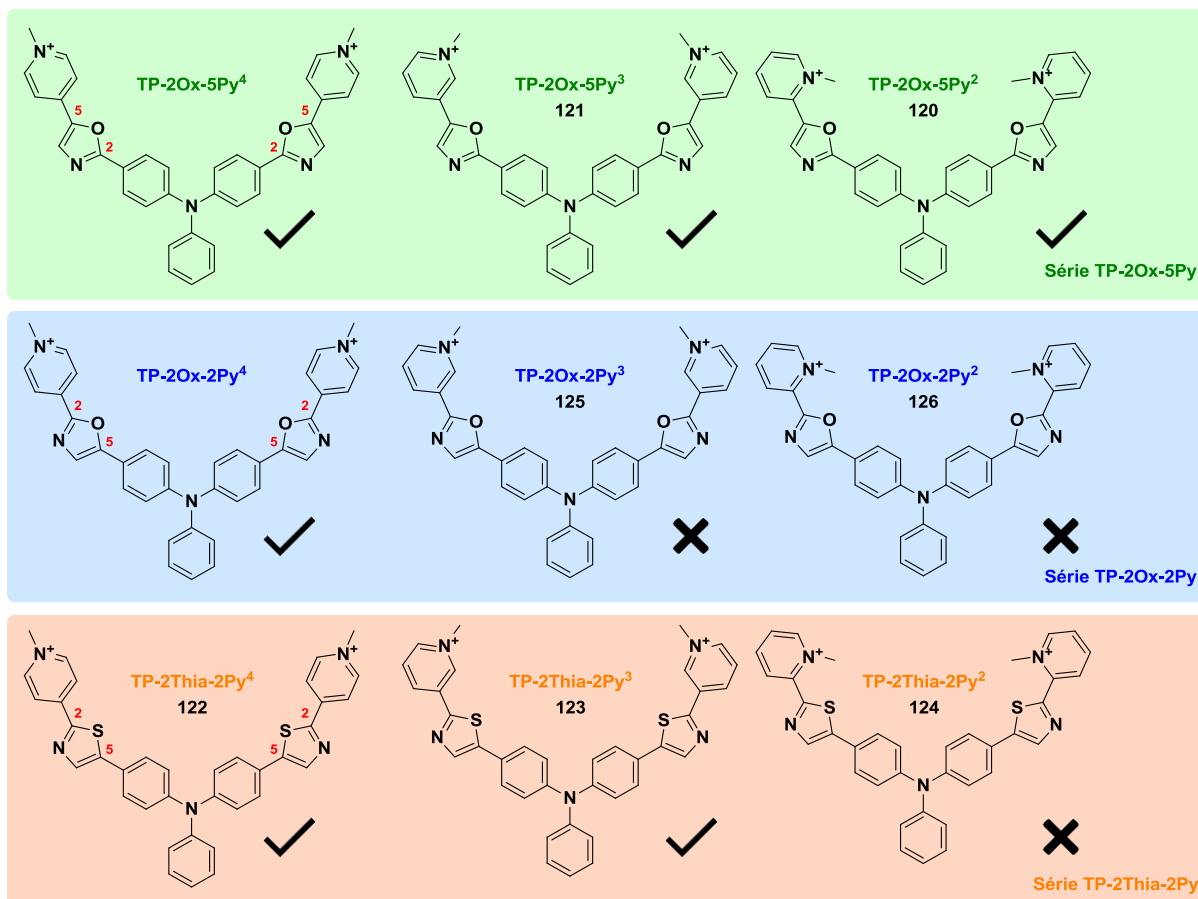


FIGURE 156 RÉSUMÉ DES PRODUITS SYNTHÉTISÉS.

2.3. SYNTHÈSE DE LA SONDE.

Parmi les nombreuses possibilités pour relier deux partenaires hautement fonctionnalisés se trouvent les couplages peptidiques et les réactions de cycloadditions de Huisgen catalysées au cuivre (I). Ces deux réactions sont généralement choisies pour leur grande tolérance fonctionnelle et le large panel de conditions opératoires douces qu'elles apportent. Dans le cadre de ce projet de thèse, la réactivité intrinsèque de l'epicocconone et de ses analogues vis-à-vis des amines primaires proscrit l'utilisation d'un couplage peptidique. C'est donc la réaction de cycloaddition de Huisgen qui a été privilégiée. Cette cycloaddition met en jeu une fonction alcyne et une fonction azoture formant, en présence d'une quantité catalytique de cuivre (I), un triazole 1,4 stable et inerte aux réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse (Figure 157).

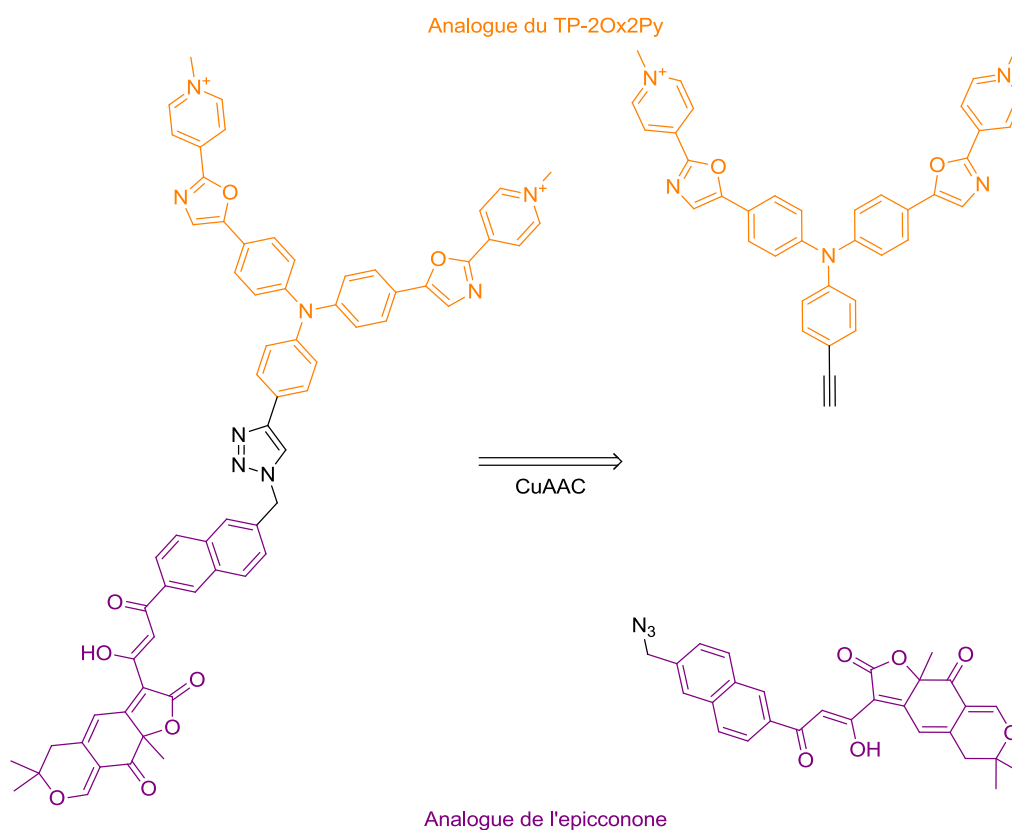


FIGURE 157 COUPURE RÉTROSYNTHÉTIQUE ENVISAGÉE POUR LA PRÉPARATION DE LA SONDE.

Historiquement, les premières cycloadditions nécessitaient des conditions rudes (températures élevées ou hautes pressions) qui étaient contraignantes et incompatibles avec la plupart des substrats complexes (comme ceux présent le cadre de cette thèse).

Dans les années 1960, le professeur Huisgen a élaboré une cycloaddition^{285,286} utilisant des conditions douces (température ambiante) en présence de métaux comme le cuivre (I),²⁸⁷ qui a également eu pour effet d'accélérer la cinétique de réaction.²⁸⁸ Ces conditions douces ont par la suite été couramment réemployées pour lier deux partenaires complexes à intérêt biologique, comme c'est le cas dans le cadre de cette thèse.^{289,290}

Il est également possible de contrôler la régiosélectivité de cette réaction en fonction du métal utilisé. Ainsi, l'utilisation du cuivre (I) (CuAAC) va générer majoritairement un triazole 1,4^{291,292} alors qu'un triazole 1,5^{293,294} sera obtenu avec du ruthénium (II) (RuAAC) (Figure 158). Cependant, ce mécanisme reste relativement incompris et de nombreuses études sont encore en cours. Dans le cas de la RuAAC, seule la taille imposante du ruthénium peut expliquer la formation majoritaire du régioisomère 1,5.^{295,296}

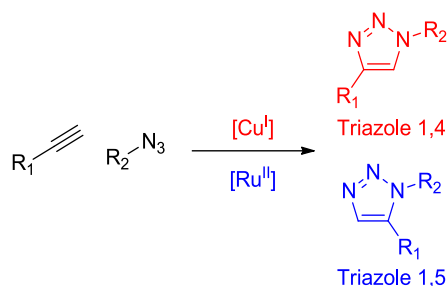


FIGURE 158 FORMATION D'UN TRIAZOLE 1,4 ET 1,5 PAR CYCLOADDITION DE HUISGEN CATALYSÉE AU CUIVRE (I) (EN ROUGE) OU AU RUTHÉNIUM (II) (EN BLEU).

Toutefois, malgré son efficacité indéniable, cette cycloaddition reste très dépendante du substrat et il est difficile d'en prévoir les résultats, et ce malgré le nombre grandissant d'exemples présents dans la bibliographie.^{297–300} En effet, de nombreux phénomènes sont à prendre en compte comme la complexation du cuivre avec les substrats, pouvant avoir un effet désactivant comme activant. Ainsi, dans certains cas, cette complexation va désactiver la réactivité du substrat en empêchant le bon déroulement du cycle catalytique, tandis que dans d'autres cas, cette chélation du substrat va permettre d'en exacerber la réactivité.³⁰¹

Cette cycloaddition a été étudiée antérieurement au sein du laboratoire par les docteurs Perraudau et Oger, sur des analogues polyfonctionnels de l'epicoconone.

2.3.1. RÉACTION DE CUAAC : TRAVAUX ANTÉRIEURS AU SEIN DU LABORATOIRE.

Ces travaux ont permis d'établir un système catalytique efficace contenant du CuSO₄ comme source de cuivre en présence d'ascorbate de sodium et de TBTA, à 10 mol % chacun.

L'ascorbate de sodium a pour rôle de réduire le cuivre (II) en cuivre (I) *in situ*, tandis que le TBTA aura plusieurs effets protecteurs. Ce ligand permet notamment de protéger le cuivre (I) de la dismutation en cuivre (II) et en cuivre (0) et de la réoxydation par l'oxygène de l'air, de ce fait l'étape de dégazage du solvant n'est alors plus nécessaire.

Ainsi, l'utilisation de ces conditions spécifiques a permis d'obtenir des analogues polyfonctionnels composés d'une partie pro-fluorescente, apportée par le squelette de l'epicocconone, et d'une partie **R** d'affinité spécifique pour une cible (comme l'affinité streptavidine/biotine) (Figure 159).^{171,172}

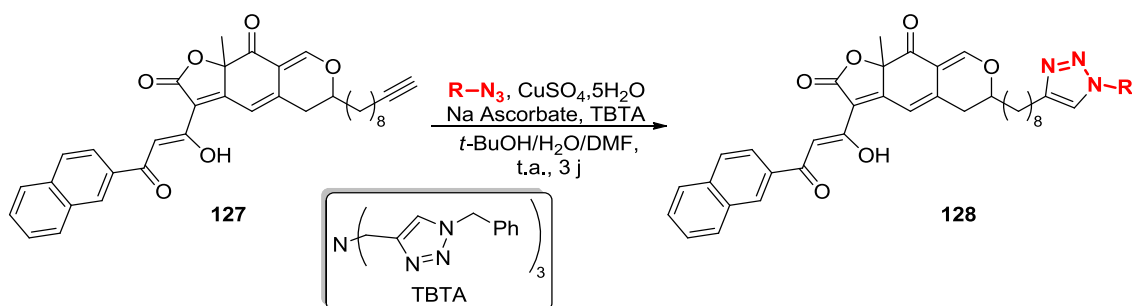


FIGURE 159 ANALOGUE DE L'EPICOCCONONE UTILISÉ EN CHIMIE CLICK.

Cependant, malgré l'optimisation de cette réaction, les rendements restent faibles (30 % au bout de trois jours) et la reproductibilité en est aussi extrêmement affectée. Ces conditions ont néanmoins été utilisées comme point de départ à l'étude de la CuAAC développée dans le cas de ce projet de thèse.

2.3.2. STRATÉGIE CUAAC, PREMIER COUPLAGE.

À la différence des travaux effectués antérieurement au sein du laboratoire, l'analogue de l'epicocconone porte ici la fonction azoture, tandis que la partie ligand de l'ADN à coupler possède la fonction alcyne. De plus, l'obtention extrêmement difficile du ligand d'ADN et les faibles reproductibilités et rendements de cette réaction interdisent la consommation superflue et excessive de ligand de l'ADN. Ainsi, des tests préalables entre l'analogue de l'epicocconone **24** et une molécule **129** ont été réalisés.

Cette molécule **129** très simple est censée mimer le ligand de l'ADN. Elle possède un groupement amido-benzylrique ainsi qu'une fonction alcyne vrai nécessaire à la cycloaddition de Huisgen (Figure 160). Le travail sur ce modèle a en outre permis de réaliser l'optimisation de la CuAAC en parallèle de la synthèse du ligand de l'ADN **31** vue précédemment.

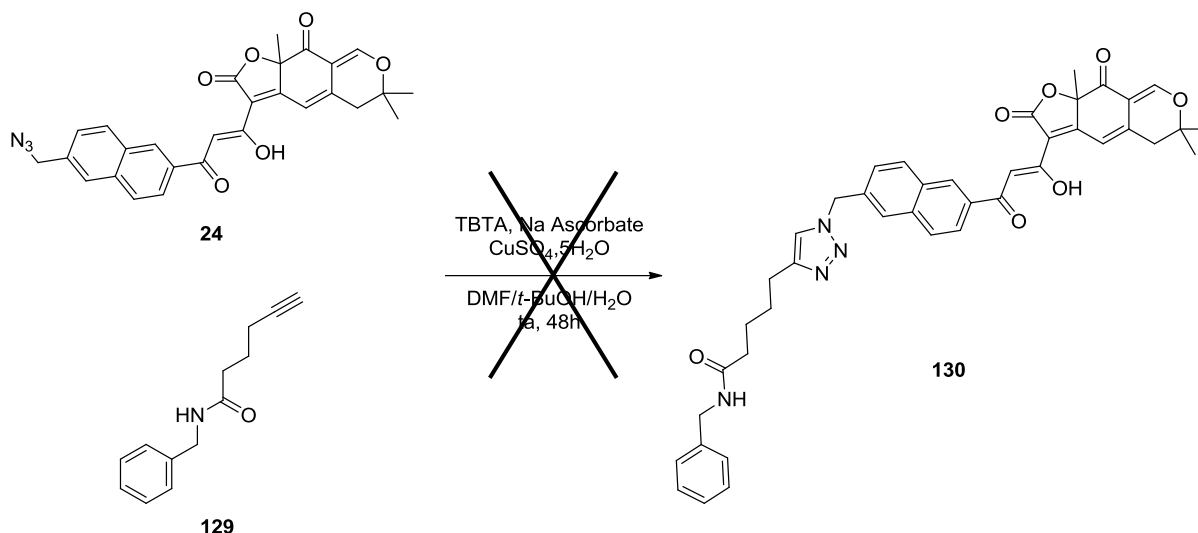


FIGURE 160 TESTS DE RÉACTION DE CYCLOADDITION CATALYSÉE AU CUIVRE DE HUISGEN SELON LES CONDITIONS OPTIMISÉES AU SEIN DU LABORATOIRE.

Cependant, l'obtention du composé **130** a toujours échoué, malgré la variation de la stœchiométrie du système catalytique (allant de 10 mol % à 3 équivalents) ou encore la température de réaction (ambient à 80°C). De plus, la présence ou l'absence de TBTA n'influence aucunement le résultat de l'expérience. Aucune trace de produit de cycloaddition n'a été décelée que ce soit par RMN ou HPLC. Seuls des produits non identifiés ont été récupérés, résultant vraisemblablement de la dégradation des substrats (Tableau 10).

TBTA	Na Ascorbate	CuSO ₄	Solvants DMF/ <i>t</i> -BuOH/H ₂ O	Température	Observations
10 mol %	10 mol %	10 mol %	1/1/1	Température ambiante	Récupération des réactifs ou dégradation
1 éq.	1 éq.	1 éq.	1/1/1		
2 éq.	2 éq.	2 éq.	1/1/1		
3 éq.	3 éq.	3 éq.	1/1/1		
0 éq.	1 éq.	1 éq.	1/1/1		
3 éq.	3 éq.	3 éq.	1/1/1	80°C	

TABLEAU 10 CONDITIONS RÉACTIONNELLES UTILISÉES POUR ÉLABORÉES LA RÉACTION DE CuAAC.

Parallèlement à ces résultats, d'autres échecs ont été reportés au sein de l'équipe par le docteur Oger, sur un composé proche de l'analogue de l'epicocconone **24**, le composé **131**. Ce composé **131** diffère du composé **24** par la présence d'un noyau fluorène possédant un azoture (Figure 161).¹⁷¹

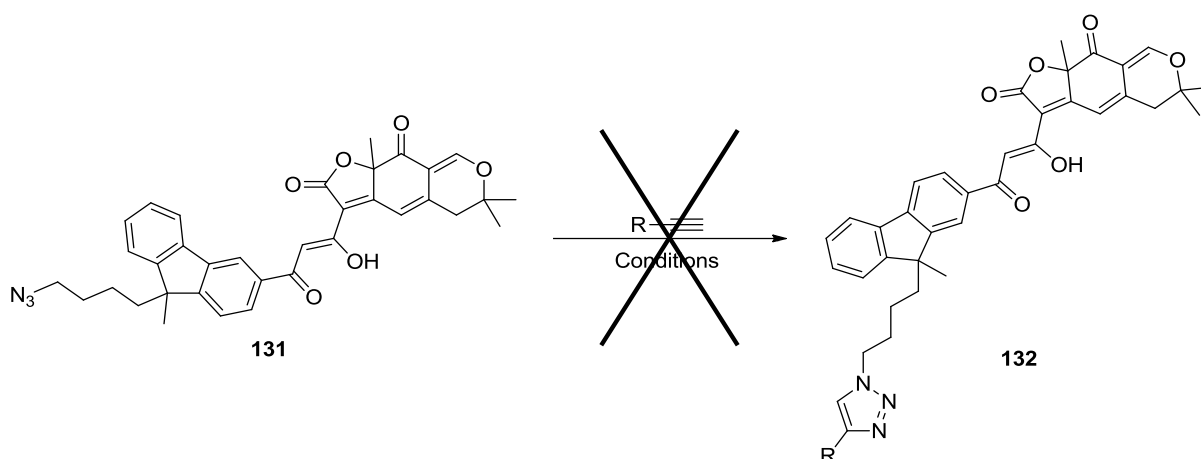


FIGURE 161 TENTATIVE DE VALIDATION DE CuAAC AVEC LE COMPOSÉ 131.

Conditions	Résultats
TBTA, Na Ascorbate, CuSO ₄ ·5H ₂ O, DMF/ <i>t</i> BuOH/H ₂ O, t.a., 48h.	Dégradations
A-21, CuI, DMF, t.a., 24h	
A-21, CuI, DMF, 40°C, micro-onde, 4h	

FIGURE 162 CONDITIONS UTILISÉES PAR LE DOCTEUR OGER SUR UN ANALOGUE DE L'EPICOCCONONE FLUORÈNE 131.

Après les échecs en utilisant les conditions développées et utilisées par le docteur Perreaudau, une alternative¹⁷¹ a été envisagée en utilisant une source de cuivre (I) supportée sur une résine Amberlyst® A-21.¹⁹⁰ L'avantage d'utiliser ce genre de résine est de pouvoir réaliser la CuAAC en milieu organique en s'affranchissant de la très faible solubilité des sels de cuivre dans ce type de milieu. Ainsi, il est possible d'élargir la bibliothèque de composés compatibles avec la CuAAC.³⁰² Cependant, malgré ces nouvelles conditions réactionnelles, seul le produit de départ a été observé au bout de 24h, avec une dégradation des composés lors d'une ultime tentative d'activation sous micro-ondes à 40°C.¹⁷¹

Après ces nombreux échecs subis en faisant varier les conditions réactionnelles et l'observation récurrente de produits de dégradation, une hypothèse incriminant l'emploi du cuivre a été émise. Ce dernier serait susceptible d'être chélaté par le motif céto-énol des analogues de l'epicoconone en formant un cycle à 6 chaînons. Ce motif est assimilable à un ligand acétylacétonate connu pour complexer de nombreux métaux : comme le titane,³⁰³ le chrome,³⁰⁴ le cobalt,³⁰⁵ le manganèse,³⁰⁵ le fer,^{305,306} le nickel,^{307–309} les lanthanides,^{308,310} le bore,³¹¹ le ruthénium³¹², le palladium³¹³, mais également le cuivre (II)^{308,309,314} et le cuivre (I)

(Figure 163).^{315,316} Il y aurait donc une complexation compétitive du cuivre entre le substrat et le TBTA, qui semble perdurer malgré l'ajout d'un excès du ligand polytriazole.

Des études préliminaires ont été menées sur l'analogue naphthyle de l'epicocconone **133** qui a été mis en présence de deux équivalents de sulfate de cuivre (II) dans un mélange acétonitrile/eau (1 pour 1) et un précipité inconnu s'est rapidement formé. De plus, un adduit a été observé à 584 Da en spectrométrie de masse, laissant spéculer la formation d'un complexe **133'** $[M+Cu+MeCN+2H_2O]^+$ (Figure 163).¹⁷¹ De plus amples investigations sont nécessaires afin de comprendre les interactions mises en jeu entre la source de cuivre et les analogues de l'epicocconone.

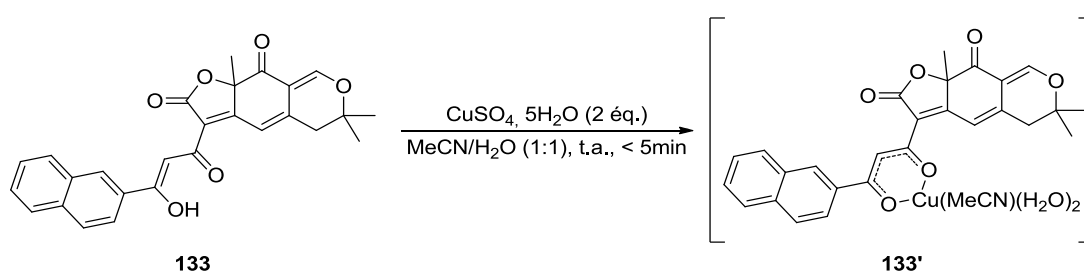


FIGURE 163 COMPLEXE POSSIBLE FORMÉ ENTRE LA FONCTION CÉTO-ÉNOL DU SQUELETTE DE L'EPICOCCONONE ET LES SOURCES DE CUIVRE.

L'emploi de cuivre est donc à proscrire dans le cas des analogues de l'epicocconone et une alternative sans cuivre est nécessaire. Parmi ces alternatives sans cuivre se trouvent une réaction de cycloaddition bio-orthogonale de plus en plus utilisée : la SPAAC (Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition).³¹⁷⁻³²⁰

2.3.3. NOUVELLE STRATÉGIE INNOVANTE : UTILISATION DE LA SPAAC.

La SPAAC repose sur une cycloaddition sans métaux spontanée entre un alcyne contraint (cyclo-octyne) et un azoture, afin de former un lien triazole (Figure 164).³¹⁷⁻³²⁰ Dans le cas d'un alcyne symétrique contraint, un seul produit est formé. Cependant, dans le cas asymétrique, deux régioisomères sont possibles. De nombreux cyclo-octynes ont été synthétisés et sont couramment utilisés en « chemical biology ». De plus, un certain nombre d'entre eux sont commercialisés (Figure 164).³²¹⁻³²⁴

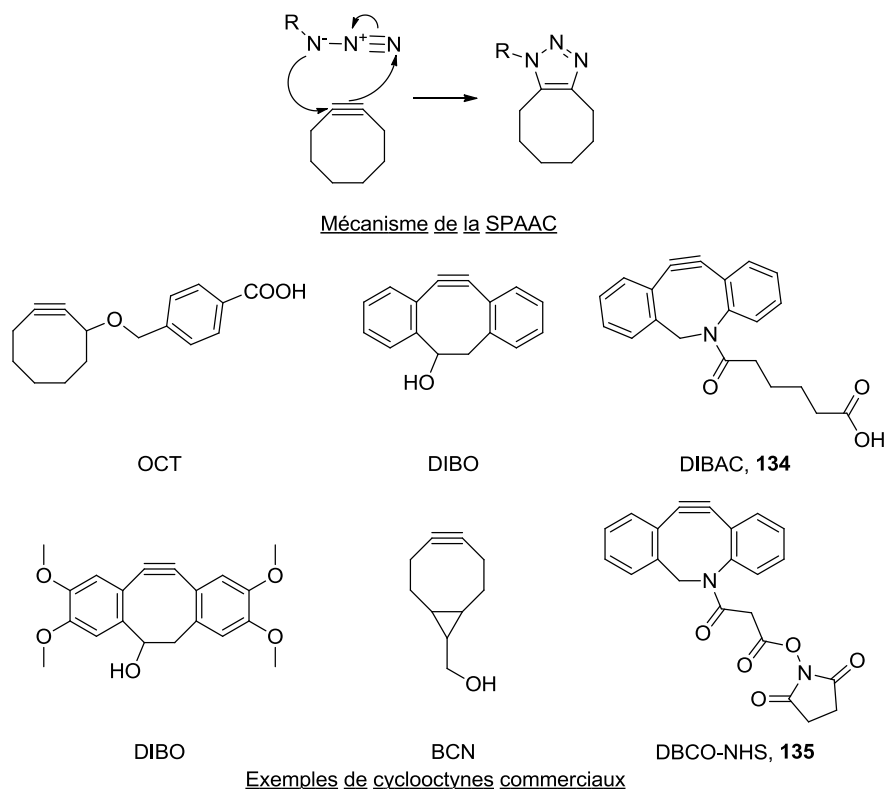


FIGURE 164 MÉCANISME DE LA RÉACTION DE SPAAC ET QUELQUES EXEMPLES DE CYCLO-OCTYNES COMMERCIAUX.

2.3.3.1. TRAVAUX PRÉLIMINAIRES DE LA SPAAC.

Un essai préliminaire de SPAAC a été effectué au sein de l'équipe par le docteur Oger entre le composé **131** précédemment utilisé et le DIBAC (cyclo-octyne acide commercial **134**, Figure 164). Cet essai a abouti à un résultat concluant et le produit de cycloaddition **136** a pu être observé par spectrométrie de masse et HPLC analytique sans aucunes traces de produits de départ (Figure 165).

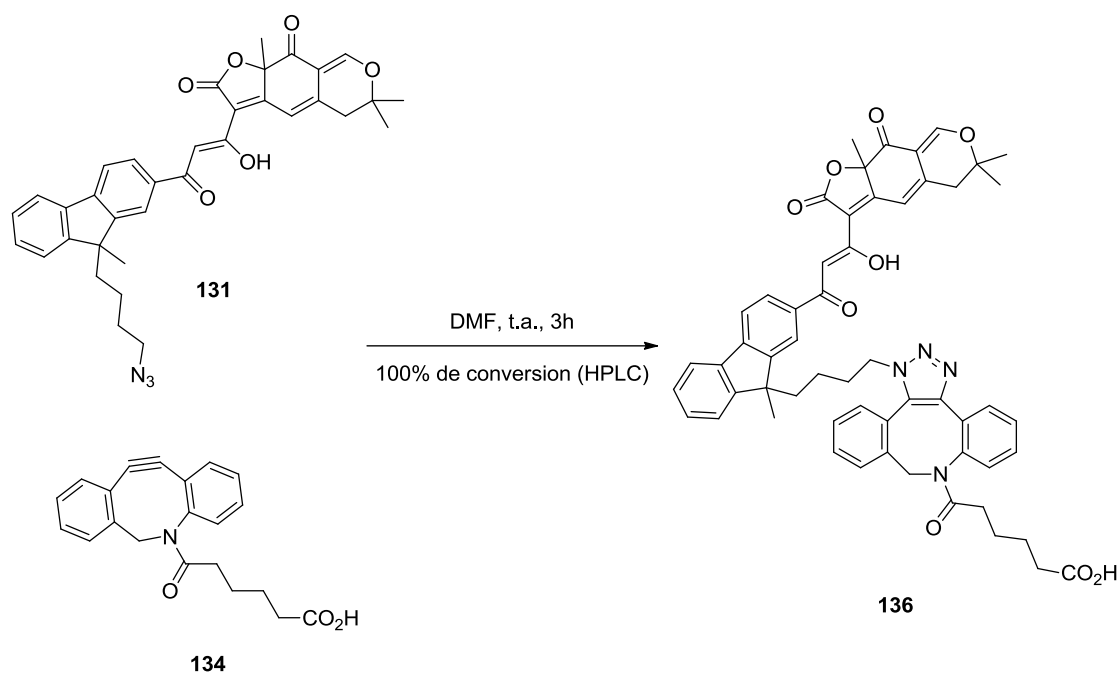


FIGURE 165 RÉACTION DE SPAAC EFFECTUÉE AU SEIN DU GROUPE ENTRE LE DIBAC **134** ET LE COMPOSÉ **131**.

Cette réussite renforce l'idée d'une incompatibilité des analogues de l'epicocconone vis-à-vis des métaux et valide l'utilisation de la stratégie SPAAC comme alternative avec ses analogues.

2.3.3.2. SYNTHÈSE DU LINKER DE LA SONDE : LA CHIMIE DU CYCLO-OCTYNE.

Ainsi, les conditions utilisées mettant en jeu les composés **131** et **134**, ont permis de valider la stratégie SPAAC par l'obtention du produit de cycloaddition **136**. Il est ainsi possible d'établir une nouvelle voie de synthèse pour la sonde ciblée en se basant sur l'utilisation du DIBAC **134**, qui sera utilisé comme linker entre le piège à protéines et le ligand de l'ADN.

La présence de l'acide carboxylique sur le DIBAC **134** permet d'envisager une liaison de type peptidique pour le relier au ligand de l'ADN (le piège à protéines portant déjà l'azoture à mettre en face de l'alcyne). À cause de l'incompatibilité des amines primaires avec le piège à protéines, il est nécessaire de réaliser dans un premier temps le couplage peptidique avec le ligand de l'ADN, puis dans un second temps, réaliser l'étape de SPAAC avec le piège à protéines.

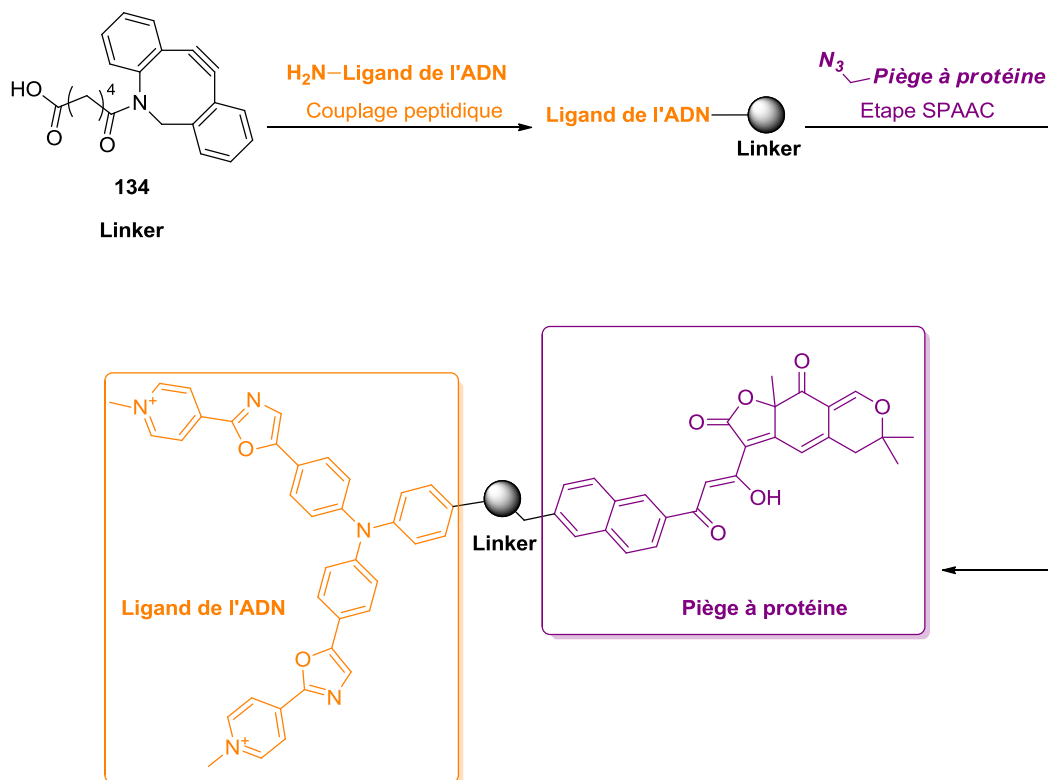


FIGURE 166 STRATÉGIE DE SPAAC ENVISAGÉE.

La stratégie de synthèse oblige donc la fonctionnalisation préalable du cyclo-octyne **134** par le ligand de l'ADN avant de pouvoir réaliser l'étape de SPAAC. Il est donc nécessaire d'introduire un groupement amine sur le ligand de l'ADN. Le couplage peptidique entre le cyclo-octyne acide **134** et le ligand de l'ADN bromé **137** (issu de la méthylation des pyridines du composé **67**) nécessite donc deux modifications préalables (Figure 167) :

- La première modification réside en l'introduction d'un groupement amine primaire permettant le couplage peptidique sur le composé **137**. Cette introduction est réalisée par un couplage de Sonogashira avec un alcyne aminé, donnant le composé **138** (Figure 167).
- La deuxième modification consiste en l'activation de la fonction acide carboxylique du DIBAC **134** en ester de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) donnant le composé **139** (Figure 167).

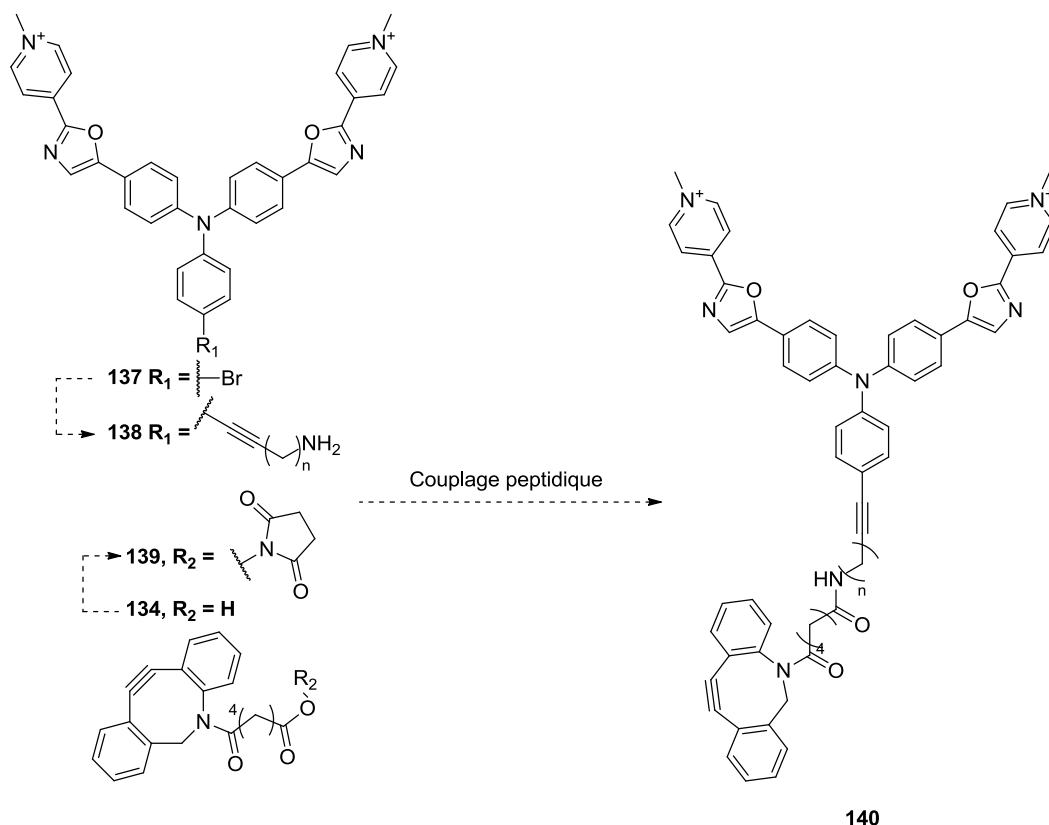


FIGURE 167 STRATÉGIE DE SYNTHÈSE DE LIAISON DU LINKER CYCLO-OCTYNE AU LIGAND DE L'ADN.

Dans un premier temps, l'introduction du groupement amine sera abordée, puis viendra l'activation du composé **134** sous forme d'ester de NHS **139**.

2.3.3.2.1. INTRODUCTION DE LA FONCTION AMINE PAR COUPLAGE DE SONOGASHIRA.

L'introduction de cette fonction amine est réalisée par un couplage de Sonogashira et a été effectuée sur deux composés différents et en deux temps. Dans un premier temps, ce couplage a été réalisé sur le composé **137** possédant le di-cation pyridinium, puis dans un second temps sur le composé **67**, précurseur du composé **137** (Figure 168).^{199,325}

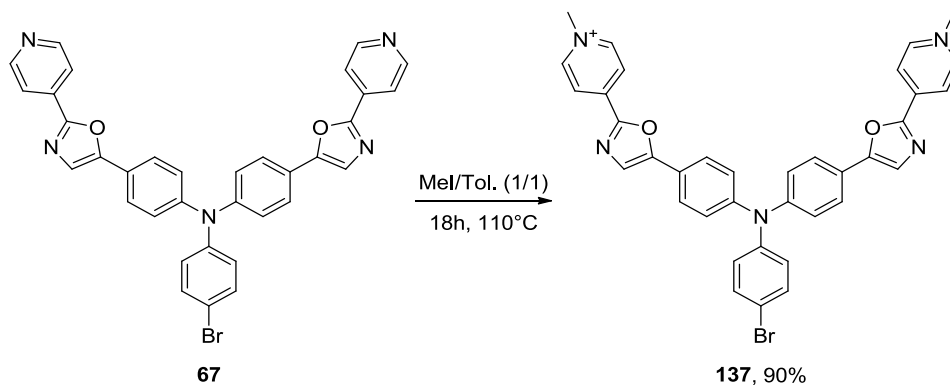


FIGURE 168 QUATERNARISATION DES PYRIDINES SOUS FORME DE PYRIDINIUM.

2.3.3.2.1.1. COUPLAGE DE SONOGASHIRA SUR LE DÉRIVÉ DI-CATIONIQUE.

Dans un premier temps, le couplage a été effectué entre le composé di-cationique **137** et la propargylamine protégée par un groupement phtalimide **141**.

Pour cela, différents solvants usuels en couplage de Sonogashira ont été utilisés comme la triéthylamine ou la DIPEA, néanmoins, aucun de ses solvants n'a pu solubiliser le composé **137**. Un cas d'insolubilité similaire a été rencontré au sein du laboratoire et la solution a été d'utiliser le DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène), dans lequel le produit **137** est également soluble.

Ainsi, les conditions de couplage de Sonogashira « classiques » ont été reprises en utilisant un mélange de Pd(PPh₃)₂Cl₂ et de CuI à 20 mol % en présence de DBU (Figure 169).

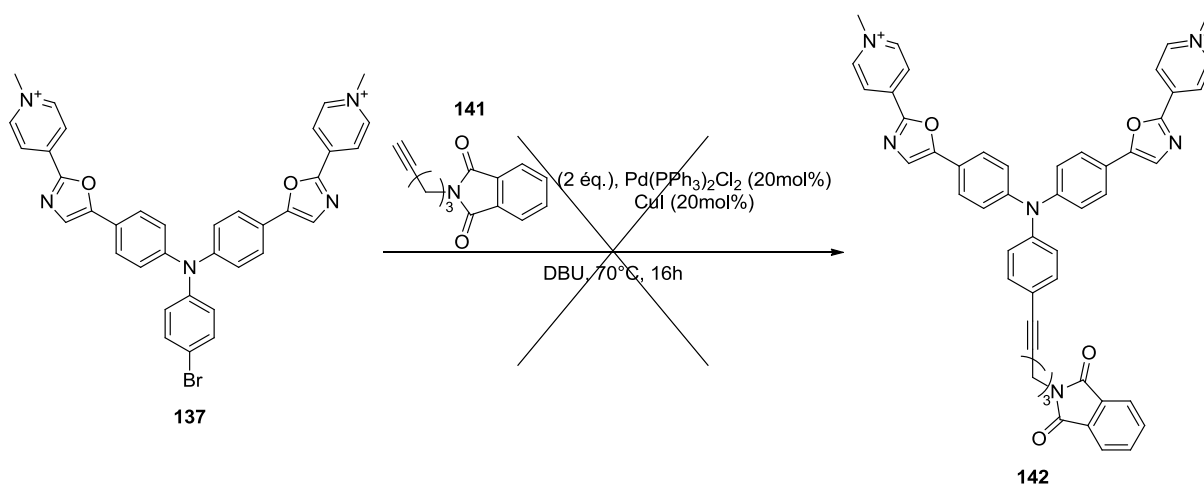


FIGURE 169 TENTATIVE DE COUPLAGE DE SONOGASHIRA.

Cependant, malgré la solubilisation totale des espèces dans le DBU, seul le produit **137** a été observé sans la présence de phtalimide. Suite à ces échecs, cette voie a été abandonnée afin de s'affranchir de l'utilisation du DBU et du di-cation **137** difficilement soluble. De plus, il a également été pris en compte la réalisation du couplage peptidique le plus tardivement possible à cause de la rareté et de la faible quantité du cyclo-octyne disponible. En prenant ces paramètres en compte, l'introduction du motif amine doit se faire sur le composé **67**, qui se trouve être soluble dans de nombreux solvants compatibles avec les couplages de Sonogashira comme le DMF, THF, Et₃N ou encore DIPEA. De plus, il est nécessaire d'introduire une amine protégée afin d'éviter sa méthylation lors de l'étape de quaternarisation des groupements pyridines (Figure 170).

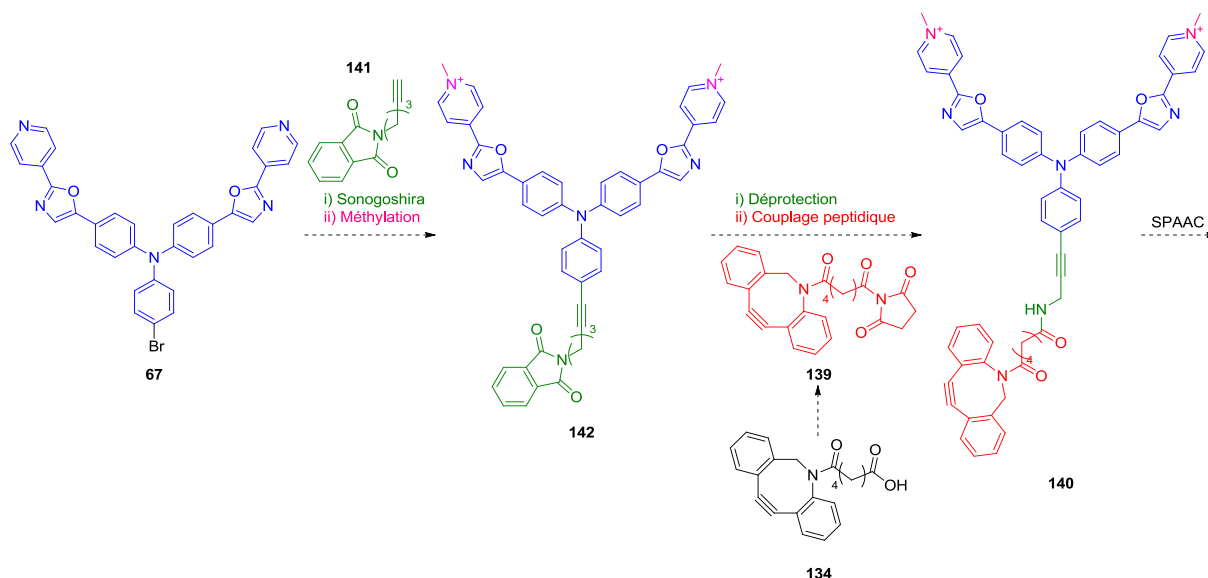


FIGURE 170 SCHEMA DE SYNTHÈSE PERMETTANT L'OBTENTION DE LA MOLÉCULE 105.

2.3.3.2.1.2. COUPLAGE DE SONOGASHIRA SUR LE COMPOSÉ 67.

Ainsi, le couplage de Sonogashira entre le composé **67** et le composé **141** a pu être effectué dans un milieu homogène en utilisant les conditions usuellement utilisées (Et_3N , DIPEA, THF ou DMF) mais également en utilisant du DBU et de la TMG (Tetraméthyleguanidine). Cette base est utilisée dans les couplages pallado-catalysés,^{326,327} et possède un pKa proche de celui du DBU (TMG : 23,3. DBU : 24,33. Mesures effectuées dans l'acétonitrile)³²⁸, en plus d'être une base non nucléophile. Les résultats obtenus sont reportés ci-dessous (Figure 171, Tableau 11) :

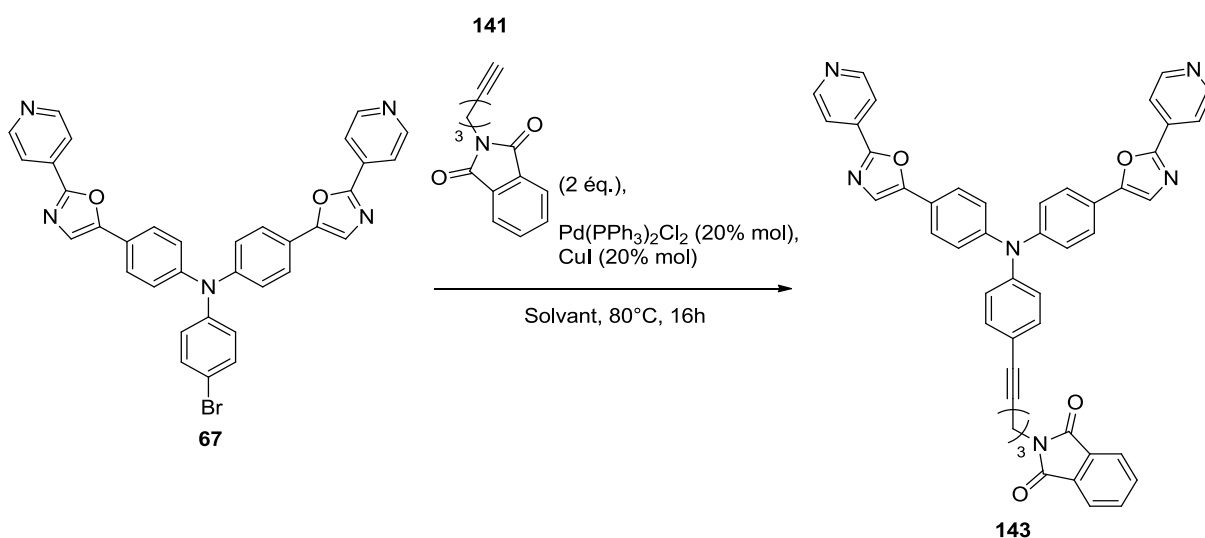


FIGURE 171 TENTATIVE DE COUPLAGE EN MODULANT LE SOLVANT DU COUPLAGE DE SONOGASHIRA.

Conditions	Résultats
Et ₃ N	Récupération des produits 67 et 141
DIPEA	
Et ₃ N/THF (1/1)	
Et ₃ N/DMF (1/1)	
DIPEA/THF (1/1)	
DIPEA/DMF (1/1)	
DBU	Dégradation
TMG	50 %
TMG/DCM (1/1)	60 %

TABLEAU 11 CONDITIONS UTILISÉES POUR EFFECTUER LE COUPLAGE DE SONOGASHIRA.

Les produits de départ ont été récupérés en utilisant des solvants dits standards (Et₃N, THF, DMF, DIPEA) et une dégradation est observée lors de l'utilisation du DBU. Cependant, l'utilisation de TMG a permis d'obtenir le composé **143** désiré avec un rendement de 50 %, dont le rendement augmente à 60 % après optimisation en utilisant un mélange équimolaire en DCM et TMG. Ce système de solvant permet d'éliminer plus facilement la TMG résiduelle et facilite donc légèrement la purification.

Une fois ce composé **143** obtenu, la synthèse peut être poursuivie par la quaternarisation des pyridines et la déprotection du groupement phtalimide. Cette déprotection va libérer l'amine nécessaire au couplage peptidique avec le linker cyclo-octyne.

2.3.3.2.2. FORMATION DU DI-CATION PYRIDINIUM, ET LIBÉRATION DE L'AMINE NÉCESSAIRE AU COUPLAGE PEPTIDIQUE.

Sous l'action d'un mélange équimolaire en toluène et iodure de méthyle, le composé **142** a pu être obtenu avec 91 % de rendement. L'utilisation de ce système de solvant particulier permet de faire précipiter le di-cation pyridinium dans le milieu, facilitant ainsi sa purification.

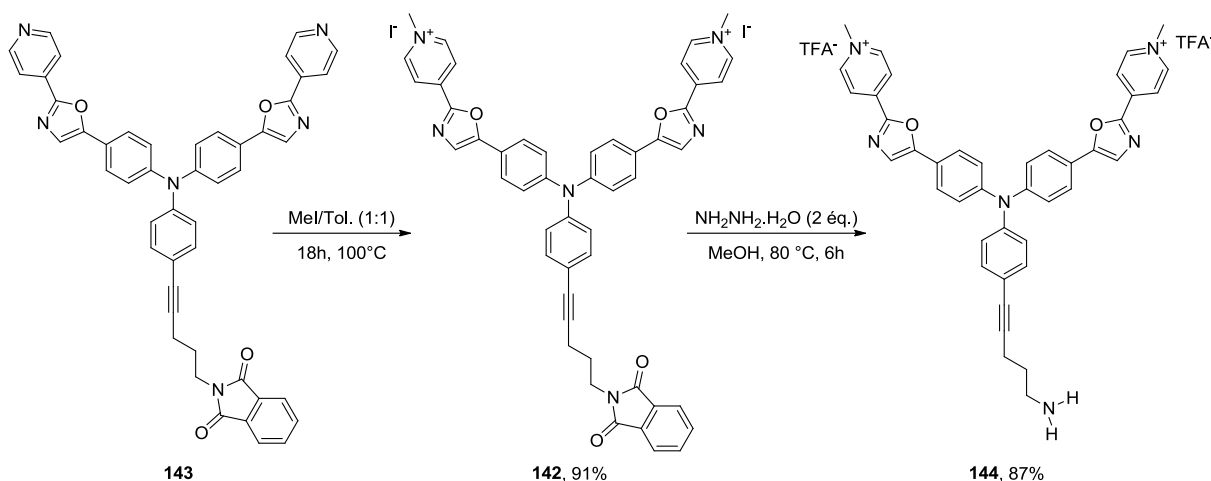


FIGURE 172 SYNTHÈSE DU COMPOSÉ 117.

Une fois ce produit **142** obtenu, l'amine primaire est libérée par l'action de l'hydrazine mono-hydrate, selon le mécanisme de la réaction de Gabriel, conduisant au produit **144** avec un rendement de 87 %, après purification en phase inverse (Figure 172).³²⁹

Le produit désiré **144** a donc pu être synthétisé avec un rendement global de 32 % sur 6 étapes, ouvrant la voie au couplage peptidique entre ce dernier et le cyclo-octyne **139**.

2.3.3.2.3. INTRODUCTION DU LINKER CYCLO-OCTYNE SUR LE LIGAND DE L'ADN PAR COUPLAGE PEPTIDIQUE.

L'introduction du linker cyclo-octyne a été effectuée en deux temps. Dans un premier temps, le cyclo-octyne acide DIBAC **134** (Figure 173), présent au sein du laboratoire, sera utilisé comme témoin pour valider ce concept. En effet, la bibliographie sur ce composé reporte une faible reproductibilité de son activation sous forme de NHS, notamment sur petite quantité.^{330–333} Afin de s'affranchir de ce problème, le cyclo-octyne NHS commercial **135** (DBCO-NHS, Figure 173) a été utilisé. Une fois la preuve de concept validée avec le DIBAC **134**, la sonde sera synthétisée sur plus grosse quantité en utilisant le DBCO-NHS **135**.

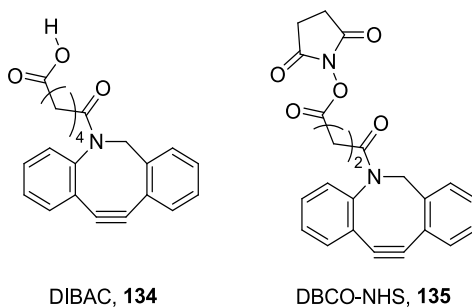


FIGURE 173 RAPPEL DES STRUCTURES DES CYCLO-OCTYNES COMMERCIALES UTILISÉES (PREUVE DE CONCEPT AVEC LE DIBAC ET SYNTHÈSE DE LA SONDE AVEC LE DBCO-NHS).

2.3.3.2.3.1. PREUVE DE CONCEPT

La preuve de concept a été validée en utilisant une faible quantité de DIBAC **134** dont l'activation a été réalisée avec succès selon les conditions établies dans la bibliographie (Figure 174).^{330–333}

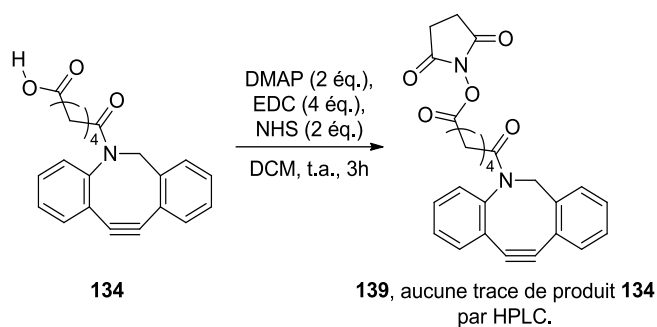


FIGURE 174 ACTIVATION DU CYCLO-OCTYNE SOUS FORME DE NHS.

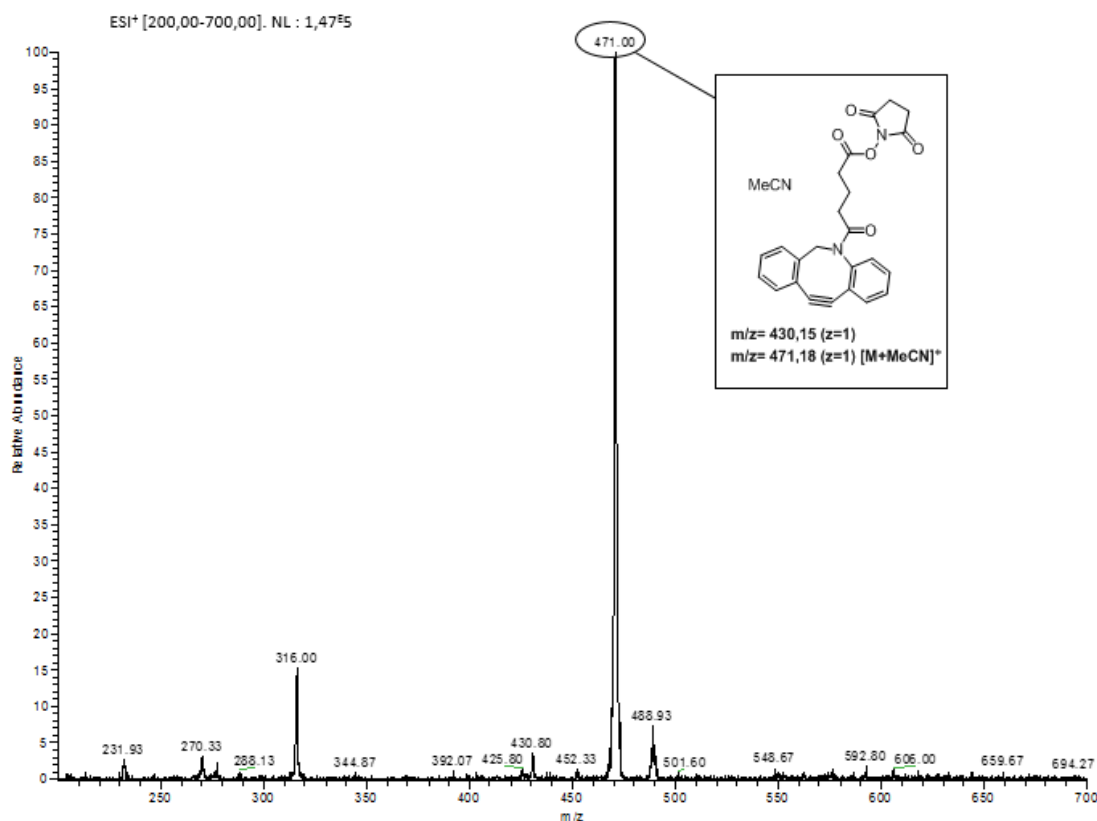


FIGURE 175 SPECTRE DE MASSE BASSE RÉOLUTION DU BRUT RÉACTIONNEL DU COMPOSÉ 103.

Le produit **139** a ainsi été observé par spectrométrie de masse (en présence d'adduit acétonitrile), avec une consommation totale de produit initial **134** déterminée par HPLC, et ce après extraction. Il est cependant important de noter que le composé **139** n'a pas été observé en HPLC, certainement dû à la faible stabilité du groupement NHS en présence de la solution d'acide trifluoroacétique à 0.1 % utilisée dans la phase mobile.

La faible quantité de produit manipulée pour cette preuve de concept, oblige l'ajout du ligand de l'ADN **144** directement dans le milieu réactionnel contenant le produit **139** sans que ce dernier ait été purifié. Un suivi par HPLC et par spectrométrie de masse est effectué (Figure 176) :

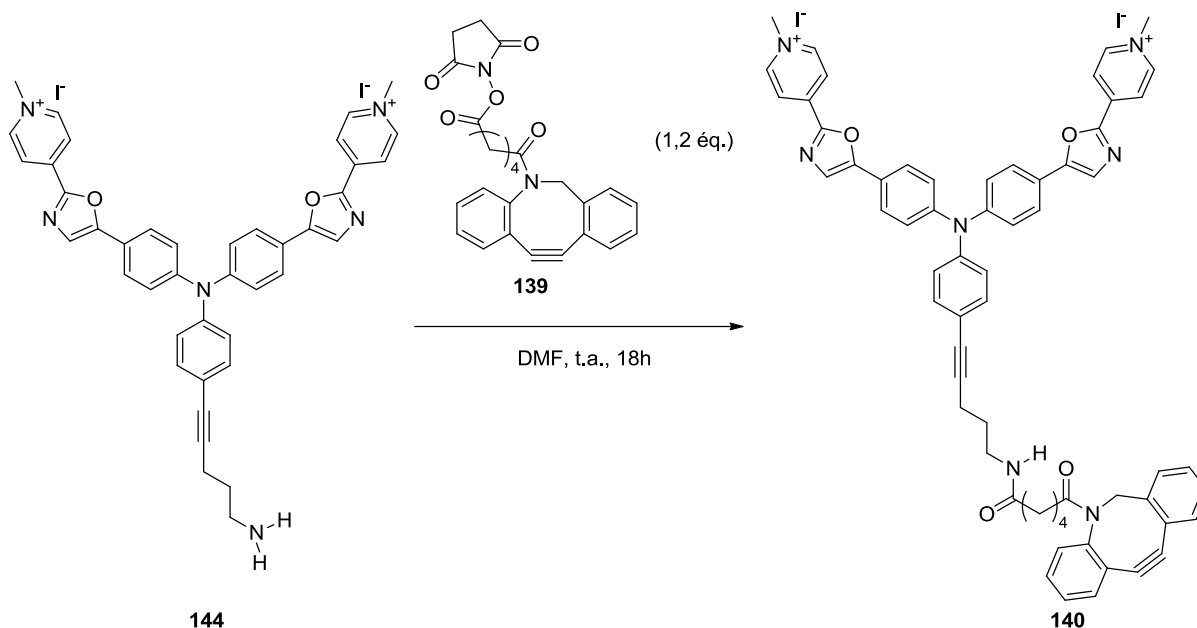


FIGURE 176 COUPLAGE PEPTIDIQUE ENTRE LES COMPOSÉS 139 ET 144.

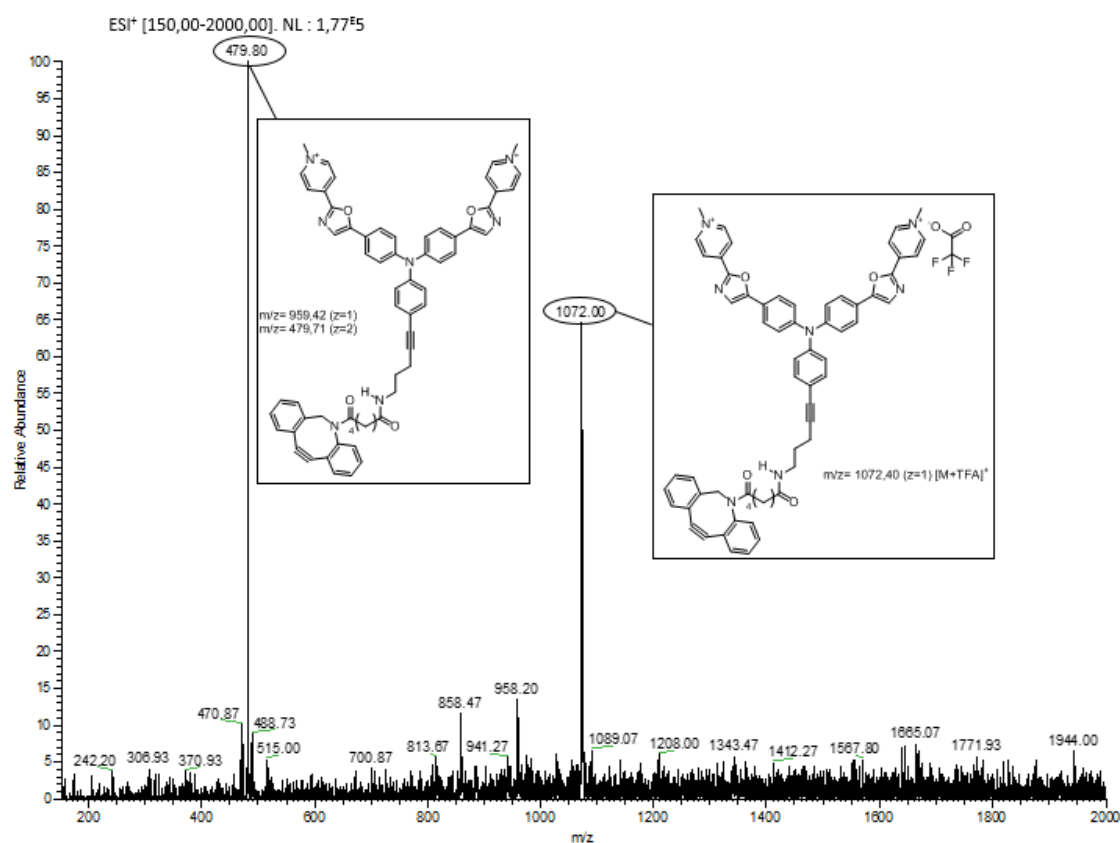


FIGURE 177 SPECTRE DE MASSE DU BRUT RÉACTIONNEL DU COMPOSÉ 140.

L'observation du composé **140** par spectrométrie de masse et la consommation totale du produit **144** mesurée par HPLC, indique la réussite du couplage avec la présence d'un adduit TFA de ce même composé (dûe aux conditions de préparation de l'échantillon HPLC).

Avec l'obtention du composé **140**, l'étape finale permettant de le relier à l'azoture **24** par réaction de type SPAAC peut être effectuée, afin d'obtenir le composé **145** souhaité. Cependant, l'obtention de deux produits n'est pas à exclure dû à l'utilisation du cyclo-octyne **140** dissymétrique.

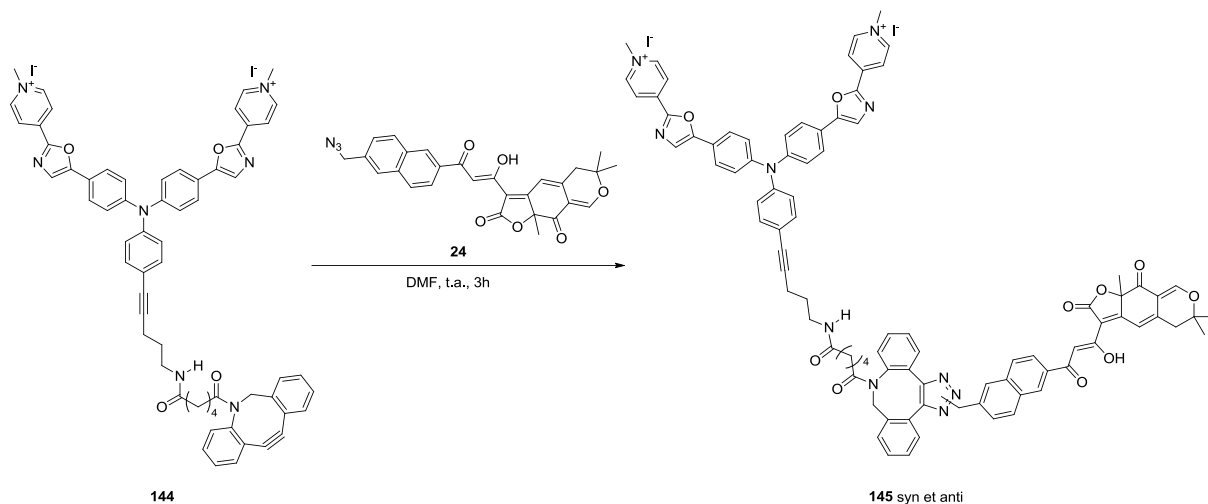


FIGURE 178 ETAPE DE SPAAC PERMETTANT LA LIAISON ENTRE LE LIGAND DE L'ADN **144** ET LE PIÈGE À PROTÉINES **24**.

Après 2h40 de réaction, le produit **145** a été observé à 728,80 Da, correspondant au produit di-chargé souhaité ($m/z=1457,62$, pour $z=1$, soit 728,81 pour $z=2$) (Figure 179).

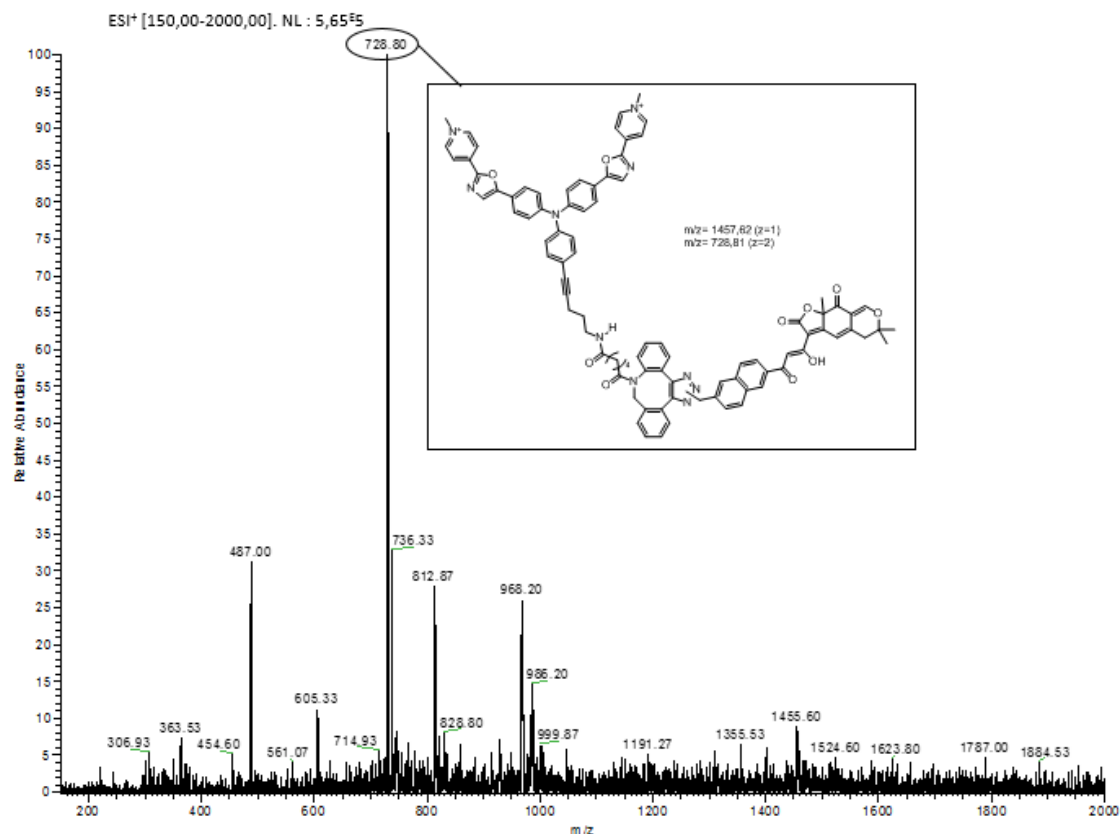


FIGURE 179 SPECTRE DE MASSE DU BRUT RÉACTIONNEL INDIQUANT LA PRÉSENCE MAJORITAIRE DU PRODUIT **119** DÉSIRÉ.

L'observation de ce composé valide donc la stratégie de synthèse. Néanmoins, il est impossible de définir si deux régioisomères ont été obtenus ou non. Cette séquence réactionnelle a ensuite été répétée avec le DBCO-NHS commercial **135** et le ligand **144**.

2.3.3.2.3.2. SYNTHÈSE DE LA SONDE.

La validation de la stratégie SPAAC permet de synthétiser la sonde initialement prévue sur une plus grosse échelle. De plus, pour s'affranchir de toute perte de produit due aux purifications, l'étape de couplage peptidique entre le ligand de l'ADN **144** et le DBCO-NHS **135** ainsi que l'étape de SPAAC avec le piège à protéines **24**, sont réalisées séquentiellement.

Le couplage peptidique est donc effectué dans un premier temps entre le ligand de l'ADN **144** et 1,2 équivalents de DBCO-NHS commercial **135**. L'utilisation de 1,2 équivalent de DBCO-NHS **135** permet d'éviter toute trace d'amine résiduelle provenant du ligand **144** dans le milieu réactionnel qui est néfaste au piège à protéines. Cette étape est suivie par HPLC et spectrométrie de masse en mesurant la consommation du ligand **144**. Une fois ce dernier consommé, le piège à protéines **24** est ajouté au milieu. (Figure 180)

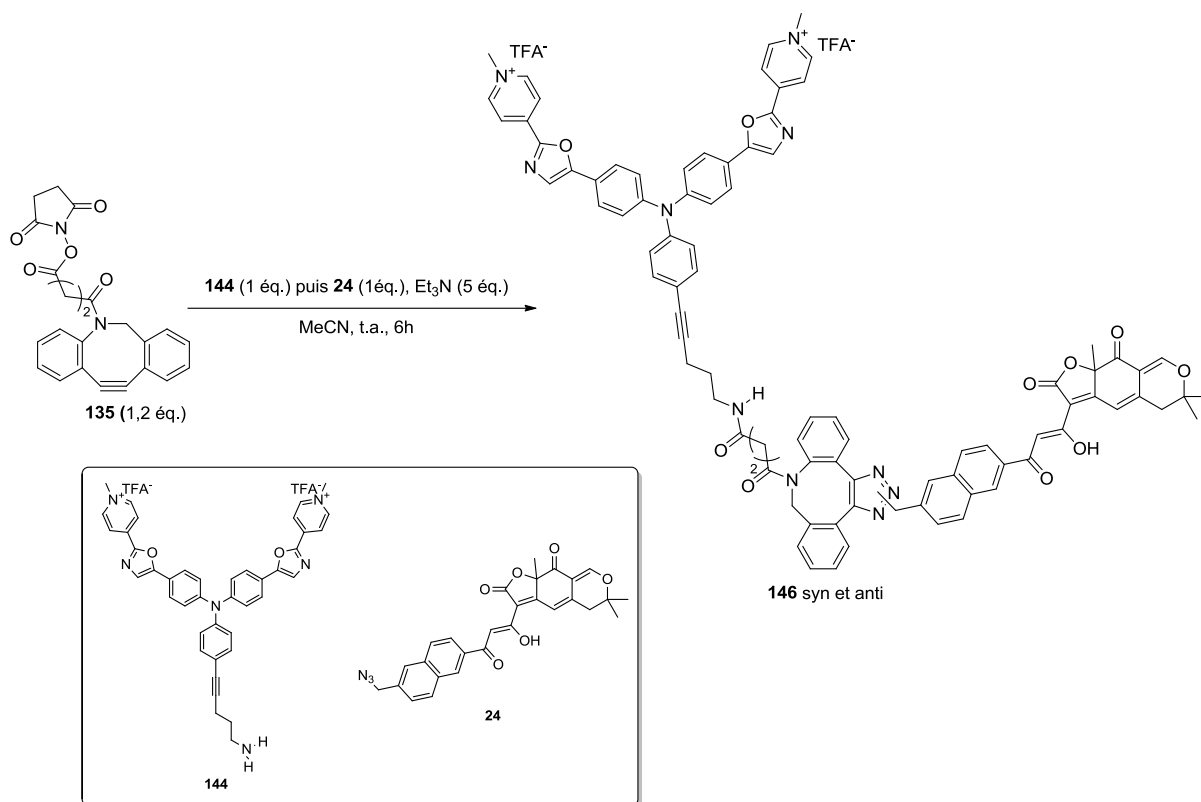


FIGURE 180 SÉQUENCE RÉACTIONNELLE IMPLIQUANT LE PRODUIT COMMERCIAL 135, LE LIGAND DE L'ADN 144 ET LE PIÈGE À PROTÉINES 24.

La purification de cette étape de synthèse a été effectuée par chromatographie en phase inverse et un produit a été isolé. Cependant, après vérification par HPLC analytique, deux produits sont présents et sont séparés de 20 secondes dans les conditions d'élutions utilisées. La proportion de ces deux produits laisse supposer un ratio 2/3 et 1/3. De plus, ces deux composés possèdent le même profil spectroscopique avec deux bandes d'émission, une première à 333 nm et une deuxième à 433 nm (Figure 181).

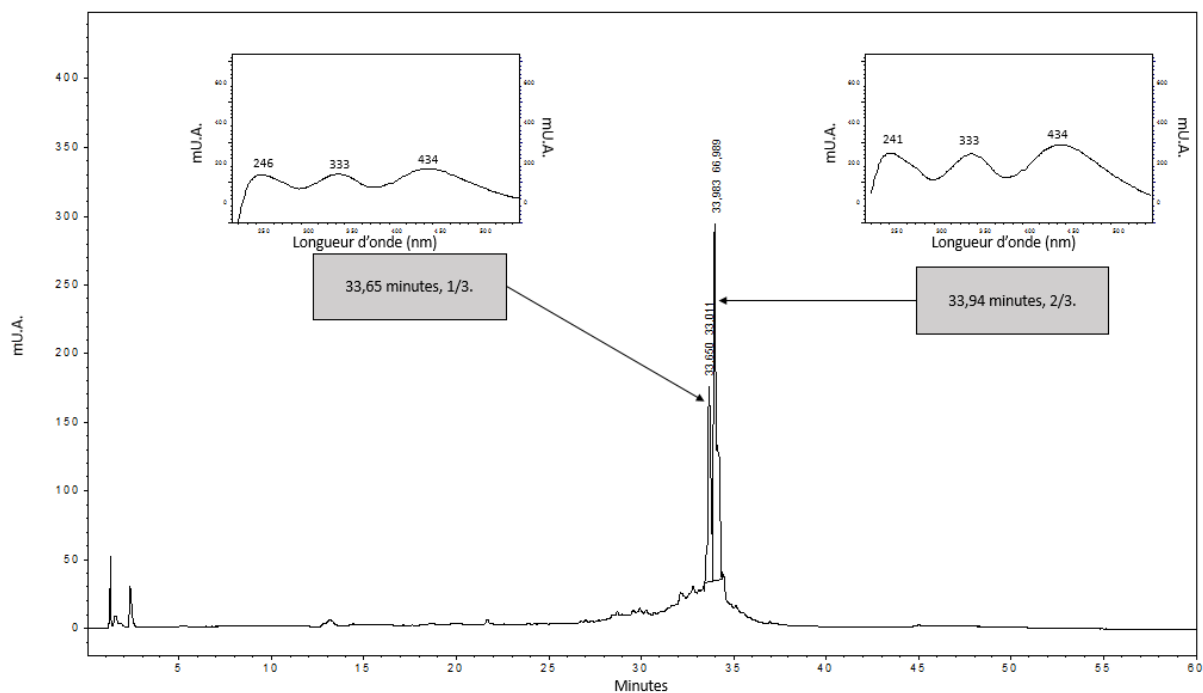


FIGURE 181 PROFIL HPLC ET UV DES COMPOSÉS 146.

L'analyse HRMS de ce mélange indique cependant une masse unique à 714,27 Da, correspondant au produit final **146** désiré ($m/z=1428,54$ $z=1$, $m/z=714,27$ $z=2$) (Figure 182).

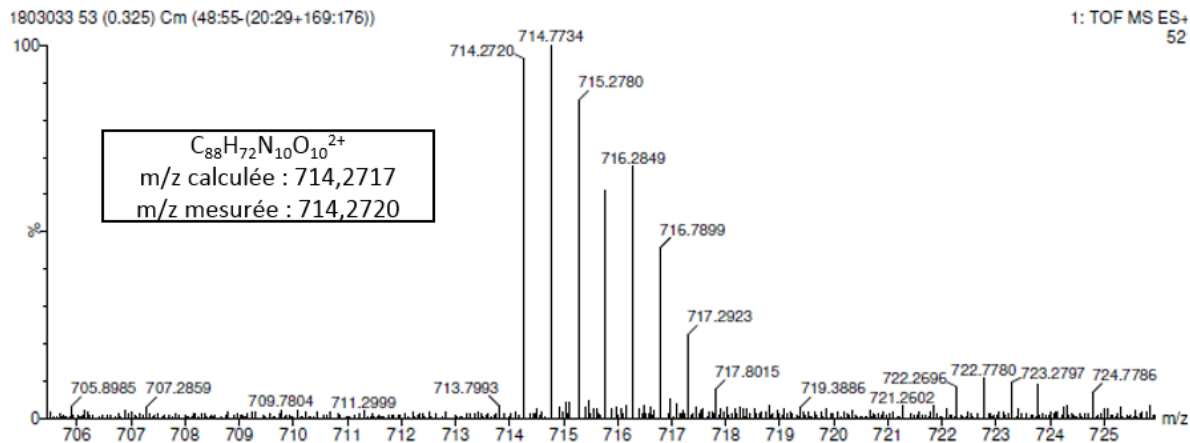


FIGURE 182 HRMS DU PRODUIT 146.

Toutes ces informations laissent donc supposer la présence des deux régioisomères issus de la réaction de SPAAC. La sonde **146**, objectif premier de ces travaux de thèse, a pu être synthétisée en 9 étapes avec un rendement global de 1 %.

2.4. CONCLUSION

L'objectif principal de ces travaux de thèse a été rempli en synthétisant la sonde **146** grâce à deux étapes clefs : une réaction de C-H activation « on water » et une cycloaddition spontanée entre un azoture et un cyclo-octyne.

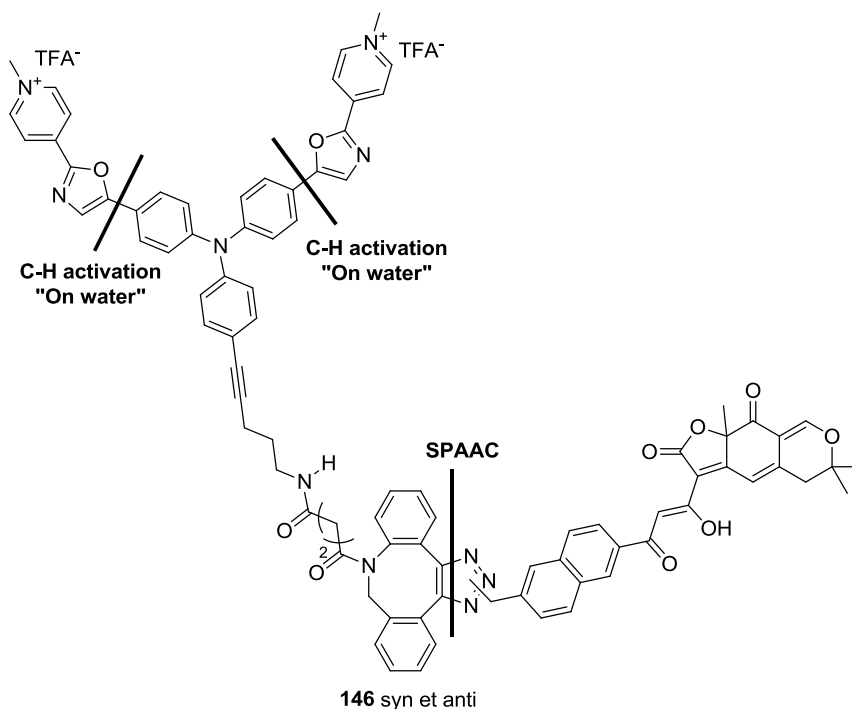


FIGURE 183 COUPURE SYNTHÉTIQUE CLEF DE LA SONDE 146.

L'étape de C-H activation « on water » a de plus été utilisée pour synthétiser de nouveaux ligands de l'ADN. L'utilisation de cette étape permet d'accéder de façon simple, rapide, efficace et convergente vers une vaste bibliothèque de nouveaux ligands. Ainsi, 4 nouveaux ligands ont pu être synthétisés.

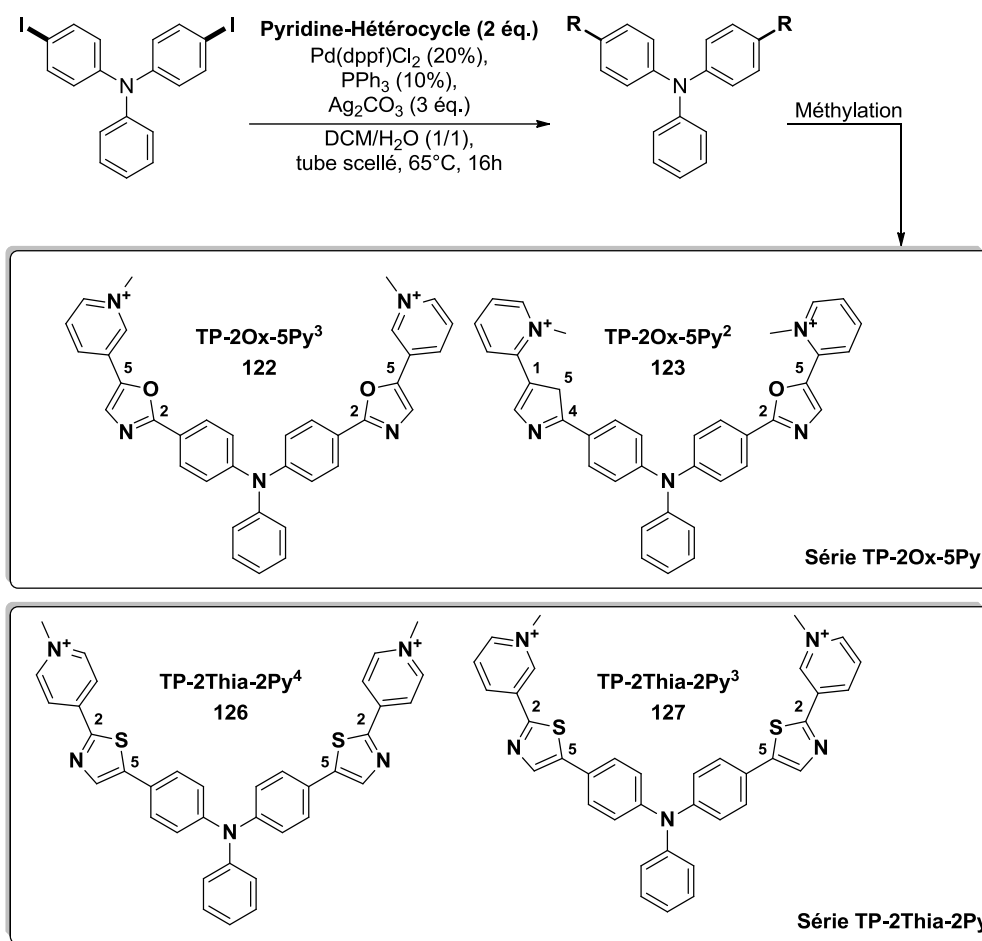


FIGURE 184 LES DIFFÉRENTS LIGANDS OBTENUS DURANT CETTE THÈSE ET L'ÉTAPE DE C-H ACTIVATION « ON WATER » CLEF.

L'obtention de ces différents ligands et de la sonde **146**, permet d'accéder à la seconde étape de ces travaux de thèse, la détermination de leurs propriétés photo-physiques et leurs comportements vis-à-vis de la cellule et de l'ADN. Ces études ont été réalisées sur une courte période de temps à l'Institut Curie.

ÉVALUATION DES LIGANDS SYNTHÉTISÉS.

3. ÉVALUATION DES LIGANDS SYNTHÉTISÉS.

3.1. INTRODUCTION.

Comme évoqué dans l'introduction générale, les ligands peuvent interagir selon de nombreuses façons avec l'ADN. Pour mettre en évidence ces interactions et déterminer leur efficacité, les techniques d'analyses utilisées en routine dans les laboratoires de chimie peuvent également être utilisées ici, notamment *via* la spectrométrie de masse et la RMN. Mais d'autres techniques biophysiques peuvent être utilisées comme la calorimétrie ou les méthodes de spectroscopies optiques (absorption UV-visible, fluorescence et dichroïsme circulaire). Le choix des méthodes dépendra donc des propriétés physico-chimiques des ligands étudiés.

Cependant, malgré les nombreuses méthodes existantes, aucune ne s'auto-suffit pour admettre un résultat et il est nécessaire de coupler les résultats de plusieurs méthodes afin d'avoir des informations complètes. C'est ce qui sera développé dans cette partie. En effet, chaque technique est spécifique et permet d'obtenir des informations différentes. Ainsi, l'utilisation de la diffraction par rayons X ou de la RMN donnera des informations structurales, tandis que les analyses par spectrométrie de masse ou par mesures spectroscopiques vont donner des informations sur la sélectivité du ligand ou sur la nature de l'interaction.

Les composés synthétisés durant ces travaux de thèse étant des sondes fluorescentes ou profluorescentes, l'analyse des interactions ADN-ligand sera focalisée sur l'utilisation de méthodes spectroscopiques. De plus, l'équipement nécessaire à ces méthodes est couramment utilisé dans les laboratoires permettant de les mettre rapidement et facilement en œuvre. Mais surtout, ces méthodes nécessitent l'utilisation de peu de matière de par leur grande sensibilité, les rendant relativement efficaces et avantageuses.

Quatre techniques spectroscopiques ainsi que de l'imagerie cellulaire sont ainsi envisagées pour caractériser les différents ligands synthétisés durant ces travaux de thèse :

- La titration fluorimétriques.
- Le FRET-melting.
- Le FID.
- Le dichroïsme circulaire.

3.1.1. LA TITRATION FLUORIMÉTRIQUE.

La titration fluorimétrique permet de mesurer la constante d'affinité d'un ligand pour l'ADN, en traçant une courbe de fluorescence F/F_0 en fonction de la concentration ajoutée d'ADN, où F est la fluorescence mesurée et F_0 est la fluorescence initiale du ligand libre en solution.^{334–336} Il s'agit ici d'une méthode de mesure directe de l'affinité. D'une manière générale, ces fluorophores vont disposer d'une exaltation de fluorescence une fois liés à l'ADN en limitant les désexcitations non-radiatives par fixation de leur conformation, comme par exemple pour le thiazole orange (Figure 185).

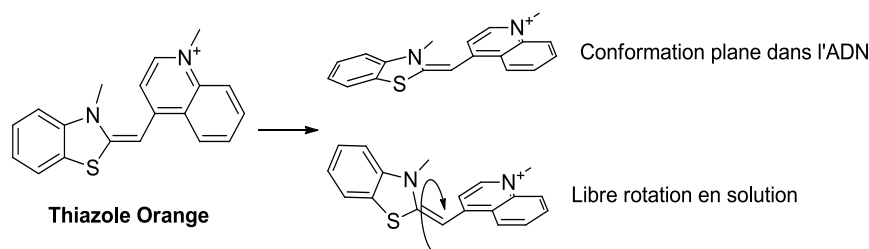


FIGURE 185 STRUCTURE DU TO (THIAZOLE ORANGE) ET SES CONFORMATIONS DANS L'ADN ET EN SOLUTION.

Il a été choisi de travailler ici à concentration constante en fluorophore afin de mettre en évidence la variation du signal de fluorescence en fonction de la concentration d'ADN ajoutée. Par conséquent, l'intensité de fluorescence augmentera jusqu'à atteindre un plateau (saturation), et plus cette saturation est atteinte rapidement, plus le ligand sera affiné pour la séquence ADN étudiée.

Cependant, il est important de noter que l'interaction entre l'ADN et un ligand ne s'accompagne pas nécessairement d'une exaltation de fluorescence. En effet, un ligand peut interagir fortement avec l'ADN sans pour autant émettre une fluorescence. Ainsi, l'affinité d'un ligand pour l'ADN ne sera pas nécessairement proportionnelle à l'exaltation de la fluorescence. L'exemple le plus concret illustrant ces propos est la différence existante entre les ligands **TP-2Ox-5Py⁴** et **TP-2Ox-2Py⁴**.¹⁶⁰ Ces deux séries de ligands, synthétisés à l'Institut Curie, sont affines pour l'ADN, mais seul le ligand **TP-2Ox-5Py⁴** possède une exaltation de fluorescence en présence d'ADN (Figure 186).

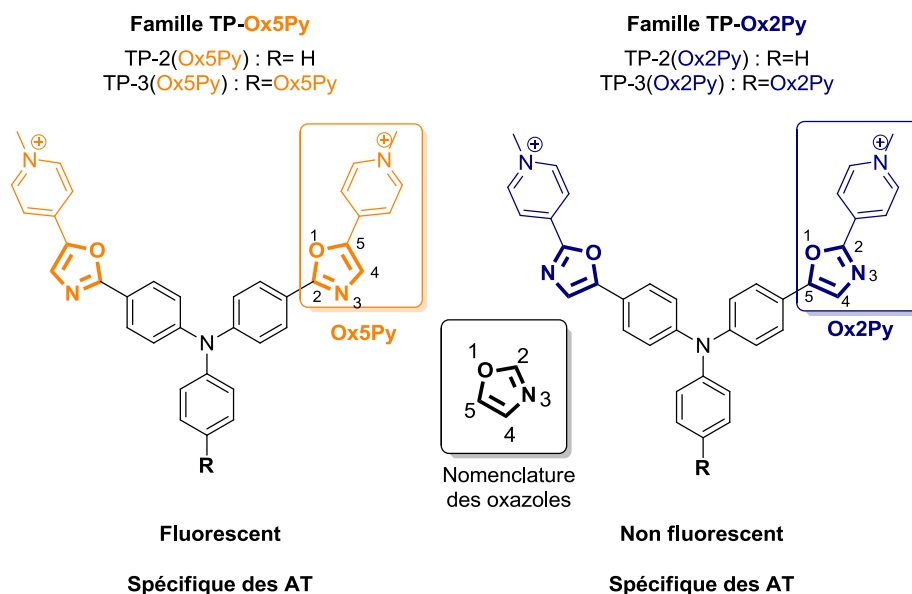


FIGURE 186 RAPPEL DES STRUCTURES LEADERS SYNTHÉTISÉS À L'INSTITUT CURIE.

Néanmoins, pour les sondes étant fluorescentes, leur efficacité ne dépend pas uniquement de leur intensité de fluorescence. En effet, en microscopie de fluorescence, la propriété la plus importante est le contraste entre l'intensité de fluorescence du ligand libre en solution et celui lié à l'ADN (ce qui pourrait être qualifié de brillance). Ce sont pour ces raisons, qu'il est légitime de faire un lien entre les valeurs de F/F_0 d'un ligand et son affinité pour l'ADN.

3.1.2. LE FRET-MELTING.

La méthode de FRET-Melting permet de déterminer l'affinité d'un ligand pour une zone spécifique de l'ADN, sans que ce ligand ne soit nécessairement fluorescent. Il s'agit d'une méthode de mesure d'affinité indirecte.

L'ADN dispose d'une absorbance naturelle qui diminue à mesure que sa structuration augmente. Ce phénomène est dû à l'empilement des paires de bases. Ainsi, la déstructuration thermique de cet empilement va avoir un effet hyperchrome, qui est recherché dans l'expérience de Melting (UV comme FRET) (Figure 187). Cette propriété est utilisée afin d'observer la stabilisation de l'ADN par un ligand quelconque, en mesurant la différence de température de demi-fusion de l'ADN avec et sans ligand (température à laquelle la moitié de l'ADN double brin est dénaturée en simple brin). Ainsi, une augmentation de cette température indiquera qu'un apport énergétique supplémentaire est nécessaire pour

dénaturer la structure, synonyme d'une interaction entre le ligand et l'ADN stabilisant ce dernier (Figure 187).

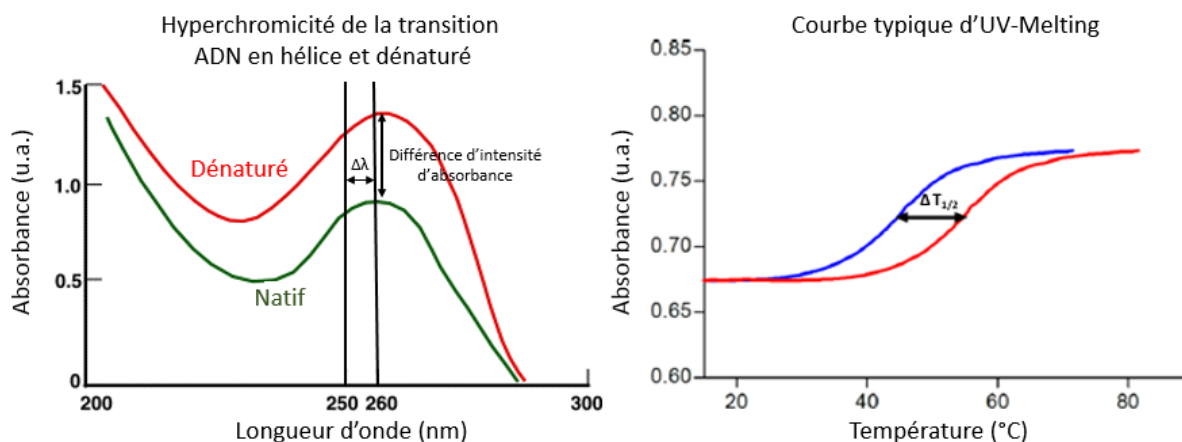


FIGURE 187 COURBE D'HYPERCHROMICITÉ DE L'ADN À GAUCHE AVEC EN VERT LA COURBE DE L'ADN HÉLICOÏDAL, ET EN ROUGE L'ADN DÉSTRUCTURÉ. À DROITE, PRINCIPE D'UV-MELTING DE L'ADN AVEC EN BLEU L'ADN SEUL, ET EN ROUGE L'ADN EN PRÉSENCE DE LIGAND.

Cependant, une légère fluctuation de la longueur d'onde du signal détecté peut survenir et rendre les courbes de fusion imprécises. Pour pallier ce problème, une méthode de FRET-melting a été mise au point.^{335–337} Cette méthode est basée sur le transfert d'énergie par résonance de type Förster (Förster Resonance Energy Transfert ou FRET)^{338–342}, qui consiste en un transfert d'énergie non-radiatif d'un fluorophore donneur vers un fluorophore accepteur. Ce transfert peut avoir lieu seulement si trois conditions sont réunies :

- Le spectre d'émission du donneur recouvre le spectre d'absorption de l'accepteur.
- Les fluorophores sont proches spatialement.
- Leurs moments dipolaires sont alignés.

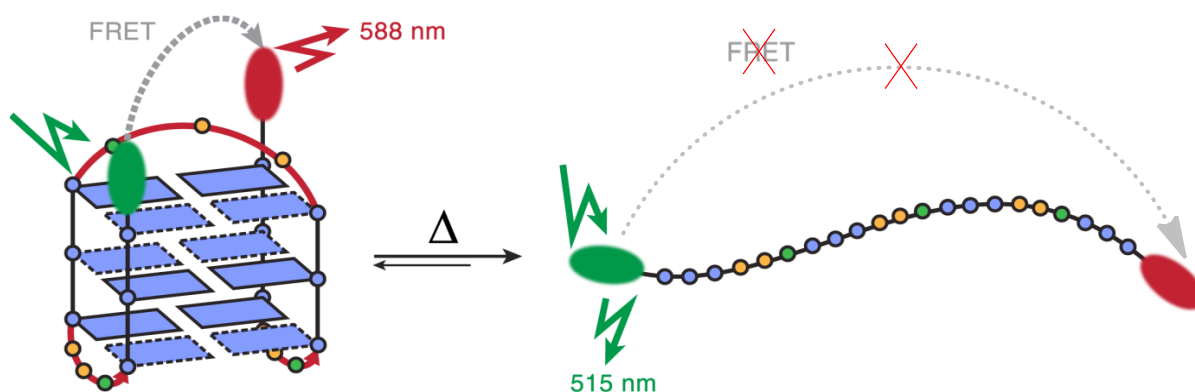


FIGURE 188 PRINCIPE DE FRET-MELTING D'UN SYSTÈME G-QUADRUPLEX AVEC EN VERT LA FLUORESCÉINE DONNEUSE ET EN ROUGE LA TETRAMÉTHYLRHODAMINE (TAMRA) ACCEPTUESE.

Le principe du FRET-melting est donc le suivant : lorsque le quadruplex est formé, c'est l'accepteur qui émet de la fluorescence. Une fois le quadruplex dénaturé, c'est la fluorescence du donneur qui sera observée. Cette méthode est ainsi beaucoup plus précise parce qu'elle fait intervenir le phénomène de fluorescence de deux composés de gamme spectrales distinguables, ce qui rend les résultats de ces expériences facilement interprétables.

Comme précédemment, un ligand affiné pour l'ADN va stabiliser la structure de l'ADN et il faudra apporter plus d'énergie thermique pour la dénaturer, ce qui se traduit par une augmentation de la température de demi-fusion (Figure 188). Au contraire, dans le cas d'un ligand déstabilisant (qui irait par exemple entre les liaisons H des bases de l'ADN et entrainerait une dénaturation locale de l'ADN), une énergie moindre sera requise pour dénaturer l'ADN. Ceci se traduisant donc par une température de demi-fusion plus faible.

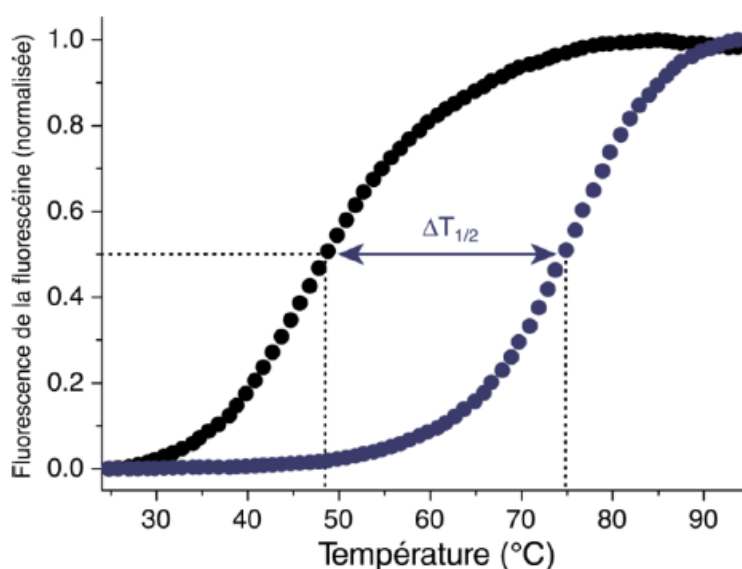


FIGURE 189 COURBES DE FUSION DE FRET-MELTING D'UN LIGAND AFFIN POUR L'ADN, AVEC EN NOIR LA COURBE SANS LIGAND, ET EN BLEU LA COURBE AVEC LIGAND.³³⁶

3.1.3. LE FID : FLUORESCENT INTERCALATOR DISPLACEMENT.

Comme le FRET-melting, le FID (Fluorescent Intercalator Displacement)^{343–346} permet d'évaluer l'affinité d'un ligand pour l'ADN, sans que ce ligand soit nécessairement fluorescent. C'est une méthode de mesure d'affinité indirecte, avec une excellente résolution, facile et rapide à mettre en œuvre.

Le principe est de marquer la séquence ADN par une molécule profluorescente (Cf. Figure 185, p185). Suite à cela, une quantité croissante de ligand est ajoutée et deux phénomènes peuvent être observés :

- Soit aucune extinction de fluorescence : signifiant que le ligand ne déplace pas le marqueur, indiquant donc une absence d'affinité de ce dernier pour la séquence ADN étudiée, ou une affinité supérieure du marqueur par rapport au ligand.
- Soit une extinction de fluorescence : signifiant que le ligand déplace le marqueur et que ce dernier possède une affinité pour la séquence ADN étudiée.

Ainsi, plus l'extinction de fluorescence sera rapide, plus le déplacement sera efficace, et plus le ligand aura une affinité élevée pour la séquence étudiée (Figure 190).

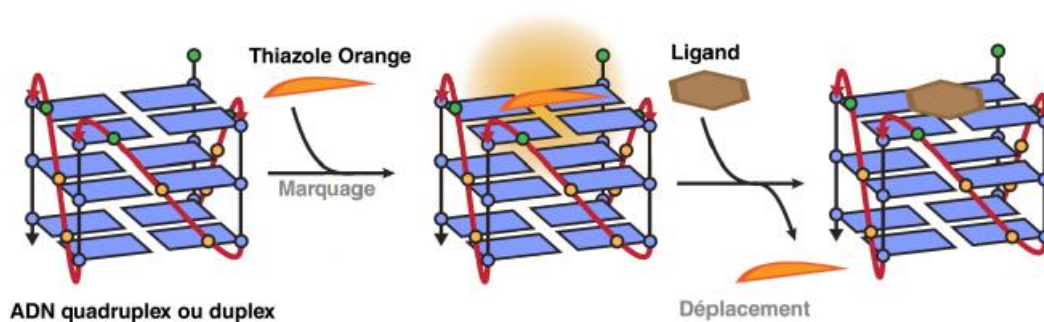


FIGURE 190 PRINCIPE DE LA MÉTHODE DE FID. ^{335,336}

Le marqueur doit donc être choisi judicieusement en fonction des propriétés spectroscopiques du ligand étudié. En effet, le marqueur doit posséder une longueur d'onde d'absorbance différente de celle du ligand afin de ne pas exciter ce dernier. En plus de cet aspect physique, il faut prendre en compte la séquence ADN étudiée (car chaque marqueur possède sa séquence de prédilection), mais également la constante d'affinité du marqueur pour l'ADN. En effet, ce dernier ne doit être ni trop affin pour l'ADN (sinon il sera difficile de déplacer le marqueur) ni pas assez affin (sinon aucune fluorescence ne sera présente). Ainsi, il est possible d'utiliser de nombreux ligands comme le Hoechst 33258, le TO-PRO-3, le TO ou encore le bromure d'éthidium (Tableau 12).

Marqueur fluorescent	λ_{em} (nm)	λ_{ex} (nm)
Bromure d'éthidium	518	605
DAPI	358	461
Hoechst 33258	352	461
TO	513	532
TO-PRO-3	642	660

TABLEAU 12 PROPRIÉTÉS SPECTROSCOPIQUES DES DIFFÉRENTS MARQUEURS COURAMMENT UTILISÉS.

3.1.4. LE DICHROÏSME CIRCULAIRE.

Le dichroïsme circulaire³⁴⁷ mentionné en introduction (p119) représente une des voies les plus simples pour mettre en évidence la présence d'un complexe ADN-ligand. C'est une technique d'analyse qui fait intervenir de la lumière polarisée circulairement. Ainsi, une lumière monochromatique va traverser un milieu optiquement actif et polariser la lumière de façon elliptique. Par conséquent, un mélange racémique aura un dichroïsme circulaire nul du fait de l'annulation de la contribution relative de chaque énantiomère. Ainsi, aucun signal ne sera décelé sauf en cas d'interactions avec l'ADN, ce qui va casser l'achiralité du ligand en induisant un signal (ICD) (Figure 191).³⁴⁸

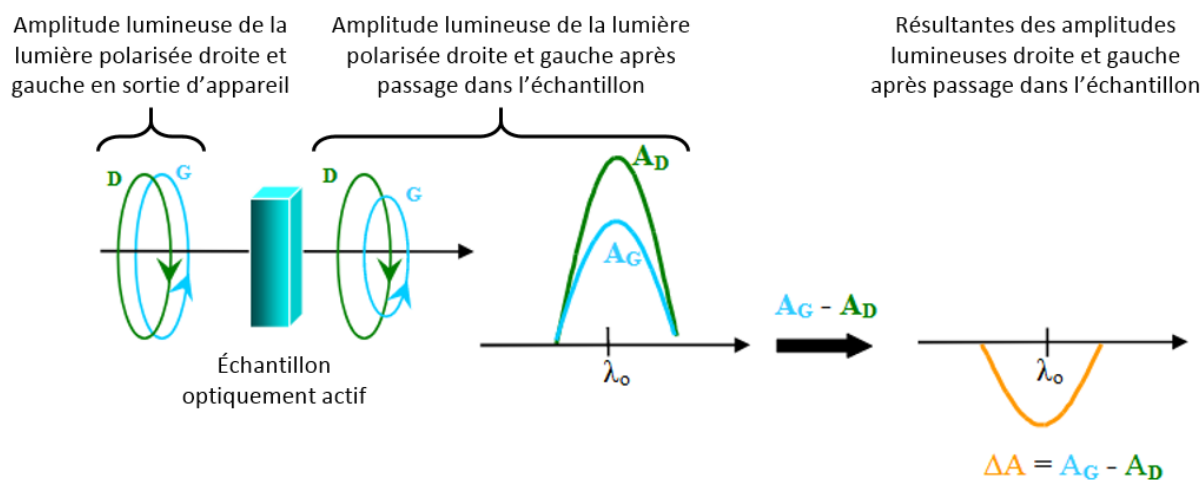


FIGURE 191 PRINCIPE DU DICHROÏSME CIRCULAIRE. D ET G SONT LES SENS DE POLARISATION DE LA LUMIÈRE (RESPECTIVEMENT DROITE ET GAUCHE), QUI SONT MODIFIÉES EN PASSANT DANS L'ÉCHANTILLON. A_D ET A_G CORRESPONDENT AUX AMPLITUDES LUMINEUSES DONT LA DIFFÉRENCE ΔA CORRESPOND À LA DIFFÉRENCE DE CES AMPLITUDES, CORRESPONDANT AU SPECTRE DE CD.

Le dichroïsme circulaire est une méthode complémentaire aux analyses utilisant le phénomène de fluorescence. En effet, c'est la seule méthode qui va permettre de déceler une interaction ADN/ligand lorsque le ligand n'est pas fluorescent. Par manque de temps, la méthode de dichroïsme circulaire n'a pas pu être utilisée pour caractériser les ligands synthétisés.

3.1.5. LES SÉQUENCES ADN D'INTÉRÊT POUR CETTE ÉTUDE.

Ces méthodes d'analyse nécessitent donc la présence d'un ligand mais également d'une séquence ADN. Chaque séquence utilisée aura une suite particulière de paires de bases mimant une zone d'intérêt de l'ADN. Les séquences utilisées durant ces expériences sont détaillées ci-dessous.

Séquence Drew AT :

Il s'agit d'une séquence palindromique, possédant une succession de 6 paires de bases AT (5'-CGA-AAT-TTG-C-3') servant à mimer les séquences riches en AT. Le fait que ces séquences soient palindromiques entraîne un auto-assemblage de l'ADN de façon anarchique. Afin de réorganiser l'ADN sous forme hélicoïdale, l'échantillon est chauffé pendant 5 minutes déstructurant ainsi l'ADN. Un retour lent à température ambiante permet à l'ADN de se réorganiser sous forme hélicoïdale, en duplex.

Séquence DS-26 :

Cette séquence ne dispose d'aucune richesse particulière en paires de bases. C'est une séquence palindromique (5'-CAA-TCG-GAT-CGA-ATT-CGA-TCC-GAT-TG-3') avec plusieurs sites de fixation courts en AT. Cette séquence mime l'ADN générique sous forme de duplex, G4 n'est présent et cette séquence est préparée de la même façon que la séquence Drew AT.

Les séquences suivantes sont des séquences riches en Guanine servant à mimer les G-quadruplex. Elles sont préparées en chauffant l'ADN à 95°C pendant 5 minutes afin de le déstructurer. Cet échantillon est ensuite aussitôt figé à 0°C dans le but de former et de stabiliser les complexes G-quadruplex. De plus, le tampon utilisé est riche en KCl (100 mM) favorisant la formation de ces complexes. Parmi ces séquences se trouvent :

La séquence C-Myc : (5'-TTG-AGG-GTG-GGT-AGG-GTG-GGT-AA-3') qui est une séquence d'un proto-oncogène humain, servant de point d'ancrage à une protéine : la nucléoline. Cette nucléoline est responsable de la synthèse et de la maturation des ribosomes (synthèse protéique). Ce couple ADN/Protéine se révèle donc être un excellent choix pour valider le concept de ces travaux de thèse qui est la synthèse d'un piège à protéines pro-fluorescent possédant une affinité pour les zones à risques de l'ADN.

La séquence Pu27 : (5'-TGG-GGA-GGG-TGG-GGA-GGG-TGG-GGA-AGG-3') qui est présente dans l'oncogène humain de C-Myc.

La séquence Pu24T : (5'-TGA-GGG-TGG-TGA-GGG-TGG-GGA-AGG-3') qui est une séquence modifiée provenant du proto-oncogène C-Myc.

La séquence F-Pu24-T : (5'FAM-TGA-GGG-TGG-TGA-GGG-TGG-GGA-AGG-3'TAMRA) qui est une séquence modifiée de Pu24T utilisée pour le FRET-Melting (Possédant une fluorescéine « Fam » et une tétraméthylrhodamine « Tamra »).

La séquence 22AG : (5'-AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-G-3') qui est une séquence présente dans les télomères humains et qui sert également de séquence référence en G-quadruplex.

La séquence F-21-T : (5'Fam-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-3'Tamra) qui est une séquence spécifique pour les expériences de FRET-melting (possédant une fluoresceine « Fam » et une tétraméthylrhodamine « Tamra ») provenant d'une séquence télomérique humaine.

3.1.6. IMAGERIE CELLULAIRE

L'imagerie cellulaire est l'ensemble des techniques permettant de visualiser la cellule et son environnement. Ce terme inclut de nombreuses techniques comme la microscopie photonique et électronique, la microscopie à force atomique, mais surtout celle qui est la plus utilisée faisant partie des méthodes usuelles d'analyses en biologie, la microscopie de fluorescence.

Cette microscopie de fluorescence permet de visualiser les éléments fluorescents d'une cellule ou les éléments rendus fluorescent par un fluorophore. Ces éléments peuvent être naturellement fluorescents, comme c'est le cas de la chlorophylle dans les cellules végétales, mais cette fluorescence peut également provenir d'une substance exogène qui va aller se fixer spécifiquement sur une structure de la cellule. Il s'agit alors de cytochimie, comme c'est le cas des sondes présentées, censées être fluorescentes une fois liées à l'ADN.

Ces images peuvent être réalisées sur différents états de la cellule, c'est-à-dire une cellule vivante, morte ou fixée. L'état de la cellule va dépendre de ce que l'expérimentateur veut observer. Ainsi, s'il veut observer les mouvements d'un élément marqué au sein d'une

cellule (comme sa vectorisation, sa consommation ou sa production), l'étude dans une cellule vivante va permettre de voir son trajet au cours du temps, sans pouvoir s'arrêter à un instant t . Cependant, si l'expérimentateur veut suivre l'élément marqué à des instants précis, il aura recours aux cellules fixées. En effet, la fixation d'une cellule empêche son évolution et ses mouvements en figeant le milieu cellulaire. Ainsi, l'utilisation de la méthode de la cellule fixée permet de retracer aisément le chemin d'un élément marqué à l'instant $t=0$, $t=x$, $t=x+1$...

La fixation des cellules se fait grâce à une solution contenant du paraformaldéhyde permettant de figer la cellule par cross-linking covalent en liant tous les éléments dans un mélange insoluble. Cette fixation va permettre de préserver la cellule de certains mécanismes comme l'autolyse ou la putréfaction, et c'est cette préservation qui la différencie de la cellule morte.

Les expériences d'imagerie cellulaire ont été réalisées sur des cellules A549, issues d'adénocarcinome humain (tumeur maligne des poumons) qui sont un modèle pour l'étude de composés thérapeutiques et fluorescents.

Bien que le but premier de la sonde **146** soit d'analyser les protéines liées aux zones riches en AT de l'ADN, le motif récurrent de ces séquences est le motif G-quadruplex. Néanmoins, il faut savoir que tout ligand de l'ADN duplex est également ligand des G-quadruplex. De plus, le couple connu C-Myc (G4 riche)/Nucléoline (protéine) est un excellent choix pour valider le concept de la sonde, d'où l'intérêt d'étudier autant de séquences G-quadruplex possibles.

Ainsi, après avoir déterminé les méthodes d'analyses à utiliser et les séquences ADN d'intérêt, l'évaluation de la sonde **146** et des nouveaux ligands synthétisés peut être réalisée.

3.2. ÉVALUATION BIOLOGIQUE DES LIGANDS SYNTHÉTISÉS.

L'évaluation biologique de ces ligands a été réalisée à l'Institut Curie sur une période de courte durée et en fin de thèse. De plus, les tests d'affinités avec les protéines n'ont pas pu être effectués faute de temps. Par conséquent, seuls les résultats d'affinité avec l'ADN seront abordés. Les résultats obtenus sont détaillés ci-dessous, en commençant par la sonde **146**, pour finir par les nouveaux ligands synthétisés.

3.2.1. ÉVALUATION DE LA SONDE **146**.

La sonde **146**, objectif principal de ces travaux de thèse, a été conçue pour piéger les protéines liées aux zones à risques de l'ADN. Pour vérifier cette hypothèse, deux expériences ont été effectuées : le Fluorescent Intercalator Displacement (FID) et le FRET-melting.

3.2.1.1. EXPÉRIENCE DE FID.

Les expériences de FID ont été effectuées avec de nombreuses séquences G-quadruplex et la séquence DS-26. De plus, pour déterminer son efficacité, une comparaison a été faite avec le ligand qui a inspiré la conception de cette sonde, le **TP-2Ox-2Py⁴**, mais également avec le meilleur ligand synthétisé à l'Institut Curie complexant les G-quadruplex, le **PhenDC3** (Figure 192).

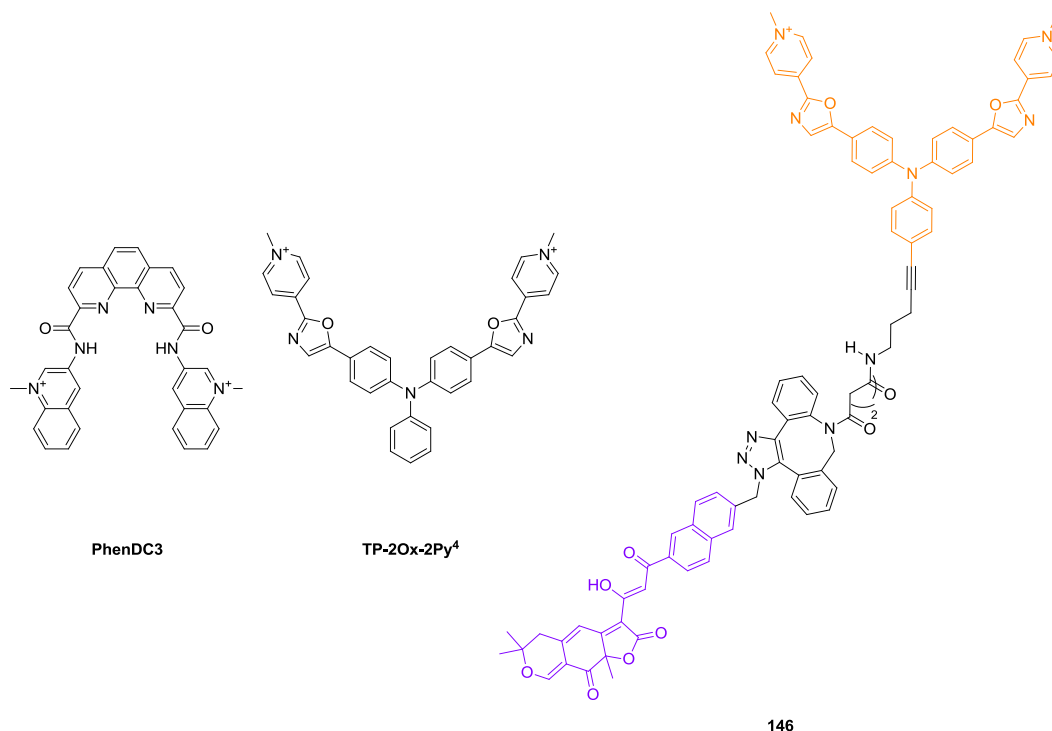


FIGURE 192 RAPPEL DES STRUCTURES UTILISÉES POUR LES EXPÉRIENCES DE FID.

Pour réaliser ces expériences de FID, une quantité croissante de ligands est ajoutée à une solution contenant la séquence ADN étudiée marquée par un fluorophore, le TO-PRO-3 ($\lambda_{em}=642$, $\lambda_{ex}=660$). Ce dernier a été choisi afin de ne pas interférer avec les propriétés spectroscopiques de la sonde **146**, dont les spectres sont représentés ci-dessous. ($\lambda_{abs} = 333$ nm, $\lambda_{em} = 475$ nm avec un signal d'exaltation de fluorescence faible et une diffusion) (Figure 193).

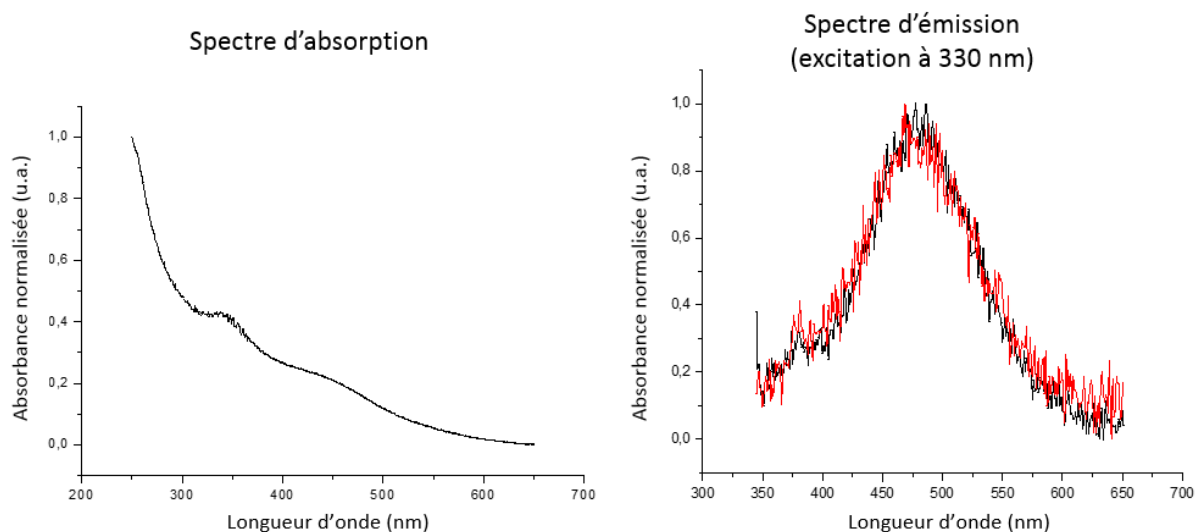


FIGURE 193 PROPRIÉTÉS SPECTROSCOPIQUES DE LA SONDE 146.

L'extinction de fluorescence du TO-PRO-3 est ainsi mesurée pour ces différentes expériences de FID. Les résultats provenant des séquences G-quadruplex seront abordés dans un premier temps.

3.2.1.1.1. SÉQUENCE RICHE EN G QUADRUPLEX.

Les mesures d'extinction de fluorescence ont d'abord été effectuées en présence de séquences C-Myc (Figure 194). Ces expériences sont réalisées avec une concentration de

0,25 μ M de séquence ADN et 2 équivalents de TO-PRO-3. Les données sont reportées ci-dessous.

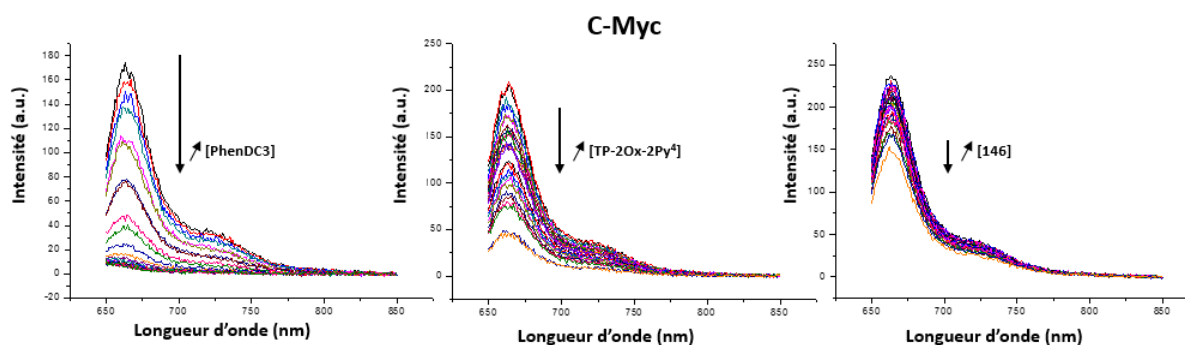


FIGURE 194 ÉVOLUTION DE L'INTENSITÉ DE FLUORESCENCE EN FONCTION DE LA QUANTITÉ DE LIGAND AJOUTÉE À UN ÉCHANTILLON DE C-MYC.

On peut constater sur la Figure 194 que le **PhenDC3**, une fois mis en présence de C-Myc, va induire une très forte diminution de l'exaltation de fluorescence. Ce phénomène est nettement moins marqué et plus lent avec le composé **TP-2Ox-2Py⁴**. Contrairement à ces deux composés, la sonde **146** ne montre quasiment aucune diminution de l'intensité de fluorescence.

Ces résultats indiquent une excellente affinité du **PhenDC3** pour la séquence C-Myc, tandis que le **TP-2Ox-2Py⁴** possède une affinité nettement plus faible. La sonde **146**, quant à elle, ne dispose d'aucune affinité pour la séquence C-Myc.

Cette extinction de fluorescence peut également être modélisée en estimant le déplacement du TO-PRO-3 par le ligand étudié en fonction de la quantité ajoutée de ce dernier (Figure 195). Les courbes ainsi obtenues peuvent être analysées et il est possible de déterminer une DC₅₀, qui correspond à la quantité nécessaire de ligand pour déplacer 50 % du marqueur (ici, le TO-PRO-3) (Figure 195).

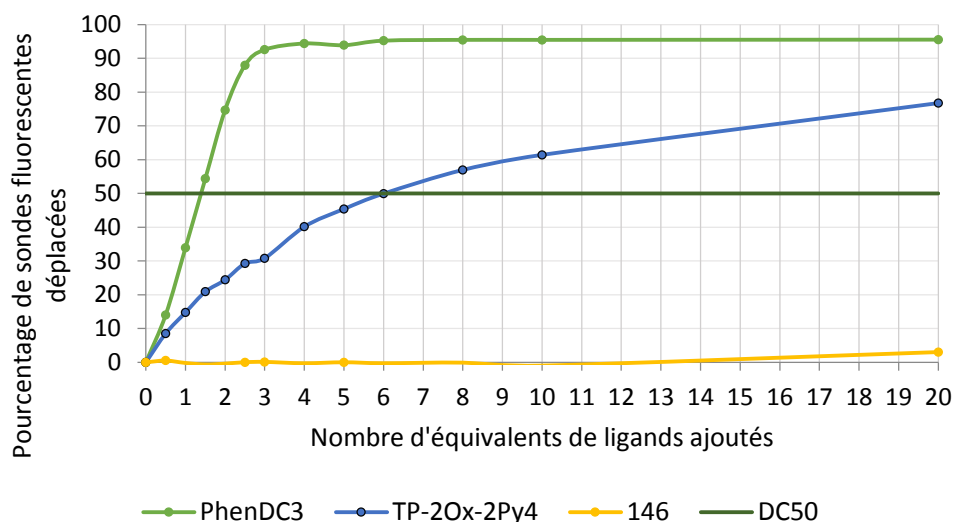


FIGURE 195 FID DES SONDES PHENDC3, TP-2OX-2PY⁴ ET 146 EN PRÉSENCE DE C-MYC.

Ainsi, après ajout de 1,5 équivalent de **PhenDC3**, la DC₅₀ est atteinte, tandis qu'il est nécessaire d'en ajouter 6 équivalents pour le **TP-2Ox-2Py⁴**. Concernant la sonde **146**, la DC₅₀ n'est jamais atteinte, même après 20 équivalents de ligand.

Cette même expérience de FID a été réitérée sur d'autres séquences riches en G-quadruplex (22AG, Pu24T et Pu27) par le docteur Beauvieux, dont seules les courbes de déplacement du TO-PRO-3 par le ligand sont représentées ci-après (Figure 196).

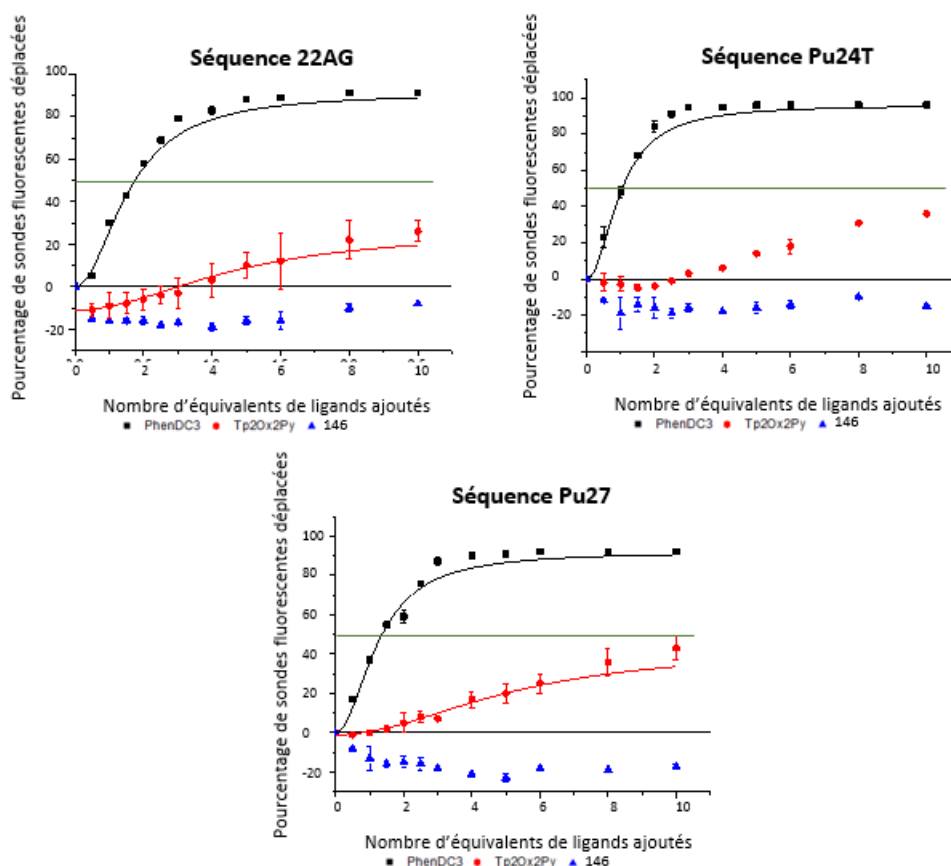


FIGURE 196 EXPÉRIENCES DE FID EFFECTUÉES SUR DIFFÉRENTES SÉQUENCES ADN ET DIFFÉRENTS LIGANDS. CHAQUE COURBE REPRÉSENTE LE DÉPLACEMENT DU TO-PRO-3 EN FONCTION DU NOMBRE D'ÉQUIVALENTS DE LIGANDS AJOUTÉS, AVEC EN VERT LA DC₅₀.

Ces différents graphiques montrent que, quelle que soit la séquence ADN riche en G-quadruplex étudiée, la DC₅₀ du ligand **PhenDC3** est atteinte aux alentours des 1,5 équivalents. Cependant, concernant le **TP-2Ox-2Py⁴**, la DC₅₀ n'est pas atteinte, même après l'ajout de 10 équivalents de ligands. En comparant les séquences ADN utilisées, la séquence C-Myc (séquence envers laquelle le ligand a le plus d'affinité) possède des zones où des adénines et thymine se suivent. Ces petites suites de 2 à 4 paires de bases doivent suffire aux ligands pour pouvoir se lier plus efficacement. Concernant la sonde **146**, aucune affinité n'est décelée envers les séquences riches en G-quadruplex et la DC₅₀ ne sera jamais atteinte.

En conclusion, le **PhenDC3** est un excellent ligand des séquences G-quadruplex, contrairement au **TP-2Ox-2Py⁴** qui est très moyen. La sonde **146** s'inspirant du **TP-2Ox-2Py⁴** ne possède quant à elle aucune affinité pour les séquences riches en G-quadruplex étudiées. Il est donc nécessaire de vérifier si ces observations sont générales, en utilisant une séquence ADN plus commune comme la séquence DS-26.

3.2.1.1.2. SÉQUENCE DS-26.

Cette même expérience de FID a été réalisée avec la sonde **146** et le **TP-2Ox-2Py⁴** sur la séquence ADN DS-26. Cependant, l'affinité pour cette séquence de **PhenDC3** étant connue, il n'est pas nécessaire de réévaluer ce ligand. Comme précédemment, des mesures d'extinction de fluorescence et de déplacement de TO-PRO-3 ont été réalisées et reportées ci-dessous (Figure 197).

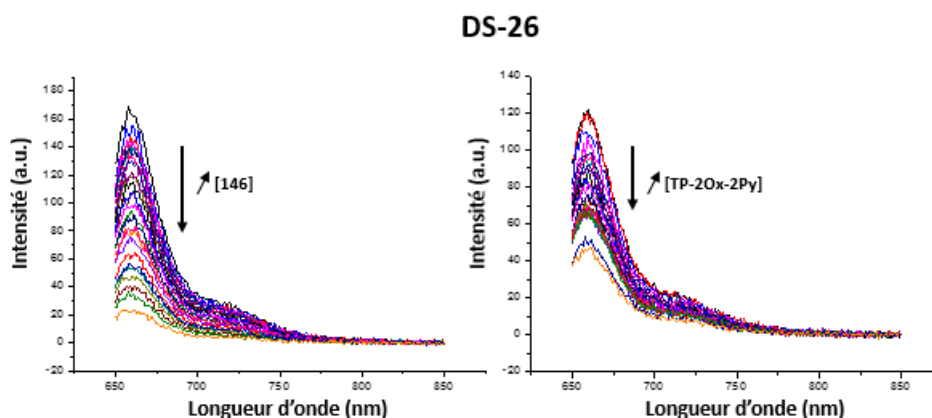


FIGURE 197 ÉVOLUTION DE L'EXALTATION DE FLUORESCENCE EN FONCTION DE LA QUANTITÉ DE LIGAND AJOUTÉE.

Ici, l'extinction de la fluorescence est plus marquée avec la sonde **146** que le **TP-2Ox-2Py⁴**, indiquant ainsi une meilleure affinité de la sonde **146** pour ces séquences ADN. La détermination de la DC₅₀ (Figure 198) est en accord avec ces observations, où l'ajout de 5 équivalents de sonde **146** suffit à atteindre la DC₅₀, là où il est nécessaire d'en ajouter 14 équivalents pour le ligand **TP-2Ox-2Py⁴**.

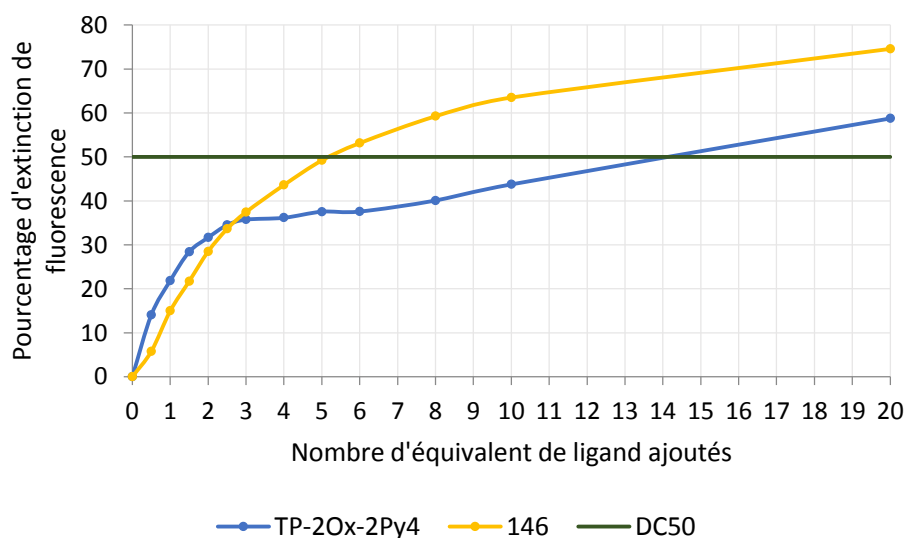


FIGURE 198 FID DES SONDES 146 ET TP-2Ox-2Py⁴ EN PRÉSENCE DE DS-26.

Ainsi, les résultats obtenus avec les séquences ADN riches en G-quadruplex et la séquence DS-26 permettent d'avancer l'hypothèse que la sonde **146** est plus affine pour les séquences duplex que quadruplex. Cependant, il n'est pas à exclure que le site de fixation de la sonde **146** soit différent de celui du TO-PRO-3 sur les séquences G-quadruplex. Afin de valider ou de réfuter cette hypothèse, des expériences de FRET-Melting ont été réalisées.

3.2.1.2. EXPÉRIENCE DE FRET-MELTING.

Les expériences de FRET-Melting ont été effectuées en présence de différentes séquences riches en G-quadruplex (F-21-T et F-Pu24T-T, modifiées par de la fluorescéine et du TAMRA) afin de compléter les expériences de FID précédentes et de déterminer si une affinité est présente entre le ligand et la séquence ADN étudiée.

Les résultats de ces expériences de FRET-Melting sont résumés dans les tableaux ci-dessous (Tableau 13).

Témoin	F-21-T seul		Témoin	F-Pu24T-T seul	
	56,4			60,7	
Ligand	F-21-T seul + ligand		Ligand	F-Pu24T-T seul + ligand	
	$T_{1/2}$ (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)		$T_{1/2}$ (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
PhenDC3	84,5	28,1±0,9	PhenDC3	79	18,3±1,2
TP-2Ox-2Py ⁴	62,6	6,2±0,5	TP-2Ox-2Py ⁴	62,5	1,8±0,2
146	55,6	-0,8±0,5	146	59,6	-1,1±0,5

TABLEAU 13 TABLEAUX RÉCAPITULATIFS DES EXPÉRIENCES DE FRET-MELTING AVEC LES DIFFÉRENTES SONDES EN PRÉSENCE DE F-21-T À GAUCHE ET DE F-PU24T-T À DROITE.

L'analyse de ces données montre que pour ces deux séquences riches en G-quadruplex, le **PhenDC3** va entraîner une augmentation de la température de demi-fusion, cette augmentation étant plus élevée dans le cas de F-21-T. Cette augmentation confirme donc l'affinité de **PhenDC3** envers les séquences riches en G-quadruplex.

Concernant **TP-2Ox-2Py⁴**, une augmentation de température de demi-fusion est observée, mais cette dernière est extrêmement faible. Tout comme **PhenDC3**, cette augmentation est plus forte en présence de F-21-T. Ces résultats indiquent une très faible affinité entre le ligand et les séquences riches en G-quadruplex.

Cependant, contrairement aux deux autres sondes, la molécule **146** ne dispose non pas d'une augmentation, mais d'une diminution presque anecdotique de la température de demi-fusion. La sonde **146** n'a donc aucune affinité pour les séquences riches en G-quadruplex.

Les résultats de FRET-Melting sont en adéquation avec les résultats issus des expériences de FID. Le **PhenDC3** possède une haute affinité pour les séquences riches en G-quadruplex (plus forte affinité pour la séquence F-21-T), alors que le **TP-2Ox-2Py⁴** ne possède qu'une très faible affinité pour ces quadruplex (plus forte affinité pour la séquence F-21-T). Cependant la sonde **146**, synthétisée durant ces travaux de thèse, ne possède aucune affinité pour ces séquences.

Des études complémentaires de FRET-melting peuvent être réalisées en ajoutant, à différentes concentrations, un compétiteur à la solution. Ce dernier est en général une séquence ADN non fluorescente, permettant ainsi de déterminer la spécificité relative du ligand étudié entre la séquence ADN et le compétiteur. Deux cas sont ainsi possibles :

- Si le ligand n'est pas spécifique, une diminution du $\Delta T_{1/2}$ sera observée entre la solution possédant la séquence ADN en présence du ligand et cette même solution dans laquelle a été ajouté le compétiteur (Figure 199, cas de gauche).
- En revanche, si une affinité spécifique est présente entre le ligand et la séquence ADN de base, aucune diminution de $\Delta T_{1/2}$ ne sera observée entre la solution possédant la séquence ADN en présence du ligand et cette même solution dans laquelle a été ajouté le compétiteur (Figure 199, cas de droite).

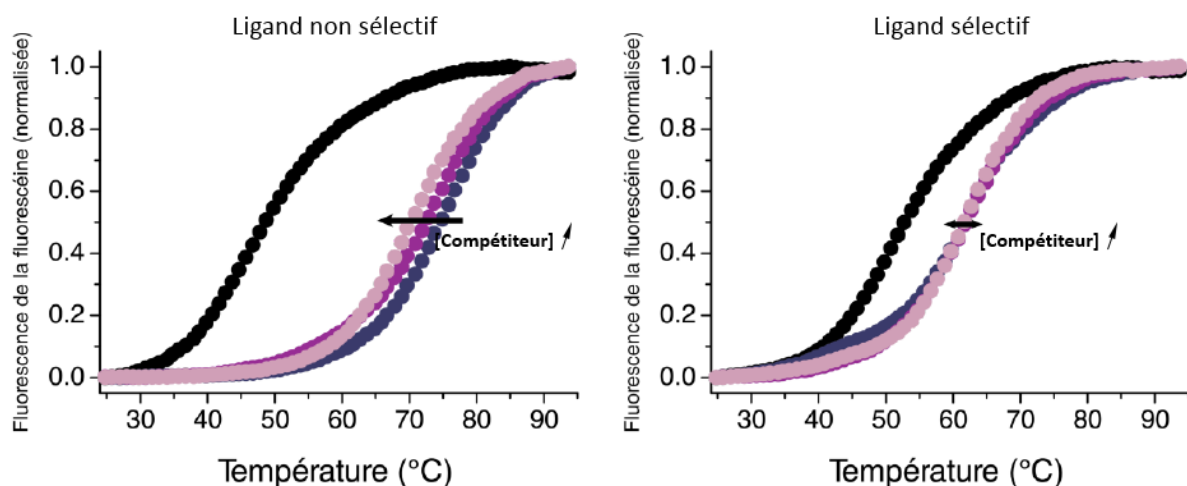


FIGURE 199 A GAUCHE UN LIGAND NON SÉLECTIF DES QUADRUPLEX AVEC DÉSTABILISATION DE CE DERNIER. À DROITE UN LIGAND SÉLECTIF DES QUADRUPLEX. EN NOIR LA SÉQUENCE ADN SEULE, EN BLEU LA SÉQUENCE D'ADN AVEC LE LIGAND ÉTUDIÉ, EN VIOLET FONCÉ LA SÉQUENCE ADN EN PRÉSENCE DU LIGAND ÉTUDIÉ D'UNE QUANTITÉ X DU COMPÉTITEUR, ET EN VIOLET CLAIR LA SÉQUENCE ADN EN PRÉSENCE DU LIGAND ÉTUDIÉ ET UNE QUANTITÉ Y DU COMPÉTITEUR ($Y > X$)

Ces études complémentaires ont été effectuées en utilisant une séquence ADN DS-26 comme compétiteur. Les résultats obtenus ont été reportés ci-dessous, en commençant par la séquence F-21-T, puis la séquence F-Pu24T-T.

Témoin	F-21-T seul		F-21-T + 15 éq. DS26		F-21-T + 50 éq. DS26	
$T_{1/2}$ (°C)	56,4		56,8		55,8	
Ligand	F-21-T seul + ligand		F-21-T + 15 éq. DS26 + ligand		F-21-T + 50 éq. DS26 + ligand	
	$T_{1/2}$ (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	$T_{1/2}$ (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	$T_{1/2}$ (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
PhenDC3	84,5	28,1±0,9	83,6	26,8±0,7	78,8	23,0±0,5
TP-20x-2Py ⁴	62,6	6,2±0,5	61,2	4,4±0,4	59,5	3,7±0,4
146	55,6	-0,8±0,5	54,9	-1,5±0,4	54,4	-1,4±0,3

TABEAU 14 TABLEAU RÉCAPITULATIF DES DONNÉES DE FRET-MELTING AVEC LA SÉQUENCE F-21-T ET LES LIGANDS PHENDC3, TP-20x-2Py⁴ ET 146.

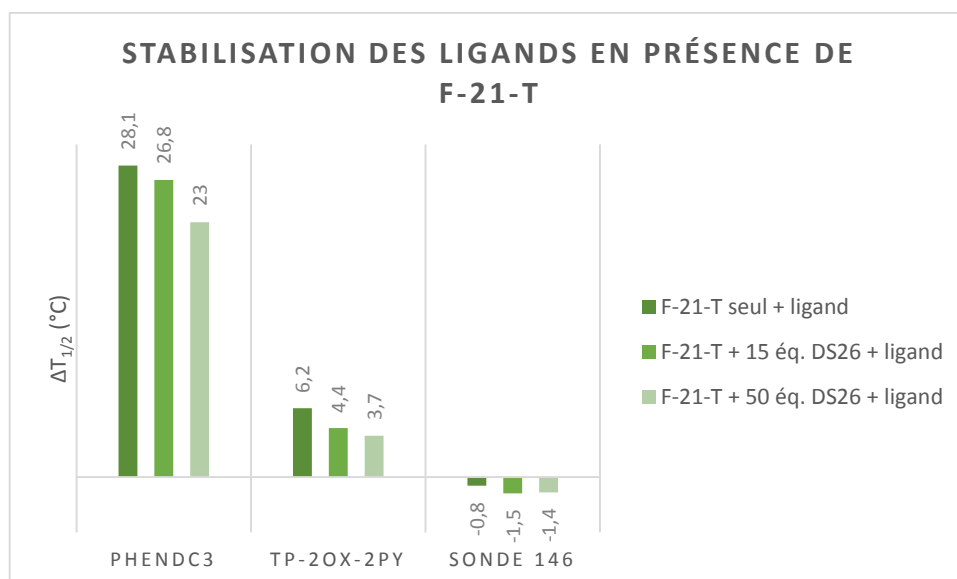


FIGURE 200 GRAPHIQUE REPRÉSENTANT LES $\Delta T_{1/2}$ DES LIGANDS AVEC LA SÉQUENCE F-21-T.

Via les données récoltées (Tableau 14, Figure 200) durant ces expériences de FRET-melting avec compétiteur, une diminution du $\Delta T_{1/2}$ est observée lors de l'ajout de compétiteur pour le **PhenDC3** et le **TP-2Ox-2Py**⁴. Cette diminution de $\Delta T_{1/2}$ indique que ces ligands ne sont pas spécifiques de la séquence F-21-T. Concernant la sonde **146** une diminution de $\Delta T_{1/2}$ est observée même si cette diminution reste anecdotique et ne signifie qu'une absence d'affinité entre le ligand et la séquence ADN.

Les résultats issus de l'autre séquence ADN étudiée (F-Pu24T-T) sont présentés ci-après.

Témoin	F-Pu24T-T seul		F-Pu24T-T + 15 éq. DS26		F-Pu24T-T + 50 éq. DS26	
$T_{1/2}$ (°C)	60,7		61,4		61,5	
Ligand	F-Pu24T-T seul + ligand		F-Pu24T-T + 15 éq. DS26 + ligand		F-Pu24T-T + 50 éq. DS26 + ligand	
	$T_{1/2}$ (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	$T_{1/2}$ (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	$T_{1/2}$ (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
PhenDC3	79	18,3±1,2	79,2	17,8±1,3	76,3	14,8±2,0
TP-2Ox-2Py⁴	62,5	1,8±0,2	62,3	0,9±0,9	62,1	0,6±0,9
146	59,6	-1,1±0,5	60,2	-1,2±0,7	60,3	-1,2±0,2

TABLEAU 15 TABLEAU RÉCAPITULATIF DES DONNÉES DE FRET-MELTING AVEC LA SÉQUENCE F-PU24T-T ET LES LIGANDS PHENDC3, TP-2OX-2PY⁴ ET 146.

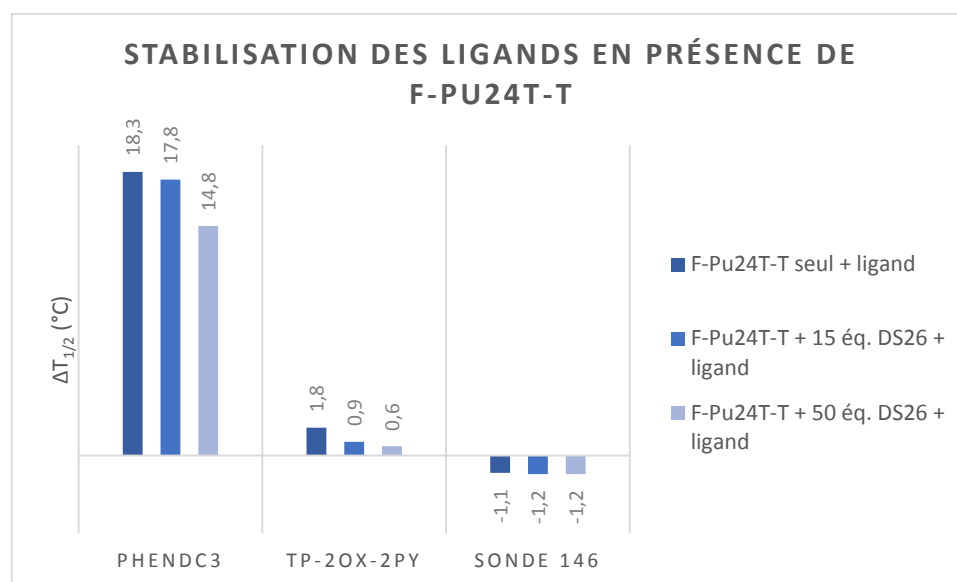


FIGURE 201 GRAPHIQUE REPRÉSENTANT LES $\Delta T_{1/2}$ DES LIGANDS AVEC LA SÉQUENCE F-PU24-T.

Tout comme la séquence F-21-T, les $\Delta T_{1/2}$ des ligands **PhenDC3** et **TP-2Ox-2Py⁴** diminuent en présence des compétiteurs de l'ADN, indiquant là aussi une non spécificité de ces ligands pour les séquences riches en G-quadruplex (Figure 201, Tableau 15). Quant à la sonde **146**, aucune conclusion ne peut être tirée sur l'effet du compétiteur. En effet, cette sonde n'étant pas affine pour la séquence G-quadruplex, aucune influence du compétiteur ne pourra être décelée.

Pour conclure, les expériences de FID et de FRET-Melting sont en adéquation entre elles. Les résultats en présence de séquences riches en G-quadruplex qui en découlent

montrent une absence d'affinité entre la sonde **146** et ces séquences, contrairement au ligand référence **PhenDC3** qui, lui, est très affiné. La sonde **TP-2Ox-2Py⁴** (dont la sonde **146** s'inspire) possède quant à elle une faible affinité pour ces séquences.

Cette différence d'affinité entre la sonde **146** et le **TP-2Ox-2Py⁴** peut s'expliquer par l'encombrement stérique nettement plus important de la sonde **146** via l'ajout du linker cyclo-octyne ainsi que la présence du piège à protéines. Cet encombrement doit empêcher la sonde de s'insérer convenablement au niveau des quadruplex par repliement sur elle-même.

Concernant l'expérience de FID avec la séquence DS26, une certaine affinité de la sonde **146** pour les séquences possédant plusieurs sites en « AAT » est observée. En couplant ces résultats et ceux obtenus avec les séquences G-quadruplex, il est seulement possible d'en conclure que la sonde **146** ne possède aucune affinité pour ces dernières. Seules des analyses plus poussées, utilisant le dichroïsme circulaire en présence d'une séquence ADN riche en AT vont permettre de confirmer le comportement de la sonde **146**.

3.2.2. ÉVALUATION DES NOUVEAUX LIGANDS SYNTHÉTISÉS.

La sonde **146** et les nouveaux ligands synthétisés n'ont pas le même but. En effet, pour rappel, la sonde **146** a pour but de piéger les protéines liées aux zones à risques de l'ADN. Il était donc intéressant de valider le concept sur un couple ADN/Protéine connue comme la séquence C-Myc/Nucléoline.

Pour les autres ligands, l'intérêt est de visualiser l'ADN dans le but de trouver de nouveaux marqueurs d'ADN. Intérêt d'autant plus intéressant si ces ligands disposent d'une spécificité pour une séquence ADN particulière, comme les séquences riches en AT. C'est d'ailleurs cette séquence qui sera dans un premier temps ciblée, car le ligand leader dont ces composés s'inspirent, est spécifique des zones AT de l'ADN. Ce sont pour ces raisons que les expériences réalisées seront différentes de la sonde **146**.

3.2.2.1. PROPRIÉTÉ SPECTROSCOPIQUE DES LIGANDS SYNTHÉTISÉS.

Avant de réaliser les expériences de titration fluorimétrique et les images cellulaires, il est nécessaire de déterminer les propriétés spectroscopiques de ces sondes. Ces données ont été reportées ci-dessous (Tableau 16, Figure 202 et Figure 203).

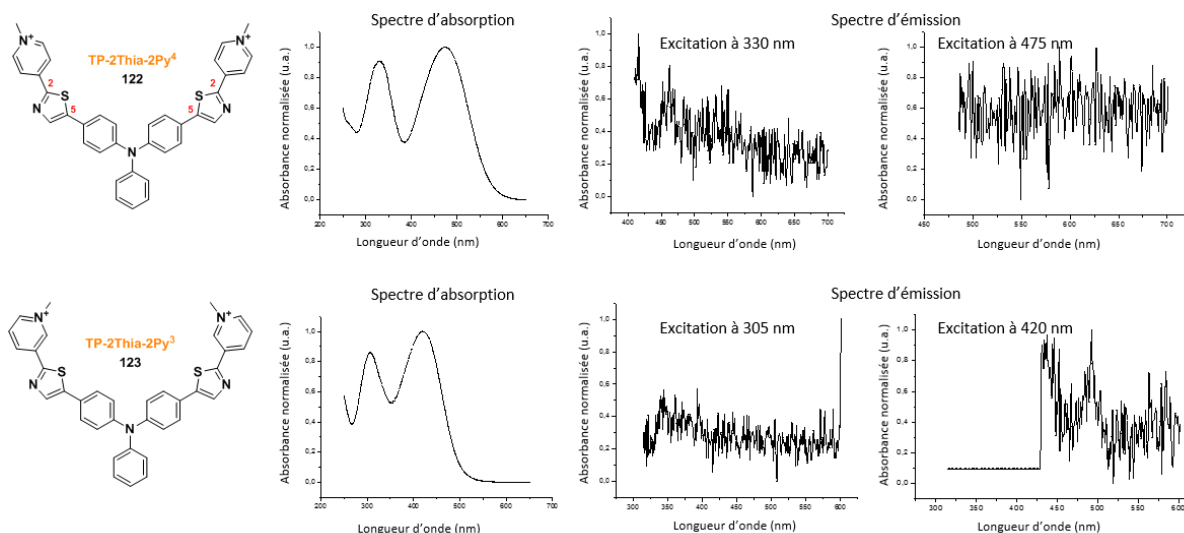


FIGURE 202 CARACTÉRISTIQUES SPECTROSCOPIQUES DE LA SÉRIE THIAZOLE (TP-2THIA-2PY).

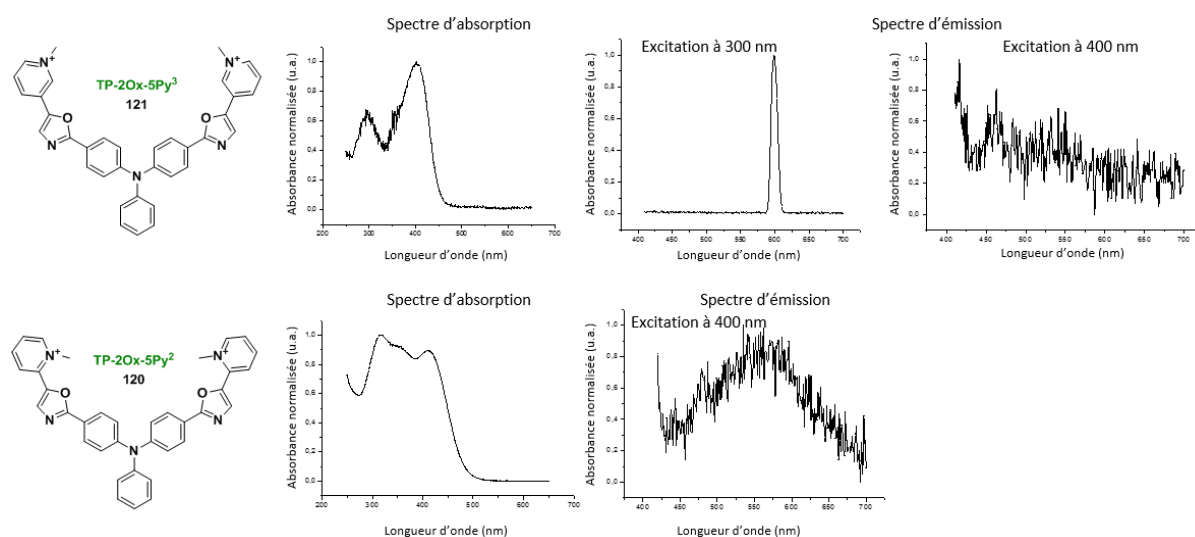


FIGURE 203 CARACTÉRISTIQUES SPECTROSCOPIQUES DE LA SÉRIE OXAZOLE (TP-2OX-5PY).

Ligands	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)
121 (TP-2Ox-5Py ³)	402	/
120 (TP-2Ox-5Py ²)	410	550
122 (TP-2Thia-2Py ⁴)	474/330	/
123 (TP-2Thia-2Py ³)	420/310	/

TABLEAU 16 TABLEAU RÉCAPITULATIF DES CARACTÉRISTIQUES SPECTROSCOPIQUES DES LIGANDS.

L'analyse de ces données montre qu'aucune exaltation de fluorescence n'a été décelée sauf pour la sonde **120** (Figure 203, Tableau 16), qui possède une exaltation de fluorescence très faible. La forte intensité relevée avec la sonde **121** est un artéfact du fluorimètre (il s'agit d'un harmonique) (Figure 203, Tableau 16). De plus, les longueurs d'onde d'absorption de la série thiazole sont sensiblement différentes, avec une différence de 54 nm vers le rouge (effet bathochrome) entre le dérivé 4-pyridine et le dérivé 3-pyridine (Tableau 16). Cet effet

batochrome s'explique par une délocalisation électronique plus forte du composé *para* (**122**) comparée au composé *meta* (**123**). Ainsi, l'énergie nécessaire pour que la sonde passe de l'état fondamental à l'état excité sera plus faible pour le composé *para*, se traduisant par un déplacement vers le rouge. Concernant la série oxazole, la longueur d'onde d'absorption est sensiblement identique (Tableau 16).

Si une analogie peut être faite entre le dérivé déjà synthétisé à l'Institut Curie le **TP2-Ox-5Py⁴** et ceux présentés ici, les résultats obtenus ne sont pas en adéquation. En effet, une exaltation de fluorescence aurait dû être observée pour la série synthétisée durant ces travaux de thèse. Concernant la série Thiazole (**TP-2Ox-2Thia**), qui est une nouvelle série, leur isomérie est identique à celle des **TP-2Ox-2Py⁴**, qui sont non fluorescents en solution mais également dans l'ADN (p119).

3.2.2.2. TITRATION FLUORIMÉTRIQUE.

Les données spectroscopiques étant établies, il est maintenant possible de réaliser les titrations fluorimétriques. Ces titrations ont été effectuées en ajoutant une quantité croissante de séquence DrewAT dans un milieu contenant la sonde à évaluer. Les résultats sont reportés ci-dessous (Figure 205).

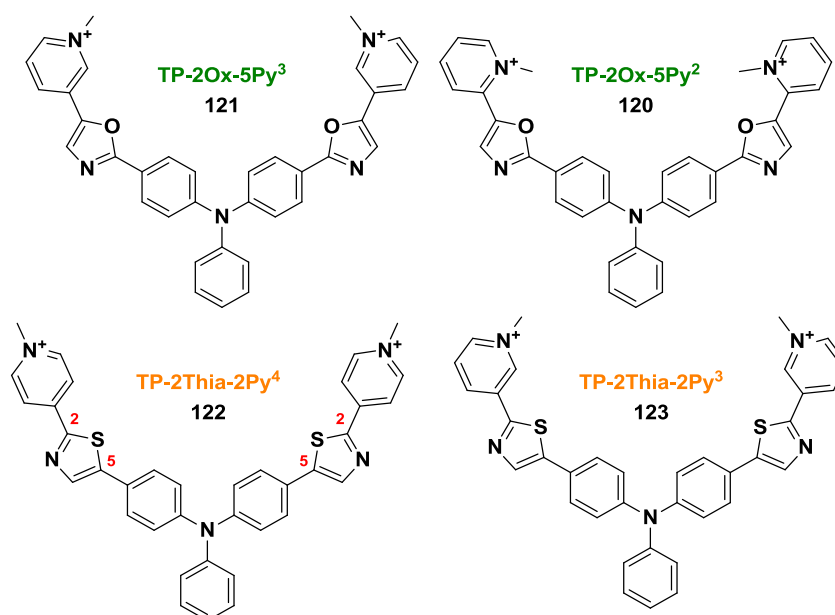


FIGURE 204 STRUCTURES DES NOUVEAUX LIGANDS SYNTHÉTISÉS.

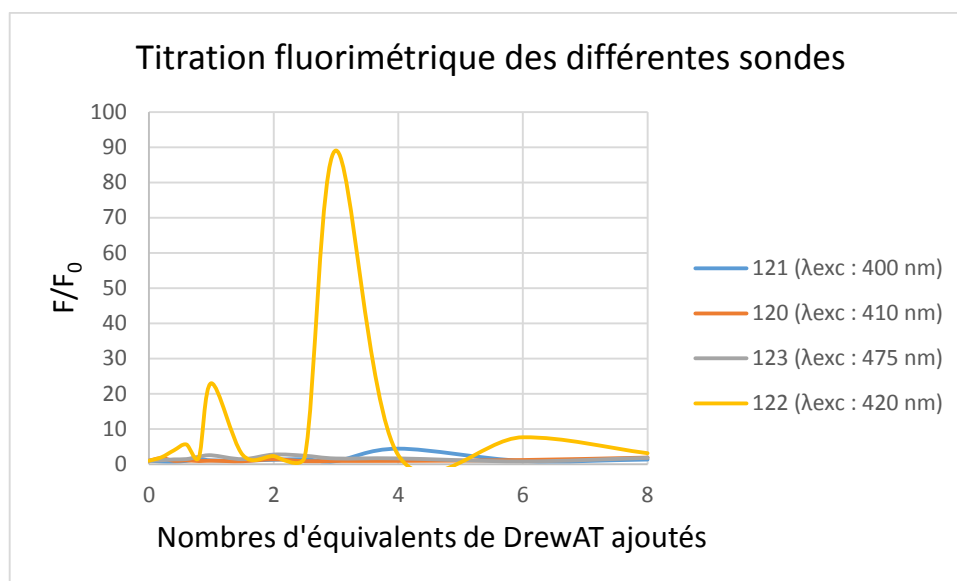


FIGURE 205 RÉSUMÉ DES DONNÉES DE F/F_0 EN FONCTION DU NOMBRE D'ÉQUIVALENTS DE DREWAT AJOUTÉS SUR LES DIFFÉRENTES SONDES SYNTHÉTISÉES.

Aucune exaltation de fluorescence n'est présente lors d'un ajout croissant de DrewAT. Les grands pics présents sur la sonde **122** sont en réalité des artéfacts et correspondent à la diffusion laser de Rayleigh. Les résultats obtenus sont assez curieux pour les sondes **121** et **120**, car leur leader **TP-2Ox-5Py⁴** dispose (contrairement à ces sondes) d'une exaltation de fluorescence avec cette séquence ADN. Concernant la série **TP-2Thia-2Py** le fait qu'aucune exaltation de fluorescence ne soit présente n'a rien d'étonnant. En effet, la série dont elle s'inspire (série **TP-2Ox-2Py⁴**) étant non fluorescente en présence d'ADN, il n'est pas anormal que les **TP-2Thia-2Py** possèdent les mêmes caractéristiques.

Ces expériences de titration fluorimétrique montrent qu'aucune exaltation de fluorescence n'est présente lors de l'ajout de DrewAT, quelle que soit la sonde étudiée. Il ne faut cependant pas en conclure que ces sondes n'ont aucune affinité pour les séquences DrewAT de l'ADN. Ces résultats indiquent seulement que ces sondes ne sont pas fluorescentes en présence de cette séquence ADN. Seules des expériences de dichroïsme circulaire pourraient indiquer une quelconque affinité entre ces sondes et l'ADN.

Suite à ces expériences de titration, des images cellulaires ont été réalisées par le docteur Nagarajan de l'Institut Curie.

3.2.2.3. IMAGERIE CELLULAIRE.

Ces différentes sondes ont été mises en présence de cellules fixées mais également en présence de cellules vivantes dont les images ont été prises à t=0 et t=4h. Les résultats sont reportés ci-dessous en commençant par la famille des TP-2Ox-5Py.

3.2.2.3.1.1. LES SONDES TP-2Ox-5PY.

3.2.2.3.1.1.1. LA SONDE 121.

La microscopie de fluorescence du ligand **121** révèle une exaltation de fluorescence faible (lors de l'excitation à 405 nm), et uniquement présente dans le cytoplasme des cellules vivantes. Cette exaltation de fluorescence est quasiment inexistante dans les cellules fixées (Figure 206).

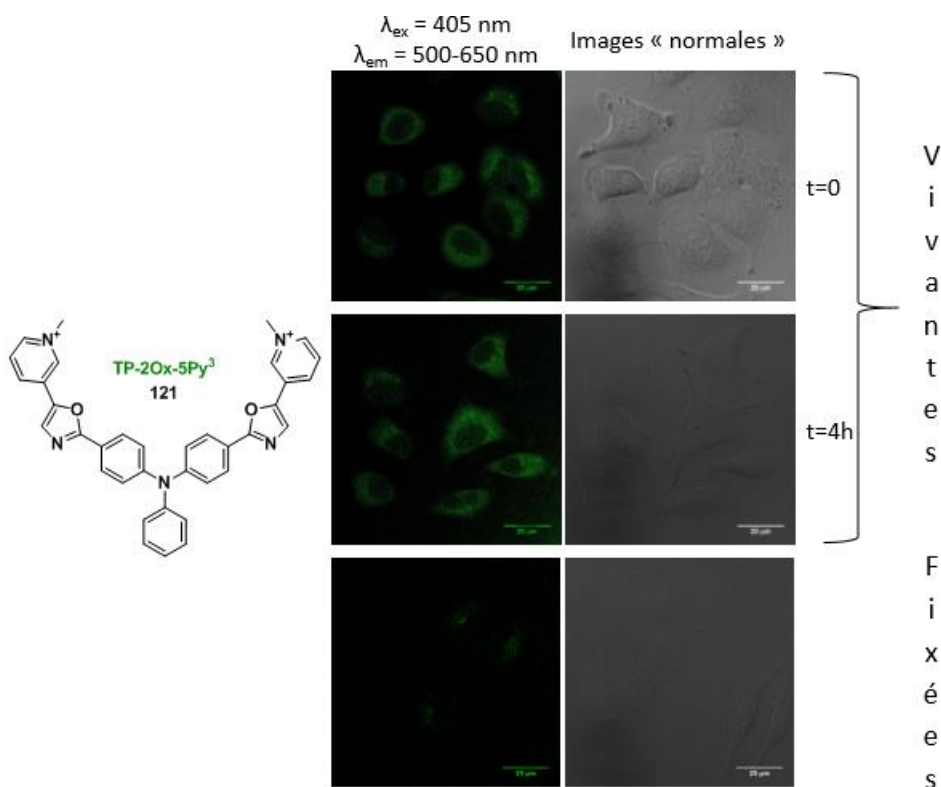


FIGURE 206 IMAGES CELLULAIRES DE LA SONDE **121** EN PRÉSENCE DE CELLULES VIVANTES ET FIXÉES.

Les images issues du ligand **121** sont en adéquation avec les expériences de titration fluorimétrique où aucune fluorescence n'a été décelée. Seules des expériences de dichroïsme circulaire complémentaires avec différentes séquences ADN ou ARN pourront confirmer si une affinité est présente.

3.2.2.3.1.1.2. LA SONDE 120.

La sonde **120** possède une exaltation de fluorescence (lors de l'excitation à 405 nm) assez intense que cela soit dans la cellule vivante ou fixée (Figure 207). Cependant, cette exaltation est située dans le cytoplasme et non dans le noyau, ce qui est en adéquation avec la titration fluorimétrique où aucune fluorescence n'est présente en présence de drewAT.

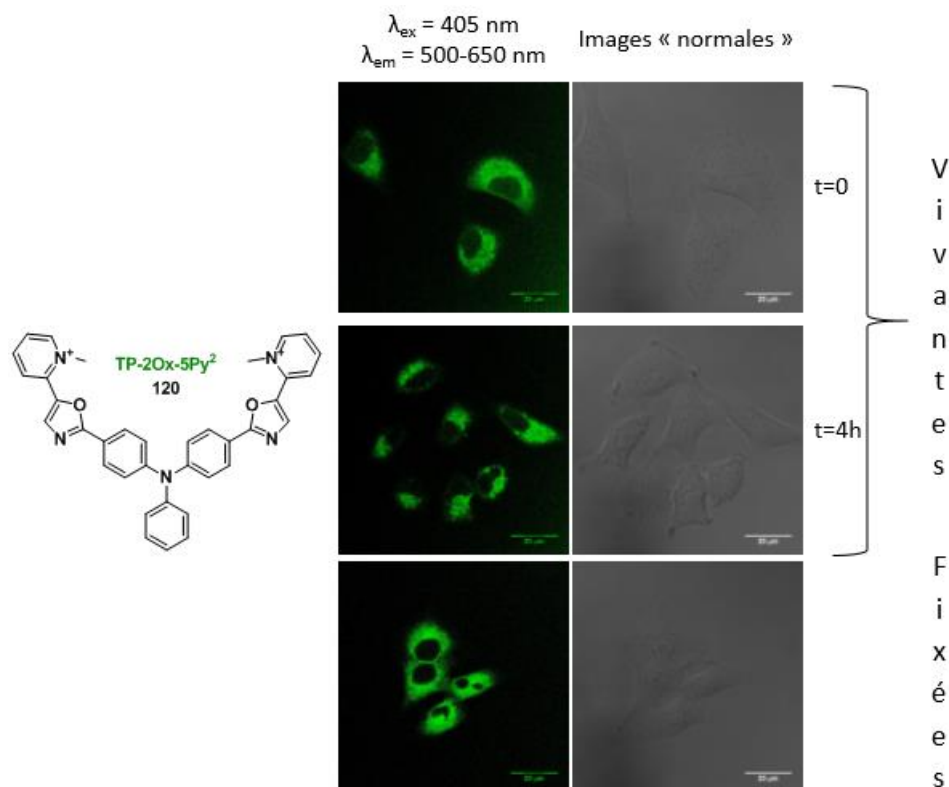


FIGURE 207 IMAGES CELLULAIRES DE LA SONDE 120 EN PRÉSENCE DE CELLULES VIVANTES ET FIXÉES.

Des expériences complémentaires d'imagerie cellulaire et de titration fluorimétrique sont nécessaires pour exploiter la forte brillance de ce composé. Son accumulation dans le cytoplasme pourrait provenir :

- D'un clash stérique présent entre le sillon de l'ADN et les méthyles des pyridiniums, empêchant sa liaison.
- D'une interaction plus forte avec d'autres organites présents dans le cytoplasme (comme l'ARN).
- D'un problème de passage de la membrane nucléaire, forçant le ligand à interagir avec les organites du cytoplasme.

3.2.2.3.1.2. LES SONDES TP-2THI-2PY.

3.2.2.3.1.2.1. LA SONDE **122**.

La sonde **122** révèle une faible exaltation de fluorescence dans les cellules vivantes (Figure 208). Cependant cette exaltation est présente dans le cytoplasme et non dans le noyau.

Concernant les cellules fixées, l'exaltation de fluorescence est plus intense lors d'une excitation à 488 nm qu'à 405 nm.

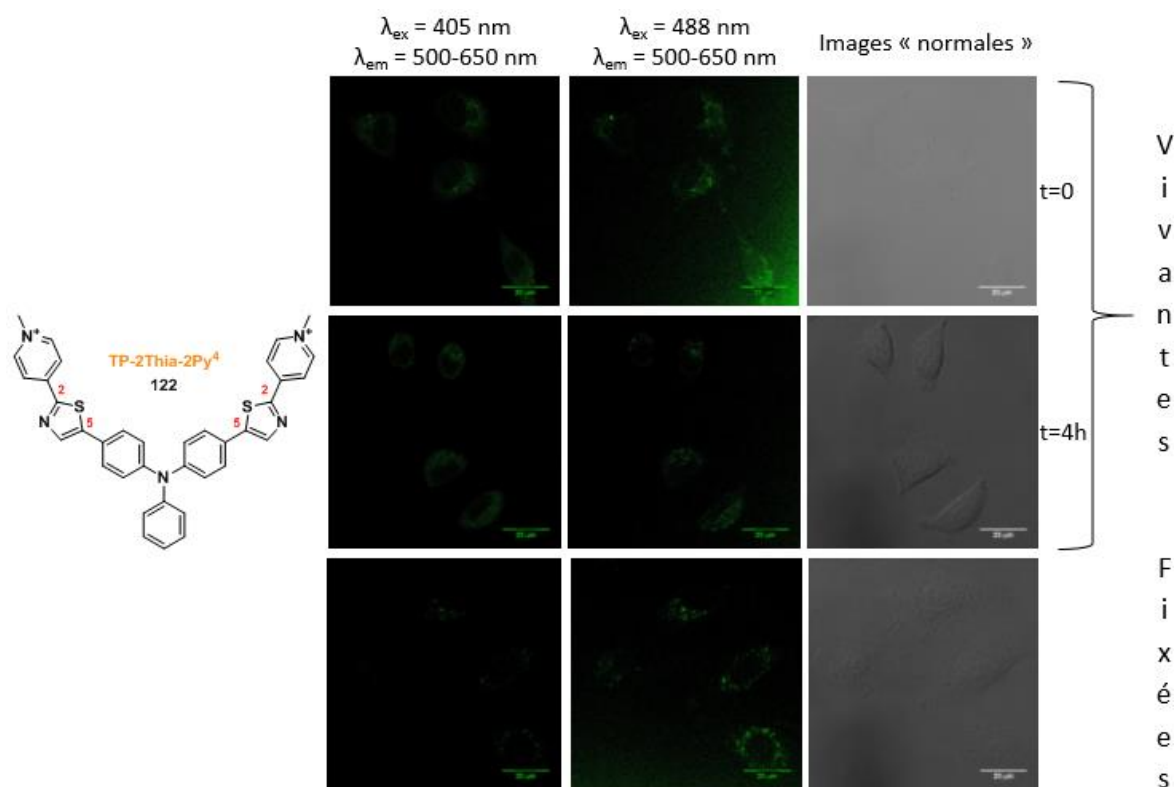


FIGURE 208 IMAGES CELLULAIRES DE LA SONDE **122** EN PRÉSENCE DE CELLULES VIVANTES ET FIXÉES.

Les images obtenues de cette sonde ainsi que les résultats de titration fluorimétrique sont en accord. Aucune exaltation de fluorescence n'est observée dans le noyau des cellules, mais une très faible exaltation apparaît dans le cytoplasme.

Malgré l'absence de fluorescence dans le noyau et en titration fluorimétrique, aucune conclusion sur l'absence d'affinité entre cette sonde et l'ADN ne peut être faite. En effet, le ligand TP-2Ox-2Py⁴ (dont s'inspire la sonde **122**) n'est pas fluorescent. Seule une expérience de dichroïsme cellulaire pourra permettre de conclure sur l'affinité de **122** pour l'ADN.

3.2.2.3.1.2.2. LA SONDE **123**.

Concernant la sonde **123**, une exaltation de fluorescence est observée en cellule vivante à t=0 minute dans le cytoplasme (Figure 209). Cette exaltation est de plus, beaucoup plus marquée lors de l'excitation à 405 nm qu'à 488 nm.

Quand on observe cette fluorescence à t=4 heures, on constate que le noyau est devenu extrêmement fluorescent, avec une légère diffusion dans le cytoplasme, indiquant une affinité pour l'ADN. Il est important de noter que le contraste est beaucoup plus présent lors d'une excitation à 488 nm qu'à 405 nm. Cependant, la fluorescence du contenu du noyau est due à une toxicité du ligand **123** vis-à-vis de la cellule. En effet, l'image sans fluorescence montre que la membrane est dégradée (cercle noir sur la Figure 209), la rendant perméable aux composés.

Deux hypothèses peuvent être émises ici. Soit le ligand a entraîné la mort cellulaire et a rendu la membrane nucléaire de la cellule perméable en mourant, soit c'est le ligand qui a rendu la membrane nucléaire perméable.

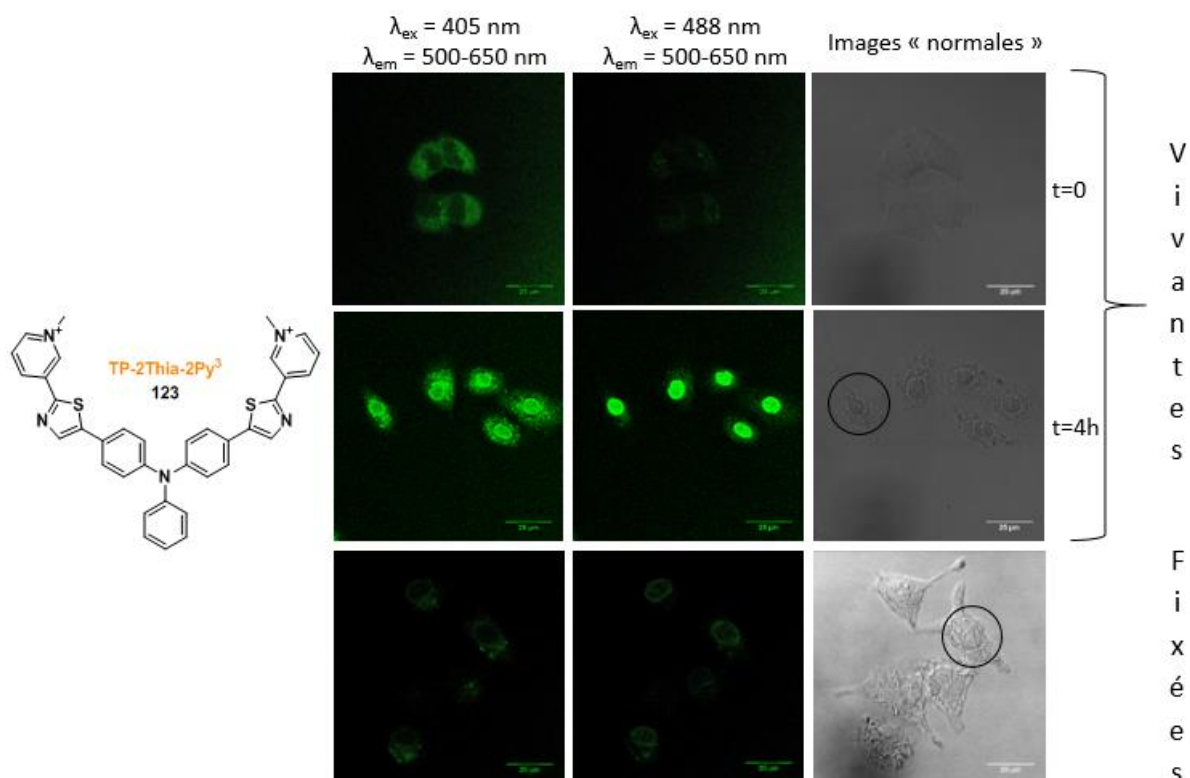


FIGURE 209 IMAGES CELLULAIRES DE LA SONDE **123** EN PRÉSENCE DE CELLULES VIVANTES ET FIXÉES.

Concernant la cellule fixée, une faible exaltation de fluorescence est également observée dans le cytoplasme (que cela soit à 405 nm comme 488 nm). De plus, sur l'image sans fluorescence, la cellule a visiblement subi un stress, ce qui est en adéquation avec la cytotoxicité observée sur la cellule vivante.

En conclusion, le ligand **123** semble cytotoxique, mais il marque malgré tout l'ADN une fois la membrane nucléaire rendue perméable. Cependant, cette observation n'est pas en adéquation avec l'expérience de titration fluorimétrique effectuée. En effet, aucune exaltation de fluorescence n'a été observée avec une séquence riche en AT. En reliant ces deux observations, il n'est pas à exclure que le ligand **123** possède une affinité pour d'autres séquences d'ADN que les séquences riches en AT utilisées lors de la titration fluorimétrique. Des études supplémentaires sont nécessaires en utilisant d'autres séquences ADN.

3.3. CONCLUSION

L'affinité du ligand **146** pour l'ADN a été évaluée et aucune affinité entre ce ligand et les séquences riches en G-quadruplex n'a pu être mise en évidence. Cependant, ceci ne doit pas mener hâtivement à une absence d'affinité totale pour l'ADN. En effet, une affinité spécifique pour la séquence riche en AT pourrait être présente, et seules des expériences de dichroïsme circulaire pourront permettre de conclure. De plus, il est envisagé d'effectuer un marquage de protéines connues pour interagir avec l'ADN afin de déterminer si la sonde peut les piéger.

Concernant les nouveaux ligands synthétisés, les sondes **121** et **122** ne possèdent aucune exaltation de fluorescence en présence d'ADN. Cependant, il ne faut pas en conclure une absence d'affinité pour l'ADN. En effet, ces composés peuvent s'y lier sans pour autant fluorescer (comme c'est le cas avec la famille des **TP-2Ox-2Py⁴**). Tout comme pour la sonde **146**, seules des expériences de dichroïsme circulaire complémentaires pourront permettre de conclure sur l'affinité de ces sondes pour l'ADN.

La sonde **120**, quant à elle, s'accumule spécifiquement dans le cytoplasme et non dans le noyau, avec une émission de fluorescence qui peut malgré tout être exploitée. Cette localisation pourrait être due à un clash stérique entre les méthyles des pyridiniums et le sillon de l'ADN.

Concernant la dernière sonde **123**, malgré une absence de fluorescence en présence de DrewAT mesurée par titration fluorimétrique, cette sonde émet une fluorescence dans le noyau de l'ADN. Malheureusement, ce marquage est dû à une cytotoxicité du composé vis-à-vis de la cellule, rendant la membrane nucléaire perméable au ligand. Le marquage de l'ADN *in vivo* et les résultats de titration fluorimétrique indiquent donc que la sonde **123** possède une affinité pour d'autres séquences que celles riches en AT. Il peut être postulé qu'en rendant la membrane nucléaire perméable grâce à un agent externe, les sondes **121**, **120** et **122** marqueraient également l'ADN.

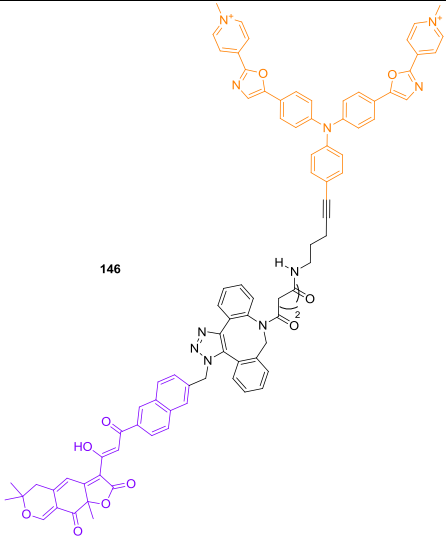
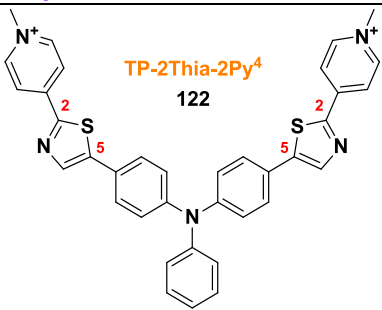
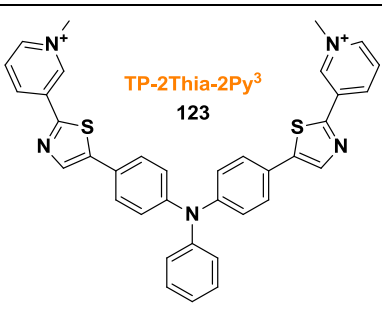
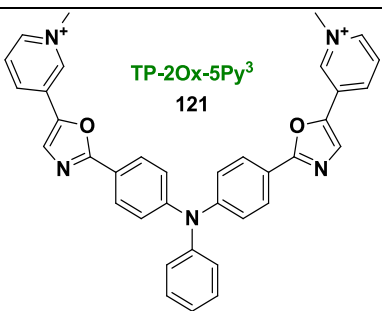
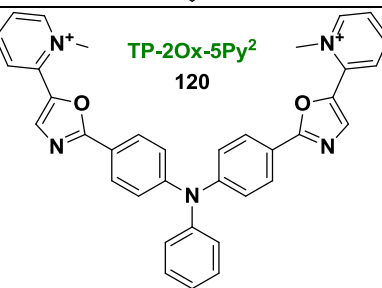
Ligand	Caractéristique du ligand
 <p>146</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ligand non affiné pour les zones riches en G-quadruplex. - Ligand non fluorescent. - Analyse de CD plus poussée sur des séquences ADN différentes des G-quadruplex - Marquage protéique à effectuer.
 <p>TP-2Thia-2Py⁴ 122</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Non fluorescent en présence de Drew AT. - Faible fluorescence du cytoplasme et aucune fluorescence du noyau. - Analyse de CD à faire sur d'autres séquences d'ADN.
 <p>TP-2Thia-2Py³ 123</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Non fluorescent en présence de DrewAT. - Cytotoxique. - Faible fluorescence du cytoplasme, forte fluorescence du noyau par perméabilité de sa membrane. - Analyse de CD et expériences de fluorescence à faire en présence de séquences ADN autres que la DrewAT.
 <p>TP-2Ox-5Py³ 121</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Non fluorescent en présence de DrewAT. - Très faible fluorescence du cytoplasme de la cellule et aucune fluorescence du noyau. - Analyse de CD à faire sur d'autres séquences ADN.
 <p>TP-2Ox-5Py² 120</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Non fluorescent en présence de DrewAT. - Forte fluorescence du cytoplasme et aucune fluorescence du noyau. - Analyses complémentaires nécessaires par CD et sur d'autres séquences ADN.

TABLEAU 17 TABLEAU RÉCAPITULATIF DES LIGANDS SYNTHÉTISÉS.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

L'analyse des différentes interactions présentes entre les protéines et l'ADN propose un double défi. En effet, la conception des outils voués à cette tâche nécessite la synthèse de composés polyfonctionnels complexes. Ces composés doivent posséder une affinité suffisante pour l'ADN mais doivent également être capables de piéger les protéines, dans le but de les analyser.

L'objectif de ces travaux de thèse s'inscrit dans cette thématique, en se concentrant plus particulièrement sur l'identification des protéines liées aux zones à risques de l'ADN, telles que les G-quadruplex et les zones riches en AT. Cette sonde est constituée de deux parties. Un premier partenaire, piège à protéines basé sur un analogue de l'epicoconone, est relié à un second partenaire, ligand de l'ADN basé sur un analogue du TP-2Ox-2Py⁴, développé au sein de l'Institut Curie. Cette sonde a été synthétisée en 9 étapes avec un rendement global de 1 %.

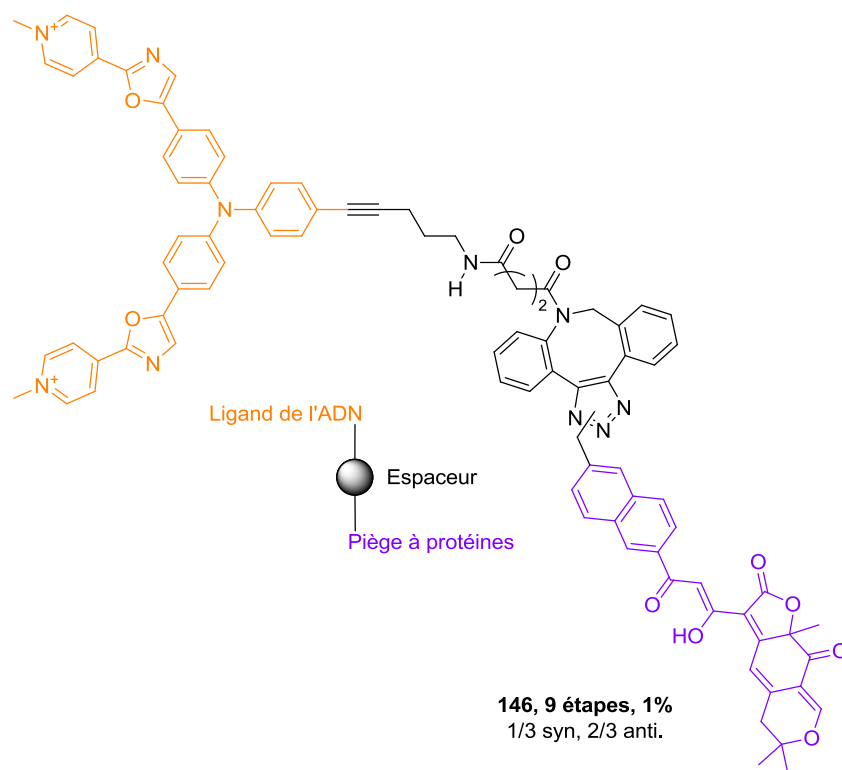


FIGURE 210 RAPPEL DE LA STRUCTURE DE LA SONDE 146 SYNTHÉTISÉE DURANT CES TRAVAUX DE THÈSE.

La synthèse de la partie « piège à protéines » a été réalisée en 8 étapes avec un rendement global de 5 %, en s'inspirant d'une synthèse déjà établie au sein du laboratoire.¹⁷³ En revanche, la partie « ligand de l'ADN » a nécessité une étude plus importante. En effet, les premières stratégies linéaires ont dû être abandonnées à cause de problèmes de purifications ou de réactivité. Cependant, la seconde stratégie envisagée basée sur une synthèse convergente s'est révélée fructueuse. Celle-ci est basée sur une étape clef de C-H activation « on water » et a permis d'obtenir la partie ligand de l'ADN en 3 étapes seulement avec un rendement de 63 %.

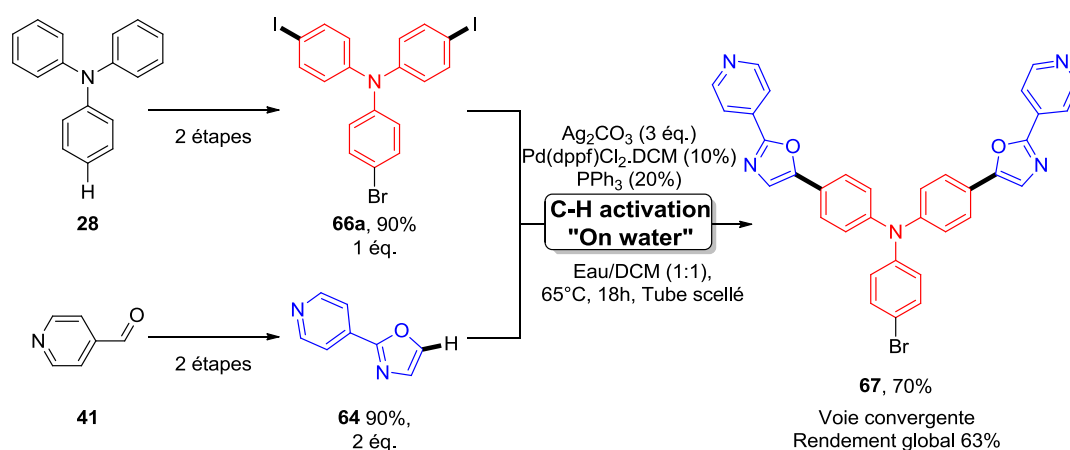


FIGURE 211 ETAPE DE C-H ACTIVATION « ON WATER » PERMETTANT D'ABOUTIR À L'INTERMÉDIAIRE 67 CLEF.

Les premières tentatives utilisant la réaction de CuAAC, permettant la liaison du ligand de l'ADN au piège à protéines, se sont soldées par des échecs qui ont été imputés à l'utilisation de cuivre. Ce dernier semble en effet être incompatible avec la fonction céto-énol de l'epicocconone et engendrerait sa dégradation. L'alternative a donc été d'utiliser une réaction de SPAAC où les contraintes stériques de l'alcyne permettent de s'affranchir de sels de cuivre. L'introduction du groupement cyclo-octyne a été réalisée sur le ligand de l'ADN par couplage de Sonogashira en présence de TMG, suivie d'un couplage peptidique. La sonde **146** a ainsi été synthétisée avec un rendement de 85 % après purification sur cette dernière réaction de SPAAC.

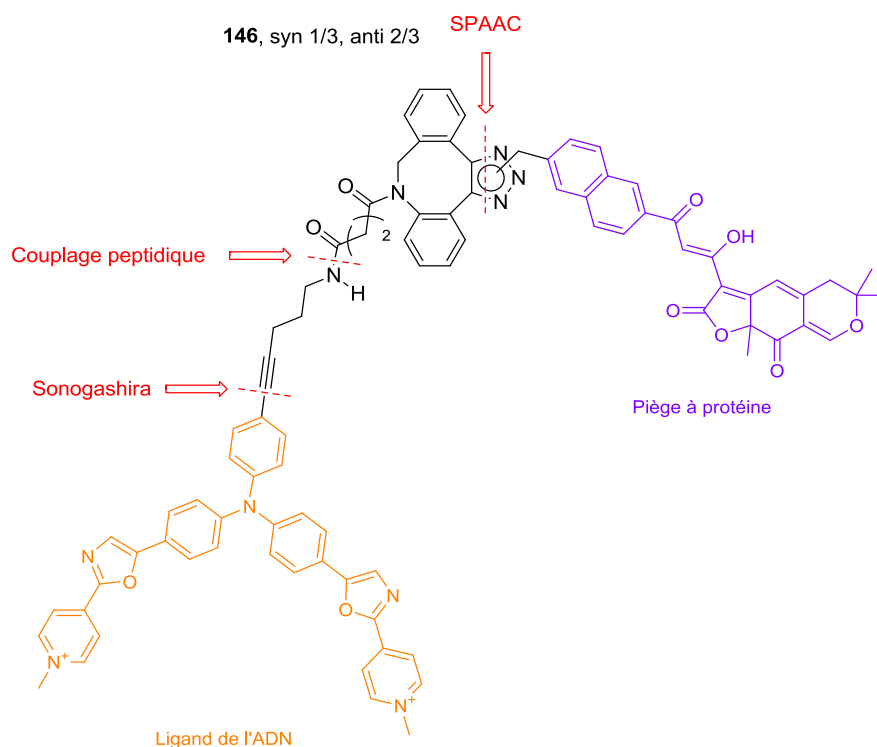


FIGURE 212 ÉTAPE DE LIAISON DES DEUX PARTENAIRES DE LA SONDE **146** PAR RÉACTION SPAAC.

Une fois cette sonde **146** obtenue, des tests d'affinités ont été réalisés à l'Institut Curie. Ces expériences se sont portées sur la détermination d'une affinité spécifique envers les séquences G-quadruplex, dans le but de valider le concept avec le couple C-Myc (séquence ADN riche en G-quadruplex)/Nucléoline (protéine interagissant avec la séquence C-Myc). Cependant, malgré l'utilisation de nombreuses séquences ADN riches en G-quadruplex, aucune affinité n'a été observée. Il n'est cependant pas à exclure qu'une affinité existe pour d'autres séquences ADN et cette possibilité est actuellement étudiée à l'Institut Curie. Des analyses complémentaires utilisant le dichroïsme circulaire sont également en cours, ainsi que des essais de marquages protéiques dans le but de déterminer l'efficacité du piège à protéines (sensibilité et brillance).

En parallèle de ce projet de thèse, la réaction de C-H activation « on water » établie durant la synthèse de la sonde **146**, a pu être valorisée en synthétisant 4 nouveaux ligands. Ces derniers diffèrent de ceux développés à l'Institut Curie par le remplacement du noyau oxazole en noyau thiazole, et le remplacement de l'isomère 4-pyridine par les isomères 2 et 3. Ces nouveaux ligands ont ainsi pu être obtenus en 3 ou 4 étapes avec de bons rendements globaux avoisinant les 20 %. L'obtention rapide de ces composés illustre l'efficacité de la méthodologie de synthèse développée pour la préparation d'analogues de ligands de l'ADN.

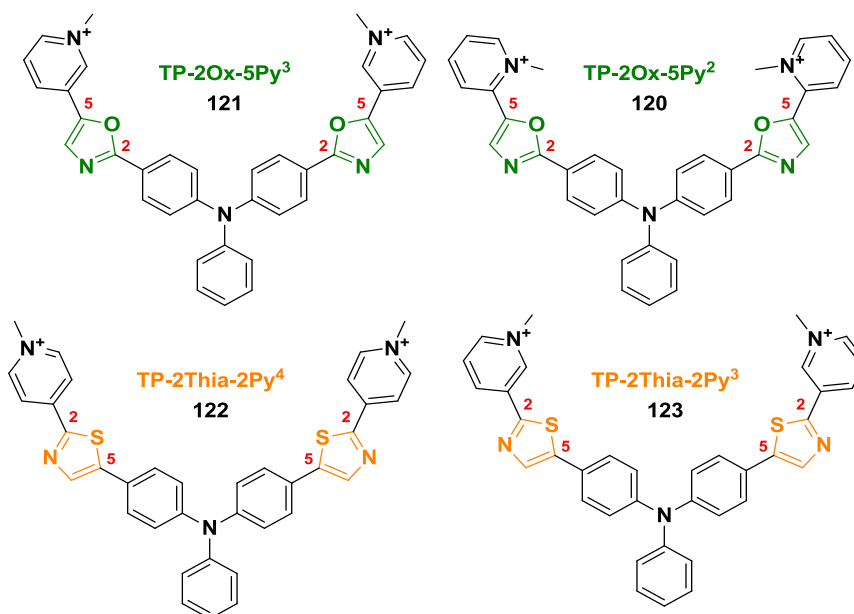


FIGURE 213 LES 4 NOUVEAUX LIGANDS SYNTHÉTISÉS DURANT CES TRAVAUX DE THÈSE.

L'affinité de ces ligands pour l'ADN a été testée par titration fluorimétrique en présence de DrewAT et en imagerie cellulaire. Cependant, ces résultats de titration fluorimétrique se sont révélés négatifs, et aucune exaltation de fluorescence n'a été observée. Des expériences supplémentaires avec d'autres séquences ADN sont envisagées, complétées par des expériences de dichroïsme circulaire.

Les images cellulaires des 4 nouveaux ligands synthétisés ont permis de mettre en évidence les ligands **120** et **123**. Le ligand **120** (TP-2Ox-5Py²) se localise exclusivement dans le cytoplasme et des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre l'origine de l'exaltation de fluorescence observée. Cette dernière pourrait provenir d'un organe cytoplasmique particulier ou même de l'ARN. Le ligand **123** (TP-2Thia-2Py³), quant à lui, est cytotoxique et marque le noyau cellulaire. Ce marquage et le résultat négatif de la titration fluorimétrique en présence de DrewAT, laissent suggérer une affinité pour des zones de l'ADN non riches en AT. Ces hypothèses sont en cours de vérification et seront complétées par des études de toxicité. En effet, il est nécessaire de déterminer si ce ligand perméabilise la membrane nucléaire ou bien s'il est uniquement toxique pour la cellule.

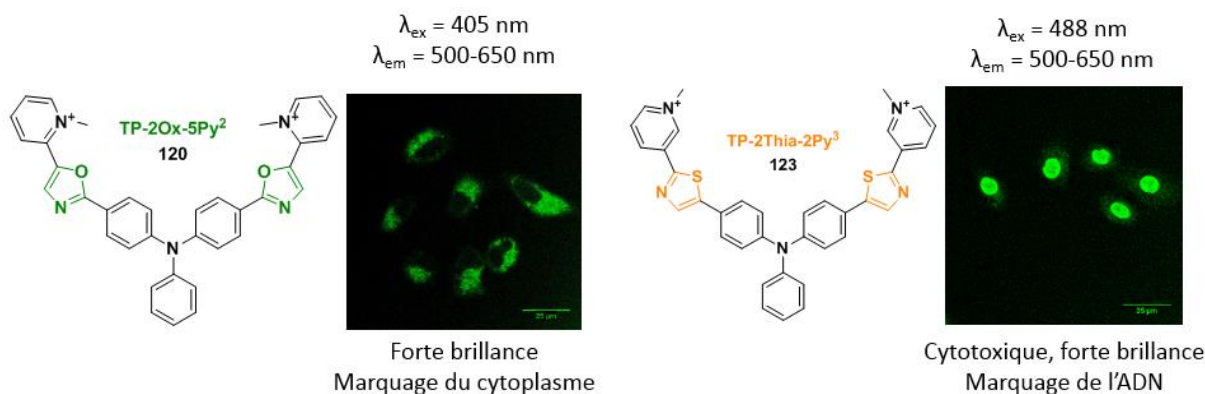


FIGURE 214 IMAGES CELLULAIRES DES LIGANDS 120 ET 123

Les résultats biologiques de ces ligands sont prometteurs et permettent d'envisager de nouveaux ligands, en utilisant la réaction de C-H activation « on water » développée durant ces travaux de thèse. Cette nouvelle voie d'accès simple et rapide aux ligands de l'ADN pourrait permettre d'établir une vaste bibliothèque dans le but de déterminer une relation structure/activité entre les ligands et l'ADN. Ainsi, il serait envisageable de moduler :

- Le cœur central triphénylamine par un carbazole qui va rigidifier la structure, augmentant le rendement quantique du ligand, en contrepartie d'une baisse d'affinité non spécifique pour l'ADN.^{163,349,350}
- Les groupements pyridines par des benzimidazoles ou benzothiazoles connus pour avoir une excellente affinité non spécifique avec l'ADN et une forte fluorescence.¹⁶⁰
- Le noyau oxazole par d'autres hétérocycles aromatiques comme les oxadiazoles ou encore les thiadiazoles, qui sont des bioisostères connus pour avoir de vastes propriétés thérapeutiques et être simples d'accès.³⁵¹⁻³⁵⁴

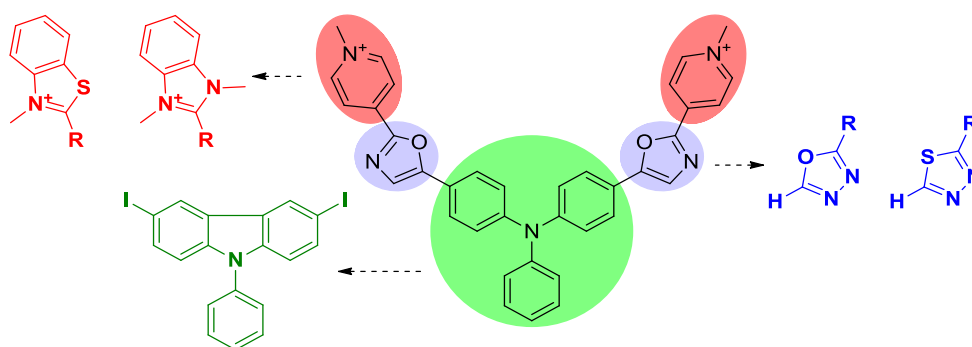


FIGURE 215 MODULATIONS POSSIBLES DES LIGANDS.

Une fois cette relation structure/activité établie, il sera possible d'optimiser de nouvelles sondes polyfonctionnelles couplées à un analogue de l'epicoconone, piège à protéines.

Le succès de la réaction de SPAAC et l'observation d'une dégradation des analogues de l'epicocconone en présence de cuivre, indiquent un effet néfaste envers ces composés. Dans cette optique, il serait alors intéressant de masquer la fonction céto-énol par un éther d'énol silylé (ou la complexation du motif par un atome de bore) puis d'effectuer une réaction de CuAAC. En effet, ce masquage de fonction pourrait empêcher les atomes de cuivre de s'y complexer et permettre de réaliser cette réaction de CuAAC avec succès. Si cette stratégie s'avère fructueuse, cela pourrait permettre de s'affranchir de la partie cyclo-octyne de la sonde **146** et réduire l'encombrement stérique potentiellement néfaste à l'affinité pour l'ADN.

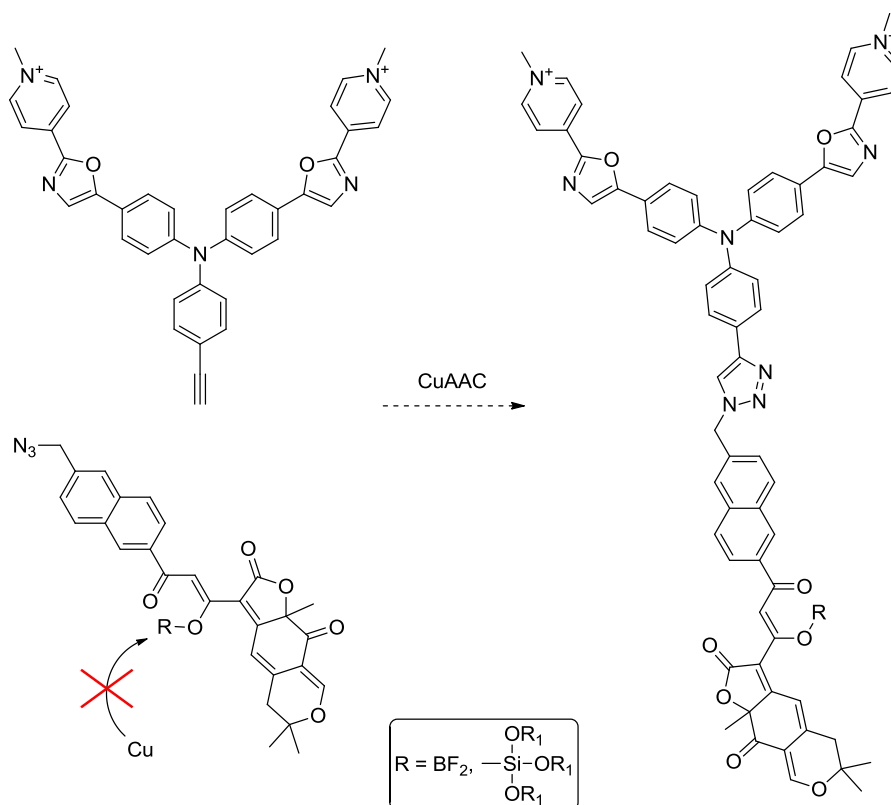


FIGURE 216 STRATÉGIE DE SYNTHÈSE COMPATIBLE AVEC LES CONDITIONS DE CuAAC.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

5. PARTIE EXPÉRIMENTALE.

5.1. GENERAL INFORMATION.

All commercially compounds were used as received, unless otherwise stated. All solvents were distilled prior to use. THF was distilled from sodium benzophenone ketyl under argon. DCM was distilled from phosphorus pentoxide under argon, EtOH and MeOH from Mg(OEt)₂ under argon. All air and water sensitive reactions were carried out under argon atmosphere. All the reactions were monitored by TLC on precoated plates (Merck silica gel 60 F 254) and the products were visualized with 254/365 nm UV followed by ethanolic PMA or KMnO₄. Purification of products was accomplished using flash chromatography (Sigma Aldrich 60, 40-63 μm).

5.1.1. NMR

Unless otherwise noted, ¹H NMR spectra were recorded at 300 MHz, ¹³C NMR spectra at 76 MHz. Residual solvent peaks were used as reference. Data for ¹H are reported as follows: chemical shift (δ ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, sex = sextet, sept = septet, m = multiplet), coupling constant (Hz), integration and attribution (as far as possible).

5.1.2. INFRARED

Infrared (IR) spectra were recorded with a universal ATR sampling accessory on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum 100 spectrometer. The bond vibration frequencies are expressed in reciprocal centimetres (cm⁻¹).

5.1.3. HPLC

Analytical RP-HPLC was performed on a Thermo Scientific Surveyor Plus instrument equipped with a PDA detector. Semi-preparative HPLC was performed on a Thermo Scientific SPECTRA SYSTEM liquid chromatography system (P4000) equipped with a UV-Vis 2000 detector. RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C18 column, 5 μm, 2.1 × 100 mm) with CH₃CN and 0.1 % trifluoroacetic acid (aq. TFA 0.1 %, pH 2.0) as eluents [100 % TFA (5 min) then linear gradient from 0 % to 100 % (45 min) of CH₃CN] at a flow rate of 0.25 mL/min was used. UV-vis detection was achieved with the Max Plot (*i.e.* chromatogram at absorbance maximum for each compound, mode: 220-650 nm).

5.1.4. MS

Low-resolution mass spectra (MS) were obtained with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus equipped with an electrospray ionization (ESI) source. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded either on a Thermo LTQ Orbitrap XL apparatus equipped with an ESI source or on a LCT Premier XE bench top orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer (Waters Micromass) equipped with an ESI source.

5.1.5. UV-FLUORESCENCE.

UV-visible absorption spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer by using a rectangular quartz cell (Varian, standard cell, Open Top, light path 10 × 10 mm, chamber volume: 3.5 mL). Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra) were performed on a Varian Cary Eclipse spectrophotometer with a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, light path: 10 × 4 mm, chamber

volume: 1400 μL , excitation filter: auto and emission filter: open, excitation and emission slit: 5 nm).

5.1.6. QUANTUM YIELD

Relative quantum yield were measured on the above solutions at 25 °C using rhodamine 6G ($\Phi_F = 0.95$ in ethanol at 488 nm) as a standard for the BSA or *n*-butylamine-reacted dyes and Lucifer Yellow CH ($\Phi_F = 0.21$ in water at 420 nm) for the native dyes.

The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yields:

$$\Phi_F(x) = \left(\frac{f_s}{f_x}\right) \left(\frac{F_x}{F_s}\right) \left(\frac{n_x^2}{n_s^2}\right) \Phi_F(s)$$

Where f is the absorption factor ($f = 1 - 10^{-A}$, where A = Absorbance at the excitation wavelength), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively.

5.1.7. BUFFER CONSTITUTION

K⁺100: Li.Caco 10mM. KCl 100mM. pH 7,2.

K⁺10: Li.Caco 10mM. KCl 10mM. LiCl 90mM. pH 7.2.

K⁺1: Li.Caco 10mM. KCl 1mM. LiCl 99mM. pH 7.2.

Na⁺400: Li.Caco 10mM. NaCl 400mM. pH 7.2.

5.1.8. DNA SEQUENCES

22AG: 5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'

c-myc: 5'-TTGAGGGTGGGTAGGGTGGGT AA-3'

DrewAT: 5'-CGA-AAT-TTG-C-3'

DS-26: 5'-CAA-TCG-GAT-CGA-ATT-CGA-TCC-GAT-TG-3'

Pu24T: 5'-TGA-GGG-TGG-TGA-GGG-TGG-GGA-AGG-3'

Pu27: 5'-TGG-GGA-GGG-TGG-GGA-GGG-TGG-GGA-AGG-3'

F-Pu24-T: 5'Fam-TGA-GGG-TGG-TGA-GGG-TGG-GGA-AGG-3'Tamra

F-21-T: 5'Fam-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-3'Tamra

5.1.9. DNA SEQUENCES PREPARATION

G4-DNA oligonucleotides were prepared by heating the corresponding sequence at 90 °C for 5 min in a K⁺100 buffer and cooling in ice to favour the intramolecular folding by kinetic trapping. Duplex-DNA ds26 was prepared by heating the self-complementary strand at 90 °C for 5 min in K⁺1-buffer followed by a slow cooling over 6 h.

5.1.10. FLUORIMETRIC TITRATION

The variation of the fluorescence signal of a fluorophore solution in buffer Na⁺400 of fixed concentration 1 μM was monitored upon addition of increasing quantities of DrewAT in Na⁺400. The titration curves were obtained by plotting F/F_0 versus the concentration of DrewAT, where F is the integrated fluorescence intensity of the oligonucleotide-dye complex and F_0 the initial integrated fluorescence intensity of the free dye.

5.1.11. G4-FID ASSAY

A temperature of 20 °C was kept constant with thermostated cell holders. Each experiment was performed in a 1-mL cell, in K⁺100 buffer in a total volume of 1 mL. The G4-FID assay was designed as follows: 0.25 μM pre-folded DNA target was mixed with **TO-PRO-3** (2 eq. for G4-DNA, 3 eq. for ds26). Each ligand addition (from 0.5 to 10 equivalents) was followed by a 3 min equilibration period, after which the fluorescence spectrum was recorded.

The percentage of displacement was calculated as follows: **TO-PRO-3** displacement (%) = $100 - [(FA / FA_0) \times 100]$, where FA and FA₀ stand for the fluorescence emission area of **TO-PRO-3** bound to DNA after each ligand addition and FA₀ before ligand addition (area measured from 650 to 800 nm, λ_{exc} = 640 nm). The percentage of displacement was then plotted as a function of the concentration of added ligand.

5.1.12. FRET-MELTING

FRET-melting assay was performed using the heating ramp as follow: 5 min at 25 °C, then increase of 0.5 °C every minute until 95 °C with oligonucleotides that mimic the human telomeric sequence, as well as other quadruplex-forming oligonucleotides (*c-Myc*, Pu24, 21) equipped with FRET partners at each extremities and the control duplex ds26:

F-Myc-T: 5'Fam- **TTGAGGGTGGGTAGGGTGGGT** AA-3'Tamra

F-Pu24-T : 5'Fam-TGA-**GGG-TGG-TGA-GGG-TGG-GGA-AGG**-3'Tamra

F-21-T : 5'Fam-**GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG**-3'Tamra

DS-26: 5'-CAA-TCG-**GAT-CGA-ATT-CGA-TCC-GAT-TG**-3'

With Fam: 6-carboxyfluorescein and Tamra: 6-carboxy-tetramethylrhodamine. Measurements were made with excitation at 496 nm and detection at 516 nm. K⁺10 buffer was used to dissolved F-21-T sequence and K⁺1 buffer was used to dissolved F-Myc-T and F-Pu24-T.

5.1.13. CELL CULTURE

HT29 cells were grown on coverslips at 37°C in monolayer cultures in complete DMEM (Gibco, Cergy Pontoise, France) with 10 % FCS and antibiotics (100 mg/ml streptomycin and 100 mg/ml penicillin) under conditions of 100 % humidity, 95 % air and 5 % CO₂ for 24 hours. Fixation and incubation with the dyes were then performed according to one of the two protocols thereafter.

Staining protocol 1 (incubation in live cells):

The cells were incubated for two hours with the desired compound. After washing twice with PBS, the cells were fixed by addition of 4 % paraformaldehyde (Stabilized with methanol, Sigma-Aldrich, USA). After 10 minutes of reaction, the cells were washed twice with PBS and the paraformaldehyde was then neutralized by addition of 2 mL of a solution of NH₄Cl (1 mg/mL PBS) (wait 5 min, repeat twice). The cells were finally washed again twice with PBS.

Staining protocol 2 (incubation in fixed cells):

The cell were first fixed by addition of 4 % paraformaldehyde (10 minutes of reaction) and washed twice with PBS. The paraformaldehyde was neutralized by addition of 2 mL of a solution of NH₄Cl (1 mg/mL PBS) (wait 5 min, repeat twice) and the cells were washed once with PBS. They were then incubated for 15 minutes with the desired compound and washed again twice with PBS.

Finally, the coverslips were mounted on microscope slides using Prolong Gold® antifade reagent (Invitrogen).

5.2.SYNTHESIS

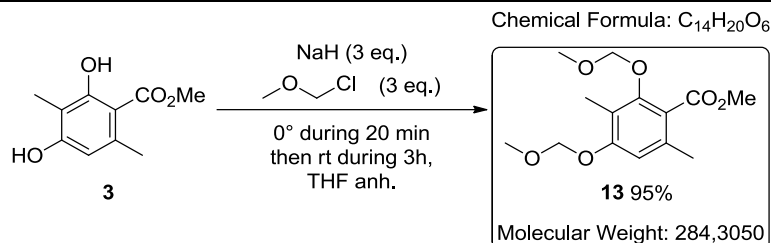
<u>5.2.1.</u>	<u>Proteins trap</u>	235
<u>5.2.1.1.</u>	<u>Dearomatised alcohol synthesis</u>	235
<u>5.2.1.2.</u>	<u>Dioxinone synthesis</u>	238
<u>5.2.1.3.</u>	<u>Acyl-furanonisation step</u>	244
<u>5.2.2.</u>	<u>DNA ligand</u>	245
<u>5.2.2.1.</u>	<u>Linear synthesis</u>	245
<u>5.2.2.2.</u>	<u>Convergent synthesis</u>	257
<u>5.2.3.</u>	<u>Linker synthesis.</u>	263
<u>5.2.3.1.</u>	<u>Linker preparation and Sonogashira step</u>	263
<u>5.2.3.2.</u>	<u>SPAAC step</u>	268
<u>5.2.4.</u>	<u>New ligand synthesis</u>	270
<u>5.2.4.1.</u>	<u>Synthesis of oxazole in position 5</u>	271
<u>5.2.4.2.</u>	<u>Synthesis of oxazole in position 2</u>	272
<u>5.2.4.3.</u>	<u>Synthesis of thioamide</u>	275
<u>5.2.4.4.</u>	<u>Synthesis of thiazole</u>	277
<u>5.2.4.5.</u>	<u>“On water” C-H activation step</u>	279
<u>5.2.4.6.</u>	<u>Methylation step of isomere in position 5</u>	285
<u>5.2.4.7.</u>	<u>Methylation step of isomere in position 2</u>	287

5.2.1. PROTEINS TRAP

5.2.1.1. DEAROMATISED ALCOHOL SYNTHESIS

(Compounds of chapter 2.1.2.1, pages 110)

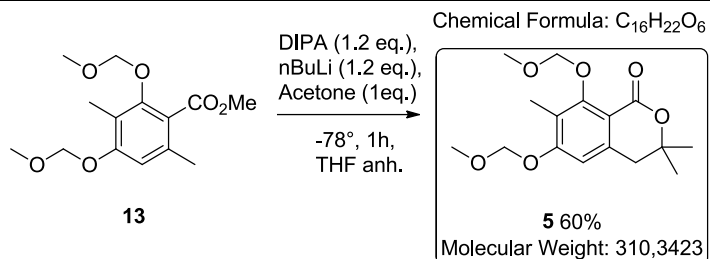
methyl 2,4-bis(methoxymethoxy)-3,6-dimethylbenzoate (**13**)



To a stirred solution of 3.92g methyl atratate **3** (20 mmol, 1 eq.) in 200mL DMF at 0 °C was added 2.4 g of NaH (60 % dispersion in oil, 60 mmol, 3 eq.). The resulting mixture was stirred at 0°C for 20 min before 28.6 mL of MOM-Cl (2.1M in toluene, 60 mmol, 3 eq.) was slowly added. The resulting mixture was warmed to room temperature and stirred for 3 h before it was quenched with saturated NH₄Cl. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with cyclohexane. The combined organic layers were washed with saturated NaHCO₃, dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. Flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc : 9/1) afforded ester **13** with 95 % yield as colorless oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 6.72 (s, 1H), 5.19 (s, 2H), 4.96 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.15 (s, 3H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 168.5, 156.8, 153.9, 134.6, 122.2, 118.3, 111.5, 100.1, 94.2, 57.3, 55.9, 51.8, 19.8, 9.3.
IR (neat) v cm⁻¹	2956, 1724, 1605, 1579, 1437, 1273, 1144, 1114, 1042, 978
MS (ESI positive mode) m/z	285 [M + H] ⁺

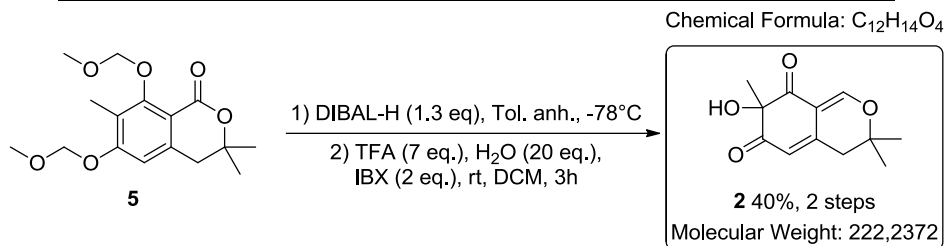
6,8-bis(methoxymethoxy)-3,3,7-trimethylisochroman-1-one (5)



To a stirred solution of 1.7 mL of DIPA (12 mmol, 1.2 eq.) in 100mL THF at -78 °C was slowly added 4.8 mL of n-BuLi (2.5 M in hexane, 12 mmol, 1.2 eq.). The resulting mixture was warmed to 0°C and stirred for 30 min before it was cooled to -78 °C and a solution of 3.41 g of ester **13** (12 mmol, 1.2 eq.) in 20 mL THF was added. The resulting mixture was stirred at -78 °C for 30 min before 740 µL of freshly distilled acetone (10 mmol, 1 eq.) was added. The resulting mixture was stirred for 5 min at -78 °C before it was quenched with HCl 1M. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. Flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc : 8/2) afforded lactone **5** with yield 60 % as a pale yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 6.69 (s, 1H), 5.25 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 3.61 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 2.92 (s, 2H), 2.22 (s, 3H), 1.41 (s, 6H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 162.6, 160.0, 159.3, 138.9, 121.4, 111.2, 108.7, 101.6, 94.3, 79.4, 57.7, 56.5, 40.7, 27.3, 9.6.
IR (neat) ν cm⁻¹	2928, 2110, 1700, 1596, 1474, 1291, 1149, 1108, 1047, 972, 917
MS (ESI positive mode) m/z :	311 [M + H] ⁺

7-hydroxy-3,3,7-trimethyl-3H-isochromene-6,8(4H,7H)-dione (2)



To a stirred solution of 4.75 g of lactone **5** (15.3 mmol, 1 eq.) in 150 mL toluene at -78 °C was added 16.6 mL of DiBAL-H (1.2 M in toluene, 19.9 mmol, 1.3 eq.). The resulting mixture was stirred at -78 °C for 20 min before it was quenched at -78 °C with H₂O. The resulting mixture was diluted with EtOAc, the layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with HCl 1M, brine, dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford the corresponding reduced lactol **14** with quantitative yields, as a light yellow oil, which was immediately used without further purification.

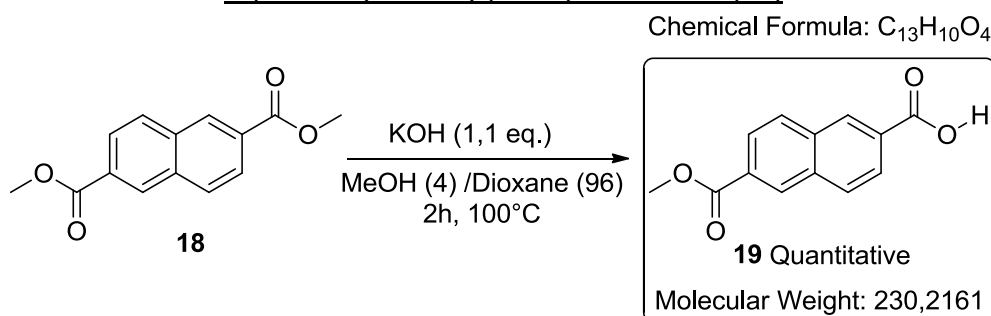
To a stirred solution of 312 mg of lactol **14** (1 mmol, 1 eq.) in 10mL DCM at room temperature were added 1.50 mL of TFA (7 mmol, 7 eq.), 360 μL of water (20 mmol, 20 eq.) and 560 mg of IBX (2 mmol, 2 eq.). The resulting mixture was stirred for 3 h before it was filtered to separate the IBX residue and the filtrate was concentrated in vacuo. Flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 80/20 to 40/60) afforded alcohol **2** with 40 % yield as a brown solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 7.75 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 4.01 (brs, 1H, OH), 2.66 (s, 2H), 1.49 (s, 3H), 1.37 (s, 6H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 197.6, 195.1, 159.1, 146.9, 116.6, 109.6, 83.1, 81.0, 39.6, 28.8, 26.5, 25.9.
IR (neat) ν cm⁻¹	3433, 2979, 2932, 1706, 1660, 1615, 1568, 1287, 1269, 1179, 1091
HRMS (ESI positive mode) m/z :	calculated for [C ₁₂ H ₁₄ O ₄ +H] ⁺ 223.0970 ; found 223.0968.

5.2.1.2. DIOXINONE SYNTHESIS

(Compounds of chapter 2.1.2.2, page 112)

6-(methoxycarbonyl)-2-naphthoic acid (**19**)



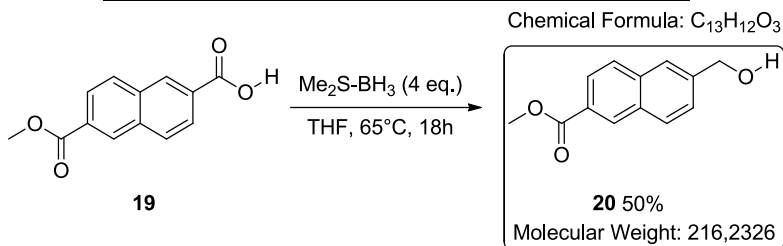
12,2 g of **18** (50 mmol, 1 eq.) was dissolved in 96mL of 1-4 dioxane. A solution of 2,8 g of KOH (55 mmol, 1,1 eq.) in 4mL of MeOH was slowly added. The reaction was heated at 100°C, and stirred at this temperature for 2 hours. A white solid appear and the reaction was quenched with HCl 6M and extracted with AcOEt. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford a white precipitate **19** with a quantitative yield.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.92 (s, 3H), 8.02-8.06 (m, 2H), 8.22-8.27 (m, 2H), 8.68 (m, 2H), 13.26 (brs, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 167.13, 166.10, 134.26, 134.05, 130.37, 130.18, 129.91, 129.78, 128.86, 126.04, 125.48, 52.43.

MS (ESI negative mode) m/z : 229 [M - H]⁻

methyl 6-(hydroxymethyl)-2-naphthoate (20)

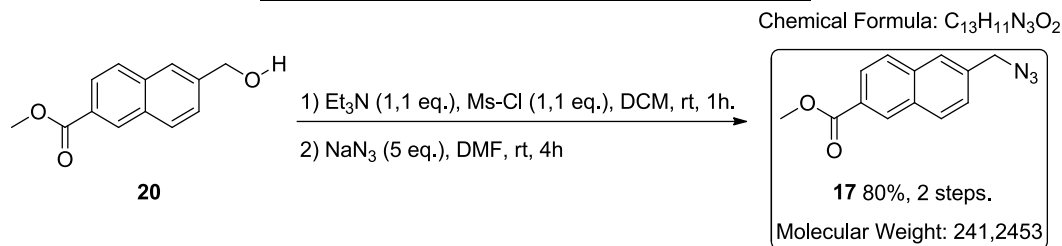


11g of **19** (48 mmol, 1 eq.) was dissolved in 100mL of THF. The solution was stirred at 0°C during the slowly addition of 14 mL of BH₃.Me₂S (4 eq., 192 mmol). The solution was heated to 65°C and stay at this temperature for 18h. The reaction was cooled to 0°C and quenched with HCl 1M. The solution was extracted with EtOAc, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was rapidly purified over celite with Cyclohexane/EtOAc (70/30) to afford the white powder **20** with 50 % yields.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.60 (s, 1H), 8.07 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.54 (dd, J = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 4.90 (s, 2H), 3.98 (s, 3H).

MS (ESI negative mode) m/z : 215 [M - H]⁻

methyl 6-(azidomethyl)-2-naphthoate (17)



9g of **20** (41.6 mmol, 1 eq.) was dissolved in 100mL of DCM and cooled to 0°C. 7,5 mL of Et_3N (45.76 mmol, 1.1 eq.) and 3,85 mL of $Ms-Cl$ (45.76 mmol, 1.1 eq.) was added to the solution. The solution was warmed to room temperature, and stirred at room temperature for 1h. After completion, the mixture was quenched with saturated $NaHCO_3$. The mixture was extracted with $EtOAc$, dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum to afford a white powder corresponding to the compound **21** which was used immediately without further purification.

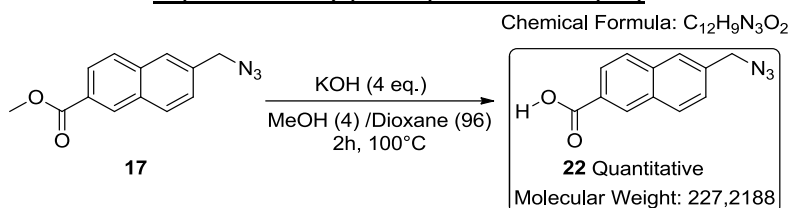
The crude product was dissolved in 90 mL of DMF and stirred at room temperature. 13g of NaN_3 (210 mmol, 5 eq.) was added to the solution and stirred at this temperature for 4h. After completion, the crude was dissolved in water and extracted with $AcOEt$. The organic layers was dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. Flash chromatography (silica gel, cyclohexane 100 to cyclohexane/ethyl acetate 70/30) afforded to a white solid **17** with 80% yield over 2 steps.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.53 (s, 1H), 8.03 (dd, $J = 8.6, 1.6$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.39 (dd, $J = 8.5, 1.7$ Hz, 1H), 4.44 (s, 2H), 3.94 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 166.88, 135.43, 135.22, 131.95, 130.65, 129.96, 128.04, 127.71, 126.60, 126.40, 125.73, 77.59, 77.17, 76.74, 54.62, 52.14.

MS (ESI positive mode) m/z : 264 $[M + Na]^+$

6-(azidomethyl)-2-naphthoic acid (22**)**



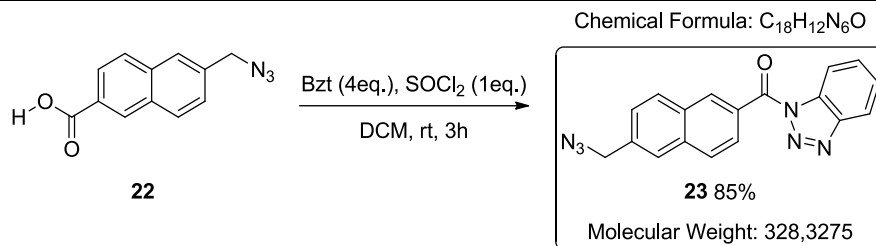
5 g of **17** (20.8 mmol, 1 eq.) was dissolved in 50mL of 1-4 dioxane. A solution of 4.48 g of KOH (80 mmol, 4 eq.) in 2mL of MeOH was slowly added. The reaction was heated at 100°C, and stirred at this temperature for 2 hours. A white solid appear and the reaction was quenched with HCl 6M. The crude product was washed with diethylether and dried under vacuum to afford the product **22** with a quantitative yield as a white powder.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.82 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.14 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 10.0 Hz, 3H), 7.58 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.67 (s, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 206.89, 167.80, 136.29, 135.24, 132.15, 130.77, 130.36, 128.85, 128.67, 127.51, 127.22, 126.15, 54.09, 40.81, 40.54, 40.26, 39.98, 39.70, 39.43, 39.15, 31.11.

MS (ESI negative mode) m/z : 228 [M - H]⁻

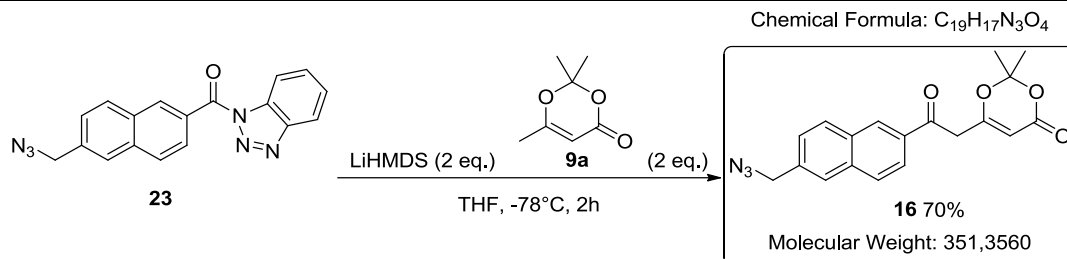
(6-(azidomethyl)naphthalen-2-yl)(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)methanone (**23**)



To a solution of 6g of benzotriazole (50 mmol, 4 eq.) in 60 mL of DCM was added 0.9 mL of thionyl chloride (12.3 mmol, 1 eq.) at room temperature. After 30 minutes, 2.8g of carboxylic acid **22** (12.3 mmol, 1 eq.) was added portion wise and stirring was continued until completion (around 3h). The white precipitate was filtered off and washed with DCM. The combines organic layers were washed with NaOH 2M, dried on MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford the desired product **23** as a white solid with 85% yield.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 8.87 (s, 1H), 8.45 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 8.31 – 8.18 (m, 2H), 8.04 (dd, <i>J</i> = 12.2, 8.6 Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.74 (ddd, <i>J</i> = 8.2, 7.2, 1.0 Hz, 1H), 7.65 – 7.50 (m, 2H), 4.59 (s, 2H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 135.76, 134.14, 132.62, 132.00, 130.81, 130.64, 128.45, 127.44, 127.08, 126.90, 126.58, 120.40, 115.03, 54.95.
IR (neat) ν cm⁻¹	2099, 1709, 1633, 1602, 1482, 1448, 1364, 1277, 1049, 984, 900, 809, 744.
MS (ESI positive mode), m/z :	Calculated for [C ₁₈ H ₁₂ N ₆ O+H] ⁺ 329.1145, found 329.1151

6-(2-(6-(azidomethyl)naphthalen-2-yl)-2-oxoethyl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-one (16)



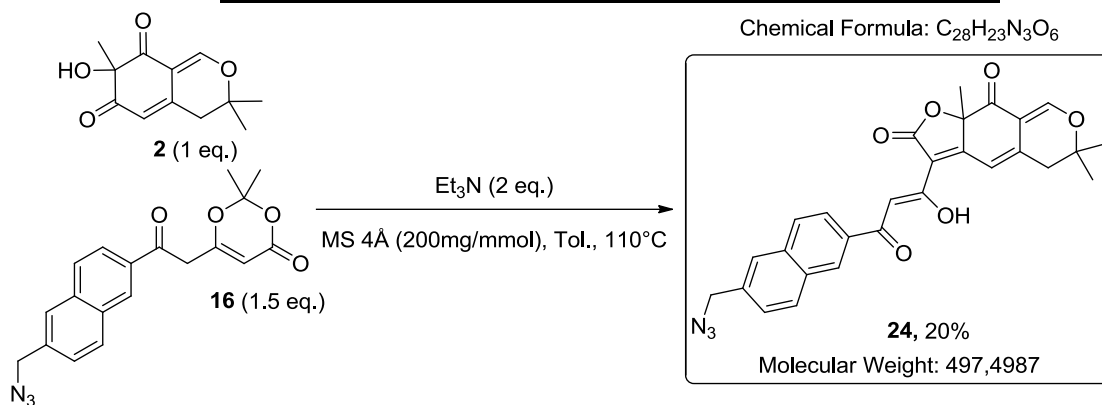
To a stirred solution of 3.8 mL of HMDS (18 mmol, 2 eq.) in 45 mL of THF at -78°C, was added 7.2 mL of n-BuLi 2.5M in hexane (18 mmol, 2 eq.). The resulting mixture was warmed to 0°C and stirred at this temperature for 30 minutes before it was cooled to -78°C and methyl dioxinone **9a** (18 mmol, 2 eq.) was added. The resulting mixture was stirred at -78°C for 30 minutes and 3g of **23** (9 mmol, 1 eq.) was added. The resulting mixture was warmed to room temperature. After 2h, the reaction was quenched with HCl 1M at 0°C and the resulting mixture was stirred and warmed to room temperature for an additional 30 minutes. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. Flash Chromatography was performed on silica gel (Cyclohexane/EtOAc 9/1 to 7/3) to obtain the desired product **16** with 70% yield as a brown powder.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 8.42 (s, 1H), 8.03 – 7.94 (m, 2H), 7.90 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.50 (dd, <i>J</i> = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 5.46 (s, 1H), 4.53 (s, 2H), 4.02 (s, 2H), 1.69 (s, 6H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 192.93, 165.34, 160.89, 136.53, 135.81, 133.59, 132.04, 130.46, 130.17, 128.93, 127.08, 126.83, 124.26, 107.41, 97.06, 54.73, 43.38, 25.03.
IR (neat) ν cm⁻¹	2926, 2084, 1721, 1680, 1640, 1373, 1202, 1180, 1016, 886, 809.
HRMS (ESI positive mode) m/z :	Calculated for [C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₄ +H] ⁺ 352.1292, found 352.1299 (Relative abundance 53.68 %) Calculated for [C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₄ +H ₂ O] ⁺ 369.1325, found 369.1586 (Relative abundance 50 %) Calculated for [C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₄ +MeCN] ⁺ 392.1485, found 392.1564 (Relative abundance 100 %)

5.2.1.3. ACYL-FURANONISATION STEP

(Compounds of chapter 2.1.2.3, page 114)

(Z)-3-(3-(6-(azidomethyl)naphthalen-2-yl)-1-hydroxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-6,6,9a-trimethyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione (**24**)



To a stirred solution of 440 mg of alcohol **2** (2 mmol, 1 eq.) and 400mg of molecular sieves (200 mg per mmol) in 20 mL of Toluene at 110°C was added 1g of dioxinone **16** (3 mmol, 1.5 eq.). The resulting mixture was stirred for 30 minutes until the consumption of alcohol **2** monitored by TLC before 560µL of Et₃N (4 mmol, 2 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 30 minutes before it was quenched at room temperature with HCl 1M for 1h. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. Flash Chromatography (silica gel, Cyclohexane/EthylAcetate 8/2 to 5/5) afforded the desired product **24** with 20% yield as an orange powder.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.55 (s, 1H), 8.08 (dd, J = 8.7, 1.7 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.78 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.50 (dd, J = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H), 2.87 – 2.68 (m, 2H), 1.75 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.41 (s, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)

δ 189.99, 189.84, 174.59, 168.46, 168.27, 159.08, 141.53, 135.84, 135.62, 133.61, 132.44, 130.59, 129.13, 128.71, 126.93, 126.85, 124.35, 114.66, 113.51, 110.70, 97.55, 86.62, 81.41, 54.98, 40.12, 28.11, 26.55, 26.28.

IR (neat) ν cm⁻¹

2098, 1751, 1701, 1579, 1372, 1262, 1175, 1089, 933, 813, 690.

HRMS (ESI positive mode) m/z :

Calculated for [C₂₈H₂₃N₃O₆+H]⁺ 498.1660, found 498.1674 (Relative abundance 35 %)
Calculated for [C₂₈H₂₃N₃O₆+H₂O]⁺ 515.1693, found 515.1930 (Relative abundance 100 %)
Calculated for [C₂₈H₂₃N₃O₆+EtOH]⁺ 543.2006, found 543.2236 (Relative abundance 35.5 %)

HPLC (Purity) :

38.23 minutes (purity 94 %)

λ_{exc} :

422 nm

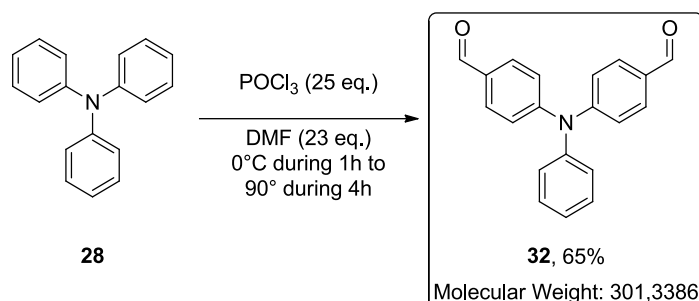
5.2.2. DNA LIGAND

5.2.2.1. LINEAR SYNTHESIS

(Compounds of chapter 2.2.2.1.1, page 121)

4,4'-(phenylazanediy) dibenzaldehyde (**32**)

Chemical Formula: C₂₀H₁₅NO₂

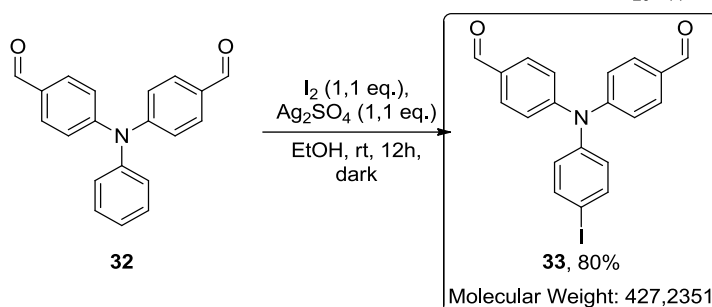


36 mL (469 mmol, 23 eq.) of dimethylformamide were cooled to 0°C under argon and 47.5 mL of phosphorus oxychloride (510 mmol, 25 eq.) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and 5 g of **28** (20.4 mmol, 1 eq.) was added to the mixture which was then stirred at 95°C for 4 h. After cooling to room temperature, the mixture was poured over a mix of ice and sodium hydroxide (1 M) and stirred for 30 min. The products were extracted with DCM and the resulting organic phases were washed abundantly with water. The solvents were removed under reduced pressure and the products separated by Flash Chromatography to afford the desired product **32** with 65% yield as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 9.89 (s, 2H), 7.81 – 7.74 (m, 4H), 7.39 (dt, <i>J</i> = 10.2, 2.0 Hz, 2H), 7.30 – 7.22 (m, 1H), 7.22 – 7.14 (m, 6H)
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 190.6 (2C), 152.1 (2C), 145.6 (1C), 131.4 (4C), 130.3 (2C), 127.2 (2C), 126.4 (1C), 122.9 (6C).
IR (neat) ν cm⁻¹	3044, 3038, 2816, 2745, 1691, 1601, 1584, 1508, 1336, 828, 772, 758
MS (ESI positive mode) m/z :	302 [M+H] ⁺

4,4'-((4-iodophenyl)azanediyl)dibenzaldehyde (33**)**

Chemical Formula: C₂₀H₁₄INO₂

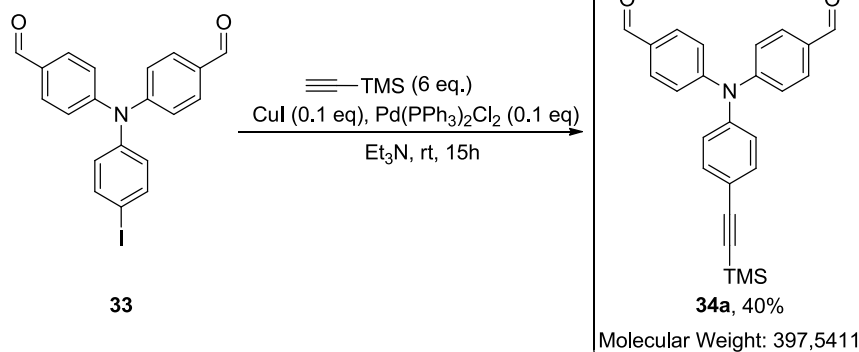


920 mg of Iodine (3,63 mmol, 1.1 eq.) was dissolved in 100 mL of ethanol. 1.13g of Silver sulfate (3,63 mmol, 1.1 eq.) was added and the mixture was stirred for 2 min at room temperature. 1g of **32** (3,3 mmol, 1.0 eq.) was introduced and the reaction stirred for 12h at room temperature in the dark (with an aluminium foil). The solution was concentrated under vacuum. A filtration in diethyl ether was done, and the filtrate was concentrated under vacuum to afford the desired product **33** with 80% yield as a yellow dark powder.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.90 (s, 1H), 7.84 – 7.73 (m, 2H), 7.73 – 7.63 (m, 1H), 7.22 – 7.13 (m, 2H), 6.96 – 6.87 (m, 1H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 190.6 (2C), 151.7 (2C), 145.5 (1C), 139.3 (2C), 131.8 (2C), 131.5 (4C), 128.6 (2C), 123.2 (4C), 90.1 (1C)
MS (ESI positive mode) m/z : 427 [M+H]⁺

4,4'-((4-((trimethylsilyl)ethynyl)phenyl)azanediyl)dibenzaldehyde (34a**)**

Chemical Formula: C₂₅H₂₃NO₂Si



1g of **33** (2.33 mmol, 1 eq.), 163mg of $\text{Pd}_2(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (0.233 mmol, 0.1 eq.) and CuI (44 mg, 0.233 mmol, 0.1 eq.) were dissolved in 23 mL of THF. The reaction was purged and degassed with argon for 20 min. 1.78 mL of TMSA (12.66 mmol, 6.0 eq.) and 23mL of Et_3N (165 mmol, 71 eq.) were added to the mixture reaction. The reaction was stirred at room temperature for 15h. The mixture was then filtered over a short pad of silica. Purification by flash chromatography (silica gel, with cyclohexane/ethylacetate, 100/0 to 70/30) afforded to the desired product **34a** with 40% yield as a yellow powder.

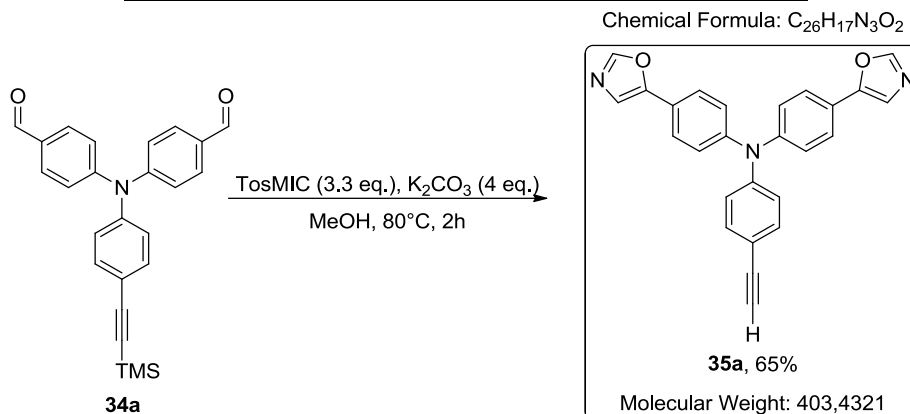
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.89 (s, 1H), 7.82 – 7.74 (m, 2H), 7.50 – 7.41 (m, 1H), 7.21 – 7.13 (m, 2H), 7.12 – 7.02 (m, 1H), 0.33 – 0.12 (m, 5H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 190.6 (2C), 152.1 (3C), 145.66 (1C), 131.46 (4C), 130.31 (2C), 127.22 (2C), 126.42 (2C), 122.92 (4C), 0.3 (3C) (2C alkyne missing)

IR (neat) ν cm⁻¹ 2203, 1689, 1584, 1504, 1483, 1272, 1214, 1163, 819, 759, 722, 700, 517, 412.

MS (ESI positive mode) m/z : 420 [M + Na]⁺

4-ethynyl-N,N-bis(4-(oxazol-5-yl)phenyl)aniline (35a)

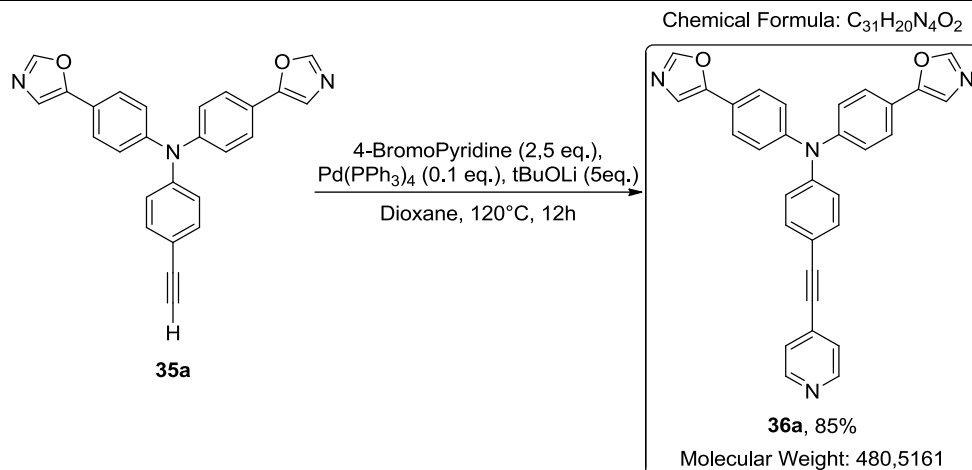


A mixture of 350 mg of **34a** (0.9 mmol, 1 eq.), 585 mg of TosMIC (3 mmol, 3.3 eq.), 497 mg of potassium carbonate (3.6 mmol, 4 eq.) in 10mL of methanol was stirred for 2 h at 80°C. The reaction mixture was concentrated to dryness and the resulting residue was diluted with DCM. The organic layer was washed with water, brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was dissolved in a minimal amount of dichloromethane and a large quantity of pentane was added. The pure title compound **35a** was obtained as a yellow foam with 65% yields.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (s, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.40 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.29 (s, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.07 (s, 1H).

MS (ESI positive mode) m/z : 404 [M + H]⁺

4-(oxazol-5-yl)-N-(4-(oxazol-5-yl)phenyl)-N-(4-(pyridin-4-ylethynyl)phenyl)aniline (36a)



A mixture of 50mg of compound **35a** (0.12 mmol, 1 eq.), 58mg of 4-bromopyridine hydrochloride (0.3 mmol, 2.5 eq.), 48 mg of lithium tert-butylate (0.6 mmol, 4 eq.) and 14mg of palladium tetrakis (0.012 mmol, 0.10 eq.) was added in 1mL of dioxane and stirred 12h at 120°C in a sealed tube. The resulting mixture was extracted with DCM and washed with water and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (silica gel, dichloromethane/methanol 100/0 to 95/5) to afford the desired compound **36a** in 85% yield as a yellow solid.

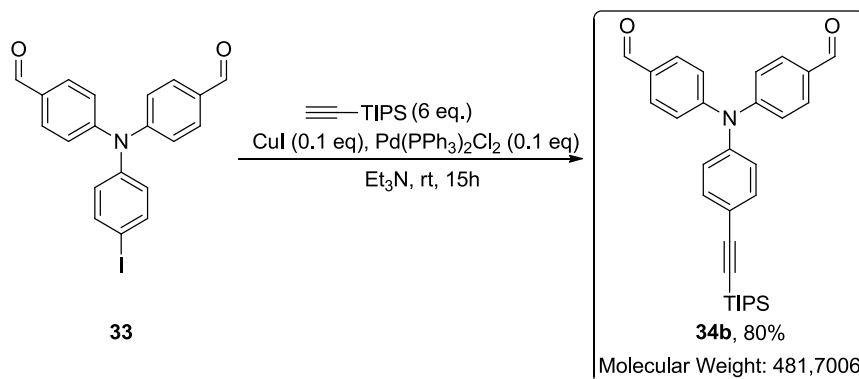
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.91 (s, 1H), 7.72 – 7.62 (m, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 147.8 (2C), 146.9 (3C), 133.3 (2C), 132.3 (2C), 132.2(2C), 132.1 (2C), 128.7 (2C), 128.5 (2C), 125.8 (4C), 125.0 (4C), 123.4 (2C), 121.2 (2C), 116.3 (2C).

MS (ESI positive mode) m/z : 503 [M + H]⁺

4,4'-((4-((triisopropylsilyl)ethynyl)phenyl)azanediyl)dibenzaldehyde (34b)

Chemical Formula: C₃₁H₃₅NO₂Si



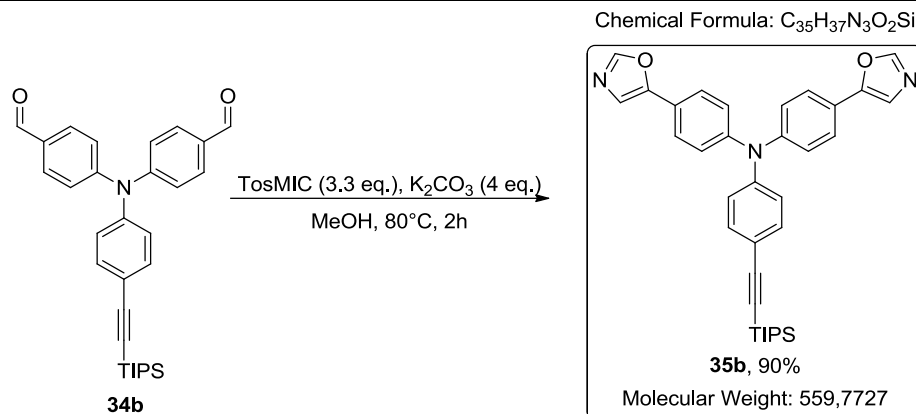
630 mg of **33** (1.47 mmol, 1 eq.), 105mg of Pd₂(PPh₃)₂Cl₂ (0.15 mmol, 0.1 eq.) and 28mg of CuI (0,233 mmol, 0.1 eq.) were dissolved in 10 mL of THF. The reaction was purged and digazed with argon for 20 min. 1.25 mL of TIPS-alkyne (8.8 mmol, 6.0 eq.) and 10mL of Et₃N (105 mmol, 71 eq.) were added to the mixture reaction. The reaction was stirred at room temperature for 15h. The mixture was then filtered over a short pad of silica. Purification by flash chromatography (silica gel, with cyclohexane/ethylacetate, 100/0 to 70/30) afforded to the desired product **34b** with 80% yield as a yellow powder.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.91 (s, 1H), 7.81 – 7.75 (m, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 1.13 (s, 10H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 190.6 (2C), 151.7 (3C), 133.9 (2C), 131.8 (2C), 131.5 (4C), 126.3 (2C), 123.3 (5C), 18.8 (6C), 11.4 (3C) (2C alkyne missing)

MS (ESI positive mode) m/z : 504 [M + Na]⁺

4-(oxazol-5-yl)-N-(4-(oxazol-5-yl)phenyl)-N-(4-((triisopropylsilyl)ethynyl)phenyl)aniline (35b**)**



A mixture of 390 mg of **34b** (0.8 mmol, 1 eq.), 521 mg of TosMIC (2.7 mmol, 3.3 eq.), 447 mg of potassium carbonate (3.24 mmol, 4 eq.) in 10mL of methanol was stirred for 2 h at 80°C. The reaction mixture was concentrated to dryness and the resulting residue was diluted with DCM. The organic layer was washed with water, brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was dissolved in a minimal amount of dichloromethane and a large quantity of pentane was added. The pure title compound **35b** was obtained as a yellow foam with 90% yields.

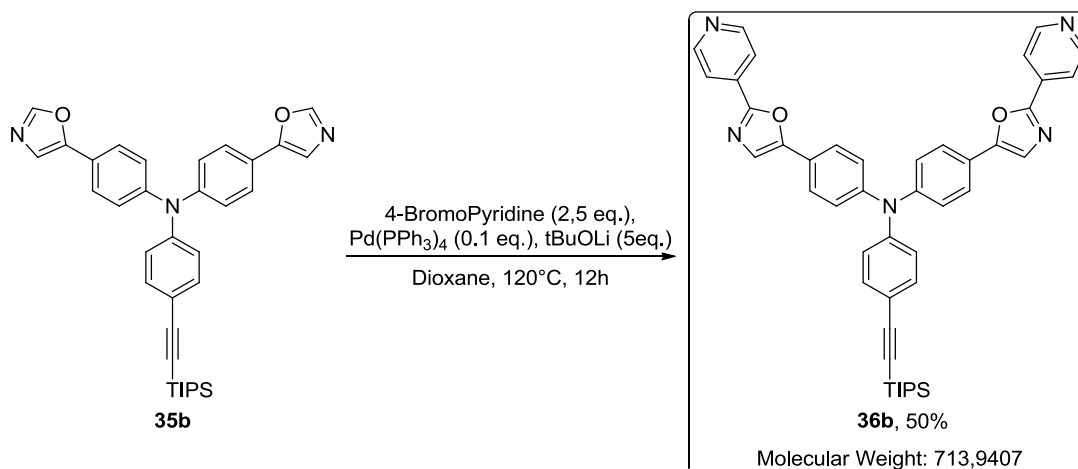
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (s, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.39 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 1.12 (s, 21H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 151.4 (2C), 150.3 (2C), 147.2 (2C), 146.9 (1C), 133.4 (4C), 125.7 (2C), 124.5 (4C), 124.1 (2C), 123.0 (2C), 121.0 (2C), 118.5 (1C), 90.5 (2C), 18.8 (6C), 11.5 (3C)

MS (ESI positive mode) m/z : 583 [M+Na]⁺

4-(2-(pyridin-4-yl)oxazol-5-yl)-N-(4-(2-(pyridin-4-yl)oxazol-5-yl)phenyl)-N-(4-((triisopropylsilyl)ethynyl)phenyl)aniline (36b)

Chemical Formula: C₄₅H₄₃N₅O₂Si



A mixture of 250mg of compound **35a** (0.45 mmol, 1 eq.), 224 mg of 4-bromopyridine hydrochloride (1.15 mmol, 2.5 eq.), 144 mg of lithium tert-butylate (1.8 mmol, 4 eq.) and 60mg of palladium tetrakis (0.05 mmol, 0.10 eq.) was added in 3mL of dioxane and stirred 12h at 120°C in a sealed tube. The resulting mixture was extracted with DCM and washed with water and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by column chromatography (silica gel, dichloromethane/methanol 100/0 to 95/5) to afford the desired compound **36b** with 50% yield as a yellow solid.

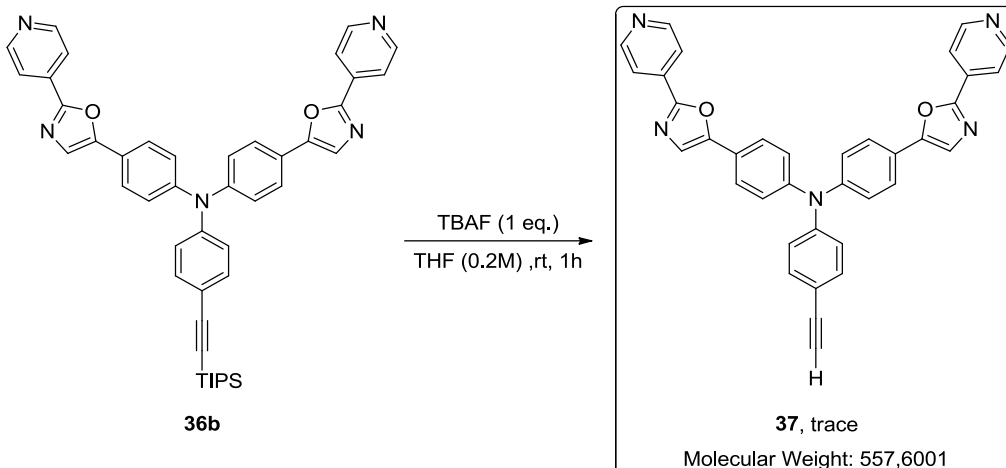
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.76 (d, *J* = 5.9 Hz, 4H), 7.93 (dd, *J* = 4.6, 1.6 Hz, 4H), 7.63 (dd, *J* = 8.5, 6.6 Hz, 4H), 7.47 – 7.39 (m, 4H), 7.22 – 7.15 (m, 4H), 7.11 – 7.05 (m, 2H), 1.14 (s, 21H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.6 (2C), 152.4 (2C), 150.7 (4C), 147.5 (2C), 146.6 (1C), 134.4 (2C), 133.6 (2C), 125.9 (4C), 124.5 (4C), 124.4 (2C), 123.6 (2C), 122.5 (2C), 119.9 (4C), 119.0 (1C), 106.8 (1C), 90.8 (1C), 18.8 (6C), 11.4 (3C).

MS (ESI positive mode) m/z : 715 [M + H]⁺

4-ethynyl-N,N-bis(4-(2-(pyridin-4-yl)oxazol-5-yl)phenyl)aniline (**37**)

Chemical Formula: C₃₆H₂₃N₅O₂

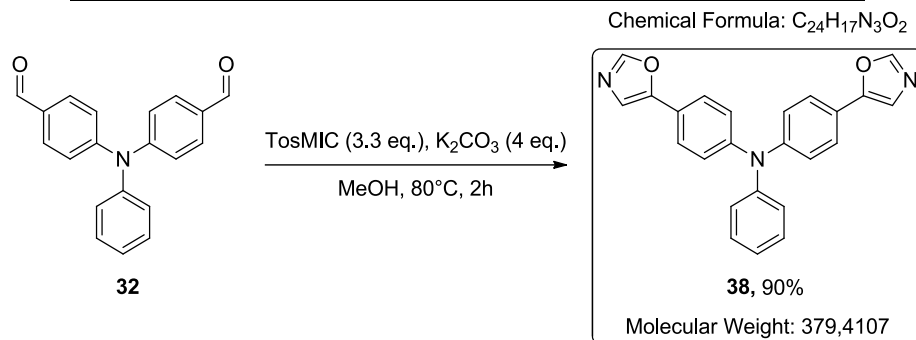


100mg of compound **36b** (0.14 mmol, 1 eq.) was dissolved in 1 mL of THF at room temperature. 140 μ L of TBAF (0.14 mmol, 1 eq.) was added to the stirring solution for 1h. The reaction is quenched with NaOH 4M and extracted a lot of time with DCM. The organic layers were dried with MgSO₄, and concentrated under vacuum. The desired product **37** was obtained as a red powder in traces (<2mg).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.76 (d, *J* = 6.1 Hz, 4H), 7.93 (dd, *J* = 4.6, 1.6 Hz, 4H), 7.66 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 7.48 – 7.41 (m, 4H), 7.20 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 7.10 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 3.09 (s, 1H).

MS (ESI positive mode) m/z : 558 [M+H]⁺

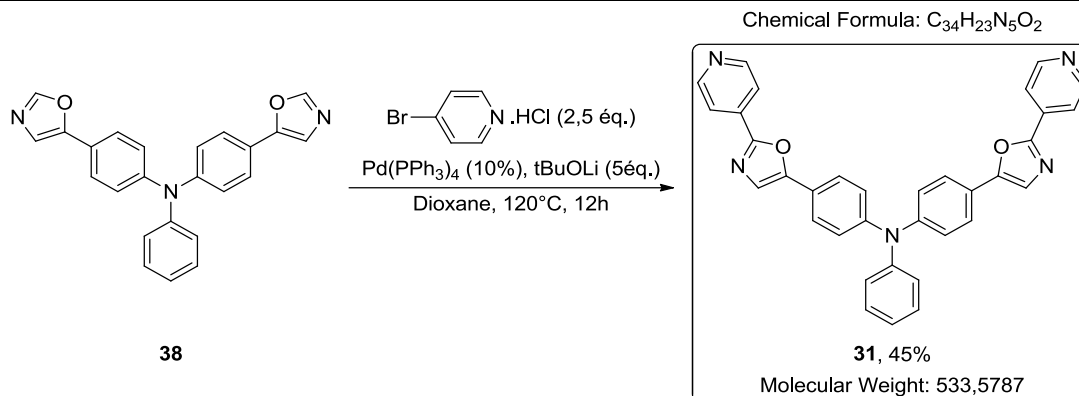
4-(oxazol-5-yl)-N-(4-(oxazol-5-yl)phenyl)-N-phenylaniline (38**)**



A mixture of 452mg of bis-formyltriphenylamine **32** (1.5 mmol, 1 equiv.), 637 mg of TosMIC (3.3 mmol, 3.3 equiv.), 830mg of potassium carbonate (6 mmol, 4 equiv.) in 20mL of methanol was stirred for 4 h at 80 °C. The reaction mixture was concentrated to dryness. The resulting residue was diluted with dichloromethane and water. After decantation, the organic layer was washed with water, brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated to dryness. The crude residue was dissolved in a minimal amount of dichloromethane and a large quantity of pentane was added. The pure title compound **38** was obtained as a yellow foam with a 90% yield.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 7.89 (s, 2H), 7.54 (d, J = 8.5, 4H), 7.36–7.29 (m, 3H), 7.26 (s, 2H), 7.18–7.08 (m, 6H)
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 151.5 (2C), 150.2 (2C), 147.7 (2C), 146.8 (1C), 129.7 (2C), 125.6 (4C), 125.4 (2C), 124.3 (1C), 123.9 (4C), 122.3 (2C), 120.7 (2C)
IR (neat) ν cm⁻¹	1587, 1486, 1269, 1175, 1093, 940, 819, 758, 697, 637.
MS (ESI positive mode) m/z :	447 [M+H] ⁺

N-phenyl-4-(2-(pyridin-4-yl)oxazol-5-yl)-N-(4-(2-(pyridin-4-yl)oxazol-5-yl)phenyl)aniline (31)



A mixture of 190mg of compound **38** (0.5 mmol, 1 equiv.), 233mg of 4-bromopyridine hydrochloride (1.25 mmol, 2.5 equiv.), 160mg of lithium tert-butyrate (2.5 mmol, 5 equiv.), 58 mg of palladium tetrakis (0.05 mmol, 0.10 equiv.) in 2mL of dioxane was stirred 12h at 120 °C in a sealed tube. Dichloromethane and water were added. After decantation, the resulting organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated to dryness. The crude residue was purified by column chromatography (silica gel, dichloromethane/methanol 100/0 to 95/5) to afford the desired compound **31** with 45% yield as a yellow solid.

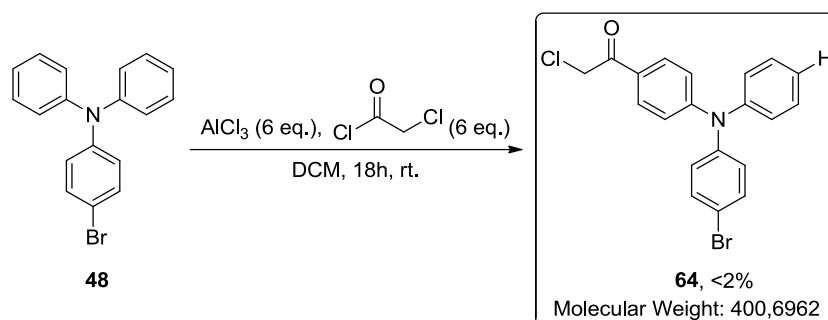
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.76 (d, J = 5.5, 4H), 7.93 (d, J = 5.5, 4H), 7.63 (d, J = 9.0, 4H), 7.44 (s, 2H), 7.35 (t, J = 7.8, 2H), 7.20–7.15 (m, 3H); 7.18 (t, J = 9.0, 4H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 158.5 (2C), 152.6 (2C), 150.7 (4C), 148.1 (4C), 146.7 (1C), 134.4 (4C), 129.9 (2C), 125.9 (2C), 125.8 (2C), 124.8 (1C), 124.0 (4C), 123.4 (2C), 122.0 (2C), 120.0 (2C)

MS (ESI positive mode) m/z : 534.0 [M+H]⁺

1-(4-((4-bromophenyl)(phenyl)amino)phenyl)-2-chloroethanone (64)

Chemical Formula: C₂₀H₁₅BrClNO



1,6 g of **48** (5 mmol, 1 eq.) and 2.4 mL of chlorure acetylchloride (30 mmol, 6 eq.) were dissolved in 50 mL of DCM at 0°C. 4g of Aluminium trichloride (30 mmol, 6eq.) was carefully added portion wise to the reaction mixture, and was then stirred at to room temperature for 18h. The resulting mixture was quenched at 0°C with HCl 1M carefully for 1h. DCM was added and the organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was purified on column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 100/0 to 50/50) to afford traces of the desired product **64** with less than <2 % yield as a brown oil.

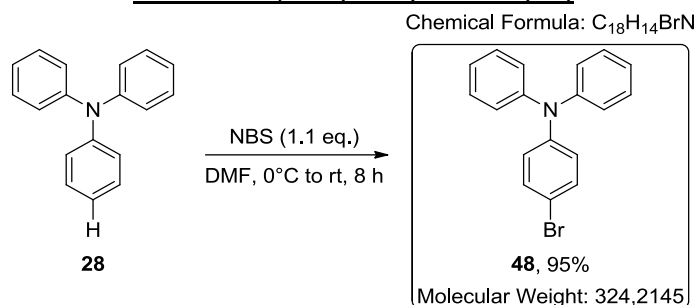
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.83 – 7.75 (m, 2H), 7.45 – 7.39 (m, 2H), 7.39 – 7.30 (m, 2H), 7.22 – 7.11 (m, 3H), 7.06 – 6.95 (m, 4H), 4.60 (s, 2H).

MS (ESI positive mode) m/z : 401 [M + H]⁺ (relative abundance 48), 403 [M + H]⁺ (Relative abundance 52)

5.2.2.2. CONVERGENT SYNTHESIS

(Compounds of chapter 2.2.2.1.2, page 130)

4-bromo-N,N-diphenylaniline (48**)**



4.5 g of **28** (18 mmol, 1 eq.) was added to 90 mL of DMF at 0°C. 3.2 g of NBS (19.8 mmol, 1.1 eq.) was added to the solution. The resulting mixture was heated to room temperature and stirred at this temperature for 8h. The crude mixture was washed with water and extracted with ethyl acetate. The organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. Purification chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 100/0 to 95/5) afforded the desired product with 95% yield as a white powder.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.30 – 7.13 (m, 6H), 7.04 – 6.81 (m, 8H).

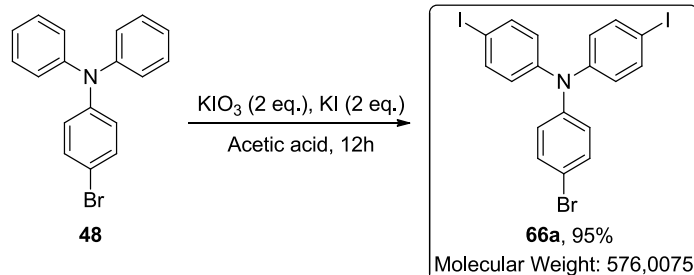
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 147.38 (2C), 147.35 (1C), 132.13 (4C), 129.50 (2C), 124.80 (4C), 124.50 (2C), 123.49 (2C), 114.08 (1C)

IR (neat) ν cm⁻¹ 586, 1493, 1461

MS (ESI positive mode) m/z : 323 [M + H]⁺ (relative abundance 51) 325 [M + H]⁺ (relative abundance 49)

4-bromo-N,N-bis(4-iodophenyl)aniline (66a)

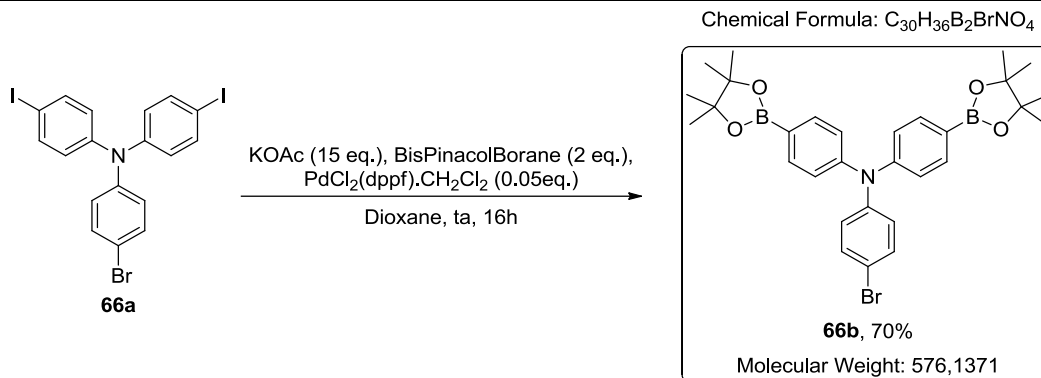
Chemical Formula: C₁₈H₁₂BrI₂N



648 mg of **48** (2 mmol, 1 eq.), 664 mg of KI (4 mmol, 2 eq.) and 854 mg of KIO_3 (4 mmol, 2 eq.) were dissolved in 15 mL of glacial acetic acid. The mixture was stirred at 90°C during 12h. The resulting mixture was precipitated in water and a dirty white solid was obtained and purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 100/0 to 80/20) to afford the desired production **66a** with 95% yield as a white powder.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 7.53 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 7.35 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.80 (d, J = 8.8 Hz, 4H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 146.8 (2C), 146.0 (1C), 138.5 (4C), 132.6 (2C), 126.1 (4C), 126.0 (2C), 116.4 (1C), 86.5 (2C)
IR (neat) ν cm⁻¹	1575, 1480, 1311, 1268, 1002, 810, 708.
MS (ESI positive mode) m/z :	576 [M + H] ⁺ (Relative abundance 47) 578 [M + H] ⁺ (Relative abundance 53)

4-bromo-N,N-bis(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)aniline (66b**)**

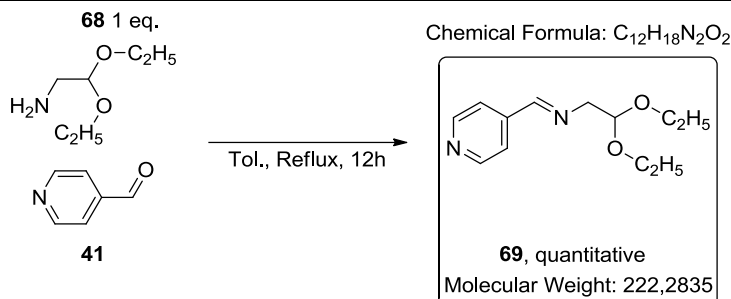


320 mg of compound **66a** (0.5 mmol, 1 eq.), 615 mg of KOAc (7.5 mmol, 15 eq.), 254 mg of BisPinacolborane (1 mmol, 2 eq.) and 8 mg of PdCl₂(dppf).DCM (0.01 mmol, 0.05 eq) were dissolved in 25 mL of dioxane. The reaction mixture was stirring at room temperature for 16h. The resulting mixture was extracted with ethyl acetate and washed with water and brine. The organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude mixture was purified on column chromatography (cyclohexane/ethyl acetate 100/0 to 80/20) to afforded the desired product **66b** with 70% yield as a white powder.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.57 – 7.49 (m, 4H), 7.35 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.80 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H), 1.26 (d, *J* = 2.9 Hz, 24H).

MS (ESI positive mode) m/z : 575 [M+H]⁺ (Relative abundance 52) 577 [M+H]⁺ (Relative abundance 48)

(E)-2,2-diethoxy-N-(pyridin-4-ylmethylene)ethanamine (69)

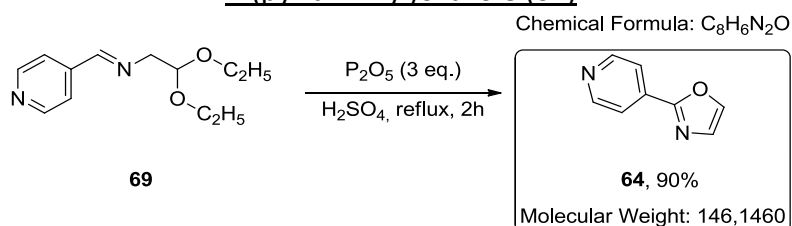


3.9 mL of **41** (50 mmol, 1 eq.) and 7.26 mL of **68** (50 mmol, 1 eq.) were added in 250 mL of toluene. The reaction mixture was heated to 110°C and stirring at this temperature during 12h. The crude mixture was concentrated under vacuum to afford the desired product **69** without further purification as a yellow oil which was immediately used.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.68 (dd, *J* = 4.4, 1.6 Hz, 2H), 8.26 (s, 1H), 7.58 (dd, *J* = 4.4, 1.6 Hz, 2H), 4.81 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 3.81 (dd, *J* = 5.3, 1.4 Hz, 2H), 3.73 (dq, *J* = 9.4, 7.1 Hz, 2H), 3.57 (dq, *J* = 9.4, 7.0 Hz, 2H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

MS (ESI positive mode) m/z : 223 [M + H]⁺

2-(pyridin-4-yl)oxazole (64)



The previous crude mixture was added portion wise at 0°C to 50 mL of concentrated H₂SO₄, until the full dissolution of the crude mixture (First solution named A). In other round bottom flask, 20g of P₂O₅ (141 mmol, 3 eq.) was added portion wise at 0°C to 50 mL of concentrated H₂SO₄ until the full dissolution of P₂O₅ (Seconde solution named B). The solution named A was carefully and dropwise added to the solution named B at 0°C. The resulting mixture was stirred at 0°C during 30 minutes and then heated at 100°C during 2h. The reaction mixture was poured on crushed ice, neutralized with solid K₂CO₃ and extracted with DCM. The organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. The resulting crude was purified on silica gel (cyclohexane/ethylacetate 80/20 to 50/50) to afford the desired product **64** as a white powder with 90% yields.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.75 (dd, *J* = 4.5, 1.6 Hz, 2H), 7.89 (dd, *J* = 4.5, 1.7 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H).

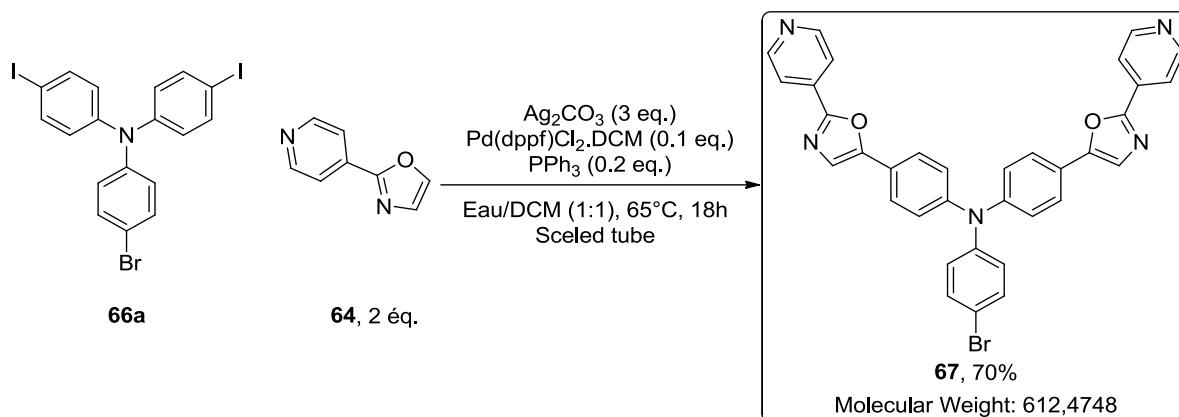
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 150.7 (2C), 139.9 (1C), 129.3 (1C), 120.1 (2C)

IR (neat) ν cm⁻¹ 2926, 1707, 1599, 1493, 1250, 830, 707.

MS (ESI positive mode) m/z : 147 [M + H]⁺

4-bromo-N,N-bis(4-(2-(pyridin-4-yl)oxazol-5-yl)phenyl)aniline (67**)**

Chemical Formula: C₃₄H₂₂BrN₅O₂



576 mg of **66a** (1 mmol, 1 eq.), 300 mg of **64** (2 mmol, 2 eq.), 120 mg of PPh₃ (0.2 mmol, 0.2 eq.), 160 mg of Pd(dppf)Cl₂.DCM (0.1 mmol, 0.1 eq.) and 900 mg of Ag₂CO₃ (3 mmol, 3 eq.) were introduced in a sealed tube. 5mL of water and 5mL of DCM were added in the sealed tube and heated to 65°C during 18h. The resulting crude was washed with NaOH 1M and extracted with DCM. The organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The resulting crude was purified on column chromatography (silica gel DCM/MeOH 100/0 to 90/10) to afford the desired product **67** as a yellow powder with 70% yields.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.76 (d, *J* = 5.4 Hz, 4H), 7.93 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H), 7.64 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.44 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H), 7.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)

δ 152.4 (2C), 150.7 (6C), 147.5 (2C), 145.8 (1C), 132.9 (2C), 126.7 (2C), 125.9 (6C), 124.2 (5C), 123.6 (2C), 122.4 (2C), 119.9 (4C)

IR (neat) ν cm⁻¹

1687, 1599, 1484, 1412, 1316, 1272, 1174, 1118, 827, 697.

HRMS (ESI positive mode) m/z :

Calculated for [C₃₄H₂₂BrN₅O₂+H]⁺ 612.1030, found 612.1039 (relative abundance 100%).

Calculated for [C₃₄H₂₂BrN₅O₂+H]⁺ 614.1030, found 614.1031 (relative abundance 75%).

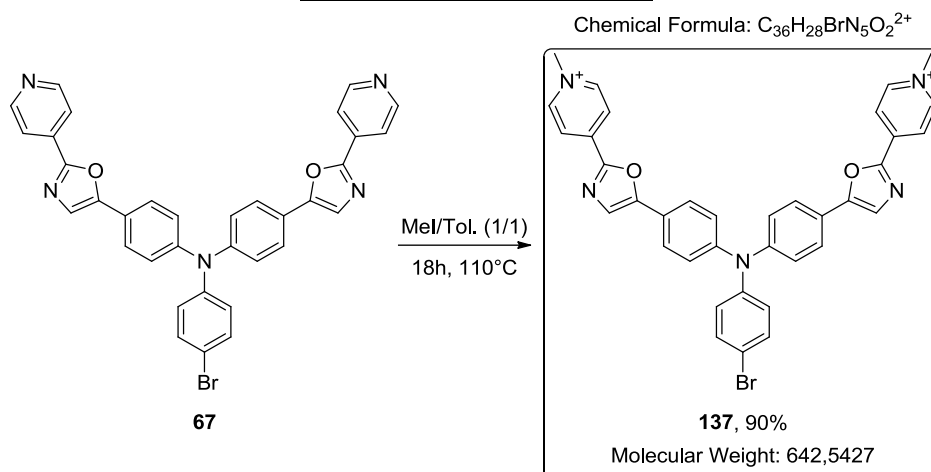
HPLC (Purity)

30.85 minutes (purity 92 %)

λ_{exc} :

319/449 nm

4,4'-(5,5'-(((4-bromophenyl)azanediyl)bis(4,1-phenylene))bis(oxazole-5,2-diyl))bis(1-methylpyridin-1-ium) (137)



100 mg of **67** (0.16 mmol, 1 eq.) was dissolved in a mixture of 1.6 mL of MeI and 1.6 mL of Toluene at 110°C for 18h. The crude mixture was concentrated under vacuum. The red precipitate was washed with toluene and concentrated under vacuum three times. The product **137** was obtained with 90% yield as a red powder.

1H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ 8.69 (s, 4H), 8.48 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H), 7.87 – 7.78 (m, 6H), 7.54 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 7.11 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 4.30 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN) δ 156.4 (2C), 156.0 (4C), 149.3 (2C), 147.0 (4C), 141.6 (1C), 133.8 (2C), 128.5 (4C), 127.5 (4C), 126.8 (5C), 125.0 (4C), 123.9 (4C), 122.3 (2C), 49.0 (2C).

IR (neat) ν cm^{-1} 1638, 1601, 1540, 1478, 1322, 1282, 1187, 1085, 832, 690.

HRMS (ESI positive mode) m/z : Calculated for $[C_{36}H_{28}BrN_5O_2+H]^{2+}$ 320.5713, found 320.5710 (Relative abundance 45 %)
 Calculated for $[C_{36}H_{28}BrN_5O_2+H]^{2+}$ 321.5713, found 321.5711 (Relative abundance 55 %)

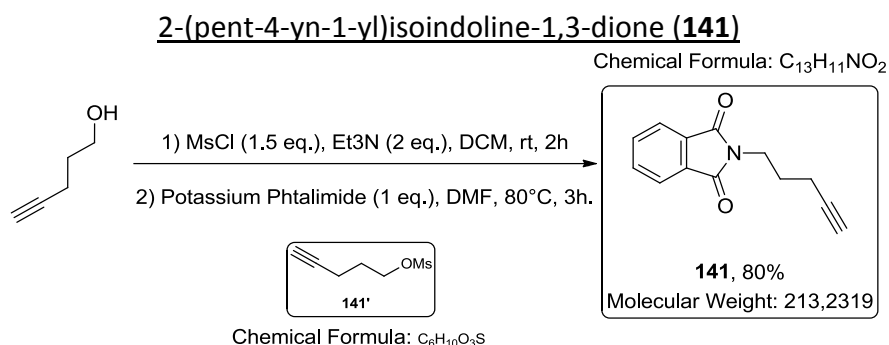
HPLC (Purity) 28.53 minutes (purity 95 %)

λ_{exc} : 323/457 nm

5.2.3. LINKER SYNTHESIS.

5.2.3.1. LINKER PREPARATION AND SONOGASHIRA STEP

(Compounds of chapter 2.3.3.2.1, page 166)



930 μ L of 4-pentyn-1-ol (10 mmol, 1 eq.), 1.16 mL of MsCl (15 mmol, 1.5 eq.), 2.76 mL of Et₃N (20 mmol, 2 eq.) were dissolved in 50 mL of DCM at room temperature and stirred during 2h. The resulting mixture was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford product **141'** an orange oil which was immediately used.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.36 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.03 (s, 1H), 2.37 (td, *J* = 6.8, 2.7 Hz, 1H), 2.05 – 1.90 (m, 2H).

The crude mixture was dissolved in 10mL of DMF and 1.85g of potassium phtalimide (10 mmol, 1 eq.) was added at 80°C and stirred during 3h. The reaction was quenched with water and extracted with DCM. The organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. The resulting crude was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 100/0 to 90/10) to afford the desired product **141** with 80% yield as a white powder.

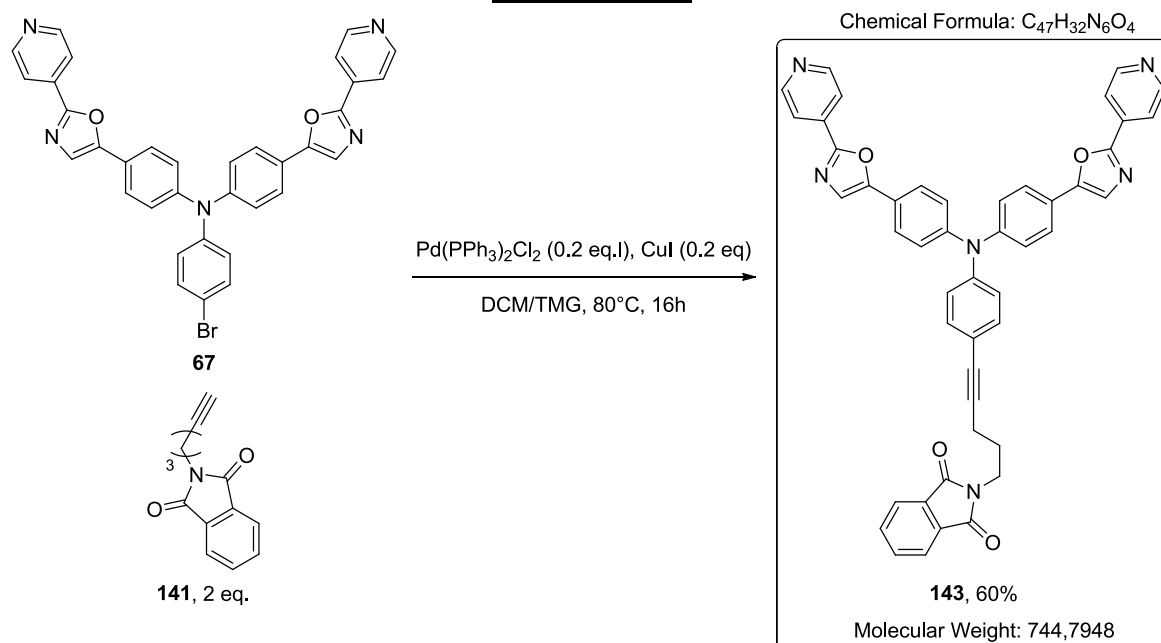
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (q, *J* = 5.4 Hz, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.71 (q, *J* = 5.4 Hz, *J* = 3.0 Hz, 2H), 3.80 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.27 (dt, *J* = 7.1 Hz, *J* = 2.6 Hz, 2H), 1.90-1.97 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 168.3 (2C), 133.9 (2C), 132.1 (2C), 123.2 (2C), 82.9 (1C), 69.0 (1C), 37.1 (1C), 27.2 (1C), 16.2 (1C).

IR (neat) ν cm⁻¹ 3266, 1762, 1699, 1439, 1396, 1354, 1120, 1017, 883, 667.

MS (ESI positive mode) *m/z* : 214 [M+H]⁺

2-(5-(4-(bis(4-(2-(pyridin-4-yl)oxazol-5-yl)phenyl)amino)phenyl)pent-1-yn-1-yl)isoindoline-1,3-dione (143)



250 mg of **67** (0.4mmol, 1 eq.) and 170 mg of **141** (0.8 mmol, 2 eq.) were added to a degassed solution of 2mL of TMG and 2mL of DCM in a sealed tube. Then, 60 mg of Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.08 mmol, 0.2 eq.) and 15 mg of CuI (0.08 mmol, 0.2 eq.) were added to the mixture solution and heated at 80°C during 16h. The reaction mixture was quenched with water and extracted with DCM. The organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude mixture was purified on column chromatography (silica gel, DCM/MeOH 99/1 to 90/10) to afford the desired product **143** with 60% as a yellow powder.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.75 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H), 7.92 (dd, *J* = 4.6, 1.6 Hz, 4H), 7.87 – 7.79 (m, 2H), 7.74 – 7.67 (m, 2H), 7.66 – 7.59 (m, 4H), 7.47 – 7.42 (m, 2H), 7.26 (dd, *J* = 6.0, 2.7 Hz, 2H), 7.21 – 7.12 (m, 4H), 7.06 – 6.99 (m, 2H), 3.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.51 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.09 – 1.95 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)

δ 168.5 (2C), 158.6 (2C), 152.4 (2C), 150.7 (4C), 147.6 (2C), 145.9 (1C), 134.3 (2C), 134.0 (2C), 133.0 (2C), 132.3 (2C), 125.8 (4C), 124.6 (2C), 124.3 (4C), 123.5 (2C), 123.3 (4C), 122.3 (2C), 119.8 (1C), 119.4 (2C), 88.9 (1C), 81.0 (1C), 37.4 (1C), 27.5 (1C), 17.4 (1C)

IR (neat) ν cm⁻¹

2980, 1708, 1599, 1494, 1395, 1320, 1280, 829, 709.

HRMS (ESI positive mode) m/z :

Calculated for [C₄₇H₃₂N₆O₄+H]²⁺ 745.2563, found 745.2556.

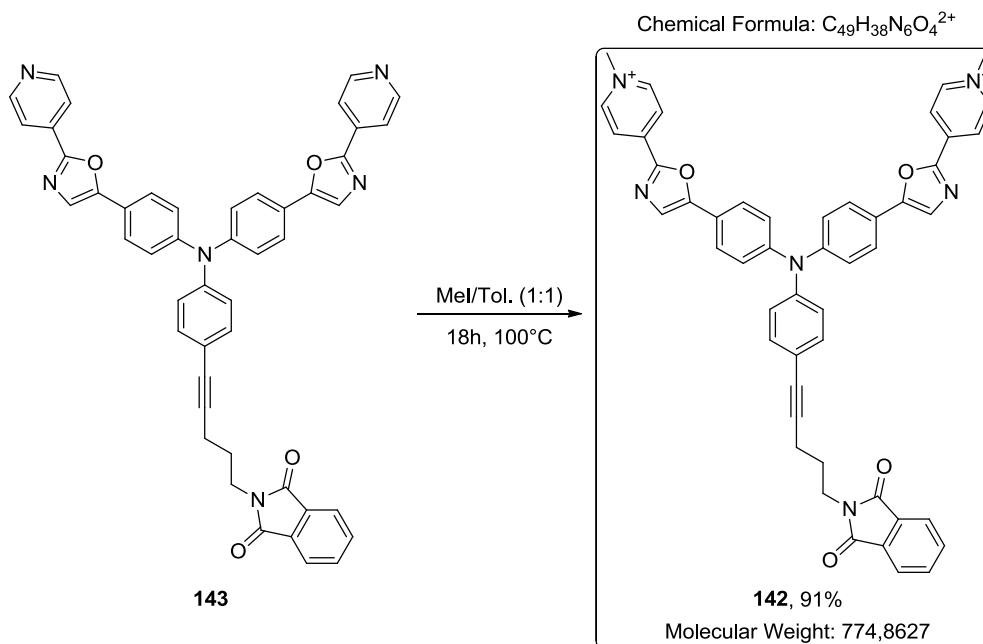
HPLC (Purity)

32.13 minutes (Purity 93 %)

λ_{exc} :

329/450 nm

4,4'-(5,5'-(((4-(5-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)pent-1-yn-1-yl)phenyl)azanediyl)bis(4,1-phenylene))bis(oxazole-5,2-diyl))bis(1-methylpyridin-1-ium) (142)



100 mg of **143** (0.134 mmol, 1 eq.) was dissolved in a mixture of 2 mL of MeI and 2 mL of Toluene at 110°C until completion monitored by HPLC. The crude mixture was concentrated under vacuum. The red precipitate was washed with toluene and concentrated under vacuum three times. The product **142** was obtained with 91% yield as a red powder and used immediately.

1H NMR (300 MHz, DMSO)

δ 9.09 (s, 4H), 8.64 (s, 4H), 8.15 (s, 2H), 7.97 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H), 7.83 (d, $J = 4.9$ Hz, 4H), 7.28 – 7.13 (m, 6H), 7.02 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.38 (s, 6H), 3.74 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 1.98 – 1.81 (m, 2H). (1 signal of 2H overlapping with DMSO)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO)

δ 168.0 (2C), 155.3 (2C), 154.1 (4C), 147.4 (2C), 146.4 (4C), 145.2 (1C), 139.1 (2C), 134.2 (4C), 132.6 (2C), 131.7 (2C), 126.6 (2C), 126.0 (2C), 124.5 (2C), 123.9 (2C), 122.9 (4C), 122.6 (4C), 121.1 (2C), 118.6 (1C), 89.8 (2C), 47.7 (2C), 36.9 (1C), 26.6 (1C), 16.6 (1C)

IR (neat) ν cm^{-1}

3351, 2257, 1647, 4023, 991, 825, 762.

HRMS (ESI positive mode) m/z :

Calculated for $[C_{49}H_{38}N_6O_4+H]^{2+}$ 387.1477, found 387.1473.

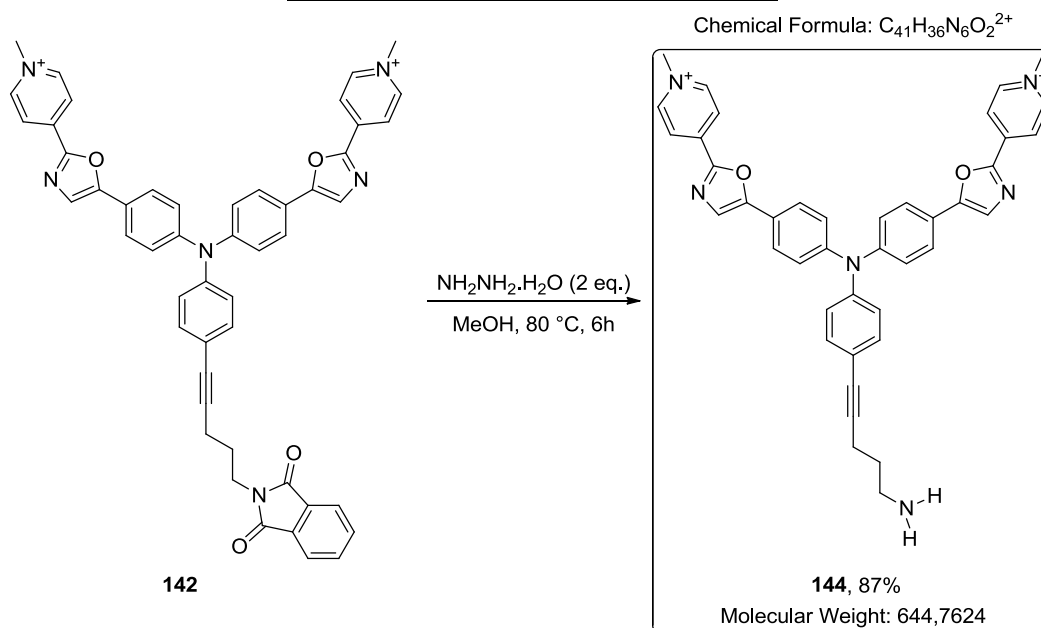
HPLC (Purity)

30.07 minutes (purity 98 %)

λ_{exc} :

332/460 nm.

4,4'-(5,5'-(((4-(5-aminopent-1-yn-1-yl)phenyl)azanediyl)bis(4,1-phenylene))bis(oxazole-5,2-diyl))bis(1-methylpyridin-1-ium) (144)



125 mg of **142** (0.122 mmol, 1 eq.) and 12 μL of Hydrazine (0.244 mmol, 2 eq.) was added in 2 mL of MeOH and stirred at 80 $^\circ\text{C}$ until completion monitored by HPLC. The resulting crude was concentrated under vacuum and purified by reversed phase chromatography on HPLC to afford the desired product **144** with 87% yield as a red powder.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3CN)

δ 8.67 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H), 8.47 (d, $J = 7.0$ Hz, 4H), 7.83 (d, $J = 9.5$ Hz, 6H), 7.41 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.29 (s, 6H), 3.11 (s, 2H), 2.54 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.71 (dt, $J = 5.0, 2.5$ Hz, 2H).

IR (neat) ν cm^{-1}

2925, 1680, 1483, 1204, 1131, 832, 752.

HRMS (ESI positive mode) m/z :

Calculated for $[\text{C}_{41}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_2]^{2+}$ 322.1450, found 322.1453 (Relative abundance 40%).

Calculated for $[\text{C}_{41}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_2+2\text{H}]^{2+}$ 324.1600, found 324.1606 (Relative abundance 100%).

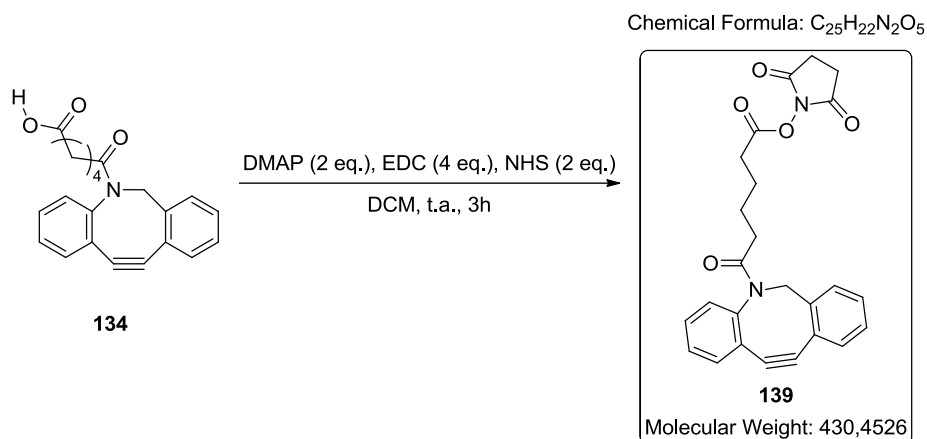
HPLC (Purity)

24.32 minutes (Purity 98 %)

λ_{exc} :

330/458 nm

DBCO-NHS (139)



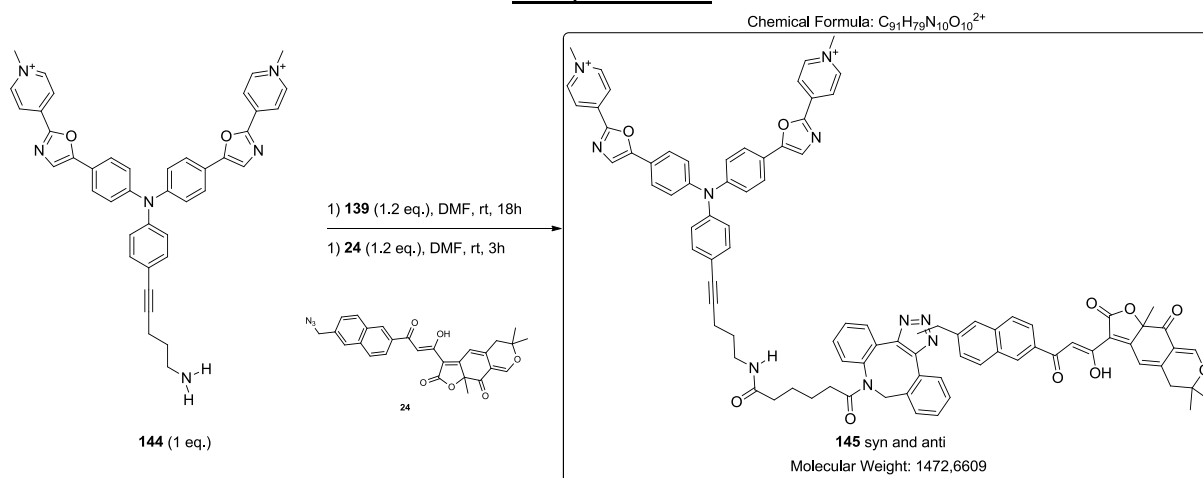
10 mg of **134** (0.032 mmol, 1 eq.), 20 mg of EDC (0.128 mmol, 4 eq.), 8 mg of DMAP (0.064 mmol, 2 eq.), 8 mg of NHS (0.064 mmol, 2 eq.) were added in 320 μ L of DCM at room temperature until completion monitored by HPLC. The resulting mixture was washed with water and extracted with DCM. The organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford a crude mixture without further purification and was used immediately.

MS (ESI positive mode) m/z : 471 [M + MeCN+H]⁺

5.2.3.2.SPAAC STEP

(Compounds of chapter 2.3.3.2.3.2, page 175)

Compound **145**

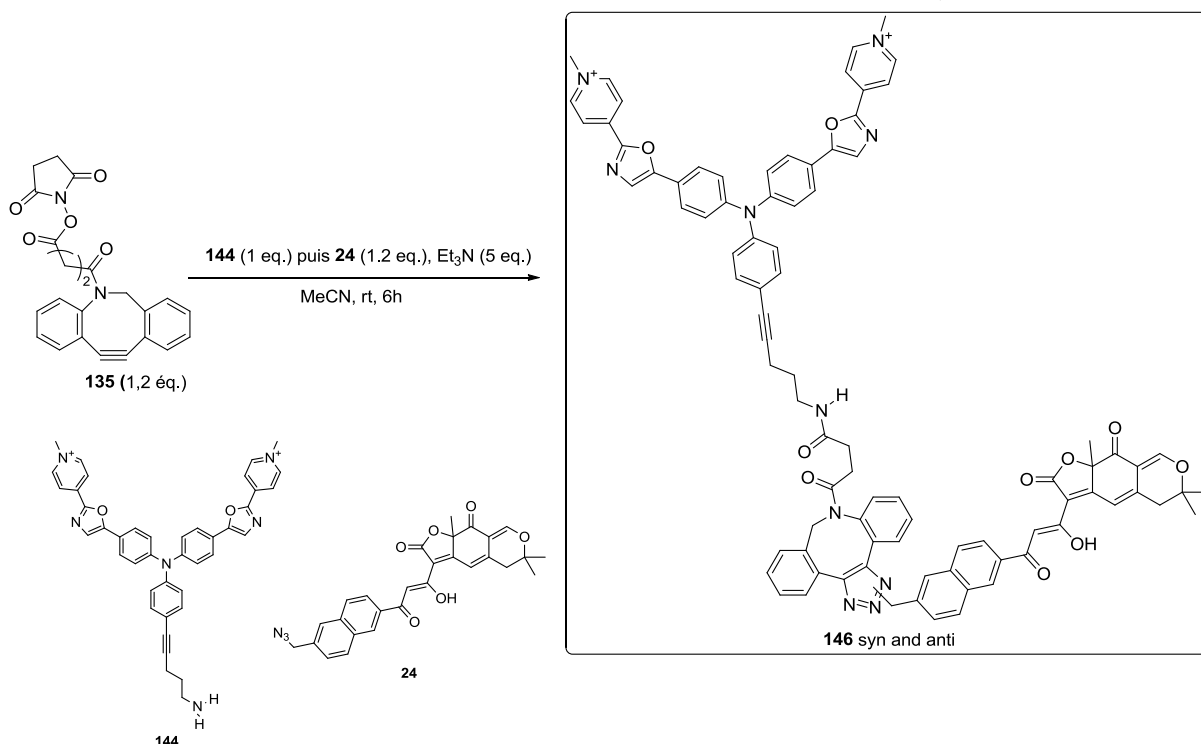


13 mg of **144** (0.02mmol, 0.8 eq.) was added to the previous crude mixture in 500 μ L of DMF at room temperature. The reaction was stirred until completion (monitored by HPLC) to afford the compound **140** without further purification and was used immediately. 10mg of **24** (0.032 mmol, 1.2 eq.) was added to the crude mixture and stirred at room temperature. The reaction was monitored by HPLC until completion. The resulting mixture was washed with water and extracted with DCM. The desired product was observed by HPLC and mass spectrometry without further purification.

Compound	140	145
MS (ESI positive mode) m/z :	480 [M+H] ⁺ , 1072 [M+TFA] ⁺	729 [M+H] ²⁺

Dye 146

Chemical Formula: $C_{89}H_{75}N_{10}O_{10}^{2+}$
Exact Mass: 1443,5657



30 mg of **144** (0.0465 mmol, 1 eq.), 32 μ L of Et_3N (0.23 mmol, 5 eq.) and 20 mg of **135** (0.056 mmol, 1.2 eq.) were added in 500 μ L of MeCN at room temperature. The reaction was stirred until completion (monitored by HPLC) and 10 mg of **24** (0.032 mmol, 1.2 eq.) was added to the crude mixture and stirred at room temperature. The reaction was monitored by HPLC until completion. The resulting mixture was concentrated under vacuum and purified by HPLC to afford the desired product **146** as a red powder.

HPLC (Purity)

33.65 minutes and 33.94 minutes (Purity 99 %)

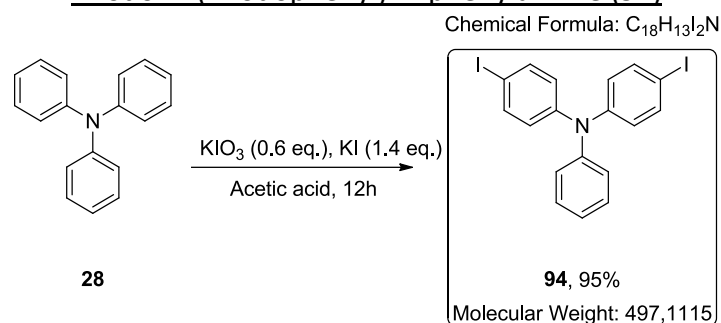
HRMS (ESI positive mode) m/z :

Calculated for $[C_{89}H_{75}N_{10}O_{10}]^{2+}$ 714.2727, found 714.2720.

5.2.4. NEW LIGAND SYNTHESIS

(Compound of chapter 2.2.2.3, page 149)

4-iodo-N-(4-iodophenyl)-N-phenylaniline (94)



5 g of **28** (20 mmol, 1 eq.), 4,32 g of KI (26 mmol, 1.33 eq.) and 2,82 g of KIO₃ (13.2 mmol, 0.67 eq.) were dissolved in 15 mL of glacial acetic acid. The mixture was stirred at 90°C during 12h. The resulting mixture was precipitated in water and a dirty white solid was obtained and purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 100/0 to 80/20) to afford the desired production **94** with 95% yield as a white powder.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.63 – 7.42 (m, 4H), 7.26 (qd, *J* = 7.5, 4.8 Hz, 2H), 7.11 – 7.02 (m, 3H), 6.85 – 6.78 (m, 4H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 147.2 (1C), 146.8 (2C), 138.3 (4C), 129.6 (2C), 125.8 (2C), 124.9 (2C), 124.0 (4C), 85.8 (2C)

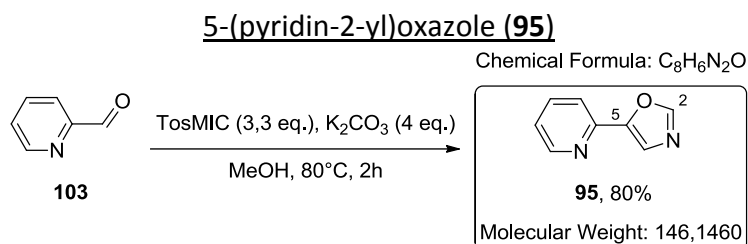
MS (ESI positive mode) m/z : 498 [M + H]⁺ (relative abundance 100)

5.2.4.1. SYNTHESIS OF OXAZOLE IN POSITION 5

(Compounds of chapter 2.2.2.3.1.1, page 150)

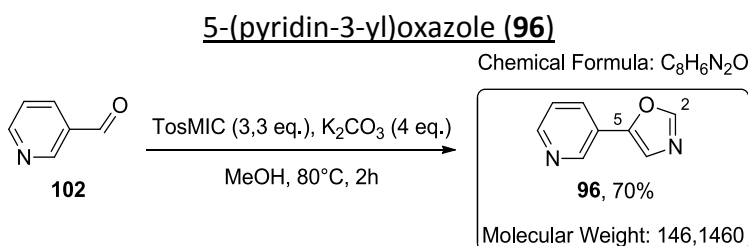
General procedure A for the synthesis of Oxazole in position 5:

A mixture of aldehyde (1 eq.), TosMIC (3.3 eq.), K₂CO₃ (4 eq.) in methanol (1M) was stirred for 2 h at 80°C. The reaction mixture was concentrated to dryness and the resulting residue was diluted with DCM. The organic layer was washed with water, brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was dissolved in a minimal amount of dichloromethane and a large quantity of pentane was added. The pure title products were obtained as a yellow foam.



Following the procedure A, the desired product **95** was obtained as a white solid with 80% yields.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 8.64 (ddd, <i>J</i> = 4.8, 1.7, 1.0 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.76 (tt, <i>J</i> = 5.0, 2.5 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.68 – 7.63 (m, 1H), 7.24 (ddd, <i>J</i> = 7.5, 4.8, 1.0 Hz, 1H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 151.3 (1C), 151.2 (1C), 150.1 (1C), 147.3 (1C), 137.0 (1C), 125.0 (1C), 123.2 (1C), 119.5 (1C).
MS (ESI positive mode) m/z :	146 [M+H] ⁺



Following the procedure A, the desired product **96** was obtained as a white solid with 70% yields.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 8.94 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 1H), 8.58 (dd, <i>J</i> = 4.8, 1.5 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.96 – 7.89 (m, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.36 (ddd, <i>J</i> = 8.0, 4.9, 0.8 Hz, 1H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 151.2 (1C), 149.7 (1C), 148.9 (1C), 145.9 (1C), 131.6 (1C), 124.1 (1C), 123.8 (1C), 122.9 (1C)
IR (neat) ν cm⁻¹	3095, 1562, 1498, 1427, 1465, 1317, 1104, 1018, 938, 809, 701, 636, 623.
MS (ESI positive mode) m/z :	146 [M+H] ⁺

5.2.4.2. SYNTHESIS OF OXAZOLE IN POSITION 2

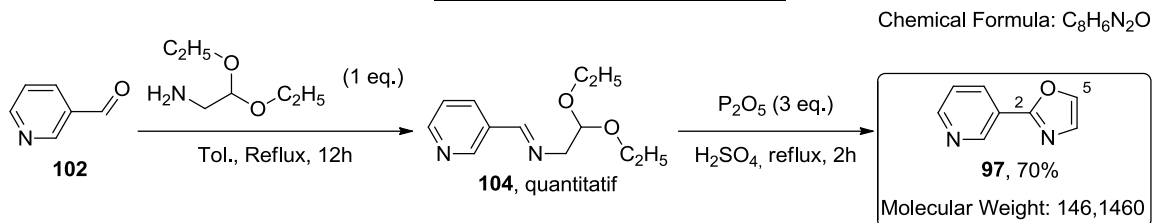
(Compounds of chapter 2.2.2.3.1.2, page 150)

General procedure B for the synthesis of Oxazole in position 2:

Aldehyde (1 eq.) and 2,2-diethoxyethanamine (1 eq.) were added in 250 mL of toluene. The reaction mixture was heated to 110°C and stirred at this temperature during 12h. The crude mixture was concentrated under vacuum to afford the desired product without further purification as a yellow oil which was immediately used.

The previous crude mixture was added portion wise at 0°C to concentrated H₂SO₄ (0.7M), until the full dissolution of the crude mixture (First solution, named A). In other round bottom flask, P₂O₅ (3 eq.) was added portion wise at 0°C to concentrated H₂SO₄ (0.7M) until the full dissolution of P₂O₅ (Second solution, named B). The solution A was added dropwise to the solution B at 0°C. The resulting mixture was stirred at 0°C during 30 minutes and then heated at 100°C during 2h. The reaction mixture was poured on crushed ice, neutralized with solid K₂CO₃ and extracted with DCM. The organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. The resulting crude was purified on silica gel (cyclohexane/ethylacetate 80/20 to 50/50) to afford the desired products as a white powder.

2-(pyridin-3-yl)oxazole (97)



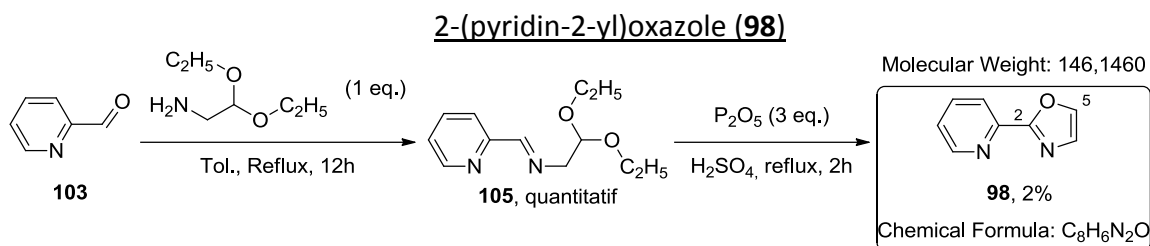
Following the procedure B, the desired products **97** was obtained with 70% as a white solid.

Compound 104

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 8.87 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 1H), 8.64 (dd, <i>J</i> = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.10 (dt, <i>J</i> = 7.9, 1.9 Hz, 1H), 7.34 (dd, <i>J</i> = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 4.81 (t, <i>J</i> = 5.3 Hz, 1H), 3.80 (dd, <i>J</i> = 5.3, 1.3 Hz, 2H), 3.77 – 3.68 (m, 2H), 3.58 (dq, <i>J</i> = 9.4, 7.0 Hz, 2H), 1.20 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 6H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 160.6 (1C), 151.7 (1C), 150.4 (1C), 134.7 (1C), 131.8 (1C), 123.7 (1C), 102.0 (1C), 64.8 (1C), 62.8 (2C), 15.4 (2C).

Compound 97

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 9.23 (s, 1H), 8.63 (dd, <i>J</i> = 4.1, 2.4 Hz, 1H), 8.30 – 8.21 (m, 1H), 7.72 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H), 7.39 – 7.29 (m, 1H), 7.23 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, 1H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 151.1 (1C), 147.7 (1C), 139.3 (1C), 133.5 (1C), 128.8 (1C), 123.6 (1C).
IR (neat) ν cm⁻¹	2972, 1580, 1434, 1265, 1089, 1047, 880, 724, 698.
MS (ESI positive mode) m/z :	146 [M+H] ⁺



Following the procedure B, the desired product **98** was obtained with 2% as a white solid.

Compound 105

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.64 (ddd, *J* = 4.8, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.98 (dt, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 1H), 7.73 (ddd, *J* = 7.5, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 7.30 (ddd, *J* = 7.5, 4.9, 1.2 Hz, 1H), 4.83 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 3.83 (dt, *J* = 10.1, 5.1 Hz, 2H), 3.79 – 3.66 (m, 2H), 3.64 – 3.52 (m, 2H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 7H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 164.3 (1C), 154.6 (1C), 149.5 (1C), 136.6 (1C), 124.9 (1C), 121.5 (1C), 101.9 (1C), 64.3 (1C), 62.5 (2C), 15.5 (2C)

Compound 98

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.69 (dd, *J* = 4.8, 0.8 Hz, 1H), 8.11 (dd, *J* = 8.0, 0.7 Hz, 1H), 7.83 – 7.73 (m, 2H), 7.37 – 7.29 (m, 1H), 7.28 (s, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 150.0 (1C), 139.8 (1C), 137.0 (1C), 128.8 (1C), 124.7 (1C), 122.1 (1C).

IR (neat) ν cm⁻¹ 3001, 1680, 1589, 1460, 1368, 1185, 996, 916, 795, 743, 713.

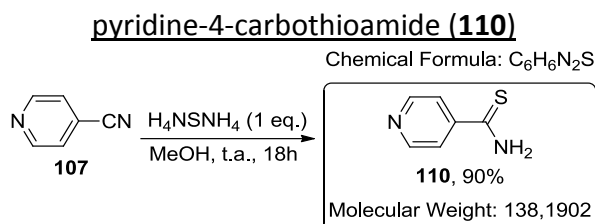
MS (ESI positive mode) m/z : 146 [M+H]⁺

5.2.4.3. SYNTHESIS OF THIOAMIDE

(Compounds of chapter 2.2.2.3.1.3, page 151)

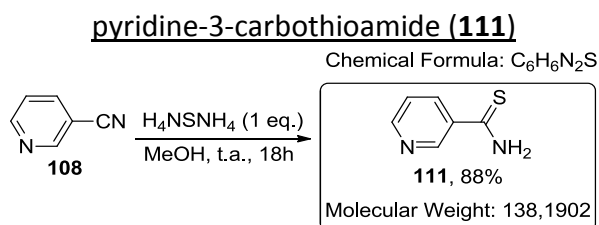
General procedure C for the synthesis of thioamide:

A solution of nitrile (1 eq.) and (NH₄)₂S (1 eq.) in MeOH (0.5M) was stirred at room temperature for 18 h. The resulting mixture was washed with water and extracted with EtOAc. The organic layers were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude mixture was filtered on silica gel (EtOAc 100 %) to afford the desired products as a yellow solid.



Following the procedure C, the desired product **110** with 90% yield as a yellow solid.

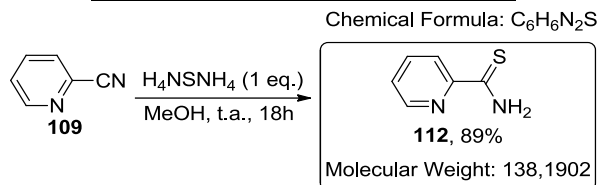
¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.66 (dd, *J* = 4.4, 1.7 Hz, 2H), 7.70 (dd, *J* = 4.4, 1.7 Hz, 2H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 149.6 (2C), 120.7 (2C) (2C are missing)
IR (neat) v cm⁻¹ 2924, 1673, 1597, 1412, 1306, 1149, 997, 923, 831, 724, 532.
MS (ESI positive mode) m/z : 139 [M+H]⁺



Following the procedure C, the desired product **111** with 88% yield as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.07 (s, 1H), 9.71 (s, 1H), 9.00 (dd, *J* = 2.4, 0.8 Hz, 1H), 8.66 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.19 (ddd, *J* = 8.0, 2.4, 1.7 Hz, 1H), 7.45 (ddd, *J* = 8.0, 4.8, 0.8 Hz, 1H).
¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 197.8 (1C), 151.5 (1C), 147.5 (1C), 135.1 (1C), 134.8 (1C), 122.9 (1C).
IR (neat) v cm⁻¹ 2959, 1674, 1586, 1454, 1395, 1310, 1183, 1149, 1025, 910, 806, 734, 696, 628.
MS (ESI positive mode) m/z : 139 [M+H]⁺

pyridine-2-carbothioamide (112)



Following the procedure C, the desired product **112** with 89% yield as a yellow solid.

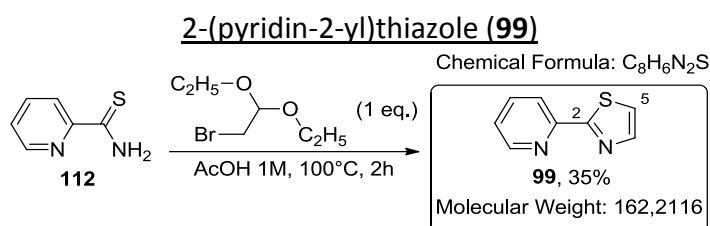
¹H NMR (300 MHz, DMSO)	δ 10.15 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.59 (ddd, <i>J</i> = 4.7, 1.8, 0.9 Hz, 1H), 8.51 (dt, <i>J</i> = 8.0, 1.1 Hz, 1H), 8.02 – 7.91 (m, 1H), 7.59 (ddd, <i>J</i> = 7.6, 4.7, 1.2 Hz, 1H).
¹³C NMR (75 MHz, DMSO)	δ 195.1 (1C), 152.2 (1C), 148.0 (1C), 137.8 (1C), 126.7 (1C), 125.0 (1C).
IR (neat) ν cm⁻¹	3140, 1599, 1579, 1433, 1304, 1255, 1144, 1089, 993, 899, 795, 725, 667.
MS (ESI positive mode) m/z :	162 [M+H+Na] ⁺

5.2.4.4. SYNTHESIS OF THIAZOLE

(Compounds of chapter 2.2.2.3.1.3, page 151)

General procedure D for the synthesis of Thiazole:

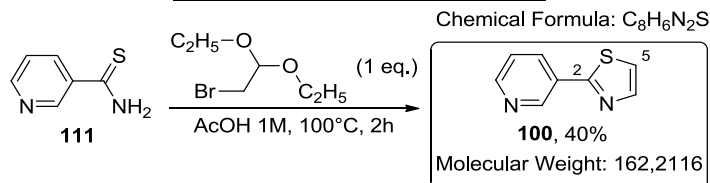
A solution of thioamide (1 eq.) and 2-bromo-1,1-diethoxyethane (1 eq.) in acetic acid (1M) was stirred at 100°C for 16 h. The residue was washed with saturated NaHCO₃ and was extracted with EtOAc. The organic layers were dried and concentrated under vacuum. The crude mixture was purified by chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc, 100/0 to 70/30) to afford the desired products as a yellow powder.



Following the procedure D, the desired product **99** with 35% yield as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 8.61 (dd, <i>J</i> = 4.8, 0.8 Hz, 1H), 8.19 (dd, <i>J</i> = 7.9, 0.9 Hz, 1H), 7.97 – 7.86 (m, 1H), 7.85 – 7.74 (m, 1H), 7.43 (dd, <i>J</i> = 3.2, 1.2 Hz, 1H), 7.31 (dd, <i>J</i> = 6.8, 5.6 Hz, 1H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 169.4 (1C), 151.5 (1C), 149.6 (1C), 144.1 (1C), 137.2 (1C), 124.59, 121.51, 119.7 (1C).
IR (neat) ν cm⁻¹	3100, 1581, 1462, 1315, 1276, 996, 843, 779, 727, 709, 834, 618.
MS (ESI positive mode) m/z :	163 [M+H] ⁺

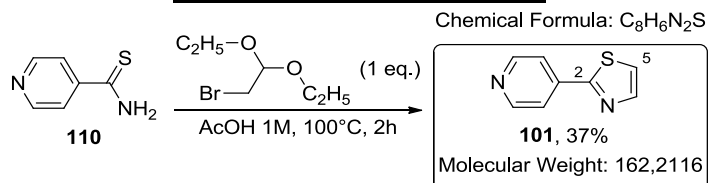
2-(pyridin-3-yl)thiazole (**100**)



Following the procedure D, the desired product **100** with 40% yield as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 9.18 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 8.68 – 8.59 (m, 1H), 8.28 – 8.16 (m, 1H), 7.92 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1H), 7.44 – 7.29 (m, 2H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 165.0 (1C), 150.9 (1C), 147.9 (1C), 144.2 (1C), 133.7 (1C), 129.7 (1C), 123.8 (1C), 119.7 (1C).
IR (neat) ν cm⁻¹	3075, 1569, 1498, 1466, 1420, 1332, 1310, 1254, 1146, 1045, 967, 873, 816, 760, 733, 701, 636, 614.
MS (ESI positive mode) m/z :	163 [M+H] ⁺

2-(pyridin-4-yl)thiazole (**101**)



Following the procedure D, the desired product **101** with 37% yield as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 8.68 (d, <i>J</i> = 4.9 Hz, 1H), 7.92 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 1H), 7.79 (d, <i>J</i> = 4.9 Hz, 1H), 7.42 (dd, <i>J</i> = 9.9, 9.1 Hz, 1H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 165.5 (1C), 150.7 (2C), 144.5 (1C), 140.3 (1C), 120.8 (2C), 120.4 (1C).
IR (neat) ν cm⁻¹	2926, 2097, 1751, 1591, 1256, 985, 821, 747, 695, 634.
MS (ESI positive mode) m/z :	163 [M+H] ⁺

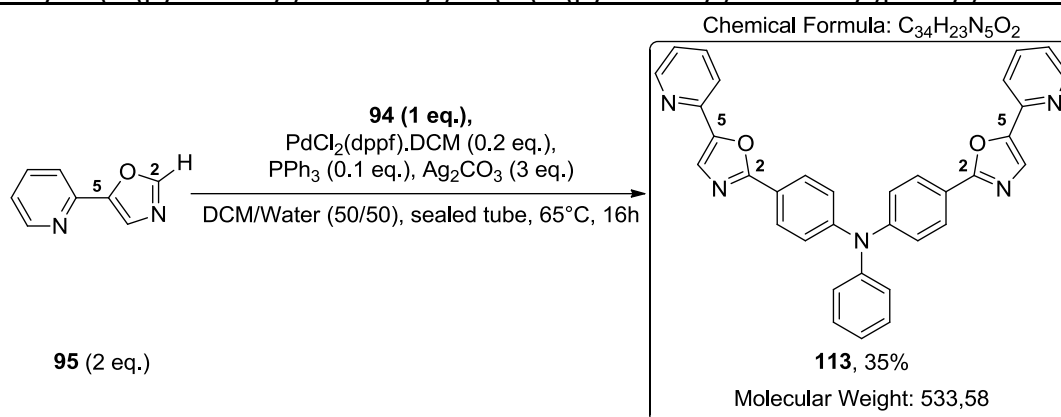
5.2.4.5. "ON WATER" C-H ACTIVATION STEP

(Compounds of chapter 2.2.2.3.2, page 153)

General procedure E for the C-H activation step:

66a (1 eq.), Thiazole/oxazole-pyridine (2 eq.), PPh₃ (0.2 eq.), Pd(dppf)Cl₂.DCM (0.1 eq.) and Ag₂CO₃ (3 eq.) were introduced in a sealed tube. DCM and water (0.5M 1/1) were added in the sealed tube and heated to 65°C during 18h. The resulting crude was washed with NaOH 1M and extracted with DCM. The organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The resulting crude was purified on column chromatography (silica gel DCM/MeOH 100/0 to 90/10) to afford the desired products as a yellow powder.

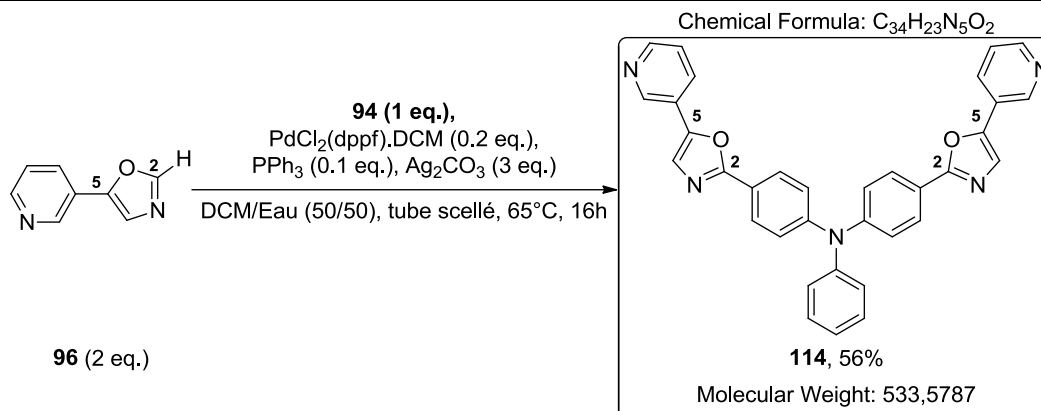
N-phenyl-4-(5-(pyridin-2-yl)oxazol-2-yl)-N-(4-(5-(pyridin-2-yl)oxazol-2-yl)phenyl)aniline (**113**)



Following the procedure E, the desired product **113** with 35% yield as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 8.98 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz, 2H), 8.57 (dd, <i>J</i> = 4.8, 1.4 Hz, 2H), 7.99 (dd, <i>J</i> = 12.5, 5.5 Hz, 6H), 7.52 (s, 2H), 7.37 (dd, <i>J</i> = 9.6, 6.6 Hz, 5H), 7.21 (dd, <i>J</i> = 8.4, 2.0 Hz, 6H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 162.0 (2C), 149.4 (2C), 149.3 (2C), 148.2 (2C), 146.45 (1C), 145.6 (2C), 131.2 (2C), 129.9 (2C), 127.8 (4C), 126.2 (2C), 125.1 (1C), 124.9 (2C), 124.5 (2C), 123.8 (2C), 123.5 (4C), 121.5 (2C)
IR (neat) ν cm⁻¹	3250, 2253, 1004, 942, 822, 760.
HRMS (ESI positive mode) m/z :	Calculated for [C ₃₄ H ₂₃ N ₅ O ₂ +H] ⁺ 534,1925 found 534.1948.
HPLC (Purity)	28.47 minutes (purity 99 %)
λ_{exc} :	293/402 nm

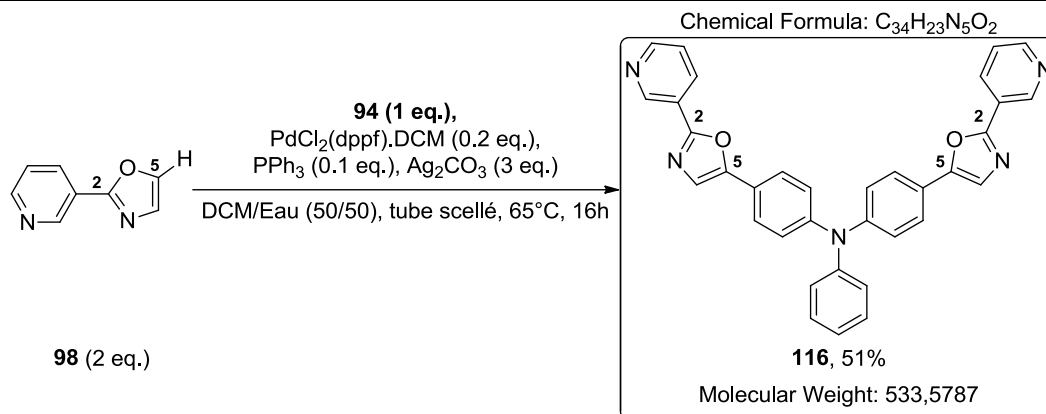
N-phenyl-4-(5-(pyridin-3-yl)oxazol-2-yl)-N-(4-(5-(pyridin-3-yl)oxazol-2-yl)phenyl)aniline (**114**)



Following the procedure E, the desired product **114** with 56% yield as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 8.68 – 8.61 (m, 2H), 8.08 – 8.00 (m, 4H), 7.80 (s, 2H), 7.74 (ddd, <i>J</i> = 7.8, 6.9, 1.3 Hz, 4H), 7.36 (dd, <i>J</i> = 8.5, 7.1 Hz, 2H), 7.26 – 7.17 (m, 9H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 162.0 (2C), 150.6 (2C), 150.1 (2C), 149.4 (2C), 147.6 (2C), 146.5 (1C), 137.0 (2C), 129.9 (2C), 127.9 (4C), 127.1 (2C), 126.2 (2C), 125.0 (1C), 123.5 (4C), 122.8 (2C), 121.6 (2C), 119.2 (2C)
IR (neat) ν cm⁻¹	2928, 1592, 1480, 1412, 1315, 1275, 1131, 1101, 1078, 987, 955, 843, 778, 738, 695.
HRMS (ESI positive mode) <i>m/z</i>	Calculated for [C ₃₄ H ₂₃ N ₅ O ₂ +H] ⁺ 534,1925 found 534.1915.
HPLC (Purity)	33.77 minutes (purity 99 %)
λ_{exc}	308/399 nm

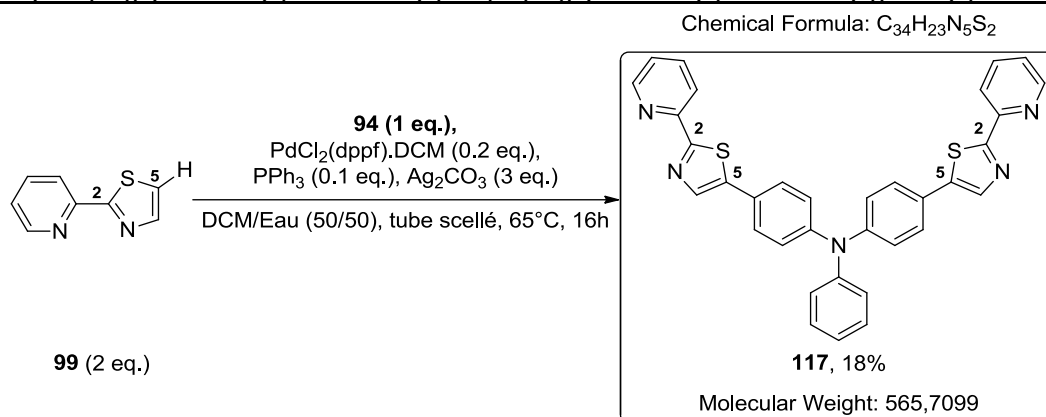
N-phenyl-4-(2-(pyridin-3-yl)oxazol-5-yl)-N-(4-(2-(pyridin-3-yl)oxazol-5-yl)phenyl)aniline (**116**)



Following the procedure E, the desired product **116** with 51% yield as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 9.32 (s, 2H), 8.68 (d, <i>J</i> = 3.8 Hz, 2H), 8.40 – 8.29 (m, 2H), 7.62 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 4H), 7.45 – 7.37 (m, 4H), 7.32 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 7.21 – 7.14 (m, 7H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 158.4 (2C), 152.0 (2C), 150.9 (2C), 147.8 (2C), 147.5 (2C), 146.7 (2C), 133.4 (2C), 129.8 (2C), 125.6 (4C), 125.5 (2C), 124.5 (2C), 124.0 (4C), 123.7 (2C), 122.9 (2C), 122.1 (2C)
IR (neat) ν cm⁻¹	2922, 1585, 1489, 1409, 1318, 1272, 1182, 1116, 814, 718, 698.
HRMS (ESI positive mode) <i>m/z</i>	Calculated for [C ₃₄ H ₂₃ N ₅ O ₂ +H] ⁺ 534,1925 found 534.1949.
HPLC (Purity)	31.33 minutes (purity 98 %)
λ_{exc} :	297/390 nm

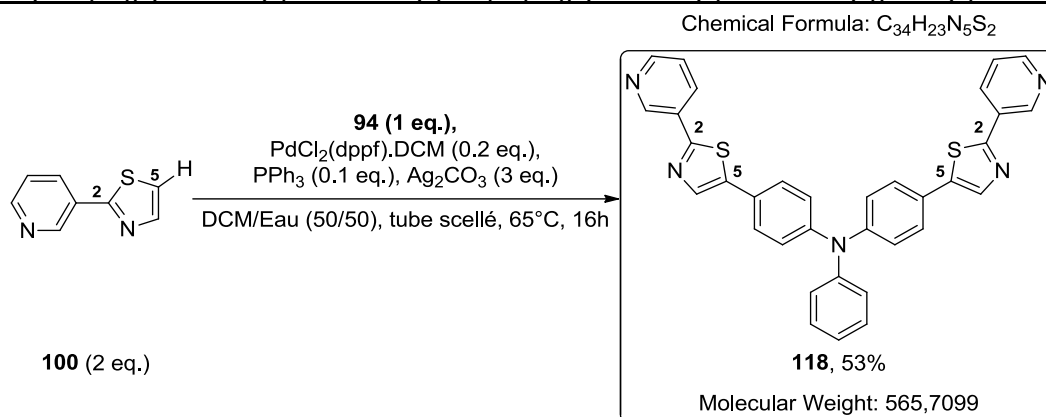
N-phenyl-4-(2-(pyridin-2-yl)thiazol-5-yl)-N-(4-(2-(pyridin-2-yl)thiazol-5-yl)phenyl)aniline (117**)**



Following the procedure E, the desired product **117** with 18% yield as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 8.62 (ddd, <i>J</i> = 4.8, 1.6, 0.9 Hz, 2H), 8.18 (dd, <i>J</i> = 4.9, 4.0 Hz, 2H), 8.07 – 7.95 (m, 2H), 7.80 (td, <i>J</i> = 7.8, 1.7 Hz, 2H), 7.58 – 7.49 (m, 4H), 7.37 – 7.27 (m, 4H), 7.26 (s, 2H), 7.21 – 7.11 (m, 7H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 149.6 (2C), 147.7 (2C), 139.1 (2C), 137.1 (4C), 129.7 (2C), 127.8 (4C), 125.9 (6C), 125.5 (2C), 124.4 (2C), 124.1 (4C), 119.5 (2C). (2C are missing)
IR (neat) ν cm⁻¹	2972, 1581, 1466, 1432, 1327, 1272, 998, 830, 779, 628.
HRMS (ESI positive mode) <i>m/z</i>	Calculated for [C ₃₄ H ₂₃ N ₅ S ₂] ⁺ 566.1473, found 566.1469.
HPLC (Purity)	39.48 minutes (purity 94 %)
λ_{exc}	299/401 nm

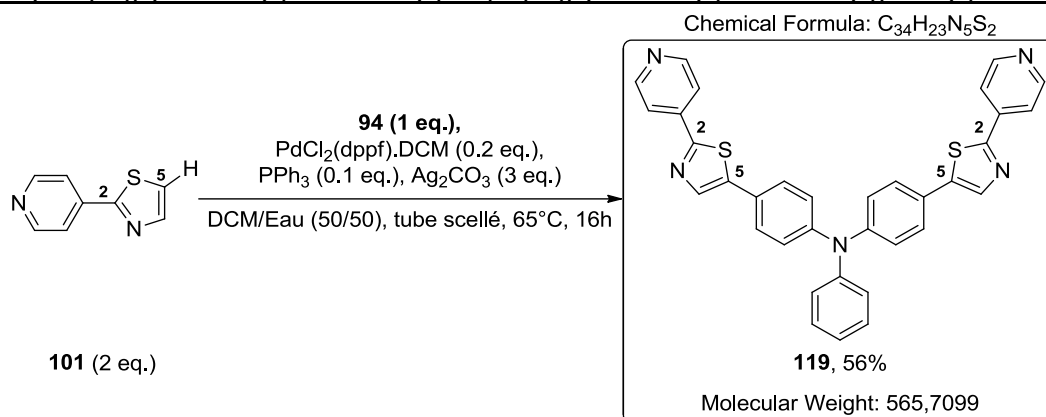
N-phenyl-4-(2-(pyridin-3-yl)thiazol-5-yl)-N-(4-(2-(pyridin-3-yl)thiazol-5-yl)phenyl)aniline (118)



Following the procedure E, the desired product **118** with 53% yield as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)	δ 9.18 (s, 2H), 8.65 (d, <i>J</i> = 4.2 Hz, 2H), 8.25 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 8.00 (s, 2H), 7.51 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 4H), 7.44 – 7.35 (m, 2H), 7.32 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H), 7.17 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 7H).
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)	δ 150.7 (2C), 147.8 (2C), 147.7 (2C), 146.7 (2C), 140.2 (2C), 139.0 (2C), 133.4 (2C), 129.8 (2C), 127.9 (4C), 125.5 (2C), 125.4 (2C), 124.4 (2C), 124.1 (4C), 123.9 (2C). (2C are missing)
IR (neat) ν cm⁻¹	2973, 1592, 1528, 1474, 1415, 1322, 1273, 1152, 976, 831, 802, 759, 697.
HRMS (ESI positive mode) <i>m/z</i>	Calculated for [C ₃₄ H ₂₃ N ₅ S ₂] ⁺ 566.1473, found 566.1471.
HPLC (Purity)	33.47 minutes (purity 99 %)
λ_{exc}	302/411 nm

N-phenyl-4-(2-(pyridin-4-yl)thiazol-5-yl)-N-(4-(2-(pyridin-4-yl)thiazol-5-yl)phenyl)aniline (119)



Following the procedure E, the desired product **118** with 53% yield as a yellow solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.71 (s, 4H), 8.04 (s, 2H), 7.81 (d, *J* = 4.6 Hz, 4H), 7.51 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 7.34 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.17 (t, *J* = 7.3 Hz, 7H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)

δ 163.3 (2C), 150.8 (2C), 148.0 (2C), 146.6 (2C), 141.3 (2C), 140.5 (1C), 139.4 (4C), 129.8 (4C), 128.02 (4C), 125.6 (2C), 125.2 (2C), 124.6 (1C), 124.1 (4C), 120.1 (2C), 2972, 1588, 1482, 1416, 1325, 1087, 1046, 814, 697.

IR (neat) ν cm⁻¹

HRMS (ESI positive mode) *m/z* :

Calculated for [C₃₄H₂₃N₅S₂]⁺ 566.1473, found 566.1473.

HPLC (Purity)

29.82 minutes (purity 95 %)

λ_{exc} :

323/468 nm

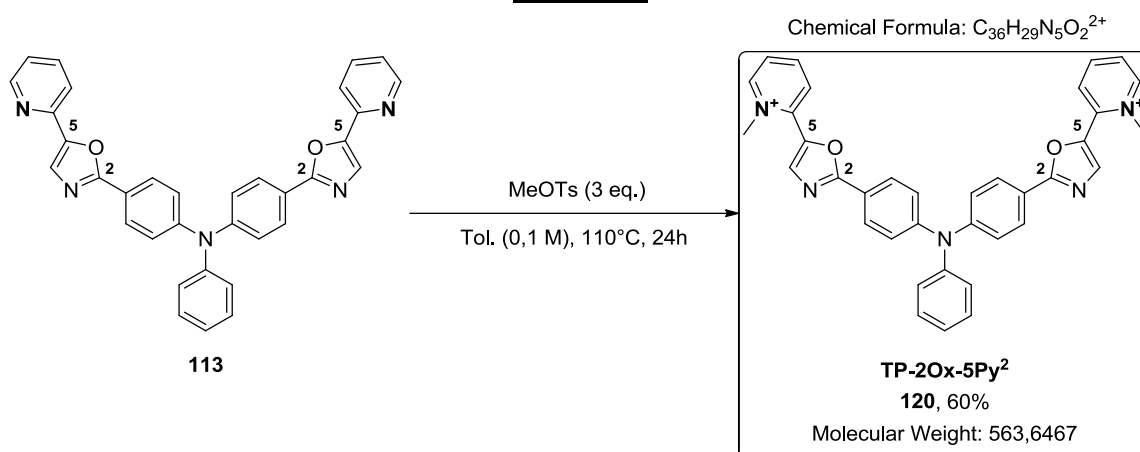
5.2.4.6. METHYLATION STEP OF ISOMERE IN POSITION 5

(Compounds of chapter 2.2.2.3.3.1, page 154)

General procedure F for the methylation of isomere 5:

A suspension of compound ligand (1 eq.) and methyl tosylate (4.5 eq.) in toluene (0.1M) was stirred for 12 h at reflux. After cooling down to room temperature, the reaction mixture was washed with toluene and diethyl ether to afford the desired salts as a red solid.

2,2'-(2,2'-((phenylazanediy)bis(4,1-phenylene))bis(oxazole-5,2-diyl))bis(1-methylpyridin-1-ium) (120)



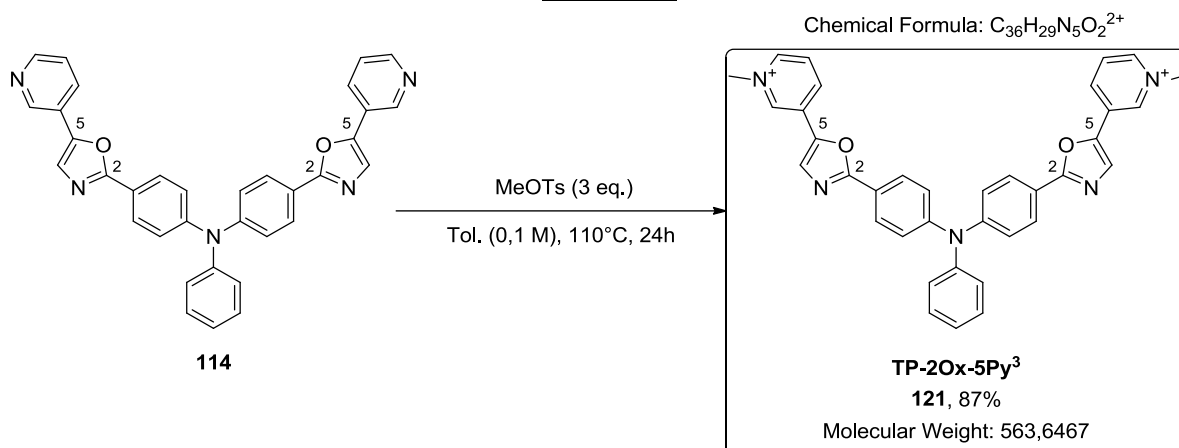
Following the procedure F, the desired product **120** was obtained with 60% yield as a red powder.

HRMS (ESI positive mode) m/z : Calculated for $[C_{36}H_{29}N_5O_2]^+$ 563.2310, found 563.2278.

HPLC (Purity) 29.60 minutes (purity 99 %)

λ_{exc} : 314/422 nm

3,3'-(2,2'-((phenylazanediy)bis(4,1-phenylene))bis(oxazole-5,2-diyl))bis(1-methylpyridin-1-ium) (121)



Following the procedure F, the desired product **121** was obtained with 87% yield as a red powder.

¹H NMR (300 MHz, D₂O)

δ 8.96 (s, 2H), 8.59 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 8.36 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.96 – 7.83 (m, 2H), 7.59 (s, 2H), 7.49 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.09 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 6.96 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 6.76 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H), 4.28 (s, 6H).

IR (neat) ν cm⁻¹

3001, 2097, 1751, 1578, 1262, 1150, 813, 960.

HRMS (ESI positive mode) m/z :

Calculated for $[C_{36}H_{29}N_5O_2+H]^{2+}$ 281.6161, found 281.6161.

HPLC (Purity)

26.07 minutes (purity 99 %)

λ_{exc} :

295/406 nm

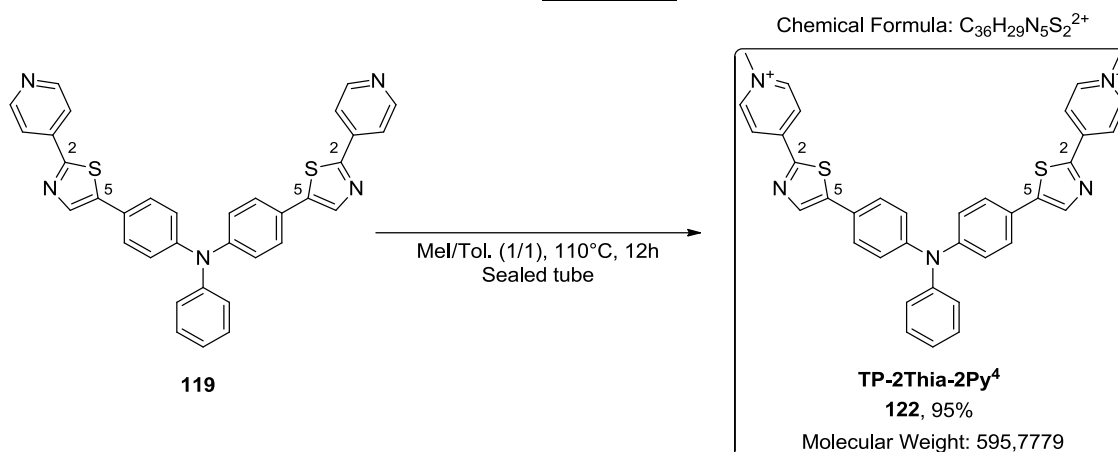
5.2.4.7. METHYLATION STEP OF ISOMERE IN POSITION 2

(Compounds of chapter 2.2.2.3.3.2, page 154)

General procedure G for the methylation of isomere 2:

Ligand (1 eq.) was dissolved in a mixture of Toluene and MeI (0.1M 1/1) at 110°C until completion monitored by HPLC. The crude mixture was concentrated under vacuum. The red precipitate was washed with toluene and concentrated under vacuum three times. The products were obtained as a red powder.

4,4'-(2,2'-((phenylazanediyl)bis(4,1-phenylene))bis(oxazole-5,2-diyl))bis(1-methylpyridin-1-ium) (122)



Following the procedure G, the desired product **122** was obtained with 95% yield as a red powder.

¹H NMR (300 MHz, DMSO)

δ 9.02 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 8.65 (s, 2H), 8.57 (d, $J = 6.9$ Hz, 4H), 7.80 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 7.45 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.28 – 7.11 (m, 7H), 4.35 (s, 6H).

IR (neat) ν cm^{-1}

2921, 2096, 1750, 1634, 1590, 1463, 1380, 1285, 1165, 831, 698.

HRMS (ESI positive mode) m/z :

Calculated for $[C_{36}H_{29}N_5S_2]^{2+}$ 297.5932, found 297.5930.

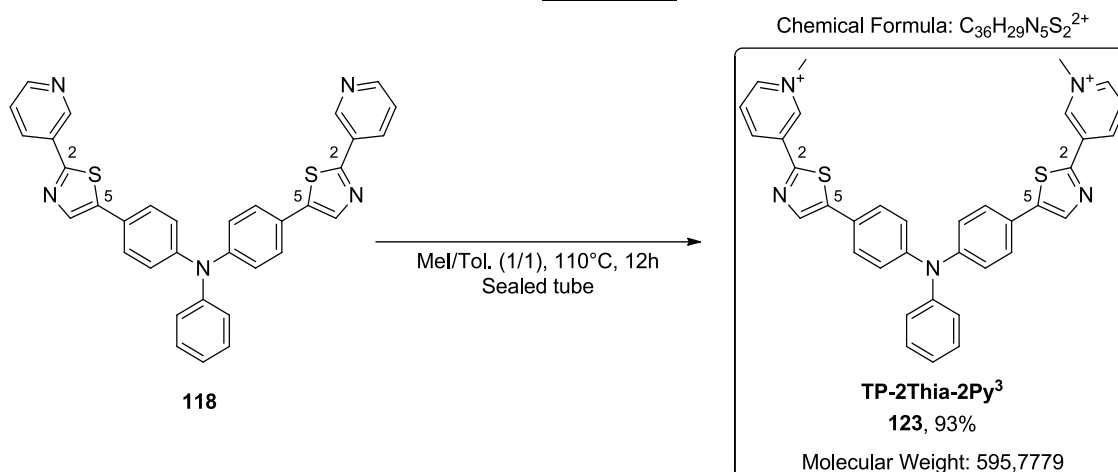
HPLC (Purity)

28.80 minutes (purity 96 %)

λ_{exc} :

330/477 nm

3,3'-(2,2'-((phenylazanediy)bis(4,1-phenylene))bis(oxazole-5,2-diyl))bis(1-methylpyridin-1-ium) (123)



Following the procedure G, the desired product **123** was obtained with 93% yield as a red powder.

¹H NMR (300 MHz, DMSO)	δ 9.62 (s, 2H), 9.06 – 8.97 (m, 4H), 8.52 (s, $J = 8.5$ Hz, 2H), 8.28 – 8.18 (m, 2H), 7.75 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 7.49 – 7.39 (m, 2H), 7.26 – 7.12 (m, 7H), 4.45 (s, 6H).
IR (neat) ν cm^{-1}	2922, 2098, 1588, 1486, 1406, 1326, 1292, 1187, 826, 700, 668.
HRMS (ESI positive mode) m/z :	Calculated for $[C_{36}H_{29}N_5S_2]^{2+}$ 297.5932, found 297.5931.
HPLC (Purity)	28.08 minutes (purity 92 %)
λ_{exc} :	306/427 nm

6. RÉFÉRENCES

- (1) Dahm, R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the Early Years of Nucleic Acid Research. *Hum. Genet.* **2008**, *122* (6), 565–581. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0433-0>.
- (2) Levene, P. A. The Structure of Yeast Nucleic Acid. *J. Biol. Chem.* **1917**, *31*, 591–598.
- (3) Levene, P. A. The Structure of Yeast Nucleic Acid. IV. Ammonia Hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **1919**, *41*, 415–424.
- (4) Hargittai, I. The Tetranucleotide Hypothesis: A Centennial. *J. Struct. Chem.* **2009**, *20* (5), 753–756. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9497-x>.
- (5) Soyfer, V. N. The Consequences of Political Dictatorship for Russian Science. *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2* (9), 723–729. <https://doi.org/10.1038/35088598>.
- (6) Hershey, A. D.; Chase, M. Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* **1952**, *36* (1), 39–56.
- (7) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- (8) Pauling, L.; Corey, R. B. Structure of the Nucleic Acids. *Nature* **1953**, *171* (4347), 346–346. <https://doi.org/10.1038/171346a0>.
- (9) Chargaff, E.; Lipshitz, R.; Green, C. Composition of the Desoxypentose Nucleic Acids of Four Genera of Sea-Urchin. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195* (1), 155–160.
- (10) Chargaff, E.; Vischer, E. The Composition of the Desoxypentose Nucleic Acids of Thymus and Spleen. *J. Biol. Chem.* **1949**, *177* (1), 405–416.
- (11) Zamenhof, S.; Brawerman, G.; Chargaff, E. On the Desoxypentose Nucleic Acids from Several Microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1952**, *9*, 402–405. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(52\)90184-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(52)90184-4).
- (12) Magasanik, B.; Chargaff, E. Studies on the Structure of Ribonucleic Acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1951**, *7*, 396–412. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(51\)90043-1](https://doi.org/10.1016/0006-3002(51)90043-1).
- (13) Gandelman, B.; Zamenhof, S.; Chargaff, E. The Desoxypentose Nucleic Acids of Three Strains of Escherichia Coli. *Biochim. Biophys. Acta* **1952**, *9*, 399–401. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(52\)90183-2](https://doi.org/10.1016/0006-3002(52)90183-2).
- (14) Travers, A.; Muskhelishvili, G. DNA Structure and Function. *FEBS J.* **2015**, *282* (12), 2279–2295. <https://doi.org/10.1111/febs.13307>.
- (15) Hoogsteen, K. The Crystal and Molecular Structure of a Hydrogen-Bonded Complex between 1-Methylthymine and 9-Methyladenine. *Acta Crystallogr. A* **1963**, *16* (9), 907–916. <https://doi.org/10.1107/S0365110X63002437>.
- (16) Reddy, B. S.; Sharma, S. K.; Lown, J. W. Recent Developments in Sequence Selective Minor Groove DNA Effectors. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8* (5), 475–508.
- (17) Jain, A.; Wang, G.; Vasquez, K. M. DNA Triple Helices: Biological Consequences and Therapeutic Potential. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1117–1130. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.02.011>.
- (18) Meselson, M.; Stahl, F. W. The Replication of DNA in Escherichia Coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1958**, *44* (7), 671–682. <https://doi.org/10.1073/pnas.44.7.671>.
- (19) Okazaki, R.; Okazaki, T.; Sakabe, K.; Sugimoto, K.; Sugino, A. Mechanism of DNA Chain Growth. I. Possible Discontinuity and Unusual Secondary Structure of Newly Synthesized Chains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1968**, *59* (2), 598–605.

- (20) Pomerantz, R. T.; O'Donnell, M. Replisome Mechanics: Insights into a Twin DNA Polymerase Machine. *Trends Microbiol.* **2007**, *15* (4), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.007>.
- (21) Ferris, A. L.; Hizi, A.; Showalter, S. D.; Pichuantes, S.; Babe, L.; Craik, C. S.; Hughes, S. H. Immunologic and Proteolytic Analysis of HIV-1 Reverse Transcriptase Structure. *Virology* **1990**, *175* (2), 456–464. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90430-Y](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90430-Y).
- (22) Temin, H. M.; Mizutani, S. Viral RNA-Dependent DNA Polymerase: RNA-Dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature* **1970**, *226* (5252), 1211–1213. <https://doi.org/10.1038/2261211a0>.
- (23) Baltimore, D. Viral RNA-Dependent DNA Polymerase: RNA-Dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature* **1970**, *226* (5252), 1209–1211. <https://doi.org/10.1038/2261209a0>.
- (24) Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell*, Sixth edition.; Garland Science, Taylor and Francis Group: New York, NY, 2015.
- (25) Osakabe, A.; Tachiwana, H.; Kagawa, W.; Horikoshi, N.; Matsumoto, S.; Hasegawa, M.; Matsumoto, N.; Toga, T.; Yamamoto, J.; Hanaoka, F.; et al. Structural Basis of Pyrimidine-Pyrimidone (6–4) Photoproduct Recognition by UV-DDB in the Nucleosome. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1). <https://doi.org/10.1038/srep16330>.
- (26) Yokoyama, H.; Mizutani, R. Structural Biology of DNA (6–4) Photoproducts Formed by Ultraviolet Radiation and Interactions with Their Binding Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (11), 20321–20338. <https://doi.org/10.3390/ijms151120321>.
- (27) Renaturation. In *Encyclopedia of Genetics*; Elsevier, 2001; p 1661. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.1993>.
- (28) Burge, S.; Parkinson, G. N.; Hazel, P.; Todd, A. K.; Neidle, S. Quadruplex DNA: Sequence, Topology and Structure. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (19), 5402–5415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl655>.
- (29) Huppert, J. L. Four-Stranded Nucleic Acids: Structure, Function and Targeting of G-Quadruplexes. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (7), 1375. <https://doi.org/10.1039/b702491f>.
- (30) Gómez-Márquez, J. DNA G-Quadruplex: Structure, Function and Human Disease. *FEBS J.* **2010**, *277* (17), 3451–3451. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07757.x>.
- (31) Bochman, M. L.; Paeschke, K.; Zakian, V. A. DNA Secondary Structures: Stability and Function of G-Quadruplex Structures. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13* (11), 770–780. <https://doi.org/10.1038/nrg3296>.
- (32) Hazel, P.; Parkinson, G. N.; Neidle, S. Predictive Modelling of Topology and Loop Variations in Dimeric DNA Quadruplex Structures. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (7), 2117–2127. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl182>.
- (33) Petraccone, L.; Erra, E.; Esposito, V.; Randazzo, A.; Mayol, L.; Nasti, L.; Barone, G.; Giancola, C. Stability and Structure of Telomeric DNA Sequences Forming Quadruplexes Containing Four G-Tetrads with Different Topological Arrangements †. *Biochemistry* **2004**, *43* (16), 4877–4884. <https://doi.org/10.1021/bi0300985>.
- (34) Piazza, A.; Adrian, M.; Samazan, F.; Heddi, B.; Hamon, F.; Serero, A.; Lopes, J.; Teulade-Fichou, M.-P.; Phan, A. T.; Nicolas, A. Short Loop Length and High Thermal Stability Determine Genomic Instability Induced by G-Quadruplex-Forming Minisatellites. *EMBO J.* **2015**, *34* (12), 1718–1734. <https://doi.org/10.15252/embj.201490702>.
- (35) Huppert, J. L. Structure, Location and Interactions of G-Quadruplexes: Structure, Location and Interactions of G-Quadruplexes. *FEBS Journal* **2010**, *277* (17), 3452–3458. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07758.x>.

- (36) Phan, A. T. Human Telomeric G-Quadruplex: Structures of DNA and RNA Sequences. *FEBS J.* **2010**, *277* (5), 1107–1117. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07464.x>.
- (37) Patel, D. J.; Phan, A. T.; Kuryavyi, V. Human Telomere, Oncogenic Promoter and 5'-UTR G-Quadruplexes: Diverse Higher Order DNA and RNA Targets for Cancer Therapeutics. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (22), 7429–7455. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm711>.
- (38) Paeschke, K.; Simonsson, T.; Postberg, J.; Rhodes, D.; Lipps, H. J. Telomere End-Binding Proteins Control the Formation of G-Quadruplex DNA Structures in Vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12* (10), 847–854. <https://doi.org/10.1038/nsmb982>.
- (39) Guédin, A.; Gros, J.; Alberti, P.; Mergny, J.-L. How Long Is Too Long? Effects of Loop Size on G-Quadruplex Stability. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (21), 7858–7868. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq639>.
- (40) Wong, H. M.; Payet, L.; Huppert, J. L. Function and Targeting of G-Quadruplexes. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2009**, *11* (2), 146–155.
- (41) Oganessian, L.; Graham, M. E.; Robinson, P. J.; Bryan, T. M. Telomerase Recognizes G-Quadruplex and Linear DNA as Distinct Substrates. *Biochemistry* **2007**, *46* (40), 11279–11290. <https://doi.org/10.1021/bi700993q>.
- (42) Oganessian, L.; Moon, I. K.; Bryan, T. M.; Jarstfer, M. B. Extension of G-Quadruplex DNA by Ciliate Telomerase. *EMBO J.* **2006**, *25* (5), 1148–1159. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601006>.
- (43) Zahler, A. M.; Williamson, J. R.; Cech, T. R.; Prescott, D. M. Inhibition of Telomerase by G-Quartet DNA Structures. *Nature* **1991**, *350* (6320), 718–720. <https://doi.org/10.1038/350718a0>.
- (44) Neidle, S. Human Telomeric G-Quadruplex: The Current Status of Telomeric G-Quadruplexes as Therapeutic Targets in Human Cancer. *FEBS J.* **2010**, *277* (5), 1118–1125. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07463.x>.
- (45) Wu, Y.; Brosh, R. M. G-Quadruplex Nucleic Acids and Human Disease: G-Quadruplex Nucleic Acids and Human Disease. *FEBS J.* **2010**, *277* (17), 3470–3488. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07760.x>.
- (46) Lopes, J.; Piazza, A.; Bermejo, R.; Kriegsman, B.; Colosio, A.; Teulade-Fichou, M.-P.; Foiani, M.; Nicolas, A. G-Quadruplex-Induced Instability during Leading-Strand Replication: G-Quadruplex-Induced Instability. *EMBO J.* **2011**, *30* (19), 4033–4046. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.316>.
- (47) Paeschke, K.; Capra, J. A.; Zakian, V. A. DNA Replication through G-Quadruplex Motifs Is Promoted by the *Saccharomyces Cerevisiae* Pif1 DNA Helicase. *Cell* **2011**, *145* (5), 678–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.015>.
- (48) London, T. B. C.; Barber, L. J.; Mosedale, G.; Kelly, G. P.; Balasubramanian, S.; Hickson, I. D.; Boulton, S. J.; Hiom, K. FANCD1 Is a Structure-Specific DNA Helicase Associated with the Maintenance of Genomic G/C Tracts. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (52), 36132–36139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808152200>.
- (49) Schiavone, D.; Guilbaud, G.; Murat, P.; Papadopoulou, C.; Sarkies, P.; Prioleau, M.-N.; Balasubramanian, S.; Sale, J. E. Determinants of G Quadruplex-Induced Epigenetic Instability in REV1-Deficient Cells. *EMBO J.* **2014**, *33* (21), 2507–2520. <https://doi.org/10.15252/emboj.201488398>.
- (50) Sarkies, P.; Reams, C.; Simpson, L. J.; Sale, J. E. Epigenetic Instability Due to Defective Replication of Structured DNA. *Mol. Cell.* **2010**, *40* (5), 703–713. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.009>.

- (51) Sarkies, P.; Murat, P.; Phillips, L. G.; Patel, K. J.; Balasubramanian, S.; Sale, J. E. FANCI Coordinates Two Pathways That Maintain Epigenetic Stability at G-Quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (4), 1485–1498. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr868>.
- (52) Schiavone, D.; Jozwiakowski, S. K.; Romanello, M.; Guilbaud, G.; Guilliam, T. A.; Bailey, L. J.; Sale, J. E.; Doherty, A. J. PrimPol Is Required for Replicative Tolerance of G Quadruplexes in Vertebrate Cells. *Mol. Cell.* **2016**, *61* (1), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.038>.
- (53) Poulet-Benedetti, J.; Valton, A.-L.; Prioleau, M.-N. G-Quadruplex : Acteurs Majeurs de La Duplication Du Génome Humain. *Med Sci (Paris)* **2017**, *33* (12), 1063–1070. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173312013>.
- (54) Sequeira-Mendes, J.; Díaz-Uriarte, R.; Apedaile, A.; Huntley, D.; Brockdorff, N.; Gómez, M. Transcription Initiation Activity Sets Replication Origin Efficiency in Mammalian Cells. *PLoS Genetics* **2009**, *5* (4), e1000446. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000446>.
- (55) Cadoret, J.-C.; Meisch, F.; Hassan-Zadeh, V.; Luyten, I.; Guillet, C.; Duret, L.; Quesneville, H.; Prioleau, M.-N. Genome-Wide Studies Highlight Indirect Links between Human Replication Origins and Gene Regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (41), 15837–15842. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805208105>.
- (56) Picard, F.; Cadoret, J.-C.; Audit, B.; Arneodo, A.; Alberti, A.; Battail, C.; Duret, L.; Prioleau, M.-N. The Spatiotemporal Program of DNA Replication Is Associated with Specific Combinations of Chromatin Marks in Human Cells. *PLoS Genetics* **2014**, *10* (5), e1004282. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004282>.
- (57) Rhodes, D.; Lipps, H. J. G-Quadruplexes and Their Regulatory Roles in Biology. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (18), 8627–8637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv862>.
- (58) Handt, O.; Sutherland, G. R.; Richards, R. I. Fragile Sites and Minisatellite Repeat Instability. *Mol. Genet. Metab.* **2000**, *70* (2), 99–105. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.2996>.
- (59) Hud, N. V.; Plavec, J. A Unified Model for the Origin of DNA Sequence-Directed Curvature. *Biopolymers* **2003**, *69* (1), 144–158. <https://doi.org/10.1002/bip.10364>.
- (60) Neidle, S. *Principles of Nucleic Acid Structure*, 1st ed.; Elsevier ; Academic Press: Amsterdam : Boston, 2008.
- (61) Heinemann, U.; Alings, C.; Bansal, M. Double Helix Conformation, Groove Dimensions and Ligand Binding Potential of a G/C Stretch in B-DNA. *EMBO J.* **1992**, *11* (5), 1931–1939.
- (62) Haran, T. E.; Mohanty, U. The Unique Structure of A-Tracts and Intrinsic DNA Bending. *Q. Rev. Biophys.* **2009**, *42* (01), 41. <https://doi.org/10.1017/S0033583509004752>.
- (63) Yang, C.; Bolotin, E.; Jiang, T.; Sladek, F. M.; Martinez, E. Prevalence of the Initiator over the TATA Box in Human and Yeast Genes and Identification of DNA Motifs Enriched in Human TATA-Less Core Promoters. *Gene* **2007**, *389* (1), 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.09.029>.
- (64) Pugh, B. F. Control of Gene Expression through Regulation of the TATA-Binding Protein. *Gene* **2000**, *255* (1), 1–14.
- (65) Tora, L.; Timmers, H. T. M. The TATA Box Regulates TATA-Binding Protein (TBP) Dynamics in Vivo. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35* (6), 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.01.007>.
- (66) Yang, C.; Bolotin, E.; Jiang, T.; Sladek, F. M.; Martinez, E. Prevalence of the Initiator over the TATA Box in Human and Yeast Genes and Identification of DNA Motifs

- Enriched in Human TATA-Less Core Promoters. *Gene* **2007**, *389* (1), 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.09.029>.
- (67) Burley, S. K.; Roeder, R. G. Biochemistry and Structural Biology of Transcription Factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65* (1), 769–799. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.004005>.
- (68) van Roon-Mom, W. M. C.; Reid, S. J.; Faull, R. L. M.; Snell, R. G. TATA-Binding Protein in Neurodegenerative Disease. *Neuroscience* **2005**, *133* (4), 863–872. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.03.024>.
- (69) Bech, S.; Petersen, T.; Nørremølle, A.; Gjedde, A.; Ehlers, L.; Eiberg, H.; Hjermand, L. E.; Hasholt, L.; Lundorf, E.; Nielsen, J. E. Huntington's Disease-like and Ataxia Syndromes: Identification of a Family with a de Novo SCA17/TBP Mutation. *Parkinsonism Relat. Disord.* **2010**, *16* (1), 12–15. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.06.006>.
- (70) Stevanin, G.; Brice, A. Spinocerebellar Ataxia 17 (SCA17) and Huntington's Disease-like 4 (HDL4). *The Cerebellum* **2008**, *7* (2), 170–178. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0016-1>.
- (71) Werner, T. Cis-Acting Locus. In *Encyclopedia of Genetics*; Elsevier, 2001; pp 377–380. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0217>.
- (72) Kowalski, D.; Eddy, M. J. The DNA Unwinding Element: A Novel, Cis-Acting Component That Facilitates Opening of the Escherichia Coli Replication Origin. *EMBO J.* **1989**, *8* (13), 4335–4344.
- (73) Coman, D.; Russu, I. M. Base Pair Opening in Three DNA-Unwinding Elements. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (21), 20216–20221. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502773200>.
- (74) Kemp, M.; Bae, B.; Yu, J. P.; Ghosh, M.; Leffak, M.; Nair, S. K. Structure and Function of the C- Myc DNA-Unwinding Element-Binding Protein DUE-B. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (14), 10441–10448. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609632200>.
- (75) Baker, T. A.; Sekimizu, K.; Funnell, B. E.; Kornberg, A. Extensive Unwinding of the Plasmid Template during Staged Enzymatic Initiation of DNA Replication from the Origin of the Escherichia Coli Chromosome. *Cell* **1986**, *45* (1), 53–64. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90537-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90537-4).
- (76) Girod, P.-A.; Mermoud, N. Use of Scaffold/Matrix-Attachment Regions for Protein Production. In *New Comprehensive Biochemistry*; Elsevier, 2003; Vol. 38, pp 359–379. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(03\)38022-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(03)38022-6).
- (77) Jackson, J. A. Matrix Attachment Region (MAR) Properties and Abnormal Expansion of AT Island Minisatellites in FRA16B Fragile Sites in Leukemic CEM Cells. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (21), 6354–6364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg832>.
- (78) Gluch, A.; Vidakovic, M.; Bode, J. Scaffold/Matrix Attachment Regions (S/MARs): Relevance for Disease and Therapy. In *Protein-Protein Interactions as New Drug Targets*; Klussmann, E., Scott, J., Eds.; Hofmann, F., Series Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; Vol. 186, pp 67–103. https://doi.org/10.1007/978-3-540-72843-6_4.
- (79) Bhavani, G. Enhanced Expression of FRA16B Using AT-Rich DNA Binding Chemicals in a Woman with Secondary Amenorrhoea. *J. Clin. Diagn. Res.* **2017**. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/26545.10043>.
- (80) Burrow, A. A.; Marullo, A.; Holder, L. R.; Wang, Y.-H. Secondary Structure Formation and DNA Instability at Fragile Site FRA16B. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (9), 2865–2877. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1245>.

- (81) Zlotorynski, E.; Rahat, A.; Skaug, J.; Ben-Porat, N.; Ozeri, E.; Hershberg, R.; Levi, A.; Scherer, S. W.; Margalit, H.; Kerem, B. Molecular Basis for Expression of Common and Rare Fragile Sites. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23* (20), 7143–7151. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.20.7143-7151.2003>.
- (82) Durkin, S. G.; Glover, T. W. Chromosome Fragile Sites. *Annu. Rev. Genet.* **2007**, *41* (1), 169–192. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.042007.165900>.
- (83) Burrow, A. A.; Marullo, A.; Holder, L. R.; Wang, Y.-H. Secondary Structure Formation and DNA Instability at Fragile Site FRA16B. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (9), 2865–2877. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1245>.
- (84) Hsu, Y. Y.; Wang, Y.-H. Human Fragile Site FRA16B DNA Excludes Nucleosomes in the Presence of Distamycin. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (19), 17315–17319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200901200>.
- (85) Felbor, U.; Feichtinger, W.; Schmid, M. The Rare Human Fragile Site 16B. *Cytogenet. Genome Res.* **2003**, *100* (1–4), 85–88. <https://doi.org/10.1159/000072841>.
- (86) Debacker, K.; Kooy, R. F. Fragile Sites and Human Disease. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16* (R2), R150–R158. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm136>.
- (87) Reeves, R. High Mobility Group (HMG) Proteins: Modulators of Chromatin Structure and DNA Repair in Mammalian Cells. *DNA Repair* **2015**, *36*, 122–136. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.09.015>.
- (88) Aravind, L.; Landsman, D. AT-Hook Motifs Identified in a Wide Variety of DNA-Binding Proteins. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26* (19), 4413–4421.
- (89) Reeves, R.; Nissen, M. S. The A.T-DNA-Binding Domain of Mammalian High Mobility Group I Chromosomal Proteins. A Novel Peptide Motif for Recognizing DNA Structure. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (15), 8573–8582.
- (90) Doyle, D. A.; Lee, A.; Lewis, J.; Kim, E.; Sheng, M.; MacKinnon, R. Crystal Structures of a Complexed and Peptide-Free Membrane Protein–Binding Domain: Molecular Basis of Peptide Recognition by PDZ. *Cell* **1996**, *85* (7), 1067–1076. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81307-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81307-0).
- (91) Lee, H.-J.; Zheng, J. J. PDZ Domains and Their Binding Partners: Structure, Specificity, and Modification. *Cell Commun. Signal* **2010**, *8*, 8. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-8>.
- (92) Dumat, B.; Faurel-Paul, E.; Fornarelli, P.; Saettel, N.; Metgé, G.; Fiorini-Debuisschert, C.; Charra, F.; Mahuteau-Betzer, F.; Teulade-Fichou, M.-P. Influence of the Oxazole Ring Connection on the Fluorescence of Oxazolyl-Triphenylamine Biphonic DNA Probes. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (1), 358–370. <https://doi.org/10.1039/C5OB02225H>.
- (93) Hannon, M. J. Supramolecular DNA Recognition. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (2), 280–295. <https://doi.org/10.1039/B606046N>.
- (94) Rescifina, A.; Zagni, C.; Varrica, M. G.; Pistarà, V.; Corsaro, A. Recent Advances in Small Organic Molecules as DNA Intercalating Agents: Synthesis, Activity, and Modeling. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 95–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.029>.
- (95) Strekowski, L.; Wilson, B. Noncovalent Interactions with DNA: An Overview. *Mutat. Res.* **2007**, *623* (1–2), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.008>.
- (96) Tse, W. C.; Boger, D. L. Sequence-Selective DNA Recognition: Natural Products and Nature's Lessons. *Chem. Biol.* **2004**, *11* (12), 1607–1617. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.08.012>.

- (97) Rohs, R.; Jin, X.; West, S. M.; Joshi, R.; Honig, B.; Mann, R. S. Origins of Specificity in Protein-DNA Recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79* (1), 233–269. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060408-091030>.
- (98) Neto, B.; Lapis, A. Recent Developments in the Chemistry of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Intercalators: Principles, Design, Synthesis, Applications and Trends. *Molecules* **2009**, *14* (5), 1725–1746. <https://doi.org/10.3390/molecules14051725>.
- (99) Patterson, S. E.; Coxon, J. M.; Strekowski, L. Intercalation of Ethidium and Analogues with Nucleic Acids: A Molecular Orbital Study. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5* (2), 277–281. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(96\)00242-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(96)00242-8).
- (100) Dervan, P. Molecular Recognition of DNA by Small Molecules. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9* (9), 2215–2235. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00262-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00262-0).
- (101) Peregrine, A. S.; Mamman, M. Pharmacology of Diminazene: A Review. *Acta Trop.* **1993**, *54* (3–4), 185–203.
- (102) Zeglis, B. M.; Pierre, V. C.; Barton, J. K. Metallo-Intercalators and Metallo-Insertors. *Chem. Comm.* **2007**, No. 44, 4565. <https://doi.org/10.1039/b710949k>.
- (103) Schiemann, O.; Turro, N. J.; Barton, J. K. EPR Detection of Guanine Radicals in a DNA Duplex under Biological Conditions: Selective Base Oxidation by Ru(Phen)₂Dppz³⁺ Using the Flash-Quench Technique. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104* (30), 7214–7220. <https://doi.org/10.1021/jp000725p>.
- (104) Rehmann, J. P.; Barton, J. K. Proton NMR Studies of Tris(Phenanthroline) Metal Complexes Bound to Oligonucleotides: Characterization of Binding Modes. *Biochemistry* **1990**, *29* (7), 1701–1709. <https://doi.org/10.1021/bi00459a006>.
- (105) Yavin, E.; Stemp, E. D. A.; O'Shea, V. L.; David, S. S.; Barton, J. K. Electron Trap for DNA-Bound Repair Enzymes: A Strategy for DNA-Mediated Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (10), 3610–3614. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600239103>.
- (106) Yavin, E.; Boal, A. K.; Stemp, E. D. A.; Boon, E. M.; Livingston, A. L.; O'Shea, V. L.; David, S. S.; Barton, J. K. Protein-DNA Charge Transport: Redox Activation of a DNA Repair Protein by Guanine Radical. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102* (10), 3546–3551. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409410102>.
- (107) Prosser, K. E.; Walsby, C. J. Electron Paramagnetic Resonance as a Tool for Studying the Mechanisms of Paramagnetic Anticancer Metallodrugs: Electron Paramagnetic Resonance as a Tool for Studying the Mechanisms of Paramagnetic Anticancer Metallodrugs. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017* (12), 1573–1585. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601142>.
- (108) Th0211095-3-Chapitre1.Pdf.
- (109) Nogueira, L.; Foerster, C.; Groopman, J.; Egner, P.; Koshiol, J.; Ferreccio, C. Association of Aflatoxin With Gallbladder Cancer in Chile. *JAMA* **2015**, *313* (20), 2075. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.4559>.
- (110) Hamilton, P. L.; Arya, D. P. Natural Product DNA Major Groove Binders. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (2), 134–143. <https://doi.org/10.1039/C1NP00054C>.
- (111) Basu, A. K.; Pande, P.; Bose, A. Translesion Synthesis of 2'-Deoxyguanosine Lesions by Eukaryotic DNA Polymerases. *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, *30* (1), 61–72. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00285>.
- (112) Wogan, G. N. Aflatoxin as a Human Carcinogen. *Hepatology* **1999**, *30* (2), 573–575. <https://doi.org/10.1002/hep.510300231>.

- (113) Castillo, G.; Spinella, K.; Poturnayová, A.; Šnejdárková, M.; Mosiello, L.; Hianik, T. Detection of Aflatoxin B 1 by Aptamer-Based Biosensor Using PAMAM Dendrimers as Immobilization Platform. *Food Control*. **2015**, *52*, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.008>.
- (114) Zhao, M.; Wang, P.; Guo, Y.; Wang, L.; Luo, F.; Qiu, B.; Guo, L.; Su, X.; Lin, Z.; Chen, G. Detection of Aflatoxin B 1 in Food Samples Based on Target-Responsive Aptamer-Cross-Linked Hydrogel Using a Handheld PH Meter as Readout. *Talanta* **2018**, *176*, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.006>.
- (115) Zhang, Q.; Xiong, K.; Tatsumi, E.; Li, L.; Liu, H. Elimination of Aflatoxin B1 in Peanuts by Acidic Electrolyzed Oxidizing Water. *Food Control*. **2012**, *27* (1), 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.029>.
- (116) Pi, F.; Sun, J.; Liu, W.; Sun, X.; Zhang, Y. Elimination of Aflatoxin B 1 in Vegetable Oil Based on Immuno-Magnetosomes Probes from a Novel Magnetotactic Bacterium. *Food Control*. **2017**, *80*, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.004>.
- (117) Hamilton, P. L.; Arya, D. P. Natural Product DNA Major Groove Binders. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (2), 134–143. <https://doi.org/10.1039/C1NP00054C>.
- (118) Zhao, Q.; He, Q.; Ding, W.; Tang, M.; Kang, Q.; Yu, Y.; Deng, W.; Zhang, Q.; Fang, J.; Tang, G.; et al. Characterization of the Azinomycin B Biosynthetic Gene Cluster Revealing a Different Iterative Type I Polyketide Synthase for Naphthoate Biosynthesis. *Chem. Biol.* **2008**, *15* (7), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.05.021>.
- (119) Coleman, R. S.; Perez, R. J.; Burk, C. H.; Navarro, A. Studies on the Mechanism of Action of Azinomycin B: Definition of Regioselectivity and Sequence Selectivity of DNA Cross-Link Formation and Clarification of the Role of the Naphthoate. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (44), 13008–13017. <https://doi.org/10.1021/ja025563k>.
- (120) Kelly, G. T.; Sharma, V.; Watanabe, C. M. H. An Improved Method for Culturing *Streptomyces Sahachiroi*: Biosynthetic Origin of the Enol Fragment of Azinomycin B. *Bioorg. Chem.* **2008**, *36* (1), 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2007.08.002>.
- (121) Fujiwara, T.; Saito, I.; Sugiyama, H. Highly Efficient DNA Interstrand Crosslinking Induced by an Antitumor Antibiotic, Carzinophilin. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (2), 315–318. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)02339-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)02339-9).
- (122) Zhao, Q.; He, Q.; Ding, W.; Tang, M.; Kang, Q.; Yu, Y.; Deng, W.; Zhang, Q.; Fang, J.; Tang, G.; et al. Characterization of the Azinomycin B Biosynthetic Gene Cluster Revealing a Different Iterative Type I Polyketide Synthase for Naphthoate Biosynthesis. *Chem. Biol.* **2008**, *15* (7), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.05.021>.
- (123) Casely-Hayford, M. A.; Pors, K.; James, C. H.; Patterson, L. H.; Hartley, J. A.; Searcey, M. Design and Synthesis of a DNA-Crosslinking Azinomycin Analogue. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (19), 3585. <https://doi.org/10.1039/b508908e>.
- (124) Ishida, N.; Miyazaki, K.; Kumagai, K.; Rikimaru, M. NEOCARZINOSTATIN, AN ANTITUMOR ANTIBIOTIC OF HIGH MOLECULAR WEIGHT. ISOLATION, PHYSIOCHEMICAL PROPERTIES AND BIOLOGICAL ACTIVITIES. *J. Antibiot.* **1965**, *18*, 68–76.
- (125) Edo, K.; Akiyama-Murai, Y.; Saito, K.; Mizugaki, M.; Koide, Y.; Ishida, N. Hydrogen Bromide Adduct of Neocarzinostatin Chromophore: One of the Stable Derivatives of Native Neocarzinostatin Chromophore. *J. Antibiot.* **1988**, *41* (9), 1272–1274. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.41.1272>.

- (126) Stassinopoulos, A.; Ji, J.; Gao, X.; Goldberg, I. H. Solution Structure of a Two-Base DNA Bulge Complexed with an Eneiyne Cleaving Analog. *Science* **1996**, 272 (5270), 1943–1946.
- (127) Andrew G. Myers; Stephen P. Arvedson; Robert W. Lee. A New and Unusual Pathway for the Reaction of Neocarzinostatin Chromophore with Thiols. Revised Structure of the Protein-Directed Thiol Adduct. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (19), 4725–4726. <https://doi.org/DOI: 10.1021/ja960335+>.
- (128) Kobayashi, S.; Hori, M.; Wang, G. X.; Hiram, M. Formal Total Synthesis of Neocarzinostatin Chromophore. *J. Org. Chem.* **2006**, 71 (2), 636–644. <https://doi.org/10.1021/jo052031o>.
- (129) Goldberg, I. H. Mechanism of Neocarzinostatin Action: Role of DNA Microstructure in Determination of Chemistry of Bistranded Oxidative Damage. *Acc. Chem. Res.* **1991**, 24 (7), 191–198. <https://doi.org/10.1021/ar00007a001>.
- (130) Yang, F.; Teves, S. S.; Kemp, C. J.; Henikoff, S. Doxorubicin, DNA Torsion, and Chromatin Dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, 1845 (1), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002>.
- (131) Liu, L. F.; Desai, S. D.; Li, T. K.; Mao, Y.; Sun, M.; Sim, S. P. Mechanism of Action of Camptothecin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, 922, 1–10.
- (132) Legarza, K.; Yang, L.-X. New Molecular Mechanisms of Action of Camptothecin-Type Drugs. *Anticancer Res.* **2006**, 26 (5A), 3301–3305.
- (133) Sriram, D.; Yogeewari, P.; Thirumurugan, R.; Ratan Bal, T. Camptothecin and Its Analogues: A Review on Their Chemotherapeutic Potential. *Nat. Prod. Res.* **2005**, 19 (4), 393–412. <https://doi.org/10.1080/14786410412331299005>.
- (134) Wall, M. E.; Wani, M. C.; Cook, C. E.; Palmer, K. H.; McPhail, A. T.; Sim, G. A. Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca Acuminata*^{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88 (16), 3888–3890. <https://doi.org/10.1021/ja00968a057>.
- (135) Stevenson, P.; Sones, K. R.; Gicheru, M. M.; Mwangi, E. K. Comparison of Isometamidium Chloride and Homidium Bromide as Prophylactic Drugs for Trypanosomiasis in Cattle at Nguruman, Kenya. *Acta Trop.* **1995**, 59 (2), 77–84. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(94\)00080-K](https://doi.org/10.1016/0001-706X(94)00080-K).
- (136) Nafisi, S.; Saboury, A. A.; Keramat, N.; Neault, J.-F.; Tajmir-Riahi, H.-A. Stability and Structural Features of DNA Intercalation with Ethidium Bromide, Acridine Orange and Methylene Blue. *J. Mol. Struct.* **2007**, 827 (1–3), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2006.05.004>.
- (137) Sabnis, R. W. *Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Applications*; Wiley: Hoboken, N.J, 2010.
- (138) Boger, D. L.; Boyce, C. W.; Garbaccio, R. M.; Goldberg, J. A. CC-1065 and the Duocarmycins: Synthetic Studies. *Chem. Rev.* **1997**, 97 (3), 787–828. <https://doi.org/10.1021/cr960095g>.
- (139) Patil, P.; Satam, V.; Lee, M. A Short Review on the Synthetic Strategies of Duocarmycin Analogs That Are Powerful DNA Alkylating Agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2015**, 15 (5), 616–630. <https://doi.org/10.2174/1871520615666141216144116>.
- (140) Suckling, C. From Multiply Active Natural Product to Candidate Drug? Antibacterial (and Other) Minor Groove Binders for DNA. *Future Med. Chem.* **2012**, 4 (8), 971–989. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.52>.

- (141) Cai, X.; Gray, P. J.; Von Hoff, D. D. DNA Minor Groove Binders: Back in the Groove. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35* (5), 437–450. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2009.02.004>.
- (142) Baraldi, P. G.; Bovero, A.; Fruttarolo, F.; Preti, D.; Tabrizi, M. A.; Pavani, M. G.; Romagnoli, R. DNA Minor Groove Binders as Potential Antitumor and Antimicrobial Agents. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24* (4), 475–528. <https://doi.org/10.1002/med.20000>.
- (143) Reddy, B. S. P.; Sondhi, S. M.; Lown, J. W. Synthetic DNA Minor Groove-Binding Drugs☆☆Editor's Note: Figures 1–99 Appear throughout Text. Structures 1–271 Appear Together at the End of This Article, Although Structures 25, 111–147, 162–181, 182–188, and 241–255 Also Appear within Tables 1–5. *Pharmacol. Ther.* **1999**, *84* (1), 1–111. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(99\)00021-2](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(99)00021-2).
- (144) Kubista, M.; Aakerman, B.; Norden, B. Characterization of Interaction between DNA and 4',6-Diamidino-2-Phenylindole by Optical Spectroscopy. *Biochemistry* **1987**, *26* (14), 4545–4553. <https://doi.org/10.1021/bi00388a057>.
- (145) Kapuscinski, J. DAPI: A DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotech. Histochem.* **1995**, *70* (5), 220–233. <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>.
- (146) McHugh, M. M.; Sigmund, R. D.; Beerman, T. A. Effects of Minor Groove Binding Drugs on Camptothecin-Induced DNA Lesions in L1210 Nuclei. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39* (4), 707–714. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(90\)90149-F](https://doi.org/10.1016/0006-2952(90)90149-F).
- (147) Katouzian-Safadi, M.; Cremet, J.-Y.; Charlier, M. Limitation of DNA-4',6-Diamidine-2-Phenylindole Assay in the Presence of an Excess of TRNA. *Anal. Biochem.* **1989**, *176* (2), 416–419. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90334-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90334-5).
- (148) Shapiro, T. A.; Englund, P. T. Selective Cleavage of Kinetoplast DNA Minicircles Promoted by Antitrypanosomal Drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87* (3), 950–954.
- (149) Portugal, J. Berenil Acts as a Poison of Eukaryotic Topoisomerase II. *FEBS Lett.* **1994**, *344* (2–3), 136–138.
- (150) Chaudhary, D.; Miller, D. M. The C-Myc Promoter Binding Protein (MBP-1) and TBP Bind Simultaneously in the Minor Groove of the c-Myc P2 Promoter. *Biochemistry* **1995**, *34* (10), 3438–3445.
- (151) Gresh, N.; Pullman, B. A Theoretical Study of the Nonintercalative Binding of Berenil and Stilbamidine to Double-Stranded (DA-DT)_n Oligomers. *Mol. Pharmacol.* **1984**, *25* (3), 452–458.
- (152) *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 7th ed.; Foye, W. O., Lemke, T. L., Williams, D. A., Eds.; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2013.
- (153) Abu-Daya, A.; Brown, P. M.; Fox, K. R. DNA Sequence Preferences of Several AT-Selective Minor Groove Binding Ligands. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23* (17), 3385–3392.
- (154) Nelson, S. M.; Ferguson, L. R.; Denny, W. A. Non-Covalent Ligand/DNA Interactions: Minor Groove Binding Agents. *Mutat. Res.* **2007**, *623* (1–2), 24–40. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.012>.
- (155) Moon, J. H.; Kim, S. K.; Sehlstedt, U.; Rodger, A.; Nordén, B. DNA Structural Features Responsible for Sequence-Dependent Binding Geometries of Hoechst 33258. *Biopolymers* **1996**, *38* (5), 593–606. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199605\)38:5<593::AID-BIP5>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199605)38:5<593::AID-BIP5>3.0.CO;2-N).
- (156) Singh, M. P.; Joseph, T.; Kumar, S.; Bathini, Y.; Lown, J. W. Synthesis and Sequence-Specific DNA Binding of a Topoisomerase Inhibitory Analog of Hoechst 33258 Designed for Altered Base and Sequence Recognition. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5* (5), 597–607.

- (157) Soderlind, K. J.; Gorodetsky, B.; Singh, A. K.; Bachur, N. R.; Miller, G. G.; Lown, J. W. Bis-Benzimidazole Anticancer Agents: Targeting Human Tumour Helicases. *Anticancer Drug Des.* **1999**, *14* (1), 19–36.
- (158) Bucevičius, J.; Lukinavičius, G.; Gerasimaitė, R. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond. *Chemosensors* **2018**, *6* (2), 18. <https://doi.org/10.3390/chemosensors6020018>.
- (159) Yasueda, Y.; Tamura, T.; Hamachi, I. Nucleus-Selective Chemical Proteomics Using Hoechst-Tagged Reactive Molecules. *Chem. Lett.* **2016**, *45* (3), 265–267. <https://doi.org/10.1246/cl.151083>.
- (160) Dumat, B.; Faurel-Paul, E.; Fornarelli, P.; Saettel, N.; Metgé, G.; Fiorini-Debuisschert, C.; Charra, F.; Mahuteau-Betzer, F.; Teulade-Fichou, M.-P. Influence of the Oxazole Ring Connection on the Fluorescence of Oxazolyl-Triphenylamine Biphotonic DNA Probes. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (1), 358–370. <https://doi.org/10.1039/C5OB02225H>.
- (161) Dumat, B.; Bordeau, G.; Faurel-Paul, E.; Mahuteau-Betzer, F.; Saettel, N.; Metgé, G.; Fiorini-Debuisschert, C.; Charra, F.; Teulade-Fichou, M.-P. DNA Switches on the Two-Photon Efficiency of an Ultrabright Triphenylamine Fluorescent Probe Specific of AT Regions. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (34), 12697–12706. <https://doi.org/10.1021/ja404422z>.
- (162) Allain, C.; Schmidt, F.; Lartia, R.; Bordeau, G.; Fiorini-Debuisschert, C.; Charra, F.; Tauc, P.; Teulade-Fichou, M.-P. Vinyl-Pyridinium Triphenylamines: Novel Far-Red Emitters with High Photostability and Two-Photon Absorption Properties for Staining DNA. *ChemBioChem* **2007**, *8* (4), 424–433. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600483>.
- (163) Dumat, B.; Bordeau, G.; Aranda, A. I.; Mahuteau-Betzer, F.; Harfouch, Y. E.; Metgé, G.; Charra, F.; Fiorini-Debuisschert, C.; Teulade-Fichou, M.-P. Vinyl-Triphenylamine Dyes, a New Family of Switchable Fluorescent Probes for Targeted Two-Photon Cellular Imaging: From DNA to Protein Labeling. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (30), 6054. <https://doi.org/10.1039/c2ob25515d>.
- (164) Parthasarathy, V.; Fery-Forgues, S.; Campioli, E.; Recher, G.; Terenziani, F.; Blanchard-Desce, M. Dipolar versus Octupolar Triphenylamine-Based Fluorescent Organic Nanoparticles as Brilliant One- and Two-Photon Emitters for (Bio)Imaging. *Small* **2011**, *7* (22), 3219–3229. <https://doi.org/10.1002/smll.201100726>.
- (165) Porrès, L.; Mongin, O.; Katan, C.; Charlot, M.; Pons, T.; Mertz, J.; Blanchard-Desce, M. Enhanced Two-Photon Absorption with Novel Octupolar Propeller-Shaped Fluorophores Derived from Triphenylamine. *Organic Letters* **2004**, *6* (1), 47–50. <https://doi.org/10.1021/ol036041s>.
- (166) Roberts, R. L.; Schwich, T.; Corkery, T. C.; Cifuentes, M. P.; Green, K. A.; Farmer, J. D.; Low, P. J.; Marder, T. B.; Samoc, M.; Humphrey, M. G. Organometallic Complexes for Nonlinear Optics. 45. Dispersion of the Third-Order Nonlinear Optical Properties of Triphenylamine-Cored Alkynylruthenium Dendrimers. *Advanced Materials* **2009**, *21* (22), 2318–2322. <https://doi.org/10.1002/adma.200803669>.
- (167) Collings, J. C.; Poon, S.-Y.; Le Droumaguet, C.; Charlot, M.; Katan, C.; Pålsson, L.-O.; Beeby, A.; Mosely, J. A.; Kaiser, H. M.; Kaufmann, D.; et al. The Synthesis and One- and Two-Photon Optical Properties of Dipolar, Quadrupolar and Octupolar Donor-Acceptor Molecules Containing Dimesitylboryl Groups. *Chemistry - A European Journal* **2009**, *15* (1), 198–208. <https://doi.org/10.1002/chem.200801719>.

- (168) Hoffman, E. A.; Frey, B. L.; Smith, L. M.; Auble, D. T. Formaldehyde Crosslinking: A Tool for the Study of Chromatin Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290* (44), 26404–26411. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.651679>.
- (169) Qin, H.; Wang, Y. Exploring DNA-Binding Proteins with in Vivo Chemical Cross-Linking and Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (4), 1983–1991.
- (170) Tretyakova, N. Y.; Groehler, A.; Ji, S. DNA–Protein Cross-Links: Formation, Structural Identities, and Biological Outcomes. *Accounts of Chemical Research* **2015**, *48* (6), 1631–1644. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00056>.
- (171) Samuel, O. Analogues fluorescents de l'epicocconone et sondes pour le piégeage de produits naturels azaphiles. Thèse, Université de Rouen Normandie: Rouen, 2017.
- (172) Perraudeau, C. Synthèse de Sondes Fluorescentes Polyfonctionnelles Basées Sur Le Squelette Du Produit Naturel Epicocconone. Thèse, Université de Rouen Normandie: Rouen, 2014.
- (173) Peixoto, P. A.; Boulangé, A.; Ball, M.; Naudin, B.; Alle, T.; Cosette, P.; Karuso, P.; Franck, X. Design and Synthesis of Epicocconone Analogues with Improved Fluorescence Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (43), 15248–15256. <https://doi.org/10.1021/ja506914p>.
- (174) Coghlan, D. R.; Mackintosh, J. A.; Karuso, P. Mechanism of Reversible Fluorescent Staining of Protein with Epicocconone. *Org. Lett.* **2005**, *7* (12), 2401–2404. <https://doi.org/10.1021/ol050665b>.
- (175) Gao, J.-M.; Yang, S.-X.; Qin, J.-C. Azaphilones: Chemistry and Biology. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (7), 4755–4811. <https://doi.org/10.1021/cr300402y>.
- (176) Makrourgras, M.; Coffinier, R.; Oger, S.; Chevalier, A.; Sabot, C.; Franck, X. Total Synthesis and Structural Revision of Chaetoviridins A. *Org. Lett.* **2017**, *19* (15), 4146–4149. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b02053>.
- (177) Huang, T.; Tan, H.; Chen, G.; Wang, L.; Wu, Z. Rising Temperature Stimulates the Biosynthesis of Water-Soluble Fluorescent Yellow Pigments and Gene Expression in *Monascus Ruber* CGMCC10910. *AMB Express* **2017**, *7* (1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0441-y>.
- (178) Bell, P. J. L.; Karuso, P. Epicocconone, a Novel Fluorescent Compound from the Fungus *Epicoccum nigrum*. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (31), 9304–9305. <https://doi.org/10.1021/ja035496+>.
- (179) Mackintosh, J. A.; Choi, H.-Y.; Bae, S.-H.; Veal, D. A.; Bell, P. J.; Ferrari, B. C.; Van Dyk, D. D.; Verrills, N. M.; Paik, Y.-K.; Karuso, P. A Fluorescent Natural Product for Ultra Sensitive Detection of Proteins in One-Dimensional and Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Proteomics* **2003**, *3* (12), 2273–2288. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300578>.
- (180) Chatterjee, S.; Karuso, P.; Boulangé, A.; Franck, X.; Datta, A. Excited State Dynamics of Brightly Fluorescent Second Generation Epicocconone Analogues. *J. Phys. Chem. B.* **2015**, *119* (20), 6295–6303. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.5b02190>.
- (181) Chatterjee, S.; Karuso, P.; Boulangé, A.; Peixoto, P. A.; Franck, X.; Datta, A. The Role of Different Structural Motifs in the Ultrafast Dynamics of Second Generation Protein Stains. *J. Phys. Chem. B.* **2013**, *117* (48), 14951–14959. <https://doi.org/10.1021/jp4092927>.
- (182) Hirashima, S.; Itoh, A. Aerobic Oxidation of Alcohols under Visible Light Irradiation of Fluorescent Lamp. *Green Chem.* **2007**, *9* (4), 318. <https://doi.org/10.1039/b613931k>.

- (183) Choi, H.-Y.; Veal, D. A.; Karuso, P. Epicocconone, A New Cell-Permeable Long Stokes' Shift Fluorescent Stain for Live Cell Imaging and Multiplexing. *J. Fluoresc.* **2006**, *16* (4), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s10895-005-0010-7>.
- (184) Schapman, D.; Perraudeau, C.; Bénard, M.; Gallavardin, T.; Boulangé, A.; Leleu, S.; Lebon, A.; Franck, X.; Galas, L. Characterization of Fluorescent Synthetic Epicocconone-Based Dye through Advanced Light Microscopies for Live Cell Imaging Applications. *Dyes Pigm.* **2017**, *141*, 394–405. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.02.034>.
- (185) Alle, T. epicocconone et analogues : Synthèse, études spectroscopiques et marquage de protéines. Thèse, Université de Rouen Normandie: Rouen, 2015.
- (186) Boulangé, A.; Peixoto, P. A.; Franck, X. Diastereoselective IBX Oxidative Dearomatization of Phenols by Remote Induction: Towards the Epicocconone Core Framework. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (37), 10241–10245. <https://doi.org/10.1002/chem.201101681>.
- (187) Cookson, R.; Barrett, T. N.; Barrett, A. G. M. β -Keto-Dioxinones and β,δ -Diketo-Dioxinones in Biomimetic Resorcyolate Total Synthesis. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48* (3), 628–642. <https://doi.org/10.1021/ar5004169>.
- (188) Ketene Chemistry and the Application in Synthesis. 38.
- (189) Hai, D.; Baran, P. *Ketene*.
- (190) Douglas, J. J.; Churchill, G.; Slawin, A. M. Z.; Fox, D. J.; Smith, A. D. Stereo- and Chemodivergent NHC-Promoted Functionalisation of Arylalkylketenes with Chloral. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (46), 16354–16358. <https://doi.org/10.1002/chem.201503308>.
- (191) Miller, R. D.; Theis, W.; Heilig, G.; Kirchmeyer, S. The Generation and Rearrangement of 2-(Diazoacetyl)Cyclobutanones: The Formation of 5-Spirocyclopropyl-2(5H)-Furanones. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (4), 1453–1463. <https://doi.org/10.1021/jo00004a022>.
- (192) Sullivan, D. F.; Woodbury, R. P.; Rathke, M. W. The Self-Condensation Reaction of Lithium Ester Enolates. Isolation of a Ketene Intermediate. *J. Org. Chem.* **1977**, *42* (11), 2038–2039. <https://doi.org/10.1021/jo00431a058>.
- (193) Boeckman, R. K.; Pruitt, J. R. A New, Highly Efficient, Selective Methodology for Formation of Medium-Ring and Macrocyclic Lactones via Intramolecular Ketene Trapping: An Application to a Convergent Synthesis of (-)-Kromycin. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (21), 8286–8288. <https://doi.org/10.1021/ja00203a044>.
- (194) Katritzky, A. R.; Wang, Z.; Slavov, S.; Tsikolia, M.; Dobchev, D.; Akhmedov, N. G.; Hall, C. D.; Bernier, U. R.; Clark, G. G.; Linthicum, K. J. Synthesis and Bioassay of Improved Mosquito Repellents Predicted from Chemical Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (21), 7359–7364. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800571105>.
- (195) Katritzky, A. R.; He, H.-Y.; Suzuki, K. *N*-Acylbenzotriazoles: Neutral Acylating Reagents for the Preparation of Primary, Secondary, and Tertiary Amides. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (24), 8210–8213. <https://doi.org/10.1021/jo000792f>.
- (196) Katritzky, A. R.; Wang, Z.; Wang, M.; Hall, C. D.; Suzuki, K. Facile Syntheses of 2,2-Dimethyl-6-(2-Oxoalkyl)-1,3-Dioxin-4-Ones and the Corresponding 6-Substituted 4-Hydroxy-2-Pyrones. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (12), 4854–4856. <https://doi.org/10.1021/jo050307m>.
- (197) Wendt, M. D.; Rockway, T. W.; Geyer, A.; McClellan, W.; Weitzberg, M.; Zhao, X.; Mantei, R.; Nienaber, V. L.; Stewart, K.; Klinghofer, V.; et al. Identification of Novel Binding Interactions in the Development of Potent, Selective 2-Naphthamide

- Inhibitors of Urokinase. Synthesis, Structural Analysis, and SAR of *N*-Phenyl Amide 6-Substitution. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (2), 303–324. <https://doi.org/10.1021/jm0300072>.
- (198) Sun, X.; Qiu, J. Novel Dihydropyrimidin-2(1h)-One Compounds as s-Nitrosogluthathione Reductase Inhibitors. WO2011038204A1, March 31, 2011.
- (199) Hammerer, F.; Garcia, G.; Chen, S.; Poyer, F.; Achelle, S.; Fiorini-Debuisschert, C.; Teulade-Fichou, M.-P.; Maillard, P. Synthesis and Characterization of Glycoconjugated Porphyrin Triphenylamine Hybrids for Targeted Two-Photon Photodynamic Therapy. *The Journal of Organic Chemistry* **2014**, *79* (3), 1406–1417. <https://doi.org/10.1021/jo402658h>.
- (200) Shi, L.; He, C.; Zhu, D.; He, Q.; Li, Y.; Chen, Y.; Sun, Y.; Fu, Y.; Wen, D.; Cao, H.; et al. High Performance Aniline Vapor Detection Based on Multi-Branched Fluorescent Triphenylamine-Benzothiadiazole Derivatives: Branch Effect and Aggregation Control of the Sensing Performance. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22* (23), 11629. <https://doi.org/10.1039/c2jm30933e>.
- (201) Wan, C.; Gao, L.; Wang, Q.; Zhang, J.; Wang, Z. Simple and Efficient Preparation of 2,5-Disubstituted Oxazoles via a Metal-Free-Catalyzed Cascade Cyclization. *Organic Letters* **2010**, *12* (17), 3902–3905. <https://doi.org/10.1021/ol101596s>.
- (202) Hsiao, T.-S.; Chen, T.-L.; Chien, W.-L.; Hong, J.-L. Molecular Design for the Highly-Sensitive Piezochromic Fluorophores with Tri-Armed Framework Containing Triphenyl-Quinoline Moiety. *Dyes and Pigments* **2014**, *103*, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.11.016>.
- (203) Do, K.; Kim, D.; Cho, N.; Paek, S.; Song, K.; Ko, J. New Type of Organic Sensitizers with a Planar Amine Unit for Efficient Dye-Sensitized Solar Cells. *Organic Letters* **2012**, *14* (1), 222–225. <https://doi.org/10.1021/ol203012s>.
- (204) Rueping, M.; Nachtsheim, B. J. A Review of New Developments in the Friedel-Crafts Alkylation - From Green Chemistry to Asymmetric Catalysis. *Beilstein J Org Chem* **2010**, *6*, 6. <https://doi.org/10.3762/bjoc.6.6>.
- (205) Sarvari, M. H.; Sharghi, H. Reactions on a Solid Surface. A Simple, Economical and Efficient Friedel-Crafts Acylation Reaction over Zinc Oxide (ZnO) as a New Catalyst. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69* (20), 6953–6956. <https://doi.org/10.1021/jo0494477>.
- (206) Chan, C. Y. K.; Lam, J. W. Y.; Zhao, Z.; Chen, S.; Lu, P.; Sung, H. H. Y.; Kwok, H. S.; Ma, Y.; Williams, I. D.; Tang, B. Z. Aggregation-Induced Emission, Mechanochromism and Blue Electroluminescence of Carbazole and Triphenylamine-Substituted Ethenes. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2* (21), 4320–4327. <https://doi.org/10.1039/C4TC00097H>.
- (207) Xiong, S.; Fu, X.; Xiang, L.; Yu, G.; Guan, J.; Wang, Z.; Du, Y.; Xiong, X.; Pan, C. Liquid Acid-Catalysed Fabrication of Nanoporous 1,3,5-Triazine Frameworks with Efficient and Selective CO₂ Uptake. *Polymer Chemistry* **2014**, *5* (10), 3424. <https://doi.org/10.1039/c3py01471a>.
- (208) Wang, C.; Hu, B.; Wang, J.; Gao, J.; Li, G.; Xiong, W.-W.; Zou, B.; Suzuki, M.; Aratani, N.; Yamada, H.; et al. Rewritable Multilevel Memory Performance of a Tetraazatetracene Donor-Acceptor Derivative with Good Endurance. *Chemistry - An Asian Journal* **2015**, *10* (1), 116–119. <https://doi.org/10.1002/asia.201402899>.
- (209) Escamilla, I. V.; Ramos, L. F. R.; Escalera, J. S.; Álvarez, A. Studies on the Deprotection of Triisopropylsilylarylacetylene Derivatives. 4.

- (210) van Leusen, A. M.; Hoogenboom, B. E.; Siderius, H. A Novel and Efficient Synthesis of Oxazoles from Tosylmethylisocyanide and Carbonyl Compounds. *Tetrahedron Letters* **1972**, *13* (23), 2369–2372. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)85305-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)85305-3).
- (211) Shen, K.; Fu, Y.; Li, J.-N.; Liu, L.; Guo, Q.-X. What Are the PKa Values of C–H Bonds in Aromatic Heterocyclic Compounds in DMSO? *Tetrahedron* **2007**, *63* (7), 1568–1576. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.12.032>.
- (212) Bordwell, F. G. Equilibrium Acidities in Dimethyl Sulfoxide Solution. *Accounts of Chemical Research* **1988**, *21* (12), 456–463. <https://doi.org/10.1021/ar00156a004>.
- (213) Chen, Z.; Zhang, K. Y.; Tong, X.; Liu, Y.; Hu, C.; Liu, S.; Yu, Q.; Zhao, Q.; Huang, W. Phosphorescent Polymeric Thermometers for In Vitro and In Vivo Temperature Sensing with Minimized Background Interference. *Advanced Functional Materials* **2016**, *26* (24), 4386–4396. <https://doi.org/10.1002/adfm.201600706>.
- (214) Zhang, Y.; Pan, J.; Zhang, C.; Wang, H.; Zhang, G.; Kong, L.; Tian, Y.; Yang, J. High Quantum Yield Both in Solution and Solid State Based on Cyclohexyl Modified Triphenylamine Derivatives for Picric Acid Detection. *Dyes and Pigments* **2015**, *123*, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2015.08.013>.
- (215) Bao, Q.; Li, H.; Li, Y.; He, J.; Xu, Q.; Li, N.; Chen, D.; Wang, L.; Lu, J. Comparison of Two Strategies to Improve Organic Ternary Memory Performance: 3-Hexylthiophene Linkage and Fluorine Substitution. *Dyes and Pigments* **2016**, *130*, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.03.040>.
- (216) Grigoras, M.; Catargiu, A. M.; Ivan, T.; Vacareanu, L.; Minaev, B.; Stromylo, E. Tuning Optical and Electronic Properties of Poly(4,4'-Triphenylamine Vinylene)s by Post-Modification Reactions. *Dyes and Pigments* **2015**, *113*, 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2014.08.016>.
- (217) Pandit, C. R.; Polniaszek, R. P.; Thottathil, J. K. PREPARATION OF 2-SUBSTITUTED OXAZOLES. *Synthetic Communications* **2002**, *32* (15), 2427–2432. <https://doi.org/10.1081/SCC-120006015>.
- (218) Grauert, M.; Bischoff, D.; Dahmann, G.; Kuelzer, R.; Rudolf, K.; Wellenzohn, B. 1,2,4-Triazoles as Allosteric Modulators of Mglu5 Receptor Activity for the Treatment of Schizophrenia of Dementia. WO/2013/083741, June 14, 2013.
- (219) Primas, N.; Bouillon, A.; Lancelot, J.-C.; Rault, S. Synthesis of 2-TIPS-Oxazol-5-Ylboronic Acid Pinacol Ester: Efficient Route to 5-(Het)Aryloxazoles via Suzuki Cross-Coupling Reaction. *Tetrahedron* **2009**, *65* (32), 6348–6353. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.06.023>.
- (220) Jun, C.-H. Transition Metal-Catalyzed Carbon–Carbon Bond Activation. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33* (9), 610–618. <https://doi.org/10.1039/B308864M>.
- (221) Park, Y. J.; Park, J.-W.; Jun, C.-H. Metal–Organic Cooperative Catalysis in C–H and C–C Bond Activation and Its Concurrent Recovery. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41* (2), 222–234. <https://doi.org/10.1021/ar700133y>.
- (222) Labinger, J. A.; Bercaw, J. E. Understanding and Exploiting C–H Bond Activation. *Nature* **2002**, *417* (6888), 507–514. <https://doi.org/10.1038/417507a>.
- (223) Yi, H.; Zhang, G.; Wang, H.; Huang, Z.; Wang, J.; Singh, A. K.; Lei, A. Recent Advances in Radical C–H Activation/Radical Cross-Coupling. *Chemical Reviews* **2017**, *117* (13), 9016–9085. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00620>.
- (224) Chen, X.; Engle, K. M.; Wang, D.-H.; Yu, J.-Q. Palladium(II)-Catalyzed C–H Activation/C–C Cross-Coupling Reactions: Versatility and Practicality. *Angewandte*

- Chemie International Edition* **2009**, *48* (28), 5094–5115. <https://doi.org/10.1002/anie.200806273>.
- (225) Lapointe, D.; Fagnou, K. Overview of the Mechanistic Work on the Concerted Metallation–Deprotonation Pathway. *Chemistry Letters* **2010**, *39* (11), 1118–1126. <https://doi.org/10.1246/cl.2010.1118>.
- (226) Gorelsky, S. I.; Lapointe, D.; Fagnou, K. Analysis of the Concerted Metalation–Deprotonation Mechanism in Palladium-Catalyzed Direct Arylation Across a Broad Range of Aromatic Substrates. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (33), 10848–10849. <https://doi.org/10.1021/ja802533u>.
- (227) Gensch, T.; Hopkinson, M. N.; Glorius, F.; Wencel-Delord, J. Mild Metal-Catalyzed C–H Activation: Examples and Concepts. *Chemical Society Reviews* **2016**, *45* (10), 2900–2936. <https://doi.org/10.1039/C6CS00075D>.
- (228) Bruneau, A.; Brion, J.-D.; Messaoudi, S.; Alami, M. A General Pd/Cu-Catalyzed C–H Heteroarylation of 3-Bromoquinolin-2(1H)-Ones. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (42), 8533–8541. <https://doi.org/10.1039/C4OB01610F>.
- (229) Galvani, G.; Vardhan Reddy, K. H.; Beauvineau, C.; Ghermani, N.; Mahuteau-Betzer, F.; Alami, M.; Messaoudi, S. Conversion of 3-Bromo-2 H -Coumarins to 3-(Benzofuran-2-Yl)-2 H -Coumarins under Palladium Catalysis: Synthesis and Photophysical Properties Study. *Organic Letters* **2017**, *19* (4), 910–913. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b00069>.
- (230) Miura, M.; Pivsa-Art, S.; Satoh, T.; Nomura, M.; Miura, M.; Dyker, G.; Heiermann, J. Palladium-Catalysed Reaction of Aryl Bromides with Metallocenes to Produce Pentaarylated Cyclopentadienes. *Chemical Communications* **1998**, No. 17, 1889–1890. <https://doi.org/10.1039/a804026e>.
- (231) Campeau, L.-C.; Fagnou, K. Palladium-Catalyzed Direct Arylation of Simple Arenes in Synthesis of Biaryl Molecules. *Chemical Communications* **2006**, No. 12, 1253. <https://doi.org/10.1039/b515481m>.
- (232) Alberico, D.; Scott, M. E.; Lautens, M. Aryl–Aryl Bond Formation by Transition-Metal-Catalyzed Direct Arylation. *Chemical Reviews* **2007**, *107* (1), 174–238. <https://doi.org/10.1021/cr0509760>.
- (233) Li, B.; Dixneuf, P. H. Sp² C–H Bond Activation in Water and Catalytic Cross-Coupling Reactions. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (13), 5744. <https://doi.org/10.1039/c3cs60020c>.
- (234) Herrerías, C. I.; Yao, X.; Li, Z.; Li, C.-J. Reactions of C–H Bonds in Water. *Chemical Reviews* **2007**, *107* (6), 2546–2562. <https://doi.org/10.1021/cr050980b>.
- (235) Santoro, S.; Kozhushkov, S. I.; Ackermann, L.; Vaccaro, L. Heterogeneous Catalytic Approaches in C–H Activation Reactions. *Green Chemistry* **2016**, *18* (12), 3471–3493. <https://doi.org/10.1039/C6GC00385K>.
- (236) Pascanu, V.; Hansen, P. R.; Bermejo Gómez, A.; Ayats, C.; Platero-Prats, A. E.; Johansson, M. J.; Pericàs, M. À.; Martín-Matute, B. Highly Functionalized Biaryls via Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Catalyzed by Pd@MOF under Batch and Continuous Flow Regimes. *ChemSusChem* **2015**, *8* (1), 123–130. <https://doi.org/10.1002/cssc.201402858>.
- (237) Lyons, T. W.; Sanford, M. S. Palladium-Catalyzed Ligand-Directed C–H Functionalization Reactions. *Chemical Reviews* **2010**, *110* (2), 1147–1169. <https://doi.org/10.1021/cr900184e>.

- (238) Chanda, A.; Fokin, V. V. Organic Synthesis “On Water.” *Chemical Reviews* **2009**, *109* (2), 725–748. <https://doi.org/10.1021/cr800448q>.
- (239) Brachet, E.; Belmont, P. Palladium-Catalyzed Regioselective Alkynylation of Pyrroles and Azoles under Mild Conditions: Application to the Synthesis of a Dopamine D-4 Receptor Agonist. *The Journal of Organic Chemistry* **2015**, *80* (15), 7519–7529. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01093>.
- (240) Narayan, S.; Muldoon, J.; Finn, M. G.; Fokin, V. V.; Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. “On Water”: Unique Reactivity of Organic Compounds in Aqueous Suspension. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (21), 3275–3279. <https://doi.org/10.1002/anie.200462883>.
- (241) van der Wel, G. K.; Wijnen, J. W.; Engberts, J. B. F. N. Solvent Effects on a Diels–Alder Reaction Involving a Cationic Diene: Consequences of the Absence of Hydrogen-Bond Interactions for Accelerations in Aqueous Media. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61* (25), 9001–9005. <https://doi.org/10.1021/jo9614248>.
- (242) Otto, S.; Blokzijl, W.; Engberts, J. B. F. N. Diels–Alder Reactions in Water. Effects of Hydrophobicity and Hydrogen Bonding. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59* (18), 5372–5376. <https://doi.org/10.1021/jo00097a045>.
- (243) Chandrasekhar, J.; Shariffskul, S.; Jorgensen, W. L. QM/MM Simulations for Diels–Alder Reactions in Water: Contribution of Enhanced Hydrogen Bonding at the Transition State to the Solvent Effect [†]. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106* (33), 8078–8085. <https://doi.org/10.1021/jp020326p>.
- (244) Li, C.-J.; Chen, L. Organic Chemistry in Water. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (1), 68–82. <https://doi.org/10.1039/B507207G>.
- (245) Brogan, A. P.; Dickerson, T. J.; Janda, K. D. Enamine-Based Aldol Organocatalysis in Water: Are They Really “All Wet”? *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (48), 8100–8102. <https://doi.org/10.1002/anie.200601392>.
- (246) Hayashi, Y. In Water or in the Presence of Water? *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (48), 8103–8104. <https://doi.org/10.1002/anie.200603378>.
- (247) Ohnmacht, S. A.; Culshaw, A. J.; Greaney, M. F. Direct Arylations of 2 *H*-Indazoles On Water. *Organic Letters* **2010**, *12* (2), 224–226. <https://doi.org/10.1021/ol902537d>.
- (248) Ohnmacht, S. A.; Mamone, P.; Culshaw, A. J.; Greaney, M. F. Direct Arylations on Water: Synthesis of 2,5-Disubstituted Oxazoles Balsoxin and Texaline. *Chemical Communications* **2008**, No. 10, 1241. <https://doi.org/10.1039/b719466h>.
- (249) Flegeau, E. F.; Popkin, M. E.; Greaney, M. F. Direct Arylation of Oxazoles at C2. A Concise Approach to Consecutively Linked Oxazoles. *Organic Letters* **2008**, *10* (13), 2717–2720. <https://doi.org/10.1021/ol800869g>.
- (250) Turner, G. L.; Morris, J. A.; Greaney, M. F. Direct Arylation of Thiazoles on Water. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (42), 7996–8000. <https://doi.org/10.1002/anie.200702141>.
- (251) Kim, M.-Y.; Vankayalapati, H.; Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Hurley, L. H. Telomestatin, a Potent Telomerase Inhibitor That Interacts Quite Specifically with the Human Telomeric Intramolecular G-Quadruplex. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (10), 2098–2099. <https://doi.org/10.1021/ja017308q>.
- (252) Giddens, A. C.; Boshoff, H. I. M.; Franzblau, S. G.; Barry, C. E.; Copp, B. R. Antimycobacterial Natural Products: Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of the Oxazole-Containing Alkaloid Texaline. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46* (43), 7355–7357. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.08.119>.

- (253) Hodgetts, K. J.; Kershaw, M. T. Ethyl 2-Chlorooxazole-4-Carboxylate: A Versatile Intermediate for the Synthesis of Substituted Oxazoles. *Organic Letters* **2002**, *4* (17), 2905–2907. <https://doi.org/10.1021/ol0262800>.
- (254) Giddens, A. C.; Boshoff, H. I. M.; Franzblau, S. G.; Barry, C. E.; Copp, B. R. Antimycobacterial Natural Products: Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of the Oxazole-Containing Alkaloid Texaline. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46* (43), 7355–7357. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.08.119>.
- (255) Arroniz, C.; Denis, J. G.; Ironmonger, A.; Rassias, G.; Larrosa, I. An Organic Cation as a Silver(I) Analogue for the Arylation of sp^2 and sp^3 C–H Bonds with Iodoarenes. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (9), 3509–3514. <https://doi.org/10.1039/C4SC01215A>.
- (256) Zheng, Q.-Z.; Jiao, N. Ag-Catalyzed C–H/C–C Bond Functionalization. *Chemical Society Reviews* **2016**, *45* (16), 4590–4627. <https://doi.org/10.1039/C6CS00107F>.
- (257) Whitaker, D.; Burés, J.; Larrosa, I. Ag(I)-Catalyzed C–H Activation: The Role of the Ag(I) Salt in Pd/Ag-Mediated C–H Arylation of Electron-Deficient Arenes. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (27), 8384–8387. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b04726>.
- (258) Lotz, M. D.; Camasso, N. M.; Canty, A. J.; Sanford, M. S. Role of Silver Salts in Palladium-Catalyzed Arene and Heteroarene C–H Functionalization Reactions. *Organometallics* **2017**, *36* (1), 165–171. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.6b00437>.
- (259) Lee, S. Y.; Hartwig, J. F. Palladium-Catalyzed, Site-Selective Direct Allylation of Aryl C–H Bonds by Silver-Mediated C–H Activation: A Synthetic and Mechanistic Investigation. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (46), 15278–15284. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b10220>.
- (260) Rouf, A.; Tanyeli, C. Bioactive Thiazole and Benzothiazole Derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *97*, 911–927. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.058>.
- (261) Keri, R. S.; Patil, M. R.; Patil, S. A.; Budagumpi, S. A Comprehensive Review in Current Developments of Benzothiazole-Based Molecules in Medicinal Chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *89*, 207–251. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.059>.
- (262) T. Chhabria, M.; Patel, S.; Modi, P.; S. Brahmkshatriya, P. Thiazole: A Review on Chemistry, Synthesis and Therapeutic Importance of Its Derivatives. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2016**, *16* (26), 2841–2862. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160506130731>.
- (263) de Souza, M. V. N. Synthesis and Biological Activity of Natural Thiazoles: An Important Class of Heterocyclic Compounds. *Journal of Sulfur Chemistry* **2005**, *26* (4–5), 429–449. <https://doi.org/10.1080/17415990500322792>.
- (264) Jin, Z. Muscarine, Imidazole, Oxazole and Thiazole Alkaloids. *Natural Product Reports* **2013**, *30* (6), 869. <https://doi.org/10.1039/c3np70006b>.
- (265) Lu, Y.-J.; Deng, Q.; Hou, J.-Q.; Hu, D.-P.; Wang, Z.-Y.; Zhang, K.; Luyt, L. G.; Wong, W.-L.; Chow, C.-F. Molecular Engineering of Thiazole Orange Dye: Change of Fluorescent Signaling from Universal to Specific upon Binding with Nucleic Acids in Bioassay. *ACS Chemical Biology* **2016**, *11* (4), 1019–1029. <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00987>.
- (266) Allard, N.; Beaupré, S.; Aïch, B. R.; Najari, A.; Tao, Y.; Leclerc, M. Synthesis and Characterization of New Poly(Thieno[3,4-*d*]Thiazole) Derivatives for Photovoltaic

- Applications. *Macromolecules* **2011**, *44* (18), 7184–7187. <https://doi.org/10.1021/ma201360r>.
- (267) Pammer, F.; Jäger, J.; Rudolf, B.; Sun, Y. Soluble Head-to-Tail Regioregular Polythiazoles: Preparation, Properties, and Evidence for Chain-Growth Behavior in the Synthesis via Kumada-Coupling Polycondensation. *Macromolecules* **2014**, *47* (17), 5904–5912. <https://doi.org/10.1021/ma501213g>.
- (268) Nygren, J.; Svanvik, N.; Kubista, M. The Interactions between the Fluorescent Dye Thiazole Orange and DNA. *Biopolymers* **1998**, *46* (1), 39–51. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199807\)46:1<39::AID-BIP4>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199807)46:1<39::AID-BIP4>3.0.CO;2-Z).
- (269) Barman, S.; Mukhopadhyay, S. K.; Biswas, S.; Nandi, S.; Gangopadhyay, M.; Dey, S.; Anoop, A.; Pradeep Singh, N. D. A *p*-Hydroxyphenacyl-Benzothiazole-Chlorambucil Conjugate as a Real-Time-Monitoring Drug-Delivery System Assisted by Excited-State Intramolecular Proton Transfer. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55* (13), 4194–4198. <https://doi.org/10.1002/anie.201508901>.
- (270) Monchaud, D.; Allain, C.; Teulade-Fichou, M.-P. Thiazole Orange: A Useful Probe for Fluorescence Sensing of G-Quadruplex–Ligand Interactions. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2007**, *26* (10–12), 1585–1588. <https://doi.org/10.1080/15257770701548212>.
- (271) Mazuryk, O.; Niemiec, E.; Stochel, G.; Gillaizeau, I.; Brindell, M. Benzothiophen-Pyrazine Scaffold as a Potential Membrane Targeting Drug Carrier. *Journal of Luminescence* **2013**, *140*, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.02.058>.
- (272) Herder, M.; Eisenreich, F.; Bonasera, A.; Grafl, A.; Grubert, L.; Pätzelt, M.; Schwarz, J.; Hecht, S. Light-Controlled Reversible Modulation of Frontier Molecular Orbital Energy Levels in Trifluoromethylated Diarylethenes. *Chemistry - A European Journal* **2017**, *23* (15), 3743–3754. <https://doi.org/10.1002/chem.201605511>.
- (273) Bellale, E.; Naik, M.; Vb, V.; Ambady, A.; Narayan, A.; Ravishankar, S.; Ramachandran, V.; Kaur, P.; McLaughlin, R.; Whiteaker, J.; et al. Diarylthiazole: An Antimycobacterial Scaffold Potentially Targeting PrrB-PrrA Two-Component System. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (15), 6572–6582. <https://doi.org/10.1021/jm500833f>.
- (274) Polshettiwar, V.; Kaushik, M. P. Recent Advances in Thionating Reagents for the Synthesis of Organosulfur Compounds. *Journal of Sulfur Chemistry* **2006**, *27* (4), 353–386. <https://doi.org/10.1080/17415990600733112>.
- (275) Goswami, S.; Maity, A. C.; Das, N. K. Advanced Reagent for Thionation: Rapid Synthesis of Primary Thioamides from Nitriles at Room Temperature. *Journal of Sulfur Chemistry* **2007**, *28* (3), 233–237. <https://doi.org/10.1080/17415990701314069>.
- (276) Schaumann, E. 6.10 Synthesis of Thioamides and Thiolactams. In *Comprehensive Organic Synthesis II*; Elsevier, 2014; pp 411–426. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097742-3.00614-5>.
- (277) Ozturk, T.; Ertas, E.; Mert, O. Use of Lawesson's Reagent in Organic Syntheses. *Chemical Reviews* **2007**, *107* (11), 5210–5278. <https://doi.org/10.1021/cr040650b>.
- (278) Curphey, T. J. Thionation with the Reagent Combination of Phosphorus Pentasulfide and Hexamethyldisiloxane. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67* (18), 6461–6473. <https://doi.org/10.1021/jo0256742>.
- (279) Bagley, M.; Chapaneri, K.; Glover, C.; Merritt, E. Simple Microwave-Assisted Method for the Synthesis of Primary Thioamides from Nitriles. *Synlett* **2004**, *2004* (14), 2615–2617. <https://doi.org/10.1055/s-2004-834812>.

- (280) Walter, W.; Bode, K.-D. Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie IV Synthesen von Thiocarbonsäureamiden. *Angewandte Chemie* **1966**, *78* (10), 517–532. <https://doi.org/10.1002/ange.19660781003>.
- (281) Charette, A. B.; Grenon, M. Mild Method for the Conversion of Amides to Thioamides. *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68* (14), 5792–5794. <https://doi.org/10.1021/jo0344485>.
- (282) Kumar, P.; Roithová, J. Mass Spectrometric Studies of Silver Complexes with a Pyridine Dicarboxamide Ligand: Interconversion of Ag(I) and Ag(III) Oxidation States in the Gas Phase. *European Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *18* (5), 457–463. <https://doi.org/10.1255/ejms.1195>.
- (283) Desimoni, G.; Faita, G.; Quadrelli, P. Pyridine-2,6-Bis(Oxazolines), Helpful Ligands for Asymmetric Catalysts. *Chemical Reviews* **2003**, *103* (8), 3119–3154. <https://doi.org/10.1021/cr020004h>.
- (284) Hallett, A. J.; O'Brien, T. M.; Carter, E.; Kariuki, B. M.; Murphy, D. M.; Ward, B. D. Copper(II) Complexes of Pyridine-Oxazoline (Pyox) Ligands: Coordination Chemistry, Ligand Stability, and Catalysis. *Inorganica Chimica Acta* **2016**, *441*, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.10.032>.
- (285) Huisgen, R.; Szeimies, G.; Möbius, L. 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen. *Chemische Berichte* **1967**, *100* (8), 2494–2507. <https://doi.org/10.1002/cber.19671000806>.
- (286) Huisgen, R. Kinetics and Reaction Mechanisms: Selected Examples from the Experience of Forty Years. *Pure and Applied Chemistry* **1989**, *61* (4), 613–628. <https://doi.org/10.1351/pac198961040613>.
- (287) Yang, M.; Li, J.; Chen, P. R. Transition Metal-Mediated Bioorthogonal Protein Chemistry in Living Cells. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (18), 6511–6526. <https://doi.org/10.1039/C4CS00117F>.
- (288) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (11), 3192–3193. <https://doi.org/10.1021/ja021381e>.
- (289) Beatty, K. E.; Xie, F.; Wang, Q.; Tirrell, D. A. Selective Dye-Labeling of Newly Synthesized Proteins in Bacterial Cells. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (41), 14150–14151. <https://doi.org/10.1021/ja054643w>.
- (290) Deiters, A.; Schultz, P. G. In Vivo Incorporation of an Alkyne into Proteins in Escherichia Coli. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15* (5), 1521–1524. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.12.065>.
- (291) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41* (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- (292) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67* (9), 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- (293) Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V. Ruthenium-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition: Scope and Mechanism. *Journal*

- of the American Chemical Society* **2008**, *130* (28), 8923–8930. <https://doi.org/10.1021/ja0749993>.
- (294) Rasmussen, L. K.; Boren, B. C.; Fokin, V. V. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Aryl Azides and Alkynes. *Organic Letters* **2007**, *9* (26), 5337–5339. <https://doi.org/10.1021/ol701912s>.
- (295) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, *340* (6131), 457–460. <https://doi.org/10.1126/science.1229506>.
- (296) Jin, L.; Tolentino, D. R.; Melaimi, M.; Bertrand, G. Isolation of Bis(Copper) Key Intermediates in Cu-Catalyzed Azide-Alkyne “Click Reaction.” *Science Advances* **2015**, *1* (5), e1500304–e1500304. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500304>.
- (297) Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. Cu-Free Click Cycloaddition Reactions in Chemical Biology. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (4), 1272–1279.
- (298) Hein, C. D.; Liu, X.-M.; Wang, D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharmaceutical Research* **2008**, *25* (10), 2216–2230. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9616-1>.
- (299) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (8), 2952–3015. <https://doi.org/10.1021/cr0783479>.
- (300) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. The Growing Applications of Click Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (8), 1249–1262. <https://doi.org/10.1039/B613014N>.
- (301) Bevilacqua, V.; King, M.; Chaumontet, M.; Nothisen, M.; Gabillet, S.; Buisson, D.; Puente, C.; Wagner, A.; Taran, F. Copper-Chelating Azides for Efficient Click Conjugation Reactions in Complex Media. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (23), 5872–5876. <https://doi.org/10.1002/anie.201310671>.
- (302) Girard, C.; Önen, E.; Aufort, M.; Beauvière, S.; Samson, E.; Herscovici, J. Reusable Polymer-Supported Catalyst for the [3+2] Huisgen Cycloaddition in Automation Protocols. *Organic Letters* **2006**, *8* (8), 1689–1692. <https://doi.org/10.1021/ol060283l>.
- (303) Wilkie, C. A.; Lin, G.; Haworth, D. T.; Thompson, D. W. *Cis* -[Dihalobis(2,4-Pentaedionato)Titanium(IV)] Complexes. In *Inorganic Syntheses*; Shriver, D. F., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2007; pp 145–148. <https://doi.org/10.1002/9780470132500.ch33>.
- (304) Cotton, F. A.; Rice, C. E.; Rice, G. W. The Crystal and Molecular Structures of Bis(2,4-Pentanedionato)Chromium. *Inorganica Chimica Acta* **1977**, *24*, 231–234. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)93880-5](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)93880-5).
- (305) Richert, S. A.; Tsang, P. K. S.; Sawyer, D. T. Ligand-Centered Redox Processes for Manganese, Iron and Cobalt, MnL₃, FeL₃, and CoL₃, Complexes (L = Acetylacetonate, 8-Quinolate, Picolate, 2,2'-Bipyridyl, 1,10-Phenanthroline) and for Their Tetrakis(2,6-Dichlorophenyl)Porphinato Complexes[M(Por)]. *Inorganic Chemistry* **1989**, *28* (12), 2471–2475. <https://doi.org/10.1021/ic00311a044>.
- (306) Lennartson, A. Optical Resolution and Racemisation of [Fe(Acac)₃]. *Inorganica Chimica Acta* **2011**, *365* (1), 451–453. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2010.07.066>.
- (307) Döhring, A.; Goddard, R.; Jolly, P. W.; Krüger, C.; Polyakov, V. R. Monomer–Trimer Isomerism in 3-Substituted Pentane-2,4-Dione Derivatives of Nickel(II). *Inorganic Chemistry* **1997**, *36* (2), 177–183. <https://doi.org/10.1021/ic960441c>.
- (308) Podyachev, S. N.; Sudakova, S. N.; Gimazetdinova, G. S.; Shamsutdinova, N. A.; Syakaev, V. V.; Barsukova, T. A.; Iki, N.; Lapaev, D. V.; Mustafina, A. R. Synthesis, Metal

- Binding and Spectral Properties of Novel Bis-1,3-Diketone Calix[4]Arenes. *New Journal of Chemistry* **2017**, *41* (4), 1526–1537. <https://doi.org/10.1039/C6NJ03381D>.
- (309) Hynes, M. J.; Blanco, C. A.; Mooney, M. T. Metal-Catalysed Ionization of a Cyclic 1,3-Diketone. The Effects of Nickel(II) and Copper(II) on the Ionization of 2-Acetylcyclohexanone. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1991**, No. 12, 2055. <https://doi.org/10.1039/p29910002055>.
- (310) Woodward, A. W.; Frazer, A.; Morales, A. R.; Yu, J.; Moore, A. F.; Campiglia, A. D.; Jucov, E. V.; V. Timofeeva, T.; Belfield, K. D. Two-Photon Sensitized Visible and near-IR Luminescence of Lanthanide Complexes Using a Fluorene-Based Donor– π -Acceptor Diketone. *Dalton Trans.* **2014**, *43* (44), 16626–16639. <https://doi.org/10.1039/C4DT01507J>.
- (311) Bai, G.; Yu, C.; Cheng, C.; Hao, E.; Wei, Y.; Mu, X.; Jiao, L. Syntheses and Photophysical Properties of BF₂ Complexes of Curcumin Analogues. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (10), 1618–1626. <https://doi.org/10.1039/C3OB42201A>.
- (312) Bennett, M. A.; Heath, G. A.; Hockless, D. C. R.; Kovacic, I.; Willis, A. C. Alkene Complexes of Divalent and Trivalent Ruthenium Stabilized by Chelation. Dependence of Coordinated Alkene Orientation on Metal Oxidation State. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120* (5), 932–941. <https://doi.org/10.1021/ja973282k>.
- (313) Tsuji, J. Palladium(II) Acetylacetonate. In *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Ltd, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2001. <https://doi.org/10.1002/047084289X.rp002>.
- (314) Zhou, S.; Xue, X.; Jiang, B.; Tian, Y. Metal Complexes of a Novel Bis- β -Diketone-Type Ligand and Its Copper(II) Complexes of Two-Photon Biological Imaging. *Science China Chemistry* **2012**, *55* (3), 334–340. <https://doi.org/10.1007/s11426-011-4470-0>.
- (315) Yang, R.-N.; Wang, D.-M.; Liu, Y.-F.; Jin, D.-M. Synthesis of Copper(I) β -Diketone Complexes. *Polyhedron* **2001**, *20* (7–8), 585–590. [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(01\)00715-X](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(01)00715-X).
- (316) Parish, E. J.; Li, S. Copper(I) Acetylacetonate. In *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Ltd, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2001. <https://doi.org/10.1002/047084289X.rc203>.
- (317) Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chemical Biology* **2006**, *1* (10), 644–648. <https://doi.org/10.1021/cb6003228>.
- (318) Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. Second-Generation Difluorinated Cyclooctynes for Copper-Free Click Chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (34), 11486–11493. <https://doi.org/10.1021/ja803086r>.
- (319) Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (12), 2253–2255. <https://doi.org/10.1002/anie.200705456>.
- (320) Gordon, C. G.; Mackey, J. L.; Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Houk, K. N.; Bertozzi, C. R. Reactivity of Biarylazacyclooctynones in Copper-Free Click Chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (22), 9199–9208. <https://doi.org/10.1021/ja3000936>.
- (321) Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, A. (Ton) J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Bioconjugation with Strained Alkenes and Alkynes. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44* (9), 805–815. <https://doi.org/10.1021/ar200059z>.

- (322) Dommerholt, J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Topics in Current Chemistry* **2016**, *374* (2). <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0016-4>.
- (323) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44* (9), 666–676. <https://doi.org/10.1021/ar200148z>.
- (324) Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Schoffelen, S.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; van Delft, F. L. Aza-Dibenzocyclooctynes for Fast and Efficient Enzyme PEGylation via Copper-Free (3+2) Cycloaddition. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (1), 97–99. <https://doi.org/10.1039/B917797C>.
- (325) Li, Z.; Ye, T.; Tang, S.; Wang, C.; Ma, D.; Li, Z. Triphenylamine-Based π -Conjugated Dendrimers: Convenient Synthesis, Easy Solution Processability, and Good Hole-Transporting Properties. *Journal of Materials Chemistry C* **2015**, *3* (9), 2016–2023. <https://doi.org/10.1039/C4TC01923G>.
- (326) Ishikawa, T.; Kumamoto, T. Guanidines in Organic Synthesis. *Synthesis* **2006**, *2006* (05), 737–752. <https://doi.org/10.1055/s-2006-926325>.
- (327) Chinchilla, R.; Nájera, C. Recent Advances in Sonogashira Reactions. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40* (10), 5084. <https://doi.org/10.1039/c1cs15071e>.
- (328) Kaupmees, K.; Trummal, A.; Leito, I. Basicities of Strong Bases in Water: A Computational Study. *Croatica Chemica Acta* **2014**, *87* (4), 385–395. <https://doi.org/10.5562/cca2472>.
- (329) Nigh, W. G. The Gabriel Synthesis of Benzylamine: An Undergraduate Organic Experiment. *Journal of Chemical Education* **1975**, *52* (10), 670. <https://doi.org/10.1021/ed052p670>.
- (330) Liu, C.; Li, T.; Rosi, N. L. Strain-Promoted “Click” Modification of a Mesoporous Metal–Organic Framework. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (46), 18886–18888. <https://doi.org/10.1021/ja307713q>.
- (331) Meeuwissen, S. A.; Debets, M. F.; van Hest, J. C. M. Copper-Free Click Chemistry on Polymersomes: Pre- vs. Post-Self-Assembly Functionalisation. *Polym. Chem.* **2012**, *3* (7), 1783–1795. <https://doi.org/10.1039/C2PY00466F>.
- (332) Campbell-Verduyn, L. S.; Mirfeizi, L.; Schoonen, A. K.; Dierckx, R. A.; Elsinga, P. H.; Feringa, B. L. Strain-Promoted Copper-Free “Click” Chemistry for ^{18}F Radiolabeling of Bombesin. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (47), 11117–11120. <https://doi.org/10.1002/anie.201105547>.
- (333) Azagarsamy, M. A.; Anseth, K. S. Wavelength-Controlled Photocleavage for the Orthogonal and Sequential Release of Multiple Proteins. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (51), 13803–13807. <https://doi.org/10.1002/anie.201308174>.
- (334) Banerjee, A.; Singh, J.; Dasgupta, D. Fluorescence Spectroscopic and Calorimetry Based Approaches to Characterize the Mode of Interaction of Small Molecules with DNA. *Journal of Fluorescence* **2013**, *23* (4), 745–752. <https://doi.org/10.1007/s10895-013-1211-0>.
- (335) Dumat, B. Sondes fluorescentes vinyl-triphénylamines optimisées pour la microscopie biphotonique : Etude des interactions non covalentes avec l'ADN et la HSA et application à l'imagerie cellulaire. Thèse, Université Paris-Sud 11 – Faculté des sciences d'Orsay Ecole doctorale de chimie de Paris-Sud – ED470, 2012.

- (336) Largy, E. Ciblage d'acides nucléiques de G-quaruplexes : Synthèse et développement de méthodes pour l'analyse et le criblage de ligands sélectifs multimodaux. Thèse, Université Paris-Sud 11 – Faculté des sciences d'Orsay Ecole doctorale de chimie de Paris-Sud – ED470: Paris, 2011.
- (337) Decian, A.; Guittat, L.; Kaiser, M.; Sacca, B.; Amrane, S.; Bourdoncle, A.; Alberti, P.; Teuladefichou, M.; Lacroix, L.; Mergny, J. Fluorescence-Based Melting Assays for Studying Quadruplex Ligands. *Methods* **2007**, *42* (2), 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.10.004>.
- (338) Piston, D. W.; Kremers, G.-J. Fluorescent Protein FRET: The Good, the Bad and the Ugly. *Trends in Biochemical Sciences* **2007**, *32* (9), 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.08.003>.
- (339) Jares-Erijman, E. A.; Jovin, T. M. FRET Imaging. *Nature Biotechnology* **2003**, *21* (11), 1387–1395. <https://doi.org/10.1038/nbt896>.
- (340) Mergny, J. L.; Maurizot, J. C. Fluorescence Resonance Energy Transfer as a Probe for G-Quartet Formation by a Telomeric Repeat. *Chembiochem* **2001**, *2* (2), 124–132.
- (341) Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **1948**, *437* (1–2), 55–75. <https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>.
- (342) Roy, R.; Hohng, S.; Ha, T. A Practical Guide to Single-Molecule FRET. *Nature Methods* **2008**, *5* (6), 507–516. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1208>.
- (343) Monchaud, D.; Allain, C.; Bertrand, H.; Smargiasso, N.; Rosu, F.; Gabelica, V.; De Cian, A.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P. Ligands Playing Musical Chairs with G-Quadruplex DNA: A Rapid and Simple Displacement Assay for Identifying Selective G-Quadruplex Binders. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1207–1223. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.02.019>.
- (344) Monchaud, D.; Allain, C.; Teulade-Fichou, M.-P. Thiazole Orange: A Useful Probe for Fluorescence Sensing of G-Quadruplex–Ligand Interactions. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2007**, *26* (10–12), 1585–1588. <https://doi.org/10.1080/15257770701548212>.
- (345) Largy, E.; Hamon, F.; Teulade-Fichou, M.-P. Development of a High-Throughput G4-FID Assay for Screening and Evaluation of Small Molecules Binding Quadruplex Nucleic Acid Structures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *400* (10), 3419–3427. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5018-z>.
- (346) Monchaud, D.; Allain, C.; Teulade-Fichou, M.-P. Development of a Fluorescent Intercalator Displacement Assay (G4-FID) for Establishing Quadruplex-DNA Affinity and Selectivity of Putative Ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16* (18), 4842–4845. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.06.067>.
- (347) *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*; Fasman, G. D., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1996. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2508-7>.
- (348) Masiero, S.; Trotta, R.; Pieraccini, S.; De Tito, S.; Perone, R.; Randazzo, A.; Spada, G. P. A Non-Empirical Chromophoric Interpretation of CD Spectra of DNA G-Quadruplex Structures. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8* (12), 2683. <https://doi.org/10.1039/c003428b>.
- (349) Dumat, B.; Bordeau, G.; Faurel-Paul, E.; Mahuteau-Betzer, F.; Saettel, N.; Bombled, M.; Metgé, G.; Charra, F.; Fiorini-Debuisschert, C.; Teulade-Fichou, M.-P. N-Phenyl-Carbazole-Based Two-Photon Fluorescent Probes: Strong Sequence Dependence of the Duplex vs Quadruplex Selectivity. *Biochimie* **2011**, *93* (8), 1209–1218. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.05.035>.

- (350) Chen, C.-H.; Hu, T.-H.; Huang, T.-C.; Chen, Y.-L.; Chen, Y.-R.; Cheng, C.-C.; Chen, C.-T. Delineation of G-Quadruplex Alkylation Sites Mediated by 3,6-Bis(1-Methyl-4-Vinylpyridinium Iodide)Carbazole-Aniline Mustard Conjugates. *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21* (48), 17379–17390. <https://doi.org/10.1002/chem.201502595>.
- (351) Jha, K. K.; Samad, A.; Kumar, Y.; Shaharyar, M.; Khosa, R. L.; Jain, J.; Kumar, V.; Singh, P. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 1,3,4-Oxadiazole Derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45* (11), 4963–4967. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.08.003>.
- (352) Othman, A. A.; Kihel, M.; Amara, S. 1,3,4-Oxadiazole, 1,3,4-Thiadiazole and 1,2,4-Triazole Derivatives as Potential Antibacterial Agents. *Arabian Journal of Chemistry* **2014**. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.09.003>.
- (353) Hu, Y.; Li, C.-Y.; Wang, X.-M.; Yang, Y.-H.; Zhu, H.-L. 1,3,4-Thiadiazole: Synthesis, Reactions, and Applications in Medicinal, Agricultural, and Materials Chemistry. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (10), 5572–5610. <https://doi.org/10.1021/cr400131u>.
- (354) Hassan, M. F.; Rauf, A. Synthesis and Multi-Spectroscopic DNA Binding Study of 1,3,4-Oxadiazole and 1,3,4-Thiadiazole Derivatives of Fatty Acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2016**, *153*, 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.09.005>.

7. TABLE DES LÉGENDES

Figure 1 Dessin des "cellules" de liège de Robert Hooke à gauche, dessin d'observation de Van Leeuwenhoek et schéma de son microscope à droite.	28
Figure 2 Représentation d'une cellule eucaryote.	29
Figure 3 Localisation de l'ADN dans la cellule.	29
Figure 4 Les quatre bases azotées de l'ADN.	30
Figure 5 Cliché 51 à gauche et sa résolution à droite.	31
Figure 6 Représentation de l'ADN selon Watson et Crick.	32
Figure 7 Organisation d'un brin d'ADN selon Watson et Crick.	32
Équation 1 Postulats d'Erwin Chargaff.	33
Figure 8 Equilibre céto-énolique et amino-imino et liaison hydrogène entre les deux paires de bases.	33
Figure 9 Représentation de l'ADN et des deux brins antiparallèles.	34
Figure 10 Photo des deux scientifiques et leur modèle d'ADN.	34
Figure 11 Représentation de l'ADN et de ses composants. (En gris les β -D- désoxyriboses relié entre eux par des groupements phosphate en violet, en rouge l'adénine, en vert la cytosine, en jaune la thymine et en bleu la guanine).	35
Figure 12 Représentation des dimensions de l'ADN et de ses sillons. À gauche.	36
Figure 13 Topologie des sillons de l'ADN (Jaune : méthyl, Rouge : Oxygène et Azote, Bleue : groupement basique).	37
Figure 14 Comparaison entre les appariements de Watson et Crick et les appariements non canoniques de Hoogsteen.	38
Figure 15 Représentation d'un triplex d'ADN à gauche et d'un G-quadruplex à droite.	39
Figure 16 Représentation de l'ADN et de ses niveaux de condensation.	40
Figure 17 Principe de semi-conservation de l'ADN. Les brins rouges et bleus de la première génération se retrouvent en troisième génération.	42
Figure 18 Représentation du phénomène de réplication de l'ADN et de ses différents complexes protéiques.	43
Figure 19 Différences entre l'ARN à gauche et l'ADN à droite.	44
Figure 20 Représentation du phénomène de transcription.	45
Figure 21 Récapitulatif des dommages faits à l'ADN.	46
Figure 22 Modifications chimiques résultant des dommages à l'ADN.	46
Figure 23 Division cellulaire de cellules saines à gauche et de cellules endommagées à droite.	47
Figure 24 Représentation des tétrades de guanines à gauche, des G4 au centre (forces électrostatiques en rouge et liaisons hydrogène en bleu) et à droite une vue de haut des G4 avec le cation au centre.	48
Figure 25 Différents types de G4 et les conformères possibles.	49
Figure 26 Localisations possibles des G4.	50
Figure 27 Localisation des télomères.	50
Figure 28 Différentes utilités des G-quadruplex au niveau des télomères. (a : Protection fournie par les G-quadruplex de la dégradation par les nucléases ou autres enzymes. b G4	

impliqués dans la structuration de la cellule. c: Protéines se liant aux G4 empêchant les télomérasés d'agir.....	51
Figure 29 Contrainte provoquée par la présence d'un G4 pendant la réplication.....	52
Figure 30 Présence des G4 au niveau des origines de réplication.....	52
Figure 31 Rôles des G4 pendant l'étape de transcription.....	53
Tableau 1 Récapitulatif des tailles moyennes de sillons pour les trois motifs principaux de l'ADN.....	54
Figure 32 Différences de taille de sillon entre les séquences riches en AT (à gauche) et en CG (à droite).....	54
Figure 33 Schéma de recrutement des complexes protéiques pour la transcription.	55
Figure 34 TBP dans le complexe protéique TFIID.....	56
Figure 35 Représentation tridimensionnelle de la TBP lié à l'ADN, avec en orange et rouge la séquence TATA courbée par la TBP, et en bleu et blanc la séquence ADN.	56
Figure 36 Caryotype montrant un site fragile sur le chromosome 16.	58
Figure 37 Représentation des acides aminés (P : Proline, R : Arginine, G : Glycine, K : Lysine) affins de la séquence AT.....	60
Figure 38 Les différents modes d'interactions entre l'ADN et un ligand.	62
Figure 39 Potentiel électrostatique des zones riches en GC à gauche et en AT à droite. ⁹⁷	63
Figure 40 Cristal d'ADN intercalé par deux molécules de Doxorubicine. (PDB :151d)	64
Figure 41 Structure du Berenil (PDB : 2grv) et intercalation de celui-ci dans les séquences riches en AT du petit sillon de l'ADN.	65
Figure 42 Complexe [Rh(phi)(Me ₂ trien)] ³⁺ reconnaissant les séquences TCGA complexé par intercalation à l'ADN.	66
Figure 43 Structures d'agents réticulants des bases puriques de l'ADN à base de platine.	66
Figure 44 Structure de la nétoprosine	67
Figure 45 <i>Aspergillus flavus</i> et sa contamination de graines.....	68
Figure 46 Mécanisme d'action de l'aflatoxine avec la guanine.	68
Figure 47 Complexe AFB1-guanine en jaune et bleu clair. (PDB : 1mk6)	69
Figure 48 Structure des azinomycines A et B. Mécanisme de liaison covalente avec l'ADN, ici sur un résidu guanine en bleu et adénine en vert.	70
Figure 49 Structure de la neocarzinostatine.	71
Figure 50 Néocarzinostatine insérée dans l'ADN. Le groupement naphthoate en rouge est intercalé entre les paires de bases et le reste de la molécule est présent dans le grand sillon de l'ADN. (PDB : 1mp7)	71
Figure 51 Mécanisme de formation de l'espèce radicalaire de la neocarzinostatine.	72
Figure 52 Structure de la doxorubicine.....	73
Figure 53 Deux molécules de doxorubicines interagissant avec l'ADN. Le polycycle en vert est bien intercalé entre les paires de bases et le cycle pyranique dans le sillon de l'ADN. (PDB : 215d).....	73
Figure 54 La camptothécine et ses analogues anti-tumorales.	74
Figure 55 Camptothécine (en jaune) intercalée dans l'ADN avec une cassure du brin créant trois brins d'ADN (rose, bleu et vert). (PDB : 1t8i).....	74
Figure 56 Bromure d'éthidium et son substitut l'iodure de propidium.	75
Figure 57 Intercalation du bromure d'éthidium dans l'ADN.....	75

Figure 58 Exemple de gène stérique provoqué par le bromure d'éthidium. (Ici une hélicase ne pouvant pas dérouler le double brin d'ADN).	76
Figure 59 Structure générale de la famille des duocarmycines, la duocarmycine A et son mécanisme d'intercalation.....	77
Figure 60 Duocarmycine SA liée à un résidu adénine en rose insérée dans le petit sillon de l'ADN. La partie indole en rouge est logée dans le sillon de l'ADN tandis que le noyau tricyclique en bleu s'intercale dans l'ADN. (PDB : 1dsa)	78
Figure 61 Structures du CC-1065 et de la duocarmycine SA.....	79
Figure 62 Analogues de la duocarmycine	79
Figure 63 Exemples de structures de composés de la famille des diarylamidines (structures non salifiées).	80
Figure 64 DAPI inséré dans une séquence riche en AT à gauche (PDB : 1d30) et cellule de glande salivaire marquée au DAPI à droite.	81
Figure 65 Insertion du berenil dans une séquence riche en AT de l'ADN. (PDB : 2gvr)	82
Figure 66 Insertion de la pentamidine dans une séquence riche en AT de l'ADN. (PDB : 1prp)	82
Figure 67 Hoechst 33258 et ses analogues communément utilisés.....	83
Figure 68 Le Hoechst 33258 en rose inséré dans un sillon riche en AT, le cycle piperazinique pointant vers nous. (PDB : 1dnh)	83
Figure 69 Fluorescence de l'ADN de cellule HeLa (lignée de cellules cancéreuses) grâce à Hoechst 33258.....	84
Figure 70 Exemple de co-marquage d'une cellule avec en bleu le Hoechst 33258 marquant le noyau, en vert le talin-GFP marquant le cytosquelette et en rouge un marqueur de mitochondrie (ThermoFischer).	85
Figure 71 Schéma de construction de la sonde de l'équipe du docteur Hamachi.	86
Figure 72 Motif général des sondes de l'équipe du docteur Teulade-Fichou (A : Accepteur, π : Système π , D : donneur).....	87
Figure 73 Première série de ligands basés sur le noyau triphénylamine.	87
Figure 74 TP-3Py à gauche et TP-3BZim à droite inséré dans un sillon de l'ADN. Le troisième bras pointe vers l'extérieur.	88
Tableau 2 Récapitulatif des données spectrales (référence Rhodamine 101 dans l'éthanol) et constantes d'affinité (K_d) pour les zones riches en AT de la première série de ligands.	88
Figure 75 Marquage de cellules MRC-5 avec $2\mu\text{M}$ de TP-2BZim, $2\mu\text{M}$ de TO-PRO et $2\mu\text{M}$ de PI (iodure de propidium).	89
Figure 76 Schéma général de sonde destinée à piéger des éléments présents dans des zones d'intérêts.	91
Figure 77 Structure de la sonde envisagée.	93
Figure 78 Principe de la sonde.	94
Figure 79 Analyse rétrosynthétique de la sonde envisagée.	95
Figure 80 Structure des composés azaphiles étudiés au laboratoire.	100
Figure 81 Noyau bicyclique pyranoquinone (pointillé) et dihydropyranoquinone, epicocconone et quelques composés naturels azaphiles.	101
Figure 82 L'epicocconone, sa réaction avec les amines primaires et ses formes fluorescentes.	102

Figure 83 Comportement spectral de l'epicocconone native en vert et bioconjuguée en orange (trait pointillé : longueur d'onde d'excitation. Trait plein : longueur d'onde d'émission).	103
Figure 84 Comparaisons de marquage sur gel d'électrophorèse de protéines solubles de souris entre l'epicocconone, le SYPRO Ruby et le nitrate d'argent.	104
Figure 85 Réversibilité de l'epicocconone avec les protéines et propriétés spectrales.	105
Figure 86 Réversibilité de l'analogue naphtyle avec les protéines et propriétés spectrales.	105
Tableau 3 Tableau comparatif de l'analogue naphtyle et l'epicocconone.	106
Figure 87 Marquage par fluorescence de cellules. a, d, g marquage de cellules par l'analogue naphtyle. b marquage du noyau par Syto 21, e marquage de l'appareil de golgi par la GFP, h marquage des mitochondries. c, superposition des image a et b, f superposition des images d et e, i superposition des image g et h. ¹⁸⁴	107
Figure 88 Analyse rétrosynthétique de la préparation des analogues de l'epicocconone 1.	108
Figure 89 Mécanisme réactionnel de l'acylfuranonisation.	109
Figure 90 Régiosélectivité de la réaction d'acylfuranonisation. En orange la cyclisation en position 8 (produit cinétique), et en vert la cyclisation en position 6 (produit thermodynamique).	109
Figure 91 Analyse rétrosynthétique de l'alcool désaromatisé.	110
Figure 92 Schéma synthétique de l'alcool désaromatisé 2.	111
Figure 93 Mécanisme de l'étape clef de désaromatisation oxydante.	111
Figure 94 Exemple de précurseurs d'acylcétène.	112
Figure 95 Synthèse des β -céto-dioxinones	112
Figure 96 Rétrosynthèse de la dioxinone souhaitée.	113
Figure 97 Synthèse de l'ester 17, précurseur de la dioxinone 16.	113
Figure 98 Fin de la synthèse de la β -céto-dioxinone souhaitée 16.	114
Figure 99 Etape d'acylfuranonisation entre les deux composés clefs 16 et 2.	115
Figure 100 Réactions parasites se produisant lors de l'étape d'acylfuranonisation.	116
Figure 101 Schéma de la sonde désirée.	117
Figure 102 Seconde série de ligands synthétisés.	118
Tableau 4 Données spectrales de la seconde génération de ligands en solution. (ND : Non défini)	118
Figure 103 Insertion du dérivé TP-2BZim (1 ^{ère} génération) en jaune et TP-2(Ox5BZim) (2 nd génération) en bleu dans un sillon riche en AT de l'ADN.	118
Figure 104 Insertion du dérivé TP-2Py (1 ^{ère} génération) en jaune, TP-2Ox5Py (2 ^{ème} génération) en violet et TP-2Ox2Py (2 ^{ème} génération) en bleu, dans un sillon riche en AT de l'ADN.	119
Figure 105 Résultat de dichroïsme circulaire du composé TP-2Ox5Py à gauche et du composé TP-2Ox2Py à droite.	119
Figure 106 Marquage de cellules HeLa avec 2 μ M de : C) TP-3Ox5BZim et A) TP-2Ox5Py	120
Figure 107 Récapitulatif des différentes familles de ligands des zones riches en AT de deuxième génération développées par l'équipe du docteur Teulade-Fichou.	120
Figure 108 Coupure rétrosynthétique envisagée pour la préparation de la sonde.	121
Figure 109 Première approche de synthèse envisagée.	122
Figure 110 Deuxième approche de synthèse envisagée.	122

Figure 111 Troisième approche de synthèse envisagée.	123
Figure 112 Synthèse du composé 39.	124
Figure 113 Étape de Sonogashira et formation des noyaux oxazoles.	125
Figure 114 Différence de pKa entre le proton de l'alcyne vrai et le proton en position 2 de l'oxazole.....	125
Figure 115 Fonctionnalisation de la position 2 de l'oxazole par réaction de C-H activation.	126
Figure 116 Etape de déprotection du groupement TIPS présent sur la fonction alcyne.....	126
Tableau 5 Récapitulatif des conditions de déprotection du groupement TIPS.	127
Figure 117 Synthèse du composé 31.	128
Figure 118 Echec de synthèse du composé 39.	128
Figure 119 Tentative d'acylation de Friedel-Craft.....	129
Tableau 6 Tableau récapitulatif des tentatives d'acylation de Friedel-Craft.....	129
Figure 120 Stratégies de synthèse convergente utilisant un couplage de Suzuki.	131
Figure 121 Synthèse des fragments 66a et 66b.	132
Figure 122 Mécanisme de cyclo-déshydratation utilisant le réactif d'Eaton.	132
Figure 123 Synthèse du composé 64.	132
Figure 124 Tentatives de borylation du noyau oxazole-pyridine 64.....	133
Tableau 7 Tableau récapitulatif des conditions utilisées pour la borylation du noyau 64. ...	133
Figure 125 Tentatives d'hallogénéation du composé 64.	133
Tableau 8 tableau récapitulatif des conditions utilisées pour l'hallogénéation du composé 64.	134
Figure 126 Réaction de C-H activation envisagée entre les composés 66a et 64.	134
Figure 127 Mécanisme général de C-H activation. ²²⁷	135
Figure 128 Conditions classiques utilisées pour les réactions de C-H activation de Miura... ..	135
Figure 129 Exemple d'amélioration d'une réaction de Diels-Alder avec l'effet « on water » décrit par Sharpless.....	137
Figure 130 Exemple de l'amélioration d'une addition nucléophile d'une pipérazine sur un époxyde avec effet « on water » décrit par Sharpless.....	137
Figure 131 Exemples de composés synthétisés par l'équipe de Greaney en utilisant sa méthodologie.	139
Figure 132 Autres exemples de C-H activation « on water » effectués par l'équipe de Greaney.	139
Figure 133 Structures de trois produits naturels possédant un ou des motifs oxazoles.....	140
Figure 134 Exemples de C-H activations de la position 5 de trois dérivés oxazoles.....	140
Figure 135 Exemples de C-H activations de la position 2 du 5-phényl-oxazole.....	141
Figure 136 Synthèse totale de la Balsoxine en deux étapes par l'équipe de Greaney.....	141
Figure 137 Synthèse totale de la Texaline en deux étapes par l'équipe de Greaney.....	141
Figure 138 Deux rôles supposés des sels d'argent dans les réactions de C-H activation.	142
Figure 139 Différents rôles tenus par l'argent dans les réactions de C-H activation.	143
Figure 140 Cycle catalytique proposé par l'équipe du professeur Larossa.	144
Figure 141 Étape de C-H activation « on water » adaptée de la méthodologie de l'équipe de Greaney.	146
Figure 142 Comparaison des deux voies de synthèse. À gauche l'ancienne voie et à droite la nouvelle voie convergente.	147

Tableau 9 Tableau récapitulatif des deux voies de synthèse d'obtention des ligands Tp-2Ox2Py.....	148
Figure 143 Exemples de produits naturels et synthétiques possédant des groupements thiazoles ou benzothiazoles.	148
Figure 144 Structure générale des nouveaux ligands désirés issus de l'étape de C-H activation « on water ».	149
Figure 145 Fragments envisagés pour la synthèse des ligands désirés.	149
Figure 146 Synthèse des intermédiaires 129 et 130 nécessaires à l'étape de CH activation.	150
Figure 147 Synthèse des composés 97 et 98.	150
Figure 148 Possible chélation avec le composé 106 avec R représentant un sel présent dans le milieu.	151
Figure 149 Obtention des isomères 5 et 2 oxazoles en partant d'un seul et même aldéhyde.	151
Figure 150 Mécanisme hypothétique de formation du noyau thiazole par cyclisation déshydratante.	152
Figure 151 Synthèse des intermédiaires thiazoles-pyridines 99, 100 et 101.	152
Figure 152 Résumé des différentes molécules synthétisées par étape de C-H activation....	153
Figure 153 Possibilité de complexation des sels d'argent avec les dérivés oxazoles et thiazoles.	153
Figure 154 Etape de méthylation de la série des TP-2Ox5Py.....	154
Figure 155 Etape de méthylation des composés de la série TP-2Thia-2Py.	155
Figure 156 Résumé des produits synthétisés.....	156
Figure 157 Coupure rétrosynthétique envisagée pour la préparation de la sonde.	157
Figure 158 Formation d'un triazole 1,4 et 1,5 par cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre (I) (en rouge) ou au ruthénium (II) (en bleu).	158
Figure 159 Analogue de l'epicocconone utilisé en chimie click.	159
Figure 160 Tests de réaction de cycloaddition catalysée au cuivre de Huisgen selon les conditions optimisées au sein du laboratoire.	160
Tableau 10 Conditions réactionnelles utilisées pour élaborées la réaction de CuAAC.	160
Figure 161 Tentative de validation de CuAAC avec le composé 131.	161
Figure 162 Conditions utilisées par le docteur Oger sur un analogue de l'epicocconone fluorène 131.	161
Figure 163 Complexe possible formé entre la fonction céto-énol du squelette de l'epicocconone et les sources de cuivre.....	162
Figure 164 Mécanisme de la réaction de SPAAC et quelques exemples de cyclo-octynes commerciaux.	163
Figure 165 Réaction de SPAAC effectuée au sein du groupe entre le DIBAC 134 et le composé 131.....	164
Figure 166 Stratégie de SPAAC envisagée.....	165
Figure 167 Stratégie de synthèse de liaison du linker cyclo-octyne au ligand de l'ADN.	166
Figure 168 Quaternarisation des pyridines sous forme de pyridinium.	166
Figure 169 Tentative de couplage de Sonogashira.	167
Figure 170 Schéma de synthèse permettant l'obtention de la molécule 105.....	168

Figure 171 Tentative de couplage en modulant le solvant du couplage de Sonogashira.	168
Tableau 11 Conditions utilisées pour effectuer le couplage de Sonogashira.....	169
Figure 172 Synthèse du composé 117.	170
Figure 173 Rappel des structures des cyclo-octynes commerciales utilisées (Preuve de concept avec le DIBAC et synthèse de la sonde avec le DBCO-NHS).....	171
Figure 174 Activation du cyclo-octyne sous forme de NHS.	171
Figure 175 Spectre de masse basse résolution du brut réactionnel du composé 103.....	172
Figure 176 Couplage peptidique entre les composés 139 et 144.....	173
Figure 177 Spectre de masse du brut réactionnel du composé 140.	173
Figure 178 Etape de SPAAC permettant la liaison entre le ligand de l'ADN 144 et le piège à protéines 24.	174
Figure 179 Spectre de masse du brut réactionnel indiquant la présence majoritaire du produit 119 désiré.	175
Figure 180 Séquence réactionnelle impliquant le produit commercial 135, le ligand de l'ADN 144 et le piège à protéines 24.....	176
Figure 181 Profil HPLC et UV des composés 146.	177
Figure 182 HRMS du produit 146.....	177
Figure 183 Coupure synthétique clef de la sonde 146.	178
Figure 184 Les différents ligands obtenus durant cette thèse et l'étape de C-H activation « on water » clef.....	179
Figure 185 Structure du TO (thiazole orange) et ses conformations dans l'ADN et en solution.	185
Figure 186 Rappel des structures leaders synthétisés à l'Institut Curie.	186
Figure 187 Courbe d'hyperchromicité de l'ADN à gauche avec en vert la courbe de l'ADN hélicoïdal, et en rouge l'ADN déstructuré. À droite, principe d'UV-melting de l'ADN avec en bleu l'ADN seul, et en rouge l'ADN en présence de ligand.	187
Figure 188 Principe de FRET-melting d'un système G-quadruplex avec en vert la fluorescéine donneuse et en rouge la tetraméthylrhodamine (TAMRA) accepteuse.....	187
Figure 189 Courbes de fusion de FRET-Melting d'un ligand affin pour l'ADN, avec en noir la courbe sans ligand, et en bleu la courbe avec ligand. ³³⁶	188
Figure 190 Principe de la méthode de FID. ^{335,336}	189
Tableau 12 Propriétés spectroscopiques des différents marqueurs couramment utilisés. ...	190
Figure 191 Principe du dichroïsme circulaire. D et G sont les sens de polarisation de la lumière (respectivement droite et gauche), qui sont modifiées en passant dans l'échantillon. A _D et A _G correspondent aux amplitudes lumineuses dont la différence ΔA correspond à la différence de ces amplitudes, correspondant au spectre de CD.....	190
Figure 192 Rappel des structures utilisées pour les expériences de FID.	194
Figure 193 Propriétés spectroscopiques de la sonde 146.	195
Figure 194 Évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la quantité de ligand ajoutée à un échantillon de C-Myc.	196
Figure 195 FID des sondes PhenDC3, TP-2Ox-2Py ⁴ et 146 en présence de C-Myc.....	197
Figure 196 Expériences de FID effectuées sur différentes séquences ADN et différents ligands. Chaque courbe représente le déplacement du TO-PRO-3 en fonction du nombre d'équivalents de ligands ajoutés, avec en vert la DC ₅₀	198

Figure 197 Évolution de l'exaltation de fluorescence en fonction de la quantité de ligand ajoutée.....	199
Figure 198 FID des sondes 146 et TP-2Ox-2Py ⁴ en présence de DS-26.	199
Tableau 13 Tableaux récapitulatifs des expériences de FRET-Melting avec les différentes sondes en présence de F-21-T à gauche et de F-Pu24T-T à droite.	200
Figure 199 A gauche un ligand non sélectif des quadruplex avec déstabilisation de ce dernier. À droite un ligand sélectif des quadruplex. En noir la séquence ADN seule, en bleu la séquence d'ADN avec le ligand étudié, en violet foncé la séquence ADN en présence du ligand étudié d'une quantité X du compétiteur, et en violet clair la séquence ADN en présence du ligand étudié et une quantité Y du compétiteur (Y>X)	202
Tableau 14 Tableau récapitulatif des données de FRET-Melting avec la séquence F-21-T et les ligands PhenDC3, TP-2Ox-2Py ⁴ et 146.	202
Figure 200 Graphique représentant les $\Delta T_{1/2}$ des ligands avec la séquence F-21-T.....	203
Tableau 15 Tableau récapitulatif des données de FRET-Melting avec la séquence F-Pu24T-T et les ligands PhenDC3, TP-2Ox-2Py ⁴ et 146.	204
Figure 201 Graphique représentant les $\Delta T_{1/2}$ des ligands avec la séquence F-Pu24-T.....	204
Figure 202 Caractéristiques spectroscopiques de la série thiazole (TP-2Thia-2Py).....	206
Figure 203 Caractéristiques spectroscopiques de la série oxazole (TP-2Ox-5Py).....	206
Tableau 16 Tableau récapitulatif des caractéristiques spectroscopiques des ligands.	206
Figure 204 Structures des nouveaux ligands synthétisés.	207
Figure 205 Résumé des données de F/F ₀ en fonction du nombre d'équivalents de DrewAT ajoutés sur les différentes sondes synthétisées.	208
Figure 206 Images cellulaires de la sonde 121 en présence de cellules vivantes et fixées. ..	209
Figure 207 Images cellulaires de la sonde 120 en présence de cellules vivantes et fixées. ..	210
Figure 208 Images cellulaires de la sonde 122 en présence de cellules vivantes et fixées. ..	211
Figure 209 Images cellulaires de la sonde 123 en présence de cellules vivantes et fixées. ..	212
Tableau 17 Tableau récapitulatif des ligands synthétisés.....	215
Figure 210 Rappel de la structure de la sonde 146 synthétisée durant ces travaux de thèse.	220
Figure 211 Etape de C-H activation « on water » permettant d'aboutir à l'intermédiaire 67 clef.	221
Figure 212 Etape de liaison des deux partenaires de la sonde 146 par réaction SPAAC.....	222
Figure 213 Les 4 nouveaux ligands synthétisés durant ces travaux de thèse.	223
Figure 214 Images cellulaires des ligands 120 et 123	224
Figure 215 Modulations possibles des ligands.....	224
Figure 216 Stratégie de synthèse compatible avec les conditions de CuAAC.	225

Résumé

La compréhension des mécanismes biologiques et l'implication des protéines dans ces mécanismes ont toujours été un enjeu important pour les biologistes. Les zones à risques de l'ADN impliquées dans les cancers, comme les G-quadruplex, les zones riches en Adénine-Thymine et leurs environnements proches sont particulièrement étudiés depuis de nombreuses années. L'essor des techniques d'analyses par fluorescence a permis aux scientifiques de mettre au point des sondes marquant ces domaines avec toujours plus de précision et de sensibilité. Cependant, de nombreuses interrogations existent sur la nature des interactions entre ces zones de l'ADN et les protéines.

Afin de répondre à cette problématique, la synthèse d'une **sonde pro-fluorescente** alliant un **ligand de l'ADN** (conçu d'après les travaux des équipes de l'Institut Curie, UMR 176) à un **piège à protéines** (basé sur le squelette de l'epicocconone) a été réalisée et son efficacité biologique a été évaluée. Ces deux parties ont été assemblées en utilisant une réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire spontanée entre un azoture et un alcyne contraint (SPAAC).

De plus, au cours de ces travaux, une nouvelle bibliothèque de **ligands de l'ADN** a été synthétisée en utilisant une méthodologie innovante basée sur une réaction de C-H activation « on water ».

Mots clefs : ADN, ligands, fluorescence, protéines, epicocconone.

Abstract

Understanding biological process and proteins involved in has challenged biologists' mind for a while. Specific DNA sequences, such as G-quadruplex and Adenine-Thymine rich sequences, have been studied for many years, especially for their involvement in genetic diseases like cancer. Scientists have also been interested in fluorescence monitoring and imaging of these specific sequences for a long time. Indeed, the huge sensitivity of these fluorescent technics and the wide scope of synthetic dyes available allowed several improvements on targeting DNA sequences responsible for genetic disorders. Nonetheless, relation between proteins and these areas remains mostly unknown.

In order to answer this question, a **pro-fluorescent dye** built of two main parts, which are a **DNA ligand** (designed by Curie Institute teams, UMR 176) and a **protein trap** (based on epicocconone core). These parts were synthesized, coupled thanks to a Spontaneous Azoture Alkyne Cycloaddition (SPAAC) and the biological properties of the probe were evaluated. Furthermore, new ligands were synthesized using a new and innovating method of "on water" C-H activation reaction.

Keywords: DNA, ligands, fluorescence, proteins, epicocconone.